

SEMBLANZAS DE LOS PREMIOS NOBEL

EL PREMIO NOBEL DE QUÍMICA

POR EL DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP)

El Premio Nobel de Química 2008 fue compartido por tres científicos:

Osamu Shimomura: Nacido el 27 de agosto de 1928 en Kyoto (Japón), cursó estudios de farmacia en Nagasaki y a partir de 1951 fue asistente en ese departamento por un periodo de cuatro años. En 1955 orientó su trabajo hacia la química orgánica. Trabajó en la Universidad de Princeton (New Jersey) de 1965 a 1982, antes de convertirse en profesor emérito del Laboratorio de Biología Marina de la Universidad de Massachusetts, y luego de la Universidad de Medicina de Boston.

Martin Chalfie: Nacido el 15 de enero de 1947 en Florida (EE.UU.). Se doctoró en neurobiología en la Universidad de Harvard y es profesor de biología en la Universidad de Columbia (Nueva York) desde 1982.

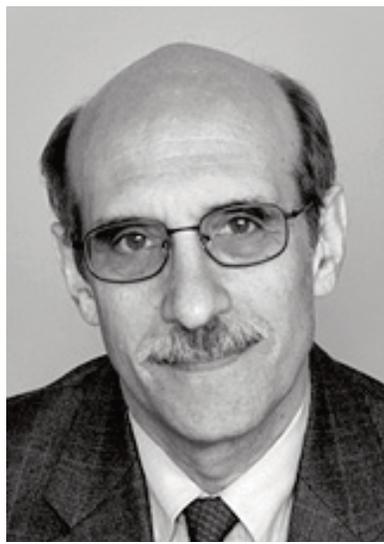
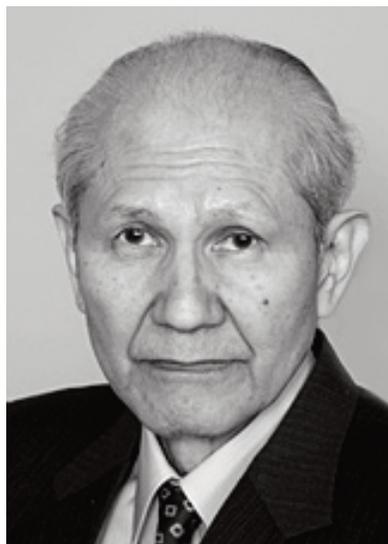
Roger Y. Tsien: Nacido el 1 febrero de 1952 en Nueva York (EE.UU.). Estudió en la Universidad de Harvard.

Tras su titulación, se unió al Laboratorio Fisiológico de la Universidad de Cambridge (Inglaterra) en 1977, y trabajó como investigador en la Escuela Gonville y Caius (Cambridge) hasta 1981. Desde 1989 esta trabajando en la Universidad de California como profesor de química y bioquímica.

Según la Academia Real Sueca, el Premio Nobel de Química de este año recompensa el descubrimiento inicial de la GFP y una serie de desarrollos importantes que han llevado a su uso como herramienta de marcado. Usando tecnología de ADN, los investigadores ahora pueden unir la GFP a otras proteínas interesantes, que de otra manera serían invisibles. Este marcador brillante permite observar los movimientos, las posiciones y las interacciones de las proteínas marcadas.

LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE (GFP) REVOLUCIONÓ LA BIOCENCIA

En los años sesenta, cuando el científico japonés **Osamu Shimomura** comenzó a estudiar la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* no se imaginaba que le llevaría a una auténtica revolución científica. Treinta años más tarde, **Martin Chalfie** usó la proteína verde fluorescente de la medusa para ayudarse en el estudio las



De izquierda a derecha: Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien.

células. Hoy se pueden estudiar procesos biológicos antes invisibles con la ayuda de las proteínas de Roger Y. Tsien, las cuales brillan con todos los colores del arco iris.

La proteína verde fluorescente, GFP, ha sido en la década pasada como una estrella guía para bioquímicos, biólogos, médicos y otros investigadores. El intenso color verde de esta proteína aparece cuando es iluminada con luz azul y ultravioleta. Permiten visualizar tumores cancerosos, mostrar el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer en el cerebro o el crecimiento de bacterias patógenas.

Un uso todavía más interesante de la GFP radica en la posibilidad de seguir procesos en el interior de las células. Cuanto más sepan los investigadores acerca de las células, cuáles son sus funciones o la forma cómo se desarrollan, mayores serán las posibilidades de que se puedan desarrollar medicamentos eficaces con un mínimo de efectos secundarios.

La observación de las moléculas que forman una célula: proteínas, ácidos grasos, hidratos de carbono, está más allá de la potencia de un microscopio ordinario. Y aún es más difícil seguir los procesos químicos que tienen lugar en su interior. Cuando los investigadores comprendan cómo las células comienzan la construcción de nuevos vasos sanguíneos, por ejemplo, se podría llegar a detener tumores cancerosos bloqueando su nutrición y oxigenación, evitando su crecimiento.

