



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Towards a single-molecule FRET study of Frauenfelder's nonexponential rebinding of CO in myoglobin

Eskandari Alughare, Z.

Citation

Eskandari Alughare, Z. (2022, June 23). *Towards a single-molecule FRET study of Frauenfelder's nonexponential rebinding of CO in myoglobin*. *Casimir PhD Series*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3348505>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3348505>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Förster Resonance Energy Transfer (FRET) is een bekende optische techniek in de biotechnologie waarmee men de dynamiek en conformatie veranderingen van eiwitten kunt volgen. Ook kan men de kinetiek van binding-ontbinding volgen van kleine moleculen aan eiwitten. Dit kan allemaal door de gevoeligheid van FRET voor inter- en intramoleculaire afstandsveranderingen tussen twee kleurstofmoleculen op een onderlinge afstand van 1-10 nm. FRET is gebaseerd op de dipool-dipool interactie tussen twee fluorescerende kleurstoffen (donor en acceptor) waarbij een stralingsloze energieoverdracht plaatsvindt van de aangeslagen toestand van de donor naar een acceptormolecuul. De grote van deze overdracht is omgekeerd evenredig met de zesde macht van de afstand tussen donor en acceptor (R^{-6}). In dit proefschrift bestuderen we de kinetiek van CO binding aan en dissociatie vanaf fluorescent gelabelde myoglobine, waarbij we gebruik maken van onderscheidbare FRET eigenschappen van verschillende toestanden van myoglobine (Hoofdstukken 3, 4). Ook wordt FRET doving (quenching) gerapporteerd voor een acceptor (ATTO575Q-kleurstof) gebonden aan de myoglobine en een donor (Azaoxa-triangulenium, ADOTA-kleurstof) dat is gedoteerd in een dunne polymeer laag. De experimenten zijn uitgevoerd op zowel ensemble- als enkelmolecuulniveau (Hoofdstuk 5)

De fotodissociatie van carboxymyoglobine (MbCO)

Myoglobine (Mb) speelt een vitale rol bij het transporteren van kleine moleculen zoals O_2 , CO en NO. Het mechanisme van de reactie tussen deze verschillende liganden met ijzerhoudend Mb (deoxy-Mb) is interessant omdat de binding omkeerbaar is en het systeem kan worden gebruikt als prototype voor complexere systemen.

Eerdere tijdsopgeloste experimenten door Frauenfelder en collega's op ensembles van myoglobine toonden aan, bij cryogene temperaturen, dat herbinding van CO aan de heem-cofactor van myoglobine na flash fotolyse een sterk uitgerekt exponentieel gedrag vertoont. Dit wordt niet waargenomen bij kamertemperatuur. Dit gedrag bij lage temperaturen wordt toegeschreven aan de structurele heterogeniteit van myoglobine en aan de verschillende herbindingssnelheden van CO. Tot op heden bestaat er echter geen directe waarneming van deze processen. De conclusie die werd getrokken uit deze experimenten was dat van individuele moleculen de reactiesnelheid een grote spreiding vertoont.

De relaxaties en fluctuaties van het eiwit zijn niet-exponentieel over de tijd bij kamertemperatuur, wat wijst op een mogelijk collectief karakter van deze bewegingen. Hoewel recent een paar onderzoeken zich hebben gericht op de variatie van eiwitreactiesnelheden door middel van enkel molecuul experimenten, is het mechanisme waarmee kleine moleculen zoals CO binden/ontbinden aan het heem van myoglobine nog niet goed begrepen. Met name inzicht in de kinetiek van CO-herbinding op enkel-molecuul niveau ontbreekt. Ons doel is om de herbindingssnelheid van CO te bestuderen door middel van fluorescentie doving van een kleurstof die aan de myoglobine is gebonden en door verschillende configuraties van FRET experimenten toe te passen.

Schatting van de dissociatie kwantumopbrengst van de Mb-CO-verbinding

In hoofdstuk 3 wordt de FRET techniek beschreven die is gebruikt om de interactie tussen myoglobine en CO te bepalen. In dit systeem wordt de donoremissie (kleurstof gehecht aan de myoglobine) gedoofd door een niet-fluorescerende acceptor (toestanden van myoglobine). Het doovingsmiddel kan bijvoorbeeld deoxy-Mb zijn waarin CO ongebonden is aan Mb, of MbCO waar CO is gebonden aan Mb. Deze toestanden hebben beide doovings eigenschappen maar MbCO heeft in verhouding geen of een minder dovend effect. Dit kan verklaard worden aan de hand van de zwakke banden boven de 700 nm en met de Band III bij 760 nm in het deoxy-Mb absorptiespectrum die de fluorescentie van een verroode kleurstof dooft, terwijl die banden voorbij 700 nm afwezig zijn in het spectrum van MbCO. Het is bekend dat zichtbaar licht in een breed spectraal bereik, in het bijzonder $400 < \lambda < 550$ nm, de Mb-CO binding hoogst efficiënt verbreekt, wat FRET-gebaseerde onderzoeken naar CO-dissociatie in dit spectrale gebied uitsluit. Daarom hebben we een strategie ontwikkeld met betrekking tot het verroode spectrale gebied, $\lambda > 700$ nm. De uitdaging is dat als rood licht van een gelabelde MbCO de Mb-CO-binding met hoge efficiëntie zou verbreken, het onderzoeken van de absorptie van MbCO met rood licht het onmogelijk zou maken om de CO-herbinding te volgen door middel van fluorescentiespectroscopie en FRET. Om deze reden wilden we eerst de kwantumopbrengst verkrijgen voor fotodissociatie van de Mb-CO onder rood licht ($\lambda > 700$ nm). Drie toestanden van myoglobine, met-Mb (heem bevat Fe³⁺), deoxy-Mb (heem bevat Fe²⁺) en MbCO (heem bevat Fe²⁺), zijn daarom bereid gemaakt en optisch gekarakteriseerd.

