Zeleni fluorescentni protein

Kerum, Antonia

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:226:577363

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of University Department of Marine Studies

SVEUČILIŠTE U SPLITU
SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA
PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

Antonia Kerum

ZELENI FLUORESCENTNI PROTEIN

Završni rad

Split, srpanj 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

SVEUČILIŠNI ODJEL ZA STUDIJE MORA

PREDDIPLOMSKI STUDIJ BIOLOGIJA I EKOLOGIJA MORA

ZELENI FLUORESCENTNI PROTEIN

Završni rad

Predmet: Molekularna biologija

Mentor:

Doc. dr. sc. Željka Trumbić

Student:

Antonia Kerum

Split, srpanj 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Splitu
Sveučilišni odjel za studije mora
Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora

Završni rad

ZELENI FLUORESCENTNI PROTEIN

Antonia Kerum

Sažetak

U ovom radu su predstavljene karakteristike i primjene zelenog fluorescentnog proteina. Zeleni fluorescentni protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*) izoliran je iz meduze *Aequorea victoria* koja je rasprostranjena duž zapadne obale Sjeverne Amerike. GFP ima oblik cilindra, tzv. formu β-limenke. Ciklizacijskim reakcijama unutarnjih lanaca β ploče i aminokiselina stvara se kromofor koji daje boju proteinu. Različitim mutacijama stvarane su različite varijante odnosno derivati GFP-a pa imamo plavi fluorescentni protein, cijan fluorescentni protein i žuti fluorescentni protein. Primjena GFP-a je raznolika, pa se isti koristi u dijagnostici tumora, kao reporter transkripcijske regulacije, kao biosenzor, pri vizualizaciji proteina u stanici te u istraživanju primarnih staničnih funkcija. Zbog svoje široke primjene nedvojbeno je da će se daljnjim istraživanjima poboljšati karakteristike GFP-a i njegovih derivata i tako proširiti područje primjene.

(22 stranice, 14 slika, 29 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: zeleni fluorescentni protein, *Aequorea victoria*, derivati GFP-a

Mentor: Doc. dr. sc. Željka Trumbić

Ocjenjivači: 1. Doc. dr. sc. Zvjezdana Popović Perković
2. Doc. dr. sc. Željka Trumbić
3. Doc. dr. sc. Mirela Petrić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Split
Department of Marine Studies
Undergraduate study Marine Biology and Ecology

BSc Thesis

GREEN FLUORESCENT PROTEIN

Antonia Kerum

Abstract

In this thesis, characteristics and applications of green fluorescent protein are presented. The green fluorescent protein (GFP) is isolated from the jellyfish *Aequorea victoria* that is widespread along the west coast of North America. GFP has cylinder shape also referred to as β-can structure. Cyclization reactions between inward-facing sidechains and amino acids creates chromophore that gives protein it's colour. Different mutations made different derivatives of GFP so we have blue fluorescent protein, cyan fluorescent protein and yellow fluorescent protein. Applications of GFP are diverse, in tumour diagnostics, as transcriptional regulation reporter, biosensor, when visualizing proteins in the cell, in research of primary cell functions, among others. It is undoubtable that further research will improve characteristics of GFP and its derivatives and thus extend the scope of their application.

(22 pages, 14 figures, 29 references, original in: Croatian)

Keywords: green fluorescent protein, *Aequorea victoria*, GFP derivatives

Supervisor: Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor

Reviewers: 1. Zvjezdana Popović Perković, PhD / Assistant Professor
2. Željka Trumbić, PhD / Assistant Professor
3. Mirela Petrić, PhD / Assistant Professor

SADRŽAJ:

1.UVOD 1
2. RAZRADA TEME 4
2.1. Biološko-ekološke karakteristike meduze *Aequorea victoria* 4
2.2. Struktura i apsorpcijski spektar zelenog fluorescentnog proteina 5
2.3. Derivati zelenog fluorescentnog proteina 6
2.3.1. Plavi fluorescentni proteini 7
2.3.2. Cijan fluorescentni protein 8
2.3.3. Žuti fluorescentni protein 9
2.4. Primjeri upotrebe zelenog fluorescentnog proteina 10
2.4.1. Transgenični organizmi 12
2.4.2. *Förster resonance energy transfer* (FRET) 14
2.4.3. Primjena zelenog fluorescentnog proteina u proučavanju i dijagnostici tumora 16
3. ZAKLJUČCI 19
4. LITERATURA 20

1.UVOD

Zeleni fluorescentni protein (GFP, engl. *green fluorescent protein*) je protein koji se sastoji od 238 aminokiselinskih ostataka (Prasher i sur., 1992) i pripada skupini fluorescentnih proteina odgovornih za stvaranje bioluminiscencije kod mnogih morskih organizama, posebno žarnjaka. Prvi put je izoliran iz fotoorgana meduze *Aequorea victoria* 1962. godine usporedno s fotoproteinom aequorinom (Shimomura i sur., 1962). Fluorescencija nastaje kad aequorin reagira sa Ca^{2+} ionima dajući plavo svjetlo. Dio energije apsorbira zeleni fluorescentni protein pri čemu se emitira zeleno svjetlo (Morise i sur., 1974).

Prije samog otkrića aequorina i GFP-a, japanski znanstvenik Osamu Shimomura je u Japanu istraživao kemijsku strukturu spojeva odgovornih za bioluminiscenciju kod ostrakodnih račića roda *Cypridina*. Kod njih bioluminiscencija nastaje enzimskom reakcijom poznatoj kao reakcija luciferin-luciferaza prilikom koje uz pomoć kisika i enzima luciferaze od luciferina nastaju oksiluciferin, ugljični dioksid i svjetlo (Shimomura i sur., 1957). Iskustvo stečeno radom na *Cypridini* je bilo ključno za razumijevanje i rad na mehanizmu bioluminiscencije kod meduze *Aequorea,* nakon što je 1960. godine Shimomura nastavio znanstveni rad na Sveučilištu Princeton u SAD-u. Prikupljajući meduze u mjestu Friday Harbor u državi Washington gdje ih je bilo mnogo i pokušavajući izolirati luminiscentne spojeve, Shimomura je zaključio da se radi o nešto drugačijem mehanizmu proizvodnje svjetla, ali također utemeljenom na proteinima. Otkrio je i izolirao aequorin, luciferazu koja uz pomoć Ca^{2+} katalizira oksidaciju celenterazina pri čemu dolazi do emisije plavog svjetla (Shimomura i sur., 1962; Day i Davidson, 2009). Uz aequorin, izoliran je i zeleni fluorescentni protein koji apsorbira plavo svjetlo i prevodi ga u zeleno, što tek objašnjava zeleno fluorescentno svjetlo koje proizvode meduze (Shimomura i sur., 1962; Morise i sur., 1974).