Los procesos químicos de las células suelen ser regulados por proteínas. Hay miles de proteínas diferentes, con distintas funciones. Conectando GFP a una de esas proteínas los investigadores pueden obtener una información muy útil. Se puede ver qué proteínas están en la célula, seguir sus movimientos y observar sus interacciones con otras proteínas. Gracias a la luz verde de la GFP es posible seguir el rastro de una proteína con el microscopio.

SHIMOMURA DESPERTÓ EL INTERÉS POR LA LUZ DE LAS MEDUSAS

En 1945 la bomba atómica que cayó sobre Nagasaki dejó a Osamu Shimomura temporalmente ciego. Esa pérdida de visión durante su adolescencia quizás fue lo que despertó su interés por estudiar la luz que emitían las especies marinas.

En 1955 obtuvo una plaza de asistente del profesor Yashimasa Hirata en la Universidad de Nagoya. Hirata

le puso a trabajar en un proyecto aparentemente imposible, descubrir por qué los restos de un triturado de molusco, *Cypridina*, brillaban cuando se humedecen con agua.

En 1956, contra todo pronóstico, Shimomura tenía el material en sus manos. Se trataba de una proteína 37.000 veces más brillante que el triturado de moluscos. Después de la publicación de sus resultados, Shimomura fue contratado por la prestigiosa Universidad de Princeton en Nueva Jersey, EE.UU., por Frank Johnson.

Esto despertó el interés de Shimomura por los materiales luminiscentes y se centró en la medusa «*Aequorea victoria*», que vive en los mares de la costa oeste de Norteamérica y cuyo borde exterior brilla cuando la medusa se mueve. Durante el verano de 1961, Shimomura y Johnson pescaron miles de medusas. Cortaron los bordes de las medusas y los presionaron contra un filtro para obtener lo que ellos llamaron una «squeeze». Un día Shimomura echó restos del squeeze en el fregadero y comenzaron a brillar. Se dio cuenta de que en el fregadero había agua de mar y de que los iones calcio que contenía eran los responsables de la reacción química. Curiosamente la luz no era verde como la del borde de las medusas, era azul. Les llevó unos meses purificar unos pocos miligramos del material luminiscente azul. Llamaron a la proteína «*aequorin*».

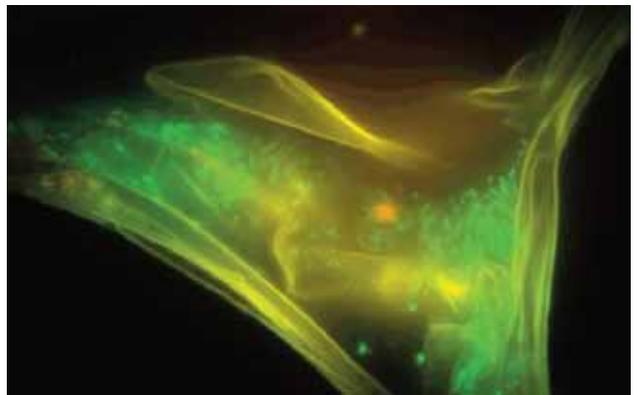


Figura 1. La proteína verde fluorescente (GFP) está formada por 238 aminoácidos unidos.

En el trabajo publicado en 1962, en el que Shimomura y Johnson describían el proceso gracias al cual se obtuvo «*aequorin*», también mencionaban que la proteína que habían aislado era de color verdoso a la luz del sol, amarillento a la luz de una bombilla y verde fluorescente bajo luz ultravioleta. Era la primera vez que alguien describía la GFP (ver Figura 1).

En los años 70 Shimomura estudió con más profundidad la fluorescencia de la GFP. Demostró que la GFP contenía un cromóforo especial. Cuando la luz ultravioleta o azul incide sobre el cromóforo, éste absorbe energía de la luz y se excita. Después, el cromóforo libera la energía emitiendo una luz verde. El grupo cromóforo de la medusa simplemente transforma la luz azul del aequorin en luz verde. Por esto la medusa y el aequorin brillan con distinto color.

Lo sorprendente de la GFP es que la proteína no necesita ningún aditivo para brillar. Es suficiente radiar la GFP con luz UV o luz azul. La luz penetra en el interior de las células y se encuentra con la GFP, la cual emite luz verde. Si los investigadores necesitaran un aditivo químico sería necesario inyectarlo en la célula, un proceso que podría alterarla y que es complicado de llevar a cabo a escala microscópica.

