

## Grün fluoreszierendes Protein

DOI: 10.1002/ange.200902040

# GFP: Ein Protein bringt Licht ins Dunkel (Nobel-Vortrag)\*\*

Martin Chalfie\*

Fluoreszierende Proteine · In-vivo-Bildgebung ·  
Mutagenese · Nobel-Vortrag

„Man kann eine Menge beobachten, wenn man einfach nur zuschaut.“  
(Yogi Berra)

„Mit meinen Gefährten wurde ich damals Zeuge eines sonderbaren Schauspiels ... Der Nautilus schwamm inmitten eines lebendigen Lichtes aus Heerscharen durchsichtiger Gallertkügelchen.“ (Jules Verne in 20.000 Meilen unter Meer)

„Nun ist es aber verdammt unwahrscheinlich, dass sich etwas so wahnsinnig Nützliches rein zufällig entwickelt haben sollte, und so sind ein paar Denker zu dem Schluss gelangt, dies sei ein entscheidender und letzter Beweis dafür, dass Gott nicht existiert.“ (Douglas Adams in Per Anhalter durch die Galaxis)

Ich danke der Königlich-Schwedischen Akademie der Wissenschaften und der Nobel-Stiftung für diese fantastische und überraschende Ehre. Zuerst habe ich mich gefragt, warum die Wahl auf mich gefallen ist – einen Biologen mit nicht gerade beneidenswerten Zensuren in Chemie. Ich habe dann realisiert, dass dieser Preis in Wirklichkeit dem GFP-Molekül gilt, und ich bin nur einer seiner Helfershelfer. Danke, dass Sie mich an dieser Feier eines wundervollen Werkzeugs zur Visualisierung des Lebens teilhaben lassen.

Wissenschaftliche Forschung beginnt mit Beobachtung. Je mehr man sehen kann, desto mehr kann man untersuchen. In der Tat geht der Fortschritt in der Wissenschaft oft mit Verbesserungen in der Bildgebung einher. Der erste Nobelpreis, der Preis für Physik 1901, war ein solcher „Bildgebungspreis“, verliehen an Wilhelm Röntgen für seine Entdeckung der Röntgenstrahlen und deren erstaunlicher Fähigkeit, einen nichtinvasiven Blick auf das menschliche Skelett zu werfen. Einige Jahre später ging der Nobelpreis für Medizin an Camillo Golgi für die Entwicklung der Silbernitratfärbung zur Visualisierung von Nervenzellen sowie an Santiago Ramón y Cajal, der mithilfe dieser Methode die zelluläre Natur des Nervensystems bewies. Diese Forschungen legten den Grundstein für die moderne Neurobiologie.

Im Laufe der Jahre wurden einige weitere Bildgebungs-techniken und ihre Entdecker durch die Nobel-Stiftung geehrt: die Röntgenkristallographie (William und Lawrence Bragg, Physik, 1915), das Ultramikroskop (Richard Zsigmondy, Chemie, 1925), die kernmagnetische Resonanz (Felix Bloch und E. M. Purcell, Physik, 1952), das Phasenkontrastmikroskop (Frits Zernike, Physik, 1953), das Radioteleskop (Martin Ryle, Physik, 1974), das Elektronenmikroskop (Ernst Ruska, Physik, 1986), das Rastertunnelmikroskop (Gerd Binnig und Heinrich Rohrer, Physik, 1986), die Computer-

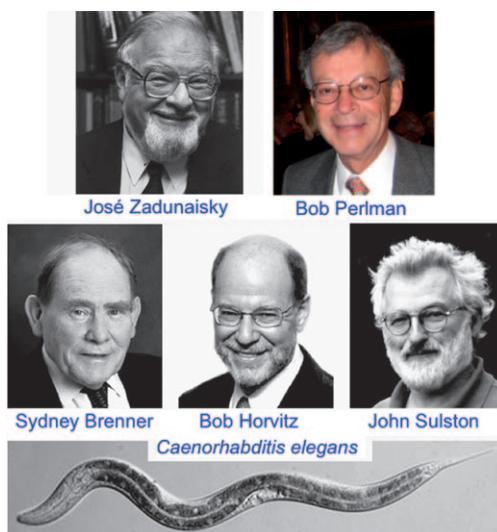
tomographie (Allan M. Cormack und Godfrey N. Hounsfield, Physiologie oder Medizin, 1979) und, vor wenigen Jahren erst, die Kernspintomographie (Paul C. Lauterbur und Sir Peter Mansfield, Physiologie oder Medizin, 2003).

Mein Weg zu den Bildgebungsverfahren verlief keineswegs in gerader Linie. Ich hatte mich seit meiner frühesten Jugend für die Wissenschaften interessiert, entschied aber nach einem desaströsen Sommerkurs, in dem jedes von mir unternommene Experiment fehlschlug, dass ich zum Forscher nicht geschaffen war. Stattdessen versuchte ich mich nach dem College an einer Reihe von Jobs, unter anderem als Chemielehrer an der High School, wo ich mich in den Sommerferien, in Zusammenarbeit mit José Zadunaisky von der Yale Medical School, noch ein letztes Mal an die Laborforschung wagte (Abbildung 1). Die tatsächlich erfolgreichen Experimente dieses Sommers gaben mir genügend Selbstvertrauen, um mich für eine Fortsetzung meines Studiums zu entschließen, und so begann ich 1972 meine Promotion am Physiology Department in Harvard bei Bob Perlman. Bob und ich hatten ein sehr gutes Verhältnis, das bis heute anhält. Er ist einer der warmherzigsten, nettesten und klügsten Menschen, die ich kenne, und außerdem jemand, mit dem man großartig Ideen diskutieren kann.

Mein eigentliches Forschungsgebiet, auf dem ich bis heute tätig bin, fand ich jedoch erst während meines Postdoktorats bei Sydney Brenner am MRC Laboratory of Molecular Biology, wo meine Studien am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* begannen. Im Jahr 2002 erhielten Sydney, Bob Horvitz und John Sulston den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Arbeiten über *C. elegans*. Alle drei hatten entscheidenden Einfluss auf meine Forscherlaufbahn. Sydney gab mir die Möglichkeit, in einem unglaublich begabten Team von Wissenschaftlern zu arbeiten. Bob, der ein Freund seit der High School war, gab mir viele wichtige Ratschläge, arbeitete in mehreren Projekten mit mir zusammen und diente mir als

[\*] Prof. M. Chalfie  
Department of Biological Sciences  
1012 Fairchild, Columbia University  
1212 Amsterdam Avenue, New York, NY 10027 (USA)  
Fax: (+1) 212-865-8246  
E-Mail: mc21@columbia.edu

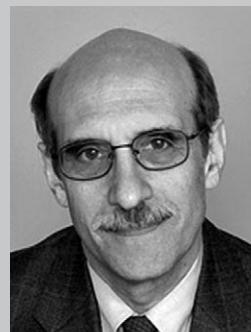
[\*\*] Copyright © The Nobel Foundation 2008. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.



**Abbildung 1.** Menschen mit großem Einfluss auf meine akademische Laufbahn. Der Erfolg meiner Arbeiten mit José Zadunaisky gab mir die Überzeugung, dass ich für die Forscherlaufbahn geeignet war. Bob Perlman war ein herausragender Doktorvater, der stets Zeit hatte, sich meine (oft verrückten) Ideen anzuhören. Die Arbeit mit Sydney Brenner, John Sulston und Bob Horvitz während meiner Postdoc-Jahre prägten meine fortdauernden Forschungen an *C. elegans*. Ich bin überzeugt, dass meine Beschäftigung mit diesem durchsichtigen Tier ein Hauptgrund dafür war, dass ich die mögliche Verwendung von GFP als biologischen Marker so aufregend fand. Bildnachweise: Lit. [1] (José Zadunaisky), M. Chalfie (Bob Perlman), Nobel-Stiftung (Sydney Brenner, John Sulston und Bob Horvitz) und Adam Antebi (*C. elegans*).

