



Białko zielonej fluorescencji (GFP) – ekologiczny marker transformacji genetycznej i narzędzie do obserwacji procesów w żywej komórce

Elwira Śliwińska

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Techniczno-Rolnicza, Bydgoszcz

Green fluorescent protein (GFP) – an ecological transformation marker and a tool for observing processes in the living cell

Summary

The green fluorescent protein (GFP) from the jellyfish *Aequorea victoria* has been extensively used as a marker of gene expression and protein targeting in intact cells and organisms. Since GFP has no toxic effect on cells and it is easy to detect, it can replace controversial transformation markers such as those for antibiotic or herbicide resistance. The protein can also be used to detect dynamic responses of signal transduction pathways, subcellular localisation of chimeric proteins, and transfection efficiency. It allows visualisation of the organelles and observation of many important cellular processes.

Key words:

fluorescence, protein localisation, organelles, transformed plants.

Adres do korespondencji

Elwira Śliwińska,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Akademia
Techniczno-Rolnicza,
ul. Kaliskiego 7,
85-796 Bydgoszcz,
e-mail:
elwira@atr.bydgoszcz.pl

1. Wstęp

Gen *gfp*, powodujący wytwarzanie białka zielonej fluorescencji (GFP – *green fluorescent protein*) pochodzi z meduzy *Aequorea victoria*. Gatunek ten przetwarza niebieską chemiluminescencję z innej, pierwotnej fotoproteiny w zieloną fluorescencję. Białko zielonej fluorescencji zostało odkryte przez Shimomura i in. w roku 1962 (1), a w roku 1974 Morise i in. (2) oczyścili je i skryś-

talizowali. Sekwencja cDNA kodująca GFP została opublikowana w 1992 r. (3), a dwa lata później Chalfie i in. (4) donieśli o możliwości uzyskania ekspresji genu *gfp* po jego przeniesieniu do innych organizmów, zarówno prokariotycznych (*Escherichia coli*) jak i eukariotycznych (*Caenorhabditis elegans*).

Białko zielonej fluorescencji zbudowane jest z 11 nici β formujących pusty cylinder, przez którego środek przechodzi helisa niosąca chromofor (usytuowany w pobliżu geometrycznego środka cylindra). Monomery białka połączone są w dimery (5,6).

GFP ma liczne zalety, które zapewniają mu przewagę nad innymi markerami optycznymi, stosowanymi w badaniach biologii komórki, takimi jak β -glukuronidaza [GUS; (7)] czy lucyferaza [LUC; (8)]. Test GUS, jakkolwiek łatwy do obserwacji, wymaga egzogenego substratu, a także utrwalenia (a zatem zniszczenia) badanej tkanki. Również test przy użyciu lucyferazy wymaga egzogenego substratu i chociaż można go przeprowadzić na żywych komórkach, to bioluminescencja jest stosunkowo słaba i wymaga skomplikowanego systemu detekcji. Ekspresja genu *gfp* natomiast może być oznaczana w rzeczywistym czasie, w żywych komórkach i organizmach, przez proste wzbudzenie za pomocą światła, nie wymaga substratu, a powstające białko nie jest toksyczne dla komórki. Niewielkie rozmiary GFP (25,9 kDa) umożliwiają konstruowanie kompleksów z innymi białkami, można je również stosować przy tworzeniu wektorów wirusowych. Światło fluorescencyjne emitowane przez białko może być wykrywane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego, cytometru przepływowego, a nawet bezpośrednio nieuzbrojonym okiem (2,9).

