

Bài báo nghiên cứu

SỬ DỤNG PHÂN TỬ CUCURBIT[8]JURIL
TRONG VIỆC CẢM ỨNG SỰ DIMER CỦA PROTEIN CFP/YFP

Đặng Thanh Dũng

Trường Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Tác giả liên hệ: Đặng Thanh Dũng – Email: dung.dthanh@ou.edu.vn

Ngày nhận bài: 30-4-2022; ngày nhận bài sửa: 17-05-2022; ngày duyệt đăng: 20-7-2022

TÓM TẮT

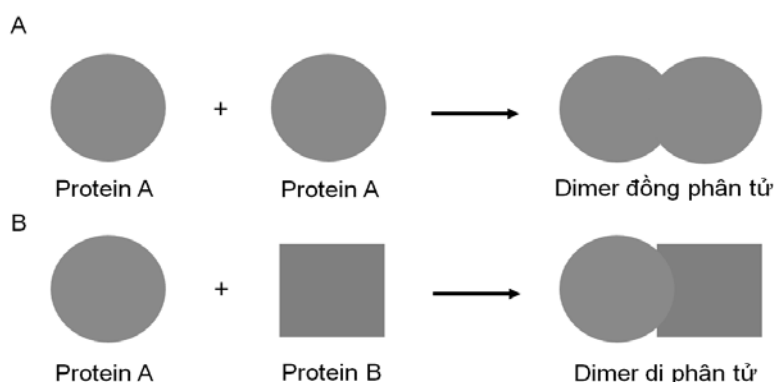
Sự dimer protein đóng vai trò quan trọng trong hầu hết các hoạt động sinh học tế bào như: hoạt động enzyme, thụ thể protein màng, nhân tố truyền tín hiệu nhân tố phiên mã. Do đó, kiểm soát sự dimer của protein giúp kiểm soát được các quá trình sinh học này. Trong nghiên cứu này, phân tử Cucurbit[8]uril được sử dụng để kiểm soát sự dimer của protein có chứa đuôi phe-ala-gly (phenylalanine-alanine-glycine) ở đầu N (N-terminus) của protein. Cặp protein chỉ thị CFP/YFP (cyan fluorescent protein/yellow fluorescent protein) chứa đuôi dung hợp phe-ala-gly được tạo ra bằng hệ thống intein tự cắt (auto cleavage). Phân tử Cucurbit[8]uril cảm ứng sự dimer của protein CFP/YFP có chứa đuôi phe-ala-gly được đánh giá bằng kỹ thuật trao đổi năng lượng FRET (fluorescence resonance energy transfer). Tỷ lệ FRET của bước sóng 525 nm/475 nm tăng mạnh từ 0.5 lên 1.2 khi có sự hiện diện của phân tử cucurbit[8]uril, đồng nghĩa với việc phân tử này có khả năng cảm ứng sự dimer của protein CFP và YFP có chứa đuôi phe-ala-gly. Kiểm soát sự dimer của protein bởi cucurbit[8]uril có tiềm năng trong việc kiểm soát các protein chức năng sinh học chứa đuôi dung hợp phe-ala-gly.

Từ khóa: CFP; Cucurbit[8]uril; dimer; protein; YFP

1. Giới thiệu

Sự tương tác giữa các protein là một quá trình sinh học quan trọng trong tế bào, trong đó các protein sáp nhập với nhau tạo thành dimer đồng phân tử (Hình 1A) hoặc dị phân tử (Hình 1B), để tạo thành một tổ hợp protein chức năng. Trên thực tế, protein hiếm khi thể hiện chức năng và hoạt động ở dạng đơn phân trong môi trường sinh học. Sự tự sáp nhập của các protein để tạo thành các dimer hoặc oligomeric (nhiều phân tử) là một hiện tượng lí sinh phổ biến, xảy ra trong mọi tế bào như màng tế bào, trong tế bào chất, trong nhân. Tất cả các quá trình sinh học trong tế bào như hoạt hóa enzym (Baselga & Swain, 2009; Citri & Yarden, 2006), truyền tín hiệu (Ahsan, 2016; Ferrer-Soler et al., 2007), và ngay cả quá trình gây bệnh (Hynes & Lane, 2005) đều được điều hòa thông qua quá trình dimer hóa protein.

