

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**A importância da proteína verde fluorescente (GFP) para o
conhecimento do funcionamento do câncer**

Erik Yuri Camargo Barros
Gabriel Coneglian Barbosa
Gustavo Franco Da Silveira
João Gabriel Costa Dearo
Renan Baraldi de Moraes

Trabalho apresentado à disciplina:
LGN0232 Genética Molecular

**Piracicaba
2016**

Erik Yuri Camargo Barros
Gabriel Coneglian Barbosa
Gustavo Franco Da Silveira
João Gabriel Costa Dearo
Renan Baraldi de Moraes

A importância da proteína verde fluorescente (GFP) para o conhecimento do funcionamento do câncer

Responsável pela disciplina:
Prof. Dra. Claudia Barros Monteiro Vitorello

Colaboradoras na disciplina:
Estagiário PAE: Luís Henrique D. Serezino

Trabalho apresentado à disciplina:
LGN0232 Genética Molecular

Sumário

1. Introdução.....	4
2. Revisão Bibliográfica.....	5
3. Objetivo	6
4. Metodologia	6
5. Discussão	9
6. Referencias bibliográficas	12

1. INTRODUÇÃO

A proteína verde fluorescente (GFP) foi descoberta em 1962 pelo pesquisador Osamu Shimomura, quando o mesmo estudava a bioluminescência da medusa *Aequorea Victoria*. Nessa ocasião, ele isolou a proteína e notou a forte fluorescência quando exposta a luz UV. Em 1980, o pesquisador Martin Chalfie começou a estudar o gene da GFP, e em 1994 conseguiu isolar e adicionar na bactéria *Escherichia coli* (CHARLFIE, 2006). Após isso, o pesquisador Roger Y. Tsien descobriu variações de cores da proteína alterando a sequência de aminoácidos, observando as cores: azul, amarela, ciano, vermelha e laranja, assim, possibilitando a visualização de diferentes processos com a GFP.

Com a descoberta e o desenvolvimento do conhecimento sobre a GFP, em 2008, Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Y. Tsein ganharam o prêmio Nobel de química.

A GFP (green fluorescent protein) tem grande versatilidade, pois é usada na microbiologia, engenharia genética e também na fisiologia. Usando de técnicas de DNA recombinante, o gene da GFP pode ser introduzido em células vivas para auxílio no estudo das mesmas (ALBERTS, 2008)

Desse modo, a GFP nos permite observar processos biológicos que eram desconhecidos como: o desenvolvimento de neurônios, o crescimento e disseminação de células cancerígenas, crescimento de bactérias patogênicas, desenvolvimento da doença de Alzheimer, entre muitos outros. Mais especificamente a GFP pode ser usada na identificação de células tumorais (Koch et Al., 2001).

Os cânceres profundos dentro do corpo são difíceis de detectar em estágio inicial, e o diagnóstico precoce é fundamental para o tratamento bem-sucedido de qualquer forma de câncer (Jazirehi et al., 2001; Klement et al., 2002; Seth et al., 1997).

Em estudos recentes foi possível infectar células tumorais em ratos, a co-injeção de esferas fluorescentes e a coloração iodeto de propídio in vivo permitiram a análise da detenção inicial das células tumorais, extravasamento, viabilidade e proliferação (Gu et al., 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gene da GFP (Green fluorescent protein) é proveniente da água viva *Aquoria Victoria* (CHALFIE et al., 1994). Esse gene é constituído de 238 aminoácidos, e nas posições 65, 66 e 67 (respectivamente: serina, tirosina e glicina) se forma um cromóforo, absorvendo e liberando luz, sendo que quando recebe luz UV, emite a luz verde fluorescente (XIAO, 2009).

Através de práticas de engenharia genética e de DNA recombinante esse gene pode ser introduzido em outras células vivas, proporcionando o entendimento de processos biológicos e também possibilitando uma melhor visualização das células e suas organelas (LODISH, 2004).

Desse modo, a função principal da proteína verde fluorescente é proporcionar o conhecimento de processos biológicos, e promover avanços em diversas áreas, como na medicina e a agricultura.

Para incorporação do gene pela célula se tem técnicas envolvendo a genética molecular, entre elas estão as técnicas de transformação, que é definida por Pizzirani-Kleiner (1998) como um processo que a célula incorpora fragmentos de DNA, exterior a ela, e absorve para seu genoma as mesmas de forma estável. Porém esses processos só se dão de forma natural em células de bactérias e leveduras; em células de organismos superiores, a transformação ocorre de forma artificial. Alguns desses processos de transformação são: eletroporação (WARD et al., 1988), bombeamento de células com partículas neutras contendo o DNA de interesse, sendo o processo chamado de biobalística (ARMALEO et al., 1990) e a agrotransformação, que é o processo de transferência de DNA intermediado pela bactéria *Agrobacterium tumefaciens* (BUNDOCK et al., 1995).