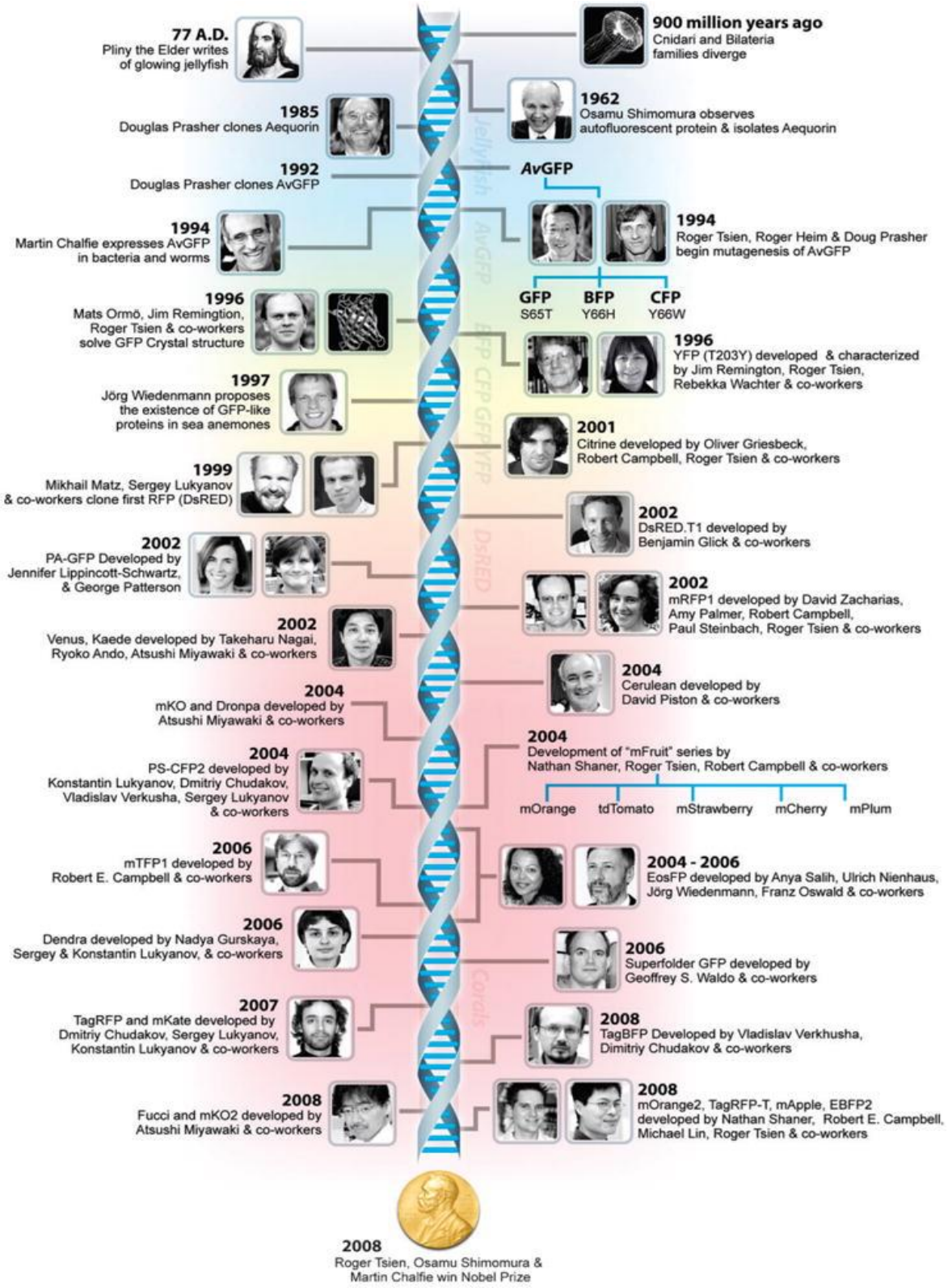
Prasher i sur. (1992) su uspješno klonirali i sekvencirali gen za GFP pri čemu je prepoznat potencijal ovog proteina kao alata u staničnoj biologiji, pod uvjetom da ga je moguće eksprimirati i u drugim biološkim sustavima osim meduze pri čemu bi mehanizam bioluminiscencije ostao očuvan. Početkom 1990.-tih Martin Chalfie i suradnici uspijevaju uspješno ugraditi i heterologno eksprimirati gen za GFP u bakteriji *Escherichia coli* i osjetnim neuronima oblića *Caenorhabditis elegans*. Stanice bakterije i oblića su proizvele GFP, a ozračene s UV ili plavim svjetlom emitirale su zeleno svjetlo (Chalfie i sur., 1994). Ovo istraživanje je dokazalo da je sinteza kromofora neovisna o drugim spojevima iz *A. victoria,*

da ga je moguće sintetizirati u prokariotskim i eukariotskim organizmima te da nije štetan za stanice. Daljnja istraživanja su potvrdila da je moguće spojiti gen za GFP s genima za druge proteine i na taj način vrlo jednostavno lokalizirati specifične proteine u živim organizmima i stanicama (Chalfie, 2009).

Roger Y. Tsien je proučavao kako struktura GFP-a dovodi do proizvodnje luminiscencije. Stečenim znanjem je mijenjao i dorađivao strukturu, posebno oko kromofora, dijela molekule ključnog za nastanak obojenja, kako bi proizveo molekule koje emitiraju svjetlo na malo drugačijim valnim duljinama te je dobio proteine, odnosno molekularne oznake ili biljege različitih boja (Tsien, 1998).

Za otkriće i rad na razvoju zelenog fluorescentnog proteina 2008. godine znanstvenici Roger Y. Tsien, Osamu Shimomura i Martin Chalfie su dobili Nobelovu nagradu (Anonimus, 2018). Odbor za Nobelovu nagradu prozvao je GFP "zvijezdom vodiljom" u biokemiji omogućavajući da prethodno nevidljivi procesi postanu vidljivi. GFP i njegovi derivati revolucionalizirali su biomedicinska istraživanja. Vremenska crta s prikazom najvažnijih događaja u otkriću i razvoju GFP-a kao molekularnog biljega je prikazana na Slici 1.

GFP je izvrstan alat u mnogim granama biologije zbog sposobnosti stvaranja vlastitog kromofora bez potrebe za ikakvim dodatnim kofaktorima, enzimima ili supstratima, a jedino što mu je potrebno je molekularni kisik. Koristi se kao biljeg za ekspresiju gena te za označavanje proteina.

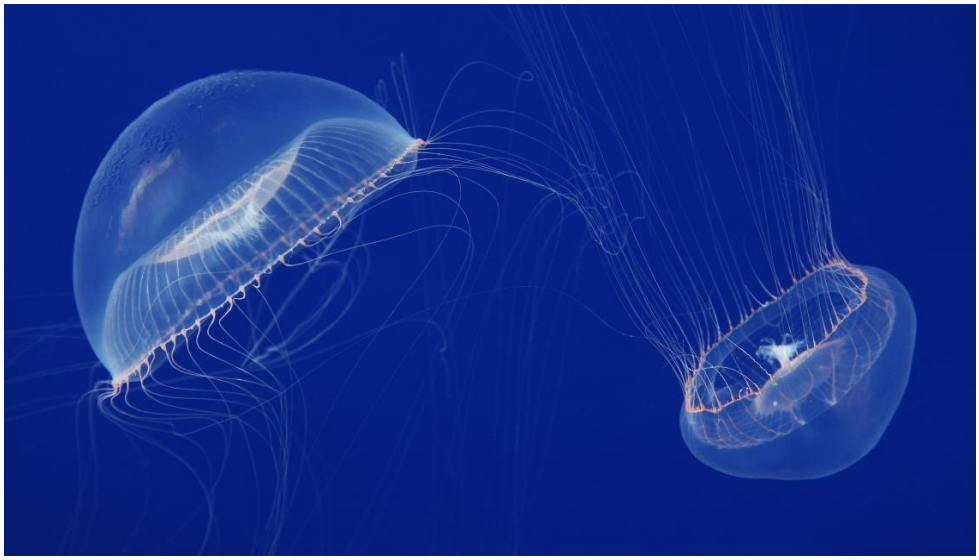


Slika 1. Vremenska crta najvažnijih događaja povezanih s otkrićem i razvojem zelenog fluorescentnog proteina kao molekularnog biljega (prema Day i Davidson, 2009).

2. RAZRADA TEME

2.1. Biološko-ekološke karakteristike meduze *Aequorea victoria*

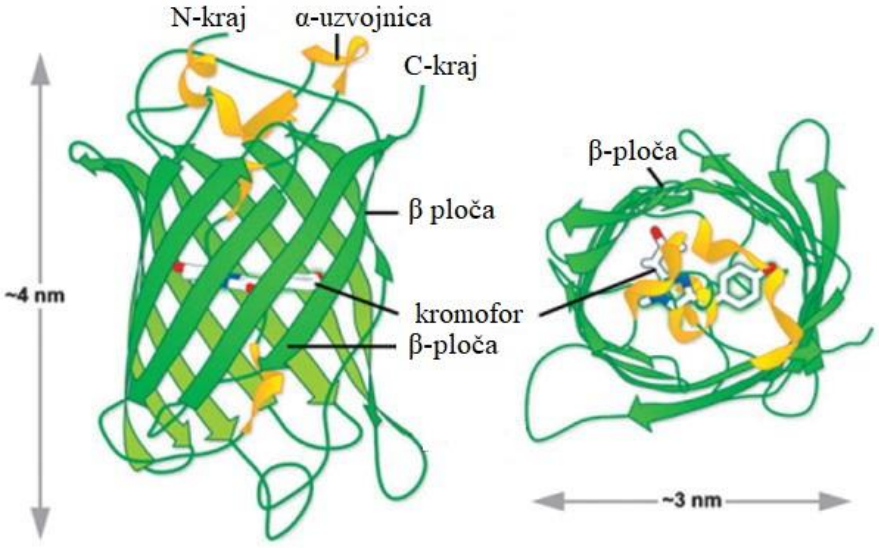
Aequorea victoria je bioluminiscentna meduza iz razreda Obrubnjaci (Hydrozoa). Rasprostranjena je duž zapadne obale Sjeverne Amerike u Tihom oceanu od Beringovog mora do južne Kalifornije (Kozloff, 1996). Ima karakterističnu oblik meduze, bezbojna je i gotovo potpuno prozirna (Slika 2). U lovkama ima nematociste koje koristi pri hvatanju plijena. Hrani se zooplanktonom te ličinkama riba i drugih organizama. Abudancija meduze *A. victoria* korelira s abudancijom zooplanktona (Purcell, 1991). *Aequorea victoria* je odvojena spola, a pokazuje dimorfnu izmjenu generacija, pri čemu bentoski polip karakterizira nespolnu, a planktonska meduza spolnu generaciju. Ova meduza je glavni izvor dva proteina važna za bioluminiscenciju: fotoproteina aequorina i zelenog fluorescentnog proteina. Otpuštanjem kalcija proizvodi se plavo svjetlo koje reagira s fotoproteinom aequorinom koje zatim prelazi u zeleno svjetlo preko zelenog fluorescentnog proteina. Oba proteina se koriste u biološkim istraživanjima. Do proizvodnje svjetla dolazi u prstenu smještenom na rubu klobuka gdje su vidljive žuto-zelene fluorescentne nakupine tkiva koje sadrže fotogenične stanice. Luminiscencija je unutarstanična i bljeskovi traju od 0,3 do 1,5 sekundi (Davenport i Nicol, 1955).



