

Kémiai Nobel-díj 2008

Osamu Shimomura, Martin Chalfie, Roger Y. Tsien

Green fluorescent protein

Kezdetek



1960-ban, amikor a japán tudós, Osamu Shimomura elkezdte tanulmányozni az *Aequorea victoria* nevű medúzát, nem volt ötlete, milyen tudományos forradalom irányíthatja.

Harminc évvel később, Martin Chalfie felhasználta a medúza zöld fluoreszkáló fehérjéjét (green fluorescent protein, GFP) ezzel segítve az élet legkisebb építőelemeinek tanulmányozását. Ma a tudomány képes tanulmányozni azokat a biológiai folyamatokat is, amik korábban kimutathatatlanok voltak Roger Y. Tsien fehérjéjének segítségével, amelyek a szívérvány minden színében ragyognak.

Amikor a tudomány hasznosította a módszert, segítségével látott dolgokat, melyek korábban láthatatlanok voltak, a kutatás mindig hatalmas lépést tett előre. Ahhoz lehetne hasonlítani, mint amikor Anton van Leeuwenhoek feltalálta a mikroszkópot a 17. században, és egy új világ tárult fel. A tudósok ennek segítségével képesek voltak eddig ismeretlen dolgok, baktérium, spermium és vér sejtek vizsgálatára. Ezeknek eddig a létezéséről sem tudtak.

A 2008-as Kémiai Nobel-díj hasonlóan jelentős hatást ért el a tudományban. A GFP jelentősége a múlt évtizedben vezérsillag volt a biokémikusoknak, biológusoknak, orvosi kutatóknak és egyéb tudósoknak. Ennek a fehérjének az erős zöld színe megjelenik kék UV fény alatt. Megvilágítja például a növekvő rák tumort, kimutatja az Alzheimer kór fejlődését az agyban, vagy a pathogenic baktérium növekedését.

Ez még inkább érdekessé tette a GFP használatát, a kutató valóban követni tudja a sejteken belüli fejlődést. A test milliárd sejtje pumpálja a szívizom sejtekből és inzulin előállító β sejtekből a makrofágokba, ami elpusztítja a hivatlan baktériumokat. A kutatók ezen ismeretekkel – hogyan fejlődik és funkcionál – nagyobb eséllyel képesek fejleszteni egy eredményes gyógyszert minimális side-effect-tel.

Nem könnyű tanulmányozni a szerkezetét ezeknek a 0.02 milliméter nagyságú sejteknek. Megfigyelik, hogy épülnek fel a blokkjai 1-1 sejtnek: a fehérje, szénhidrát és egyéb molekulák már meghaladják egy közönséges mikroszkóp képességeit. És így még inkább nehéz követni a kémiai folyamatokat a sejteken belül, de ez az a kellően részletes szint, amit a tudósoknak ki kell dolgozni. Ha a kutatók megértik, hogy kezdenek a sejtek új ereket építeni, talán meg tudnák állítani a rákos daganatokat tápláló és oxidáló érrendszerek felépítésével. Ezzel megelőzhetik a rák kialakulását!

A sejtek kémiai folyamatait rendszerint fehérjék szabályozzák. Rengeteg különböző fehérje van, és mindegyik különböző szerepet tölt be. A GFP-n keresztül létfontosságú információkat nyerhetnek a kutatók, mivel ezen fehérjék egyikéhez csatlakozik. Láthatják, melyik sejt a szokatlan fehérje tartózkodási helye. Hála a GFP zöld fényének, a tudósok már felismerik az egyedüli nyomát a mikroszkóp alatt.

Shimomura halakkal mutatja ki a foszforeszkáló anyagot

Ma a GFP szabvány eszköze kutatók ezreinek a világ minden táján. A felfedezés története Japánban kezdődött a második világháború utáni évben. Osamu Shimomura oktatását megszakította a háború és az atombomba okozta pusztítás. Ennek ellenére 1955-ben Yashimasa Hirata professzor asszisztensként alkalmazta a Nagoya Egyetem-en. Hirata professzor egy látszólag lehetetlen project-re alkalmazta – feltárni, mit rejt egy megsemmisült puhatestű, Cypridina, maradványa: ragyogott, amikor vízzel érintkezett.

