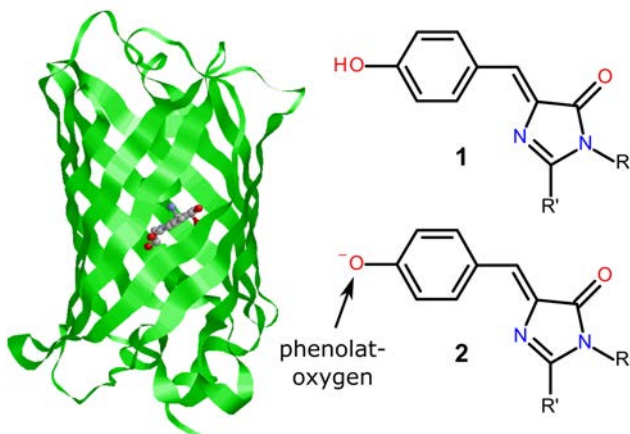


Det grønne fluorescerende proteins fotoaktive molekyle: Hvad tænder det?

Jeppe Langeland, Christina Kjær, Lars H. Andersen og Steen Brøndsted Nielsen, Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet

Naturen er farverig, hvilket ofte skyldes proteiner, der indeholder lysabsorberende eller fluorescerende molekyler. Eksempler er fotosynteseproteiner i planter og alger, opsiner i øjet, luciferase i ildfluer og andre insekter, hæmoglobin i røde blodlegemer, og det grønne fluorescerende protein (GFP) i gopler. I denne artikel vil vi se, hvad vi kan lære, når vi tager proteinets fotoaktive molekyle (kromoforen) ud og studerer det alene i vakuum og i samspil med kontrollerede omgivelser.

Det grønne fluorescerende protein findes i gopler kaldet *aequorea victoria*. Proteinets absorberer blåt lys og udsender grønt lys med en kvanteeffektivitet på 80%, dvs. kun 20% af de absorberede fotoner ender op som varme. Det fotoaktive molekyle (1) sidder i proteinets midte, og er delvist skjæret fra kontakt med vandmolekyler som følge af proteinets tøndelignende struktur (figur 1). Dvs. inden i proteinlommen er der kun få vandmolekyler. Efter lysabsorption overfører molekylet i sin anslåede tilstand en proton til en tætsiddende aminosyre. Den dannede negative kromofor-ion (anionen 2) er også elektronisk anslået og falder tilbage til grundtilstanden ved udsendelse af en grøn foton, – det vi kalder fluorescens.