Com as inúmeras aplicações da GFP, uma das mais usadas vem sendo a fusão genética. Nesse processo o gene da GFP é fundido com o gene que codifica a proteína de desejo, tendo como resultado a expressão das características e funções esperadas e somados a isso a fluorescência, desse modo permitindo o controle de localização da célula em questão (TSIEN, 1998).

A vantagem da utilização do gene da GFP é que esta proteína é de origem animal, facilmente sintetizada quando se introduz o seu gene em outros organismos. Desse modo, a proteína não causa danos ambientais nem a célula na qual ela foi introduzida.

3. OBJETIVOS

Possibilitar a compreensão do artigo científico que foca como assunto o GFP (green fluorescent protein) no estudo e aplicação em células cancerígenas in vivo, permitindo em tempo real a visualização da progressão de tumores, metástases, além do comportamento celular e da eficácia de agentes antimetastáticos, tomando como base a ligação de assuntos vistos em aulas com os presentes no artigo. Podendo assim mostrar a importância e a versatilidade do uso dessa proteína na genética molecular.

4. METODOLOGIA

Tendo descoberto as enzimas envolvidas na bioluminescência, ele percebeu que combinando luciferases com outras moléculas, era possível aproveitar a emissão de luz para mensurar processos biológicos.

Isso pavimentaria o caminho para uma revolução na pesquisa médica e no diagnóstico clínico.

Isso foi realizado pelo cientista premiado Martin Chalfie com a GFP retirado das águas-vivas.

O uso de gene repórter com base em proteína fluorescente verde (GFP), que permite a expressão genotípica a ser vista com sensibilidade e de forma não invasiva facilitou grandemente a biotecnologia. Melhorias na molécula GFP aumentaram o seu uso numa variedade muito ampla de cenários. Devido a sua natureza altamente sensível e com o aumento da disponibilidade a luciferase fez-se o repórter de maior escolha que pode ser aplicado em muitas estratégias de transformação. Estes repórteres versáteis complementam outros sistemas, tais como β -galactosidase, fosfatase alcalina secretada, cloranfenicol acetiltransferase, e β -glucuronidase [2-4], pelo fato de permitir um controle preciso e contínuo de expressão de genes em tecidos vivos. (WELSH; KAY, 1997)

A estrutura cristalina da GFP foi resolvida em 1996. Onze cadeias beta compõem o beta-barrel e um alfa-helix atravessa o centro. O cromóforo está localizado no meio da beta-barrel, que é ocasionalmente referido como a "luz na lata." O cromóforo de GFP é responsável pela sua fluorescência.

A maior diferença entre a proteína fluorescente verde e seu análogo vermelho, é que o cromóforo tem uma dupla ligação adicional (desenhado em amarelo) que se estende a conjugação cromóforos e faz com que o desvio para o vermelho.

Existe uma ferramenta muito utilizada pela engenharia genética, biotecnologia e bioquímica chamada de BLAST ela nos auxilia a encontrar sequencias proteicas e de bases nitrogenadas para determinados genes e proteínas.

Uma pesquisa BLAST permite que um investigador compare uma sequencia fornecida em uma consulta com uma biblioteca ou base de dados de sequências e identificar as bibliotecas de sequências que se assemelham à consultada e que estejam acima de um certo grau de semelhança.

A Proteína Fluorescente Verde é um polipeptídio de 238 aminoácidos caracterizado pela sequencia seguinte:

1 mskgeelftg vvpilveldg dvnghkfsvs gegedatyg kltkficct gklpvpwptl

61 vttltygvqc fsrypdmkr hdfksampe gyvqertisf kddgnyktra evkfegdtlv

121 nriekgidf kedgnilghk leynynshnv yitadkqkng ikanfktrhn iedggvqlad

181 hyqqntpigd gpvllpdnhy lstqsalskd pnekrdhmv lfvtaagit hgmdelyk

Para realizar tais aplicações científicas alguns processos devem ser realizados para que se possa utilizar a GFP como gene repórter.

