

## Grün fluoreszierendes Protein

DOI: 10.1002/ange.200901916

# Die Farbpalette der fluoreszierenden Proteine (Nobel-Vortrag)\*\*

Roger Y. Tsien\*

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

## Die Anfänge

Das erste Mal, dass ich mit fluoreszierenden Proteinen (FPs) in Berührung kam, war gegen Ende meiner Zeit in Berkeley. Professor Alexander Glazer, ein Freund und Kollege an der dortigen Fakultät, war der weltweit führende Fachmann für Phycobiliproteine, das sind brillant gefärbte und intensiv fluoreszierende Proteine, die im Photosyntheseapparat von Cyanobakterien und blaugrünen Algen als „lichtsammelnde“ Antennen dienen. Eines Tages, es muss um 1987 gewesen sein, erzählte mir Glazer, seine Arbeitsgruppe habe das Gen eines der Phycobiliproteine geklont. Das Besondere war, dass das aus diesem Gen erzeugte Apoprotein fluoreszierte, wenn es mit seinem Chromophor vereinigt wurde. Der Chromophor war ein niedermolekularer Cofaktor, der unter Bedingungen, bei denen seine Bindung zum Phycobiliprotein gespalten wird, aus getrockneten Cyanobakterien extrahiert werden konnte. Ich fand die Vorstellung aufregend, ein beliebiges Protein *in situ* mit einem Fluoreszenzmarker markieren zu können, indem man es gentechnisch an das Phycobiliprotein fusioniert und dann den Chromophor zugibt, von dem ich hoffte, dass er Membranen durchdringen und in das Innere von Zellen gelangen könnte. Leider fand Glazers Gruppe dann heraus, dass die spontane Reaktion zwischen dem Apoprotein und dem Chromophor das „falsche“ Produkt ergab, dessen Fluoreszenz rotverschoben und fünfmal geringer war als die des nativen Phycobiliproteins.<sup>[1-3]</sup> Ein Enzym der Cyanobakterien war nötig, um den Chromophor korrekt in das Apoprotein einzubinden. Dieses Enzym war ein Heterodimer zweier Genprodukte, sodass also mindestens drei cyanobakterielle Gene in einen anderen Organismus eingeschleust werden mussten – ganz zu schweigen von etwaigen Genprodukten, die zur Synthese des Chromophors nötig waren.<sup>[4]</sup>

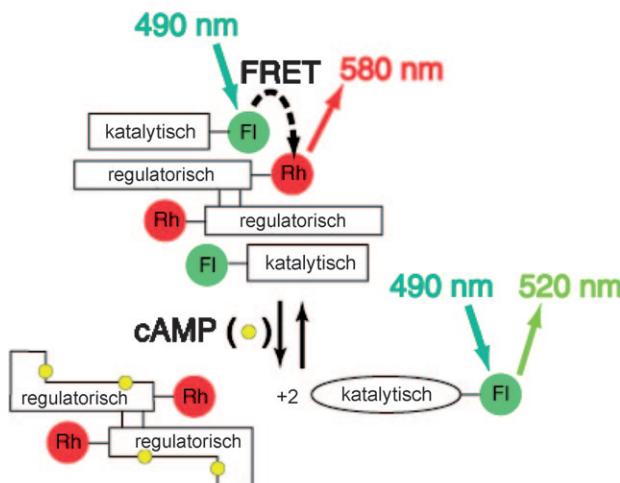
Eines meiner wichtigsten Forschungsprojekte zur damaligen Zeit galt der Fluoreszenzbildgebung des Sekundärbotenstoffs cAMP (cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat). Ziel war es, einen fluoreszierenden Sensor zum Nachweis von cAMP zu erzeugen, der die nötige Affinität und Selektivität für eine Anwendung im Innern von Zellen besitzen musste. Hierfür erschien es mir am geeignetsten, ein natürliches cAMP-bindendes Protein zu „entführen“. Nach reiflicher Abwägung der zahlreichen infrage kommenden Kandidaten, die seinerzeit bekannt waren, wählte ich die cAMP-abhängige Proteinkinase, heute bekannt als PKA. Die

PKA enthält zwei Arten von Untereinheiten: regulatorische und katalytische. In Abwesenheit von cAMP binden die regulatorischen Untereinheiten fest an die katalytischen und inhibieren diese. Sobald cAMP verfügbar wird, bindet es an die regulatorischen Untereinheiten, die sich daraufhin von den katalytischen Untereinheiten lösen, die dann wiederum anfangen, Phosphatgruppen vom Adenosintriphosphat (ATP) auf spezifische Proteine zu übertragen.<sup>[5-7]</sup> Hier trat nun die Frage auf, wie man die Aktivierung der PKA durch cAMP im Innern einer einzelnen lebenden Zelle sichtbar machen könnte. Schon seit meinem Studium faszinierte mich ein bestimmtes biophysikalisches Phänomen, das als resonanter Fluoreszenzenergietransfer (FRET) bezeichnet wird. Bei diesem Vorgang überträgt ein angeregtes Farbstoffmolekül seine Energie auf ein benachbartes Molekül. Ähnlich wie bei einem Fußball- oder Basketballspieler, der den Ball einem Mitspieler zupasst, sinkt dabei die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Übertragung mit größer werdendem Abstand zwischen den Spielern/Molekülen. Wenn wir nun eine Sorte von Farbstoffmolekülen an den regulatorischen Untereinheiten und eine zweite Sorte an den katalytischen Untereinheiten anbringen, so würde in einer intakten PKA ein FRET stattfinden können, weil sich die Untereinheiten in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Sobald das cAMP dann den PKA-Komplex spaltet, wird der FRET unterbrochen und man könnte einen Wechsel der Fluoreszenzfarbe beobachten.

Bevor wir diese Experimente aber in Angriff nehmen konnten, benötigten wir reichlich Vorrat an PKA-Untereinheiten sowie jede Menge Ratschläge, wie diese zu handhaben wären, denn wir hatten nur wenig Erfahrung in Proteinbiochemie. Ich wendete mich an Susan Taylor an der UC San Diego, die über enorme Expertise verfügte und routinemäßig große Mengen an rekombinanten PKA-Untereinheiten herstellte, da sie deren Kristallstruktur lösen wollte (Abbil-

[\*] Prof. R. Y. Tsien  
Howard Hughes Medical Institute and  
Departments of Pharmacology and Chemistry & Biochemistry  
University of California, San Diego  
9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0647 (USA)  
E-Mail: rtsien@ucsd.edu

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



**Abbildung 1.** Die cAMP-induzierte Abspaltung der regulatorischen von den katalytischen Untereinheiten der Proteinkinase A (PKA) kann anhand der Abnahme des FRET von einem Fluorescein- auf einen Rhodaminmarker gemessen werden. Bild: S. Adams, Y. Buechler, S. Taylor.

dung 1).<sup>[8,9]</sup> Sie stellte uns zahlreiche Chargen des Proteins zur Verfügung, das wir dann versuchten, mit Farbstoffen zu markieren. Leider ließen sich die Farbstoffe nicht anbinden, oder sie störten die Untereinheiten in der Weise, dass sie auf cAMP nicht mehr reagierten. Der Wunsch, diese Zusammenarbeit zu vertiefen, war mit ein Grund, weshalb ich 1989 mit meiner Arbeitsgruppe von Berkeley an die UCSD umzog. Nach einem Jahr gemeinsamer Forschung hatten schließlich Dr. Stephen Adams aus meiner Gruppe zusammen mit Ying Ji Buechler und Wolfgang Dostmann aus der Taylor'schen Gruppe ein reproduzierbares Verfahren entwickelt, um Fluorescein-markierte katalytische Untereinheiten mit Rhodamin-markierten regulatorischen Untereinheiten so zu kombinieren, dass ein FRET-Sensor für cAMP vorlag.<sup>[10,11]</sup> In den folgenden Jahren nutzten wir diese Proteinkomplexe, um etliche interessante Aspekte der cAMP-Signalübertragung zu untersuchen.<sup>[12,14]</sup> Zum Beispiel wiesen wir in Zusammenarbeit mit Eric Kandel und Mitarbeitern die Existenz räumlicher Gradienten in Lernprozessen unterzogenen Nervenzellen der Meeresschnecke *Aplysia californica* als Modell der synaptischen Plastizität nach.<sup>[15]</sup>

Obwohl der cAMP-Sensor einigermaßen erfolgreich war, erwies es sich aus experimentellen Gründen als sehr schwierig, den allgemeinen Ansatz auf andere Proteine zu übertragen.



Roger Tsien, geboren 1952 in New York, studierte Chemie und Physik an der Harvard University (BSc 1972) und promovierte 1977 bei R. Adrian an der University of Cambridge. 1981 wurde er Assistentenprofessor an der University of California in Berkeley. Seit 1989 ist er Professor für Pharmakologie, Chemie und Biochemie in San Diego und Forscher am Howard Hughes Medical Institute. Sein derzeitiger Forschungsschwerpunkt ist die Bildgebung und die Behandlung von Krebstumoren.

gen. Die Methode erforderte 1) ein hohes Expressionsniveau der Proteine oder Proteinuntereinheiten sowie deren sehr sorgfältige Aufreinigung, 2) die kontrollierte Anbindung zweier unterschiedlicher Farbstoffe an spezifische Domänen oder Untereinheiten in vitro, ohne dabei die Funktion des Proteins zu stören, 3) die erneute Aufreinigung des so erhaltenen Komplexes und 4) die Rückinjektion in lebende Zellen, die überdies hinreichend groß und robust sein mussten, um eine Glaskapillare einstechen zu können. Zudem brauchte es einen geduldigen und geschickten Experimentator – und das war ich ganz und gar nicht. Diese Hindernisse wären zu umgehen gewesen, wenn wir Gene besessen hätten, die für zwei fluoreszierende Proteine mit passender Farbe codieren würden. Diese Gene hätten wir dann mit den Genen der interessierenden Proteine fusionieren können. Methoden, um die Fusionsgene in die zu untersuchenden Zellen zu bringen, standen damals schon zur Verfügung. Gene lassen sich generell einfacher in Zellen einschleusen (Transfektion) als Proteine, weil jede Zelle nur eine (oder einige wenige) DNA-Kopien benötigt (dagegen Milliarden von Proteinmolekülen). Außerdem hat die Zelle nach einer Transfektion genügend Zeit, um etwaige Membranschädigungen zu reparieren, und es besteht die Möglichkeit, nur diejenigen Zellen fortzupflanzen, die die DNA erfolgreich assimiliert haben. Einmal in die Zelle gelangt, sollten diese Gene in situ die gewünschten Proteinkonstrukte erzeugen, die fluoreszieren und dabei ihre native biologische Funktion behalten.

Da ich wusste, dass Glazers Gruppe nach wie vor Schwierigkeiten mit ihren Phycobiliproteinen hatte, begann ich nach einfacheren fluoreszierenden Proteinen zu suchen. Ich erinnerte mich, dass bestimmte Quallen (Abbildung 2) ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) enthielten, das normalerweise als störende Verunreinigung von Aequorin,



**Abbildung 2.** Die Qualle *Aequorea victoria* (oder *Aequorea aequorea*), aus der Aequorin und das grün fluoreszierende Protein isoliert wurden. Bild: Dr. Claudia E. Mills, Friday Harbor Laboratories.

einem zur Messung von intrazellulären Calciumsignalen eingesetzten Quallenprotein, abgetrennt werden musste.<sup>[16]</sup> Eines Tages im April oder Mai 1992 suchte ich in der Medline-Datenbank, auf die man an der UCSD seit kurzem zu griff hatte, nach „green fluorescent protein“. Zu meinem Erstaunen fand sich ein Treffer auf ein gerade erschienenes Paper von Douglas Prasher und Mitarbeitern am ozeanographischen Institut in Woods Hole (Abbildung 3),<sup>[17]</sup> das die

Gene, 111 (1992) 229–233  
© 1992 Elsevier Science Publishers B.V. All rights reserved. 0378-1119/92/\$05.00

GENE 06296

**Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein**

(Bioluminescence; Cnidaria; equorin; energy transfer; chromophore; cloning)

Douglas C. Prasher<sup>a</sup>, Virginia K. Eckenrode<sup>a</sup>, William W. Ward<sup>a</sup>, Frank G. Prendergast<sup>a</sup> and Milton J. Cormier<sup>b</sup>  
SUMMARY

Many cnidarians utilize green-fluorescent proteins (GFPs) as energy-transfer acceptors in bioluminescence. GFPs fluoresce in vivo upon receiving energy from either a luciferase-oxy luciferin excited-state complex or a  $\text{Ca}^{2+}$ -activated photoprotein. These highly fluorescent proteins are unique due to the chemical nature of their chromophore, which is comprised of modified amino acid (aa) residues within the polypeptide. This report describes the cloning and sequencing of both cDNA and genomic clones of GFP from the cnidarian, *Aequorea victoria*. The *gfp* 10 cDNA encodes a 238-aa-residue polypeptide with a calculated  $M_r$  of 26888. Comparison of *A. victoria* GFP genomic clones shows three different restriction enzyme patterns which suggests that at least three different genes are present in the *A. victoria* population at Friday Harbor, Washington. The *gfp* gene encoded by the AGFP2 genomic clone is comprised of at least three exons spread over 2.6 kb. The nucleotide sequences of the cDNA and the gene will aid in the elucidation of structure-function relationships in this unique class of proteins.

