

18,00 sati tlak je porastao na 114 075 Pa. Temperatura je bila 22,0 °C.

g) **Procijenite** množinu plina skupljenog u komori.

U tom je času gđica Z ugasila lampu i pritisnula dugme upaljača. Kada se komora ohladila do početne temperature, konačni tlak iznosio je 104 740 Pa.

**Predložite** formulu(e) plina (plinova) koji je nastao i **napišite** jednadžbu prve kemijske reakcije koja se zbiva pri osvjetljenju.

h) **Koliki** bi bio konačni tlak nakon paljenja, ako bi komoru punili tijekom 24 sata prije paljenja?

i) **Procijenite** kvantno iskorištenje za stvaranje produkta u otopini Ce(III).

### Teorijski zadatak 9

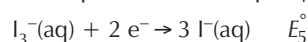
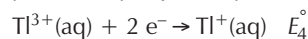
Talij može postojati u dva oksidacijska stanja:  $Tl^+$  i  $Tl^{3+}$ . U vodenoj otopini jodidni ioni s jodom tvore  $I_3^-$ .

Standardni redukcijski potencijali za neke relevantne reakcije su:



Konstanta ravnoteže za reakciju  $I_2(s) + I^-(aq) \rightarrow I_3^-(aq)$ :  $K_1 = 0,459$  ( $t = 25^\circ\text{C}$ ).

a) Izračunajte redukcijski potencijal za sljedeće reakcije:



b) **Napišite** empirijske formule svih teorijski mogućih spojeva koji sadrže jedan ion talija i odgovarajući broj jodidnih i/ili trijodidnih iona.

Jedna empirijska formula jednaka je za dva spoja. Odredite koja?

Na temelju standardnih redukcijskih potencijala odredite koji je od dva gore spomenuta izomera stabilan pri s. u. Napišite jednadžbu reakcije izomerizacije drugog izomera talijeva jodida.

Stvaranje kompleksa može pomaknuti tu ravnotežu. Kumulativna konstanta stvaranja kompleksa za reakciju  $Tl^{3+} + 4I^- \rightarrow TlI_4^-$  je  $\beta_4 = 10^{35,7}$ .

c) **Napišite** reakciju koja se zbiva ako se otopini stabilnijeg izomera talijeva jodida doda suvišak KI. **Izračunajte** konstantu ravnoteže za tu reakciju.

Ako se otopini stabilnijeg izomera doda jako bazični reagens, taloži se crna tvar. Nakon uklanjanja vode iz taloga, preostala tvar sadrži 89,5 % talija (maseni udio).

d) **Odredite** empirijsku formulu tog spoja? Prikažite kako ste računom došli do rezultata. Napišite jednadžbu stvaranja tog produkta.

## Nobelova nagrada za kemiju 2008.

Ovogodišnji laureati Nobelove nagrade za kemiju su znanstvenici Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien, koji ravnopravno dijele nagradu od 1,54 milijuna dolara za "otkriće i razvoj zelenog fluorescentnog proteina"

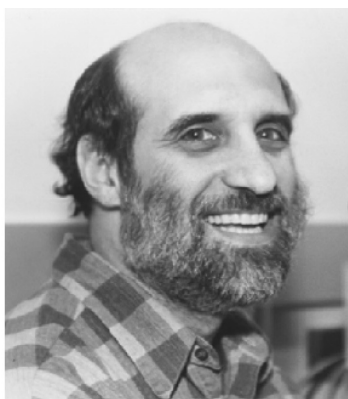
M. Dulić i J. Rokov Plavec

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Zavod za biokemiju



Osamu Shimomura



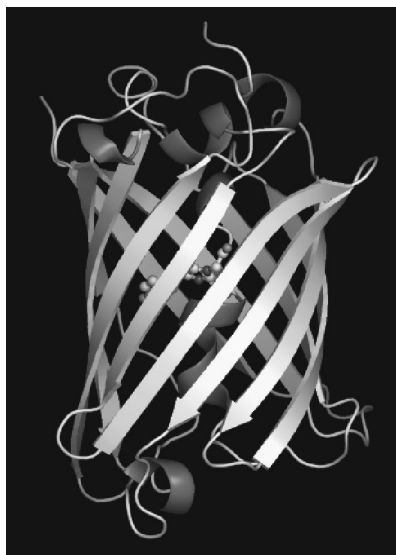
Martin Chalfie



Roger Y. Tsien

Zeleni fluorescentni protein ili GFP (engl. *green fluorescent protein*, slika 1) danas je jedan od najznačajnijih alata u suvremenoj znanosti za iluminaciju života na staničnoj i molekularnoj razini. Ekscitiran plavim ili UV-svjetlom ovaj protein fluorescira u zelenom dijelu spektra. Budući da je GFP uglavnom netoksičan za stanice, te se može eksprimirati u raznim organizmima, njegova uporaba omogućuje praćenje biokemijskih i bioloških procesa te njihove dinamike u stvarnom vremenu u gotovo svim živim stanicama i or-

