



PREMIO NOBEL EN QUÍMICA 2008

La proteína verde fluorescente - una herramienta valiosa en la biomedicina

Kira Welter*

Wiley-VCH, Alemania

(* kwelter@wiley.com)

Recibido: 20/11/2008

Aceptado: 05/12/2008

Resumen:

El Premio Nobel de Química del 2008 ha sido otorgado a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien por el descubrimiento y el desarrollo de la proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, "green fluorescent protein"). El uso de proteínas fluorescentes para estudiar procesos químicos en células vivas es hoy en día un método de gran importancia en la biomedicina. Además, el descubrimiento de la GFP ha permitido el desarrollo de biosensores altamente potentes y el mejoramiento de técnicas modernas de microscopía. Este artículo describe algunas de las contribuciones más importantes de los tres galardonados.

Palabras clave: biomedicina, biosensores, fluorescencia, GFP, Premio Nobel de Química

Abstract:

The Nobel Prize in Chemistry 2008 has been awarded to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien for the discovery and development of the green fluorescent protein (GFP). The use of fluorescent proteins to study chemical processes in living cells has become a very important method in biomedicine. The discovery of GFP has also allowed the development of powerful biosensors and the improvement of modern microscopic techniques. This article describes some of the most important contributions of the three laureates.

Keywords: biomedicine, biosensors, fluorescence, GFP, Nobel Prize in Chemistry

El uso de proteínas fluorescentes para estudiar procesos químicos en células vivas es hoy en día un método estándar en la biología y la investigación médica. Con esta técnica, los científicos han logrado obtener una nueva visión de la vida—en dimensiones moleculares—y han podido estudiar (in situ) procesos importantes como la propagación de células cancerígenas en organismos vivos o la forma en que trabajan las células nerviosas en el cerebro¹ (Fig. 1). La proteína verde fluorescente (o GFP, por sus siglas en inglés, "green fluorescent protein") ha jugado un papel pionero en el desarrollo de esta valiosa técnica. Este año, el Premio Nobel de Química ha sido otorgado al japonés Osamu Shimomura y a los estadounidenses Martin Chalfie y Roger Y. Tsien (Fig. 2) por el descubrimiento y el desarrollo de la GFP.

Cada uno de los galardonados representa así una etapa importante desde el hallazgo de la proteína hasta su uso actual en la investigación. Por medio de la tecnología de ADN, es posible fusionar la GFP (o alguna de sus proteínas afines) con otras proteínas presentes en células

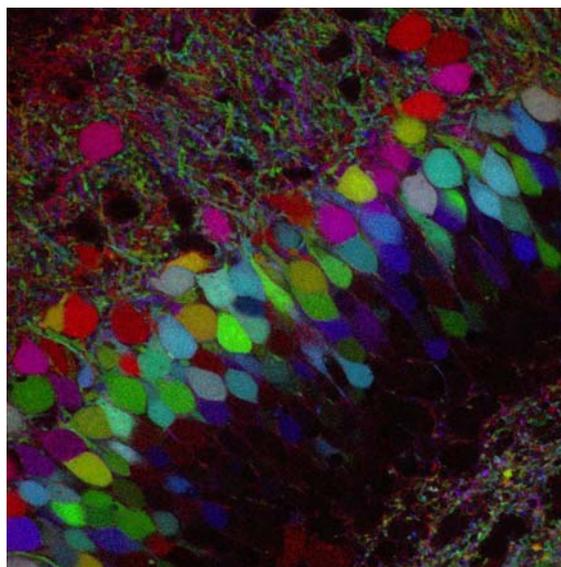


Fig. 1 Neuronas individuales observadas en el cerebro (hipocampo) de ratas tratadas con proteínas fluorescentes [Jean Livet et al., Universidad de Cambridge, imagen publicada en *Nature*]

