



di Mauro Fasano
Presidente della Divisione di Chimica
dei Sistemi Biologici
Dipartimento di Biologia Strutturale
e Funzionale
Università dell'Insubria
mauro.fasano@uninsubria.it

PROTEINE A COLORI

Il Premio Nobel per la Chimica 2008 è stato assegnato a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger J. Tsien per la scoperta e lo sviluppo della Green Fluorescent Protein, una proteina in cui tre residui amminoacidici formano spontaneamente un fluoroforo imidazolinonico.

L'Accademia delle Scienze di Svezia conferirà il prossimo 10 dicembre il Premio Nobel per la Chimica a Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger J. Tsien per la scoperta e lo sviluppo della Green Fluorescent Protein (GFP). La GFP è stata isolata nel 1962 da Shimomura del gruppo di Frank Johnson a Princeton dalla medusa *Aequorea victoria* (Fig. 1) [1]. Questa medusa è bioluminescente e Shimomura aveva il compito di isolare e caratterizzare la proteina responsabile del processo. Tale proteina, che fu isolata e chiamata Aequorina, è in grado di emettere luce blu con intensità dipendente dalla concentrazione di Ca^{2+} . Il risultato fu sorprendente in quanto la medusa emette luce verde! Shimomura si orientò allora ad isolare un'altra proteina caratterizzata da una marcata fluorescenza verde, arrivando a scrivere queste osservazioni sulla GFP: "Abbiamo isolato una proteina che appare verdastra alla luce del sole, ma appena giallina alla luce di una lampadina, e che mostra una fluorescenza verde molto intensa alla luce della lampada UV. Non abbiamo evidenze di reazioni luminescenti da parte di questa sostanza. Stiamo studiando gli spettri di emissione sia di essa che della Aequorina". Successivamente, Shimomura dimostrò che il massimo di emissione di Aequorina ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$) corrisponde ad un massimo

nel visibile dello spettro di eccitazione della GFP. La luce verde emessa da *Aequorea victoria* deriva pertanto da un trasferimento di energia non radiativo tra Aequorina e GFP.

A differenza di altre proteine fluorescenti o chemiluminescenti, le proprietà ottiche della GFP non sono dovute a gruppi prostetici, bensì alla formazione intramolecolare di un fluoroforo a partire da un motivo Serina(Treonina)-Tirosina-Glicina interno alla struttura primaria [2]. L'azoto del legame peptidico della Glicina 67, conservata in tutti i mutanti di GFP che mantengono le proprietà ottiche, conduce attacco nucleofilo sul carbonio carbonilico del residuo Serina 65 portando alla formazione di un anello imidazolinonico [2]. La successiva ossidazione spontanea del legame $\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta$ della Tiro-sina 66 estende la coniugazione all'anello aromatico con la formazione di *p*-idrossibenzilidenimidazolinone (Fig. 2). La coniugazione spostata così il massimo di assorbimento a 400 nm con un minore, ma significativo, picco a 470 nm [2]. È interessante notare come questa reazione intramolecolare avvenga spontaneamente per effetto del folding della catena polipeptidica che porta il gruppo carbonilico del residuo 65 (serina o treonina) estremamente vicino alla glicina 67, in virtù del suo ridotto ingombro sterico. Ne consegue che l'espressione di GFP in organismi eterologhi è sufficiente

