

El Premio Nobel de Química 2008

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

Osamu Shimomura (1928). USA

Martin Chalfie (1947). USA

Roger Y. Tsien (1952). USA

“Por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP.”

Cómo la medusa verde fluorescente revolucionó la Biociencia

En los años sesenta cuando el científico japonés **Osamu Shimomura** comenzó a estudiar la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* no suponía que conduciría a una auténtica revolución científica. Treinta años más tarde, **Martin Chalfie** usó la proteína verde fluorescente de la medusa para ayudarse en el estudio del constituyente más pequeño de los organismos vivos, la célula. Hoy los científicos 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.

Cuando los científicos desarrollan métodos que les permiten ver cosas hasta entonces invisibles, la investigación da un gran paso hacia delante. Por ejemplo, cuando Anton van Leeuwenhoek inventó el microscopio en el s. XVII, abrió las puertas de un nuevo mundo. Los científicos pudieron ver, de repente, bacterias, espermatozoides y células sanguíneas. Cosas que antes nadie suponía que pudieran existir.

El Premio Nobel de Química de este año premia un efecto similar sobre la ciencia. *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 se la ilumina con luz azul y ultravioleta. Ello permite, por ejemplo, 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. El cuerpo está compuesto de miles de millones de células, desde las células que forman el músculo del corazón y las células beta, productoras de la insulina, a los macrófagos que destruyen las bacterias indeseables. 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.

Estudiar cómo funcionan células que miden 0,02 milímetros, no es fácil. La observación de los bloques básicos que forman una célula: proteínas, ácidos grasos, hidratos de carbono y otras moléculas, 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, pero este es un nivel de detalle al que los científicos necesitan descender. Cuando los investigadores comprendan cómo las células comienzan la construcción de nuevos vasos sanguíneos, por ejemplo, podría ser posible detener tumores cancerosos bloqueando su nutrición y oxigenación. Esto evitaría su crecimiento.

Los procesos químicos de las células son regulados normalmente por proteínas. Hay decenas de miles de proteínas diferentes, cada una con funciones distintas. Conectando GFP a una de esas proteínas los investigadores pueden obtener información vital. Pueden 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 los investigadores pueden seguir el rastro de una proteína con el microscopio.

Shimomura “pesca” material luminiscente

Hoy la GFP es una herramienta común para miles de investigadores de todo el mundo. La historia de este descubrimiento empieza en Japón tras la Segunda Guerra Mundial. La educación de

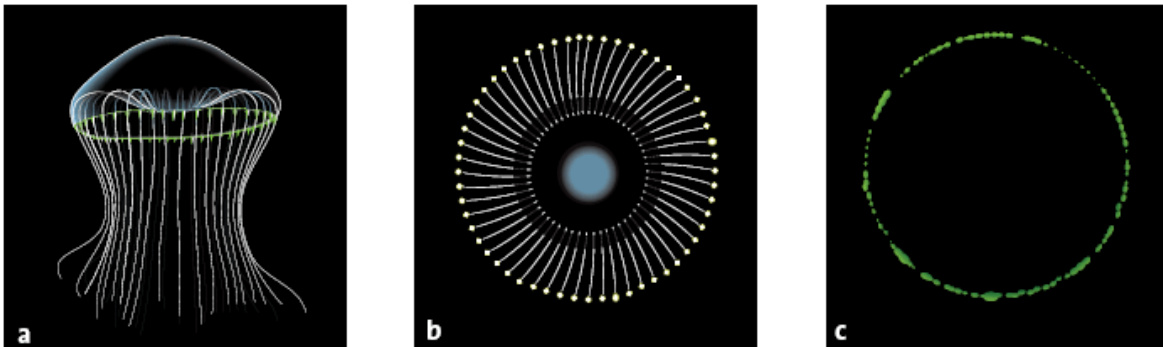
Osamu Shimomura fue interrumpida por la guerra y la devastación causada por la bomba atómica. A pesar de ello, en 1955, obtuvo una plaza de asistente del profesor Yashimasa Hirata en la Universidad de Nagoya.

