

# SEBBM DIVULGACIÓN

## LA CIENCIA AL ALCANCE DE LA MANO



### Las proteínas fluorescentes, nuevos colores para la biología celular

Lucía Sánchez Ruiloba

Servicio de Microscopía Óptica y Confocal del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"

#### Biografía

Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid (2002). Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid (2008), título del trabajo: "Localización y función de la proteína quinasa d y kidins220 en células neuronales". Durante su periodo de tesis realizó una estancia de 5 meses en la Universidad de Pensilvania (Philadelphia, EEUU). Tiene 8 publicaciones en revistas internacionales. Ha asistido a 4 congresos internacionales, así como a 2 nacionales. Durante algo más de un año trabajó en el laboratorio de microscopía confocal del Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. (octubre 2005-febrero 2007). Desde el 2010 es responsable del servicio de microscopía óptica y confocal del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, que da soporte a numerosos grupos de investigación.

<http://www.sebbm.es/>

HEMEROTECA:

[http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos\\_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion\\_29](http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/la-ciencia-al-alcance-de-la-mano-articulos-de-divulgacion_29)

SEBBM  
SEBBM

Sociedad Española  
de Bioquímica y  
Biología Molecular

#### Resumen

**El descubrimiento y desarrollo de las proteínas fluorescentes supuso una revolución en el campo de la biología celular. La fusión de proteínas fluorescentes con proteínas de interés permite monitorizar multitud de procesos biológicos en tiempo real en células y organismos vivos. Gracias a las proteínas fluorescentes se han desarrollado técnicas específicas para el estudio de la dinámica y movimiento de proteínas (FRAP) así como para el análisis de interacciones proteicas (FRET).**

#### Summary

**The discovery and development of fluorescent proteins have revolutionized cell biology. Fluorescent proteins can be incorporated into proteins of interest by genetic fusion. These chimeric proteins allow imaging of a wide range of biological events in living cells and full organisms. New technologies have been developed using fluorescent proteins. These technologies have greatly advanced our understanding of proteins dynamics (FRAP) and protein interactions (FRET).**

El descubrimiento de la proteína verde fluorescente por el doctor Osamu Shimomura en 1968 se produjo cuando estudiaba la capacidad de emitir luz verde de la medusa *Aequorea victoria*.

Descubrió que están implicadas dos proteínas. *Aequorin*, que emite luz azul a través de un proceso de bioluminiscencia, y otra proteína capaz de absorber esta luz azul y emitir fotones de luz verde. A esta proteína se le denominó proteína verde fluorescente o GFP, del inglés *Green Fluorescent Protein*. En 1992 se identificó la secuencia de nucleótidos de esta proteína fluorescente y dos años más tarde Martin Chalfie la introdujo en un organismo completo, en el nematodo *Caenorhabditis Elegans*. Así se descubrió que la GFP posee dos características claves que han permitido su posterior aplicación en el campo de la biología celular. Por un lado, se pliega de manera espontánea y adquiere su conformación fluorescente sin necesidad de ningún cofactor. Por otro lado, no produce toxicidad al expresarla en otro organismo. Tras el descubrimiento de la proteína verde fluorescente muchos investigadores han centrado sus esfuerzos en identificar y desarrollar nuevas proteínas fluorescentes. Se han descubierto proteínas procedentes de otros organismos como la DsRed, proteína con fluorescencia roja que proviene de la anémona *Discosoma Striata*. Además, realizando sustituciones de aminoácidos en las proteínas ya conocidas se han mejorado características como el brillo o la estabilidad, y se ha modificado su espectro de emisión. La sustitución de la treonina 203 por tirosina en la GFP da lugar a una proteína con fluorescencia amarilla.

En este campo es especialmente relevante el trabajo de Roger Tsien. Ya que tras dedicarse al estudio de la estructura de la GFP ha sido capaz de crear una gran variedad de proteínas fluorescentes de diferentes colores.

Las proteínas fluorescentes disponibles en la actualidad cubren prácticamente todo el espectro de luz visible. Combinándolas en la misma muestra se pueden realizar marcajes multicolores y estudiar diferentes moléculas simultáneamente.

El descubrimiento y desarrollo de las diferentes variedades de las proteínas fluorescentes supuso una revolución en la biología celular.

Tanto es así, que los investigadores Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Tsien obtuvieron el premio Nobel de Química en 2008.

Las técnicas y aplicaciones que se han desarrollado gracias al uso de estas proteínas son muy variadas y los objetivos que persiguen son muy diferentes.