Slika 2. Meduza *Aequorea victoria* (izvor: https://www.montereybayaquarium.org/animal-guide/invertebrates/crystal-jelly).

2.2. Struktura i apsorpcijski spektar zelenog fluorescentnog proteina

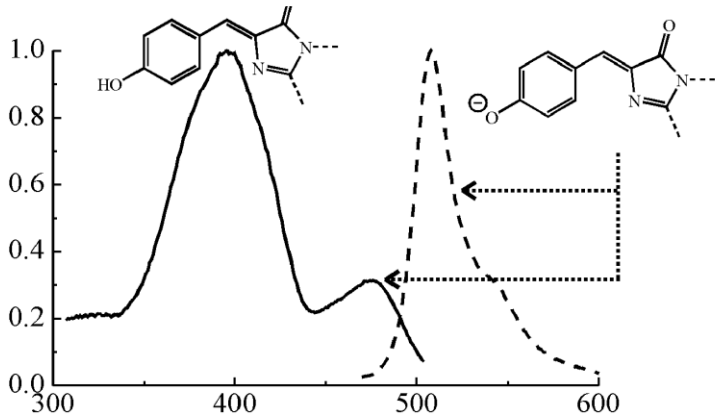
Zeleni fluorescentni protein ima oblik cilindra, a sastoji se od 11 β ploča i jedne α uzvojnice na koju je kovalentno vezan kromofor. Kromofor je dio molekule odgovoran za obojanost i nalazi se zaštićen u centru molekule (Slika 3). Struktura GFP-a formira gotovo savršen cilindar dug 42 Å i širok 24 Å stvarajući tako formu β-limenke (engl. *β-can*) (Ormö i sur., 1996). Kromofor u centru cilindra je p-hidroksibenzilideneimidazolidinon koji nastaje kemijskom reakcijom između rezidua Ser65-Tyr66-Gly67 (brojevi označavaju redni broj aminokiselina) (Tsien, 1998). U odsutnosti pravilno savijenog GFP-a kromofor je nefluorescentan i uglavnom se nalazi u neioniziranom fenolnom obliku. Unutarnji bočni lanci cilindra potiču ciklizacijsku reakciju između Gly67 i Ser65 kada nastaje imidazolinon nakon čega molekularni kisik dehidrogenizira α-β vezu Tyr66 i konjugira njegov aromatski prsten s imidazolinonom (Tsien, 1998). Ovaj proces post-translacijske modifikacije naziva se sazrijevanje i tek nakon njega kromofor postaje fluorescentan. Fluorescentni kromofor se naziva fluorofor. Na boju, intenzitet i fotostabilnost utječu vodikove veze i interakcije elektrona s bočnim lancima. Divlji tip GFP-a (wt, engl. *wild-type*) se lako i spontano savija u pravilnu strukturu na nižim temperaturama dok je ovaj proces otežan na višim temperaturama (Tsien, 1998).



Slika 3. Struktura zelenog fluorescentnog proteina (prema Day i Davidson, 2009).

Zeleni fluorescentni protein ima dva ekscitacijska vrhunca: veliki na 395 nm i manji na 475 nm kojima odgovaraju emisijski vrhunci na 508 nm i 503 nm, respektivno (Slika 4).

Ovo upućuje na to da se radi o smjesi kemijskih formi. Porast pH vrijednosti u načelu dovodi do povećanja amplitude ekscitacijskog vrhunca na 475 nm (Tsien, 1998).



Slika 4. Ekscitacijski (puna linija) i emisijski (iscrtkana linija) spektar izvornog zelenog fluorescentnog proteina izoliranog iz meduze *Aequorea victoria* sa strukturama kromofora (prema Tsien, 1998).

2.3. Derivati zelenog fluorescentnog proteina

Uslijed složenog apsorpcijskog spektra, visokog ekstincijskog koeficijenta na UV valnim duljinama i niskog kvantnog prinosa, upotreba divljeg tipa GFP-a izoliranog iz *Aequorea victoria* u promatranju stanica je bila ograničena (Day i Davidson, 2009). S ciljem poboljšanja, razvijeni su brojni izmijenjeni zeleni fluorescentni proteini korištenjem procesa mutageneze. Mutageneza uključuje izmjenu nukleotidnog slijeda gena za GFP i ekspresiju rekombinantnog proteina u živoj stanici. U slučaju GFP-a, često se mijenjaju aminokiseline u bočnim lancima cilindra koje utječu na ponašanje i stabilnost GFP-a, ali i sam kromofor. Prvi takvi mutanti su nastali uvođenjem točkastih i nasumičnih mutacija koje su dovele do poboljšanja spektralnih karakteristika GFP-a (Heim i sur., 1995). Različitim mutacijama nastajale su različite varijante proteina pa tako, osim skupine zelenih (GFP), imamo plave (BFP, engl. *blue fluorescent protein*), cijan (CFP, engl. *cyan fluorescent protein*) i žute (YFP, engl. *yellow fluorescent protein*) fluorescentne proteine.

Zamjenom serina s treoninom na mjestu 65 te fenilalanina s leucinom na mjestu 64 nastao je unaprijeđeni (engl. *enhanced*) zeleni fluorescentni protein (EGFP) sa značajno

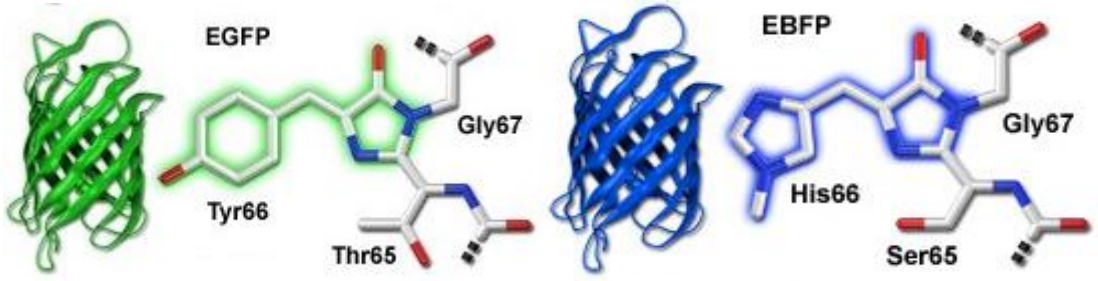
poboljšanim svojstvima (Heim i sur., 1995; Tsien, 1998). EGFP ima bolje definirani apsorpcijski profil, kvantni prinos i brže vrijeme sazrijevanja što omogućava ranije promatranje stanica nakon transfekcije. Postoje i drugi derivati EGFP-a kao safir, smaragd (emerald), „superfolder“, i dr. (Day i Davidson, 2009). GFP koji se danas koristi zapravo je neki od derivativa EGFP-a koji se konstantno razvijaju i poboljšavaju. Roh i sur. (2013) su tako napravili oblik koji se može izlučiti iz stanice čime se omogućilo kvantitativno praćenje ekspresije regulatorne sekvence gena od interesa. EGFP su izmijenili dodavanjem signalnog peptidnog slijeda koji kodira β-podjedinicu folikulostimulirajućeg hormona (FSH) kod miševa.