CHALFIE TIENE UNA BRILLANTE IDEA

El segundo laureado, Martin Chalfie, oyó hablar de la proteína verde fluorescente por primera vez en 1988 en un seminario dedicado a los organismos bioluminiscentes en la Universidad de Columbia, en Nueva York.

Diariamente Chalfie trabaja con los pequeños gusanos «*Caenorhabditis elegans*», unos de los organismos más estudiados en el mundo. A pesar de que sólo consta de 959 células, tiene cerebro, envejece y se aparea. Además, una tercera parte de sus genes están relacionados con los genes humanos. Por último, *Caenorhabditis elegans* es transparente, lo cual hace muy sencillo para los investigadores estudiar sus órganos con un microscopio ordinario.

Durante el seminario de 1988 Chalfie se dio cuenta de que la proteína verde fluorescente podría ser una herramienta fantástica para estudiar al *elegans*. La proteína podría actuar como marcador verde fluorescente para visualizar algunas de las actividades de las células del gusano.

Para poder apreciar la idea de Chalfie hay que conocer algunos conceptos básicos de la biología celular. Hay miles de proteínas en nuestro cuerpo y a pesar de que realizan diferentes funciones, todas ellas están construidas de la misma forma. Constan de veinte tipos de aminoácidos que se unen para formar largas cadenas. Las proteínas se diferencian por la longitud de la cadena, la secuencia de sus aminoácidos y la forma en

la que la cadena se enrolla en el espacio. En general cada gen codifica una proteína. Cuando una célula necesita una proteína, el gen se activa y la proteína es sintetizada.

Por ejemplo, cuando te has comido una bolsa grande de dulces y el nivel de azúcar en sangre es demasiado alto, se activa el gen productor de la insulina en las células beta del páncreas. Todas las células del cuerpo tienen el gen de la insulina en el interior de su núcleo, pero sólo las células beta del páncreas reaccionan a un aumento del nivel de azúcar produciendo insulina. El «interruptor» del gen, el promotor, situado cerca del gen en el ADN, se conecta. Cuando el promotor se activa el gen de la insulina comienza a ser copiado. La copia es necesaria si la célula necesita acceder y leer el código genético.

La copia del gen de la insulina es transferida desde el núcleo de la célula a la «factoría» de la célula, el citoplasma. Entonces la copia del gen es usada como un patrón para enlazar los aminoácidos formando la proteína de la insulina. La insulina se libera en el torrente sanguíneo donde se adhiere a los músculos y a las células de grasa, que absorben y almacenan el azúcar de la sangre.

La idea de Chalfie consistió en conectar el gen de la GFP con varios promotores de los genes o con genes de otras proteínas, así podría ver la activación de los genes promotores en las células y saber dónde son producidas las diferentes proteínas. La luz verde actuaría como un faro.

Con la objetivo de poner a prueba sus ideas, Chalfie necesitaba localizar el gen de la GFP en el genoma de la *Aequorea victoria*. Tras investigar un poco, descubrió que un investigador llamado Douglas Prasher del Woods Hole Oceanographic Institution, en Massachusetts, había comenzado a buscar el gen de la GFP. Chalfie le pidió que se pusiera en contacto con él si lograba aislar el gen correcto.

Un par de años más tarde Prasher envió el gen de la GFP a Chalfie. Chalfie entonces instruyó a una graduada, Ghia Euskirchen, en la manera que había que proceder para intentar que la bacteria intestinal *Escherichia coli* produjera GFP.

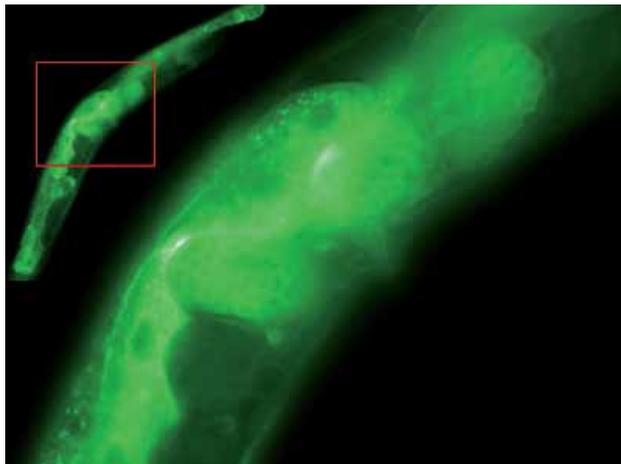
Un mes más tarde Euskirchen tuvo éxito, había visto con el microscopio que la bacteria brillaba con luz verde cuando era irradiada con luz UV. Este descubrimiento está en la base del revolucionario uso que hoy se da a la GFP. Pero el descubrimiento en sí fue inesperado.

