

TRANSFORMACJA ROŚLIN Z WYKORZYSTANIEM GENU *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROTEIN)

Rafał Barański

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wstęp

W transformacji roślin powszechnie używa się genów reporterowych i markerowych w celu selekcji komórek z wprowadzonym transgenem i oceny skuteczności stosowanych metod transformacji. Wśród genów reporterowych, jednym z najczęściej stosowanych jest gen *gus* kodujący enzym β -glukuronidazę (GUS). Wykorzystanie GUS ma wiele zalet, jednak jego detekcja wymaga stosowania dodatkowych substratów do reakcji hydrolizy katalizowanej przez β -glukuronidazę i długiego barwienia histochemicznego wykrywającego barwny produkt. Efektem tego jest degradacja komórek i tym samym niemożliwa jest ocena żywych tkanek. Otrzymanie transformowanych roślin wymaga więc stosowania dodatkowego systemu selekcji w oparciu o geny markerowe, zwykle oporności na antybiotyki lub herbicydy, co często budzi wiele kontrowersji z uwagi na ich ewentualne interakcje w środowisku. Szczególną uwagę przywiązuje się do obecności genów oporności na antybiotyki w modyfikowanych organizmach. Szereg krajów opowiada się za zakazem uwalniania takich organizmów do środowiska, co nadaje nowe kierunki w pracach nad roślinami transgenicznymi.

Białko zielonej fluorescencji

Białko zielonej fluorescencji GFP (ang. green fluorescent protein) znane jest już od 40 lat, kiedy Shimomura i współpracownicy wyizolowali je z fotocytów meduzy *Aequorea victoria*. W ciągu kolejnych lat poznano jego właściwości fizyczne i chemiczne, ale dopiero w roku 1992 poznano sekwencję kodującego je genu [PRASHER i in. 1992]. W dwa lata później wykazano możliwość ekspresji *gfp* w innych organizmach [CHALFIE i in. 1994] i od tego czasu zaczęto coraz częściej wykorzystywać GFP do modyfikacji genetycznej organizmów. Obecnie ekspresja *gfp* jest możliwa we wszystkich organach roślinnych, a do detekcji białka GFP nie jest wymagany żaden dodatkowy substrat. Dzięki swoim właściwościom fluorescencyjnym możliwa jest bezpośrednia detekcja tego białka w żywych komórkach zarówno makroskopowo przy użyciu przenośnych lamp UV, jak i mikroskopowo, i tym samym obserwowanie ekspresji wprowadzanych genów już w pierwotnie transformowanych komórkach oraz zmian ekspresji zachodzących w czasie [HA-

SELOFF, AMOS 1995]. Stosowanie konstruktów z genem *gfp* może jednocześnie zastąpić konieczny do tej pory podwójny system genów reporterowych i markerowych do selekcji transformantów [STEWART 2001].

Białko GFP obecne w *A. victoria* jest kodowane przez gen *gfp* o długości 714 pz i ma wielkość 25,9 kDa. Duże zainteresowanie, jakim się cieszy to białko, wynika z jego właściwości fluorescencyjnych. Fluoryzuje ono bowiem w zakresie fal zielonych z maks. przypadającym na 508 nm, jeżeli jest wzbudzane światłem w zakresie fal albo dalekiego UV (maks. 395 nm), albo niebieskich (maks. 475 nm), przy czym ekstynkcja przy wzbudzaniu w świetle UV jest ok. 3 razy większa niż w świetle niebieskim. Właściwości te wynikają z budowy cząsteczki GFP, która składa się z 238 aminokwasów ułożonych w tzw. 'β-can' – cylinder złożony z 11 nici β z α-helisą przechodzącą wzdłuż jego osi. Chromofor (p-hydroksybenzylidenoimidazolinon) jest przyłączony do α-helisy i znajduje się prawie dokładnie w środku tego cylindra. Powstaje on z trzech aminokwasów Ser-Tyr-Gly w pozycji 65–67 po tzw. procesie dojrzewania, tj. zaginania łańcucha, tworzenia imidazolinonu, reakcji dehydratacji i utleniania [TSIEN 1998].