El profesor Hirata lo 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.

Puede parecer extraño que Hirata diera a un asistente inexperto una tarea de esa dificultad. Un destacado grupo de investigadores norteamericanos había tratado durante mucho tiempo de aislar este material, así que Hirata decidió que no quería dar el trabajo a un estudiante que necesitaba tener éxito con el fin de obtener su doctorado.

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. Como un obsequio de despedida, el profesor Hirata propuso que a Shimomura se le otorgara un doctorado de la Universidad de Nagoya, un acto inusual ya que en realidad no era un estudiante de doctorado.

Después de un largo viaje por el Pacífico y el continente americano, Shimomura se dedicó a estudiar otro material luminiscente. Esta vez se trataba de la medusa *Aequorea victoria*, cuyo borde exterior brilla cuando la medusa se mueve.



La medusa *Aequorea victoria* vive en los mares de la costa oeste de Norteamérica (a). La medusa tiene un órgano bioluminiscente localizado a lo largo del borde del “paraguas” (b y c)

Durante todo el verano de 1961, Shimomura y Johnson reunieron medusas en Friday Harbor, en la costa oeste de Norte América. Cortaron los bordes de la medusa y los presionaron contra un filtro para obtener lo que ellos llamaron una “squeezeate”. Un día Shimomura echó restos del squeezeate en el fregadero y comenzaron a brillar. Se dio cuenta que en el fregadero había agua de mar y 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.

Johnson y Shimomura reunieron material durante todo ese verano y regresaron con squeezeate de alrededor de 10.000 medusas a Princeton. Les llevó unos meses purificar unos pocos miligramos del material luminiscente azul. Llamaron a la proteína *aequorin*.



La proteína verde fluorescente GFP consiste en 238 aminoácidos unidos formando una larga cadena. Esta cadena se pliega en forma de barril que tiene en su interior los aminoácidos 65,66 y 67, los cuales forman el grupo que absorbe luz UV y azul y produce fluorescencia verde.

La fluorescencia se vuelve verde bajo luz ultravioleta

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 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. Shimomura y Johnson la llamaron la proteína verde, pero más tarde fue llamada la proteína verde fluorescente.

En los años 70 Shimomura estudió con más profundidad la fluorescencia de la GFP. Demostró que la GFP contenía un cromóforo especial, un grupo químico que absorbe y emite luz. Cuando la luz ultravioleta o azul incide sobre el cromóforo, éste absorbe energía de la luz y se excita. En la fase siguiente el cromóforo libera la energía. Emite luz, verde esta vez.

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 realmente revolucionario de la GFP es que la proteína no necesita ningún aditivo para brillar, en contraste con otras proteínas bioluminiscentes que requieren un suplemento continuo de moléculas ricas en energía. 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 en química este año, **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. Cuando Chalfie escuchó que existía una proteína brillante se sintió encantado.

En su trabajo diario, Chalfie, trabaja con los pequeños gusanos *Caenorhabditis elegans*, uno 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, pero no menos importante, *C. 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.

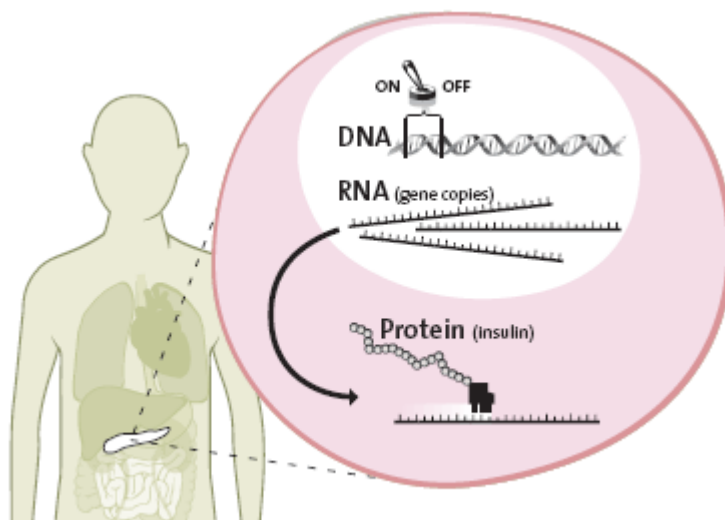
Para poder apreciar totalmente la idea de Chalfie necesitamos conocer algunos conceptos básicos de la biología celular. Como se mencionó más arriba varias proteínas realizan casi todo el trabajo en las células y hay decenas de miles de proteínas en nuestro cuerpo. A pesar de que realizan diferentes funciones, todas ellas están construidas de la misma forma. Constan de veinte tipos de aminoácidos que se enlazan para formar largas cadenas. Lo que distingue a una proteína de otra es 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. Es como copiar un valioso libro antiguo que se conserva en un almacén seguro. La copia es necesaria si la célula necesita acceder y leer el código genético.

