

Investigación Química

Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008: "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP"

Juan C. Ferrer

Resumen: El premio Nobel de Química de 2008 ha sido concedido a Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, por sus respectivas contribuciones científicas, que han convertido una curiosidad de la naturaleza, como es la capacidad de emitir luz verde de una medusa, en una poderosísima herramienta hoy en día ampliamente utilizada en investigación biomédica y biotecnológica.

Palabras clave: Premio Nobel, Proteína Verde Fluorescente (GFP), localización y tráfico intracelular de proteínas, interacciones proteína-proteína, investigación biomédica.

Abstract: The Nobel Prize in Chemistry 2008 has been awarded to Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Y. Tsien, by their respective scientific contributions, which have transformed a curiosity of Nature, such as the ability of a jelly fish to emit green light, into a powerful tool nowadays vastly used in biomedical and biotechnological research.

Keywords: Nobel Prize, Green Fluorescent Protein (GFP), intracellular protein localization and trafficking, protein-protein interactions, biomedical research.

Introducción

La proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP), cuyo descubrimiento y desarrollo ha merecido, según la Real Academia de Ciencias de Suecia, la distinción con el Premio Nobel de Química de Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien por sus trabajos en este campo, es un ejemplo típico, uno más, de cómo la denominada investigación básica acaba convirtiéndose en el punto de partida de una verdadera revolución científica y tecnológica, con innumerables aplicaciones prácticas en áreas diversas, que van desde la biomedicina hasta el desarrollo de exóticos animales de compañía.



Figura 1. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien.

Descubrimiento y desarrollo de la GFP

La historia comienza en el año 1960, cuando Osamu Shimomura se incorpora al laboratorio de Frank Johnson, en la Universidad de Princeton, con la intención de elucidar el mecanismo molecular responsable de la capacidad de emitir



J. C. Ferrer

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Barcelona, Avda. Diagonal, 645,
Edificio Nuevo, planta -1
08028, Barcelona
C-e: jcferrer@ub.edu

Recibido: 11/11/2008. Aceptado: 25/11/2008.

luz verde de *Aequorea victoria*, una medusa que habita las aguas del noroeste del Pacífico. En 1962, después de recolectar más de 10.000 ejemplares de la medusa y de obtener homogenados de sus fotoórganos, Shimomura y Johnson consiguieron aislar unos miligramos de una proteína que en presencia de Ca^{2+} emitía luz azul y que denominaron aequorina.^[1] Este resultado inesperado, ya que la bioluminiscencia de *Aequorea victoria* es claramente verde (Figura 2), les llevó a identificar una segunda proteína, que más tarde fue denominada proteína verde fluorescente (GFP, en sus siglas inglesas) y que en palabras del propio Shimomura, "daba disoluciones verdosas a la luz solar, amarillentas bajo luz incandescente y que emitían una intensa fluorescencia verde al ser iluminadas con luz ultravioleta".^[1]

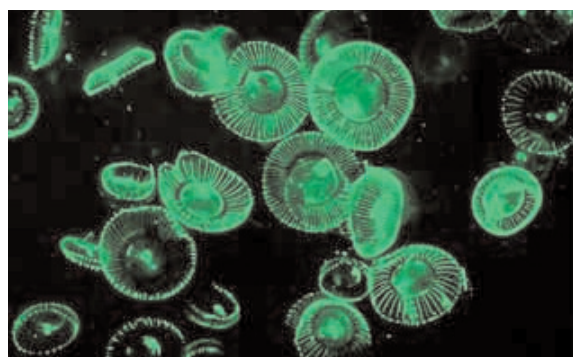


Figura 2. Bioluminiscencia de la medusa *Aequorea victoria*.

La aequorina, una proteína quimioluminiscente, es capaz de transformar energía química en lumínica, mientras que la GFP es una proteína fluorescente que absorbe luz azul o ultravioleta y libera la energía absorbida emitiendo fotones de longitud de onda mayor, correspondiente al color verde. Shimomura y colaboradores demostraron que la luz emitida por la aequorina ($\lambda_{\text{max}} = 470 \text{ nm}$)^[2] solapaba con el ancho pico de absorción de la GFP ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$). La bioluminiscencia verde característica de *Aequorea victoria* era el resultado de un proceso, hoy en día conocido como FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), en el que la energía del dipolo electrónico excitado químicamente de la aequorina (dador) se transfiere directamente y de forma no radiativa al cromóforo de la GFP (aceptor), el cual finalmente

Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008...

retorna a su estado fundamental emitiendo luz verde.^[3] Shimomura también determinó la estructura química del fluoróforo de la GFP.^[4] Tras digerir la proteína con papaina, proceso durante el cual ésta perdía sus propiedades fluorescentes, identificó un péptido con un espectro de absorción similar al de la GFP intacta, cuyo análisis y comparación con compuestos modelo le permitió proponer la estructura de *p*-hidroxibencilidenimidazolinona (1) (Figura 3), que posteriormente ha sido confirmada.^[5]

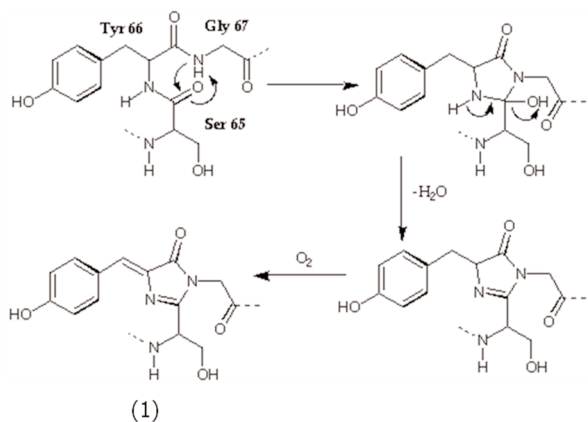


Figura 3. Estructura química y mecanismo autocatalítico de formación del cromóforo (1) de la GFP.

Martin Chalfie, el segundo de los laureados, oyó por primera vez hablar sobre la GFP el año 1988, en un seminario sobre organismos bioluminiscentes en la Universidad de Columbia. El hecho de que fuera una proteína intrínsecamente fluorescente captó de inmediato su atención. Chalfie pretendía utilizar la GFP como marcador luminoso en su investigación con el gusano *Caenorhabditis elegans*, un organismo modelo muy empleado en estudios de desarrollo, ya que consta de exactamente 959 células, que incluyen un rudimentario cerebro y un sistema nervioso, es transparente, y por lo tanto se puede estudiar en un microscopio ordinario, y aproximadamente un tercio de sus genes están relacionados con los genes humanos. Sin embargo, Chalfie necesitaba disponer del gen de la GFP para poder llevar a la práctica sus ideas. Fue Douglas Prasher, trabajando en el laboratorio de Milton Cormier, quien unos años más tarde identificó y aisló dicho gen a partir del genoma completo de *Aequorea victoria*. Prasher también mostró que el gen de la GFP codifica para una proteína de 238 aminoácidos y que el precursor del fluoróforo es el tripeptido compuesto por los residuos Ser65-Tyr66-Gly67.^[5,6] A principios de los 90 se creía que, como ocurre con muchos otros pigmentos naturales, la generación de un fluoróforo funcional en la GFP requería la participación de un complejo enzimático, probablemente característico de la medusa, que catalizara la transformación química del tripeptido precursor (Figura 3).

En 1992 Chalfie y colaboradores, tras obtener el gen de la GFP clonado por Prasher, consiguieron expresarlo en la bacteria intestinal *Escherichia coli* y en determinadas células del sistema nervioso de *C. elegans* y, en ambos casos, las células que lo expresaban mostraron una intensa fluorescencia verde.^[7] Por un lado, estos resultados arrojaban dudas sobre

la necesidad de catálisis enzimática externa para la maduración del fluoróforo de la GFP, ya que en ese caso el mismo sistema enzimático debía encontrarse también presente en la bacteria y en el gusano, además de en la medusa. Sin embargo, la importancia de estos experimentos radica en que mostraron fehacientemente la posibilidad de expresión heteróloga del gen de la GFP, es decir, en organismos distintos del que la produce normalmente, y abrieron la puerta para su utilización como marcador genético universal en el estudio de procesos dinámicos en células vivas.