a produrre la proteina spettroscopicamente attiva, senza che sia necessaria l'interazione con gruppi prostetici. Siccome durante l'ossidazione spontanea del gruppo *p*-idrossibenilico della Tirosina 66 si forma presumibilmente H_2O_2 in quantità stechiometrica, l'espressione di GFP a livelli molto elevati può risultare tossica per la cellula. Nonostante ciò, l'espressione a livelli sufficienti per poterne rilevare la fluorescenza è risultata perfettamente tollerata dai numerosi organismi in cui essa è stata espressa, a differenza di altri fluorofori come la fluoresceina isotiocianato [3]. La formazione spontanea di un fluoroforo dalla stessa catena polipeptidica e la sua bassa tossicità hanno reso GFP molto versatile; essa può infatti essere utilizzata come tracciante semplicemente clonando la sua sequenza a monte o a valle della proteina di cui si vuole osservare la localizzazione cellulare, ottenendo così proteine di fusione che conservano le proprietà ottiche di GFP. Se il gene di GFP viene clonato a valle del gene dell'actina, la proteina che polimerizzando forma i filamenti che costituiscono il citoscheletro, sarà possibile, ad esempio, visualizzare il citoscheletro mediante microscopia a fluorescenza (Fig. 3). Potenzialmente, qualsiasi processo cellulare può essere visualizzato con risoluzione spazio-temporale in qualsiasi sistema vivente. Utilizzando una tecnica di microimaging nota come Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) è possibile, inoltre, ottenere informazioni a livello cinetico. FLIM è una tecnica che descrive la distribuzione spaziale di stati eccitati con emivita dell'ordine del nanosecondo. Se la proteina di fusione interagisce con una proteina immobilizzata all'interno di una struttura cellulare, sarà possibile localizzare l'emissione se la fluorescenza viene rilevata per un tempo inferiore al tempo di residenza della

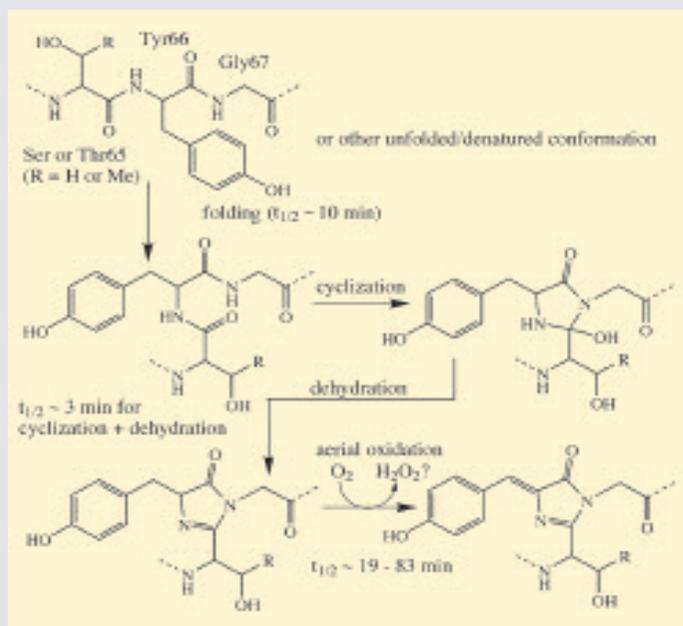


Fig. 2 - Meccanismo proposto per la biosintesi intramolecolare del fluoroforo di GFP [2]

proteina di fusione del complesso; in caso contrario, GFP diffonderà nel citosol e la sua emissione risulterà conseguentemente diffusa. Di conseguenza sarà possibile determinare non solo l'avvenuta interazione delle proteine a formare il complesso, ma anche il tempo di emivita del complesso stesso.

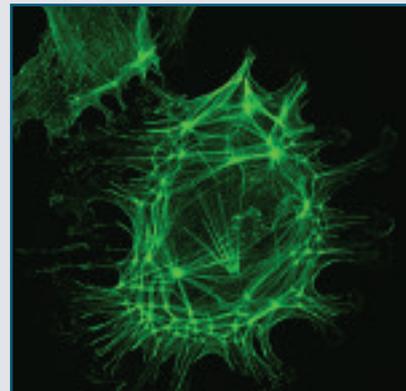


Fig. 3 - La proteina di fusione GFP-actina polimerizza insieme all'actina a formare il citoscheletro che può essere visualizzato mediante microscopia a fluorescenza

GFP viene anche ampiamente utilizzata come gene *reporter*. Se la sequenza codificante per GFP viene clonata a valle del promotore della proteina di cui si vuole valutare l'espressione, essa si troverà sotto lo stesso controllo trascrizionale della proteina di interesse e verrà espressa agli stessi livelli [3]. La tecnica può essere utilizzata anche *in vivo*. Generando modelli murini in cui GFP si trovi sotto il controllo di un elemento regolatore di cui si voglia caratterizzare la funzione, la selezione della progenie trasformata sarà possibile sulla base dell'osservazione della fluorescenza di GFP nell'animale intero (Fig. 4) [4].

