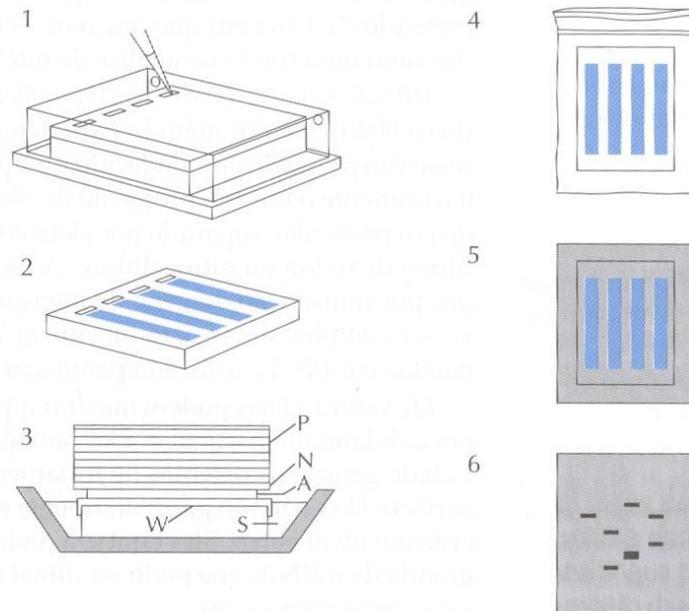


Triagem Baseada em Análise Computacional. Com as seqüências do genoma de muitos organismos completas ou quase completas, geralmente não é necessário isolar um cDNA de uma biblioteca. Um gene de interesse pode ser identificado pela triagem de um banco de dados. Usando tal informação, podem ser feitos primers específicos para a extremidade 5' e 3' do gene. O primer 3' é pareado ao mRNA isolado de células que expressam o gene de interesse, e um cDNA é produzido utilizando-se RT. A seguir, o primer 5' é adicionado e a síntese da segunda fita é realizada com a utilização do DNA polimerase da *E. coli*, produzindo um cDNA fita dupla específico. Essa estratégia tem um ponto fraco. Se o mRNA está presente em pequena quantidade, pode ser difícil ter cDNA fita dupla suficiente para efetuar o trabalho. A alternativa é fazer a transcrição reversa do mRNA para produzir o cDNA e, então, adicionar o primer 5' e usar a reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) para amplificar o cDNA em várias cópias, conforme a necessidade (ver Capítulo 6). Esse método é denominado PCR transcriptase reversa (RT-PCR, do inglês *transcriptase reverse PCR*).

Trabalhando com genes clonados

Uma vez que um gene tenha sido clonado de uma biblioteca, uma grande quantidade de possibilidades se abrem para análise.

Hibridização Southern. A hibridização Southern (ou *blotting*), assim denominada após sua descoberta por Ed Southern, pode ser utilizada para estudar a organi-



Southern blotting

(1) Aplicar o DNA digerido no gel de agarose e separar por eletroforese; (2) visualizar o DNA e desnaturar no gel; (3) transferir o DNA para filtro de nitrocelulose por capilaridade (P = toalhas de papel, N = nitrocelulose, A = gel de agarose, W = esponja, S = solução com alta concentração de sal); (4) hibridizar a sonda radioativa ao filtro que, se corado, será uma réplica do gel no espelho; (5) lavar o filtro e revestir com filme de raios X e (6) o autoradiograma realizado revela a localização de bandas às quais a sonda se ligou. (Adaptada a partir do projeto de arte de Lisa Shoemaker.)

zação de DNA genômico. Como na triagem de biblioteca, Southern baseou-se na capacidade de uma fita de DNA procurar por sua seqüência complementar e ligar-se a ela.

O DNA total é isolado e digerido em reações separadas com uma ou várias enzimas de restrição. Então, o DNA digerido é separado por eletroforese em um gel de agarose. Depois da eletroforese, o DNA no gel é desnaturado para criar fitas simples e, então, transferido para um filtro de nylon ou nitrocelulose por capilaridade. Uma sonda radioativa fita simples é incubada com o filtro sob condições que promova hibridização. O filtro é lavado e exposto a um filme de raio X. Como em triagem de placas ou colônias, a sonda radioativa hibridiza a sua seqüência complementar de DNA no filtro e uma banda no filme reflete a posição dessa seqüência no gel de agarose. O PCR tem substituído em grande parte a hibridização Southern para análise de fragmentos de DNA relativamente curtos, incluindo exames forenses e de identidade. No entanto, o *blotting* ainda é utilizado para estudar arranjos de DNA em larga escala e para analisar o genótipo de plantas e animais que são submetidos à manipulação de células-tronco com a finalidade de introduzir um gene novo (transgene). No último caso, o DNA genômico é isolado e hibridizado com uma sonda para mostrar a presença ou a ausência do transgene.

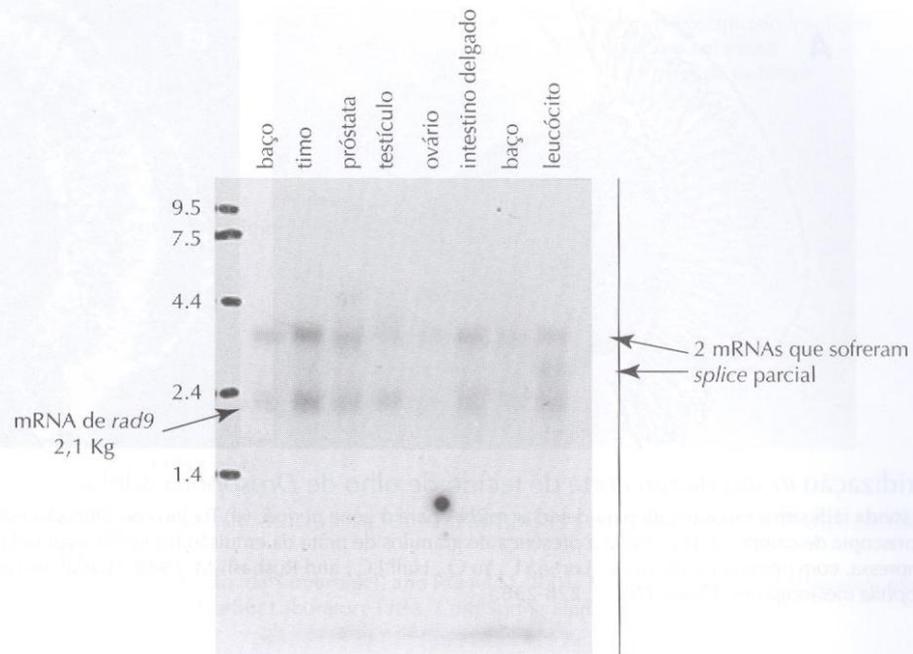
Análise de mRNA

Todas as células no organismo (exceto as germinativas) carregam o mesmo grupo de genes, mas apenas um subgrupo deles é ativo em uma célula ou em um tecido em particular. Por exemplo, células nervosas necessitam de proteínas estruturais e enzimas diferentes daquelas de células renais. Para entender quais genes têm funções em quais células, é necessário ver quais deles estão sendo transcritos em mRNA ("expressados"). Uma vez que um gene é clonado de uma biblioteca, ele pode ser utilizado como uma sonda na análise de mRNA.

