

Zöld fluoreszcens fehérje irányított mutagenézise és a mutáció hatásának vizsgálata

Directed Mutagenesis of Green Fluorescent Protein and Study of the Mutation Effect

Mutageneza direcționată a proteinei fluorescente verde și analiza efectul mutației

SZABÓ Mária¹, KOVÁCS Erika¹, SZILÁGYI László^{2,3},
MIKLÓSSY Ildikó¹, ÁBRAHÁM Beáta¹, LÁNYI Szabolcs¹

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Kémia és Anyagtudományok Kar, Bukarest, Splaiul Independenței, 313, tel. 40214029100, fax. 40213181005, palfimaria2004@yahoo.com, www.pub.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Természettudományok Kar, Csíkszereda, Szabadságtér 1, tel. +40266317121, fax. +40266372099, lanyiszabolcs@sapientia.sicilorum.ro, www.csik.sapientia.ro

³Eötvös Lóránd Tudomány Egyetem, Biokémia Tanszék, Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C, tel. +36 3812171 fax. +36 1 3812172, www.elte.hu

ABSTRACT

In this work we realized two fluorescent protein (EGFP- Enhanced Green Fluorescent Protein) mutants by site-directed mutagenesis. The mutants contain one or two histidine residues respectively in the proximity of the chromophore group. The two histidines (S202H, Q204H) were introduced by substitution of two amino acids. We investigated the effect of mutations on the structural stability of proteins, however, the effects of metal ions on the fluorescence of proteins.

ÖSSZEFOGLALÓ

Munkánk során helyspecifikus mutációval két zöld fluoreszcens fehérje (EGFP- Enhanced Green Fluorescent Protein) mutánst hoztunk létre. A mutánsok egy, illetve két hisztidint tartalmaznak a fehérje kromofor csoportjának közelében. A hisztidineket két aminosav (S202H, Q204H) kicserélésével juttattuk be a fehérjébe. Vizsgáltuk a mutáció hatását a fehérjék szerkezeti stabilitására, ugyanakkor a fémionok hatását a fehérjék fluoreszcenciájára.

Kulcsszavak: Zöld fluoreszcens fehérje, helyspecifikus mutáció, kromofor, hisztidin

1. BEVEZETÉS

Napjainkban az élő szervezet bonyolult működésében szerepet játszó összetett molekulákat széleskörűen alkalmaznak különböző ipari műveletek kivitelezéséhez, környezeti problémák megoldásához. A fehérjéket a biomérnökök átalakítják, újratervezik ezáltal új funkcionális tulajdonságokkal ruhazzák fel őket, ami lehetővé teszi, hogy az ipar számos területén igényeinket kielégítve elláthassanak különböző feladatokat. A fehérjéket gyakran alkalmazzák az élelmiszeriparban, gyógyászatban és a vegyiparban. Az enzimek különleges tulajdonságaik révén alkalmasak bonyolult reakciók katalizálására. Más fehérjék, mint például a receptorok képesek különböző vegyületek szelektív felismerésére, ami alkalmassá teszi őket bizonyos anyagok kimutatására.

A fehérjemérnökség a fehérjék átalakításának korszerű technikája, a fehérjéket kódoló gének irányított mutagenézise révén alakítja át a fehérjék szerkezetét. Az átalakítás célja lehet a fehérje működésének megértése vagy a fehérjék felruházása új funkcionális tulajdonságokkal, így azok a természetestől eltérő körülmények között, ipari és gyógyászati célra is felhasználhatóak.

A zöld fluoreszcens fehérje egy biolumineszcens fehérje, amelyet az 1960-as években izoláltak *Aequorea victoria* nevű medúzából [1]. 1992-ben közölték le a fehérjét kódoló gén szekvenciáját, valamint a *gfp* gén sikeres klónozását [2]. Ez egy jelentős előrelépés volt a fehérje rekombináns technológiával való előállításában.