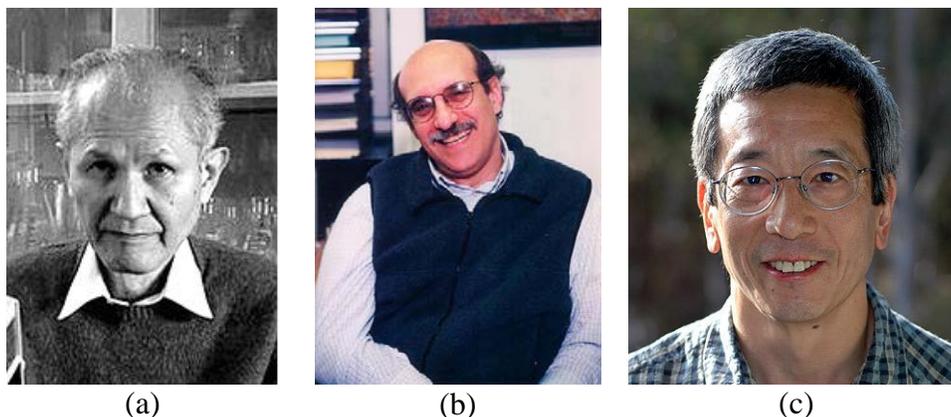


Fig. 2: (a) Osamu Shimomura [J. Henriksson/SCANPIX], (b) Martin Chalfie [Universidad de Columbia] y (c) Roger Y. Tsien [Universidad de California]

vivas, lo cual permite observar en el microscopio óptico la posición, el movimiento y las interacciones de estas proteínas, las cuales son normalmente "invisibles" para el ojo humano. De entre las aproximadamente 20.000 proteínas que hay en una célula, es posible marcar justamente la que se desea estudiar. De esta manera se puede investigar una gran variedad de procesos biológicos fundamentales, tales como la expresión genética, la división celular o la replicación cromosómica. "Con la GFP, los científicos pueden monitorear la 'vida' de una proteína dentro de un organismo vivo", dice el químico Marc Zimmer del Connecticut College, quien desde hace mucho tiempo estudia las propiedades estructurales y fotofísicas de las proteínas fluorescentes. Hoy en día, la famosa proteína verde luminosa, la cual ha revolucionado completamente las ciencias biomédicas, está siendo utilizada en miles de laboratorios en todo el mundo.

El descubrimiento

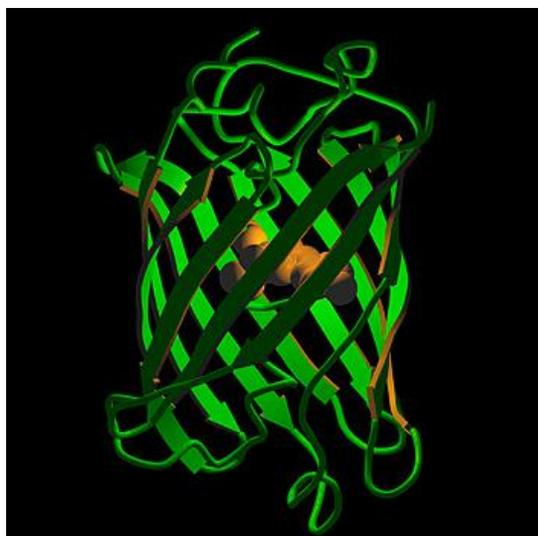
El bioquímico Osamu Shimomura nunca se hubiera imaginado esto cuando se dedicó a estudiar la bioluminiscencia en la medusa *Aequorea victoria* a principios de los años sesenta. La medusa *Aequorea victoria* se asemeja a un paraguas transparente y posee puntos verdes relucientes alrededor de su cuerpo (Fig. 3). Shimomura (quien trabajaba en aquella época en la Universidad de Princeton) quería averiguar de dónde procedía esta bioluminiscencia. Con el fin de conseguir una respuesta a esta pregunta, el científico japonés (quien hoy ya tiene 80 años de edad) decidió pasar cada una de sus vacaciones de verano en Friday Harbor, un pueblo ubicado en la costa noroccidental de Estados Unidos. Allí se dedicó a recoger medusas junto con su esposa y sus dos hijos. Cada verano, la familia lograba recopilar alrededor de 50.000 ejemplares—y esto durante diecinueve años!



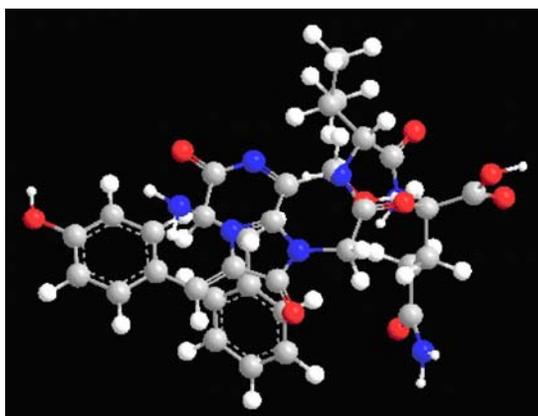
Fig. 3 La medusa *Aequorea victoria* [Sierra Blakely, imagen publicada en Wikipedia].

