

Radim Homolka; Veronika Kozáková; Matyáš Suja; Jaromír Plášek
Fluorescenční proteiny - zářící makromolekuly odhalující buněčná tajemství

Pokroky matematiky, fyziky a astronomie, Vol. 63 (2018), No. 4, 245–262

Persistent URL: <http://dml.cz/dmlcz/147583>

Terms of use:

© Jednota českých matematiků a fyziků, 2018

Institute of Mathematics of the Czech Academy of Sciences provides access to digitized documents strictly for personal use. Each copy of any part of this document must contain these *Terms of use*.



This document has been digitized, optimized for electronic delivery and stamped with digital signature within the project *DML-CZ: The Czech Digital Mathematics Library*
<http://dml.cz>

Fluorescenční proteiny – zářící makromolekuly odhalující buněčná tajemství

Radim Homolka, Veronika Kozáková, Matyáš Suja, Jaromír Plášek

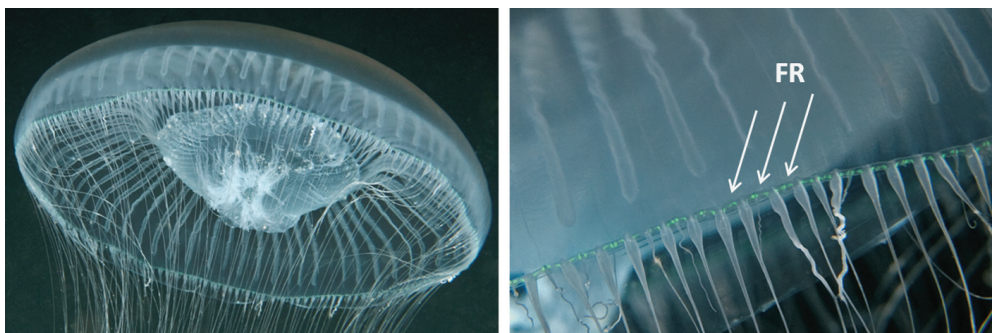
Abstrakt. Fluorescenční proteiny (FP)¹ jsou užitečným nástrojem pro studium biologických procesů na molekulární úrovni přímo v živých buňkách. Poprvé byly tyto proteiny izolovány a studovány před více než půl stoletím. Postupem času byly objasněny jejich funkce, struktura a vlastnosti a byla popsána řada možností jejich využití v biomedicíně výzkumu. Cílem tohoto článku je seznámit čtenáře se základními poznatky o struktuře a optických vlastnostech této mimořádně zajímavé skupiny bílkovin i hlavními směry jejich praktických aplikací.

Příběh, který v roce 2008 vyvrcholil udělením Nobelovy ceny, začal v padesátých letech 20. století, když Osamu Šimomura (Shimomura) studoval bioluminiscenci medúz *Aequorea victoria* [42]. Podařilo se mu izolovat protein aequorin. Ten v přítomnosti vápenatých iontů emituje luminiscenci modré barvy, která pochází z excitovaného stavu vytvořeného oxidací jedné z podjednotek tohoto fotoproteinu. Během purifikace aequorinu však Šimomura objevil ještě jeden protein, který po excitaci ultrafialovým zářením vykazoval silnou fluorescenci zelené barvy. Vžilo se proto pro něj pojmenování Green Fluorescent Protein (zelený fluorescenční protein, s anglickou zkratkou GFP, která je běžně používána i v českých textech). Výše zmíněné dva proteiny se podílí na zeleném světélkování medúz rodu *Aequorea*, kterému předchází nezářivý přenos excitační energie mezi donorem aequorinem a fluorochromem GFP, jenž díky tomu následně emituje zelené světlo [9]. Samotný GFP však na rozdíl od dříve poznáných bioluminiscenčních proteinů nepotřebuje žádnou energii z chemických reakcí. Jeho fluorescenci lze vybudit ozářením ultrafialovým nebo modrým světlem.

Bezprostředně po objevu GFP si nikdo nedokázal představit, jak tato molekula v budoucnu obohatí možnosti studia širokého spektra procesů probíhajících v živých buňkách. Zatímco stále ještě v podstatě není známo, jaký význam má světélkování GFP pro samotné medúzy, již koncem 80. let byl analyzován gen tohoto proteinu. Krátce nato si americký vědec Martin Chalfie uvědomil, že připojením GFP k vybranému proteinu určité buňky by bylo možné vytvořit geneticky kódovanou značku, jejíž zelená fluorescence by indikovala, kdy a kde se v dané buňce začíná syntetizovat protein s připojeným GFP. V 90. letech se mu to ve spolupráci s G. Euskirchenovou skutečně podařilo realizovat v bakterii *Escherichia coli* a červu *háďátku obecném* (*Caenorhabditis elegans*). Tím bylo také demonstrováno, že k vytvoření funkční formy GFP není třeba žádný specifický enzymatický aparát medúzy *A. victoria* [15], [56],

¹Výrazně méně často se jim též říká fluorescentní nebo fluoreskující proteiny.

Mgr. RADIM HOMOLKA, Bc. VERONIKA KOZÁKOVÁ, Bc. MATYÁŠ SUJA, Prof. RNDr. JAROMÍR PLÁŠEK, CSc., Matematicko-fyzikální fakulta UK, Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2, e-mail: radimhomolka@seznam.cz, veronkakozak@gmail.com, Matyas.Suja@seznam.cz, plasek@karlov.mff.cuni.cz



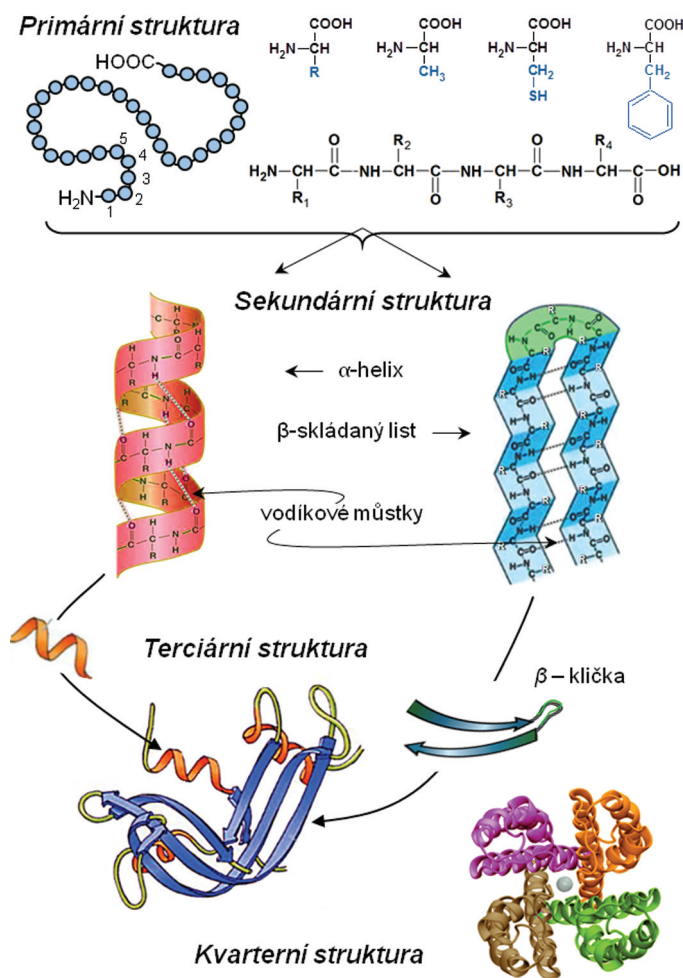
Obr. 1. Medúza *Aequorea victoria*. Vlevo: Pohled na spodní část zvonovitého „těla“ s ústy uprostřed a okolním paprskovitým systémem kanálků vycházejících z trávicí dutiny. Na okraji zvonu jsou smyslové orgány a chapadla. Vpravo: Zvětšený pohled na okraj zvonu se zeleně fluoreskujícími fotoreceptory (FR). Namodralá barva celé medúzy není luminiscencí, nýbrž podobně jako v případě mnoha dalších fotografií medúz se jedná pouze o světlo použité k osvětlení fotografovaného objektu, které je odraženo nebo rozptýlováno jeho odlišnými strukturálními elementy. ©Merry Passage, <http://diver.net/bbs/posts003/86092.shtml>. Publikováno se svolením autorky

[37]. Od této chvíle se již začaly objevovat nejrůznější možnosti aplikací GFP, jejichž počet záhy prudce narostl. Veškeré chemické procesy v živých buňkách jsou v principu regulovány určitými bílkovinami, jichž existují desítky tisíc a každá s jinou specifickou funkcí. GFP se proto stal velmi cenným nástrojem umožňujícím jejich studium pomocí světelné fluorescenční mikroskopie.