A zöld fluoreszcens fehérje 238 aminosavból áll. Molekuláris szerkezetét 11 beta lemezből álló kompakt hordószerű struktúra képezi, amely körülzárja a kromofor csoportot [3]. Ez a kompakt szerkezet védelmet biztosít a kromofor csoportnak a környezeti hatásokkal szemben [4]. A fehérje kromofor csoportja egy posztranszlációs modifikáció során, spontán módon képződik, melynek során a fehérje polipeptid láncában három egymást követő aminosav (S65, Y66, G67) ciklizálódik, és kialakul egy konjugált imidazolinon gyűrű [5]. A fehérje csak a natív három dimenziós szerkezet kialakulása után fluoreszkál. Az EGFP a GFP egyik mutánsa, amely két mutációt (F64L, S65T) hordoz a kromofor régióban, ezáltal gyorsabban kerül érett állapotba és intenzívebben fluoreszkál [6].

A különböző expressziós rendszerekben termeltetett fehérje képes volt a natív állapot kialakítására és fluoreszcencia kibocsátására. A GFP génjét számos mutációnak vetették alá, ezáltal próbálták bizonyos tulajdonságait feljavítani [7]. Hamarosan széleskörűen alkalmazták fluoreszcens jelölő molekulaként. Felhasználták génexpresszió kimutatására, fúziós fehérjeként a sejtekben lejátszódó folyamatok nyomkövetésére, más fehérjék lokalizációjának monitorizálására [8, 9, 10].

Kutatásunk célja az EGFP irányított mutációjával két mutáns fehérje létrehozása, valamint a mutáció hatásának vizsgálata a fehérje tulajdonságaira. Ezáltal próbálunk információt szerezni a fehérje szerkezete és tulajdonságai közti összefüggésekről.

2. KÍSÉRLETI RÉSZ

2.1. Az EGFP irányított mutagenézise

Az EGFP-t kódoló gén a pET15b vektorba volt klónozva. A pET 15b-EGFP plazmidot L. Radnaitól (Biokémia Tanszék, Eötvös Loránd Tudomány Egyetem, Budapest) kaptuk. A hisztidinek bevitelét helyspecifikus mutációval valósítottuk meg. A mutációt a Quick Change Site Directed Mutagenesis Kit leírása alapján végeztük. A mutációhoz szükségünk volt az EGFP génjét hordozó plazmidra (pET15b-EGFP), valamint a mutációt hordozó primerekre. A primereket úgy terveztük meg, hogy komplementerek legyenek az EGFP-t kódoló szekvencia megfelelő szakaszával, ugyanakkor a megfelelő pozíciókban tartalmazzák a hisztidint kódoló kodonokat.

A mutáció során az EGFP-t kódoló szekvenciában a megfelelő pozíciókban lévő kodonokat kicseréltük hisztidint kódoló kodonokra. A mutációt a polimeráz láncreakció (PCR) segítségével hajtottuk végre. A reakció során a mutációt hordozó primerek bekötődnek az EGFP szekvencia megfelelő szakaszaihoz, és a *Taq* polimeráz enzim az eredeti plazmid mintájára kiépíti a mutáns plazmidot, beépítve a mutációt hordozó primereket is.

A folyamat következő lépése a PCR reakció termékének restrikciós emésztése, *Dpn* I restrikciós enzimmel, amely a metilezett DNS régiókat hasítja. Az emésztés segítségével eltávolítható a reakció elegyből a mutációt nem tartalmazó plazmid, amely metilezett. A mutáns plazmidot XL1-Blue szuperkompetens sejtekbe transzformáltuk, amelyek képesek a PCR reakció során képződött plazmid DNS-ben lévő hibák kijavítására. Utolsó lépésként a mutáns plazmidot izoláltuk XL1-Blue sejtekből, majd tisztítottuk annak érdekében, hogy az expressziós sejtvonal transzformálásához megfelelő plazmid preparátumot nyerjünk.

