

An. R. Acad. Nac. Farm., 2009, 75 (1): 99-112

El descubrimiento de las proteínas fluorescentes y su utilidad en la investigación biomédica (Premio Nobel de Química de 2008)

José Javier Lucas*

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBM“SO”, CSIC/UAM) y Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CiberNed, Instituto de salud Carlos III).

El premio Nobel de Química 2008 ha sido otorgado a los científicos Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien por el descubrimiento de la proteína verde fluorescente (GFP, por sus iniciales en inglés) y por el desarrollo de herramientas derivadas de ésta para su aplicación en biotecnología y en investigación biomédica (1).

1. LOS PROTAGONISTAS Y LA SECUENCIA DE SUS DESCUBRIMIENTOS

El primer protagonista de la serie de descubrimientos laureados es Osamu Shimomura de nacionalidad estadounidense aunque nacido en Kyoto (Japón) en 1928 (1). Su carrera como biólogo marino estuvo llena de dificultades debidas a la Segunda Guerra Mundial y la consiguiente devastación de Japón en los años de posguerra. Pese a ello, en 1955, fue contratado como ayudante por el profesor Yashimasa Hirata de la Universidad de Nagoya. El profesor Hirata le encomendó la tarea de aislar e identificar la sustancia que hace que un triturado del molusco *Cypridina* brille en contacto con el agua. Se trataba de un proyecto difícil en el que ya había fracasado un grupo de investigación estadounidense líder en el campo. Hirata prefirió encomendar este proyecto a Shimomura en lugar de a estudiantes de doctorado para no comprometer las posibilidades de éstos de llevar a buen término una tesis doctoral. Contra todo pronóstico, en 1956 Shimomura consiguió aislar la proteína responsable de la luminiscencia de *Cypridina*. La proteína purificada emitía una



"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

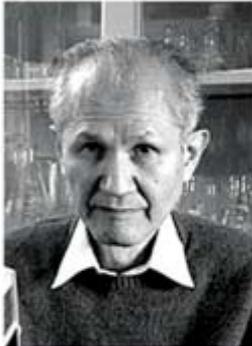
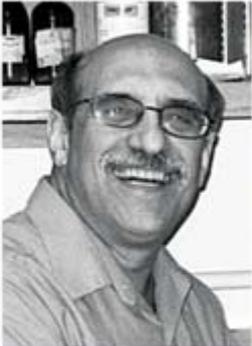
		
Photo: J. Henriksson/SCANPIX	Photo: J. Henriksson/SCANPIX	Photo: UCSD
Osamu Shimomura	Martin Chalfie	Roger Y. Tsien
🕒 1/3 of the prize	🕒 1/3 of the prize	🕒 1/3 of the prize
USA	USA	USA
Marine Biological Laboratory (MBL) Woods Hole, MA, USA	Columbia University New York, NY, USA	University of California San Diego, CA, USA
b. 1928 (in Kyoto, Japan)	b. 1947	b. 1952

Figura 1. Comunicado Original y fotografías de los investigadores premiados que aparecen en la web oficial de la Fundación Nobel (reproducido a partir de del contenido de la página web http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/).

luz 37.000 veces más brillante que la emitida por el triturado del molusco. Tras publicar sus resultados (2), Shimomura fue fichado por el profesor Frank Johnson de la Universidad de Princeton en Nueva Jersey (Estados Unidos). Como regalo de despedida, el Profesor Hirata se encargó de que Shimomura recibiera el título de doctor por la Universidad de Nagoya (1).