El genoma, todo nuestro ADN, está bien protegido en el interior del núcleo de la célula.

Cuando un gen se activa se copia su información. Esta copia la realiza una molécula llamada ARN. El gen copiado es transportado al citoplasma, la "factoría" de la célula, donde unos complejos sistemas, los ribosomas, leen la información paso a paso. Tomando como base la información "leída" por los ribosomas, se enlazan los aminoácidos para formar las proteínas.



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 las células de grasa, que absorben y almacenan el azúcar de la sangre.

La idea de Chalfi consistió en conectar el gen de la GFP con varios promotores de los genes o 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.

Un descubrimiento inesperado

A fin 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 contactó con Prasher y le pidió que se pusiera en contacto con él si lograba aislar el gen correcto. En el lenguaje de los investigadores esto se llama clonar un gen. Un investigador aísla un gen del genoma de un organismo y, ayudado por la tecnología del ADN, lo coloca en un organismo unicelular que es más fácil de manejar. Por lo general los investigadores utilizan la bacteria intestinal *Escherichia coli*. Entonces usan la bacteria como una factoría de proteínas activando el gen extraño.

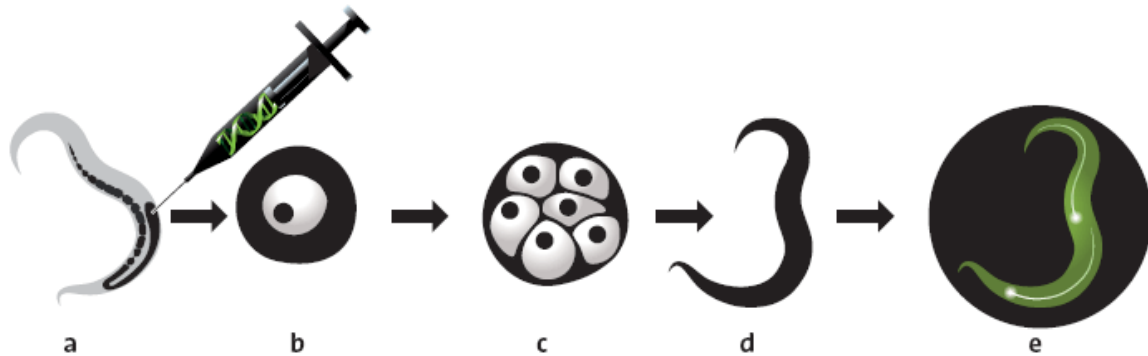
Un par de años más tarde Prasher envió el gen de la GFP a Chalfie. Chalfie entonces instruyó a una graduada, Ghia Euskirchen, en la manera que había que proceder para intentar que la *E. coli* produjera GFP.

Un mes más tarde Euskirchen llamó a Chalfie. ¡Había tenido 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 bastante inesperado.

A principio de los años 90, los científicos asumían que las moléculas y pigmentos que tienen una fluorescencia natural (los cuales dan a las flores, peces y otros organismos su color) eran producidos en varios pasos en las células. Cada uno de estos pasos requiere una proteína para controlar el proceso químico. Muchos expertos creían que unas pocas proteínas eran necesarias para producir el cromóforo de la GFP, pero el experimento de Chalfie y Euskirchen mostraba que esta premisa estaba equivocada. No se necesitaba ninguna otra proteína más que la GFP.