2.2. Mutáns fehérjék expressziója és tisztítása

Expressziós sejtvonalként az *E. coli* STAR sejtvonalat választottuk, mivel a szakirodalomban az EGFP-t hordozó pET 15b plazmidhoz ezt a sejtvonalat ajánlják. A mutáns fehérje előállítása érdekében a mutáns plazmidot hőszokk transzformáltuk kompetens sejtekbe. A transzformálás után a sejteket ampicilines (100 µg/ml) Luria Bertani agaros lemezekre szélesztettük. A sikeresen transzformált sejteket antibiotikum rezisztencia alapján szelektáltuk. A kinőtt telepekből egyet átoltottunk 3 ml Luria Bertani ampicilines (100 µg/ml) táplevesbe és növeltük 2 órát, 37 °C-on. Ezzel a sejtkultúrával, 1 ml/20 ml arányban, feldúsított ampicilines táplevest (2YT: 16% baktotripton, 10% élesztő kivonat, 5% só) oltottunk be, és tovább növeltük a sejteket, 16 órán át, 150 RPM rázatás mellett. Ezalatt a sejtek megtermelték a rekombináns plazmiddal bevitt gén terméket, vagyis a mi fehérjénket.

Mivel a mutáns fehérje a sejtek citoplazmájában expresszálódik, ezért szükséges a sejtek feltárása, a fehérje kinyeréséhez. Első lépésként a sejteket centrifugálással kiülepítettük, majd 50mM Na foszfát-pufferben (7 pH értékű) felszuszpendáltuk. Ezt követte a sejtek falának lizozim enzimmel való szétbontása. A lizálás

eredményeként kapott szuszpenziót két órán át $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottuk. Kiolvasztás után a szuszpenziót szonikáltuk, a DNS feldarabolása érdekében. Utolsó lépésként a kicsapódott DNS-t és a fehérjéket centrifugálással kiülepítettük, az így kapott felülúszó tartalmazta a mi fehérjénket.

Az expressziós vektor tartalmaz egy hat hisztidint kódoló oligonukleotidot, amely az EGFP-t kódoló szekvenciához van fuzionáltatva. Így az expresszált EGFP N-terminális végén lesz egy hat hisztidinből álló oligopeptid, amely képessé teszi a fehérjét, hogy szelektíven kötődjön a Ni-NTA- Sepharose-hoz. A kötődés után a gyártó cégek útmutatásait követve eluáljuk a proteint Na foszfát pufferrel, amiben az imidazol koncentrációja 250 mM .

2.3. Spektrális tulajdonságok vizsgálata

Vizsgáltuk a vad típusú valamint a mutáns EGFP fehérjék emissziós illetve abszorpciós spektrumait. Az abszorpciós spektrunok felvételéhez 1 ml fehérje oldatot mértünk ki és Varian Cary 50 UV-Vis típusú spektrofotométert használtunk. Az emissziós spektrumok felvételéhez a fehérje-oldatot 100X hígításban használtuk. A mérésekhez 3 ml kvartz küvettát használtunk, $2\text{--}2\text{ ml}$ fehérje oldatot mértünk be és a méréseket Fluoro Max Spex 320 típusú fluoro spektrofotométerrel végeztük. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A kapott spektrumokat normalizáltuk a fehérjék koncentrációjának megfelelően.

2.4 Mutáns fehérjék denaturációjának vizsgálata

A tisztított mutáns fehérjéket denaturáló körülményeknek tettük ki, vizsgálva a mutáns fehérje szerkezeti stabilitását. A denaturálást különböző koncentrációban guanidin hidrokloridot tartalmazó ($0,5\text{M}$ - 6M) Na foszfát (20mM , $\text{pH } 7$) pufferben vizsgáltuk, szobahőmérsékleten. A denaturációt a fluoreszcencia intenzitás változásának mérésével követtük.