Um gene repórter é um gene que, na técnica de engenharia genética, é inserido conjuntamente com outros genes (ou sequências) de interesse. A atividade do gene repórter pode ser acompanhada mais facilmente - por exemplo, o gene da aquaporina produz uma proteína fluorescente verde (ela brilha no escuro e produz uma luz esverdeada), se esse gene é colocado junto com um outro gene A, se a

célula apresentar um brilho esverdeado, então é quase certo que o gene A também estará presente. Então esse gene reporta a presença de outro gene, que é o de interesse. (WELSH; KAY, 1997).

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é provavelmente o organismo mais conhecido da microbiologia. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Possui múltiplos flagelos dispostos em volta da célula. A *E.coli* é um dos poucos seres vivos capaz de produzir todos os componentes de que é feita, a partir de compostos básicos e fontes de energia suficientes (ALMEIDA. A, 2013). Ela é uma enzima fermentadora de açúcares que é grandemente responsável pela flatulência de cada pessoa, especialmente após o consumo de leite e seus derivados. Atualmente, muito se sabe sobre a bioquímica e a genética da *E. coli*, sendo ela uma ferramenta importante para a pesquisa biológica básica e considerada por muitos pesquisadores quase como um animal de laboratório (TORTORA, et al., 2003).

Um plasmídeo para ser um bom vetor de clonagem deve conter as seguintes propriedades:

- a) possuir uma origem de replicação, ou seja, uma sequência de DNA que permita que o vetor seja replicado na célula hospedeira;
- b) múltiplos Sítios de Clonagem, é o local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem;
- c) as células transformadas com tais vetores são capazes de crescer num meio contendo o antibiótico, enquanto que as células não transformadas acabam morrendo. (WELSH; KAY, 1997)

Os plasmídeos são ferramentas importantes nos laboratórios de genética e bioquímica, onde são usados rotineiramente para multiplicar ou expressar genes específicos. Inicialmente, o gene a ser replicado é inserido num plasmídeo. Os plasmídeos são então inseridos em bactérias por um processo chamado transformação.

Após alguns processos realizados em laboratório, a transformação do gene e sua multiplicação realizada pela bactéria *E.coli*, teremos em mão uma grande ferramenta biológica que poderemos utilizar em diversos casos. Atualmente a GFP tem ajudado em muitos processos de visualização, na medicina, por exemplo, ela auxilia em

processos tomográficos, visualização de vírus como o HIV e em caso de câncer pode encontrar a célula defeituosa e acompanhar o processo de metástase.

5. DISCUSSÃO

Atualmente, 8,2 milhões de pessoas morrem por ano de câncer no mundo. No Brasil, foram registradas 189.454 mortes por câncer em 2013 (INCA). Para 2016, estima-se a ocorrência de mais de 596 mil casos da doença no País

Entre os homens, são esperados 295.200 novos casos, e entre as mulheres, 300.870. O tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos será o de pele não melanoma (175.760 casos novos a cada ano), o que corresponde a 29% do total estimado. Depois desse, para os homens, os cânceres mais incidentes serão os de próstata (61.200 novos casos/ano), pulmão (17.330), cólon e reto (16.660), estômago (12.920), cavidade oral (11.140), esôfago (7.950), bexiga (7.200), laringe (6.360) e leucemias (5.540). Entre as mulheres, as maiores incidências serão de cânceres de mama (57.960), cólon e reto (17.620), colo do útero (16.340), pulmão (10.860), estômago (7.600), corpo do útero (6.950), ovário (6.150), glândula tireoide (5.870) e linfoma não-Hodgkin (5.030). (INCA)

Diante esses dados, que representam o câncer no Brasil, cientistas e pesquisadores, com a ajuda das características da GFP, trabalham constantemente para que o câncer possa ser uma enfermidade menos temida por todas as pessoas.

Quando o Prêmio Nobel de Química foi concedido pela descoberta da proteína fluorescente verde (GFP) em 2008, o Comitê caracterizou a GFP como uma estrela-guia para processos bioquímicos permitindo o que eram anteriormente invisíveis, tais como as células cancerígenas se espalhando, a ser notavelmente visíveis, GFP e seus primos vermelho, azul, amarelo e laranja revolucionaram a investigação biomédica e permitiu que cada doença grave, causa e efeito, iluminem-se em laboratório para que os pesquisadores estejam aptos visualizar, compreender e, eventualmente, conquistar os processos bioquímicos. (PRÊMIO NOBEL DE QUÍMICA, 2008)

