

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Zelený fluorescenční protein jako nástroj molekulární a buněčné biologie

Vítězslav Plocek

Školitel:

Doc. RNDr. Zdena Palková, CSc.

2007/2008

OBSAH:

Obsah	2
1. Abstrakt	5
2. Anglický abstrakt	6
3. Úvod	7
4. Historie GFP	8
5. Struktura GFP	10
6. Chromofor GFP	12
7. Modifikace GFP	14
8. Využití GFP	16
8.1. Fluorescenční značky	16
8.2. Biofyzikální metody	19
8.3. Biosenzory	21
9. Neškodný GFP?	24
10. Závěr	25
11. Seznam použité literatury	26

Tato práce vznikla pod vedením doc. RNDr. Zdeny Palkové, CSc., které bych chtěl tímto poděkovat za trpělivost a věcné připomínky k textu a zpracování. Dále bych chtěl poděkovat kolektivu naší laboratoře, zejména Ditě Strachotové, Ivaně Ferčíkové a Aleši Holoubkovi, za věcné připomínky a odbornou pomoc při zpracování problematiky týkající se práce.

Nakonec bych chtěl poděkovat Jaroslavu Smejkalovi za některé rady k úpravě textu.

ZKRATKY:

GFP	zelený fluorescenční protein v širším významu slova
wtGFP	přírodní forma zeleného fluorescenčního proteinu
eGFP	zesílený zelený fluorescenční protein
CFP	azurový fluorescenční protein
YFP	žlutý fluorescenční protein
RFP	červený fluorescenční protein
BFP	modrý fluorescenční protein
roGFP	redoxně citlivý zelený fluorescenční protein
deGFP	pH-citlivý zelený fluorescenční protein
FRAP	obnovení fluorescence po vybělení
FLIP	ztráta fluorescence vlivem vybělování
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FRED	fluorescenční rezonanční přenos energie
pHluorin	pH-citlivý fluorescenční protein

1. ABSTRAKT

Zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“; GFP) z medúzy *Aequorea victoria* je jedním z nejdůležitějších nástrojů v molekulární a buněčné biologii. Protein, tvořený 238 aminokyselinami, zaujímá specifickou terciární strukturu - β -soudek. Svoji slávu si GFP zasloužil mimo jiné i tím, že ve většině případů není pro buňku toxický, čímž umožňuje její studium *in vivo*. Díky mnoha mutacím ve struktuře proteinu vzniklo velké množství forem s rozdílnými vlastnostmi a využitím.

Široké spektrum aplikací GFP se dá rozdělit do dvou velkých skupin. V jedné se využívá GFP jako fluorescenční značky, určené ke sledování úrovně genové exprese nebo buněčné lokalizace, zaměřené na proteiny nebo buněčné kompartmenty, se kterými je GFP fúzován. Druhá velká skupina se zabývá využitím GFP jako biosenzoru, od sledování molekulárních interakcí přes zjišťování přítomnosti kovů a solí, určování redoxního potenciálu v okolí až po měření pH.

Klíčová slova: GFP, fluorescence, fluorescenční značky, biosenzor, chromofor, excitační a emisní spektra

2. ANGLICKÝ ABSTRAKT

GREEN FLUORESCENT PROTEIN: EXCELLENT TOOL IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

Green fluorescent protein (GFP) from jellyfish *Aequorea victoria* is one of the most important tools in molecular and cellular biology. The protein formed from 238 aminoacids folds a tertiary structure specific for it - β -can. GFP earns its fame among others due to its nontoxicity for cell, so it allows in vivo studies. Thanks to mutagenesis in the protein structure, many forms with different characteristics and usage were constructed.

Extensive applications of GFP may be divided into two major groups. The first uses GFP as a fluorescence tag to detect gene expression in vivo and display tagged protein localization within the cell or cell compartments. The second uses GFP as a molecular indicator, for example for the monitoring of molecular interactions, the detection of metals and salts, the determination of redox potencial or pH measurement.

Key words: GFP, fluorescence, fluorescent tag, biosensor, chromophore, absorbance and excitation spectra

3. ÚVOD

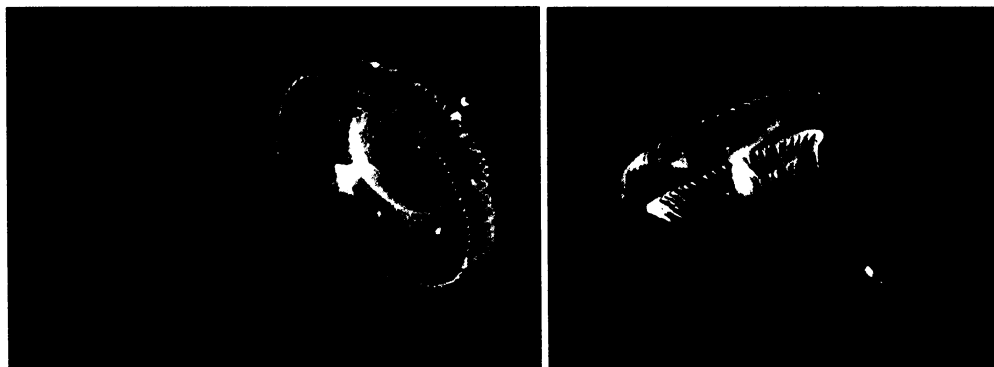
Za posledních 14 let se GFP stal z relativně obskurního proteinu jedním z nejvíce prozkoumaných proteinů v buněčné biologii a biochemii. Gen pro zelený fluorescenční protein („green fluorescent protein“ neboli GFP) z medúzy *Aequorea victoria* zapříčinil revoluci v mnoha oblastech buněčné a molekulární biologie. Jeho hlavní výhodou je, že pro svoje sbalení a fluorescenci nepotřebuje žádné speciální kofaktory, a tím pádem může být použit v rozmanité škále buněčných kultur. Většinou také neznamená výrazné nebezpečí pro buňku, která ho produkuje, což umožňuje její studium in vivo.

V této práci se zaměřím především na široké spektrum využití jmenovaného proteinu a shrnutí nejčastěji používaných metodik práce s tímto proteinem.

4. HISTORIE GFP

Fluorescenční proteiny se nacházejí v různých zástupcích kmene žahavců (*Cnidaria*). Popsány jsou například v medúzách (*Scyphozoa*) rodů *Aequorea*, *Obelia* a *Phialidium* nebo v korálech (*Anthozoa*) rodu *Renilla* (Morin a Hastings 1971; Ward a Cormier 1979). V buněčné a molekulární biologii se však skoro výhradně používají GFP a RFP (červený fluorescenční protein) z korálu *Discosoma* (Matz et al., 1999).

Zelený fluorescenční protein (GFP) je znám už několik desetiletí. Poprvé byl nalezen ve fotoorgánech medúzy *Aequorea victoria* (Obr. 1). Zde se společně s proteinem aequorinem podílí na její chemiluminiscenci (Shimomura et al., 1962). Aequorin vyzařuje modré světlo s emisním maximem na vlnové délce asi 470nm, což je blízko jednoho z absorpčních maxim GFP. Ten toto modré světlo přijímá a pohlcenou energii vyzařuje v zelené části spektra, přičemž excitační vrchol je v 508 nm (Johnson et al., 1962).



