

Ook rood is van de partij

Het is een bijzondere uitvinding van Nederlandse bodem: het superheldere rood fluorescerende eiwit mScarlet. Wordt dit eiwit de nieuwe standaard in de celbiologie?

‘D e afgelopen zestien jaar deden gerenommeerde labs, waaronder de groep van de onlangs overleden Nobelprijswinnaar Roger Tsien, veel vruchteloze pogingen om een helder rood fluorescerend eiwit te verkrijgen. ‘Het is best bijzonder dat het nu wel gelukt is met een Nederlands team’, zegt een trotse Dorus Gadella, hoogleraar moleculaire cytologie aan de UvA.

Gadella mag zonder meer trots zijn: het rood fluorescerende eiwit (RFP) mScarlet dat zijn lab ontwikkelde, is maar liefst 350 % helderder dan mCherry, het wereldwijd meest gebruikte RFP dat Tsien creëerde. Het is geen wonder dat het nieuwe RFP gewild is bij veel onderzoekslaboratoria in de wereld, waaronder dat van hoogleraar Kees Jalink van het NKI: ‘Als tag moet een RFP helder en stabiel zijn, en zonder dimerisatie tot expressie komen. Het RFP mScarlet is superieur in alle opzichten.’

Bijzondere ontwikkeling

In de celbiologie dienen fluorescerende eiwitten als lichtbakens om de locatie, beweging en interactie van en tussen eiwitten in kaart te brengen. In de jaren negentig is het groene fluorescerende eiwit (GFP) ontdekt in fluorescerende kwallen. Door daaraan te sleutelen, volgden later ook blauwe, turquoise en gele versies. De rode variant is aan het begin van de 21ste eeuw ontdekt in koraal, maar tot nu toe bleef de helderheid van het RFP een flink stuk achter op dat van GFP.

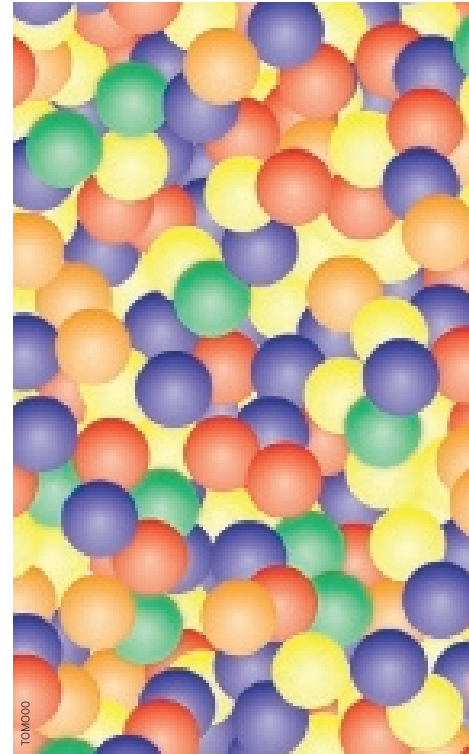
En dus gingen Gadella en zijn promovendi

Daphne Bindels en Lindsay Haarbosch in 2012 aan de slag om een helder RFP te maken. Dat deden zij in tegenstelling tot andere onderzoeksgroepen niet door het RFP uit koraal te halen, maar met als startpunt een synthetisch stuk DNA. ‘Wij hebben veel in de natuur voorkomende fluorescerende eiwitten met elkaar vergeleken en gecombineerd met de kennis die we al hadden’, vertelt Gadella. ‘Daaruit volgde een template met alle essentiële aminozuren.’

In de natuur zijn RFP's tetrameren, maar dat is niet handig voor celbiologisch onderzoek. ‘Zo'n tetrameer bindt aan vier eiwitten in plaats van een, waardoor er aggregatie kan ontstaan in de cel. Dat is niet wat je wilt. Een fluorescerend eiwit moet dus strikt een monomeer zijn’, legt Gadella uit. ‘Dat is precies wat tot nu toe het probleem was bij het optimaliseren van RFP's, want een tetrameer opbreken gaat ten koste van de helderheid. Dat vermeden wij door de template al vanaf het begin een monomeer te laten zijn.’