En el otoño de 1960, poco después de la llegada de Shimomura a Princeton, el profesor Johnson le enseñó un pequeño frasco con un polvo blanco y le explicó que se trataba de un liofilizado de *Aequorea victoria*, una medusa luminosa del orden Hydrozoa que vive en las costas occidentales de Norteamérica. *Aequorea victoria* tiene unos pequeños organos lumínicos en el borde de la umbrela, justo en la base de cada tentáculo, que emiten un destello de luz verdosa cuando la medusa es agitada o sacudida. Johnson le explicó a Shimomura que si se mezclaba ese liofilizado con agua, emitía luz. Tal y como relata el propio Shimomura (3), la demostración que el doctor Johnson intentó realizar a continuación no funcionó, pero era tal el entusiasmo que ponía en describir la brillante luminiscencia de las medusas vivas que abundan en las costas en torno a Friday Harbour en el estado de Washington que Shimomura no pudo resistirse a aceptar el proyecto de identificar la molécula o moléculas responsables de esta bioluminiscencia. Así, a principios del verano de 1961, Shimomura, su esposa, el doctor Johnson y un ayudante, pertrecharon la furgoneta que Johnson acababa de comprar para la ocasión y emprendieron un viaje de siete días hasta Friday Harbour. Una vez allí, el doctor Robert Fernald, el director de los Friday Harbour Laboratories, les condujo al pequeño laboratorio en el que Shimomura y el resto del equipo llevaron a cabo las dos tareas principales de la expedición: por un lado, aprender a recolectar de las medusas la actividad bioluminiscente en condiciones de manipulación en las cuales la actividad lumínica estuviera reversiblemente inhibida y, por otro lado, recolectar una cantidad ingente de medusas para producir extractos suficientes para posteriormente en Princeton aislar la molécula o moléculas responsables de la actividad. Desoyendo los consejos del doctor Johnson que estaba centrado en la hipótesis de que el sistema luminiscente de *Aequorea* sería similar al de la Luciferina-luciferasa, Shimomura se centró en inactivar la actividad manteniendo los triturados de medusa en pH ácido y después comprobó que los extractos libres de células recuperaban la luminiscencia al restaurar un pH neutro. Pero el gran avance fue por casualidad al arrojar Shimomura restos de extracto en la pila y observar un destello lumínico, aunque azul y no verdoso, como hubiera sido de esperar. Como la pila contenía restos de agua de mar, comprendió que uno de los componentes de esta sería el responsable de esa activación. La composición del agua marina era bien conocida y pronto Shimomura comprobó que era el Ca^{2+} el

responsable de la activación y, por tanto, que el EDTA sería la gran herramienta para mantener la actividad reversiblemente inhibida. El resto del verano, lo dedicaron a recolectar el máximo posible de ejemplares de medusa en los bancos que pasaban mañana y tarde con las mareas para inmediatamente recortar los bordes de las sombrillas de las medusas con tijeras y después preparar el extracto de los mismos. Cuando llevaban recolectados unos 10.000 ejemplares, por alguna razón, las medusas dejaron de aparecer con las mareas. El grupo volvió a Princeton con el extracto de medusa empaquetado en hielo seco. Tras muchas rondas de cromatografía en distintos tipos de columnas, a principios de 1962, fueron capaces de juntar 5 miligramos del principio activo. La sustancia capaz de emitir luz cuando se añadía calcio resultó ser una proteína de un peso molecular en torno a 20.000 a la que denominaron Aequorina. A lo largo del proceso de purificación de la Aequorina también se observaba otra proteína que emitía una luz verdosa. En la publicación de la Aequorina Shimomura menciona por primera vez como “proteína verde” la que ahora todos conocemos como GFP. Se refirió a ella como una proteína que también se obtiene durante el proceso de purificación de Aequorina y que “hace que las soluciones tomen un color verdoso a la luz solar, sólo amarillento con luz de bombilla y una muy brillante fluorescencia verde si se iluminan con luz ultravioleta”.

No fue hasta la década de los 70 que Shimomura y demás investigadores se dieron cuenta de que, en la medusa, tiene lugar una transferencia energética intermolecular entre la Aequorina y la GFP. La Aequorina, en respuesta al calcio, emite una luz azul que es captada por la GFP resultando en fluorescencia verde. En 1979, Shimomura identificó el cromóforo de la GFP, que es el responsable de la fluorescencia (que no quimioluminiscencia) de la GFP. Este cromóforo, cuando recibe luz azul o ultravioleta absorbe la energía de la luz y la emite también en forma de luz pero con otra longitud de onda, en el espectro del verde.