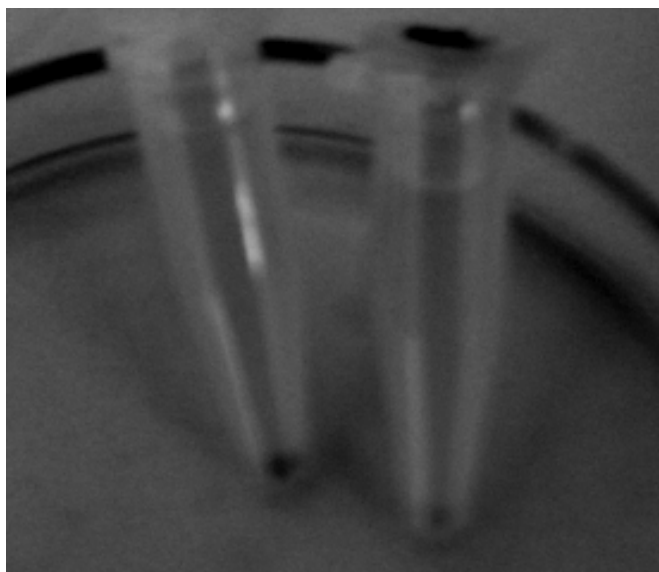
2.5 Fémionok hatásának vizsgálata

Vizsgáljuk a különböző fémionok (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) hatását a mutáns illetve vad típusú fehérjék fluoreszcenciájára. A minták tartalmazták a mutáns fehérjét mikromólos koncentrációkban ($5\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$), valamint a különböző fémionokat $50\text{--}200\text{ }\mu\text{M}$ koncentrációkban 20 mM Na foszfát pufferben ($\text{pH } 7$). A méréseket Fluoro Star Optima típusú fluoriméterrel végeztük.

3. ERDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

3.1. Mutáns fehérjék expressziója

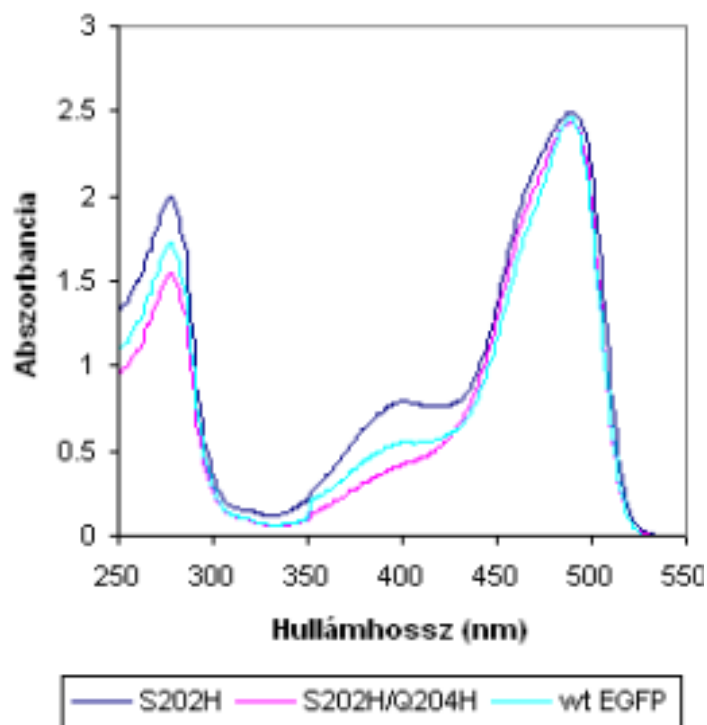
A zöld fluoreszcens fehérje termelődése expresszió után már rögtön ellenőrizhető. Ugyanis az általunk megtermeltetett fehérje a natív konformáció kialakítása után rövi idő elteltével érett állapotba kerül, és ezáltal már természetes fényel gerjesztve is szemmel láthatóan fluoreszkál. Ennek köszönhetően már a termelő sejtszuszenzió sárgás-zöldes árnyalatú lesz.



