Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Wechselwirkungen

zwischen Chromophor und Proteinmatrix in den autofluoreszierenden Proteinen GFP und drFP583 (DsRed)

von Jens Wiehler
aus Kiel

2001

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 31.05.01

Jens Wiehler

Dissertation eingereicht am 015.06.2001
1. Gutachter Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker
2. Gutachter PD Dr. Boris Steipe.

Mündliche Prüfung am 26.07.2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Jung, G., J. Wiehler, W. Göhde, J. Tittel, T. Basche, B. Steipe, und C. Bräuchle. 1998. Confocal microscopy of single molecules of the green fluorescent protein. *Bioimaging*, 6: 54-61.

Seebacher, C., F. W. Deeg, C. Bräuchle, J. Wiehler, und B. Steipe. 1999. Stable Low - Temperature Photoproducts und Hole Burning of Green Fluorescent Protein (GFP). *J. Phys. Chem B*, 103: 7728-7732.

Kummer, A., J. Wiehler, H. Rehaber, C. Kompa, B. Steipe, und M. E. Michel-Beyerle. 2000. Effects of Threonine 203 Replacements on Excited-State Dynamics und Fluorescence Properties of the Green Fluorescent Protein (GFP). *J. Phys. Chem. B*, 104: 4791-4798.

Wiehler, J., J. Hummel, und B. Steipe. 2001. Mutants of *Discosoma* Red Fluorescent Protein with a GFP-like chromophore. *FEBS Letters* 487: 384-389

Jung, G., J. Wiehler, B. Steipe, C. Bräuchle, und A. Zumbusch. 2001. Single Molecule Microscopy of GFP with Two-Color Excitation. *Chem. Phys. Chem.*, 2 (6): 392-396

Schüttrigkeit, T., U. Zachariae, T. von Feilitzsch, M. E. Michel-Beyerle, J. Wiehler, J. von Hummel, und B. Steipe. 2001. The novel red fluorescent protein drFP583. Highly efficient excitation energy transfer between separate domains. *Chem. Phys. Chem.*, 2 (5): 325-328

Ich bedanke mich herzlich bei...

Herrn Dr. Boris Steipe für die Möglichkeit, an einem so faszinierenden Protein zu arbeiten, für interessante Ideen und Diskussionen und für die Unterstützung bezüglich des Besuchs von Kongressen,

Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker für die Anfertigung des Erstgutachtens und, ebenso wie Herrn Prof. Dr. Rudolf Grosschedl, für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut,

Frau Prof. Dr. Maria-Elisabeth Michel-Beyerle von der TU München und den Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe Andreas Kummer, Tanja Schüttrigkeit und Ulli Zachariae sowie Herrn Prof. Dr. Christoph Bräuchle von der LMU München und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe Gregor Jung, Christian Seebacher und Andreas Zumbusch für die hervorragende Zusammenarbeit, die fachkompetenten Diskussionen und das nette Miteinander und die Ermunterungen,

Volker Hartmut Rohde und Peter Wirtz für die Bereitschaft, Hypothesen und Argumentationen kritischen Prüfungen zu unterziehen und, ebenso wie bei Claudia Buchen, Karin Schulz, Monika Niggemann, Dr. Heike Bruhn und Jan Barnikow, für die anregende Gruppendynamik und vor allem für die schöne Zeit,

allen Kollegen im Institut für die gegenseitige fachliche und seelische Unterstützung,

Siggi Kastenmüller für die ihre Hilfsbereitschaft

und bei Volker Hartmut Rohde, Peter Wirtz, Gregor Jung und Thies Schröder für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

λ_{Abs}	Wellenlänge maximaler Absorption
λ_{Em}	Wellenlänge maximaler Fluoreszenz
λ_{Ex}	Wellenlänge maximaler Anregung
λ_{max}	Wellenlänge maximaler Intensität
β-ME	β-Mercapto-ethanol
A	Adenin
A_{280}	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AMP	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammonium-peroxodisulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
BFP	Blau Fluoreszierendes Protein (*Blue Fluorescing Protein*)
bla	Gen der β-Lactamase
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (*Bovine Serum Albumine*)
C	Cytosin
CIAP	Alkalische Phosphatase (*Calf Intestine Alkaline Phosphatase*)
Cam	Chloramphenicol
CD	Circular-Dichroismus
CFP	Cyan Fluorescing Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DTT	Dithiothreit
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein*
ESPT	Abgabe eines Protons aus einem angeregten Zustand (*Excited State Proton Transfer*)
EtOH	Ethanol
FP	Fluoreszierendes Protein
FRET	Fluorescenz-Resonanz-Energietransfer (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*)
G	Guanin
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein (*Green Fluorescing Protein*)
Gl.	Gleichung
h	Stunden
IPTG	Isopropyl-thiogalactosid
Kan	Kanamycin
kDa	kilo Dalton (kg/mol)

LB_{+Amp}	LB-Medium mit 100 mg/L Ampicillin
Lsg.	Lösung
min	Minuten
mPCR	PCR unter mutagenen Bedingungen
M_W	Molekulargewicht
OD_{600}	optische Dichte bei 600 nm
Oligo	Oligodesoxynukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (*Phosphate-Buffered Saline*)
PDB	Datenbank der Proteinstrukturen (*Protein Data Base*)
PEG	Polyethylenglycol
pfu	Koloie-bildende Einheiten (*Plaque Forming Units*)
QA	Quantenausbeute
R^-	Chromophor mit deprotoniertem phenolischen Sauerstoff
R^{-*}	Angeregter Chromophor mit deprotoniertem phenolischen Sauerstoff
rcf	relative Zentrifugalkraft (*Reciprocal Centrifugal Force*)
RH	Chromophor mit protoniertem phenolischen Sauerstoff
RH*	Angeregter Chromophor mit protoniertem phenolischen Sauerstoff
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natrium-dodecylsulfat (*Sodium Dodecylsulfate*)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
tetR	Gen des tet-Repressors
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (*Units*)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w.E.	willkürliche Einheiten
w/v	Gewicht pro Volumen (*weight per volume*)
wt	Wildtyp
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein (*Yellow Fluorescing Protein*)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Entdeckung des GFP 1

1.2 Proteinstruktur 3

1.3 Chromophorbildung 5

1.4 Molekulare Grundlagen der spektralen Eigenschaften 6

1.5 Autofluoreszierende Proteine - eine neue Proteinfamilie 7

1.6 Anwendungen in der Zell und Molekularbiologie 8

1.7 Aufgabenstellung 9

2 Material 11

2.1 Bakterien und Phagen 11

2.2 DNA 12

2.2.1 Vektoren 12

2.2.2 Oligodesoxynukleotide 12

2.2.2.1 PCR-Primer und Sequenzier-Oligos 12

2.2.2.2 Mutagenese-Oligos 13

2.3 Enzyme und andere Proteine 13

2.4 Standards und Kits 14

2.5 Chemikalien 14

2.6 Geräte 16

2.7 Andere Materialien 16

3 Methoden 19

3.1 Molekularbiologische Methoden 19

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von E. coli 19

3.1.2 Plasmid-DNA-Präparation 20

3.1.2.1 Plasmid-Schnellpräparation 20

3.1.2.2 Qiagen- bzw. Jetstar-Plasmid-DNA-Präparation 21

3.1.3 Präparation von Einzelstrang-DNA (Sambrook et al., 1989) 21

3.1.4 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden 22

3.1.5 Mutagenese 22

3.1.5.1 Ortsspezifische Mutagenese 22

3.1.5.2 Mutagene Polymerase-Kettenreaktion (mPCR) 23
3.1.6 Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA 24
3.1.6.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen 24
3.1.6.2 Herstellung elektroporationskompetenter Zellen 25
3.1.6.3 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA 25
3.1.6.4 Elektroporation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA 25
3.1.7 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA 26
3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese 26
3.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel 27
3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten 28
3.1.10.1 Ligation im Gel 28
3.1.10.2 Ligation in der Lösung 29
3.1.11 DNA-Sequenzierung 29
3.2 Gewinnung rekombinanter Proteine 29
3.2.1 Expression in E. coli 29
3.2.2 Zellaufschluss 30
3.3 Proteinchemische Methoden 31
3.3.1 Reinigung der Proteine über Affinitätschromatografie 31
3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE) 32
3.3.2.1 Herstellen der Gele 32
3.3.2.2 Elektrophorese 33
3.3.2.3 Silberfärbung von Proteingelen 33
3.3.2.4 Coomassie-Färbung 34
3.3.3 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen 34
3.4 Spektroskopische Methoden 35
3.4.1 Absorptionsspektroskopie 35
3.4.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung 35
3.4.1.2 Absorptionsspektren von Proteinen 35
3.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen 35
3.4.1.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration 36
3.4.2 Fluoreszenzmessungen von Proteinen 36
3.5 Computer-Analysen 37
4 Die Mutationsserie an T203 39
4.1 Motivation 39
4.2 Ergebnisse 40
4.2.1 Proteinausbeuten in E. coli-Expressionskulturen 40
4.2.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren 40
4.2.3 Quantenausbeuten und kinetische Parameter 43
4.3 Diskussion 43

4.3.1 Proteinausbeuten in E. coli-Expressionskulturen 43
4.3.2 Die Seitenkette 203 interagiert mit dem Chromophor 44
4.3.3 Die B-Spezies kann nur mit T203 ausgebildet werden 46
4.3.4 Energieverlust von RH* durch Aromaten an Position 203 48

5 Grundzustandsspezies und Dimerisierung 51

5.1 Motivation 51

5.2 Ergebnisse 51
5.2.1 Stabilisierung der Grundzustandsspezies durch Mutagenese 51
5.2.2 Konzentrationsabhängige Populierung der Grundzustandsspezies 54

5.3 Diskussion 58
5.3.1 Phänotypen der Mutanten 58
5.3.2 Dimerisierung von wt-GFP 59

6 Die Schlüsselpositionen 65, 203 und 222 61

6.1 Motivation 61

6.2 Ergebnisse 61
6.2.1 Proteinausbeuten in E. coli-Expressionskulturen 61
6.2.2 Verschiebung des Grundzustandsgleichgewichts 62
6.2.3 Absorptions- und Fluoreszenspektren 65
6.2.4 Quantenausbeuten 67

6.3 Diskussion 68
6.3.1 Faltung und Chromophorbildung 68
6.3.2 Wechselwirkungen von Seitenkette 203 mit dem Chromophor 69
6.3.3 Mechanismen des Grundzustandsgleichgewichts 70
6.3.4 Strahlungsloser Energieverlust aus R-* 71
6.3.5 Nur der Kontext S65/E222 ermöglicht effektiven ESPT 72
6.3.6 Blaue Emission in der Variante G65/V203/Q222 73
6.3.7 Ökologische und evolutive Konsequenzen 73

7 Zufallsmutagenesen 75

7.1 Motivation 75

7.2 Ergebnisse 76
7.2.1 Methodische Ergebnisse 76
7.2.2 wt-GFP als Templat 77
7.2.3 T203Y als Templat 78
7.2.3.1 Selektierte Varianten 78
7.2.3.2 Steigerung der Proteinausbeuten durch die V163A-Mutation 80

7.3 Diskussion **81**
7.3.1 Art und Verteilung von Mutationen 81
7.3.2 wt-GFP als Templat 82
7.3.3 T203Y als Templat 82
7.3.3.1 Steigerung der Proteinausbeuten 82
7.3.3.2 Veränderte Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften 84

8 Untersuchungen am rot fluoreszierenden Protein DsRed **85**

8.1 Motivation **85**

8.2 Ergebnisse **87**
8.2.1 Konstruktion des Gens 87
8.2.2 Maturierung des Chromophors 87
8.2.3 Zufallsmutagenese 89
8.2.3.1 Selektion auf Fluoreszenzintensität 89
8.2.3.2 Selektion auf abweichende Fluoreszenzspektren 91
8.2.4 Eigenschaften des Chromophors im entfalteten Protein 93

8.3 Diskussion **95**
8.3.1 Maturierung des Proteins über GFP-ähnliche Intermediate 95
8.3.2 Stabilisierung der Intermediate werden durch Punktmutationen 95
8.3.3 Der intermediäre Ds-Red-Chromophor ist identisch mit dem von GFP 96
8.3.4 Denaturierung allein konvertiert den DsRed-Chromophor nicht zurück in den GFP-Chromophor 97
8.3.5 FRET in Heterooligomeren von DsRed und seinen Mutanten 97
8.3.6 Nachtrag: Bezug zu aktuellen Publikationen 98

9 Implikationen für zellbiologische Anwendungen - Ausblick **99**

9.1 Multispektrale Detektion mit der T203V-Variante **99**

9.2 Verbesserung des Proximity-Imaging mit GFP **100**

9.3 Neue spektrale Phänotypen von GFP **101**

9.4 Optimierung von DsRed **102**

10 Zusammenfassung **103**

11 Literaturverzeichnis **105**

1 Einleitung

Das aus der pazifischen Qualle *Aequorea victoria* isolierte Grün Fluoreszierende Protein (GFP) fasziniert durch seine laternenartige Struktur und die rein genetisch kodierte Fähigkeit zur Fluoreszenz. Durch eine genetische Fusion ermöglicht GFP die Visualisierung von Genexpression und Proteinlokalisation *in vivo* und erlaubt so Einblicke in die komplexe Organisation von Zellen und Organismen, die auch ästhetisch reizvoll sind. Ein grundlegendes Verständnis der Funktionsweise von GFP ist unter anderem für die anwendungsorientierte Optimierung des Proteins von Bedeutung. (Für einen Übersichtsartikel zum GFP siehe Tsien, 1998.)

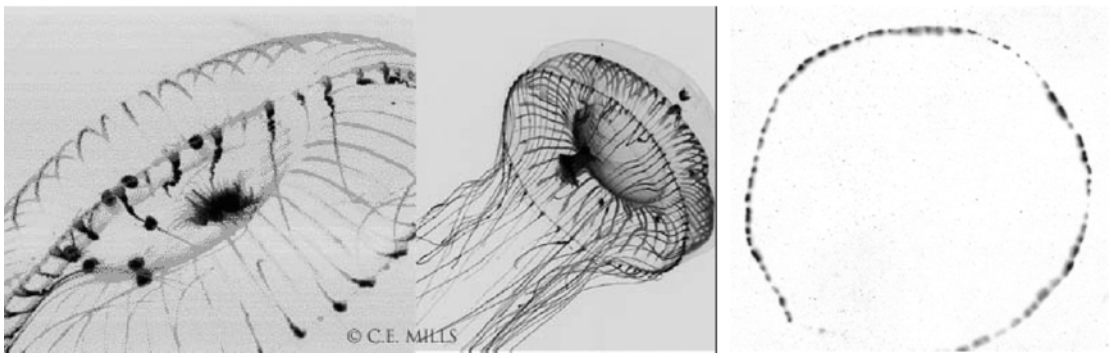

Abb. 1.1. Links: Der Habitus von *Aequorea victoria* (Homepage von Dr. Claudia E. Mills). Rechts: Lokalisation der Fluoreszenz im Tentakelbereich (unbekannter Autor). Graustufen invertiert.

1.1 Entdeckung des GFP

An der nördlichen Pazifiküste der USA und Kanadas finden sich in den Sommermonaten große Vorkommen von *Aequorea victoria*, einer Qualle mit charakteristischer grüner Emission vor allem im Tentaktelbereich (Abb. 1.1) in spezialisierten Photozyten (Davenport & Nicol, 1955). Aus Quetschextrakten der Tiere wurde von Shimomura *et al.* (1962) die Ca^{2+}-aktivierbare Oxoluciferase Aequorin isoliert. Damit assoziert fanden die Autoren ein „nach Anregung mit UV-Licht hell grün fluoreszierendes Protein". Dieselbe Gruppe publizierte kurz darauf das mit dem *Aequorea*-Gewebe identische Emissionsspektrum von GFP mit einer maximalen Wellenlänge (λ_{Em}) von = 508 nm (Johnson *et al*., 1962). Das von reinem Aequorin erzeugte cyane Licht (λ_{Em}= 472 nm) deckt sich mit dem langwelligen

Anregungsmaximum (λ_{Ex}) von GFP bei 477 nm. Als Schlussfolgerung lag nahe, dass die Aequorin-Lumineszenz durch das assoziierte GFP in grünes Licht konvertiert wird. Dieser strahlungsfreier Energietransfer wurde 1974 zusammen mit dem Absorptionsspektrum und den Fluoreszenzquantenausbeuten von GFP beschrieben (Morise *et al*., 1974). Das exakte Molekulargewicht des monomeren Proteins wurde 1978 von Prendergast & Mann veröffentlicht. Durch Proteolyse und physikochemische Analyse des die Absorptionseigenschaften tragenden Fragments konnte die Struktur des Chromophors identifiziert werden (Shimomura, 1979). Dieser ist ein in das Proteinrückgrat eingebautes 4-(p-Hydroxybenzyliden)-Imidazolidinon (vgl. Abb. 1.4). Der nächste wissenschaftliche Durchbruch war die Isolierung des Gens und die Zuordnung der Chromophor-bildenden Aminosäuren in die Primärsequenz (Prasher *et al*., 1992; Abb. 1.2). 1994 zeigten Inouye & Tsuji, dass auch in *E. coli* die Expression des Gens zu nativem fluoreszenzierendem Protein führt. Von diesem Zeitpunkt an ist die Bedeutung von GFP als *in vivo*-Marker für Genexpression und Proteinlokalisation explosionsartig angewachsen (vgl. 1.5).

```
  1         11         21         31         41         51
  MGKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTL

 61         71         81         91        101        111
  VTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLV

121        131        141        151        161        171
  NRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLAD

181        191        201        211        221        231        241
  HYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYKGHHHHHH
```

Abb. 1.2. Aminosäuresequenz von wt-GFP, wie es in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Sequenz unterscheidet sich von Prasher *et al*. (1992) durch die Mutation Q80R (durch einen frühen PCR-Fehler entstanden und funktional neutral; Chalfie *et al*., 1994), durch das C-terminale Gly-His_6 sowie die Mutation S2G. Fett: Chromophormotiv; unterstrichen: Aminosäuren mit β-Strang-Sekundärstruktur.

1.2 Proteinstruktur

Die Röntgenstruktur des 238 Aminosäuren bzw. 26.9 kDa großen Proteins wurde 1996 parallel gelöst (Yang *et al.* bzw. Ormö *et al.*; PDB-Einträge 1ema und 1gfl). Die Aminosäurekette bildet einen Zylinder aus 11 β-Strängen (β-*barrel*), der terminal mit „Deckeln" aus *Loop*-Strukturen und kurzen α-Helices verschlossen ist (Abb. 1.3). Das Zentrum des β-*barrels* wird von einer α-Helix durchquert, in deren Mitte sich, analog zu einer durch ein Laternengehäuse geschützten Lichtquelle, der Chromophor befindet.

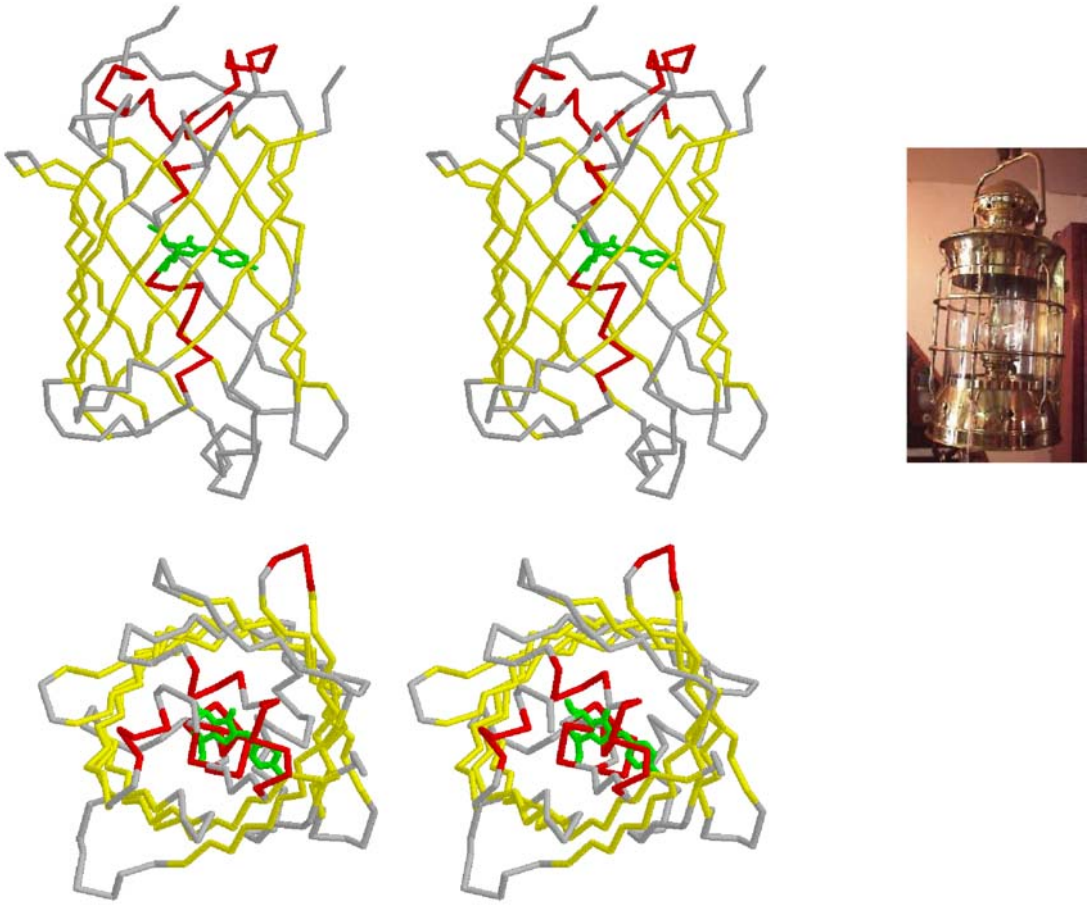

Abb. 1.3 Stereo-Darstellung der Struktur von wt-GFP (seitlich und Aufsicht; nach dem PDB-Eintrag 1gfl). Durchmesser bzw. Länge des Moleküls betragen ca. 24 bzw. 50 Å. Im dargestellten Verlauf des Peptidrückrats sind β-Stränge gelb und α-Helices rot dargestellt. Die Aminosäuren, welche den Chromophor bilden, sind grün und in atomarer Auflösung gezeigt. In Funktion und Struktur ähnelt das Molekül einer Laterne (rechts).

Der Chromophor ist von einigen polaren Aminosäuren (besonders Q69, R96, H148, T203, S205 und E222) und strukturierten Wassermolekülen umgeben, was für das Innere eines Proteins ungewöhnlich ist (Abb. 1.4). Der Faltungstyp von GFP war neuartig; eine Suche nach ähnlichen Strukturen in der Datenbank PDB bringt nur erheblich größere β-*barrels* zutage.

Das Protein ist erstaunlich resistent gegen Denaturierungsmittel (6 M Guanidiniumchlorid, 8 M Harnstoff oder 1 % SDS), Hitze (~100 % Fluoreszenz bis 63 °C und noch 50 % bei 78 °C) oder Proteasen (Ward *et al*., 1980; Bokman & Ward, 1981). Dagegen ist die einmal erfolgte Denaturierung kaum reversibel.

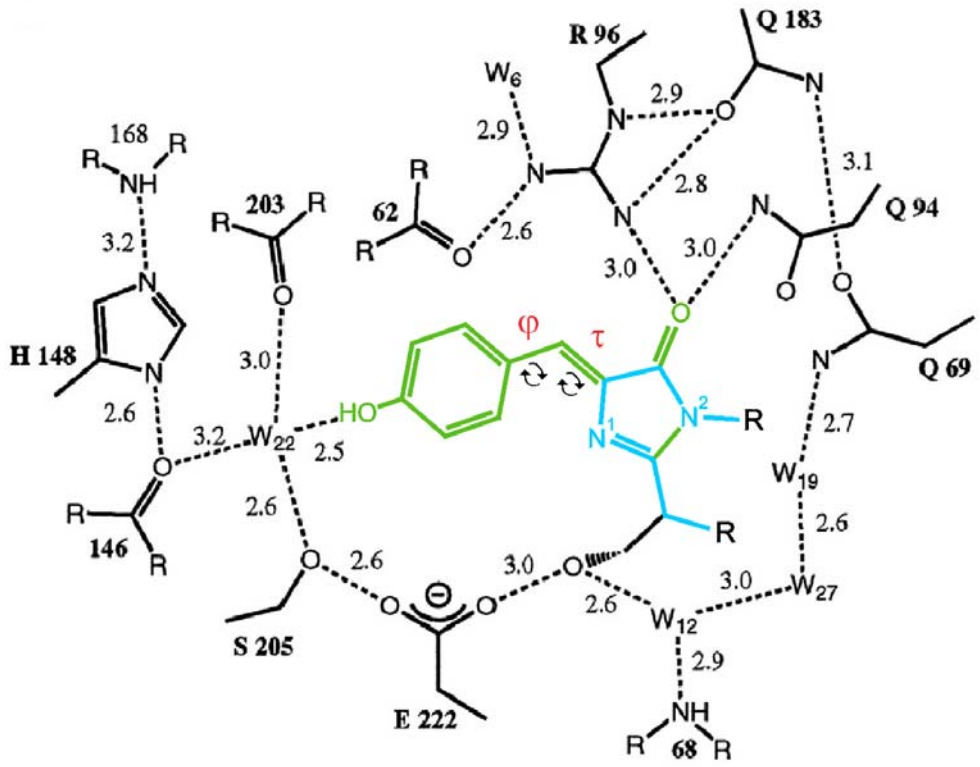

Abb. 1.4. Projektion des aus S65-Y66-G67 gebildeten Chromophors (grün; ursprüngliches Aminosäurerückgrat blau) und seiner unmittelbaren räumlichen Proteinumgebung (aus Brejc *et al*., 1997). Die exozyklischen Bindungen des Chromophors bzw. die entsprechenden Rotations-Freiheitsgrade sind mit φ und τ bezeichnet.

1.3 Chromophorbildung

Der GFP-Chromophor entsteht autokatalytisch aus den Aminosäuren S65, Y66 und G67 (Heim *et al*., 1994; Abb. 1.5). Nach der Faltung des Proteins zyklisiert das Aminosäurerückrat mit einen nukleophilen Angriff der Aminogruppe von G67 auf den Carbonyl-Kohlenstoff von S65. Diese Kondensations-Reaktion wird durch das Sequenzmotiv SYG räumlich favorisiert (Branchini *et al*., 1997 & 1998). Erst nach dem folgenden geschwindigkeitsbestimmenden Oxidationsschritt ist der Chromophor fluoreszent.

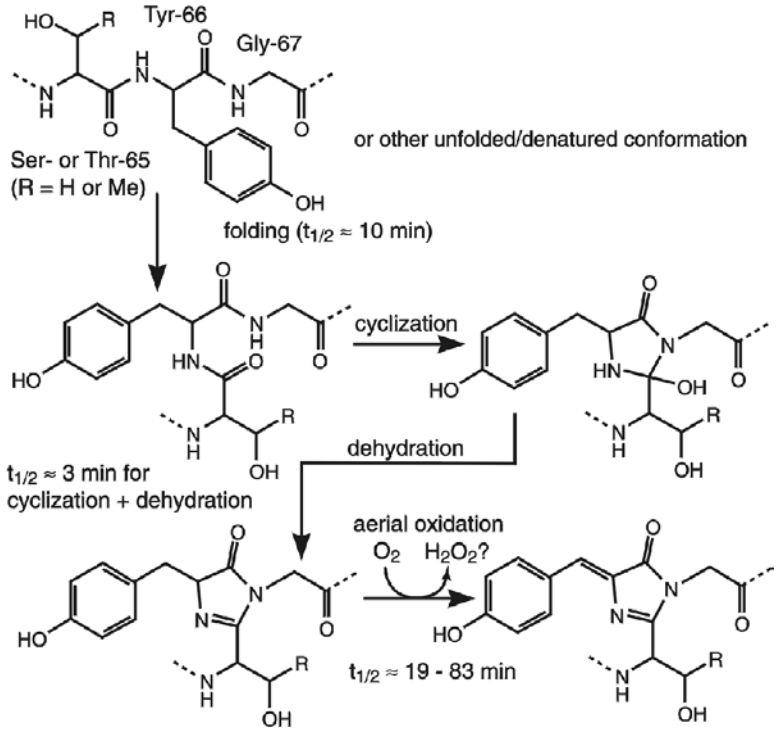

Abb. 1.5. Von Heim *et al.* (1994) vorgeschlagener Mechanismus für die intramolekulare Synthese des GFP-Chromophors. Die angegebenen Halbwertszeiten wurden durch *de novo*-Faltung von ungefaltetem Protein (aus *Inclusion Bodies*) sowie Entfaltungs-, Rückfaltungs- und Denaturierungsexperimente gemessen (Reid & Flynn, 1997; an der Variante S65T). Mit freundlicher Genehmigung von Dr. A. Kummer.

1.4 Molekulare Grundlagen der spektralen Eigenschaften

Der GFP-Chromophor fluoresziert nur im nativen Protein, durch Denaturierung geht diese Fähigkeit verloren (Ward *et al*., 1980). Nach einer Studie am chemisch synthetisierten Chromophor folgerten Niwa *et al.* (1996), dass ohne eine Fixation durch die Proteinmatrix die Anregungsenergie durch eine Rotationsbewegung um die exocyclische Bindung τ (Abb. 1.4) verloren geht. Damit sinkt die Fluoreszenzquantenausbeute (das Verhältnis von absorbierten zu emittierten Photonen) stark ab.

Der phenolische Sauerstoff des Chromophors kann protoniert (RH-Chromophor) bzw. negativ geladen (R^--Chromophor) vorliegen. Diese beiden im Gleichgewicht stehenden Spezies absorbieren im nativen GFP um 398 bzw. 477 nm (Abb. 1.6 links). Die Absorptionsbande um 280 nm wird dagegen durch die aromatischen Seitenketten des Proteins verursacht.

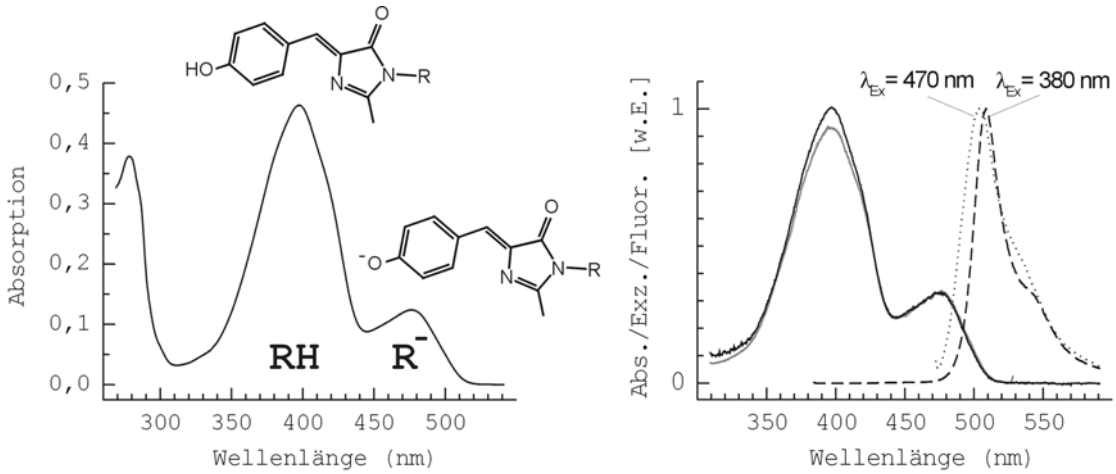

Abb. 1.6. Spektrale Eigenschaften von wt-GFP. Links: Absorptionsspektrum und die zugrunde liegenden Chromophorspezies RH und R^-. Rechts: Zusätzlich Emissionsspektren nach Anregung von RH bzw. R^- und Anregungsspektrum für die grüne Emission (grau). und Die im Verhältnis zu R^- geringfügig niedrigere Anregbarkeit in RH beruht auf der nicht 100 %-igen Quantenausbeute für den ESPT.

Der Anregung der R^--Population des Proteins (die Schreibweise für die angeregte R^--Spezies ist R^{-*}) folgt eine grüne Emission. Warum entsteht diese aber auch nach Anregung der RH-Bande (Abb. 1.6 rechts)? Die Anregung des Chromophors geht mit einer Verschiebung der Elektronendichte aus dem Phenolring in den Bereich des Imidazolrings einher (Voityuk *et al*., 1998b & Bublitz *et al*., 1998). Die erhöhte Azidität bewirkt bei RH* eine schnelle Dissoziation des tyrosylischen Protons und

resultiert damit in einer grün emittierenden R^{-}*-Spezies (auch intermediäre Spezies, I-Spezies). Diese Abgabe des Protons (*Excited State Proton Transfer*, ESPT) kann durch die Verlangsamung des Prozesses in einer deuterierten Probe nachgewiesen werden (Lossau *et al*., 1996 & Chattoraj *et al*., 1996). Konkurrierende Prozesse aus RH* sind ein strahlungsloser Energieverlust (Kummer *et al*., 1998) sowie ein geringer Anteil direkter blauer Emission (Lossau *et al*., 1996 & Chattoraj *et al*., 1996).

1.5 Autofluoreszierende Proteine - eine neue Proteinfamilie

Ende 1999 wurden von Matz *et al.* sechs neue fluoreszierende Proteine vorgestellt. Deren Gene konnten aus nicht biolumineszenten Riffkorallen isoliert werden. Die Proteine sind 225-266 Aminosäuren groß und zeigen nur 20-30 % Sequenzidentität mit dem *Aequorea*-GFP. Später wurden dann noch weitere homologe Proteine kloniert, von denen eines fast nicht fluoresziert. Es färbt die Tentakelenden der Seeanemone *Anemonia sulcata* ausschließlich durch seine Absorption lila ein (Fradkov *et al*., 2000 & Lukyanov *et al*., 2000). Fluoreszierende Proteine wurden bisher nur bei den *Cnidaria* (Nesseltiere) und dort innerhalb der Hydrozoa (z.B. *Aequorea*, *Obelia* und *Phialidium*) und Anthozoa (beinhalten die Seeanemonen und Riffkorallen) entdeckt.

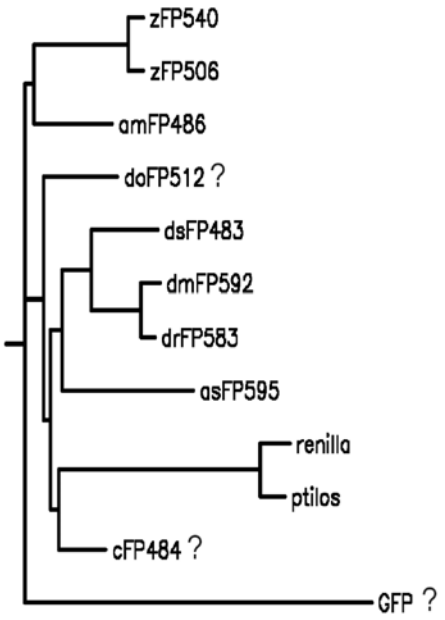

Abb. 1.7. Phylogenetische Beziehungen zwischen allen bekannten Fluoreszierenden Proteinen. Die Nomenklatur gibt die Spezies und meist die Fluoreszenzwellenlänge in nm wieder. Der ungewurzelte Baum wurde aus den Werten für die paarweisen genetischen Distanzen (Dayhoff-Methode) errechnet. Diese Distanzen sind proportional zur aufsummierten Länge der horizontalen Linien zwischen zwei Proteinen bzw. Verzweigungen. Die Plazierung der mit „?" markierten Proteine ist unsicher. J. Wiehler, unveröffentlicht. Die zum Teil noch unveröffentlichten Proteinsequenzen wurden von A.P. Savitsky zur Verfügung gestellt. Erstellt mit PHYLIP 3.5c (© Joe Felsenstein & Univ. of Washington, 1991-1993).

Eine Analyse der phylogenetischen Beziehungen zeigt, dass GFP von den anderen Proteinen durch eine große genetische Distanz evolutiv isoliert ist (Abb. 1.7). Alle fluoreszierenden Proteine teilen sich das Tyrosin-Glycin-Motiv des Chromophors, das

für die Chromophorbildung essentielle R96 (Ormö *et al*., 1996) sowie die Sekundärstruktur. Die Absorptions- bzw. Emissionmaxima umfassen 443-573 nm bzw. 483-593 nm. Die Identität des Chromophor vom *Renilla*-GFP mit dem vom *Aequorea*-GFP wurde von Ward *et al.* (1980) nachgewiesen. Das für eine multispektrale *in vivo*-Markierung interessanteste Protein ist das rot emittierende drFP583 (DsRed) aus *Discosoma spec*.. DsRed wurde deshalb kurzfristig als Untersuchungsobjekt in die vorliegende Arbeit einbezogen.

1.6 Anwendungen in der Zell und Molekularbiologie

Aufgrund seiner genetisch kodierten Fähigkeit zu Fluoreszenz ermöglicht GFP die *in vivo*-Visualisierung von Genexpression und Proteinlokalisation. Dabei wird das Gen des Ziel-Proteins mit dem von GFP fusioniert und das Fusionsgen in die Zielzelle transformiert. Das Produkt der Translation, das Fusionsprotein, lässt sich fluoreszenzmikroskopisch *in vivo* lokalisieren und quantifizieren. Dies bedeutet einen gewaltigen Fortschritt für die Zellbiologie, da nun nahezu jedes beliebige cytoplasmatische Protein *in vivo* und in einer Zeitspur mikroskopiert werden kann (erstmalig bei Chalfie *et al*., 1994). Auch die Aktivität von Promotoren lässt sich auf diese Weise quantifizieren. Mit geeigneten GFP-Varianten können *in vivo* pH-Werte in Zellorganellen oder -kompartimenten gemessen werden (Kneen *et al*., 1998; Robey *et al*., 1998 & Miesenböck *et al*., 1998). Überlappt die Emission eines Chromophors (Donor) mit der Absorption eines Zweiten (Akzeptor), kann die Energie strahlungsfrei vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden. Die Effizienz dieses *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) ist distanzabhäng (Förster *et al*., 1948 & Stryer *et al*., 1978). Werden zwei Proteine mit geeigneten GFP-Varianten markiert, kann deshalb deren Distanz *in vivo* fluoreszenzspektroskopisch gemessen werden (Mitra *et al*., 1996). Calmodulin reagiert auf die Bindung von Ca^{2+} mit Konformationsänderungen. Über die Fusion FRET-geeigneter GFPs an die Termini von Calmodulin ist eine lokale und dynamische *in vivo*-Messung der Ca^{2+}-Konzentration möglich (Miyawaki *et al*., 1997 & 1999). Mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz lassen sich auch Zelltypen markieren und aussortieren (Cormack *et al*., 1996) oder in Versuchstieren Tumorwachstum und -metastasierung sowie das Verhalten von Xenotransplantaten beobachten. In Mikrotiterplatten können bei geigneter GFP-Markierung im Hochdurchsatzverfahren Wirksubstanzen gefunden werden. Die Liste der möglichen Applikationen von GFP lässt sich nahezu beliebig erweitern.