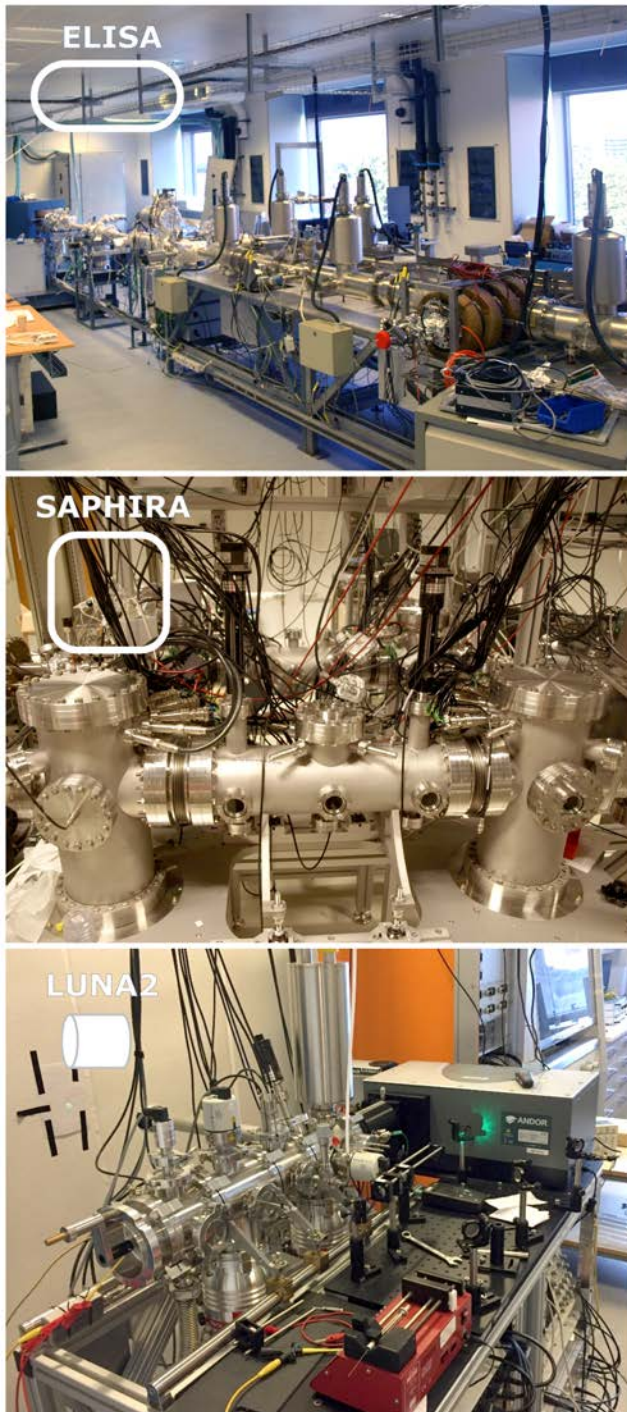
Figur 1. Det grønne fluorescerende protein (GFP) (1GFL fra Protein Data Bank). Kromoforen, der ses i midten, er en modificeret form af tripeptidet Ser65-Tyr66-Gly67 (Ser = serin, Tyr = tyrosin, Gly = glycin). Den er hovedsageligt tilstede i sin neutrale form (1), men afgiver en proton efter lysabsorption og danner anionen (2). De to R-grupper er peptidkæder, som er erstattet af CH₃ i vores modelsystem.

Proteinets er afgørende for anionens fluorescens: Tager man anionen ud af GFP, og har den enten i vandig opløsning eller isoleret i gasfase, lyser den ikke! Molekylets fotofysik er naturligvis bestemt af dets egne egenskaber, men også det omgivende mikromiljø, dvs. vekselvirkninger med proteinets aminosyrer og evt. et vandmolekyle. Et oplagt spørgsmål er: Hvilke vekselvirkninger tænder for fluorescensen? Det er her, at vi som fysikere kommer ind i billedet med vores nedefra-og-op tilgang: *beskriv den isolerede ion og påfør gradvist et mikromiljø.*

Gasfasespektroskopi

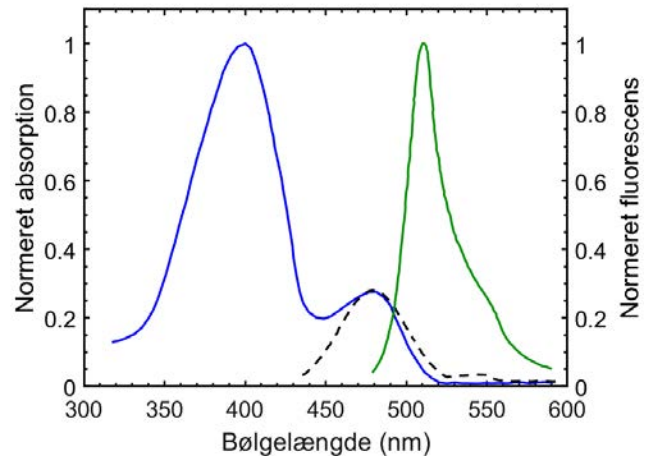
Det er nu mere end tyve år siden, at vi begyndte at studere den isolerede ion (2) i gasfase vha. massespektroskopiske teknikker. Vores første eksperiment involverede måling af ionens absorptionsspektrum for at sammenligne med proteinet, som absorberer maksimalt ved 475 nm, når kromoforen er på sin negative form. Dette eksperiment er ikke så simpelt, som det måske lyder. Først skal ionerne på gasform uden at gå i stykker. Løsningen er “electrospray ionisering” (ESI), en såkaldt “blød” ioniseringsteknik udviklet i 80’erne af John Fenn, og som er detaljeret beskrevet i litteraturen. Kort fortalt dannes ioner ved atmosfæretryk og føres herefter ind i massespektrometret. Tætheden af ioner er imidlertid meget lavere end i opløsning, og der er for få ioner til at kunne detektere en reduktion i transmitteret lysintensitet, hvis ionerne bestråles med lys. Absorptionsspektret kan derfor kun måles indirekte. Vores metode baserer sig på fotodestruktion af ioner: En ion, der har absorberet lys ved en bestemt bølglængde, går i stykker i to fragmenter, et ladet og et neutralt. Sker der ingen absorption, sker der ingen spaltning. Enten detekteres fragment-ionen eller også det neutrale fragment. Udbyttet af fragment-ioner eller neutrale fragmenter som funktion af excitationens bølglængde repræsenterer således (til god approksimation) absorptionsspektret. Vi benyttede i 2000 lagerringen ELISA (ELectrostatic Ion Storage ring in Aarhus, figur 2) til at måle neutrale fragmenter dannet fra 2 efter lysbeskydning [1].