En 1961, Shimomura logró aislar por primera vez una proteína de la medusa *Aequorea victoria*. Sin embargo, ésta proteína no emitía luz verde, tal como él lo esperaba, sino azul. El científico la llamó "Aequorina" y descubrió que eran necesarios iones de calcio (posiblemente procedentes del agua de mar) para hacerla brillar. Un año más tarde, el investigador japonés publicó éstos resultados en el *Journal of Cellular and Comparative Physiology* (una revista de Wiley)², donde además reportó la presencia de una segunda proteína, la cual brillaba con un color verde muy intenso al ser irradiada con luz ultravioleta. Ésta misma proteína emitía una luz verde opaca en presencia de la luz del día y mostraba una apariencia más bien amarillenta al ser sometida a luz artificial. Shimomura había descubierto la GFP (Fig. 4a).

En la década de los setenta, él logró explicar que el comportamiento característico de la nueva proteína se debía a la presencia de un determinado cromóforo fluorescente (o fluorocromo) (Fig. 4b)³. Después de muchos años fue posible descubrir finalmente de dónde provenía la bioluminiscencia en la medusa *Aequorea*



(a)



(b)

Fig. 4 a) La proteína verde fluorescente (GFP) tiene la forma de un cilindro (el fluorocromo se encuentra en el medio) [Grupo de Tsien, Universidad de California, San Diego]. b) El fluorocromo de la GFP (C=gris; H=blanco; O=rojo; N=azul) se origina espontáneamente a partir de la secuencia de aminoácidos Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ de la cadena peptídica.

Victoria. Lo que ocurre es una transferencia no radiativa de energía desde el estado excitado de la aequorina (en presencia de iones de calcio) hacia la GFP (éste proceso se llama FRET, por las siglas en inglés "fluorescence resonance energy transfer", y juega un papel muy importante en muchas de las aplicaciones de la GFP). El fluorocromo de la proteína verde fluorescente absorbe ésta energía y la convierte finalmente en luz verde.

El gen apropiado

El estadounidense Martin Chalfie reconoció inmediatamente el enorme potencial de la GFP al escuchar hablar por primera vez de la existencia de la proteína durante un seminario en Nueva York en 1988. Chalfie, profesor de biología en la Universidad de Columbia, estaba trabajando ya en aquella época con el gusano nemátodo transparente

Caenorhabditis elegans—uno de los organismos modelo favoritos en la biología—y se imaginó que la GFP podría ser un recurso prometedor para estudiar mejor su sistema. El biólogo quería introducir la proteína fluorescente en las células del gusano donde funcionaría como una especie de "señal verde luminosa". Sin embargo, para poder materializar ésta idea, era necesario conseguir primero el gen apropiado de la GFP dentro del genoma (o material genético) de la *Aequorea victoria*.

Ya en esa época el biólogo molecular norteamericano Douglas Prasher se había dedicado a averiguar ésto, pues él también estaba convencido del gran potencial de aplicación de la GFP. Al lograr (en 1992) aislar y clonar el gen de la GFP — y determinar la secuencia exacta de los 238 aminoácidos que lo componen⁴ — Prasher estableció el fundamento para el uso actual de la GFP en los estudios celulares. Aunque su nombre no aparezca en la lista de los galardonados con el Premio Nobel (éste premio solo puede ser otorgado a un máximo de tres personas), su trabajo en ésta área fue esencial. Lamentablemente, a Prasher se le acabó el financiamiento antes de poder expresar el gen exitosamente en bacterias—un paso necesario para poder demostrar que había encontrado la secuencia correcta. Además, como tampoco le dieron un puesto fijo en la Institución Oceanográfica de Woods Hole, el talentoso científico tuvo que irse de allí. Luego de varias reducciones presupuestarias en distintos centros de investigación (y después de rotar de una institución a otra sin conseguir trabajo fijo), Prasher se vió obligado a abandonar la ciencia. Hoy en día, trabaja como conductor en una línea de taxis (shuttle service) en Huntsville, Alabama. Afortunadamente, antes de retirarse de la investigación, el biólogo estadounidense decidió enviarle una copia del gen de la proteína fluorescente a su colega Chalfie, lo cual permitió que se iniciara una fase importante en el desarrollo de la GFP.

