

Denizsel Organizmalardan Elde Edilen Yeşil Floresans Protein (GFP) ve Kullanım Alanları

*İsmail Karaboz, Atakan Sukatar, Aslı Parlakay

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 35100, Bornova, İzmir, Türkiye
*E mail: karaboz@fenfak.ege.edu.tr

Abstract: *Green fluorescent protein (GFP) isolated from marine organisms and its usages.* Many marine organisms are luminescent. The proteins that produce the light are primary light producers (aequorin or luciferase) and secondary proteins that shifts the red light for better penetration into the ocean. Green fluorescent protein (GFP) which is a secondary protein has extraordinary characteristics because of the fact that it is fluoroscent, has fluorophore made up of modified amino acid residues and has 3D structure. GFP isolated from the jellyfish *Aequorea victoria* and the sea pansy *Renilla reniformis* functions as energy-transfer acceptors in these organisms. In this study, the molecular structure of GFP that is isolated from marine organisms was explained and its recently usage was discussed.

Key Words: *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis*, GFP.

Özet: Çoğu denizsel organizma lüminesens özelliklere sahiptir. Işık oluşturan proteinler, primer ışık üreticiler (aequorin ya da lusiferaz) ve denizde daha iyi nüfuz etmesi için kırmızı ışığı değiştiren sekonder fotoproteinlerdir. Bir sekonder protein olan Yeşil floresans protein (GFP) floresans özellikte olması, modifiye olmuş amino asit kalıntılarında oluşan floroforu bulunması ve üç boyutlu yapısı nedeniyle sıra dışı özelliklere sahiptir. Deniz anası *Aequorea victoria* ve deniz menekşesi *Renilla reniformis* türlerinden izole edilen GFP, bu canlılarda enerji transferinde rol oynamaktadır. Bu çalışmada, denizsel organizmalardan elde edilen GFP'nin moleküler yapısı açıklanmış ve günümüzdeki kullanım alanlarına değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Aequorea victoria*, *Renilla reniformis*, yeşil floresans protein.

Giriş

Işık oluşturan türlerin birbirinden bağımsız olarak evrimsel atalardan kökenlendiği düşünülmektedir. Bu organizmalardan bazıları ilkel ışık üretme reaksiyonları oluştururken, daha sonra evrimleşenlerin ise renk değiştirici sekonder proteinlere sahip oldukları görülmüştür. Sekonder proteinlerden GFP, denizsel organizmalardan izole edilen ve ışık oluşturan bir proteindir. Bu protein, aequorin ya da lusiferaz gibi primer proteinlerden aldığı mavi ışığı, dalga boyu daha kısa olan ve daha uzak mesafelere ulaşan yeşil floresans ışığa dönüştürmektedir.

1970'li yılların ortalarında keşfedilen GFP, ancak bilim adamları tarafından genetik çalışmalarla çoğaltıldıktan sonra bir marker olarak kullanılmaya başlanmıştır. *Aequorea victoria*'dan elde edilen GFP'nin cDNA ve genomik klonlarının dizisi ilk olarak Prasher ve diğ. (1992) tarafından ortaya çıkarılmıştır. GFP'nin bakterilerde fonksiyonel olarak eksprese edilebilmesinin, hücre ve moleküler biyolojide ilgi çekici araştırmalara olanak sağlayacağını ise Chalfie ve diğ. (1994) göstermiştir. GFP'nin üç boyutlu yapısının ortaya çıkarılması bu proteinin temel fotokimyasal özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur. Bu yapının ortaya çıkarılması ile bir çok araştırma laboratuvarı ışık yayan proteinler, özellikle de GFP ile onun mutantları üzerinde yapısal çalışmalar yürütmeye başlamıştır. GFP ile etiketlenen proteinler tanımlanıp yerleri belirlenebilmekte ve böylece hücre bağlantıları izlenebilir, gen

