

Świejące białko

– Nobel 2008

Tegoroczna Nagroda Nobla przyznana w dziedzinie chemii jest bardzo... biologiczna. Laureatami zostali trzej naukowcy: Osamu Shimomura, Martin Chalfie i Roger Y. Tsien.

■ ZBIGNIEW ADAMSKI

Pierwszy z noblistów wyizolował białko wykazujące fluorescencję ze stłbiopława *Aequorea victoria*. Białko to nazwano *green fluorescent protein*, czyli w skrócie GFP. W świetle ultrafioletowym świeciło ono na zielono. Shimomura w swoich badaniach naukowych zajmował się bioluminescencją, czyli świeceniem żywych organizmów. Meduzy tego gatunku wytwarzają zielone światło w niewielkich organach, umieszczonych na brzegu dzwonu. Jeśli kilkadziesiąt takich meduz pokroi się i przepuści przez specjalną gazę, otrzymamy płyn wykazujący słabe świecenie. **Osamu Shimomura** postawił sobie za cel wyizolowanie świecącej substancji. Było to zajęcie niewiarygodnie pracochłonne. Ocenia się, że tegoroczny noblista zebrał i „zuzył” ponad milion meduz! Jednym z najważniejszych odkryć było stwierdzenie, że do luminescencji konieczny jest wapń. Łączy się on z białkiem – ekworyną, która wtedy emituje niebieskie światło. To światło jest absorbowane przez GFP, które w efekcie emituje nikielne, jasnozielone światło, jeśli oświetli się je światłem widzialnym, a bardzo żywą zieleń po naświetleniu ultrafioletem.

Wyizolowanie białka samo w sobie nie byłoby jednak warte Nagrody Nobla, wszak białka izoluje się „co chwilę”. Istotą GFP jest możliwość jego użycia jako markera. Jako pierwszy na taki pomysł wpadł Do-

uglas Prasher: jeśli GFP udałoby się w komórce połączyć w jakiś sposób z innym białkiem, dajmy na to z hemoglobina, to tak powstałe białko hybrydowe by świeciło, a więc mielibyśmy możliwość jego wykrywania i lokalizacji. Może więc spróbować połączyć sekwencję kodującą białko GFP i hemoglobiny, tworząc jeden gen (np. przed kodonem stop sekwencji kodującej hemoglobinę wstawić, w zgodnej fazie, fragment DNA kodujący GFP)? W konsekwencji powstanie białko fuzyjne, które po oświetleniu światłem UV będzie wykazywać zieloną luminescencję, pozwalając na wykrycie hemoglobiny. Oczywiście hemoglobinę można wykryć znacznie łatwiej, ale istnieje wiele białek, których lokalizacji w komórce nie da się ustalić wcześniej dostępnymi sposobami. Wiele z nich pełni niezwykle istotne zadania, uczestnicząc w tak ważnych procesach jak np. regulacja ekspresji genów czy transport innych białek do specyficznych kompartmentów komórkowych. Dlatego odkrycie tegorocznych noblistów jest tak ważne. Stało się bowiem kluczem do poznania mechanizmów ekspresji genów oraz losów białek w komórkach.

Ale dlaczego akurat GFP? Po pierwsze, jest to białko niewielkie, co ma duże znaczenie, ponieważ niebezpieczeństwo, że GFP zmieni właściwości białka, do którego jest dołączone, jest mniejsze. Po drugie, ja-

ko niewielkie białko może w miarę łatwo przemieszczać się wewnątrz komórki. Po trzecie, w odróżnieniu od innych tego typu białek, w środowisku tlenowym do fluorescencji GFP nie są potrzebne inne związki czy pierwiastki (tak jak wapń w przypadku ekworiny u meduz czy ATP w przypadku lucyferazy u świetlików), a więc do wizualizacji wystarczy naświetlenie komórek promieniami UV.