ganizmima. Uz pomoć GFP-a istraživači su razvili načine promatranja procesa koji su prethodno bili nevidljivi, kao što je razvoj živčanih stanica u mozgu, širenje tumorskih stanica ili rast patogenih bakterija. Primjenjujući genetičko inženjerstvo, znanstvenici mogu povezati GFP s drugim zanimljivim, ali inače nevidljivim proteinima. Tako GFP postaje svijetleća oznaka, koja omogućuje promatranje unutarstaničnog položaja, kretanja i interakcija označenih proteina pod mikroskopom. Osim toga, moguće je ekspri-



Slika 1 – GFP je malen protein koji sadrži 238 aminokiselina. Njegova tercijska struktura ima oblik  $\beta$ -bačve (engl.  $\beta$ -barrel) s 11 lanaca koji čine vanjsku stijenku i  $\alpha$ -zavojnica u unutrašnjosti. Fluorescentni kromofor *p*-hidroksibenzilidenimidazolinon je dio unutrašnje  $\alpha$ -zavojnice, a spontano ga stvaraju aminokiseline na položajima od 65 do 67 (Ser-Tyr-Gly) u polipeptidnom lancu GFP-a



Slika 2 – Meduza *Aequorea victoria* iz koje je Shimomura izolirao GFP

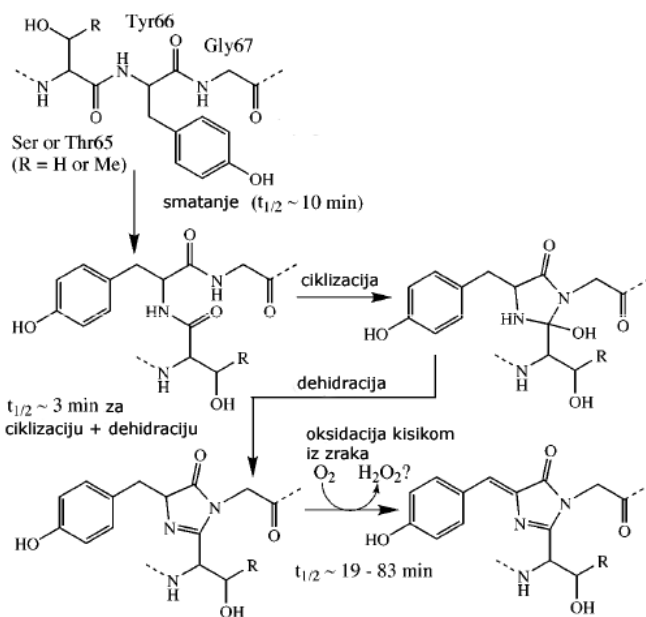
mirati GFP u specifičnim stanicama te pratiti njihov prostorno-vremenski razvoj u organizmu.

Priča o GFP-u započinje na obalama Tihog oceana uz Sjevernu Ameriku, koje nastanjuje meduza *Aequorea victoria* (slika 2). Neobično svojstvo ovog bioluminiscentnog organizma je da njegov vanjski rub sjaji zeleno pri potresavanju. U ranim 1960-im, **Osamu Shimomura** strpljivo je prikupljao materijal iz tisuća meduza, te izolirao malu količinu plavog luminiscentnog proteina, nazvanog ekvorin. Tijekom tog procesa, pronašao je i protein, kasnije nazvan GFP, koji je obasjan UV-svjetlošću sjajio zeleno. Shimomura i suradnici su pokazali da zeleni sjaj meduze nastaje procesom prijenosa energije u kojem donor ekvorin ekscitira akceptor GFP, koji onda emitira zeleno svjetlo. Osim toga, Shimomura je analizirao fizikalno-kemijska svojstva GFP-a, uključujući ekscitacijske i emisijske spektre njegove fluorescencije u raznim uvjetima. Na temelju svojih istraživanja ispravno je predložio da je kromofor dio polipeptidnog lanca GFP-a, te da se sastoji od *p*-hidroksibenzilidenimidazolinona.