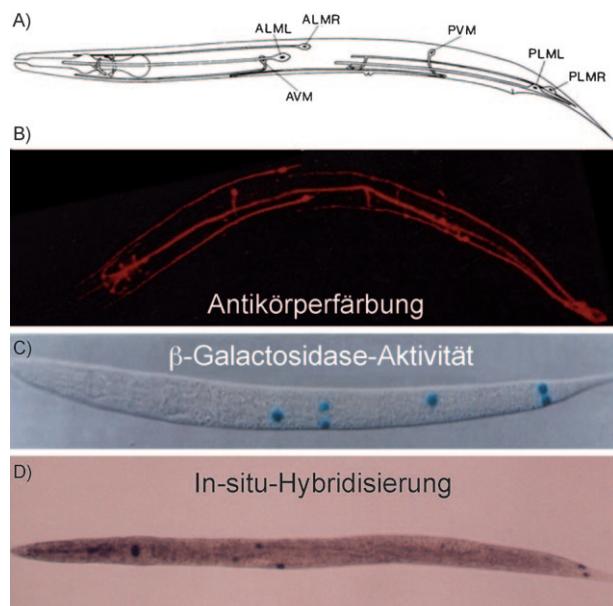
ein Vorbild dafür, was man in der Wissenschaft erreichen kann (ich folge noch immer seinen Fußstapfen). John schließlich, mit dem ich die engste Zusammenarbeit hatte, führte mich zu dem Projekt, das noch immer den größten Teil meiner Zeit in Anspruch nimmt: das Studium der Mechanosensation.

Meine Kollegen und ich sprechen von diesem Nobelpreis oft als dem „ersten Wurm-Preis“. Der zweite ging 2006 an Andy Fire und Craig Mello für die Entdeckung der RNA-Interferenz. Ich betrachte den diesjährigen Preis als den dritten Wurm-Preis, denn ich bin überzeugt, dass ich das GFP, als ich das erste Mal von ihm hörte, ignoriert hätte, wenn ich nicht über *C. elegans* geforscht und den Leuten in einem fort erzählt hätte, dass seine Durchsichtigkeit einer der Vorteile des Wurmes ist.



*Martin Chalfie, geboren am 15. Januar 1947, promovierte 1977 an der Harvard University im Fach Physiologie. 1982 wurde er Professor für Biologie an der Columbia University und später an gleicher Stelle William R. Kenan Jr.-Professor. Seine Forschungen, die auf den Fadenwurm *C. elegans* als Modellorganismus zurückgreifen, gelten der zellulären Entwicklung und Funktion von Nervenzellen.*

Im Jahr bevor ich das GFP kennenlernte hatte meine Arbeitsgruppe begonnen, die Genexpression im Nervensystem von *C. elegans* zu erforschen. Wir untersuchten die Differenzierung und Funktion der für die Mechanosensation zuständigen Nervenzellen. Mechanosensoren sprechen auf physische Störungen an, und einige unserer Sinne – Tastsinn, Gehör und Gleichgewichtssinn – beruhen auf ihrer Wirkung. Diese Sinne sind kaum verstanden, insbesondere sind die Transmittermoleküle, die das mechanische Signale detektieren, praktisch unbekannt. Die genetischen Studien, die ich zusammen mit John Sulston ausführte, zielten teilweise darauf ab, solche Transmittermoleküle zu entdecken. Wir dachten, dass wir mithilfe von Mutanten mit defektem Tast- sinn diejenigen Gene identifizieren könnten, die für die Bildung und Differenzierung der insgesamt sechs für die Tast- sensorik zuständigen Zellen und für die Neurotransmission nötig sind. In den späten 80ern klonierten wir mehrere Tast- empfindlichkeitsgene und prüften, ob diese in den Tast- rezeptorzellen von Versuchstieren exprimiert werden. Drei allgemeine Methoden wurden damals genutzt, um Gen- und Proteineexprimerungen zu untersuchen. Die erste Methode beruhte auf der Verwendung von markierten Antikörpern, die dank ihrer hohen Spezifität hervorragende proteinspezifische Marker darstellen. Die zweite Methode war die Verwendung der  $\beta$ -Galactosidase aus dem *lacZ*-Gen von *Escherichia coli*, das in Form transkriptioneller und translatorischer Fusionate exprimiert und dann durch Spaltung und nachfolgende Oxidation von X-gal unter Bildung eines blauen Produkts visualisiert werden konnten. Die dritte Methode war die In-situ-Hybridisierung mit mRNA. Wir machten von allen drei Methoden Gebrauch, um Genexpressionen zu verfolgen (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Gängige Methoden zur Untersuchung der Genexpression vor (und nach) der Entdeckung des GFP. A) Lage der sechs Tastrezeptorzellen in *C. elegans*. B) Antikörperfärbung des  $\beta$ -Tubulins MEC-7.<sup>[2]</sup> C) Exprimierung von  $\beta$ -Galactosidase durch ein transkriptionelles *mec-9*-Fusionat.<sup>[3]</sup> D) In-situ-Hybridisierung an *mec-7*-mRNA (Shohei Mitani).

Alle drei Methoden unterlagen beträchtlichen Einschränkungen, vor allem erforderten sie eine teure und zeitraubende Gewebepräparation. Die Versuchstiere mussten fixiert und in der Weise permeabilisiert werden, dass der Antikörper, das X-gal-Substrat oder die DNA-Sonde in das Gewebe eindringen konnte. Durch diese Art der Präparation, die mit jeder Tiercharge separat vorgenommen werden musste, ließ sich nur totes Gewebe betrachten, sodass wir nur ein statisches Bild der Expression erhielten. Um verstehen zu können, welche Veränderungen sich während der Entwicklungsphase abspielten, mussten wir Photographien vieler Individuen miteinander vergleichen.

Die Idee, GFP in Würmer einzuschleusen, kam mir erstmals am frühen Nachmittag des 25. April 1989, einem Dienstag. In meinem Institut wurde Dienstags eine Seminarreihe in Neurobiologie angeboten, und der Vortragende an diesem Tag war Paul Brehm, der zur damaligen Zeit an der Tufts University forschte. Er begann seine Vorlesung mit einer Beschreibung der Lichterzeugung durch Quallen und ähnliche Tiere. Diese Arbeiten waren, wie ich später erfuhr, von Osamu Shimomura<sup>[4,5]</sup> begonnen und dann von Jim Morin und Woody Hastings<sup>[6,7]</sup> fortgeführt worden. Brehm sprach zuerst über das Aequorin, von dem ich gehört hatte, dass es ein Calciumindikator war. Im weiteren Verlauf erwähnte er dann ein mir bis dahin unbekanntes Protein, das fluoreszierte und der Qualle ermöglichte, grünes anstatt blaues Licht zu erzeugen. Geprägt durch meine jahrelange Beschäftigung mit dem durchsichtigen *C. elegans* und inmitten meiner Arbeiten über Antikörper und *lacZ*-Fusionate befindlich, begann ich sogleich darüber zu fantasieren, wie dieses grün fluoreszierende Protein (GFP) als biologischer Marker verwendet werden könnte. Ich muss gestehen, dass ich dem Rest des Seminars keine Aufmerksamkeit mehr schenkte: Zu aufgeregt war ich.

Ich fand kürzlich meine Notizen aus dieser Zeit wieder, und sie erlauben es mir, den weiteren Verlauf der Ereignisse zu rekonstruieren (Abbildung 3). Ich verbrachte die nächsten zwei Tage am Telefon, wo ich einiges über das GFP erfuhr und schließlich Douglas Prasher am Apparat hatte (Abbildung 4), der am Woods Hole Oceanographic Institute forschte und sich dort mit der Klonierung der cDNA des *gfp*-Gens beschäftigte. Wir hatten ein wunderbares Gespräch und stellten fest, dass wir durchaus ähnliche Ideen darüber hatten, was man mit dem GFP anfangen könnte, und ich entschloss mich zu einer Zusammenarbeit – sobald Douglas die Klonierung des Gens beendet hätte.

Im Verlauf dieses Tages erfuhr ich, dass GFP einige Eigenschaften hat, die es zu einem sehr attraktiven Kandidaten für einen biologischen Marker machten: 1) Es war ein relativ kleines Protein bestehend aus nur 238 Aminosäuren. 2) Es war als Monomer aktiv. 3) Es konnte durch ultraviolettes oder blaues Licht angeregt werden. 4) Es war ein stabiles Protein, das eine hohe Quantenausbeute hatte und nicht rasch ausbleichte. 5) Das aktive Protein benötigte weder einen Cofaktor noch andere kleine Moleküle, um zu fluoreszieren.

