

GFP: Uma Ferramenta Brilhante para a Visualização da Vida de Farias, Florence. M. C.*

Rev. Virtual Quim., 2009, 1 (1), 2-8. Data de publicação na Web: 2 de Fevereiro de 2009

<http://www.uff.br/rvq>

Nobel Prize in Chemistry-2008. GFP: A Shining Tool to Visualize Life.

Abstract: Osamu Shimomura, Martin Chalfie and Roger Tsein are the winners of Nobel Prize in Chemistry 2008 for the discovery, identification and development of the green fluorescent protein (GFP). This text briefly describes their trajectory in this research.

Keywords: Nobel Prize in Chemistry, fluorescent proteins, GFP

Resumo

Osamu Shimomura, Martin Chalfie e Roger Tsein foram os vencedores do Prêmio Nobel de Química 2008 pela descoberta, identificação e aplicação da proteína verde fluorescente (GFP). Este texto relata brevemente a trajetória dos mesmos nesta linha de pesquisa.

palavras-chave: Prêmio Nobel de Química, proteínas fluorescentes, GFP.

*Endereço completo: Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Centro, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, 24020-150

E-mail para correspondência: ggoflor@vm.uff.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20090002](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20090002)

GFP: Uma Ferramenta Brilhante para a Visualização da Vida

Florence M. Cordeiro de Farias

Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Centro, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, 24020-150
gqoflor@vm.uff.br

Recebido em 22 de janeiro de 2009

Com uma proposta de homenagem e divulgação dos laureados com o prêmio Nobel de Química, e como uma extensão da seção “Novidades na Ciência” do portal da Secretaria Regional da SBQ do Rio de Janeiro,¹ a **RVQ**, em seu primeiro número, apresenta um breve relato sobre o trabalho dos pesquisadores agraciados em 2008.

O prêmio Nobel de Química de 2008 foi dado para Osamu Shimomura – pela descoberta, isolamento e identificação da Proteína Fluorescente Verde (**GFP**, do inglês “**Green Fluorescent Protein**”), Martin Chalfie, pelo pioneirismo na incorporação da GFP em organismos vivos e sua utilização como marcador biológico, e para Roger Tsien pela ampliação de seu uso em processos biotecnológicos e biomédicos. Como frisou Tsien em seu discurso durante a conferência de premiação, chama atenção o fato de que estes três pesquisadores nunca trabalharam em colaboração direta e que, na realidade os três são representantes de uma comunidade de cientistas envolvidos com pesquisas em proteínas e marcadores biológicos, destacando principalmente a pessoa de Douglas Prasher, pela clonagem do gene que codifica a GFP.²



Osamu Shimomura nasceu em Kioto, Japão (1928) tendo recebido o título de Doutor em Química Orgânica pela Universidade de Nagoya em 1960. Atualmente é Professor Emérito do Laboratório de

Biologia Marinha (MBL) de Woods Hole, e da Escola

de Medicina da Universidade de Boston, localizadas em Massachusetts, E. U. A. Em sua conferência de premiação (Universidade de Estocolmo, 8/12/2008) conta a história de seu envolvimento na pesquisa com a GFP e presta homenagem aos professores Shungo Yasunaga, Yashimata Hirata e Frank Jonhson, responsáveis por sua trajetória acadêmica.³

Em 1945 Shimomura estava com 16 anos, era estudante secundarista e trabalhava em uma fábrica local, quando da explosão da bomba atômica. A cidade foi praticamente destruída e a única possibilidade de curso superior, na época, foi o de farmácia na Universidade de Nagasaki. Conforme suas palavras, o estudo de farmácia nunca havia sido seu objetivo. No entanto, ao ingressar no curso foi trabalhar com o professor Shungo Yasunaga. Ao graduar-se, e para permitir seu desenvolvimento profissional, Yasunaga encaminha-o para a Universidade de Nagoya.³