Bez pionirskih istraživanja Shimomure u kojima je primjenjivao klasične metode pročišćavanja proteina i spektroskopije, GFP bi možda i dalje ostao jedna od skrivenih tajni Tihog oceana.

Razvoj GFP-a kao univerzalne fluorescentne oznake za proučavanje bioloških fenomena počeo je tek u ranim 1990-im kad je identificiran gen za GFP. Tada je **Martin Chalfie** ekspimirao gen za GFP u bakteriji *Escherichia coli*. Transformirane bakterije su sintetizirale GFP te fluorescirale zeleno pod UV-svjetlom. U jednom od njegovih prvih eksperimenata ekspresija GFP-a u specifičnim stanicama pokazala je gdje i kada se pojavljuju ove stanice tijekom razvoja oblika *Caenorhabditis elegans*, još jednog važnog modelnog organizma u modernoj biologiji.

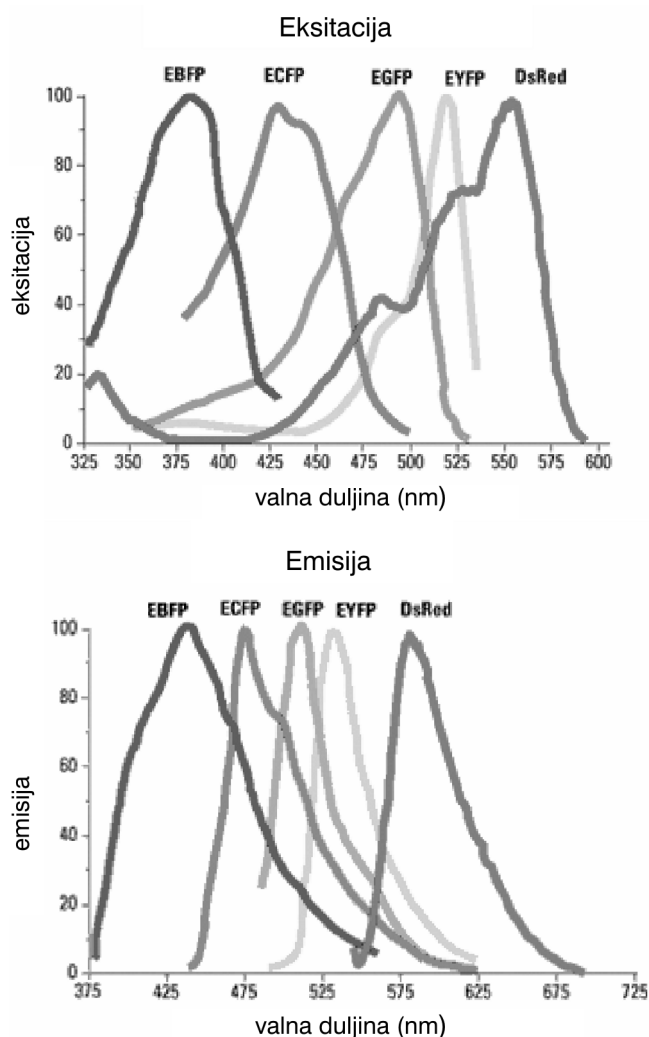
Ekspresijom fluorescirajućeg GFP-a u heterolognim organizmima, Martin Chalfie i suradnici pokazali su da za stvaranje kromofora i fluorescenciju GFP-a nisu potrebni dodatni enzimi ili neki drugi pomoćni faktori kako se do tada smatralo. Ovi rezultati značili su prekretnicu jer su pokazali iskoristivost GFP-a kao univerzalnog genetičkog biljega te otvorili vrata kvantitativnim studijama dinamičkih procesa u živim stanicama.



Slika 3 – Shema kemijskih reakcija u kojima nastaje fluorescentni kromofor GFP-a

Daljnji razvoj GFP-a temeljio se na većem razumijevanju molekulske strukture proteina i njegovog kromofora. **Roger Y. Tsien** otkrio je da stvaranje fluorescentnog kromofora GFP-a nastaje posttranslacijski te da je za tu reakciju potreban kisik. Tijekom smatanja GFP-a u nativnu konformaciju tri aminokiseline Ser-Tyr-Gly (slika 3, gore) u položajima od 65 do 67 u polipeptidnom lancu se prostorno tako smještaju (slika 3, sredina lijevo) da je omogućen nukleofilni napad amida u Gly67 na karbonil u Ser65, što dovodi do stvaranja imidazolinona ciklizacijom (slika 3, sredina desno) i dehidracijom (slika 3, dolje lijevo). Tada GFP još ne fluorescira, ali u prisutnosti molekularnog kisika  $\alpha$ - $\beta$ -veza u Tyr66 se oksidira te se konjugira s imidazolinonom (slika 3, dolje desno), što dovodi do maturacije kromofora u njegov fluorescentni oblik.