Hibridização Northern. *Northern blotting* (nome dado como trocadilho para *Southern blotting*) é um método para detectar mRNA e determinar se um gene de interesse é expressado em um tecido ou tipo celular específico. O *Northern blotting* segue basicamente o mesmo protocolo do *Southern blotting*. O mRNA é isolado de um tecido em particular, separado por eletroforese em um gel desnaturante e transferido em filtros de nylon ou nitrocelulose. As sondas radioativas para o mRNA são preparadas por transcrição do gene de interesse na *direção oposta*. (Lembrar que a sonda deve ser complementar para hibridizar ao mRNA, portanto, a fita que normalmente não faz o mRNA é utilizada para fazer a sonda.)

Os *northern blots* podem mostrar aqueles genes que estão ativos ou inativos em tipos celulares em particular. Eles também podem mostrar alterações nos níveis de atividade gênica decorrentes de tratamento ou perturbação específica. No entanto, os *northern blots* não são particularmente sensíveis e podem não detectar um gene transcrito em nível baixo. Eles também podem necessitar uma quantidade razoavelmente grande de mRNA, que pode ser difícil de obter a partir de um tecido pequeno, tal como o rim embrionário.

Hibridização in situ. A hibridização *in situ* é o método mais sensível para visualização de atividade gênica diretamente em células ou tecidos fixados. Ela foi desenvolvida independentemente por dois grupos, em 1969: Joseph Gall e Mary Lou Pardue, em Yale; e Max Birnstiel e Ken Jones, no Institute of Molecular Biology em Zurique, e no MRC, em Edinburg. Em vez da extração do mRNA das células, o mRNA é deixado no local e a célula, o tecido ou o embrião inteiro é fixado utilizando-se paraformolaldeído. A fixação previne a quebra de moléculas e as mantém no local para análise.



Northern blot

Este Northern blot mostra as quantidades relativas de mRNA de *rad9* humano em vários tecidos (listados acima de cada raia). Um marcador de tamanho também foi deixado correr e as posições dos mRNAs são mostradas à esquerda em quilobases. O mRNA *rad9* que sofreu *splice* total de 2,1 kb é visto em várias intensidades em cada raia. Um mRNA que sofreu *splice* parcial também é visto em cada raia. A última raia mostra outro mRNA de tamanho intermediário que sofreu *splice* parcial. (Cortesia de Kevin Hopkins e Howard Lieberman, Columbia University.)



Hibridização *in situ* de um embrião de camundongo com uma sonda de *miogenina*

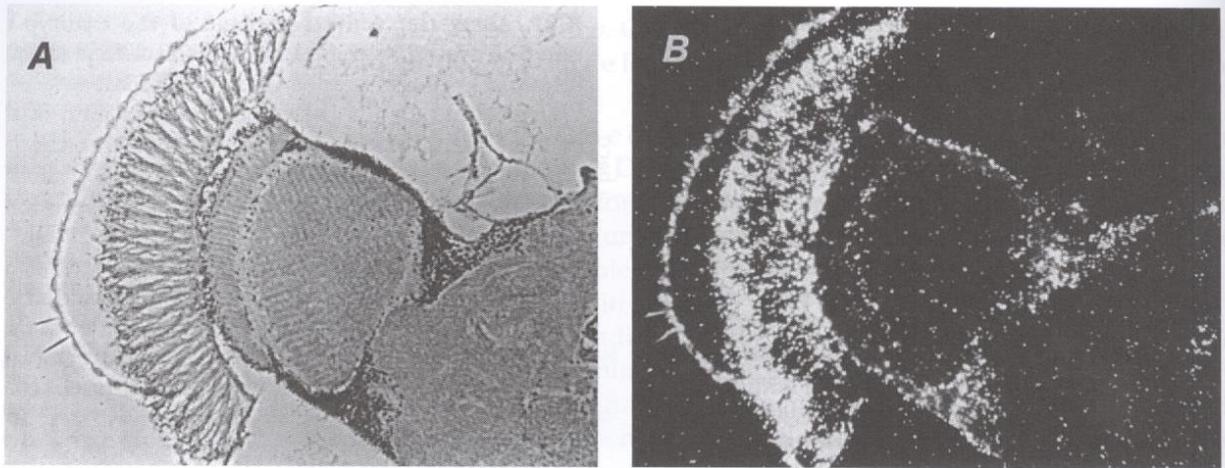
A sonda foi visualizada com o indicador BCIP/NPT. A expressão do gene é mostrada como os retalhos escuros no miótomo dos somitos, que se tornarão músculo. (Cortesia de Deborah Chapman, University of Pittsburgh.)

A primeira vez em que essa técnica foi utilizada, os tecidos eram cortados em seções muito finas e aderidas em lâminas de microscópio. As sondas radioativas eram utilizadas para procurar atividade gênica diretamente em cortes de tecido. As soluções contendo sondas eram adicionadas a cada lâmina e, após uma incubação, as lâminas eram lavadas para remover qualquer sonda não-ligada. Em lugar de expor as lâminas ao filme fotográfico, as próprias lâminas eram mergulhadas em uma emulsão fotográfica. As lâminas eram expostas algum tempo à emulsão e depois reveladas, usando os mesmos agentes químicos empregados na revelação de filmes fotográficos.

Algumas das desvantagens da técnica são as questões de segurança envolvidas no uso de materiais radioativos, além da necessidade de cortes de tecidos. O corte consome tempo; e é difícil obter uma descrição global de expressão gênica de todo um organismo a partir de seções pequenas. Tais problemas são bem aplicados por meio da hibridização *in situ* de amostras inteiras com sondas não-radioativas.

Em vez da marcação de sondas com nucleotídeos radioativos, as mesmas são ligadas a substratos que fluorescem ou produzem um precipitado colorido (tais como biotina, digoxigenina e fosfatase alcalina). Quando um substrato fluorescente é utilizado para marcar, a sonda ligada ao mRNA no tecido pode ser visualizada *diretamente*, por um microscópio de fluorescência. As sondas marcadas com fosfatase alcalina, biotina ou digoxigenina devem ser visualizadas *indiretamente*.