As proteínas fluorescentes permitem visualizar, em tempo real, todos os aspectos importantes do cancer em animais vivos, incluindo o ciclo de células cancerígenas, a mitose, apoptose, morte, invasão, metástase e angiogênese. Proteínas coloridas

permitiram a codificação de cores de células cancerosas em crescimento in vivo e permitiu a distinção de acolhimento de tumor com resolução de uma única célula em vivo.(C. BAUMSTARK; M. PALM; J. WEHNER; M. OKABE; M. IKAWA;G. HORNECK, 1999)

O comportamento de células cancerígenas marcadas com GFP e células marcadas com proteína fluorescente vermelha (RFP) pode ser simultaneamente comparada em vivo. O estroma e as células do câncer podem ser codificados por cores com proteínas fluorescentes. Por exemplo, um ratinho transgênico que expressa GFP em todas as suas células (ou em células específicas tais como células endoteliais) transplantados com células cancerígenas que expressam RFP permite que a interação entre as células cancerosas e as células hospedeiras a serem visualizados em tempo real.

O comprimento de onda de excitação reduz a extensão da fotodegradação e permite a imagiologia profunda. Portanto, a imagem em tempo real de crescimento tumoral e metástase pode ser realizada no animal intacto em tecidos profundos. A resolução é tão precisa que podemos analisar uma única célula e fragmentos de pele, cérebro, pulmão, fígado, etc. (HOFFMAN, 2015)

Para marcar, por exemplo tumores existentes em ratos é utilizado o adenovírus para assim este servir de vetor e no DNA da célula tumosora faze lo expressar o gene GFP, tornando assim, essa celula fluorecente e de facil acompanhamento por medicos e estudantes.

Diferentes cores das proteínas colocadas nas células ajudam a distinguir fases distintas da célula, estágios do câncer, além outras características como caráter da célula sendo tumorosa ou não.

Quando a GFP é introduzida na célula, sendo ela uma célula normal ou tumorosa, o gene não sai mais da mesma e é transmitido para suas filhas a cada divisão celular. Por isso, o câncer pode ser identificado e acompanhado no individuo, caso seja introduzida a GFP na fase inicial das células do câncer, pelo fato da permanência do gene nas várias gerações das células da doença.

Conclusões e previsões futuras

As células tumorais que expressam de forma estável a GFP e outras proteínas fluorescentes in vivo são uma nova ferramenta poderosa para a investigação do cancer. A estabilidade da expressão foi estudada por Naumov, que observou que todas as células do ovário de hamster chinês utilizadas no seu estudo eram

fluorescentemente estáveis mesmo após 24 dias de crescimento em meio a ausência de antibióticos vetoriais seletivos. Esta descoberta implica que a GFP pode ser expressa de forma estável em células in vivo. Este recurso provou ser verdadeiro para todas as células estudadas até agora e é exemplificado pela geração de extensas metástases que expressam GFP.

Novos desenvolvimentos procuram expandir o uso de imagens GFP in vivo. Um método melhorado de formação de imagens GFP de corpo inteiro utilizou uma fonte de excitação de laser e filtros de banda e de emissão de fluorescência do tecido conjuntivo. O processamento das imagens de fluorescência GFP primárias adquiridas pela câmara de dispositivo de carga acoplada pode agora ser subtraído pela autofluorescência do tecido de fundo. Esta abordagem obteve 100% de sensibilidade e especificidade para a detecção in vivo de 10% de células que expressam GFP dentro de uma população de células tumorais pancreáticas que foram enxertadas subcutaneamente ou implantadas ortotopicamente nos pâncreas de ratinhos sem pelos. As sondas NEARINFRARED que podem ser ativadas por proteases 70-72 podem também ser utilizadas para imagens ópticas de tumores. Esta abordagem requer que o tumor expresse uma protease específica que cliva a sonda injectada de modo que se torne fluorescente.(NAUMOV et al.8)

No entanto, os tumores em tecidos tais como o fígado, onde as células normais expressam muitas proteases diferentes, não podem ser visualizados porque os sinais de fundo são muito elevados. As aplicações de imagens celulares in vivo com proteínas fluorescentes devem se expandir com o desenvolvimento de proteínas com novas cores.(SHANER et al.73)

Com mais modificação genética este grupo criou uma série de proteínas modificadas com novas cores de amarelo-laranja a vermelho-laranja. Estas novas proteínas coloridas incluem mBanana, tdTomato, mTangerine e mStrawberry, com máximos de emissão cada vez mais longos. Espera-se que muitas proteínas coloridas adicionais sejam isoladas de vários organismos e modificadas para produzir ainda mais cores. A disponibilidade de proteínas coloridas diferentes permitirá a imagem simultânea de múltiplos eventos celulares in vivo, ultrapassando o que pode atualmente ser visualizado tanto in vivo como in vitro. Imagens de proteínas fluorescentes está permitindo não só imagens de corpo inteiro, mas, devido à sua resolução celular e múltiplas cores, está dando origem a um novo campo da biologia celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHIMOMURA, O.; The discovery of aequorin and Green fluorescent protein. **Journal Microscopy**, v.217, p. 1-2, 2005.