Obrázek č. 1: *Aequorea victoria* (Finet a Lesage, 2005; Oertner, 2006)

RFP, s excitačním a emisním maximem v 558 nm a 583 nm, září v červené oblasti spektra (Matz et al., 1999), čímž se stává vhodným doplněním wtGFP (wild-type GFP) a jeho různých odvozených forem. V odborných pracích bývá červený fluorescenční

protein nejčastěji označován nikoliv zkratkou RFP („red fluorescent protein“), nýbrž svým komerčním názvem DsRed.

První krystalografická studie wtGFP byla provedena v 70. letech minulého století (Morise et al., 1974), první difrakční modely pocházejí z konce 80. let (Perozzo et al., 1988). K jeho masovému využívání v buněčné a molekulární biologii došlo však mnohem později. Nejprve byla popsána primární struktura GFP (Prasher et al., 1992), následně se podařilo naklonovat jeho cDNA kopii do bakterie *Escherichia coli* (Chalfie et al., 1994). Tento úspěch se stal zlomovým okamžikem pro využití ve vědě, protože se tak dokázalo, že GFP nepotřebuje žádné zvláštní kofaktory pro svoje sbalení a funkci. Následně byla popsána struktura, nezávisle na sobě dvěma pracovními skupinami (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996a).

5. STRUKTURA GFP

Sekvence přírodního GFP z medúzy *Aequorea victoria* je 238 aminokyselin dlouhá (Prasher et al., 1992).

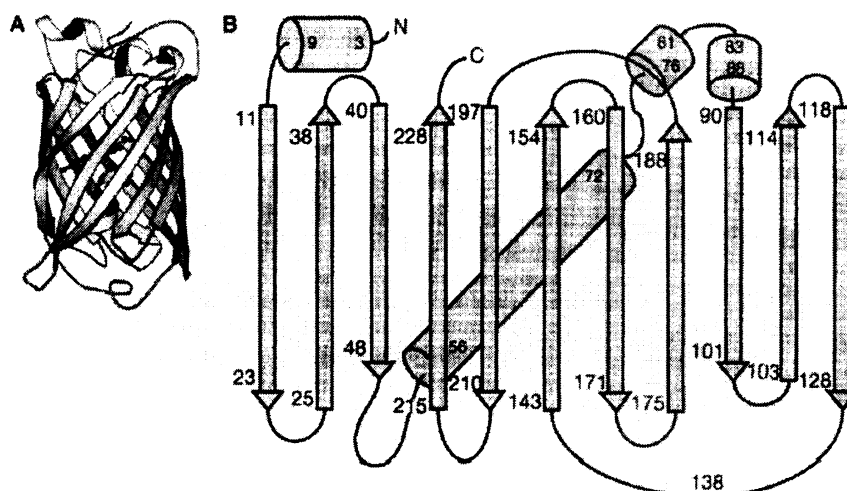
Struktura cDNA pro wtGFP:

```
1   atg agt aaa gga gaa gaa ctt ttc act gga
31  gtg gtc cca gtt ctt gtt gaa tta gat ggc
61  gat gtt aat ggg caa aaa ttc tct gtc agt
91  gga gag ggt gaa ggt gat gca aca tac gga
121 aaa ctt acc ctt aat ttt att tgc act act
151 ggg aag cta cct gtt cca tgg cca aca ctt
181 gtc act act ttc tct tat ggt gtt caa tgc
211 ttc tca aga tac cca gat cat atg aaa cag
241 cat gac ttt ttc aag agt gcc atg ccc gaa
271 ggt tat gta cag gaa aga act ata ttt tac
301 aaa gat gac ggg aac tac aag aca cgt gct
331 gaa gtc aag ttt gaa ggt gat acc ctt gtt
361 aat aga atc gag tta aaa ggt att gat ttt
391 aaa gaa gat gga aac att ctt gga cac aaa
421 atg gaa tac aac tat aac tca cat aat gta
451 tac atc atg gga gac aaa cca aag aat ggc
481 atc aaa gtt aac ttc aaa att aga cac aac
511 att aaa gat gga agc gtt caa tta gca gac
541 cat tat caa caa aat act cca att ggc gat
571 ggc cct gtc ctt tta cca gac aac cat tac
601 ctg tcc aca caa tct gcc ctt tcc aaa gat
631 ccc aac gaa aag aga gat cac atg atc ctt
661 ctt gag ttt gta aca gct gct agg att aca
691 cat ggc atg gat gaa cta tac aaa
```

Aminokyselínová sekvence wtGFP:

MSKGEELFTG	VVPVLVELDG	DVNGQKFSVS	GEGEDATYG	KLTLNFICTT
1	11	21	31	41
GKLPVPWPTL	VTFFSYGVQC	FSRYPDHMKQ	HDFFKSAMPE	GYVQERTIFY
51	61	71	81	91
KDDGNYKTRA	EVKFEGDTLV	NRIELKGIDF	KEDGNILGHK	MEYNYNSHNV
101	111	121	131	141
YIMGDKPKNG	IKVNFKIRHN	IKDGSVQLAD	HYQQNTPIGD	GPVLLPDNHY
151	161	171	181	191
LSTQSALSKD	PNEKRDHMIL	LEFVTAARIT	HGMDELYK	
201	211	221	231	

Protein je tvořen jedenácti β -vlákný vytvářecími β -barely, s α -helixem procházejícím skrz barely. Chromofor je napojen na α -helix a je skryt téměř uprostřed barely. Tato struktura, specifická pro GFP, se nazývá „ β -can“, česky také β -soudek (Obr. 2) (Ormö et al., 1996; Yang et al., 1996a). GFP má velikost 27-30 kDa v závislosti na izotypu proteinu (Arun et al., 2005).

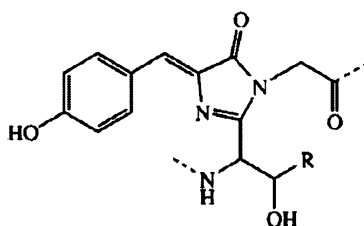


Obrázek č. 2: A) Schematický náčrt 3D-struktury pro molekulu GFP. B) Schematický náčrt kostry GFP, s vyznačenými jednotlivými vlákny proteinu (Ormö et al., 1996).