Mijenjajući pojedine aminokiseline u GFP-u koristeći metode genetičkog inženjstva, Tsien i suradnici su razvili poboljšane varijante GFP-a s promijenjenim spektralnim osobinama, pojačanom fluorescencijom i povećanom stabilnošću. Također, razvili su i GFP-varijante sa znatno promijenjenim emisijskim spektrima te ih nazvali plavi (engl. *BlueFP*), žuti (engl. *YellowFP*) i svijetlo plavi (engl. *CyanFP*) fluorescentni protein. Ipak, nisu mogli dobiti crvenu varijantu GFP-a. Nakon što je u koraljima otkriven crveni fluorescentni protein DsRed, Tsien i suradnici su pripremili njegove



Slika 4 – Eksitacijski i emisijski spektri poboljšanog GFP-a (EGFP), njegovih varijanti (EBFP, ECFP i EYFP) i crvenog fluorescentnog proteina DsRed

poboljšane inačice bez kojih praktična primjena tog proteina u biomedicinskim istraživanjima ne bi bila moguća. Zahvaljujući izuzetnom doprinosu Tsiena, danas se upotrebljavaju fluorescentni proteini koji sjaje u svim duginim bojama (slika 4), što omogućuje znanstvenicima da raznim proteinima i stanicama daju različite boje, tako slijedeći nekoliko različitih bioloških procesa u isto vrijeme.

Tsien je u svojim istraživanjima razvio i varijante GFP-a koje služe kao biosenzori za praćenje razine unutarstaničnog kalcija. Danas se, na sličnim principima, razvijaju GFP-senzori koji služe kao indikatori pH, membranskog napona, drugih metala (npr. arsena, kadmija, cinka) i nekih malih molekula.



Slika 5 – Prikaz aktivnosti promotora engrailed u jednom od razvojnih stadija mušice *Drosophila melanogaster*. Stanice u kojima je promotor aktivan fluoresciraju zbog ekspresije GFP-a, dok su one u kojima taj promotor nije aktivan tamne.

Revolucija proizašla iz otkrića GFP-a imala je svoju čvrstu podlogu u istraživanjima trojice nagrađenih znanstvenika, ali i u brzom usporednom razvoju kvantitativne svjetlosne mikroskopije, "imaging" tehnika, biofizičkih fluorescencijskih metoda, elektronike te molekularnog modeliranja staničnih procesa. Brzi razvoj tehnika utemeljenih na uporabi GFP-a i njemu sličnih proteina omogućuje na molekularnoj razini kvantitativno i eksperimentalno dobro definirano promatranje prostorno-vremenskih međustaničnih i unutarstaničnih procesa koji definiraju dinamičko ponašanje svih živih sustava (slika 5).

GFP je primjer kako je kemija imala snažan utjecaj na način izvođenja i interpretiranja eksperimenata u biološkim znanostima. Međutim, sve više, GFP nalazi svoju primjenu i u kemijskim znanostima. Doista, budućnost GFP-a je blistava i sjajna, kao i on sam!

### Biografije

**Osamu Shimomura** rođen je 1928. u Kyotu u Japanu. Doktorirao je 1960. iz područja organske kemije na Sveučilištu Nagoya u Japanu. Od 1960. do 1982. radi na Princeton University u SAD-u kao znanstvenik biokemičar. Od 1982. do 2001. radi kao profesor organske kemije na Sveučilištu Boston. Trenutačno je profesor emeritus na Marine Biology Laboratory, Woods Hole i Boston University Medical School, Boston u SAD-u.

**Martin Chalfie** rođen je 1947., a odrastao je u Chicagu, SAD. Doktorirao je 1977. iz područja neurobiologije na Sveučilištu Harvard, SAD. Od 1982. radi kao profesor bioloških znanosti na Sveučilištu Columbia u New Yorku, SAD.

**Roger Y. Tsien** rođen je 1952. u New Yorku, SAD. Doktorirao je 1977. iz područja fiziologije na Sveučilištu Cambridge, Velika Britanija. Od 1982. do 1989. radi na University of California u Berkeleyu, SAD. Od 1989. radi kao profesor farmakologije te profesor kemije i biokemije na University of California u San Diegu, SAD.