Különösnek tűnt, hogy Hirata egy ilyen nehéz feladatot adott egy tapasztalatlan asszisztensnek. Egy vezető amerikai kutató csoport hosszú ideig próbálta elszigetelni ezt az anyagot, így Hirata eldöntötte, hogy nem akarja a munkát egy olyan diáknak adni, akinek csak arra kell, hogy megkapja a doktorátusát.

1956-ban minden nehézség ellenére Shimomura a kezében tartotta az anyagot. Ez egy fehérje volt, ami 37-szer hosszabb ideig ragyogott, még fényesebben, mint a megsemmisült puhatestű. Miután megjelentek az eredményei, Shimomura-t meghívta Frank Johnson a rangos Princeton Egyetem-re, New Jersey-be. Mint búcsú ajándék, Hirata professzor elintézte,

hogy Shimomura elnyerje a Ph.D.-t a Nagoya Egyetem-től – ez rendkívüli cselekedet, mivel ő valójában nem volt feljegyezve, mint doktoráló tanuló.

Egy hosszú utazás után, keresztül a Csendes-óceánon és Amerika kontinensén, Shimomura hozzálátott egy másik természetesen foszforeszkáló anyag tanulmányozásához. Ez alkalommal az *Aequorea victoria* medúzából, aminek a külső szegélye zölden világít, ha a medúza izgatott.



Az *Aequorea victoria* medúza a tengerben él Észak-Amerika nyugati partvidékének legtávolabbi részein. A medúza biológiailag fluoreszkáló szerve az "esernyő" résznek a pereme.

Shimomura és Johnson medúzát gyűjtött Friday Harbor-ban, Észak-Amerika nyugati partvidékén 1961 teljes nyarán. Levágták a medúzák világító szélét és keresztül préselték egy szűrőn, így jutottak ahhoz, amit 'squeeze'-nek hívnak. (squeeze= összenyomva) Egyik nap, amikor Shimomura egy kevés squeeze-t öntött a tartályba, az fényesen villant fel. Észrevette, hogy tengervíz volt a tartályban, ami kalcium ionokat is tartalmazott, ez okozta a kémiai reakciót. Meglepő módon a villanás fénye nem zöld volt, mint a medúza szélén. Kék színű volt.

Johnson és Shimomura egész nyáron alapanyagot gyűjtött és visszavitte a squeeze-t körülbelül 10.000 medúzáról Princeton-ba. Pár mg megtisztítása és folyadékból kék foszforeszkáló anyaggá alakítása hónapokat vett igénybe. Ezt a fehérjét nevezték aequorinnak.

UV fényben zölden foszforeszkál

Az 1962-es tudományos publikációban, melyben Shimomura és Johnson leírták a folyamatot, mellyel aequorin nyerhető, arról is beszámoltak, hogy mindezt elszigetelt fehérjén hajtották végre, ami napfényben halványzöld, villanykörte fényében sárgás, és UV fényben fluoreszkáló zöld volt a kísérlet során. Ez volt az első alkalom, hogy leírták a GFP-t. Shimomura és Johnson először csak Green Protein-nek hívta, majd később nevezték el Green Fluorescent Protein-nek.

Az 1970-es években Shimomura még közelebbről vizsgálta a GFP fluoreszkálását. Rámutatott, hogy a GFP tartalmaz egy különleges színhordó csoportot, egy kémiai csoportot, ami kibocsátja és el is nyeli a fényt. Amikor UV fény vagy kék fény éri a kromofor-t, felszívja az energiát a fényben, gerjesztett állapotba kerül. A következő fázisban a kromofor megszabadul az energiától. Zöld fényt bocsát ki.

A zöld fluoreszkáló fehérje 238 aminosavból áll, egy hosszú láncot alkotva. A lánc véget ér, ha elérte a lehető leghosszabb sormintát. A soron belül a strukturált 65,66 és 67 alakú aminosavak vegyi csoportja elnyeli az UV és a kék fényt, és zölden fluoreszkál.