A diferencia de las reacciones de bioluminiscencia que Shimomura había estudiado con anterioridad, en el caso de la GFP, no hacía falta ninguna otra proteína o cofactor para que la fluorescencia tuviera lugar. En esto, y en su pequeño tamaño, radica el potencial de la GFP como marcador biológico. Pero Shimomura nunca imaginó cuando caracterizó la GFP, la revolución que esto iba a suponer en biomedicina.

Douglas C. Prasher fue la primera persona que se dio cuenta del potencial de la GFP como marcador biológico o trazador vital. Prasher reportó el clonaje y la secuencia de la GFP en un artículo de 1992 en la revista *Gene* (4). El trabajo fue realizado en Woods Hole Oceanographic Institution con financiación de la American Cancer Society. El proyecto de investigación de Prasher financiado por la American Cancer Society precisamente tenía como objetivo el clonaje de la GFP para usarla como marcador de células tumorales y así poder visualizar la evolución de éstas en la progresión del cáncer o en respuesta a agentes anti-tumorales.

La colaboración de Prasher con los dos laureados Chalfie y Tsien fue clave e instrumental para el desarrollo de la técnica y se refleja en su coautoría en las publicaciones seminales de ambos laureados (5-7). El propio Chalfie ha declarado su pesar por no encontrarse Prasher entre los premiados (8), llegando a decir que hubiera sido igualmente justo que el premio lo hubiera recibido Prasher en detrimento del propio Chalfie. Nunca llegaremos a saber todas las razones que relegaron a Prasher fuera del premio, pero, el hecho de que Prasher no se llegó a estabilizar en el sistema científico tras trabajar para distintas instituciones estadounidenses, que sus últimas publicaciones científicas reflejadas en Medline datan de 1997 y que no trabajaba en ciencia en los últimos años, probablemente han sido factores decisivos.

El siguiente premiado en entrar en escena fue Martin Chalfie. Estadounidense, nacido en 1947, doctorado en Neurobiología por Harvard en 1977 y profesor de Biología de Columbia University en Nueva York desde 1982. El trabajo de Chalfie ha estado centrado en el estudio de la organogénesis y de la función neural del nematodo *C. elegans*, un pequeño gusano terrestre de apenas un milímetro de longitud, que se alimenta de bacterias del suelo. Este nematodo se utiliza como modelo animal por las muchas ventajas que aporta. Estas incluyen: su pequeño tamaño, que se puede criar en placas de petri con césped bacteriano y su corto ciclo vital. Pero sobre todo, su gran ventaja es el hecho de ser transparente lo que permite visualizar las 959 células que lo componen, así como las divisiones y migraciones celulares que tienen lugar desde el embrión de una sola célula hasta la formación del organismo adulto completo. Además, el gusano tiene un sistema nervioso rudimentario, que le permite interactuar con

su entorno, desplazarse y copular. Por último, las manipulaciones genéticas son fáciles en este organismo, cuyo genoma se conoce por completo y la mayoría de sus genes tienen homólogos en vertebrados, incluido el hombre, con lo que las claves sobre organogénesis y función neuronal obtenidas en el nematodo han permitido descifrar las claves de fenómenos similares en organismos superiores.

El interés de Chalfie por la GFP surgió en 1988, mientras escuchaba un seminario en Columbia sobre organismos bioluminiscentes. A partir del momento en que escuchó las cualidades de la GFP que la hacían candidata a ser un excelente trazador vital, Chalfie dejó de prestar atención al seminario obsesionado con la idea de cómo conseguir adaptarlo a sus estudios en *C. elegans*. Tras un par de días de pesquisas supo que Prasher estaba trabajando en el clonaje de la GFP rastreando genotecas de *Aequorea victoria* y se puso en contacto con él. Prasher envió el clon con la secuencia de la GFP a Chalfie y éste le encomendó a la estudiante Ghia Euskirchen que lo expresara en la bacteria *E. coli* (8). Un mes más tarde, la estudiante lo consiguió y, lo que es más importante, bastaba con mirar las bacterias transformadas en un microscopio de luz ultravioleta para ver que fluorecían. Quedaba así demostrado, que la proteína GFP no necesita ningún otro complemento de *Aequorea victoria* para emitir su fluorescencia verde. El siguiente paso que dieron en el laboratorio de Chalfie fue el de modificar genéticamente el gusano *C. elegans* de manera que resultara una estirpe que expresa el gen de la GFP bajo el promotor de un gen que está activo tan solo en las 6 neuronas mecanosensoras del nematodo. En el gusano resultante, al iluminarlo con luz ultravioleta, se distinguían perfectamente los cuerpos de estas neuronas y sus proyecciones axonales a lo largo del gusano en libre movimiento. Esto es lo que se observa en la portada del número de 11 de febrero de 1994 de la revista *Science* en el que Chalfie, Prasher y tres colaboradores más publicaron este primer uso de la GFP como marcador tanto en bacterias como en eucariotas (5). A partir de este momento, el número de publicaciones en las que se utiliza la GFP como marcador fue aumentando exponencialmente.