Correspondence to: Dr. D.C. Prasher, Redfield Bldg., Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA 02543 (U.S.A.)  
Tel. (508)457-2000, ext. 2311; Fax (508)457-2195.  
D.C.P.

Supported in part by a Mellon Award from the Woods Hole Oceanographic Institution (27/50.44) and a grant from the American Cancer Society (NP640) to D.C.P.

**Abbildung 3.** Titel, Abstract und Danksagung des Papers von Prasher et al., das die Klonierung des für das grün fluoreszierende Protein codierenden Gens und die Struktur des GFP-Chromophors beschreibt.<sup>[17]</sup>

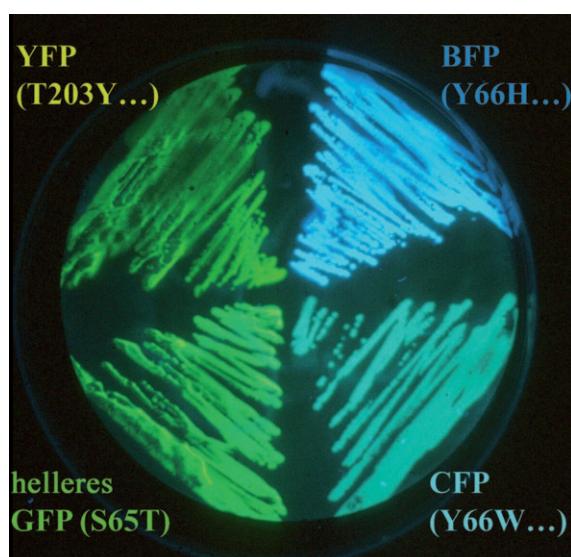
Klonierung des GFP-Gens beschrieb und postulierte, dass der Chromophor kein externer Cofaktor, sondern ein integraler Bestandteil des Proteins war. Ich rief Prasher im Mai 1992 an und war überrascht zu hören, dass er nicht beabsichtigte, weiter an GFP zu arbeiten. In ersten Studien hatte er zunächst ein verkürztes Gen kloniert (etwa 70 % des vollständigen Gens) und versucht, es in Bakterien zu exprimieren – es erschien aber keine Fluoreszenz. Da Prasher keine Fördermittel mehr für sein Projekt erhielt und ohnehin eine andere Forschungsrichtung einschlagen wollte, hatte er keine Einwände, dass wir das Projekt weiterverfolgten. Wir mussten ihm nur versprechen, ihn im Erfolgsfall als Coautor zu anzugeben. Ich stimmte dieser sehr verständlichen Bitte zu, und er versprach uns, eine Probe der GFP-codierenden DNA und einiges an gefrorenem Quallengewebe zu schicken, in dem wir nach den Enzymen suchen sollten, von denen wir beide befürchteten, dass sie für die Synthese des GFP-Chromophors benötigt würden. Allerdings war ich zu dem Zeitpunkt noch nicht genügend vorbereitet, um die Proben in Empfang zu nehmen, denn niemand in meiner Gruppe hatte Erfahrung in molekularer Genetik. Stephen Adams hatte aus der Kolaboration mit Susan Taylor viel über Proteinbiochemie gelernt, die Erarbeitung der molekularbiologischen Grundlagen hatte man dort aber längst hinter sich liegen, als wir in die Zusammenarbeit einstiegen.<sup>[8,9]</sup> So blieb mir nichts anderes übrig, als zu warten, bis sich jemand mit Erfahrung in molekularer Genetik meiner Gruppe anschließen würde. Diese Person war Roger Heim, der gerade in der Schweiz über  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen promoviert hatte.<sup>[18,19]</sup> Heim kam Ende September 1992 mit starken Empfehlungen seines Doktorvaters

Professor Ernesto Carafoli an die UCSD. In seiner Arbeitsgruppe gab es den Spruch, dass wenn Heim ein Experiment nicht in Gang bringen könnte, es auch kein anderer schaffen würde. Ironischerweise wollte Heim von der Molekülbiologie weg und bewarb sich deshalb auf ein Postdoktorat in meiner Gruppe, um etwas über die Bildgebung von  $\text{Ca}^{2+}$  zu lernen. Er akzeptierte aber meinen Vorschlag, sich stattdessen mit Prashers GFP-Gen zu beschäftigen. Er sollte sehen, ob er etwas Nützliches damit anfangen könnte.

## Erste Experimente

Ich kontaktierte Prasher Anfang Oktober 1992 erneut und erzählte ihm, dass wir mit Heims Eintritt in die Arbeitsgruppe nun bereit waren, mit seinen Proben zu arbeiten. Prasher sagte mir, dass in den Monaten seit meinem ersten Anruf Martin Chalfie von der Columbia University ebenfalls nach dem Gen gefragt und dieses von ihm bereits bekommen hatte. Ich traf Chalfie kurze Zeit später bei einer Tagung der Society for Neuroscience und erfuhr von ihm, dass das Gen Bakterien (*E. coli*) fluoreszieren ließ, was tatsächlich bedeutete, dass keine anderen Bestandteile aus der Qualle nötig waren. Heim konzentrierte seine Bemühungen deshalb darauf, GFP in Hefe (*S. cerevisiae*) zu exprimieren. Dieses System wählten wir zum einen, um Chalfies Arbeiten nicht unnötig zu duplizieren, und zum anderen, weil wir uns Ausrüstung und Reagenzien von Scott Emrs Gruppe an der UCSD geborgt hatten, der ein überragender Molekül- und Zellbiologe war und sich auf Hefe spezialisiert hatte. Dank Chalfies Ratschlag, nur die proteincodierende Region der cDNA zu amplifizieren und also die flankierenden strangaufwärts und strangabwärts gelegenen Abschnitte zu verwerfen, gelang es Heim, einige Hefezellen zum Fluoreszieren zu bringen, wenngleich enorme Schwankungen in der Helligkeit auftraten. Wir zeigten Emr die Zellen unter dem Mikroskop und wollten wissen, ob sie seiner Meinung nach dazutaugen könnten, irgendein biologisches Problem zu lösen. Emr war tatsächlich begeistert von den Ergebnissen und meinte, man könne mithilfe des GFP die Bewegung von Frachtproteinen durch das sekretorische System der Hefe verfolgen. Einer von Emrs Postdocs stellte Fusionate aus GFP mit einem sekretierten Protein und einem lysosomalen Protein in der Hefe her. Leider waren die Fluoreszenzsignale sehr schwach und schwankten enorm von Zelle zu Zelle. Dies bestätigte, dass Wildtyp-GFP nicht genügend zuverlässig war, sodass Emr das GFP-Projekt vorerst zurückstellte.

Meine ursprüngliche Hoffnung in Bezug auf fluoreszierende Proteine war, die beiden PKA-Untereinheiten mit unterschiedlichen Farbstoffen zu versehen. Offensichtlich benötigten wir also einen zweiten Farbstoff. Der Chromophor des GFP enthielt ein Tyrosin an der Position 66, und ich bat Heim daher, diese Aminosäure zu Tryptophan zu mutagieren, einer ebenfalls absorptions- und fluoreszenzfähigen Aminosäure. Das mutagierte GFP zeigte praktisch keinerlei Fluoreszenz. Nachdem meine Idee also gescheitert war, nahm Heim eine statistische Mutation des GFP vor. Tatsächlich fand er bald eine blau fluoreszierende Mutante (Abbildung 4, oben rechts), die laut Sequenzierung überraschend



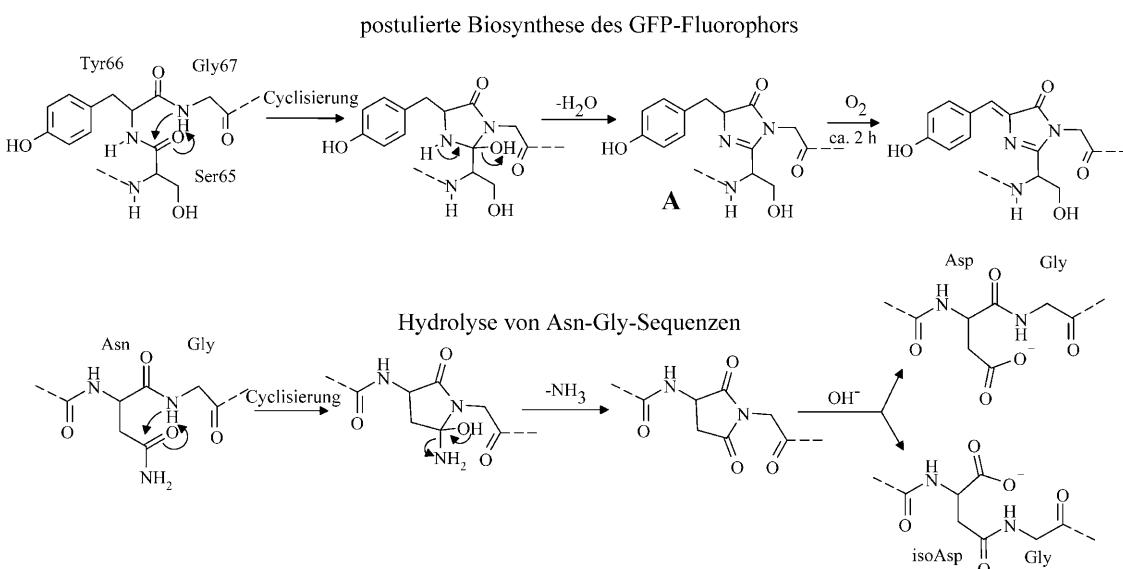
**Abbildung 4.** Fluoreszierende *E.-coli*-Bakterien, die (im Uhrzeigersinn von oben rechts) blau, cyan, grün und gelb fluoreszierende Proteine exprimieren. Die Mutationen, die für die spektralen Änderungen in erster Linie maßgeblich sind, sind angegeben.<sup>[23]</sup>

schenderweise ein Histidin an der Position 66 aufwies.<sup>[20]</sup> Später entdeckten wir, dass Tryptophan ein noch nützlicheres und zudem bleichresistenteres cyan fluoreszierendes Protein (CFP) ergibt, allerdings nur, wenn durch zusätzliche Mutationen ausreichend Platz im Protein geschaffen wurde, um das sperrige Tryptophan aufnehmen zu können (Abbildung 4, unten rechts). Auch die Histidinmutation in Position 66 profitiert von einem spezifischen Satz kompensatorischer Mutationen im Protein.<sup>[21]</sup>

Noch verstanden wir nicht, wie die spontane Bildung des Chromophors (technisch gesprochen ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidinon) aus Serin 65, Tyrosin 66 und Glycin 67

vonstatten ging.<sup>[17,22]</sup> Es schien keine biochemische Präzedenz für eine solche posttranskriptionale Modifikation zu geben, die nicht nur einen heterocyclischen Ring lieferte, sondern auch die  $\alpha,\beta$ -Einfachbindung des Tyrosins zu einer Doppelbindung dehydrierte. Dehydrierungen setzen entweder Wasserstoffgas ( $H_2$ ) frei, was ich in diesem Fall für äußerst unwahrscheinlich hielt, oder erfordern ein Oxidationsmittel, um die beiden Wasserstoffatome aufzunehmen. Das einzige Oxidationsmittel, das wir in der Zelle direkt kontrollieren konnten, war atmosphärischer Sauerstoff ( $O_2$ ). Heim züchtete GFP-exprimierende Bakterien unter strikt anaeroben Bedingungen und fand, dass das Protein gebildet wurde, aber nicht fluoreszierte. Brachte man das Protein an die Luft, fluoreszierte es grün über mehrere Stunden.<sup>[20]</sup> Unser Glück war also, dass das erforderliche Oxidationsmittel,  $O_2$ , in allen Organismen außer eben in anaeroben Spezies verfügbar ist, dass es andererseits aber auch leicht eliminiert werden kann, sodass sich seine notwendige Rolle gut aufzeigen lässt. Mit dieser Entdeckung waren wir in der Lage, einen plausiblen Mechanismus für die Bildung des Chromophors vorzuschlagen (Abbildung 5). Eine wichtige Folge des Mechanismus ist, dass zwei Wasserstoffatome mit  $O_2$  ein potenziell toxisches Bei- produkt bilden, nämlich  $H_2O_2$  (Wasserstoffperoxid). Darauf kam ich, weil ich es noch von der High School her gewohnt war, dass chemische Gleichungen stets ausgeglichen sein mussten. Überraschend wenige Forscher erkannten diesen simplen Befund – vielleicht auch deshalb, weil die Bedeutung detaillierter Massenbilanzen in universitären Chemiekursen meist nicht genügend betont wird. Diese vorhergesagte Bildung von einem Molekül  $H_2O_2$  pro Molekül GFP wurde später experimentell bestätigt.<sup>[23]</sup>

Bevor wir den FRET von der blauen Mutante (BFP) zum GFP zur Messung von Konformationsänderungen im Protein oder von Protein-Protein-Wechselwirkungen anwenden konnten, mussten wir erst noch ein anderes großes Problem lösen. Idealerweise sollte sich das GFP ausschließlich durch



