

Um Prêmio Nobel por uma Proteína Brilhante

Vadim R. Viviani e Etelvino J. H. Bechara

O prêmio Nobel de Química deste ano foi dado para Osamu Shimomura – por uma descoberta literalmente brilhante para os campos da Biologia e Medicina: a Proteína Fluorescente Verde, também chamada GFP (Green Fluorescent Protein) – e para Martin Chalfie e Roger Tsien pela aplicabilidade biotecnológica e biomédica que essa proteína assumiu nos anos seguintes.

► Proteína Fluorescente Verde, bioluminescência, prêmio Nobel ◀

Recebido em 15/11/08, aceito em 17/11/08

24

A proteína fluorescente verde é uma macromolécula que, mediante irradiação com luz azul, produz uma intensa fluorescência verde. Ela foi isolada por Shimomura (Figura 1) na década de 1960 a partir de águas-vivas bioluminescentes do gênero *Aequorea* (Figura 2), coletadas na costa oeste dos EUA.

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria e visível por organismos vivos com função de comunicação biológica. Ela ocorre principalmente no ambiente marinho,

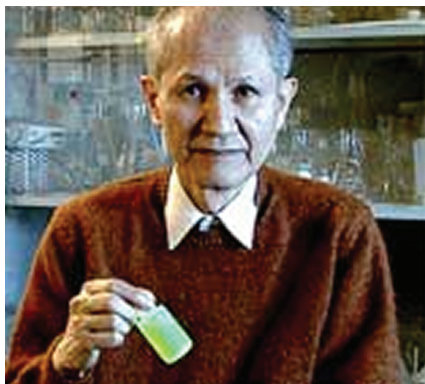


Figura 1: Osamu Shimomura e a GFP

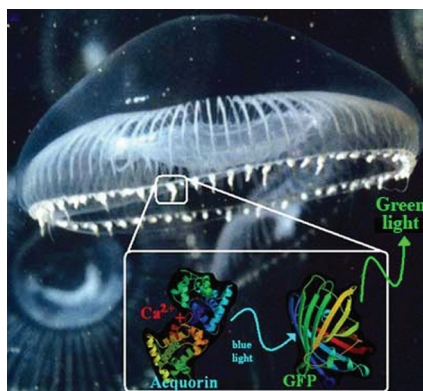
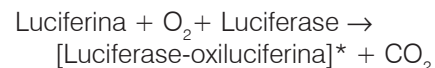


Figura 2: A medusa *Aequorea* e o seu sistema bioluminescente de transferência de energia da luciferase aequorina para a GFP.

em organismos como bactérias, algas, celenterados (entre os quais as águas-vivas) e peixes, embora também ocorra no ambiente terrestre em organismos como vaga-lumes e fungos. A produção da luminescência ocorre por meio de uma reação química altamente exotérmica em que a oxidação de uma molécula orgânica, genericamente chamada de luciferina, libera energia preferencialmente

na forma de luz visível. Essa reação é catalisada por enzimas genericamente chamadas de luciferases. A natureza química das luciferinas, cofatores e a seqüência e estrutura destas variam de um grupo taxonômico a outro, levando a conclusão que a bioluminescência se originou várias vezes e independentemente durante a evolução.



No caso das águas-vivas do gênero *Aequorea*, a bioluminescência é em geral verde. Curiosamente, os primeiros estudos bioquímicos, que tentavam caracterizar o sistema bioluminescente dessas águas-vivas, mostraram que a ruptura da estrutura celular das lanternas resultava no isolamento de uma luciferase e luciferina que produziam luz azul, em vez de verde como observado no animal vivo. Havia um terceiro componente que produzia

A seção "Atualidades em Química" procura apresentar assuntos que mostrem como a Química é uma ciência viva, seja com relação a novas descobertas, seja no que diz respeito à sempre necessária revisão de conceitos.

luminescência verde. Foi essa observação que levou Shimomura a isolar a proteína fluorescente verde em 1962 no laboratório de Frank Johnson em Princeton. Essa proteína, embora não seja luminescente por si só, ao ser irradiada com luz visível na faixa azul do espectro, produz uma luminescência verde intensa, um processo chamado de fluorescência. Shimomura e colegas verificaram que, no sistema bioluminescente intacto das medusas, quem transfere a energia para a GFP é a própria reação bioluminescente da luciferase e luciferina. Quando o complexo luciferase-luciferina e a GFP estão suficientemente próximos (Figura 2), a energia de excitação do complexo luciferase-oxiluciferina excitada é eficientemente transferida para a GFP, que fluoresce na região do verde. Essa modalidade de transferência de energia é chamada de transferência por ressonância e depende da proximidade e sobreposição dos espectros de emissão do doador de energia (o complexo luciferase-oxiluciferina excitada) e de absorção do receptor de energia (a GFP).