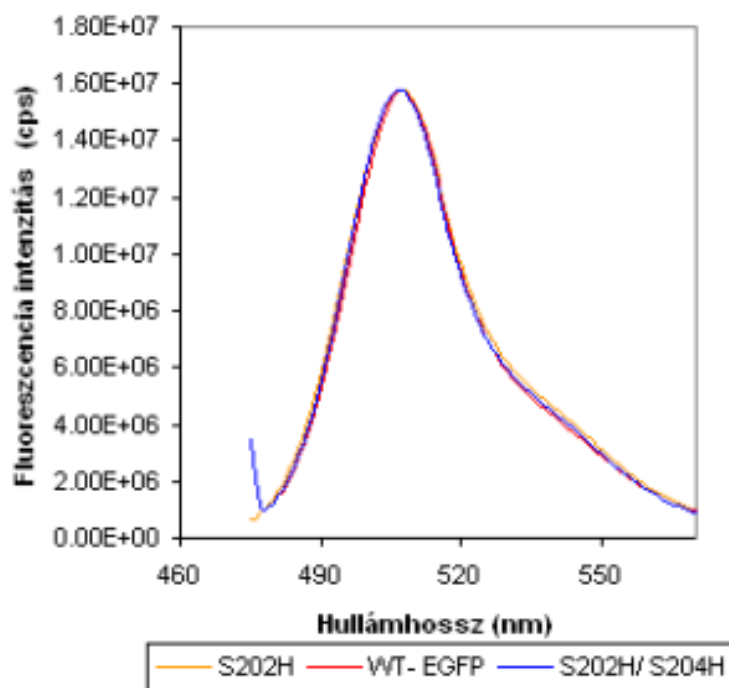
1. ábra
Mutáns fehérjék expressziója

3.2. Spektrális tulajdonságok vizsgálata

Felvettük a vad típusú illetve mutáns EGFP fehérjék abszorpciós és emissziós spektrumait. Az EGFP abszorpciós maximuma 485 nm-nél, míg emissziós maximuma 509 nm-nél található. A 7 pH-jú közegben a fehérjék abszorpciós illetve emissziós spektrumai közel azonosak, vagyis az elvégzett mutációknak nem volt hatása a spektrumokra.



2. ábra
Abszorpciós spektrumok



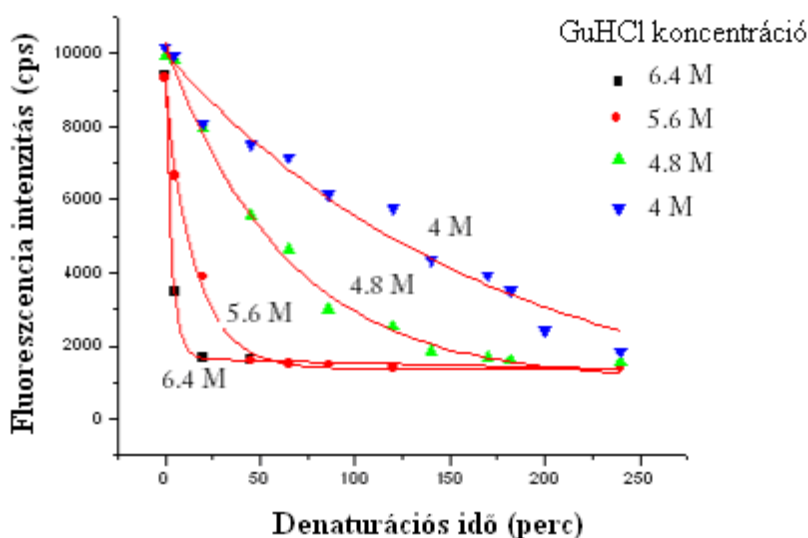
3. ábra
Emissziós spektrumok (Ex. 475 nm)