Em 1955 Shimomura vai trabalhar como professor assistente no grupo do professor Yashimata Hirata na Universidade de Nagoya. Neste grupo, iniciou suas atividades com um projeto que buscava a elucidação do mecanismo de bioluminescência observada em resíduos triturados úmidos do molusco *Cypridina hilgendorffii*. Este trabalho já havia sido tentado por um grupo de pesquisadores americanos que não alcançaram sucesso. Assim, o professor Hirata não quis entregar o projeto a alunos de doutorado, na medida em que resultados infrutíferos não levariam ao desenvolvimento de uma tese. Após um ano, Shimomura vence este desafio científico descrevendo o mecanismo de ação e a identificação

estrutural da luciferina, responsável por este fenômeno. A partir destes resultados, Shimomura foi convidado para trabalhar na Universidade de Princeton, New Jersey (E.U.A.), com o professor Frank Johnson. Como presente de despedida, a Universidade de Nagoya conferiu a Shimomura o título de Doutor em Química Orgânica.⁴

Na Universidade de Princeton, Shimomura inicia seus trabalhos (1960) com o estudo da água-viva *Aequorea Victoria*, que nas condições oceânicas normais diurnas fluoresce azul, e, quando agitada ou irradiada com luz azul, produz uma bioluminescência verde em organelas localizadas em seu guarda-chuva (Figura 1).³

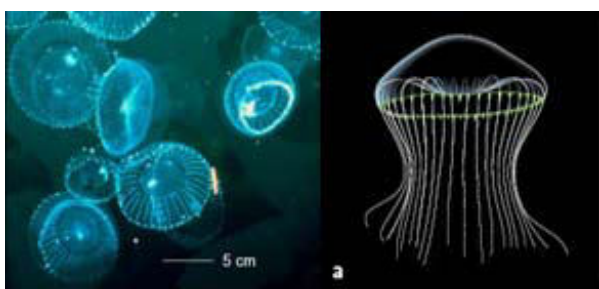


Figura 1. *Aequorea victoria*.⁵

Para o estudo deste fenômeno Shimomura e colaboradores coletaram, durante o verão de 1961, em Friday Harbor (estado de Washington, E.U.A.), na costa oeste norte-americana, 2,5 toneladas da água-viva (cerca de 2.500 a 3000 águas-vivas/dia) e deste material isolaram 150 mg de aequorina,³ proteína responsável pela emissão de luz azul. Curiosamente, estes estudos levavam sempre ao isolamento desta proteína que só emitia na região do azul, não observando, nos extratos, a emissão na região do verde, conforme ocorria no organismo vivo. Deveria, então, existir um terceiro componente que emitia na região do verde. Realmente, no trabalho publicado em 1962, onde Shimomura e Johnson relatam a técnica utilizada para o isolamento e identificação da aequorina, os autores também mencionam o isolamento de outra proteína que apresentava-se ligeiramente esverdeada sob luz solar, amarelada com iluminação comum e com uma fluorescência verde frente a lâmpada de UV. Na época os autores denominaram-na de proteína verde.⁶

Em uma continuação desta linha de pesquisa, Shimomura relata, em 1970, o isolamento e identificação da GFP. Essa proteína, embora não seja luminescente por si só, ao ser irradiada com luz

visível na faixa do azul do espectro, produz, por fluorescência, uma luminescência verde intensa. Na realidade, este fenômeno ocorre com a intermediação tanto da aequorina, quanto da GFP. A aequorina, uma luciferina clássica, ao complexar-se com íons de cálcio (Ca^{+2}) sofre um processo de bioluminescência e emite uma luz azul (485 nm). No entanto, se próximo a ela estiver uma molécula de GFP, a energia do processo é transferida (transferência por ressonância) para esta proteína que, ao retornar ao seu estado normal, emite luz na região do verde (509 nm) (Figura 2).⁷

A GFP consiste de uma cadeia monomérica de 238 aminoácidos. O enovelamento desta cadeia leva a uma conformação semelhante a uma lata de cerveja denominada barril- β . Os aminoácidos nas posições 65,66 e 67 localizam-se no centro da cadeia e constituem o fluoróforo responsável pela emissão da cor verde (Figura 3).²

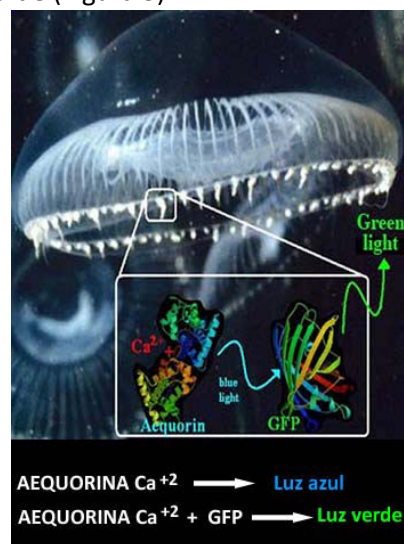


Figura 2. Processo de transferência da energia de bioluminescência da aequorina para a GFP.⁸