Cite this article as: Dang Thanh Dung (2022). Using Cucurbit[8]uril to create dimerization of protein CFP/YFP. *Ho Chi Minh City University of Education Journal of Science*, 19(11), 1799-1807.

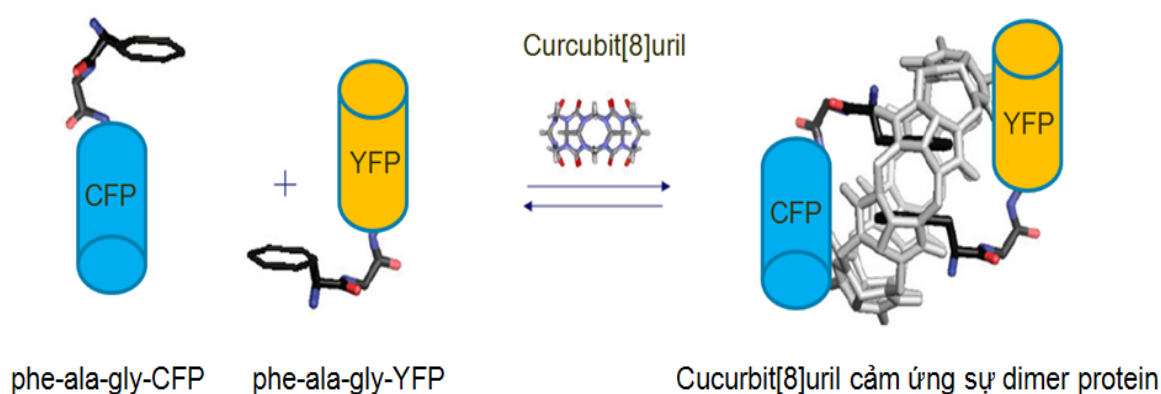


Hình 1. Mô hình cho quá trình dimer hóa đồng phân tử hay dị phân tử

Quá trình điều hòa dimer protein là một quá trình cần thiết trong tế bào để phát triển cấu trúc vật chất của sinh vật dưới tác động của các yếu tố nội tại hoặc ngoại sinh trong môi trường tự nhiên (Marianayagam, Sunde, & Matthews, 2004). Do đó, kiểm soát cơ chế phân tử của quá trình dimer hóa và chức năng của protein là bước tiến mới của nghiên cứu và các ứng dụng y sinh. Hiện nay, các kĩ thuật được sử dụng để kiểm soát quá trình dimer hóa protein (Bayle et al., 2006; Dang, 2022a; Kharenko & Ogawa, 2004; Nguyen, Dang, van Dongen, & Brunsveld, 2010), do đó, tạo điều kiện thuận lợi cho việc tăng độ ổn định và chức năng của protein (Ardejani, Li, & Orner, 2011; Grueninger et al., 2008). Ví dụ, protein có thể được thiết kế để có dimer hóa thông qua việc giới thiệu trình tự dây kéo cuộn cuộn (Junius, O'Donoghue, Nilges, Weiss, & King, 1996; Mason & Arndt, 2004). Dây kéo dạng cuộn có chức năng thông qua tương tác kỵ nước giữa các amino acid leucine tạo thành trạng thái đồng nhất hoặc dị phân. Một ví dụ về mặt này là sự hình thành dimer giữa c-Jun và c-Fos, để tạo thành các yếu tố phiên mã DNA chức năng (Gazon, Barbeau, Mesnard & Peloponese, 2017). Ngoài ra, kĩ thuật đột biến bề mặt để tạo môi trường kỵ nước của các vùng peptide trong protein có khả năng giúp protein dimer hóa thông qua các tương tác kỵ nước.