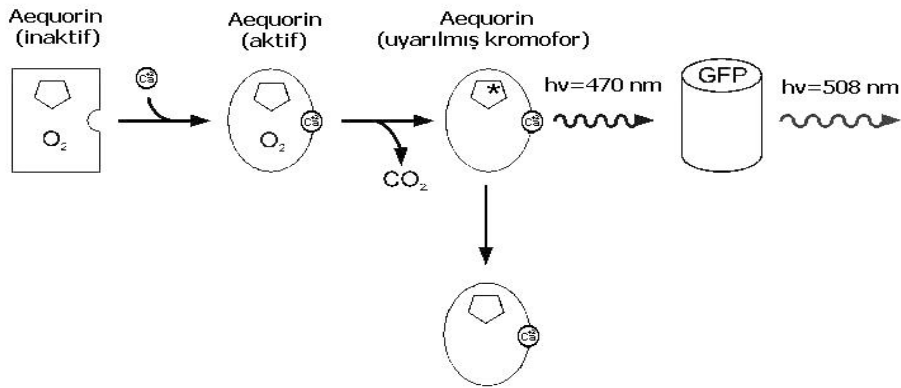
ekspresyonu rapor edilebilir, protein-protein etkileşimleri gözlenebilir ve sinyal oluşturan olaylar ortaya çıkarılabilir duruma gelmektedir. Bugüne kadar GFP bakteriler, mayalar, civık mantarlar, bitkiler, *Drosophila*, zebra balığı ve memeli hücrelerinde eksprese edilmiştir.

GFP'nin *in vivo*'da Rolü

Deniz anası *Aequorea victoria* ve deniz menekşesi *Renilla reniformis* gibi biyölüminesens özellikteki birçok sölenler, yeşil floresans protein sayesinde yeşil ışık yayar.

GFP, *A. victoria*'da Ca^{2+} ile aktive olmuş fotoprotein ve *R. reniformis*'de lusiferaz-oksilusiferin kompleksinden enerji alarak enerji-transfer edici olarak görev yapar.

Mekanik bir uyarılma ile *A. victoria* yeşil ışık yaymakla birlikte, kalsiyum ile uyarılmış aequorinin, *A. victoria*'nın fotositlerinden izole edildiğinde ise yeşilden daha çok mavi ışık oluşturduğu belirlenmiştir. GFP, aktive olmuş aequorinden enerji alan sekonder floresans proteindir. Aequorin 21.4 kDa'luk bir apoprotein, moleküler oksijen ve sölenlerin (423 moleküler ağırlığa sahip imidazol bir bileşik) kompleksidir. Aequorin Ca^{2+} ile aktive olduğunda sölenlerin, uyarılmış durumdaki sölenleramide oksidasyonunu katalizler. Sölenleramid 470 nm'de ışık yayarak (izole edilmiş aequorin tarafından meydana getirilen mavi ışık) temel duruma geri döner. *in vivo*'da uyarılmış durumdaki sölenleramidten (aequorin ve Ca^{2+} ile birleşmiş) GFP'ye doğru bir enerji transferi gerçekleşir ve böylece yeşil floresans oluşur.



Şekil 1. *A. victoria*'da biyoluminesens olayı (Ca^{2+} ile uyarılan aequorinden GFP'ye enerji transferi) (S.Inouye ve F. I. Tsuji, 1996).

A. victoria'daki GFP'nin Temel Bazı Özellikleri

Aequorea GFP ve *Renilla* GFP'sinin evrimsel ilişkisi bilinmemektedir, çünkü *Renilla* GFP'sinin amino asit dizisi henüz tespit edilememiştir. *Aequorea* GFP'sinin primer yapısı cDNA dizisi analizi ile ortaya çıkarılmıştır. *Aequorea* GFP'si, moleküler ağırlığı 27 ile 30 kDa arasında değişen, 238 amino asitlik bir proteindir ve doğal olarak meydana gelen birçok tipi vardır. Doğal GFP sulandırılmış solüsyonlarda (2 mg/mL'nin altında) monomerdendir ve konsantre solüsyonlarda (5 mg/mL'nin üstünde) dimeriktir. *in vivo*'da dimerik GFP'nin meydana gelip gelmediği henüz bilinmemektedir.