Posteriormente, otros investigadores expresaron también una GFP funcional en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y en células de mamífero. Especial mención merecen los primeros experimentos realizados con *Drosophila melanogaster*, otro organismo modelo en Biología. En dichos experimentos el gen de la GFP se unió al gen de una proteína propia de la mosca del vinagre, de tal forma que las células que incorporaban esa construcción expresaban una proteína en la que se había añadido la GFP a su secuencia original. Esta proteína quimérica de fusión mantenía la actividad y la localización espacio-temporal en el interior celular de la proteína endógena nativa, al mismo tiempo que presentaba las propiedades fluorescentes de la GFP.^[8]

El tercero de los galardonados con el Nobel, Roger Y. Tsien, que había trabajado hasta la fecha en el desarrollo y utilización de marcadores fluorescentes para la medida de diversos parámetros intracelulares como pH, concentración de Ca²⁺ o de metabolitos, hace su aparición en escena en 1994. Ese año publicó un artículo^[9] en el que mostraba que la maduración postraduccional del fluoróforo de la GFP era autocatalítica, sin la intervención de enzimas o cofactores adicionales, y tan sólo requería la presencia de oxígeno molecular para que tuviera lugar el último paso del proceso que consiste en una oxidación (Figura 3). Este resultado explicaba porque previamente se había conseguido la expresión de GFP fluorescente en los organismos en los que se había ensayado, dada la ubiquidad del oxígeno molecular en las células de organismos aerobios. En el mismo trabajo, los autores introdujeron diversas mutaciones puntuales en la secuencia de la GFP que se traducían en profundos cambios de sus propiedades espectrales. Así por ejemplo la sustitución del residuo Tyr66, que forma parte del fluoróforo, por un residuo de histidina produce una proteína fluorescente en la que el pico de emisión aparece en la región del espectro correspondiente al color azul. En años posteriores, Tsien profundizó en el conocimiento de las propiedades fluorescentes de la GFP y desarrolló numerosas variantes de la proteína con características espectrales alteradas,^[9,10] con una fluorescencia más intensa^[11] o con una cinética de plegamiento mejorada.^[10] También contribuyó a la determinación de la estructura tridimensional de la GFP,^[12] que fue simultáneamente y de forma independiente caracterizada por Yang y colaboradores,^[13] en lo que ha representado un importante avance para el diseño racional de variantes de esta proteína.

La GFP tiene una peculiar forma cilíndrica de aproximadamente 45 Å de longitud por 30 Å de diámetro (Figura 4). La parte exterior consiste en un barril β formado por once seg-

mentos que envuelven una hélice α , la cual transcurre a lo largo del eje del cilindro y contiene los aminoácidos que dan lugar al cromóforo. La estructura de la proteína es tal que en su estado nativo las moléculas de agua que la rodean no pueden acceder al interior y, por lo tanto, entrar en contacto con el cromóforo. Si esto sucede, el cromóforo aún retiene la capacidad de absorber luz, pero la energía absorbida se disipa mediante procesos no radiativos y la proteína pierde la capacidad de fluorescer. La eliminación de 3 residuos en su extremo N-terminal o de 7 residuos en el C-terminal hacen que la GFP deje de ser fluorescente. A pesar de ello, la GFP es una proteína muy resistente a la desnaturalización y su estructura tridimensional y consecuentemente la fluorescencia se mantienen en un amplio intervalo de pH, temperatura y concentración salina.

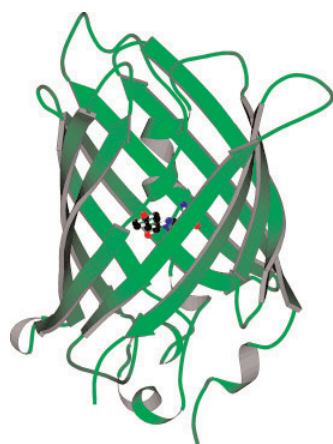


Figura 4. Estructura cristalográfica de la GFP

De las muchas variantes de la GFP que se han generado ninguna, hasta fechas muy recientes,^[14] poseía la capacidad de emitir luz roja. Esta luz penetra los tejidos biológicos con mayor facilidad y es por lo tanto especialmente útil para los investigadores que estudian células y tejidos en el interior de organismos enteros. Ante esta carencia, Sergei Lukanov decidió estudiar otros organismos marinos con la finalidad de aislar una proteína fluorescente roja. A partir de la especie de coral rojo *Discosoma striata* obtuvo una proteína, la DsRed, con las propiedades espectrales deseadas,^[15] pero que no era útil para el marcaje genético, dado su carácter obligatoriamente tetramérico. Tsien contribuyó también de forma muy notable al estudio de la DsRed, caracterizando la estructura de su fluoróforo y de las reacciones químicas que conducen a su formación,^[16] así como en la generación de variantes, que incluyen una forma monomérica de la proteína,^[17] adecuada para su empleo como marcador, y otras con propiedades espectrales modificadas o con mayor fotoestabilidad.^[18]