Białko zielonej fluorescencji wytwarzane w wyniku działania pierwotnego genu, pochodzącego z *Aequorea victoria* (typu „dzikiego”), ma jednakże kilka cech, które ograniczają jego zastosowanie, takich jak mała intensywność fluorescencji, znaczące opóźnienie między syntezą białka a wytworzeniem zdolności do fluorescencji oraz skomplikowana fotoizomeryzacja. Cechy te mogą być poprawione za pomocą mutagenезy. Dotąd powstało wiele form zmutowanych, a najczęściej wykorzystywaną jest S65T, w której seryna 65 została zamieniona na treoninę. Forma ta, w porównaniu z typem „dzikim”, emituje do stu razy więcej światła, substrat czterokrotnie szybciej ulega utlenianiu do formy świecącej, a proces wygaszania bioluminescencji przebiega znacznie wolniej (10,11).

2. GFP jako marker transformacji

Obecnie gen *gfp* jest przedmiotem zainteresowania coraz większej liczby badaczy, którzy wykorzystują go głównie jako gen reporterowy i/lub markerowy w procesie transformacji genetycznej. Możliwość stosowania *gfp* w tym procesie nabiera szczególnego znaczenia wobec kontrowersji, jakie budzi wykorzystywanie genów oporności na antybiotyki czy oporności na herbicydy jako genów markerowych. Zastąpienie tych genów przez *gfp* stwarza szansę uniknięcia potencjalnych zagro-

zeń, jakie dla organizmów żywych stanowi możliwość nabycia przez te organizmy niepożądaną odporności.

Stosowanie GFP ma także tę zaletę, że efekt transformacji jest widoczny już na bardzo wczesnych etapach kultury. Potwierdza to na przykład doświadczenie wykonane przez Panappa i in. (12), którzy poddali mikrowstrzeliwaniu zawieszoną komórek soi. Obecność białka zielonej fluorescencji była obserwowana już po upływie 1,5 godziny. Elliot i in. (13) obserwowali ekspresję *gfp* w komórkach trzciny cukrowej, tytoniu, kukurydzy i sałaty po 48 godzinach od przeprowadzenia transformacji metodą mikrowstrzeliwania.

Na podstawie dotychczas opublikowanych wyników wydaje się, że *gfp* wykazuje ekspresję u wszystkich gatunków, do których próbowano go wprowadzić (tab. 1). Najwięcej udanych prób transformacji genem *gfp* przeprowadzono u tytoniu i rzodkiewnika, które są roślinami modelowymi dla inżynierii genetycznej.

Tabela 1

Przykłady roślin wyższych, do których wprowadzono gen *gfp* za pomocą transformacji genetycznej

Roślina	Metoda transformacji	Literatura
rzodkiewnik	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mikrowstrzeliwanie elektroporacja	(14-17,43) (18) (19,20)
tytoń	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mikrowstrzeliwanie elektroporacja	(14,21-25) (13,26-28) (13,29,30)
ryż	mikrowstrzeliwanie	(31)
kukurydza	mikrowstrzeliwanie elektroporacja	(13,32) (11,13,20,33)
pszenica	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(34)
jęczmień	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(34)
owies	mikrowstrzeliwanie	(35)
trzcina cukrowa	mikrowstrzeliwanie i elektroporacja	(13)
soja	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mikrowstrzeliwanie	(36) (12)
sałata	mikrowstrzeliwanie i elektroporacja	(13)
szpinak	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	(37)
banan	mikrowstrzeliwanie	(38)
bambus	elektroporacja	(30)
cebula	mikrowstrzeliwanie	(39,40)
lilia	elektroporacja	(30)

3. Wizualizacja specyficznych tkanek roślinnych

Dzięki konstruowaniu wektorów, zawierających odpowiednie promotory, możliwe jest wywołanie ekspresji *gfp* tylko w specyficznych komórkach lub tkankach, takich jak np. komórki szparkowe, czy tkanki przewodzące. Można to obserwować w transformowanych roślinach *Arabidopsis* po zastosowaniu promotorów CoY lub KATI, specyficznych odpowiednio w stosunku do floemu i do komórek szparkowych (15). U bananowca natomiast ekspresję *gfp* w tkankach przewodzących liścia i korzenia powodowały odpowiednio promotory BT4 i BT5 (38). Po zastosowaniu promotora ZM13 i wprowadzeniu *gfp*, uzyskano jego ekspresję w ziarnach pyłku *Tradescantia paludosa* i *Nicotiana tabacum* (27). Obecność GFP stwierdzono również w łagiewkach pyłkowych.