Det målte “absorptionsspektrum” af de nøgne 2 ioner er vist i figur 3 sammen med proteinets. Det var en stor overraskelse at se, at spektrene er nærmest identiske! Ionens absorption i vandig opløsning er derimod skiftet mod det blå, med maximum ved 426 nm. Lommen, som 2 sidder i inde i proteinet, er derfor mere lig vakuum end vand. Det stemmer også med, at vands dielektricitetskonstant (80) er meget højere end den, der typisk benyttes for proteiner (4) [3] (højere værdier benyttes nogle gange). Der er dog lokale elektriske felter i proteinet, men vores resultat viser, at hvis de skifter overgangsenergien, gør de det sådan, at den totale effekt er minimal.



Figur 2. Instrumenter i Aarhus, som vi har benyttet til at undersøge de fotofysiske egenskaber af nøgne 2^- -ioner. Øverst og i midten: Lagerringene ELISA ("racerbane") og SAPHIRA (firkantet). I disse accelereres ioner til høj kinetisk energi, hvorefter de ønskede ioner masseselekteres med en elektromagnet. I ringen holdes ionerne i deres bane vha. elektriske felter til de går i stykker eller taber en elektron som følge af enten restgaskollisioner eller laserbeskydning med lys fra pulserende lasere. Nogle af de neutrale produkter detekteres og giver vores signal. Ved ELISA laves typisk "absorptionsspektroskopi" mens SAPHIRA benyttes til at måle anslåede tilstandes levetider. Nederst: LUNA2. Her akkumuleres ioner i en Paul-fælde, idet ionerne køles i deres translationsbevægelse i kollisioner med helium-buffergas. Efter masseselektion beskydes ionerne med laserlys, igen fra en pulseret laser. Paul-fælden er lavet som en cylinder med et metalnet i den ene ende, hvorved så mange fotoner som muligt slipper ud af fælden og opsamles. Fotonerne adskilles efter bølglængde i spektrometeret og detekteres med et CCD-kamera. Paul-fælden er kølet til ca. 100 K.

Resultatet vakte stor opsigt, og andre grupper kastede sig også over ionen. Blandt andet en række teoretikere, som ønskede at beregne overgangsenergien. Gasfasespektroskopi giver overgangsenergien af den nøgne ion, som er simple at udregne, end når vekselvirkninger fra fx vandmolekyler skal medtages. Vores spektrum kunne så at sige bruges til at teste beregningsmetoder, særligt relevant for molekyler af denne betydelige størrelse med rigtig mange elektroner!



Figur 3. Absorptionsspektre af isoleret 2^- (sort stiplede kurve) og GFP (blå kurve). De to bånd for proteinet tilskrives 1^- og 2^- , maxima ved hhv. 395 nm og 475 nm. Proteinets fluorescensspektrum (grøn kurve) er også vist. Data er fra [2] (protein) og [1] (nøgen ion).