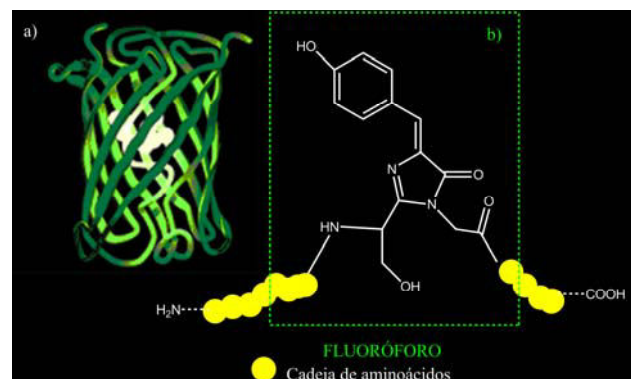


Figura 3. a) Arranjo conformacional da GFP;⁹ b) Fluoróforo responsável pela emissão da cor verde⁵

A grande vantagem da GFP, responsável inclusive por sua grande aplicabilidade em biotecnologia, reside no fato de, como o fluoróforo faz parte da cadeia peptídica, ela não precisa de nenhum aditivo para fluorescer, ao contrário da aequorina e outras luciferinas, que necessitam da complexação com co-fatores para a emissão de luz.⁷

Douglas Prasher foi o primeiro pesquisador a visualizar a aplicação da GFP como marcador biológico, baseado nas seguintes propriedades:

a) *Facilidade de detecção e acompanhamento dos movimentos proteicos no interior das células na medida em que a irradiação das células com lâmpada de UV leva ao aparecimento de fluorescência;*

b) *A GFP é uma proteína pequena. Normalmente, proteínas pequenas ligadas às proteínas de interesse não causam modificações em suas propriedades. Além disso, este tamanho facilitaria o acompanhamento das proteínas fundidas em organelas como os neurônios, onde a difusão de proteínas mais volumosas é difícil;*

c) *A GFP, uma vez produzida na água-viva, é fluorescente por si, não necessitando de co-fatores, diferente da aequorina, que necessita de Ca^{+2} e coelenterazina, e da luciferase de vagalumes que requer ATP, magnésio e luciferina, marcadores biológicos bastante usados na época.²*

Com esta idéia D. Prasher iniciou seus trabalhos em 1988 com financiamento do Instituto Nacional do Câncer (E.U.A.) e em 1992 ele relata a sequência dos 238 aminoácidos da GFP, bem como a sua clonagem a partir da *A. victoria*. Infelizmente, sua bolsa terminou em 1992 e ele não pode continuar suas pesquisas.²



Martin Chalfie, o segundo cientista laureado com o prêmio Nobel, nasceu em Chicago, E. U. A. (1947) e doutorou-se em Neurobiologia na Universidade de Harvard em 1977. Atualmente é

professor de Ciências Biológicas da Universidade de Columbia, Nova York.

Em sua conferência de premiação, M. Chalfie relata que tomou conhecimento da existência da GFP em abril de 1989, quando assistia a um

seminário sobre organismos bioluminescentes na Universidade de Columbia.¹¹ Na época Chalfie trabalhava em uma linha de pesquisas com o nematelminto *Chaenorabditis elegans*, um dos organismos mais estudados no mundo, pois possui neurônios diferenciados, envelhece e cruza. Além disso, um terço de seu material genético relaciona-se ao humano e assim, o mesmo é muito utilizado como modelo. Chalfie buscava um método de acompanhamento dos mecanismos sensoriais deste organismo e as técnicas utilizadas na época para a expressão de genes (diz-se que um gene se expressa quando produz sua proteína) exigiam procedimentos laboriosos que resultavam, sempre, em morte da espécie em estudo. Assim, o que se obtinha como material investigativo era uma figura estática da expressão gênica. Por conta disso, ao tomar conhecimento da existência e propriedades da GFP, imaginou a possibilidade de utilizá-la para este fim. Segundo suas palavras, “ficou tão excitado com esta possibilidade que não conseguiu prestar mais atenção ao resto do seminário”.⁹ Imediatamente após o término da palestra entrou em contacto com Prasher que prometeu que logo que tivesse em mãos o gene da GFP lhe enviaria uma amostra. Em 1992 Chalfie recebe o material e consegue expressar o gene tanto na bactéria *Escherichia coli*, quanto no *C. elegans*, mostrando que a GFP pode ser utilizada para expressão genética tanto em células procarióticas, quanto eucarióticas (Figura 4).¹²