Mặc dù, những thành công lớn đã đạt được, nhưng các phương pháp tiếp cận hiện tại đối với sự dimer hóa protein được thiết kế có những hạn chế của chúng, đặc biệt là về mặt kiểm soát hai chiều của các protein này. Ngoài ra, các đột biến được thực hiện trong vùng hoạt động của protein mục tiêu có thể thay đổi cấu trúc và chức năng sinh học của chúng. Do đó, việc tạo ra phương pháp mới có khả năng kiểm soát hai chiều (tạo sự dimer hóa hoặc ngược lại) của protein là cần thiết. Trước đây, sử dụng Cucurbit[8]uril để cảm ứng sự dimer hóa protein chứa đuôi phe-gly-gly (phenylalanine-glycine-glycine) đã được báo cáo (Dang, 2022b). Điều thú vị, phân tử Cucurbit[8]uril có thể kiểm soát sự dimer và chức năng của enzyme caspase (enzyme đóng vai trò quan trọng trong việc gây chết tế bào) (Dang, Nguyen, Merks, & Brunsveld, 2013; Dang, van Onzen, Dorland, & Brunsveld, 2018). Cucurbit[8]uril là một supramolecule hóa học được tổng hợp dạng vòng gồm có tám đơn vị glycoluril có cầu nối metylen. Cucurbit [8] uril đã cho thấy tính hấp dẫn trong ứng dụng sinh hóa do khả năng hòa tan trong nước tốt, độc tính thấp và khả năng liên kết mạnh với các phân tử điện

tích dương. Đặc biệt, Cucurbit[8]uril có khả năng liên kết cùng lúc với hai peptide phe-gly-gly thông qua tương tác điện tích với các vòng aromatic của phenylalanine (Dang, 2012; Dang, 2022b; Dang, Bosmans, Moitzi, Voets, & Brunsveld, 2014; Dang et al., 2013; Dang, Nguyen, Truong, Nguyen, & Phan, 2021; Dang & Phan, 2019; Dang et al., 2018). Điều này cho phép Cucurbit[8]uril có khả năng cảm ứng sự dimer hóa của protein chứa đuôi dung hợp phe-gly-gly. Trong nghiên cứu này, phân tử Cucurbit[8]uril được sử dụng để cảm ứng sự dimer của protein chứa đuôi phe-ala-gly (Hình 2) nhằm nghiên cứu sự đa dạng hóa việc cảm ứng dimer của các protein có chứa các đuôi khác nhau. Việc kiểm soát sự dimer của protein có tiềm năng lớn trong việc điều hòa hoạt tính các protein chức năng trong tế bào ở trạng thái dimer.



Hình 2. Mô hình cảm ứng sự dimer của protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP bởi phân tử cucurbit[8]uril

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Tạo những plasmids mã hóa protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP bằng phương pháp đột biến điểm

Những plasmid mã hóa cho các protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP được tạo ra bằng phương pháp PCR đột biến điểm (site-directed mutagenesis) từ các khung gốc phe-gly-gly-CFP (Nguyen et al., 2010) và phe-gly-gly-YFP (Nguyen et al., 2010) với cặp mồi ON1: 5'-gtg gct cgc gcc agc aaa gtt gtg tac aat gat gt-3' và ON2: 5'-aca tca ttg tac aca act ttg ctg gcg cga gcc ac-3'. Sau đó, trình tự DNA mã hóa protein mục tiêu được giải bởi Công ty 1st BASE Pte Ltd (Singapore).