Rozsah využití GFP se značně rozšířil poté, co se v polovině 90. let podařilo Rogeru Tsienovi připravit řadu modifikací GFP lišících se navzájem např. emisními spektry nebo teplotní stabilitou [13], [46]. V roce 2008 pak Osamu Šimomura, Martin Chalfie a Roger Tsien obdrželi Nobelovu cenu za chemii za „objev a rozvoj zeleného fluorescenčního proteinu“ [11]. O aktuálním významu fluorescenčních proteinů v řadě oblastí biomedicínského výzkumu svědčí mimo jiné i to, že počet referencí získaných v databázi Web of Science s klíčovými slovy „fluoresc* protein*“ se v době dokončení tohoto článku těsně přiblížil k 54 tisícům. V počtech citací mezi nimi nikterak překvapivě zauímají čelní místo právě práce nobelistů Chalfieho a Tsiena [15], [46], těsně následované článkem o fotoaktivovatelných fluorescenčních proteinech, které souvisí s Nobelovou cenou udělenou v roce 2014 za rozvoj metod superrezoluční fluorescenční mikroskopie [5].

Struktura proteinů

Bez ohledu na to, jak odlišné biologické role mohou různé proteiny zastávat, všechny mají společnou chemickou povahu. Jedná se o polypeptidové řetězce vytvořené z pouhých 20 různých typů aminokyselin, jejichž konkrétní sekvence (tzv. primární struktura proteinu) předurčují unikátní výsledné prostorové a fyzikální vlastnosti dané makromolekuly. Základní fakta o stavbě těchto makromolekul jsou shrnuta na obr. 2 v minimálním rozsahu potřebném pro následující výklad specifických vlastností fluorescenčních proteinů.



Obr. 2. Čtyři úrovně struktury proteinů. Na horním okraji obrázku jsou zleva doprava chemické vzorce obecné struktury aminokyseliny (R značí libovolnou vedlejší skupinu, tzv. aminokyselinový zbytek) a dále alaninu, cysteinu a fenylalaninu jako příklady nepolárních, polárních a aromatických aminokyselin. Pod nimi je vzorec polypeptidového řetězce aminokyselin propojených peptidovými vazbami, jenž na jedné straně končí volnou aminoskupinou NH₂ (N-konec) a na straně opačné karboxylovou skupinou COOH (C-konec). Pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci číslujeme směrem od N-konce

Mezi -NH a C=O skupinami nacházejícími se podél polypeptidového řetězce mohou vzniknout vodíkové můstky, které s přispěním interakcí mezi blízkými aminokyselinovými zbytky stabilizují prostorové uspořádání určitých segmentů řetězce v některé z možných forem sekundární struktury. Jedná se buď o šroubovici (nejčastěji α -helix) nebo β -skládaný list tvořený antiparalelními vlákny podélně spojenými vodíkovými můstky a na koncích zpětnými β -kličkami. Proteiny dále obsahují zpětné kličky (β -kličky a vlásenkové ohyby), což jsou úseky polypeptidového vlákna spojující domény sekundárních struktur v prostorovém uspořádání podmíněném interakcemi mezi ved-

lejšími skupinami řetězců (elektrostatické interakce, vodíkové můstky, SH-můstky, nepolární interakce). Toto prostorové uspořádání se nazývá terciární struktura proteinu. Poslední stupeň v této hierarchii představují kvarterní struktury proteinů složených z několika podjednotek, které nejsou vzájemně propojeny peptidovými vazbami. Jako příklad je uvedena kvarterní struktura draslíkového iontového kanálu KcsA z buněčných membrán bakterií.

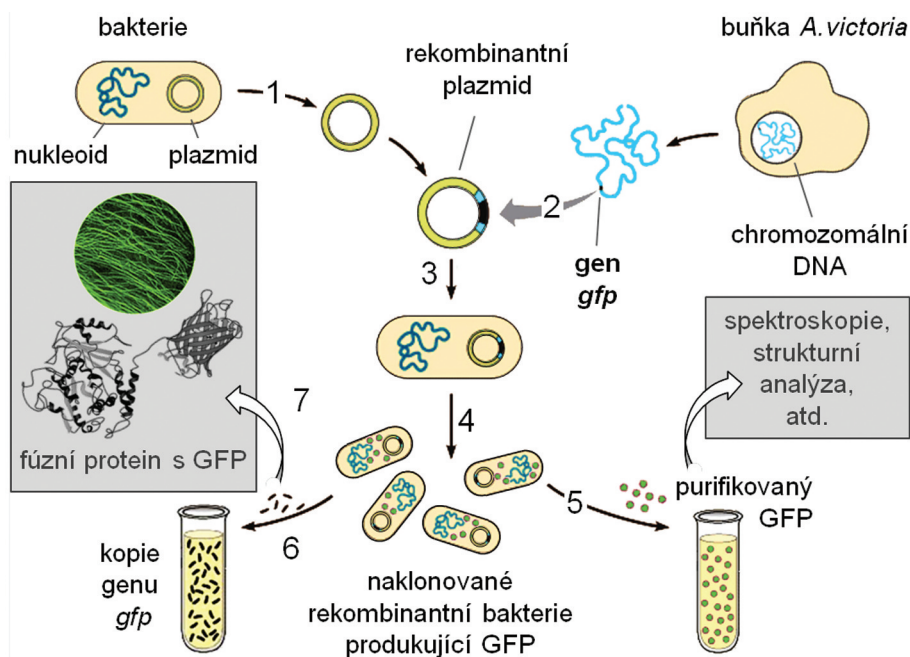
Buněčná syntéza proteinů a genové inženýrství

V každé buňce se nachází velké množství různých typů proteinů, lišících se v první řadě sekvencí svých aminokyselin. Informace o této primární struktuře je uchovávána v molekulách deoxyribonukleových kyselin (DNA). Mezikrokem při syntéze proteinů podle sekvence nukleotidů DNA je tvorba jednovláknových molekul ribonukleových kyselin mRNA (messenger RNA) v procesu nazývaném transkripce. Tato mRNA následně slouží jako předloha, podle níž následně probíhá translace, při které je syntetizován polypeptidový řetězec aminokyselin konkrétního proteinu. Úsek DNA, který kóduje mRNA určitého proteinu, lze zjednodušeně označit jako gen. Celou kaskádu dějů, při nichž je dle funkčních úseků (exonů) daného genu syntetizován výsledný protein, pak označujeme jako expresi genetické informace [1].

Genové (genetické) inženýrství představuje rozsáhlou oblast molekulární biologie, zabývající se umělými rekombinacemi syntetických a přirozených nukleových kyselin s cílem vytvořit pomocí pokročilých DNA technik nové biologické systémy jak pro základní výzkum zaměřený na studium struktury, funkce a exprese genů, tak pro různé biotechnologické aplikace. Pokud změníme sekvenci nukleotidů určitého úseku genu, ať nahodilou mutací nebo její cílenou modifikací, dojde k odpovídající změně primární struktury exprimovaného proteinu. Ta může mít někdy zcela nepodstatný vliv na jeho vlastnosti a funkci, ale jindy naopak vliv tak zásadní, že vzniklý protein vykazuje výrazně odlišné vlastnosti nebo je dokonce zcela nefunkční. Speciální kategorií genetických manipulací představuje vytváření tzv. transgenních organismů, k nimž patří také organismy produkující rekombinantní proteiny exprimované s geneticky připojenými fluorescenčními proteiny.