De tweede stap was de template verbeteren. Dat deden Gadella en zijn collega's niet met willekeurige mutagenese, zoals de meeste labs doen, maar door selectief veranderingen aan te brengen. ‘We verander-

‘Het nieuwe RFP is superieur in alle opzichten’



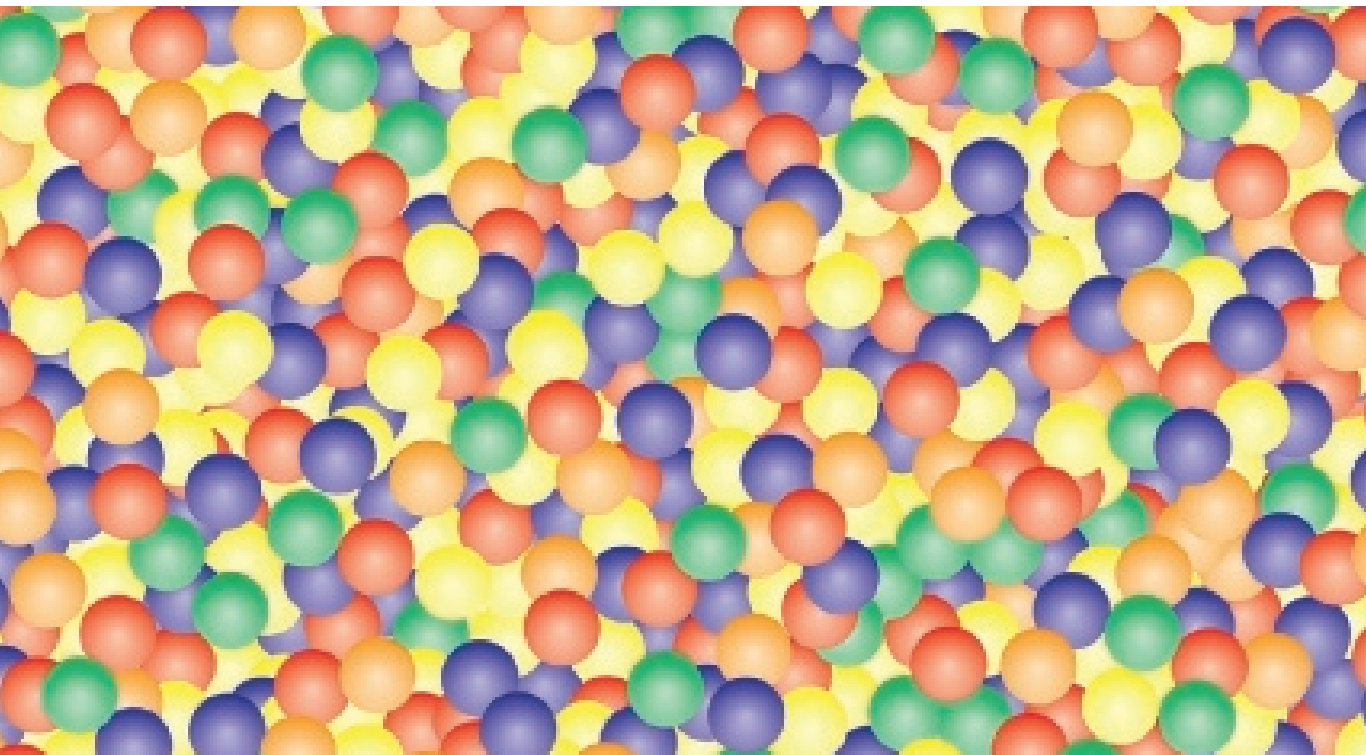
den steeds specifiek een set van vijf aminozuren die rondom de chromofloor, het fluorescerende gedeelte van het eiwit, lagen. Dan heb je niet het probleem zoals bij willekeurige mutagenese dat een toevallige goede mutatie vrijwel altijd gepaard gaat met een ongewenste slechte mutatie elders in het eiwit’, zegt Gadella.

Selecteren

Vervolgens screenen de onderzoekers de gemaakte RFP's in bacteriën, en later in dierlijke cellen. Ze selecteerden niet op helderheid, maar op fluorescentielevensduur, de tijd dat het molecuul blijft aangeslagen. ‘Veel onderzoekers selecteren de helderste bacteriekolonie, maar de helderheid hangt van veel factoren af’, stelt Gadella.