1.7 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Wechselwirkungen zwischen dem GFP-Chromophor und seiner Proteinmatrix zu charakterisieren. Der experimentelle Zugang soll über die Substitution von Aminosäuren erfolgen; der Chromophor dient durch die Veränderung seiner spektroskopischen Eigenschaften als Messsonde.

Die Mutationen können mit zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden in das Protein eingefügt werden. (i) *Rationales Vorgehen* beruht auf der Interpretation von Röntgenstrukturen des Proteins und eventuell auf bereits bekannten Effekten von Mutationen. Diesbezügliche publizierte Untersuchungen wurden meist an Mehrfachmutanten durchgeführt. Hier liegt der Schwerpunkt dagegen auf systematischen Einfachmutationen, deren Effekte sich eindeutiger zugeordnen lassen. (ii) Bei *evolutivem Vorgehen* werden in eine große Zahl von Genen zufällige Punktmutationen eingefügt. Aus der resultierenden „Proteinbibliothek" werden spektroskopisch abweichende Varianten isoliert. Die Identifizierung der betroffenen Aminosäuren ermöglicht dann Hypothesen zur Funktionalität. Alle mutierten Proteine werden vor allem bezüglich ihrer stationären Absorptions- und Fluoreszenzspektren charakterisiert.

Die Auswirkungen der Mutationen können oft nur durch hohen apparativen Aufwand und das dazugehörige Wissen ermittelt bzw. interpretiert werden. Dies erfordert die enge kooperative Abstimmung von Experimenten. In der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Maria-Elisabeth Michel-Beyerle (Inst. für Physikalische und Theoretische Chemie der TU München) können mit zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen schnelle lichtinduzierte Prozesse erfasst werden. In der Arbeitsgruppe von Professor Dr. Christoph Bräuchle (Institut für Physikikalische Chemie der LMU München) wurden Einzelmolekülspektroskopie, Zwei-Farben-Experimente, Tieftemperaturmessungen sowie Spektrales Lochbrennen durchgeführt.

2 Material

2.1 Bakterien und Phagen

Escherichia coli-Stämme

BL21 (DE3) *hsdS gal* (λ*c*I*ts*857 *ind*1 *S*am7 *nin*5 *lac*UV5-T7 gene *1*)

Der Stamm dient zur Überexpression plasmidkodierter Gene unter dem starken Promoter des T7-Bakteriophagen. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase ist in das Genom des Stamms integriert, seine Expression wird durch Zugabe von IPTG induziert (Studier & Moffatt, 1986). Zur Selektion auf plasmidtragende Klone wird dem Medium das entsprechende Antibiotikum zugesetzt.

XLI Blue *supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac*$^-$ *F'*[*proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*ΔM15 Tn*10(tet*^{r}*)*]

Der rekombinationsdefiziente Stamm restringiert DNA nicht und dient hier zur Gewinnung von Plasmid-DNA, zum Beispiel für Klonierungsexperimente. Zur Selektion auf plasmidtragende Klone wird dem Medium das entsprechende Antibotikum zugesetzt.

CJ 236 F'*cat* [pCJ 105 (M13^{s}Cm^r)]/*dut1 ung1 thi-1 relA1 spoT1 mcrA*

Der Stamm wird zur Gewinnung von Uracil-haltiger Einzelstrang-DNA verwendet. Um das zur Phagen-Transfektion essentielle F'-Plasmid zu erhalten, müssen Bakterien dieses Stammes unter Selektionsdruck mit Chloramphenicol gehalten werden (Geisselsoder *et al*., 1987).

Alle Stämme wurden aus der Sammlung der Arbeitsgruppe bezogen.

Bakteriophage

M13K07 *II'* (M13mp1), *ori* p15A, *kan*$^+$ (Tn903) (Vieira & Messing, 1987).

Von Bio-Rad Laboratories GmbH, München, dient zur Präparation von Einzelstrang-DNA.

2.2 DNA

2.2.1 Vektoren

pRSET5d	(Schoepfer, 1993) aus der Sammlung der AG Steipe
Ptbi-Gfpuv3-Lac	von Prof. Dr. R. Glockshuber, ETH Zürich
pDsRed1-N1	(www.clontech.com) von K. Schulz, LMU, München

2.2.2 Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide (Oligos) wurden von der Firma Interactiva, Ulm, nach dem Phosphoramiditverfahren (Sinha *et al*., 1984 & Kaplan, 1985) hergestellt. Sie wurden entschützt und entsalzt geliefert.

2.2.2.1 PCR-Primer und Sequenzier-Oligos

prSET25f (*sense*, PCR und Sequenzierung)
5' CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCA CAA C 3'

prSET190r (*antisense*, PCR und Sequenzierung)
5' CCG GAT CAA GCT TCG AAT TCT TAC TAG 3'

prSET 190mr (*antisense*, -EcoRI, nur für mutagene PCR)
5' CCG GAT CAA GCT TCT AAT TCT TAC TAG 3'

prRN671f (sense, für DsRed-Klonierung)
5′ TCG CCA CCA TGG TGC GCT CCT C 3′

prRN1089f (sense, -NcoI, für DsRed-Klonierung)
5′ GCA GAA GAA GAC tAT GGG CTG GGA G 3′

prRN113r (*antisense*, -NcoI, für DsRed-Klonierung)
5′ CTC CCA GCC CAT aGT CTT CTT CTG C 3′

prRN1338mr (*antisense*, + C-terminales His_6-*tag, +Hin*dIII, +*Eco*RI, für DsRed-Klonierung)
5′ TTC GAA TTC TTA CTA GTG ATG GTG ATG GTG GTG CAG GA ACA GGT
GGT GGC GG 3′

2.2.2.2 Mutagenese-Oligos

Durch die Mutagenese eingeführte (+) oder entfernte (-) Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind jeweils in Klammern angegeben. Alle Oligos liegen physikalisch in der *antisense*-Richtung vor.

oligo_S65G (+BsaHI)
5' TCT TGA AAA GCA TTG GAC GCC ATA ACC GAA AGT AGT GAC AAG 3'

oligo_I167GII (-HincII)
5' CTT CAA TGT TGT GTC TGC CTT TGA AGT TtA CTT TGA TTC CAT TCT TTT
GTT TGT CTG CC 3'

oligo_T203H (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GTG GGA CAG GTA ATG

oligo_T203I (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GAT GGA CAG GTA ATG

oligo_T203L (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GAG GGA CAG GTA ATG

oligo_T203M (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG CAT GGA CAG GTA ATG

oligo_T203F (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GAA GGA CAG GTA ATG

oligo_T203N (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GTT GGA CAG GTA ATG

oligo_T203Y (+Alw44I)
5' ATC TTT CGA AAG TGC ACT TTG GTA GGA CAG GTA ATG

oligo_E222Q (+PstI)
5' CAG CAG CTG TTA CAA ACT GCA GAA GGA CCA TGT GGT C 3'

2.3 Enzyme und andere Proteine

dam-Methylase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rinderserum-Albumin (BSA)	New England Biolabs GmbH, Schwalbach
RNase A	Roth GmbH, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach,

	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach, MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs GmbH, Schwalbach

2.4 Standards und Kits

DNA-Längenstandards	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Jetstar® Plasmid Kit	Genomed GmbH, Bad Oeynhausen
Proteinmarker	Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein / Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Qiagen® Mini Plasmid Kit	Qiagen, Düsseldorf
QIAquick® Gel Extr. Kit	Qiagen, Düsseldorf
QIAquick® PCR Purif. Kit	Qiagen, Düsseldorf

2.5 Chemikalien

Adenosin-5´-triphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Agarose, *elektrophorese grade*	Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose, *low melting*	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Ammoniumpersulfonsäure (APS)	Merck AG, Darmstadt
Ampicillin (Amp)	Roth GmbH, Karlsruhe
anhydro-Tetracyclin-hydrochlorid	Acros Organics, Geel, Belgien
Bromphenolblau	Merck AG, Darmstadt
Chloramphenicol, kristallin	Roth GmbH, Karlsruhe
2´-Desoxynukleotid- 5´-triphosphate (dNTP's)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck AG, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Merck AG, Darmstadt
1,4-Dithiothreit (DTT)	Merck AG, Darmstadt
Essigsäure, p.a.	Fluka Chemie, Neu-Ulm
Ethanol, p.a. (EtOH)	Merck AG, Darmstadt
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck AG, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd, 37 %, p.a.	Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin (87 %)	Riedel de Haën, Seelze
Glycin, p.a.	Riedel de Haën, Seelze
Guanidiniumchlorid (GdmCl)	ICN-Biomedicals GmbH, Meckenheim
Harnstoff, p.a.	Roth GmbH, Karlsruhe
Imidazol	Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropyl-ß-D-thiogalactosid (IPTG)	Hoechst, Gersthofen
Kalium-dihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck AG, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck AG, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck AG, Darmstadt
Kanamycin-disulfat	Merck AG, Darmstadt
Kupfersulfat	Merck AG, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck AG, Darmstadt
Magnesiumsulfat-7-hydrat	Merck AG, Darmstadt
Mangan-(II)-chlorid-2-hydrat	Merck AG, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck AG, Darmstadt
Natriumacid	Merck AG, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogensulfat	Merck AG, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck AG, Darmstadt
Paraffin, dünnflüssig	Merck AG, Darmstadt
Roti®-Phenol	Roth GmbH, Karlsruhe
2-Propanol, 99 % z. Synth.	Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat, Rotipuran®	Roth GmbH, Karlsruhe
Tetracyclin Hydrochlorid (Tet)	Merck AG, Darmstadt
N, N, N´, N´-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth GmbH, Karlsruhe
Zinkchlorid	Merck AG, Darmstadt

2.6 Geräte

Absorptionsspektrophotometer Uvikon 941	Kontron Instruments GmbH, Neufahrn
Mikrotiterplattenreader Fluoreszenz Biolumin 960 Kinetic	Molecular Dynamics
Mikrotiterplattenreader Absorption SpectraMax 250	MWG Biotech
Brutschrank für Agarplatten	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Brutschrank für Schüttelkulturen	Adolf Kühner AG, Birsfelden, Schweiz
Chromatographiesäulen	Pharmacia GmbH, Freiburg
Eagle Eye TM II	Stratagene GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammern	HarnischmacherLabortechnik, München, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzspektrophotometer Hitachi F4500	Jouan Meßtechnik GmbH, München
French-Press	Gaulin, Wodenstadt
Kühlzentrifuge Universal 16R	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Z233MK	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen
Kühlzentrifugen Sorvall RC-3B/-5B/-5C	Du Pont GmbH, Bad Homburg
Kugelmühle	Retsch
Niederdruck-Chromatographie-Anlage	Pharmacia GmbH, Freiburg
Pipetten Gilson Pipetman	Abimed, Langenfeld
ThermoBlock Typ 5436	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler Varius V45	Landgraf, Langenhagen
Wasserbad DC1	Gebrüder Haake GmbH, Karlsruhe

2.7 Andere Materialien

Dialyse Membran Spectra Por 1 (MWCO: 6-8 kDa) 14,6 mm	Spectrum Medical Industries, Houston, Texas
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1.5/ 2 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg
Fluoreszenz-Einmalküvetten	Semadeni, Ostermundingen, Schweiz
Gel drying film	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Glasperlen Ø 0.1-0.2 mm	Bernd Euler, Frankfurt
Magnetrührfische	Roth GmbH, Karlsruhe

membraspin-micro, 10 kDa	membraPure GmbH, Lörzweiler
Nickel-NTA-Agarose, Fast Flow	Qiagen, Hilden
Quarzglas-Küvetten	Hellma GmbH & Co., Müllheim/Baden
Silikonentschäumer	Roth GmbH, Karlsruhe
Sterilfilter Millex GV	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
Ultrafiltration-Zelle, Modell 8050	Amicon GmbH, Witten
Ultrafiltration membraneYM 10	Amicon GmbH, Witten
Zentrifugenflaschen 1l / GS3 / GSA / SS34	Nalgene Company, Rochester, N.Y., USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Peske GmbH, Ainding-Pichl

3 Methoden

Die Vorschriften orientieren sich überwiegend an den von Sambrook *et al.* (1989) publizierten Protokollen. Medien werden mit entionisiertem, Puffer teilweise mit zusätzlich ultrafiltriertem Wasser angesetzt. Mischungsverhältnisse sind für flüssige Substanzen als Volumen pro Volumen (v/v) und für Lösungen fester Stoffe als Masse pro Volumen (w/v) angegeben. Molekularbiologische Arbeiten werden mit sterilen Medien und Gefäßen durchgeführt. Nach Benutzung werden alle mit Bakterien kontaminierten Geräte und Flüssigkeiten autoklaviert.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Aufbewahrung von *E. coli*

Einzelkolonien werden durch einen Verdünnungsausstrich auf Luria-Bertani-Kulturschalen (LB-Platten, je nach Stamm und Plasmid mit den entsprechenden Antibiotika versetzt) und Inkubation für 12-15 h bei 37 °C erhalten. Die Platten können, mit Parafilm verschlossen, etwa 1 Monat bei 4 °C gelagert werden. Kulturschalen werden generell auf dem Deckel liegend aufbewahrt. Für Flüssigkulturen von *E. coli* wird dem LB-Medium je nach Selektion (z.B. auf plasmidtragende Zellen) Antibiotikum zugesetzt. Nach Animpfen mit einer Einzelkolonie wird, soweit nicht anders angegeben, für ca. 12-15 h mit 200 Upm bei 37 °C geschüttelt. Die Zelldichte wird über die optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) verfolgt. Zur längerfristigen Aufbewahrung von *E.-coli*-Stämmen können Glycerinkulturen angelegt werden. Hierzu werden 700 µl einer Übernachtkultur mit 300 µl sterilem 87 % Glycerin in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und bei -80 °C gelagert. Glycerinkulturen können über mehrere Jahre aufbewahrt werden.

LB-Medium: 10 g Bacto Trypton
5 g Bacto Yeast Extract
5 g NaCl
1.3 ml 2 M NaOH; ad 1L mit entionsiertem Wasser auffüllen, autoklavieren und bei RT lagern; für Kulturschalen + 1.5 % Bacto Agar

Antibiotika-Stammlösungen: Ampicillin (Amp) 100 mg/ml in H_2O

Tetracyclin (Tet)	50 mg/ml	in Ethanol
Chloramphenicol (Cam)	30 mg/ml	in Ethanol
Kanamycin (Kan)	70 mg/ml	in H_2O

Die sterilfiltrierten, aliquotierten Stammlösungen werden bei -20°C gelagert und 1/1000 verdünnt eingesetzt.

3.1.2 Plasmid-DNA-Präparation

3.1.2.1 Plasmid-Schnellpräparation

2 ml einer Übernacht-Flüssigkultur eines plasmidtragenden *E. coli*-Stammes werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 2 min mit 18000 rcf zentrifugiert. Das Zellsediment wird in 100 µl Lösung I resuspendiert, mit 200 µl Lösung II versetzt, durch Invertieren gemischt und 5 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von 150 µl Lösung III neutralisiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wird 10 min bei 4 °C und 18000 rcf zentrifugiert. Der Überstand enthält die Plasmid-DNA und wird möglichst ohne Verunreinigungen in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des 2.5-fachen Volumen (1 ml) an 4 °C kaltem absolutem Ethanol und anschließendem Durchmischen wird die gefällte Plasmid-DNA durch Zentrifugation bei 4 °C mit 18000 rcf pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 0.5 ml 70 % Ethanol (RT) gewaschen, zentrifugiert und bei RT bis 45 °C vollständig getrocknet. Zur Entfernung der RNA wird das Pellet in 20 µl TE/RNase A gelöst. Die DNA wird bei -20 °C gelagert. Bei einem *high-copy-number*-Plasmid mit einem *Col*E1-Replikationsursprung ist eine Ausbeute von ca. 3-5 µg Plasmid-DNA pro ml Bakterienkultur zu erwarten. Die isolierte DNA ist stark durch Proteine verunreinigt. Für Anwendungen wie analytische Restriktionsverdaus ist die Reinheit jedoch meist ausreichend.

Lösung I:	50 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	10 mM	EDTA
Lösung II:	0.2 M	NaOH
	1 %	SDS (0.4 M NaOH, 2 % SDS im Verhältnis 1:1 frisch angesetzt)
Lösung III:	60 ml	5 M Kaliumacetat
	11.5 ml	Eisessig
	28.5 ml H_2O	(Endkonzentrationen: 3 M K^+, 5 M Acetat)
TE:	10 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM	EDTA

TE/RNase A: 10 mg/ml DNase-freie RNase A; 20 min bei 95-100°C in TE erhitzen, langsam abkühlen lassen und in einer Endkonzentration von 20 µg/ml einsetzen.

3.1.2.2 Qiagen- bzw. Jetstar-Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA, welche mit Hilfe des Jetstar-Mini- oder des Qiagen-Mini-Plasmid Kits nach Anleitung der Hersteller gewonnen wird, kann für Sequenzierreaktionen verwendet werden. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse und einer anschließenden Reinigung über einen Anionenaustauscher. Hier wurden 6 ml Übernachtkultur plasmidtragender *E. coli* verwendet, mit Ausbeuten von ca. 20-50 µg Plasmid-DNA

3.1.3 Präparation von Einzelstrang-DNA (Sambrook *et al.*, 1989)

1 ml 2×YT-Medium (inclusive 30 µg/ml Chloramphenicol und Antibiotikum zur Selektion auf das Plasmid) wird mit einer Einzelkolonie von *E. coli* CJ236 angeimpft und bei 37 °C mit 200 Upm geschüttelt. Sobald die Kultur eine leichte Trübung zeigt, wird sie zu 20 ml des gleichen Mediums in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit dem Phagen M13K07 (Endkonzentration 2 x 10^7 pfu/ml) transfiziert. Nach 2-stündigem Schütteln bei 37 °C und 250 Upm wird zur Selektion auf Phageninfektion Kanamycin (Endkonzentration 70 µg/ml) zugesetzt und bei 37 °C und 250 Upm weiter über Nacht inkubiert.

Die Übernachtkultur wird zweimal 5 min bei 4 °C und 12000 rcf zentrifugiert, das Zellpellet jeweils verworfen. Die Phagenpartikel werden aus dem Überstand durch Zugabe von 135 µl 20 % PEG 6000 in 2.5 M NaCl-Lösung pro ml Überstand gefällt. Nach 15 min Inkubation bei RT sowie 5 min Zentrifugation bei 12000 rcf und 4 °C wird das Pellet durch Vortexen in 500 µl TE aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach Aufschluß der Phagenpartikel durch 1 Vol. TE-gesättigtem Phenol wird bei 4 °C, 18000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die phenolische Phase erneut mit 200 µl TE extrahiert. Die Überstände werden in einem Corex-Glas vereinigt und die Einzelstrang-DNA nach Zugabe von 0.1 Vol. 8 M LiCl-Lösung mit 2.5 Vol. EtOH 1 h bei -20 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 4 °C, 12000 rcf) wird das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 min) und bei RT getrocknet. Die DNA wird in 25-50 µl TE aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Durch Elektrophorese eines Aliquots im Agarose-Gel kann die Reinheit (Anteil an M13K07) und durch Extinktionsmessung bei 260 nm die Ausbeute abgeschätzt werden (A_{260} = 1 entspricht etwa 33 µg Einzelstrang-DNA). Es sind etwa 1 µg DNA pro ml Übernachtkultur zu erwarten.

2×YT-Medium:	16 g/l	Bacto Trypton
	10 g/l	Bacto Yeast Extrakt
	5 g/l	NaCl, mit NaOH auf pH 7.4 einstellen und autoklavieren
PEG-Lösung:	20 %	PEG 6000
	2.5 M	NaCl; sterilfiltrieren

3.1.4 Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden

Oligodesoxynukleotide werden in sterilem Wasser zu einer Endkonzentration von 100 pmol/µl gelöst. Zu 200 pmol eines Oligos werden 10 µl 3× Kinase-Mix sowie 4.5 U T4-Polynukleotidkinase gegeben, der Ansatz wird mit Wasser auf 30 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 37 °C wird die Kinase durch 10 min Behandlung bei 65 °C inaktiviert. Die Lösung wird mit 70 µl Wasser aufgefüllt (Endkonzentration der phosphorylierten Oligos 2 pmol/µl) und bei -20 °C gelagert.

3× Kinase Mix:	300 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	60 mM	DTT
	30 mM	$MgCl_2$
	3 mM	ATP; zu 10 µl aliquotiert bei -20°C zu lagern

3.1.5 Mutagenese

3.1.5.1 Ortsspezifische Mutagenese

Für die ortsspezifische Mutagenese werden 5'-phosphorylierte Mutagenese-Oligodesoxynukleotide (vgl. 2.2.2.2) eingesetzt. 0.2 pmol Einzelstrang-DNA wird mit 2 pmol Mutagenese-Oligo und 1 µl 10× *Annealing*-Puffer gemischt und mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wird 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der DNA zu lösen, anschließend für 15 min bei der Oligo-spezifischen Hybridisierungstemperatur inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Zur *in vitro*-Polymerisation werden dem Ansatz 1 µl 10× Synthese-Puffer, 1 µl T4-DNA-

Polymerase (3 U) und 1 µl T4-DNA-Ligase (6 U) zugegeben. Nach vorsichtigem Schütteln wird 5 min auf Eis und 90 min bei 37 °C inkubiert.

Vor der Transformation in *E. coli* wird ein dam-Methylierungsschritt durchgeführt. Dazu wird zu dem Reaktionsansatz 1 µl 15× dam-Methylase-Puffer, 0.5 µl S-Adenosyl-methionin-Lösung und 1 µl dam-Methylase (5 U) gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird 15 min bei 65 °C inaktiviert. Der Mutageneseansatz wird mit TE-Puffer auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und kann bei -20 °C gelagert werden. Zur Transformation in *E. coli* XL1 Blue werden 10 µl eingesetzt.

10× *Annealing*-Puffer:	500 mM NaCl 200 mM Tris/HCl, pH 7.4 20 mM $MgCl_2$
10× Synthese-Puffer:	100 mM Tris/HCl, pH 7.9 50 mM $MgCl_2$ 20 mM DTT 10 mM ATP 5 mM jedes dNTPs
15× dam-Methylase Puffer:	300 mM Tris/HCl, pH 7.5 255 mM EDTA 75 mM *2*-Mercaptoethanol
S-Adenosyl-methionin-Lsg.:	2.5 mM S-Adenosyl-methionin

Alle Lösungen werden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt.
Die Hybridisierungstemperatur T_M wird nach der „2 + 4-Regel" berechnet: $T_M = 2 (n_A + n_T) + 4 (n_G + n_C)$

3.1.5.2 Mutagene Polymerase-Kettenreaktion (mPCR)

Um in das GFP-Gen zufällige Mutationen einzufügen, wird eine Polymerase-Kettenreaktion unter mutagenen Bedingungen durchgeführt (Cadwell & Joyce, 1992). 100 µl wässrige mPCR-Lösung enthalten 40 ng Templat-DNA im Vektor prSET5d, je 3 nmol *sense*- und *antisense*-Oligo, 10 mM Tris pH 8.3, 10 µg BSA, 50 mM KCl, 7 mM $MgCl_2$, 2 mM GTP, 2 mM ATP, 10 mM TTP, 10 mM CTP, 1.25 mM $MnCl_2$ und 5 U Taq-Polymerase. Das $MnCl_2$ und die Taq-Polymerase werden zuvor zusammengegeben und gut durchmischt. Die Lösung wird mit 2-3 Tropfen dünnflüssigen Paraffinöls überschichtet und in einen Thermocycler (Landgraf Varius V45) überführt. Zur Amplifikation des Templats wird die Doppelstrang-DNA zunächst aufgeschmolzen, das Oligonukleotid bei der spezifischen *Annealing*-

Temperatur T_M (vgl. 3.1.5.1) gebunden und durch die Polymerase zur Doppelstrang-DNA aufgefüllt. Hierzu wurde folgendes Programm-Muster verwendet:

1 Zyklus: 60 s 94 °C
30 Zyklen: 60 s bei 94 °C, 60 s bei 45 °C, 60 s bei 72 °C
Am Ende des Programms wurde die Probe auf 4 °C gekühlt.

Nach Ende der PCR-Reaktion wird die wässrige Phase vorsichtig abgenommen und zur Abtrennung von Templat-DNA auf einem 1 % Agarose-Gel aufgetragen. Das PCR-Fragment (1-3 µg) wird ausgeschnitten, gereinigt, mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII geschnitten und wieder aus einem Agarose-Gel aufgereinigt. Die Probe wird mit einem dephosphorylliertem Vektorfragment für 5-20 h (vgl. 3.1.10) ligiert und nach Hitzeinaktivierung dialysiert. Die resultierende Proteinbibliothek wird in *E. coli* BL21 DE3 elektroporiert. Die resultierenden Kolonien können auf gewünschte Phänotypen durchsucht werden.

3.1.6 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

3.1.6.1 Herstellung transformationskompetenter Zellen

200 ml LB-Medium (eventuell mit Antibiotika) werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit 20 ml stationärer Übernachtkultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft. Die Kultur wird bei 200 Upm und 37 °C bis zu einer OD_{600} von möglichst genau 0.94 geschüttelt, durch Schwenken in einem Eiswasserbad abgekühlt und in Zentrifugenbecher überführt. Alle weiteren Schritte erfolgen unter strikter Eiskühlung. Die Bakteriensuspension wird 15 min bei 3000 rcf und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird vorsichtig in 40 ml TfBI-Lösung resuspendiert und die Suspension in Falcongefäße überführt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 2000 rcf wird das Pellet vorsichtig in 8 ml TfBII-Lösung aufgenommen, zu je 100 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bei -80 °C mehrere Monate gelagert werden. Die Transformationseffizienz sollte für *E. coli* XL1 Blue bei ca. 10^6 Kolonien pro µg DNA liegen und für *E. coli* BL21 DE3 bei ca. 10^3 Kolonien pro µg DNA.

TfB I :	100 mM	KCl
	50 mM	$MnCl_2$
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	$CaCl_2$
	15 %	Glycerin ; Sterilfiltration der Lsg.

TfB II:	75 mM	$CaCl_2$
	10 mM	KCl
	10 mM	NaMOPS, pH 7.0
	15 %	Glycerin; Autoklavierung der Lsg.

3.1.6.2 Herstellung elektroporationskompetenter Zellen

1 l LB-Medium (eventuell mit Antibiotika) werden in einem 5 l Erlenmeyerkolben mit 10 ml stationärer Übernachtkultur (200 Upm) von *E. coli* BL21 DE3 angeimpft. Die Kultur wird bei 120 Upm und 37 °C möglichst genau bis zu einer OD_{600} von 0.94 geschüttelt, durch Schwenken in einem Eiswasserbad abgekühlt und in 0.5 l Zentrifugenbecher überführt. Alle weiteren Schritte erfolgen unter strikter Eiskühlung und im Kühlraum (4 °C), Zentrifugation bei 4 °C. Die Bakteriensuspension wird 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird zunächst in 1 l eiskaltem Wasser vollständig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Waschschritte werden nacheinander mit 500 ml und 20 ml Wasser wiederholt. Das Bakterienpellet wird in 2.5 ml einer 10 %-igen Glycerinlösung (autoklaviert) resuspendiert, zu je 40 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bei -80 °C mehrere Monate gelagert werden. Die Transformationseffizienz von sollte bei circa $2 \cdot 10^8$ Klone pro µg DNA (pRSET5d) liegen.

3.1.6.3 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Zellen wird auf Eis getaut. Etwa 0.5 -10 µl DNA-Lösung werden dazugegeben und durch mehrmaliges Aufnehmen mit der Pipette und kurzes Vortexen gemischt. Um 10-100 Bakterienkolonien zu erhalten, müssen 0.01 bis 0.1 ng (*E. coli* XL1 Blue) bzw. 10-100 ng (*E. coli* BL21 DE3) Plasmid-DNA (pRSET5d) eingesetzt werden. Der Ansatz wird nach 5-minütiger Inkubation auf Eis auf einer bei 37 °C vorgewärmte LB-Kulturschale mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die Kolonien werden nach ca. 8 h Inkubation bei 37 °C sichtbar.

3.1.6.4 Elektroporation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Ein Aliquot (40-100 µl) elektrokompetenter *E. coli* BL21 DE3 wird auf Eis getaut, mit 0.5-5 µl gegen Wasser dialysierter DNA gemischt und in die auf Eis vorgekühlten Elektroporationsküvetten pipettiert. Die Elektroporation wird bei einer Spannung von

1,25 kV pro mm Küvettendurchmesser durchgeführt. Die Zeitkonstante sollte ca. 4 betragen. Anschließend werden die Zellen sofort in 1 ml raumwarmen LB-Medium suspendiert und in ein Reagenzglas überführt. Nach 1 Stunde Inkubation (37°C, 200 Upm) werden geeignete Volumina auf vorgewärmte LB-Kulturschalen mit geeignetem Antibiotikum plattiert.

3.1.7 Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme werden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen verwendet. Bei Doppelverdaus mit unterschiedlichen Enzymen, für die der Hersteller keinen gemeinsamen Reaktionspuffer empfiehlt, wird zunächst mit dem Enzym geschnitten welches niedrigere Salzkonzentrationen benötigt. Nach Hitzeinaktivierung, meist 20 min bei 65 °C, werden die Pufferbedingungen angeglichen und die DNA mit dem zweiten Enzym verdaut.

Analytisch: Zu etwa 1 µg Plasmid-DNA werden 1-2 U der entsprechenden Restriktionsendonukleasen, 1 µl des empfohlenen 10× Reaktionspuffers und evt. 1 µl einer BSA-Lösung (1 mg/ml, Endkonzentration 100 µg/ml) gegeben. Der Ansatz wird mit sterilem Wasser auf 10 µl aufgefüllt und 1-10 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert.

Präparativ: Klonierungen von Genen werden zur Kombination oder Vereinzelung bereits vorhandener Punktmutationen sowie zum Einfügen von DNA in Vektoren verwendet. Hierzu wird mindestens soviel DNA eingesetzt, dass die entstehenden Fragmente im Agarose-Gel gut erkennbar sind (etwa 50 ng). Die gewünschten Banden werden unter langwelligen UV-Licht (um 366 nm) sorgfältig mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein zuvor abgewogenes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Masse des Gelfragments wird bestimmt.

3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Restringierte DNA-Proben werden nach Zugabe eines 6× Auftragspuffers in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Zum Größenvergleich dient ein DNA-Längenstandard. Zur Trennung von Fragmenten <500 bp wird ein 1.4-1.7 %-iges Gel, für größere Fragmente ein 0.8-1.2 %-iges Agarose-Gel verwendet. Zur präparativen Elektrophorese mit folgender Ligation im Gel (vgl. 3.1.10.1) oder Agarase-Verdau (vgl. 3.1.9) werden 0.7 -0.8 %-ige *Low-Melting*-Agarose-Gele in TAE-Puffer bei

einer Spannung von 50 V verwendet. Bei folgender Spin-Kit-Reinigung werden TBE-Agarose-Gele wie im analytischen Restriktionsverdau verwendet.

Zur Herstellung von Agarose-Gelen wird trockene Agarose im entsprechenden Volumen TBE oder TAE Puffer in einem Mikrowellenherd aufgekocht, bis eine homogene, viskose Lösung entsteht. Dieser heißen Lösung wird ein 1/10000 Vol. EtBR-Lsg. (10 mg/ml) zugegeben, um DNA durch die Fluoreszenz des interkalierenden Farbstoffes im UV-Licht (254 oder 366 nm) sichtbar zu machen. Nach Abkühlen auf unter 50 °C wird das Gel in die entsprechende Apparatur gegossen und ein Taschenformer eingeschoben. Nach dem Erstarren werden die Proben aufgetragen. Gele der Größe 10 x 15 cm werden bei 80-100 Volt, Gele der Größe 6 x 8 cm bei ca. 50 Volt in 1x TBE-Puffer gefahren. Die Laufzeiten betragen zwischen 30 und 60 min. Die Gele werden mit einem Eagle Eye II fotografisch dokumentiert.

6× Auftragspuffer:	1.5 mg/ml	Bromphenolblau
	1.5 mg/ml	Xylencyanol
	50 %	Glycerin
1× TBE-Puffer:	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA
50× TAE-Puffer:	242 g	Tris
	57.1 ml	Eisessig
	100 ml	0.5 M EDTA, pH 8.0; ad 1 l mit Wasser auffüllen

3.1.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus dem Agarose-Gel

Agaraseverdau: Aus einem 0.8-1.0 %-igem *Low-Melting*-Agarose-Gel wird ein DNA-Fragment ausgeschnitten, gewogen und mit 1/10 des Volumens an 10× β-Agarase-Puffer versetzt. Das Fragment wird 10 min bei 65 °C aufgeschmolzen, auf 40 °C temperiert, mit 1 U β-Agarase pro 100 µl Gel versetzt und unter intermediärem Vortexen mindestens 1 h bei 40 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 des Volumens an 3 M NaOAc und 150 min Inkubation auf Eis werden unverdaute Carbohydrate mit 15000 rcf abzentrifugiert. Die DNA im Überstand wird durch Zugabe und Durchmischen mit 2 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation bei 4 °C und 18000 rcf pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit 0.5 ml 70 % Ethanol (4 °C) gewaschen, zentrifugiert und bei RT bis 45 °C vollständig getrocknet.

QIAquick Gel Exctraction Kit: DNA kann mit den QIAquick-Kits schnell und effektiv nach Anleitung der Hersteller aufgereinigt werden. Die Methode beruht auf der Adsorption von DNA an einer Silicamembran bei einer hohen Konzentration an chaotropen Salzen, während die Verunreinigungen herausgewaschen werden. Die Lösungen können durch Zentrifugation in Eppendorf-Caps oder ein angelegtes Vakuum schnell durch die Membran gezogen werden. Zuvor wird die aus einem Agarose-Gel ausgeschnittene Bande mit einem Puffer versetzt und bei 50 °C aufgeschmolzen.

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Restriktion des Vektors wird das noch enthaltene Insert mit einem weiteren Enzym geschnitten. Dadurch sinkt die Häufigkeit von nur einfach restringiertem Vektor, der wieder religieren könnte. Als zusätzliche Sicherung wird der Vektor in den letzen 30 min der Restriktion durch Zugabe von Alkalischer Phosphatase (CIAP; 0.2 U/µg Vekor) dephosphorylliert. Als Kontrolle dient ein Ligationsansatz mit Vektor-DNA ohne Insert.

3.1.10.1 Ligation im Gel

Zur Umklonierung werden das gewünschte Vektorplasmid und das Insert durch Restriktion mit den gleichen Enzymen präpariert und die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem Agarose-Gel herauspräpariert (vgl. 3.1.7-3.1.9). Die Gelstücke werden bei 40° C geschmolzen und die gewünschte Kombination von Vektor und Insert in einem molaren Verhälnis von etwa 1:5 gemischt (Endvolumen 20 µl). Nach Zugabe von 1/10 Volumen 10× Ligasepuffer wird auf RT abgekühlt und ca. 2 U T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ansatz wird 1 h bei 20 °C inkubiert und danach in kompetente *E. coli* XL1 Blue transformiert (vgl 3.1.6.3).

10× Ligase Puffer:	500 mM	Tris/HCl, pH 7.8
	100 mM	$MgCl_2$
	100 mM	DTT
	10 mM	ATP
	250 µg/ml	BSA

3.1.10.2 Ligation in der Lösung

Ca. 100 ng des nach der Restriktion aus dem Agarose-Gel isolierten Vektors (vgl. 3.1.3) werden mit dem 3-fachen molaren Überschuss an Insert und ddH_2O zusammengegeben. Nach 5 min bei 45 °C wird die Lösung auf Eis gegeben und mit 1 µl 10× Ligasepuffer und 0.1 U T4-Ligase auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation bei 18 °C sollte mindestens 30 min dauern, kann aber zur Erhöhung der Ausbeute auf 12 h ausgedehnt werden. Die Transformationseffizienz wird durch abschließendes 15-minütiges Erhitzen auf 65 °C erhöht. Bei größeren Ansätzen, z. B. bei der Ligation der mPCR (vgl. 3.1.5.2), werden die DNA-Konzentrationen nicht verringert, da dann die Ligationseffizienz sinkt.

3.1.11 DNA-Sequenzierung

Für Sequenzreaktionen werden unphosphorylierte Oligodesoxynukleotide eingesetzt. Diese sind so zu wählen, dass der Abstand zwischen dem 3'-Ende des Primers und dem ersten interessierenden Nukleotid etwa 30-50 bp beträgt. Die Sequenzierungs-Oligos sollten einen T_M-Wert von 54-56 °C besitzen (vgl. 3.1.5.1). Für alle Sequenzierungen wurden die Oligos *prSET25f und prSET190r* verwendet.

Die Sequenzreaktionen wurden von der Firma Toplab, Martinsried, mit einem Cycle-Sequencing-Kit und fluoreszenzmarkierten Terminatoren nach der Kettenabbruch-Methode durch Didesoxynukleotide durchgeführt. Die Detektion und Sequenzanalytik erfolgte mit einem Automatischen DNA-Sequenzer ABI-373 A. Später wurden die Sequenzierungen mit der gleichen Methodik von der Arbeitsgruppe Helmut Blum am Genzentrum der LMU durchgeführt.

3.2 Gewinnung rekombinanter Proteine

3.2.1 Expression in *E. coli*

Die Gene der fluoreszierenden Proteine werden in *E. coli* BL21 DE3 oder *E. coli* BL21 DE3 *pLys* cytoplasmatisch exprimiert. In dem Vektor pRSET5d (Schoepfer, 1993) stehen sie unter Kontrolle des starken T7-Promoters. Das Gen für die virale T7-RNA-Polymerase ist in das Genom des Bakteriums integriert und wird durch die Bindung des lacZ-Repressors an das lacZ-Operatorgen reprimiert. Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase wird IPTG ins Medium gegeben. Dieses diffundiert

in die Bakterien und verhindert durch die Bindung an den lacZ-Repressor die Repression des lacZ-Operatorgens. Die Proteine können löslich oder unlöslich als *Inclusion Bodies* vorliegen.

In einem typischen Experiment werden 2 l Expressionskulturen angesetzt. Die Spanne reicht aber von 10 ml für einen Vorversuch bis 8 l bei großem Mengenbedarf oder schlechten Ausbeuten an löslichem Protein. Abends werden frisch transformierte *E. coli* ausplattiert und inkubiert. Am folgenden Morgen wird mit der Impföse eine gut gewachsene Kolonie in 100 ml LB-Medium mit raumwarmen Ampicillin (100 µg/ml) überführt und bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Bei deutlicher Trübung nach ca. 5-6 h wird die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindende Bakterienkultur in Medium (2 l in einem 5 l -Erlmeyerkolben, auf 37 °C vorgewärmt) überimpft und bei 37 °C und 140-160 Upm weiter inkubiert. Nach 2-5 h haben die Zellen eine OD_{600} von 0.8 erreicht und die Expression der T7-Polymerase wird durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0.5 mM; Stammlösung 1M in Wasser, sterilfiltriert) induziert. Die Kultur wird über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Zellen auf Eis oder bei 4 °C heruntergekühlt und in gewogenen 0.5 l-Becher Bechern (12 min bei 4 °C, 7000 Upm) abzentrifugiert. Der Überstand wird sorgfältig dekantiert und das feuchte Bakterienpellet (etwa 3-5 g pro l Kultur) gewogen.