GFP, geri dönüşümlü olarak floresans olmayan bir proteine denatüre olabilir. Ayrıca pH ve ısı değişimlerine karşı kararlı bir proteindir. Proteolitik sindirime karşı da oldukça dirençlidir. Bu sıra dışı kararlılığı sıkı tersiyer yapısından kaynaklanmaktadır.

GFP Kromoforu

GFP, diğer floresans proteinlerden farklı özelliklere sahiptir. Çünkü kromoforu ayrı olarak sentezlenmeyen bir prostetik grup olup, polipeptit zinciri modifiye olmuş amino asit kalıntılarından meydana gelmiştir.

Kromoforun Kimyasal Yapısı

Saflaştırılmış GFP'nin, papain ile proteolizi sonucu oluşan heksapeptidin analizi ile kromoforun, iç kısmında Ser-Tyr-Gly (serin, tirozin, glisin) dizisinden meydana geldiği belirlenmiştir. *Aequorea* ve *Renilla*'dan elde edilen heksapeptitlerin amino asit dizileri aşağıdaki gibidir.

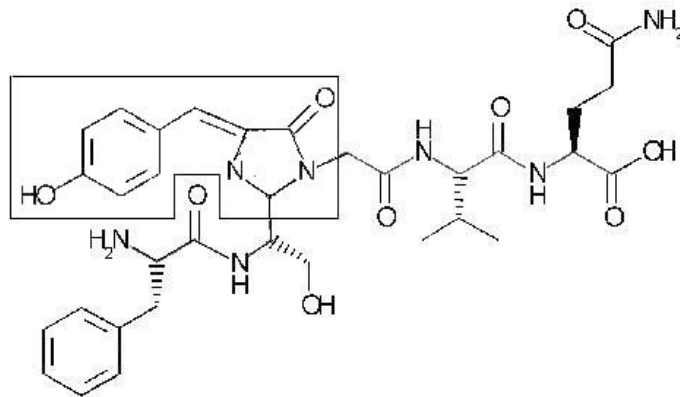
Aequorea: FSYGVQ (Fenilalanin, serin, tirozin, glisin, valin, glutamin)

Renilla: FSYGDR (Fenilalanin, serin, tirozin, glisin, aspartat, arjinin)

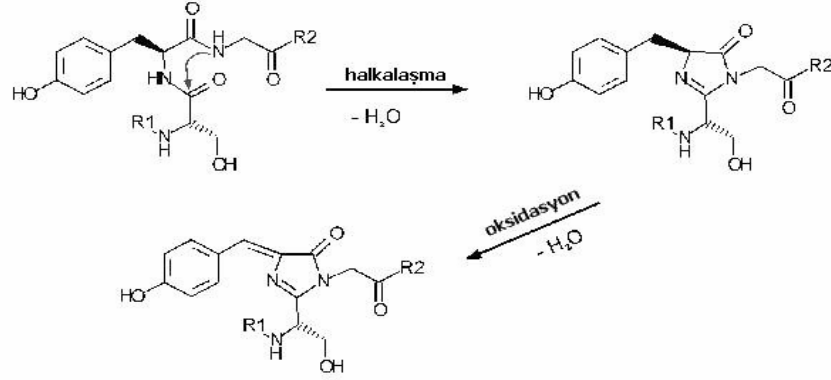
Kromofor, p-hidroksibenziliden-imidazolidon'dur ve GFP'nin 65-67 (Ser-dehidro Tyr- Gly) kalıntılarından meydana gelir. Bu kalıntıların halka oluşturmuş omurgası imidazolidon yapısını oluşturur. SYG (serin, tirozin, glisin) amino asit dizisi diğer proteinlerde de bulunmasına karşın, bunların hiçbirinde ne halka oluşumu gözlenir, ne tirozin oksitlenir ne de bu proteinler floresans yapar.

Kromoforun biyosentezi

Kromoforun biyosentezinde ilk basamak Ser65'in karbonil grubu üzerine Gly67'nin amino grubunun nükleofilik bağlanmasıdır. Daha sonra suyun ayrılmasıyla imidazolidon halkası oluşur. İkinci basamakta ise Tyr66'nin C^{alfa}-C^{beta} bağı oksitlenir.