Pero la gran revolución en el uso de proteínas fluorescentes estaba aun por llegar. El protagonista de las mejoras que elevaron el potencial de la nueva herramienta fue el tercer galardonado, el estadou-

nidense Roger Y. Tsien. Nacido en Nueva York en 1952, Tsien se doctoró en fisiología por la Universidad de Cambridge (Reino Unido) en 1977 y es profesor la Universidad de California en San Diego (UCSD) desde 1989.

Las primeras de las muchas aportaciones de Tsien al conocimiento y mejora de las proteínas fluorescentes fue esclarecer el mecanismo molecular por el que la GFP adquiere su capacidad fluorescente y el desciframiento de la estructura tridimensional de la proteína. Tsien demostró que la GFP tiene una forma cilíndrica parecida a la de una lata de refresco cuyo centro alberga el fluoróforo (9) y, aunque la estructura del fluoróforo compuesto por los aminoácidos 65-67 ya había sido descrita por Shimomura (10) y posteriormente matizada por Prasher y colaboradores (11), Tsien demostró que para que el fluoróforo se forme es necesaria una reacción de oxidación en el centro del cilindro que es catalizada por la propia GFP (7).

El siguiente gran avance del grupo de Tsien fue descubrir que si introducía la mutación S65T en la secuencia peptídica de la GFP, la reacción de oxidación que forma el cromóforo es cuatro veces más rápida que en la versión silvestre. La nueva versión mejorada de la GFP resultante de esta modificación se denominó EGFP por las siglas en inglés de “enhanced green fluorescent protein” (12).

Las siguientes aportaciones de Tsien tuvieron que ver con la combinación de GFP con dominios funcionales de otras proteínas de manera que la fluorescencia variara según las condiciones del interior de la célula y se convirtiera así en un sensor funcional. El primer ejemplo de esto fue la fusión de la EGFP con dominios de calmodulina que unen calcio y producen cambios conformacionales que hacen que el espectro de emisión de la proteína vaya variando en función del número de iones que ha unido y, por tanto, a modo de indicador de la concentración de Ca^{2+} . La nueva versión de la proteína fluorescente modificada recibió el nombre de Camaleón (13, 14).

Finalmente, el otro tipo de mejoras introducidas por Tsien y sus colaboradores ha sido la que han ampliado el abanico de colores en que emiten las distintas versiones de la GFP y otras proteínas fluorescentes de distinto origen. Así, la primera mutagénesis de GFP que resultó en una versión que emitía en un color distinto al verde fue la que tenía una mutación en la posición 66 y que hacía que la tirosina

del fluoróforo fuera sustituida por una histidina. Esta nueva versión emitía en azul (7). El siguiente nuevo color fue debido a una mutación diseñada en función del conocimiento de la estructura tridimensional. Se trataba de la mutación T203Y que resultaba en una versión que emitía en amarillo y que se denominó YFP por las siglas de su nombre inglés “yellow fluorescent protein” (9).