En el siguiente paso, Chalfie colocó el gen detrás de un promotor que está activo en seis receptores neuronales del tacto en *C. elegans*. El resultado fue publicado por Chalfie y sus colegas en la revista Science en febrero de 1994. En la portada los lectores podían ver una imagen de *C. ele-*

gans en la cual el receptor neuronal emitía una brillante luz verde.



Usando tecnología del ADN, Chalfie colocó el gen de GFP detrás de un gen promotor activo en seis neuronas receptoras del tacto en *C. elegans*. Después inyectó el ADN modificado en las gónadas de un gusano adulto (a). El gusano es hermafrodita y se autofertiliza. El gen de la GFP está presente en muchos de los huevos que el gusano pone (b). El huevo se divide formando nuevos individuos cuyos receptores neuronales brillan con luz verde bajo la luz UV. (c y d). La ilustración muestra dos de estas neuronas (e).

Tsien crea una paleta con todos los colores de 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 había mostrado previamente 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 el auxilio de otras proteínas.

Con la ayuda de la tecnología del ADN, Tsien dio el siguiente paso 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. .

Entonces dos investigadores rusos, *Mikhail Matz* y *Sergei Lukyanov*, participaron en la revolución de la GFP. Ellos buscaron proteínas similares a la GFP en los corales fluorescentes y encontraron seis más, una roja, una azul y el resto verdes.

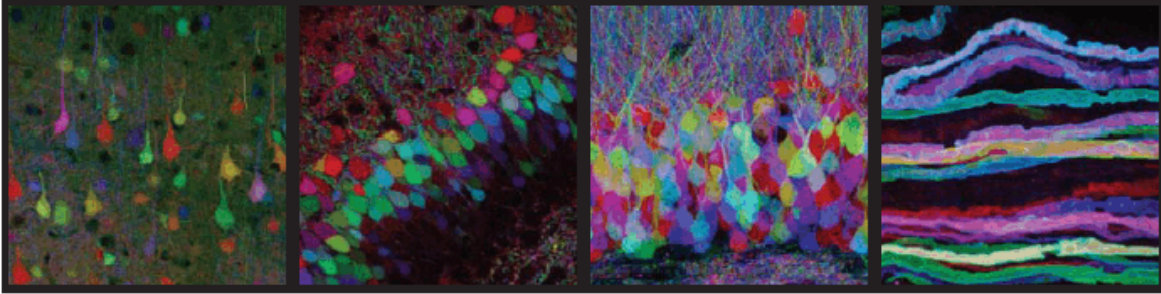
Pero la tan buscada proteína roja, DsRED, era, desafortunadamente, más grande y pesada que la GFP. DsRED constaba de cuatro cadenas de aminoácidos en vez de una y fue menos usada como marcador en los procesos biológicos. El equipo de investigadores de Tsien solucionó el problema, rediseñaron DsRED para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

A partir de esta proteína más pequeña el grupo de Tsien también desarrolló proteínas con nombres tan curiosos como *mPlum* (ciruela), *mCherry* (cereza), *mStrawberry* (fresa), *mOrange* (naranja) y *mCitrine*, indicadores de su color. Otros investigadores y compañías han contribuido con nuevos colores a esta brillante paleta. Así hoy, 46 años después de que Shimomura escribiera por primera vez sobre la proteína verde fluorescente, hay un caleidoscopio de proteínas similares a la GFP que

brillan con todos los colores del arco iris.

El "brainbow"

Tres de estas proteínas han sido utilizadas por los investigadores en un espectacular experimento. Modificaron ratones genéticamente para producir cantidades variables de los colores amarillo, cian y rojo dentro de las células nerviosas de su cerebro. Esta combinación de colores es similar a la utilizada por las impresoras. 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 en la densa telaraña del cerebro. Los investigadores llamaron a este experimento el "brainbow".