2.3.1. Plavi fluorescentni proteini

Zamjenom tirozina na mjestu 66 s histidinom u GFP-u nastaje plavi fluorescentni protein (BFP), jedan od prvih derivata GFP-a (Slika 5). Tom mutacijom nastao je kromofor šireg apsorpcijskog spektra centriran oko 380 nm, a emisija plavog svjetla doseže svoj vrhunac na 448 nm (Heim i sur., 1995). Izvorna verzija BFP-a imala je niski kvantni prinos te je njegova svjetlina iznosila samo 15-20% svjetline GFP-a. Dodatnim mutacijama BFP-a poboljšane su njegove karakteristike, međutim još uvijek nije imao istu jačinu svjetlosti kao GFP pa je stoga i korištenje prvih varijanti BFP-a kao staničnog biljega bilo ograničeno. Osim slabije svjetline i osjetljivosti na fotoizbjeljivanje (engl. *photobleaching*), korisnost BFP-a kao staničnog biljega bila je ograničena i njegovom potrebom za ekscitacijom u blizini UV svjetla koje je fototoksično za stanice sisavaca (Day i Davidson, 2009).

Nekoliko grupa znanstvenika su prije desetak godina naprednim metodama mutageneze uspjeli proizvesti BFP viših kvantnih prinosa i veće fotostabilnosti kao što su azurit, SBFP2 (engl. *strongly enhanced blue fluorescent protein*) i EBFP2 (engl. *enhanced blue fluorescent protein*) (Day i Davidson, 2009). Derivat koji najviše obećava je EBFP2 (Ai i sur., 2007), najsjajniji je i najstabilniji, te se pokazao kao izvrstan donor za FRET metodu praćenja prijenosa energije između dvije fotoosjetljive molekule (engl. *Förster resonance energy transfer*, vidi potpoglavlje 2.4.2.). EBFP2 bi trebao biti koristan i u dugotrajnom snimanju živih stanica kada je potrebna plava sonda, pogotovo pri korištenju dvofotonske ekscitacije čime se izbjegava oštećenje stanica u blizini UV svjetla.

Supstitucijom tirozina na mjestu 66 s fenilalaninom u wtGFP nastaje BFP čiji se spektar pomiče na još kraće valne duljine (ekscitacija na 360 nm, a emisija na 442 nm), te je ova varijanta izrazito slaba (Tsien, 1998). Napredna varijanta ovog derivata BFP-a je Sirius koji je puno svjetliji od roditeljske Phe66 varijante, fotostabilniji od EBFP2 i izrazito neosjetljiv na fluktuacije pH (Tomosugi i sur., 2009). Međutim, zbog ekscitacije u UV spektru i problema s autofluorescencijom, upotreba Siriusa u dugotrajnim studijama promatranja stanica bi mogla biti problematična (Day i Davidson, 2009).

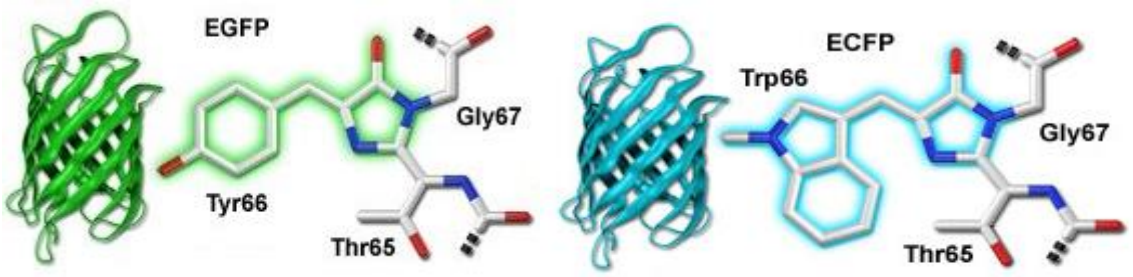


Slika 5. Struktura i kromofor poboljšanog zelenog (EGFP) i plavog fluorescentnog proteina (EBFP) (izvor: https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/fpcolorpalette).

2.3.2. Cijan fluorescentni protein

Zamjenom tirozina 66 s triptofanom, nastaje cijan fluorescentni protein (CFP) (Slika 6). Dodatnim supstitucijama unutar okolne strukture nastala je poboljšana verzija CFP-a, ECFP (engl. *enhanced* CFP) (Day i Davidson, 2009). Uvođenje korisnih mutacija u ECFP rezultiralo je poboljšanim karakteristikama: poboljšana svjetlina, topljivost, učinkovitost za FRET postupke. Svjetlina ECFP-a iznosi samo 40% svjetline EGFP-a. ECFP, kao i wtGFP, ima složeni ekscitacijski spektar što znači da ima više pobuđenih stanja što nadalje ograničava korištenje ovog proteina kao sonde u određenim primjenama. U nastojanjima da se razriješe složena pobuđena stanja ECFP-a, znanstvenici su proizveli varijantu visokih performansi nazvanu cerulean (Rizzo i sur., 2004). Cerulean je rezultat ciljanih supstitucija na površini ECFP-a izloženoj otapalu. Ovaj protein ima povećani kvantni prinos, veći ekstincijski koeficijent i pojednostavljeno pobuđeno stanje u usporedbi s ECFP (Rizzo i sur., 2004). Kombinacija ceruleana i jednog od žutih fluorescentnih proteina visokih performansi trenutno je najpopularnija kombinacija za FRET mjerenja. Zahvaljujući svojim poboljšanim

svojstvima, cerulean je jedan od najuspješnijih derivativa GFP-a meduze *Aequorea* (Day i Davidson, 2009).

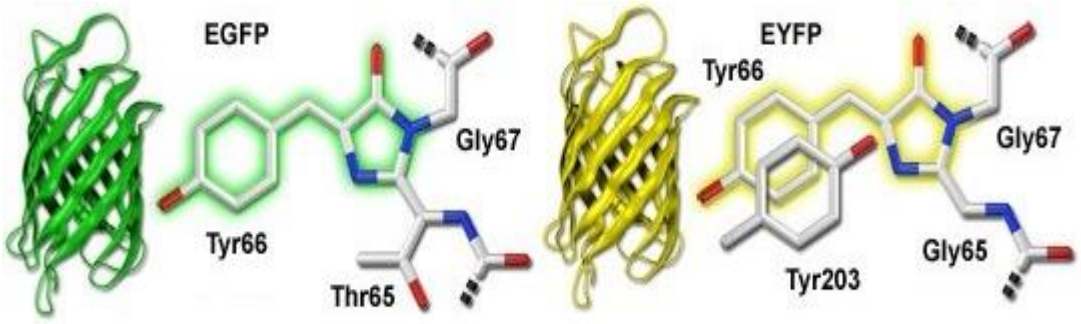


Slika 6. Struktura i kromofor poboljšanog zelenog (EGFP) i cijan fluorescentnog proteina (ECFP) (izvor: https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/fpcolorpalette).

2.3.3. Žuti fluorescentni protein

Supstitucija treonina 203 s tirozinom pomiče ekscitacijski spektar GFP-a za 20 nm prema dužim valnim duljinama, te na taj način nastaje fluorescentni protein sa žuto-zelenom emisijom, žuti fluorescentni protein (YFP) (Ormö i sur., 1996; Tsien, 1998) (Slika 7). Poboljšana verzija žutog fluorescentnog proteina, EYFP, jedna je od najsjajnijih fluorescentnih proteina, međutim EYFP je osjetljiv na niski pH i koncentraciju kloridnih iona, te pokazuje slabu fotostabilnost u usporedbi s ostalim fluorescentnim proteinima. Upravo ta osjetljivost je iskorištena za razvoj biosenzora koji mjere citoplazmatski pH i koncentraciju kloridnih iona (Day i Davidson, 2009).

Daljnji rad na poboljšanju YFP-a rezultirao je različitim varijantama s poboljšanim svojstvima, npr. supstitucija glutamina na položaju 69 s metioninom daje citrin, fluorescentni protein koji je fotostabilniji od drugih žutih fluorescentnih proteina, ima veću kiselinsku stabilnost, smanjenu osjetljivost na koncentraciju kloridnih iona te se učinkovitije eksprimira u stanicama sisavaca (Griesbecek i sur., 2001). Daljnjim eksperimentima je pokazano da supstitucija fenilalanina 45 s leucinom poboljšava učinkovitost sazrijevanja i smanjuje halidnu osjetljivost žutog fluorescentnog proteina. Ovaj protein je nazvan venus fluorescentni protein (Day i Davidson, 2009).