Biểu hiện và tinh chế protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP

Các plasmid sau khi đã giải trình tự được biến nạp vào chủng vi khuẩn *E. coli* BL21 (DE3, New England BioLabs). Vi khuẩn được nuôi trong môi trường LB chứa 100 µg / ml ampicillin và tế bào được nuôi cấy ở 37 °C, lắc 250 vòng / phút đến OD₆₀₀ 0,5-0,7, sau đó IPTG được thêm vào nồng độ cuối cùng là 0,4 mM. Các tế bào được ủ liên tục qua đêm ở 15 °C, lắc 180 vòng / phút trước khi thu hoạch. Sinh khối tế bào được cho vào dung dịch chiết xuất protein bugBuster (Merck, Germany) cộng với benzonase nuclease. Sau đó, phần

không hòa tan được loại bỏ bằng cách li tâm ở 20.000 vòng / phút trong 40 phút ở 4 °C. Phần hòa tan được cho qua cột chứa các hạt chitin (New England Biolabs) thông qua dòng chảy trọng lực, và cột được rửa bằng dung dịch đệm natri photphat (10 mM, 100 mM natri clorua, pH 7) và sau đó được ủ 10 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các protein tự phân cắt (tại vị trí của intein) được thu nhận trong dung dịch đệm photphat. Các protein mục tiêu được phân tích bằng SDS-PAGE để kiểm tra độ tinh khiết và LC-MS để biết chính xác khối lượng phân tử của protein.

Cucurbit[8]uril

Phân tử cucurbit[8]uril sử dụng trong nghiên cứu được mua từ Công ty Merck, Đức. Sử dụng sóng siêu âm để xử lý cucurbit[8]uril hòa tan vào dung dịch đệm 10 mM kali photphat, pH 6,5 ở nồng độ 100 μ M.

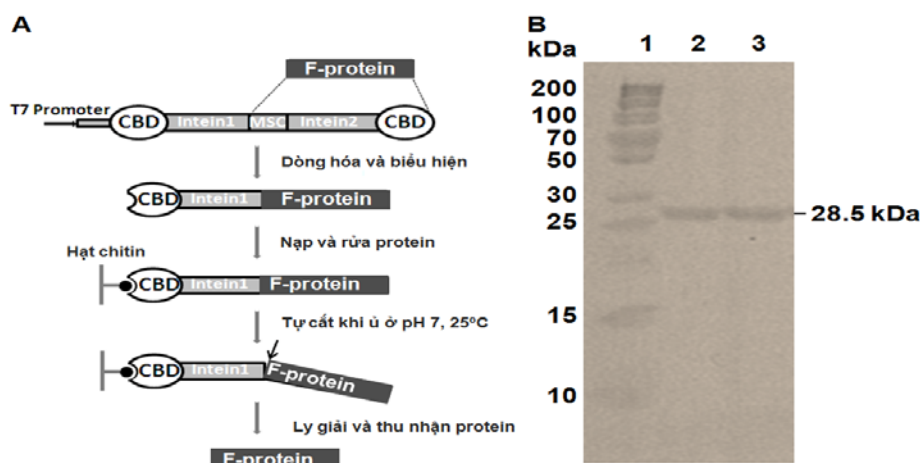
Kĩ thuật FRET

Kĩ thuật FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) đã được sử dụng như một công cụ hữu ích cho việc xác định quá trình dimer của protein. Sự xuất hiện của tín hiệu FRET phụ thuộc vào khoảng cách khoảng 1-10 nm giữa phân tử protein cho và phân tử protein nhận. Thí nghiệm FRET được thực hiện trong dung dịch đệm chứa 10 mM kali photphat, pH 6,5 trong cuvet thạch anh có chiều dài đường dẫn 10 mm (Hellma). Các protein dùng để đo FRET được sử dụng ở nồng độ 1 μ M. Các phép đo FRET được thực hiện bằng máy quang phổ huỳnh quang Cary Eclipse (Varian) và tất cả dữ liệu huỳnh quang được ghi lại ở nhiệt độ phòng với bước sóng kích thích là 400 nm. Các thông số của thiết bị được cố định trong tất cả các phép đo để cho việc so sánh các dữ liệu.