Alberts, B. *et al.* (2008). *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science. p592-598.

Chalfie, M. and Kain, S. R. (2006). *Green fluorescent protein: Properties, applications and protocols*. 2nd ed. New Jersey: Wiley - Interscience.

Lodish, H. *et al.* (2004). *molecular cell biology*. 5th ed. New York: W.H. Freeman. p188-189.

Xiao, J. (2009). Single-molecule imaging in living cells. In: Hinterdorfer, P. and Van Oijen A. *Handbook of single-molecule biophysics*. New York: Springer. p46-84.

Gu J, Kagawa S, Takakura M, Kyo S, Inoue M, Roth JA and Fang B. (2000). *Cancer Res.*, 60, 5359 ± 5364.

Koch PE, Guo ZS, Kagawa S, Gu J, Roth JA and Fang B. (2001). *Mol. Ther.*, 3, 278 ± 283.

Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D and Kerbel RS. (2002). *Clin. Cancer Res.*, 8, 221 ± 232.

Jazirehi AR, Ng CP, Gan XH, Schiller G and Bonavida B. (2001). *Clin. Cancer Res.*, 7, 3874 ± 3883.

CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W.W., PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* v.263, p. 802-805, 1994.

PIZZIRANI-KLEINER, A. *Genética de Fungos no Laboratório*. Editora Universidade do Amazonas, 1998, 138p.

WARD, M.; KODAMA, K. H.; WILSON, L. J. The *oliC* gene of *Aspergillus niger* isolation, sequence and use as a selectable marker for transformation. *Current Genetics*, v. 28, p. 37-42, 1988.

ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JONHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Current Genetics*, v.17, p. 97, 1990

BUNDOCK, P., DENDULKRAS, A., BEIJERSBERGEN, A., HOOYKAAS, P.J. J. Transkingdon T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal*. v.14, p. 3206-3214, 1995.

Hoffman RM. Fluorescent proteins as visible in vivo sensors. In: Morris May C (ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Burlington, 2013;113, pp389–402.

Tome Y, Sugimoto N, Yano S, et al. Real-time imaging of α_v integrin molecular dynamics in osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Anticancer Res* 2013;33:3021–3025.

Kojima T, Hashimoto Y, Watanabe Y, et al. A simple biological imaging system for detecting viable human circulating tumor cells. *J Clin Invest* 2009;119:3172–3181.
Kolostova K, Pinterova D, Hoffman RM, et al. Circulating human prostate cancer cells from an orthotopic mouse model rapidly captured by immunomagnetic beads and imaged by GFP expression. *Anticancer Res* 2011;31:1535–1539.

Yamauchi K, Yang M, Jiang P, et al. Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer cell-trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system. *Cancer Res* 2006;66:4208–4214

Chishima, T. et al. Metastatic patterns of lung cancer visualized live and in process by green fluorescent protein expression. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 547–552 (1997).

Shcherbo, D.; Merzlyak, E.M.; Chepurnykh, T.V.; Fradkov, A.F.; Ermakova, G.V.; Solovieva, E.A.; Lukyanov, K.A.; Bogdanova, E.A.; Zaraisky, A.G.; Lukyanov, S.;

Chudakov, D.M. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging. *Nat. Methods* 2007, 4, 741-746.

Yang, M.; Jiang, P.; Hoffman, R.M. Whole-body subcellular multicolor imaging of tumor-host interaction and drug response in real time. *Cancer Res.* 2007, 67, 5195-5200.

Tome Y, Uehara F, Mii S, et al. 3-dimensional tissue is formed from cancer cells in vitro on Gelfoams, but not on Matrigel™. *J Cell Biochem* 2014;115:1362–1367.

Soto MS, Serres S, Anthony DC, et al. Functional role of endothelial adhesion molecules in the early stages of brain metastasis. *Neuro Oncol* 2014;16:540–551.

Yano S, Zhang Y, Miwa S, et al. Spatial-temporal Fucci imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle* 2014;13:2110–2119.