4. Badanie dynamiki organelli komórkowych

Białko zielonej fluorescencji, po fuzji z innymi białkami, zostało wprowadzone do niemalże wszystkich struktur i organelli komórkowych, takich jak cytoszkielet, membrany plazmatyczne, retikulum endoplazmatyczne, aparat Golgiego, mitochondria, wakuole i jądro (5). Pozwala to na wizualizację tych struktur i przebiegających w nich procesów.

Tak na przykład, dzięki fuzji GFP z domeną MBD, wiążącą białka mikrotubul MAP4, obserwowano dynamikę tych struktur w dzielących się komórkach tytoniu (21). Podobnie, przeprowadzając fuzję GFP z odpowiednimi białkami, badano procesy zachodzące w mitochondriach i chloroplastach *Arabidopsis thaliana* (19). Logan i Leaver (16), po wprowadzeniu GFP do mitochondriów rzodkiewnika stwierdzili, że: 1) mitochondria nie są równomiernie rozmieszczone w cytoplazmie, 2) mają różny kształt i wielkość, 3) są strukturami wysoce dynamicznymi, zmieniającymi z dużą szybkością kształt i swoje położenie w komórce. Obserwację *in vivo* retikulum endoplazmatycznego umożliwiło włączenie do plazmidu, zawierającego *gfp*, sekwencji powodującej wprowadzenie produkowanego białka do tej struktury komórki (17,41).

Fuzja białka zielonej fluorescencji z sygnałem lokalizacji jądrowej (NLS) i β -glukuronidazą umożliwiła obserwację jądra komórkowego tytoniu (23). Stworzenie takiego kompleksowego białka, o masie molekularnej powyżej 100 kDa, spowodowało akumulację GFP wyłącznie w jądrze. Taki sam kompleks został także wprowadzony do *Arabidopsis* (15). Obserwowano różne kształty jąder, zależnie od rodzaju komórek – od kulistych w wierzchołku korzenia do wrzecionowatych w komórkach włóśnikowych. Jednocześnie po raz pierwszy zaobserwowano, że jądra w korzeniach siewek *Arabidopsis* są w ciągłym ruchu, niekiedy przemieszczając się na znaczne odległości (42). Szybkość tego ruchu zależała od rodzaju komórki i położenia jądra i wynosiła 0,3-5 $\mu\text{m}/\text{min}$. W celu ustalenia przyczyny tego ruchu traktowa-

no rośliny roztworami substancji powodujących zmiany w polimeryzacji tubulin lub aktyny, a także inhibitorami metabolizmu. Stwierdzono, że ruchy jąder wymagają energii oraz są zależne od aktyny.

5. Lokalizacja białek w komórce

GFP umożliwia także lokalizację określonych białek w komórce. Tak na przykład Mitsuda i in. (43) badali rozmieszczenie w komórce i lokalizację subkomórkową nowego typu pirofosfatazy, H^+ -PPazy, zidentyfikowanej w roślinach rzodkiewnika. Uwidaczniając badane białko poprzez fuzję z GFP, a poszczególne organelle komórkowe za pomocą barwników fluorochromowych lub przeciwciał, stwierdzono obecność H^+ -PPazy w aparatach Golgiego.