A fosfatase alcalina reage com BCIP/NPT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroblue tetrazolium cloreto) para formar um precipitado púrpura insolúvel. Assim, esse marcador químico é adicionado diretamente ao tecido para visualização do mRNA ligado. As sondas marcadas com digoxigenina são visualizadas pelo uso de anticorpos antidigoxigenina ligados a uma enzima marcadora tal como a fosfatase alcalina. Novamente, é adicionado BCIP/NPT, que forma um precipitado colorido. A

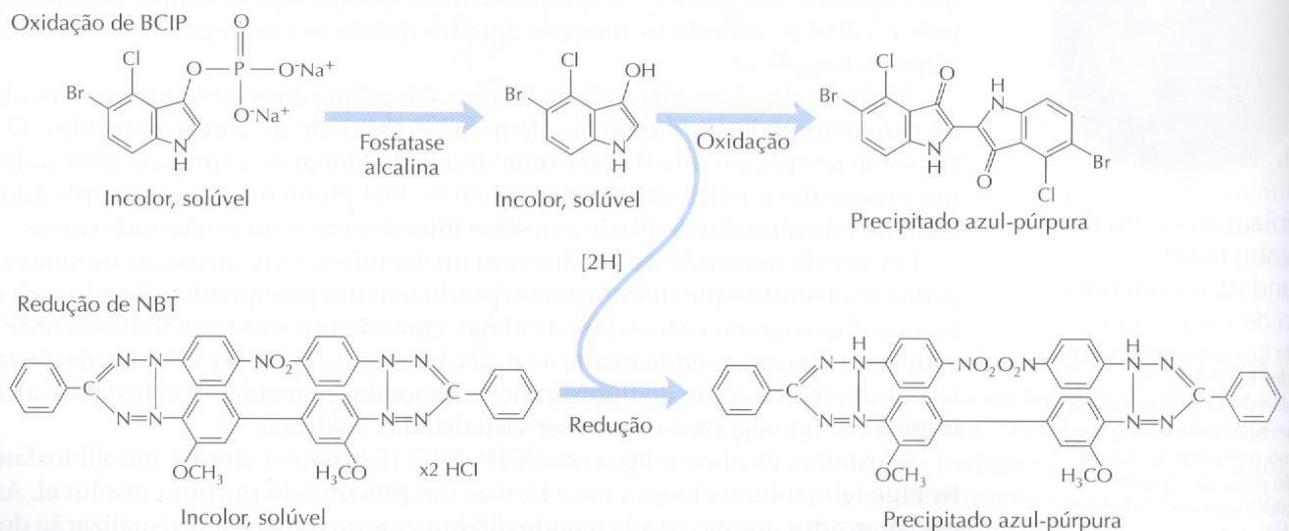


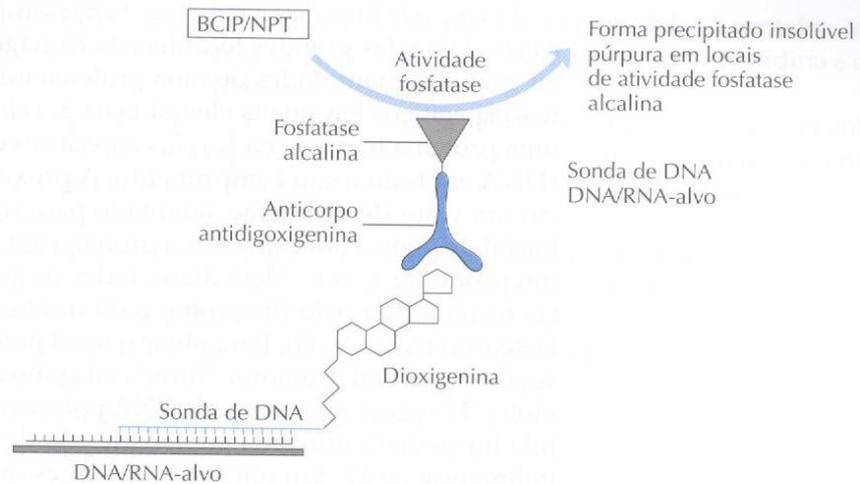
Hibridização *in situ* de um corte de tecido de olho de *Drosophila* adulta

Uma sonda radioativa foi utilizada para detectar mRNA para o gene *period*. (A) Tecidos do olho são mostrados com microscopia de campo claro; (B) a microscopia de campo escuro revela a presença de grânulos de prata da emulsão fotográfica em células nas quais o gene *period* é expressado. (Reimpressa, com permissão, de Liu X., Lorenz L., Yu Q., Hall J.C., and Rosbash M. 1988. Spatial and temporal expression of the *period* gene in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2: 228-238.)

biotina é uma vitamina solúvel em água que se liga com alta afinidade à estreptavidina, uma glicoproteína básica encontrada na clara de ovo. A estreptavidina também é ligada a uma enzima marcador para visualização.

As sondas não-radioativas têm muitas vantagens. Embora as sondas radioativas decaiam depois de um tempo curto, as não-radioativas podem ser estocadas congeladas durante períodos longos sem perda na atividade. As sondas não-radioativas também têm substituído as radioativas para marcação de *blots* e hibridização *in situ* de seções de tecidos em lâminas. Além disso, elas podem ser utilizadas para hibridização *in situ* de tecidos inteiros ou pequenos organismos, eliminando a necessidade de subdivisão e proporcionando uma imagem tridimensional global clara de expressão do gene.

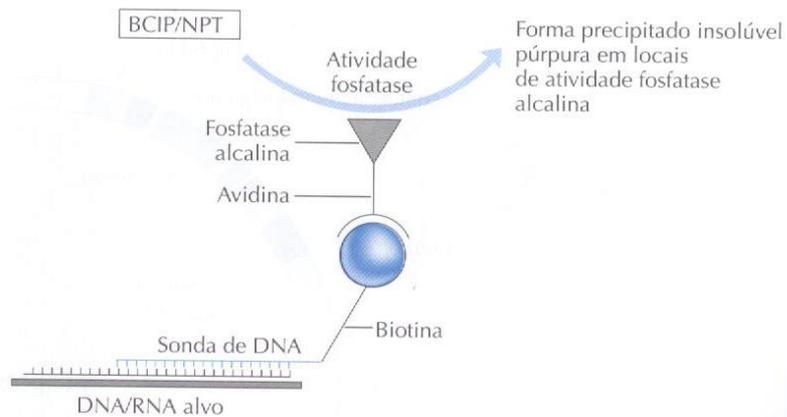




Detecção de sondas de ácido nucléico marcadas com digoxigenina utilizando BCIP/NPT

(Reimpressa, com permissão, de Sambrook J. and Russel D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.)

Com preparação cuidadosa, uma sonda pode penetrar em embriões intactos e em pequenos organismos, tais como *C. elegans*. Os tecidos dissecados são fixados em paraformaldeído e tratados com uma proteinase e um detergente para ajudar a quebrar estruturas e membranas celulares, permitindo melhor penetração da sonda. Após a incubação com a sonda, os tecidos são lavados e embebidos em solução contendo o substrato necessário para visualização. Depois de observada a expressão no tecido inteiro, pode ser realizado o corte para visualizar a expressão em um nível celular.