Jelikož celý rozsáhlý výzkum týkající se vlastností fluorescenčních proteinů a jejich využití při studiu živých buněk by nebyl bez genetického inženýrství možný, zmíníme se zde stručně také o metodách, kterými lze zasáhnout do genomu organismu. Často se za tímto účelem využívají specifické enzymy cílící na DNA nebo též tzv. plazmidy (kruhové molekuly DNA běžně se vyskytující v bakteriích), do nichž byl vložen vybraný cizorodý gen pomocí série enzymatických reakcí uskutečněných *in vitro*. Pro modifikaci buněčného genomu je dále možné využít některé bakteriofágy, případně další nástroje. Na obr. 3 je schematicky znázorněno, jak se provádí klonování GFP v bakteriích pomocí bakteriálních plazmidů. Množící se rekombinantní bakterie s genem *gfp* pak začnou sloužit jako chemické továrny produkující v dostatečně velkém množství fluorescenční protein vhodný pro navazující spektroskopickou analýzu nebo krystalografické studium jeho struktury.

Geny fluorescenčních proteinů lze metodami genového inženýrství zabudovat i do složitějších organismů, než jsou bakterie, a vytvořit tak například fluoreskující myši nebo rostliny. Genové inženýrství rovněž umožňuje vložit do genomu buněk určitého



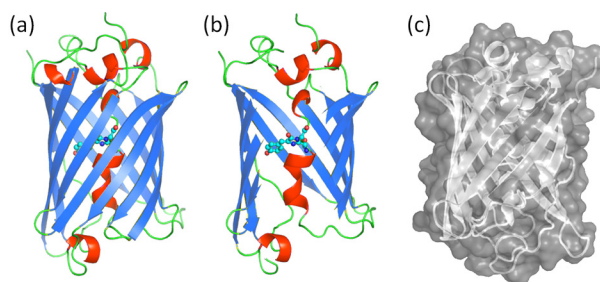
Obr. 3. Schematické znázornění metody klonování GFP pomocí bakteriálních plazmidů: (1) Izolace plazmidové DNA. (2) Izolace fragmentu DNA s genem *gfp* a jeho zabudování do plazmidu. (3) Vložení rekombinantních plazmidů do bakteriálních buněk. (4) Klonování rekombinantních bakterií obsahujících plasmidy s *gfp* genem, které ve svém cytosolu exprimují GFP. (5) Izolování vyrobeného GFP a jeho purifikace. (6) Izolování kopií genu *gfp* z klonovaných rekombinantních bakterií. (7) Vložení genu *gfp* do buněk jiného organismu, které pak produkují fluorescenčně označené fúzní proteiny, jejichž vnitrobuněčnou lokalizaci lze zobrazit fluorescenční mikroskopií (v zorném poli je příklad cytoskeletu zviditelněného pomocí GFP fúzovaného s α -tubulinem)

organismu chimérní gen jejich vybraného proteinu spojený s genem fluorescenčního proteinu. Uvnitř takto geneticky modifikovaných buněk poté dojde k expresi fúzních proteinů, jejichž primární strukturu tvoří za sebou seřazené sekvence vybraného původního proteinu buňky a připojeného fluorescenčního proteinu. Expresí proteinů s geneticky kódovanými fluorescenčními značkami pak umožňuje studovat jejich vnitrobuněčnou lokalizaci, dynamiku či interakci s jinými buněčnými proteiny pomocí fluorescenční mikroskopie.

Struktura zeleného fluorescenčního proteinu a jeho fluoroforu

Organické fluorofory, resp. fluorochromy² jsou mnohoatomové molekuly (zpravidla obsahující poměrně rozsáhlé systémy konjugovaných dvojných vazeb), u kterých dochází po absorpci UV-VIS záření k zániku excitovaných elektronových stavů vyzářením fluo-

²Jako fluorochrom bývá označováno libovolné fluorescenční barvivo sloužící k fluorescenčnímu obarvení studovaných objektů. Fluoroforem je (analogicky k definici chromoforu) konkrétní molekula nebo její funkční skupina schopná absorbovat světelné záření a následně emitovat fluorescenci.

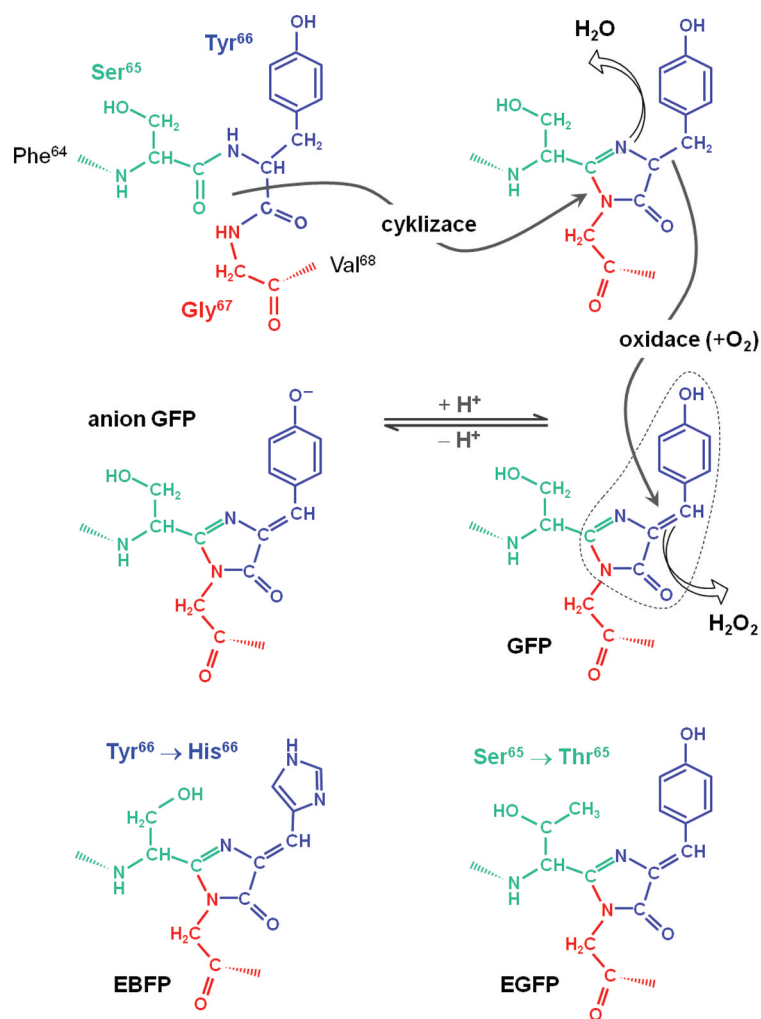


Obr. 4. Prostorová struktura zeleného fluorescenčního proteinu z *A. victoria*: Protein Data Bank – PDB: 1GFL. (a) Skica terciární struktury GFP; (b) odkrytý pohled na fluorofor lokalizovaný na centrální šroubovici (upraveno podle R. Keller, Wikimedia Commons); (c) superpozice obrazu povrchu molekuly GFP a skici jeho terciární struktury (upraveno podle [52])

rescence. Abychom patřičně ocenili výjimečnost GFP a dalších fluorescenčních proteinů, připomeňme si, že za fluorescenci běžných proteinů jsou zodpovědné tři aminokyseliny s aromatickým jádrem – tryptofan (Trp), tyrosin (Tyr) a fenylalanin (Phe), jejichž absorpční spektra, a tudíž i excitační spektra fluorescence leží v UV oblasti mezi 240–300 nm a příslušná emisní spektra jsou posunuta směrem k větším vlnovým délkám (280 až 400 nm) [22].