**Abbildung 5.** Ursprünglicher Vorschlag für den Bildungsmechanismus des GFP-Chromophors.<sup>[75]</sup> Die anfängliche Cyclisierung ist analog zur bekannten Cyclisierungstendenz von Asn-Gly-Sequenzen.<sup>[76]</sup> Man beachte, dass pro Molekül GFP ein Molekül  $H_2O_2$  erzeugt wird. In neueren Studien wurde vorgeschlagen, dass die Oxidation der Dehydratisierung vorangeht.<sup>[23]</sup>

die blaue, vom BFP emittierte Wellenlänge anregen lassen. Die selektive Anregung des BFP durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht würde dann entweder zu einer blauen Emission ohne FRET oder zu einem Energietransfer zum GFP, das dann grün leuchtet, führen. Das ursprüngliche GFP wurde nun allerdings durch das UV-Licht stärker angeregt als durch das blaue Licht des BFP, was bedeutete, dass GFP ein schlechterer FRET-Akzeptor gegenüber BFP war. Die Frage war, weshalb GFP zwei Anregungsbanden zeigte, eine intensive im UV-Bereich und eine schwache im blauen Bereich. Meine Hypothese war, dass die intensive UV-Bande auf den eigentlichen Chromophor zurückzuführen war, wie es schon Shimomura<sup>[24]</sup> und Prasher<sup>[17,22]</sup> postuliert hatten, während ich die schwächere blaue Bande einem kleinen Teil an Chromophoren zuschrieb, deren Serin 65 durch Dehydratisierung in ein Dehydroalanin umgewandelt worden war. Eine solche Dehydratisierung würde eine zusätzliche Doppelbindung erzeugen, die mit dem Rest des Chromophors konjugiert ist und vielleicht eine Verschiebung zu höheren Wellenlängen erklären konnte. Um diese Hypothese zu prüfen, mutagierte Heim das Serin 65 zu Alanin oder Cystein, von denen ich annahm, dass sie die Bildung einer zusätzlichen Doppelbindung verhindern bzw. fördern und damit die blaue Bande ausschalten oder verstärken würden. Erneut lag ich falsch: Beide Mutationen schalteten die UV-Bande aus und verstärkten die gewünschte blaue Bande. Heim versuchte dann, Serin 65 durch Threonin zu ersetzen. Obwohl Threonin von allen Aminosäuren die größte Ähnlichkeit mit Serin hat – beide unterscheiden sich nur um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe –, verschwand die unerwünschte UV-Bande komplett, während die blaue Bande fast sechsmal intensiver wurde und sich außerdem um etwa 10 nm nach höheren Wellenlängen verschob (Abbildung 6).<sup>[25]</sup> Wir schlugen deshalb diese Mutante S65T

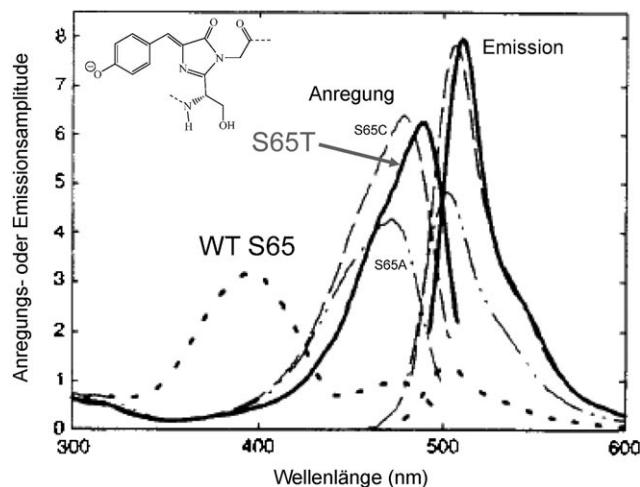


Abbildung 6. Anregungs- und Emissionspektren von Wildtyp(WT)-GFP und mehreren Mutanten von Ser 65.<sup>[25]</sup> Der Einschub zeigt die Struktur des Wildtyp-Chromophors.

als eine allgemeine Verbesserung des Wildtyp-GFP vor (Abbildung 4, unten links). S65T zeigte deutlich erhöhte Fluoreszenzeigenschaften in Hefe<sup>[26]</sup> und schien durchaus geeignet, Emrs Problemstellung angehen zu können. Um prinzipiell zu zeigen,<sup>[21]</sup> dass ein FRET zwischen GFP-Mutanten biochemische Signale anzeigen kann, erzeugte Heim ein Fusionat aus BFP und dem S65T-GFP, indem er diese über einen z. B. durch Trypsin proteolysierbaren Peptidlinker verband. Ohne das Enzym war im chimären Protein ein FRET wirksam, der dann nach der Spaltung des Linkers erwartungsgemäß verschwand (Abbildung 7A). Glücklicher-

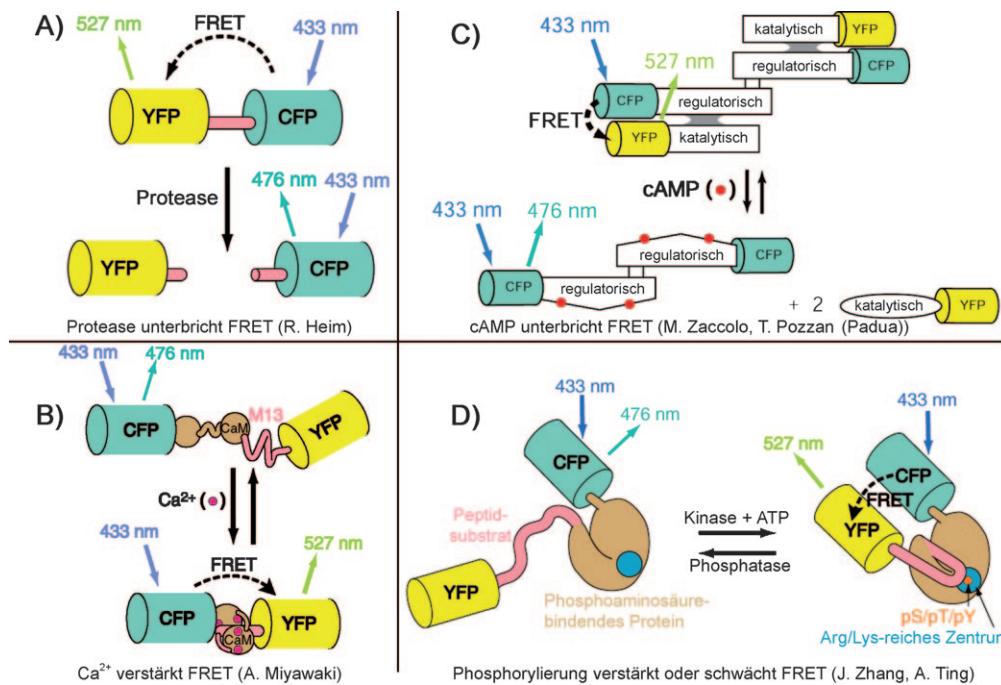
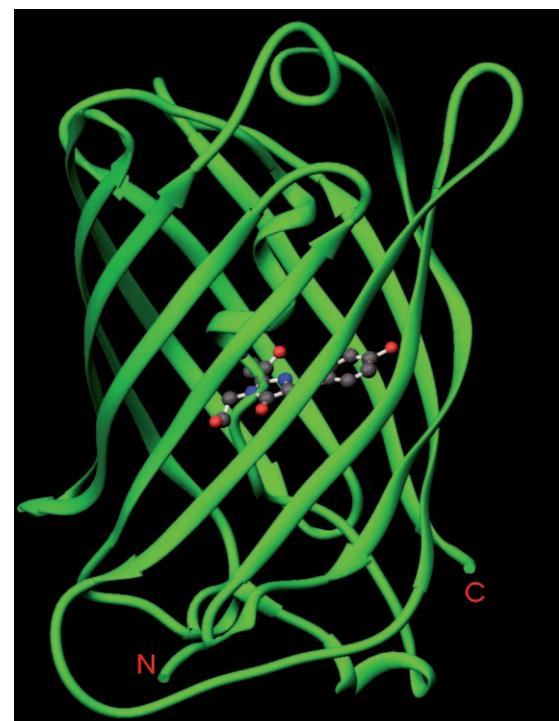


Abbildung 7. Beispiele genetisch codierter Fluoreszenzindikatoren auf Basis eines FRET vom CFP zum YFP. Registriert wird: A) Proteaseaktivität, B) Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen, C) cAMP-Konzentrationen, D) das Gleichgewicht zwischen Proteinkinaseaktivität und Phosphataseaktivität.

weise waren die FPs selber gegenüber Protease verhältnismäßig resistent. Andere GFP-Mutanten mit ähnlichen spektralen Eigenschaften wie S65T und ihre Anwendung als FRET-Akzeptoren mit BFP wurden in unabhängigen Studien durch Youvan und Mitarbeiter entwickelt.<sup>[27,28]</sup>

In einem randomisierten Screening auf optimale Mutationen der Aminosäuren 55 bis 74 bestätigten Cormack et al.<sup>[29]</sup> die Bedeutung der S65T-Variante. Aus diesen Experimenten ging außerdem eine weitere Mutation hervor, F64L, die eine Faltung bei höheren Temperaturen erlaubt. Die resultierende Doppelmutante, „verstärktes GFP“ (enhanced GFP), wurde durch die Firma Clontech offensiv vermarktet und entwickelte sich zum Standard-GFP für die meisten späteren Anwendungen – oft auch ohne explizite Angabe der beiden Mutationen. Mit Verbesserungen wie diesen revanchierten wir uns bei Emr für seine Hilfe, denn sein Arbeitskreis konnte die nun verfügbaren intensiveren GFPs für zahlreiche Studien der Proteinsortierung in den sekretorischen und endozytischen Systemen der Hefe nutzen.

Die oben beschriebenen Verbesserungen wurde allesamt ohne nähere Kenntnisse der dreidimensionalen Proteinstrukturen erzielt. Letztere würden die gezielte Entwicklung weiterer Varianten natürlich enorm erleichtern. Mein Arbeitskreis hatte keine Erfahrung mit Röntgenkristallographie und zaghafte Anfragen bei Strukturbiologen vor Ort verließen im Sande. GFP war schon vor den Klonierungsstudien gut kristallisiert worden,<sup>[30]</sup> und ich hatte gehört, dass auch etliche andere Gruppen versuchten, die Struktur des Wildtyp-Proteins zu lösen. Jim Remington an der Universität von Oregon sandte mir im Mai 1995 eine E-Mail, in der er um einen Expressionsvektor für GFP bat. Ich empfahl ihm, die S65T-Struktur zu lösen, weil er die Ergebnisse auch dann noch publizieren könnte, wenn ihm eine andere Gruppe mit der Wildtyp-Struktur zuvorkäme. Innerhalb weniger Monate hatte Dr. Mats Ormø aus Remingtons Gruppe die Kristallstruktur gelöst (Abbildung 8), wobei er eine Substitution mit Selenomethionin zur Phasierung einsetzte. Das Protein war ein fast perfekter Zylinder von 2.4 nm Durchmesser und 4.2 nm Höhe, bestehend aus elf  $\beta$ -Strängen, die eine Helix einfassen, in die der Chromophor eingeschoben ist. Der Chromophor war tief im Protein verborgen, was klar aufzeigte, wie er vom Lösungsmittel abgeschirmt und so fixiert sein konnte, dass er fluoreszierte (sobald das Protein denaturiert wird, erlischt die Fluoreszenz des nun exponierten Chromophors vollständig). Wir konnten nun auch erklären, warum der Chromophor spontan gebildet werden musste, da kein Enzym durch die Schale des Proteins gelangen konnte. Remington bemerkte eine Kavität neben dem Chromophor und vermutete, dass diese einen aromatischen Ring in Form einer  $\pi$ -Stapelung aufnehmen könnte, was in einer Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge resultieren würde. Um diesen Ring einzuführen, ersetzte Andrew Cubitt, ein neuer Postdoc in meiner Gruppe, Thr 203 durch verschiedene aromatische Aminosäuren. Tatsächlich verschoben sich Anregungs- und Emissionsmaximum um etwa 20 nm nach höheren Wellenlängen. Das erhaltene Protein fluoreszierte merklich gelber und erhielt die Bezeichnung YFP (Abbildung 4, oben links). Diese Verschiebungen machten YFP zu einem guten FRET-Akzeptor mit CFP. Wir waren froh, unsere BFP/GFP-



**Abbildung 8.** Röntgenkristallstruktur der S65T-Mutante von GFP.<sup>[31]</sup>  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind als Bänder, Verbindungssegmente als Röhren und der Chromophor als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Die C- und N-Termini sind gekennzeichnet.

Kombination durch das CFP/YFP-Paar ersetzen zu können, weil BFP allzu leicht ausbleicht und eine potenziell schädigende UV-Anregung erforderte.

