

## Kolorowa biofizykochemia

*Do przodu żyj, żyj kolorowo, marzenia najbarwniejsze* miew, śpiewała Ewa Bem, ale piosenki tej nie mógł znać Osamu Shimomura, gdy pół wieku temu z pomocą rodziny i przyjaciół przerabiał tony odławianych meduz *Aequorea victoria* w celu wyodrębnienia substancji powodującej zieloną fluorescencję zgrubień na jej brzegu po podrażnieniu. Prawdopodobnie nie przypuszczał, jak wielka rewolucja w badaniach biochemicznych dokona się dzięki odkrytemu przez niego zielonemu białku fluoryzującemu GFP (*green fluorescent protein*). Czy marzyło mu się otrzymanie Nagrody Nobla z Chemii za swój rybacki trud? Nie można tego wykluczyć. Żeby marzenia mogły się spełnić, trzeba je mieć.

Shimomura nie był jedynym zajmującym się świecąca meduzą. Pracował już wtedy na Uniwersytecie w Princeton, gdzie przybył na zaproszenie Franka Johnsona. Wyodrębnienie świecącej substancji nikomu się jednak nie udawało, co świadczyło o tym, że fluorescencja nie chciała zachodzić *in vitro*. Pomógł przypadek. Shimomura zaobserwował fluorescencję, gdy kiedyś wrzucił trochę przecieru z meduz do zlewu, w którym była morska woda. Błysk był jednak niebieski, a nie zielony. Później doszedł do tego, że to jony wapnia powodują reakcję. Wspólnie z Johnsonem, po kilku miesiącach pracy, otrzymali kilka miligramów białka, które nazwali aequorin. W publikacji wspomnieli również o uzyskaniu jeszcze mniejszej ilości innego białka, które świeciło na zielono po oświetleniu ultrafioletem. Był to pierwszy opis proteiny nazwanej później GFP, która miała zrewolucjonizować mikrobiologię.

Na razie nie bardzo było wiadomo, dlaczego bioluminescencja daje kolor zielony, podczas gdy aktywacja wapniem powoduje świecenie na niebiesko. Inaczej mówiąc, dlaczego (i jak) *in vivo* aktywowane jest GFP zamiast aequorinu. Na początku lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku Shimomura wraz ze współpracownikami (i konkurentami) doszli do wniosku, że niebieska luminescencja aequorinu ( $\lambda = 470$  nm) odpowiada długości fali powodującej ekscytację GFP, a następnie emisję światła zielonego ( $\lambda = 510$  nm). W 1974 roku Shimomura wraz ze współpracownikami wykazał, że luminescencja aequorinu może powodować luminescencję GFP, a sprzężenie zależy od wzajemnej odległości protein.

Choć Shimomura był bardziej zainteresowany aequorinem (o czym świadczy chociażby zapożyczenie nazwy właśnie tego białka od nazwy meduzy), między innymi, jako potencjalnym indykatozem wapnia, to nie zaprzestał badań GFP. W 1979 roku, po potraktowaniu GFP papainą (enzymem wstępnie trawiącym białka, otrzymywanym, między innymi, z papai), co zatrzymało fluorescencję białka, odnalazł peptyd o tym samym spektrum absorpcji co nienaruszone GFP. Badając ten peptyd, niemal bezbłędnie określił budowę chromoforu GFP.

Rozległych zastosowań GFP oraz jego pochodnych nie mielibyśmy, lub przynajmniej nie mielibyśmy tak prędko, bez prac Douglasa Prashera, wielkiego przegranego zeszłorocznej Nagrody Nobla. Jego prace doprowadziły w 1992 roku do wyizolowania genu odpowiedzialnego za tworzenie GFP. On sam jednak podzielał opinię środowiska o luminescencyjnej nieaktywności proteiny GFP pozbawionej enzymatycznego środowiska rodzimej meduzy. Możliwe, że właśnie ta zachowawcza opinia pozbawiła go zeszłorocznej Nagrody.

Dostał ją natomiast Martin Chalfie, który po jej przyznaniu powiedział: „Mogli równie dobrze dać nagrodę Douglasowi zamiast mnie”. Martinowi zamarzyło się wprowadzenie genu GFP do nicienia *Caenorhabditis elegans* (ulubionego robaczka genetyków), jeszcze zanim Douglasowi udało się sekwencjonować genu GFP. Obaj panowie utrzymywali kontakt i dzięki temu, zaraz po szczęśliwym odtworzeniu genu, Martin mógł poinstruować doktorantkę Gnię Euskirchen, jak wprowadzić go do pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*). Po miesiącu udało się bardziej niż Chalfie mógł się spodziewać. Pałeczki wyhodowane przez Euskirchen, po oświetleniu ultrafioletem, świeciły na zielono! To niespodziewane odkrycie braku potrzeby jakiegokolwiek enzymatycznej maszyny do aktywowania GFP jest podstawą wszystkich współczesnych zastosowań tego typu świecących protein.

Ostatnim z laureatów został Roger Tsien, któremu udało się zmodyfikować GFP tak, żeby świecenie było mocniejsze i dawało inne barwy. Wyjątkowo trudne okazało się uzyskanie koloru czerwonego, który jest szczególnie użyteczny ze względu na lepszą penetrację żywej tkanki. Udało się tego dokonać poprzez odchudzenie podobnych do GFP protein znalezionych we fluorescencyjnych koralach przez Michaiła Maca i Siergieja Łukianowa.

GFP i jemu podobne proteiny pozwalają obecnie na przestrzenne i czasowe monitorowanie rosnącej liczby zjawisk w żywych organizmach. Jest to możliwe dzięki rozwojowi metod detekcji i sposobów zastosowania kombinacji protein o odpowiednio dobranych częstościach absorpcji i emisji, ale przede wszystkim dzięki łatwości tworzenia genetycznych znaczników zawierających instrukcje tworzenia GFP w interesujących badaczy miejscach i czasie.

Działalność ta jest *par excellence* interdyscyplinarna. Podobnie jak nowe kierunki studiów na Wydziale Fizyki UW, o czym można i warto przeczytać na tylnej okładce.

Piotr ZALEWSKI

Na podstawie materiałów Komitetu Noblowskiego ([www.nobel.se](http://www.nobel.se)).

Zobacz również:

Robert E. Campbell, *Fluorescent proteins*, Scholarpedia (2008), [www.scholarpedia.org/article/Fluorescent\\_proteins](http://www.scholarpedia.org/article/Fluorescent_proteins)