La struttura della GFP fu determinata mediante diffrazione di raggi x alla risoluzione di 1,9 Å e mostra un motivo beta-barrel formato da 11 tratti a struttura secondaria β con un'elica coassiale che attraversa il motivo e forma il cromoforo (Fig. 5) [5]. I residui interni sono sorprendentemente polari e la loro sostituzione con residui aromatici o eterociclici (ad esempio Treonina 203 con Tirosina o Istitina) ha permesso di modificare lo spettro di assorbimento e di emissione con un sostanziale spostamento batocromico [2] ed un aumento di intensità dell'emissione; per effetto di un'interazione π - π tra l'anello aromatico della Tirosina 203 ed il fluoroforo, il mutante Thr203Tyr emette nel giallo e prende il nome di YFP (Yellow Fluorescent Protein). La sostituzione del residuo critico Tirosina 66 con Istitina o Triptofano, invece, porta alla formazione di cromofori strutturalmente diversi con minore o maggiore estensione della coniugazione, rispettivamente. Il mutante Tyr66His è in grado di emettere nel blu ed è pertanto definito BFP (Blue Fluorescent Protein), mentre Tyr66Trp emette nell'azzurro (CFP, Cyan Fluorescent Protein). La presenza del gruppo indolico, con elevato ingombro sterico, ha però rese necessarie altre sostituzioni allo scopo di ottenere una proteina con intensità di emissione ragionevole [2]. La Fig. 6 mostra una capsula di Petri, realizzata dal laboratorio di Tsien, su cui sono state piastrate diverse colture di *Escherichia coli*, ciascuna delle quali esprime un diverso mutante di GFP che



Fig. 4 - Questi neonati di topi risultano in parte fluorescenti in quanto derivati da cellule staminali transfettate in modo da esprimere GFP. La fluorescenza permette di identificare gli individui transgenici [4]

emette a diverse lunghezze d'onda, oltre ad una proteina estratta da un corallo che emette nel rosso.

La creazione di un grande numero di mutanti di GFP con proprietà spettroscopiche diverse ha permesso di localizzare e seguire nel tempo più di una proteina contemporaneamente, visualizzando i diversi colori mediante microscopia laser confocale. Tuttavia, l'applicazione più interessante dei mutanti di GFP è senz'altro il Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). FRET è un trasferimento non radiativo di energia tra due dipoli elettronici che avviene con una costante di velocità inversamente proporzionale alla sesta potenza della distanza tra di essi. In questo modo è possibile osservare il fenomeno FRET qualora i due dipoli si trovino a meno di 100 Å di distanza ad indicare co-localizzazione oppure, ancora più interessante dal punto di vista biochimico, interazione proteina-proteina. Quando due proteine X e Y interagiscono tra di loro, X fusa ad una GFP il cui spettro di emissione sia sovrapposto allo spettro di assorbimento di una seconda GFP fusa ad Y, si osserverà un marcato effetto FRET a testimoniare l'avvenuta interazione. Il principio del FRET ha permesso a Tsien di sviluppare una tecnica per misurare la concentrazione intracellulare di Ca^{2+} a livelli non misurabili con le tecniche precedentemente disponibili [6]. La proteina BFP o CFP viene espressa fusa alla calmodulina, una proteina che lega cooperativamente Ca^{2+} con una conseguente variazione conformazionale; insieme a questa viene espressa una proteina di fusione in cui YFP o GFP viene attaccata al dominio che lega la calmodulina di M13, una chinasi che fosforila la miosina. In seguito all'entrata di Ca^{2+} nella cellula, in conseguenza dell'attivazione di specifiche proteine canale o in