Pierwsze próby transformacji roślin z użyciem genu *gfp* u tytoniu [BAULCOMBE i in. 1995] i kukurydzy [HU, CHENG 1995] były bardzo obiecujące, jednakże szereg autorów nie obserwowoła ekspresji genu *gfp* u innych gatunków [HASELOFF i in. 1995; PANG i in. 1996]. Praktyczne wykorzystanie GFP wymagało „udoskonalenia” genu *gfp*, aby jego ekspresja zachodziła w różnych organizmach i aby właściwości fluorescencyjne białka były stabilne w różnych warunkach. Obecnie stosowane zmodyfikowane formy GFP są kodowane przez geny, w których indukowano szereg mutacji, głównie polegających na zamianie pojedynczych aminokwasów. Uzyskano geny ulegające ekspresji we wszystkich gatunkach roślin, do których próbowano je wprowadzić. Powstające białka GFP są termostabilne, wykazują powinowactwo do różnych organelli komórkowych oraz charakteryzują się różnymi właściwościami spektralnymi.

Najważniejszym odkryciem dotyczącym częstego braku ekspresji genu *gfp* u transformowanych roślin było stwierdzenie obecności fragmentu o długości 84 pz, który wykazuje wysoką homologię do znanych intronów roślinnych. W wyniku tego, u szeregu gatunków roślin fragment ten był rozpoznawany jako intron i ulegał delecji, a powstające białko było pozbawione właściwości fluorescencyjnych z uwagi na zmienioną budowę. Indukowane mutacje w kodonach flankujących tę sekwencję doprowadziły do wytworzenia genu *mgfp4*. W wyniku jego ekspresji powstaje białko o takich samych właściwościach jak jego odpowiednik u *A. victoria* [HASELOFF i in. 1997].

Wspomniany wyżej proces „dojrzewania” GFP jest zależny od temperatury i dlatego uzyskiwano bardzo słabą fluorescencję GFP w temp. powyżej 25°C. Kolejne indukowane mutacje doprowadziły do otrzymania zmienionej formy białka GFP(S65T), w której zastąpiono serynę w pozycji 65 treoniną. Zmiana ta spowodowała, że w temperaturze 37°C otrzymane białko miało kilkukrotnie zwiększoną emisję w porównaniu do GFP [HEIM i in. 1995]. Podobnie białko GFP_A, w którym indukowano mutacje V163A i S175G, wykazuje wyższą fluorescencję nawet o 35 razy [SIEMERING i in. 1996]. Wykazano ponadto, że dodatkowe podstawienia aminokwasowe w łańcuchu pozwalają na utrzymywanie stabilnej fluorescencji w temperaturach dochodzących do 65°C.

GFP jest widoczne w całej cytoplazmie, ale szczególnie ulega akumulacji w obrębie jądra komórkowego i dlatego przez długi okres przypuszczano, że GFP

wpływa toksycznie na komórki roślinne. Wynikało to z obserwacji, że intensywnie fluoryzujące linie *Arabidopsis* nie udawało się doprowadzić do regeneracji w rośliny [HASELOFF, SIEMERING 1998]. Dalsze prace innych autorów wykazały jednak, że GFP nie jest toksyczne dla roślin [HARPER i in. 1999; MOLINIER i in. 2000]. W międzyczasie uzyskano możliwość fuzji GFP z innymi białkami specyficznymi dla różnych organelli komórkowych. Dzięki temu możliwa jest akumulacja GFP w większości organelli, np.: mitochondriach [RIZZUTO i in. 1996], retikulum endoplazmatycznym [HASELOFF i in. 1997], jądrach [GREBENOK i in. 1997] oraz peroksysomach, wakuolach, aparatach Golgiego i błonach komórkowych [TSIEN 1998].

Analogi GFP

Prace nad GFP zmierzają także do otrzymania form o różnych właściwościach fluorescencyjnych. Obecnie funkcjonuje szereg wariantów, które różnią się zakresami wzbudzenia, emisji i intensywności fluorescencji. Do najczęściej stosowanych należą białka: mGFP5 z dwoma zakresami wzbudzenia, podobnie jak GFP, ale o podobnych ekstynkcjach [SIEMERING 1996]; EGFP tylko z jednym zakresem wzbudzenia maks. przy 488 nm [YANG i in. 1996]; sGFP [CHIU i in. 1996] i PGFP [PANG i in. 1996] również z jednym zakresem wzbudzenia maks. przy 489 nm, ale z intensywnością emisji przewyższającą dziki typ GFP odpowiednio 100 i 150 razy; smRS-GFP i smGFP z odpowiednio jednym i dwoma zakresami wzbudzenia [DAVIS, VIERSTRA 1998]. Cechą wspólną wszystkich wymienionych białek jest ich fluorescencja w zakresie fal zielonych z maks. przypadającym na 507–511 nm.