Un resultado inesperado

Ésta fase comenzó en 1994 cuando Chalfie y la estudiante de postgrado Ghia Euskirchen lograron expresar el gen de la GFP en la bacteria intestinal *Escherichia coli*. Este resultado fue totalmente inesperado, ya que se pensaba que eran necesarias algunas enzimas especiales para poder generar el fluorocromo de la GFP. El trabajo de Chalfie demostró lo contrario. A diferencia de lo que se había observado hasta ese entonces para otras proteínas bioluminiscentes conocidas, la GFP no requería ni de enzimas ni de ningún otro tipo de moléculas para emitir luz. Gracias a ésta propiedad no es necesario introducir ningún tipo de sustancias químicas adicionales en las células para poder realizar estudios en organismos vivos. Debido a que el fluorocromo de la GFP se forma

espontáneamente, esta proteína puede ser utilizada como marcador para prácticamente cualquier proteína en cualquier organismo vivo. Chalfie y sus colegas la utilizaron por primera vez en 1994 para iluminar seis neuronas sensoriales en el gusano *Caenorhabditis elegans* (Fig. 5)⁵. Hoy en día, el galardonado de 61 años de edad sigue mostrando un gran entusiasmo por las virtudes de la GFP. La proteína luminosa es importante, dice Chalfie, "porque proporciona una etiqueta hereditaria que permite el estudio no invasivo de las actividades celulares en tejidos y organismos vivos". Sin embargo, la tecnología GFP también tiene una desventaja: Puesto que la célula es inducida a producir la proteína ella misma al ofrecérsele el ácido ribonucleico mensajero (mARN) de la proteína de fusión, ella lo hará aún cuando normalmente no necesite de ésta proteína [el mARN es un mensajero que se encarga de transportar la información acerca de la secuencia de aminoácidos de la proteína desde el ADN ("sala de control") hasta el ribosoma ("fábrica de proteínas")].

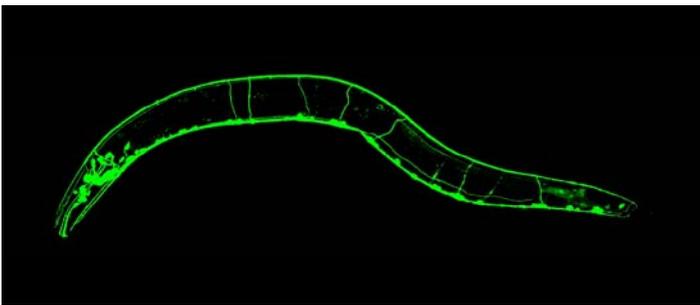
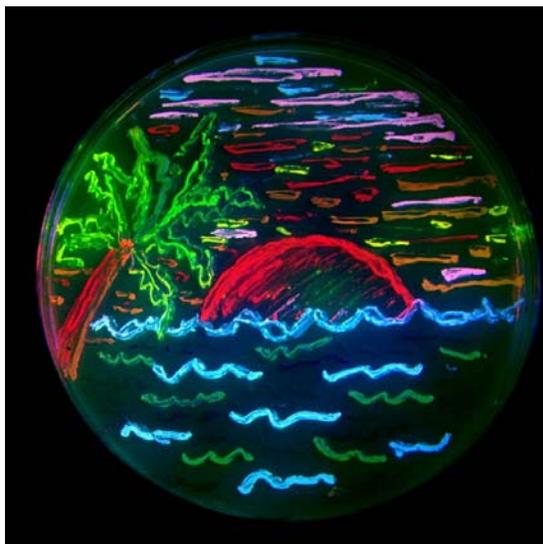


Fig. 5 Expresión de la GFP en el sistema nervioso del gusano *Caenorhabditis elegans* [John Kratz, Universidad de Columbia, imagen publicada en *Chem. Unserer Zeit*]

Un mundo lleno de colores

Durante un tiempo no se sabía exactamente cuál era el mecanismo de formación del fluorocromo de la GFP, hasta que Roger Y. Tsien y sus colegas de la Universidad de California en San Diego consiguieron una respuesta a ésta pregunta⁶. Ellos demostraron que el grupo químico fluorescente se forma autocatalíticamente a partir de la secuencia de aminoácidos Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ de la cadena peptídica de la GFP. Lo único que se necesita para que esto ocurra es la presencia de oxígeno molecular. Además, por medio de la ingeniería de proteínas, los científicos lograron producir una gran cantidad de proteínas mutantes tipo GFP con propiedades mejoradas. De esta manera, ellos pudieron ampliar la gama de colores de la proteína y producir variantes más estables e intensas en tonos como amarillo, violeta o azul—una contribución muy importante que representa la base para el estudio simultáneo de diversas proteínas en una célula, lo cual se logra marcándolas con distintos colores. Sin embargo, inicialmente no fue posible producir variantes fluorescentes en los colores rojo o anaranjado, los cuales son particularmente útiles para obtener imágenes en tejidos vivos.