Přírodní zelený fluorescenční protein obsahuje 238 aminokyselin o celkové molekulové hmotnosti 26,9 kDa. Skládá se z centrální šroubovice obklopené jedenácti antiparalelními β -řetězci ve tvaru téměř přesného válce (β -barelu) o průměru 2,4 nm a výšce 4,2 nm [56], [54], obr. 4. V případě fluorescenčních proteinů vytvořila příroda neobvyklou konfiguraci řetězce tří aminokyselin (Ser⁶⁵–Tyr⁶⁶–Gly⁶⁷), které se nacházejí na centrální šroubovici uvnitř β -barelu, jímž jsou fixovány v konfiguraci umožňující sérii posttranslačních chemických reakcí probíhajících po ukončení syntézy peptidového řetězce a jeho sbalení do finální terciární struktury. Posttranslační syntéza fluoroforu probíhá ve dvou krocích znázorněných na obr. 5. Začíná rychlou spontánní autokatalytickou cyklizační reakcí mezi rezidui aminokyselin Ser⁶⁵ a Gly⁶⁷, při které vznikne nefluoreskující chromofor imidazolin-5-on s pětičlenným heterocyklem. Následuje oxidace bočního řetězce aromatického rezidua Tyr⁶⁶ vyžadující přítomnost molekulárního kyslíku, jenž odebere dva vodíky z C–C vazby spojující imidazolin s tyrosinem přeměnou na peroxid vodíku. Díky přidané dvojně vazbě se podstatně rozšíří systém konjugovaných elektronových orbitalů, čímž konečně vznikne fluorofor 4-(p-hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on [7], [45]. Tato fáze maturace GFP je mnohem pomalejší než předcházející cyklizace a v konečném důsledku tak určuje prodlevu mezi syntézou primárního polypeptidového řetězce a jeho proměnou ve fluorescenční molekulu GFP trvající cca 2–4 hodiny [13].

Významným krokem na cestě k dnešním mnohačetným aplikacím fluorescenčních proteinů při studiu živých buněk byl objev, že plně funkční GFP může vzniknout i v transgenních organismech zcela odlišných od *A. victoria* [15], [14]. Jak bylo později opakovaně potvrzeno, na rozdíl od jiných přírodních barviv zodpovědných za barvy těl živočichů nebo květin není syntéza fluoroforu GFP výsledkem kaskády enzymatických reakcí vyžadujících zapojení dalších specifických proteinů. Unikátní sekundární struktura GFP a příbuzných fluorescenčních proteinů funguje sama jako katalyzátor syntézy svého fluoroforu.



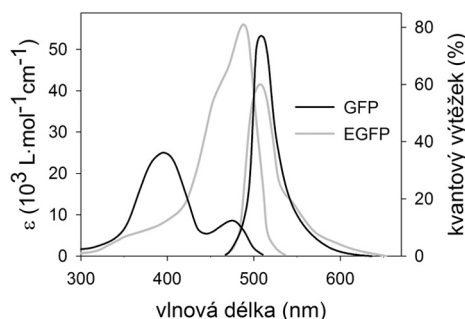
Obr. 5. Chemická struktura fluoroforů zeleného fluorescenčního proteinu GFP, zdokonaleného („enhanced“) zeleného fluorescenčního proteinu EGFP a zdokonaleného modrého fluorescenčního proteinu EBFP. Nahoře: Schéma dvoustupňové posttranslační syntézy fluoroforu GFP z tripeptidu Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷. Dole: mutantní fluorofory EBFP a EGFP

Specifické prostorové uspořádání β -barelu má pro vznik fluoroforu GFP zásadní význam, jak lze vyvodit z toho, že zkrácení jeho polypeptidového řetězce o 7 aminokyselin na C-konci, resp. o pouhou jednu aminokyselinu na N-konci, znemožní vytvoření funkčního fluorescenčního proteinu [8]. Podobný závěr plyne i ze skutečnosti, že rigidní struktura s fluoroforem vznikajícím posttranslačně uvnitř β -barelu není specifickou zvláštností GFP medúz rodu *Aequorea*, ale nachází se také ve všech známých fluorescenčních proteinech získaných z bezobratlých mořských korálnatců (*Anthozoa*), k nimž patří například mořské sasanky. Předpokládá se dále, že pro úspěšný průběh autokatalytické cyklizační reakce mají zásadní význam také aminokyseliny Arg⁹⁶ a Glu²²², které se nacházejí ve všech dosud objevených fluorescenčních proteinech [10].

Komplexní systém vodíkových můstků stabilizujících sekundární struktury β -řetězců barelu i centrální šroubovice s α -helikálními segmenty zasahuje též do nejbližšího okolí samotného fluoroforu zahrnujícího blízké polární aminokyseliny a několik molekul vody. Tato síť vodíkových můstků obklopující fluorofor je účinnou bariérou proti zhašení fluorescence GFP srážkami s hydroxoniovými kationty H_3O^+ nebo molekulami kyslíku [55]. Fluorescence GFP je proto v porovnání s běžnými organickými fluorescenčními sondami a značkami relativně nezávislá na okolním prostředí. Z praktického hlediska je též velmi důležitá stabilita fluorescence GFP v čase (GFP i další fluorescenční proteiny jsou obecně několikanásobně odolnější vůči vysvěcování, neboli fotobleachingu, než běžné fluorescenční pigmenty [15], [40]) i její relativně vysoký kvantový výtěžek (72–85 % v případě neutrální formy [33]).

Spektrální vlastnosti GFP a dalších fluorescenčních proteinů

Absorpční spektrum přírodního GFP z medúzy *A. victoria* je tvořeno dvěma pásy s maximy u 395 nm ($\epsilon_{\text{max}} \approx 3 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 475 nm ($\epsilon_{\text{max}} \approx 7 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), obr. 6. První z nich přísluší fluoroforům v neutrální formě, druhý jejich disociovaným aniontům. Konkrétní poměr mezi těmito dvěma pásy proto závisí na pH vzorku. Na rozdíl od spekter absorpčních (a potažmo též excitačních spekter fluorescence) mají obě tyto formy GFP téměř shodné úzké emisní spektrum s maximem u 508 nm (neutrální forma) nebo 503 nm (anionická forma) [13], [46], [31], [51]. Přírodní GFP z *A. victoria* a GFP z transgenní bakterie *E. coli* mají zcela identická spektra fluorescence, excitační i emisní [15], což ukazuje, že i klonované fluorescenční proteiny se dokáží svinout do správného terciárního prostorového uspořádání.



Obr. 6. Absorpční a emisní spektra GFP a EGFP. Emisní spektra jsou normována tak, aby se jejich intezity v maximu číselně rovnaly příslušným kvantovým výtěžkům fluorescence. Vytvořeno z dat převzatých z <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence> a <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>

K zajímavému zjištění vedlo srovnání fluorescenčních spekter A-GFP z *A. victoria* se spektry R-GFP z mořské sasanky *Renilla reniformis*. Oba proteiny mají téměř identickou sekvenci aminokyselin i od ní odvozenou terciární prostorovou strukturu, a to včetně fluoroforu vzniklého z tripeptidu Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷. Nejbližší okolí fluoroforu ale mají různé [38]. Místo páru Val⁶⁸-Glu⁶⁹ se v R-GFP nachází sekvence Asp⁶⁸-Arg⁶⁹.

Důsledkem této zdánlivě marginální záměny sousedních aminokyselin fluoroforu je velmi podstatná změna charakteru excitačního spektra fluorescence. V případě R-GFP se pozoruje pouze jeden úzký excitační pás s maximem u 498 nm a cca 5,5× větším absorpčním koeficientem než má hlavní absorpční pás A-GFP [13]. Jeho emisní spektrum přitom zůstává se spektrem A-GFP téměř shodné. Prokázaný vliv bodových modifikací primární struktury na výsledné fluorescenční vlastnosti GFP inspiroval záměrné hledání mutantních forem s odlišnými spektrálními vlastnostmi. První takový experiment spočíval v klonování nahodile mutované sekvence DNA fluorescenčního proteinu v buňkách *E. coli* následovaném vizuálním vyhledáváním odlišně fluoreskujících kolonií narostlých na agarových miskách [13], které vedlo k objevu modře fluoreskujícího proteinu (blue fluorescent protein, BFP) s emisním maximem u 448 nm. Fluorofor BFP se liší od A-GFP mutací Tyr⁶⁶ → histidin, pro kterou se používá označení Y66H využívající jednopísmenné kódy aminokyselin (Tyr/Y a His/H). Pro praktické aplikace však tento BFP není příliš vhodný z důvodu nízkého kvantového výtěžku fluorescence, jenž je zhruba 5× menší než u původního A-GFP.