3. Kết quả và thảo luận

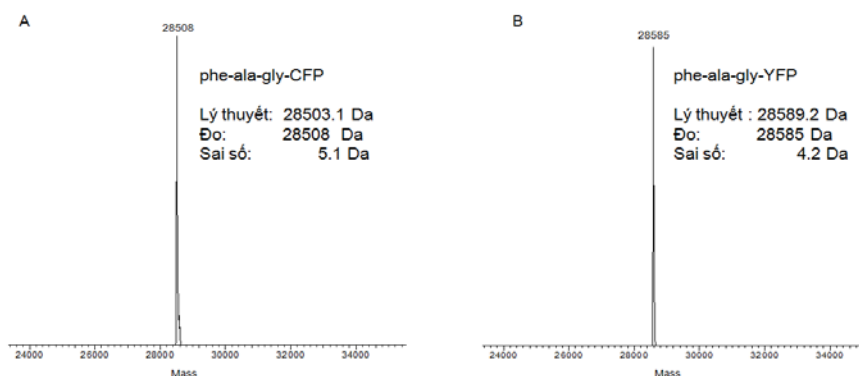
Thu nhận protein phe-ala-gly -CFP và phe-ala-gly-YFP

Thông thường, protein bắt đầu với amino acid methionine (M) ở đầu N. Do đó, để tạo protein CFP và YFP có chứa đuôi dung hợp phe-ala-gly ở đầu N cần sử dụng hệ thống tự cắt intein (Hình 3A). Protein mục tiêu được cho qua cột cố định hạt chitin, protein mục tiêu được bám vào hạt chitin và được ủ trong cột trong dung dịch đệm pH 7 và nhiệt độ 25 °C. Trong thời gian ủ, protein mục tiêu sẽ tự cắt tại vị trí intein và sẽ được thu nhận sau quá trình li giải. Protein mục tiêu sau đó được phân tích độ tinh sạch và khối lượng phân tử bằng phương pháp SDS Page và LC-MS. Kết quả điện di trên gel SDS cho thấy, hai protein mục tiêu phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP có độ tinh sạch khoảng 95% và di chuyển giữa vạch 25 kDa và 30 kDa của thang protein chuẩn (Hình 3B).



Hình 3. Biểu hiện và tinh chế protein. A) Mô hình dòng hóa biểu hiện và tinh chế protein mục tiêu chứa đuôi dung hợp phe-ala-gly. B) Kết quả điện di protein trên gel SDS với thang (cột 1), phe-ala-gly-CFP (cột 2) và phe-ala-gly-YFP (cột 3)

Để biết chính xác khối lượng phân tử, protein mục tiêu chứa đuôi phe-ala-gly được phân tích khối lượng phân tử bằng LC-MS. Kết quả phân tích cho thấy khối lượng phân tử của phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP lần lượt là 28508 Da và 28585 Da. Kết quả này phù hợp với khối lượng phân tử lí thuyết phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP lần lượt là 28503.1 Da (Hình 4A) và 28589.2 Da (Hình 4B). Qua đó cho thấy, sử dụng hệ thống intein có khả năng thu nhận thành công hai protein mục tiêu phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP với độ tinh sạch cao.