3.3. Mutáns fehérjék denaturációjának vizsgálata

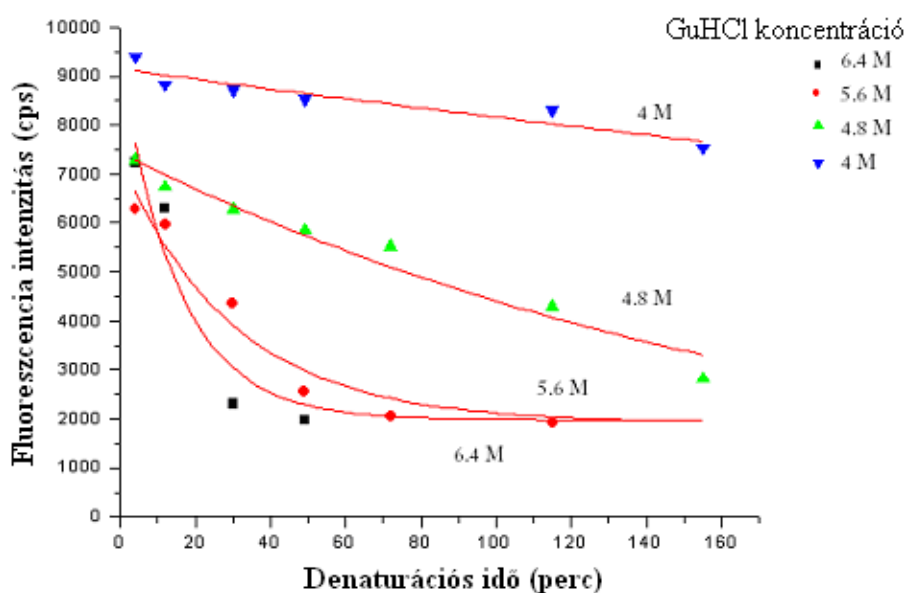
A GFP akkor fluoreszkál intenzíven, ha a kromofor csoport a fehérje belsejében található. Mivel a fehérje fluoreszcenciája szerkezetfüggő, ezért a fluoreszcencia csökkenés mérésével információt szerezhetünk a szerkezet széttekeredéséről, natív állapot elvesztéséről. Munkánk során fluoreszcencia spektroszkópia segítségével tanulmányoztuk a vad típusú ill. mutáns fehérjék denaturációját guanidine hidroklorid jelenlétében. A guanidin hidroklorid egy kaotropikus ágens, amely megszünteti a vízmolekulák rendezettségét a hidrofób részek körül, ezáltal előidézi a fehérje denaturációját.

Tanulmányoztuk a fehérjék denaturációjának időbeni lezajlását, mérve a fluoreszcencia intenzitás változását. Megfigyeltük, hogy a fehérjék fluoreszcencia intenzitása csökkent a denaturáció során. A denaturációs folyamat előrehaladásával a fehérje szerkezete destabilizálódik, a hordót alkotó beta lemezek eltávolodnak egymástól, ezáltal lecsökken a kromofor csoport védettsége. A fehérje kromofor csoportja hozzáférhetővé válik a kisebb molekulák számára. Az oldatban lévő vízmolekulák bejutnak a fehérje belsejébe, és protonálják a kromofor csoportot. A protonált kromofor nem fluoreszkál.

A fehérjék fluoreszcencia intenzitásának csökkenését a denaturáció során az alábbi ábrák szemléltetik.



4. ábra
S202H-EGFP mutáns denaturációja



5. ábra.
S202H/Q204H-EGFP mutáns denaturációja

A denaturációs folyamat a következő függvénnyel írható le: $I = I_0 \cdot (\exp(-kt))$, ahol I_0 a denaturáció előtti fluoreszcencia intenzitás, k - a denaturáció sebességi állandója és t - a guanidine hidroklorid hozzáadása után eltelt idő. A fenti egyenletből meghatároztuk a denaturációs folyamat sebességi állandóit, amelyeket az 1. táblázatban foglalunk össze.