Objasnění prostorové struktury GFP pomocí rentgenové krystalografie [54] spolu s možností jeho snadné produkce v transgenních klonech bakterie *E. coli* [15] otevřelo cestu k pochopení vztahu mezi strukturou a spektrálními vlastnostmi fluorescenčních proteinů, a tím i k cílené přípravě mutantních forem buď s jinou než zelenou barvou, nebo s intenzivnější a stabilnější fluorescencí. Když R. Tsien a spol. použili místo nahodilých mutací metodu cílené oligonukleotidem řízené mutagenese s využitím polymerázové řetězové reakce, podařilo se jim mutací Ser⁶⁵ → threonin (S65T) připravit fluorescenční protein, který má jednopásové excitační spektrum připomínající R-GFP a navíc se vyznačuje jasnější fluorescencí a rychlejší maturací než původní GFP [46], [12]. Přidáním mutace Phe⁶⁴ → leucin, F64L do GFP^{S65T} byl později vytvořen další fluorescenční protein s ještě kratší dobu maturace, označovaný jako EGFP (enhanced GFP) [10], obr. 5.

Postupně se ukázalo, že excitační a emisní parametry fluorescenčních proteinů lze úspěšně upravovat nejen mutacemi aminokyselin v místě samotného fluorochromu nebo v jeho bezprostředním okolí, ale též bodovými mutacemi na velmi vzdálených segmentech polypeptidového řetězce. Příkladem takové mutace je Thr²⁰³ → isoleucin (T203I), kterou byl z GFP vytvořen fluorescenční protein nazývaný Sapphire [46] s neobvykle velkým Stokesovým posuvem mezi maximy excitace (399 nm) a emise (511 nm). Proto je Sapphire často používán jako donor pro nezářivý Försterův rezonanční přenos excitační energie, FRET. Jinou cílenou mutací vzdáleného segmentu, konkrétně Thr²⁰³ → tyrozin (T203Y), byl vytvořen žlutozeleně fluoreskující protein YFP (yellow FP), jehož spektrální vlastnosti jsou důsledkem patrové π - π interakce mezi aromatickými jádry Tyr⁶⁶ a Thr²⁰³. Od něj bylo posléze odvozeno několik dalších mutantů s vylepšenou fotostabilitou, jasnější fluorescencí a sníženou citlivostí na změny okolního pH (EYFP, Citrine a Venus) [10].

Rogeru Tsienovi ani ostatním badatelům se však nedařilo připravit mutantní GFP s červenou fluorescencí [45], které by našly uplatnění jako možné akceptory ve FRET experimentech (viz níže), navíc v červené spektrální oblasti, kde s výjimkou zelených rostlin je autofluorescence živých buněk řídkou výjimkou. V této etapě hledání nových variant fluorescenčních proteinů si ruští biochemici Lukyanov a Matz uvědomili, že zrod fluorescenčních proteinů nemusel být svázán s evolucí bioluminiscenčních sys-

témů. Začali proto pátrat po fluorescenčních proteinech i v mořských organismech bez bioluminiscence [21], [2]. Prototypem této třídy fluorescenčních proteinů je tetramerní DsRed izolovaný z mořské sasanky *Discosoma striata*, který fluoreskuje s maximem emise u 583 nm. Jeho reálná použitelnost v biologických experimentech je ale komplikována jak dlouhou dobou maturace, tak problémy s přípravou fúzních proteinů. Tento kritický problém se konečně Tsienovi a spol. podařilo překonat vytvořením monomerního fluorescenčního proteinu mRFP1, který se od mateřské formy DsRed odlišuje celkem 33 mutacemi [10]. Na základě mRFP1 nakonec vznikla oranžovo-červená řada monomerních fluorescenčních proteinů s „ovocnými“ názvy (jako mBanana, mOrange, mStrawberry, mCherry) zvolenými příležitostně k barvám jejich fluorescence ve spektrální oblasti 540–610 nm [39], později rozšířená o mPlum s maximem emise u 649 nm.

Během dvou dekad na přelomu tisíciletí bylo nalezeno nebo cílenými mutacemi připraveno úctyhodné množství fluorescenčních proteinů, mezi nimiž najdeme varianty se spektrálními, chemickými i fyzikálními vlastnostmi vyladěnými pro různé speciální aplikace v buněčné biologii [29], [44]. Jedná se například o zobrazování fluorescenčně označených fúzních proteinů v buňkách metodou FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging), studium kolokalizace různých buněčných proteinů pomocí FRET nebo nové metody superrezoluční lokalizační mikroskopie, která využívá fotoaktivovatelné fluorescenční proteiny [35], [34], [25], [23]. K nim patří například Dronpa s fluorochromem, který lze ozařováním intenzivním modrozeleným světlem (≈ 490 nm) opakovaně převést do nefluoreskující trans-konformace a pak ozařením fialovým světlem (≈ 400 nm) vrátit zpět do silně fluoreskující cis-konformace s maximy excitačního a emisního spektra u 503 nm a 518 nm [3].

Hlubší popis všech aspektů optimalizace fluorescenčních proteinů, což se týká nejen jejich fotochemických a fotofyzikálních parametrů, ale též zkracování doby maturace, viz např. [27], je zcela mimo rámec tohoto krátkého článku. Totéž platí o přehledu známých variant fluorescenčních proteinů a jejich vlastností, který je však k dispozici například v práci [16]. Ze stejných důvodů se zde nebudeme zabývat fluorescenčními proteiny existujícími ve formě dimerů nebo tetramerů, kterých se navíc týká jen velmi malá část praktických aplikací. Na závěr poznamenejme, že realizace nových aplikací je v současnosti velmi zjednodušena tím, že plazmidy řady fluorescenčních proteinů jsou již komerčně dostupné.

Několik příkladů využití fluorescenčních proteinů

S aplikacemi fluorescenčních proteinů se dnes můžeme setkat v téměř všech oblastech biomedicínského výzkumu zaměřeného na studium struktury a funkce živých systémů na různých úrovních složitosti, zahrnujících *in vitro* roztoky bioaktivních molekul, jednobuněčné mikroorganismy, individuální buňky mnohobuněčných organismů v tkáňových kulturách nebo dokonce *in situ* v celistvých transgenních rostlinách a živočiších. Z deseti hlavních oblastí biomedicínských aplikací FP vymezených v práci [16] jsme pro ilustraci vybrali několik následujících příkladů, které považujeme za srozumitelné i bez hlubších znalostí z příslušné vědní oblasti.

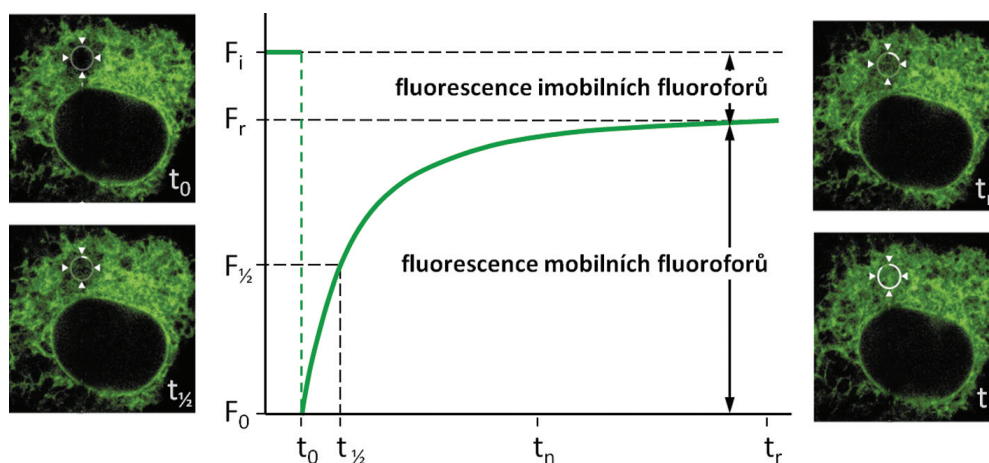
Subcelulární lokalizace proteinů i celých vnitrobuněčných struktur představuje nej- přímočařejší využití možnosti připojit k vybraným buněčným proteinům některý ze

široké škály fluorescenčních proteinů. Tímto způsobem pak lze pomocí fluorescenční mikroskopie zviditelnit tvorbu i lokalizaci fluorescenčně označených proteinů uvnitř jednotlivých buněk, případně pomocí některých speciálních mikroskopických technik, jako jsou níže zmíněné metody FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) a FRET (Förster Resonance Energy Transfer), sledovat i translační pohyby buněčných proteinů nebo jejich vzájemné interakce. Je zřejmé, že díky jejich specifické proteinové kompozici je pak možné selektivně zviditelnit nejrůznější buněčné struktury a organely, jak jsme již viděli na obr. 3 na příkladu mikrotubulů cytoskeletu zviditelněných pomocí GFP fúzaného s α -tubulinem. Vrcholnou úroveň této kategorie aplikací představuje zobrazování metodami superrezoluční mikroskopie s rozlišovací schopností v řádu pouhých desítek nanometrů, o kterých jsme v tomto časopise psali v souvislosti s Nobelovou cenou za chemii udělenou v roce 2014 [35].