3.2.2 Zellaufschluss

Das Bakterienpellet aus 3.2.1 wird in Sonifizierpuffer (2 ml/g Feuchtgewicht) resuspendiert und in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen lassen sich bereits durch dreimaliges Einfrieren bei -80 °C und Auftauen im raumwarmen Wasserbad effektiv aufschließen. Im eingefrorenen Zustand können die Proben für einige Tage gelagert werden. Die Proben werden dann für den weiteren Aufschluss und zur Fragmentierung von Nukleinsäuren auf Eis sonifiziert (Micro Tip Limit, 20× 80 %-ige Zyklen). Für größere Expressionskulturen ist alternativ, nach einmaligem Einfrieren und Tauen, die French Press eine effektive Aufschlussmethode. Nach Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 20000 Upm (ca. 50000 rcf) befinden sich die löslichen Proteine im Überstand. Zur Vermeidung einer Säulenverunreinigung der bei der nachfolgenden Reinigung über Affinitätschromatographie empfielt sich eine Wiederholung des Zentrifugationsschrittes oder eine Sterilfiltration der Proteinlösung.

Sonifikationspuffer	300 mM NaCl
	50 mM Na_2HPO_4; Einstellen auf pH 8.0 mit HCl

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Reinigung der Proteine über Affinitätschromatografie

Durch das C-terminale His_6-*Tag* kann das GFP mittels Affinitäts-Chromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) in einem Schritt zu hoher Reinheit aufgereinigt werden. Eine Säule von Nickel-NTA-Agarose (Bindekapazität 10-20 mg GFP pro ml Säulenvolumen) wird mit 4 Säulenvolumen (SV) Sonifikationspuffer äquilibriert. Der Überstand des Zellaufschlusses wird aufgetragen und durchläuft die Säule. Die Entfernung unspezifisch bindender Proteine sowie die Elution des gereinigten GFP erfolgen durch die Kompetition der Bindung mit Imidazol (in Sonifikationspuffer, pH 8.0). Dabei wird, ausgehend von 6 ml 30 mM Imidazol in Volumina von 2 SV, die Konzentration an Imidazol um jeweils 10 mM erhöht, bis das fluoreszierende Protein von der Säule auswäscht. Die Reinigung wird mit mindestens 4 SV der nächstniedrigeren Imidazolkonzentration beendet. Das über den His_6-*Tag* bindende Protein wird schließlich mit 3.5 SV Elutionspuffer (300 mM Imidazol in Sonifikationspuffer, pH 8.0) eluiert. Die Fraktionen Auftrag, Durchlauf und Eluat werden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (vgl. 3.3.2) auf Gehalt und Reinheit des exprimierten Proteins überprüft (Abb. 3.1). Bei nicht fluoreszierenden Proteinen wird durch eine Chromatographieanlage automatisch und kontinuierlich die Imidazolkonzentration im Puffer erhöht und durch die A_{280} das Elutionsprofil erstellt. Das Eluat wird dabei von einem Fraktionssammler fraktioniert. Sollte die Reinheit der Proteine nicht ausreichen, wird die gesamte Reinigung nach einer Dialyse (vgl. 3.3.3) gegen Sonifikationspuffer wiederholt. Vor einer erneuten Verwendung werden die Säulen gesäubert. Dies erfolgt mit 4 SV H_2O, 4 SV 0.1 M NaOH, 4 SV H_2O, 4 SV Regenerationspuffer (5 M technisches Guanidiniumchlorid, 100 mM EDTA und 100 mM Tris HCl, pH 8.0), 4 SV H_2O, 2 SV 100mM $NiSO_4$, 4 SV H_2O, 2 SV 40 % Ethanol. Die Aufbewahrung erfolgt in 40 % Ethanol bei 4 °C.

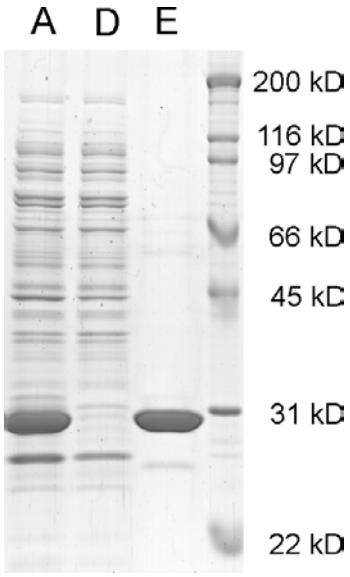

Abb. 3.1. Dokumentation der Reinigung von GFP-T203V an immobilisierten Nickel-Ionen. Coomassie-gefärbtes 10 %-iges SDS-PAGE-Gel.

Das im Cytoplasma gelöste Gesamtprotein wird auf die Säule gegeben (Auftrag, Spur A). Die *E.coli*-Proteine durchlaufen die Säule (Durchlauf, Spur D), während das GFP quantitativ an das Säulenmaterial bindet und nach den Waschschritten sauber von der Säule eluiert wird (Eluat, Spur E). In Spur A ist der hohe Anteil des GFP am gesamten löslichen Protein gut zu erkennen. Mit der T203V-Variante beträgt die Proteinausbeute ca. 30-35 mg/g Zellnassgewicht (vgl. 4.21 & 6.21).

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteine können in Polyacrylamid-Gelen nach Denaturierung mit Natriumdodecyl-Sulfat (SDS) und Reduktion nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden (Abb. 3.1). Die fluoreszierenden Proteine (ca. 28 kDa) werden gut durch ein 10 %-iges Gel unter den Pufferbedingungen von Fling & Gregerson (1986) aufgelöst.

3.3.2.1 Herstellen der Gele

Das folgende Rezept genügt zum Gießen von sechs Gelen. Für das 10 %-ige Trenngel werden 16 ml Ultrapure Protogel (30 % Acrylamid, 0.8 % Bisacrylamid), 12 ml 4× *Lower-Tris*-Puffer und 20 ml Wasser in einem Becherglas gemischt, mit 20 µl TEMED und 260 µl 10 % APS versetzt. Die Gelkammern werden damit bis ca. 2 cm unter dem Rand gefüllt. Um die Eintrocknung während der Polymerisation zu vermeiden, wird mit etwa 1 ml 50 % 2-Propanol überschichtet, welches nach erfolgter Polymerisation mit Wasser herausgespült wird. Für das 5 % Sammelgel werden 2 ml Ultrapure Protogel, 4 ml 4× *Upper-Tris*-Puffer und 10 ml Wasser mit 24 µl TEMED und 160 µl 10 % APS-Lösung angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Da die Polymerisation schnell erfolgt, wird der Taschenformer zügig eingesetzt. Die Gele können in feuchten Zellulosetüchern eingewickelt und bei 4 °C für ca. 2 Wochen gelagert werden.

3.3.2.2 Elektrophorese

Zur Elektrophorese werden die Gele in die Vertikal-Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Pufferkammern mit Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben werden mit 1/4 Vol. an 5× SDS-Auftragspuffer versetzt und zur Denaturierung 5 min auf 95 °C erhitzt. Vor dem Auftragen der Proben werden die Taschen mit Laufpuffer gespült. Die Elektrophorese erfolgt bei 100-150 Volt. Zur Visualisierung der Proteinbanden werden die Gele mit Silber oder Coomassie gefärbt.

4× lower tris Puffer:	3 M	Tris/HCl, pH 8.85
	0.4 %	SDS
4× upper tris Puffer:	0.5 M	Tris/HCl, pH 6.8
	0.4 %	SDS
5× SDS-Auftragspuffer:	50 %	Glycerin
	7.5 %	SDS
	250 mM	Tris/HCl, pH 8.0
	0.5 %	Bromphenolblau
	12.5 %	*2*-Mercaptoethanol
Fling & Gregerson Laufpuffer:	50 mM	Tris
	190 mM	Glycin
	0.1 %	SDS

3.3.2.3 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von SDS-Gelen ist sehr empfindlich, im Idealfall können Einzelbanden von 1 ng Polypeptid nachgewiesen werden. Hierzu wird das Gel durch Inkubation in den unten angegebenen Lösungen behandelt (Blum *et al*., 1987). Nach erfolgter Färbung kann es zwischen zwei feuchten Polyacetat-Folien (*Gel Drying Film*) getrocknet werden.

45’	Fixierlsg.	50 %	Methanol
		12 %	Essigsäure
		0.02 %	Formaldehyd
10’	Waschen	50 %	Ethanol
10’	Waschen	30 %	Ethanol
1’	*sensitizer*	0.2 mg/ml	$Na_2S_2O_3$
3x 30’’	Waschen		Wasser
20’	Färbe-Lsg.	1 mg/ml	$AgNO_3$
		0.03 %	Formaldehyd
2x 30’’	Waschen		Wasser
5-20’	Entwickler	40 pg/ml	$Na_2S_2O_3$
		6 %	Na_2CO_3
		0.02 %	Formaldehyd
30’-1 h	Stop-Lsg.	5 %	Essigsäure

1-10 h	Trocknungs-Lsg.	50 %	Ethanol
		5 %	Methanol
		5 %	Glycerin

3.3.2.4 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist weniger sensitiv (Detektionsgrenze 10-50 ng), dafür ist eine quantitative Abschätzung der Proteinbanden möglich. Für die Färbung wird das Gel zunächst in 0.125 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % Ethanol und 7 % Essigsäure überführt und 30 min unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung wird es zunächst 10 min in 10 % Ethanol / 7 % Essigsäure und danach in 7 % Essigsäure geschüttelt.

3.3.3 Dialyse und Konzentrierung von Proteinen

Proteinlösungen werden zweimal gegen das 100-fache Volumen des gewünschten Puffers (meist PBS, *Phosphate Buffered Saline*) entweder 3 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht dialysiert. Hierzu werden Dialyseschläuche (Spectra Por 1 aus regenerierter Cellulose mit einer Ausschlussgröße von 6-8 kDa) verwendet, die zuvor zweimal in TE-Puffer aufgekocht und bis zur Verwendung bei 4 °C in TE-Puffer steril aufbewahrt werden. Nach der Dialyse werden die Proteine sterilfiltriert und nach Zugabe von 1/100 Vol. 2 % NaN_3-Lösung bei 4 °C oder -20 °C aufbewahrt.

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgt durch Ultrafiltration an einem Membranfilter. Dazu wird eine Amicon 8400 bzw. 8050 Ultrafiltrationszelle mit Magnetrührer und einer YM10 Membran (Ausschlussgröße 10 kDa) verwendet, in der die Proteine unter einer Stickstoffadruck von 3-4.5 bar bei 4 °C konzentriert werden. Volumina bis 4 ml können durch Zentrifugation mit membraspin-micro-Gefäßen bei 5000 rcf, 4 °C aufkonzentriert werden.

PBS	4 mM	KH_2PO_4
	16 mM	Na_2HPO_4
	115 mM	NaCl
	pH ist 7.4	

3.4 Spektroskopische Methoden

3.4.1 Absorptionsspektroskopie

Für alle absorptionsspektroskopischen Untersuchungen wird ein Uvikon 941 UV/Vis-Spektrophotometer benutzt. Für die Bestimmung der OD_{600} von Bakterien wurde teilweise alternativ ein MWG Biotech SpectraMax 250 Mikrotiterplattenreader verwendet. Die Auflösung beträgt 2 nm. Die Proteine wurden, wenn nicht anders erwähnt, in PBS-Puffer pH 7.4 vermessen.

3.4.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben erfolgt durch Bestimmung der A_{260} in 60 µl Quarzglas-Mikroküvetten. Für Doppelstrang-DNA entspricht eine Absorptionseinheit 50 µg/ml, für Einzelstrang-DNA 40 µg/ml.

3.4.1.2 Absorptionsspektren von Proteinen

Absorptionsspektren von Proteinlösungen werden durch Messung der Extinktion im Wellenlängenbereich in 1 oder 0.5 ml Quarzglas-Küvetten mit 10 mm Weglänge bestimmt. Als Referenz wird eine gleiche Lösung ohne Protein (Dialysepuffer) in den zweiten Strahlengang des Photometers gestellt. Im Optimalfall sollte die maximale Absorption 0.1-1 betragen. Bei hohen Proteinkonzentrationen wird deshalb eine 0.5 ml Fluoreszenzküvette quer in den Strahlengang gestellt (2 mm Weglänge). Für sehr hohe Konzentrationen wird eine Spezialküvette mit 0.2 mm Weglänge verwendet. Die Scangeschwindigkeit beträgt 200 oder 500 nm/min bei 0.5 nm Schrittweite. Der Auflösung beträgt 2.5 nm.

3.4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt für reine Proteine durch Messung der Absorption bei 280 nm in 1 ml Quarzglas-Küvetten und nach Denaturierung in konzentrierter GdmCl-Lösung (5-6 M). Da in vollständig denaturierten Proteinen alle Chromophore die gleiche chemische Umgebung besitzen, gilt für ihren molaren Absorptionskoeffizienten folgende Relation (Gill & von Hippel, 1989),

$$\varepsilon_{280} = 5690 \cdot n_W + 1280 \cdot n_Y + 120 \cdot n_{SSBr}$$

mit n_w Anzahl der Tryptophane, n_Y Anzahl der Tyrosine und n_{SSBr} Anzahl der Disulfidbrücken im Molekül. Ist das Verhältnis der molaren Absorptionskoeffizienten im gefalteten und entfalteten Protein bekannt, kann die Proteinkonzentration auch im nativen Zustand bestimmt werden.

3.4.1.4 Bestimmung der Bakterienkonzentration

Zur Ermittlung der Bakteriendichte wird von ~0.8 ml einer Suspension in einer Einweg-Absorptionsküvette die OD_{600} gemessen. Neben der Absorption ist dabei die Lichtstreuung von maßgeblichen Einfluss. Diese ist aufgrund der unterschiedlichen Bauweisen von Absorptionsspektrometern gerätespezifisch. Für die Messung von 0.2 ml Suspension in 96-Well-Mikrotiterplatten wurde anhand einer Verdünnungsreihe eine Eichkurve erstellt. Im verwendeten Messbereich entspricht die OD_{600} in den Mikrotiterplatten dem im Absorptionsspektrometer ermittelten und mit 0.299 multiplizierten Wert.

3.4.2 Fluoreszenzmessungen von Proteinen

Für die Aufnahme von Fluoreszenz-Spektren werden alle Puffer partikelfiltriert (0.2 µm) und entgast. Die Auflösung für die Exzitation und Emission ist, wenn im einzelnen nicht anders angegeben, 2.5 oder 5 nm. Exzitationsspektren wurden immer für Geräteparameter korrigiert gemessen, über 600 nm herausgehende Emissionsspektren konnten nur unkorrigiert aufgenommen werden. Die Scangeschwindigkeit beträgt 60 nm/min.

Teilweise wurden auch Spektren direkt aus Suspensionen mit *E. coli* BL21 DE3 aufgenommen. Dazu werden 1-3 Kolonien mit der Impföse von der Petrischale abgekratzt, in PBS suspendiert und in Einwegküvetten auf eine OD_{600} von 0.02-0.1 verdünnt. Fluoreszenz-Intensitätsmessungen wurden auch in 96-Well-Mikrotiterplatten mit einem Molecular Dynamics Biolumin 960 Reader durchgeführt. Die Einstellung der Exzitations- und Emissionswellenlängen erfolgte über Filter mit einer Durchlassbreite von ±10 nm, die Messzeit pro Well wurde auf 0.1 s eingestellt.

3.5 Computer-Analysen

Kristallstrukturen von Proteinen werden mit dem Programmpaket *InsightII* 2.3. (Biosym Technologies Inc.) oder *RasMac* visualisiert. DNA- und Proteinsequenz-Analysen, wie die Erstellung der Restriktionsanalysen, Planung von Oligodesoxynukleotiden für ortsspezifische Mutagenesen und Sequenzvergleiche, werden mit Hilfe des *Sequence Analysis Package* der Genetics Computer Group, University of Wisconsin (UWGCG, Devereux *et al*., 1984) oder *GeneDoc* (K. Nicholas) durchgeführt. Spektren und Kinetiken werden mit *Kaleidagraph* (Abelbeck Software) oder *Microcal Origin* (Microcal Software, Inc.) ausgewertet.

4 Die Mutationsserie an T203

4.1 Motivation

In wt-GFP besteht mit einer Wasserstoff-Brücke von T203(O^{γ}) nach Y66(O^{η}) eine direkte Interaktion zwischen Seitenkette 203 und dem R^--Chromphor (Abb. 4.4). Mit dem Austausch von Thr203 gegen Leu, Ile, Met, His, Phe, Tyr und Trp wird der diesbezügliche Einfluss von Polarisierbarkeit und Größe aliphatischer und aromatischer Substituenten als Einzelmutationen untersucht. Für die größeren substituierten Seitenketten steht über dem Chromophor eine Kavität von ~135 $Å^3$ (Ormö *et al*., 1996) zur Verfügung. Diese ist im wt-GFP mit vier Wassermolekülen besetzt, deren möglicher Einfluss auf die spektralen Eigenschaften des Chromophors durch die Mutationsserie experimentell zugänglich wird.

Mutationen an der Position 203 wurden von anderen Autoren bis auf T203I (Ehrig, *et al*., 1995) immer gemeinsam mit anderen Mutationen untersucht (T203I bei Heim *et al*., 1994 sowie T203H, T203Y und T203W bei Ormö *et al*., 1996). Die beobachteten Verschiebungen im Grundzustandsgleichgewicht zwischen RH und R^- sowie veränderte Absorptions- und Emissionsmaxima sind deshalb nur schwer molekularen Mechanismen zuzuordnen. Varianten mit der Mutation T203Y erreichen die stärkste Emissionsrotverschiebung gegenüber wt-GFP. Für multispektrale Analysen oder FRET (vgl. 1.5) sind diese *Yellow Fluorescing Proteins* (YFPs) besonders gut geeignet. Auch für diese Rotverschiebung gibt es, trotz vorliegender Röntgenstrukturen, keine einhellige Begründung (Ormö *et al*., 1996; Wachter *et al*., 1998 & Weber *et al*., 1999). Die YFPs zeigen nach Anregung von RH zudem einen starken Verlust an Fluoreszenzquantenausbeute (Kummer *et al*., 1998). In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Michel-Beyerle sollen fluoreszenzkinetische Messungen an den Einfachmutanten als Grundlage für mechanistische Modelle dienen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Proteinausbeuten in *E. coli*-Expressionskulturen

Die Proteine wurden parallel in 20 ml Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert und die lösliche Fraktion in 300 µl Ni-NTA-Säulchen aufgereinigt. Die Ausbeuten von cytoplasmatisch gelöstem Protein sind im Verhältnis zum Wildtyp bei V203 ca. 3-fach höher (Abb. 4.1). Mit der Mutation T203Y erhöhen sich die Proteinausbeuten leicht, der Austausch gegen das hydrophobe Phenylalanin bzw. Methionin oder Tryptophan führt zu Ausbeuten deutlich unter 1 % des Wildtyp-Wertes.

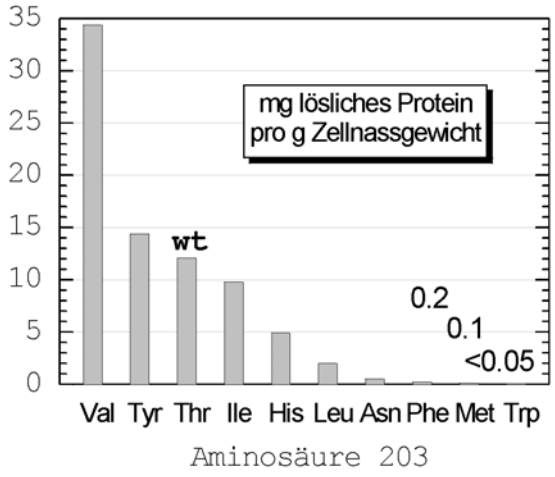

Abb. 4.1. Ausbeute an cytoplasmatisch löslichem Protein nach der Expression in *E.coli* BL21 DE3 und Reinigung mittels Affinitätschromatografie.

4.2.2 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Grundzustandsgleichgewicht: Das Grundzustandsgleichgewicht zwischen den beiden Chromophorspezies RH und R^- wird durch Verhältnis ihrer Absorptionsintensitäten in den Maxima (bei 400 nm und bei 480-510 nm) reflektiert (dividiert durch die Extinktionskoeffizienten). Ändert sich in den Proteinen das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten von RH und R^- nicht erheblich, verschieben die Substitutionen das Gleichgewicht meist zu RH, während die Absorption von R^- kaum noch sichtbar ist (Abb. 4.2). Nur die Mutationen T203Y und besonders T203F bewirken eine starke Populierung von R^-.

R^--Absorptionsspektrum: Das R^--Absorptionsspektrum von wt-GFP ist breit mit einem auslaufenden langwelligen Rand. Alle an T203 substituierten Proteine unterscheiden sich hier durch ein schmaleres Spektrum mit einer deutlichen kurzwelligen Schulter und einem steil abfallenden, langwelligen Rand. (Abb. 4.2 &

4.3 links). Im Vergleich mit wt-GFP verschiebt sich $\lambda_{Abs}(R^-)$ bei den aliphatisch substituierten Proteinen von 477 nm auf 494-500 nm. Dies entspricht einer Abnahme von 720-960 cm^{-1} (Tab. 4.1). (An geeigneter Stelle werden Differenzen in Wellenzahlen statt in Wellenlängen angegeben, da dann eine Proportionalität zur Energie gegeben ist.) Bezogen auf die V203-Variante bewirken die aromatischen Substituenten noch zusätzliche Rotverschiebungen mit Abnahmen von 160-430 cm^{-1}.

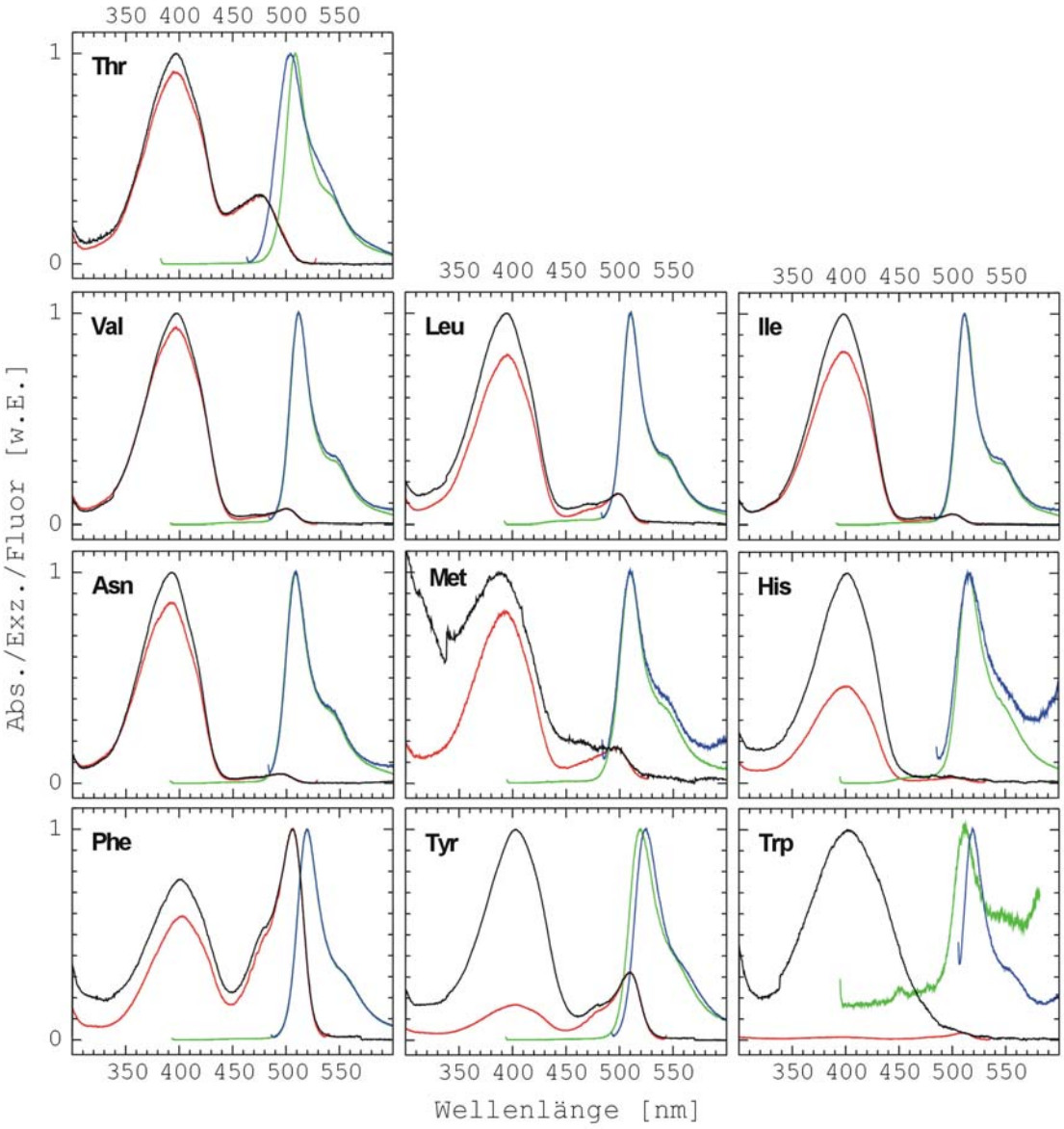

Abb. 4.2. Spektrale Eigenschaften der an T203 substituierten GFP-Varianten. Der R^--Peak des Anregungsspektrums (rot, λ_{Em}= 530-540 nm) wurde je auf den des Absorptionsspektrums (schwarz) normiert. Emissionsspektren nach Anregung von RH (grün, λ_{Ex}= 390 nm) bzw. R^- (blau, λ_{Ex}= 5-15 nm kürzerwelliger als λ_{Abs}). Die Proteinkonzentrationen betragen 5-7 μM, bei den Varianten M203 bzw. W203 etwa 1 bzw. 2 μM. Wegen der geringen Ausbeuten ließen sich diese beiden Proteine zudem nicht vollständig aufreinigen.

RH-Absorptionsspektrum: Die Form des Absorptionsspektrums von RH bleibt, im Gegensatz zu dem von R^-, relativ konstant. Die aliphatisch substitutierten Proteine absorbieren hier eher blauverschoben zwischen 389 und 398 nm (wt-GFP: 397 nm), die absorbierte Energie nimmt damit bis 520 cm^{-1} zu. Die aromatischen Seitenketten bewirken dagegen wieder Rotverschiebungen auf 401-403 nm, eine Abnahme von 250-380 cm^{-1}.

	λ_{Abs} (RH) (nm)	λ_{Abs} (R^-) (nm)	ΔE_{Abs}(RH) rel. zu wt (cm^{-1})	ΔE_{Abs}(R^-) rel. wt (cm^{-1})	ΔE_{Abs}(R^-) rel. V203 (cm^{-1})	λ_{Em} (RH ang.) (nm)	λ_{Em} (R^- ang.) (nm)
Thr (wt)	397	477	0	0	924	509	505
Val	397	499	0	- 924	0	511	511
Leu	395	499	128	- 924	0	511	511
Ile	398	500	- 63	- 964	- 40	511	511
Asn	393	494	256	- 721	203	508	509
Met	389	497	518	- 844	81	510	510
His	402	503	-313	-1084	-159	515	516
Phe	402	506	-313	-1202	-277	520	520
Tyr	403	510	-375	-1357	-432	520	525
Trp	401	509	-251	-1318	-394	512	519

Tab. 4.1. Spalte 1 & 2: Absorptionsmaxima von RH und R^- in T203-substituierten GFP. Wenn λ_{Abs} (R^-) nicht genau bestimmbar war, wurde der äquivalente Wert aus λ_{Ex} (R^-) verwendet. Spalte 3-5: Differenz der Absorptionsmaxima zum wt-GFP bzw. zu der V203 Variante in Wellenzahlen. Spalte 6 & 7: Emissionsmaxima nach Anregung von RH bzw. R^-.

Emissionsspektrum: Das Emissionsspektrum von wt-GFP ist bei Anregung von RH gegenüber der Anregung von R^- um 4 nm längerwellig (λ_{Em}= 509 bzw. 505 nm) und etwas schmaler geformt (Tab. 4.1 & Abb. 4.3 rechts).

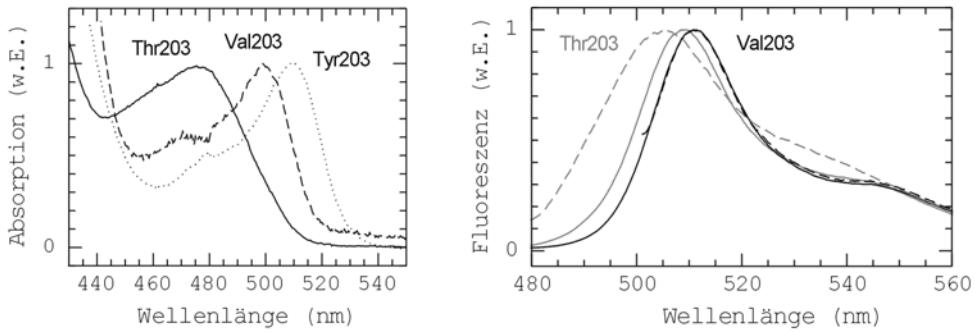

Abb. 4.3. Links: Absorptionsspektren von repräsentativen T203-Varianten gegenüber wt-GFP (Auf den R^--Peak normiert). Rechts: Emissionsspektren nach Anregung von RH (solide) und R^-(gestrichelt).

Diesen Phänotyp zeigen alle an T203 substituierten Proteine sowohl bei Anregung von RH als auch von R^-. Die Emissionspektren nach Anregung von RH bzw. R^- sind, außer bei wt-GFP sowie der Y203- und W203-Variante, kaum unterscheidbar; ihre Form ist spiegelbildlich zur vibronisch strukturierten R^--Absorption der mutierten Proteine. Das Emissionsmaximum liegt bei den nichtaromatischen Substituenten bei 508-511 nm. Die aromatischen Substitutionen bewirken eine auf 512-525 nm rotverschobene Emission, gegenüber 509 nm eine Abnahme von 240-580 cm^{-1}.

4.2.3 Quantenausbeuten und kinetische Parameter

Werden die Anregungsspektren für die grüne Emission und die Absorptionsspektren in R^- auf denselben Wert normiert, so entspricht die Effizienz des ESPT (vgl. 1.4) dem Verhältnis der entsprechenden Wert in RH. (Dies gilt nur unter der Voraussetzung, dass die emittierenden Spezies dieselben Fluoreszenzquanten-ausbeuten aufweisen. Der Messfehler ist umso größer, je kleiner und verrauschter die R^--Absorption ist, besonders bei den Varianten M203, H203 und W203). Demnach vollziehen bei aliphatischen Seitenketten an Position 203 80-93 % der RH*-Chromophore den ESPT, während die Werte für die aromatisch mit Phe, His, Tyr und Trp substituierten Proteine nur ca. 77 , 46 , 17 und 0.3-2 % betragen (Abb. 4.2). Die Histidin-Variante zeigt gleichzeitig eine deutliche blaue RH*-Emission.

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Michel-Beyerle wurden die fluoreszenzkinetischen Parameter von sechs der Proteine gemessen. Die durchschnittliche Lebensdauer von RH* lag für die Varianten V203, I203, F203 und H203 bei 60 ps, für wt-GFP (T203) bei 28 ps und für Y203 nur bei 9 ps. Die Y203-Variante zeigte mit 1.6 ps außerdem die schnellste Fluoreszenz-*Decay*-Komponente von RH*. Dabei ähneln sich der zeitliche Verlauf der Abnahme von RH* und der Wiederbesetzung von RH (mit transienter Absorption gemessen).

4.3 Diskussion

4.3.1 Proteinausbeuten in *E. coli*-Expressionskulturen

Für die teilweise äußerst niedrigen Ausbeuten an löslichem Protein bei der zytoplasmatischen Expression gibt es eine Reihe von Ursachen. Eher unwahrscheinlich ist bei den hier diskutierten Punktmutationen eine wesentlicher Einfluß von Transkriptions- und Translationsgeschwindigkeit. Bei niedriger

thermodynamischer Stabilität ist ein proteolytischer Abbau der ungefalteten Polypeptidkette möglich. Ist dagegen die Kinetik der Faltungsreaktion langsam, können Faltungsintermediate mit exponierten hydrophoben Seitenketten irreversibel aggregieren (Rudolph & Lilie, 1996). Dieser Prozess wird durch die hohe Proteinkonzentration bei einer Überexpression gefördert (Kieferhaber *et al*., 1991). Kompliziert wird die Betrachtung des GFP in dieser Hinsicht, dadurch daß das Protein nach seiner ersten Faltung autokatalytisch seinen Fluorophor ausbildet. Da die thermodynamische Stabilität von nativem wt-GFP sehr hoch ist (Ward *et al*., 1980; Bokman & Ward, 1981), könnte eine Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein eher auf eine effektivere Faltung des Proteins vor Ausbildung des Fluorophors hinweisen. Die Folge wäre ein geringerer Anteil unlöslicher Aggregate, *Inclusion Bodies*, am Gesamtprotein der Zelle; was experimentell bestätigt wird (Heim *et al*., 1994; Crameri *et al*., 1995 & Cormack *et al*., 1996; vgl. auch 7.3.3.1). Eine niedrigere Ausbeute an löslichem Protein kann dagegen auch auf eine starke thermodynamische Destabilisierung des nativen Proteins zurückzuführen sein. Dabei sollten bei einer Expression in 28 °C, wie durchgeführt, nahezu alle löslichen GFP-Moleküle einen funktionalen Chromophor gebildet haben (Patterson *et al*., 1997).

Das hydrophile Threonin an Position 203 ist bezüglich der Ausbeute an löslichem Protein nicht die optimale Aminosäure. Dies scheint sicht aber nur auf die Polarität und nicht auf die Raumstruktur der Aminosäure zu beziehen, denn mit dem zu Threonin sterisch ähnlichem Valin ergeben sich die höchsten Proteinausbeuten, die in der Reihenfolge I203 und L203 wieder deutlich abnehmen. Tyrosin und Phenylalanin sind sterisch ebenfalls ähnlich. Da beide Substituenten vergleichbare Fluoreszenzrotverschiebungen verursachen, scheinen die Seitenketten im Protein gleichartig räumlich positioniert zu sein (vgl. 4.3.3). Die Ursache der geringen Proteinausbeute mit dem unpolaren F203 liegt daher wahrscheinlich in der kinetisch oder thermodynamisch gestörten Faltung. Möglicherweise wird eine hydrophile Funktion in der Position des phenolischen Sauerstoffs von Tyrosin benötigt (siehe Röntgenstruktur 1YFP; Wachter *et al*.; 1998). Bei der W203-Variante dürfte auch die Größe der Seitenkette, welche die Aufnahmekapazität der ~135 $Å^3$-Kavität bei weitem übersteigt, störend sein. Palm *et al.* (1997) vermuten, dass schon die Größe der zentralen α-Helix die Formierung des β-*barrels* erschwert.

4.3.2 Die Seitenkette 203 interagiert mit dem Chromophor

Die zentralen Eigenschaften der an T203 substituierten Proteine sind (i) die stark nach RH verschobenen Grundzustandsgleichgewichte, (ii) die übermäßige

Rotverschiebung der Absorption von R^- sowie (iii) die Ununterscheidbarkeit der Emissionsspektren nach Anregung von RH bzw. R^- (Abb. 4.2 & 4.3, Tab. 4.1). Diese Eigenschaften stehen in ursächlichem Zusammenhang. In wt-GFP wird die negative Ladung am phenolischen Sauerstoffs des Chromphors durch eine Wasserstoff-Brücke mit T203(O^γ) stabilisiert (Ormö *et al*., 1996 & Brejc *et al*., 1997). Wird der Wasserstoff-Donor durch die Mutagenese deletiert, verschiebt sich deshalb das Gleichgewicht stark zugunsten von RH. (Eine strukturelle Interpretation zum Grundzustandsgleichgewicht erfolgt in 5.3.3). Eine Ausnahme bilden dagegen die Proteine mit F203 und Y203, bei denen spezifische Wechselwirkungen mit den Phenolringen anscheinend die negative Ladung des Chromophors delokalisieren und damit R^- stabilisieren (vgl. Kummer *et al*., 2000).

Worin liegt die Ursache für die starke rotverschobene R^--Absorption schon durch die aliphatischen Substitutionen von T203? Die Anwort liegt, ebenso wie bei der RH-Stabilisierung im Grundzustandsgleichgewicht, in der Abwesenheit der Wasserstoff-Brücke, welche im R^--Zustand zwischen T203(O^γ) und Y66(O^η) besteht. Die Deprotonierung des Chromophors im wt-GFP verschiebt die Elektronendichte in den Imidazolring (Voityuk *et al*., 1998 & 1998b) und hat eine starke Rotverschiebung der Absorption von 397 auf 476 nm zur Folge, entsprechend einer Abnahme um 4180 cm^{-1}. Durch die Deletion der Wasserstoff-Brücke ergibt sich eine zusätzliche Absorptions-Rotverschiebung von 476 auf 499 nm, entsprechend einer Abnahme um 970 cm^{-1} (Tab. 4.1). Dies wird in theoretischen Berechnungen am Zwitterion des GFP-Chromophor vorausgesagt (Voityuk *et al*., 1997). Die Erhöhung der Distanz *r* von Y($O^{\eta-}$) zu einem Wasserstoff-Brückenbindungspartner H_3O^+ führt zu einer kontinuierlichen Rotverschiebung, die mit zunehmder Distanz konvergiert. Für *r*= 2.6 Å (aus Röntgenstrukturen für wt-GFP (R^-) abgeschätzte Distanz von T203(O^γ) nach Y66($O^{\eta-}$) errechnet sich ein Absorptionsmaximum von 475 nm, bei *r*= 3.5 Å bzw. *r*= 5.0 Å Maxima von 501 nm bzw 503 nm (Voityuk *et al*., 1997). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Werten der aliphatischen T203-Substituenten. Für eine Verschiebung der Elektronendichte in den Imidazolring durch die aliphatischen T203-Mutationen spricht auch der deutlich verringerte Stokes-Shift von R^-, z.B. von 1160 cm^{-1} auf 470 cm^{-1} durch die Mutation T203V. Der Stokesshift (Differenz zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge) stellt die Reaktion der Umgebung auf die Dipolmomentsänderung durch die Anregung dar. Die Anregung des Chromophors führt ebenfalls zu einer Verschiebung der Elektronendichte, genauer zum Imidazol-Sauerstoff (Bublitz *et al*., 1998 & Voityuk *et al*., 1998b). Dies bewirkt letztendlich auch die Azidität des RH*-Chromophors und den folgenden ESPT (vgl. 1.4).