Conforme palavras de Chalfie, a partir destes trabalhos elaborou-se uma excelente ferramenta para a visualização da vida. Sua importância é bem evidenciada no gráfico I que mostra o número de publicações utilizando a GFP (dados de 1990 até 2006).⁹

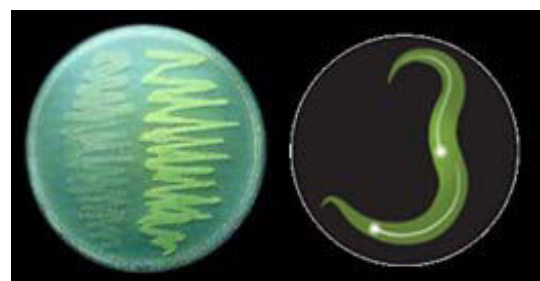
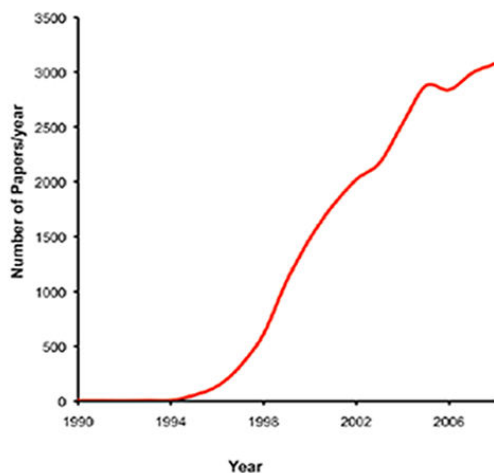


Figura 4. a) A bactéria (*E. coli*) do lado direito da figura, que possui uma proteína fundida com GFP, fluoresce por irradiação com luz U.V.;⁸ b) Fluorescência verde de neurônios de *C. elegans* expressados com gene da GFP⁵