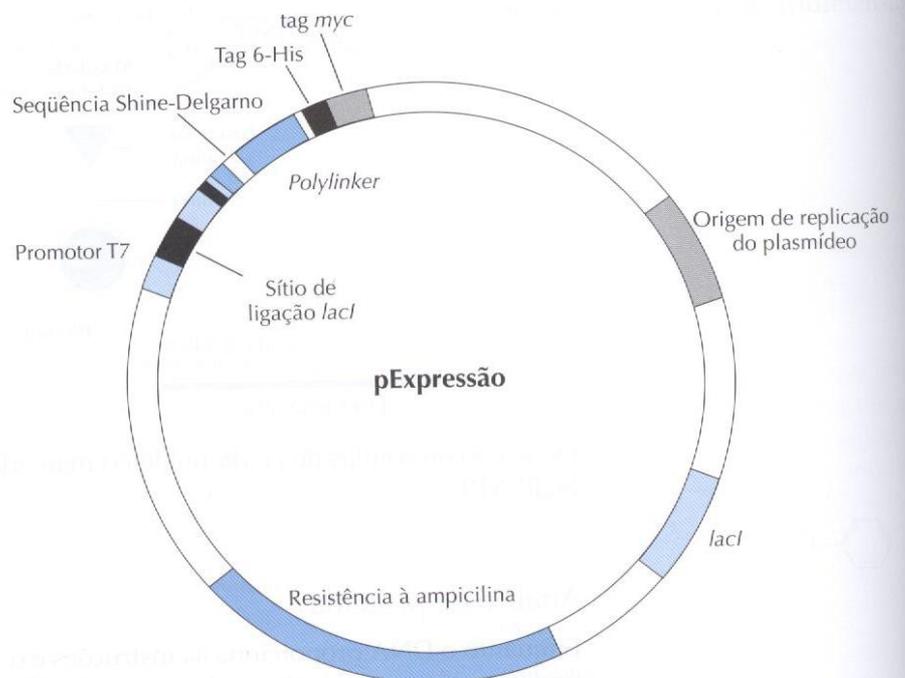
Detecção de sondas de ácido nucléico marcadas com biotina utilizando BCIP/NPT

Análise de proteína

Enquanto o DNA proporciona as instruções e o mRNA é a molécula mensageira, as proteínas são as moléculas realizadoras da célula. Para entender os processos estruturais e enzimáticos da célula, deve-se entender as moléculas de proteína que executam tais funções. A tecnologia de clonagem de DNA tem proporcionado um meio para a investigação de proteínas.

Produzindo Proteínas por meio da Expressão de Genes Externos na E. coli e Outros Sistemas. Uma das grandes façanhas da clonagem de DNA é a habilidade de produzir grandes quantidades de uma proteína específica por meio da expressão de genes específicos em níveis elevados na *E. coli* ou de outras células. Para expressar uma proteína humana na *E. coli*, começa-se com o isolamento de uma fita dupla de cDNA em todo o seu comprimento. A próxima etapa é inserir o cDNA fita dupla em um vetor de expressão, adaptado para funcionar na *E. coli* – apesar da origem inicial do gene. Para expressar a proteína em *E. coli*, o cDNA deve ser transcrito por um promotor *E. coli*. Além disso, todos os genes bacterianos contêm uma seqüência reconhecida pelo ribossomo para tradução, conhecida como seqüência Shine-Delgarno (AGGAGG). Para obter o nível mais alto de produção de proteína, deve-se selecionar um promotor “forte”, tal como o promotor de bacteriófago T7. O promotor T7 requer a presença de RNA polimerase funcional de fago T7 e, assim, a célula hospedeira utilizada para expressão de proteína deve conter o gene da RNA polimerase de T7. Em um vetor de expressão padrão, a seqüência Shine-Delgarno é colocada abaixo (no lado 3') do promotor T7. Próximo à seqüência Shine-Delgarno está uma seqüência de início de tradução ATG e, finalmente, um *Polylinker* (uma série de seqüências de reconhecimento de restrição para clonagem no cDNA dispostas lado a lado).

Além desses elementos para expressão de proteínas, o vetor também deve conter seqüências-alvo, as quais facilitam o isolamento da proteína expressada. Normalmente, seqüências-alvo são seqüências curtas de DNA que codificam um peptídeo específico, traduzido como parte da proteína expressada. Um tipo de alvo liga-se a um componente específico que pode ser imobilizado em uma partícula e utilizado para purificar a proteína expressada por afinidade. Por exemplo, a seqüência-alvo 6-His possui seis histidinas consecutivas que criam um sítio para ligação de níquel ou de outros metais. O extrato de células que expressam uma proteína contendo a seqüência alvo 6-His é passado por uma coluna contendo níquel. A proteína 6-His liga-