Una de las aplicaciones más extendidas de las proteínas fluorescentes es la fusión con proteínas de interés, lo que permite observar la localización de la proteína quimérica manteniendo las células intactas. Se han creado proteínas fluorescentes con secuencias específicas de localización que las sitúan en los diferentes orgánulos celulares, de esta manera se puede realizar un seguimiento de su morfología, fusión y fisión, segregación durante la división celular... Combinando el marcaje de proteínas de interés con el marcaje de orgánulos específicos se pueden realizar estudios de localización, tráfico y movimiento de proteínas a lo largo del tiempo. Además de moléculas intracelulares las proteínas fluorescentes permiten el marcaje de células o tejidos en animales enteros. El objetivo de estos marcajes es la visualización de la morfología, localización y movimiento de las células o tejidos marcados durante el desarrollo embrionario o procesos tumorales, entre otros.

Un subgrupo dentro de las proteínas fluorescentes lo componen las

fotoactivables y las fotoconvertibles. Las proteínas fotoactivables en su estado basal no son fluorescentes pero tras su iluminación con una determinada longitud de onda sufren un cambio conformacional y adquieren capacidades fluorescentes. Las fotoconvertibles se comportan igual que las anteriores pero su fluorescencia es reversible si se vuelven a iluminar con la longitud de onda precisa.

Estas proteínas permiten la monitorización de moléculas o células en el espacio y en el tiempo. Presentan la ventaja de que se pueden activar regiones de interés y así discernir el comportamiento de determinados subgrupos de proteínas o células.

Las proteínas fluorescentes han permitido el desarrollo de técnicas microscópicas basadas en las propiedades de sus cromóforos. Entre ellas cabe destacar la técnica de FRAP que estudia la recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado.

Consiste en excitar con luz de alta intensidad las proteínas fluorescentes de una región concreta de manera que pierdan su fluorescencia. A continuación se analiza cómo se recupera la fluorescencia en esa región. Esta recuperación será debida al movimiento de las partículas fluorescentes que se encontraban fuera de la región sobre-excitada. Así se obtienen datos sobre el movimiento o la difusión de las moléculas marcadas fluorescentemente.

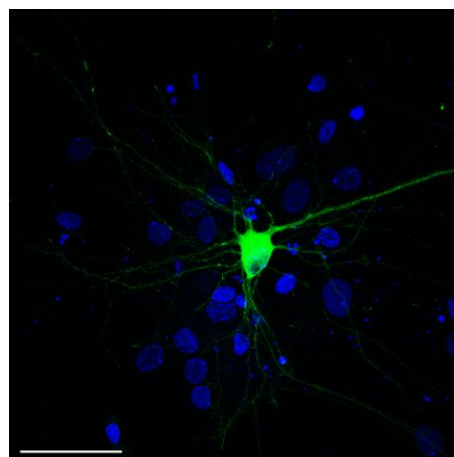
Otra técnica ampliamente utilizada es el FRET (*Föster Resonance Energy Transfer*). Se basa en el uso simultáneo de una pareja de moléculas fluorescentes, en la cual la primera de ellas emite luz de una longitud de onda capaz de excitar a la segunda. Si estas moléculas se encuentran a menos de 10 nanómetros, iluminando la primera de ellas podremos observar fluorescencia emitida por la segunda. Esto es debido a que ha sido excitada con la luz de emisión de la primera. Usando esta técnica podemos identificar inequívocamente

interacciones entre las proteínas estudiadas.

Las proteínas fluorescentes, así como las técnicas derivadas de ellas, han supuesto un gran avance en el área de la biología celular, pero este campo está en continuo desarrollo y en los próximos años aparecerán nuevas técnicas y proteínas que nos permitirán mejorar nuestros conocimientos y responder a nuevas preguntas.

## Referencias

1. Handbook of Biological Confocal Microscopy. Second edition. James B. Pawley.
2. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/nobelguide\\_che.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/nobelguide_che.pdf)
3. Páginas web con información de microscopía.  
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/livecellimaging/index.html>  
<http://www.microscopyu.com/articles/livecellimaging/fpintro.html>  
<http://www.olympusconfocal.com/applications/index.html>



**Figura. Cultivo de neuronas corticales de embrión de rata transfectadas con un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP). La tinción en azul corresponde con el marcador de ácidos nucleicos DAPI a través del cual se puede detectar el núcleo de todas las células presentes en el campo. Como se puede observar solo una de ellas expresa la proteína verde fluorescente. La barra de escala corresponde a 50 micras. Imagen cedida por la Dra. Teresa Iglesias Vacas del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid.**