

# Das grün fluoreszierende Protein: Schlüssel zur Untersuchung chemischer Prozesse in lebenden Zellen\*\*

G. Ulrich Nienhaus\*

DNA · Fluoreszenzsonden · Imaging-Substanzen ·  
Nobelpreis · Proteine

Unsere Kenntnisse der molekularen Grundlagen des Lebens haben sich in den letzten Jahrzehnten enorm vertieft. Die Sequenzierung ganzer Genome hat die Baupläne biomolekularer Komponenten, Proteine und Nucleinsäuren enthüllt. Zehntausende von Proteinstrukturen sind durch Kristallographie und Kernresonanzspektroskopie aufgeklärt, und die für die Funktion wichtige Dynamik vieler Proteine wurde detailliert mit einer Vielzahl biochemischer und biophysikalischer Methoden untersucht. Allerdings kann die Funktionsweise von Proteinen nicht allein auf der Grundlage von Experimenten mit isolierten Molekülen in Reagenzgläsern verstanden werden. In Zellen wechselwirken Proteine mit vielen anderen Molekülen, sammeln sich in bestimmten Zellkompartimenten und lagern sich am Cytoskelett sowie an Membranstrukturen der Zelle an. Darüber hinaus können sie modifiziert werden und sich als Teil ihrer Funktion durch Diffusion oder aktiven Transport durch Zellen bewegen. Daher konzentrieren sich viele Biowissenschaftler auf die orts- und zeitaufgelöste Untersuchung der biomolekularen Wechselwirkungen und die daraus folgenden Funktionseffekte in lebenden Zellen, Geweben oder Organismen.

Für derartige Studien ist die optische Fluoreszenzmikroskopie die Methode der Wahl, weil sie eine minimalinvasive Technik ist, die die Beobachtung von Vorgängen in lebenden Zellen über längere Zeit hinweg ermöglicht, und zudem hochempfindlich ist, bis hinab auf die Ebene des einzelnen Moleküls; neue Mikroskopietechniken erreichen zudem eine Bildauflösung jenseits der Abbeschen Beugungsgrenze. Der entscheidende Vorteil ist aber, dass man sich auf spezielle funktionelle Prozesse konzentrieren kann, indem man Fluorophore spezifisch an Moleküle (oder andere Strukturen wie Membranen, Organellen oder Zellen) heftet.

Der Nobelpreis für Chemie 2008 wurde an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien für die Entdeckung und Entwicklung des grün fluoreszierenden Proteins

(GFP) verliehen. GFP und verwandte fluoreszierende Proteine (FPs) der GFP-Familie haben sich als äußerst nützliche und vielseitige Werkzeuge zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in lebenden Zellen erwiesen. Zehntausende von Artikeln wurden über GFP publiziert – dieses kleine Protein hat die Biowissenschaften wahrhaft revolutioniert.

Die Polypeptidkette von GFP besteht aus 238 Aminosäuren, und es faltet sich zu einem starren, 11-strängigen  $\beta$ -Fass mit einer zentralen Helix entlang seiner Achse (Abbildung 1). Ein fluoreszierender Chromophor, der autokatalytisch aus einem Tripeptid gebildet wird (bei GFP: Ser65-Tyr66-Gly67), befindet sich in der Mitte der Helix, ungefähr in der Mitte des dosenförmigen Proteins. Das GFP-Gen kann in die DNA einer Zelle eingeführt werden, sodass die Zelle dieses Protein produziert. Darüber hinaus kann es an das Gen desjenigen Proteins gekoppelt werden, das man untersuchen möchte. Das Fusionsprotein enthält dann eine zusätzliche GFP-Domäne (Abbildung 2), deren Fluoreszenz durch Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge angeregt werden kann (Abbildung 3). Diese Strategie wurde angewendet, um eine Vielzahl von Prozessen in Zellen zu beobachten, z. B. Genexpression, Proteinlokalisierung, Translokation und Abbau sowie viele biomolekulare Wechselwirkungen. In der Folge sind GFP und verwandte Proteine Standardwerkzeuge für tausende Forscher auf der ganzen Welt geworden.