6. CHROMOFOR GFP

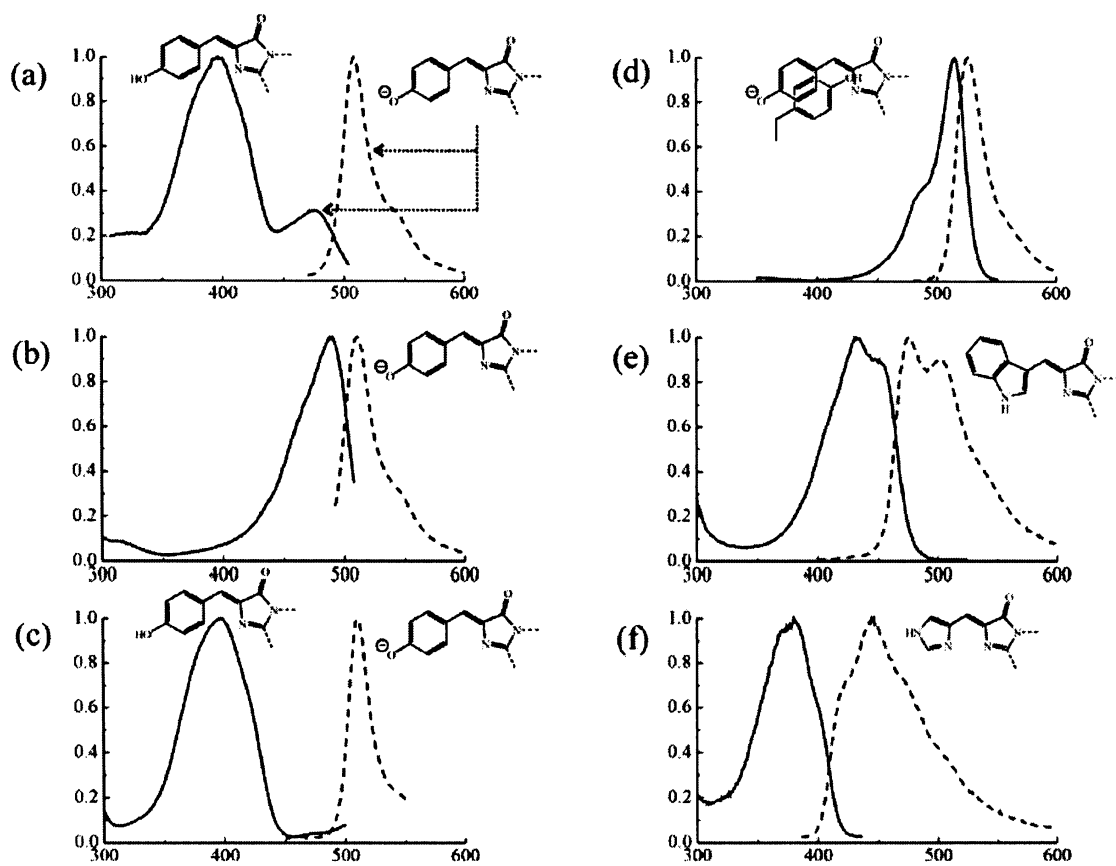
Chromofor wtGFP tvoří p-hydroxybenzylideneimidazolinone, který je formován ze zbytků aminokyselin řetězce 65-67, což jsou konkrétně Serin-Tyrosin-Glycin (Obr. 2) (Shimomura et al., 1979; Cody et al., 1993). Pro správné složení chromoforu je třeba molekuly kyslíku (Inouye a Tsuji, 1994; Heim et al., 1994). Molekula wtGFP (Obr. 3) má dva absorpční vrcholy, vyšší v 395 nm a nižší v 475 nm. V normálních podmínkách excitace v 395 nm dává emisní vrchol pro vlnovou délku 508 nm a excitace v 475 nm pro 503 nm (Heim et al., 1994).

Na vlastnosti chromoforu má vliv velké množství aminokyselinových zbytků. Mezi nimi jsou zvláště důležité Gln69, Arg96, His148, Thr203, Ser205, a Glu222 (Tsien, 1998).



Obrázek č. 3.: Molekula p-hydroxybenzylideneimidazolinone (Tsien, 1998).

Varianty GFP lze rozdělit do sedmi skupin, podle způsobu formování jejich chromoforu. Může ho tvořit: 1) směs neutrálního fenolu a anionického fenolátu (wtGFP), 2) fenolátový anion (eGFP), 3) neutrální fenol (pH citlivé varianty GFP), 4) fenolátový anion s umístěným π -elektronovým systémem (žluté fluorescenční proteiny), 5) indol (azurové fluorescenční proteiny), 6) imidazol (modré fluorescenční proteiny), 7) fenyl (Obr. 4). Skupiny 1-4 jsou odvozeny od polypeptidu tyrosinu na pozici 66, zatímco skupiny 5-7 postupně od tryptofanu, histidinu a fenylalaninu na této pozici (Tsien 1998).



Obrázek č. 4: Nákres šesti hlavních variant chromoforů GFP s typickým fluorescenčním spektrem (plnou čarou absorpční a přerušovanou čarou excitační spektrum): (a) wtGFP, (b) eGFP, (c) GFPuv, (d) YFP, (e) CFP a (f) BFP (Tsien 1998).

7. MODIFIKACE GFP

Ve chvíli, kdy se plně ukázala užitečnost wtGFP pro biologické aplikace, pokoušeli se vědci z celého světa upravit tento protein tak, aby lépe vyhovoval kladeným nárokům.

První úprava GFP byla nevědomky udělána hned u prvního klonování, a to mutace Q40R, což byla nejspíše chyba PCR (Chalfie et al., 1994). Později byla tato chyba u některých izoforem odstraněna, ale u některých zůstala.

Úprav molekuly wtGFP bylo provedeno mnoho, proto zde zmíním jen ty nejdůležitější. Největší význam má mutace S65T (serin za threonin), která podporuje ionizaci chromoforu, což má za následek zvýšení jasnosti fluorescence a také způsobuje rychlejší sbalení proteinu (Heim et al., 1995). Další významnou mutací je F64L (fenylalanin za leucin), která způsobuje lepší sbalení proteinu ve 37 °C (Cormack et al., 1996). Tyto mutace se staly základem pro jednu z nejpoužívanějších variant, a to eGFP („enhanced GFP“) (F64L/S65T) (Yang et al., 1996b).

Mutacemi v tripeptidu chromoforu a jeho okolí bylo dosaženo různých barevných změn spekter proteinu (Obr. 5) (Tab. 1). Kromě původní zelené barvy tak v současnosti existují i varianty modré (BFP), žluté (YFP) a azurové (CFP) (Tab. 1) (Tsien, 1998).

Pro lepší expresi genu GFP (a jeho variant) v různých organismech bylo třeba udělat několik úprav. V rostlinách je nezbytné upravit původní sekvenci tak, aby následně nedocházelo ke kryptickému sestřihu (Haseloff et al., 1997). Dále byly také upraveny kodóny tak, aby odpovídaly požadavkům savčích buněk (Zolotukhin et al., 1996; Yang et al., 1996b) nebo patogenní kvasince *Candida albicans* (Cormack et al., 1997). Další důležitou úpravou GFP pro savčí buňky bylo přidání ribosóm-vázacího místa, známého též jako

Kozakova sekvence (Kozak, 1989), jež je optimální pro zahájení translace.



Obrázek č. 5: Rozmanitost barevných variant dokumentuje tato agarová plotna porostlá bakteriemi, které exprimují 8 různých barev fluorescenčních proteinů (<http://www.tsienlab.ucsd.edu/>).