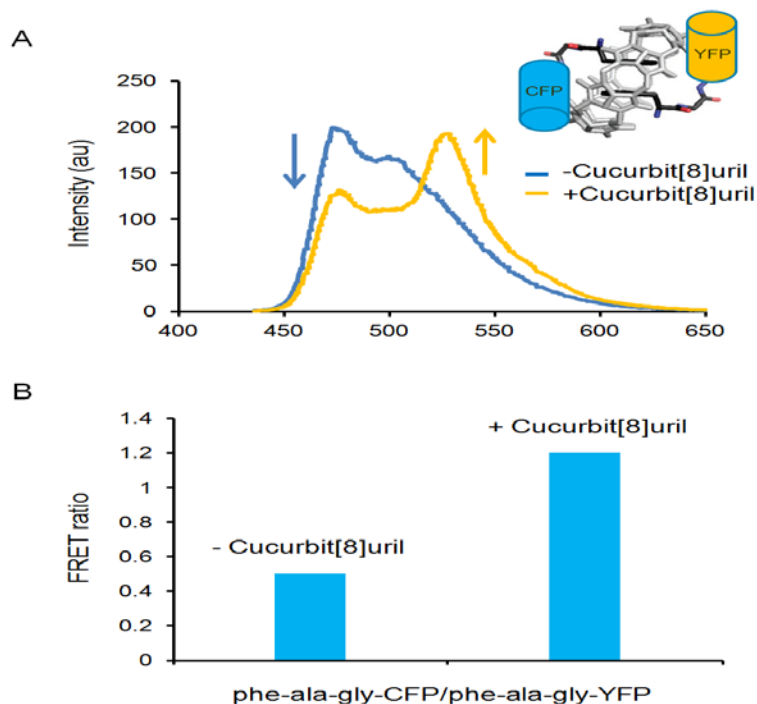


Hình 4. Phân tích khối lượng phân tử protein mục tiêu bằng LC-MS. A) Khối lượng phân tử protein phe-ala-gly-CFP: lí thuyết 28503.1 Da, kết quả đo được: 28508 Da, sai số: 5.1 Da. B) Khối lượng phân tử protein phe-ala-gly-YFP: lí thuyết 28589.2 Da, kết quả đo được: 28585 Da, sai số: 4.2 Da

Phân tích sự cảm ứng dimer protein bởi phân tử cucurbit[8]uril bằng kĩ thuật FRET

Trong nghiên cứu này, kĩ thuật FRET được sử dụng cho việc xác định sự dimer hóa của hai protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP được cảm ứng bởi phân tử cucurbit[8]uril. Dựa vào tính chất vật lí trong việc trao đổi năng lượng giữa protein cho CFP và protein nhận YFP khi khoảng cách giữa hai protein này từ 1-10 nm sẽ tạo nên tín hiệu FRET. Khi hai protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP ở nồng độ 1 μ M trong dung

dịch không thấy được tín hiệu FRET vì khoảng cách giữa hai protein này xa nhau (Hình 5A). Tỷ lệ ở bước sóng 525 nm/ 475 nm có giá trị là 0,5 (Hình 5B). Khi có sự bổ sung phân tử cucurbit[8]uril (1 μ M) vào hỗn hợp dung dịch chứa hai protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP cho thấy có sự trao đổi năng lượng hay tín hiệu FRET giữa protein cho CFP và protein nhận YFP. Năng lượng của protein CFP ở bước sóng 475 nm giảm, đồng thời năng lượng của protein YFP ở bước sóng 525 nm tăng (Hình 4A). Tỷ lệ ở bước sóng 525 nm/ 475 nm có giá trị 1,2. Kết quả cho thấy tỉ lệ FRET (525 nm/ 475 nm) tăng lên từ 0,5 đến 1,2 khi có sự hiện diện của phân tử cucurbit[8]uril (Hình 5B). Do đó, có thể kết luận phân tử cucurbit[8]uril có khả năng cảm ứng sự dimer của hai protein phe-ala-gly-CFP và phe-ala-gly-YFP thông qua tương tác tĩnh điện của vòng cucurbit[8]uril với hai phe-ala-gly để tạo thành phức hợp 1cucurbit[8]uril:2phe-ala-gly. Nghiên cứu trước đây cho thấy, phân tử cucurbit[8]uril có khả năng cảm ứng sự dimer của protein chứa đuôi dung hợp phe-gly-gly, ngoài ra phân tử này có thể hoạt hóa enzyme phe-gly-gly-caspase-8 và phe-gly-gly-caspase-9. Kết quả cũng cho thấy được, ngoài protein mang đuôi dung hợp phe-gly-gly thì phân tử cucurbit[8]uril còn có khả năng cảm ứng sự dimer của protein mang đuôi dung hợp phe-ala-gly. Đây cũng là tiềm năng lớn khi sử dụng phân tử cucurbit[8]uril để kiểm soát hoạt tính của các protein chức năng chứa các đuôi dung hợp phe-gly-gly hay phe-ala-gly có thể được ứng dụng trong các lĩnh vực y dược.