Es ist bemerkenswert, dass von der Entdeckung des GFP bis zu seiner Entwicklung zu einer der leistungsfähigsten Imaging-Substanzen mehrere Jahrzehnte vergingen. Viele Forscher haben dazu beigetragen; Shimomura, Chalfie und Tsien wurden mit guten Gründen als Nobelpreisträger ausgewählt, denn ihre Namen sind mit den entscheidenden Schritten der GFP-Entwicklung verknüpft. 1962 isolierte Osamu Shimomura das Protein aus Gewebeauszügen der Qualle *Aequorea victoria* im Rahmen seiner Arbeiten über die Biolumineszenz dieses Tieres.<sup>[1]</sup> Er reinigte das Protein, charakterisierte seine optischen Eigenschaften und identifizierte die chemische Natur des Fluorophors.<sup>[2]</sup> Als Prasher und Mitarbeiter 1992 das GFP-Gen klonierten,<sup>[3]</sup> legten sie das Fundament für die zweite Phase der GFP-Forschung, die mit der rekombinanten Expression von GFP in *Escherichia coli* und *Caenorhabditis elegans* durch Martin Chalfie und Mitarbeiter begann.<sup>[4]</sup> War zunächst angenommen worden, dass spezielle Enzyme nötig seien, um die Polypeptidkette in das fluoreszierende Protein umzuwandeln, zeigte diese

[\*] G. U. Nienhaus  
Institut für Biophysik, Universität Ulm  
89069 Ulm  
und  
Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign  
Urbana, IL 61801 (USA)  
E-Mail: uli@uiuc.edu

[\*\*] Der Autor dankt für finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 497 und Ni 291/9).

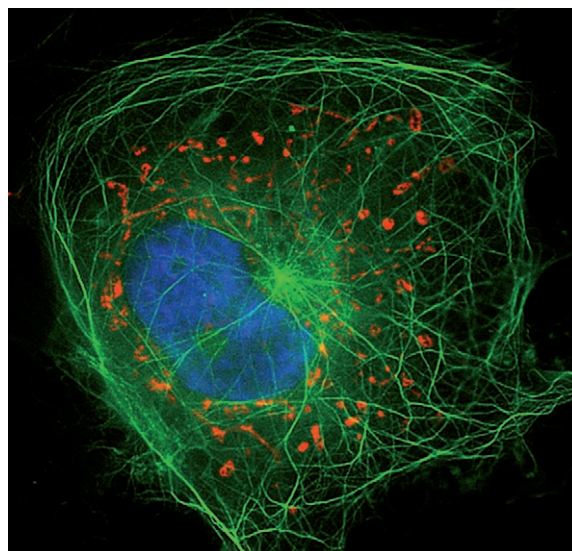


**Abbildung 1.** Darstellung (Seitenansicht und Aufsicht) der charakteristischen Polypeptidfaltung von EosFP, einem Protein der GFP-Familie.<sup>[13]</sup> Der Chromophor (weiß) ist als Stabmodell gezeigt.

bahnbrechende Arbeit, dass hierfür kein weiterer Bestandteil von *Aequorea victoria* nötig ist. Da der Fluorophor spontan gebildet wird, kann GFP im Wesentlichen in allen Organismen als genetisch kodierte Fluoreszenzmarkierung exprimiert und genutzt werden. 1996 wurde die dreidimensionale Struktur von GFP in den Arbeitsgruppen von Remington (PDB: 1EMA) und Phillip (PDB: 1GFL) röntgenkristallographisch aufgeklärt.<sup>[5,6]</sup> Roger Tsien und seine Mitarbeiter konnten zeigen, dass der stark fluoreszierende Chromophor 4-(*p*-Hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon autokatalytisch aus dem Tripeptid Ser-Tyr-Gly gebildet wird, wozu nichts weiter als molekularer Sauerstoff benötigt wird.<sup>[7]</sup> Eine Vielzahl von Mutanten GFP-artiger Proteine mit neuen und verbesserten Eigenschaften wurde in seiner Arbeitsgruppe durch Protein-Engineering hergestellt. So wurden auch Varianten in neuen Farbtönen wie Blau (BFP), Cyan (CFP) und Gelb (YFP) erhalten, was mehrfarbige Anwendungen, Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Studien (FRET) der Protein-Protein-Wechselwirkungen und die Entwicklung von Biosensoren auf der Grundlage von FRET ermöglichte, z.B. für die Messung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen.



**Abbildung 2.** Ein Fusionsprotein, das aus einer GFP-Domäne (grün) und einem anderen Protein (weiß) besteht.



**Abbildung 3.** Dreifarbenbild einer kultivierten Zelle. Tubulinfasern wurden mit einem GFP-markierten Tubulin-bindenden Protein grün gefärbt, Mitochondrien wurden mit einem roten FP markiert, das an ein Lokalisierungssignal der Mitochondrien koppelt. Der Kern wurde mit DAPI, einem organischen Farbstoff, blau gefärbt. Wiedergabe aus Lit. [19].