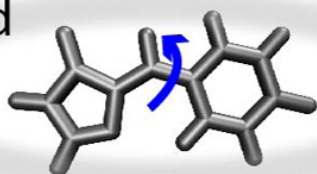
Men vores eksperiment er dog ikke perfekt. Et problem er, at absorption af to fotoner er nødvendig for at forårsage den negative ions dissociation inden for den tidsskala, vi observerer spaltning på (op til omkring 100 ms). Absorptionstværsnittet kan være forskellig for absorption af anden foton i forhold til den første foton, og kan derved give et misvisende billede af ionens absorption. En løsning på problemet kom for nyligt af Webers gruppe på University of Colorado i Boulder. Hans gruppe kølede ionerne ned til omkring 50 K i en cryokølet ionfælde. Ved denne temperatur er det muligt at binde kvælstofmolekyler (N_2) til ionerne, og et N_2 -molekyle tabes let efter absorption af en enkelt foton. Gruppen målte ganske simpelt absorptionsspektret som udbyttet af 2^- dannet fra $2^- \cdot N_2$ som funktion af bølglængden [4]. Bortset fra et lille skift af spektret mod det blå grundet den lavere temperatur er spektret i fin overensstemmelse med vores.

Nu det er fastlagt, at 2^- 's absorption ikke er meget forskelligt fra proteinets, er det næste oplagte spørgsmål, *hvad med fluorescens?* Det viser sig som sagt, at hvis ionen er i vandig opløsning, lyser den ikke. Der skal køles til meget lave temperaturer for at se fluorescens. Men er det vekselvirkninger med vandmolekyler, der måske slukker for lysudsendelsen? Nej, for ionen lyser heller ikke, når den er isoleret i gasfase [5]! Forklaringen er, at de to ringe drejer ift. hinanden i den anslåede tilstand, hvilket fører til et punkt på den potentielle energioverflade, hvor energien er lig den i grundtilstanden, et såkaldt konisk krydsningspunkt. Bevægelsen der fører til stabilisering på den anslåede

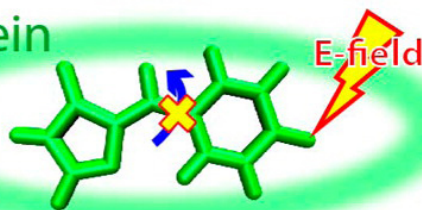
overflade, er ultrahurtig, og ionen kommer derfor tilbage i grundtilstanden på under et picosekund (10^{-12} s) [6]. Den tid er for kort til, at ionen kan nå at udsende lys. Typiske tider for fluorescens er nanosekunder, dvs. tre størrelsesordener længere end levetiden. Da ionen lyser, når den sidder inden i proteinet, må proteinmiljøet forhindre denne rotationsbevægelse, men hvorledes? Er det fordi, der simpelthen ikke er plads inden i lommen til at lave denne bevægelse? Eller er det en enkelt lokal vekselvirkning med en aminosyre, der skal til for at tænde for fluorescensen?

En amerikansk gruppe foreslog det sidste baseret på kvantekemiberegninger, og de identificerede en protoniseret arginin i nærheden af 2's phenolatgruppe [7]. Den positive ladning forhindrer ifølge deres model elektrontæthed i at bevæge sig fra det negative phenolatoxygen og ind i broen mellem de to ringe efter fotoexcitation (figur 4). Resultatet er, at barrieren for rotation af de to ringe ift. hinanden øges betydeligt! Vi besluttede os for nogle år siden at undersøge dette nærmere eksperimentelt for den isolerede ion.

Isolated



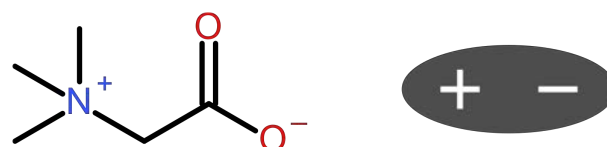
In protein



Figur 4. Når **2** er isoleret i gasfase, er der intet til hinder for en rotation af de to ringe i forhold til hinanden, hvilket hurtigt bringer molekylet tilbage til grundtilstanden uden lysudsendelse. I proteinet forhindres rotationen muligvis af et højt elektrisk felt, idet feltet holder på den negative ladning ved phenolat-oxygenet (jf figur 1). Figuren er reproduceret fra [7] med tilladelse fra American Chemical Society ©2016.