Pokud se použije současné značení různých proteinů odlišně barevnými fluorescenčními proteiny, lze vedle základní informace o jejich vnitrobuněčné distribuci také navíc zjistit, zda označené proteiny kolokalizované v určitých buněčných strukturách se nacházejí tak blízko sebe, že spolu mohou přímo interagovat. Ještě dříve, než byla vyvinuta superrezoluční fluorescenční mikroskopie, sloužila k tomuto účelu a dodnes slouží metoda FRET využívající nezářivý přenos excitační energie mezi dvěma fluorofory – donorem a akceptorem [4], [48]. Připomeňme, že absorpční spektrum akceptoru musí být posunuto oproti donoru směrem k větším vlnovým délkám a navíc musí vykazovat výrazný spektrální překryv s emisním spektrem donoru. Pokud se molekuly takového páru nacházejí ve vzdálenosti srovnatelné nebo menší, než je pro ně charakteristický Försterův poloměr řádu jednotek nanometrů, FRET začne silně konkurovat fluorescence excitovaných donorů, což lze zjistit z poklesu intenzity jejich fluorescence provázeného nárůstem fluorescence akceptoru.

Sofistikované fluorescenční techniky také umožňují monitorovat difuzi označených proteinů uvnitř buněk nebo v jejich membránách. Nejčastěji se k tomu používá metoda FRAP [50], [36], [6]. Pulsem velmi intenzivního laserového záření trvajícím obvykle desítky milisekund jsou nejprve nevratně fotochemicky degradovány („vyběleny“) fluorochromy v malé oblasti vzorku (o rozměrech definovaných průměrem ohniska laserového paprsku fokusovaného mikroskopem na studovaný objekt). V následující fázi je monitorována intenzita fluorescence ve „vybělené“ oblasti při excitaci laserovým paprskem s intenzitou zeslabenou na úroveň, při které by již k další fotodegradaci fluorochromů nemělo docházet. Jak v důsledku prostorové difuze proteinů dochází k výměně degradovaných fluoroforů za nepoškozené molekuly přicházející z okolních částí zkoumaného objektu, postupně narůstá intenzita fluorescence ve sledované oblasti, dokud nedosáhne určité rovnovážné hodnoty. Z analýzy časové závislosti tohoto procesu pak získáme informaci o pohyblivosti (resp. difuzních koeficientech) fluorescenčně označených proteinů, obr. 7.

K méně známým, ale z metodického hlediska velice zajímavým metodám sledování exprese buněčných proteinů patří použití časoměrných fluorescenčních proteinů. Červeně fluoreskující fluorochrom tetramerního proteinu DsRed-E5 (mutantní protein původem z korálnatců, *Anthozoa*), se tvoří s určitým časovým odstupem dodatečnou chemickou modifikací zeleně fluoreskujícího mezistupně, přičemž poměr mezi intenzitou červené a zelené fluorescence lineárně roste po mnoho hodin od počátku exprese příslušného fúzního genu [43], [47]. Díky tomu lze pomocí fluorescenční mikroskopie



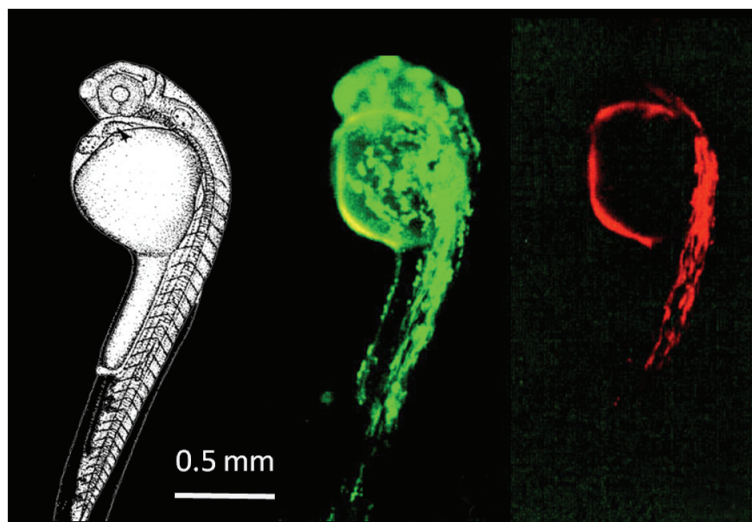
Obr. 7. Princip metody FRAP. Po ozáření malé oblasti vzorku s fluorofory intenzivním pulsem fokusovaného laserového záření intenzita fluorescence skokem klesne v čase t_0 z počáteční hodnoty F_i na nulu. Následuje postupný návrat intenzity fluorescence k hodnotě F_r . Z poločasu obnovování fluorescence, $t_{1/2}$, lze stanovit koeficient laterální difúze fluorescenčně označených proteinů. Upraveno podle [36]

zachytit časový průběh jeho exprese v barevné škále přecházející od zelené přes žlutou až k finální červené.

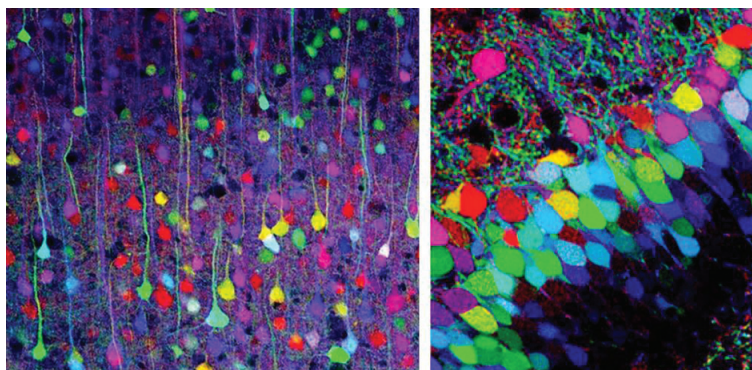
Fluorescenční značení buněk a tkání patří k velmi úspěšným a frekventovaným aplikacím FP v biomedicíně výzkumu. Při vhodné volbě konkrétních genů pro expresi fúzních proteinů lze totiž pomocí fluorescence výběrově zviditelnit určité typy buněk, čehož se hojně využívá především v imunologii, neurobiologii, embryologii, transplantologii, nebo výzkumu karcinogeneze [16]. Jako jeden příklad z mnoha můžeme zmínit využití fluorescenční mikroskopie pro studium interakce virů s hostitelskou buňkou. Pokud vložíme do virové částice gen fluorescenčního proteinu, který je exprimován spolu s nukleoproteinem viru (protein spojený s RNA viru), lze pomocí fluorescenčního mikroskopu sledovat průběh virové infekce buněk [17].

Jednou z předností fluorescenčních proteinů je možnost snadného barevného odlišení různých buněčných typů jednoho organismu během jeho vývoje, což je založeno na principu fúzování vybraných genů s různými FP. Následující obr. 8 ukazuje embryo transgenní ryby *danio pruhované* (akvarijní zebřička, anglicky zebrafish) s cytokeratinem vyvíjejícího se kožního epitelu fluorescenčně označeným pomocí EGFP a myosinem svalové tkáně označeným RFP [49].