Hình 5. Cảm ứng sự dimer hóa protein bởi phân tử cucurbit[8]uril được phân tích bởi FRET. A) Tín hiệu huỳnh quang thu được trong hỗn hợp phe-ala-gly-CFP (1 μ M) và phe-ala-gly-YFP (1 μ M) khi không (xanh) có bổ sung phân tử cảm ứng cucurbit[8]uril (1 μ M) (màu vàng). B) Tỷ lệ FRET phân tích khi không và có bổ sung cucurbit[8]uril vào hỗn hợp phe-ala-gly-CFP/ phe-ala-gly-YFP

4. Kết luận

Kiểm soát sự dimer protein đóng vai trò quan trọng trong điều hòa các quá trình sinh học trong tế bào cũng như ứng dụng trong các liệu pháp điều trị. Sử dụng hệ thống biểu hiện intein tự cắt có khả năng tạo protein mục tiêu với đuôi dung hợp phe-ala-gly ở đầu N, nhờ đó mà protein có thể được cảm ứng dimer thông qua tương tác giữa đuôi phe-ala-gly và phân tử cucurbit[8]uril. Tín hiệu FRET cho thấy phân tử cucurbit[8]uril cảm ứng sự dimer hóa của protein CFP và YFP chứa đuôi dung hợp phe-ala-gly. Đây cũng là phương pháp mới có thể ứng dụng để kiểm soát sự dimer và hoạt hóa các protein chức năng của tế bào như các protein màng hay các enzyme.

❖ **Tuyên bố về quyền lợi:** Tác giả xác nhận hoàn toàn không có xung đột về quyền lợi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahsan, A. (2016). Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors and Therapeutic Approaches: An Update. *Adv Exp Med Biol*, 893, 137-153. doi:10.1007/978-3-319-24223-1_7
- Ardejani, M. S., Li, N. X., & Orner, B. P. (2011). Stabilization of a protein nanocage through the plugging of a protein-protein interfacial water pocket. *Biochemistry*, 50(19), 4029-4037. doi:10.1021/bi200207w
- Baselga, J., & Swain, S. M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*, 9(7), 463-475. doi:10.1038/nrc2656
- Bayle, J. H., Grimley, J. S., Stankunas, K., Gestwicki, J. E., Wandless, T. J., & Crabtree, G. R. (2006). Rapamycin analogs with differential binding specificity permit orthogonal control of protein activity. *Chem Biol*, 13(1), 99-107. doi:10.1016/j.chembiol.2005.10.017
- Citri, A., & Yarden, Y. (2006). EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(7), 505-516. doi:10.1038/nrm1962
- Dang, D. T., S. J., & Brunsveld, L. (2012). Cucurbit [8] uril-mediated protein homotetramerization. *Chemical Science*, 3(9), 2679-2684.
- Dang, D. T. (2022a). Characterization of TERRA 9 repeat G4-binding RHAU peptides by Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Science and Technology Development Journal*, 25(1), 2336-2341.
- Dang, D. T. (2022b). Molecular Approaches to Protein Dimerization: Opportunities for Supramolecular Chemistry. *Front Chem*, 10, 829312. doi:10.3389/fchem.2022.829312
- Dang, D. T., Bosmans, R. P., Moitzi, C., Voets, I. K., & Brunsveld, L. (2014). Solution structure of a cucurbit[8]uril induced compact supramolecular protein dimer. *Org Biomol Chem*, 12(46), 9341-9344. doi:10.1039/c4ob01729c