Así pues, la mutagénesis de la GFP de *Aequorea victoria* resultó en nuevas versiones con espectros de emisión que abarcaban desde el azul al amarillo pasando por el cian y el verde. Pero en ningún caso llegaba al rango del anaranjado y del rojo. El siguiente avance en este sentido resultó de los trabajos de un grupo de científicos rusos entre los que se encuentran Sergey Lukyanov y sus colaboradores. Lo que hicieron estos científicos fue analizar si era posible encontrar análogos de GFP en corales fluorescentes. De hecho fueron capaces de encontrar seis proteínas de coral similares a la GFP de las cuales cuatro emitían en rango del verde/amarillo, una en el del azul y, por fin, una en el del rojo (15). La que emitía en rojo era de la especie del coral *Discosoma* y recibió el nombre de DsRed (16). Así mismo, la que emitía en amarillo recibió el nombre de citridina (16). Pese al gran avance de disponer por primera vez de una proteína fluorescente que emitía en el rango del rojo, el inconveniente de DsRed como trazador vital es que es una proteína de gran tamaño y, además, tetramérica. Es decir, que está formada por cuatro subunidades protéicas independientes. El siguiente logro de la factoría Tsien fue generar un versión monomérica de la DsRed mediante ingeniería genética (17). La proteína resultante se denominó mRFP por las siglas de “monomeric red fluorescente protein”.

Así pues, gracias al descubrimiento de la GFP de *Aequorea victoria* por Shimomura, su posterior aplicación como marcador celular vital por primera vez gracias a Chalfie (con la ayuda Prasher y colaboradores) y la generación de variantes de GFP así como de otras proteínas fluorescentes por Tsien y otros para que emitan en todos los colores del espectro visible así como para que actúen de biosensores al variar su fluorescencia según las condiciones del medio intracelular, en la actualidad las proteínas fluorescentes son una herramienta cotidiana en los laboratorios de biología molecular con numerosas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Describiremos a continuación algunas de estas múltiples aplicaciones.

2. MODOS Y EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS FLUORESCENTES

No se pretende aquí hacer una revisión sistemática ni exhaustiva de las innumerables aplicaciones que han tenido la GFP y sus derivados. Se citarán sólo algunos usos por lo generalizado de su empleo, otros muy concretos por lo llamativo o curioso de la aplicación y, por último, algunos de los que usamos en nuestro laboratorio para el estudio *in vivo* en modelos animales y celulares de las enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington.

Una primera distinción entre el tipo de usos que se ha dado a las proteínas fluorescentes radica en el hecho de si se usan como tales o si se usan unidas a otra proteína como anexo a la secuencia aminoacídica de ésta. Cuando se expresan como tal en un determinado tipo celular funcionan normalmente como un mero colorante vital que permite visualizar un subtipo celular *in vivo*. Cuando se usan fusionadas a otra proteína pueden permitir, además, visualizar la función de la proteína a la que se ha unido. En este sentido, debemos recordar la gran ventaja que suponen el pequeño tamaño de la GFP y su compacta estructura que han permitido que la fusión de la proteína GFP, normalmente en el extremo carboxilo-terminal de otra proteína no modifique significativamente ni la función ni la localización subcelular de la proteína nativa a la que se ha unido.

Otra distinción es si se expresa GFP o una de sus variantes para simplemente para localizar su presencia o si se usan formas modificadas que florecen de distinta forma o son más o menos estables según el momento metabólico de la célula. Esta última variante resulta ser un indicador funcional y ha tenido múltiples aplicaciones biotecnológicas. Así, se han generado bacterias que expresan las proteínas fluorescentes sólo en presencia de determinados contaminantes como el arsénico o los metales pesados (18). Dichas bacterias son de gran utilidad pues son una forma rápida y económica de comprobar si aguas de pozo están o no contaminadas antes de destinarlas al consumo humano.

En cualquier caso, todo empieza por transferir la secuencia de ADN que codifica por la proteína fluorescente a la línea celular u organismo que se quiera marcar. Esto se hace por técnicas estándar de trans-

fección y/o de generación de plantas y animales transgénicos. En el caso de la transgénesis, la expresión puede tener lugar en unos tipos celulares o en otros dependiendo de la secuencia promotora que se emplee. El promotor es la región de ADN genómico que antecede a la región que se transcribe a ARN mensajero y que tiene los elementos de secuencia para reconocimiento por distintos factores de transcripción que hace que ese mensajero se exprese en determinados tipos celulares y no en otros y, en muchos casos, que además se exprese en mayor o menor medida según el momento fisiológico de esa célula.

