

STORIA DELLA GREEN FLUORESCENTE PROTEIN. PREMIO NOBEL PER LA CHIMICA 2008

di Laura Teodori, Luigi Campanella

Quest'anno il Premio Nobel per la Chimica è stato assegnato a Roger Tsien, professore presso l'Università di San Diego, California, a Martin Chalfie, della Columbia University, e a Osamu Shimomura, ricercatore presso il Marine Biological Laboratory in Massachusetts, "for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP". Con questo premio si è voluto riconoscere il contributo della GFP nella comprensione dei meccanismi che regolano la vita cellulare.

La Green Fluorescent Protein (GFP) fu scoperta già nel 1962 (1) in una medusa, l'*Aequorea victoria* (così chiamata perché raccolta nella baia dell'isola Victoria in Canada). Una proteina presente nell'*Aequorea victoria*, chiamata *aequorina*, emette luce blu quando si lega al calcio; questa luce blu è assorbita dalla GFP, che a sua volta emette una luce verde. Sia l'*aequorina* che la GFP si trovano in piccoli organelli situati nell'anello intorno all'ombrello della medusa (2). Nel 1994 la GFP è stata clonata e da allora, a scopi scientifici, industriali e commerciali, cellule, alghe, batteri, vermi e perfino conigli, maiali o pesci sono stati resi fluorescenti. Questa tecnologia è così avanzata e così utile che la GFP è stata definita il microscopio del terzo millennio. Il suo impatto nel campo delle biotecnologie e della biomedicina è enorme.

Osamu Shimomura è stato il primo a isolare la GFP e a scoprire la sua fluorescenza verde. Nel 1960, dal Giappone si recò a lavorare a Princeton proprio per studiare il fenomeno della bioluminescenza. Tuttavia l'interesse di Shimomura per *Aequorea* era diretto esclusivamente allo studio e caratterizzazione dal punto di vista chimico e biochimico del fenomeno della bioluminescenza; mai aveva pensato di utilizzare la GFP come molecola tracciante. Fu Douglas Prasher il primo a intuire la possibilità di usare la GFP come tracciante e questa intuizione aprì la strada alla straordinaria rivo-

luzione che ha portato la GFP a meritare il premio Nobel (3,4). Egli pensò di utilizzarla come tracciante per studiare l'espressione e il destino delle proteine. Capì, infatti, che se avesse potuto legare la GFP a una determinata proteina, ad esempio l'emoglobina, sarebbe stato in grado di identificare questa proteina e seguire il corso della sua esistenza. È infatti noto che, quando in un organismo è necessaria una determinata proteina, si attiva un processo di produzione che parte dall'attivazione e successiva lettura del gene, alla cui fine si trova una sequenza - denominata "stop codon" - che informa che la sequenza genica da copiare è finita. Doug Prasher pensò che se fosse stato possibile, attraverso tecniche biomolecolari, inserire il gene della GFP alla fine del gene dell'emoglobina prima dello stop codon - in modo tale che, prima di arrivare allo stop codon venisse copiato anche il gene della GFP -, la proteina in questione sarebbe stata fluorescente; era il 1987. Shimomura aveva mostrato circa 10 anni prima che la GFP era una piccola proteina. Ciò era di fondamentale importanza, perché in tal caso la GFP avrebbe interferito poco o niente con le funzioni e proprietà della proteina a cui veniva attaccata. La GFP, al contrario di molte altre molecole fluorescenti, non necessita di alcun substrato o enzima per fluorescere. L'*aequorina*, ad esempio, richiede il calcio. Prasher isolò il gene dalla medusa e lo fece esprimere da batteri, inoltre caratterizzò la sequenza dei 238 aminoacidi presenti nella GFP. Ma il suo lavoro si fermò qui perché finirono i suoi fondi il suo contratto non fu più rinnovato. Prasher, infatti, non lavora più nel mondo scientifico, è autista per un'agenzia automobilistica in Huntsville.

Fu Martin Chalfie a fare il passo successivo. Una studentessa del suo gruppo, Ghia Euskirchen, riuscì a incorporare il gene della GFP, che Chalfie aveva avuto da Prasher, dentro *E. coli*, cosicché diventasse verde quando veniva illuminata con luce blu. Era il 1994 e per la prima

volta la GFP era stata espressa da cellule viventi transgeniche (5,6).

Un altro passo avanti fu fatto da Sergey Lukyanov, che trovò alcune proteine simili alla GFP nei coralli. Nessuno ci aveva mai pensato, perché i coralli non sono bioluminescenti. Lukyanov trovò che alcune proteine avevano una fluorescenza rossa e un meccanismo simile a quello della GFP (7). Questa scoperta aprì la

strada per la ricerca di molte altre proteine simili e a basso costo. Ma il maggior contributo alla comprensione del funzionamento della GFP venne da Roger Tsien. Egli mise a punto nuove tecniche, produsse molte proteine mutanti, che emettono fluorescenza più rapidamente, con maggiore intensità e anche di diversi colori (8). Uno dei più fenomenali metodi di *cell tracking* era stato inventato.

LAURA TEODORI

Laura Teodori è primo ricercatore presso BAS BIOTEC-MED ENEA-Casaccia

Professore a Contratto presso la Scuola di Specializzazione di Oncologia- Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

È Presidente del Membership Committee dell'International Society for the Advancement of Cytometry-ISAC. www.isac-net.org Bethesda, MD USA

LT, Dipartimento di Biotecnologie, Agroindustria e Protezione della Salute, ENEA

Contatti:

E-mail: Teodori@casaccia.enea.it

Ufficio : +39 06 30484930

<http://profiles.within3.com/teodori>

Mobile (servizio): +39 3208528534

LUIGI CAMPANELLA

Vedere pag. 26

Bibliografia

- 1) Shimomura, O, Johnson FH, Saiga Y. 1062. J. Cell Comp. Physiol. 59:223-239.
- 2) Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. FEBS Lett. 104, 220-222.
- 3) Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast M. J. Cormier (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene 111, 229-233
- 4) Cody, C. W., D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast W. W. Ward (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. Biochemistry 32, 1212-1218
- 5) Chalfie M. Green fluorescent protein. Photochem Photobiol. 1995 Oct;62(4):651-6. Review.
- 6) Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 1994 Feb 11;263(5148):802-5.
- 7) Lukyanov, K. A., A. F. Fradkov, N. G. Gurskaya, M. V. Matz, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, M. L. Markelov, A. G. Zaraisky, X. Zhao, Y. Fang, W. Tan S. A. Lukyanov (2000) Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. J. Biol. Chem. 275, 25879-25882.
- 8) Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509-544.