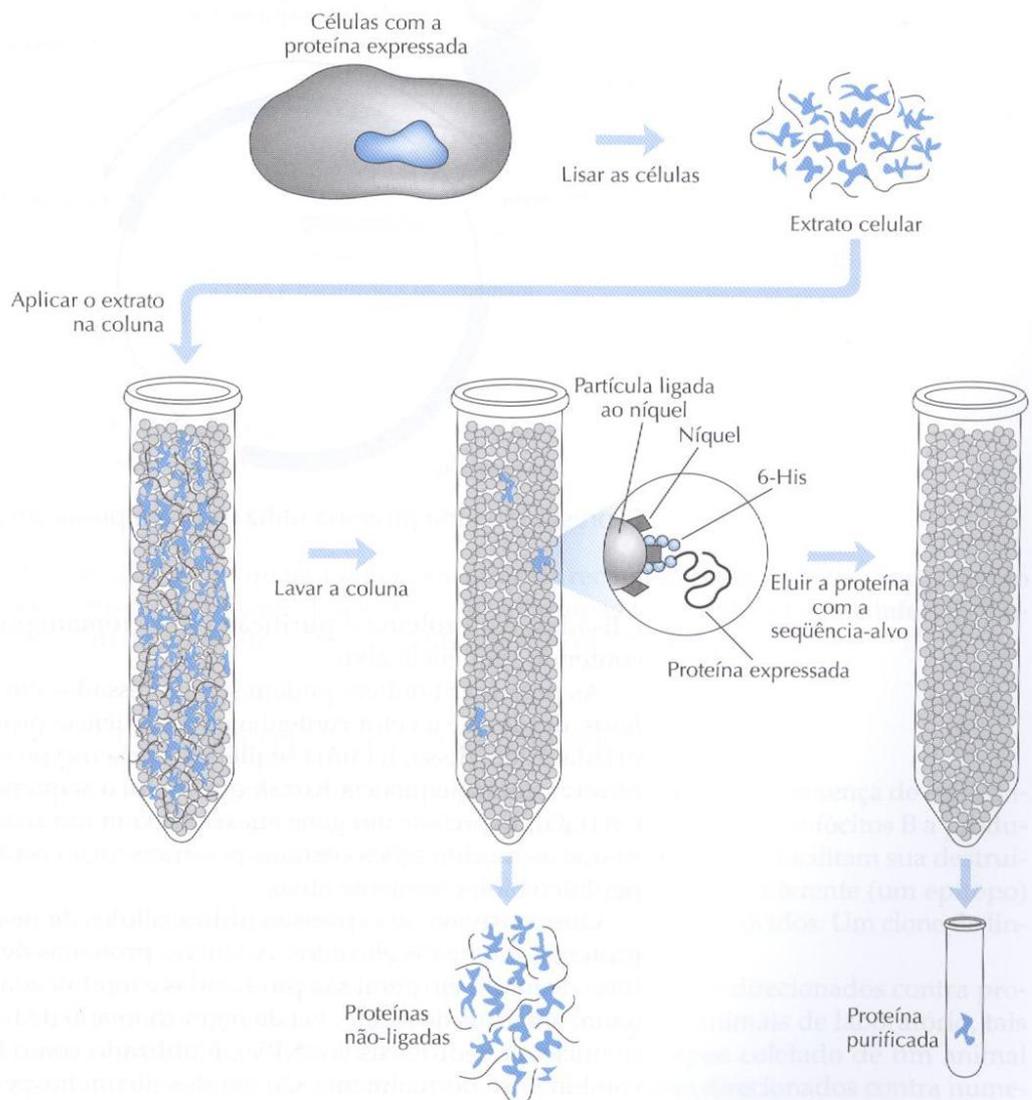


Um plasmídeo de expressão geral e seus elementos-chave

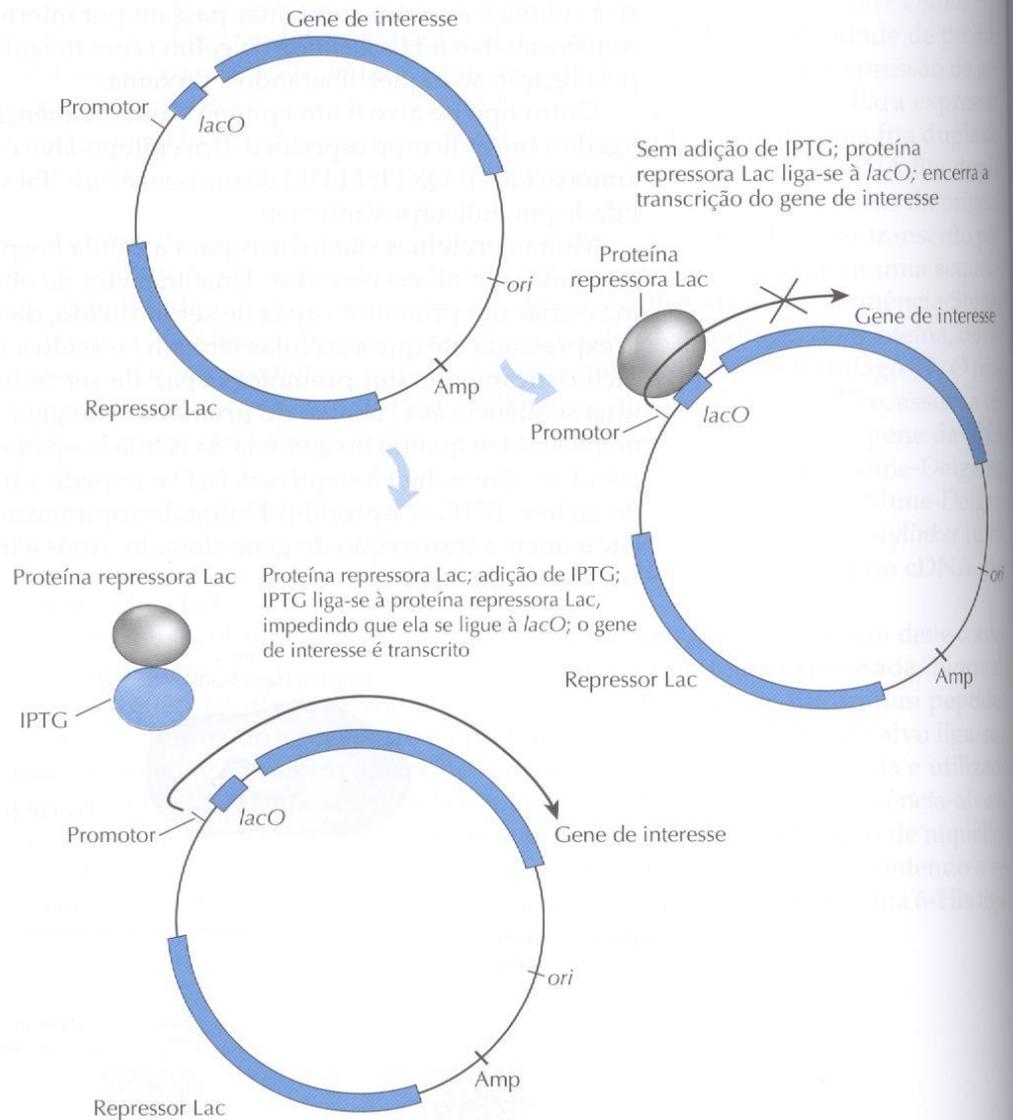
se à coluna e as outras proteínas passam por intermédio dela. A proteína contendo seqüência-alvo 6-His é eluída da coluna com imizol, que imita a histidina e compete pela ligação ao níquel, liberando a proteína.

Outro tipo de alvo é um epítipo – uma seqüência peptídica que é reconhecida e ligada a um anticorpo específico. Um epítipo-alvo é a alvo *myc*, uma seqüência de 10 aminoácidos (EQKLISEEDL) do oncogene *myc*. Tal seqüência-alvo é ligada com facilidade por anticorpos anti-*myc*.

Muitas proteínas são tóxicas para a célula hospedeira, em especial quando expressadas em níveis elevados. Uma maneira de obter proteção contra esse problema é criar um promotor capaz de ser induzido, de tal modo que a proteína não seja expressada até que as células tenham crescido a uma densidade apropriada. Caracteristicamente, um promotor capaz de ser induzido é criado pela inserção de uma seqüência *lacO* abaixo do promotor. Um gene *repressor lac* está presente tanto no plasmídeo quanto no genoma da célula hospedeira e expressa a proteína repressora Lac, que se liga à seqüência *lacO* e impede a transcrição. A adição do análogo de lactose IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosida) inibe a proteína repressora Lac e inicia a transcrição do gene clonado. Após a indução, as células são coletadas