Experimenteel wordt de kwantumopbrengst van het verbreken van Mb-CO-bindingen vastgesteld door het aantal deoxy-Mb-moleculen te volgen die niet opnieuw aan CO zijn gebonden op een gegeven tijdstip na fotodissociatie. Omdat de recombinitie van CO naar het heem snel is, is het echter essentieel om de kinetiek van recombinitie van het ontsnapte CO-molecuul naar het heem te vertragen. CO-moleculen moeten na fotodissociatie en het ontsnappen uit het eiwit worden verwijderd uit de buurt van het nieuw gevormde deoxy-Mb. We hebben CO-recombinitie chemisch voorkomen door H₂O₂ te gebruiken als oxidatiemiddel dat het deoxy-Mb snel omzet in een andere vorm die CO niet bindt, bijvoorbeeld met-Mb. De exacte hoeveelheid MbCO omgezet in deoxy-Mb werd gemeten door het absorptiespectrum van MbCO te volgen (met behulp van de absorptiebanden bij 542 nm en 579 nm die kenmerkend zijn voor MbCO). Aangezien de kwantumopbrengst van de verbreking van MbCO-bindingen door blauw licht dicht bij 1 ligt, kunnen we dit als bijpassende referentie gebruiken.

Door te vergelijken wat het effect van verlichting door een rode LED ($\lambda = 730$ nm) op MbCO is in aanwezigheid van H₂O₂ met de effecten van de blauwe LED ($\lambda = 450$ nm) konden we schatten dat er een bovengrens is van de kwantumopbrengst van MbCO-fotodissociatie bij rood licht ($\lambda = 730$ nm) van minder dan 6%.

FRET-studie van CO-binding aan fluorescent gelabelde myoglobine

Op basis van de geschatte kwantumopbrengst van het breken van bindingen (zie hoofdstuk 3), concluderen we dat belichting van MbCO met verrood licht (700-800 nm) de Mb-CO-binding niet efficiënt verbreekt en dat het MbCO-complex stabiel genoeg is om FRET van de verroode donor naar de heem te meten, met voldoende donorfluorescentiefotonen die worden uitgezonden voordat MbCO wordt gedissocieerd tijdens de meting. Voor het FRET experiment is selectie van de juiste kleurstof, zijn positie op het eiwit en de label methode cruciaal. Voor dit doel is niet alleen een onafhankelijke schatting van de FRET efficiëntie nodig om de herbinding

van CO te karakteriseren, maar ook de ontwikkeling van kwantitatieve methodologieën voor het meten van steady-state parameters van ligandbinding is cruciaal. In hoofdstuk 4 hebben we twee verschillende labelmethodes uitgevoerd: labelling op gemanipuleerde locaties en N-terminale labeling. Er werden verschillende kleurstoffen uitgetoetst (ATTO643, ATTO740 en Cy7) die in het rood absorberen en uitzenden. Verschillende labelposities, bijvoorbeeld op de positie van serine 3, werden gerealiseerd door plaatsgerichte mutagenese. Tijdens de FRET experimenten hebben we de fluorescentie intensiteit van de kleurstof en/of de fluorescentielevensduur van gelabeld Met-Mb, Deoxy-Mb en MbCO gemeten. We konden significante intensiteitsverschillen waarnemen tussen ATTO 740 gelabeld deoxy-Mb en MbCO met hetzelfde label, wat aantoont dat het mogelijk is om deze twee toestanden in een mengsel te onderscheiden.

Niet-fluorescerende uitdoving voor het FRET assay in ensemble en op enkel molecuul niveau in een polymeer laagje

Single Molecule FRET (smFRET) kan de distributies verschaffen van experimentele parameters zoals de levensduur van de aangeslagen toestand, fluorescentie intensiteit, lokale omgevingsfluctuaties, enz. Theodor Förster voorspelde rond 80 jaar geleden een uitgerekt exponentieel verval van de fluorescentie-intensiteit onder ensemble omstandigheden. Dit hangt samen met een verdeling van acceptoren in de buurt van elke donor groep. Want de vervalsnelheid is afhankelijk van de acceptorconcentratie rond de donor. Deze niet-exponentiële kinetiek komt voort uit verdelingen van exponentiële stappen. In hoofdstuk 5 hebben we eerst de consistentie van Förster's theorie getest voor een ensemble van acceptoren (ATTO575Q) rond de donor (Azaoxa-triangulenium, ADOTA). Dit hebben we bestudeerd voor verschillende concentraties van acceptor in een dun polymeer laagje. Het voordeel van het gebruik van een met kleurstof gedoteerde polymeerlaagje is dat men de dispersie van de kleurstofmoleculen in de polymeerlaag kan reguleren en dat elk type uitdoving anders dan FRET kan worden voorkomen. Onze enkel molecuul studie toonde aan dat histogrammen van vervalsnelheden van individuele ADOTA-moleculen veel gevoeliger zijn voor heterogeniteit dan het gemiddelde niet-exponentiële verval. Elk individueel molecuul vertoont een enkelvoudig exponentieel verval van de fluorescentie intensiteit, maar de verdeling van acceptorposities rond elk molecuul produceert een brede verdeling van vervalsnelheden.