Şekil 2. *Aequorea victoria* GFP'sinden elde edilen papain türevli kromofor peptidin kimyasal yapısı (Cody, C. W. ve diğ., 1993).



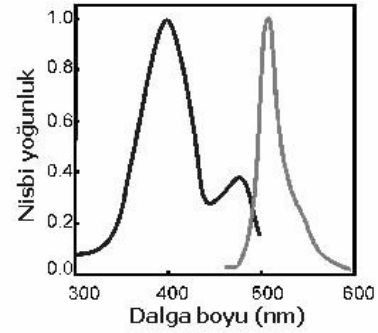
Şekil 3. Kromoforun biyosentezi (R. Heim ve diğ., 1994).

GFP'nin Absorpsiyon ve Floresans Emisyon Spektrumu

Denatüre olmuş GFP floresans özelliğe sahip değildir ve absorpsiyon spektrumu belirgin bir şekilde doğal GFP'den farklıdır. Bunun nedeni; kromofor ve onun çevresinin kovalent olmayan etkileşimlerinin, spektral özellikleri üzerine büyük bir etkisinin olması ve floresansın, GFP'nin tersiyer yapısındaki kromofora yakın amino asitler tarafından meydana getirilmesidir.

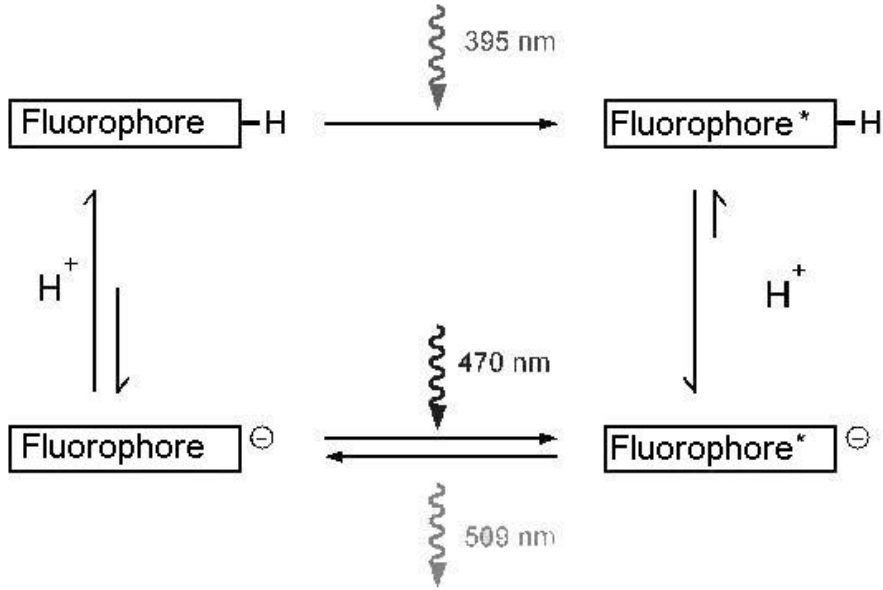
A. victoria'dan elde edilen doğal GFP'nin absorpsiyon spektrumu 395 nm ve 470 nm'de olmak üzere iki maksimuma sahiptir. Floresans emisyon spektrumunun ise 509 nm'de pik yaptığı ve 540 nm'ye doğru düşüş gösterdiği görülür.

E. coli'de meydana gelen rekombinant *A. victoria*-GFP, benzer spektral özelliklere sahiptir. *R. reniformis*-GFP'nin absorpsiyon spektrumu ise farklı olmakla birlikte, emisyon spektrumu benzerdir.

Şekil 4. *A. victoria*'dan elde edilen GFP'nin uyarılma ve emisyon spektrumları (M. Chalfie ve diğ., 1994).

Förster Döngüsü

GFP merkezinde Förster döngüsü meydana gelir. Bu döngü Şekil 5'te gösterilmektedir.