Investigadores de la Universidad de Harvard (USA) colorearon las células nerviosas del cerebro de un ratón para que se iluminen con todos los colores del arco iris. Las células nerviosas producen diferentes cantidades de tres proteínas semejantes a la GFP que dan fluorescencia amarilla, cian y roja, la mezcla de colores usada en las impresoras. Esto permite a los investigadores ver como las células nerviosas individuales se conectan a otras formando una red.

Sensores GFP para arsénico y metales pesados

La proteína verde fluorescente también puede ser utilizada para aplicaciones en biotecnología, incluyendo la detección de arsénico en los pozos de agua. Este es un enorme problema en algunas partes del sudeste de Asia, donde el arsénico que se produce de manera natural está contaminando el agua de muchos miles de personas. Los investigadores han modificado genéticamente bacterias resistentes al arsénico para que se iluminen en 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.

Un misterio que queda por resolver

Cuando Osamu Shimomura comenzó a estudiar los organismos marinos biofluorescentes, pretendía entender lo que les hacía brillar. Éste es un ejemplo típico de cómo la investigación básica puede dar lugar a una inesperada revolución científica.

Sin embargo, un misterio queda por resolver. ¿Por qué la medusa *Aequorea* brilla? Muchos organismos marinos vivos usan la luz de sus proteínas biofluorescentes para confundir a sus enemigos, para atraer a sus presas o para conseguir pareja. Pero nadie sabe cuál es la causa de que la *Aequorea victoria* produzca aequorin y GFP.

LINKS AND FURTHER READING

More information about this year's prizes, including a scientific background article in English, is to be found at the Royal Swedish Academy of Sciences' website, www.kva.se and at <http://nobelprize.org> where you can also see the press conference as web-TV. Further information about exhibitions and activities concerning the Nobel Prizes is available at www.nobelmuseum.se.

Books

Pieribone, V., Gruber D. F., *A Glow in the Dark*. 2005, Cambridge, Massachusetts, and London, England, The Belknap

Press, Harvard University Press

Zimmer M., *Glowing Genes*. 2005, Amherst, New York, Prometheus Books

Scientific review articles

Shimomura, O. (2005) The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *Journal of Microscopy* **217** 3-15
Shaner, N.C. et al. (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nature Methods* **5** 545-551

Link

Movie showing a cell producing GFP-tagged HIV particles (green dots):

www.nature.com/nature/journal/v454/n7201/supinfo/nature06998.html

Website describing the GFP-revolution: www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm

LOS LAUREADOS

Osamu Shimomura

Marine Biological Laboratory (MBL)

7 MBL Street

Woods Hole, MA 02543

USA

and

Boston University Medical School
School of Medicine

715 Albany Street

Boston, MA 02118

USA

www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html

Japanese citizen. Born 1928 in Kyoto,

Japan. Ph.D. in organic chemistry 1960, from Nagoya University, Japan.

Professor Emeritus at Marine Biological

Laboratory (MBL), Woods Hole, MA, USA and Boston University

Medical School, MA, USA.

Martin Chalfie

Columbia University

Biological Sciences

1012 Fairchild Center, M.C. 2446

New York, NY 10027

USA

www.columbia.edu/cu/biology/faculty-data/martin-chalfie/faculty.html

US citizen. Born 1947 in Chicago,

IL, USA. Ph.D. 1977 in physiology

from Harvard University. William

R. Kenan, Jr. Professor of Biological

Sciences at Columbia University,

New York, NY, USA, since 1982

Roger Y. Tsien

Howard Hughes Medical Institute

University of California, San Diego

9500 Gilman Dr

CMM West 310

La Jolla, CA 92093-0647

USA

www.tsienlab.ucsd.edu

US citizen. Born 1952 in New York, NY,

USA. Ph.D. in physiology 1977 from

Cambridge University, UK. Professor

and Investigator at Howard Hughes

Medical Institute, University of

California, San Diego, La Jolla, CA,

USA since, 1989.