Az eredmények alapján elmondható, hogy azonos körülmények mellett az S202H-EGFP mutáns denaturációja gyorsabb, mint az S202H/Q204H-EGFP mutánsé, amit a nagyobb denaturációs sebességi állandó igazol. Tehát a két hisztidint (S202H/Q204H) hordozó mutáns kevésbé érzékeny a denaturálószer jelenlétére, mint az egy hisztidint (S202H) hordozó mutáns.

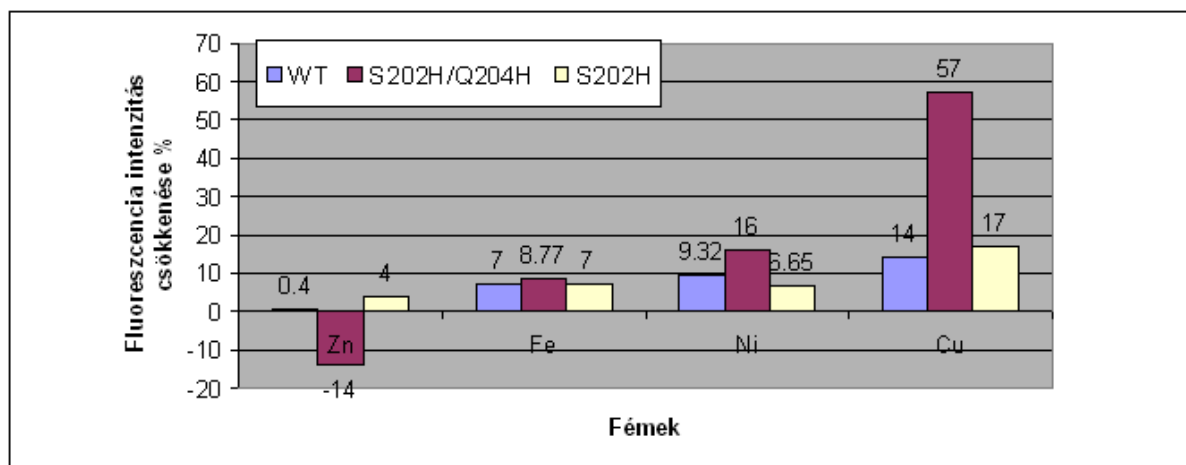
Denaturációs sebességi állandók

1. Táblázat

GuHCl koncentráció	S202H-EGFP mutáns fehérje	S202H/Q204H-EGFP mutáns fehérje
	<i>Denaturációs sebességi állandó, k (perc⁻¹)</i>	<i>Denaturációs sebességi állandó, k (perc⁻¹)</i>
6.4 M	0.244	0.0642
5.6 M	0.0553	0.0154
4.8 M	0.01736	0.005230
4 M	0.0021	0.001136

3.4. Fémionok hatásának vizsgálata

Vizsgáltuk a különböző fémionok hatását a vad típusú valamint a mutáns fehérjék fluoreszcenciájára. A szakirodalomból tudjuk, hogy bizonyos fémionok, ha elég közel kerülnek a fehérje kromofor csoportjához, akkor kioltják a fehérje fluoreszcenciáját [11]. Fluoreszcencia kioltásról beszélünk, amikor a fluorofór által kibocsátott fény intenzitása csökken olyan molekulák vagy ionok jelenlétében, melyek elektronszerkezete megfelelő ahhoz, hogy a fluorofórral kölcsönhatásba léphessenek [12]. A 6. ábra a cink, vas, nikkel valamint a réz ionok fluoreszcencia kioltó hatását szemlélteti.