Ifølge teorigruppen er det elektriske felt ved phenolat-oxygen 100 MV/cm grundet den positive ladning. Vi kan ikke bare se på komplekset mellem **2** og protoniseret arginin, da den samlede ladning er nul. Massespektrometri kræver en ladning, så vi kan styre vores ioner i magnetiske og elektriske felter. I stedet tænkte vi, at man måske kan realisere et stort elektrisk felt ved at hæfte et meget polært molekyle på ionen. Valget faldt på betain (*N,N,N*-trimethylglycin, figur 5), der har et dipolmoment på hele 12 Debye (til sammenligning er vandmolekylets 1,85 Debye; betainmolekylet er mere end seks gange så polært som et vandmolekyle). Baseret på beregnet afstand mellem betain og phenolatoxygen giver det anledning til et felt på omkring 70 MV/cm, ikke helt det i proteinet, men trods alt signifikant. Komplekset **2**•betain er let at lave med ESI, og det kræver kun en enkelt synlig foton at slå

komplekset i stykker, idet bindingsenergien er omkring 1 eV. Først målte vi kompleksets absorptionsspektrum, som vi fandt var blåskiftet en smule fra den nøgne ions [8]. Dette resultat viser, at der sker noget ladningsoverførsel fra den negative ende af ionen imod den anden ende, om end begrænset. Ja umiddelbart er det måske overraskende, at spektret ikke ændres mere, når man tænker på den store perturbation af elektronstrukturen, som det polære molekyle forårsager. Men resultatet passer fint med, at proteinmiljøet ikke påvirker absorptionen meget. Som det næste vil vi undersøge, om komplekset fluorescerer efter fotoexcitation.



Figur 5. Betain-molekylet har både en positiv og negativ ende, hvilket giver det et stort dipolmoment, der er mere end seks gange højere end vandmolekylets. Det er derfor et ideelt molekyle til at simulere de høje elektriske felter, der måtte være i et protein.

Til måling af lysudsendelse fra isolerede ioner i gasfase lagrer vi ioner i en såkaldt Paul-fælde (en RF-fælde). I denne 'fluorescens-celle' køles ioner i deres bevægelse ned ved kollisioner med helium-atomer, så de til sidst befinder sig i fældens centrum, hvor de bestråles med laserlys. Så mange som muligt af de udsendte fotoner opsamles derefter og detekteres. Imidlertid vil der også i de uelastiske kollisioner mellem ionerne og helium-atomerne ske omdannelse af kinetisk energi til indre energi i ionerne, hvilket kan føre til spaltning. Det er særligt et problem for komplekser med lav dissociationsenergi som **2**•betain, og desværre havde vi ikke tilstrækkeligt med komplekser, der overlevede de hårde betingelser i fælden. Vi kan derfor endnu ikke sige noget om vigtigheden af et elektrisk felt for lysudsendelse.

Men hvad sker der så ved lav temperatur i gasfasen?

Det har vi undersøgt med et andet lagerringsinstrument (SAPHIRA, figur 2), hvor ionernes levetid i den anslåede tilstand kan måles vha. femtosekund pumpe-probe spektroskopi (eksperimentet svarer til transient absorptionsspektroskopi). Ved stuetemperatur er ionernes levetid rigtignok kort (< 1 ps); men ved en temperatur på omkring 100 K er der en brøkdel af ioner, der lever tre størrelsesordener længere, dvs. nanosekunder [6]. Kunne det tænkes, at disse ioner fluorescerer?

Det fører til vores næste opgave, at undersøge, om køling af **2** til 100 K tænder for fluorescensen. Vi har inden for de sidste to år konstrueret et nyt instrument (LUNA2, figur 2) til måling af fluorescens fra kolde ioner [9]. Ionerne lagres og fotoexciteres igen i en Paul-fælde, men nu er fælden kølet til omkring 100 K, idet fælden er i fysisk kontakt med en kobberbeholder fyldt med flydende kvælstof, en kold finger så at sige. Indtil videre har vi ikke kunnet detektere fluorescens fra **2**, hvilket måske skyldes, at støjniveauet i vores CCD-kamera er for højt. Instrumentet er under stadig udvikling, og vi håber at kunne flytte detektionsgrænsen

for udsendte fotoner et par størrelsesordener ved brug af en fotomultiplier istedet. Det er også værd at bemærke, at en lavere temperatur giver den fordel, at det måske er lettere at få 2•betain-komplekserne til at overleve i fælden, inden de bliver beskudt af fotoner.