Douglas Prasher pracował nad możliwością zastosowania GFP do wykrywania komórek rakowych. Potrzebny był jednak marker, charakterystyczny wyłącznie dla nowotworowych komórek. Ich wizualizacja byłaby potężnym narzędziem w walce z nowotworami, w których komórkach można by łatwo taki marker wykryć. Wielką zasługą Prashera było również zlokalizowanie genu kodującego GFP u *Aequorea victoria*, sklonowanie go w bakteriach, zsekwencjonowanie i opisanie sekwencji aminokwasowej GFP.

Drugi z tegorocznych laureatów – **Martin Chalfie** – wykorzystał GFP w badaniach molekularnych. Chciał on użyć GFP jako markera, konstruując geny, w których sekwencja kodująca GFP jest połączona funkcjonalnie (w sposób umożliwiający syntezę w komórce gospodarza GFP) z promotorem odpowiednim dla komórki, do której taki konstrukt wprowadzano. Zespołowi Chalfiego udało się skonstruować geny umożliwiające wytwarzanie GFP w komórkach pałeczki okrężnicy (*Escherichia coli*) i nicienia *Caenorhabditis elegans*. Otrzymane transgeniczne organizmy świeciły na zielono po naświetleniu światłem ultrafioletowym o odpowiedniej długości fali. Niewiele później ekspresję genu dla GFP udało się również uzyskać w komórkach drożdży, owadów i ssaków.

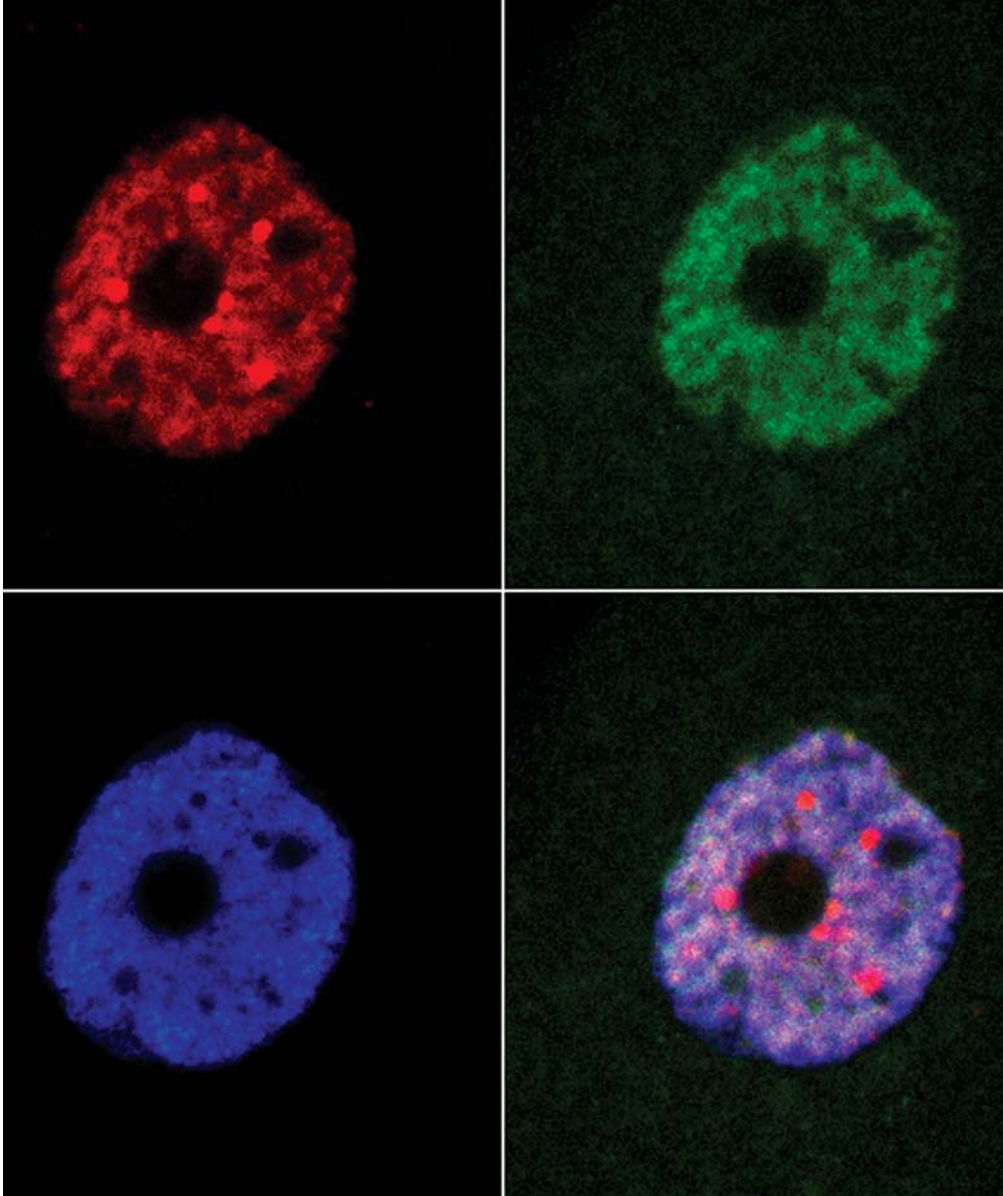
Trzeci nagrodzony naukowiec – **Roger Y. Tsien** – w znaczący sposób przyczynił się do zrozumienia działania GFP oraz rozwoju technik związanych z zastosowaniem GFP. Stwierdził on, że białko nie fluoryzuje w warunkach beztlenowych. To jego zespołowi udało się otrzymać mutanty o fluorescencji