‘Bijvoorbeeld: hoe meer kopieën een bacterie aanmaakt, hoe helderder zij is, maar dat zegt niets over hoe helder een kopie is. Daarom nemen we de fluorescentielevensduur als referentie; die is recht evenredig met de helderheid van een fluorescent eiwit.’

Nadat de meest veelbelovende RFP's de eerste screeningsrondes overleefden, volgde alsnog willekeurige mutagenese. Gadella: ‘Dat is nodig, want het is niet te beredeneren waar je moet ingrijpen voor snelle en complete eiwitvouwing. En dus



laten we de evolutie haar gang gaan.’ Het eindproduct was mScarlet, het eerste synthetische RFP, dat ook nog eens zijn concurrenten met een ruime factor drie overschrijdt in helderheid. Hoe dat kan, blijkt uit de molecuulstructuur van mScarlet, die de onderzoeksgroep van Antoine Royant, universiteit van Grenoble, analyseerde met behulp van de Europese deeltjesversneller ESRF. Gadella: ‘De chromofoor van mScarlet ligt helemaal vlak en wordt perfect in bedwang gehouden door de aminozuren rondom deze chromofoor. Hoe vlakker de chromofoor, hoe helderder het fluorescerende eiwit. Daar waren al aanwijzingen voor, maar deze structuur levert daar extra bewijs voor.’

De ontwikkeling van mScarlet heeft nogal wat opzien gebaard in de celbiologie, aldus Gadella. Hij heeft het plasmide van mScarlet opgestuurd naar DNA-bank AddGene. Daarna is binnen een maand het RFP naar minstens 180 laboratoria over de hele wereld gezonden. ‘Ook hebben we veel mooie verhalen gehoord. Zoals van een onderzoeksgroep die in gistcellen, waarin wij niet hebben getest, een fluorescentie hebben gemeten van wel zesmaal dat van mCherry!’

Ook in Nederland zijn er inmiddels diverse gebruikers van mScarlet. ‘Wij gebruiken

mScarlet als tag in onder andere zenuwtumorcellen’, vertelt Jalink. ‘Dit doen wij bijvoorbeeld met FRET-experimenten, waarbij energie wordt overgedragen tussen fluorescerende eiwitten. Deze eiwitten zijn dan gebonden aan bepaalde signaaltransductie-eiwitten. Het is van groot belang dat het fluorescerende eiwit in FRET, dat energie ontvangt, geen groene immature vorm heeft. Soms komt dat wel voor, zoals bij twee andere RFP’s die we hebben geprobeerd. Die matureren pas later tot de rode vorm en worden eerst groen ‘geboren’. Het nadeel is dat het immature RFP dan onterecht als groen te zien is. Dat is desastreuus voor FRET-proeven. Dat probleem heb je niet met mScarlet, die al vanaf het begin rood is.’

Ook biosensoren

Behalve om eiwitten te volgen via FRET lijkt mScarlet ook uitermate geschikt voor biosensoren. De groep van hoogleraar Maarten Merkx van de TU/e werkt daarom aan de ontwikkeling van BRET (*bioluminescence resonance energy transfer*)-sensoren. ‘Onze recentste BRET-sensor, genaamd LU-MABS, kan met behulp van de camera van een mobiele telefoon in een druppel bloed bepaalde antilichamen meten. Op dit moment gebruiken we hiervoor een GFP, maar we hebben mScarlet besteld om te testen of

‘Selecteren op fluorescentielevensduur is het credo’

we dit eiwit ook kunnen inzetten als acceptor in deze sensor. Het voordeel van rood licht is dat dit minder wordt geabsorbeerd in bloed. Bovendien is het beter te onderscheiden van blauw licht, dat wordt geproduceerd door het donorluciferase in deze sensoren.’

Op dit moment is ook Gadella’s groep bezig om mScarlet in te bouwen in biosensoren. ‘We gebruiken ze om de signaaltransductie van celmigratie te bestuderen. Daarnaast zijn we begonnen met een oranje fluorescent eiwit te maken, en ook een chromo-eiwit. Dat laatste is een eiwit dat wel absorbeert, maar niet fluoresceert. We gebruiken daarvoor mScarlets-ruggegraat. Daardoor hoeven we niet *from scratch* te beginnen’, vertelt Gadella. Dat scheelt ook veel werk voor toekomstig onderzoek. Het is duidelijk: mScarlet heeft de toon gezet in de wereld van de fluorescerende eiwitten. ●