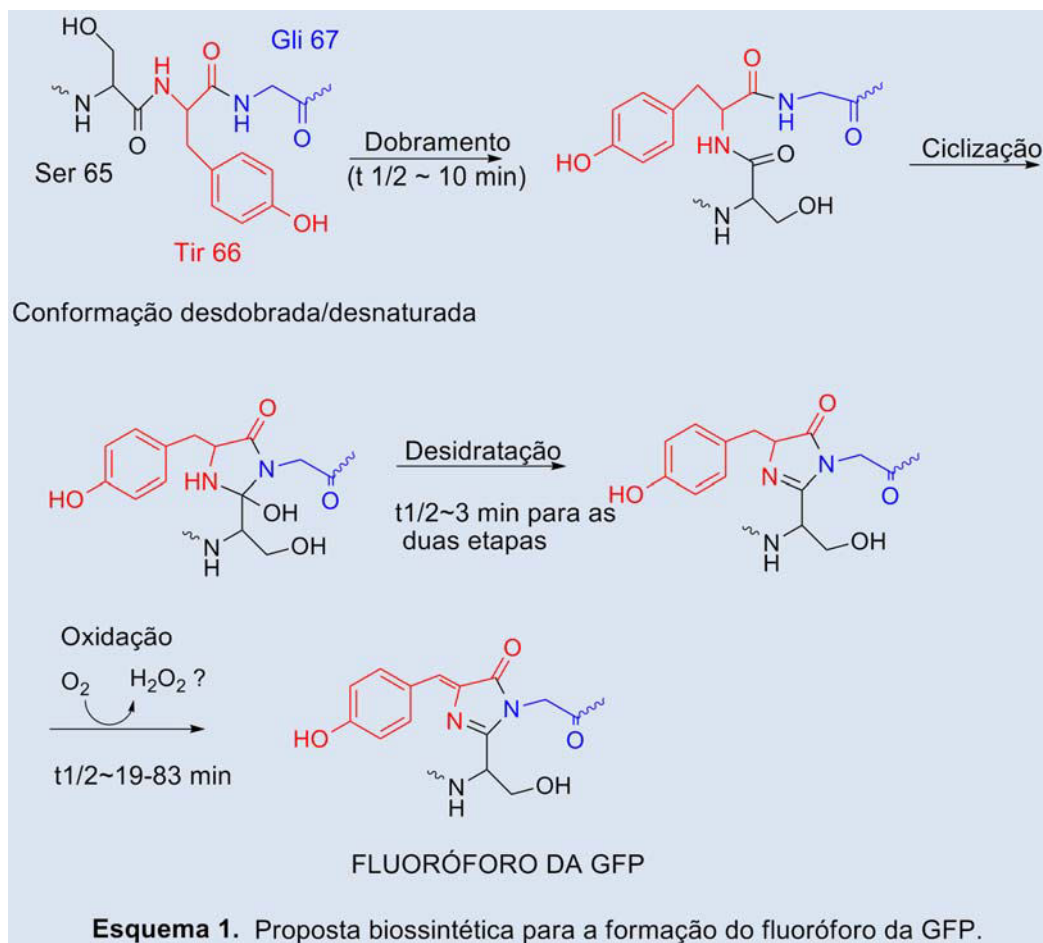
Papers Using Green Fluorescent Protein



Roger Tsien, o terceiro cientista premiado, nasceu em Nova York, E. U. A. (1952) tendo adquirido o título de Doutor em Fisiologia em 1977 na Universidade de Cambridge, Inglaterra. Atualmente é professor da Universidade da Califórnia em San Diego. Tsien foi o responsável pelo entendimento do mecanismo de ação e pela obtenção de mutantes da GFP.⁷



Gráfico 1. N^o de trabalhos publicados com o uso da GFP X ano. (Diapositivo da conferência de M. Chalfie)⁹



Tsein expressou o gene da GFP anaerobicamente na *E. coli* e observou que na ausência de oxigênio não ocorria o fenômeno de fluorescência. No entanto, a adição de oxigênio em células vivas, ou em extratos diluídos, levava ao aparecimento do fenômeno, isto é, ocorria *de novo* a biossíntese protéica e, para a bioluminescência, o oxigênio molecular era o único co-fator necessário. Como o oxigênio molecular está presente em todas as células aeróbicas este é o motivo pelo qual ocorria o fenômeno em todos os organismos em que a GFP era expressa. A partir daí, Tsein propõe o mecanismo de formação do fluoróforo envolvendo uma reação entre os aminoácidos das posições 65,66 e 67 da cadeia peptídica (Esquema 1).⁷

Tendo esclarecido o mecanismo de formação do fluoróforo, Tsein, através de modificações na cadeia peptídica e na estrutura do próprio cromóforo, obteve vários mutantes da GFP causando efeitos pronunciados nas propriedades espectrais com consequentes modificações na coloração da luz emitida (Figura 5).¹³

Além das várias formas mutantes da GFP, Tsein também realizou contribuições importantes para o desenvolvimento de variantes de proteínas fluorescentes vermelhas baseado na estrutura da proteína DsRed isolada da coral *Discosoma* por LuKyanov e colaboradores (Figura 5).⁷

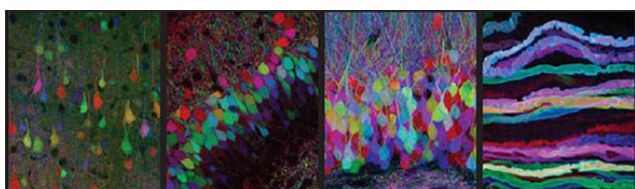


Figura 5. Neurônios de ratos coloridos com proteínas fundidas derivadas da GFP e da DsRed⁵

Em resumo, devido as suas propriedades fluorescentes, o gene da GFP tornou-se um importante marcador de expressão gênica em células e tecidos. Com o auxílio desta proteína pode-se investigar o comportamento de células e marcar tecidos, embriões e células tronco, o que tornou-a o gene repórter mais utilizado em pesquisas biológicas, biomédicas e biotecnológicas.¹² A Figura 6 mostra um coelho fluorescente obtido por expressão do gene da GFP em células embrionárias.