In den späten 1990er Jahren entdeckten Wiedenmann<sup>[8]</sup> sowie Lukyanov und Mitarbeiter<sup>[9]</sup> überraschenderweise, dass Proteine der GFP-Familie auch in nicht biolumineszierenden Anthozoen vorkommen. Seitdem wurden viele GFP-artige Proteine charakterisiert, von denen manche gänzlich neue Eigenschaften aufweisen. Vor allem konnten lange gesuchte orange und rot fluoreszierende Proteine gefunden werden. Diese Proteine sind wertvoll für die Abbildung von lebenden Zellen und Geweben, weil in diesem Bereich des Spektrums die Autofluoreszenz und Streuung der Zellen geringer ist. Darüber hinaus wird mit ihnen die Palette für mehrfarbige Markierungen und FRET-Experimente erweitert.

In den letzten Jahren sind so genannte „photoaktivierbare“ FPs („optical highlighter“-FPs) zu leistungsfähigen neuen Hilfsmitteln für die Abbildung von Zellen entwickelt worden.<sup>[10]</sup> Durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge können diese FPs zwischen einem fluoreszierenden und einem nicht fluoreszierenden Zustand umgeschaltet werden (Photoschalten),<sup>[11,12]</sup> oder die Wellenlänge ihrer Fluoreszenz kann geändert werden (Photokonversion).<sup>[13,14]</sup> Indem man Licht auf bestimmte Teile in einer lebenden Zelle fokussiert, kann ein Teil der Proteine aktiviert und ihre Dynamik orts- und zeitaufgelöst verfolgt werden. Eine weitere hochinteressante Anwendung für photoaktivierbare FPs ist die optische Mikroskopie jenseits der Abbeschen Beugungsgrenze, auch als „Nanoskopie“ bekannt.<sup>[15–17]</sup> Eine solch hohe Auflösung wird erreicht durch Einsammeln der Fluoreszenzphotonen von einzelnen Molekülen oder von Ensembles innerhalb eines Volumens weit unterhalb der Lichtwellenlänge. Solche Bereiche können mit einer Genauigkeit von bis zu 10 nm lokalisiert werden. Mit photoaktivierbaren FPs wurden kürzlich erstaunliche hochaufgelöste Bilder erhalten.<sup>[16,17]</sup>

Zurzeit wird die FP-Technologie von Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt erforscht, die versuchen, monomere, schnell reifende, helle und lichtstabile FP-Varianten zu erhalten, die Farbpalette ins Rote zu erweitern oder das Verhalten photoaktivierbarer FPs zu verbessern.<sup>[18]</sup> Rationales Protein-Engineering auf der Grundlage unserer immer besseren Kenntnisse der Struktur-Funktions-Beziehungen von FPs sowie zufällige Mutagenese in Kombination mit ausgefeilten Screening-Methoden dürften uns einen zügigen Fortschritt auf diesem Gebiet bescheren.

Wir stehen zurzeit am Beginn einer Ära, in der chemische Wechselwirkungen innerhalb lebender Zellen beobachtet

werden. Der Nobelpreis für Chemie 2008 feiert drei Wissenschaftler, die GFP als ein zentrales Werkzeug dieser Forschungen etabliert haben. Dank weiteren Fortschritten bei der FP-Technologie und schnellen Verbesserungen der quantitativen optischen Bildgebung wird man die Geheimnisse lebender Zellen und Organismen vielleicht eines Tages lüften können.

Online veröffentlicht am 16. Oktober 2008

- [1] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, 59, 223.
- [2] O. Shimomura, *FEBS Lett.* **1979**, 104, 220.
- [3] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, 111, 229.
- [4] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, 263, 802.
- [5] M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, 273, 1392.
- [6] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, Jr., *Nat. Biotechnol.* **1996**, 14, 1246.
- [7] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 509.
- [8] J. Wiedenmann, Deutsches Patent- und Markenamt, Patent DE 197 18 640, **1997**.
- [9] M. V. Matz, A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 969.
- [10] J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, *Expert Rev. Proteomics* **2006**, 3, 361.
- [11] G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz, *Science* **2002**, 297, 1873.
- [12] S. Habuchi, R. Ando, P. Dedecker, W. Verheijen, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 9511.
- [13] J. Wiedenmann, S. Ivanchenko, F. Oswald, F. Schmitt, C. Röcker, A. Salih, K. D. Spindler, G. U. Nienhaus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 15905.
- [14] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12651.
- [15] S. W. Hell, *Science* **2007**, 316, 1153.
- [16] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacio, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. F. Hess, *Science* **2006**, 313, 1642.
- [17] S. T. Hess, T. P. Girirajan, M. D. Mason, *Biophys. J.* **2006**, 91, 4258.
- [18] N. C. Shaner, G. H. Patterson, M. W. Davidson, *J. Cell Sci.* **2007**, 120, 4247.
- [19] J. Wiedenmann, F. Oswald, R. Heilker, G. U. Nienhaus, *Bioforum* **2007**, (5), 20.