silniejszej niż naturalna, a także o fluorescencji w innych kolorach niż zielony czy wywoływanej przez światło niebieskie, a nie przez światło UV. To ostatnie jest szczególnie ważne, bowiem naświetlanie komórek światłem ultrafioletowym nie jest dla nich obojętne, co w znacznym stopniu ogranicza możliwość prowadzenia obserwacji przyżyciowych. W oparciu o prace innych naukowców Tsien wniósł również wielki wkład w zbadanie właściwości białka fosforyzującego na czerwono, tzw. *DsRed fluorescent protein*, uzyskanego z koralowca *Discosoma*. W ten sposób nauka otrzymała kolejne narzędzie, dzięki któremu możliwa jest wizualizacja kilku związków równocześnie.

Obecnie znamy wiele białek fluoryzujących w różnych kolorach. Dlaczego ich znaczenie jest tak wielkie? Przede wszystkim ze względu na powszechność i wielość zastosowań. Jednym z najczęściej przytaczanych przykładów jest obrazowanie neuronów. Metoda ta, nazwana „Brainbow”, umożliwia obserwację fluoryzujących w różnych kolorach, pojedynczych komórek nerwowych, połączeń między nimi czy defektów występujących w przypadku schorzeń układu nerwowego. Można również badać poszczególne neurony lub obszary mózgu, uaktywniające się w wyniku zadziałania bodźca. Innym bardzo ważnym zastosowaniem jest wykorzystanie fluorescencji w badaniach nad rozwojem nowotworów. W tym przypadku wykorzystuje się myszy, którym implantuje się komórki nowotworowe z wklonowanym genem białka fluoryzującego. Można następnie obserwować przebieg metastazy, czyli przerzutów komórek nowotworowych w badanym organizmie. Białka fluoryzujące wykorzystywane są również w badaniach nad malarią. Za pomocą metod fluorescencyjnego znakowania gonad można odróżnić larwy samców i samic. Metody fluorescencji wykorzystuje się również do badania cyklu komórkowego. Umożliwiają one bowiem rozpoznanie fazy cyklu, w której znajduje się komórka. I tak za pomocą metody nazwanej Fucci (ang. *fluore-*

scent, ubiquitination-based cell cycle indicator) można odróżnić komórki w fazie replikacji (są żółte) od tych, które są w fazach G1 (czerwone), S (zielone) i G2 (niewybarwione). Zastosowań białek fluoryzujących jest oczywiście znacznie więcej. Wymieniliśmy tu tylko kilka najważniejszych.

Fluorescencja jest zatem metodą obrazowania procesów zachodzących w komórkach, tkankach i organach. Na tym poziomie organizacji żywych organizmów podstawowym narzędziem badacza jest mikroskop. W tym przypadku – mikroskop fluorescencyjny lub mikroskop konfokalny.