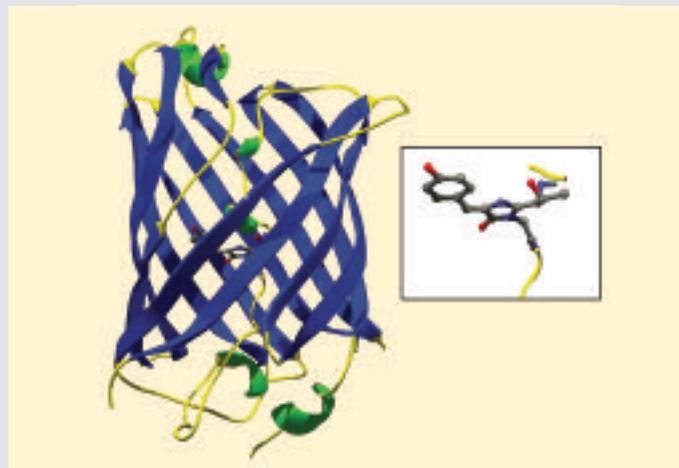


Fig. 5 - Struttura tridimensionale della GFP. La struttura terziaria è formata da 11 tratti estesi che formano un β -barrel attraversato da un passaggio parzialmente avvolto ad α -elica al centro del quale si trova il fluoroforo formato dai residui Thr65-Tyr66-Gly67 (nell'inserto). L'immagine è stata realizzata a partire dalle coordinate depositate in Protein Data Bank con il codice 1EMA [5]

seguito al rilascio dai depositi intracellulari del reticolo endoplasmatico, calmodulina assume la conformazione che le permette di interagire con M13. Di conseguenza, i due centri GFP-simili si verranno a trovare a breve distanza e si osserverà il fenomeno FRET.

Quelle descritte in poche pagine sono solo alcune delle idee originali e delle applicazioni che sono state sviluppate in prima persona da Osamu Shimomura, da Martin Chalfie, da Roger J. Tsien e da molti altri dall'anno della scoperta di GFP ad oggi. Il mondo delle applicazioni che ogni giorno vengono proposte è ovviamente molto più vasto. Il premio Nobel per la Chimica 2008 viene dunque ad essere un riconoscimento ad una scoperta che ha dato il via ad una rivoluzione nelle scienze della vita, la rivoluzione delle proteine a colori.

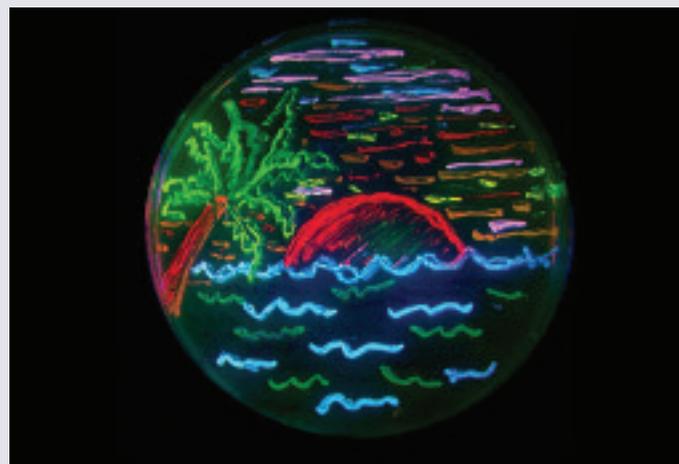


Fig. 6 - Un'immagine che rappresenta la spiaggia di San Diego ottenuta mediante batteri che esprimono sette diversi mutanti di GFP più una proteina rossa ottenuta da un corallo. L'immagine è stata ottenuta nel laboratorio di Roger Tsien nel 2006

Bibliografia

- [1] O. Shimomura *et al.*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 1962, **59**, 223.
- [2] R. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, **67**, 509.
- [3] M. Chalfie *et al.*, *Science*, 1994, **263**, 802.

- [4] J.M. Oatley, R.L. Brinster, *Methods Enzymol.*, 2006, **419**, 259.
- [5] M. Ormò *et al.*, *Science*, 1996, **273**, 1392.
- [6] A. Miyawaki *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, **96**, 2135.