Purificando proteína contendo uma seqüência-alvo 6-His em uma coluna de níquel

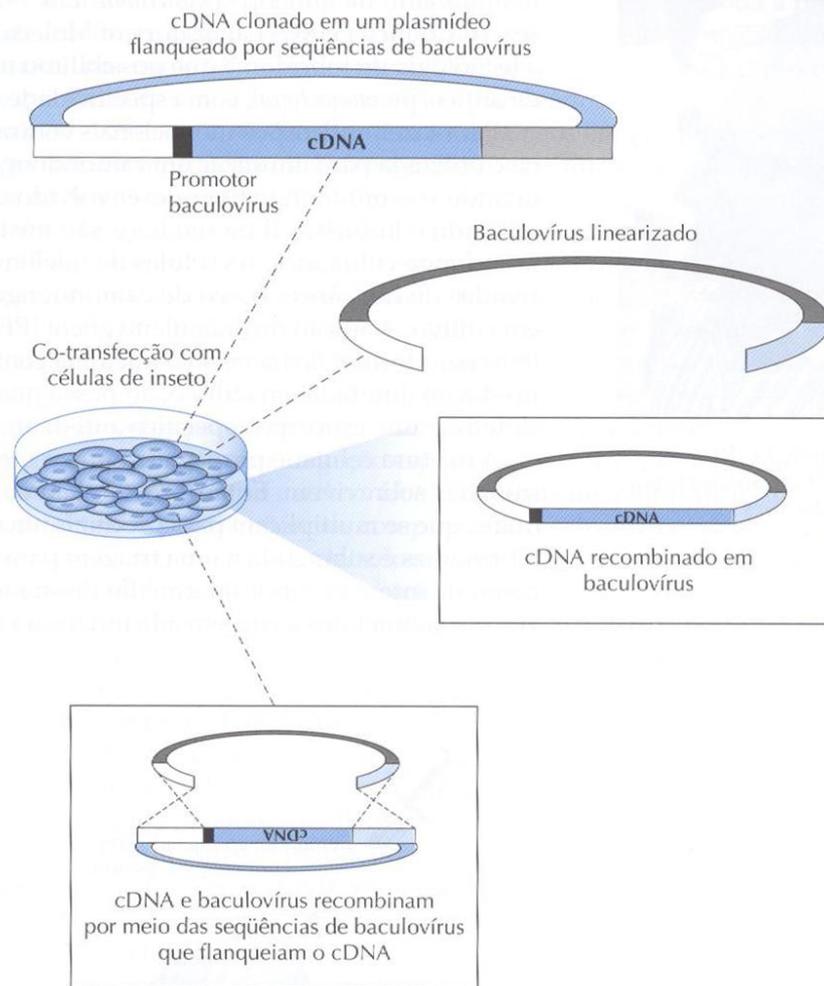


Expressando uma proteína utilizando um promotor capaz de ser induzido

e lisadas; e a proteína é purificada por cromatografia, utilizando uma seqüência contendo seqüência alvo.

As proteínas também podem ser expressadas em leveduras ou células de mamíferos, desde que o vetor contenha uma seqüência promotora espécie-específica apropriada. Além disso, há uma seqüência consenso no sítio de início de transcrição conhecida como seqüência Kozak que inclui a seqüência de iniciação ATG (GCCACATGG). Expressar um gene eucariótico em um sistema celular eucariótico assegura que as modificações corretas pós-transcrição serão feitas para garantir um polipeptídeo biologicamente ativo.

Outro sistema de expressão utiliza células de inseto, as quais expressam muitas proteínas em níveis elevados. Ademais, proteínas de mamíferos expressadas em células de inseto em geral são produzidas e modificadas de maneira correta. Nesse sistema, um vírus de inseto, via de regra chamado de baculovírus, *Autographa californica* nucleopoliedrovírus (AcNPV), é utilizado como hospedeiro. Os baculovírus recombinantes normalmente são obtidos de um hospedeiro natural, a larva de *Trichoplusia ni*, uma mariposa comum em toda a América do Norte. A seqüência de DNA da proteína a ser expressada é clonada em um plasmídeo, flanqueada por seqüências de baculovírus. O DNA linearizado de baculovírus e o plasmídeo são co-transfecta-



O cDNA do gene a ser expresso é introduzido em um baculovírus por recombinação

dos em células nas quais a seqüência inserida recombina com o baculovírus, criando um vírus recombinante. Então, esse vírus é propagado e utilizado para infectar células a fim de produzir grandes quantidades de proteína.

Utilizando anticorpos e proteínas marcadoras

Os anticorpos são produzidos como parte da resposta imune à presença de substâncias estranhas (antígenos). A exposição a um antígeno estimula linfócitos B a produzirem anticorpos (imunoglobulinas) que se ligam ao antígeno e facilitam sua destruição. Cada anticorpo reconhece uma superfície característica diferente (um epítipo) da molécula antigênica que consiste de poucos muitos aminoácidos. Um clone de linfócitos secreta um anticorpo específico para um epítipo.

Durante anos, os cientistas vêm produzindo anticorpos direcionados contra proteínas específicas por meio de injeções de proteínas em animais de laboratório, tais como camundongos e coelhos. O soro rico em anticorpos coletado de um animal imunizado contém uma mistura de anticorpos que estão direcionados contra numerosos epítipos da proteína injetada, assim como contra outros antígenos aos quais o animal foi exposto. Dessa forma, o soro utilizado a partir de um animal imunizado é

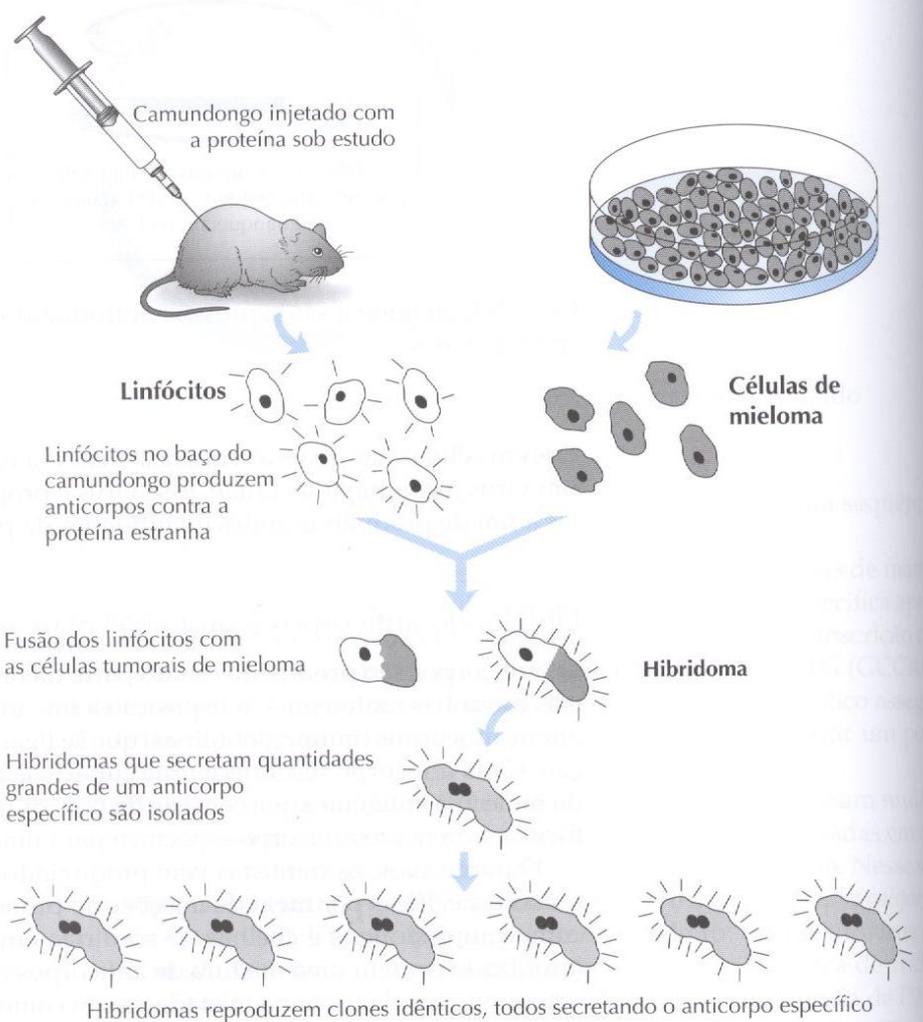


César Milstein, ca. 1976
(Cortesia de Cold Spring Harbor Laboratory Archives.)