- Dang, D. T., Nguyen, H. D., Merckx, M., & Brunsveld, L. (2013). Supramolecular control of enzyme activity through cucurbit[8]uril-mediated dimerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(10), 2915-2919. doi:10.1002/anie.201208239
- Dang, D. T., Nguyen, L. T. A., Truong, T. T. T., Nguyen, H. D., & Phan, A. T. (2021). Construction of a G-quadruplex-specific DNA endonuclease. *Chem Commun (Camb)*, 57(37), 4568-4571. doi:10.1039/d0cc05890d
- Dang, D. T., & Phan, A. T. (2019). Development of a ribonuclease containing a G4-specific binding motif for programmable RNA cleavage. *Sci Rep*, 9(1), 7432. doi:10.1038/s41598-019-42143-8
- Dang, D. T., van Onzen, A., Dorland, Y. L., & Brunsveld, L. (2018). Cucurbit[8]uril Reactivation of an Inactivated Caspase-8 Mutant Reveals Differentiated Enzymatic Substrate Processing. *Chembiochem*, 19(23), 2490-2494. doi:10.1002/cbic.201800521
- Ferrer-Soler, L., Vazquez-Martin, A., Brunet, J., Menendez, J. A., De Llorens, R., & Colomer, R. (2007). An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) -induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review). *Int J Mol Med*, 20(1), 3-10.
- Gazon, H., Barbeau, B., Mesnard, J. M., & Peloponese, J. M., Jr. (2017). Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front Microbiol*, 8, 2686. doi:10.3389/fmicb.2017.02686
- Grueninger, D., Treiber, N., Ziegler, M. O., Koetter, J. W., Schulze, M. S., & Schulz, G. E. (2008). Designed protein-protein association. *Science*, 319(5860), 206-209. doi:10.1126/science.1150421
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 5(5), 341-354. doi:10.1038/nrc1609
- Junius, F. K., O'Donoghue, S. I., Nilges, M., Weiss, A. S., & King, G. F. (1996). High resolution NMR solution structure of the leucine zipper domain of the c-Jun homodimer. *J Biol Chem*, 271(23), 13663-13667. doi:10.1074/jbc.271.23.13663
- Kharenko, O. A., & Ogawa, M. Y. (2004). Metal-induced folding of a designed metalloprotein. *J Inorg Biochem*, 98(11), 1971-1974. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.07.015
- Marianayagam, N. J., Sunde, M., & Matthews, J. M. (2004). The power of two: protein dimerization in biology. *Trends Biochem Sci*, 29(11), 618-625. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.006
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *Chembiochem*, 5(2), 170-176. doi:10.1002/cbic.200300781
- Nguyen, H. D., Dang, D. T., van Dongen, J. L., & Brunsveld, L. (2010). Protein Dimerization Induced by Supramolecular Interactions with Cucurbit[8]uril. *Angew Chem Int Ed Engl*, 49(5), 895-898. doi:10.1002/anie.200904413

USING CUCURBIT[8]URIL TO CREATE DIMERIZATION OF PROTEIN CFP/YFP**Dang Thanh Dung**

Ho Chi Minh City Open University, Vietnam

Corresponding author: Dang Thanh Dung – Email: dung.dthanh@ou.edu.vn

Received: April 30, 2022; Revised: May 17, 2022; Accepted: July 20, 2022

ABSTRACT

Protein dimerization plays an important role in many cellular biological activities, such as activated enzymes, membrane protein receptors, signaling factors, and transcription factors. Therefore, controlling protein dimerization helps to prevent these biological processes. In this study, the molecule curcubit[8]uril was used to manage the dimerization of protein consisting of the-ala-gly motif at the N-terminus. The CFP/YFP protein pair containing the phe-ala-gly fusion motif was generated using an auto cleavage intein system. The Curcubit[8]uril molecule that induces dimerization of the CFP/YFP protein containing the phe-ala-gly motif was evaluated by FRET (fluorescent resonance energy transfer) technique. The FRET ratio of 525 nm/475 nm increased significantly from 0.5 to 1.2 in the presence of curcubit[8]uril, which means that this molecule is capable of inducing the dimerization of CFP and YFP proteins bearing the phe-ala-gly motif. Control of protein dimerization by curcubit[8]uril can potentially control biologically functional proteins containing the phe-ala-gly fusion motif.

Keywords: CFP; Cucurbit[8]uril; dimer; protein; YFP