A medúzában a GFP kromofor-ja egyszerűen alakítja át a kék fényt aequorin-ból zöld fényé. Ezért ragyog más színben a medúza és az aequorin.

Az a forradalmi a GFP-ben, hogy a fehérjének nincs szüksége adalékanyagra a ragyogáshoz, ellentétben az aequorin-nal és más foszforeszkáló fehérjékkel, melyek folyamatosan igénylik az energia gazdag molekulákkal való ellátást. A GFP-t elég UV vagy kék fénynek kitenni. A fény belép a sejtekbe és találkozik a GFP-vel, ami zölden világít. Ha a kutatónak kémiai anyagot kellett hozzáadni, befecskendeztek a sejtbe – a folyamat amivel megzavarja sejtet és megnehezíti a kivitelezést egy szabad szemmel nem látható mérlegen.

Chalfie-nek van egy briliáns ötlete

Ennek az évnek a második kémiai Nobel-díjasa Martin Chalfie, aki 1988-ban hallott először a GFP-ről a Columbia egyetem biológiai foszforeszkáló organizmusainak szemináriumán New York-ban. Amikor Chalfie hallott az izzó fehérjéről, nagyon meglepődött.

Mindennapi munkája közben milliméter hosszúságúra osztotta a *Caenorhabditis elegans* roundworm's gént, ez az egyik legbonyolultabb szervezet a földön. Bár csak 959 sejtből áll, de rendelkezik intelligenciával, előrepszik és párosodik. Együttal az egy harmada a roundworm's gének

összefüggő emberi gén. Végül de nem utolsósorban az átlátszó *C.elegans*-t áttetsző, ami megkönnyíti a kutatását és tanulmányozását hagyományos mikroszkóp alatt.

Az 1988-as szeminárium alatt, Chalfie rájött hogy a GFP egy fantasztikus eszköz a gyűrűsféreg fehérjéjének vizsgálatára. Az lenne a szerepe, hogy zölden izzon a gyűrűsféreg különböző aktivitású sejtjeiben.

Ahhoz, hogy teljesen ki tudjuk értékelni Chalfie ötletét, tudnunk kell néhány alapvető tényt a sejt biológiáról. Ahogy az előbb említettük, a különböző fehérjék kivitelezik majdnem az egész munkát a sejtben, és több tízezer fehérje van a testünkben. Bár mindegyik különböző szerepet tölt be, az összes fehérje egységesen épül fel. 20 féle különböző aminosavat tartalmaznak, ezek egy hosszú láncba kapcsolódnak össze. Ami megkülönböztet egy fehérjét a többitől, az a lánc hossza, az aminosavak sorrendje, és hogy hogyan hajtódnak egymásra a láncok.

Általában mindegyik fehérjének van egy gén leírása. Amikor egy fehérje keletkezik egy sejtben, a gén aktiválódik, aminek eredményeként létrejön a sejtben az igényelt fehérje.

Például, amikor egy nagy táskát eddeséget ebédelsz és emiatt magas lesz a vércukor szinted az inzulin gén a pancreatic β sejtekhez kapcsolódik. A testben minden sejtnek van inzulin génje a sejt középpontjában, de csak a béta sejtekre hat a vércukor szint és indítja meg

az inzulin termelést. A kapcsoló a gén, a kezdeményező, amelyik közel van a génben a DNA-hoz, fordított. Amikor a kezdeményező aktiválja, elkezdődik az inzulin gén másolása. ... Ez a másolat szükséges, hogy a sejt el tudja érni és el tudja olvasni a genetikai fénymásolatot.

Az inzulin gének másolatát átviszi a sejt középpontból a sejt műhelybe, a citoplazmába. Ekkor a gén másolatát használja mintaként az aminosavval együtt, a fehérje inzulin képzéséhez. Az inzulin felszabadítja a vércukrot, ahol az hozzátapad az izmokhoz és a zsír sejtekhez, amik a vérből elnyelik és tárolják a cukrot.