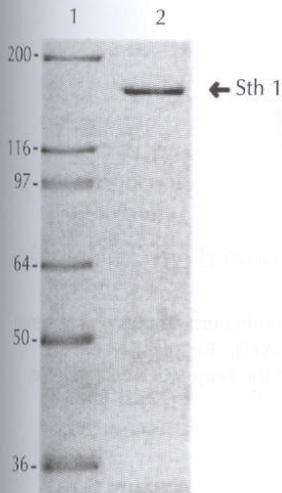
denominado de anticorpo *policlonal*. Em 1976, trabalhando no British Medical Research Council (MRC) Laboratory of Molecular Biology, Cesar Milstein desenvolveu a tecnologia do hibridoma que possibilitou uma maneira de fazer preparações puras de anticorpo *monoclonal*, com especificidade para um único epítipo.

Para fazer anticorpos monoclonais contra actina humana, por exemplo, a proteína é utilizada para imunizar um camundongo de laboratório. Após poucas semanas, quando o camundongo tiver desenvolvido uma resposta imune suficiente, ele é sacrificado e linfócitos B de seu baço são misturados com células de mieloma de camundongo cultivadas. As células de mieloma usadas são células imortalizadas, derivadas de um câncer ósseo de camundongo, que vivem basicamente para sempre em cultivo. A adição de polietileno glicol (PEG) estimula a fusão dos dois tipos celulares para formar *hibridomas*. O mieloma confere ao hibridoma a capacidade para reprodução ilimitada em cultivo, ao passo que o linfócito B confere a habilidade para sintetizar um anticorpo específico anti-actina.

A mistura celular é propagada em um meio seletivo no qual apenas as células fusionadas sobrevivem. Então, tais células são diluídas para isolar hibridomas individuais, que se multiplicam para produzir uma colônia pura de clones. Essa coleção de hibridomas é submetida a uma triagem para identificar clones que produzam o anticorpo de interesse – por intermédio de sua reação com o antígeno. Os clones positivos são submetidos à triagem adicional para identificar aqueles que produzem os an-



Produzindo anticorpos monoclonais



Western blot

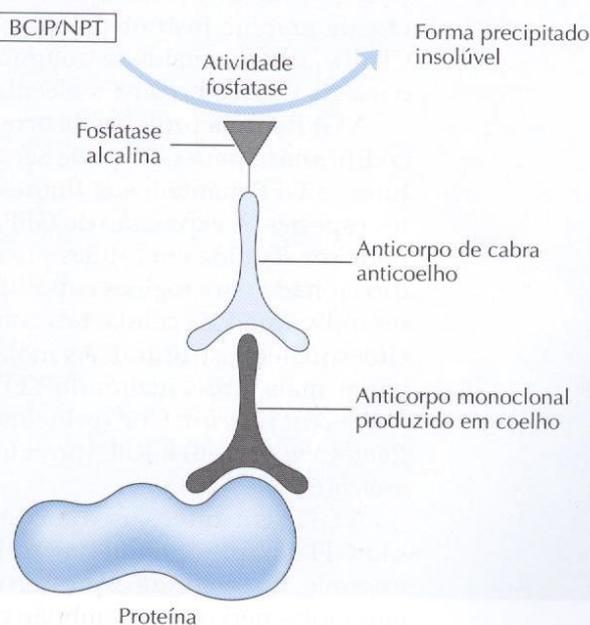
A banda na raia 2 mostra a presença da proteína Sth1 em células de levedura. Nesse caso, uma proteína Sth1 contendo uma seqüência-alvo His foi produzida em níveis elevados com a utilização de um vetor de expressão. A raia 1 mostra marcadores de peso molecular. (Reimpressa, com permissão, de Saha A., Wittmeyer J., and Cairns B.R. 2002. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev.* 16: 2120-2134.)

ticorpos de alta afinidade que se ligam fortemente ao antígeno. Toda a progênie de clones de um único hibridoma ancestral produz anticorpos idênticos da mesma especificidade, por isso o termo anticorpo monoclonal. Assim, os anticorpos contra epítopos específicos de um antígeno podem ser purificados.

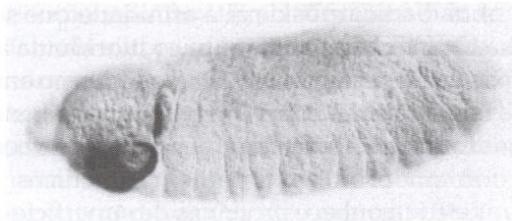
Usos para Anticorpos. Anticorpos têm muitos usos em pesquisa científica, assim como em tratamentos médicos. Um exemplo é a produção de um anticorpo que reconhece proteínas de superfície celular presentes em células tumorais, tal como o anticorpo monoclonal conhecido como herceptina. Esse anticorpo reconhece especificamente HER2 (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (do inglês *human epidermal growth factor receptor 2*), encontrado na superfície de muitas células de câncer de mama. O anticorpo liga-se à célula, bloqueando o sinal para crescimento celular, o que proporciona uma nova ferramenta para tratar o câncer de mama.

Métodos para o Estudo de Proteínas: Western Blot e Imunocitoquímica. Western blots (assim denominados para continuar a série depois que Southern e northern blots foram desenvolvidos) utilizam a ligação específica de anticorpos a proteínas, bastante semelhante ao Southern e ao northern blots, que utilizam a hibridização específica de sondas produzidas para seqüências complementares de nucleotídeos. Primeiramente, proteínas são separadas por eletroforese em gel e transferidas para um filtro de nylon ou nitrocelulose. O filtro é incubado com anticorpo IgG que se liga especificamente a uma proteína de interesse. Esse anticorpo "primário" pode ser monoclonal ou policlonal, produzido de modo específico em camundongo ou coelho. O excesso de anticorpo primário é lavado, sendo adicionado um anticorpo "secundário" que se liga a uma região estável de todos os anticorpos produzidos por uma espécie. (Por exemplo, IgG de coelho pode ser injetado em cabras e usado para produzir anticorpos de cabra que reconhecerão todas as moléculas IgG de coelho.) Tal anticorpo secundário está ligado de modo covalente a uma enzima marcadora, geralmente fosfatase alcalina (AP) ou peroxidase de rabanete (HRP, do inglês *horseradish peroxidase*). Os excessos de anticorpos secundários são lavados do filtro e adicionados a um substrato apropriado que reagirá com a enzima para produzir um composto colorido ou fluorescente detectável.

A imunocitoquímica é o equivalente protéico da hibridização *in situ*. Nesse procedimento, anticorpos são introduzidos em tecidos e em células fixadas. Os anticorpos



Deteção de sondas anticorpo com BCIP/NPT



Imunocitoquímica utilizada para localizar a proteína Deformed em um embrião de *Drosophila*

A coloração revela a presença de anticorpos contra Deformed ligados à proteína em células no segmento maxilar da cabeça em desenvolvimento. (Reimpressa, com permissão, de Jack T., Regulski, M., and McGinnis W. 1988. Pair-rule segmentation genes regulate the expression of the homeotic selector gene, *Deformed*. *Genes Dev.* 2: 635-651.)