Wir waren der Meinung, dass diese neue Kristallstruktur eine erstrangige Veröffentlichung verdiente, weil sie so viele Eigenschaften des GFP erklärte und unmittelbar gezielte Verbesserungen ermöglichen würde, sodass wir die Arbeit bei *Science* einreichten. Die Gutachter waren jedoch nicht beeindruckt. Einer gestand uns zu, dass wir die Struktur kompetent bestimmt hatten, war aber nicht davon überzeugt, dass GFP von genügender Wichtigkeit war. Der andere Gutachter äußerte sich enttäuscht, dass unser Paper die wirklich wichtige Frage zum GFP, nämlich was dessen native biologische Funktion in der Qualle sei, nicht beantworten konnte. Wir hielten es für unangemessen, dass eine Kristallstruktur eine ökologische Frage klären sollte, und ich legte deshalb Einspruch gegen die Entscheidung des Redakteurs ein, der das Manuskript darauf einem dritten Gutachter vorlegte. Viele Wochen verstrichen ohne Antwort. Dann vermeldete eine der Gruppen, die an der Struktur des Wildtyp-GFP arbeiteten, in einer Internet-Newsgroup, dass sie die Struktur gelöst hatten und die Ergebnisse in Kürze in *Nature Biotechnology* erscheinen würden. Ich leitete diese Ankündigung an *Science* weiter, die unser Paper Tags darauf ohne das lange erwartete dritte Gutachten annahmen. Glücklicherweise erschienen die beiden Paper<sup>[31,32]</sup> fast zeitgleich (binnen einer Woche) und waren über die wichtigsten Struktureigenschaften in Einklang – mit der Ausnahme, dass das Wildtyp-GFP in Yangs und Phillips' Kristallen als Dimer vorlag, während das S65T-GFP in Ormös und Remingtons Kristallen, die unter anderen Be-

dingungen gezüchtet wurden, ein Monomer war. Aus diesen Strukturen sowie einer detaillierteren Studie von Brejc et al.<sup>[33]</sup> ging klar hervor, dass die ultravioletten und blauen Anregungsbanden des Wildtyp-GFP von der neutralen bzw. anionischen Form des Chromophors stammten und dass die Mutation von Serin65 zum Threonin die Hydroxygruppe in der Seitenkette so umorientierte, dass das Wasserstoffbrückennetzwerk, das die Ionisation des Chromophors bestimmt, verändert wird.

### Direkte Beobachtung von biochemischen Vorgängen in der Zelle

Unsere ersten Versuche, den FRET-Effekt zur direkten Messung intrazellulärer Signale zu nutzen, wurden durch Atsushi Miyawaki ausgeführt, der aus Tokio in meine Arbeitsgruppe gekommen war. In Japan hatte sich Atsushi mit der Klonierung und Charakterisierung des InsP<sub>3</sub>-Rezeptors befasst (InsP<sub>3</sub> = Inositol-1,4,5-trisphosphat).<sup>[34,35]</sup> Dieser Sekundärabotenstoff ist an der Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum beteiligt, und ich wollte unbedingt eine Möglichkeit finden, ihn zu visualisieren. Wir hofften dies dadurch zu erreichen, dass wir Donor- und Akzeptor-FPs an entgegengesetzten Enden der cytosolischen Domäne des InsP<sub>3</sub>-Rezeptors anbrachten, von dem wir annahmen, dass er bei der Bindung von InsP<sub>3</sub> einen Konformationswechsel eingeht. Allerdings reagierte keines von Miyawakis Konstrukten mit einer nennenswerten Änderung des FRET zum InsP<sub>3</sub>, und wir mussten erkennen, dass wir nicht einmal richtig wussten, wo InsP<sub>3</sub> im Rezeptor bindet. Mit der unschätzbar hilfreichen Hilfe von Dr. Mitsuiko Ikura in Toronto begann Miyawaki, an einem genetisch erzeugten Rezeptor bekannter Struktur<sup>[36]</sup> – einem Fusionat aus Calmodulin (CaM) mit dessen Zielpeptid M13 aus der smMLCK (skeletal muscle myosin light chain kinase) – zu üben. CaM und M13 sind in Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> relativ strukturlos; sobald aber die Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> steigt, bindet Ca<sup>2+</sup> an CaM, das sich daraufhin um M13 faltet (Abbildung 7B). Meine Begeisterung für das Projekt hielt sich anfangs in Grenzen, da ich mich früher schon mit organischen synthetischen Indikatoren für Ca<sup>2+</sup> beschäftigt hatte und der Meinung war, dass es nicht noch mehr Ca<sup>2+</sup>-Indikatoren bräuchte. Zumindest ließ sich aber einräumen, dass dieser Exkurs eine gute „Generalprobe“ wäre, und so konjugierte Miyawaki BFP (später durch CFP ersetzt) an den N-Terminus von CaM und S65T-GFP (später durch YFP ersetzt) an den C-Terminus von M13. Das vierteilige Fusionat (siehe Abbildung 7B) sprach auf die Erhöhung des Ca<sup>2+</sup>-Gehalts tatsächlich mit einem FRET-Anstieg an. Miyawaki gab diesen chimären Proteinen den Namen „Camäleons“. Das fehlende „h“ war beabsichtigt und sollte die sprachliche Herkunft vom CaM andeuten, während der Name an sich natürlich auf den Farbwechsel in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup> anspielt, sowie auch auf die Möglichkeit, das Ansprechverhalten des Proteins durch scheinbar geringfügige Mutationen beeinflussen zu können.<sup>[37,38]</sup> Die Tatsache, dass die Camäleons genetisch codierbar waren, brachte weitere große Vorteile mit sich: 1) Die Proteine können in jeder Zelle (oder jedem Or-

ganismus) erzeugt werden, in die sich die DNA einschleusen lässt; 2) die Produktion des Indikators kann über lange Zeiträume kontinuierlich aufrechterhalten werden; 3) spezifische Zelltypen innerhalb eines komplexen Gewebeverbundes werden präzise erkannt und angesteuert; 4) subzelluläre Strukturen werden ebenfalls präzise angesteuert; 5) es besteht die Möglichkeit, Verbesserungen mithilfe gezielter oder zufälliger Mutationen vorzunehmen. Aus den genannten Gründen wurden Camäleons zu den verbreitetsten Werkzeugen für die Bildgebung der Neuronenaktivität in intakten Nervensystemen. Eine spektakuläre Demonstration für die Bildgebung dynamischer Ca<sup>2+</sup>-Signale mithilfe eines verbesserten Camäleons ist der kurzzeitige Ca<sup>2+</sup>-Anstieg in den Zellteilungsspalten während der frühen Entwicklungsphase eines Zebrafischembryos (Abbildung 9).

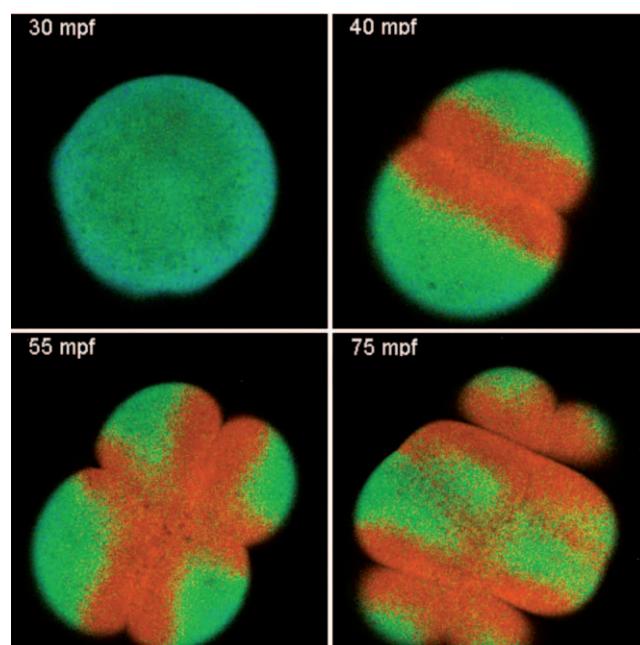
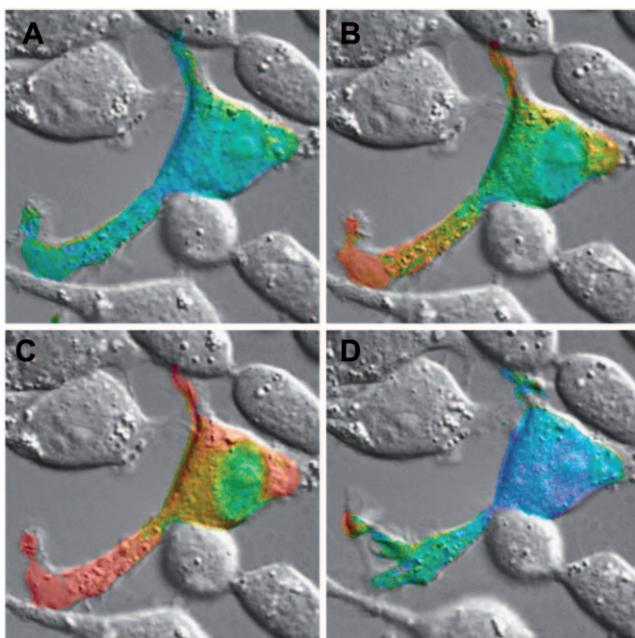


Abbildung 9. Transgener Zebrafischembryo, der das gelbe Camäleon 2.60 exprimiert.<sup>[77]</sup> Die Aufnahmen wurden in der konfokalen z-Ebene erstellt (mpf = Minuten nach der Befruchtung). Der Videofilm, aus dem die Standbilder stammen, wurde freundlicherweise von Hide Mizuno und Atsushi Miyawaki, RIKEN, Japan, zur Verfügung gestellt.

Wie verhielt es sich nun mit der Markierung der PKA, dem eigentlichen Ausgangspunkt des GFP-Projekts? Die PKA funktionierte im Endeffekt genauso gut (Abbildung 7C), wobei die Arbeiten vor allem von Manuela Zaccolo aus Tullio Pozzans Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Charles Cho aus meiner Gruppe durchgeführt wurden.<sup>[39]</sup> Pikanterweise stellte sich die PKA als eines der schwieriger zu markierenden Proteine heraus, und es waren ungewöhnlich viele Versuche notwendig, um geeignete Linker zu finden, die die Anknüpfung der FPs ermöglichen, ohne das Ansprechverhalten der Untereinheiten auf cAMP zu stören. Mit dem letztlich funktionierenden System gelang es Zaccolo und Pozzan, die lange vermutete subzelluläre Kompartimentalisierung von cAMP in Herzmuskelzellen nach Stimulation mit einem Adrenalinanalogon direkt abzubilden.<sup>[40]</sup>

Wir und andere entwickelten einen allgemeineren Ansatz für die Bildgebung der Dynamik von Proteinkinasen, und zwar sowohl der Serin und Threonin phosphorylierenden Kinasen<sup>[41-46]</sup> wie auch der Tyrosin phosphorylierenden Kinasen.<sup>[47-49]</sup> Das Prinzip (Abbildung 7D) bestand darin, M13 durch ein Peptidsubstrat (rosa) für die interessierende Kinase und CaM durch eine Proteindomäne (braun), die phosphoryliertes Ser, Thr oder Tyr bindet, zu ersetzen. Beispiele für solche Domänen sind 14-3-3 (für pSer oder pThr), FHA1 (für pThr) und SH2 (für pTyr). Nachdem die Kinase das Serin, Threonin oder Tyrosin phosphoryliert hat, wird diese Aminosäure durch die Phosphoaminoäure-bindende Domäne intramolekular komplexiert, wodurch sich der Abstand oder die Orientierung zwischen den Donor- und Akzeptor-FPs ändert. Ein Beispiel für die dynamische Bildgebung der Kinaseaktivität ist in Abbildung 10 gezeigt.