Una primera aplicación muy general ha sido en el campo de la investigación de los trasplantes de células incluidos los de células madre. En este tipo de experimentos se desea poder cuantificar el grado de implantación y colonización de las células exógenas dentro del huésped así como los subtipos celulares que se han originado. En este sentido, los ratones transgénicos que expresan EGFP bajo el control de un promotor ubicuo (que se expresa en todo tipo celular) y constitutivo (que se expresa en todo momento de la vida de una célula) como el de la beta-actina se han convertido en la cepa de ratones de elección para preparar células para experimentos de trasplantes. Las células exógenas se distinguen fácilmente en la sangre y tejidos sólidos del ratón receptor sin necesidad de fijar ni permeabilizar gracias a la fluorescencia de la GFP.

Respecto a la utilidad de expresar GFP fusionada a otra proteína, esto da información de tanto de los tipos celulares que expresan la proteína como de la localización subcelular de la proteína objeto de estudio. Esto es especialmente interesante cuando se generan modelos animales de enfermedades por expresión ectópica de una proteína patogénica. Así, por ejemplo en el caso de la enfermedad de Huntington que está causada por una mutación que resulta en una secuencia anómalamente larga de poliglutamina en la proteína huntingtina (Htt) y que hace que ésta autoagregue (19, 20), ha sido muy útil la inserción de GFP en la secuencia de la Htt mutada. Esto permite monitorizar el nivel de expresión de la proteína patogénica en los distintos tejidos a lo largo de la edad del animal así como la formación y localización subcelular de los agregados proteicos aberrantes. Un ejemplo de esto es la reciente generación del primer modelo transgénico en primate de una enfermedad humana por expresión de una forma mutada de Htt fusionada a GFP (21, 22).