Eine Eigenschaft hatte das GFP jedoch, die es für eine Expression in anderen Organismen als der Qualle ungeeignet erscheinen ließ: Der Chromophor wurde durch die Cyclisie-

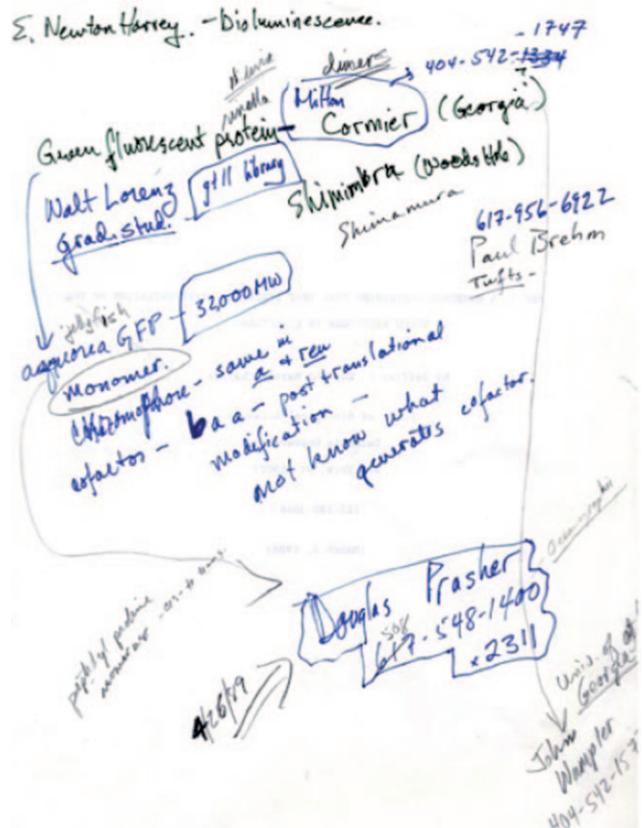


Abbildung 3. Notizen vom April 1989, angefertigt beim Aufspüren von Kollegen, die am GFP arbeiteten.



Douglas Prasher



Ghia Euskirchen

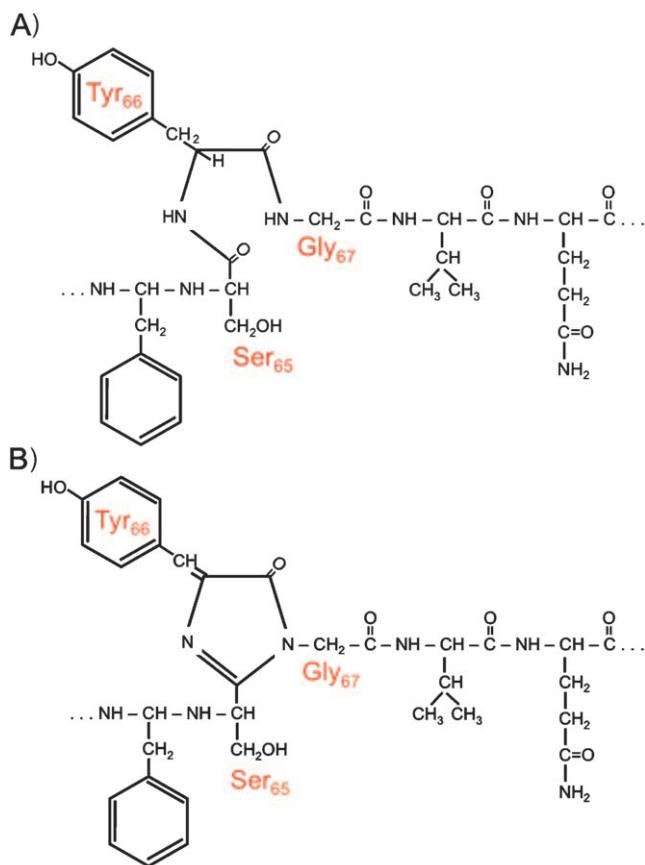


Yuan Tu



Bill Ward

Abbildung 4. Das GFP-Team. Douglas Prasher klonierte die cDNA des *gfp*, Ghia Euskirchen exprimierte die cDNA in *E. coli*, Yuan Tu exprimierte die cDNA in *C. elegans* und Bill Ward verglich die Anregungs- und Emissionsspektren des nativen und rekombinanten GFP. Bildnachweis: Douglas Prasher und Bill Ward (eigene Photos), M. Chalfie (Ghia und Yuan).



**Abbildung 5.** Bildung des GFP-Chromophors. A) Die primäre Aminosäuresequenz des GFP. B) Die Sequenz nach der Cyclisierung. Wiedergabe nach Cody et al.<sup>[8]</sup>

rung des Peptidrückgrats zwischen Ser<sub>65</sub> und Tyr<sub>66</sub> gebildet (Abbildung 5). Niemand wusste genau, wie diese Cyclisierung ablief, die allgemeine Lesart war aber, dass ein oder mehrere Enzyme benötigt würden, um das apoGFP in das fluoreszierende Produkt umzuwandeln.<sup>[8]</sup> Falls tatsächlich andere Proteine benötigt würden, wäre GFP kein sehr guter Marker.

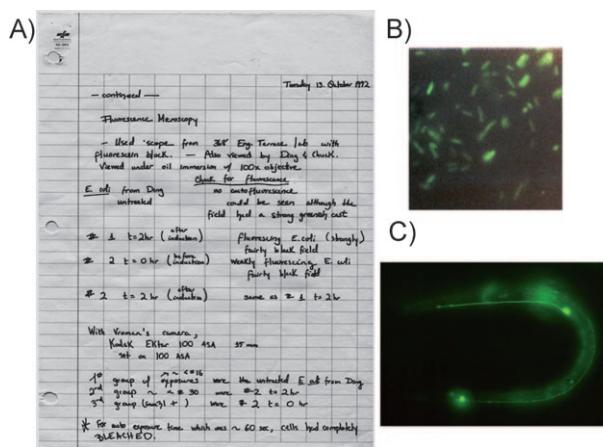
Das nächste wichtige Ereignis war meine Heirat Ende 1989 mit Tulle Hazelrigg. Tulle war Forscherin an der University of Utah, gut 2000 Meilen entfernt von New York City. In Anbetracht der Entfernung hielt ich es für berechtigt, mir ein Freisemester zu nehmen, das ich dann in Tullen Arbeitsgruppe verbrachte. Unglücklicherweise schloss Douglas nun während meiner Abwesenheit die Klonierung der *gfp*-cDNA ab und versuchte mich leider erfolglos zu kontaktieren. Er kam zu dem Schluss, dass ich aus der Wissenschaft ausgeschieden sei. Ich meinerseits, da ich von Douglas nichts hörte, bildete mir ein, dass er die cDNA nicht gefunden hatte.

So verharrten wir in gegenseitiger Unkenntnis bis September 1992. Zu dieser Zeit kam Ghia Euskirchen (Abbildung 4) als Doktorandin in meine Arbeitsgruppe, worüber ich mich besonders freute, weil sie gerade ihr Studium an der hiesigen Engineering School mit einer Arbeit über Fluoreszenz beendet hatte. Ich erzählte ihr von meiner Idee, ein fluoreszierendes Protein zur Markierung von Zellen einzusetzen und beklagte dabei den Umstand, dass ich nichts von Douglas gehört hatte. Als wir dann aber in der Medline-Da-

tenbank nach „fluorescent protein“ suchten, war das erste Paper, auf das wir stießen, Douglas' Veröffentlichung vom Februar 1992, in der er die Isolierung der *gfp*-cDNA beschrieb.<sup>[9]</sup> Flugs in die Bibliothek geeilt, fanden wir die Veröffentlichung, entdeckten, dass das Paper Douglas' Telefonnummer enthielt, und eilten zurück in mein Büro, um ihn gleich anzurufen. Nachdem wir die Missverständnisse bezüglich unserer beider Werdegänge geklärt hatten, nahmen Douglas und ich unsere Zusammenarbeit wieder auf.