Slika 7. Struktura i kromofor poboljšanog zelenog (EGFP) i žutog fluorescentnog proteina (EYFP) (izvor: https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/applications/fpcolorpalette).

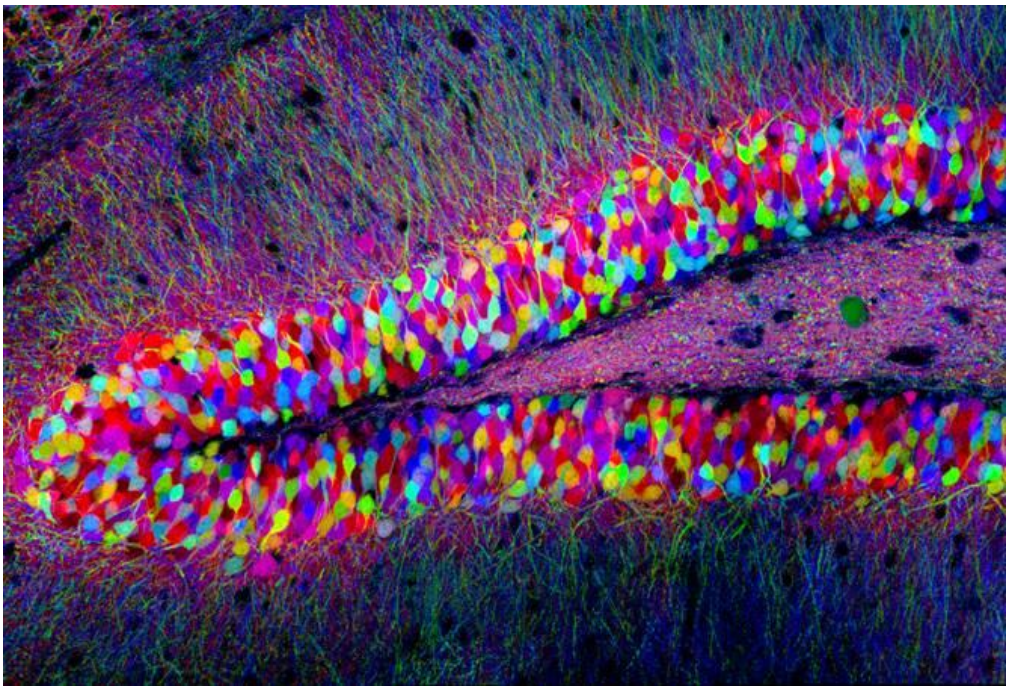
2.4. Primjeri upotrebe zelenog fluorescentnog proteina

Upotreba zelenog fluorescentnog proteina, njegovih derivata, ali i njemu sličnih proteina izoliranih iz drugih morskih organizama, kao što su koralji i vlasulje, s emisijskim spektrom u narančastom i crvenom području, je raznolika i redefinirala je područje fluorescentne mikroskopije i način na koji se koristi u biološkim znanostima. Fluorescentni proteini su manje štetni od npr. FITC-a (engl. *fluorescein isothiocyanate*), kemijskog biljega, u primjeni na živim stanicama. To je potaknulo razvoj različitih modifikacija i visoko automatiziranih sistema kojima se promatraju stanice za vrijeme ekspresije proteina obilježenih fluorescentnim proteinima. Fluorescentni proteini (FPs) se koriste kao: reporteri transkripcijske regulacije i aktivacije gena, biosenzori, fuzijski proteini za praćenje pokretljivosti proteina/stanica tijekom razvoja, molekularni biljezi za praćenje rasta stanica (npr. patogene bakterije i stanice tumora) te biljezi za lokalizaciju proteina u stanicama (Stepanenko i sur., 2008). Prednost GFP-a i njemu sličnih proteina je u tome što kromofor nastaje interno kao posljedica njihove strukture i nije potrebno dodavanje dodatnih faktora i supstrata. Spajanjem gena za zeleni fluorescentni protein s genom od interesa nastaje fuzijski protein koji eksprimiran u živoj stanici svijetli i moguće je odrediti kako i gdje dolazi do izražaja tog gena. Označavanje proteina fluorescentnim markerima daje nam uvid u promjene proteina pri različitim uvjetima. GFP je stabilan i u načelu ne utječe na funkciju označenih proteina, iako su neželjene interakcije zabilježene, npr. remeti interakciju aktina i miozina (Stepanenko i sur., 2008).

Jedna od zanimljivih primjena fluorescentnih proteina je tzv. *brainbow* (engl.) tehnika s posebnom primjenom u neuroznanosti (Livet i sur., 2007). Koristeći *cre-lox* rekombinacijski

sustav, nizom različitih fluorescentnih proteina označuju su pojedinačni neuroni transgeničnih miševa te se na taj način proučava kako neuroni međusobno djeluju i dobiva se uvid u funkciju živčanog sustava (Slika 8) .

Sredinom druge polovice 20. stoljeća (1970-tih) pojavila se tehnika fotoizbjeljivanja (engl. *photobleaching*) koja se koristi za vizualizaciju i kvantifikaciju dinamičkih procesa u stanici. Fotoizbjeljivanje je fotokemijska promjena boje ili molekule fluorofora tako da trajno ne može fluorescirati, a često se postiže primjenom lasera. To se događa zbog cijepanja kovalentnih veza ili zbog nespecifičnih reakcija fluorofora i okolnih molekula. Oporavak fluorescencije u izbijeljenoj regiji se mjeri kao funkcija vremena, a stopa unosa neizbjeljenih fluorescentnih proteina se povezuje s pokretljivošću populacije označenih proteina. Interpretacija rezultata fotoizbjeljivanja je vrlo zahtjevna. Nepotpuni povratak fluorescencije može ukazivati na prisutnost jedne ili više populacija nepokretnih proteina koji su stabilno vezani unutar fotoizbjeljene regije, dok je u slučaju visoko mobilnih proteina nemoguće potpuno fotoizbjeliti ciljano područje (Day i Davidson, 2009).



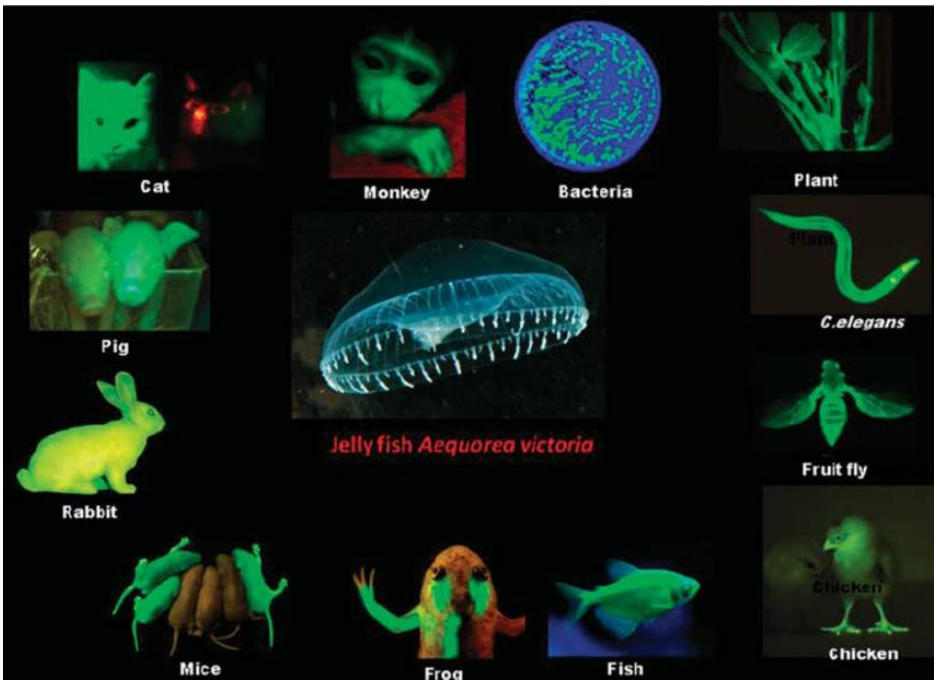
Slika 8. Neuroni u hipokampusu *brainbow* transgeničnih miševa označeni različitim fluorescentim proteinima uz pomoć *cre-lox* rekombinacijskog sustava (izvor: https://www.cell.com/pictureshow/brainbow).