Třída	Protein	Vytvořeno v laboratoři (reference)	Excitace (nm)	Emise (nm)	pKa	Oligomerizace
Žluto-zelený	mCitrinei	Tsien (16,23)	516	529	5.7	Monomer
	Venus	Miyawaki (1)	515	528	6.0	slabý dimer
	YPetg	Daugherty (2)	517	530	5.6	slabý dimer
Zelený	EYFP	Invitrogen (18)	514	527	6.9	slabý dimer
	Emeraldg	Invitrogen (18)	487	509	6.0	slabý dimer
	EGFP	Clontech	488	507	6.0	slabý dimer
Azurový	CyPet	Daugherty (2)	435	477	5.0	slabý dimer
	mCFPmm	Tsien (23)	433	475	4.7	monomer
	Ceruleang	Piston (3)	433	475	4.7	slabý dimer
UV-excitovaný zelený	T-Sapphireg	Griesbeck (6)	399	511	4.9	slabý dimer

Tabulka č. 1: Přehled vlastností nejlepších komerčně dostupných barevných variant wtGFP (Shaner et al., 2005).

8. VYUŽITÍ GFP

Přestože uplynulo pouze 14 let od zahájení éry využití GFP v buněčné a molekulární biologii, široké rozpětí aplikací snad nezná hranic. Využití GFP v buněčné a molekulární biologii se dá velmi zjednodušeně rozdělit do dvou skupin. Jedna velká skupina postupů je založena na značení proteinů fluorescenčními značkami, zatímco druhá sleduje změny GFP v závislosti na podmínkách, ve kterých se molekula nachází (biosenzory).

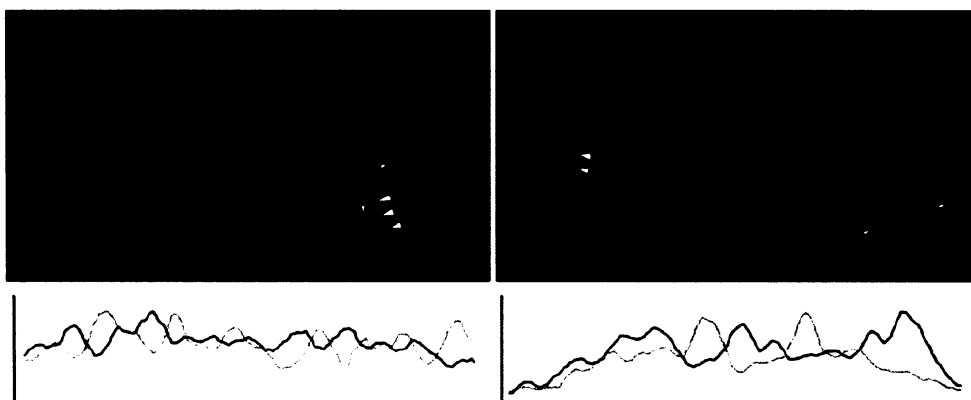
8.1. Fluorescenční značky

Nejpopulárnější aplikací GFP je jeho využití jako fluorescenční značky pro zjištění lokalizace daného proteinu. Využívá se pro sledování pohybu proteinu v individuální buňce nebo pro značení organel a buněčných kompartmentů, v některých případech ale také pro značení celých orgánových systémů nebo celých organismů.

GFP je velmi účinným markerem při zjišťování lokalizace proteinu našeho zájmu. Například jsme jej přímo v naší laboratoři využili při analýze lokalizace proteinů Ato 1,2 a 3, které hrají důležitou roli při produkci amoniaku u kvasinkových kolonií. Pomocí GFP značky bylo určeno, že dva z těchto proteinů (Ato1p-GFP, Ato3p-GFP) jsou lokalizované na cytoplasmatické membráně v raftových shlucích, zatímco třetí (Ato2p-GFP) je na membráně rovnoměrně rozmístěn (Řičicová et al., 2007). Práce, zabývající se membránovými rafty jsou obecně pěkným příkladem využití GFP-značených fuzních proteinů. Značení různých proteinů pomocí dvou různých variant GFP ukázalo na existenci dvou rozdílných typů raftů (Obr. 6) (Malínská et al., 2003; Grossmann et al., 2006).

Pomocí GFP byly značeny také všechny hlavní buněčné kompartmenty, například: plasmatická membrána (Malínská et al., 2003; Řičicová et al., 2007), jádro (Seibel et al., 2007; Helber a Requena, 2008), endoplazmatické retikulum (Presley et al., 1997; Hirschberg et al., 1998), Golgiho aparát (Presley et al., 1997; Hirschberg et al., 1998), mitochondrie (León et al., 2005; Davids et al., 2006), peroxizomy (Horiuchi et al., 2001; Nenicu et al., 2007), vakuoly (Kim et al., 1999; Mitsuhashi et al., 2000), sekreční váčky (Hirschberg et al., 1998; Toomre et al., 1999; Williams a Pessin, 2008), chloroplasty (Yang et al., 2006) nebo fagozomy (Maniak et al., 1995).

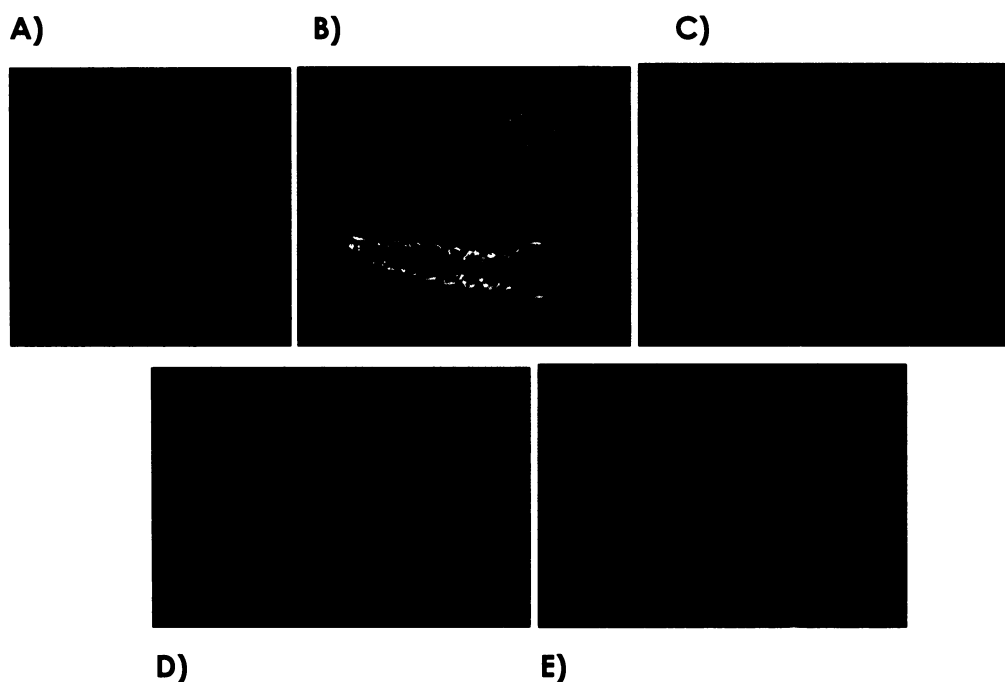
Při vytváření transgenních mnohobuněčných organismů se značí buď požadované orgánové soustavy, nebo celý živočich (Obr. 7).