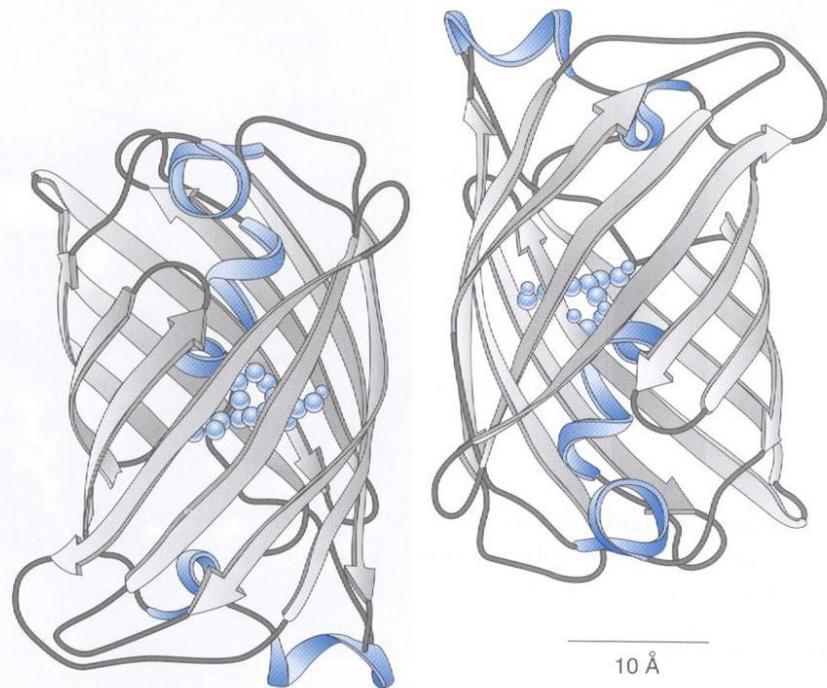
primários são submetidos à reação com anticorpos secundários contendo uma enzima marcadora, que identifica a localização da proteína de interesse dentro de um tecido ou de uma célula.

Proteína Fluorescente Verde (GFP). Os métodos descritos até aqui proporcionam análises estáticas para a atividade de genes e proteínas. A maioria dos componentes utilizados para visualização, quer radioativos ou não, é tóxica para células vivas. Os métodos para utilizar as sondas nas células são também com frequência destrutivos. Por isso, a maior parte do conhecimento sobre onde as proteínas são traduzidas e onde elas se localizam na célula provém de estudos de tecidos mortos fixados. Para estudar alterações na expressão e na atividade ao longo do tempo, é necessário um método não destrutivo e não-tóxico para visualização da atividade gênica. Teoricamente, o método consistiria de uma proteína que ocorra de forma natural, podendo ser expressada em muitos tipos celulares e proporcionar um método simples para indicar sua presença.

A água-viva *Aequorea victoria* forneceu uma solução para esse dilema. No início da década de 1960, Osamu Shimomura e Frank Johnson, da Universidade de Princeton, coletaram espécimes de água-viva em estudos para compreender sua "bioluminescência". Um dos componentes descoberto por eles foi chamado de proteína fluorescente verde (GFP, do inglês *green fluorescent protein*), pois ela emitia um brilho verde forte sob luz UV. Muitos anos depois, em 1992, Douglas Prasher, no Woods Hole Oceanographic Institute, clonou um cDNA para GFP. Em 1994, Prasher e Martin Chalfie, na Universidade Columbia, foram os primeiros a perceber o potencial para o uso da GFP como uma molécula marcadora.

A GFP é uma proteína de ocorrência natural com 238 aminoácidos. A sequência codificadora para GFP pode ser clonada com facilidade em uma variedade de vetores. A GFP mantém sua fluorescência quando expressada em células de diferentes espécies. A expressão de GFP não parece ter efeitos tóxicos, de maneira que ela pode ser seguida em células vivas ao longo do tempo. A proteína pode ser mesmo direcionada para regiões subcelulares específicas, permitindo a observação de partes individuais da célula, tais como mitocôndrias, membranas celulares, núcleo ou citoesqueleto estrutural. As moléculas fluorescentes de outras espécies foram clonadas mais tarde, incluindo YFP (proteína fluorescente amarela, do inglês *yellow fluorescent protein*), CFP (proteína fluorescente ciano ou azul, do inglês *cyan or blue fluorescent protein*) e RFP (proteína fluorescente vermelha, do inglês *red fluorescent protein*).

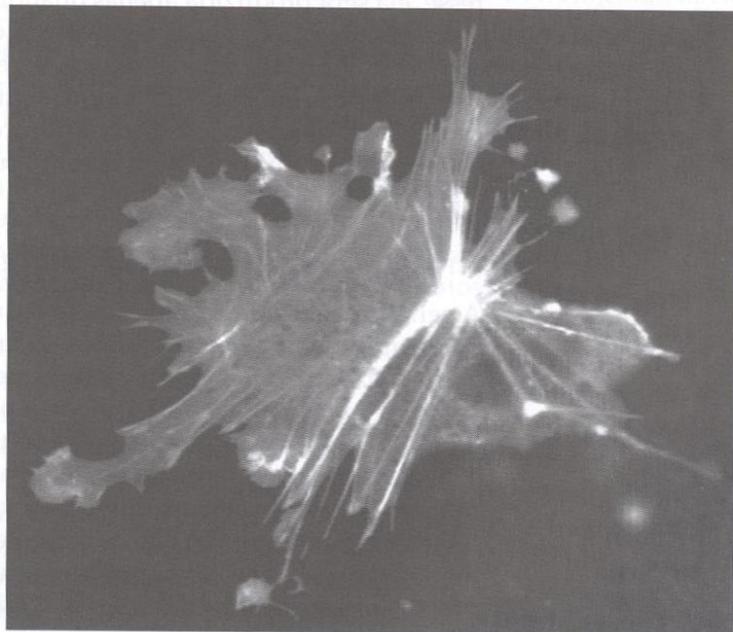
A GFP tem muitos usos em estudos biológicos. A inserção de um vetor de expressão GFP simples permite marcar uma célula específica com um sinal visual. Por exemplo, um vetor de expressão contendo GFP pode ser inserido por eletroporação em células nervosas no embrião do peixe paulistinha (*zebrafish*). Depois, sob um microscópio de fluorescência, pode ser observado como tais células crescem e migram por todo o organismo. Uma construção de DNA recombinante pode ser feita de for-



Estrutura da proteína fluorescente verde

GFP forma uma estrutura cilíndrica chamada "lata b". O fluoróforo está no centro da lata. (Adaptada, com permissão, de Yang F., Moss L.G., and Phillips G.N.Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14: 1264-1251.)

ma que combine as regiões regulatórias para um gene de interesse com a região codificadora de GFP. A inserção dessa construção em uma célula viva proporciona uma ferramenta para observar as modificações na expressão do gene ao longo do tempo.



GFP em uma célula viva da crista neural em cultivo

Neste caso, GFP foi localizada na actina, que é o componente estrutural-chave da célula. (Cortesia de Andrew Ewald, California Institute of Technology.)