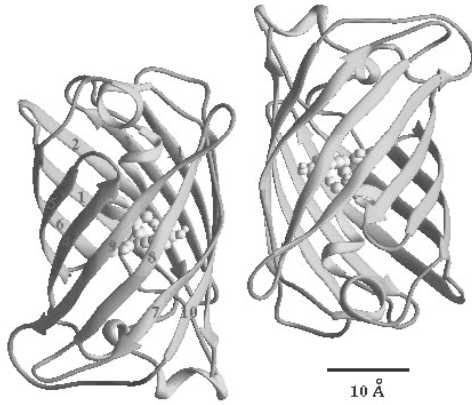
Şekil 5. Förster döngüsü (D. C. Youvan, M. E. Michel-Beyerle, 1996).

Tyr66 hidroksil formda (sol üstte) ise flofor 395 nm'de ışığı absorplarken, fenolat formda ise (sol altta) ancak 470 nm'de ışığı absorplamaktadır. Fenoller uyarılmış durumda temel durumdan daha çok asidik oldukları için, protonlu uyarılmış formdaki flofor (sağ üstte), floresans özellikteki tek tür olan uyarılmış fenolata (sağ altta) dönüşür ve 509 nm'de ışık verir. Özet olarak, döngüde flofor bir proton absorplar, sonra protonunu kaybederek bir foton yayar ve son basamakta bir proton alarak temel duruma geri döner.

Yabani tip GFP ve GFP'nin S65T (proteinin 65. sırasında bulunan serinin, triptofana dönüşmesi ile oluşan tipi) tipinin yapısı X-ışını kristalografisiyle çözüldükten sonra, Förster döngüsü ve bazı GFP tiplerinin 3 boyutlu yapısı anlaşılmıştır.

GFP'nin 3 Boyutlu Yapısı

Yang ve diğ. (1996), rekombinant yabani tip *A. victoria* GFP'sinin kristal yapısını ortaya çıkarmışlardır. *A. victoria* GFP'sinin S65T tipinin 3 boyutlu yapısı ise Ormö ve diğ. (1996) tarafından tayin edilmiştir.



Şekil 6. GFP'nin üç boyutlu yapısı (M. Carson, 1987).

GFP, yeni bir protein katlanma özelliği göstermektedir. Bu yapı Yang ve diğ. (1996) tarafından beta-fiçı olarak adlandırılmıştır. Proteinin dışındaki 11 adet beta ipliği çok sıkı bir silindir oluşturmuştur. Beta yapısının içinde alfa-helikslere sahiptir ve bunun ortası kromofordur. Aynı zamanda proteinin uç kısımlarında da kısa helikal segmentler bulunmaktadır. Silindir yaklaşık 30 Å çapında ve 40 Å uzunluğundadır.

Molekülün merkezinde kromoforun çok sıkı bir şekilde bağlanması ve bu sayede hacim genişlemesinin önlenmesi, GFP'nin bazı özelliklerini açıklayabilir:

- GFP denatürasyona karşı çok dirençlidir (90 C'de 6 M guanidinium hidroklorit ile muamele edildiğinde ya da pH<4 ve pH>10)

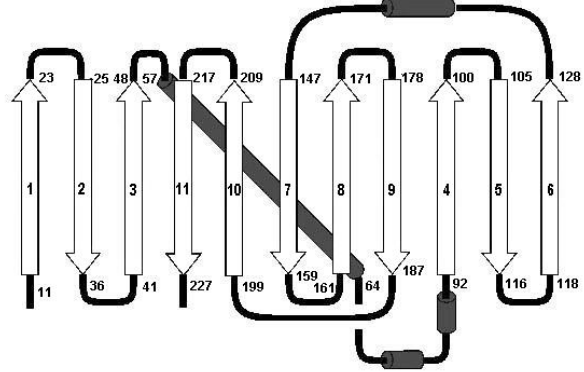
- N- ucundan Met (metionin)'nin ya da C- ucundan yediden fazla amino asidin çıkarılması toplam floresans kaybına neden olur ve flofor zarar görmese de protein absorpsiyon özelliğini yitirir. Çok küçük bir parçasında hata olsa bile beta-fiçı yapısı oluşturulamaz.

- GFP, N- ya da C- ucundan bir diğer protein ile birleşebilir. Birleştiği takdirde beta-fiçı yapısının yüzeyi oldukça esnek olduğu için GFP'nin yapısı bozulmaz.