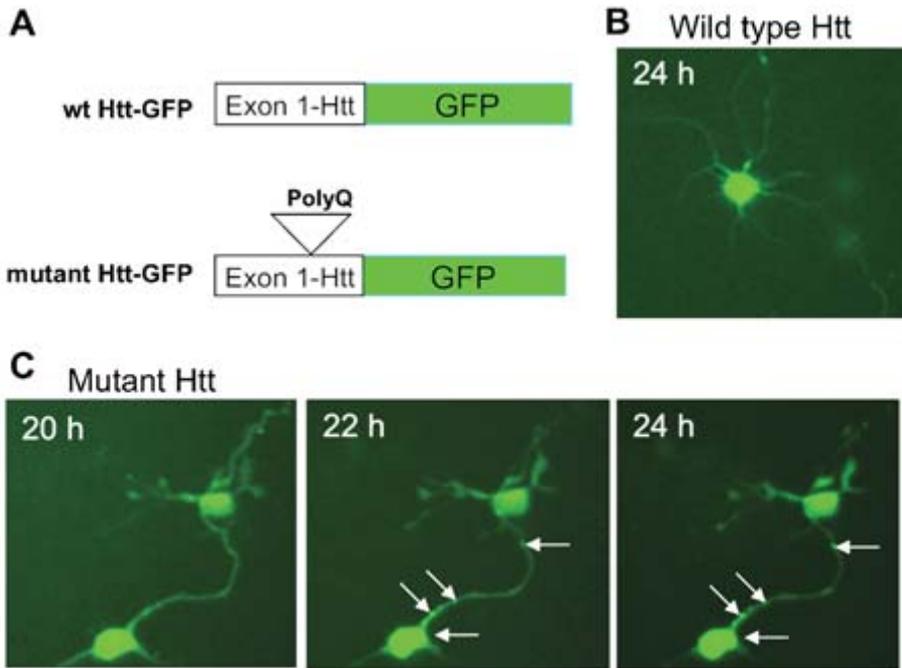


Figura 2. Experimentos de transfección de cultivos primarios de neuronas de ratón con formas de huntingtina marcadas con GFP para visualizar la formación de los cuerpos de inclusión característicos de esta enfermedad neurodegenerativa. **A)** Construcciones de ADN para expresar en experimentos de transfección la porción de Huntingtina (Htt) codificada por el exón 1 y fusionada a GFP, ya sea la forma silvestre (wt) o la mutada con una expansión de poliglutamina (mutant). **B)** Neurona expresando forma wt a las 24 horas de haber sido transfectada. **C)** Dos neuronas transfectadas con la forma mutada a distintos tiempos post-transfección. En la neurona inferior es posible visualizar la formación de los agregados de Htt mutada característicos de la enfermedad de Huntington.

También hay ejemplos de uso de proteínas fluorescentes modificadas como biosensores en combinación con su uso en modelos animales transgénicos para estudio del mecanismo patogénico de enfermedades neurodegenerativas. Una hipótesis prevalente en la enfermedades neurodegenerativas en general y en la enfermedad de Huntington en particular es la de que los agregados proteicos aberrantes que se observan en el interior de las neuronas pueden ser tanto causa como indicación de un mal funcionamiento del sistema ubiquitina proteasoma. El sistema

ubiquitina proteasoma se encarga del recambio por degradación endoproteolítica de la mayoría de las proteínas solubles intracelulares cuando estas presentan señales para su degradación. La señal en concreto es la unión covalente de varias copias de una pequeña proteína de 76 aminoácidos denominada ubiquitina. Cuando una proteína contiene esta señal de poliubiquitinación es eficientemente degradada por el complejo multiprotéico y multicatalítico denominado proteasoma (23). Se han generado formas de GFP con modificaciones que hacen que la proteína fluorescente se poliubiquitile muy eficientemente. Por tanto, estas proteínas son rápidamente degradadas por el proteasoma y tienen un vida media extremadamente corta (24). Cuando los genes que codifican por estas formas de GFP se expresan en una célula, la proteína no se llega a acumular y por tanto la célula no muestra fluorescencia a no ser que el sistema ubiquitina-proteasoma no esté funcionando correctamente. Estas proteínas son pues biosensores de inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma. Para explorar la hipótesis de que un mal funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasoma en la enfermedad de Huntington estamos combinando nuestro modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Huntington (25, 26) con ratones con expresión ubicua de una de estas formas de GFP reporteras de inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma generadas por nuestro colaborador Nico Dantuma del Karolinska Institutet (27). De entre los distintos abordajes experimentales posibles para explorar la posible inhibición del sistema ubiquitina-proteasoma en la enfermedad de Huntington, este posee numerosas ventajas y muy en particular la resolución celular a la hora de detectar si dicha inhibición está teniendo lugar sólo en un subtipo neuronal o sólo en un momento muy concreto de la evolución de la enfermedad (28).

Por último, una aplicación reciente y probablemente la más espectacular de las proteínas fluorescentes es el denominado experimento "*brainbow*" (29), por el juego de palabras inglesas *brain* (cerebro) y *rainbow* (arco iris). Lo que hicieron Livet y sus colaboradores de la Universidad de Harvard (USA) fue generar ratones modificados genéticamente que incorporaban en sus genomas las secuencias de ADN que codifican tres de estas proteínas fluorescentes. Concretamente, una azul-cian, otra amarilla y otra roja. Por la manera en que se generó este ratón transgénico, cada neurona de éste expresa una cierta proporción de cada una de estas tres proteínas. De esa forma, al igual que ocurre al combinar las tintas de una impresora, cada neurona fluoresce-

ce en un color determinado del arco iris ligera o totalmente distinto del que exhibe la neurona vecina. Gracias a este experimento ha sido posible observar por primera vez la intrincada complejidad de todas las proyecciones neuronales simultáneamente.