Shimomura e colegas purificaram a GFP a partir de dezenas de milhares de águas-vivas coletadas na costa oeste dos Estados Unidos. Eles verificaram que se trata de uma pequena proteína de 27.000 Da. Em seguida, a GFP foi caracterizada quanto às suas propriedades físico-químicas. O fluoróforo que produz a fluorescência verde da GFP é constituído pelos próprios resíduos de aminoácidos dessa proteína, que sofreram um processo de oxidação e ciclização, dando origem a uma estrutura altamente fluorescente, que foi determinada em 1979. Em 1992, o gene que codifica essa proteína foi clonado a partir de águas-vivas por Douglas Prasher.

Logo em seguida, M. Chalfie e colegas inseriram e expressaram o gene da GFP em bactérias *Escherichia coli*

A proteína fluorescente verde (GFP) é uma macromolécula que, mediante irradiação com luz azul, produz uma intensa fluorescência verde.

A bioluminescência é o processo de emissão de luz fria e visível por organismos vivos com função de comunicação biológica.

e vermes *Chaenorabditis elegans*, demonstrando que o gene dessa proteína pode ser utilizado para fazer marcação fluorescente da expressão gênica em diferentes organismos. Desde então, a GFP tem sido produzida em larga escala por engenharia genética e vem sendo empregada como importante marcador de expressão gênica em células, tecidos e organismos inteiros. A GFP foi cristalizada e sua estrutura tridimensional foi determinada por difração de raios X. Ela tem uma estrutura tridimensional única, formada por folhas β , dispostas na forma de um Barril (Figura 2), nome que deu origem ao nome de estrutura tipo Barril β . Mais recentemente (1998), R. Tsien e seus colaboradores produziram, por engenharia genética, várias formas mutantes que produzem diferentes cores de fluorescência como amarelo, laranja e vermelho, ampliando consideravelmente os horizontes de aplicações bioanalíticas dessas proteínas fluorescentes. Assim, M. Chalfie e R. Tsien, os outros dois laureados do prêmio Nobel, foram os principais responsáveis por popularizarem a aplicabilidade da GFP em diferentes campos de pesquisa.

Devido às suas propriedades de fluorescência, o gene da GFP logo se tornou um importante marcador de expressão gênica em diferentes células e tecidos (Figura 3). Genes que conferem uma marcação específica às células são chamados de genes repórter. Existem alguns tipos de genes repórter que conferem marcação como coloração, reação enzimáticas, luminescência. Entretanto, a GFP e suas parceiras de bioluminescência, as luciferases, por produzirem luminescência

que é um sinal facilmente detectado e quantificado tanto visualmente quanto por técnicas de fotometria, logo se tornaram os genes repórter mais utilizados em diversas áreas da pesquisa biológica, biomédica e biotecnológica.

Além dos estudos com a GFP, Shimomura investigou mecanismo de bioluminescência de variados sistemas bioluminescentes, incluindo fungos, moluscos e vaga-lumes.

que é um sinal facilmente detectado e quantificado tanto visualmente quanto por técnicas de fotometria, logo se tornaram os genes repórter mais utilizados em diversas áreas da pesquisa biológica, biomédica e biotecnológica.



Figura 3: Camundongo transgênico fluorescente expressando GFP.

Pode-se marcar, por exemplo, células cancerígenas com GFP e rastrear pela fluorescência o processo de metástase do câncer em modelos animais, auxiliando na seleção de novas drogas e agentes terapêuticos (Figura 4). Por meio do mesmo princípio, podem-se marcar vírus, bactérias e fun-

gos patogênicos, e rastrear infecções em modelos animais e plantas, auxiliando no desenvolvimento de novas terapias e na bioprospeção de novos medicamentos para essas patologias. Pode-se investigar o comportamento de células do sistema imune como macrófagos e leucócitos durante processos de infecção e inflamação. Podem-se marcar tecidos, embriões e células-tronco durante processos de desenvolvimento embrionário, reconstituição e transplante de tecidos e órgãos. Também se utiliza a GFP e seus derivados para marcar elementos regulatórios da expressão gênica (promotores) que controlam os ritmos circadianos de células e organismos, sinalizando toda vez que um determinado evento gênico é ativado nas células. Assim, a GFP e as luciferases contribuíram no nascimento de um novo campo de investigação biomédica: a biofotônica de baixa intensidade,

que usa marcadores moleculares fluorescentes e bioluminescentes para imagear, em tempo real, processos biológicos e patológicos em nível molecular e celular em organismos vivos. Nenhuma outra técnica utilizada até agora consegue detectar tais processos biológicos e patológicos em tempo real com tanta sensibilidade. Atualmente existem equipamentos de bioimageamento como câmaras de fotodetecção ultra-sensíveis e microscópios de bioluminescência que foram desenvolvidos especificamente para imagear processos “iluminados” pela GFP e luciferases.

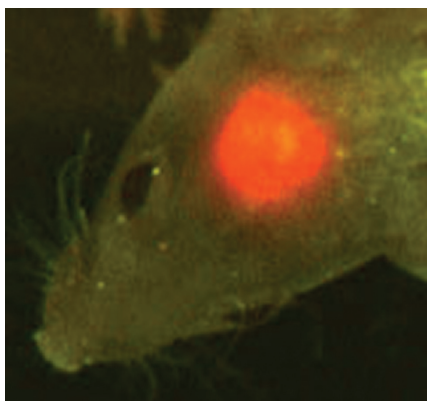


Figura 4: Visualização de tumor marcado com uma variante vermelha da GFP: uma aplicação biofotônica de proteínas bioluminescentes como GFP e luciferases.