Katlanma Modeli

Şekil 7'de proteinin katlanma modeli gösterilmiştir. Beta-iplikler ok biçiminde, alfa-helikslere silindirik yapıda ve bağlayıcı düğümler ise siyah iplikler şeklinde gösterilmiştir. İkincil yapısal elementlerin başında ve sonunda amino asit kalıntılarının numaraları verilmiştir.

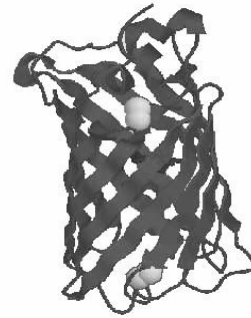
Ormö ve diğ. (1996) S65T tipi için temel olarak benzer modeli bulmuşlardır. Bunun yanında N- terminalde kısa alfa-helikslere, 6. ve 7. beta-iplikleri arasındaki heliks yerine bir ilmik olduğunu iddia etmektedirler.



Şekil 7. GFP'nin katlanma modeli (M. Carson, 1987).

Sisteinler

3. beta-iplikte Cys48 ve içteki helikte Cys70 olmak üzere iki sistein vardır, bunlar disülfid bağı oluşturmazlar. Cys48 kısmen çözenlere maruz kalabilir, ancak Cys70 proteinin merkezine gömülmüştür. Bu yapıdan dolayı GFP'nin floresans özelliği, sodyum ditiyonit gibi güçlü indirgeyici ajanlar ile geri dönüşümlü olarak kaybolabilir, ancak beta-merkaptolan (BME), ditiyotreitil (DTT) ya da indirgenmiş glutatyon (GSSG) gibi zayıf indirgeyici ajanlar ile muamele edildiğinde kaybolmaz. Buna karşın sülfidril ayracı ditiyobisnitrobenzoik asit ile muamelesi, floresansı geri dönüşümsüz olarak ortadan kaldıracaktır. Serbest sistein kalıntısı floresans için gerekli olabilir.

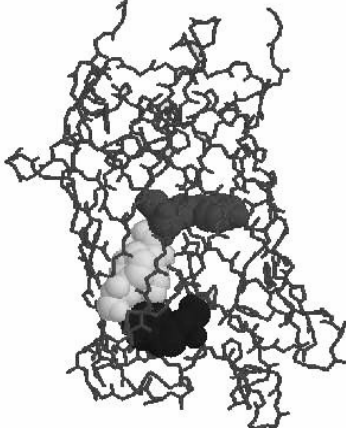


Şekil 8. GFP'nin üç boyutlu yapısı içindeki sistein amino asitlerinin konumları (Inouye, S. ve Tsuji, F.I., 1994).

Triptofan floresansı

GFP, kromofordan (üstte) 13 ile 15 Å uzakta bulunan serbest bir Trp57 (triptofan57)'ye (altta) sahiptir. Trp57, Phe64 (fenilalanin64) ile Phe46 (ortada) ile kromofordan ayrılır ve

Trp57'nin halka sisteminin uzun eksenini kromoforun uzun eksenine paralel durumdadır. Bu nedenle, Trp'dan kromofora etkin bir enerji transferi gerçekleşmekte ve bu nedenle ayrı bir triptofan emisyonu gözlenmemektedir.



Şekil 9. GFP yapısındaki kromofor, fenilalanin ve triptofanın konumları (M. Ormö ve diğ., 1996).