Calfie ötlete kapcsolatban állt azzal a génnel, ami a GFP-nek egy eltérő génjét átfordítja vagy más génekkel más fehérjékből, meg akarta nézni a sejtek génjeinek az átfordító aktivitását és látni akarta hol tér el a fehérjék előállítására. A zöld fény jelként akar hatni a változó eseményekre.

Egy váratlan felfedezés

Hogy leteztelje ötletét, el kellett helyeznie a gént GFP-hez az *Aequorea victoria* génállományába. Pár vizsgálat után Chalfie rájött hogy egy Douglas Prasher nevű kutató Massachusetts-ben a Woods Hole Oceanographic Institution-ben már elkezdte kutatni a GFP gént. Chalfie beszélt Prasher-rel és megkérte, hogy vegye fel vele a kapcsolatot, ha sikerült elszigetelnie a megfelelő gént. A kutatási nyelvben ezt hasonmás génnek nevezik. Egy kutató elszigetelt egy gént az organizmus génállományából, és a DNA technológia segítségével, helyezett egy egysejtű organizmusban, amivel könnyebben sikerült. A kutatók általában a közönséges *Escherichiacoli* bélbaktériumot használják. Akkor tudnak előállítani baktériumot, ha a kívülről a gén aktiválja a fehérje előállítást.

Pár évvel később Prasher küldte a GFP gént Chalfie-nek. Chalfie ekkor egy diplomás diákot, Ghia Euskirchen-t oktatja, a GFP előállításához szükséges *E.coli* nyeréséért folytatott kísérletek közepette.

Egy hónappal később Euskirchen hívta Chalfie-t. Sikerült neki! Végig tudták kísérni mikroszkóp alatt, mikor az említett baktérium zöld fényel izzott UV fény hatására. Ez a felfedezés az alapja a GFP mai forradalmi használatának. De a felfedezés maga teljesen váratlan volt.

Az 1990-es évek elején általánosan feltételezték a tudósok, hogy a természetesen fluoreszkáló molekulák és pigmentek (melyek a virágoknak, halaknak és egyéb élőlényeknek adják színüket) különböző lépésekben alakulnak ki a sejtekben. Ezeknek a lépéseknek szükségük van egy fehérjére ellenőrizni a kémiai termelődést. Rengeteg szakértő hitte, hogy néhány különböző fehérjére van szükség a kromofor előállításához a GFP-ben, de Chalfie és Euskirchen kísérlete rámutatott ezen tétel hibásságára. Nincs több fehérje, mint amit a GFP igényel.

A következő lépésben Chalfie elhelyezte a gént amögött a kezdeményező mögött, mely aktív a 6 érintéses receptor neuronokban a *C.elegans*-ban. Az eredményeket 1994. februárjában tették közzé Chalfie és kollégái egy tudományos folyóiratban. A leírás elején az olvasók láthattak egy ábrát a *C.elegans*-ról, melyben az érintő receptor neuronok fényes zölden izzottak.

Tsien készít egy palettát a szivárvány összes színével

Ez az a pont, ahol a Nobel-díj harmadik babérkoszorúsa, Roger Tsien belépett. A nagyszerű hozzájárulása a GFP forradalomhoz a kutatók palettájának kibővítése volt sok-sok új színnel, melyek szintén izzottak, ráadásul hosszabb ideig és nagyobb intenzitással.

Először is, Tsien táblázatot készített arról, hogy alakul a GFP kromofor kémiaiilag a 238-aminosav-hosszú GFP fehérjében. A kutatók azelőtt kimutatták, hogy 3 aminosav 65-67

helyen van kémiai kölcsönhatásban egymással, alakítva a kromofort. Tsien megmutatta, hogy ez a kémhatás oxigént igényel, és megmagyarázta, hogy történhet más fehérjék segítségével nélkül.