Die starke Absorptionsrotverschiebung (gegenüber wt-GFP) auf 510 nm bei den Y203-Varianten kann also, entgegen Vermutungen (Ormö *et al*., 1996 & Wachter *et al*. 1998), nur zu maximal 2/3 auf den vorgeschlagenen π-π-Wechselwirkungen beruhen. Auch ein Zusammenhang mit der Größe des Substituenten, wie in Betracht gezogen (Palm & Wlodawer, 1999), kann hier nicht bestätigt werden. Um eben diese zusätzlichen Verschiebungen in der R^--Absorptionswellenlänge zu dokumentieren, kann die V203-Variante als Referenz verwendet werden (Tab. 4.1). Für alle substituierten Proteine sind die Änderungen der Anregungsenergien von RH und R^- ähnlich. Die Proteine mit aromatischen Seitenketten an Position 203 zeigen für beide Grundzustandsspezies Abnahmen von 160-430 cm^{-1} (bathochrome Shifts), die jeweils mit ähnlich rotverschobenen Emissionswellenlängen einhergehen. Diese Effekte sprechen für die prognostizierten π-π-Wechselwirkungen und legen nahe, dass die eingeführten Aromaten eine zum Chromophor ähnlich koplanare und dicht benachbarte Position einnehmen, wie in der Röntgenstruktur einer Y203-Mehrfachmutante sichtbar (Wachter *et al*., 1998; vgl. Abb. 7.3). Andererseits errechnen Weber *et al*. (1999) auf der Grundlage der koplanaren Y203-Tyrosylgruppe eine stärkere Vergrößerung des Dipolmoments im Grundzustand als im angeregten Chromophor. Daraus folgt eine Blauverschiebung der R^--Absorption um theoretisch 59 nm statt der experimentell ermittelten spezifisch aromatisch verursachten Rotverschiebungen. Die Kopplung der aromatisch verursachten Rotverschiebung mit der phenolischen Stabilisierung der R^--Spezies im Grundzustandsgleichgewicht kann in Kapitels 7.3.3.2 durch kompensatorische Mutationen experimentell belegt werden.

Die Mutationen T203N und T203M können die Absorptionsmaxima der Proteine um ähnliche Energiewerte blauverschieben, wie die aromatisch verursachten Rotverschiebungen. Dies deutet auf andere Interaktionen mit dem Chromophor hin.

4.3.3 Die B-Spezies kann nur mit T203 ausgebildet werden

In ihrem Modell zu strukturellen Grundlagen in GFP bezeichnen Brejc *et al*. (1997) die R^--Spezies im Grundzustandsgleichgewicht als B-Spezies (vgl. 1.4). Die Anregung von RH (A-Spezies) resultiert nach der schnellen Deprotonierung in der nur als intermediär angenommenen fluoreszierenden I*-Spezies. Diese gleicht strukturell der A-Spezies, während sich die B-Spezies vor allem durch die Wasserstoff-Brücke von T203(O^{γ}) nach Y66(O^{η}) unterscheidet (Abb. 4.4). Deshalb müsste bei aliphatischen T203-Substitutionen, speziell der sterisch ähnlichen Mutation T203V, die R^--Spezies strukturell mit der I-Spezies in wt-GFP identisch sein.

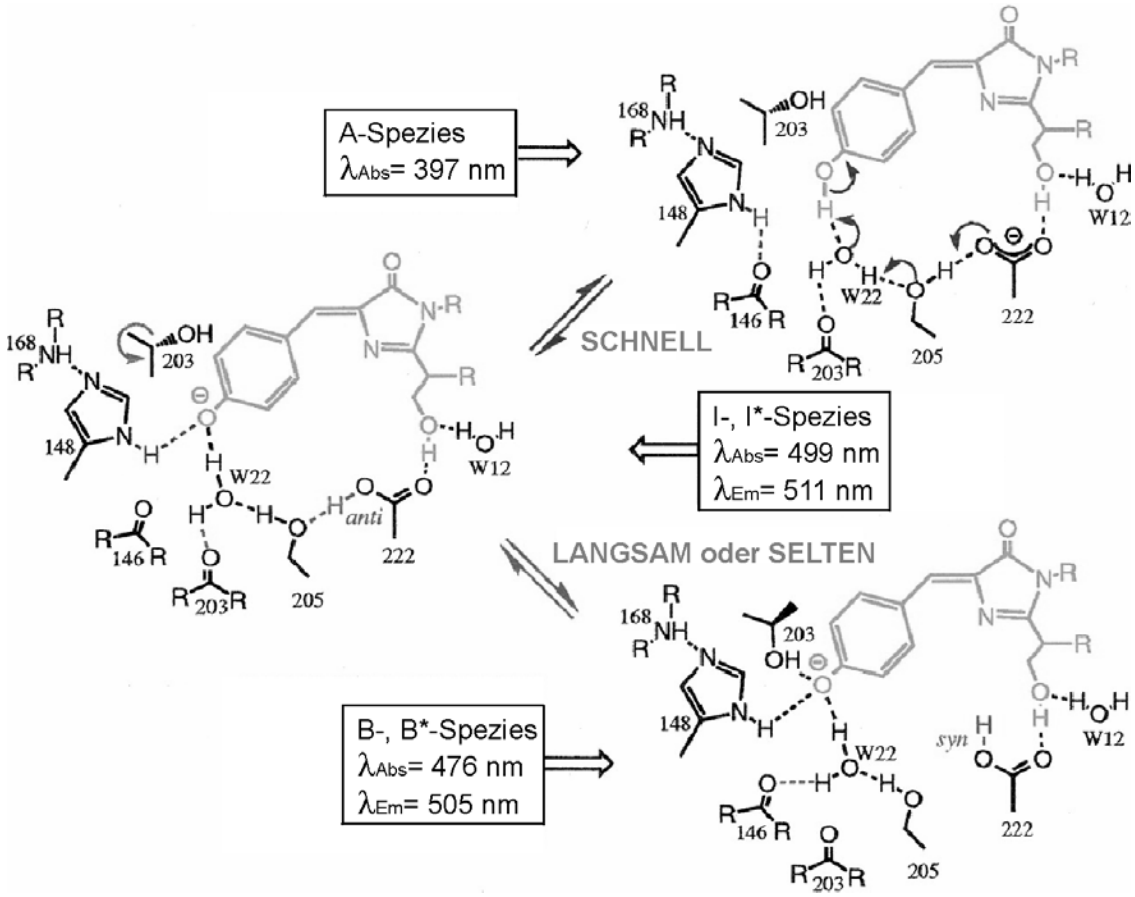

Abb. 4.4. Strukturelles Modell zur Photoisomerisation der Grundzustandsspezies A, B und I in wt-GFP (Brejc *et al*., 1997; modifiziert). Das Modell wurde nach Röntgenstrukturen von wt-GFP und der R^--Variante S65T erstellt. Danach stabilisiert das negativ geladene E222 elektrostatisch das Proton am phenolischen Sauerstoff des Chromophors. Nach Anregung der A-Spezies (RH) wird in einer schnellen Umlagerung des beteiligten Wasserstoff-Brückennetzwerkes das Proton auf E222 übertragen, es entsteht intermediär die I*-Spezies. Nach der Lichtemission kann die I- zur A-Spezies revertieren oder zur B-Spezies konvertieren. Die strukturellen Änderungen beruhen dabei vor allem auf einer Rotationsbewegung der Seitenkette von T203. Diese Schlussfolgerung ziehen auch Palm *et al.* (1997).

Tatsächlich sind hier, im Gegensatz zu wt-GFP, die Emissionsspektren nach Anregung von RH bzw. R^- bis zur Ununterscheidbarkeit ähnlich (Abb. 4.2 & 4.3, Tab. 4.1), ein Hinweis auf die Ähnlichkeit oder Identität der emittierenden Chromophorspezies. Zudem ähneln die Emissionsspektren dem von wt-GFP nach Anregung von RH sowohl im Kurvenverlauf als auch im Emissionsmaximum. Die durch die T203-Substitutionen gegenüber der B-Spezies isolierte I-Spezies unterscheidet sich also von dieser sowohl in ihrer langwelligeren Absorption (vgl. 4.3.2) als auch im Emissionsspektrum. Beides harmoniert mit dem Modell von Brejc

et al. (1997). Die Grundzustandsspezies A, B und I werden besonders in Kapitel 5, aber auch in Kapitel 6 näher untersucht.

4.3.4 Energieverlust von RH* durch Aromaten an Position 203

In der T203Y-Variante geht die schnelle Abnahme der RH*-Population mit einer zeitlich ähnlich verlaufenden Wiederbesetzung von RH einher. Anscheinend wird RH* direkt wieder zu RH konvertiert, wobei die Anregungsenergie strahlungsfrei verloren geht. Diese Abnahme von RH* dominiert über den ESPT und erklärt den starken Verlust an Fluoreszenzquantenausbeute in der T203Y-Variante (vgl. Kummer *et al*., 2000). Welcher molekulare Mechanismus liegt dem zugrunde?

Für den Chromophor im elektronischen Grundzustand ist die potentielle Energie minimal, wenn Imidazol- und Phenolring koplanar positioniert sind (vgl. Abb. 7.3). Dagegen ist das Energieminimum für den elektronisch angeregten Chromophor eine Konfiguration, in der die beiden Ringsysteme orthogonal zueinander stehen. Dies kann durch Rotation um die exozyklischen Bindungen erreicht werden (Weber *et al*., 1999). Ist dann eine ausreichende Überschneidung mit dem Energieprofil des Grundzustandschromophors gegeben, kann die Anregungsenergie statt durch Emission eines Photons durch mechanische Relaxation thermisch abgegeben werden. Man spricht dabei von "innerer Konversion". Weitere Beispiele für diesen Mechanismus, der zu einer wesentlichen Verringerung der Fluoreszenzquantenausbeute führen kann, sind das Stilben (Waldeck, 1991; Gano *et al*., 1997; Lewis & Yang, 1997), das *Photoactive Yellow Protein* (Xie *et al*., 1996 & Hoff *et al*., 1994) oder das Rhodopsin (Kochendörfer *et al*., 1995; Spudich *et al*., 1995 & Warshel, 1976). Aufgrund eines derartigen thermischen Verlustes der Anregungsenergie fluoresziert der GFP-Chromophor im entfalteten Protein nur, wenn beispielsweise mit Tieftemperatur oder durch viskose Lösungsmittel (A. Kummer, pers. Mitt.) die mechanische Relaxation verhindert wird. Im nativen GFP verhindern dagegen die Wechselwirkungen mit der rigiden Proteinmatrix den strahlungsfreien Verlust der Anregungsenergie (Voityuk *et al*., 1998 b & Helms *et al*., 1999). Da der Imidazolring im Protein fixiert ist, bleibt für eine mechanistische Erklärung des strahlungslosen Energieverlustes in der Y203-Variante nur eine Rotation des Y66-Phenolringes um die exozyklischen Bindungen φ oder τ bzw. beide gleichzeitig (*Hula-Twist*; Weber *et al*., 1999). Die entsprechenden Energieprofile in Abhängigkeit vom Bindungswinkel können sich durch den Protonierungsgrad der Tyrosylgruppe und des heterozyklischen Stickstoffs N^1 (Abb. 1.4) sowie durch sterische Gegebenheiten ändern (Weber *et al*., 1999 & Voityuk *et al*., 1998b). In Proteinen sind

Phenolringe oft rechtwinklig zueinander positioniert, so das diese *T-Geometrie* gegenüber der Koplanarität (*Sandwich-Geometrie*) eventuell energetisch äquivalent oder begünstigt ist. Die im Grundzustand annähernd koplanaren Phenolringe von Y203 und Y66 könnten durch Rotation um φ oder den *Hula Twist* eine nahezu perfekte *T-Geometrie* erreichen (Weber *et al*., 1999). Eine andere Erklärung für die schnelle strahlungslose Konversion von RH* zu RH bietet eine Veränderung der Partialladung des heterozyklischen Stickstoffs (N^1) durch eine Wasserstoff-Bindung mit E222 (vgl. Abb. 1.4). Dies ist exklusiv in Röntgenstrukturen von Y203/G65-Varianten gegeben (Wachter *et al*., 1998). Eine größere Seitenkette an Position 65, wie in der hier verwendeten Y203-Variante mit S65 gegeben, schirmt aber wahrscheinlich N^1 vor derartigen Wechselwirkungen sterisch ab. Gerade durch die *Sandwich-Geometrie* mit dem Y203-Phenolring sollte die Beweglichkeit des Chromophors deutlich eingeschränkt sein und der *Hula-Twist* ist die Bewegung mit dem geringsten Raumbedarf.

Ein gänzlich andersartiger Mechanismus für den strahlungslosen Energieverlust könnte ein Elektronentransfer von Y203 auf RH* sein. Hiergegen spricht aber die Zunahme der Fluoreszenzquantenausbeute von RH* in Tieftemperatur (vgl. Kummer *et al*., 2000), so dass die innere Konversion favorisiert wird. In jedem Fall ist die Anwesenheit der Hydroxylgruppe in der Y203-Variante für die Fluoreszenzverluste verantwortlich, die mit F203 fast nicht auftreten.

Mit W203, der größten substituierten Seitenkette, sinkt die Quantenausbeute für den ESPT fast auf Null. Eine „Aufweitung" der Proteinumgebung des Chromophors könnte, analog zum denaturierten Protein, sterisch Rotationen um die exozyklischen Bindungen φ und τ ermöglichen. In MD-Simulationen mit dem neutralen RH-Chromophor zeigen Weber *et al*. (1999), dass die Seitenketten von S65 und E222 anscheinend Energiebarrieren für die τ-Rotation darstellen. Der Einfluss dieser Aminosäuren auf derartige Prozesse wird in Kapitel 6 durch systematische Mutationen untersucht.

5 Grundzustandsspezies und Dimerisierung

5.1 Motivation

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass in den an T203 substituierten Proteinen die R^--Spezies strukturell der I-Spezies (nach dem ESPT von A*) entspricht. Die Existenz einer Grundzustands-Population der I-Spezies in wt-GFP wurde aufgrund von Photoprodukten, der Verschmälerung des langwelligen Randes des Absorptionspektrums in Tieftemperatur und den mit der Anregungswellenlänge variierenden Emissionsspektren der R^--Spezies postuliert (Creemers *et al*., 1999). Diese I-Spezies-Population ist wegen der Überlagerung des Absorptionsspektrums mit dem der dominierenden B-Spezies nicht direkt nachweisbar. Auf der Grundlage des molekularen Modells (Abb. 4.4) von Brejc *et al.* (1999) werden durch Mutagenese alle Grundzustandsspezies von wt-GFP stabilisiert. Zur Charakterisierung der Proteine werden in der AG von Prof. Dr. Bräuchle Tieftemperaturspektren gemessen. Das Grundzustandsgleichgewicht zwischen RH und R^- wird durch die Proteinkonzentration, die Ionenkonzentration, die Temperatur oder die Anwesenheit von Glycerol beeinflusst (Ward *et al*., 1982; Chattoraj *et al*., 1996 & Lossau *et al*., 1996). Diese Veränderungen könnten, so die Hypothese, auch die relative Populationsgrösse der I-Spezies betreffen. Durch eine detaillierte spektrale Analyse der Absorptionsspektren in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration kann gleichzeitig der Oligomerisierungsprozess von wt-GFP charakterisiert werden.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Stabilisierung der Grundzustandsspezies durch Mutagenese

Mit der sterisch ähnlichen Mutation T203V wird die Wasserstoff-Brücke von T203(O^{γ}) zu Y66(O^{η}) deletiert. Dadurch bleibt die Stabilisierung des R^--Chromophors aus und die T203-Variante repräsentiert die A-Spezies von wt-GFP (vgl. 4.3.2). Das Proton an der Tyrosylgruppe des RH-Chromophors wird anscheinend über das Wasserstoff-Brückennetzwerk durch das negativ geladenen E222 stabilisiert (Brejc *et al*., 1999; vgl. Abb. 1.4 und Kapitel 6.3.3). Mit der Mutation E222Q wird die negative Ladung entfernt, während die sterische Konformation der Seitenkette größtmöglich

erhalten bleibt. Deshalb sollte der R^--Chromphor durch die Mutation stabilisiert werden.

Absorption in Raumtemperatur Die Absorptionsspektren der mutierten Proteine T203V ($\varepsilon_{RH} \approx$ 25500 $mol^{-1}cm^{-1}$, λ_{Abs}= 397 nm) und E222Q ($\varepsilon_{R^-} \approx$ 29900, λ_{Abs}= 477 nm) sind deckungsgleich mit denen von wt-GFP RH und R^- (Abb. 5.1 links oben; zu den Extinktionskoeffizienten vgl. 6.2.2). Die in der T203V-Variante zwar sichtbare, aber kaum populierte I-Spezies (vgl. 4.3.3) müsste durch die zusätzliche Mutation E222Q im Grundzustandsgleichgewicht stabilisiert werden. Das Gen für die Doppelmutante T203V/E222Q wurde deshalb durch Klonierung erzeugt. Das Absorptionsspektrum des Proteins ($\varepsilon_{R^-} \approx$ 55350 $mol^{-1}cm^{-1}$, λ_{Abs}= 499 nm) zeigt die erwartete Dominanz des langwelligen Maximums der T203V-Variante.

Emission in Raumtemperatur Innerhalb der Varianten T203V und T203V/E222Q sind die Emissionsspektren nach Anregung der A- bzw. I-Spezies identisch und vom schmalen I*-Phänotyp. Zwischen den Varianten T203V und T203V/E222Q besteht in der Lage des Emissionsmaximums (λ_{Em}= 511 bzw. 513 nm) eine geringe Differenz (Abb. 5.1 links unten; vgl. 4.3.3). Dagegen ist das Emissionsspektrum von wt-GFP bei Anregung der B-Spezies gegenüber dem bei Anregung der A-Spezies etwas breiter und um 4 nm kürzerwellig (λ_{Em}= 505 bzw. 509 nm). Mit der Anregung des langwelligen Randes der R^--Absorption findet aber eine Annäherung an den Emissionsphänotyp der I*-Spezies (nach dem ESPT) statt, die als die Präsenz einer Grundzustands-Population der I-Spezies interpretiert wurde (Creemers *et al*., 1999). Die E222Q-Variante zeigt, abgesehen von einer geringen Rotverschiebung der Emissionsspektren um 1 nm, ein gleichartiges Verhalten wie wt-GFP. Das Emissionsspektrum bei kurzwelliger Anregung wird aufgrund der geringen Populierung von RH sowie der schlechten Quantenausbeute für den ESPT (vgl. 6.3.4) von der B*-Spezies dominiert und ist deshalb nicht gezeigt. Auch bei der T203V/E222Q-Variante könnte die Ähnlichkeit der diesbezüglichen Emissionsspektren die gleiche Ursachen haben.

Exzitation in Tieftemperatur Das Herunterkühlen der Proteine auf 3 K in 70 % Glycerol hat eine beträchtliche Linienverschmälerung und -verschiebung in den Exzitations- und Emissionsspektren zur Folge (Abb. 5.1 rechts). Dies, die Destabilisierung der A-Spezies und die direkte blaue A*-Emission wurden für wt-GFP bereits ausführlich beschrieben (Chattoraj *et al*., 1996; Lossau *et al*., 1996; Creemers *et al*., 1999 & Seebacher *et al*., 1999).

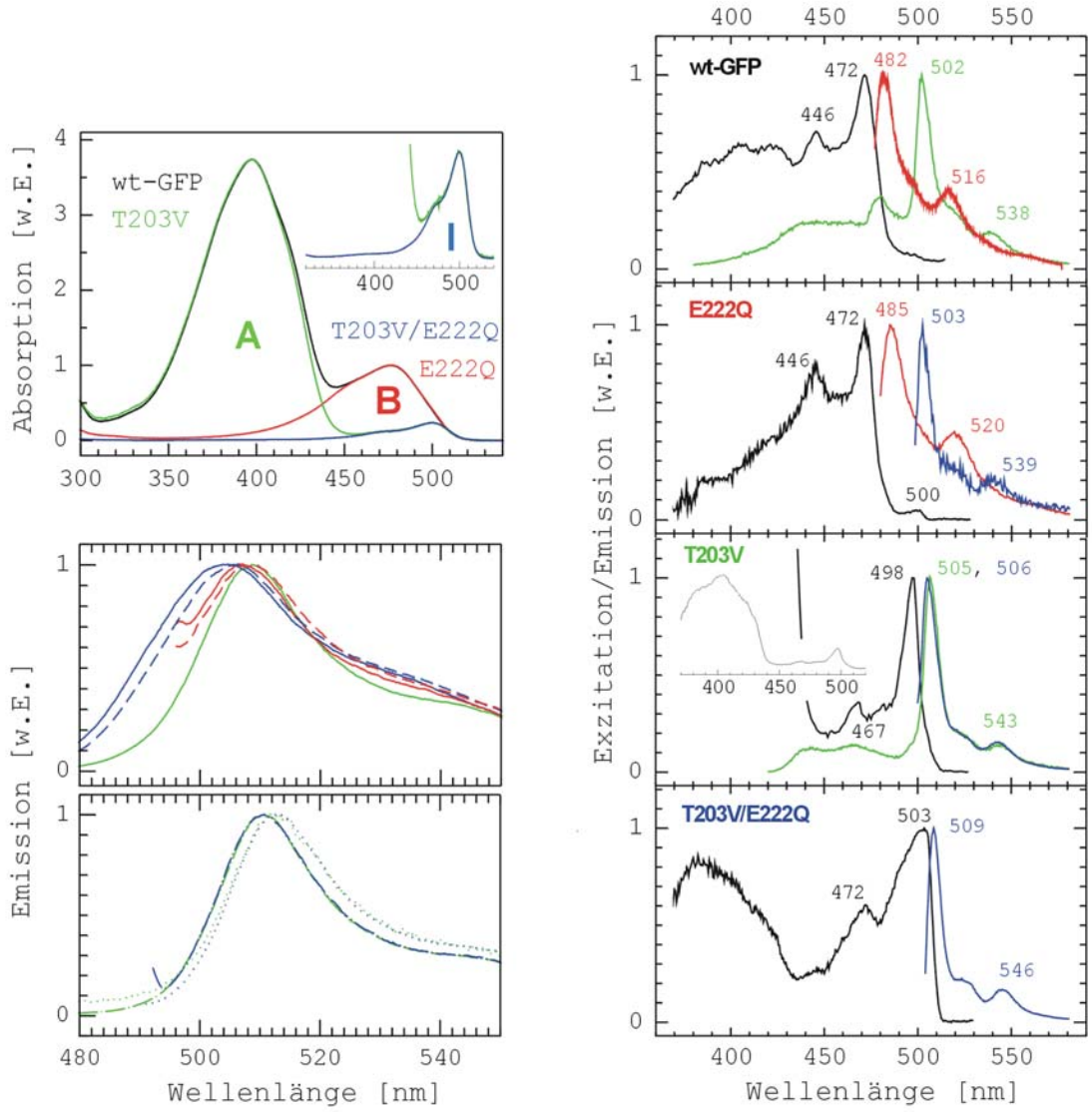

Abb. 5.1. Links oben: Absorptionsspektren von wt-GFP (schwarz) im Vergleich mit den Varianten T203V (grün), E222Q (rot) und T203V/E222Q (blau). Der langwellige Absorptionsbereich ist für die Varianten T203V und T203V/E222Q vergrößert dargestellt. Die Proteinkonzentrationen betragen 20, 16, 11 und 15 µM.

Links unten: Emissionsspektren nach 5-facher Verdünnung der Proben. Anregung der A-Spezies mit λ_{Ex}= 380 nm (grün), der I-Spezies mit λ_{Ex}= 490 bzw. 495 nm (blau) sowie der B-Spezies mit λ_{Ex}= 470 nm (rot). wt-GFP: solide, E222Q: gestrichelt, T203V: Strich-Punkt und T203V/E222Q: gepunktet.

Rechts: Exzitationsspektren (schwarz) für die grüne Emission und Emissionsspektren nach Anregung der A-, B- und I-Form (Farbkodierung wie links) bei 3 K. Für die T203V-Variante ist das komplette Exzitationsspektrum zusätzlich gezeigt. Die Wellenlängen der Maxima sind in nm angegeben. Die Anregungswellenlängen sind wt-GFP (364 nm und 473 nm), E222Q (473 nm und 496 nm), T203V (407 und 496 nm) sowie T203V/E222Q (407 und 502 nm). Die Messungen wurden in einem Phosphatpuffer mit 70 % Glycerol, pH 7.0 von C. Seebacher (AG Prof. Dr. Bräuchle) und gemessen.

Die Verschmälerung am langwelligen Rand des R^--Exzitationsspektrums wurde als Destabilisierung der I-Spezies interpretiert (Creemers *et al*., 1999). Das Exzitationsmaximum der wt-GFP B-Spezies liegt bei 472 nm mit einer Schwingungsschulter bei 446 nm (ΔE= 1240 cm^{-1}). Dieses Spektrum wird mit der E222Q-Variante reproduziert. Dieses Protein zeigt noch ein zusätzliches Exzitationsmaximum bei 500 nm. Durch die Mutationen T203V bzw. T203V/E222Q verschieben sich, wie in Raumtemperatur, die Exzitationsmaxima von R^- ins Rote und zeigen Maxima bei 498 bzw. 503 nm (Schwingungsschultern bei ΔE= 1330 bzw. 1310 cm^{-1}). Das R^--Spektrum der T203V/E222Q-Variante ist etwas breiter. Bei diesem Protein wird in Tieftemperatur zudem die A-Spezies deutlich populiert.

Emission in Tieftemperatur Die Anregung der A- bzw. B-Spezies in wt-GFP resultiert in Emissionsspektren mit Maxima bei 502 bzw. 482 nm. Die unterschiedliche Intensität der Schwingungsschultern (bei ΔE= 1330 bzw. 1370 cm^{-1}) erklärt die unterschiedliche Breite der jeweiligen Emissionsspektren in Raumtemperatur. Mit der Mutation E222Q wird das Emissionsspektrum der B*-Spezies mit einer geringen Rotverschiebung von 3 nm reproduziert. Die Anregung bei 500 nm führt dagegen zu einer grünen Emission, deren Spektrum bemerkenswert dem von wt-GFP nach Anregung der A-Spezies ähnelt. Die Emissionsspektren der T203V-Variante sind, wie in Raumtemperatur, sowohl nach Anregung der A-Spezies als auch der R^--Spezies kaum unterscheidbar (λ_{Em}= 506 nm, Schwingungsschultern bei ΔE= 1350 cm^{-1}). Abgesehen von 3-4 nm Rotverschiebung sind die Spektren vom wt-GFP I*-Phänotyp. Den zeigt auch die T203V/E222Q-Variante bei langwelliger Anregung (λ_{Em}= 509 nm, Schwingungsschulter bei ΔE= 1330 cm^{-1}). Ein Emissionsspektrum bei kurzwellige Anregung wurde hier leider nicht gemessen.

5.2.2 Konzentrationsabhängige Populierung der Grundzustandsspezies

Um durch Oligomerisierung induzierte spektroskopische Änderungen nachzuweisen, wurde die Proteinlösung stark aufkonzentriert und dann seriell verdünnt. Die Absorptionsspektren (1.7 mM - 2.2 µM) wurden mit Anregungsspektren ergänzt (5.2 µM - 22 nM, λ_{Det}= 540 nm; Auflösung für Exzitation bzw. Emission 1 oder 5 nm bzw. 5, 10 oder 20 nm). Es wurde sichergestellt, dass die unterschiedlichen Messbedingungen den Kurvenverlauf der Spektren nicht signifikant beeinflussen.

Mit steigender Konzentration von wt-GFP nimmt die RH-Absorption zu, während das R^--Absorptionsmaximum um das ca. 1.4-fache dessen abnimmt (Abb. 5.2 oben). Aufgrund des anscheinend auftretenden isosbestischen Punkt wurde dies Verhalten als Interkonversion zweier Populationen im Gleichgewicht betrachtet (Ward *et al*.,

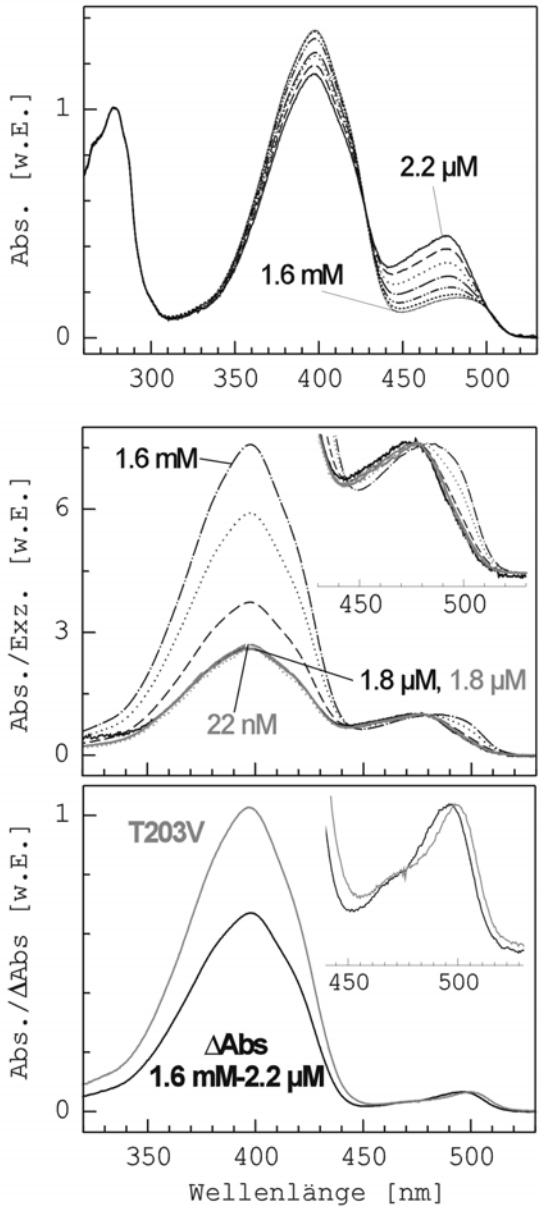

Abb. 5.2. Oben: Absorptionsspektren von wt-GFP in verschiedenen Konzentrationen (serielle Verdünnung von 2.2 µM - 1.6 mM) Die Spektren wurden auf auf 280 nm normiert.

Mitte: Absorptionsspektren (schwarz, 1.6 mM - 1.8 µM) bzw. Exzitationsspektren (grau, 1.8 µM - 22 nM) von wt-GFP. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde das Absorptions- bzw. Exzitationsspektrum bei 1.8 µM fett gedruckt. Die Spektren sind auf den Absorptionsbereich von R^--normiert und wurden dort vergrößert dargestellt.

Unten: Differenzspektrum der Absorptionen bei 1.6 mM und 2.2 µM im Vergleich mit dem Absorptionsspektrum der Variante T203V. Die Spektren sind auf den Absorptionsbereich von R^--normiert und wurden dort vergrößert dargestellt.

1980; Chattoraj *et al*., 1996). Die Normierung auf das Absorptions- bzw. Anregungsmaximum von R^- zeigt aber, dass gleichzeitig eine starke Verbreiterung des R^--Maximums im Bereich um 500 nm entsteht. Die Veränderungen sind unterhalb von 5.2 µM, im Bereich der Anregungsspektren, kaum noch messbar (Abb. 5.2, Mitte). Die Inhomogenität in der langwelligen Absorption deutet auf die Populierung mindestens einer zusätzlichen Chromophorspezies von R^- hin, die zur genaueren Charakterisierung durch das Differenzspektrum ΔAbs abgebildet werden kann (Abb. 5.2 unten). Dadurch wird, neben dem Maximum von RH, ein langwelliger Absorptionspeak sichtbar. Dieser gleicht einschließlich der vibronischen Substruktur demjenigen der T203V-Variante (λ_{Abs}= 496 bzw. 499 nm).

Da sich dasselbe Differenzspektrum unabhängig von den zugrundeliegenden Proteinkonzentrationen ergibt, kann die gegenseitige Überlappung von I_{wt} und B in den jeweiligen Absorptionsmaxima herausgerechnet werden. Dies geschieht unter der Annahme, dass die zusätzliche langwellige Absorption nur der I-Spezies und die residuale R^--Absorption nur der B-Spezies zuzuordnen ist. M_{476} ist der Messwert der Absorption bei 476 nm und R_{476} der zu errechnende Realwert. Das Differenzspektrum ergibt:

(i) $R_{476} = M_{476} - 0.543 \times R_{497}$

(ii) $R_{497} = M_{497} - 0.196 \times R4_{76}$

Durch Einsetzen kann das Gleichungssystem aufgelöst werden:

(ia) $R_{476} = 1{,}119 \times M_{476} - 0.608 \times M_{497}$

(iia) $R_{497} = 1{,}119 \times M_{497} - 0.219 \times M_{476}$

Unter der Abschätzung von $\varepsilon(A) \approx \varepsilon(RH_{T203V}) \approx 25500\ M^{-1}cm^{-1}$ und $\varepsilon(I) \approx \varepsilon(R^-_{T203V/E222Q}) \approx 55400\ M^{-1}cm^{-1}$ folgt aus den konzentrationsabhängigen Veränderungen der Populationsgrößen $\Delta[A] + \Delta[I] \approx -\Delta[B]$ die Größe des Extinktionskoeffizienten mit $\varepsilon(B) \approx 36500\ M^{-1}cm^{-1}$ (vgl. Tab. 6.1). Als Kontrolle wurde für alle sechs Konzentrationen, bei denen Absorptionsspektren gemessen wurden, die Abweichung der errechneten Summe der Populationsgrößen von der Gesamtproteinkonzentration errechnet (<3.5 %, $\bar{x}$ = +1.7 %). Werden die Verhältnisse der jeweiligen maximalen Absorptions- bzw. Exzitationswerte der Spezies A (397 nm), B (476 nm) und I (497 nm) durch deren Extinktionskoeffizienten gewichtet, so spiegeln sie die Verhältnisse der jeweiligen Populationsgrößen wieder. Diese einzelnen Werte sind unabhängig von Fehlern in der Konzentrationsbestimmung, die hier wegen des Einbeziehens der Anregungsspektren rechnerisch aus der seriellen Verdünnung erfolgt. Die Relation der Werte zueinander, und damit der Kurvenverlauf, ist unabhängig von Fehlern bei der Bestimmung der Extinktionskoeffizienten. Die Auftragung der Werte gegen die Gesamtkonzentration zeigt, dass bei zunehmender Konzentration [A] bzw. [I] in gleichartiger Weise gegenüber [B] zunimmt. Aus den Gleichgewichtskonstanten $K_{AB} / K_{IB} = K_{AI}$ folgt ein konstantes Verhältnis von [A] zu [I] (Abb. 5.3). Die leichten Abweichungen beider Anregungs-Werte aus den höchsten Proteinkonzentrationen deuten dabei auf eine messungsbedingte Überschätzung von [I] hin.

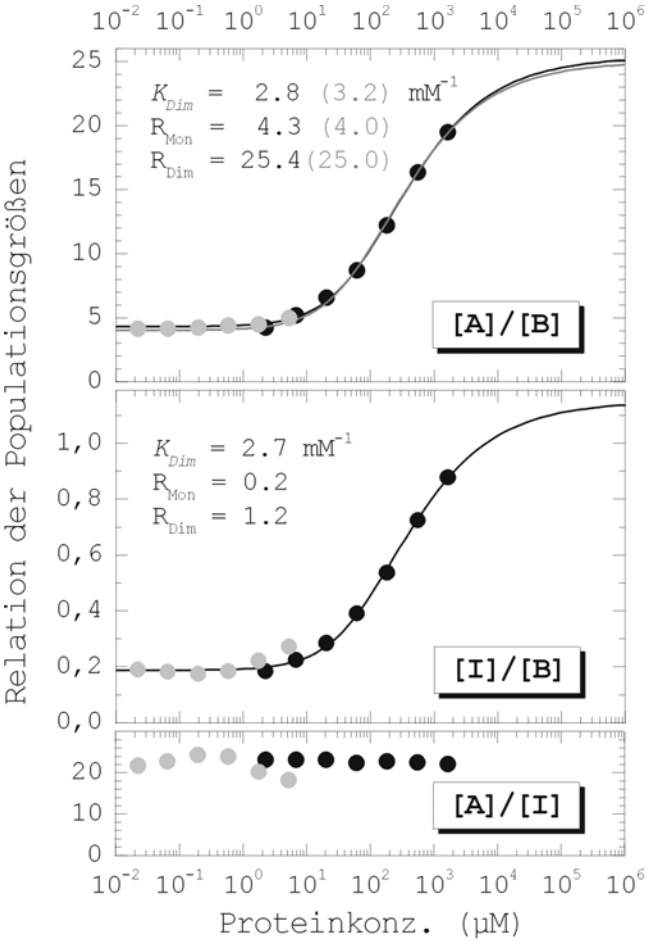

Abb. 5.3. Verhältnis der Populationsgrößen von A, B und I, errechnet aus ihren realen Absorptions- bzw. Anregungsmaxima für die grüne Fluoreszenz (schwarze bzw. graue Kreise, keine Korrektur für die Fluoreszenzquantenausbeute. Die schwarzen Linien geben die Fits für die Absorptionswerte (siehe Text) wieder. K_{dim} entspricht der Gleichgewichtskonstanten der Dimerisierung und R_{Mon} bzw. R_{Dim} den relativen Populationsgrössen des reinen Monomers bzw. Dimers. Werden die Anregungswerte um die Fluoreszenzquantenausbeute der A-Spezies in Relation zur B-Spezies korrigiert (0.93) und einbezogen, ergibt sich ein ähnlicher Fit (graue Linie).

Ist Dimerisierung der einzige Oligomerisierungsprozess, folgt aus

(i) $2\times$ *Monomer (M)* $\leftrightharpoons$ *Dimer (D)*, mit der Gleichgewichtskonstante K_{Dim} und

(ii) $[G] = [M] + 2\,[D]$, wobei $[G]$ = [Gesamtprotein]

die Konzentrationsabhängigkeit der relativen Populationsgrößen der Chromophorspezies A und B in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration mit

(iii) $$\frac{[A]}{[B]} = \left(\left(1+\frac{1-\sqrt{1+8K_{Dim}[G]}}{4K_{Dim}[G]}\right) \times \left(\frac{[A]}{[B]}_{Dim} - \frac{[A]}{[B]}_{Mon}\right)\right) + \left(\frac{[A]}{[B]}_{Mon}\right)$$

Der erste Term entspricht der relativen Konzentration von im Dimer vorliegenden Protein 2[D]/[G]. Den relativen Populationsgrößen von A und B im reinen Dimer bzw. Monomer entsprechen die Terme $([A]/[B])_{Dim}$ bzw. $([A]/[B])_{Mon}$.