Fot. 1. Jądro pierwszorzędowego oocyty myszy. Chromatyna wybarwiona jodkiem propidyny (czerwona), acetylowany histon H3 wyznakowany na kolor zielony, nowosyntetyzowany RNA wyznakowany na kolor niebieski. Fot. M. Meglicki

Mikroskop fluorescencyjny jako źródła światła używa lampy rtęciowej. Preparaty są wybarwiane barwnikami fluoryzującymi, czyli fluorochromami (np. fluoresceina, rodamina, DAPI). Zawierają endogenne substancje fluoryzujące (lipofuscyny, porfiryny, chlorofil), wklonowane białka takie jak właśnie GFP czy DsRed, bądź też są znakowane przeciwciałami sprzężonymi z fluorochromem (metody immunologiczne). W efekcie można obserwować obraz, w którym świecenie świadczy o obecności poszukiwanych przez badacza cząsteczek. Kolor fluorescencji zależy od właściwości substancji fluoryzującej. Mikroskop fluorescencyjny jest wyposażony w szereg filtrów:

- filtr przepuszczający jedynie promieniowanie UV o pożądanej długości fali (tzw. filtr wzbudzenia),
- filtr absorbujący promieniowanie ciepłe (podczerwień),
- filtr umieszczony w tubusie lub okularze, pochłaniający ultrafiolet i chroniący w ten sposób oczy osoby badającej preparat (tzw. filtr barierowy).

Lasery skaningowy mikroskop świetlny, powszechnie zwany mikroskopem konfokalnym lub też współogniskowym, jest jednym z nowszych typów mikroskopów świetlnych. Różni się od innych typów mikroskopów tym, że źródłem światła jest laser, a najczęściej mikroskop konfokalny wykorzystuje kilka laserów emitujących światło o różnych długościach fal. Wielką zaletą tego mikroskopu jest to, że cały obserwowany obiekt jest widziany jako ostry, nie ma obszarów rozmytych, nieostrych. Lasery wzbudzają fluorescencję tylko w tych fragmentach komórki, na które są zogniskowane. Następnie w ten sam sposób skanowana jest kolejna, niżej położona warstwa komórki. Oczywiście oglądanie takiego preparatu za pomocą okularu nie miałoby większego sensu. Widzielibyśmy tylko niezmiernie mały fragment preparatu. Dlatego wszystkie obrazy składane są za pomocą komputera w jedną całość. Otrzymujemy ostry obraz, który możemy oglądać w trzech

wymiarach. Ma to szczególnie duże znaczenie przy pracy z dużymi powiększeniami, gdzie głębia ostrości obiektywów jest niejednokrotnie znacznie mniejsza niż grubość preparatu. Ponadto technika komputerowa pozwala na oglądanie preparatu z różnych stron, tworzenie filmów obrazujących przebieg procesów zachodzących w obserwowanym preparacie. Możliwa jest więc obserwacja przyżyciowa, zatem pewne procesy (np. przemieszczanie się organelli komórkowych) mogą być obserwowane w czterech wymiarach. Z kolei zastosowanie różnych długości fal światła laserowego oraz różnych fluorochromów pozwala na wzbudzenie świecenia w kilku kolorach i równoczesną detekcję kilku elementów.