A DNA technológia segítségével vette a következő lépést és kicserélt különböző aminosavakat a GFP egyes részeiben. Ez vezetett ahhoz, hogy a fehérje mindkettőt elnyeli, és a színek más részeiben bocsátja ki a fényt. Az aminosav összetételét kutató kísérleteknek köszönhetően Tsien ki tudta fejleszteni a GFP új változatát, mely még erősebben és egészen különböző színekben ragyog, úgy mint a cián, kék és sárga. Így tudják megfigyelni a kutatók manapság a különböző fehérjéket különböző színekben, hogy nyomon követhessék közöttük a kölcsönhatásokat.

Egy színt azonban nem tudott Tsien előállítani GFP-vel, és ez a piros. A piros fény még könnyebben áthatol a biológiai szöveten, és ezért különösen hasznos a kutatóknak, akik a sejteket és a szerveket kívánják tanulmányozni.

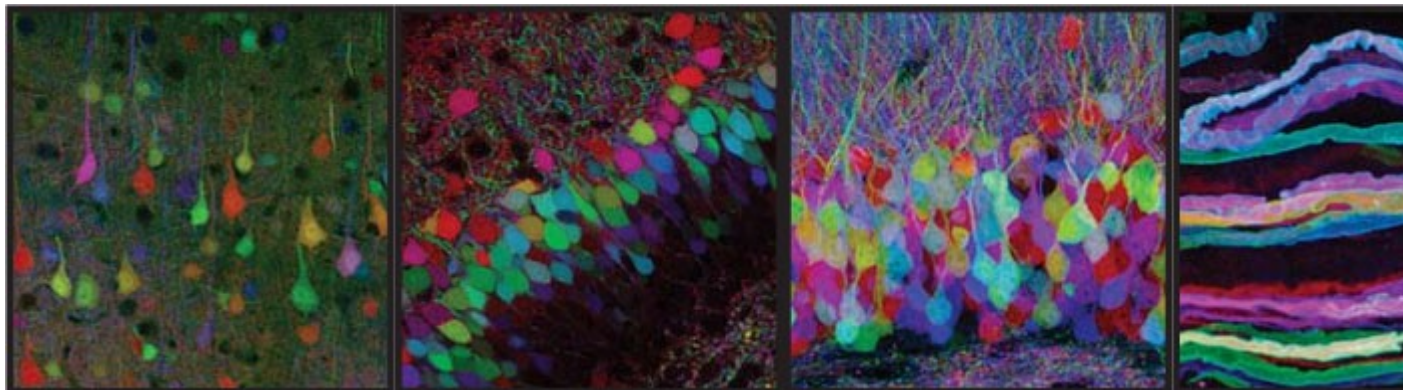
Ezen a ponton két orosz kutató, Mikhail Matz and Sergei Lukyanov, zavarosságot fedezett fel a GFP forradalmában. Úgy kutatták a GFP-t, mint fehérjék a fluoreszkáló korallokban és találtak hat másik fehérjét, egy vöröset, egy kéket és 4 fajta zöldet.

A kívánt vörös fehérje, a DsRed sajnos nagyobb és nehezebb volt, mint a GFP. A DsRed négy aminosav láncból állt egy helyett, és kisebb része volt hasznosítható fluoreszkáló jelnek a biológiai folyamatban. Tsien kutató csoportja megoldotta ezt a problémát, újratervezték a DsRed-et, így már ez a fehérje is stabil és fluoreszkálásra képes, mint egy egyedülálló aminosav lánc, mely könnyen kapcsolódik más fehérjékhez.

Ettől a kisebb fehérjétől Tsien kutató csoportja szintén fejlesztett fehérjéket beszélő nevekkel, mint mPlum, mCherry, mStrawberry, mOrange és mCitrine, a ragyogásuk színe alapján. Számos más kutatók és cégek szintén közreműködtek a fluoreszkáló paletta színeinek bővítéséhez. Így mára, 46 évvel azután, hogy megjelent Shimomura első írása a GFP-ről, van egy kaleidoszkópja a GFP-nek, mint fehérjének, amely képes a szivárvány minden színében pompázni.