Velmi originální variantou barevné identifikace buněk fluorescenčními proteiny je technika nazvaná Brainbow, která dokáže zobrazit individuální neurony mozku transgenních myši ve škále pastelových barev mnohem pestřejší, než je dostupná paleta barev fluorescenčních proteinů [24], [53], obr. 9. Základem Brainbow je nahodilá rekombinace genomu dělících se nervových buněk s geny tří nebo více fluorescenčních proteinů (například CFP, YFP a RFP [24] nebo BFP, GFP, YFP a RFP [53]) pomocí Cre rekombinázy z bakteriofága P1. Tyto fluorescenční proteiny jsou pak v jednotlivých buňkách exprimovány v mnohačetných kopiích s nahodilými poměry jejich kon-



Obr. 8. Selektivní zobrazení vyvíjejícího se kožního epitelu a svalové tkáně v embryu ryбки *danio pruhované*. Vlevo – kresba embrya, 31 hodin po fertilizaci (hpf); uprostřed – kožní epitel, fluorescence EGFP; vpravo – svalová tkáň, fluorescence RFP (obojí 30 hpf). Upraveno podle [49] a [18]



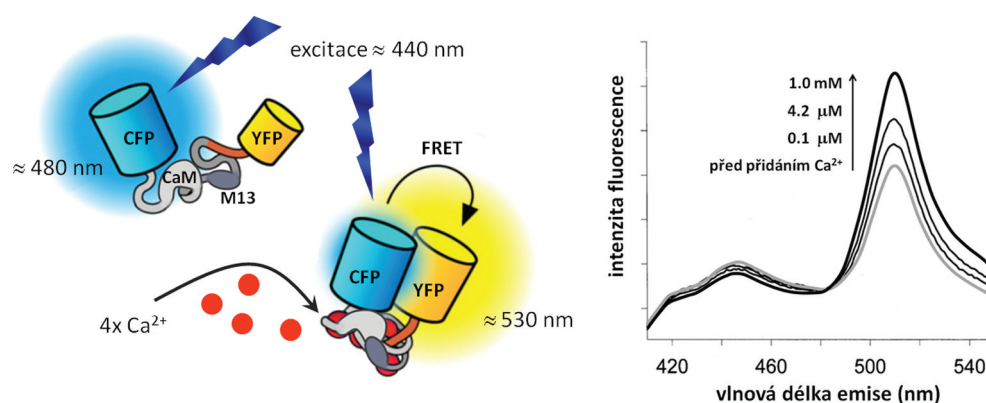
Obr. 9. Metoda Brainbow – zobrazení jednotlivých neuronů v mozku transgenní myši. Vlevo – mozková kůra; vpravo – detail hipokampu (*gyrus dentatus*) [53]. Otištěno se svolením prof. J. Lichtmana (Harvard Medical School)

centrací. Na těchto poměrech závisí relativní intenzity příslušných barevných složek fluorescence, které se aditivně skládají ve výsledný barevný vjem. Metoda Brainbow byla postupně modifikována i pro jiné organismy než myši, konkrétně hlístice, octomilky a ryбки zebříčky.

Fluorescenční senzory vnitrobuněčného prostředí jsou poslední velkou skupinou aplikací fluorescenčních proteinů v biomedicinském výzkum, kterou jsme zahrnuli do tohoto přehledu. Na rozdíl od dřívějších fluorescenčních sond jejich použití nevyžaduje žádné invazivní metody barvení zkoumaných buněk. Geneticky kódované senzory

lze relativně jednoduše a jednoznačně nasměrovat i do konkrétních buněčných organel a navíc spojit jejich expresi s expresí specifických buněčných proteinů. Tímto způsobem pak lze vizualizovat v čase a prostoru aktivitu vybraných enzymů, například proteáz nebo proteinkináz. Tyto senzory však především umožňují měření vnitrobuněčných koncentrací různých iontů, metabolitů nebo signálních posílů [29], [16].

Podrobněji se zde zmíníme pouze o měření vnitrobuněčných koncentrací iontů H^+ (neboli měření vnitrobuněčného pH) a vápenatých iontů Ca^{2+} . Specifické hodnoty pH existující v jednotlivých kompartmentech buněk ovlivňují prakticky všechny biochemické procesy, jako třeba skládání syntetizovaných proteinů do jejich finální struktury, aktivity enzymů nebo redoxní stavy. Kationty Ca^{2+} zase hrají významnou roli v přenosu signálu od membránových receptorů k funkčním molekulám jako tzv. sekundární poslové. S tím souvisí velký zájem o spolehlivé a snadné měření jak pH [26], [32], tak koncentrace vápenatých iontů uvnitř živých buněk. Velký pokrok v metodách měření vnitrobuněčného pH znamenal vytvoření mutantní formy GFP se zvýšenou závislostí poměru dvou excitačních pásů na pH prostředí. Tento senzor, známý pod názvem poměrový pHluorin, vznikl metodou systematického vyhledávání optimální kombinace mutací sedmi aminokyselinových zbytků, identifikovaných na základě známé krystalové struktury GFP jako místa, s nimiž by fluorofor mohl interagovat spolu s protony z okolního prostředí [28]. Příkladem geneticky kódovaného indikátoru koncentrace Ca^{2+} je cameleon [20], [30]. Vzniká tandemovou fúzí donor-akceptorového páru dvou fluorescenčních proteinů (BFP nebo CFP a EGFP nebo YFP) se spojovacím článkem tvořeným kalmodulinem (CaM) a peptidem M13. Ten se v přítomnosti Ca^{2+} váže na kalmodulin, což vede k markantní změně konformace spojovacího řetězce, kterou se oba fluorescenční proteiny dostanou do těsné blízkosti s vysokou účinností FRET. Skrze změny poměru mezi intenzitami fluorescence donoru a akceptoru pak lze po kalibraci v definovaném prostředí měřit koncentrace Ca^{2+} v rozsahu od 10^{-8} do 10^{-2} mol/L. Na obr. 10 je schéma struktury cameleonu, kterou zde ukazujeme i z toho důvodu, že ji lze považovat za prototyp struktury mnoha dalších FRET senzorů.



Obr. 10. Geneticky kódovaný indikátor koncentrace kationtů Ca^{2+} cameleon. Vlevo – schematické znázornění jeho struktury nejprve ve stavu emitujícím fluorescenci donoru a poté po sbalení vyvolaném navázáním čtyř kationtů Ca^{2+} , při kterém dominuje FRET a fluorescence akceptoru; vpravo – emisní spektra cameleonu při různých koncentracích Ca^{2+} (excitace 380 nm, pH 7,47); $1 \mu M = 10^{-6} \text{ mol} \cdot L^{-1}$. Spektra převzata z [30]

Abychom alespoň nastínili, jak pestré a různorodé může být využití fluorescenčních proteinů v biomedicinském výzkumu, zařadili jsme do této kapitoly i málo známý senzor vnitřní teploty buněk s názvem tsGFP [19]. Teplotu lze pomocí tsGFP monitorovat s vysokým časovým i prostorovým rozlišením, jichž nejde dosáhnout žádnou klasickou kalorimetrickou metodou ani infračervenou termografií. Senzor tsGFP je dimer tvořený dvěma GFP molekulami s připojenými teplocitlivými proteiny TlpA bakterií rodu *Salmonella*. Tento dimer, který se reverzibilně rozpadá při teplotách kolem 37 nebo 42 °C (varianta tsGFP1 nebo tsGFP2), je držen pohromadě čtyřmi do dvojic svinutými helixy. Tato konformační změna senzoru je spojena s měnícím se poměrem intenzit dvou pásů excitačního spektra jeho fluorescence, které se nacházejí u 400 a 480 nm. Poměr jejich intenzit, exc400/exc480, sigmoidálně klesá s teplotou rostoucí od 34 do 41 °C (resp. od 38 do 46 °C).

Jedno atypické využití fluorescenčních proteinů na závěr

Zatímco evropské úřady mají stále velmi rezervovaný přístup k využívání transgenických organismů, jako jsou například geneticky modifikované zemědělské plodiny, jinde se objevují překvapivě kreativní aplikace. Jednou z nich je transgenní bourec morušový produkující hedvábná vlákna obarvená fluorescenčními proteiny [41]. Očekává se, že takové hedvábní by se mohlo stát ekonomicky i ekologicky výhodnou alternativou k tradičním barvířským metodám textilního průmyslu.