Obrázek č. 6: GFP-značené membránové rafty: dva membránové proteiny značené různými fluorescenčními proteiny (zelený a červený). Pokud by oba proteiny měly stejnou lokalizaci, výsledný signál by byl žlutý. Obrázek ale ukazuje, že každý z proteinů je lokalizován v jiné části membrány (Malínská et al., 2003).

GFP se uplatňuje i v dalších oblastech, například v ekologii při sledování mykorrhizy v kořenech rostlin pomocí GFP-značených kultur hub (Gorfer et al., 2007), při sledování tvorby bakteriálních biofilmů (Tolker-Nielsen et al., 2000) nebo při studiu horizontální přenosu

genů v přírodě (Nancharaiyah et al., 2003). Fluorescenční proteiny poskytují velmi vítaný nástroj pro mikrobiální ekologii (Larrainzar et al., 2005).



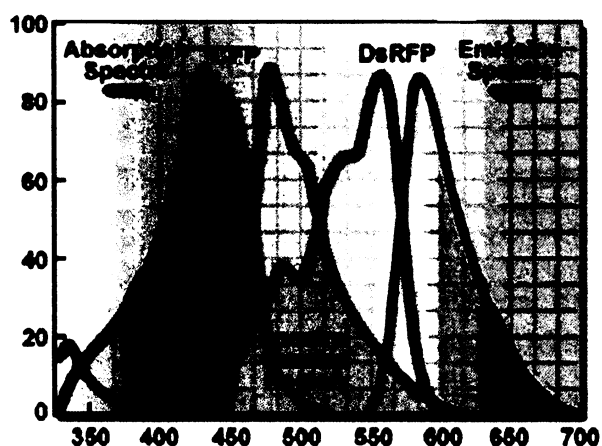
Obrázek č. 7: A) GFP-značený protein v krysím hippokampálním neuronu (<http://www.greenspine.ca/en/framed.html>); B) GFP-značené gonády u larev komárů (<http://www.ic.ac.uk/P6929.htm>); C) GFP-značená prasata (<http://news.bbc.co.uk/2/hi/asia-pacific/4605202.stm>); D) umístění GFP-značených tukových těles v dospělci mouchy (<http://www.dkfz.de/en/signal-transduction-cancer/index.html>); E) GFP značená myš (www.conncoll.edu).

GFP se dá také dobře použít při sledování genové exprese (Lissemore et al., 2000; Daelemans et al., 2001), avšak toto sledování má několik nevýhod. GFP je v důsledku své struktury velmi odolný vůči degradaci v buňce a dlouho v ní zůstává i po degradaci s ním fúzovaného proteinu (Arai et al., 2001). Proto je při tomto typu experimentů vždy velmi důležité, provést velké množství kontrol, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. V neposlední řadě existují další metody

pro sledování genové exprese (například Western blotting), které lze paralelně provést.

8.2. Biofyzikální metody

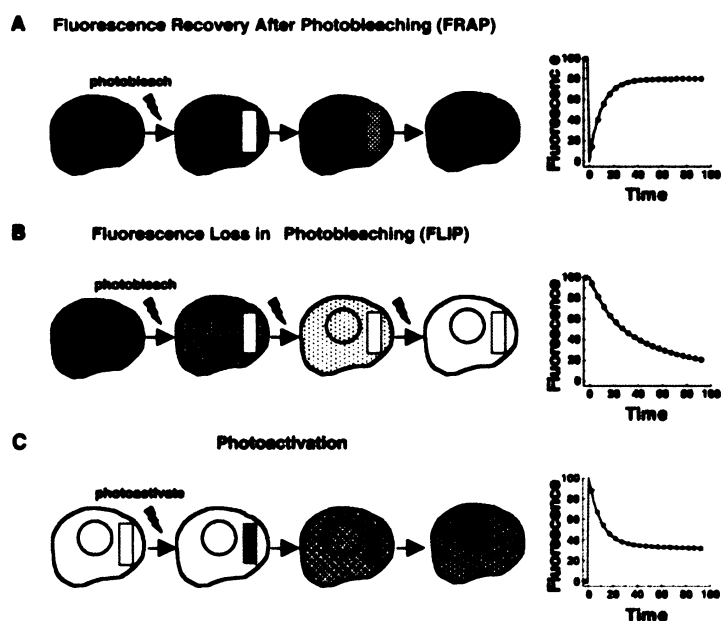
Fluorescenční rezonanční přenos energie („fluorescence resonance energy transfer“ - FRET) je metoda určená na sledování molekulových interakcí ve vzdálenosti kolem 1-10 nm (Takanishi et al., 2006). Vývoj různých barevných forem proteinů GFP znamenal obrovské usnadnění pro použití FRETu při studiu v živých buňkách. FRET je založen na energetickém přenosu mezi dvěma chromofory. Dárcovský chromofor (donor) je schopen ve svém excitovaném stavu přenést energii, pomocí nezářivého, dalekonosného, dipól-dipól spojení, na příjemce (akceptor) (Obr. 8).



Obrázek č. 8: Schematický obrázek spekter dvou fluorescenčních molekul, které tvoří pár pro aplikaci FRET (<http://www-ipcms.u-strasbg.fr/spip.php?article1144>).

První vhodnou dvojicí chromoforů se staly BFP (donor) a GFP s fenolátovým aniontem - například eGFP - (akceptor) (Shimomura,

1998). V současnosti se asi nejvíce využívána dvojice CFP (donor) a YFP (akceptor) (Shimomura, 1998; Takanishi et al., 2006). V poslední době se stále častěji používá i dvojice eGFP (donor) a DsRFP (akceptor) (Yang et al., 2005).



Obrázek č. 9: Kinetické mikroskopické techniky: (A) FRAP, oblast buňky je selektivně a intenzivně ozářena až do vybělení fluorescenčních molekul. Poté se sleduje obnovení fluorescence ve vybělené oblasti. (B) FLIP, oblast buňky je opakovaně vybělována. Pohyb fluorescenčních molekul do této oblasti má za následek postupný úbytek fluorescence. (C) Fotoaktivace, vybraná oblast je ozářena a začne fluoreskovat. Následně se sleduje pohyb zářících molekul ven z oblasti skrz buňku. (Lippincott-Schwartz a Patterson, 2003).

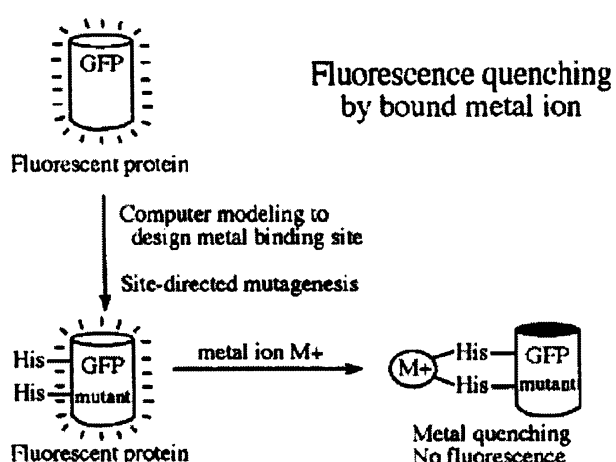
Metody fluorescenčního zobrazování jsou nepostradatelné pro studium lokalizace a chování GFP-značených proteinů. Jednou z nejvýznamnějších je 4D-mikroskopie a to především obnovení fluorescence po vybělení („fluorescence recovery after photobleaching“ - FRAP), ztráta fluorescence vlivem vybělování („fluorescence loss in photobleaching“ - FLIP) a fluorescenční korelační

spektroskopie („fluorescence correlation spectroscopy“ - FCS) (Obr. 9). Při těchto technikách nám data naměřená z celé buňky poskytují prostorové a časové informace o změnách a rozmístění značených proteinů během doby pokusu.