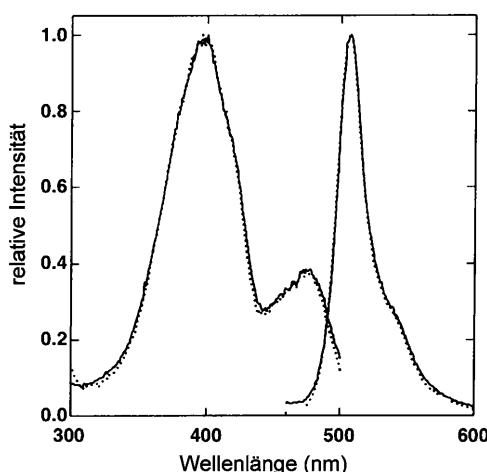
Sechs Tage später schickte uns Douglas die DNA. An diesem Punkt hatte ich die Wahl zwischen zwei Möglichkeiten, das Experiment auszuführen. Douglas hatte die cDNA als ein *Eco*RI-Fragment in einen Lambda-Vektor kloniert. Wir konnten das Fragment entweder gewinnen, indem wir es mit dem gleichen Restriktionsenzym aus dem Vektor ausschneiden würden, wodurch aber zusätzliche nichtcodierende Quallen-DNA anfallen würde. Oder wir konnten mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nur die codierende Sequenz amplifizieren, was riskant war, da die damaligen PCR-Techniken zu Basenaustauschen neigten. Ich entschied mich für die letztere Strategie, was sich als glücklich herausstellte, denn wir erfuhren später, dass andere Arbeitsgruppen, die auf das Restriktionsenzym gesetzt hatten, keine Fluoreszenz erhielten. Vermutlich interferierte die fremde Quallen-DNA mit der Expression. Mit der gängigen Annahme, dass das GFP zum Aufbau seiner Fluoreszenz ein oder mehrere Enzyme benötigte, konnte das Ausbleiben der Fluoreszenz bei Bakterien so interpretiert werden, dass noch weitere Komponenten aus der Quelle benötigt wurden.

Ein Monat, nachdem uns Douglas die DNA überlassen hatte, war Ghia die Herstellung von grün fluoreszierendem *E. coli* gelungen (Abbildung 6). Um dieses beobachten zu können, mussten wir auf ein Mikroskop aus Ghias früherem Arbeitskreis zurückgreifen. Wir waren begeistert! Kein weiteres Quallenprotein wurde benötigt, um das Protein in seine fluoreszierende Form umzuwandeln. Ghia nahm mehrere



**Abbildung 6.** Die erstmalige Expression von GFP in heterologen Organismen. A) Seite aus Ghia Euskirchens Labortagebuch, auf der sie notierte, dass in *E. coli* exprimiertes GFP fluoresziert. Das von ihr benutzte Mikroskop befand sich nicht in unserem Laboratorium. B) Eine von Ghia aufgenommene Photographie dieser ersten fluoreszierenden Bakterien. C) Exprimiertes GFP in den Tastrezeptorneuronen von *C. elegans*.<sup>[10]</sup> Wiedergabe mit Genehmigung der AAAS.

Bilder der Bakterien auf, und ich begann still und leise, sie unter Kollegen herumzuzeigen, denn ich konnte meine Aufregung kaum zurückhalten. Bald nachdem Ghia meine Gruppe verlassen hatte, bat ich Yuan Tu (Abbildung 4), meinen damaligen technischen Mitarbeiter, GFP in *C. elegans* einzubringen. Auch dieses Experiment verlief erfolgreich, und zum ersten Mal hatten wir GFP in den Tastrezeptorneuronen von *C. elegans* exprimiert (Abbildung 6). In der Folge schloss sich Bill Ward (Abbildung 4) dem Projekt an. Ward war Biochemiker und beschäftigte sich schon seit einigen Jahren mit dem GFP. Er konnte zeigen, dass das in *E. coli* erzeugte Protein die gleichen optischen Eigenschaften wie das native Protein hatte (Abbildung 7).



**Abbildung 7.** Anregungs- (links) und Emissionsspektren (rechts) von nativem (gepunktete Linie) und rekombinantern GFP (durchgezogene Linie).<sup>[10]</sup> Wiedergabe mit Genehmigung der AAAS.

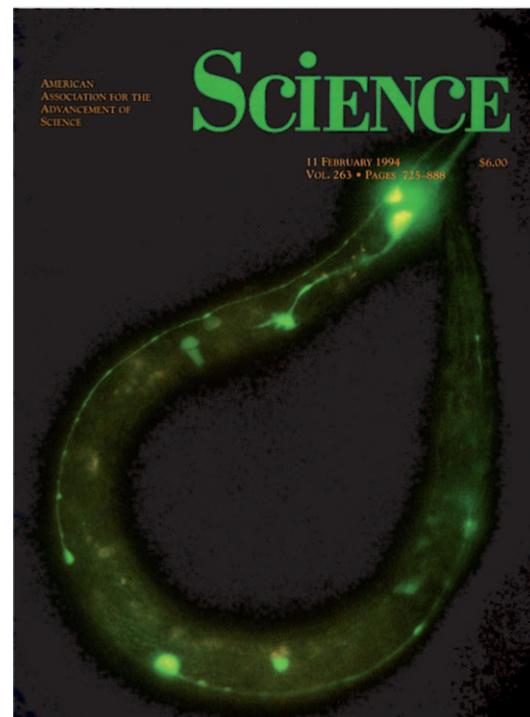
Wie aus Ghias Labortagebuch hervorgeht, hatten wir ein Problem bei unseren Experimenten, nämlich dass sie die Bakterien in ihrem früheren Labor mikroskopieren musste. Wir besaßen kein funktionierendes Fluoreszenzmikroskop. Dies erwies sich als ein andauerndes Problem, das ich so zu lösen versuchte, dass ich das institutseigene Konfokalmikroskop benutzte, und wenn das nicht ging, Außendienstler darum bat, uns Vorführmikroskope mitzubringen, die ich vor dem Kauf angeblich testen wollte. In Wirklichkeit benutzten wir die Mikroskope für unsere Experimente.

Ab den späten 70er bis in die 90er Jahre war es unter *C. elegans*-Forschern üblich, dass man neue Fortschritte vor deren eigentlicher Veröffentlichung bekannt mache, sodass die erste schriftliche Mitteilung unserer GFP-Arbeiten im Oktober 1993 im Newsletter der *Worm Breeder's Gazette* erschien.<sup>[11]</sup> Dieser Beitrag löste eine Flut von Anfragen betreffend der GFP-Vektoren aus, und vor der offiziellen Publikation in *Science* im Februar 1994 hatten mich schon ungefähr 50 Kollegen kontaktiert.<sup>[10]</sup>

Allerdings gab es mit der Veröffentlichung einige Schwierigkeiten. Das erste Problem war der Titel. Das zur Vorabprüfung eingereichte Manuskript verkündete im Titel, dass wir „A New Marker for Gene Expression“ gefunden hatten. Der Redakteur trug uns auf, das Wort „new“ aus dem

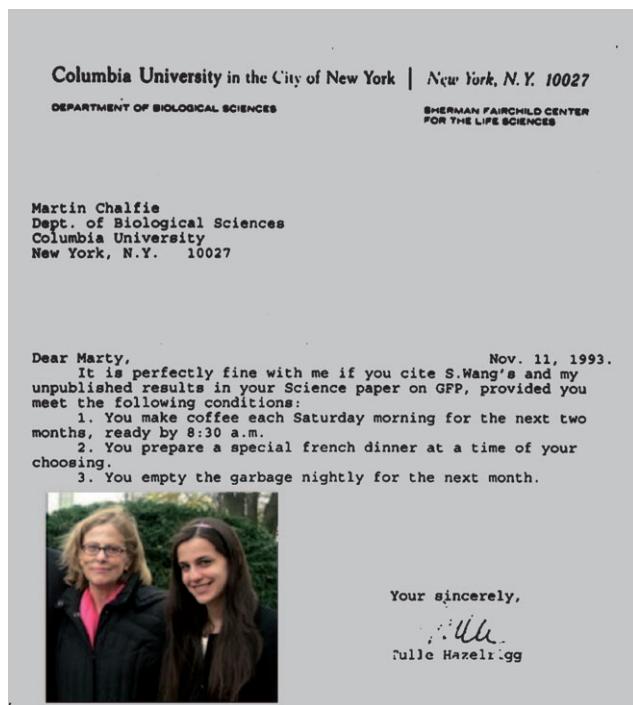
Titel zu streichen, weil schließlich jede in *Science* veröffentlichte Arbeit über neuartige Ergebnisse berichtete. Wir wurden außerdem gebeten, den Titel aussagekräftiger bezüglich der beschriebenen Ergebnisse zu machen. Teilweise aus Verärgerung verpasste ich der für die Gutachter gedachten Fassung einen sehr viel längeren Titel („The *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein Needs No Exogenously-Added Component to Produce a Fluorescent Product in Prokaryotic and Eukaryotic Cells“). Nachdem das Manuskript angenommen war, bat uns nun wiederum der Copy Editor um Kürzung des Titels, und wir reichten einen neuen Titel ein, der fast identisch mit dem ursprünglichen war („Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression“).