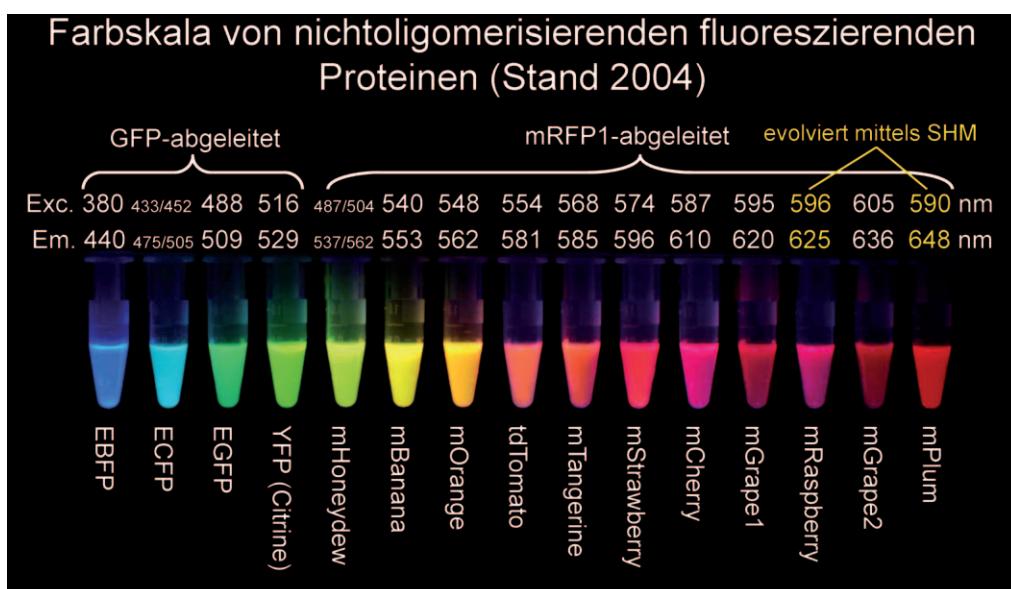
**Abbildung 10.** Ein mit einem Indikator<sup>[47]</sup> für die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors (EGF = Hautwachstumsfaktor) transfizierter Fibroblast. Die Höhe des FRET, die die Phosphorylierung des Indikators quantifiziert, ist in Pseudofarbdarstellung von Blau (vernachlässigbare Phosphorylierung) nach Rot (maximale Phosphorylierung) dargestellt. Die Farbdarstellung ist mit Interferenzkontrastbildern überlagert, die die Zellmorphologie zeigen. Die gefärbte Zelle war die einzige, die in diesem Bildfeld transfiziert wurde. Im Ruhezustand zeigt der Indikator eine vernachlässigbare Phosphorylierung (A). Nach Stimulation mit EGF beginnt die Phosphorylierung (zu erkennen an den wärmeren Farbtönen) an der Zellperipherie (b) und breitet sich dann Richtung Zellkern aus (C). Nach Entfernen des EGF zieht sich die Phosphorylierungszone zurück und verbleibt lediglich noch an einem Ausläufer der Zelle (D).

Der letzte wichtige Schritt in der FP-Entwicklung kam mit der Entdeckung, dass FPs nicht nur als Hilfsproteine in biolumineszenten Nesseltieren vorkommen, sondern auch für viele Farben nichtbiolumineszenter Korallen verantwortlich sind. In einer bahnbrechenden Studie isolierten Matz et al. ein für ein rot fluoreszierendes Protein (DsRed) codierendes



**Abbildung 11.** Nachgebildete Struktur des rot fluoreszierenden DsRed-Chromophors<sup>[52]</sup> mithilfe von Bakterien (*E. coli*), die das Protein exprimieren. Strukturbestimmung: Larry Gross, Nachbildung: Varda Lev-Ram und Geoff Baird.

Gen aus einer in einem Moskauer Aquarium gehaltenen Koralle.<sup>[50]</sup> Das Gen wurde sehr rasch kommerzialisiert, sodass wir eingehende Studien damit ausführen konnten. Wir entdeckten, dass DsRed ein obligates Tetramer ist<sup>[51]</sup> und dass sein Chromophor (Abbildung 11) anfangs identisch mit dem GFP-Chromophor ist, dann aber eine andere Art von Dehydrierung eingeht und ein ungewöhnliches Acylimin bildet, das nur im Innern des intakten Proteins stabil ist.<sup>[52]</sup> Theoretische Studien von Dr. Kim Baldridge an der UCSD bestätigten, dass die Erweiterung des Chromophors um zwei Doppelbindungen die beobachtete Rotverschiebung im Anregungs- und Emissionspektrum verursachen könnte.<sup>[52]</sup> Die tetramere Zusammensetzung des Proteins und die Struktur des Chromophors wurden kurz später röntgenkristallographisch bestätigt.<sup>[53,54]</sup> Die sehr starke gegenseitige Bindung der vier Untereinheiten war äußerst hinderlich für die Verwendung von DsRed als Fusionsmarker, da jedes Fusionat mit anderen Proteinen mindestens eine tetramere Form annehmen musste. War der Fusionspartner ganz von selbst an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt, so kam es oft zu massiven Aggregatbildungen mit sichtbaren Niederschlägen. Dennoch konnte Robert Campbell nach vielen Evolutionszyklen ein monomeres rot fluoreszierendes Protein (RFP) erzeugen, das relativ zuverlässige Fusionen ermöglichte.<sup>[55]</sup> Campbell, Nathan Shaner und Lei Wang entwickelten darauf eine ganze Farbskala an monomeren FPs, deren Emissionsmaxima den Rest des sichtbaren Spektrums bis 648 nm abdeckten (Abbildung 12).<sup>[56,57]</sup> Andere Gruppen entwarfen ebenfalls eine Vielzahl an FPs mit komplementären Eigenschaften, z.B. der äußerst nützlichen Fähigkeit der Photoschaltung.<sup>[58]</sup>



**Abbildung 12.** Monomere und dimere fluoreszierende Proteine, abgeleitet vom GFP aus *Aequorea* oder vom RFP aus *Discosoma*, nach Expression in Bakterien und Aufreinigung. Die Photographie ist eine Langzeitaufnahme der bei verschiedenen Wellenlängen angeregten und durch verschiedene Cutoff-Filter gemessenen Fluoreszenz.<sup>[56,57]</sup> SHM = somatische Hypermutation.

### Beispiele für Anwendungen in der Medizin und in der Schule

Ich werde sehr häufig gebeten, in einer dem Laien verständlichen Sprache zu erklären, worin nun die Bedeutung des GFP und anderer FPs besteht. Für gewöhnlich lautet meine Antwort, dass die genetisch codierten Fluoreszenzfarben der FPs viele biochemische Schlüsselprozesse direkt in lebenden Zellen und Organismen sichtbar machen können. Mithilfe molekularbiologischer Tricks lassen sich die Gene der Wirtzelle mit den FP-Genen verknüpfen, und wir können dann beobachten, wann und wo diese Wirtzellgene an- und ausgeschaltet werden, wann die Proteinprodukte auftauchen, wohin sie wandern, mit welchen anderen Proteinen sie wechselwirken und wie lange sie überleben. Selbst wenn wir die interessierenden Signale nicht direkt anzeigen können, z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ , cAMP, Protease- oder Kinaseaktivitäten, können wir oft FP-basierte Indikatoren wie in Abbildung 7 gezeigt entwerfen, um diese Signale indirekt abzubilden. Da diese verallgemeinerten Erklärungen aber vielen zu abstrakt sein dürften, will ich einige konkrete Beispiele medizinischer Verwendungen nennen:

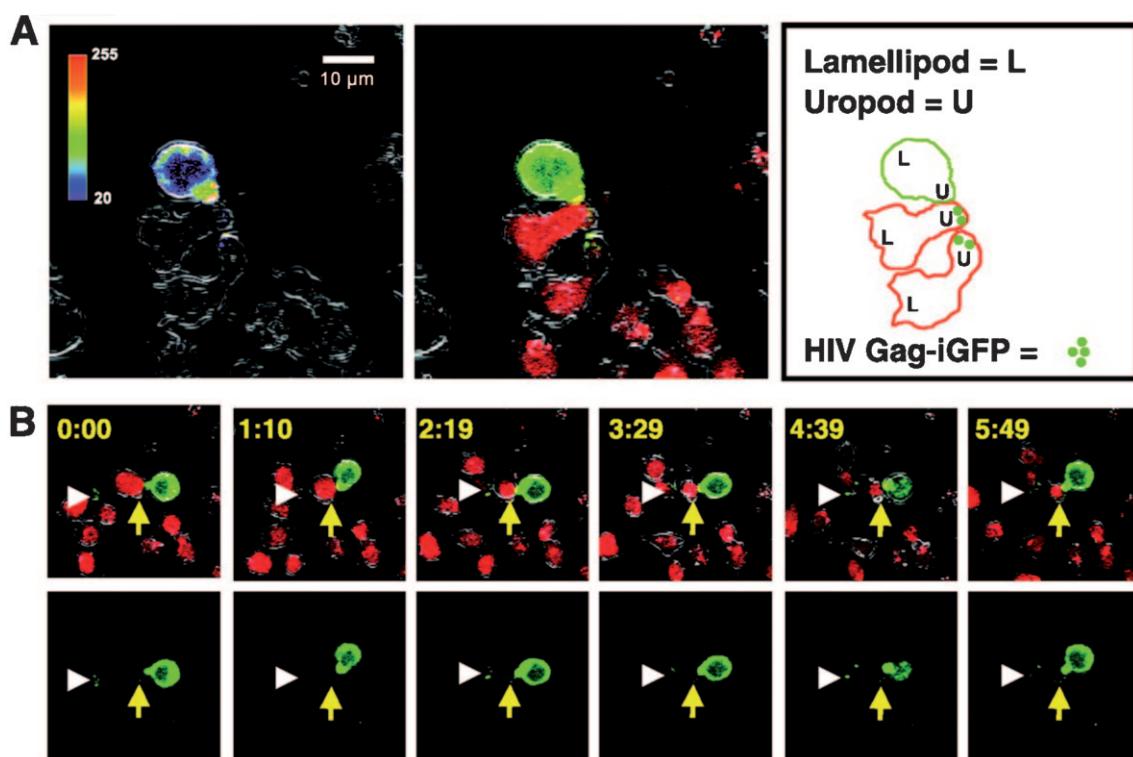
Ein Impfstoff gegen AIDS, der bereits infizierte Patienten heilen könnte, wäre eine höchst erstrebenswerte Errungenschaft. Wenn man das verursachende Virus mit GFP markiert und infizierte T-Zellen im räumlichen Kontakt mit naiven Zellen durch hochauflösende Mikroskopie zeitlich verfolgt, so erkennt man, dass das Virus über spezialisierte kurzlebige Adhäsionen („virologische Synapsen“) direkt von einer Zelle zur nächsten wandern kann (Abbildung 13). Falls sich das Virus tatsächlich zwischen den Zellen ausbreitet, ohne auch nur vorübergehend dem extrazellulären Milieu (wo es durch Antikörper neutralisiert werden könnte) ausgesetzt zu sein,

so macht dies die Aufgabe, die ein postinfektiöser Impfstoff zu lösen hat, sehr viel schwerer.

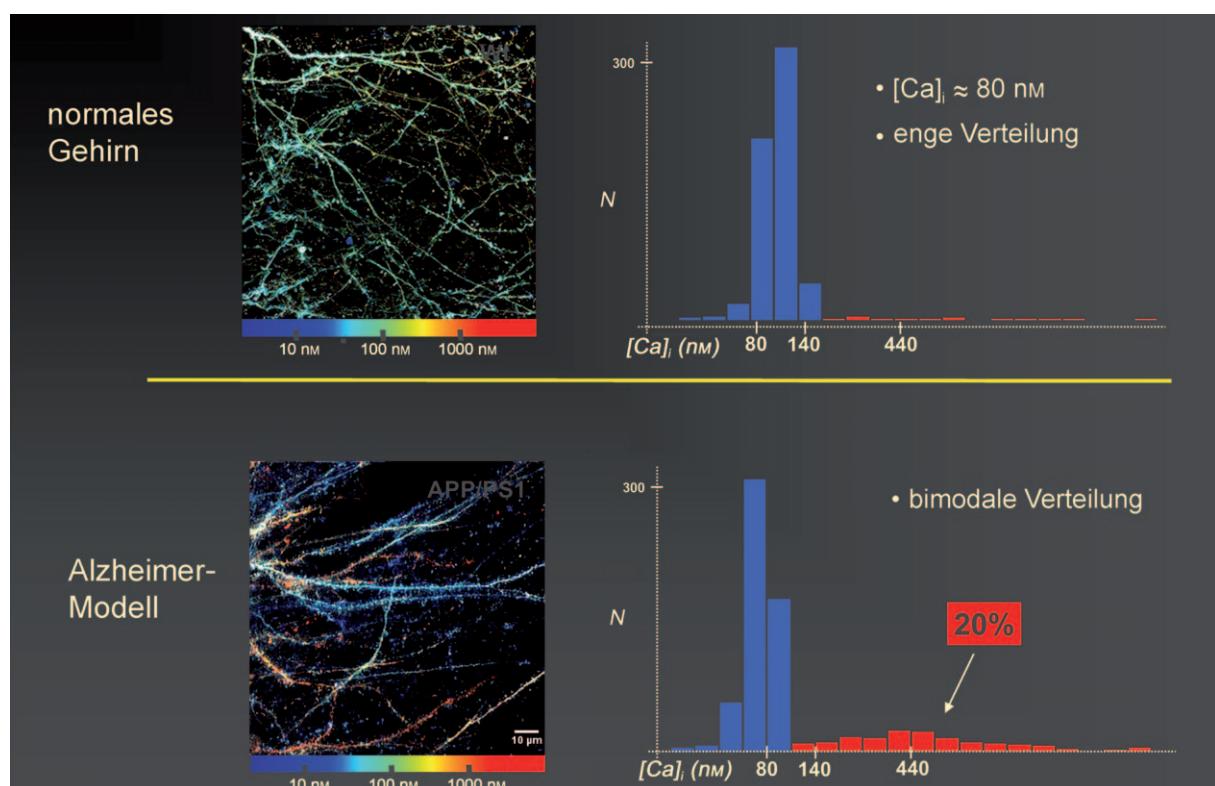
Bei der Alzheimer-Krankheit gibt es die Hypothese, dass ein Teil der Symptomatik aus der chronischen Erhöhung des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in den betroffenen Nervenzellen resultiert,<sup>[59]</sup> allerdings stammen die experimentellen Hinweise aus Studien an kultivierten Nervenzellen, nicht an intakten Versuchstieren. Mithilfe der genetisch codierbaren Camäleon-Proteine gelang es nun aber,  $\text{Ca}^{2+}$  in den Gehirnen von normalen Mäusen und transgen veränderten Alzheimer-Mäusen abzubilden.<sup>[60]</sup> In normalen Versuchstieren ist die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  in ruhenden Nervenzellen sehr strikt auf ca. 80 nm reguliert, während in den Alzheimer-Modellen etwa 20% der Dendrite sehr viel höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel von ca. 400 nm aufwiesen, vor allem in unmittelbarer Umgebung der Alzheimer-Plaques (Abbildung 14). Diese Beobachtung ist ein direkter Beweis für eine Fehlregulierung des neuronalen  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Alzheimer-Krankheit.