GFP'nin Kullanıldığı Alanlar

Doğal GFP ile absorpsiyon ve emisyon spektrumları benzer olan rekombinant GFP günümüze kadar bakteriler, nematodlar, böcekler ve memeli hücreleri gibi birçok canlıda eksprese edilebilmiştir. Bu sayede *in vivo*'da gözlenemeyen birçok olay ortaya çıkarılmıştır. Örneğin *Drosophila*'da, *bicoid* mRNA lokalizasyonu için gerekli *exuperantia* geninin üretimini belirlemek için Wang ve diğ. (1994) GFP'yi kullanmışlardır. Nancy Hopkins ve çalışma arkadaşları (1995) GFP'yi zebra balığı embriyolarının gelişimi sırasında gen ekspresyonunun özelliklerini gözlemek için kullanmışlardır. Bir araştırmada (Chishima ve diğ., 1997) ise insanlardaki karaciğer kanserinin metastazını izlemek için GFP kullanılmıştır. Bu çalışmalar, kobay olarak fındık fareleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. GFP-S65T cDNA ile transfekte edilmiş kanserli hücre dizisi çok parlak bir yeşil ışık ürettiği için kolay bir şekilde belirlenebilmiştir. GFP transfekte edilmiş kanserli karaciğer hücreleri başlangıçta farelerde inkübe edilir ve transplantasyondan 5 hafta sonra, tümör 1 cm çapına ulaşır, çok parlak GFP floresansına sahip hale gelir. Böylece metastaz rahatlıkla gözlenebilir. GFP ile transfekte edilmiş ve edilmemiş tümör, benzer metastatik özellikler gösterir çünkü GFP ekspresyonu metastaz üzerine etkili değildir. 1999 yılında Yang ve diğ. tarafından yapılan bir çalışmada hamster ovarium hücrelerinde ifade edilen kararlı, yüksek düzeyde GFP bu hayvanlardaki hücre dizilerinin metastatik davranışlarını izlemek için kullanılmıştır. GFP, Wysocka ve Krawczyk (2000) tarafından stresle indüklenen hsp70 fare geni promotörünün aktivitesini izlemek için bir marker olarak, Chudakov ve Lokyanov (2003) tarafından ise canlı hücrelerdeki protein lokalizasyonu ve hareketini belirlemek için kullanılmıştır.

Bitkiler üzerine yapılan araştırmalara baktığımızda; Steve Kay (Virginia Üniversitesi) sirkadiyen ritimlerin

transkripsiyonel kontrolünü incelemek için GFP ile çalışmalarını yürütürken, Scripps Araştırma Enstitüsü'nden Curtis Holt ve Roger Beachy enfekte olmuş tütün bitkilerindeki rekombinant virüslerin yayılımını izlemek için GFP'yi kullanmışlardır. GFP'nin raporör olarak kullanımı, transgenik bitki dokularını *in vivo*'da herhangi bir gelişim basamağında izlemeye olanak sağlamıştır. Bunun için Remans ve diğ. (1999) tütünde S65T (sGFP)'yi kullanmıştır. Ottenschläger ve diğ. (1999) daha parlak floresans özellik gösteren GFP geninin mutan formlarını (GFP4, GFP5ER, GFP4S65C) elde ederek, tütün ve *Arabidopsis thaliana* gibi bitkilerin polen gelişimi *in vitro*'da gözleyebilmişlerdir. Tütün ve *Arabidopsis*'in olgunlaşmamış polenleri farklı gelişim basamaklarında izole edilip, GFP içeren plasmidlerle borbardıman edilerek kültüre alınmıştır. Bu şekilde GFP ekspresyonu olgunlaşma, çimlenme ve polinasyon sırasında her gün gözlenmiştir. Son yıllarda GFP transgenik bitki ve hayvanlara gen aktarımında marker olarak da kullanılmaktadır. Örneğin ayçiçeğine, GFP geni taşıyan *Agrobacterium* geni aktarıldıktan sonra, transforme olmuş dokuların kolayca tespit edilebilen parlak yeşil floresansı sayesinde optimal bir rejenerasyon ve transformasyon işlemi düzenlenmiştir (Müller ve diğ., 2001). Elväng ve diğ. (2001), ortamda klorofenol bulunmasıyla gelişimi artan bir bakteri olan *Arthrobacter chlorophenolicus* ile bir araştırma gerçekleştirmişlerdir. Bakterinin bu özelliğinden yararlanılarak, GFP ve lusiferaz geni ile etiketlenmiş bakteri hücreleri klorofenol seviyesi yüksek toprağın tespit edildikten sonra temizlenmesi için kullanılmıştır. Sonuç olarak, keşfedildikten çok kısa bir süre sonra bu kadar geniş kullanım alanı bulunan GFP'nin önümüzdeki yıllarda daha çok yeni kullanım alanlarının bulunacağı ve ülkemiz denizlerinde de gelişen birçok deniz organizmasının farklı amaçlar için değerlendirilmesi yönünde çalışmaların başlatılması gerektiği inancındayız.