Ein zweites Problem gab es mit dem Titelbild. Ich hatte ein Bild eingesandt, auf das ich recht stolz war und das einen neuronalen Wachstumskegel in einem lebenden Tier zeigte. Die Graphikerin ließ mich jedoch wissen, dass Grün die auf dem Titelbild am schwierigsten zu druckende Farbe sei und fragte, ob man die Farbe ändern könne. Glücklicherweise konnte ich sie davon überzeugen, dass eine Änderung der Farbe in diesem Fall nicht angebracht sei (Abbildung 8).



**Abbildung 8.** Das Titelbild der *Science*-Ausgabe vom 11. Februar 1994 zeigt GFP in Nervenzellen von *C. elegans*.<sup>[12]</sup> Wiedergabe mit Genehmigung der AAAS.

Das dritte Problem war, dass es Schwierigkeiten mit jemandem gab, der bereits mit GFP gearbeitet hatte und dessen unveröffentlichte Daten ich zitieren wollte. Die meisten Kollegen ließen ihre Ergebnisse gerne diskutieren, dieser aber knüpfte besondere Bedingungen an die Verwendung seiner Daten (Abbildung 9). Gewiss hatten diese zusätzlichen Ansprüche damit zu tun, dass es sich bei dem „Kollegen“ um



**Abbildung 9.** Von meiner Frau aufgestellte Bedingungen, unter denen ich ihre unveröffentlichten GFP-Daten in meiner Veröffentlichung zitieren durfte. Bis heute ist es Gegenstand der Debatte, ob diese Bedingungen tatsächlich erfüllt worden sind. Das Photo zeigt meine Frau mit unserer Tochter Sarah (Bildnachweis: Roger Tsien).

meine Frau handelte! Die Photographie in Abbildung 9 zeigt sie zusammen mit unserer Tochter Sarah; beide haben aus mir einen besseren und sehr glücklichen Menschen gemacht.

Die Arbeiten, die ich mit Tulle's Erlaubnis zitieren durfte, stellten tatsächlich den nächsten wichtigen Fortschritt bei der Verwendung des GFP dar. Tulle hatte zusammen mit ihrem Doktoranden Shengxian Wang das erste Proteinfusionat mit GFP hergestellt und gezeigt, dass es das ursprüngliche Protein funktionell ersetzt und somit verwendet werden kann, um die Lokalisierung des normalen Proteins in der Zelle aufzuzeigen.<sup>[13]</sup> Typisch für ihre Bescheidenheit, verzichtete Tulle auf die Wörter „green fluorescent protein“ oder „GFP“ im Titel.

Diese Veröffentlichungen demonstrierten den großen Nutzen des GFP als biologischen Marker für die Genexpression und die Lokalisierung von Proteinen. Das GFP hatte einige klare Vorteile gegenüber früheren Markern. Erstens war GFP, genau wie die  $\beta$ -Galactosidase, vererbbar. Es war möglich, Organismen mit GFP-codierender DNA zu transformieren, sodass sich modifizierte Stämme heranzüchten ließen. Dies erlaubte die direkte Untersuchung von Versuchstieren, ohne aufwendige Gewebepräparationen durchzuführen zu müssen. Darüber hinaus konnten die mit besonderen Zellen oder Proteinen markierten Stämme für eine Vielzahl von Studien genutzt werden. Zweitens war die Visualisierung von GFP im Wesentlichen nichtinvasiv; das Protein konnte sichtbar gemacht werden, indem man das Versuchsexemplar einfach mit blauem Licht anstrahlte. Drittens war GFP ein relativ kleines und reaktionsträges

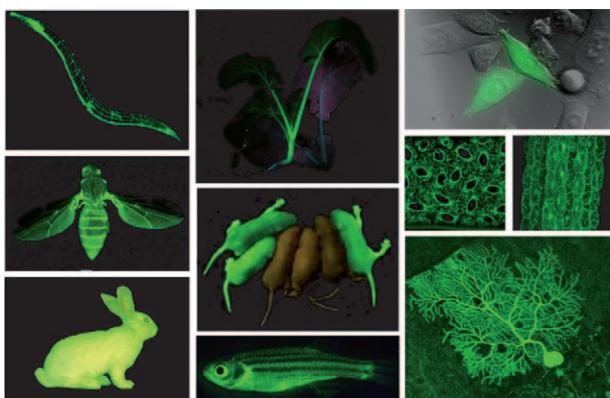
Molekül, das die untersuchten biologischen Prozesse nicht zu stören schien. Das aktive Protein war darüber hinaus ein Monomer, weshalb es leicht durch Zellen, insbesondere Nervenzellen, diffundieren konnte und deren gesamte Gestalt abzeichnete. Die  $\beta$ -Galactosidase ist in ihrer monomeren Form viermal größer und außerdem nur als Tetramer enzymatisch aktiv, was die Diffusion erschwert. Viertens konnte die vom GFP erzeugte Fluoreszenz in lebenden Organismen beobachtet werden, was die zeitliche Verfolgung biologischer Ereignisse erlaubte. Zudem war es möglich, biologische Aktivitäten von Proteinen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle zu messen, wofür sich die  $\beta$ -Galactosidase nicht eignet.

Das native GFP ließ sich in verschiedenen Experimenten einsetzen, bevor es aber als ein wirklich nützliches Werkzeug für biologische Studien dienen konnte, mussten etliche seiner Eigenschaften verbessert werden. Die ersten Studien, die auf die Entwicklung verbesserter GFP-Varianten abzielten, gehen auf den hier ebenfalls ausgezeichneten Roger Tsien zurück, der Methoden entwickelte, um die Emissionsfarbe zu ändern und die Fluoreszenzausbeuten des Proteins bei Anregung mit blauem Licht zu erhöhen. Die Einzelheiten sollen seinem Vortrag überlassen bleiben. Ich will stattdessen zu unserem *Science*-Paper zurückkehren und schildern, wie die Fachwelt darauf reagierte.

Nach der Veröffentlichung unseres Papers erhielten wir unzählige Anfragen bezüglich des GFP-Vektors, und wir versendeten schätzungsweise 1500 selbst produzierte Proben, bevor wir die Verteilung in andere Hände gaben. Zwei Dinge fand ich außerordentlich interessant: Erstens, dass nicht wenige der Kollegen angaben, sie hätten erstmals von einem ihrer Doktoranden oder Postdocs vom GFP gehört, was stark darauf hindeutet, dass jene Mitarbeiter die eigentliche treibende Kraft in den Arbeitskreisen waren. Zweitens, dass einige Leute sogleich fragten, ob ich denn wüsste, ob GFP schon in ihrem „Lieblingsorganismus“ eingesetzt worden sei. Als Grund dieser Frage erwartete ich, dass sie die ersten sein wollten, und war überrascht, dass bei Verneinung der Frage manche lieber warten wollten, bis jemand anders die Methode ausgearbeitet hatte. Ich bin noch immer etwas bestürzt über diese Reaktion, obgleich es wohl bedeutet, dass wir weniger echte Konkurrenten hatten als ich zuerst annahm.

Auf jeden Fall wurde GFP rasch in eine gigantische Ansammlung von Organismen aus allen drei Lebensdomänen – Archaeen, Bakterien und Eukaryoten – eingeschleust (Abbildung 10). Ein Suche in PubMed mit den Begriffen „GFP“ oder „green fluorescent protein“ liefert über 30000 Publikationen – eine Zahl, die seit 1994 exponentiell angestiegen ist und ohne Frage nur eine untere Grenze darstellt. Mit Eduardo Kacs Hase Alba fand das GFP sogar seinen Weg in die Kunst, und es spielt auch eine Rolle in der Anfangssequenz des Spielfilms „Hulk“ (2003) von Ang Lee, aus der wir schließen müssen, dass der Hulk der erste transgene Mensch mit dem *gfp*-Gen ist.