6. ábra

A vad típusú (WT) illetve mutáns fehérjék érzékenysége a rézionokra

Amint azt a 6. ábrán is látható, a rézionok jelenlétében csökkent leginkább a fehérjék fluoreszcenciája. A vad típusú EGFP illetve az S202H/EGFP kevésbé érzékeny a fémek jelenlétére, mint az S202H/Q204H/EGFP mutáns. Az S202H/EGFP mutáns érzékenysége közel azonos a vad típusú EGFP érzé-

kenységével. Látható, hogy a cinkionok jelenlétében az S202H/Q204H/EGFP mutáns fluoreszcenciája 14%-al megnövekedett. Ez az eredmény kissé meglepő, de a szakirodalomban találtunk hasonló eredményeket [13]. Az S202H/Q204H/EGFP mutáns fokozott érzékenysége a fémionok iránt azzal magyarázható, hogy a fémionok, miután hozzákötődnek a mutáció során bevitt hisztidinekhez, ezáltal elég közel kerülnek a kromofor csoporthoz, és interakcióba lépnek vele. Kialakul egy komplex az adott fémion és a gerjesztett állapotban lévő kromofor között, majd a gerjesztett kromofor átadja az energiáját a fémionnak.

KÖVETKEZTETÉSEK

A kapott eredményeink azt igazolják, hogy a fehérje szerkezete és tulajdonságai szoros összefüggésben állnak. Ez a kapcsolat még szembetűnőbb a kromofor közelében lévő aminosavak kicserélése esetén. Az általunk elvégzett mutáció a kromofor közelében lévő aminosavakat érintette (távolság $<10\text{\AA}$), amelyeknek szerepe lehet a fehérje spektrális tulajdonságainak kifejeződésében. A standard körülmények (298K, pH 7) között felvett fehérje-spektrumok nem különböznek jelentősen, ami azt sugallja, hogy a mutációnak nem volt jelentős hatása a fehérje spektrális tulajdonságaira.

A fémek fluoreszcencia csökkentő hatása leginkább az S202H/Q204H/EGFP mutánsnál érvényesült. Tehát a mutáció (S202H/Q204H) hatására megnövekedett az EGFP érzékenysége a fémionok iránt. Azt feltételezzük, hogy az általunk bevitt két hisztidin potenciális fémkötő helyként viselkedik, ezáltal elősegíti a fémionok kromofor közelébe való jutását.

FELHASZNÁLT IRODALOM

- [1] R. Y. Tsien, The green fluorescent protein, Annual review of biochemistry, 1998, 67, 509-544
- [2] D. Prasher, V. Eckenrode, W. Ward, F. Prendergast, M. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, Gene, 1992, 111/2, 229-233
- [3] F. Yang, L.G. Moss, G.N. Phillips, The molecular structure of green fluorescent protein, Nature biotechnology, 1996, 14,1246-1251
- [4] S. G. Olenych, N. S. Claxton, G. K. Ottenberg, M. W. Davidson, The fluorescent protein color palette, The Florida State University, Tallahassee, Florida, 1-34
- [5] M.Ormo, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, Science, 1996, 273, 1392-1395
- [6] B.P.Cormack, R. Valdivia, S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), Gene, 1996, 173, 33-38
- [7] A. Cubitt, R. Heim, S. Adams, A. Boyd, L. Gross, R. Y. Tsien, Understanding, improving and using green fluorescent proteins, Trends in biochemical sciences, 1995, 20, 448-455
- [8] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, Science, 1994, 263 /5148, 802-805
- [9] M. Chalfie, S. R. Kain, Green fluorescent protein. Properties, applications, and protocols, Second edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2006
- [10] D. Chudakov, S. Lukyanov, K. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, Trends Biotechnology, 2005, 23/12, 605-613
- [11] T. A. Richmond, T. T. Takahashi, Riti Shimkhada, Jennifer Bernsdorf, Engineered metal binding sites on green fluorescence protein, Biochemical and biophysical research communications, 2000, 268, 462-465
- [12] J. R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, Third Edition, USA, 2006, 9-15
- [13] D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, Structural chemistry of a green fluorescent protein Zn biosensor, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124 /14, 3522-3524