Kaynakça

- Anderson, S., S. Kay, 1996. Illuminating the mechanism of the circadian clock in plants. *Trends in Plant Science*. 1 (2): 51-57.
- Amsterdam A, S. Lin, N. Hopkins, 1995. The Aequorea victoria Green Fluorescent Protein Can Be Used as a Reporter in Live Zebrafish Embryos. *Developmental Biology*. 171 (1): 123-129.
- Chalfie, M., 1995. Photochem. Photobiol. 62, 651-656.
- Carson, M., 1987. Ribbon models of macromolecules. *J. Mol. Graphics*. 5: 103-6.
- Chishima, T., Y. Miyagi, X. Wang, E. Baranov, Y. Tan, H. Shimada, A. R. Moossa, R. M. Hoffman, 1997. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescence protein expression. *Clinical and Experimental Metastasis*. 15 (5): 547-552.
- Chudakov, D. M., K. A. Lukyanov, 2003. Use of Green Fluorescent Protein (GFP) and Its Homologs for *in vivo* Protein Motility Studies. *Biochemistry (Moscow)*. 68 (9): 952-957.
- 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.
- Elväng, A. M., K. Westerberg, C. Jernberg, J. K. Jansson, 2001. Use of green fluorescent protein and luciferase biomarkers to monitor survival and activity of *Arthrobacter chlorophenolicus* A6 cells during degradation of 4-chlorophenol in soil. *Environmental Microbiology*. 3 (1): 32-42.
- Gerdes, H., C. Kaether, 1996. Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Letters*. 389: 44-47.

- Heim, R., D. C. Prasher, R.Y. Tsien, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91, 12501-12504.
- Inouye, S., F. I. Tsuji, 1994. FEBS Lett. 351, 211-214.
- Larrick, J. W., R. F. Balint, D. C. Youvan, 1995. Green fluorescent protein: untapped potential in immunotechnology. Immunotechnology 1: 83-86.
- Müller, A., M. Iser, D. Hess, 2001. Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker. Transgenic Research. 10 (5): 435-444.
- Ormö, M., A. Cubitt, K. Kallio, L. Gross, R. Tsien, S. Remington, 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. Science. 273, 1392-1395.
- Ottenschläger, I., I. Barinova, V. Voronin, M. Dahl, E. Heberle-Bors, A. Touraev, 1999. Green fluorescent protein (GFP) as a marker during pollen development. Transgenic Research. 8 (4): 279-294.
- Phillips, G. N., 1997. Structure and dynamics of green fluorescent protein. Current opinion in Structural Biology. 7: 821-827.
- Remans, T., P. M. Schenk, J. M. Manners, C. P. L. Grof, A. R. Elliott, 1999. A Protocol for the Fluorometric Quantification of mGFP5-ER and sGFP(S65T) in Transgenic Plants. Plant Molecular Biology Reporter. 17 (4): 385-395.
- Wang, S., T. Hazelrigg, 1994. Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. Nature 369: 400-403.
- Wysocka, A., Z. Krawczyk, 2000. Green fluorescent protein as a marker for monitoring activity of stress-inducible hsp70 rat gene promoter. Molecular and Cellular Biochemistry. 215 (1-2): 153-156.
- Yang, F., L. G. Moss, G. N. Phillips, 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. Nature Biotechnology. 14 (10): 1246-1251.
- Yang, M., T. Chishima, X. Wang, E. Baranov, H. Shimada, A. R. Moossa, R. M. Hoffman, 1999. Multi-organ metastatic capability of Chinese hamster ovary cells revealed by green fluorescent protein (GFP) expression. Clinical&Experimental Metastasis. 17 (5): 417-422.
- Youvan, D. C., M. E. Michel-Beyerle, 1996. Nature Biotech. 14, 1219-1220.