Nach der Veröffentlichung unseres GFP-Papers wendete ich mich wieder meinen Arbeiten zur Mechanosensation zu und wandelte mich damit von einem Entwickler zu einem Anwender des GFP. Im Folgenden will ich beschreiben, wie wir GFP für unsere Forschungen genutzt haben, und einige



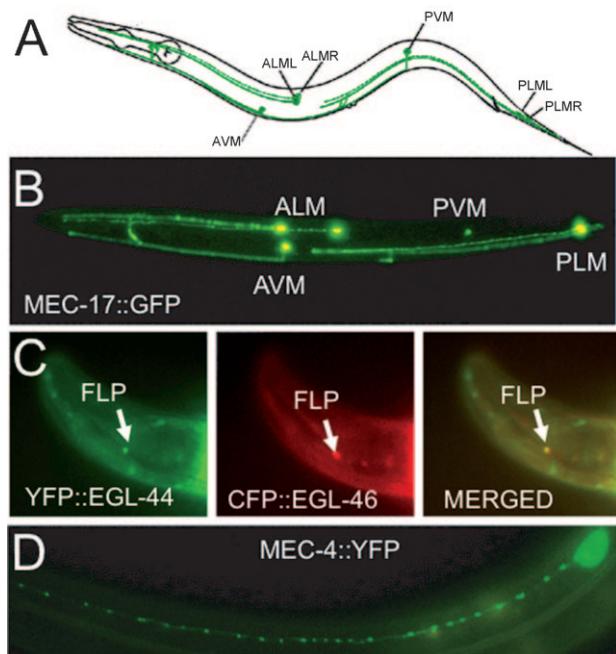
**Abbildung 10.** Gallerie von GFP-Bildern. Photonachweis, spaltenweise von links nach rechts: *C. elegans* (John Kratz), Drosophila (Ansgar Klebes, Freie Universität Berlin), der GFP-Hase Alba (Eduardo Kac, Raps [M. D. Halfhill (St. Ambrose University) sowie H. A. Richards, R. J. Millwood und C. N. Stewart, Jr. (University of Tennessee)]), Mäuse (Ralph Brinster, University of Pennsylvania), Zebrafisch (Brant Weinstein, NIH), kultivierte HeLa-Zellen (Jerry Kaplan und Michael Vaughn, University of Utah), Embryozellen von Drosophila (Jennifer Lippincott-Schwartz, NIH), Hypocotylzellen von *Arabidopsis thaliana* (David Ehrhardt, Carnegie Institution of Washington), Purkinje-Zelle der Maus (National Center for Microscopy and Imaging Research, University of California, San Diego).

Beispiele dafür geben, wie vielseitig und hilfreich dieses Protein bei wissenschaftlichen Entdeckungen sein kann.

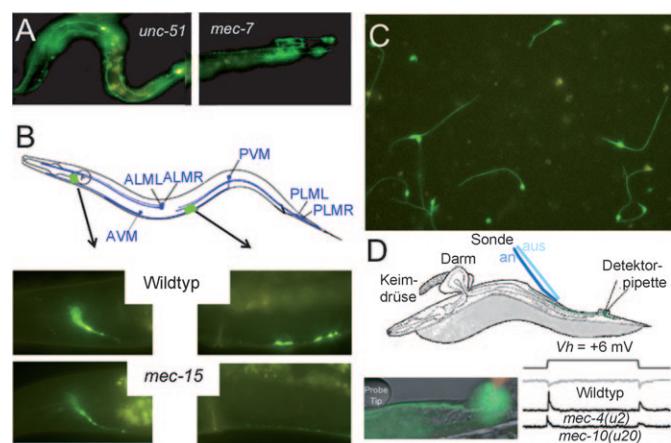
Als erstes setzten wir GFP natürlich in transkriptionellen Fusionaten ein, um die Expressionsmuster der Gene zu charakterisieren (Abbildung 6). Als zweites verwendeten wir translatorische GFP-Fusionate, an denen wir sowohl die Genexpression als auch die Lokalisierung der Proteine untersuchten (Abbildung 11). Mit der Einführung verschiedenfarbiger Fluoreszenzproteine konnten wir auch die Coexpression von Genen erforschen. Studien an Mutanten mit defektem Tastsinn ergaben, dass das Tastvermögen von *C. elegans* einen Kanalkomplex bestehend aus mindestens vier Proteinen sowie eine spezialisierte extrazelluläre Matrix und Mikrotubuli benötigte. Mithilfe eines translatorischen MEC-4::GFP-Fusionats konnten wir nachweisen, dass der Kanal-Komplex an diskreten Punkten entlang der Bahn des neuronalen Prozesses lokalisiert ist (Abbildung 11 D).

Die mit GFP markierten Zellen können für zahlreiche Anwendungen genutzt werden, z.B. führten wir etliche Experimente an *C. elegans*-Mutanten mit verschiedenartigen Defekten durch. In Studien mit vollständig GFP-markierten Tastrezeptorneuronen fanden wir Mutanten mit einer geringeren oder größeren Zahl an fluoreszierenden Zellen (Identifizierung der zur Steuerung der Zellentwicklung benötigten Gene), Mutanten mit abnorm lokalisierten Zellen (Identifizierung der zur Positionierung der Zellen benötigten Gene) und Mutanten mit zusätzlichen Zellprozessen oder abnorm verzweigten Zellen (Identifizierung der am neuronalen Auswuchs beteiligten Gene) (Abbildung 12 A).

Mutanten mit spezifischeren Defekten kann man erhalten, indem man GFP an Proteine fusioniert, die sich in bestimmten Bereichen der Zelle aufhalten. Michael Nonet an der Washington University in St. Louis erforscht z.B. Gene,



**Abbildung 11.** Anwendung von translatorischen Fusionaten fluoreszierenden Proteine. A) Lage der sechs Tastrezeptorneuronen von *C. elegans* (grün). B) Ein MEC-17::GFP-Fusionat wird in allen sechs Tastrezeptorneuronen exprimiert.<sup>[14]</sup> C) Die FP-Fusionate der Transkriptionsfaktoren EGL-44 und EGL-46 lokalisieren beide am Zellkern eines FLP-Neurons.<sup>[15]</sup> D) Lokalisation von MEC-4::YFP an Adhäsionskontakten entlang der Bahn eines neuronalen Prozesses.<sup>[16]</sup>



**Abbildung 12.** Verwendung von GFP zur Identifizierung und Charakterisierung von Genen. A) Mutationen in den Genen *unc-51* und *mec-7* beeinflussen den Zellauswuchs von mit MEC-2::GFP markierten Tastrezeptorzellen.<sup>[17]</sup> B) Mutationen im Gen *mec-15* verkleinern Synapsen in mit GFP::RAB-3 markierten Tastrezeptorneuronen.<sup>[18]</sup> C) Tastrezeptorneuronen können aus Embryos kultiviert und durch Zellsortierung isoliert werden und lassen sich zur Identifizierung zellspezifischer Gene einsetzen.<sup>[14]</sup> D) Fluoreszenzbasierte elektrophysiologische Studien der Tastneuronen in Wildtyp- und mutierten Tierexemplaren.<sup>[19]</sup>

die für die Bildung chemischer Synapsen, die die Nervenzellen verbinden, zuständig sind. Hierzu erzeugte er Fusionate von GFP mit an den Synapsen lokalisierten Proteinen (Abbildung 12 B). Die Fusionate markieren die beiden Regionen

in Tastrezeptorneuronen, die chemische Synapsen enthalten. Wir haben derzeit ein gemeinsames Projekt, im Rahmen dessen wir ein für die chemischen Synapsen der Tastrezeptorneuronen benötigtes Gen erforschen.