Esto sólo pudo lograrse a través del sorprendente descubrimiento de los grupos de investigación de Jörg Wiedenmann⁷ (Universidad de Ulm) y Sergey Lukyanov⁸ (Academia Rusa de las Ciencias), quienes reportaron (independientemente) la presencia de proteínas de la familia GFP en corales no bioluminiscentes. Éstas nuevas proteínas tipo GFP brillaban con distintos colores,



(a)



(b)

Fig. 6 a) Varias proteínas fluorescentes (expresadas en la bacteria intestinal *Escherichia coli*) son utilizadas para crear un paisaje. [Grupo de Tsien, Universidad de California, San Diego]. b) Proteínas fluorescentes de distintos colores [Grupo de Tsien, Universidad de California, San Diego].

incluyendo el rojo. El descubrimiento de la proteína roja fluorescente en el coral *Discosoma* (DsRed) ha sido un resultado clave, dice Lukyanov, "porque la luz roja puede penetrar más profundamente en los tejidos orgánicos que la luz verde". Además, las proteínas verdes fluorescentes requieren de luz altamente energética, por ejemplo, luz azul o luz ultravioleta, para ser excitadas, lo cual puede causarle daños a las células. Por el contrario, las variantes fluorescentes rojas pueden ser excitadas con luz menos energética—como luz verde o anaranjada—lo cual representa una clara ventaja para estudios in vivo. Sin embargo, el uso de la proteína DsRed en su forma natural es bastante limitado, sobre todo debido a la formación de agregados y tetrámeros. La ingeniería de proteínas le permitió al más joven de los tres galardonados, Tsien, mejorar también las propiedades de ésta proteína y fabricar variantes (monoméricas) de la DsRed adecuadas para ser usadas en estudios celulares⁹. Gracias a este interesante trabajo, irradian hoy en día las proteínas sucesoras de la GFP y la DsRed en casi todos los colores del arco iris (Fig. 6). Tsien demostró también que es posible utilizar proteínas fluorescentes para el desarrollo de biosensores, por ejemplo, para medir concentraciones intracelulares de calcio.

Los tres ganadores del premio Nobel de química del 2008 crearon con su trabajo las condiciones necesarias no sólo para el estudio espacio-temporal de una gran variedad de procesos en organismos vivos, sino también para el desarrollo de sensores altamente potentes y el mejoramiento de técnicas modernas de microscopía.

Agradecimientos

La autora le da las gracias al Prof. Gerd Ulrich Nienhaus (Universidad de Ulm), al Prof. Karl Otto Greulich (FLI, Instituto de Leibniz para los estudios del envejecimiento) y al Prof. Thomas Gensch (Centro de investigaciones de Jülich) por sus valiosos comentarios.

Referencias

Artículos originales (selección):

1. J. Livet, T. A. Weissman, H. Kang, R. W. Draft, J. Lu, R. A. Bennis, J. R. Sanes, J. W. Lichtman. **Nature**, **450**, 56 (2007).
2. O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. **J. Cell. Comp. Physiol.**, **59**, 223 (1962).
3. O. Shimomura. **FEBS Lett.**, **104**, 220 (1979).
4. D. C. Prasher, V. K Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier. **Gene**, **111**, 229 (1992).
5. M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher. **Science**, **263**, 802 (1994).
6. R. Y. Tsien. **Annu. Rev. Biochem.**, **67**, 509 (1998).

7. J. Wiedenmann. Deutsches Patent- und Markenamt, Patent DE 197 18 640 (1997).
8. M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov. **Nat. Biotechnol.**, **17**, 969 (1999).
9. R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **99**, 7877 (2002).

Artículos generales:

10. M. Ehrenberg. *The green fluorescent protein: discovery, expression and development*. The Royal Swedish Academy of Sciences (2008).
11. G. U. Nienhaus. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **47**, 8992 (2008).
12. K. Welter, **Chem. Unserer Zeit**, **42**, 425 (2008).

Internet:

The Nobel Foundation (<http://nobelprize.org>)

Marc Zimmer, Connecticut College webpage on GFP (<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>).

Cape Cod Times, Shuttle driver reflects on Nobel snub (<http://www.capecodonline.com/apps/pbcs.dll/article?AID=/20081011/NEWS/810110328>)

Algunas citas de las entrevistas:

Marc Zimmer: "One can think of GFP as a molecular microscope, it lets scientists follow the "life" of a protein in a living organism."

Martin Chalfie: "GFP is important because it provides an inheritable tag that permits a noninvasive means of following cellular activity in living tissues and organisms."

Sergey Lukyanov: "The key finding was a protein that emitted red fluorescence because red light penetrates through animal tissue much deeper than green".