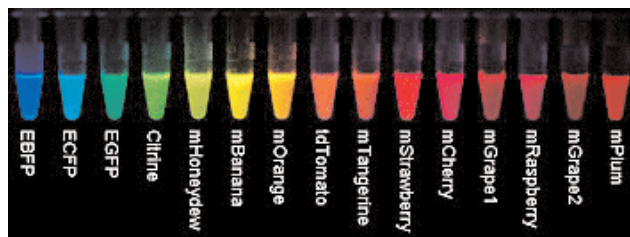


Figura 5. Paleta de colores de las proteínas fluorescentes.

Hoy en día, gracias al trabajo de Tsien y de otros investigadores, la comunidad científica dispone de una paleta de colores formada por gran número de proteínas fluorescentes que cubren prácticamente la totalidad del espectro visible (Figura 5).

Impacto científico de la GFP

Una clara demostración del altísimo impacto que ha tenido el descubrimiento de la GFP y proteínas relacionadas en la investigación en ciencias de la vida es el número de publicaciones científicas, más de 20.000, que han aparecido desde su descubrimiento en 1962 hasta la fecha y que informan sobre estas proteínas fluorescentes o sus aplicaciones.

El uso más común de la GFP ha consistido en el marcaje genético para el estudio de la localización y tráfico intracelular de proteínas y hoy en día esta técnica es práctica habitual en muchos laboratorios bioquímicos. Como los trabajos iniciales de Wang y Hazelrigg^[8] mostraron, mediante técnicas de ADN recombinante es posible fusionar el gen de la GFP al gen de la proteína que se desee y expresar esta construcción tipo celular elegido. En estas condiciones, el seguimiento en el interior celular de la proteína, ahora marcada con una etiqueta fluorescente, y la visualización de los procesos dinámicos en los que interviene, se pueden realizar mediante la simple iluminación con la luz adecuada y la observación en el microscopio. Así, empleando esta metodología se han estudiado entre otros muchos procesos biológicos la división celular, la expresión génica, la organización y replicación cromosómica, el transporte intracelular o la biogénesis y herencia de orgánulos.

Para entender el funcionamiento de la célula es imprescindible conocer, además de dónde y cuándo las proteínas realizan su función, en qué momento y bajo qué estímulos éstas interaccionan entre sí. El marcaje con proteínas fluorescentes ha demostrado ser una herramienta muy valiosa en este sentido, ya que la observación directa en el microscopio óptico no puede proporcionar tal información. La resolución máxima que se puede alcanzar en un microscopio óptico es del orden de 200 nm. Ello no es debido a limitaciones técnicas, si no a la propia naturaleza de la radiación empleada, luz visible, para la observación. Esta distancia es excesivamente grande para poder afirmar que dos proteínas marcadas que aparecen como un único punto en el microscopio de fluorescencia están efectivamente en contacto íntimo una con la otra. Sin embargo, existen diversas técnicas indirectas basadas en la GFP que permiten estudiar las interacciones proteína-proteína in vivo. Una de ellas, denominada BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*), consiste en dividir la GFP en dos mitades y fusionar una mitad a una de las proteínas cuya interacción se quiere estudiar y el segundo fragmento a la otra proteína. Por separado, las dos mitades de la GFP no son fluorescentes, pero si las proteínas a las que se han fusionado interaccionan se reconstruye una unidad funcional de GFP, que ahora si es capaz de emitir luz verde al ser iluminada. Otra técnica, FRET, que como ya se ha comentado anteriormente es la responsable de que en *Aequorea victoria* la

Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008...

quimioluminiscencia azul de la aequorina se transforme a través de la excitación de la GFP en luz verde, se basa en el marcaje con proteínas fluorescentes de distintos colores. Para que pueda tener lugar transferencia de energía entre los dos fluoróforos se han de cumplir diversas condiciones. En primer lugar, el espectro de emisión del fluoróforo dador ha de solapar con el pico de absorción del fluoróforo aceptor. Dada la gran variedad de proteínas fluorescentes actualmente disponibles, es fácil escoger una pareja que cumpla esta condición. La transferencia de energía no radiativa entre fluoróforos es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia que los separa y este proceso es significativo y medible tan solo para distancias inferiores a aproximadamente 100 Å. Así, la demostración de la existencia de FRET entre dos fluoróforos unidos respectivamente a dos proteínas distintas se considera prueba de la interacción directa entre ellas. Además de la inherente simplicidad de estas metodologías, lo que las convierte en realmente revolucionarias es que, a diferencia de otros métodos que necesariamente deben emplear células muertas, el marcaje con proteínas fluorescentes permite realizar este tipo de análisis a tiempo real y en células vivas.