W celu sprawdzenia subkomórkowej lokalizacji białka IF_1 , hamującego syntezę ATP w komórkach cebuli, przeprowadzono jego fuzję z GFP (39). Po zwiększeniu masy molekularnej kompleksu białkowego przez dołączenie β -glukuronidazy, stwierdzono lokalizację białka IF_1 w mitochondriach. Potwierdziło to hipotezę, że białko to ma fragment N-terminalny charakterystyczny dla sygnału lokalizacji mitochondrialnej. Równolegle przeprowadzono fuzję GFP z sygnałem lokalizacji jądrowej (NLS), co spowodowało akumulację białka w jądrze komórkowym. Wprowadzenie białka zielonej fluorescencji do jądra posłużyło także do ustalenia sekwencji aminokwasów, funkcjonujących jako sygnał lokalizacji jądrowej (40). Stosując technikę PCR spowodowano delecję fragmentów DNA, odpowiedzialnych za przyłączanie poszczególnych aminokwasów białek LIM5 i LIM13 lilii, i po fuzji z genem *gfp*, wprowadzono poszczególne sekwencje do komórek cebuli. Obserwując fluorescencję GFP, zidentyfikowano sekwencję aminokwasową odpowiedzialną za lokalizację jądrową.

6. Badanie infekcji wirusowej

GFP może być także reporterem infekcji wirusowej (44). Po raz pierwszy Baulcombe i in. (45) wprowadzili gen *gfp* do wirusa roślinnego, jakim jest wirus X ziemniaka. Umożliwiło to obserwację przebiegu infekcji roślin. Dzięki fuzji białka zielonej fluorescencji z białkiem odpowiedzialnym za ruch wirusa mozaiki tytoniu, zbadano także powiązanie tego wirusa z cytoszkieletem infekowanych komórek (46).

Podsumowując należy podkreślić, że białko zielonej fluorescencji znajduje obecnie szerokie zastosowanie w wielu dziedzinach biologii, takich jak biologia komórki czy inżynieria genetyczna, i jego rola ciągle wzrasta. Jako białko nieszkodliwe dla żywych organizmów, może stanowić ekologiczny marker transformacji. Wytwarzana przez nie fluorescencja służy także do wizualizacji określonych struktur i organeli komórkowych oraz umożliwia lokalizację białek, nie wpływając na procesy ży-

ciowe badanego organizmu. Należy się spodziewać, że coraz większa liczba badaczy będzie wykorzystywała GFP w swoich pracach i dzięki temu możliwa będzie obserwacja zjawisk, które nie zostały do tej pory dokładnie zbadane.