Es besteht auch die Möglichkeit, markierte Zellen zu isolieren und dann zu untersuchen. Beispielsweise haben wir Embryos gespalten und die embryonischen Zellen kultiviert. Die Tastrezeptorneuronen können anhand ihrer Fluoreszenz unter all den anderen Zellen detektiert werden (Abbildung 12C). Bemerkenswerterweise zeigen diese Zellen die gleiche Morphologie wie im Organismus, während andere markierte Nervenzellen völlig anders aussehen. Die Zellen konnten unter Verwendung eines fluoreszenzaktivierten Zellsortierers isoliert werden und wurden genutzt, um zellspezifische Boten-RNAs zu identifizieren. Mithilfe dieser Methoden konnten wir ungefähr 200 zusätzliche Gene identifizieren, die in diesen Zellen überexprimiert werden.

Die markierten Zellen konnten auch genutzt werden, um die elektrischen Eigenschaften der Tastrezeptorneuronen zu untersuchen. Insbesondere gelang es uns hierbei, die ersten Transmittermoleküle einer eukaryotischen mechanischen Sinnesempfindung zu identifizieren. *C. elegans* ist ein wunderbarer Modellorganismus für ein breites Spektrum von Studien, hat aber auch den Nachteil sehr dünner Nervenzellen. Glücklicherweise entwickelte Miriam Goodman in der Arbeitsgruppe von Shawn Locker an der University of Oregon eine GFP-basierte Methode, mit der elektrophysiologische Messungen an *C. elegans* ausgeführt werden können<sup>[20]</sup> und die sie später im Rahmen ihres Postdoktorats in meiner Gruppe auf Tastrezeptorneuronen anwendete (Abbildung 12D). Mithilfe dieser Methode fanden Bob O'Hagan (einer meiner Doktoranden), Miriam, die nun in Stanford ist, und ich, dass spezifische Mutationen, die sich auf die Kanaluntereinheiten der Tastneuronen auswirken, den normalen einwärts gerichteten Strom, wie er durch ein Tastereignis ausgelöst wird, in einen nach außen gerichteten Strom umkehrt, was zeigt, dass diese Kanalproteine direkt an der Neurotransmission beteiligt sind.

Keines der Ergebnisse, die ich beschrieben habe, hätte ohne die Anwendung von GFP erzielt werden können. Bei aller Schwärmerei weist GFP jedoch einige Einschränkungen auf, sodass wir begonnen haben, modifizierte Proteine mit verbesserten Eigenschaften zu entwerfen. Ein Problem ist, dass die GFP-Expression auf genregulatorische Elemente angewiesen ist. Dass wir uns mit den Tastneuronen beschäftigen, erweist sich als ein glücklicher Umstand, denn wir kennen Gene, die nur in den Tastneuronen exprimiert werden und sind in der Lage, ihre regulatorischen Sequenzen zu nutzen. Eine solche zellspezifische Expression ist aber weder in *C. elegans* noch in anderen Organismen der Normalfall, sodass eine spezifische Markierung mit GFP schwierig sein kann. Eine bemerkenswerte Entdeckung von Lynne Regan an der Yale University hat uns allerdings geholfen, dieses Problem zu umgehen.

Lynne fand, dass in zwei Hälften gespaltenes GFP rekonstituiert werden kann, wenn die beiden Hälften durch wechselwirkende Peptide verbunden werden.<sup>[21]</sup> Lynnes und andere Arbeitsgruppen haben diese Eigenschaft zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen genutzt. Zwei meiner

Mitarbeiter, Shifang Zhang und Chuck Ma, erkannten, dass dieses Zweikomponenten-GFP, dem wir die Bezeichnung recGFP gaben, das Spezifitätsproblem lösen könnte, wenn man die beiden Hälften mittels unterschiedlicher Promotoren exprimieren würde. Durch Verwendung von recGFP sollte es möglich sein, 80 % statt 20 % der existierenden neuronalen Zelltypen in *C. elegans* zu markieren (Abbildung 13).

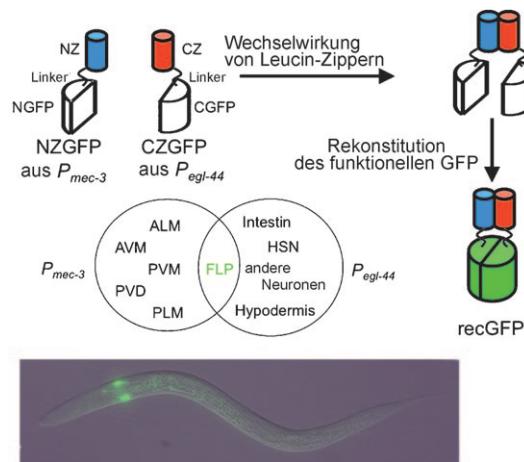
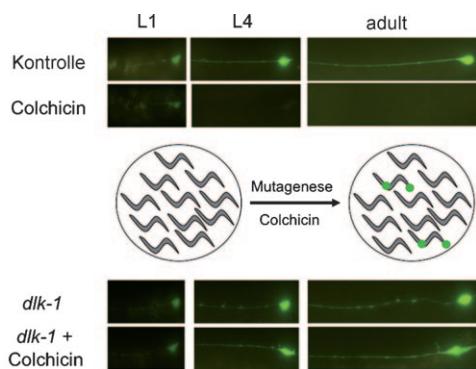


Abbildung 13. Anwendung von recGFP zur Markierung der FLP-Neuronen von *C. elegans*.<sup>[22]</sup>

Eine andere Eigenschaft des GFP, die je nach Situation ein Vorteil oder Nachteil sein kann, ist seine hohe Stabilität. Günstig ist diese Eigenschaft dann, wenn man durch Anreicherung von GFP ein helleres Signal erzeugen möchte. Wir hatten aber Situationen, in denen wir nicht das Ein-, sondern das Ausschalten der Genexpression untersuchen wollten, und in diesen Fällen ist die Stabilität des GFP ein Hindernis. Wir fanden, dass die Fusion von GFP mit den RING-Domänen bestimmter E3-Ubiquitinligasen ein instabiles GFP ergibt. Wir haben instabiles GFP eingesetzt, um herauszufinden, wie die Spaltung von Mikrotubuli in den Tastrezeptorneuronen zu einer pauschalen Verringerung der Proteinspiegel in den Zellen führt. Unbehandelte Tiere fluoreszieren im adulten Stadium. Behandelte man die Tiere dagegen mit dem mikrotubuli-hemmenden Wirkstoff Colchicin, der eine selektive Berührungsunempfindlichkeit verursacht, so wurde keine Fluoreszenz beobachtet (Abbildung 14). Wir konnten mehrere Gene identifizieren, die an dieser Herabregulierung beteiligt sind (u. a. Gene des p38-MAPK-Signalwegs und einen mutmaßlichen Transkriptionsfaktor), indem wir die Population mutagenierten und adulte Tiere mit sichtbarer Fluoreszenz selektierten. Ich finde diese Experimente vor allem aus zwei Gründen spannend: Erstens hängen der axonale Auswuchs, die Verästelung und die Synapsenbildung vom Zustand nahegelegener Mikrotubuli ab. Die Beziehung zwischen dem Zustand der Mikrotubuli und der MAPK-Aktivität kann helfen, die Rolle der Mikrotubuli in diesen Prozessen aufzuklären. Zweitens haben wir nun eine Methode zur Hand, um die Herabregulierung von Genaktivitäten zu erforschen. Wir haben auch andere Fälle gefunden, in denen die Genexpression in postmitotischen Zellen verringert ist, und



**Abbildung 14.** Gen-Identifizierung mithilfe eines rasch abbauenden GFP (praj::GFP). In Gegenwart von Colchicin zeigen adulte Tastrezeptorneuronen keine GFP-Fluoreszenz. Mutagenese der Wildtypexemplare liefert einige Tiere mit adulter Fluoreszenz. Ein durch diese Methode identifiziertes Gen ist *dkk-1*, das für eine mitogenaktivierte Protein-kinase codiert.<sup>[23]</sup>

wir verwenden instabiles GFP, um die hieran beteiligten Gene zu identifizieren.