Aus dem Fit der relativen Populationsgrößen [A]/[B] bzw. [A]/[I] mit dieser Funktion ergeben sich K_{Dim} von ca. 2.8 bzw. 2.7 mM^{-1}. Ein alternativer Fit für $[A]/[B]$ unter Einbeziehung der um die Effizienz des ESPT korrigierten Werte aus den Anregungsspektren ergibt nur geringe Abweichungen ($K_{Dim} \approx 3.2$ mM^{-1}; Abb. 5.3).

5.3 Diskussion

5.3.1 Phänotypen der Mutanten

Sowohl der RH- als auch der R^--Chromophor von wt-GFP lassen sich durch die Mutationen T203V und E222Q isoliert phänotypisch darstellen (Abb. 5.1). Mit der Mutation E222Q wird fast kein RH-Chromophor mehr ausgebildet. Dies bestätigt das Modell von Brejc *et al*. (1999), in dem das Wasserstoff-Brückennetzwerk vom negativ geladenen E222 zu der Tyrosylgruppe des Chromophors (Abb. 1.4 & Abb. 4.4) die A-Spezies stabilisiert. (Eine ausführliche Diskussion dazu erfolgt in 6.3.3). Im Gegensatz zu den S65-Mutationen (Heim *et al*., 1995; vgl. 6.2.3) wird das R^--Absorptionsspektrum nicht verändert, was sowohl an der weitgehenden Konservierung der Seitenkette mit der Mutation E222Q als auch an der gewählten Aminosäureposition *per se* liegen könnte. Größere Seitenketten als Glycin an Position 65 verhindern vermutlich sterisch eine Interaktion zwischen Seitenkette 222 und dem heterozyklischen Stickstoff N^1 (vgl. Abb. 1.4). Die Unterschiedlichkeit der RT-Emissionsspektren bei Anregung in der R^--Absorption im kürzer- bzw. längwelligen Bereich legt bei wt-GFP das Vorhandensein einer kleinen Population der I-Spezies nahe (Creemers *et al*., 1999). Dies trifft auch auf die E222Q-Variante zu und aufgrund der mutagenen Destabilisierung der A-Spezies kann im Tieftemperatur-Exzitationsspektrum noch eine residuale Population der I-Spezies detektiert werden. Ihre Identifizierung erfolgt über die Position des Exzitationsmaximums und das dazugehörige Emissionsspektrum.

Die B-Spezies in wt-GFP zeichnet sich gegenüber der A- bzw. I-Spezies durch die Wasserstoff-Brücke von T203(O^γ) zu Y66(O^η) aus. Deshalb und wegen der Identität der grünen Emission nach Anregung der A-Spezies bzw. der I-Spezies kann der R^--Chromophor der T203V-Variante als äquivalent zur I-Spezies gelten (vgl. 4.3.3). Die I-Spezies wird unter nur geringen spektralen Abweichungen nahezu exklusiv populiert, wenn durch die zusätzliche Mutation E222Q die Stabilisierung der A-Spezies ausbleibt. Die drei Grundzustände von wt-GFP lassen sich also durch zwei „isostere" Punktmutationen bzw. ihre Kombination stabilisieren.

Bei einer hohen Konzentration von wt-GFP wird nicht nur die A-Spezies zunehmend populiert, sondern in gleichem Maße eine weitere Chromophor-Spezies. Die Differenz der Absorptionsspektren bei verschiedenen Proteinkonzentrationen ist hier von einer scharf definierten Form und ähnelt dem Phänotyp der I-Spezies (Abb. 5.2). Das Absorptionsmaximum bei ca. 496 nm stimmt gut mit dem auf ca. 495 nm berechneten 0-0-Übergang (energetisch niedrigster Übergang) für die I-Spezies überein (Creemers *et al*., 1999). Das Absorptionsspektrum der I-Spezies in wt-GFP

kann damit durch die Differenzspektren erstmals direkt abgebildet werden. Im Verlauf der Arbeit wurden in Kooperation mit der AG Bräuchle von C. Seebacher Experimente durchgeführt, in denen wt-GFP bei Tieftemperatur mit starkem Laserlicht angeregt wurde (Spektrales Lochbrennen). Als Fotoprodukt von RH* dominierte eine bei 502 nm absorbierende Spezies (P502). P502 wurde als die durch ESPT erzeugte und „ausgefrorene" I-Spezies identifiziert und emittiert mit λ_{Em}= 505 nm (Seebacher *et al*., 1999). Dies harmoniert den hier für die I-Spezies in Tieftemperatur gefundenen Exzitations- und Emissionsmaxima.

5.3.2 Dimerisierung von wt-GFP

Die paarweisen Verhältnisse der Populationsgrößen von A, B und I in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration lassen sich gut mit dem Dimerisierungsmodell fitten (Abb. 5.3). Für einen Dimerisierungsprozess spricht zudem, dass in einem Gelfiltrationsexperiment nur Monomere und Dimere von GFP-V163A/S175G nachgewiesen werden konnten (De Angelis *et al*., 1998). Werden für K_{Dim}≈ 2.6-3.2 mM^{-1} angenommen, kommen bei 290-420 µM Gesamtprotein jeweils 50 % der GFP-Moleküle als Monomer bzw. Dimer vor. Der Sättigungsbereich für das Dimer ist experimentell nicht zugänglich. Bereits bei einer Proteinkonzentration von ca. 50 mM wären in der Lösung keine Wassermoleküle mehr vorhanden. Dieser Wert wurde unter der Annahme einer spezifischen Protein-Dichte von 1.4 kg/l (P. Cramer, pers. Mitt.) errechnet. Die relativen Grundzustandsenergien zwischen der A- bzw. I-Spezies und der B-Spezies unterscheiden sich mit jeweils ca. 4.4 kJ/mol Differenz deutlich zwischen Monomer ($\Delta G_{A,B} \approx$ -3.4 bzw. $\Delta G_{I,B} \approx$ 3.8 kJ/mol) und Dimer ($\Delta G_{A,B} \approx$ -7.8 bzw. $\Delta G_{I,B} \approx$ -0.6 kJ/mol). Das Gleichgewicht zwischen der A- und der I-Spezies bleibt dagegen mit $\Delta G_{A,I} \approx$ -7.2 kJ/mol konstant. Die Veränderungen der Ladungsverteilung im Wasserstoff-Brückennetzwerk, welche mit der Deprotonierung der A- zur I-Spezies einhergehen (Abb. 4.4), sind demnach von den durch die Dimerisierung induzierten strukturellen Umlagerungen energetisch getrennt. Dies legt nahe, dass die relative Lage der am Wasserstoff-Brückennetzwerk beteiligten Komponenten zwischen der A- und der I-Spezies konstant bleibt. Die Aussage, dass durch den ESPT (von A* nach I*) kaum strukturelle Umlagerungen im Protein zu erwarten sind (Brejc *et al*., 1999) kann durch die Analyse des Grundzustandgleichgewichts zwischen der A- und der I-Spezies experimentell gestützt und erweitert werden.

Da sich die Grundzustandsgleichgewichte innerhalb weniger Minuten nach dem Verdünnungsvorgang eingestellt haben, können die Aktivierungsbarrieren zwischen

den Grundzustandsformen von wt-GFP nicht so hoch sein, wie bezüglich der A-Form und B-Form angenommen (Chattoraj *et al*., 1996; Striker *et al*., 1999)

Was ist die mechanistische Erklärung für die beobachteten Phänomene? Die Röntgenstruktur von wt-GFP zeigt, das T203 im Zentrum der Dimerkontaktfläche lokalisiert ist (Abb. 5.4). Der β-Strang mit T203 könnte durch die Dimerisierung distal aus dem Protein „herausgezogen" werden; A206 als eine der drei am hydrophoben *Patch* beteiligten Aminosäuren (Yang *et al*., 1996) könnte dabei eine wichtige Rolle spielen. Zugunsten der A- und I-Spezies würde dann die Wasserstoff-Brücke von T203(O^{γ}) zu Y66(O^{η}) und damit die B-Spezies destabilisiert. (Wiehler *et al*.; in Vorbereitung).

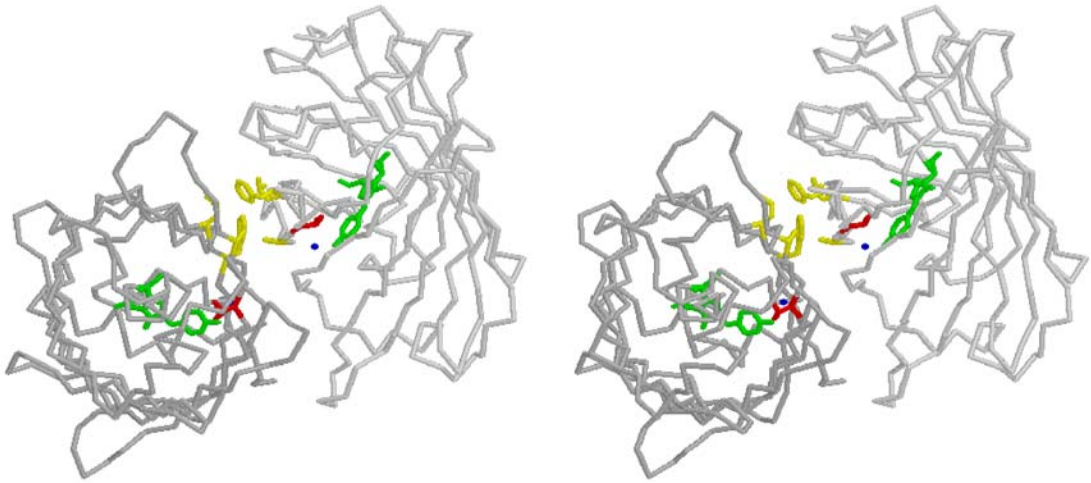

Abb. 5.4. Stereodarstellung des Dimers von wt-GFP (Röntgenstruktur 1gfl; Yang *et al*., 1996). Atomar aufgelöst sind der Chromophor (grün) und die Seitenketten von T203 (rot) sowie hydrophoben kontaktbildenden Aminosäuren (gelb, A206, L221 und F223). Ebenfalls markiert ist das Wassermolekül H_2O_{reg} (blau, entspricht W22 in Abb. 1.4; vgl. auch 5.4.3)

6 Die Schlüsselpositionen 65, 203 und 222

6.1 Motivation

Die Funktionalität eines Proteins beruht allgemein auf seiner Struktur, die wiederum wegen der wechselseitigen, kontextabhängigen Interaktionen der Aminosäuren als komplexes System verstanden werden kann. Im Speziellen deutet die räumliche Nachbarschaft und die Verknüpfung über Wasserstoff-Brückenbindungen (Abb. 1.4) direkt auf Wechselwirkungen der Aminosäuren S65, T203 und E222 hin, die maßgeblich die spektralen Eigenschaften von GFP bestimmen können. In den Kapiteln 4 & 5 wurden die Auswirkungen von Einzelmutationen an T203 und E222 charakterisiert. Um einen tieferen Einblick in diese funktionale Interaktionen zu gewinnen, werden in diesem Kapitel die Mutationen S65G, T203V, T203Y und E222Q in ihrer kombinatorischen Vielfalt von insgesamt 12 Proteinen untersucht. In Analogie zu genetischen *Knock-Out*-Organismen werden in dem GFP durch die sterisch ähnlichen Mutationen T203V und E222Q sowie durch die Mutation S65G je eine reaktive Hydroxylgruppe deletiert. Die Reduktion der Seitenkette an Position 65 ermöglicht gleichzeitig eine sterische Zugänglichkeit des Chromophor-Imidazolstickstoff N^1 (vgl. Abb. 1.4). Dessen Protonierungsstatus kann nach Modellrechnungen sowohl starke spektrale Verschiebungen von Absorption und Emission als auch Verluste an Fluoreszenzquantenausbeuten bewirken (Voityuk *et al*., 1997,1998 & 1998b; Weber *et al*., 1999; vgl. 4.3.4). Die Mutation T203Y ist wegen der aromatischen Wechselwirkungen der Seitenkette mit dem Chromophor, die in Rotverschiebungen von Absorption und Emission resultieren (vgl. 4.3.2), für multispektrale Anwendungen bedeutsam.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Proteinausbeuten in *E. coli*-Expressionskulturen

Die Ausbeuten an cytoplasmatisch löslichem Protein wurden in parallelen Expressionskulturen der 12 GFP-Varianten nach Zellaufschluss und IMAC-Reinigung fotometrisch bestimmt (Abb. 6.1). Dabei zeigt sich, dass die Mutation E222Q 2-fach

bis 8-fach niedrigere Ausbeuten zur Folge hat. Der Austausch T203V oder Y203V erhöht dagegen die Ausbeuten bis zu 3-fach.

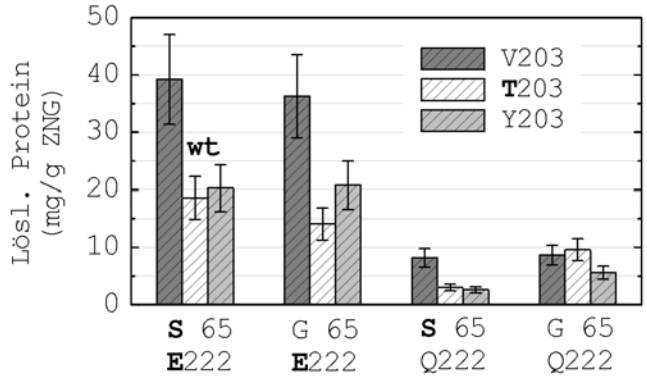

Abb. 6.1. Ausbeuten an löslichem Protein pro g Zellnassgewicht. Expression bei 28 °C in Kulturen von *E.coli* BL21 (DE 3) *pLys*. Von den jeweiligen Aminosäuren an den Positionen 65, 203 und 222 wurden die Wildtyp-Aminosäuren fett gedruckt.

6.2.2 Verschiebung des Grundzustandsgleichgewichts

Das Grundzustandsgleichgewicht RH ⇋ R^- spiegelt sich im Verhältnis der Absorptionsmaxima beider Spezies wieder (Abb. 6.2). Für eine genauere Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten und der Differenz der Grundzustandsenergien ΔG ist eine Abschätzung der Extinktionskoeffizienten ε(RH) bzw. ε(R^-) notwendig. Dies ist, nach fotometrischer Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, für diejenigen Varianten möglich, bei denen das Gleichgewicht nahezu vollständig nach RH bzw. R^- verschoben ist. (Und unter der Annahme, dass nahezu alle in Lösung befindlichen Proteine den Chromophor ausgebildet haben; vgl. Patterson *et al*., 1997) Die Korrektur für den jeweiligen Rest der nur gering vorhandenen Chromophorspezies erfolgt iterativ. Für diejenigen 5 Proteine, bei denen sowohl RH als auch R^- deutlich populiert sind, werden die Extinktionskoeffizienten je nach Mutationsmuster abgeschätzt (Tab. 6.1, vgl. 5.2.2). Als Kontrolle wird hier die Gesamtkonzentration an Chromophoren errechnet und mit der Proteinkonzentration verglichen. Die Abweichung sind <16 %.

Das Gleichgewicht RH ⇋ R^- verschiebt sich von der am stärksten nach RH verlagerten Wildtyp-Kombination S65/E222 schrittweise in der Reihenfolge G65/Q222, G65/E222 und S65/Q222 und um bis zu $\Delta\Delta G$= -14 kJ/mol nach R^- (Abb. 6.3). Die beiden Aminosäurepositionen 65 und 203 zeigen somit eindeutig nichtadditive Effekte, was auf wechselseitige Interaktionen hindeutet. Die beschriebene Verlagerung ist für die Y203-Varianten am schwächsten und für die V203-Varianten am stärksten. Zum anderen verschiebt der Austausch von T203

gegen Tyrosin ($\Delta\Delta G$= +1.8 bis +4.2 kJ/mol) und besonders gegen Valin ($\Delta\Delta G$= +2.0 bis +6.3 kJ/mol) das Gleichgewicht zugunsten von RH.

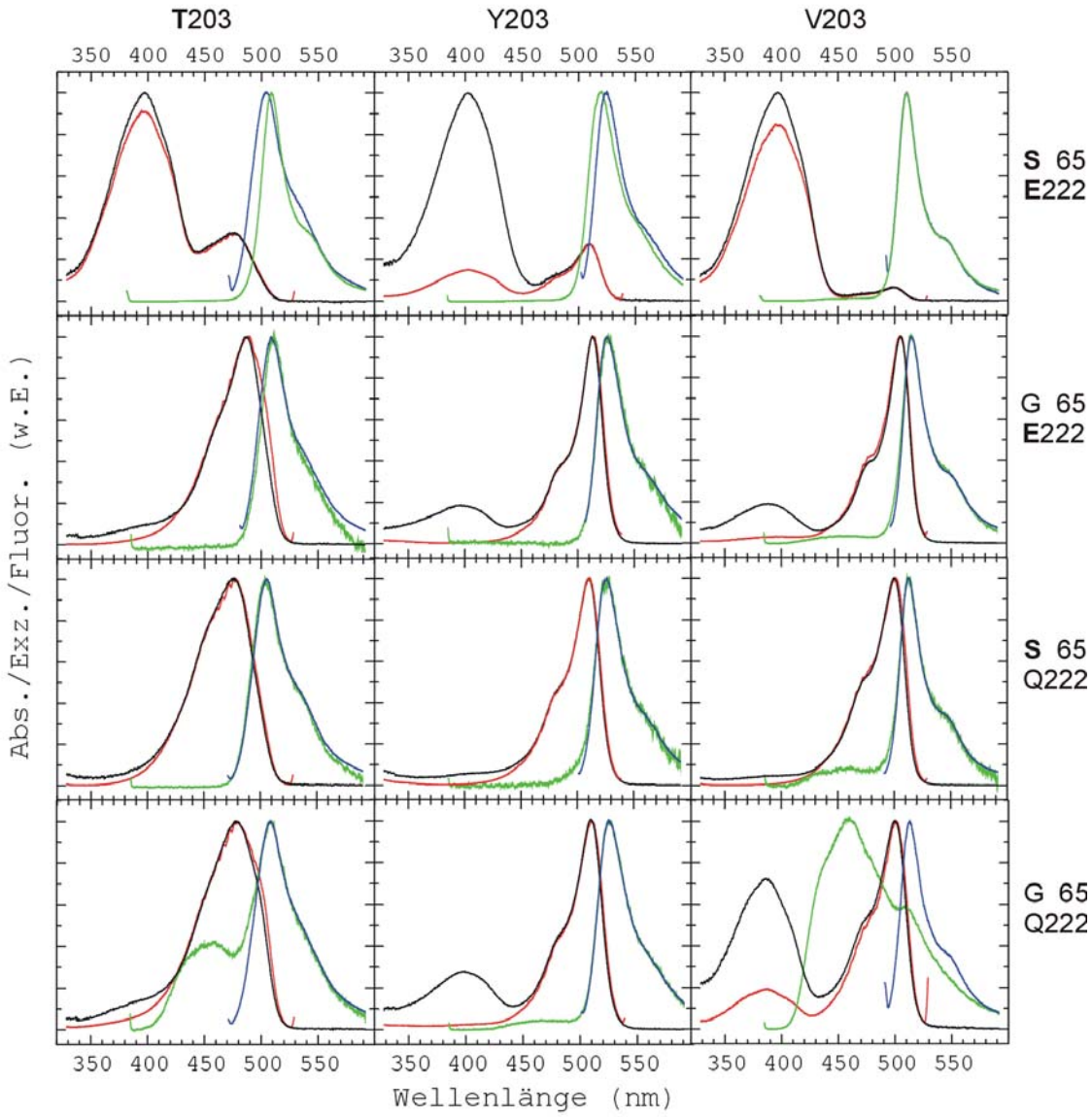

Abb. 6.2. Spektrale Eigenschaften der an T203 substituierten GFP-Varianten (Wildtyp-Aminosäuren fett gedruckt). Der R^--Peak des Anregungsspektrums (rot, λ_{Em}= 530 bzw. 540 nm mit T203 und V203 bzw. Y203) wurde je auf den des Absorptionsspektrums (schwarz) normiert. Emissionsspektren nach Anregung von RH (grün, λ_{Ex}= 380 nm) bzw. R^- (blau, λ_{Ex}= 5-15 nm kürzerwelliger als λ_{Abs}). Die Proteinkonzentrationen betragen ca. 5-6 μM.

# 065	# 203	# 222	ε (RH) ($M^{-1}cm^{-1}$)	ε (RH) ($M^{-1}cm^{-1}$)	[RH]+[R⁻]/ [GFP]
S	T	E	21 000	35 000	1.01
S	**Y**	E	**21 000**	49 500	
S	**V**	E	**25 500**	55 400	
G	T	E	21 000	**41 700**	
G	**Y**	E	25 500	49 500	1.12
G	**V**	E	21 000	55 400	1.16
S	T	**Q**	21 000	**29 900**	
S	**Y**	**Q**	25 500	**49 500**	
S	**V**	**Q**	21 000	**55 400**	
G	T	**Q**	21 000	**31 000**	
G	**Y**	**Q**	25 500	49 500	1.02
G	**V**	**Q**	21 000	55 400	0.86

Tab. 6.1. Extinktionskoeffizienten von RH und R^- im jeweiligen Absorptionsmaximum von GFP-Varianten. Die Werte wurden aus direkt aus den Proteinkonzentrationen errechnet (fett gedruckt) oder aus dem Mutationsmuster abgeschätzt. Mussten beide Extinktionskoeffizienten abgeschätzt werden, dient das Verhältnis von Chromophor-Gesamtkonzentration zur Proteinkonzentration als Kontrolle. wt-Aminosäuren an den Positionen 65, 203 und 222 fett gedruckt.

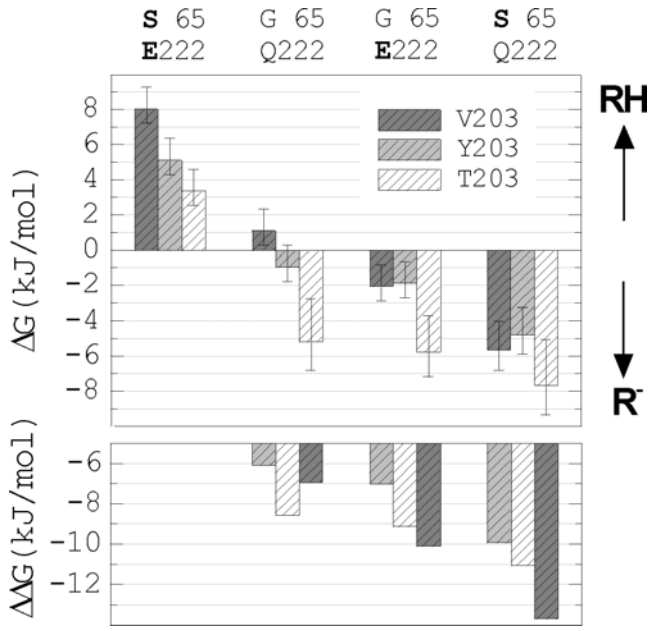

Abb. 6.3. Oben: Differenz der Grundzustandsenergien von RH und R^- in GFP-Varianten. Unten: Differenz der Werte zu denen der S65/E222-Varianten (absteigend sortiert). Die Fehlerbalken entsprechen ±40 % Abweichung im Verhältnis $\varepsilon(RH)/\varepsilon(R^-)$. In denjenigen Proteinen mit nur geringer RH-Konzentrationen enthalten sie einen zusätzlichen Fehler von bis zu ±50 % für die Bestimmung des Absorptionswertes von RH.

6.2.3 Absorptions- und Fluoreszenspektren

Die Mutationen T203V bzw. T203Y führen kontextunabhängig zu einer Vergrößerung des R^--Absorptionsmaximums um 19-23 nm auf 499-506 nm bzw. um 27-34 nm auf 510-514 nm (Abb. 6.2, Tab. 6.1). Das R^--Absorptionsspektrum ist dann schmal mit einer steilen langwelligen Kante, während in den Proteinen mit T203 das Spektrum besonders im Langwelligen breit ausläuft (Abb.6.2).

#065	#203	#222	λ_{Abs}(RH) (nm)	λ_{Abs}(R^-) (nm)	λ_{Em}(RH ang.) (nm)	λ_{Em}(R^- ang.) (nm)
S	**T**	**E**	397	476	509	505
S	Y	**E**	403	510	520	525
S	V	**E**	397	499	511	511
G	**T**	**E**	395	487	511	509
G	Y	**E**	397	514	527	526
G	V	**E**	389	506	515	515
S	**T**	Q	395	477	506	506
S	Y	Q	400	511	526	526
S	V	Q	395	500	513	513
G	**T**	Q	395	479	505	505
G	Y	Q	399	511	525	525
G	V	Q	387	501	460	513

Tab. 6.2. Absorptionsmaxima von RH bzw. R^- und Emissionsmaxima nach Anregung von RH (λ_{Ex}= 380 nm) bzw. R^- (λ_{Ex}= λ_{Abs} - 5 bis 10 nm) in GFP-Varianten. wt-Aminosäuren an den Positionen 65, 203 und 222 fett gedruckt.

Werden die T203-Varianten im langwelligeren Bereich der R^--Absorption angeregegt, verschiebt sich das Emissionsmaximum um 2-3 nm ins Rote und das Emissionsspektrum verschmälert sich (Abb. 6.4). Diese Inhomogenität wurden bereits bei einer Auswahl der Proteine auf die gleichzeitige Populierung zweier R^--Spezies, der B-Spezies und der langwelliger absorbierenden I-Spezies interpretiert (vgl. 4.3.3 & 5.3). Die B-Spezies ist durch eine Wasserstoff-Brückenbindung zwischen T203(O^{γ}) und Y66(O^{η}) charakterisiert. Bei Substitution von T203 kann als R^--Chromophor ausschließlich die I-Spezies populiert werden. Deshalb sind bei den V203- bzw. Y203-Varianten die Emissionsspektren nach der Anregung von RH oder R^- identisch und vom I*-Phänotyp (vgl. 4.3.3). Dies bezieht sich sowohl auf den zur R^--Absorption spiegelbildlichen Kurvenverlauf als auch auf die Lage des Maximums (mit Ausnahme der Variante S65/Y203/E222). In den T203-Varianten kann die kurzwellige Absorption der B-Spezies im Absorptionsbereich der A-Spezies dominieren. Die

Anregung in dieser Wellenlänge resultiert dann, besonders bei zusätzlich schwacher A*-Quantenausbeute für die grüne Emission, vordringlich im B*-Emissionsphänotyp (Abb. 6.2).

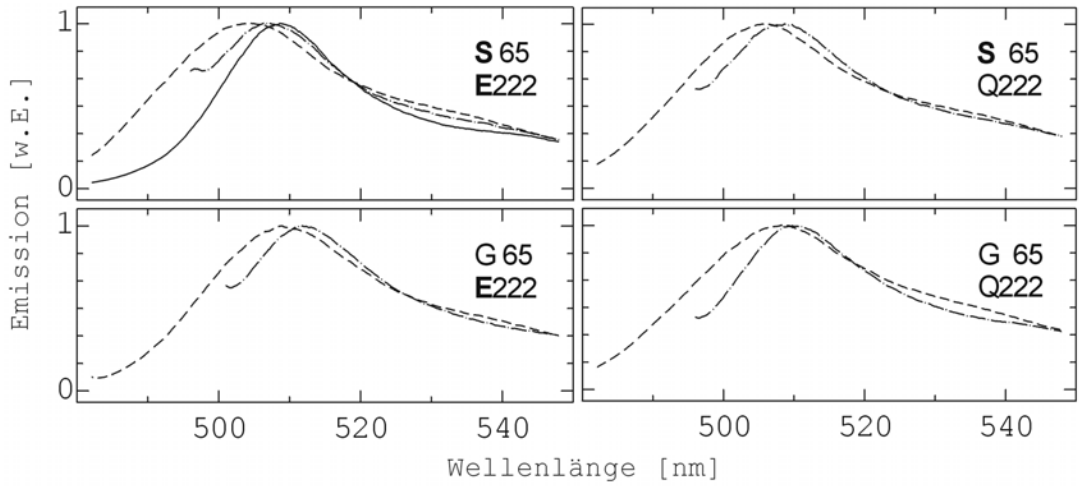

Abb. 6.4. Emissionsspektren von GFP-Varianten mit T203 nach Anregung mit λ_{Ex}= 380 nm (solide), 470 nm (gestrichelt; G65/E222: 480 nm) und 495 nm (Strich-Punkt; G65/E222: λ_{Ex} 500 nm). wt-Aminosäuren an den Positionen 65 und 222 fett gedruckt.

Der Austausch V203Y resultiert in einer Rotverschiebung des R^--Absorptionsmaximums um 8-11 auf 510-514 nm, entsprechend einer Abnahme von 310-430 cm^{-1} (Tab. 6.2). Auch das Absorptionsmaximum von RH ist mit Y203 gegenüber T203 oder V203 um 2-12 nm auf 397-403 nm rotverschoben, entsprechend einer Abnahme von 130-780 cm^{-1}. Das gleiche gilt für das I*-Emissionsmaximum mit einer Verschiebung um 9-20 nm auf 520-527 nm, entsprechend einer Abnahme von 340-750 cm^{-1}. Derartige Rotverschiebungen wurden im Wildtyp-Kontext als spezifisch aromatische Wechselwirkungen zwischen der Tyrosylgruppe von Y203 und dem Chromophor interpretiert (vgl. 4.3.2).

Die kurzwelligsten RH-Absorptionen zeigen mit 387 und 389 nm die Varianten G65/V203/E222 und G65/V203/Q222 (Tab. 6.2). Die Mutationen G65S oder V203T verursachen wieder eine Rotverschiebung um 6-8 nm auf 395-398 nm, entsprechend einer Abnahme von 390-550 cm^{-1}. Gleichzeitig hat aber unter den Proteinen mit T203 oder V203 die Variante G65/V203/E222 die langwelligste R^--Absorption (506 nm) und die langwelligste Emission von (515 nm).

In der Variante G65/V203/Q222 dominiert bei Anregung von RH die direkte blaue RH*-Emission (vgl. Niwa *et al*., 1996; Lossau *et al*., 1996 & Chattoraj *et al*., 1996). Diese prägt auch in dem Protein G65/T203/Q222 das Emissionsspektrum. Hier wird

vermutlich der Anteil der grünen Emission durch die starke Überschneidung mit der R^--Absorption artifiziell angehoben (Abb. 6.2).

6.2.4 Quantenausbeuten

Die gemessenen Emissionsspektren sind quantenkorrigiert, das heisst die Intensität bei einer Wellenlänge ist proportional zur Anzahl der emittierten Quanten. Daher lässt sich die Fluoreszenzquantenausbeute (emittierte Quanten / absorbierte Quanten) aus dem Verhältnis der integrierten Emission zur Absorption bei der Anregungswellenlänge errechnen. Als Referenz für die Berechnung der absoluten Werte wurde die Quantenausbeute für wt-GFP bei λ_{Ex}= 470 nm (0.80; vgl. Heim *et al*., 1995; Cubitt *et al*., 1999; Patterson *et al*., 1997 & Palm *et al*., 1997) verwendet.

Bei Anregung von R^- nehmen die Fluoreszenzquantenausbeuten gegenüber dem Wildtyp-Kontext (S65/E222) durch die Mutationen E222Q bzw. S65G bis auf Werte um 0.3 ab (Abb. 6.5 oben). Bei Kombination beider Mutationen in den G65/E222-Varianten addieren sich auch die jeweiligen Verluste an Fluoreszenzquantenausbeuten. Dabei sinken die Werte bis unter 0.2. Ist an Position 203 Tyrosin statt Valin oder Threonin eingefügt, sind die Verluste insgesamt deutlich geringer. Selbst in der G65/E222/Y203-Variante werden ca. 65 % der absorbierten Quanten wieder emittiert.

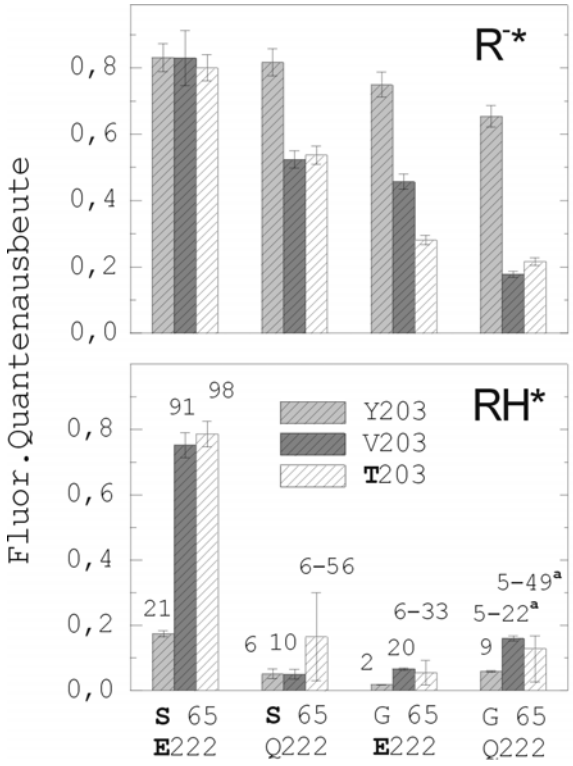

Abb. 6.5. Fluoreszenzquantenausbeuten in GFP-Varianten Die gesamte Emission zwischen λ_{Ex} und 600 nm wurde integriert. Oben: Fluoreszenzquanten-ausbeuten nach Anregung von R^-. Die Anregung erfolgt 5-15 nm kürzerwellig als das Absorptionsmaximum).

Unten: Fluoreszenzquantenausbeuten bei Anregung von RH* mit 380 nm. Die großen Fehler kommen bei einer schwachen RH-Absorption zustande. Die Zahlen geben die ESPT-Quantenausbeute in Prozent an. „ª": starke blaue RH*-Fluoreszenz.

Die Ausbeute an grüner Emission von RH* gegenüber der von R^{-*} gibt die Quantenausbeute des ESPT-Prozesses wieder (Abb. 6.5 unten). Die ESPT-Effizienz kann bei Normierung auf R^- auch direkt aus dem Verhältnis des RH-Exzitations- zum RH-Absorptionsmaximum abgeschätzt werden (Abb. 6.2). Bei beiden Berechnungsmethoden wird vorausgesetzt, dass die (ESPT-) I*-Spezies gleiche Fluoreszenzquantenausbeuten hat wie die R^{-*}-Spezies.

Auch bei Anregung von RH sind die Fluoreszenzquantenausbeuten im Wildtyp-Kontext S65/E222 mit knapp 0.8 am stärksten. Mit T203 oder V203 unterliegen dabei ca. 91-98 % der RH*-Population dem ESPT. Die niedrige ESPT- (und damit Fluoreszenz-) Quantenausbeute der S65/E222/Y203-Variante wurde bereits auf einen schnellen strahlungslosen Verlust der Anregungsenergie zurückgeführt (vgl. 4.3.4). Bei Substitution von S65 und/oder E222 sinken die ESPT-Quantenausbeuten allgemein auf Werte unter 20 %. Die geringsten Werte zeigen dabei die Varianten mit Y203. In den Varianten G65/T203/Q222 bzw. G65/V203/Q222 wird die Fluoreszenzquantenausbeute durch die blaue RH*-Emission wieder etwas erhöht.

Weicht der Kurvenverlauf des Anregungsspektrums vom dem des Absorptionsspektrums ab, so kann dies ein Hinweis auf Chromophor-Subpopulationen mit verschiedenen Fluoreszenzquantenausbeuten sein. Eine derartige Abweichung ist bei den Varianten G65/T203/E222 bzw. G65/T203/Q222 am langwelligen Rand der R^--Absorbtion gegeben (bei ca. 500 nm; Abb. 6.2). Sie kann als die Existenz einer längerwellig absorbierenden R^--Subpopulation mit relativ höherer Quantenausbeute die kürzerwellige(n) Population(en) interpretiert werden (vgl. auch Kapitel 5).

6.3 Diskussion

6.3.1 Faltung und Chromophorbildung

Mit der Mutation T203V sind die Ausbeuten an cytoplasmatisch löslichem Protein hoch, während die Mutation T203Y diesbezüglich neutral ist (vgl. 4.3.1). Dieses Verhalten zeigt sich unabhängig vom Kontext der Aminosäuren an Position 65 und 222 (Abb. 6.1). Die Mutation E222Q führt immer zu erheblich schlechteren Proteinausbeuten. In allen GFP-Röntgenstrukturen ist einer der Carbonylsauerstoffe von E222 mit dem Seitenkettensauerstoff von S65 oder T65 in 2.6-3.1 Å Distanz wasserstoff-verbrückt. Durch die Mutation E222Q könnte die Seitenkette von S65 freigegeben werden, mit anderen polaren Gruppen des Proteins interagieren und so den Faltungsprozess stören (vgl. 4.2.1 & 4.3.1). Dies würde erklären, warum der

negative Effekt der Mutation E222Q durch die zusätzliche Mutation S65G etwas kompensiert werden kann. Die Extinktionskoeffizienten der Chromophore wurden auf der Grundlage der Proteinkonzentrationen ausgerechnet. Da sich mit den Mutationen E222Q oder S65G die Werte nur wenig verändern (Tab. 6.1), scheint der Chromophor bei allen Proteinen in ähnlicher Quantität, vermutlich nahezu vollständig, ausgebildet wird (vgl. Patterson *et al*., 1997). Die Erhöhung des Extinktionskoeffizienten von R^- vor allem mit den T203-Mutationen entspricht einer auf theoretischer Grundlage gegebenen Abhängigkeit von der Form und der Wellenlänge des Absorptionsspektrums (Gregor Jung, pers. Mitt.).

6.3.2 Wechselwirkungen von Seitenkette 203 mit dem Chromophor

Anhand systematischer Substitutionen von T203 wurde festgestellt, dass die Wasserstoff-Brücke von T203(O^{γ}) nach Y66($O^{\eta-}$) sowohl für das Absorptionsmaximum von 477 nm auch für die Stabilisierung der B-Spezies in wt-GFP verantwortlich ist. Dagegen liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen mit aliphatischen T203-Substituenten bei ca. 500 nm (I-Spezies, vgl. 4.3.3 & 5.3.1). Für die I-Spezies ist weiterhin das schmälere Absorptionsspektrum sowie das ebenfalls schmälere und geringfügig längerwellig positionierte Emissionsspektrum charakteristisch (vgl. 5.2.1). Unabhängig vom Kontext der Seitenketten 65 und 222 ist eine R^--Population mit den Eigenschaften der B-Spezies nur bei Anwesenheit von T203 vorhanden und dominiert dann über eine kleine Population der I-Spezies. Mit den Aminosäuren V203 bzw. Y203 liegt dagegen eine (unter den verwendeten Messmethoden) homogene R^--Population mit den Eigenschaften der I-Spezies vor (Abb. 6.2-6.4, Tab. 6.1). Einzig in der S65/Y203/E222-Variante deuten die unterschiedlichen Emissionsspektren nach Anregung von RH bzw. R^- auf unterschiedliche emittierende Chromophorspezies hin. Ebenfalls kontextunabhängig sind die Rotverschiebungen von Absorption und Emission, die mit dem Austausch von T203 oder V203 gegen Tyrosin einhergehen. Diese wurden in 4.3.2 als spezifisch aromatische, vermutlich π-π-Wechselwirkungen mit dem Chromophor interpretiert.