2.4.1. Transgenični organizmi

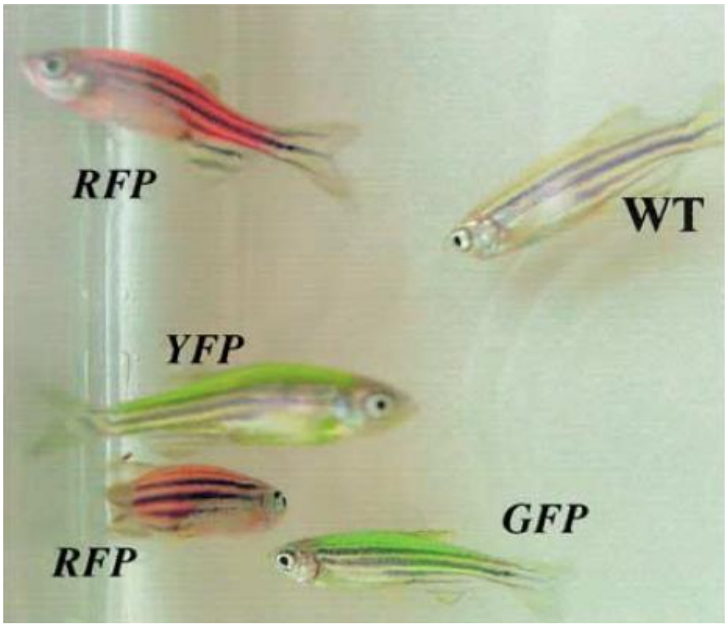
Nakon prve uspješne transformacije oblića *Caenorhabditis elegans* zelenim fluorescentnim proteinom (Chalfie i sur., 1994), fluorescentni proteini su postali jedan od osnovnih alata u proizvodnji i analizi transgeničnih organizama, kako u temeljnim tako i u primijenjenim istraživanjima. Modificirani su i drugi modelni organizmi, kao vinska mušica *Drosophila melanogaster*, stanične linije sisavaca, kvasac, biljke, miš *Mus musculus*, zebrasta ribica *Danio rerio* i afrička pandžašica *Xenopus laevis* (pregledno opisano u Stewart, 2006) (Slika 9). Izmijenjeni organizmi proizvode fluorescentno svjetlo, ovisno o tipu transformacije, s različitom potencijalnom primjenom u funkcionalnoj genomici i razvojnoj biologiji biljaka i životinja, primjerice u praćenju uzoraka ekspresije gena, razvoju tkiva i organa, aktivacije promotora i regulacije genske aktivnosti, praćenju uspješnosti mutageneze, nuklearne transplantacije, RNA interferencije, homologne mitotske rekombinacije i dr. (Gong i Wan, 2001; Stewart, 2006). Zbog prozirnosti embrija, zebrasta ribica *Danio rerio* i medaka *Oryzias latipes*, transformirane GFP-om ili njegovim derivatima, su vrlo zanimljivi modeli u razvojnoj biologiji (Gong i Wang, 2001). U kombinaciji s promotorima osjetljivima na koncentracije teških metala ili hormona čija bi aktivacija bila povezana s pojavom fluorescencije, riblji modeli bi potencijalno mogli služiti i kao indikatori onečišćenja u okolišu. Transformiranje svih komercijalnih ili uzgajanih transgeničnih organizama s fluorescentnim proteinima, bilo u agrikulturi, stočarstvu ili akvakulturi, bi potencijalno omogućilo njihovo praćenje, detekciju homozigotnosti ili introgresije u prirodne populacije (Stewart, 2006). Smatra se da fluorescentni proteini nisu štetni za organizme te da nema nepoželjnih posljedica kod transgeničnih organizama.

S kulturnog aspekta, fluorescentne životinje su pobudile zanimanje javnosti. U Nacionalnom institutu za agronomske znanosti (INRA, Institut National de la Recherche Agronomique) u Francuskoj za potrebe umjetnosti napravljen je kontroverzni zeleno-fluorescentni zec Alba. Transgenične zebraste ribice predstavljaju komercijalno najuspješnije transgenične organizme koji se prodaju kao ornamentalni organizmi poznati pod nazivom „GlowFish“ (Stewart, 2006) (Slika 10). Godine 2009. južnokorejski tim sa Sveučilišta u Seoulu je uzgojio transgenične biglove, prve genetski modificirane pse (Hong i sur., 2009). Pseći fetalni fibroblasti su uspješno transformirani crvenim fluorescentnim proteinom (RFP), podrijetlom iz koralja *Discosoma striata*, nakon čega je izvršena nuklearna transplantacija

oocite jezgrom fibroblasta. Psi su emitirali crveno fluorescentno svjetlo, a namijenjeni su proučavanju gena koji uzrokuju ljudske bolesti poput narkolepsije i sljepoće**.**



Slika 9. Transgenični organizmi modificirani fluorescentnim proteinom (prema Kumar i Sahal, 2014).



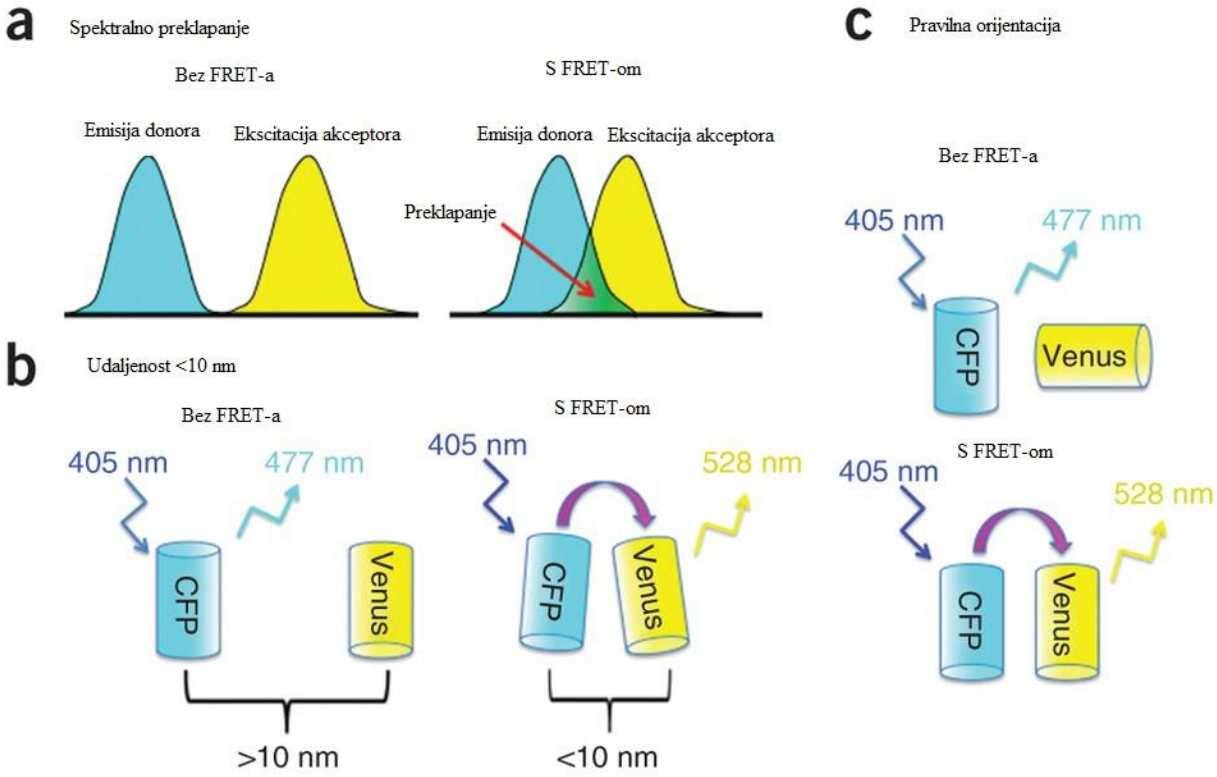
Slika 10. Usporedba transgeničnih zebrastih ribica *Danio rerio* modificiranih sa zelenim (GFP), crvenim (RFP) i žutim (YFP) fluorescentnim proteinom u odnosu na divlji tip (WT) (prema Gong i Wan, 2001).