Literatura

1. Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y., (1962), *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-239.
2. Morise H., Shimomura O., Johnson F. H., Winant J., (1974), *Biochemistry*, 13, 2656-2662.
3. Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J., (1992), *Gene*, 111, 229-233.
4. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C., (1994), *Science*, 263, 802-805.
5. Tsien R. Y., (1998), *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 509-544.
6. Yang F., Moss L. G., Phillips G. N., (1996), *Nature Biotechnology*, 14, 1246-1251.
7. Jefferson R. A., Ravanagh T. A., Bevan M. W., (1987), *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
8. Ow D. W., Wood K. V., DeLuca M., de Wet J. R., Helinski D. R., Howell S. H., (1986), *Science*, 234, 856-859.
9. Galbraith D. W., Anderson M. T., Herzenberg L. A., (1999), *Methods in Cell Biology*, 58, 315-341.
10. Cubitt A. B., Heim R., Adams S. R., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y., (1995), *Trends Biochem. Sci.*, 20, 448-455.
11. Pang S. Z., DeBoer D. L., Wan Y., Ye G., Layton J. G., Neher M. K., Armstrong C. L., Fry J. E., Hinchey M. A. W., Fromm M. E., (1996), *Plant Physiol.*, 112, 893-900.
12. Panappa T., Brzozowski A. E., Finer J. J., (1999), *Plant Cell Rep.*, 19, 6-12.
13. Elliot A. R., Campbell J. A., Dugdale B., Brettell R. I. S., Grof. C. P. L., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 707-714.
14. Boudonck K., Dolan L., Shaw J. P., (1999), *Mol. Biol. Cell.*, 10, 2297-2307.
15. Chytilowa E., Macas J., Galbraith D. W., (1999), *Ann. Bot.*, 83, 645-654.
16. Logan D. C., Leaver C. J., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 865-871.
17. Ridge R. W., Uozumi Y., Plazinski J., Hurley U. A., Williamson R. E., (1999), *Plant Cell Physiol.*, 40, 1253-1261.
18. Davis S. J., Vierstra R. D., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 36, 521-528.
19. Akashi K., Grandjean O., Small I., (1998), *FEBS Letters*, 431, 39-44.
20. Sheen J., Hwang S., Niwa Y., Kobayashi H., Galbraith D. W., (1995), *Plant J.*, 8, 777-784.
21. Granger C. L., Cyr R. J., (2000), *Planta*, 210, 502-509.
22. Grebenok R. J., Lambert G. M., Galbraith D. W., (1997), *Plant J.*, 12, 685-696.
23. Grebenok R. J., Pierson E., Lambert G. M., Gong F.-C., Afonso C. L., Haldeman-Cahill R., Carrington J. C., Galbraith D. W., (1997), *Plant J.*, 11, 573-586.
24. Molinier J., Himer C., Hahne G., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 219-223.
25. Rouwendal G. J. A., Mendes O., Wolbert E. J. H., de Boer A. D., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 33, 989-999.
26. Itaya A., Hickman H., Bao Y., Nelson R., Ding B., (1997), *Plant J.*, 12, 1223-1230.
27. Keller N. L., Hamilton D. A., (1998), *Sex Plant Reprod.*, 11, 163-165.
28. Wang J. Shi H. Z., Zhou C., Yang H. Y., Zhang X. L., Zhang R. D., (1998), *Sex Plant Reprod.*, 11, 159-162.
29. Oparka K. J., Prior D. A. M., Santa Cruz S., Padgett H. S., Beachy R. N., (1997), *Plant J.*, 12, 781-789.
30. Wu F.-S., Feng T.-Y., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 381-386.
31. Vain P., Worland B., Kohli A., Snape J. W., Christou P., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 96, 164-169.
32. van der Geest A. H. M., Petolino J. F., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 760-764.
33. Galbraith D. W., Lambert G. M., Grebenok R. J., Sheen J., (1995), *Methods in Cell Biology*, 50, 3-14.
34. McCormac A. C., Wu Huixia, Bao Manzhu, Wang Y., Xu R., Elliott M. C., Chen D. F., (1998), *Euphytica*, 99, 17-25.
35. Kaeppeler H. F., Menon G. K., Skadsen R. W., Nuutila A. M., Carlson A. R., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 661-666.

36. Cho H.-J., Farrand S. K., Noel G. R., Widholm J. M., (2000), *Planta*, 210, 195-204.
37. Zhang H.-X., Zeevaart J. A. D., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 640-645.
38. Dugdale B., Becker D. K., Beetham P. R., Harding R. M., Dale J. L., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 810-814.
39. Nakazono M, Imamura T., Tsutsumi N., Sasaki T., Hirai A., (2000), *Planta*, 210, 188-194.
40. Ogata S.-I., Takase H., Hiratsuka K., Hotta Y., (1999), *Plant Cell Rep.*, 19, 101-105.
41. Satiat-Jeunemaitre B., Boevink P., Howes C., (1999), *Biochimie*, 81, 597-605.
42. Chytilowa E., Macas J., Śliwińska E., Rafelski S. M., Lambert G. M., Galbraith D. W., (2000), *Mol. Biol. Cell.*, 11, 2733-2741.
43. Mitsuda N., Enami K., Nakata M., Takeyasu K., Sata M. H., (2001), *FEBS Letters*, 488, 29-33.
44. Oparka K. J., Boevink P., Santa Cruz S., (1996), *Trends in Plant Science*, 1(12), 412-418.
45. Baulcombe D. C., Chapman S. N., Santa Cruz S., (1995), *Plant J.*, 7, 1045-1053.
46. Heinlein M., (1995), *Science*, 270, 1983-1985.