A „Brainbow”

A kutatók hármak használtak fel ezek közül a fehérjék közül látványos kísérletükben. Egereken végeztek genetikai módosításokat, hogy előállítsák a változó sárga, cián és vörös színek összegét, az agyukban lévő idegsejteken belül. Ezen színek kombinációja hasonló a számítógép nyomtatóiban használtakkal. Az eredmény az egér agyának fluoreszkálása volt a szivárvány színeiben. A kutatók nyomon tudták követni az idegrosttól az egyéni sejtek sűrű hálózatát az agyban. A kutatók ezt a kísérletet brainbow-nak nevezték el (Brain=agy,Rainbow=szivárvány) .



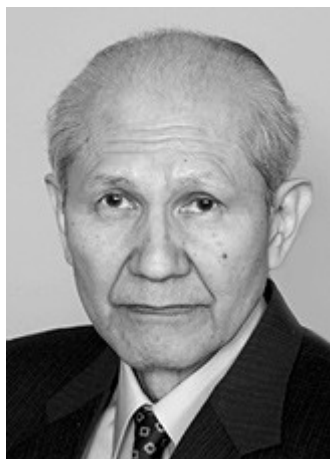
Brainbow technikával megfestett idegsejtek. A módszer a különböző színű fluoreszcens fehérjék véletlenszerű kombinálásán alapszik.

GFP szenzor arzénhez és nehézfémhez

A zöld fluoreszkáló fehérjének vannak biotechnológiai alkalmazásai is, beleértve az arzén érzékelését, még vízben is. Ez egy hatalmas probléma Dél-Kelet-Ázsia egyes részein, ahol természetesen fordul elő arzén, emberek sok ezreit mérgezve. A kutatók rendelkeznek genetikailag módosított arzén-álló baktériummal, mely zölden világít arzén jelenlétében. A tudósok létrehoztak más módosított organizmusokat is, hogy fluoreszkáljanak a robbanékony TNT vagy nehézfém, mint például cadmium vagy horgany jelenlétében. Manapság a játékokban is gyakran találkozhatunk GFP-vel.

Egy megoldatlan rejtély

Amikor Osamu Shimomura tanulmányozni kezdte a biológiailag fluoreszkáló organizmusokat a tengerben, meg akarta érteni, mi teszi őket ragyogóvá. Ez egy tipikus példája, hogy egy alap kutatás egy váratlan tudományos forradalomhoz vezet. Am egy rejtély még megoldatlan maradt. Miért világít az *Aequorea victoria* medúza? Sok organizmus él a tengerben és használ biológiai fluoreszkáló fehérjét összezavarni az ellenségét, ételmet vonzani, vagy a társát csábítani. De senki nem tudja, mi készítette az *Aequorea victoria* medúzát, hogy kifejlessze a GFP-t és az aequorin-t.



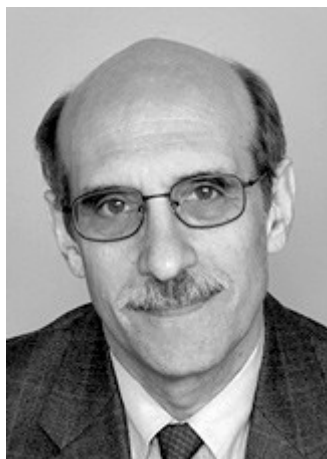
Osamu Shimomura

🕒1/3 része a díjnak

Marine Biological Laboratory (MBL)
Woods Hole, MA, USA; Boston
University Medical School
Massachusetts, MA, USA

Született:

1928. Augusztus 27.
Kyoto, Japán



Martin Chalfie

🕒1/3 része a díjnak

Columbia University
New York, NY, USA

Született:

1947. Január 15.
Chicago, USA



Roger Y. Tsien

🕒1/3 része a díjnak

University of California
San Diego, CA, USA; Howard
Hughes Medical Institute

Született:

1952. Február 1.
New York, USA

Készítette Fenyvesi Virág és Eperjesi Petra 9.c,

a hivatalos angol nyelvű publikálás alapján