Ein Beispiel für die Anwendung von FPs in der Wirkstoffentwicklung ist die Suche nach niedermolekularen Verbindungen, die das Aggregieren des Alzheimer-Peptids  $\text{A}\beta$  zum  $\beta$ -Amyloid hemmen. Bei einem Fusionat von  $\text{A}\beta$  mit dem N-Terminus von GFP bleibt die Aggregation des  $\text{A}\beta$  genügend schnell, um die Faltung des GFP und somit dessen Fluoreszenz zu unterdrücken. Falls ein Wirkstoffkandidat die Aggregation von  $\text{A}\beta$  verhindert, wird hingegen eine Fluoreszenz gemessen. Das Messprinzip wurde auf ein einfacher durchzuführendes Hochdurchsatz-Screening kombinatorischer Bibliotheken ausgedehnt (Abbildung 15).<sup>[61]</sup>

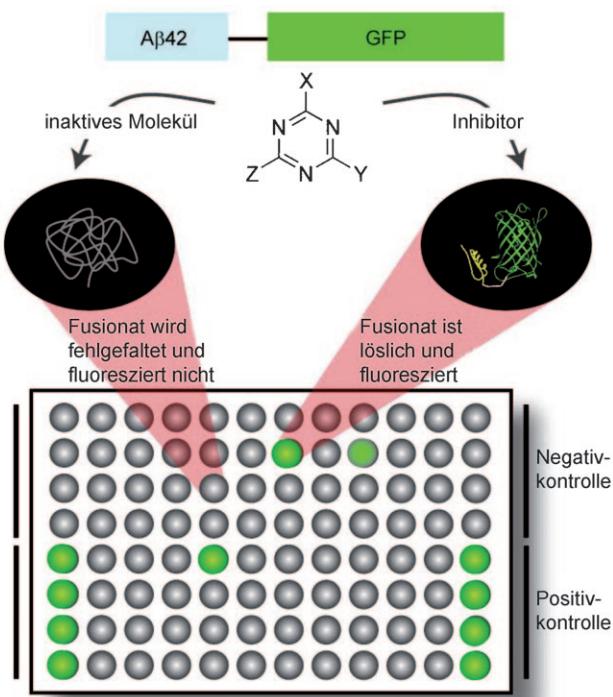
Ein letztes Beispiel ist die Anwendung von FPs als Indikatoren des mitotischen Zellzyklus. Bestimmte Proteindomänen signalisieren einer Zelle, in welchen Zellzyklusphasen sie die betreffenden Proteine anreichern und wieder



**Abbildung 13.** Durch Markierung des humanen Immunodefizienzvirus (HIV) mit GFP lässt sich nachweisen, dass sich das Virus über virologische Synapsen von Zelle zu Zelle ausbreiten kann, ohne Antikörpern ausgesetzt zu sein. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [78].



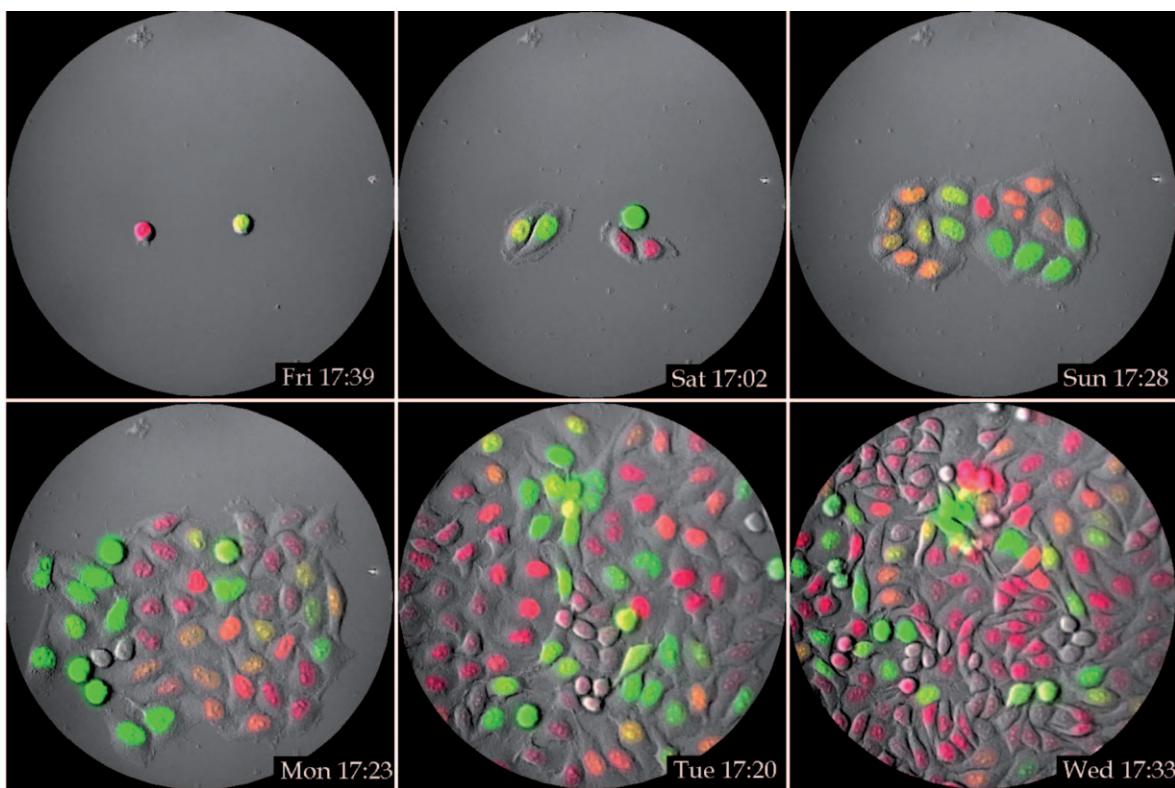
**Abbildung 14.** Zwei-Photonen-Bildgebung von gelbem Camäleon 3.60<sup>[77]</sup> in Gehirnen normaler und durch APP1/Presenilin-Mutation transgen veränderter Mäuse. Die Farbskala von Blau nach Rot kennzeichnet niedrige bis hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel.  $N$  = Zahl der Neuriten. Im Alzheimer-Modell zeigen 20% der Nervenzellen eine markant höhere Konzentration an cytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$ , insbesondere in der Umgebung der Plaques. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [60].



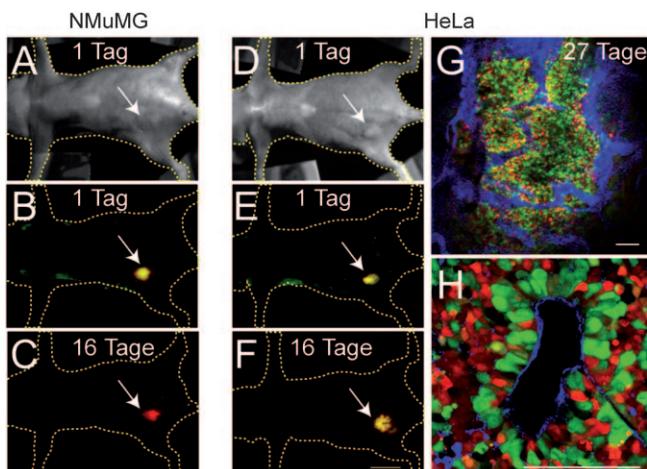
**Abbildung 15.** Hochdurchsatz-Screening nach kombinatorischen Wirkstoffen zur Suche nach Inhibitoren der A $\beta$ -Aggregation. Sobald ein Wirkstoff die Aggregation hemmt, kann das A $\beta$ 42-GFP-Fusionat fluoreszieren. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [61].

zerstören soll. Pflanzt man diese Domänen auf verschiedenfarbige FPs, so lässt sich damit erreichen, dass die Zellen z. B. während ihrer Teilungsphase mit einer bestimmten Farbe fluoreszieren (z. B. grün) und während der Ruhephase mit einer anderen Farbe (z. B. rot).<sup>[62]</sup> In Zellkulturen zeigen solche Zellen spektakuläre Oszillationen, die an ein Luftbild von asynchronen Verkehrsampeln erinnern (Abbildung 16). Transplantiert man markierte Zellen aus einer gutartigen Tumorzelllinie (z. B. NMuMG) in ein Versuchstier, so erscheint der Tumor bei niedriger optischer Auflösung zunächst gelb (Abbildung 17), da er eine Mischung aus grün und rot fluoreszierenden Zellen enthält. Im Laufe mehrerer Tage färbt sich der Tumor vollständig rot, was bedeutet, dass sich die Zellen nicht mehr teilen – deshalb ist der Tumor gutartig. Transplantiert man hingegen Zellen einer bösartigen Tumorzelllinie (z. B. HeLa), so behält der Tumor seine gelbe Farbe. Aufnahmen bei höherer Auflösung zeigen das zeitlich-räumliche Muster der Zellzyklusphasen in der Umgebung der Blutgefäße (Abbildung 17G,H). Das Muster hängt von verschiedenen Faktoren ab, unter anderem vom Reifegrad der Blutgefäße und vom Ausmaß der Nekrose im umgebenden Gewebe, sodass das Experiment eindrucksvoll demonstrieren kann, welche Bedeutung die Bildung neuer Blutgefäße für die Krebszellproliferation hat.

Mehrfarbige FPs können auch zu Lehrzwecken sehr gut eingesetzt werden. In einfachen Experimenten mit FPs können Schüler oder Studenten mit eigenen Augen verfolgen, wie z. B. DNA-Moleküle Zellen transformieren, wann Mu-



**Abbildung 16.** Standbilder aus einem Videofilm von wachsenden und sich teilenden HEK293-Zellen in Gewebekultur bei Transfektion mit einem Zweifarbindikator (YFP und mCherry) für die Zellzyklusprogression. Die grün fluoreszierenden Zellen befinden sich in der Phase der Zellkernteilung, die rot fluoreszierenden sind in der Interphase.<sup>[62]</sup> Videofilm: Asako Sawano und Atsushi Miyawaki, RIKEN.



**Abbildung 17.** Bildgebung der Zellzyklusprogression von gutartigen (NMuMG) und bösartigen Tumormarken (HeLa) in vivo. Wiedergabe mit Genehmigung aus Lit. [62].



**Abbildung 18.** Im Rahmen des BioBridge-Programms lernen Schulkinder mit fluoreszierenden Proteinen zu experimentieren (siehe [biobridge.ucsd.edu](http://biobridge.ucsd.edu)).

tationen stattgefunden haben oder wie sich Proteine biochemisch verhalten (Abbildung 18). Jeremy Babendure aus meiner Arbeitsgruppe startete nach seiner Promotion ein sehr erfolgreiches Programm ([biobridge.ucsd.edu](http://biobridge.ucsd.edu)), um solche Experimente auch Schülern zugänglich zu machen.