Bei den beiden G65/T203-Varianten deutet die geringe Inhomogenität zwischen Absorptions- und Anregungsspektrum in R^- (Abb. 6.2) auf eine höhere Fluoreszenzquantenausbeute für die I*-Spezies gegenüber der B*-Spezies hin. Ein derartiger Unterschied kann nicht durchgängig zwischen den Varianten mit T203 bzw. V203 festgestellt werden (Abb. 6.5 oben). Da bei den T203-Varianten sowohl die B-Spezies als auch die I-Spezies (durch die Überschneidung der

Absorptionsspektren) angeregt wurden, sind für eine genaue Aussage systematischere Messungen nötig.

6.3.3 Mechanismen des Grundzustandsgleichgewichts

Im denaturierten GFP oder der Modellverbindung beträgt der pK_A-Wert der Tyrosylgruppe des GFP-Chromophors 8.1 (Ward *et al*., 1980; Palm & Wlodawer, 1999) und bei einigen GFP-Varianten ist die Tyrosylgruppe auch im nativen Protein titrierbar (Kneen *et al*., 1998; Llopis *et al*., 1998 & Elsliger *et al*., 1999). Die hier beobachtete Dominanz der R^--Population kann vor allem durch gemeinsame Wasserstoff-Brücken mit Donoren wie T203(O^η) erreicht werden (Abb. 1.4), wie die Destabilisierung von R^- in Proteinen mit T203-Substitutionen beweist (Abb. 6.2 & 6.3; vgl. Palm *et al*., 1997). Ein weiterer Wasserstoff-Donor für den phenolischen Chromophorsauerstoff kann H148(N_δ) sein. Die Mutation H148G führt demgemäß in der YFP-Variante zu einer Erhöhung des pK_a-Wertes von 7.0 auf 8.0 (Wachter *et al*., 1998 & Elsliger *et al*., 1999). Worauf beruht aber der offensichtliche Einfluss der Seitenketten an den Positionen 65 und 222?

In den Röntgenstrukturen von GFP mit dominierender RH-Population bindet ein Wassermolekül (W22 in Abb. 1.4) in ca. 2.5 Å Distanz zu Y66(O^η) durch Wasserstoff-Brücken direkt oder indirekt sowohl H148 als auch T203 und fungiert gleichzeitig als Akzeptor in einer Wasserstoff-Brücke mit Y66(O^η). Diese Konstellation wird über eine weitere Wasserstoff-Brücke von W22 (im folgenden H_2O_{reg}) mit dem Wasserstoff-Donor S205 und durch die weiteren Donoren in der Kette, E222 und S65, stabilisiert (Ormö *et al*., 1996; Yang *et al*., 1996; Brejc *et al*., 1997 & Palm *et al*., 1997). In den Röntgenstrukturen von R^--Varianten des GFP ist die Wechselwirkung von E222 mit S205 unterbrochen. Durch die Substitution von S65 oder E222 wird S205 also zum Wasserstoff-Donor für H_2O_{reg}, welches wiederum zum Wasserstoff-Donor für den nun negativ geladenen Tyrosylsauerstoff des Chromophors wird. H148 und T203 können jetzt mit Y66($O^{\eta-}$) eine direkte Wasserstoff-Brückenbindung eingehen. E222 stabilisiert den RH-Chromophor also weniger direkt durch seine negative Ladung, sondern genauer über die Fixierung von H_2O_{reg} und damit H148 und T203. Dies wird dadurch bestätigt, dass anscheinend auch in der E222G-Variante die R^--Population stark dominiert. Ehrig *et al*. (1995) präsentieren hier leider nur Exzitations- und keine Absorptionsspekten; weitere Hinweise kommen aber von Palm & Wlodawer (1999). Warum aber wird gerade in der Kombination S65/Q222 R^- am stärksten populiert? Das plausibelste Modell ist, dass das Wasserstoff-Brückennetzwerk zwischen S65 und Y66(O_η^-) auch in der R^--

Population persistiert. Dabei fungiert die Amidgruppe von Q222 als Wasserstoff-Donor für S205 und „invertiert" dadurch das Wasserstoff-Brückennetzwerk zum Chromophor. Diese Konformation wird durch die Wasserstoff-Bindung zwischen S65/Q222 stabilisiert. Alternativ könnte eine Wasserstoff-Brücke von den Donoren E222 oder Q222 zum heterozyklischen Stickstoffs (N^1) (enstprechend der Interpretation der Röntgenstruktur von Y203/G65-Varianten mit R^--Dominanz; Wachter *et al*., 1998) die Azidität der Tyrosylgruppe des Chromophors erhöhen. Dies ist aufgrund der Abschirmung von N^1 durch S65 oder größere Seitenketten nur für G65-Varianten wahrscheinlich. Diesbezügliche Hypothesen werden durch den ungeklärten Protonierungszustand von N^1 noch komplizierter (positiv geladen: Voityuk *et al*., 1997; Palm & Wlodawer, 1999; negativ geladen: Weber *et al*., 1999; Wachter *et al*., 1998; Thor *et al*., 1998, Bell *et al*., 2000).

6.3.4 Strahlungsloser Energieverlust aus R^-*

Die Verluste an Fluoreszenzquantenausbeute bei Anregung von R^-* sind durch die Mutation S65G etwas stärker als durch die Mutation E222Q. Die Kombination beider Einzelmutationen hat hier einen additiven Effekt und die Verluste sind im Zusammenhang mit Y203 am geringsten (Abb. 6.5). Eine Veränderung der Geschwindigkeit des Fluoreszenzprozesses von R^-* sollte mit Veränderungen von Form bzw. Lage der Absorptions- oder Emissionsmaxima oder der Größe des Stokesshifts einhergehen (Gregor Jung, pers. Mitt.). Da dies nicht beobachtet wird, muss die Energie durch einen mit der Emission konkurrierenden strahlungsfreien Prozess verloren gehen. Dieser wird schneller, wenn Hydroxylgruppen oder Atome in der unmittelbaren Nachbarschaft des Imidazolringes entfernt werden. Die Mutationen S65G und E222Q würden vor allem auf die Rotation des Phenolrings des Chromophors um τ sterisch erleichtern, die Mutation T203Y einen derartigen Prozess dagegen erschweren (Abb. 1.4, vgl. 4.3.4). Weber *et al*. (1999) zeigen tatsächlich, dass Energiebarrieren dazu in den Seitenketten von S65 und E222 bestehen. Dabei wurden nach schrittweisen Rotationsbewegungen des neutralen RH-Chromophor um τ die Relaxationsbewegungen der wt-GFP-Matrix simuliert. Andererseits wurden die Energieprofile, welche einen strahlungsfreien Energieverlust ermöglichen, nur für den *Hula-Twist* bzw. eine Rotation um φ errechnet. Hierbei handelt es sich aber um widersprüchliche theoretische Berechnungen (vgl. Voityuk *et al*. 1998), die sich zudem auf Elektronenverteilungen in Grenzzuständen gründen. Die experimentellen Daten sprechen für eine erhöhte Bewegungsfreiheit in der „Bindungstasche" des Chromophors, die mit der Reduktion von Seitenketten und Wasserstoff-Brückenbindungen harmoniert. Wechselwirkungen von E222 mit dem

heterozyklischen Stickstoffs (N^1) sind dagegen nur für die G65-Varianten wahrscheinlich.

6.3.5 Nur der Kontext S65/E222 ermöglicht effektiven ESPT

In 4.3.4 wurde für die Y203-Variante im Wildtyp-Kontext S65/E222 ein schneller strahlungsloser Energieverlust von RH* festgestellt und als innere Konversion durch Rotationsbewegungen im Chromophor interpretiert (Kummer *et al*., 2000). Die Quantenausbeute für den ESPT ist schon mit T203 oder V203 ähnlich gering, wenn S65 und/oder E222 nicht vorhanden sind. Mit Y203 gibt es noch einen zusätzlichen Verlust an grüner Emission (Abb. 6.5). Da sich die Intensitätsverluste durch die Mutationen S65G und E222Q nicht additiv verhalten, kann das für R^-* favorisierte Modell der erhöhten Rotationsfreiheit um die exozyklischen Bindungen des Chromophors hier nicht alleine die Dominanz eines strahlungsfreien Verlustes der Anregungsenergie aus RH* gegenüber dem ESPT erklären. Aufgrund der genannten sterischen Konflikte mit S65 ist ein schneller Energieverlust durch Wechselwirkungen von E222 oder Q222 mit dem heterozyklischen Stickstoff N^1 unwahrscheinlich. Statt mit schneller innerer Konversion können die experimentellen Daten besser mit einer erheblichen Verlangsamung des ESPT durch die Mutationen S65G und E222Q erklärt werden. Die folgende Interpretation ist zusätzlich im Einklang mit dem Modell zur Photoisomerisation, welches auf der Grundlage von Röntgenstrukturen erstellt wurde (Abb. 4.4; Brejc *et al*., 1999). Dabei wird das Proton des RH*-Chromophors auf die negative Ladung von E222 transferiert. Nach dem Austausch von E222 oder des die negative Ladung auf E222 stabilisierenden S65 steht anscheinend kein Akzeptor für einen effektiven ESPT (in wt-GFP $\tau \approx$ 6 ps; Lossau *et al*., 1996) zur Verfügung. Gegen einen anderen Mechanismus, den schnelleren strahlungslosen Verlust der Anregungsenergie, spricht der meist deutliche Anteil an blauer RH*-Emission in den Varianten mit V203 oder T203. Die Geschwindigkeitskonstante für den ESPT t_{ESPT} kann abgeschätzt werden (Tab 6.3). Im Vergleich zu wt-GFP verlangsamt sich t_{ESPT} mit der Mutation T203V um das 3-fache. Werden zusätzlich noch die Mutationen S65G und E222Q bzw. beide eingeführt, findet eine Verlangsamung um das 7-fache, das 21-fache bzw. 80- bis 330-fache statt.

H148 wird deshalb als alternativ vorhandener Protonenakzeptor unwahrscheinlich. Für diese Schlussfolgerung wurde die Mutation E222Q bereits von Palm *et al*. (1997) vorgeschlagen. Die Seitenkette an Position 203 zeigt einen zusätzlichen Einfluss auf die anregungsinduzierte Dissoziation des Protons.

	T203	Y203	V203
S 65 E222	100 %	96 %	31 %
G 65 E222	n.m.	n.m.	14 %
S 65 Q222	n.m.	n.m.	<4.7 %
G 65 Q222	<2.4%	14 %	0.3-1.2 %

Tab. 6.3. Relative Geschwindigkeit für den ESPT gegenüber wt-GFP. Die Werte wurden aus dem Verhältnis der blauen zur grünen Fluoreszenz nach kurzwelliger Anregung (korrigiert für die Fluoreszenzquantenausbeute, vgl. Abb. 6.5) abgeschätzt. n.m: wegen schwacher RH-Absorption nicht messbar

6.3.6 Blaue Emission in der Variante G65/V203/Q222

In den Varianten G65/V203/Q222 und auch in G65/T203/Q222 tritt bei Anregung von RH eine blaue, relativ intensive Emission auf (Abb. 6.2 & 6.5). Worin liegt hierfür die Ursache? Die oben beschriebene Verringerung der ESPT-Rate muss zusätzlich mit der Verlangsamung des strahlungsfreie Verlustes der Anregungsenergie einhergehen. In der Röntgenstruktur von Y203/G65-Varianten ist eine Wasserstoff-Bindung von E222 (Donor) zum heterozyklischen Stickstoffs (N^1) sichtbar (Wachter *et al*., 1998). Diese sterischen Verhältnisse sind nur im Kontext mit G65 wahrscheinlich und könnten eine Rotation der Tyrosylgruppe um φ oder τ, und damit einen derartigen Energieverlust deutlich einschränken. Eine Veränderung des Protonierungsstatus von N^1 könnte die Effektivität eines strahlungsfreien Verlustes der Anregungsenergie auch aufgrund der Elektronenverteilung im Chromophor beeinflussen (vgl. 6.3.3 sowie Weber *et al*., 1999 & Voityuk *et al*., 1998b). In beiden Fällen müsste die Wasserstoff-Bindung auch mit Q222 persistieren.

6.3.7 Ökologische und evolutive Konsequenzen

Im wt-Kontext S65/E222 ist das Grundzustandsgleichgewicht am stärksten nach RH verschoben und nach Anregung von RH findet effizienter ESPT ebenfalls nur in dieser Umgebung statt. Demgemäß scheint die Umgebung des Chromophors evolutiv auf grüne Emission nach kurzwelliger Anregung optimiert worden zu sein. T203 ist zwar für die Proteinfaltung weniger optimal als V203, lässt aber durch die Populierung der B-Spezies die langwellige Anregung durch Aequorin zu.

Aus dem Sonnenlicht wird der Wellenlängebereich um 420 nm im klaren Ozeanwasser am wenigsten absorbiert (Lythgoe, 1972). Deshalb kann durch die

Population des RH-Chromophors *Aequorea victoria* auch in größeren Meerestiefen noch zu grüner Emission angeregt werden.

Aus der Abschätzung der Extinktionskoeffizienten ergibt sich, dass die Mutation E222Q auf den Anteil von Proteinen mit einem oxidierten Chromophor kaum Einfluss hat. Deshalb kann hier (Matz *et al*., 1999 & Yarbrough *et al*., 2001; Jim Remington, pers. Mitt.) auch nicht die Ursache für die Konservierung dieser Aminosäure in allen gefundenen homologen Proteinen (A. S. Savitsky, pers. Mitt.) liegen. Die Ursache für die Konservierung könnte aber immer noch eine effizientere Faltung oder einer schnelleren Zyklisierung bzw. Oxidation des Chromophors sein. (Wiehler & Steipe., in Vorbereitung).

7 Zufallsmutagenesen

7.1 Motivation

Eine geeignete Methode zur Untersuchung des Sequenzraums eines Proteins ist das zufällige Einfügen von Mutationen, gefolgt von einer Analyse der erhaltenen Phänotypen. Die strukturelle Lokalisation und die Art einer Mutation im Zusammenhang mit ihrer Wirkung kann Einblicke in grundlegende funktionale Mechanismen erlauben. Zum anderen können sich in der erhaltenen Bibliothek auch Varianten mit verbesserten oder neuen Eigenschaften befinden.

Aus Gründen der Kombinatorik ist für diese Zwecke die Herstellung großer Bibliotheken notwendig. Für ein Protein mit 238 Aminosäuren wie dem GFP gibt es schon 4522 (= 238×19) mögliche Einzelmutationen und 2×10^7 (= 4522×237×19) mögliche Doppelmutationen. Andererseits können ähnlich gelagerte Aminosäuresubstitutionen, zum Beispiel gegen hydrophobe Aminosäuren ähnlicher Größe wie Valin, Leucin oder Isoleucin, ähnliche oder identische Auswirkungen auf das Protein haben. Im Extremfall ist die Funktionalität für die ursprüngliche Aminosäure spezifisch und alle anderen Aminosäuren bewirken denselben Phänotyp. Die spektralen Eigenschaften von GFP werden am wahrscheinlichsten durch Aminosäuremutationen in der unmittelbaren räumlichen Chromophorumgebung verändert. Da die entsprechenden Aminosäurepositionen über die gesamte Primärsequenz des Proteins verteilt sind, werden die Mutationen mittels mutagener PCR (mPCR, vgl. 3.1.5.2) zufallsverteilt in das Gen eingefügt. Aminosäuremutationen, welche die Substitution nicht nur von einem, sondern von zwei oder sogar drei Basenpaaren im Codon benötigen, sind dabei äußerst unwahrscheinlich. Aus monoklonalen *E. coli*-Kolonien, welche je einen Genotyp der Proteinbibliothek exprimierten, sollen intensiver fluoreszierende GFP-Varianten und solche mit mit neuen Absorptions- und Emissionsspektren isoliert werden. Die Anzahl der Klone, die in einem adäquaten Zeitraum mit dem Auge untersucht werden kann, wird auf ca. 10^5 geschätzt. Damit sollten alle wahrscheinlichen Einzelmutationen und zumindest ein guter Anteil der wahrscheinlichen Doppelmutationen erfasst werden.

Zur Etablierung der Methode und zum Auffinden fluoreszenzspektroskopisch neuer Varianten wurde eine mPCR mit wt-GFP durchgeführt. Die T203Y-Variante war ein weiteres Templat. Diese Mutation verschiebt das Absorptions- und Emissionsspektrum von GFP zu größeren Wellenlängen. In den Kapiteln 4.3.2 & 6.3.2 wurden dies auf aromatische Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und der eingefügten Tyrosylgruppe zurückgeführt. Ein unerwünschter Effekt der Mutation T203Y ist der starke Verlust an Fluoreszenzquantenausbeute nach Anregung von RH, was die *in vivo*-Applikation von Y203-Mutanten auf eine langwellige Anregung einschränkt. Das *Screening* mit einer UV-Lampe (ca. 366 nm) kann neben Varianten mit höheren Ausbeuten an funktionalem Protein auch solche mit Verschiebungen der Emissionswellenlänge (präferentiell ins Rote) oder höheren Fluoreszenzquantenausbeuten bei Anregung von RH zutage bringen. Letzteres kann die systematischen Untersuchungen über den der inneren Konversion zugrundeliegenden Mechanismus ergänzen (vg. 4.3.4 & 6.3.5). Die Ergebnisse der Zufallsmutagenese am rot fluoreszierenden Protein DsRed werden in Kapitel 8 gesondert behandelt.

7.2 Ergebnisse

7.2.1 Methodische Ergebnisse

Die erst gegen Ende der Arbeit verwendeten QIAquick-Aufreinigungskits für PCR-Produkte und für DNA-Fragmente aus Agarose-Gelen (vgl. 3.1.9) bedeuten eine erhebliche Zeitersparnis für die Erstellung der Proteinbibliotheken. Bei elektrokompetenten *E. coli* BL21 DE3 (ca. $1\text{-}3\cdot10^8$ cfu/µg Kontrollplasmid) konnten mit 100 µl mPCR-Ansatz ca.10^8 Klone mit zufallsmutierten Genen erzeugt werden. Damit lagen, im Vergleich mit einem aus *E. coli* XL1 Blue isolierten Kontrollplasmid, 3-9 % der in der PCR-Reaktion primär erzeugten Gene in funktionalen Plasmiden vor. Die Hintergrundverunreinigung durch Fremdplasmide konnte auf unter 0.5 % der Klone gesenkt werden (vgl. 3.1.10). Auf einer Agarplatte mit 226×226 mm Kantenlänge können im Optimum ca. $1.5\cdot10^4$ Klone für ein optisches *Screening* ausplattiert werden.

Bei der Erzeugung der Mutationen mittels mPCR (vgl. 3.1.5.2) wurde von einer Mutationswahrscheinlichkeit von 0.66 % bei annähernder Zufallsverteilung der Mutationen auf DNA-Ebene ausgegangen. Wie ist die tatsächliche Anzahl und Verteilung der Mutationen in den mPCR-Produkten? Werden beide

Zufallsmutagenesen zusammengenommen, wurden neun der aus der mPCR resultierenden Varianten und damit insgesamt 7225 bp sequenziert. Dabei treten 26 DNA-Mutationen an 23 Positionen auf (zwei Mutationen treten zweifach auf, an einer Position liegen zwei verschiedene Substitutionen vor). Daraus ergibt sich eine Mutationshäufigkeit von 0.36 % pro Nukleotidposition. Pro Gen treten im sequenzierten Bereich dreimal zwei, zweimal drei, einmal vier und zweimal fünf DNA-Mutationen auf. Deletionen und Insertionen wurden nicht gefunden, was sich durch die Selektion auf nur fluoreszierende Klone, also funktionale Proteine mit dem korrekten genetischen Leseraster, erklärt. Tab. 7.1 zeigt eine starke Häufung der Mutationen T bzw. A zu X, während G bzw. C fast nicht ausgetauscht werden. Da in der PCR Mutationen am antisense-Strang solchen am sense-Strang entsprechen, sind komplementäre Mutationen äquivalent. In Übereinstimmung mit den Literaturangaben (Cadwell & Joyce; Clontech Homepage) ist die Verteilung der Mutationen über das Gen zufällig. Im kodierenden Bereich liegen 23 der 26 Mutationen, davon verursachen aber nur 10 (= 44 %) einen Aminosäureaustausch.

	G	**A**	**T**	**C**	Σ	$\mathbf{f_{G,A,T,C}}$
G zu	–	0	0	0	0	0.20
A zu	3	–	5	1	9	0.34
T zu	2	3	–	8	13	0.27
C zu	1	1	0	–	2	0.20
Σ	6	4	5	9	24	

Tab. 7.1 Absolute Häufigkeit der möglichen Nukleotidsubstitutionen in 9 sequenzierten PCR-Produkten. Rechts ist die Frequenz der einzelnen Nukleotide im sequenzierten Bereich angegeben. Die beiden doppelt aufgetretenen Substitutionen wurden nur einfach gezählt, da ein nur einmaliges Entstehen in der PCR wahrscheinlich ist.

7.2.2 wt-GFP als Templat

Ca. 60000 Klone, verteilt auf insgesamt fünf Agarplatten, wurden wiederholt innerhalb weniger Wochen nach der Transformation zuerst auf einem UV-Tisch und später wiederholt mit einer UV-Handlampe (λ_{max}= 366 nm) unter einer Sterilbank optisch durchmustert. Ca. 50 % der Klone zeigten keine sichtbare Fluoreszenz, während die Intensitäten der fluoreszierenden 50 % Klone stufenlos unterschiedlich war. Die Fluoreszenzintensität der Kontroll-Kolonien mit wt-GFP wurde dabei nur von sehr wenigen Klonen übertroffen. Erst bei wiederholtem *Screening* und nach zwei Wochen wurden mit neun blau emittierenden Klonen qualitativ abweichende entdeckt. Alle gefundenen Klone wurden aufgenommen, in 1 ml LB_{+Amp} suspendiert und in verschiedenen Volumina auf Petrischalen ausplattiert. Aus den resultierenden Klonen wurde je ein blau emittierender für eine Plasmid-Schnellpräparation ausgewählt. Die erhaltene DNA wurde in *E. coli* BL21 DE3 retransformiert und

ausplattiert. Die DNA der zwei am hellsten fluoreszierenden Klone D1_blue und A3_blue wurde in *E. coli* XL1 Blue transformiert und eine DNA-Präparation mit anschließender Sequenzierung durchgeführt. Von den Substitutionen auf DNA-Ebene (T236C/T294C bzw. T80C/T294C/A518G) bewirkt nur die gemeinsamen Mutation T294C eine Aminosäuremutation, nämlich Y66H. Damit wird die Tyrosylgruppe des Chromophors gegen einen Imidazolring ausgetauscht. In einem ähnlichen Experiment hatten Heim *et al.* (1994) ebenfalls die Y66H-Variante gefunden und bereits spektroskopisch charakterisiert. Die Röntgenstruktur wurde 1997 zusammen mit den Mutationen F64L bzw. Y145F präsentiert (Palm *et al*., 1997 bzw. Wachter *et al*., 1997).

7.2.3 T**203**Y **als Templat**

7.2.3.1 Selektierte Varianten

Ca. 80000 Klone auf insgesamt vier Agarplatten wurden wie in 7.2.2 auf hohe Fluoreszenzintensitäten und abweichende Emissionsfarben durchmustert. Die Verteilung der Fluoreszenzhelligkeiten entsprach der in 7.2.2 vorgefundenen. 11 hellere bzw. abweichend fluoreszierende Klone wurden aufgenommen, in LB_{+Amp} suspendiert und neu ausplattiert. Am nächsten Tag wurden ein bis wenige Kolonien in PBS-Puffer auf eine OD_{600} von ca. 0.1 verdünnt und bezüglich ihrer Fluoreszenzeigenschaften vermessen. Dabei wurde je ein Exzitationsspektrum (λ_{Em} = 523 nm) und die Emissionsspektren bei Anregung von RH bzw. R^- (λ_{Em} = 403 bzw. 485 nm) unter identischen Bedingungen aufgenommen. Dies wurde zwei Tage später für weitere 51 aufgenommene Klone wiederholt, so dass insgesamt 62 Klone ausgewertet wurden. Ca. 40 % der selektierten Klone zeigten exakt das Spektrum von wt-GFP. Bei Sequenzierung zweier Gene wurde die DNA-Sequenz des Templats gefunden. Da die Reversion der Mutation T203Y den Austausch von mindestens zwei Basen im Codon erfordert, ist eine Kontamination mit dem wt-GFP-Plasmid wahrscheinlich. Von den verbleibenden Klonen wurden diejenigen, welche in der Fluoreszenzintensität pro Bakteriendichte oder den Fluoreszenzspektren am deutlichsten von der T203Y-Variante abwichen, ausgewählt. Deren GFP-Gene wurden sequenziert und entsprechenden Proteine wurden exprimiert, gereinigt und spektroskopisch charakterisiert.

Die Absorptionsspektren der selektierten Proteine zeigt Abb. 7.1. Das Verhältnis der Absorptionsmaxima beider Chromophorspezies RH und R^- reflektiert deren Grundzustandsgleichgewicht. Durch die Mutationen K166Q/I229F, aber vor allem

V224A und N105Y/V224T wird das Grundzustandsgleichgewicht stark zugunsten von RH verschoben, während S72A und V163G das Gegenteil bewirken.

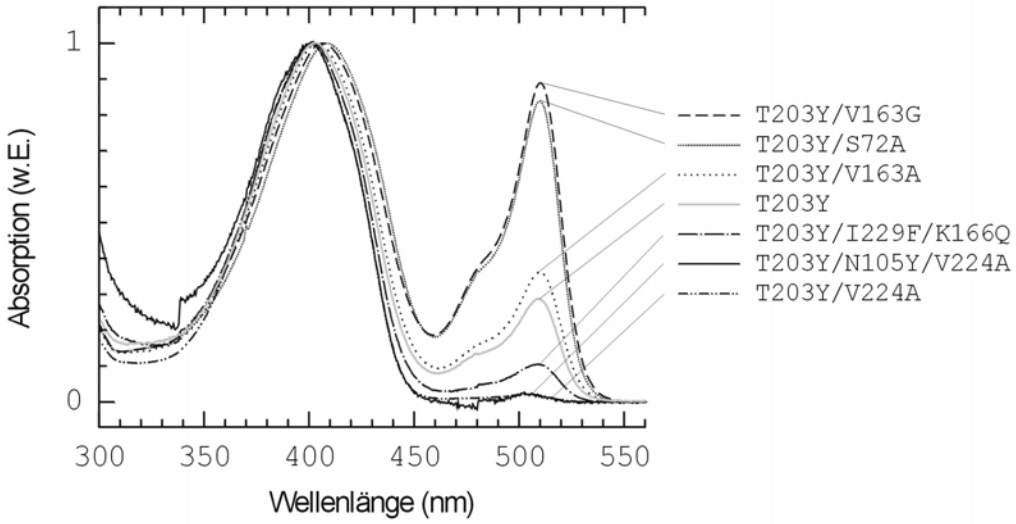

Abb. 7.1. Absorptionsspektren der T203Y-Variante und aller aus der Zufallsmutagenese stammenden Varianten mit abweichenden Absorptions- und/oder Emissionsspektren.

	T203Y	T203Y S72A	T203Y V163G	T203Y V163A	T203Y V224A	T203Y N105Y V224T	T203Y K166Q I229F
Ausbeute [mg]	21	69	80	72	26	0.4	0.6
λ_{Abs}(RH) [nm]	403	409	406	404	401	401	402
λ_{Abs}(R^-) [nm]	510	510	510	510	505	504	509
λ_{Em}(RH ang) [nm]	520	525	523	519	514	514	517
λ_{Em}(R^- ang) [nm]	525	525	525	525	517	519	523
QA_{RH*}(% R^-) [nm]	12	15	9	10	16	10-30	14

Tab. 7.2. Eigenschaften der aus *E.coli*-Kolonien isolierten Y203-Varianten. Ausbeute an löslichem Protein pro 570 ml Expressionskultur. Die Absorptionsspektren wurden in ca. 50 µM Proteinlösungen gemessen (bei den Varianten N105Y/224T und K166Q/I229F nur ca. 5 µM). Für die Emissionsspektren wurde die Lösung 10× verdünnt. Die Quantenausbeute für die grün-gelbe Emission ist für RH* relativ zu R^- angegeben.

Die Selektion der Proteine mit den Mutationen S72A, V163A und V163G war aufgrund der stärkere Fluoreszenz der Bakterienkolonien vorgenommen worden. Eine mögliche Ursache ist eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute nach Anregung von RH. Durch den Vergleich der Absorptions- und Anregungsspektren der Proteine kann die Quantenausbeute der gelben Emission relativ zu der nach Anregung von R^-

abgeschätzt werden (vgl. 6.2.4 oder Kummer *et al*., 2000). Die Werte zeigen, trotz eines starken methodischen Fehlers bei sehr niedrigen Absorptionswerten von R^- (Abb. 7.1), keine deutlich veränderten Quantenausbeuten von RH (Tab. 7.2). Demgegenüber sind die Ausbeuten an löslichem Protein für diese Varianten ca. 2-fach bis 3-fach höher als in der T203Y-Variante. Deutliche Rotverschiebungen wurden nur mit der zusätzlichen Mutation S72A gefunden. Sie verschiebt die Absorption von RH bzw. die Emission nach Anregung von RH um je 5-6 nm ins Rote (Tab. 7.2). Dagegen bewirken die Mutationen V224A und N105Y/V224T Blauverschiebungen Emissionsmaxima um 6-8 nm und der Absorptionsmaxima von RH bzw. R^- um 2 nm bzw. 5-6 nm.

7.2.3.2 Steigerung der Proteinausbeuten durch die V163A-Mutation

Zum Vergleich mit den für *in vivo*-Applikationen interessanten Y203-Varianten ist die F203-Variante mit der isosteren, aber hydrophoben Seitenkette geeignet. Besonders für zeitaufgelöste Messungen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Michel-Beyerle (vgl. 4.2.3; Kummer *et al*., 2000), aber auch für zukünftige Resonanz-Raman-Spektroskopie werden größere Mengen an Protein benötigt. Die schlechten Ausbeuten der T203F-Variante in *E. coli*-Expressionskulturen (vgl. 4.2.1.) machen es schwierig, ausreichende Probenmengen für derartige Experimente zu bekommen. Zur Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein wurde deshalb die Mutation V163A in die T203F-Variante einkloniert (vgl. 7.2.3.2). In der Variante T203Y wird durch die zusätzliche Mutation V163A die Proteinausbeute deutlich angehoben (Tab. 7.2). Dabei werden, von einer leicht stärkeren R^--Absorption abgesehen, die Absorptions- oder Emissionsspektren weder in Form noch in der Lage beeinflusst (Abb. 7.2).

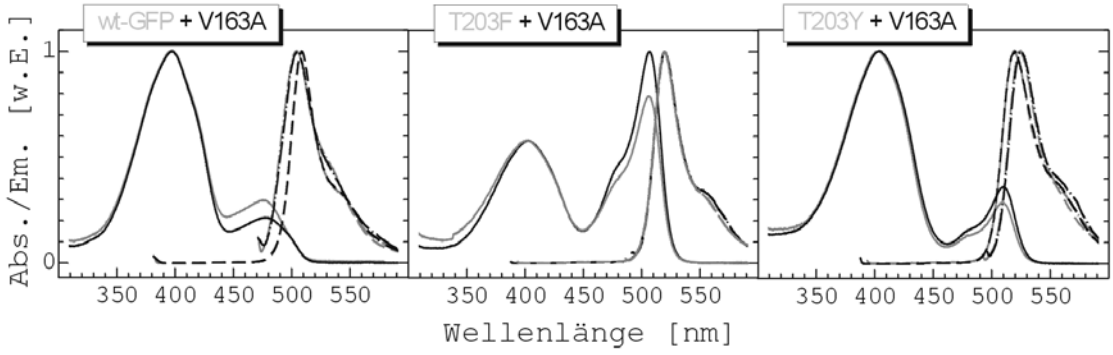

Abb. 7.2. Absorptions- und Emissionsspektren von Proteinen mit (schwarz) und ohne (grau) die Mutation V163A. Absorption (solide) und Emission nach Anregung von RH bzw. R^- (gestrichelt bzw. gepunktet). Alle Absorptionsspektren wurden bei 20 μM Proteinkonzentration aufgenommen; für die Emissionsspektren wurden die Proben 10-fach verdünnt.

Als zuätzliche Kontrolle für einen Einfluss der Mutation V163A auf spektrale Eigenschaften wurde die Mutation zusätzlich in wt-GFP einkloniert. Die Ausbeuten an cytoplasmatisch löslichem Protein steigen bei der T203F-Variante 109-fach auf 19 mg bzw. bei wt-GFP 4-fach auf 52 mg/g Zellnassgewicht. In allen drei Proteinen treten durch die Mutation V163A leichte Verschiebungen des Grundzustandsgleichgewichtes auf. Die langwellige Verbreiterung im Absorptionsspektrums von R^- in wt-GFP ist im Einklang mit der Feststellung, dass zusammen mit der A-Spezies auch die bei ca. 500 nm absorbierende I-Spezies stärker populiert wird (vgl. 5.3.). Ansonsten sind weder bezüglich der Form oder Lage der Absorptions- und Emissionsspektren (Abb. 7.2) noch in den Quantenausbeuten für den ESPT (Daten nicht gezeigt, vgl. Kapitel 4) signifikante Effekte messbar.

7.3 Diskussion

7.3.1 Art und Verteilung von Mutationen

In dem der Zufallsmutagenese zugrunde liegenden Protokoll ist, normiert auf eine identische Häufigkeit aller Nukleotide, eine annähernd gleichförmige Verteilung der Substitutionen angegeben (Cadwell & Joyce, 1992). In der experimentell ermittelten Verteilung tritt dagegen der Austausch von Guanin und Cytosin selten bis gar nicht auf, wodurch unerwünschterweise die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen sehr unwahrscheinlich sind. Im Verlauf der Arbeit wurde von Clontech ein Kit für mPCR's herausgegeben (*Diversify™ PCR Random Mutagenesis Kit*). In den Herstellerangaben werden ähnliche Abweichungen von der Zufallsverteilung angegeben, die sich anscheinend auch durch eine Variation der beteiligten Komponenten nicht optimieren ließen. Eine Erhöhung der gesamten Mutationsrate im PCR-Gemisch ist zwar möglich, erhöht aber den Bias weiter. Ein alternatives und einfaches Verfahren ist die Erhöhung der Anzahl der in der PCR durchlaufenen Zyklen entweder direkt oder in einem frischen PCR-Ansatz (Cadwell & Joyce, 1992).

Die Verteilung der Mutationen über die DNA-Sequenz ist, in Übereinstimmung mit den Literaturangaben zufällig. Von den 23 im kodierenden Bereich befindlichen Mutationen resultieren aber nur 44 % in einer Aminosäuremutation. Dies ist eine deutliche Abweichung vom Erwartungswert, denn je nach Codon bewirken ca. 78-89 % und im Durchschnitt ca. 80 % aller zufälligen Mutationen in einem Codon den Austausch der kodierten Aminosäure. Das Ergebnis kann aber durch die Selektion auf Fluoreszenz erklärt werden, wenn die Mehrzahl der Aminsäuresubstitutionen

Störungen auf dem Weg zum funktionalen Protein verursacht. Hier sind vor allem Einflüsse auf die Proteinfaltung zu erwarten (vgl. 4.3.1).

7.3.2 wt-GFP als Templat

Der Mangel an sichtbarer Fluoreszenz bei ungefähr der Hälfte der Klone beruht wahrscheinlich ebenfalls vor allem auf negativen Auswirkungen der Mutationen auf die Faltung und in Folge degradierten oder in *Inclusion Bodies* aggregierten Proteinen. Auch die durch Verschlechterung von Zyklisierung und Oxidation des Chromophors oder eine verringerte Fluoreszenzquantenausbeute können die Fluoreszenzintensität der Bakterien verringern. Derartigen Auswirkungen sind vor allem bei Mutationen in der direkten räumlichen Nachbarschaft des Chromophors und deshalb weniger häufig zu erwarten. Auch das Einfügen von Stoppcodons resultiert meist in nicht funktionalem Protein.

Die blaue Emission beider sequenzierter Proteine beruht auf der gemeinsamen DNA-Mutation T294C und der resultierenden Aminosäuresubstitution Y66H. Die Mutation könnte in einem relativ frühen PCR-Zyklus als gemeinsamer Vorläufer entstanden sein. Gegen die alternative Hypothese einer unabhängigen Entstehung spricht die geringe statistische Wahrscheinlichkeit; dafür spricht wiederum die relativ hohe Konzentration an Templat-DNA. Die physiko-chemische Charakterisierung der Y66H-Variante auf der Grundlage von stationären Absorptions- und Emissionsspektren wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen publiziert. Das Protein konnte jedoch, zusammen mit der Variante Y66F für eine eine kinetische Charakterisierung verwendet werden, die in Kooperation in der Arbeitsgruppe von Prof. Michel-Beyerle (Kummer *et al*., in Vorbereitung) durchgeführt wurde.

7.3.3 T**203**Y als Templat

7.3.3.1 Steigerung der Proteinausbeuten

Die Varianten mit den zusätzlichen Mutationen S72A, V163G und V163A wurden wegen der stärkeren Fluoreszenz aus 80000 Klonen selektiert. Die Intensitätssteigerung beruht hauptsächlich an der höheren Menge an funktionalem Protein in den *E. coli*-Zellen, wie die Abschätzung der Quantenausbeute von RH und die Ausbeuten an cytoplasmatisch löslichem Protein in den Expressionskulturen zeigen. S72A wurde bereits, zusammen mit anderen Mutationen, bei einer Zufallsmutagenese der Aminosäuren 55-74 gefunden (Cormack *et al*., 1996). Die

gesteigerte Fluoreszenzintensität beruhte nicht auf der stärkeren Expression, sondern auf der effizienteren Faltung der Proteine. Im Gegensatz zu dem Wildtyp-Protein bildeten die *E. coli*-Zellen mit der Mutation S72A fast nur funktionales und lösliches Protein statt *Inclusion Bodies*. Die Mutation V163A wurde ebenfalls in Bibliotheken randomisierter GFP-Varianten mehrfach gefunden. Siemering *et al*. (1996) beschreiben V163A, zusammen mit einer anderen Mutation, als faltungsverbessernd besonders bei Expressionen mit 37 °C. Crameri *et al.* (1996) bzw. Heim *et al.* (1996) selektierten dieselbe Substitution aus Bibliotheken von wt-GFP bzw. *Cyan Fluorescing Protein* mit der Y66W-Mutation. S72 ist in der zentralen α-Helix von GFP lokalisiert und bildet einen Teil des „Daches" der Kavität (Abb. 7.3), die sich über dem Chromophor befindet und durch die mutierte Seitenkette von Y203 größtenteils ausgefüllt wird.