Bevor ich meinen Vortrag beende, möchte ich zwei Gründe nennen – abgesehen von der offensichtlichen Ehre –, weshalb ich diesen Preis besonders wertschätze. Erstens würdigt diese Auszeichnung die Grundlagenforschung. Das GFP wurde von Osamu Shimomura im Zuge von Studien entdeckt, die die Frage klären sollten, wie manche Organismen Licht erzeugen können. Die Werkzeuge, die Roger Tsien und ich entwickelten, finden weitreichende Anwendungen in der Zellbiologie, der Entwicklungsbiologie, der Neurobiologie und im Grunde in den gesamten Biowissenschaften. Ich möchte auch hinzufügen, dass wir von den Studien an *C. elegans* außerordentlich viel über das Leben gelernt haben – was im nun schon dritten Nobelpreis seinen klaren Ausdruck findet. Man hört diese Tage häufig, dass die Wissenschaften mehr in Richtung translationaler Forschung gelenkt werden sollen, Forschung also, die im Labor gewonnene Einsichten auf Probleme der menschlichen Gesundheit anwendet. Obwohl die Anwendung von Wissen auf die Gesundheit und das Wohlbefinden offenkundig wichtig ist, denke ich, dass viele Aussagen, die den Schritt von der Grundlagenforschung zur translationalen Forschung anmahnen, von zwei falschen Voraussetzungen ausgehen. Die eine ist, dass Wissenschaftler gefühllos oder ignorant gegenüber den Folgen ihrer Forschung seien. Ich finde diese Haltung lächerlich und falsch, weil praktisch jeder Wissenschaftler, den ich kenne, sehr tiefgründig über die Bedeutung und Auswirkungen seiner Forschung nachdenkt. Zweitens denke ich, dass manche Menschen, die die translationale Forschung anpreisen, so tun, als ob wir bereits alles wüssten, was wir für die Heilung menschlicher Krankheiten bräuchten. Ein Blick auf ein beliebiges sequenziertes Genom – ob von Wurm, Fliege, Maus oder Mensch stammend – straft diese Annahme Lügen, denn die meisten der vorhergesagten Gene codieren für Produkte, die als „Proteine mit unbekannter Funktion“ beschrieben werden. Wir haben noch so viel mehr zu lernen. Nicht nur, was diese Proteine tun, sondern auch, wie sie zur Aufrechterhaltung des Lebens und der Fortpflanzung miteinander wechselwirken. Oder wie häufig schon gesagt wurde: Man

muss Material zum Translatieren haben, um translationale Forschung zu betreiben. Und wenn wir erst bedenken, wie wenige Organismen Wissenschaftler bislang studiert haben, werden die Geheimnisse, die uns umgeben, noch viel größer. Was wird der *A. victoria* und *C. elegans* der Zukunft sein? Oder gar: Was wird das GFP der Zukunft sein?

Zweitens würdigt die Königlich-Schwedische Akademie der Wissenschaften mit der Vergabe dieses Preises an O. Shimomura, R. Tsien und mich, dass wissenschaftlicher Fortschritt nicht aus singulären Ereignissen folgt, sondern ein kontinuierlicher Prozess ist. Jeder von uns hat einen Schritt in der sehr umfangreichen Entwicklung des GFP getan, und wir waren nicht allein. Hunderte anderer Forscher haben fluoreszierende Proteine bearbeitet und variiert und dazu beigetragen, ein breites Spektrum von ziemlich spektakulären Forschungswerkzeugen herzustellen. Ich war immer wieder erstaunt über die Raffinesse und Kreativität meiner Kollegen aus allen Teilen der Welt. In gewissem Sinne ist GFP eine herrliche Metapher für unsere Arbeit als Wissenschaftler. Genauso wie GFP und andere fluoreszierende Moleküle Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und es in Licht einer anderen Wellenlänge umwandeln, nehmen auch wir das auf, was wir von anderen über die Welt gelernt haben, fügen unsere eigenen Beobachtungen und Einblicke hinzu und erzeugen einen Zugewinn an menschlichem Wissen.

*Ich widme diesen Vortrag drei Menschen, mit denen ich diese Ehre sehr gerne geteilt hätte, die aber nicht mehr am Leben sind: meiner Großmutter mütterlicherseits, Madeline Friedlen, einer netten, intelligenten und bemerkenswerten Frau, die in der Zeit der großen Depression ihr eigenes Geschäft gründete und die, als ich vielleicht zehn Jahre alt war, wollte, dass ich Chemiker, genauer gesagt Metallurg werden sollte; meiner Mutter, Vivian Chalfie, die stets behauptete, in unserer Familie habe die Intelligenz eine Generation übersprungen, damit aber nicht Recht hatte; und meinem Vater, Eli Chalfie, von dem ich meinen Sinn für Humor und meine Liebe für das Gitarrespiel geerbt habe. Schließlich danke ich allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, auf deren Intelligenz, harte Arbeit und Gefährtschaft ich in all den Jahren stets bauen konnte. Ihr habt mich auf Zack gehalten! Vielen Dank! Die Forschungen in meiner Arbeitsgruppe wurden durch die National Institutes of Health gefördert.*

Eingegangen am 16. April 2009  
Online veröffentlicht am 30. Juni 2009

- [1] „Obituary: José A. Zadunaisky“: F. Bronner, *J. Exp. Zool. Part A* **2006**, *305*, 103.
- [2] „Mutations in the *C. elegans*  $\beta$ -tubulin gene *mec-7*: Effects on microtubule assembly and stability and on tubulin autoregulation“: C. Savage, Y. Xue, S. Mitani, D. Hall, R. Zakhary, M. Chalfie, *J. Cell Sci.* **1994**, *107*, 2165–2175.
- [3] „Extracellular Proteins Needed for *C. elegans* Mechanosensation“: H. Du, G. Gu, C. William, M. Chalfie, *Neuron* **1996**, *16*, 183–194.
- [4] „Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*“: O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239.

- [5] „Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*“: F. H. Johnson, O. Shimomura, Y. Saiga, L. C. Gershman, G. T. Reynolds, J. R. Waters, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *60*, 85–103.
- [6] „Biochemistry of the bioluminescence of colonial hybrids and other coelenterates“: J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 305–312.
- [7] „Energy transfer in a bioluminescent system“: J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313–318.
- [8] „Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein“: C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1212–1218.
- [9] „Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein“: D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, *111*, 229–233.
- [10] „Green fluorescent protein as a marker for gene expression“: M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.
- [11] „Glow Worms—A New Method of Looking at *C. elegans* Gene Expression“: M. Chalfie, Y. Tu, D. C. Prasher, *Worm Breeder's Gazette* **1993**, *13*, 19; [www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00014747;class=Paper](http://www.wormbase.org/db/misc/paper?name=WBPaper00014747;class=Paper).
- [12] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 725.
- [13] „Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis“: S. Wang, T. Hazelrigg, *Nature* **1994**, *369*, 400–403.
- [14] „Identification of genes expressed in *C. elegans* touch receptor neurons“: Y. Zhang, C. Ma, T. Delohery, B. Nasipak, B. C. Foat, A. Bounoutas, H. J. Bussemaker, S. K. Kim, M. Chalfie, *Nature* **2002**, *418*, 331–335.
- [15] „Inhibition of touch cell fate by *egl-44* and *egl-46* in *C. elegans*“: J. Wu, A. Duggan, M. Chalfie, *Genes Develop.* **2001**, *15*, 789–802.
- [16] „The mechanosensory protein MEC-6 is a subunit of the *C. elegans* touch-cell degenerin channel“: D. S. Chelur, G. G. Ernstrom, M. B. Goodman, C. A. Yao, L. Chen, R. O'Hagan, M. Chalfie, *Nature* **2002**, *420*, 669–673.
- [17] „Genes regulating touch cell development in *C. elegans*“: H. Du, M. Chalfie, *Genetics* **2001**, *158*, 197–207.
- [18] A. Bounoutas, M. Nonet, M. Chalfie, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [19] „The MEC-4 DEG/ENaC channel of *C. elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals“: R. O'Hagan, M. Chalfie, M. B. Goodman, *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 43–50.
- [20] „Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons“: M. B. Goodman, D. H. Hall, L. Avery, S. R. Lockery, *Neuron* **1998**, *20*, 763–772.
- [21] „Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein“: I. Ghosh, A. D. Hamilton, L. Regan, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5658–5659.
- [22] „Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins“: S. Zhang, C. Ma, M. Chalfie, *Cell* **2004**, *119*, 137–144.
- [23] A. Bounoutas, C. Ma, L. Emtage, M. Chalfie, unveröffentlichte Ergebnisse.