## Grenzen heutiger FPs und Lösungsansätze

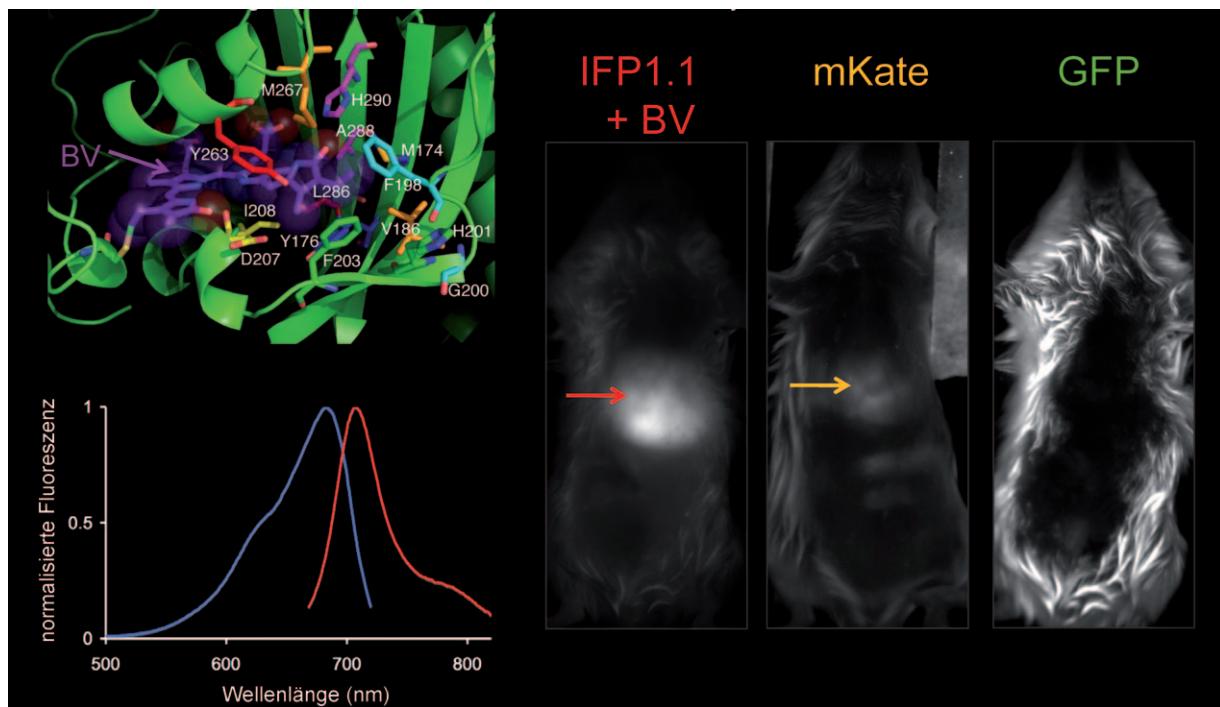
Fluoreszierende Proteine unterliegen einigen offensichtlichen Einschränkungen:

1) Alle FPs, die zum Quallen-GFP und Korallen-RFP homologe Strukturen aufweisen (Zylinder bestehend aus elf  $\beta$ -Strängen), enthalten über 200 Aminosäuren. Bisweilen erweisen sich solche Strukturen als zu groß und störungsanfällig, um mit anderen Proteinen fusionierbar zu sein.<sup>[63-65]</sup> Auch benötigen manche FPs zu viel Zeit für die Faltung und Chromophorbildung.<sup>[66,67]</sup> In solchen Fällen können FPs durch kürzere Sequenzen ersetzt werden, z. B. durch das zwölf Aminosäuren lange Peptid FLNCCPGCCMEP,<sup>[68]</sup> das über die Sulfhydrylreste der vier Cysteine Farbstoffe mit zwei passend platzierten Arsenatomen zu binden vermag. Die dreidimensionale Haarnadelstruktur eines solchen Komplexes wurde kürzlich NMR-spektroskopisch aufgeklärt.<sup>[69]</sup>

2) Dass für die Chromophorbildung  $O_2$  benötigt wird, schließt die Anwendung von FPs in Organismen aus, die schon bei kurzzeitigem Kontakt mit  $O_2$  geschädigt werden. Eine mögliche Lösung ist die Verwendung von Flavin-bindenden Proteinen.<sup>[70]</sup>

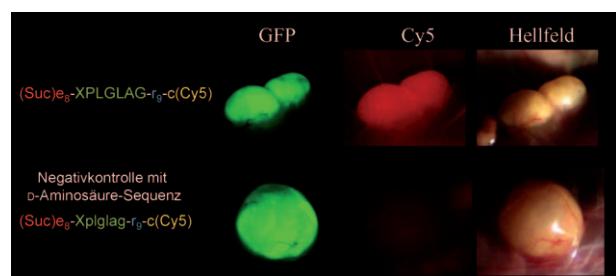
3) Für die Bildgebung von transfizierten Zellen und Organen in lebenden Säugetieren wären Anregungs- und Emissionswellenlängen von  $>600\text{ nm}$  sehr vorteilhaft, da Hämoglobin und andere Pigmente bei kürzeren Wellenlängen enorm absorbieren und den Lichteinfall abschwächen. Leider hat sich die Entwicklung von Korallen-FPs, die bei Anregungswellenlängen  $>600\text{ nm}$  eine hohe Helligkeit beibehalten, als schwierig erwiesen. Wie eingangs erwähnt, weisen einige Phycobiliproteine aus blaugrünen Algen solche Eigenschaften auf. In neueren Studien wurden Pflanzenphytochrome zu langwellig emittierenden FPs mutageniert (Phytofluore).<sup>[71,72]</sup> Allerdings konnte keines dieser FPs in Säugetierzellen exprimiert werden, vermutlich weil die als Cofaktoren benötigten Pigmente fremdartig sind. In meiner Arbeitsgruppe fand kürzlich Xiaokun Shu, dass bakterielle Phytochrome zu FPs mit Anregungsmaxima im fernen Rotbereich (z. B. 684 nm) und Emissionsmaxima  $>700\text{ nm}$  mutageniert werden können (Abbildung 19).<sup>[73]</sup> Der entscheidende Vorteil der bakteriellen Phytochrome ist der spontane Einbau ihres Cofaktors Biliverdin, dem Primärprodukt des Häm-Abbaus aller aerober Organismen einschließlich des Menschen. Uns stehen somit nun infrarote FPs zur Verfügung, die in lebenden Versuchstieren wie Mäusen und Fliegen eingesetzt werden können. Angesichts meines zunächst erfolglosen Interesses an den Phycobiliproteinen empfinde ich dies als ein besonders befriedigendes Ergebnis.

4) Der entscheidende Vorteil der FPs, ihre genetische Codierbarkeit, ist bei menschlichen Patienten von eher geringem Wert, da Gentherapien beim Menschen zuerst einmal sicher und wirksam werden müssen und die Einführung eines FP-Gens dem Patienten unmittelbar einen Vorteil bringen müsste. Für die molekulare Bildgebung in menschlichen Patienten ist man noch immer auf synthetische Moleküle angewiesen. Darüber hinaus ist das menschliche Gewebe dicker und lichtundurchlässiger als das von Mäusen, sodass Ganzkörper-Scans am Menschen nichtoptische Techniken wie Röntgencomputertomographie, Positronenemissionstomo-



**Abbildung 19.** Ein infrarot fluoreszierendes Protein (IFP), das von einem Phytochrom aus *Deinococcus radiodurans* abgeleitet wurde. Oben links: Kristallstruktur des Wildtyp-Phytochroms (PDB: 1ztu).<sup>[79]</sup> Das Chromophor (Biliverdin, violett) sowie die zu mutagenierenden Aminosäuren sind gekennzeichnet. Unten links: normalisierte Anregungs- (blau) und Emissionsspektren (rot) von IFP1.4. Rechts: Leber-basierte Fluoreszenz von intakten Mäusen nach Injektion von IFP1.1-codierenden Adenoviren, mKate (einem für die In-vivo-Bildgebung entwickelten RFP)<sup>[80]</sup> und eines verstärkten GFP. 1 h vor Aufnahme des IFP-Bildes erfolgte eine intravenöse Injektion von Biliverdin (250 nmol). Um das mKate-Bild sichtbar zu machen, wurde es per Software um den Faktor 5 aufgehellt. Den Versuchstieren wurde mit Enthaarungscreme das Bauchfell entfernt, die Haut blieb dabei unverletzt. Die Lage der Leber ist mit Pfeilen angezeigt. Im GFP-Bild ist die Leber aufgrund starker Autofluoreszenz nicht sichtbar. Die sehr viel bessere Sichtbarkeit der IFP-behandelten Leber demonstriert klar den großen Nutzen langer Anregungs- und Emissionswellenlängen für die In-vivo-Fuoreszenzbildgebung.

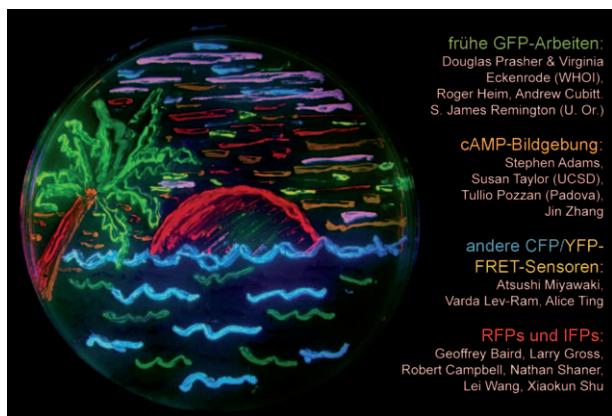
graphie oder Kernspintomographie erfordern. Wir haben deshalb aktivierbare zellpenetrierende Peptide (ACPPs) bestehend aus einem polykationischen zellpenetrierenden Peptid (CPP) und einer polyanionischen Domäne entwickelt. Die Aufnahme der ACPPs in die Zelle wird durch die polyanionische inhibitorische Domäne unterdrückt und nach Proteolyse des Peptidlinkers, der die polyanionische mit der polykationischen Domäne verbindet, wieder in Gang gesetzt. Die lokale Wirkung von Proteasen, die den Linker zu spalten vermögen, verursacht die verstärkte Retention im Gewebe und die zelluläre Aufnahme des CPP.<sup>[74]</sup> Die zelluläre Aufnahme von ACPPs in Tumoren ist gegenüber einer Negativkontrolle aus D-Aminosäuren um bis zu vierfach erhöht, wenn das Substrat einer Matrixmetalloproteinase als Linker eingesetzt wird (PLGLAG) (Figure 20). Durch Konjugation der ACPPs an makromolekulare Träger, z.B. Dendrimere, lässt sich die Pharmakokinetik verlängern und die Markerbeladung (Cy5 oder Gd-DOTA oder beide im selben Molekül) des Tumors für Anwendungen in der Ferninfrarot- oder Kernspintomographie erhöhen. Mit Cy5 und Gd-DOTA doppelt markierte Sonden ermöglichen die Ganzkörper-Kernspintomographie von Patienten mit anschließender fluoreszenzgeführter Chirurgie. Durch Thrombin spaltbare ACPPs reichern sich in atherosklerotischen Plaques und ex-



**Abbildung 20.** Colokalisierung von aktivierbaren zellpenetrierenden Peptiden (ACPPs) mit GFP-transfizierten Hep2-Xenotransplantaten in Tumorzellen. Mit EGFP stabil transfizierte Hep2-Tumorzellen wurden in Nacktmäuse transplantiert. Drei Wochen nach der subkutanen Implantierung von  $5 \times 10^6$  Zellen war der Tumor auf einen Durchmesser von ca. 5 mm angewachsen. Obere Reihe: 6 h nach systemischer Injektion von 10 nmol des ACPP Succinyl-e<sub>8</sub>-XPLGLAG-r<sub>9</sub>c(Cy5) wurde die Haut über dem Tumor entfernt, und GFP-Fuoreszenz, Cy5-Fuoreszenz sowie Hellfeldbilder des anästhetisierten Versuchstieres wurden aufgenommen. X ist 6-Aminohexanol; Großbuchstaben stellen L-Aminosäuren, Kleinbuchstaben D-Aminosäuren dar. Die Sequenz PLGLAG wird durch Matrixmetalloproteinase-2 und -9 gespalten.<sup>[74]</sup> Untere Reihe: ein analoges Experiment mit einer Negativkontrolle, Succinyl-e<sub>8</sub>-Xplglag-r<sub>9</sub>c(Cy5), die in der Sequenz D- anstelle von L-Aminosäuren enthält und damit proteaseresistent wird. Das Fehlen des Cy5-Signals im Tumor bedeutet, dass die CPP-Retention von der Spaltung durch Proteasen abhängig ist.

perimentellen Schlaganfallmodellen an, sodass auch die Bildgebung vaskulärer Krankheitsbilder möglich ist. Die Fähigkeit von ACPPs, verschiedenste Substanzen in protease-exprimierenden Lebendgeweben anzureichern, birgt ein enormes Potenzial für klinische Anwendungen. Vor allem hierauf richten sich zurzeit die Forschungen meiner Arbeitsgruppe.

Die wichtigsten Kollegen und Mitarbeiter, die an den hier beschriebenen Forschungen beteiligt waren, sind in Abbildung 21 erwähnt. Preisträger bringen oft den Hinweis an, dass bestimmte Experimente von ihren Mitarbeitern ausgeführt wurden. Im meinem Fall geht es aber darüber hinaus, denn ich muss gestehen, dass ich die meisten Experimente gar nicht hätte eigenhändig ausführen können, weil mir einfach die praktische Ausbildung fehlte, insbesondere in der Molekularbiologie. Den hier genannten Mitarbeitern wie auch vielen anderen, die zu zahlreich sind, um eigens erwähnt zu werden, bin ich daher zu tiefstem Dank verpflichtet. Ich danke außerdem dem Howard Hughes Medical Institute, das mich von Anfang an unterstützt hat, sowie den National Institutes of Health für langjährige Förderung. Unsere erst begonnene Krebsforschung wird vom Breast Cancer Research Program und dem Verteidigungsministerium unterstützt.



**Abbildung 21.** Mitarbeiter und Kollegen, die an den hier beschriebenen Studien entscheidend beteiligt waren. In der links gezeigten Petrischale ist mithilfe FP-exprimierender Bakterien ein typisch kalifornischer Sonnenuntergang nachgebildet.

Ein eingegangen am 8. April 2009  
Online veröffentlicht am 29. Juni 2009  
Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] „In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. I. Specific covalent adduct formation at cysteinyl residues involved in phycocyanobilin binding in C-phycocyanin“: D. M. Arciero, D. A. Bryant, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18343–18349.
- [2] „In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. II. Determination of the structures of tryptic bilin peptides derived from the phycocyanobilin adduct“: D. M. Arciero, J. L. Dallas, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18350–18357.