En el siguiente paso, Chalfie colocó el gen detrás de un promotor que está activo en seis receptores neu-

ronales del tacto en *Caenorhabditis elegans*. El resultado fue publicado por Chalfie y colaboradores en la revista *Science* en febrero de 1994 (ver Figura 2). En la portada se puede ver una imagen de *Caenorhabditis elegans*, en la cual el receptor neuronal emitía una brillante luz verde (ver Figura 3).



Figuras 2 y 3. Gusano «*Caenorhabditis elegans*» con la proteína GFP incorporada en su organismo.



TSIEN CREA UNA PALETA CON TODOS LOS COLORES DEL ARCO IRIS

Aquí es donde el tercer galardonado con el Premio Nobel, *Roger Tsien*, hace su entrada. Su mayor contribución a la revolución de la GFP fue que amplió la paleta con varios colores nuevos que brillaban durante más tiempo y más intensamente.

Para empezar, Tsien indicó cómo se forma químicamente el cromóforo GFP en la larga proteína GFP formada por 238 aminoácidos. Otros investigadores habían mostrado que tres aminoácidos en las posiciones 65-67 reaccionaban químicamente entre sí para formar el cromóforo. Tsien mostró que esta reacción química necesitaba oxígeno y explicó cómo podía llevarse a cabo sin la ayuda de otras proteínas.

Con la ayuda de la tecnología del ADN, Tsien dio un paso más y cambió diversos aminoácidos en diferentes partes de la GFP. Esto condujo a que la proteína absorbiera y emitiera luz en otras regiones del espectro. Experimentando con la composición de los aminoácidos, Tsien logró desarrollar nuevas variantes de la GFP que brillan con más fuerza y en diferentes colores como el cian, azul y amarillo. Así los investigadores pueden hoy marcar diferentes proteínas con diferentes colores para ver sus interacciones.

Un color, sin embargo, que Tsien no pudo lograr producir con la GFP fue el rojo. La luz roja penetra en los tejidos más fácilmente y es especialmente útil cuando los investigadores quieren estudiar células y órganos en el interior del cuerpo.

Unos científicos rusos encontraron la proteína roja en unos corales. Pero era, desafortunadamente, más grande y pesada que la GFP. Estaba formada por cuatro cadenas de aminoácidos en vez de una y fue menos usada como marcador en los procesos biológicos. El equipo de investigadores de Tsien solucionó el problema, rediseñaron la proteína roja para que la proteína fuera más estable y fluorescente con una sola cadena de aminoácidos, con lo que puede ser fácilmente conectada a otras proteínas.

EL «BRAINBOW» O «ARCO IRIS DEL CEREBRO»

Varias de estas proteínas han sido utilizadas por los investigadores en un espectacular experimento. Modificaron ratones genéticamente para producir distintas cantidades de los colores amarillo, ciano y rojo dentro de las



Figura 4. Ratón con la proteína GFP.

células nerviosas de su cerebro. El resultado fue que el cerebro del ratón brillaba con los colores del arco iris. Los investigadores pudieron entonces seguir los nervios de las células individuales del cerebro y llamaron a este experimento el «brainbow».

APLICACIONES EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOMEDICINA

En cuanto a las aplicaciones biomédicas cabe destacar el marcaje con proteínas fluorescentes permite visualizar de forma no invasiva la evolución de tumores en animales de experimentación, simplemente observando la fluorescencia que emiten las células cancerosas al iluminar los animales vivos con luz del color adecuado (ver figura 4).

La observación del crecimiento de bacterias patógenas, el desarrollo de circuitos neuronales o de la enfermedad de Alzheimer, la lucha contra la malaria son ejemplos de los muchos estudios que han visto luz verde gracias a la GFP.

Además de sus aplicaciones en medicina, también tiene otras aplicaciones en biotecnología. La proteína verde fluorescente también se puede usar para la detección de arsénico en los pozos de agua. Éste es un enorme problema en algunas partes del sudeste de Asia, donde el arsénico existente en la naturaleza está con-

taminando el agua de miles de personas. Los investigadores han modificado genéticamente bacterias resistentes al arsénico para que se iluminen con color verde en presencia de este elemento. También han modificado otros organismos para que emitan fluorescencia verde en presencia del explosivo trinitrotolueno (TNT) o metales pesados como el cadmio o zinc. Hoy en día hay GFP incluso en los juguetes que se iluminan en la oscuridad.

LINKS

- http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/info.html
- <http://www.rsc.org/chemistryworld/Issues/2008/November/AGlowingGreenNobel.asp>
- http://garritz.com/andoni_garritz_ruiz/documentos/72-Garritz-Shimomura-Chalfie_y_Ts-EQ-2009.pdf
- www.nature.com/nature/journal/v454/n7201/supinfo/nature06998.html
- www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm

Jesús López Sanz, Elena Pérez Mayoral,
Antonio José López Peinado y
Rosa María Martín Aranda
Dpto. de Química Inorgánica y Química Técnica