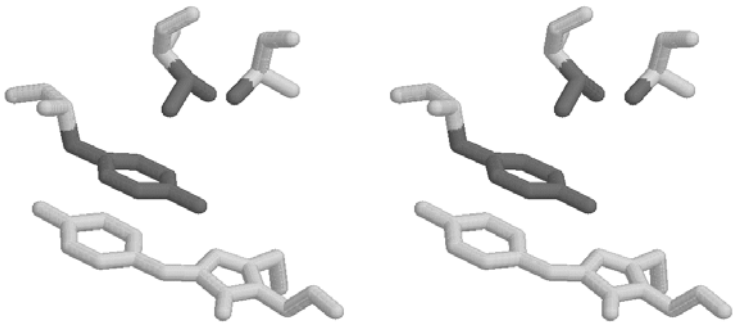

Abb. 7.3. Ausschnitt aus der Röntgenstruktur 1YFP als Stereobild. Dargestellt sind von unten nach oben der Chromophor sowie Y203, V224 und A72 (Seitenketten dunkelgrau).

Die überwiegend hydrophobe Umgebung der Aminosäure legt nahe, dass die zur Proteinfaltung notwendige Aktivierungsenergie durch die Mutation herabsetzt wird. V163 befindet sich in einem der β-Stränge in Chromophornähe (ca. 7-8 Å Distanz). Die proximal ausgerichteten Seitenkette könnte aufgrund ihrer Größe die Proteinfaltung stören. Damit übereinstimmend vermuten Palm *et al*. (1997), dass der Umfang der zentralen α-Helix die Formierung des β-*barrels* erschwert. Sowohl S72A als auch V163A sind in den meisten zellbiologisch verwendeten GFP-Varianten enthalten.

Die Mutation V163A kann, wie an der T203F-Variante gezeigt wurde, große Steigerungen der Ausbeute an funktionalem Protein bewirken, ohne die spektralen Eigenschaften zu beinflussen (Abb. 7.2). Das obere Limit bezüglich der Proteinausbeuten ist sicherlich durch die Kapazität der exprimierenden *E. coli*-Zellen

bestimmt. GFP ist unter den cytoplasmatisch gelösten Proteinen mit ca. 14 mg/g Zellnassgewicht bereits stärker vertreten als zelleigene Proteine (Abb. 3.1).

7.3.3.2 Veränderte Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften

Die Mutation T203Y führt gegenüber wt-GFP zu Rotverschiebungen von Absorption und Fluoreszenz um ca. 400 cm^{-1} (Tab. 4.1), die auf aromatische Wechselwirkungen mit dem Chromophor zurückgeführt wurden (vgl. 4.3.2 & 6.3.2). Diese Rotverschiebungen nehmen durch die Mutationen V224A oder N105Y/V224T konsistent auf die Hälfte ab. Die genauere Betrachtung der Röntgenstruktur einer Y203-Variante liefert dafür eine plausible Hypothese.

Der Phenolring von Y203 ist einerseits mit den beiden Methylgruppen der V224-Seitenkette und andererseits mit dem Phenolring des Chromophors in van-der-Waals-Kontakt. Die Seitenkette von V224 kann dadurch die Koplanarität beider Phenolringe sterisch erzwingen (Abb. 7.3). Der Austausch gegen V224A oder V224T könnte zu einer Rotation des Phenolringes von Y203 oder zu einer Vergrößerung der Distanz mit dem Chromophor führen. Beides hätte eine Entkoppelung beider Aromaten bzw. deren π-Elektronenwolken und damit die beobachtete Abnahme der durch T203Y verursachten Rotverschiebungen zur Folge. Gleichzeitig würde die beobachtete relative Abnahme der R^--Population (bei identischen Extinktionskoeffizienten) auftreten, da die phenolischen Wechselwirkungen den R^--Chromophor im Grundzustandsgleichgewicht anscheinend stabilisieren (vgl. 4.3.2)

Wird das in der Nachbarschaft von V224 lokalisierte S72 gegen Alanin ausgetauscht, werden überraschenderweise beide Effekte, die Blauverschiebung und die relative Abnahme von R^-, umgekehrt. Laut Weber *et al*. (1999) sollte die koplanare Tyrosylgruppe das Dipolmoment im Grundzustandschromophor stärker vergrößern als im angeregten Zustand und so den Grundzustandschromophor relativ stabilisieren. Daraus errechnet sich eine Blauverschiebung der R^--Absorption um 59 nm statt der beobachteten Rotverschiebung um 11 nm (vgl. 4.3.2). Eine Röntgenstruktur der T203Y/V224A-Variante könnte die strukturelle Ursache für die spektralen Rotverschiebungen durch die T203Y-Mutation aufklären.

8 Untersuchungen am rot fluoreszierenden Protein DsRed

8.1 Motivation

Das aus *Discosoma sp.* isolierte rot fluoreszierende drFP586(DsRed) ist unter den neuen autofluoreszierenden Proteinen (Matz *et al*., 1999; vgl. auch 1.5) für multispektrale Applikationen am besten geeignet. Von dem Protein lagen jedoch nur die Primärsequenz sowie das Absorptions- und Emissionsspektrum vor, während über die über die Struktur und Entstehung des Chromophors nichts bekannt war. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, dass 49 Aminosäuren mit wt-GFP identisch sind (Abb. 8.1).

```
          10        20        30        40        50
  MSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTT    GFP
  MRSSKNVIKEFMRFKVRMEGTVNGHEFEIEGEGEGRPYEGHNTVDLKVT.    DsRed
          10        20        30        40

            60        70        80        90       100
  GKLPVP..WPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFF  GFP
  KGGPLPFAWDILSPQFQYGSKVYVKHPADIP..DYKKLSFPEGFKWERVMNF  DsRed
 50        60        70        80           90

         110       120       130       140       150
  KDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNV    GFP
  EDGGVVTVTQDSSLQDGCFIYKVKFIGVNFPSDGPVM.QKKTMGWEASTE    DsRed
100       110       120       130        140

         160       170       180       190       200
  YIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY    GFP
  RLYP..RDGVLKGEIHKALKLKDGGHLLVEFKSIYMAKK..PVQLPGYYY    DsRed
150          160       170       180         190

         210       220       230
  LSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITHGMDELYK                GFP
  VDSKLDITSHNEDYT.IVEQYERTEGRHHLFL                      DsRed
     200       210       220
```

Abb. 8.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen von wt-GFP (Prasher *et al*., 1992) und DsRed (Matz *et al*., 1999). In der GFP-Sequenz sind die 11 β-Stränge unterstrichen, die Aminosäuren mit proximal orientierten Seitenketten schattiert und das Chromophormotiv fett gedruckt. In der DsRed-Sequenz sind mit wt-GFP identische Aminosäuren schattiert (Matz *et al*., 1999; verändert). Das in dieser Untersuchung verwendete Ds-Red unterscheidet sich durch die Insertion V1a (von Clontech eingeführt) und ein C-terminales His_6-*Tag* (für die Proteinreinigung mit Affinitätschromatographie; vgl. 3.3.1).

Darunter sind das Tyr-Gly-Motiv des Chromophors, das für bei GFP für die Chromophorbildung essentielle R96 (Ormö *et al*., 1996) und die bereits besprochene Aminosäure E222 (vgl. Kapitel 5 & 6). Aufgrund der Einbeziehung der höchstwahrscheinlich konservierten Sekundärstrukturelemente ist das Sequenzalignment dabei zuverlässiger, als die geringe Sequenzidentität vermuten lässt. Die konservierten Aminosäuren sind ohne eindeutige Präferenz für Sekundärstrukturelemente oder proximal orientierte Seitenketten über die gesamte Sequenz verteilt. Das Absorptionsmaximum ist mit 558 nm (zwei Nebenmaxima liegen bei 485 nm und 530 nm) ca. 81 nm längerwellig als R^- von wt-GFP. Das Emissionsmaximum liegt bei 583 nm und ist gegen das von wt-GFP um ca. 75 nm rotverschoben (Abb. 8.2).

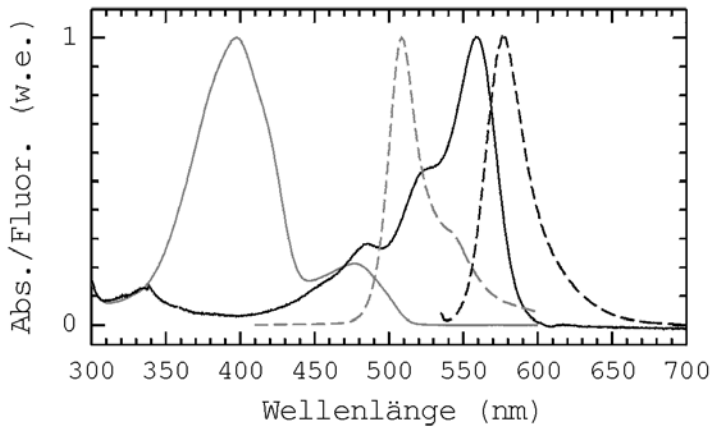

Abb. 8.2. Absorptions- und Emissionsspektren (solide bzw. gestrichelt) von wt-GFP (grau, λ_{Ex}= 395 nm) und DsRed (schwarz, λ_{Ex}= 530 nm). Das Emissionsspektrum von DsRed ist nicht für instrumentelle Parameter korrigiert.

In diesem Abschnitt soll die Frage beantwortet werden, ob bei DsRed die spektralen Rotverschiebungen gegenüber wt-GFP auf einem kovalent distinkten Chromophor oder auf Wechselwirkungen eines gleichartigen Chromophors mit einer andersartigen Proteinumgebung beruhen. Die evolutive Umgebung von DsRed wird auf veränderte Phänotypen durchsucht, um sowohl Hinweise auf die Funktionalität des Proteins zu bekommen, als auch für Applikationen interessante Varianten aufzuspüren.

8.2 Ergebnisse

8.2.1 Konstruktion des Gens

Die für DSRED kodierende Sequenz stammt aus dem CLONTECH-Vektor pDsRed1-N1 und wurde über eine *Two-Stage-PCR* bei *Annealing*-Temperaturen von 65°C und mit einem 1:100-Gemisch aus *Vent*-/*Taq*-Polymerase modifiziert. Die komplementären Primer *prRN1113r* und *prRN1089f* entfernen eine *Nco*I-Schnittstelle bei 1100 bp. Der Primer *prRN1338mr* verlängert das Gen C-terminal um ein His_6-*Tag* und eine *Hin*dIII- sowie eine *Eco*RI-Schnittstelle. Im ersten Schritt wurde je eine PCR mit den Primerpaaren *prRN671f* und *prRN1113r* sowie *prRN1089f* und *prRN1338mr* durchgeführt. Mit den durch eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigten PCR-Produkten (je 0.5 ng) und den Primern *prRN671f* und *prRN1338mr* kann, da die PCR-Produkte über den Bereich der komplementären Primer überlappen, in einer weiteren PCR das gewünschte Fragment hergestellt werden. Das gereinigte PCR-Fragment wurde über *Nco*I und *Eco*RI in pT7GFPav kloniert; der entstandene Vektor pT7RFPav wurde durch Sequenzierung bestätigt.

8.2.2 Maturierung des Chromophors

Der Vektor pt7RFPav wurde in *E. coli* BL21 DE 3 transformiert und in einer 4 l-Kultur für 8 h exprimiert. Die Zellen wurden über Nacht in -80 °C aufbewahrt und neben dem üblichen Verfahren (3.2.2) zusätzlich noch mit der *French Press* aufgeschlossen. Nach der Reinigung des Proteins wurde von dem Eluat (in Sonifikationspuffer mit 300 mM Imidazol, pH 8.0) sofort wiederholt die Absorption gemessen. Ein Aliquot der Probe wurde sofort 100-fach verdünnt und zu Fluoreszenzmessungen verwendet, die immer direkt nach den Absorptionsmessungen durchgeführt wurden. Alle Messungen und die Probenaufbewahrung fanden bei 20 °C statt.

In den zeitabhängigen Absorptionsspektren des frisch exprimierten DsRed zeigen sich zusätzliche Absorptionsmaxima bei 408 nm und 480 nm, welche den Chromophorspezies I408 bzw. I480 zugeordnet werden (Abb. 8.3). Im finalen Absorptionsspektrum ist I408 nicht mehr sichtbar, während I480 persistiert. Die Normierung der Spektren auf das finale Absorptionsmaximum bei 558 nm zeigt, dass die relative Populationsgröße von I480 mit der Zeit stark abnimmt. Die absolute Zunahme bei λ_{Abs}= 480 nm ist mehrfach geringer als die des überlappenden finalen Maximums, so dass die Konzentration sowohl von I408 als auch von I480 absolut

abnimmt. Dies ist ein Hinweis auf das Vorliegen von Intermediaten der Chromophormaturierung.

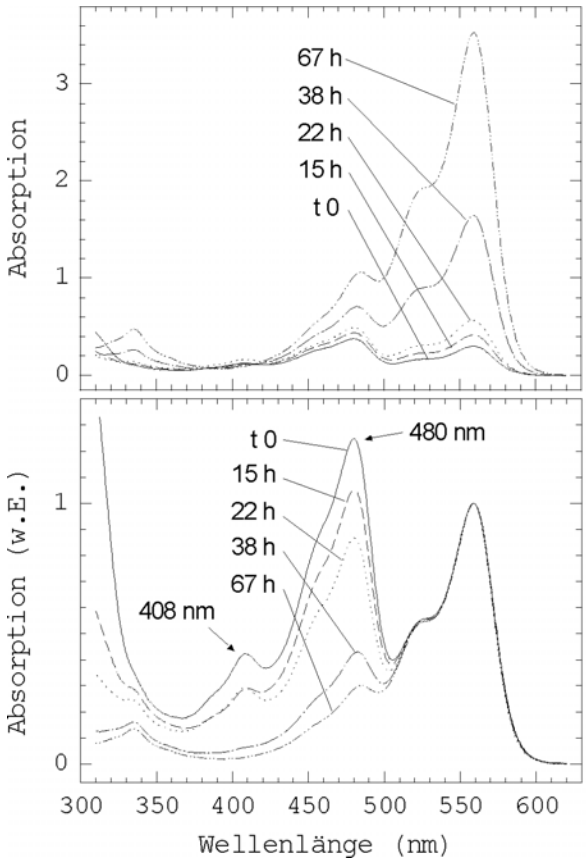

Abb. 8.3. Absorptionsspektren von frisch exprimiertem DsRed zu verschiedenen Zeitpunkten nach der ersten Messung (t 0). Oben: Tatsächliche Absorption.

Unten: Die Spektren wurden auf das finale Maximum bei 558 nm normiert. Das Spektrum bei t= 67 h änderte sich auch nach mehreren Tagen und nach Dialyse gegen PBS nicht mehr.

Da I408 auch in frühen Anregungsspektren, die zum Zeitpunkt der ersten Absorptionsmessung aufgenommen wurden, nicht repräsentiert ist (Abb. 8.5 links), findet Emission nicht oder nur mit sehr geringen Quantenausbeuten statt. Im Gegensatz dazu resultiert die Anregung von I480 in grüner (λ_{Em}= 500 nm) und roter Emission (Abb. 8.5 rechts). Die rote Emission ist spektral identisch mit derjenigen, die durch Anregung des finalen Maximums erhalten wird. Die grüne Emission nimmt zum Beginn der Messungen an Intensität zu, sinkt dann aber im Einklang mit der abnehmenden Populationsgröße von I480. Alle Änderungen bezüglich Absorption und Emission sind ausschließlich quantitativer Natur und betreffen nicht Form oder Lage der Spektren. Deshalb können die Spektren als Mischung aus wenigen diskreten Populationen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften interpretiert werden. In einem zweiten Experiment konnten trotz kürzerer Expressions- und Reinigungszeiten (und zusätzlicher Dialyse gegen PBS pH 7.4) erst spätere Zeitpunkte der Prozesses erfasst werden. Dies lässt auf einen Einfluss der präzisen Expressionsbedingungen, z. B. der Belüftung, auf die Geschwindigkeit der Prozesse schließen.

8.2.3 Zufallsmutagenese

8.2.3.1 Selektion auf Fluoreszenzintensität

Mit dem DsRed-Gen wurde eine mutagene PCR durchgeführt und die resultierenden Plasmide in *E. coli* BL21 DE3 elektroporiert (vgl. 3.1.5.2; das weitere methodische Vorgehen, soweit nicht anders angegeben, entspricht dem in 4.5 beschriebenen). Die Bakteriensuspension wurde auf vier großen Petrischalen ausplattiert und nach dem Wachstum über Nacht zur Inhibition weiteren Wachstums in 4° C gestellt. Eine der Petrischalen mit je ca. 38000 Kolonien wurde zur Variation der Expressionsbedingungen durch einen Vernebler mit ~1.5 ml 0.1 M IPTG gleichmäßig besprüht. Die Aufbewahrung während der *Screening*-Phase erfolgte wegen der erwarteten höheren Geschwindigkeit der zur Fluoreszenz führenden Prozesse bei Raumtemperatur. Weiteres Koloniewachstum konnte aber durch intermediäre Kühlung der Petrischalen für mehrere Stunden bei 4 °C inhibiert werden.

Rot emittierende Kolonien wurden auf der IPTG-behandelten Platte erst am nächsten Tag entdeckt, auf den nichtbehandelten am übernächsten Tag. Wie in den anderen Zufallsmutagenesen (vgl. 7.3.2) waren ~50 % der Klone optisch nicht fluoreszent. Die übrigen zeigten eine rötliche Emission mit Intensitäten von sehr schwach bis leicht stärker als mit wt-DsRed; nur 40-80 Klone pro Platte fluoreszierten deutlich stärker. Spektrale Abweichungen konnten optisch nicht festgestellt werden. 45 der hellsten Kolonien wurden aufgenommen, in LB-Medium suspendiert und in einem Verdünnungsaustrich ausplattiert. 30 Klone fluoreszierten wie vorher intensiv. Von je einer Kolonie wurde die DNA isoliert, in *E. coli* XL1 Blue transformiert, wieder isoliert und in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Am nächsten Tag wurde in 12-Well Mikrotiterplatten je 1 ml LB_{+Amp}-Medium mit je einem Klon angeimpft. Während des Wachstums (37 °C, 60 Upm) wurde dreimal von je 200 µl der Kultur in 96-Well-Mikrotiterplatten die OD_{600} gemessen. Von den schneller wachsenden Kulturen wurde nach der Messung je ein entsprechender Teil des Volumens abgenommen. Alle Kulturen wurden wieder mit Medium auf 1 ml aufgefüllt. Als alle Kulturen eine OD_{600} von ~0.2 erreicht hatten, wurde die Expression mit je 1/1000 1 M IPTG induziert. Nach ~3 h Inkubation bei 37 °C wurden die Bakterien abzentrifugiert und zum Stoppen der Translation in 1 ml 30 µg/ml Chloramphenicol in PBS resuspendiert. Je 300 µl der Suspension wurden direkt und nach 20-facher Verdünnung im selben Puffer in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Ab ca. 2 h nach dem Ende der Expression wurde in Zeitintervallen von 432 s bei 37 °C die OD_{600} und die Fluoreszenzintensität (λ_{Ex}= 560 nm, λ_{Em}= 600 nm bzw. 650 nm) gemessen. Nach spätestens 12 h Messung mussten die Proben aufgrund der Verdunstung von ca. 200 µl mit Wasser auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt

werden, es stellte sich heraus, das dadurch ein großer Messfehler entstand. Durch die variierenden Salzkonzentrationen sind die Entwicklungen der Fluoreszenzintensitäten auch bis zu diesem Zeitpunkt nur in Relation zueinander aussagekräftig.

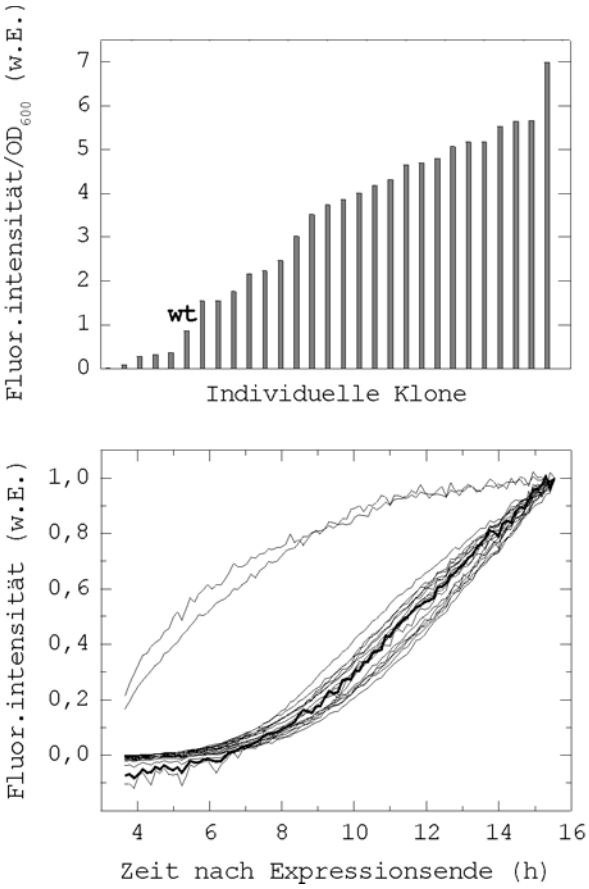

Abb. 8.4. Oben: Fluoreszenzintensitäten pro OD_{600} (wt-DsRed= 1) von Kolonien aus der ersten Selektionsrunde der Zufallsmutagenese. Die Werte wurden 13 h nach Ende der dreistündigen Expression direkt in *E. coli* BL 21 DE3 in 96-Well Mikrotiterplatten gemessen.

Unten: Zeitliche Entwicklung der Fluoreszenzintensität für Kolonien aus der zweiten Selektionsrunde. Messbedingungen wie oben. wt-DsRed = dicke Linie. Die beiden abweichenden unter den auf den letzten Messpunkt normierten Kurven sind den orange leuchtenden Klonen Bo3 und Ao1 zugeordnet.

Bezogen auf die OD_{600} ergab sich, dass die fast alle Klone bei ähnlicher zeitlicher Entwicklung der Fluoreszenz bis zu 7-fach stärker fluoreszierten als wt-DsRed (Abb. 8.4). Die DNA für die 16 hellsten (Templat A) und daraus noch einmal ein Untergruppe von zwei (Templat B) wurden als Template für eine zweite mPCR verwendet. Nach der Elektroporation in BL21 DE3 wurden von jedem mutierten Templat-Pool ~30000 Kolonien auf zwei Petrischalen, von denen eine mit IPTG besprüht wurde, optisch durchmustert. Wie oben waren ~50 % der Kolonien nicht optisch fluoreszent und 20-50 Kolonien pro Platte fluoreszierten, wenn auch mit einer erheblich geringeren Intensitätssteigerung als bei der vorigen Selektionsrunde, stärker als das hellste Templat. Von 22 Kolonien wurde in Mikrotiterplatten die zeitliche Entwicklung der roten Emission gemessen. 15.5 h nach Expressionsende war die absolute Intensität pro OD_{600} bei sechs Klonen 12-fach bis 17-fach stärker als bei wt-DsRed, gegenüber den Templaten eine 2- bis 3-fache Steigerung. Dabei ist die

Reproduzierbarkeit des Versuchs mit einem Fehler von bis zu 50 % unbefriedigend. Der Kurvenverlauf war wie vorher identisch mit dem von wt-DsRed. Nur die beiden diesbezüglich gemessenen orangen Klone (siehe unten) zeigten eine schnellere zeitliche Entwicklung der roten Emission mit abweichendem Kurvenverlauf (Abb. 8.4).

8.2.3.2 Selektion auf abweichende Fluoreszenzspektren

Unter den insgesamt ~60000 untersuchten Bakterienkolonien der zweiten Selektionsrunde befanden sich auch 20-40 mit gelber (y) oder oranger (o) Farbe. Je 5 wurden wie beschrieben selektiert und sequenziert (Tab. 8.1). Die DsRed-Gene aller Klone der B-Gruppe entstammen den Templaten B1 oder B2. Daraus kann gefolgert werden, dass in By2 und Bo1 höchstwahrscheinlich die K166R-Mutation revertiert wurde.

wtDsRed		V	N	T	P	N	K	N	K	L	K	V	P	Q	Y	T
aa #		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2
		0	0	2	3	4	8	9	3	5	6	7	8	8	1	1
		1a	6	1	7	2	3	8	9	7	6	5	6	8	4	7
B1									R							
B2			D	S							R					
By1			D	S	S						R					
By2	→		D	S			R				/					
By3			D	S			R				R					
Ay1				S			R									
Ay2				S			R	I								
Bo1	→		D	S					R		/	A	S			S
Bo2			D	S						Q	R			P	C	
Bo3	→	M				H			R							
Ao1	→			S												S
Ao2	→															S

Tab. 8.1. Mutationen in dem DsRed-Gen. Der Name der Proteine gibt das Templat in der Zufallsgenese (A oder B) sowie den Phänotyp wieder (*yellow* oder *orange*). B1 und B2 repräsentieren alle B-Template. Die Nummerierung der Aminosäurepositionen entspricht der DsRed-Sequenz. →: spektroskopisch näher charakterisierte Proteine; /: höchstwahrscheinlich revertierte Mutation.

Da die Proteine B1 und B2 dieselben Exzitations- und Emissionsspektren zeigen wie wt-DsRed, sollten die Einzelmutationen K83R bzw. P37S für den gelben Phänotyp verantwortlich sein. Der orange Phänotyp wird demgemäß durch die

Einzelmutationen N43H bzw. T218S verursacht; in Ao2 ist T218S sogar die einzig vorhandene Mutation. 8 der sequenzierten Gene wurden exprimiert, bei 5 davon waren die Ausbeuten an cytoplasmatisch löslichem Protein hoch genug für eine weitergehende Charakterisierung. Für die Messung von Absorptionsspektren wurden alle Proteine auf eine maximale Absorption von 0.26-0.28 konzentriert, für die Fluoreszenzmessungen wurden die Proben dann 10-fach verdünnt.

Bei allen mutierten Proteinen dominiert ein Absorptionspeak um 480 nm, welcher dem der intermediären Chromophorspezies I480 von wt-DsRed gleicht (Abb. 8.5 links). Bei den orangen Proteinen ist in nur leicht unterschiedlichen Verhältnissen zusätzlich noch der ursprüngliche längerwellige finale Absorptionspeak von wt-DsRed vorhanden. Die Anregung des kurzwelligen Absorptionsmaximums der DsRed-Varianten resultiert, wie beim maturierenden Wildtyp-Protein, in grüner Emission bei 500 nm und zusätzlich in der ursprünglichen roten Emission (Abb. 8.5 rechts).

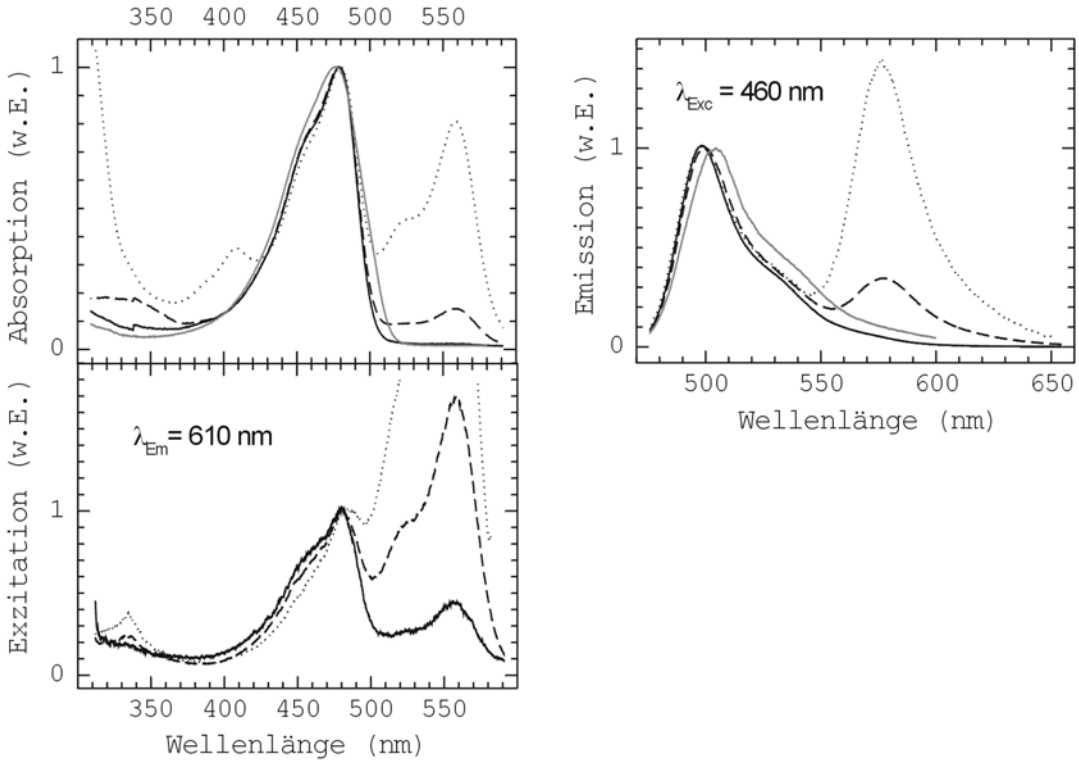

Abb. 8.5. Spektrale Eigenschaften des maturierenden wt-DsRed zum Zeitpunkt t 0 (gepunktet) und je eines Repräsentanten der mutierten orangen (Ao1; gestrichelt) bzw. gelben Proteine (By2; solide). Links: Absorptionsspektren und Anregungsspektren für die rote Emission. Rechts: Emissionsspektren nach Anregung bei 460 nm. Zum Vergleich wurde das Absorptionsspektrum der GFP-E222Q-Variante (vgl. 4.3.2) bzw. das Emissionsspektrum von wt-GFP eingefügt (beide grau und solide).

Der 480 nm-Absorptionspeak ist auch im Exzitationsspektrum für die rote Emission zu finden (Abb. 8.5 links). Deshalb kann diese nicht ausschliesslich durch die Anregung kurzwelliger Schwingungsschultern des langwelligen Absorptionspeaks entstehen.

8.2.4 Eigenschaften des Chromophors im entfalteten Protein

Die Proteine GFP, DsRed und Ao1 wurden (in 1 mM Imidazol, 1.5 mM Tris, 1 mM Glycin, 0.15 mM EDTA und 100 mM NaCl, pH 9.0) so aufkonzentriert, dass sie im entfalteten Zustand ähnliche Absorptionswerte zeigten. Zu 70 µl Proteinlösung wurden 630 µl Puffer (6.67 M GdmHCl, 1.5 mM Tris, 1 mM Glycin, 0.15 mM EDTA; eingestellt auf pH 6.7, pH 8.1 und pH 10.8 mit HCl / NaOH) gegeben und vorsichtig gemischt. Die Fluoreszenz der Proteine geht quantitativ verloren, wenn sie im Wasserbad für 2 min auf 85 °C unter intermediärem Invertieren des Eppendorf-Caps kurz hitzedenaturiert werden. Von den Proben wurden sofort Absorptionsspektren gemessen. Durch wiederholte Messungen wurde dabei sichergestellt, dass die Absorptionsspektren sich bei 20 °C nicht veränderten. Um zusätzliche Informationen über hitzeinduzierte Veränderungen der Chromophore zu bekommen, wurden die Proben bei 65 °C für 1 h erneut erhitzt und wieder vermessen. Dies wurde wiederholt.

Die Absorptionsspektren der bei verschiedenen pH-Werten in 6 M Guanidiniumchlorid denaturierten Proteine sind in Abb. 8.6 gezeigt. Die Absorptionsspektren von GFP werden je nach dem pH-Wert durch die Chromophorspezies RH bzw. R^- mit protoniertem (λ_{Abs}= 384 nm) bzw. negativ geladenem (λ_{Abs}= 449 nm) phenolischen Sauerstoff geprägt. Einschließlich des isosbestischen Punktes von 406 nm entsprechen die Spektren den von Ward *et al.* (1980) beschriebenen (nicht gezeigt). Nicht nur die Absorptionsspektren von Ao1 sondern auch deren isosbestischer Punkt sind im denaturierten Zustand nahezu ununterscheidbar von wt-GFP. Nach 2 h Hitzebehandlung zeigen die Absorptionsmaxima beider Proteine ähnliche Abnahmen um 8 % ±2 bei pH 6.7 und um 18 % ±1 bei pH 10.8. Die Chromophore sind also nicht nur spektroskopisch identisch, sondern zeigen noch eine gleiche Empfindlichkeit gegenüber alkalischen Bedingungen. Nur im Bereich um 340 nm ist bei Ao1 eine zusätzliche Absorption sichtbar, die mit der Hitzebehandlung zunimmt. Die Absorptionsspektren des denaturierten wt-DsRed haben einen ähnlichen Kurvenverlauf und pH-Abhängigkeiten wie GFP bzw. Ao1.

Die Absorptionsmaxima bei niedrigem bzw. hohem pH sind aber um 5 nm bzw. 20 nm rotverschoben und auch ein isosbestischer Punkt ist nicht mehr gegeben. Mit weiterer Hitzeeinwirkung nähern sich die Maxima und deren pH-abhängiges Gleichgewicht dem Phänotyp des GFP-Chromophors. Nach 2 h Hitzeeinwirkung ist die Abnahme der Absorptionsmaxima mit 22 % bei pH 6.7 bzw. mit 74 % bei pH 10.8 jedoch erheblich stärker. Zudem tritt in anderen Wellenlängenbereichen zusätzliche Absorption auf.

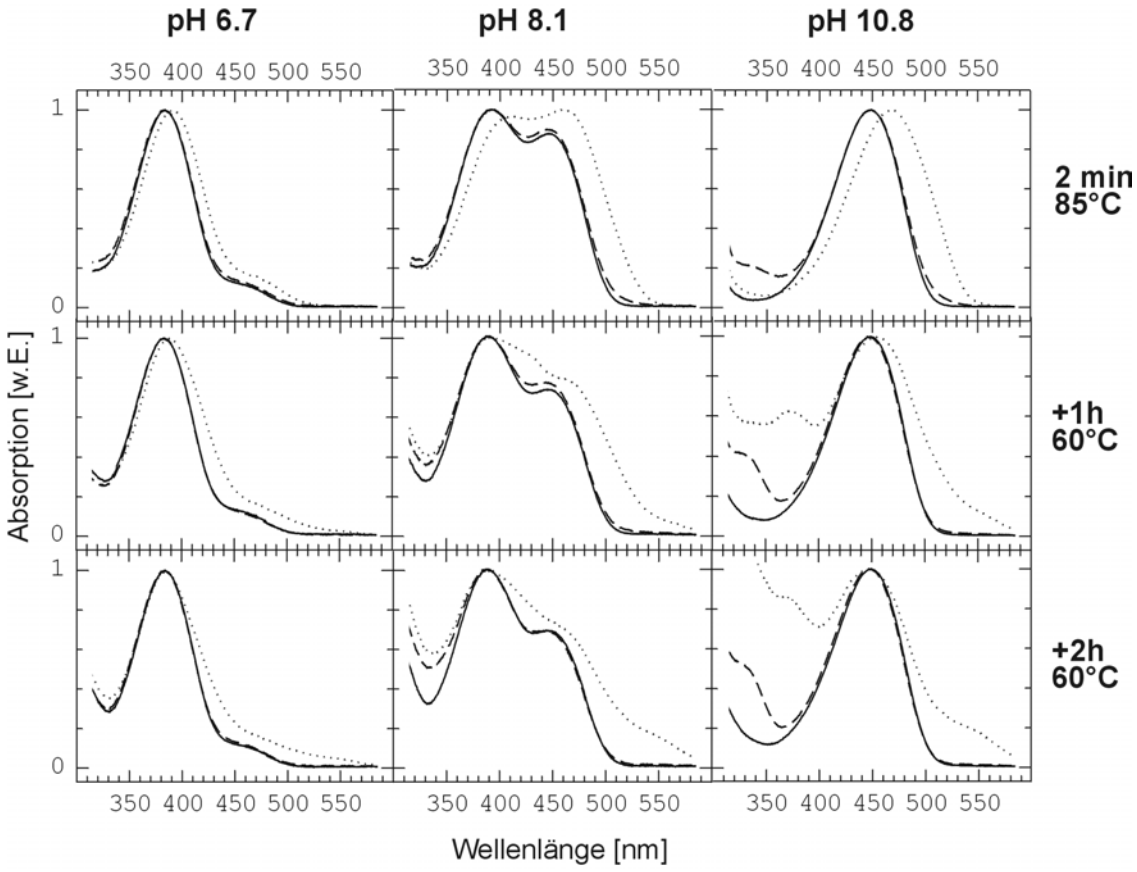

Abb. 8.6. Absorptionsspektren der entfalteten Proteine GFP (solide), Ao1 (gestrichelt) und DsRed (gepunktet) bei verschiedenen pH-Werten. Die Entfaltung wurde durch kurze Hitzebehandlung induziert, die Proteine wurden danach wiederholt eine Stunde auf 60 °C erhitzt.

8.3 Diskussion

8.3.1 Maturierung des Proteins über GFP-ähnliche Intermediate

Während 2-3 Tage andauernden Maturierung zum finalen Chromophor finden sich Intermediate mit Absorptionsmaxima von 408 und 480 nm (I408 und I480, Abb. 8.3). Die Lage der Spektren ähnelt denen von RH und R^-, den im Grundzustandsgleichgewicht stehenden Chromophorspezies von GFP mit protoniertem bzw. negativ geladenen phenolischem Sauerstoff (vgl. 1.4). Die Ähnlichkeit des Absorptionsspektrums von I480 mit R^- von wt-GFP (in Abb. 8.5 durch die E222Q-Variante repräsentiert; vgl. 5.3.1) ist auffallend. Das GFP-E222Q-Spektrum ist im langwelligen Bereich etwas breiter. Selbst diese geringfügige Abweichung ist durch kleine Population der um 498 nm absorbierenden I-Spezies erklärbar (vgl. 5.3.1). Auch bezüglich der Emission unterscheidet sich I480 von GFP nur in einem um ca. 5 nm blauverschobenen Maximum (Abb. 8.5). Aufgrund der spektralen Ähnlichkeiten liegt die Schlussfolgerung nach, dass der GFP-Chromophor als Intermediat in dem Maturierungsprozess gebildet wird. Die mangelnde Emission nach Anregung von I408, welches bezüglich der Absorption GFP-RH ähnelt, ist dafür ein weiterer Hinweis. Die Fluoreszenzquantenausbeute des GFP-RH*-Chromophors ist empfindlich von einer definierten Proteinumgebung abhängig (vgl. 6.3.5).