8.3. Biosenzory

Využití GFP jako biosenzoru se v poslední době ukazuje být velmi perspektivním směrem. Při tvorbě biosenzorů se uplatňují dva postupy. První a jednodušší je navázat GFP na protein, který je v buňce produkován vlivem přítomnosti sledované látky v okolí. Takto například byly vytvořeny biosenzory na zjišťování toluenu a příbuzných sloučenin (Li et al., 2008) nebo sledování oxidativního stresu v *Saccharomyces cerevisiae* (Jayaraman et al., 2005).

Druhým způsobem je mutace GFP, taková, aby molekula vlivem okolních podmínek měnila svoje absorpční nebo emisní spektrum. Takto byly vytvořeny varianty citlivé na pH, redukčně-oxidační potenciál nebo koncentraci různých iontů (Obr. 10).

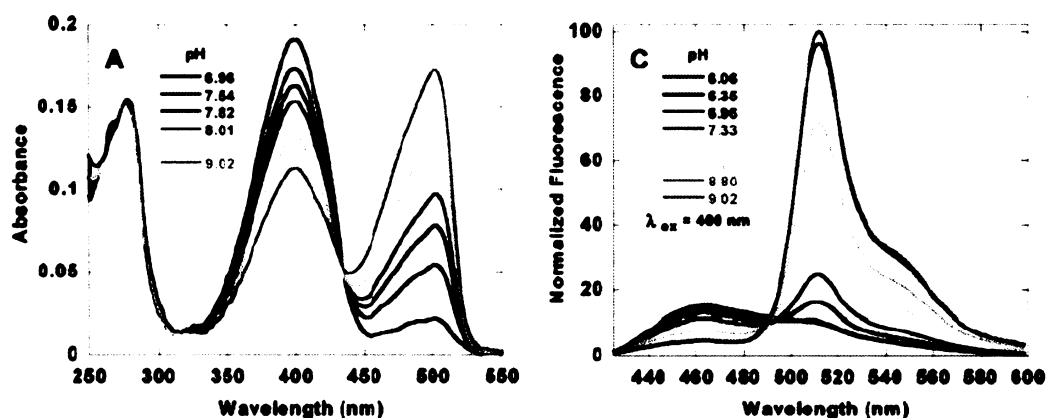


Obrázek č. 10: Schéma jedné z možností, jak vytvořit GFP-biosenzor s citlivostí na koncentraci kovových iontů (Richmond et al., 2000).

Mezi biosenzory citlivé na přítomnost iontů bych zahrnul různé senzory sledující koncentraci například vápenatých iontů (Romoser et al., 1997; Miyawaki et al., 1999), solí, třeba chloridového aniontu (Jayaraman et al., 2000) nebo kovů, či detekující kationty mědi a zinku (Richmond et al., 2000; Barondeau et al., 2001).

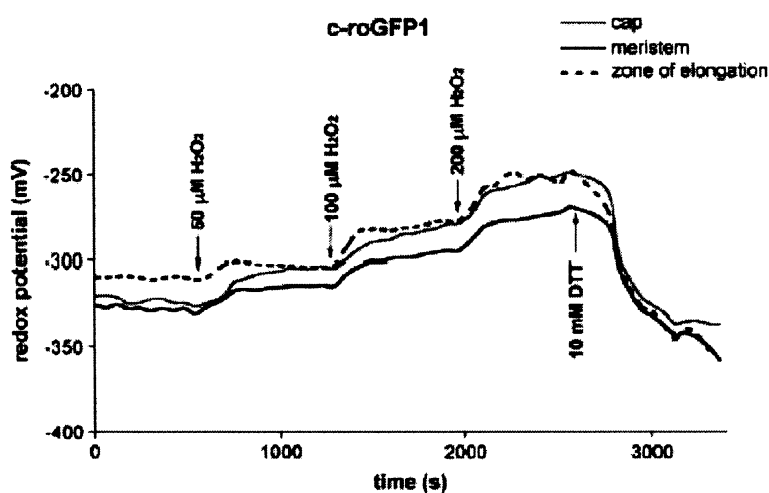
První takovýto senzor byl vytvořen za účelem sledování koncentrace Ca^{2+} v buňce. Spojením GFP a vápník vázajícího proteinu – calmodulinu, vznikl senzor reagující na koncentraci vápníku, nazývaný se cameleon (Romoser et al., 1997; Miyawaki et al., 1999). Při tvorbě senzorů citlivých na přítomnost kovových iontů musíme mít na zřeteli jejich nespecifitu. Například senzor na sledování koncentrace Zn^{2+} zároveň váže také ionty Cu^{2+} .

Už dříve bylo zjištěno, že wtGFP mění strukturu svého spektra v závislosti na okolním pH (Tsien, 1998). Změnami v okolí chromoforu, byly vytvořeny mutanty, které se dají využít jako buněčné měřiče pH (Obr. 11) (Miesenböck et al., 1998; Hanson et al., 2002). Tyto mutanty dostaly jména pHluorin (Miesenböck et al., 1998) nebo deGFP (Hanson et al., 2002).



Obrázek č. 11: Vliv pH na spektrum fluorescenčního proteinu deGFP1. (A) Závislost absorbance na vlnové délce pro různé hodnoty pH. (C) Závislost fluorescence na vlnové délce pro různé hodnoty pH. (Hanson et al., 2002).

Výměnou aminokyselinových zbytků odkrytých na povrchu GFP za cysteiny tak, aby mohly tvořit disulfidické můstky, bylo dosaženo citlivosti GFP k redukčně-oxidačnímu potenciálu v jeho okolí. Takto vzniklé varianty byly pojmenovány roGFP (Hanson et al., 2004). Tyto varianty byly zatím použity především v živočišných buňkách (Hanson et al., 2004; Dooley et al., 2004) nebo v rostlině *Arabidopsis thaliana* (Obr. 12) (Jiang et al., 2006; Mayer et al., 2007).



Obrázek č. 12: Změny cytosolického redoxního potenciálu v různých částech kořenorostliny *Arabidopsis* způsobené vlivem přidání H₂O₂ a následně DTT. Šipky ukazují čas přidání těchto látek (Jiang et al., 2006).