- [3] „In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. III. Properties of the phycoerythrobilin adduct“: D. M. Arciero, J. L. Dallas, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 18358–18363.
- [4] „Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin  $\alpha$  subunit phycocyanobilin lyase“: C. D. Fairchild, A. N. Glazer, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 8686–8694.
- [5] „A cyclic-3',5'-adenosine monophosphate dependent protein kinase from the adrenal cortex: comparison with a cyclic AMP binding protein“: G. N. Gill, L. D. Garren, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, 39, 335–343.
- [6] „A cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase from cardiac muscle“: M. A. Brostrom, E. M. Reimann, D. A. Walsh, E. G. Krebs, *Adv. Enzyme Regul.* **1970**, 8, 191–203.
- [7] „Mechanism of activation by adenosine 3':5'-cyclic monophosphate of a protein phosphokinase from rabbit reticulocytes“: M. Tao, M. L. Salas, F. Lipmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, 67, 408–414.
- [8] „Expression of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*“: L. D. Saraswat, M. Filutowicz, S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 11091–11096.
- [9] „Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*“: L. W. Slice, S. S. Taylor, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 20940–20946.
- [10] „Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells“: S. R. Adams, A. T. Harootunian, Y. J. Buechler, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Nature* **1991**, 349, 694–697.
- [11] S. R. Adams, B. J. Bacska, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Fluorescent Probes for Biological Activity of Living Cells—A Practical Guide* (Hrsg.: W. T. Mason), Academic Press, New York, **1993**, S. 133–149.
- [12] „Single-cell analysis of cyclic AMP response to parathyroid hormone in osteoblastic cells“: R. Civitelli, B. J. Bacska, M. P. Mahaut-Smith, S. R. Adams, L. V. Avioli, R. Y. Tsien, *J. Bone Miner. Res.* **1994**, 9, 1407–1417.
- [13] „Spatio-temporal dynamics of cAMP signals in an intact neural circuit“: C. M. Hempel, P. Vincent, S. R. Adams, R. Y. Tsien, A. I. Selverston, *Nature* **1996**, 384, 166–169.
- [14] „Intracellular cyclic AMP not  $\text{Ca}^{2+}$  determines the direction of vesicle movement in melanophores: direct measurements by fluorescence ratio imaging“: P. J. Sammak, S. R. Adams, A. T. Harootunian, M. Schliwa, R. Y. Tsien, *J. Cell Biol.* **1992**, 117, 57–72.
- [15] „Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons“: B. J. Bacska, B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S. R. Adams, B. K. Kaang, E. R. Kandel, R. Y. Tsien, *Science* **1993**, 260, 222–226.
- [16] „Measurement of  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations in living cells“: J. R. Blinks, W. G. Wier, P. Hess, F. G. Prendergast, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1982**, 40, 1–114.
- [17] „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.
- [18] „Expression, purification, and properties of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump and of its N-terminally truncated 105 kDa fragment“: R. Heim, T. Iwata, E. Zvaritch, H. P. Adamo, B. Rutishauser, E. E. Strehler, D. Guerini, E. Carafoli, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 24476–24484.
- [19] „Microdiversity of human-plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region“: R. Heim, M. Hug, T. Iwata, E. E. Strehler, E. Carafoli, *Eur. J. Biochem.* **1992**, 205, 333–340.
- [20] „Wavelength mutations and post-translational autooxidation of green fluorescent protein“: R. Heim, D. C. Prasher, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12501–12504.
- [21] „Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence energy transfer“: R. Heim, R. Y. Tsien, *Curr. Biol.* **1996**, 6, 178–182.

- [22] „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.
- [23] „Reaction progress of chromophore biogenesis in green fluorescent protein“: L. Zhang, H. N. Patel, J. W. Lappe, R. M. Wachter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4766–4772.
- [24] „Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein“: O. Shimomura, *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 220–222.
- [25] „Improved green fluorescence“: R. Heim, A. B. Cubitt, R. Y. Tsien, *Nature* **1995**, *373*, 663–664.
- [26] „Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*“: A. Wach, A. Brachat, C. Alberti-Segui, C. Rebischung, P. Philippse, *Yeast* **1997**, *13*, 1065–1075.
- [27] „Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein“: S. Delagrave, R. E. Hawtin, C. M. Silva, M. M. Yang, D. C. Youvan, *Bio/Technology* **1995**, *13*, 151–154.
- [28] „Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein“: R. D. Mitra, C. M. Silva, D. C. Youvan, *Gene* **1996**, *173*, 13–17.
- [29] „FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)“: B. P. Cormack, R. H. Valdivia, S. Falkow, *Gene* **1996**, *173*, 33–38.
- [30] „X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of *Aequorea* green fluorescent protein crystals“: M. A. Perozzo, K. B. Ward, R. B. Thompson, W. W. Ward, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 7713–7716.
- [31] „Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein“: M. Ormö, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Science* **1996**, *273*, 1392–1395.
- [32] „The molecular structure of green fluorescent protein“: F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, Jr., *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1246–1251.
- [33] „Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein“: K. Brejc, T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormö, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2306–2311.
- [34] „Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P<sub>400</sub>“: T. Furuchi, S. Yoshikawa, A. Miyawaki, K. Wada, N. Maeda, K. Mikoshiba, *Nature* **1989**, *342*, 32–38.
- [35] „Structure-function relationships of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor“: A. Miyawaki, T. Furuchi, Y. Ryou, S. Yoshikawa, T. Nakagawa, T. Saitoh, K. Mikoshiba, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 4911–4915.
- [36] „A calmodulin-target peptide hybrid molecule with unique calcium-binding properties“: T. Porumb, P. Yau, T. S. Harvey, M. Ikura, *Protein Eng.* **1994**, *7*, 109–115.
- [37] „Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin“: A. Miyawaki, J. Llopis, R. Heim, J. M. McCaffery, J. A. Adams, M. Ikura, R. Y. Tsien, *Nature* **1997**, *388*, 882–887.
- [38] „Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons“: A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 2135–2140.
- [39] „A genetically encoded, fluorescent indicator for cyclic AMP in living cells“: M. Zaccolo, F. De Giorgi, C. Y. Cho, L. Feng, T. Knapp, P. A. Negulescu, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, T. Pozzan, *Nat. Cell Biol.* **2000**, *2*, 25–29.
- [40] „Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes“: M. Zaccolo, T. Pozzan, *Science* **2002**, *295*, 1711–1715.
- [41] „Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering“: J. Zhang, Y. Ma, S. S. Taylor, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 14997–15002.
- [42] „FRET-based biosensors for protein kinases: illuminating the kinase“: J. Zhang, M. D. Allen, *Mol. Biosyst.* **2007**, *3*, 759–765.
- [43] „A genetically encoded fluorescent reporter reveals oscillatory phosphorylation“: J. D. Violin, J. Zhang, R. Y. Tsien, A. C. Newton, *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 899–909.
- [44] „Targeting protein kinase C activity reporter to discrete intracellular regions reveals spatiotemporal differences in agonist-dependent signaling“: L. L. Gallegos, M. T. Kunkel, A. C. Newton, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 30947–30956.
- [45] „Spatio-temporal dynamics of protein kinase B/Akt signaling revealed by a genetically encoded fluorescent reporter“: M. T. Kunkel, Q. Ni, R. Y. Tsien, J. Zhang, A. C. Newton, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 5581–5587.
- [46] „Calcium-dependent regulation of protein kinase D revealed by a genetically encoded kinase activity reporter“: M. T. Kunkel, A. Toker, R. Y. Tsien, A. C. Newton, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 6733–6742.
- [47] „Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells“: A. Y. Ting, K. H. Kain, R. L. Klemke, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 15003–15008.
- [48] „A pair of FRET-based probes for tyrosine phosphorylation of the CrkII adaptor protein in vivo“: K. Kurokawa, N. Mochizuki, Y. Ohba, H. Mizuno, A. Miyawaki, M. Matsuda, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 31305–31310.
- [49] „Visualizing the mechanical activation of Src“: Y. Wang, E. L. Botvinick, Y. Zhao, M. W. Berns, S. Usami, R. Y. Tsien, S. Chien, *Nature* **2005**, *434*, 1040–1045.
- [50] „Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species“: M. V. Matz, A. F. Fradkov, Yu. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov, S. A. Lukyanov, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 969–973.
- [51] „Biochemistry mutagenesis, and oligomerization of dsRed, a red fluorescent protein from coral“: G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11984–11989.
- [52] „The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral“: L. A. Gross, G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldridge, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 11990–11995.
- [53] „Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution“: D. Yarbrough, R. M. Wachter, K. Kallio, M. V. Matz, S. J. Remington, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 462–467.
- [54] „The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed“: M. A. Wall, M. Socolich, R. Ranganathan, *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7*, 1133–1138.
- [55] „A monomeric red fluorescent protein“: R. E. Campbell, O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7877–7882.
- [56] „Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein“: N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1567–1572.
- [57] „Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation“: L. Wang, W. C. Jackson, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16745–16749.
- [58] „Advances in fluorescent protein technology“: N. C. Shaner, G. H. Patterson, M. W. Davidson, *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 4247–4260.
- [59] „Alzheimer’s disease—Fresh evidence points to an old suspect: Calcium“: J. Marx, *Science* **2007**, *318*, 384–385.
- [60] „A beta plaques lead to aberrant regulation of calcium homeostasis in vivo resulting in structural and functional disruption of neuronal networks“: K. V. Kuchibhotla, S. T. Goldman, C. R.

- Lattarulo, H.-Y. Wu, B. T. Hyman, B. J. Bacska, *Neuron* **2008**, *59*, 214–225.
- [61] „A high-throughput screen for compounds that inhibit aggregation of the Alzheimer’s peptide“: W. Kim, Y. Kim, J. Min, D. J. Kim, Y.-T. Chang, M. H. Hecht, *Chem. Biol.* **2006**, *1*, 461–469.
- [62] „Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression“: A. Sakaue-Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, *Cell* **2008**, *132*, 487–498.
- [63] „Short tetracysteine tags to beta-tubulin demonstrate the significance of small labels for live cell imaging“: M. Andresen, R. Schmitz-Salue, S. Jakobs, *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 5616–5622.
- [64] „A FlAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells“: C. Hoffmann, G. Gaietta, M. Bünenmann, S. R. Adams, S. Oberdorff-Maass, B. Behr, J.-P. Vilardaga, R. Y. Tsien, M. H. Ellisman, M. J. Lohse, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 171–176.
- [65] „Secretion of type III effectors into host cells in real time“: J. Enninga, J. Mounier, P. Sansonetti, G. T. Van Nhieu, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 959–965.
- [66] „The potential of nucleic acid repair in functional genomics“: M. C. Rice, K. Czymbek, E. B. Kmiec, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 321–326.
- [67] „Visualization of mRNA translation in living cells“: A. J. Rodriguez, S. M. Shenoy, R. H. Singer, J. Condeelis, *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 67–76.
- [68] „Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity“: B. R. Martin, B. N. Giepmans, S. R. Adams, R. Y. Tsien, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1308–1314.
- [69] „Hairpin structure of a biarsenical-tetracysteine motif determined by NMR“: F. Madani, J. Lind, P. Damberg, S. R. Adams, R. Y. Tsien, A. O. Gräslund, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4613–4615.
- [70] „Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen“: T. Drepper, T. Eggert, F. Circolone, A. Heck, U. Krauß, J.-K. Gutert, M. Wendorff, A. Losi, W. Gärtner, K.-E. Jaeger, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 443–445.
- [71] „Harnessing phytochrome’s glowing potential“: A. J. Fischer, J. C. Lagarias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17334–17339.
- [72] „The phytofluors: a new class of fluorescent protein probes“: J. T. Murphy, J. C. Lagarias, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 870–876.
- [73] „Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome“: X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Science* **2009**, *324*, 804–807.
- [74] „Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides“: T. Jiang, E. S. Olson, Q. T. Nguyen, M. Roy, P. A. Jennings, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17867–17872.
- [75] „Understanding, using and improving green fluorescent protein“: A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, R. Y. Tsien, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 448–455.
- [76] „Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins“: H. T. Wright, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 1–52.
- [77] „Expanded dynamic range of fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$ , by circularly permuted yellow fluorescent proteins“: T. Nagai, S. Yamada, T. Tominaga, M. Ichikawa, A. Miyawaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10554–10559.
- [78] „Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses“: P. Chen, W. Hubner, M. A. Spinelli, B. K. Chen, *J. Virol.* **2007**, *81*, 12582–12595.
- [79] „A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome“: J. R. Wagner, J. S. Brunzelle, K. T. Forest, R. D. Vierstra, *Nature* **2005**, *438*, 325–331.
- [80] „Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging“: D. Shcherbo, E. M. Merzlyak, T. V. Chepurnykh, A. F. Fradkov, G. V. Ermakova, E. A. Solovieva, K. A. Lukyanov, E. A. Bogdanova, A. G. Zaraisky, S. Lukyanov, D. M. Chudakov, *Nat. Methods* **2007**, *4*, 741–746.