2.4.2. *Förster resonance energy transfer* (FRET)

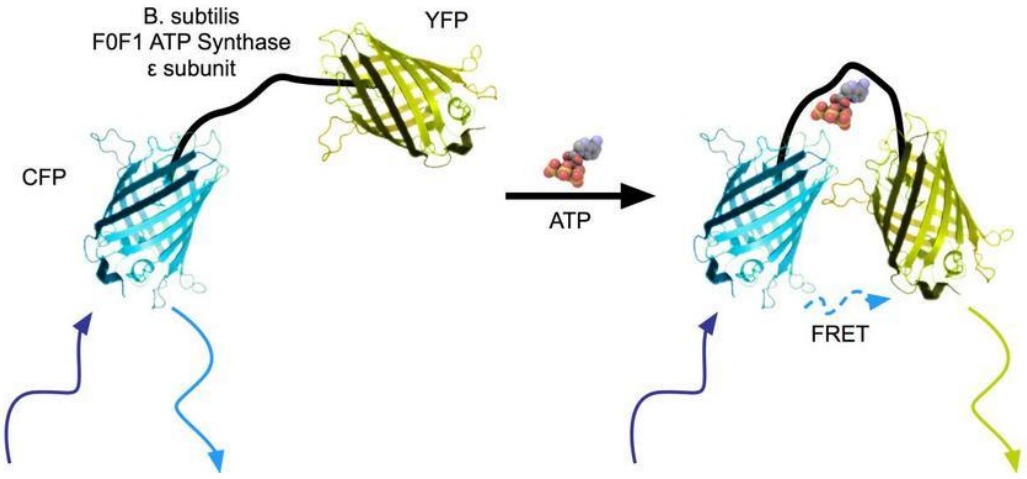
FRET je mikroskopska metoda koja prati prijenos energije između dvije fotoosjetljive molekule (fluorofora). Donor fluorofor koji se nalazi u pobuđenom elektronskom stanju predaje energiju akceptor fluoroforu preko dipol-dipol veze i na taj način fluorofor akceptor emitira fluorescenciju (Day i Davidson, 2009). FRET je razvijen s ciljem proučavanja interakcija između proteina s visokom rezolucijom na način da se na protein od interesa veže ili akceptor ili donor fluorofor. Za učinkoviti FRET, spektar emisije i ekscitacije korištenih fluorofora se treba preklapati, a proteini moraju biti na udaljenosti manjoj od 80-100 Å i u optimalnoj orijentaciji (Slika 11). Korištenje fluorescentnih proteina (FP) kao biosenzora je pogodno jer se ovi proteini genetičkim inženjerstvom spoje s proteinom od interesa i njihovi emisijski/apsorpcijski spektri se preklapaju. Prvi FP-FRET par koji se koristio bio je sastavljen od EBFP (engl. *enhanced blue* FP) i EGFP (engl. *enhanced green* FP), ali zbog niske svjetline i fotostabilnosti njihova primjena je bila nepraktična (Stepanenko i sur., 2008). Najpopularniji FP-FRET parovi su derivati CFP-YFP-a (engl. *cyan* FP i *yellow* FP), točnije cerulean u kombinaciji s venusom ili citrinom (Day i Davidson, 2009). Tumačenje FRET analize može biti kompliciranо uslijed potrebe za sintezom standarda (fuzijski proteini oba fluorofora), pojave nespecifične fluorescencije ili oligomerizacije probi zbog čega signal nije odraz isključivo interakcije proteina i treba ga analitički pročistiti (Day i Davidson 2009).

FRET je pronašao primjenu među biosenzorima za praćenje unutarstaničnog okoliša (npr. pH, redoks potencijala, koncentracije iona kalcija, itd). FRET biosenzori mijenjaju boju ovisno o fiziološkim i biokemijskim signalima (Stepanenko i sur., 2008. Fluorescentni proteini su vezani za različite dijelove proteina biosenzora i međusobno povezani peptidnim linkerom koji nakon vezanja s ligandom ili uslijed drugih biokemijskih modifikacija i interakcija mijenja konformaciju, fluorofore dovodi u bliski položaj i dolazi do prijenosa energije i promjene FRET signala (Day i Davidson, 2009). Jedan takav biosenzor je ATeam (engl. *Adenosine 5'-Triphosphate (ATP) indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements*) koji sadrži CFP fuziran s YFP preko epsilon podjedinice F0F1 ATP sintaze bakterije *Bacillus subtilis* koja služi kao linker i iznimno je osjetljiva na količinu slobodnog ATP-a u stanici (Slika 12). Stabilna stanična linija makrofaga miša koja eksprimira ovaj biosenzor je razvijena i korištena u praćenju procesa ovisnih o ATP-u u aktivaciji inflamasoma (Yaron, 2015). FP-FRET biosenzori su korisni i u istraživanju molekularnih

mehanizama nastanka tumora, imunoloških i neuroloških bolesti, te imaju veliku ulogu u otkrivanju novih lijekova (Day i Davidson, 2009).



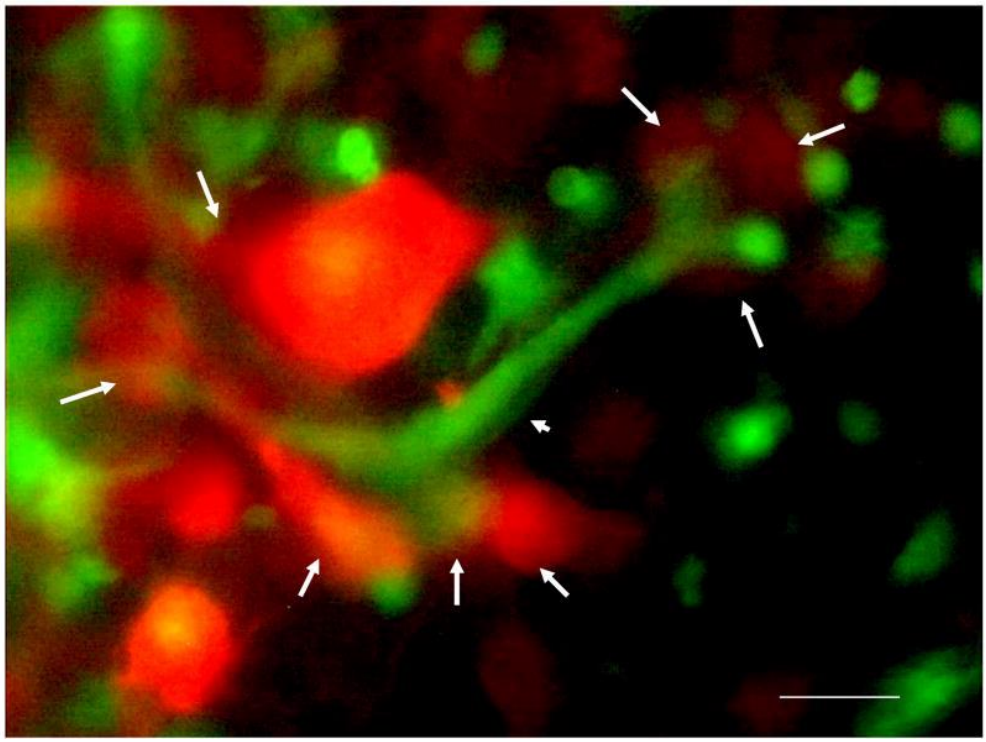
Slika 11. *Förster resonance energy transfer* – FRET. FRET je mikroskopska metoda koja prati promjenu fluorescencije uslijed prijenosa energije između dvaju fluorofora, donora i akceptora. Da bi do prijenosa energije došlo, njihovi absorpcijski/emisijski spektri se moraju preklapati (a), moraju biti u bliskom položaju (b) i optimalnoj orijentaciji (c). Ovdje je prikazan FP-FRET par, CFP i venus YFP(izvor: https://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/fluorescence-resonance-energy-transfer/).



Slika 12. Shematski prikaz ATeam biosenzora koji se sastoji od CFP i YFP proteina fuziranih eta podjedinicom F0F1 ATP sintaze bakterije *Bacillus subtilis* koja je osjetljiva na koncentraciju slobodnog ATP-a u stanici (prema Yaron, 2015).