Afsluttende bemærkninger

Hvad der helt præcist får 2 til at lyse, når det sidder i proteinets lomme, har vi endnu ikke svaret på, men vi håber, at vores eksperimenter inden for den nærmeste fremtid kan løfte sløret.

Det er afslutningsvist også værd at bemærke, at GFP-proteinet ikke kun er interessant, fordi det får gopler til at lyse, men også fordi man kan bruge det i cellebiologi til at følge biologiske processer som cervækst. Proteinmodifikationer er udviklet for at flytte emissionen mod rødt lys, der har en bedre gennemtrængelighed i væv. Det er forholdsvist let at modificere det fotoaktive molekyles kemiske struktur såvel som de omkringliggende aminosyrer vha. molekylærbiologiske teknikker. Men problemet er, at alle udviklede proteinvarianter, der lyser rødt (røde fluorescerende proteiner, RFP'er), har lavt fluorescenskvanteudbytte. For at komme videre er det nødvendigt med fundamental viden om kromoforens fotofysik og at belyse hvilke vekselvirkninger, der tænder eller slukker for fluorescensen. At tænde for den isolerede GFP kromofor-anions emission og at øge fluorescenskvanteudbyttet for RFP'er kan vise sig at være to sider af samme sag!

Litteratur

- [1] S.B. Nielsen, A. Lapierre, J.U. Andersen, U.V. Pedersen, S. Tomita og L.H. Andersen (2001) Absorption spectrum of the green fluorescent protein chromophore anion in vacuo, *Phys. Rev. Lett.*, bind **87**, side 228102.
- [2] H. Morise, O. Shimomura, F.H. Johnson og J. Winant (1974) Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*, *Biochemistry*, bind **13**, side 2656–2662.
- [3] M.K. Gilson og B. Honig (2004) Calculation of the total electrostatic energy of a macromolecular system: solvation energies, binding energies, and conformational analysis, *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.*, bind **4**, side 7–18.
- [4] W. Zagorec-Marks, M.M. Foreman, J.R.R. Verlet og J.M. Weber (2019) Cryogenic ion spectroscopy of the Green Fluorescent Protein Chromophore in Vacuo, *J. Phys. Chem. Lett.*, bind **10**, side 7817–7822.
- [5] M.W. Forbes og R.A. Jockusch (2009) Deactivation pathways of an isolated Green Fluorescent Protein model chromophore studied by electronic action spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, bind **131**, side 17038–17039.
- [6] A. Svendsen, H.V. Kiefer, H.B. Pedersen, A.V. Bochenkova og L.H. Andersen (2017) Origin of the intrinsic fluorescence of the green fluorescent protein, *J. Am. Chem. Soc.*, bind **139**, side 8766–8771.
- [7] J.W. Park og Y.M. Rhee (2016) Electric field keeps chromophore planar and produces high yield fluorescence in Green Fluorescent Protein, *J. Am. Chem. Soc.*, bind **138**, side 13619–13629.

[8] J. Langeland, C. Kjær, L.H. Andersen og S. Brøndsted Nielsen (2018) The effect of an electric field on the spectroscopic properties of the isolated green fluorescent protein chromophore anion, *ChemPhysChem*, bind **19**, side 1686–1690.

[9] C. Kjær, J. Langeland, T.T. Lindkvist, E.R. Sørensen, M.H. Stockett, H.G. Kjærgaard og S. Brøndsted Nielsen (2021) A new setup for low-temperature gas-phase ion fluorescence spectroscopy, *Rev. Sci. Instrum.*, bind **92**, side 033105.



Jeppe Langeland er tidligere ph.d.-studerende fra Lars H. Andersens gruppe og har siden 2021 været post.doc. ved Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet.



Christina Kjær er tidligere ph.d.-studerende fra Steen Brøndsted Niensens gruppe og har siden 2019 været post.doc. ved Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet.



Lars H. Andersen er professor og har forsket i molekylers egenskaber og reaktion i gasfasen ved Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet, siden 1992.



Steen Brøndsted Nielsen er professor og har lavet spektroskopi på ioner ved Institut for Fysik og Astronomi, Aarhus Universitet, siden 2000.