9. NEŠKODNÝ GFP?

Využívání GFP a od něho odvozených variant se zakládá na předpokladu, že tato bílkovina není pro buňku zásadně škodlivá, což nemusí být vždycky pravda. Při vytváření fúzních proteinů značených GFP je velmi důležité pečlivě naplánovat jeho umístění. U proteinů, které jsou například membránovými receptory, se GFP často nedá navázat na C nebo N konec bílkoviny, protože by taková vazba znemožnila správnou funkci receptoru. U jiných proteinů případné připojení na špatné místo může mít za následek defektní složení bílkoviny. Dalším úskalím, pokud GFP v buňce exprimujeme z cizího promotoru, je možnost zahlcení buněčného proteosyntetického aparátu. Použijeme-li silný promotor, buňka sice bude produkovat velké množství GFP, ale může mít menší kapacitu pro tvorbu vlastních potřebných bílkovin, což může mít za následek její nestandardní chování. Oba tyto problémy však nejsou nepřekonatelné a správným plánováním se daří tyto jevy eliminovat.

Postupně se také v některých studiích ukazuje, že GFP samo o sobě nemusí být tak „nevinný“, jak se předpokládalo. Exprese GFP může způsobovat apoptózu značených buněčných linií (Liu, 1999), zhoršení aktin-myosinové vazby v srdečním svalu (Agbulut et al., 2006), rozšířenou kardiomyopatoii u myši značených GFP (Huang et al., 2000), neuropatologii při koexpresi s β -galaktooxidázou (Krestel et al., 2004). Protein také může mít negativní vliv na polyubiquitinaci (Beans et al., 2006) a způsobuje snížení fotosyntézy u listů rostlin značených GFP (Zhou et al., 2005).

10. ZÁVĚR

GFP je v současnosti jedním z nejvýznamnějších proteinů, se kterými moderní věda pracuje. Jedná se o zajímavou molekulu s řadou velmi neobvyklých vlastností, které ji dělají tak přitažlivou a užitečnou pro současný vědecký výzkum.

Tematika týkající se GFP je nesmírně široká a není v možnostech této práce ji celou popsat. Cílem práce proto bylo stručně shrnout aspoň jednu její část, kterou je využití GFP v molekulární a buněčné biologii a nastínit široké spektrum možností, které využití těchto fluorescenčních proteinů skýtá. Dalším cílem bylo ukázat, že problematika možností využití fluorescenčních proteinů v buněčné biologii zdaleka není ještě vyčerpána. Vybranými metodami se snažím přiblížit moderní trendy ve využití tohoto proteinu v molekulární a buněčné biologii.

V minulosti bylo nejvíce prací vytvořených a publikovaných v souvislosti s GFP zaměřeno na jeho využití jako molekulární značky, s účelem sledování genové exprese a lokalizace proteinů. V budoucnu lze očekávat velký rozmach metod založených na využití GFP jako biosenzoru nebo aplikací na bázi FRETu. Například pH a redoxně citlivé mutanty GFP se jeví jako velmi slibné pro další výzkum. Stále častěji se využívají také různé barevné varianty proteinu. A lze si jistě představit, že budoucí rozvoj přinese i další, nové způsoby užití GFP, o nichž zatím nic nevíme. Rovněž lze očekávat rozmach využití fluorescenčních proteinů v nových oblastech (např. mikrobiální ekologii).

11. SEZNAM LITERATURY

Agbulut, O., Coirault, C., Niederländer, N., Huet, A., Vicart, P., Hagège, A., Puceat, M., Menasché, P. (2006): GFP expression in muscle cells impairs actin-myosin interactions: implications for cell therapy. *Nat. Methods* 3:331.

Arai, K., Ohkuma, S., Matsukawa, T., Kato, S. (2001): A simple estimation of peroxisomal degradation with green fluorescent protein – an application for cell cycle analysis. *FEBS Lett.* 507(2):181–6.

Baens, M., Noels, H., Broeckx, V., Hagens, S., Fevery, S., Billiau, A. D., Vankelecom, H., Marynen, P. (2006): The dark side of EGFP: defective polyubiquitination. *PLoS ONE.* 1:e54.

Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G., Ward, W. W. (1993): Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* 32(5):1212–8.

Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., Brown, A. J. (1997): Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (pt2):303–11.

Cormack, B. P., Valdivia, R. H., Falkow, S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene.* 173(1 Spec No):33–8.

Daelemans, D., De Clercq, E., Vandamme, A. M. (2001): A quantitative GFP-based bioassay for the detection of HIV-1 Tat transactivation inhibitors. *J. Virol. Methods* 96(2):183–8.

Dauids, L. M., Corrigall, A. V., Meissner, P. N. (2006): Mitochondrial targeting of human protoporphyrinogen oxidase. *Cell Biol. Int.* 30(5):41626. Epub 2006 Mar 6.

Dooley, C. T., Dore, T. M., Hanson, G. T., Jackson, W. C., Remington, S. J., Tsien, R. Y. (2004): Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279(21):22284–93. Epub 2004 Feb 25.

Finet, B., Lesage, F., (2005): Feature Article: Colors by the Thousands – Light, Colors and Corals, Part I. *Advanced Aquarist's Online Magazine.*

Gorfer, M., Klaubauf, S., Bandian, D., Strauss, J. (2007): *Cadophora finlandia* and *Phialocephala fortinii*: *Agrobacterium*-mediated transformation and functional GFP expression. *Mycol. Res.* 111(Pt 7):850–5. Epub 2007 May 18.

Grossmann, G., Opekarova, M., Novakova, L., Stolz, J., Tanner, W. (2006): Lipid raft-based membrane compartmentation of a plant transport protein expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5(6):945–53.

Hanson, G. T., Aggeler, R., Oglesbee, D., Cannon, M., Capaldi, R. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J. (2004): Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279(13):13044–53. Epub 2004 Jan 13.

Hanson, G. T., McAnaney, T. B., Park, E. S., Rendell, M. E., Yarbrough, D. K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S. G., Montrose, M. H., Remington, S. J. (2002): Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry* 31;41 (52):15477–88.

Hanson, G. T., McAnaney, T. B., Park, E. S., Rendell, M. E., Yarbrough, D. K., Chu, S., Xi, L., Boxer, S. G., Montrose, M. H., Remington, S. J. (2002): Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. 1. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry*. 41 (52):15477–88.

Haseloff, J., Siemering, K. R., Prasher, D. C., Hodge, S. (1997): Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:2122–27.

Heim, R., Cubitt, A. B., and Tsien, R. Y. (1995): Improvement of green fluorescent protein by site-directed mutations. *Nature* 373: 663–664.

Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994): Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12501–12504.

Helber, N., Requena, N. (2008): Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to a nuclear localization signal in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol.* 177(2):537–48. Epub 2007 Nov 7.

Hirschberg, K., Miller, C. M., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. D., Phair, R. D., Lippincott-Schwartz, J. (1998): Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* 143(6):1485–503.

Horiguchi, H., Yurimoto, H., Goh, T., Nakagawa, T., Kato, N., Sakai, Y. (2001): Peroxisomal catalase in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*: transport efficiency and metabolic significance. *J. Bacteriol.* 183(21):6372–83.

Huang, W. Y., Aramburu, J., Douglas, P. S., Izumo, S. (2000): Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat. Med.* 6:482–483.

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148):802–5.

Inouye, S., Tsuji, F. (1994): Evidence for redox forms of the Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters* 351 (1994) 211–214.