Poděkování. Děkujeme prof. RNDr. Zdeňku Fišarovi, CSc., doc. RNDr. Janu Malínskému, Ph.D., a Ondřeji Štěpánkovi, Ph.D., za kritické poznámky a podnětné připomínky k rukopisu tohoto článku.

L i t e r a t u r a

- [1] ALBERTS, B., et al.: *Molecular biology of the cell*. 6th ed., Garland Science, New York and Abingdon, 2014.
- [2] ALIEVA, N. O., et al.: *Diversity and evolution of coral fluorescent proteins*. PLOS ONE 3 (2008), e2680.
- [3] ANDRESEN, M., et al.: *Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (2007), 13005–13009.
- [4] ARAI, Y., NAGAI, T.: *Extensive use of FRET in biological imaging*. Microscopy 62 (2013), 419–428.
- [5] BETZIG, E., et al.: *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*. Science 313 (2006), 1642–1645.
- [6] CARISEY, A., et al.: *Fluorescence recovery after photobleaching*. In: Cell Migration Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), Humana Press, 2011.
- [7] CODY, C., et al.: *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry 32 (1993), 1212–1218.
- [8] CUBITT, A. B., et al.: *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem. Sci. 20 (1995), 448–455.
- [9] ČERNÝ, J.: *Zelený fluorescenční protein*. Vesmír 88 (2009), 228–231.

- [10] DAY, R. N., DAVIDSON, M. W.: *The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging*. Chem. Soc. Rev. *38* (2009), 2887–2921.
- [11] EHRENBERG, M.: *Scientific background on the Nobel Prize in chemistry 2008*. The Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, 2008.
- [12] HEIM, R., CUBITT, A. B., TSIEN, R. Y.: *Improved green fluorescence*. Nature *373* (1995), 663–664.
- [13] HEIM, R., PRASHER, D. C., TSIEN, R. Y.: *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *91* (1994), 12501–12504.
- [14] CHALFIE, M.: *Green fluorescent protein*. Photochem. Photobiol. *62* (1995), 651–656.
- [15] CHALFIE, M., et al.: *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science *263* (1994), 802–805.
- [16] CHUDAKOV, D. M., et al.: *Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues*. Physiol. Rev. *90* (2010), 1103–1163.
- [17] KANEHIRA, K., UCHIDA, Y., SAITO, T.: *Visualization of avian influenza virus infected cells using self-assembling fragments of green fluorescent protein*. Electron. J. Biotechnol. *19* (2016), 61–64.
- [18] KIMMEL, C. B., et al.: *Stages of embryonic development of the zebrafish*. Dev. Dyn. *203* (2002), 253–310.
- [19] KIYONAKA, S., et al.: *Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells*. Nat. Methods *10* (2013), 1232–1238.
- [20] KOLDENKOVA, V. P., NAGAI, T.: *Genetically encoded Ca^{2+} indicators: Properties and evaluation*. Biochim. Biophys. Acta *1833* (2013), 1787–1797.
- [21] LABAS, Y. A., et al.: *Diversity and evolution of the green fluorescent protein family*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *99* (2002), 4256–4261.
- [22] LAKOWICZ, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer US, Boston, 2006.
- [23] LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., PATTERSON, G. H.: *Photoactivatable fluorescent proteins for diffraction-limited and super-resolution imaging*. Trends Cell Biol. *19* (2009), 555–565.
- [24] LIVET, J., et al.: *Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system*. Nature *450* (2007), 56–62.
- [25] LUKYANOV, K. A., et al.: *Photoactivatable fluorescent proteins*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6* (2005), 885–891.
- [26] MARTYNOV, V. I., et al.: *Genetically encoded fluorescent indicators for live cell pH imaging*. Biochim. Biophys. Acta *1862* (2018), 2924–2939.
- [27] MEROLA, F., et al.: *Engineering fluorescent proteins towards ultimate performances: lessons from the newly developed cyan variants*. Methods Appl. Fluoresc. *4* (2016), [online] 012001.
- [28] MIESENBOCK, G., DE ANGELIS, D. A., ROTHMAN, J. E.: *Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins*. Nature *394* (1998), 192–195.
- [29] MISHIN, A. S., et al.: *Novel uses of fluorescent proteins*. Curr. Opin. Chem. Biol. *27* (2015), 1–9.

- [30] MIYAWAKI, A., et al.: *Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin*. *Nature* 388 (1997), 882–887.
- [31] MORISE, H., et al.: *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*. *Biochemistry* 13 (1974), 2656–2662.
- [32] ORIJ, R., et al.: *In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in Saccharomyces cerevisiae reveals a relation between intracellular pH and growth*. *Microbiology* 155 (2009), 268–278.
- [33] ORMO, M., et al.: *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. *Science* 273 (1996), 1392–1395.
- [34] PLÁŠEK, J.: *Optická mikroskopie od van Leeuwenhoeka k Nobelově ceně za chemii v roce 2014*. *Čs. čas. fyz.* 65 (2015), 365–369.
- [35] PLÁŠEK, J.: *Superrozlišení v optické mikroskopii: Nobelova cena za chemii za rok 2014*. *PMFA* 60 (2015), 19–38.
- [36] REITS, E. A. J., NEEFJES, J. J.: *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells*. *Nat. Cell Biol.* 3 (2001), E145–E147.
- [37] RODA, A.: *Discovery and development of the green fluorescent protein, GFP: the 2008 Nobel Prize*. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010), 1619–1622.
- [38] SAN PIETRO, R. M., PRENDERGAST, F. G., WARD, W. W.: *Sequence of the chromogenic hexapeptide of Renilla green fluorescent protein*. *Photochem. Photobiol.* 57 (1993), S63.
- [39] SHANER, N. C., et al.: *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp red fluorescent protein*. *Nat. Biotechnol.* 22 (2004), 1567–1572.
- [40] SHANER, N. C., STEINBACH, P. A., TSIEN, R. Y.: *A guide to choosing fluorescent proteins*. *Nat. Methods* 2 (2005), 905–909.
- [41] SHIMIZU, K.: *Genetic engineered color silk: fabrication of a photonics material through a bioassisted technology*. *Bioinspir. Biomim.* 13 (2018), 041003.
- [42] SHIMOMURA, O.: *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. *J. Microscop.* 217 (2005), 3–15.
- [43] TERSKIKH, A., et al.: *“Fluorescent timer”: Protein that changes color with time*. *Science* 290 (2000), 1585–1588.
- [44] THORN, K.: *Genetically encoded fluorescent tags*. *Mol. Biol. Cell* 28 (2017), 848–857.
- [45] TSIEN, R. Y.: *Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture)*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009), 5612–5626.
- [46] TSIEN, R. Y.: *The green fluorescent protein*. *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998), 509–544.
- [47] VERKHUSHA, V. V., et al.: *Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins*. *Chem. Biol.* 11 (2004), 845–854.
- [48] WALLRABE, H., PERIASAMY, A.: *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005), 19–27.
- [49] WAN, H. Y., et al.: *Generation of two-color transgenic zebrafish using the green and red fluorescent protein reporter genes gfp and rfp*. *Mar. Biotechnol.* 4 (2002), 146–154.
- [50] WANG, Y. X., SHYY, J. Y. J., CHIEN, S.: *Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: Seeing is believing*. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 10 (2008), 1–38.

- [51] WARD, W. W., et al.: *Spectrophotometric identity of the energy-transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent protein*. Photochem. Photobiol. 31 (1980), 611–615.
- [52] WARNER, K. D., et al.: *Structural basis for activity of highly efficient RNA mimics of green fluorescent protein*. Nat. Struct. Mol. Biol. 21 (2014), 658–663.
- [53] WEISSMAN, T. A., PAN, Y. A.: *Brainbow: New resources and emerging biological applications for multicolor genetic labeling and analysis*. Genetics 199 (2015), 293–306.
- [54] YANG, F., MOSS, L. G., PHILLIPS, G. N.: *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat. Biotechnol. 14 (1996), 1246–1251.
- [55] ZIMMER, M.: *Green fluorescent protein: (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior*. Chem. Rev. 102 (2002), 759–781.
- [56] ZIMMER, M.: *GFP – from jellyfish to the Nobel prize and beyond*. Chem. Soc. Rev. 38 (2009), 2823–2832.