3. BIBLIOGRAFÍA

1. Nobel-Foundation. (2008) The Nobel Prize in Chemistry 2008. *The Royal Swedish Academy of Sciences* www.kva.se.
2. Shimomura, O., Johnson, F.H. & Saiga, Y. (1962) Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-239.
3. Shimomura, O. (1995) A Short Story of Aequorin. *The Marine Biological Laboratory Biological Bulletin.* 189: 1-5.
4. Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G. & Cormier, M.J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111: 229-233.
5. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W. & Prasher, D.C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263: 802-805.
6. Haseloff, J., Siemering, K.R., Prasher, D.C. & Hodge, S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 2122-2127.
7. Heim, R., Prasher, D.C. & Tsien, R.Y. (1994) Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91: 12501-12504.
8. Service, R.F. (2008) Three Scientists Bask in Prize's Fluorescent Glow. *Science.* 232: 361.
9. Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y. & Remington, S.J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273: 1392-1395.
10. Shimomura, O. (1979) Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 104: 220-222.
11. Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G. & Ward, W.W. (1993) Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry.* 32: 1212-1218.
12. Heim, R., Cubitt, A.B. & Tsien, R.Y. (1995) Improved green fluorescence. *Nature.* 373: 663-664.
13. Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J.M., Adams, J.A., Ikura, M. & Tsien, R.Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388: 882-887.
14. Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R. & Tsien, R.Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 2135-2140.

15. Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zarskiy, A.G., Markelov, M.L. & Lukyanov, S.A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17: 969-973.
16. Heikal, A.A., Hess, S.T., Baird, G.S., Tsien, R.Y. & Webb, W.W. (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 11996-12001.
17. Campbell, R.E., Tour, O., Palmer, A.E., Steinbach, P.A., Baird, G.S., Zacharias, D.A. & Tsien, R.Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 7877-7882.
18. Roberto, F.F., Barnes, J.M. & Bruhn, D.F. (2002) Evaluation of a GFP reporter gene construct for environmental arsenic detection. *Talanta.* 58: 181-188.
19. Gusella, J.F. & MacDonald, M.E. (1995) Huntington's disease. *Semin. Cell Bio.* 6: 21-28.
20. Martin Aparicio, E. & Lucas Lozano, J.J. (2002) Molecular basis of Huntington's disease and possible pathogenic mechanisms. *Rev. Neurol.* 35: 212-220.
21. 2008. Transgenic primate models inch forward. *Nat. Neurosci.* 11: 729.
22. Yang, S.H., Cheng, P.H., Banta, H., Piotrowska-Nitsche, K., Yang, J.J., Cheng, E.C., Snyder, B., Larkin, K., Liu, J., Orkin, J., et al. (2008) Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature.* 453: 921-924.
23. Glickman, M.H. & Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82: 373-428.
24. Dantuma, N.P., Lindsten, K., Glas, R., Jellne, M. & Masucci, M.G. (2000) Short-lived green fluorescent proteins for quantifying ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis in living cells. *Nat. Biotechnol.* 18: 538-543.
25. Diaz-Hernandez, M., Torres-Peraza, J., Salvatori-Abarca, A., Moran, M.A., Gomez-Ramos, P., Alberch, J. & Lucas, J.J. (2005) Full motor recovery despite striatal neuron loss and formation of irreversible amyloid-like inclusions in a conditional mouse model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 25: 9773-9781.
26. Yamamoto, A., Lucas, J.J. & Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell.* 101: 57-66.
27. Lindsten, K., Menendez-Benito, V., Masucci, M.G. & Dantuma, N.P. (2003) A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat. Biotechnol.* 21: 897-902.
28. Ortega, Z., Diaz-Hernandez, M. & Lucas, J.J. (2007) Is the ubiquitin-proteasome system impaired in Huntington's disease? *Cell. Mol. Life Sci.* 64: 2245-2257.
29. Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R. & Lichtman, J.W. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature.* 450: 56-62.

*** Información de contacto:**

Dr. José J. Lucas.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC/UAM.

C/ Nicolás Cabrera, 1. 28049 Madrid.

Tel 91 196 4552 / 91 196 4582. Fax 91 196 4420.

E-mail: jjlucas@cbm.uam.es

<http://www.cbm.uam.es/lineas/joselucas.htm>

<http://www.ciberned.es/grupojoselucas.aspx>