La disponibilidad de proteínas fluorescentes con características espectrales diversas y la rápida evolución paralela de sofisticadas técnicas digitales de imagen han creado las sinergias necesarias para que métodos basados en fluorescencia conocidos previamente, como FRET, FCS (*Fluorescence Correlation Spectroscopy*), FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*), hayan experimentado un gran auge y se hayan desarrollado otros nuevos, como FLIM (*Fluorescence Life-time Imaging*), PALM (*high-resolution Photo-Activation Localization Microscopy*) o GRAB (*GFP Recognition After Bleaching*), para el análisis de procesos dinámicos en el interior celular.

En un ámbito más aplicado, los usos que se han dado a la GFP son también innumerables. Por ejemplo, se han generado animales transgénicos que expresan proteínas fluorescentes y que tienen aplicaciones muy diversas en investigación biomédica o incluso como extravagantes animales de compañía (Figura 6).

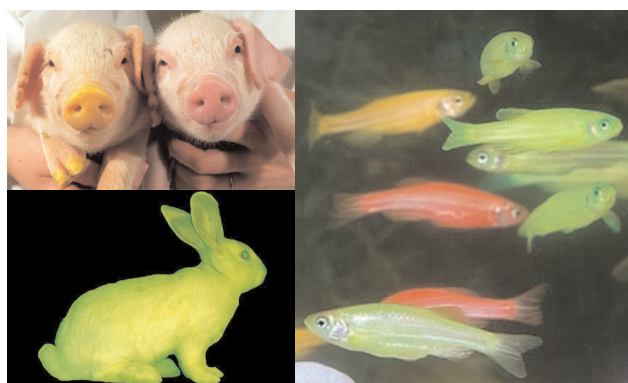


Figura 6. Animales transgénicos fluorescentes: cerdo transgénico que expresa la proteína amarilla fluorescente en pezuñas y morro; Alba, el conejo transgénico que expresa la GFP en todas la células de su cuerpo; peces fluorescentes.

El marcaje con proteínas fluorescentes se ha utilizado para la visualización de forma no invasiva de la evolución de tumores en animales de experimentación, para la observación

del crecimiento de bacterias patógenas, del desarrollo de circuitos neuronales o de la enfermedad de Alzheimer, la detección de contaminación por metales pesados o para el desarrollo de nuevas estrategias en la lucha contra la malaria, entre otros muchos ejemplos.^[19,20]

Según palabras publicadas por la propia Real Academia de Ciencia de Suecia, "ningún otro descubrimiento reciente ha tenido un impacto tan grande en la manera como se realizan e interpretan los experimentos en ciencias de la vida [...] Los métodos basados en la GFP han cambiado radicalmente el potencial experimental en prácticamente todas las ramas de las ciencias biológicas".

Referencias

- [1] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223–240.
- [2] O. Shimomura, F. H. Johnson, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3991–3997.
- [3] H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant, *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656–2662.
- [4] O. Shimomura, *FEBS Letters* **1979**, *104*, 220–222.
- [5] C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1212–1218.
- [6] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, *111*, 229–233.
- [7] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [8] S. X. Wang, T. Hazelrigg, *Nature* **1994**, *369*, 400–403.
- [9] R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 12501–12504.
- [10] R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 178–182
- [11] R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **1995**, *373*, 663–664.
- [12] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395
- [13] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips Jr., *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1246–1251.
- [14] A. S. Mishin, F. V. Subach, I. V. Yampolsky, W. King, K. A. Lukyanov, V. V. Verkhusha, *Biochemistry* **2008**, *47*, 4666–4673.
- [15] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 969–973.
- [16] L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11990–11995.
- [17] 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* **2002**, *99*, 7877–7882.
- [18] N. C. Shaner, M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, H. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. Y. Tsien, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 545–551.
- [19] M. Zimmer, "Glowing Genes: A Revolution in Biotechnology", Prometheus Books, New York, **2005**.
- [20] <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/cooluses0.html>. "Cool uses of the GFP"