2.4.3. Primjena zelenog fluorescentnog proteina u proučavanju i dijagnostici tumora

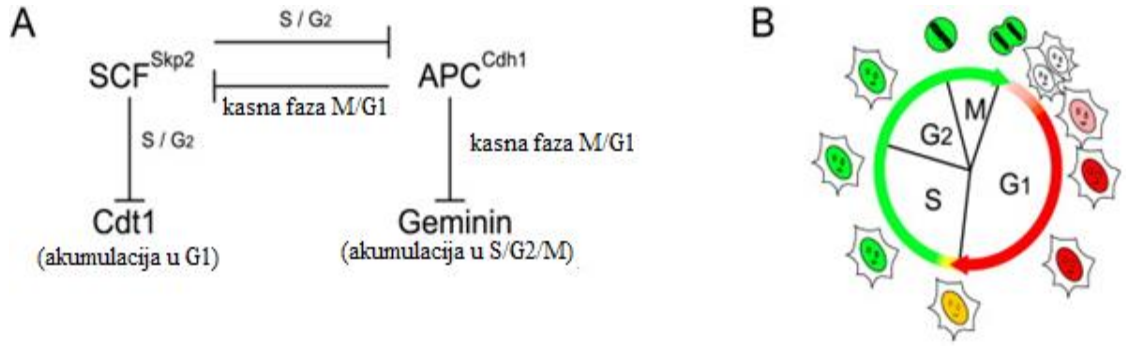
Korištenje fluorescentnih proteina je neinvazivna metoda koja je omogućila praćenje dinamike metastaziranja tumora i određivanje učinkovitosti antitumorskih lijekova. Tumorske stanice je moguće označiti fluorescentnim proteinima i, nakon implantacije u živi model, najčešće miša, posebno razvijenim metodama mikroskopije pratiti njihovo kretanje, interakciju sa zdravim stanicama, angiogenezu te proces metastaziranja, posebno ako su normalne stanice životinje označene drugom bojom (Hoffman, 2015) (Slika 13). Znanstvenici su razvili i proces označavanja tumorskih stanica u živom organizmu koji ima dijagnostičke primjene, posebno kod tumora koji se nalaze duboko u ljudskim organima. Proces uključuje stabilnu transformaciju tumorskih stanica fluorescentnim proteinima korištenjem promijenjenih sojeva virusa koji proizvode fluorescentne proteine (adenovirusa ili herpes virusa) kao posrednika koji se razmnožavaju samo u tumorskim stanicama i na taj način ih specifično označe. Osvjetljavanjem tkiva, posebna kamera detektira svjetleće proteine koji pokazuju gdje se nalazi tumor, a metoda ima i potencijalnu primjenu prilikom kirurških intervencija s obzirom da je fluorescencija stabilna i može se koristiti kao vodič za precizno izrezivanje kanceroznog tkiva (Hoffman, 2015). Zbog stabilne ekspresije, moguće je pratiti i zaostale stanice te njihovo ponašanje.



Slika 13. Fibroblasti glodavca označeni zelenim fluorecentnim proteinom (GFP) i stanice raka prostate glodavaca označene crvenim fluorecentnim proteinom (RFP). Skala = 20 μm (prema Hoffman, 2015).

Nadalje, fluorescentni proteini su primijenjeni kao biljezi za praćenje staničnog ciklusa, u tzv. FUCCI (engl. *fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator*) metodi (Sakaue-Sawano i sur., 2008). Jedan od mehanizama kontrole staničnog ciklusa uključuje proteolizu staničnih proteina posredovanu ubikvitinom u kojem dvije specifične E3 ligaze ubikvitinom označavaju proteine koje treba razgraditi. S obzirom da njih dvije aktiviraju/kontroliraju jedna drugu mehanizmom povratne sprege, njihova količina recipročno oscilira između različitih faza staničnog ciklusa (Sakaue-Sawano i sur., 2008). U FUCCI metodi fluorescentni proteini se spajaju sa specifičnim supstratima ovih ligaza, Cdt1 i gemininom, koji imaju ulogu u kontroli aktivnosti ishodišta replikacije (Slika 14A). Kako stanica prelazi iz G1 u S fazu, njihova boja se mijenja iz crvene u zelenu (Sakaue-Sawano i sur., 2008) (Slika 14B).

Studije su pokazale da se većina tumorskih stanica nalazi u G0/G1 fazi kada aktivno migriraju i tada pokazuju rezistenciju na citotoksičnu kemoterapiju. Poticanje stanica da uđu u S/G2/M fazu staničnog ciklusa kada se aktivno dijele i kad su kemosenzitivne, predstavlja potencijalnu terapijsku metodu (Hoffman, 2015).



Slika 14. Osnova praćenja staničnog ciklusa fluorescentnim obilježavanjem preko FUCCI metode. **A**. Regulacija staničnog ciklusa E3 ligazama SCFSkp2 i APCCdh1 koje sudjeluju u proteolizi posredovanoj ubikvitinom. Bistabilnost se održava između G1 i S/G2/M faza preko supstrata Cdt1 i geminin. **B.** Fluorescentna proba obilježava stanice u G1 fazi u crveno, a one u S/G2/M zeleno (prema Sakaue-Sawano i sur., 2008).

3. ZAKLJUČCI

Otkriće zelenog fluorescentnog proteina iz meduze *Aequorea victoria* i njegove biotehnološke transformacije su potaknula istraživanja koja su transformirala područje molekularne biologije stanice i omogućila promatranje i vizualizaciju staničnih procesa i interakcija fluorescentnom mikroskopijom. Danas imamo čitav spektar boja fluorescentnih proteina izoliranih i iz drugih morskih organizama koji pružaju širok izbor molekularnih biljega za citološke analize. Većina danas korištenih fluorescentnih proteina su modificirani mutagenezom kako bi se optimizirala njihova ekspresija u biološkim sustavima. Nedvojbeno je da će se daljnjim istraživanjima nastaviti poboljšavati njihove spektralne karakteristike, fotostabilnost, svjetlina, otpornost na kiseline, čime će se dodatno proširiti područje primjene fluorescentnih proteina.

4. LITERATURA

Ai HW, Shaner NC, Cheng Z, Tsien RY, Campbell RE. 2007. Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins. Biochemistry, 46: 5904-5910.

Anonimus. 2008. The Nobel Prize in Chemistry 2008. Dostupno sa: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/, pristupljeno: svibanj 2018.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263: 802-805.

Chalfie M. 2009. GFP: Lighting up life. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106: 10073–10080.

Davenport D., Nicol JAC. 1955. Luminescence in Hydromedusae. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 144: 399-411.

Day RN, Davidson MW. 2009. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. Chemical Society Reviews, 38: 2887-2921.

Gong Z, Ju B, Wan H. 2001. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. Genetica, 111: 213-225.

Griesbeck O, Baird GS, Campbell RE, Zacharias DA, Tsien RY. 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. The Journal of Biological Chemistry, 276: 29188-29194.

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY. 1995. Improved green fluorescence. Nature, 373: 663-664.

Hoffman RM. 2015. Application of GFP imaging in cancer. Laboratory investigation, 95: 432-452.

Hong SG, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Park JE, Kang JT, Koo OJ, Kim T, Kwon MS, Koo BC, Ra JC, Kim DY, Ko C, Lee BC. 2009. Generation of red fluorescent protein transgenic dogs. Genesis, 47: 314-322.

Kozloff EN. 1996. Marine Invertebrates of the Pacific Northwest. University of Washington Press, Seattle, 539.

Kumar V, Sahal D. 2014. Genetic Engineering. U: Elvers B (ur.), Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, str. 72.

Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. 2007. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins the nervous system. Nature, 450: 56-62.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminiscent system of *Aequorea*. Biochemistry, 13: 2656-2662.

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science, 273: 1392–1395.

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene, 111: 229-233.

Purcell JE. 1991. Predation by *Aequorea victoria* on other species of potentially competing pelagic hydrozoans. Marine Ecology Progress Series, 72: 255-260.

Rizzo MA, Springer GH, Granada B, Piston DW. 2004. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. Nature Biotechnology, 22: 445-449.

Roh JY, Koo BC, Kwon MS, Kim M, Kim NH, Kim T. 2013. Modification of Enhanced Green Fluorescent Protein for Secretion out of Cells. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 18: 1135-1141.

Sakaue-Sawano A, Kurokawa H, Morimura T, Hanyu A, Hama H, Osawa H, Kashiwagi S, Fukami K, Miyata T, Miyoshi H, Imamura T, Ogawa M, Masai H, Miyawaki A. 2008. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. Cell, 132: 487-498.

Shimomura O, Goto T, Hirata Y. 1957. Crystalline Cypridina Luciferin. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 30: 929-933.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 59: 223-239.

Shimomura O. 2005. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. Journal of Microscopy, 217: 1-15.

Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. 2008. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. Current Protein & Peptide Science, 9: 338-369.

Stewart CN Jr. 2006. Go with the glow: fluorescent proteins to light transgenic organisms. Trends in Biotechnology, 24: 155-162.

Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K, Nagai T. 2009. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. Nature Methods, 6: 351-353.

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein. Annual Review of Biochemistry, 67: 509-544.

Yaron JR. 2015. Ion Flux Regulates Inflammasome Signaling, Doktorska disertacija, Arizona, State University, 116 str.