Shimomura nasceu na prefeitura de Kyoto em 1928. Cresceu no devastado Japão dos anos pós-guerra, chegando a perder a visão temporariamente por causa da explosão atômica de Nagasaki. Graduiu-se em Química pela Universidade de Nagasaki em 1951. Em 1960, obteve seu doutorado pela Universidade de Nagoya, trabalhando com a purificação da luciferina do crustáceo bioluminescente *Cypridina* que ocorre nos mares do Japão. Seu trabalho com a bioluminescência da *Cypridina* chamou

a atenção de Frank Johnson da Universidade de Princeton, que o convidou para trabalhar com o sistema bioluminescente de águas-vivas, estudos esses que o levaram à descoberta da aequorina, uma luciferase, e em seguida da GFP.

Além dos estudos com a GFP, Shimomura investigou mecanismo de bioluminescência de variados sistemas bioluminescentes, incluindo fungos, moluscos e vaga-lumes. Uma de suas contribuições científicas mais importantes foi para o campo da química da bioluminescência, elucidando a participação de intermediários dióxetanos (Peróxidos cíclicos) nas reações bioluminescentes, inclusive aquela de vaga-lumes. Esse trabalho foi apresentado, a convite de Giuseppe Cilento (1923-1994; IQ-USP), no International Conference of Chemi- and Bioenergized Processes, um evento realizado no Guarujá (SP) em 1978 que reuniu importantes pesquisadores da área, incluindo pesquisadores brasileiros. Em 2004, foi homenageado em Yokohama (Japão) pela Sociedade Internacional de Bioluminescência e Quimioluminescência pela descoberta da GFP. Recentemente, lançou o livro *Bioluminescence: chemical principles*, resumando a química dos principais sistemas bioluminescentes investigados. Shimomura é professor emérito da Boston University Medical School

(Boston) e do Marine Biological Laboratory em Woods Hole, Massachussets. Vive com a esposa Akemi Shimomura, também pesquisadora, em Woods Hole, onde continua seus estudos com o sistema bioluminescente da lula-vaga-lume (*Hotaru-ika*), que ocorre nos mares do Japão,

Embora Shimomura não tivesse idéia da aplicabilidade que a GFP assumiria, seus estudos com essa proteína foram o ponto de partida que abriu o horizonte para uma variada gama de importantes aplicações biomédicas e biotecnológicas.

Devido às suas propriedades de fluorescência, o gene da GFP logo se tornou um importante marcador de expressão gênica em diferentes células e tecidos.

em laboratório próprio montado em sua residência.

O trabalho de Shimomura é um caso clássico que mostra a importância da pesquisa básica, movida pela pura curiosidade,

para a humanidade. Homem reservado de poucas palavras e muita persistência, trabalhou na maior parte de sua carreira com recursos limitados em laboratórios relativamente simples. Embora Shimomura não tivesse idéia da aplicabilidade que a GFP assumiria, seus estudos com essa proteína foram o ponto de partida que abriu o horizonte para uma variada gama de importantes aplicações biomédicas e biotecnológicas. Certamente a humanidade não usufruiria dos benefícios dessa proteína brilhante se não houvesse a curiosidade e o fascínio desse cientista pelos mecanismos de bioluminescência.

Vadim R. Viviani (viviani@ufscar.br), licenciado em Ciências Biológicas pela PUC de Campinas, doutorado em Bioquímica pelo Instituto de Química da USP, pós-doutorados nas Universidades de Shizuoka (Japão) e Harvard (USA), é professor adjunto da UFSCAR, Campus de Sorocaba, onde lidera o grupo de Bioluminescência e representa o Brasil na International Society of Bioluminescence and Chemiluminescence. **Etelvino J. H. Bechara**, professor titular do Depto. de Bioquímica, Instituto de Química, USP; professor titular do Depto. de Ciências Exatas e da Terra, UNIFESP, Diadema, é membro da Academia Brasileira de Ciências.

Para saber mais

SHIMOMURA O. *Bioluminescence: chemical principles and methods*. Hackensack: World Scientific Pub., 2006.

VIVIANI V.R. e OHMIYA Y. *Luciferases and fluorescent proteins: principles and applications in bioimaging and biotechnology*. *Transworld Research*, Kerala, India, 2007.

Nobelprize. Disponível em: <http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008>.

GFP – Green fluorescent protein. Disponível em: <<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html>>.

Abstract: A Nobel Prize for a Bright Protein. This year, the Nobel Prize was awarded to Osamu Shimomura for the discovery of a truly bright protein, the Green Fluorescent Protein or GFP, and to Martin Chalfie and Roger Tsien for the biomedical and biotechnological applicability that this protein assumed in the following years.

Keywords: GFP, bioluminescence, Nobel Prize