Fluorescencja GFP została zaobserwowana także w innych zakresach fal: niebieskim, żółtym i pomarańczowym w zależności od rodzaju podstawnika w cząsteczce chromoforu [TSIEN 1998], ale nie znalazły one jak dotąd tak powszechnego zastosowania jak zielono fluoryzujące formy. W ostatnich latach podjęto również badania nad innymi białkami fluoryzującymi z grupy 'β-can'. Białka asFP499, asFP522 i asFP595, wyizolowane z śródziemnomorskiego gatunku *Anemonia sulcata* [WIEDENMANN i in. 2000] oraz DsRed sklonowany z koralowca *Discosoma* ssp. [MATZ i in. 1999], charakteryzują się zasadniczo zbliżoną budową do GFP. Fluoryzują one w zakresie dłuższych fal niż GFP, DsRed ma maks. emisji przy 583 nm, a asFP595 przy 595 nm, i z tego względu nazywane są białkami czerwonej fluorescencji. Podstawowe właściwości fizyczne tych białek zostały już zbadane [BAIRD i in. 2000; GROSS i in. 2000]. Charakteryzują się dużą intensywnością i stabilnością fluorescencji, ale wymagają ulepszenia procesu ich 'dojrzwiania' w celu jego skrócenia i uniezależnienia od szeregu czynników, takich jak pH czy temperatura. Ze względu jednak na dodatkową zaletę, jaką jest fluorescencja w innym zakresie niż światło zielone, stanowią one potencjalnie ważną grupę białek alternatywnych dla GFP, które będą mogły być wykorzystywane jako markery w transformacji.

Podsumowanie

Historia badań nad białkami fluorescencji ma zaledwie 10 lat, a praktyczne wykorzystanie właściwości tych białek w transformacji roślin nastąpiło dopiero po

roku 1996. Postęp badań genetycznych umożliwia obecnie identyfikację nowych form białek z tej grupy oraz dokonywanie modyfikacji ich budowy pociągających za sobą zmianę właściwości fizykochemicznych. Dzięki temu postępowi w dyspozycji badaczy jest obecnie szerokie spektrum białek o właściwościach fluorescencyjnych, które mogą być wykorzystywane w pracach z zakresu inżynierii genetycznej zarówno roślin, jak i innych organizmów.

Literatura

- BAIRD G.S., ZACHARIAS D.A., TSIEN R.Y. 2000. *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. PNAS 97(22): 11984–11989.
- BAULCOMBE D.C., CHAPMAN S., CRUZ S.S. 1995. *Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections*. Plant Journal 7: 1045–1053.
- CIALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W.W., PRASHER D.C. 1994. *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science 263: 802–805.
- CHIU W.L., NIWA Y., ZENG W., HIRANO T., KOBAYASHI H., SHEEN J. 1996. *Engineered GFP as a vital reporter in plants*. Curr. Biol. 6: 325–330.
- DAVIS S.J., VIERSTRA R.D. 1998. *Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants*. Plant Mol. Biol. 36: 521–528.
- GREBENOK R.J., PIERSON E., LAMBERT G.M., GONG F.C., AFONSO C.L., HALDEMAN-CAHILL C.L., CARRINGTON J.C., GALBRAITH D.W. 1997. *Green fluorescent protein fusions for efficient characterization of nuclear targeting*. Plant J. 11: 573–586.
- GROSS L.A., BAIRD G.S., HOFFMAN R.C., BALDRIDGE K.K., TSIEN R.Y. 2000. *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. PNAS 97(22): 11990–11995.
- HARPER B.K., MABON S.A., LEFFEL S.M., HALFHILL M.D., RICHARDS H.A., MOYER K.A., STEWART C.N. 1999. *Green fluorescent protein as a marker for expression of a second gene in transgenic plants*. Nat. Biotechnol. 17: 1125–1129.
- HASELOFF J., AMOS B. 1995. *GFP in plants*. Trends in Genetics 11: 328–329.
- HASELOFF J., SIEMERING K.R. 1998. *The uses of GFP in plants, w: Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols*. Chalfie M., Kain S.R. (red.). Wiley, New York: 191–220.
- 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: 2122–2127.
- HEIM R., CUBITT A.B., TSIEN R.Y. 1995. *Improved green fluorescence*. Nature 373: 663–664.
- HU W., CHENG C-L. 1995. *Expression of Aequorea green fluorescent protein in plant cells*. FEBS Lett. 369: 331–334.
- MATZ M.V., FRADKOV A.F., LABAS Y.A., SAVITSKY A.P., ZARAIISKY A.G., MARKELOV M.L., LUKYANOV S.A. 1999. *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat. Biotechnol. 17: 969–973.
- MOLINIER J., HIMBER C., HAHNE G. 2000. *Use of green fluorescent protein for detection of transformed shoots and homozygous offspring*. Plant Cell Rep. 19: 219–223.