Mikroskop konfokalny ma zatem bardzo dużo zalet właściwych mikroskopom świetlnym: stosunkowo łatwe i szybkie przygotowanie preparatu, najczęściej nakładanego na zwykłe szkiełko podstawowe i zamykanego tradycyjnym szkiełkiem nakrywkowym, możliwość obserwacji dużych obiektów, kolorowy obraz, obserwacje przyżyciowe oraz stosowanie technik, pozwalające na rozróżnienie organelli lub związków zawartych w komórkach. Dodatkowo, zastosowanie dokładnego ogniskowania zapobiega uzyskiwaniu obrazów nieostrych. Choć obecnie prawie wszystkie typy mikroskopów mogą być wyposażone w kamery cyfrowe i komputery, to w przypadku mikroskopii skaningowej cyfrowa obróbka uzyskanych obrazów pozwala na przedstawianie obrazów trójwymiarowych. Tak jak i w innych przypadkach, praca z komputerem umożliwia również dokonywanie dodatkowego kontrastowania. Mikroskop konfokalny ma też oczywiście „klasyczne wady” mikroskopu świetlnego, np. niewielka w porównaniu z mikroskopem elektronowym rozdzielczość i możliwość powiększenia obrazu. Tym niemniej, wraz z coraz powszechniejszym zastosowaniem białek takich jak GFP, znaczenie tego mikroskopu w naukach biologicznych jest coraz większe. Po ten typ mikroskopii sięgają nie tylko biologzy komórki i histo-

lodzy, ale także biochemicy, genetycy, fizjologowie i taksonomowie.

Kilka zadań związanych z GFP i mikroskopią

1. Malaria jest jedną z najgroźniejszych chorób pasożytniczych. Około 300 500 milionów ludzi na świecie cierpi na tę chorobę, a ponad milion rocznie umiera. Zarodźce malarii roznoszone są przez samice komarów. Kopulują one tylko jeden raz w ciągu życia.

W 2005 roku opisano metodę wkłonywania fluoryzujących białek tak, aby były one widoczne w jądrach rozwijających się larw. W ten sposób można określić płeć larw. Skonstruowano również maszyny, które mogą oddzielać samce od samic, właśnie na podstawie fluorescencji jąder. Samce można następnie wysterylizować.

Określ, jak wypuszczenie sterylnych samców wpłynie na występowanie malarii.

.....

Przykład prawidłowej odpowiedzi:

Wypuszczone sterylne samce będą kopulować z samicami, ale nie doprowadzi to do zapłodnienia, w związku z czym zmniejszy się/wyginie populacja komarów na danym terenie i zarodźce malarii nie będą się rozprzestrzeniać na danym terenie.

2. Mikroskop konfokalny i mikroskop fluorescencyjny to dwa typy mikroskopów wykorzystujących fluorescencję. Podaj jedną zaletę mikroskopii konfokalnej w porównaniu ze zwykłą mikroskopią fluorescencyjną.

.....

Przykład prawidłowej odpowiedzi:

Mikroskop konfokalny umożliwia uzyskanie obrazu, który jest w stu procentach ostry. Mikroskop konfokalny po-

zwala na uniknięcie uzyskania obrazu nieostrego/rozmytego.

Mikroskopia konfokalna pozwala na uzyskanie obrazu trójwymiarowego.

3. Pewnej grupie naukowców udało się stworzyć szczep myszy, u których uaktywnione neurony produkowały GFP. Badano następnie aktywność kory węchowatej tych zwierząt – obserwowano, czy neurony w tym obszarze mózgu wykazują zieloną fluorescencję. Opisz, jak powinna wyglądać próba kontrolna i próba badana w tym doświadczeniu.

.....

Przykład prawidłowej odpowiedzi:

Grupa kontrolna: kilkanaście/30 myszy w komorze o stałym stężeniu CO₂.

Grupa badana: kilkanaście/30 myszy w komorze o tym samym stężeniu CO₂ co w grupie kontrolnej, następnie podniesienie stężenia dwutlenku węgla w atmosferze/komorze (o pewną wartość).

4. Dzięki badaniom przy użyciu GFP wykazano, że pewne obszary mózgu myszy reagują na wzrost stężenia dwutlenku węgla w atmosferze z 0,03% do 0,06%. Myszy są zwierzętami nocnymi. Określ, jakie znaczenie dla tych zwierząt może mieć wyczuwanie zwiększonego stężenia CO₂ w otoczeniu.

Przykład prawidłowej odpowiedzi:

Wyższe stężenie CO₂ może ostrzegać przed zbliżaniem się drapieżnika. (W wydychanym powietrzu jest duże stężenie CO₂).

.....

dr ZBIGNIEW ADAMSKI

Wydziałowa Pracownia Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej,
 Wydział Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza
 w Poznaniu