Figura 6. Coelho transgênico obtido por expressão do gene da GFP⁸

Dando um tom de informalidade em sua conferência de premiação, Chalfie exhibe vários exemplos de organismos mutantes desenvolvidos a partir da expressão gênica da GFP, mas levanta a questão de que, talvez, a primeira pessoa a imaginar sua utilização para este fim tenha sido o cineasta Ang Lee, ao criar o super-herói Hulk (Figura 7).⁹

The First Human GFP Transgenic?



Ang Lee

Figura 7. Primeiro humano transgênico expressado com GFP? (Diapositivo da conferência de M. Chalfie)⁹

Concluindo, merece reflexão o discurso proferido por R. Tsein na outorga do Nobel¹¹ e também disponível no Portal da GFP,² em nome dos três laureados, que traduzimos a seguir:

“Financiamentos para pesquisas básicas como, por exemplo, o estudo de organismos como águas-vivas são difíceis de serem obtidos. Com este prêmio espera-se o reconhecimento da importância da pesquisa básica para o desenvolvimento de tecnologias que venham a auxiliar no

desenvolvimento da saúde e da economia mundial. Além disto, nos últimos dez anos, houve um declínio enorme de várias espécies de águas-vivas da costa oeste norte-americana. Biólogos da região atribuem este declínio a fatores poluentes devido ao aumento populacional e a rejeitos industriais. Felizmente, as pesquisas iniciais com a GFP foram desenvolvidas antes desta queda populacional. Mas, que outras ferramentas científicas em potencial serão perdidas por conta da poluição humana e do aquecimento global?

*Nenhum químico, até hoje, conseguiu realizar o que um único gene da *A. victoria* é capaz: 238 condensações ordenadas + 1 ciclização + 1 oxidação em meio aquoso aerado, em poucos minutos, sem o*

uso de grupos de proteção e com 100% de rendimento, gerando um produto extremamente útil e que brilha com uma coloração verde.

Corais produzem proteínas com fluorescência vermelha e amarela, através do mesmo mecanismo e com apenas mais uma etapa de oxidação. No entanto, recifes de coral em todo o mundo estão em perigo por conta da acidificação e aquecimento dos oceanos.”

Assim, seus agradecimentos finais são para as águas-vivas e corais: que encontrem *habitats* intactos nos quais ainda possam brilhar.

Referências Bibliográficas

¹ De Farias, F. M. C., Prêmio Nobel de Química 2008: da água-viva ao caleidoscópio de neurônios, *Novidades na Ciência – SBQ Rio*, 19 outubro 2008. Disponível em: <<http://www.uff.br/sbqrio/>>. Acesso em: 2 janeiro 2009.

² Zimmer, M., Green Fluorescent Protein Page. Disponível em: <<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/GFP-1.htm>>. Acesso em: 2 janeiro 2009.

³ Shimomura, O., Nobel Lecture: Discovery of Green Fluorescent Protein, GFP. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laur_eates/2008/shimomura-lecture.html>. Acesso em: 6 janeiro 2009.

⁴ Nobel Foundation, The Nobel Prize in Chemistry 2008: Information for the public. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laur_eates/2008/info.pdf>. Acesso em: 2 janeiro 2009.

⁵ Figuras reproduzidas com permissão da Fundação Nobel. Disponível em: <<http://nobelprize.org>>. Acesso em: 6 de janeiro de 2009.

⁶ Shimomura, O.; Johnson, F.; Saiga, Y. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223. [CrossRef]

⁷ Nobel Foundation, The Nobel Prize in Chemistry 2008: Scientific background. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laur_eates/2008/chemadv08.pdf>. Acesso em: 13 janeiro 2009.

⁸ Figura obtida do portal da GFP, referência 2.

⁹ Chalfie, M., Nobel Lecture: GFP: Lighting Up Life. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laur_eates/2008/chalfie-lecture.html>. Acesso em: 12 janeiro 2009.

¹⁰ Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W. W.; Prasher, D. C. *Science* **1994**, 263, 802. [CrossRef]

¹¹ Tsien, R.Y., Nobel Lecture: Constructing and Exploiting the Fluorescent Protein Paintbox. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laur_eates/2008/tsien-lecture.html>. Acesso em: 14 janeiro 2009.

¹² Viviani, V. R.; Bechara, E. J. H. *Química Nova na Escola* **2008**, 30, 24. Disponível em: <<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc30/>>. Acesso em: 2 janeiro 2009.