Jayaraman, M., Radhika, V., Bamne, M. N., Ramos, R., Briggs, R., Dhanasekaran, D. N. (2005): Engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain BioS-OS1/2, for the detection of oxidative stress. *Biotechnol. Prog.* 21(5):1373–9.

Jayaraman, S., Haggie, P., Wachter, R. M., Remington, S. J., Verkman, A. S. (2000): Mechanism and cellular applications of a green fluorescent protein-based halide sensor. *J. Biol. Chem.* 275(9):6047–50.

Jiang, K., Schwarzer, C., Lally, E., Zhang, S., Ruzin, S., Machen, T., Remington, S. J., Feldman, L. (2006): Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 141(2):397–403.

Johnson, F. H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L. C., Reynolds, G., and Waters, J. R. (1962): Quantum efficiency of Cybridina luminescences, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60:85–103.

Kim, J., Dalton, V. M., Eggerton, K. P., Scott, S. V., Klionsky, D. J. (1999): Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol. Biol. Cell* 10(5):1337–51.

Kozak, M. (1989): The scanning model for translation: an update. *J. Cell Biol.* 108:229–41.

Krestel, H. E., Mihaljevic, A. L., Hoffman, D. A., Schneider, A. (2004): Neuronal coexpression of EGFP and beta-galactosidase in mice causes neuropathology and premature death. *Neurobiol. Dis.* 17:310–318.

Larrainzar, E., O'Gara, F., Morrissey, J. P., (2005): Applications of autofluorescent Proteins for In Situ Studies in Microbial Ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:257–77.

Léon, S., Touraine, B., Briat, J. F., Lobréaux, S. (2005): Mitochondrial localization of *Arabidopsis thaliana* Isu Fe-S scaffold proteins. *FEBS Lett.* 579(9):1930–4.

Li, Y. F., Li, F. Y., Ho, C. L., Liao, V. H. (2008): Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environ. Pollut.* 152(1):123–9. Epub 2007 Jun 20.

Lippincott-Schwartz, J., Patterson, G. H. (2003): Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300(5616):87–91.

Lissemore, J. L., Jankowski, J. T., Thomas, C. B., Mascotti, D. P., deHaseth, P. L. (2000): Green fluorescent protein as a quantitative reporter of relative promoter activity in *E. coli*. *Biotechniques* 28(1):82–4, 86, 88–9.

Liu, H. S., Jan, M. S., Chou, C. K., Chen, P. H., Ke, N. J. (1999): Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260:712–717.

Malínská, K., Malínský, J., Opekarová, M., Tanner, W. (2003): Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Mol. Biol. Cell* 14(11):4427–36.

Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., Gerisch, G. (1995): Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag. *Cell* 83(6):915–24.

Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L., Lukyanov, S. A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17(10):969–73.

Meyer, A. J., Brach, T., Marty, L., Kreye, S., Rouhier, N., Jacquot, J. P., Hell, R. (2007): Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J.* 2007 Dec; 52(5):973–86. Epub 2007 Sep 22.

Miesenböck, G., De Angelis, D. A., Rothman, J. E. (1998): Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* 394(6689):192–5.

Mitsuhashi, N., Shimada, T., Mano, S., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. (2000): Characterization of organelles in the vacuolar-sorting pathway by visualization with GFP in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol.* 41(9):993–1001.

Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., Tsien, R. Y. (1999): Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999 Mar 2;96(5):2135–40.

Morin, J. G., Hastings, J. W. (1971): Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77(3):305–12.

Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H., Winant, J. (1974): Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* 13:2656–62.

Nancharaiyah, Y. V., Wattiau, P., Wuertz, S., Bathe, S., Mohan, S. V., Wilderer, P. A., Hausner, M. (2003): Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4846–52.

Nenicu, A., Lüers, G. H., Kovacs, W., David, M., Zimmer, A., Bergmann, M., Baumgart-Vogt, E. (2007): Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol. Reprod.* 77(6):1060–72. Epub 2007 Sep 19.

Oertner, T. G. (2006): The bright side of life. *Nature* 440(7082):280.

Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y., Remington, S. J. (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 1996 Sep 6;273(5280):1392–5.

Perozzo, M. A., Ward, K. B., Thompson, R. B., Ward, W. W. (1988): X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals. *J. Biol. Chem.* 263:7713–16.

Prasher, D. C., Eckenrode V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., Cormier, M. J. (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2):229–33.

Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J., Lippincott-Schwartz, J. (1997): ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389(6646):81-5.

Richmond, T. A., Takahashi, T. T., Shimkhada, R., Bernsdorf, J. (2000): Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000 Feb 16;268(2):462–5.

Romoser, V. A., Hinkle, P. M., Persechini, A. (1997): Detection in living cells of Ca^{2+} -dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J. Biol. Chem.* 272(20):13270–4.

Řičicová, M., Kučerová, H., Váchová, L., Palková, Z. (2007): Association of putative ammonium exporters Ato with detergent-resistant compartments of plasma membrane during yeast colony development: pH affects Ato1p localisation in patches. *Biochim. Biophys. Acta* 1768(5):1170–8.

Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M., Hampe, W. (2007): Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal. Biochem.* 368(1):95–9. Epub 2007 May 26.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2005): A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods* 2(12):905–9.

Shimomura, O. (1979): Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 104:220–22.

Shimomura, O., Johnson, F. H., Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59:223–39.

Takanishi, C. L., Bykova, E. A., Cheng, W., Zheng, J. (2006): GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res.* 1091(1):132–9. Epub 2006 Mar 10.

Takanishi, C. L., Bykova, E. A., Cheng, W., Zheng, J. (2006): GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res.* 1091(1):132–9. Epub 2006 Mar 10.

Tolker-Nielsen, T., Brinch, U. C., Ragas, P. C., Andersen, J. B., Jacobsen, C. S., Molin, S. (2000): Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182:6482–89.

Toomre, D., Keller, P., White, J., Olivo, J. C., Simons, K. (1998): Dual-color visualization of trans-Golgi network to plasma membrane traffic along microtubules in living cells. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1): 21–33.

Tsien, R.Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 1998. 67:509–44.

Ward, W. W., Cormier, M. J. (1979): An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* 254(3):781–8.

Williams, D., Pessin, J. E. (2008): Mapping of R-SNARE function at distinct intracellular GLUT4 trafficking steps in adipocytes. *J. Cell Biol.* 180(2):375–87.

Yang, F., Moss, L. G., Phillips, G. N. Jr. (1996a): The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14:1246–51.

Yang, J. Y., Sun, Y., Sun, A. Q., Yi, S. Y., Qin, J., Li, M. H., Liu, J. (2006): The involvement of chloroplast HSP100/ClpB in the acquired thermotolerance in tomato. *Plant Mol. Biol.* 2006 Oct;62(3):385–95. Epub 2006 Aug 16.

Yang, T.-T., Cheng, L., Kain, S. R. (1996b): Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res.* 24:4592–93.

Yang, X., Xu, P., Xu, T. (2005): A new pair for inter- and intra-molecular FRET measurement. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330(3):914–20.

Zhou, X., Carranco, R., Vitha, S., Hall, T. C. (2005): The dark side of green fluorescent protein. *New Phytol.* 168(2):313–22.

Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W. W., Guy, J., Muzyczka, N. (1996): A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol.* 70(7):4646–54.