- PANG S.-Z., DEBOER D.L., WAN Y., YE G., LAYTON J.G., NEHER J.G., ARMSTRONG C.L., FRY J.E., HINCHEE M.A.W., FROMM M.E. 1996. *An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants*. *Plant Physiol.* 112: 893–900.
- PRASHER D.C., ECKENRODEV. K., WARD W.W., PRENDERGAST E.G., CORMIER M.J. 1992. *Primary structure of the Aequorea-victoria green – fluorescent protein*. *Gene* 111: 229–233.
- RIZZUTO R., BRINI M., DE GIORGI F., ROSSI R., HEIM R., TSIEN R., POZZAN T. 1996. *Double labeling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo*. *Curr. Biol.* 6: 183–188.
- SIEMERING K.R., GOLBIK R., SEVER R., HASELOFF J. 1996. *Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein*. *Curr. Biol.* 6: 1653–1663.
- STEWART C.N. 2001. *The utility of green fluorescent protein in transgenic plants*. *Plant Cell Rep.* 20: 376–382.
- TSIEN R.Y. 1998. *The green fluorescent protein*. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509–544.
- WIEDENMANN J., ELKE C., SPINDLER K.D., FUNKE W. 2000. *Cracks in the β -can: Fluorescent proteins from Anemonia sulcata (Anthozoa, Actinaria)*. *PNAS* 97(26): 14091–14096.
- YANG T.-T., CHENG L., KAIN S.R. 1996. *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. *Nucleic Acids Res.* 24: 4592–4593.

Słowa kluczowe: białko zielonej fluorescencji, GFP, mutanty, transformacja genetyczna

Streszczenie

Białko zielonej fluorescencji (GFP), dzięki swoim właściwościom fluorescencyjnym, emituje zielone światło i tym samym może być obserwowane w żywych komórkach do których został wprowadzony kodujący je gen *gfp*. Obecnie wykorzystuje się wiele form białek GFP różniących się od dzikiej formy GFP z *Aequorea victoria*. Białka te mają zmienione właściwości spektralne, intensywniej fluoryzują i są termostabilne. Wykazano także istnienie innych analogów GFP, które emitują fale z zakresu światła niebieskiego, żółtego i pomarańczowego oraz białek pochodzących z innych organizmów morskich fluoryzujących na czerwono.

PLANT TRANSFORMATION WITH THE USE OF *gfp* (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) GENE

Rafał Barański

Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,
Agricultural University, Kraków

Key words: green fluorescent protein, GFP, mutants, genetic transformation

Summary

Green fluorescent protein (GFP) has got a fluorescent ability to emit green light and therefore can be directly visualized in live transgenic cells. There are several modified forms of GFP used, which differ from its wild type from *Aequorea victoria*. These proteins having got different spectra, are more intense in fluorescence and are thermostable. There are also other GFP analogues, which emission is shifted towards cyan, yellow and orange light, as well as red fluorescent proteins found in other marine organisms.

Dr Rafał **Barański**
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja
Al. 29 Listopada 54
31-425 KRAKÓW