8.3.2 Stabilisierung der Intermediate werden durch Punktmutationen

Die Einzelmutationen P37S, N42H, K83R und T217S (Tab. 8.1) verursachen einen Abbruch der Chromophormaturierung bei Phänotypen, die in Absorption und Emission dem Intermediat I480 gleichen (Abb. 8.5). Der finale wt-DsRed-Chromophor wird dabei in verschiedenen Verhältnissen noch gebildet, die Spektren verändern sich dann aber über Monate hinaus nicht mehr. Deshalb scheinen die Mutationen weniger eine kinetische Barriere einzufügen, als vielmehr die Gleichgewichtskonstante zwischen dem intermediären GFP-artigen und dem finalen DsRed-Chromophor zu verändern.

Der Sequenzvergleich von GFP und DsRed (Abb. 8.1) wurde dazu verwendet, die mutierten Aminosäuren auf der Röntgenstruktur von GFP räumlich zu positionieren. Dabei entsprechen die Aminosäuren P37, N42, K83 und T217 im GFP die Aminosäuren A37, N42, F84 und V224.

Diese befinden sich alle im Bereich C-terminalen Region der zentralen α-Helix und in der Nähe des Imidazolidinonrings des Chromophors (Abb. 8.7).

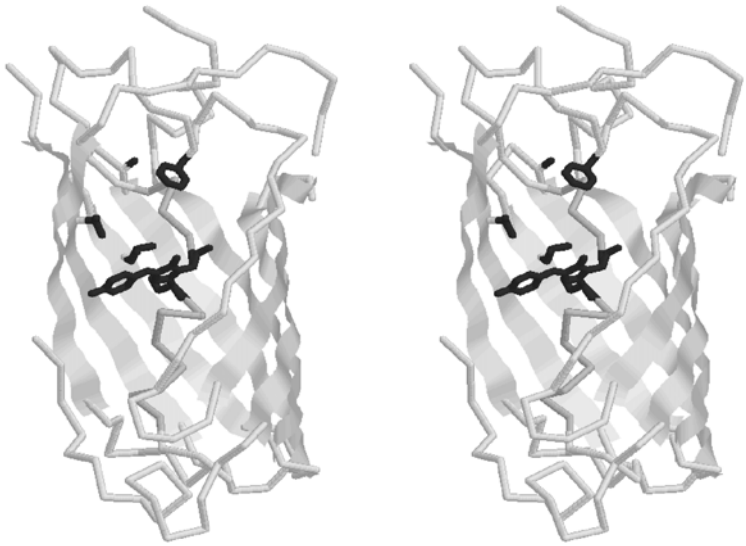

Abb. 8.7. Stereobild der Struktur von wt-GFP (1gfl; Yang *et al*., 1996). Schwarz gezeichnet sind der Chromophor und die Aminosäuren A37, N42, F84 und V224. Diese sind homolog den Aminosäuren P37, N42, K83 und T217, deren Mutationen in DsRed Farbänderungen verursachen. Die zentrale Alphahelix ist dunkelgrau gefärbt. Zur besseren Visualisierung wurden die Aminosäuren 147-187 entfernt.

8.3.3 Der intermediäre Ds-Red-Chromophor ist identisch mit dem von GFP

Die spektroskopische Ähnlichkeit von I480 mit GFP im nativen Zustand wird durch den Vergleich der entfalteten Proteine noch offenkundiger. Nach 2 min bei 85 °C ist Ao1 vollständig entfaltet und die pH-abhängigen Absorptionsspektren der Mutante Ao1 sind nahezu ununterscheidbar von denen des GFP (Abb. 8.6). Ao1 ist ein Modell mit einem stabilisierten Intermediat I480 der DsRed-Maturierung und dieses Intermediat gleicht spektroskopisch dem GFP-Chromophor so sehr, dass eine identische molekulare Struktur angenommen werden kann. Dies ist konsistent mit der Konservierung des Chromophormotivs Tyrosin-Glycin und von R96, das für die Chromophorbildung bei GFP essentiell zu sein scheint (Ormö *et al*., 1996). Gleichzeitig zeigt die Variante Ao1, dass die sequentiell benachbarten Aminosäuren ohne spektroskopischen Einfluss sind.

8.3.4 Denaturierung allein konvertiert den DsRed-Chromophor nicht zurück in den GFP-Chromophor

Die Hitzedenaturierung von DsRed in 6 M GdmHCl resultiert in zwei Absorptionsbanden, die zwar im Kurvenverlauf und Titrationsverhalten dem von GFP ähneln, sich aber durch signifikante Rotverschiebungen von 5 nm bis 20 nm unterscheiden (Abb. 8.6). Durch zusätzliche Hitzeeinwirkung wird dieser Unterschied geringer, was mit einer starken Absorptionsabnahme und dem Auftreten neuer Absorptionsmaxima einhergeht. Offensichtlich ist der DsRed-Chromophor instabil gegenüber Hitze und basischem Lösungsmittel. Wenn der Maturierungsprozess von I480 zu DsRed auf zusätzlichen nichtkovalenten Wechselwirkungen beruht, müssten diese bei den gegebenen experimentellen Daten unter den gewählten Entfaltungsbedingungen zumindestens teilweise persistieren. Da die Denaturierung von Ao1 aber vollständig ist, müsste zur Aufrechterhaltung dieses Modells Ao1 gegenüber DsRed nur durch die Mutationen T21S/T217S destabilisiert werden. Dies ist aber nicht konsistent mit der vergleichsweise geringen Änderung der freinen Energie, die durch Deletion von einzelnen Methylgruppen erreichbar ist (Jackson *et al*., 1993). Deshalb ist die wahrscheinlichere Erklärung der beobachteten Differenz in den Absorptionsspektren von DsRed gegenüber GFP und Ao1 eine kovalente Modifikation des Chromophors. Diese ist zwar chemisch labil gegenüber Hitze und basischem pH, überdauert aber wenigstens partiell die Denaturierung des Proteins. Ein zusätzlicher Teil der starken Rotverschiebungen im nativen Protein gegenüber GFP oder Ao1 könnte dennoch auf zusätzlichen nichtkovalenten Wechselwirkungen beruhen.

8.3.5 FRET in Heterooligomeren von DsRed und seinen Mutanten

In DsRed und allen untersuchten Mutanten führt die Anregung des 480 nm-Absorptionsmaximums nicht nur zu grüner, sondern auch zu roter Emission, welche der vom finalen 559 nm-Absorptionsmaximum gleicht. Für dieses Phänomen gibt es zwei Modelle: *Excited State Proton Transfer* (ESPT), wie für GFP beschrieben (Lossau *et al.* 1996; vgl. 1.4) oder *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET, vgl. 1.5) von dem intermediären GFP-Chromophor auf den finalen DsRed-Chromophor als Akzeptor. (Die dritte Möglichkeit eines weiteren Chromophors in den Proteinen wird hier als unwahrscheinlich verworfen.) Durch kinetische Fluoreszenzmessungen an wt-DsRed und einigen der Mutanten konnte die FRET-Hypothese bestätigt werden (Schüttrigkeit *et al*., 2001). Für einen effizienten FRET ist unter anderem eine Donor-Akzeptor-Distanz notwendig, welche die Förster-

Distanz unterschreitet. Diese beträgt typischerweise 60 bis 100 Å (Stryer, 1978). Aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen in den Proben (um 1 μM) ist also eine starke Tendenz der Proteine zur Oligomerisierung zu erwarten.

8.3.6 Nachtrag: Bezug zu aktuellen Publikationen

Durch Massenspektroskopie konnte inzwischen die Struktur des maturierten DsRed-Chromophors aufgeklärt werden (Gross *et al*., 2000). Die Struktur entspricht der des GFP-Chromophors, das π-Elektronensystem ist aber durch eine Dehydrogenierung mit einer daraus folgenden Oxidation zur Doppelbindung zwischen Cα und N der Aminosäure Q66 (entspricht S65 in GFP, vgl. Abb. 1.4) erweitert. Die Röntgenstruktur von DsRed wurde im kurzem zeitlichen Abstand gelöst (Wall *et al*., 2000 & Yarbrough *et al*., 2001). Das Sequenzalignment (Abb. 8.1) und damit die Richtigkeit der Positionierung der Mutationen in Abb. 8.7 kann durch den Vergleich mit der Struktur von GFP bestätigt werden. Die Maturierung des Chromophors über das Intermediat I480 wurde mit Fluoreszenzspektroskopie bestätigt (Baird *et al*., 2000 & Terskikh *et al*., 2000) aber nicht mit Absorptionsspektren belegt. Wegen der fehlenden Fluoreszenz konnte deshalb I408 hier nicht detektiert werden (vgl. 8.2.1). Auch Baird *et al*. (2000) isolierten Mutationen, welche den Maturierungsprozess inhibieren. Identisch mit den in 8.2.2 beschriebenen ist nur K83R, ansonsten wurden noch andere Substituenten für K83 sowie die Mutationen K70R, K70M, Y120H und S197T beschrieben. Mit den Mutationen V105A/S197T wurde eine DsRed-Variante mit verschnellertem Maturierungsprozess und stärkerer grüner Emission gefunden (*Fluorescent Timer*; Terskikh *et al*., 2000). Der molekulare Mechanismus der Oxidation zur Doppelbindung, dem finalen Maturierungsschritt; ist noch unverstanden, ebenso der Einfluss der mutierten Aminosäuren. Durch analytische Ultrazentrifugation konnte in Übereinstimmung mit den Röntgenstrukturen eine starke Tetramerisierung des Proteins feststellt werden (Baird *et al*., 2000). Die Autoren schlussfolgerten ebenfalls auf FRET zwischen nichtmaturierten und maturierten Chromophoren (vgl. 8.2.5). Die Tetramerisierung wurde durch zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen bestätigt (Heikal *et al*., 2000).

9 Implikationen für zellbiologische Anwendungen - Ausblick

9.1 Multispektrale Detektion mit der T203V-Variante

Eine der ersten für *in vivo*-Applikationen optimierten GFP-Varianten ist das GFPuv (Crameri *et al*., 1995). Die Mutationen (F99S/M153T/V163A) bewirken eine höhere Ausbeute an funktionalem Protein, haben darüber hinaus aber kaum Einfluss auf das spektrale Verhalten (Daten nicht gezeigt; vgl. auch Patterson *et al*., 1997). Für die Quantifizierung von markiertem Protein in der Zelle ist eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der lokalen Konzentration an markiertem Protein wünschenswert. GFPuv hat aber denselben Phänotyp konzentrationsabhängigen Verhaltens wie wt-GFP (vgl. 5.3.2, für GFPuv Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu zeigt die T203V-Variante keine konzentrationsbedingte Veränderung in den Fluoreszenz- oder Absorptionsspektren. Zudem sind die Ausbeuten an löslichem Protein gegenüber wt-GFP deutlich höher (vgl. 4.2.1 & 6.3.1) und das Grundzustandsgewicht ist bei vergleichbaren Fluoreszenzquantenausbeuten deutlich stärker nach RH verschoben (Abb. 9.1; vgl. 4.2.2 & 4.2.3). Deshalb sind in Kolonien von *E. coli* BL21 DE3 die Fluoreszenzintensitäten für die T203V-Variante und GFPuv bei 400 nm-Anregung ähnlich hoch (nicht gezeigt). Durch zusätzliche Mutationen wie V163A oder S72A (vgl. 7.3.3.1) könnte sich die Fluoreszenzintensität der T203V-Variante vermutlich noch steigern lassen.

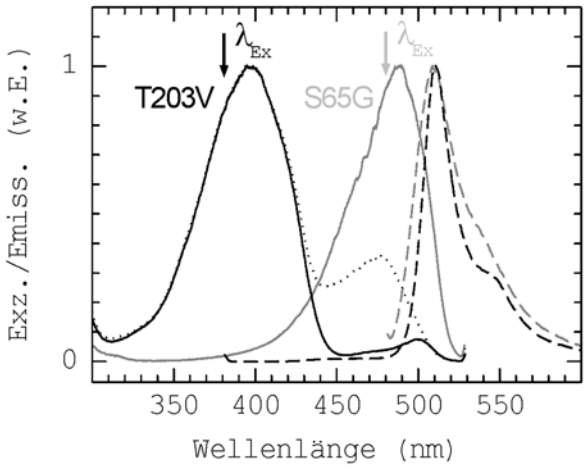

Abb. 9.1. Die Varianten T203V und S65G sind bei ähnlichen Emissionsspektren (gestrichelt) durch die Anregungsspektren für die grüne Fluoreszenz (solide) spektral separiert und ermöglichen so eine multispektrale Detektion. Zum Vergleich ist das Anregungs-spektrum von wt-GFP eingefügt (gepunktet).

Darüber hinaus eignet sich die T203V-Variante für eine multispektrale Detektion zusammen mit den häufig verwendeten EGFP-Varianten (Yang *et al.*; 1996b). Die spektroskopische Separation beider Proteine beruht hierbei nicht auf unterschiedlichen Emissions-, sondern auf den verschiedenen Anregungsspektren (Abb. 9.1). Dies wurde von Yang *et al.* (1996c) bereits erfolgreich mit dem dafür nicht optimalen wt-GFP sowie EGFP durchgeführt. Im Anregungsmaximum der EGFP-Varianten bei 490 nm lässt sich die T203V-Variante nur noch zu ca. 6 % anregen, während dies bei wt-GFP bzw. GFPuv (bei niedrigen Proteinkonzentrationen) 25 % bzw. 31 % sind. Umgekehrt ist EGFP nur zu 3-5 % bei 397 nm, dem Anregungsmaximum der T203V-Variante, anregbar. Durch FRET (vgl. 1.6) könnten unerwünschte Artefakte entstehen. Da sich aber nur 18 % des Anregungsspektrums von EGFP mit dem Emissionsspektrum der T203V-Variante überschneiden (beide Maxima auf dieselbe Intensität normiert), ist selbst bei ansonsten günstiger Geometrie die FRET-Effizienz begrenzt. Eine multispektrale *in vivo*-Detektion mit der T203V-Varianten soll in Kooperation mit der AG von R. Baumeister (Genzentrum LMU) an *C. elegans* durchgeführt werden.

9.2 Verbesserung des *Proximity-Imaging* mit GFP

Spektrale Änderungen von fluoreszierenden Proteinen aufgrund deren räumlicher Nähe wurden durch FRET bereits für verschiedene *in vivo*-Messungen genutzt (vgl. 1.6). Die Dimerisierung eine intrazellulären Proteins ließ sich dagegen durch die Dimerisierung des fusionierten GFP(V163A/S175G) nachweisen (De Angelis *et al*., 1998). Mit derselben Methode wurde auch die räumliche Anhäufung (*Clustering*) von GPI-Zellmembran-verankerten Proteinen *in vivo* detektiert (*Proximity Imaging*; De Angelis *et al*., 1998). Die mit Anregungungsspektren detektierten Änderungen entsprachen jedoch nicht immer den in 5.2.2 charakterisierten. Dies legt unerwünschte Interaktionen zwischen den GFP-Molekülen und den beobachteten Proteinen nahe. Die grundlegende *in vitro*-Charakterisierung der Dimerisierungsprozesse in Kapitel 5 ist eine Vorbedingung für derartige *in vivo*-Messungen von lokalen effektiven Proteinkonzentrationen. Mit der Methodik lassen sich darüber hinaus theoretisch Wechselwirkungen zwischen zwei verschiedenen GFP-markierten Proteinen intrazellulär und lokal nachweisen; hierfür besteht ein beträchtliches Interesse seitens der Forschung.

9.3 Neue spektrale Phänotypen von GFP

Die Anregung der RH-Population der GFP-Variante G65/V203/Q222 resultiert in der blauen RH*-Emission (Abb. 6.2). Zu der Fluoreszenzquantenausbeute von insgesamt 0.14-0.17 trägt die grüne Emission nach ESPT nur 5-22 % bei. Ein derartiges blaues Emissionsspektrum konnte bisher nur mit entfaltetem GFP und Verlangsamung der inneren Konversion mittels Tieftemperatur erzielt werden (vgl. 4.3.4 & 6.3.5). Für multispektrale Anwendungen bietet sich die Möglichkeit, bei entsprechender Optimierung diesen neuen GFP-Phänotyp alternativ zu den ebenfalls blau emittierenden, aber schnell photobleichenden Y66H- oder Y66W-Varianten (vgl. Patterson *et al*., 1997) zu verwenden. Da die RH*-Emission direkt in die Wiederbesetzung von RH münden sollte, könnte Photobleichen oder -konversion noch zusätzlich reduziert sein. Die Ausbeute an löslichem Protein sollte durch die Mutationen S72A und/oder V163A (vgl. 7.3.3.1) unproblematisch auf das zellphysiologische Maximum zu steigern sein. Für eine stärkere Verschiebung des Grundzustandsgleichgewichts in Richtung RH bietet sich z.B. die Substitution von H148 an (vgl. Wachter *et al*., 1998 & Elsliger *et al*., 1999). Das schwierigste Problem ist wahrscheinlich eine Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute. Hier könnten neben Zufallsmutagenesen mit der Variante G65/V203/Q222 als Templat auch Substitutionen an der Positionen 64 (vgl. Delagrave *et al*., 1995) 65, 203 und 222 sowie eine kinetische Charakterisierung der Varianten hilfreich sein.

Um einen dominante Populierung von R^- zu erreichen, werden bisher ausschließlich S65-Mutationen (EGFP-Varianten) verwendet. Eine Alternative dazu ist die E222Q-Substitution. Zusammen mit der T203V-Mutation kann ein 10-20 nm langwelligeres und scharf definiertes Absorptionsspektrum bei 500 nm erreicht werden (Abb. 6.2). Einer leichten Abnahme der Fluoreszenzquantenausbeute auf 0.5-0.6 (Abb. 6.5) wirkt der hohe Extinktionskoeffizient von ~55400 (vgl. 6.2.2) entgegen. Es zeigt sich, dass E222, trotz seiner Konservierung in den GFP-homologen fluoreszierenden Proteinen und entgegen der gängigen Meinung, nicht essentiell für die Bildung des GFP-Chromophors ist (vgl. 1.5 & 6.3.7). Die Seitenkette ist aufgrund ihrer sterischen Nähe sowie potentiellen Interaktionen mit dem Chromophoren (Yarbrough *et al*., 2001) damit ein interessantes Ziel für die mutagene Veränderung der Eigenschaften fluoreszierender Proteine. Die Proteine mit Q222 unterscheiden sich zudem durch ihr auffälliges Photokonversionsverhalten (Jung *et al.* 1998, 2000, 2001 & 2001b, in Vorbereitung) von anderen GFP-Varianten.

9.4 Optimierung von DsRed

In Kapitel 8 wurde gezeigt, dass der GFP-Chromophor der Vorläufer des finalen, rot fluoreszierenden Chromophors in DsRed ist. Dies und die Identifikation von Mutationen, welche die finale Maturierung einschränken (vgl. 8.2.1 - 8.2.4), ist eine Wissensgrundlage für die Optimierung des Proteins. Eine der größeren Herausforderungen ist dabei ein physiko-chemisches Verständnis des Maturierungsprozesses und seine Beschleunigung. Deshalb wurde in Kooperation in der AG von Dr. Tad Holak (AK Prof. Dr. Huber, MPI für Biochemie, Martinsried) eine Röntgenstruktur der Variante Ao1, in der die finale Chromophor-Maturierung unterdrückt ist (vgl. 8.2.3.2 & 8.3.2), erstellt. Die Auflösung der Struktur ist noch nicht hoch genug für eine genaue Interpretation.

10 Zusammenfassung

Durch die genetische Fusion mit dem Grün Fluoreszierenden Protein können seit 1994 Proteine oder Genexpression *in vivo* visualisiert werden, ein bedeutender Fortschritt für die Lebenswissenschaften. Die Nutzungsmöglichkeiten können z. B. mit der gleichzeitigen Verwendung von fluoreszenzspektroskopisch unterscheidbaren GFP-Varianten (multispektrale Detektion) erweitert werden. Eine Veränderung der spektralen Eigenschaften des Proteins unter Beibehaltung seiner Funktionalität *in vivo* kann nur durch Mutagenese erfolgen. Das Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur grundlegenden Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und der umgebenden Proteinmatrix zu leisten.

Durch die Substitution von T203 in wt-GFP kann gezeigt werden, dass die B-Spezies gegenüber der A- und der I-Spezies durch eine Wasserstoff-Brücke von T203 zum Chromophor gekennzeichnet ist. Diese bewirkt gegenüber der I-Spezies ein Blauverschiebung der Absorption um ca. 23 nm. Die I-Spezies kann durch Doppelmutationen stabilisiert werden und stellt unter den GFP-Varianten einen neuen spektralen Phänotyp dar. Die Tendenz zur Dimerisierung ermöglicht die absorptionsspektroskopische Darstellung einer Population der I-Spezies in wt-GFP. Gleichzeitig wird das Dimerisierungsmodell experimentell bestätigt und mit einer relativ schwachen Dimerisierungskonstante von ca. 3 mM^{-1} ergänzt. Die spektroskopischen Eigenschaften wichtiger GFP-Varianten lassen sich nun mit einem molekularen Modell erklären. So wird bewiesen, dass die Absorptionsrotverschiebung um 33 nm durch die Mutation T203Y (YFP-Varianten) nur zu ca. 1/3 auf spezifisch aromatischen Wechselwirkungen beruht. Zusammen mit den EGFP-Varianten eignet sich die T203V-Variante für eine neue Art der multispektralen Detektion auf der Grundlage der sehr gut separierten Anregungsspektren. Die Kenntnisse über die Vorgänge bei der Dimerisierung von wt-GFP bzw. GFPuv lassen sich prinzipiell für die intrazelluläre und lokale *in vivo*-Messung effektiver Proteinkonzentrationen bzw. von Protein-Protein-Wechselwirkungen nutzen.

Durch kombinatorische Mutagenese wurde deutlich, dass der schnelle Protonentransfer (ESPT) nach Anregung der A-Spezies das negativ geladene E222 als Akzeptor benötigt. Ansonsten wird der Prozess deutlich verlangsamt, was mit einer entsprechenden Abnahme der Quantenausbeute für die grüne Emission einhergeht. In der Variante S65G/T203V/E222Q wird zusätzlich der strahlunglose Verlust der Anregungsenergie von A* stark verringert. Dadurch dominiert die blaue A*-Emission das Emissionsspektrum. Dieser neue spektrale GFP-Phänotyp ist für multispektrale Anwendungen geeignet.

Von den GFP-homologen Proteinen, die erst seit Ende 1999 entdeckt werden, hat das stark rot emittierende aus *Discosoma* (DsRed) die langwelligste Emission und ist deshalb für *in vivo* Applikationen am interessantesten. Es wird bewiesen, dass der Chromophor des Proteins über die langsame kovalente Modifikation des intermediär entstehenden GFP-Chromophors gebildet wird. Mit der Entfaltung des Proteins wird dieser Prozess teilweise revertiert. Aus einer Proteinbibliothek konnten Varianten identifiziert werden, in denen räumlich gruppierte Einzelmutationen diesen finalen Maturierungsschritt in verschiedenem Ausmaß unterdrücken. Die Emission des intermediären GFP-Chromophors kann von dem finalen DsRed-Chromophor absorbiert werden (FRET), was auf eine starke Oligomerisierung hindeutet.

11 Literaturverzeichnis

Baird, G.S.; Zacharias, D.A. und Tsien, R.Y. (2000). *PNAS* 97 (22): 11984-11989.

Blum, H.; Beier, H. und Gross, H.J. (1987). *Electrophoresis* 8: 93-99.

Bokman, S.H. und Ward, W.W. (1981). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 101 (4): 1372-1380.

Branchini, B.R.; Lusins, J.O. und Zimmer, M. (1997). *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 14 (4): 441-448.

Branchini, B.R.; Nemser, A.R. und Zimmer, M. (1998). *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1): 1-6.

Brejc, K.; Sixma, T.K.; Kitts, P.A.; Kain, S.R.; Tsien, R.Y.; Ormö, M. und Remington, S.J. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 2306-2311.

Bublitz, G.; King, B.A. und Boxer, S.G. (1998). *J. Am. Chem. Soc.* 120 9370-9371.

Cadwell, R.C. und Joyce, G.F. (1992). *PCR Methods Appl* 2 28-33.

Chalfie, M.; Tu, Y.; Euskirchen, G.; Ward, W.W. und Prasher, D.C. (1994). *Science* 263 802-804.

Chattoraj, M.; King, B.A.; Bublitz, G.U. und Boner, S.G. (1996). *Proc. Natl. Sci. USA* 93: 8362-8367.

Cormack, B.P.; Valdivia, R.H. und Falkow, S. (1996). *Gene* 173 33-38.

Crameri, A.; Whitehorn, E.A.; Tate, E. und Stemmer, W.P.C. (1995). *Nature Biotechnology* 14: 315-319.

Creemers, T.M.H.; Lock, A.J.; Subramaniam, V.; Jovin, T.M. und Völker, S. (1999). *Nature Structural Biology* 6 (6): 557-560.

Cubitt, A.B.; Heim, R.; Adams, S.R.; Boyd, A.E.; Gross, L.A. und Tsien, R.Y. (1995). *TIBS* 20: 448-455.

Davenport, D. und Nicol, J.A.C. (1955). *Proc. R. Soc. London, Ser. B.* 144: 399-411.

De Angelis, D.A.; Miesenböck, G.; Zemelmann, B.V. und Rothman, J.E. (1998). *Cell Biology* 95: 12312-12316.

Delagrave, S.; Hawtin, R.E.; Silva, C.M.; Yang, M.M. und Youvan, D.C. (1995). *Bio/Technolojgy* 13: 151-154.

Ehrig, T.; O'Kane, D.J. und Prendergast, F.G. (1995). *FEBS Letters* 367 163-166.

Elsliger, M.A.; Wachter, R.M.; Hanson, G.T.; Kallio, K. und Remington, S.J. (1999). *Biochemistry* 38 (17): 5296-5301.

Fling, S.P. und Gregerson, D.S. (1986). *Analytical Biochemistry* 155: 83-88.

Förster, T. (1948). *Ann. Phys.* 2: 55-75.

Fradkov, A.F.; Chen, Y.; Ding, L.; Barsova, E.V.; Matz, M.V. und S.A., L. (2000). *FEBS Letters* 479: 127-130.

Gano, J.E.; Garry, P.A.; Sekher, P.; Schliesser, J.; Kim, Y.W. und Lenoir, D.J. (1997). *J. Am. Chem. Soc.* 119: 3826 ff.

Geisselsoder, J.; Witney, F. und Yuckenberg, P. (1987). *BioTechniques* 8: 786-791.

Gill, S.C. und Hippel, P. (1989). *Analytical Biochemistry* 182: 319-326.

Gross, L.A.; Baird, G.S.; Hoffmann, R.C.; Baldridge, K.K. und Tsien, R.Y. (2000). *PNAS* 97 (22): 11990-11995.

Heikal, A.A.; Hess, S.T.; Baird, G.S.; Tsien, R.Y. und Webb, W.W. (2000). *PNAS* 97 (22): 11996-12001.

Heim, R.; Cubitt, A.B. und Tsien, R.Y. (1995). *Nature* 373: 663-664.

Heim, R.; Prasher, D.C. und Tsien, R.Y. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12501-12504.

Heim, R. und Tsien, R.Y. (1996). *Current Biology* 6 178-182.

Helms, V.; Straatsma, T.P. und McCammon, J.A. (1999). *J. Phys. Chem. B* 103: 3263-3269.

Hoff, W.D. *et al.* (1994). *J. Biochemistry* 33: 13959 ff.

Inouye, S. und Tsuji, F.I. (1994). *FEBS Letters* 341: 277-280.

Jackson, S.E.; Moracci, M.; ElMasry, N.; Johnson, C.M. und Fersht, A.R. (1993). *Biochemistry* 32 (42): 11259-11269.

Johnson, F.H.; Shimomura, O.; Saiga, Y.; Gershman, L.C.; Reynolds, G.T. und Water, J.R. (1962). *J. Comp. Cell. Physiol.* 60: 85-103.

Jung, G.; Bräuchle, C. und Zumbusch, A. (2001b). *Journal of Chemical Physics* 114 (7): 3149-3162.

Jung, G.; Mais, S.; Zumbusch, A. und Bräuchle, C. (2000). *J. Phys. Chem.* 104 (5): 873-877.

Jung, G.; Wiehler, J.; Bräuchle, C.; Steipe, B. und Zumbusch, A. (2001). *Chem. Phys Chem.* 2 (6)

Jung, G.; Wiehler, J.; Göhde, W.; Tittel, J.; Basche, T.; Steipe, B. und Bräuchle, C. (1998). *Bioimaging* 6: 54-61.

Jung, G.; Wiehler, J.; Steipe, B.; Bräuchle, C. und Zumbusch, A.; *in Vorbereitung* .

Kaplan, B.E. (1985). *Trends in Biotechnology* 3: (253-256): .

Kieferhaber, T.; Grunert, H.P.; Hahn, U. und Schmidt, F.X. (1990). *Biochemistry* 29: 6475-6480.

Kneen, M.; Farinas, J.; Li, Y. und Verkmann, A.S. (1998). *Biophysical Journal* 74: 1591-1599.

Kochendoerfer, G.G. und Mathies, R.A. (1995). *Israel Journal of Chemistry* 35: 211.

Kummer, A.; Wiehler, J.; Rehaber, H.; Kompa, C.; Steipe, B. und Michel-Beyerle, M.E. (2000). *J. Phys. Chem. B* 104: 4791-4798.

Kummer, A.; Wiehler, J.; Steipe, B. und Michel-Beyerle, M.E.; *in Vorbereitung*.

Kummer, A.D. *et al.* (1998). *Chemical Physics* 237: 183-193.

Lewis, F.D. und Yang, J.S. (1997). *J. Am. Chem. Soc.* 119: 3834 ff.

Llopis, J.; McCaffery, J.M.; Miyawaki, A.; Farquhar, M.G. und Tsien, R.Y. (1998). *PNAS* 95: 6803-6808.

Lossau, H. *et al.* (1996). *Chemical Physics* 213: 1-16.

Lukyanov, K.A. *et al.* (2000). *J Biol Chem* 275 (34): 25879-25882.

Matz, M.V.; Fradkov, A.F.; Labas, Y.A.; Savitsky, A.P.; Zaraisky, A.G.; Markelov, M.L. und Lukyanov, S.A. (1999). *Nature Biotechnology* 17: 969-973.

Miesenböck, G.; Angelis, D.A. und Rothman, J.E. (1998). *Nature* 394: 192-195.

Mitra, R.D.; Silva, C.M. und Youvan, D.C. (1996). *Gene* 173: 13-17.

Miyawaki, A.; Griesbeck, O.; Heim, R. und Tsien, R.Y. (1999). *PNAS* 96: 2135-2140.

Miyawaki, A.; Llopis, J.; Heim, R.; McCaffery, J.M.; Adams, J.A.; Ikura, M. und Tsien, R.Y. (1997). *Nature* 388: 882-887.

Morin, J.G. und Hastings, J.W. (1971). *J. Cell. Physiol.* 77 (77): 305-312.

Morise, H.; Shimomura, O.; Johnson, F.H. und Winant, J. (1974). *Biochemistry* 13: 2656-2662.

Niwa, H.; Inouye, S.; Hirano, T.; Matsuno, T.; Kojima, S.; L., K.; Ohashi, M. und Tsuji, F. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13617-13622.

Ormö, M.; Cubitt, A.B.; Kallio, K.; Gross, L.A.; Tsien, R.Y. und Remington, S.J. (1996). *Science* 273: 1392-1395.

Palm, G.J. und Wlodawer, A. (1999) in: Green Fluorescent Protein, Vol. 302: 378-394; (Conn, P.M., Edt.); Academic Press: San Diego, London

Palm, G.J.; Zdanov, A.; Gaitanaris, G.A.; Stauber, R.; Pavlakis, G.N. und Wlodawer, A. (1997). *Nature Structure Biology* 4 (5): 361-365.

Patterson, G.H.; Knobel, S.M.; Sharif, W.D.; Kain, S.R. und Piston, D.W. (1997). *Biophysical Journal* 273: 2782-2790.

Prasher, D.C.; Eckenrode, V.K.; Ward, W.W.; Prendergast, F.G. und Cormier, M.J. (1992). *Gene* 111: 229-233.

Prendergast, F.G. und Mann, K.G. (1978). *Biochemistry* 17: 3448-3453.

Reid, B.G. und Flynn, G.C. (1997). *Biochemistry* 36: 6786-6791.

Robey, R.B. *et al.* (1998). *Biochemistry* 37: 9894-9901.

Rudolph, R. und Lilie, H. (1996). *FASEB J.* 10: 49-56.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schoepfer, R. (1993). *Gene* 124: 83-85.

Schüttrigkeit, T.A.; Zachariae, U.; von Feilitzsch, T.; Wiehler, J.; von Hummel, J.; Steipe, B. und Michel-Beyerle, M.E. (2001). *ChemPhysChem* 2 (5): 325-328.

Seebacher, C.; Deeg, F.W.; Bräuchle, C.; Wiehler, J. und Steipe, B. (1999). *J. Phys. Chem. B* 103 (36): 7728-7732.

Shimomura, O. (1979). *FEBS Letters* 104: 220-222.

Shimomura, O.; Johnson, F.H. und Saiga, Y. (1962). *J. Cell. Comp. Physiol.* 59: 223-239.

Siemering, K.R.; Golbik, R.; Sever, R. und Haseloff, J. (1996). *Current Biology* 6 (12): 1653-1663.

Sinha, N.D.; Biernat, J.; McManus, J. und Köster, H. (1984). *Nucleic Acids Research* 12 (4539-4557): .

Spudich, J.L.; Zacks, D.N. und Bogomolni, R.A. (1995). *Israel Journal of Chemistry* 35: 495 ff.

Striker, G.; Subramaniam, V.; Seidel, C.A.M. und Volkmer, A. (1999). *J. Phys. Chem. B* 103 : 8612-8617

Stryer, L. (1978). *Ann. Rev. Biochem.* 47: 819-46.

Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). *Journal of Molecular Biology* 189 113-130.

Terskikh, A. *et al.* (2000). *Science* 290: 1585-1588.

Thor, J.J.v.; Pierik, A.J.; Nugteren-Roodzant, I.; Xie, A. und Hellingwerf, K.J. (1998). *Biochemistry* 37: 16915-16921.

Tsien, R.Y. (1998). *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509-544.

Vieira, J. und Messing, J. (1987). *Methods in Enzymology* 153: 3-11.

Voityuk, A.A.; Michel-Beyerle, M.-E. und Rösch, N. (1997). *Chemical Physics Letters* 272: 162-167.

Voityuk, A.A.; Michel-Beyerle, M.-E. und Rösch, N. (1998). *Chemical Physics* 231 (1): 13-25.

Voityuk, A.A.; Michel-Beyerle, M.-E. und Rösch, N. (1998b). *Chemical Physics Letters* 296: 269-276.

Wachter, R.B.; Elsliger, M.-A.; Kallio, K.; Hanson, G.T. und Remington, S.J. (1998). *Structure* 6: 1267-1277.

Wachter, R.M.; King, B.A.; Heim, R.; Kallio, K.; Tsien, R.Y.; Boxer, S.G. und Remington, S.J. (1997). *Biochemistry* 36: 9759-9765.

Waldeck, D.H. (1991). *Chem. Rev* 91: 415 ff.

Wall, M.A.; Socolich, M.A. und Ranganathan, R. (2000). *Nat.Struct.Bio* 7 (12): 1133-1138.

Ward, W.W. (1979). *Photochem. Photobiol. Rev.* 4: 1-57.

Ward, W.W. und Bokman, S.H. (1982). *Biochemistry* 21: 4535-4540.

Ward, W.W.; Cody, C.W.; Hart, R.C. und Cormier, M.J. (1980). *Photochemistry and Photobiology* 31: 611-615.

Warshel, A. (1976). *Nature* 260: 679 ff.

Weber, W.; Helms, V.; McCammons, J.A. und Langhoff, P.W. (1999). *PNAS* 96: 6177-6182.

Wiehler, J.; Seebacher, C.; Zumbusch, A.; Bräuchle, C. und Steipe, B.; *in Vorbereitung* .

Wiehler, J. und Steipe, B.; *in Vorbereitung* .

Xie, A.; Hoff, W.D.; Kroon, A.R. und Hellingwerf, K.J. (1996). *J. Biochemistry* 35: 14671ff.

Yang, F.; Moss, L.G. und Phillips, G.N.J. (1996). *Nature Biotechnology* 14: 1246-1251.

Yang, T.; Kain, S.R.; Kitts, P.; Kondepudi, A.; Yang, M.M. und Youvan, D.C. (1996b). *Gene* 173: 19-23.

Yang, T.T.; L., C. und Kain, S.R. (1996c). *Nucleic Acids Res.* 24: 4592-4593.

Yarbrough, D.; Wachter, R.M.; Kallio, K.; Matz, M.V. und Remington, S.J. (2001). *PNAS* 98 (2): 462-467.

Lebenslauf

J e n s W i e h l e r

Anschrift	Lipowskystr. 18 a, 81373 München
Geburtsdatum/-ort	15.10.68 in Kiel
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Ausbildung & Zivildienst

1974 - 1987	Schulausbildung mit Abschluss Abitur am Friedrich-Schiller-Gymnasium in Preetz bei Kiel
1988 - 11.88	1 Semester Studium der Chemie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
11.88 - 10.91	Grundstudium Biologie an der CAU Kiel, 2 Urlaubssemester, Vordiplom
12.90 - 08.91	Zivildienst beim Umweltamt der Stadt Kiel
10.91 - 06.95	Hauptstudium Biologie an der CAU Kiel
07.95 - 07.96	Diplom und Diplomarbeit am Institut für Haustierkunde der CAU Kiel unter Anleitung von Prof. Dr. Hartl. Thema: "Untersuchungen zur Populationsgenetik und Systematik des mitteleuropäischen Rehs (*Capreolus Capreolus L.*) mittels Sequenzierung der mitochondrialen Kontrollregion"
01.97 - 12.00	Promotion am Genzentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Betreuung von Prof. Dr. Winnacker (Anleitung von Dr. Boris Steipe). Thema: „Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Proteinmatrix in den autofluoreszierenden Proteinen GFP und drFP583 (DsRed)"

Weitere Tätigkeiten

06.98 - 12.00	Eigenverantwortlich Aufbau und Betreuung der Institutsbibliothek des Genzentrums der LMU München in Nebentätigkeit
1987	Vollzeitbeschäftigung als Lagerist für ca. 7 Monate bei der Spedition Mordhorst in Raisdorf bei Kiel
1992 - 1996	Studentische Hilfskraft bei Instituten der CAU Kiel: Betreuung verschiedener zoologischer und des populationsgenetischen Kurses, populationsgenetische Laborarbeit, histologische und anatomische Präparationen, Ökosystemforschung und Speziesbestimmung, Organisation und Durchführung von Kleinwaltransporten