

## ¿QUÉ SE HIZO?

### SUSTITUCIONES ALEATORIAS EN LOS RESIDUOS POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA PARA MEJORAR LA mRFP1 Y PRODUCIR PROTEÍNAS FLUORESCENTES DE OTROS COLORES.

**mRFP1** Es un monómero de una proteína conocida como “DsRed” proveniente de *Discosoma* sp. Las demás proteínas fluorescentes rojas o amarillas son tetrámeros y son tóxicas o disruptivas, es por esto la importancia de esta proteína monomérica.

*Fue necesario realizar ciertas modificaciones a mRFP1 para así poder mejorarla en cuanto a maduración, fluorescencia y para que fueran más “indiferentes” a la fusión en el extremo amino o carboxilo terminal. En total se realizaron 33 rondas de mutación.*

**mRFP1:** Superó la tetramerización (es un monómero), la lenta maduración y las longitudes de onda de excitación y emisión de la proteína original. Sin embargo, disminuyó la calidad en cuanto a coeficiente de extinción, rendimiento cuántico de fluorescencia y fotoestabilidad.

*Se llevan a cabo las rondas de mutación dirigida utilizando selección manual basada en clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).*

**mRFP1.1:** Se seleccionó de una biblioteca de proteínas con mutaciones en los residuos cercanos al cromóforo (encargado de la fluorescencia). mRFP1.1 Es el “clon superior (o sea, la más perrona en este grupo)” y tiene a sustitución de los residuos 66,67 y 68. La mutación Q66M es la responsable de aumentar la maduración de la proteína y del desplazamiento de 5nm en cuanto a las longitudes de onda de emisión y excitación con respecto a mRFP1.

**mRFP1.3:** ¿Dónde quedó la mRFP1.2? QUIEN SABE. En este caso, siguieron con la reducción de la sensibilidad de las fusiones en los extremos N y C terminal. Tomaron como ejemplo a la proteína verde fluorescente (GFP, que es insensible a las fusiones en N- terminal), entonces, sustituyeron los primeros 7 residuos amino terminal de la proteína mRFP1.1 con los primeros 7 residuos amino terminal de la GFP, después agregaron una secuencia espaciadora NNMA y por último agregaron los 7 residuos C-terminal de GFP a mRFP1.1. Con todo esto se obtuvo a mRFP1.3.

**mRFP1.4:** Se encontró que las mutaciones V7I y M182K son beneficiosas para el plegado de la proteína y por eso se incorporaron en el clon mRFP1.4. Después se descubrió (por azar) a la sustitución M163Q que resulta en la desaparición casi completa del pico de absorbancia en aprox 510nm que estaba presente en las clonas anteriores.

**mCherry**: se hicieron dos rondas más de evolución dirigida para producir esta variante optimizada, la cual incluye también a las mutaciones N6aD, R17H, K194N, T195V y D196N.

Ahora, había que comparar si esta variante mejorada funcionaba mejor que las clonas anteriores, es por eso que se hizo la comparación de mRFP1 vs mCherry en proteínas de fusión expresadas en células de mamíferos (se utilizó la línea celular HeLa y las proteínas de fusión tubulina-mRFP1 y tubulina-mCherry).

**----Tubulina-mRFP1**: Fluorescencia citoplasmática difusa, no se dio la incorporación adecuada a los microtúbulos (que es a donde se supone que debería de ir).

**---Tubulina-mCherry**: se dio una incorporación exitosa a los microtúbulos en la mayoría de las células.

Además, se hizo lo mismo para otras dos líneas celulares (riñón canino Madin-Darby fibroblastos humanos primarios) y con la fusión a actina (mCherry y mRFP1 tuvieron resultados similares).

**dTomato**: después de cinco rondas de evolución dirigida, se encontró una “combinación óptima” de mutaciones V22M, Q66M, V105L y F124M que dieron como resultado una maduración mejorada. Tiene terminaciones de tipo GFP similares a las de mCherry. Para construir una etiqueta no agregada de la proteína brillante dTomato, se fusionaron dos copias del gen para crear un dímero en tándem (td).

## Proteínas de otros colores, YAY!

Como muchas de las proteínas de otros colores son obligatoriamente tetraméricas y el proceso de monomerización es tedioso y complicado, algo mucho más fácil y rápido (ajá) sería modificar la longitud de onda de excitación y emisión de la mRFP1 para producir proteínas de colores diferentes.

**mHoneydew**: sustitución de Y67W

**mBanana**: sustitución Q66C y I197E.

Mutaciones en la posición 66 de mRFP1.1 como Q66S, Q66T, Q66C originan proteínas desplazadas al azul con respecto a mRFP1.

**mTangerine**: tiene sustituciones Q66C, Q213L.

**mOrange**: después de seis rondas de evolución dirigida se produjo esta variante con mayor brillo, coeficiente de extinción similar a mCherry, pero con una sensibilidad al pH ácido (pKa de 7.1).

*Por sus propiedades de coeficiente de extinción y rendimiento cuántico, se seleccionó a esta proteína para analizarla como aceptor de transferencia de energía de FRET (resonancia de fluorescencia)*

**mStrawberry**: se generó después de cinco rondas de evolución dirigida a partir de mRFP1.4, esta es una variante “rojo anaranjado” más estable con el coeficiente de extinción más alto y rendimiento cuántico de la fluorescencia similar al de mCherry y mOrange.

## **MENSAJE A CASA:**

Una aplicación obvia de la proliferación de colores de proteínas fluorescentes es discriminar muchos tipos de células, actividades transcripcionales o proteínas de fusión y citometría de flujo.

Son múltiples las aplicaciones de las FP en la ciencia. Dentro de las más comunes está su utilización como marcador fusionado a polipéptidos o como indicador de estados químicos-fisiológicos intracelulares, en todo tipo de células, subcompartimentos celulares y organismos, desde procariotas hasta mamíferos. La FP también es útil a diversas disciplinas de la biología y la medicina. Si la FP es usada como marcador fusionada a otra proteína, Tsien la clasifica como una aplicación pasiva que sólo refleja los niveles de expresión de la proteína diana o la ubicación subcelular de dicha proteína. Se debe recordar que la FP, al no ser una enzima, resulta un excelente indicador porque no interfiere con el mecanismo fisiológico de la célula (Tsien, 1998; Fernández et al., 2006).

Aplicaciones más avanzadas son posibles si se unen las propiedades de las FP a otras técnicas, como las de microscopia de fluorescencia para los estudios en células vivas. Estas técnicas confieren acertadas ventajas sobre los estudios en tejidos fijados, en los que no se aprecia la dinámica del sistema que se desea estudiar.

GRACIAS WIKIPEDIA, FIN.