

# Zugang zu photochromen und fluoreszierenden Biliproteinen über fusionierte Gene\*\*

Juan Zhang, Xian-Jun Wu, Zhi-Bin Wang, Yu Chen, Xing Wang, Ming Zhou, Hugo Scheer und Kai-Hong Zhao\*

Fluoreszierende oder durch Licht schaltbare Proteine sind wichtige Werkzeuge in den Lebenswissenschaften und Kandidaten für die Speicherung von Daten. Dabei sind für In-vivo-Markierungen insbesondere Proteine von Interesse, deren Chromophore autokatalytisch aus der Aminosäurekette gebildet werden,<sup>[1]</sup> wobei einige auch zwischen zwei Zuständen schaltbar sind.<sup>[2,3]</sup> Ein alternativer Ansatz ist die Verwendung von Apoproteinen, die spontan endogene Chromophore wie Retinal aufnehmen.<sup>[4,5]</sup>

Die offenkettigen Tetrapyrrol-Chromophore der Biliproteine zeigen eine bemerkenswerte Kontrolle des angeregten Zustands durch das Apoprotein.<sup>[6–8]</sup> So werden Absorption und Fluoreszenz von Phycocyanobilin (PCB) im nativen Protein im Vergleich zu denen des freien Chromophors deutlich verstärkt, die Anregungsenergien können über 100 nm und mehr verschoben werden, und in photochromen Biliproteinen wie den Phytochromen<sup>[9]</sup> und Cyano(bacterio)-chromen<sup>[7]</sup> wird ein photochemischer Reaktionsweg geöffnet. Aufgrund der natürlichen Varianten sowie der Möglichkeit, die photophysikalischen Eigenschaften weiter durch Mutation zu verändern, sind Biliproteine prinzipiell ausgezeichnet

zur Markierung in den Lebenswissenschaften und als photochemische Materialien geeignet.

Ihre Anwendung wurde allerdings dadurch behindert, dass bei den Biliproteinen die Chromophore getrennt synthetisiert und anschließend mit dem Apoprotein kovalent verknüpft werden müssen. In früheren Ansätzen wurden die Gene für das Apoprotein zusammen mit denen exprimiert, die für die Biosynthese der Chromophore und ihre kovalente Verknüpfung mit dem Apoprotein kodieren.<sup>[10–12]</sup> Wir berichten hier über einen alternativen Zugang, bei dem in situ verschiedene Biliproteine ausgehend von einem einzigen, multifunktionellen Gen und endogenem Häm erhalten wurden. Als Beispiele dafür beschreiben wir zwei dauerhaft rot fluoreszierende Biliproteine auf der Basis von Allophycocyaninen und zwei von einem neuartigen Cyanobacteriochrom abgeleitete photochrome Biliproteine, die durch Licht reversibel zwischen einem rot absorbierenden, intensiv fluoreszierenden Zustand ( $P_r$ ) und einem spektroskopisch gut getrennten, grün absorbierenden und schwächer fluoreszierenden Zustand ( $P_g$ ) schaltbar sind.

Das Gen *slr1393* des Cyanobacteriums *Synechocystis* sp. PCC6803 kodiert ein photoreversibles Cyanobacteriochrom. Das Vollängenprotein enthält drei GAF-Domänen, von denen nur GAF3 (AS 441-596) in der Lage ist, autokatalytisch PCB an Cystein-528 zu binden.<sup>[21]</sup> Die Addition von PCB an GAF<sub>3</sub> liefert ein photoreversibel photochromes Chromoprotein, das als Rot-Grün-schaltbares Protein (RGS) bezeichnet wurde. Im Zustand  $P_r$  ( $\lambda_{\max} = 650$  nm) ist es stark fluoreszierend ( $\Phi_F = 0.06$ ) und kann durch Rotlicht reversibel in den Zustand  $P_g$  mit blauverschobener Absorption ( $\lambda_{\max} = 539$  nm) und verminderter Fluoreszenz überführt werden (Tabelle 1, Abbildung 1a). Dieses lichtinduzierte Schalten kann viele Male wiederholt werden; es ist über einen weiten pH-Bereich stabil und bleibt auch beim Einbetten von RGS in Polyvinylalkohol(PVA)-Filme erhalten (Abbildungen S1, S2 in den Hintergrundinformationen).

Chromophor tragendes RGS lässt sich in *E. coli*-Zellen<sup>[11,13]</sup> bilden, die durch mehrfache Transformation das GAF3-Apoprotein sowie zwei biosynthetische Enzyme produzieren, welche Häm in PCB umwandeln: die Häm-Oxygenase HO1 und die Biliverdin-Reduktase PcyA. Die Zellen zeigen nach Induktion eine intensive rote Fluoreszenz, die durch Rotlicht gelöscht und durch nachfolgendes Bestrahlen mit Grünlicht wiederhergestellt wird (Abbildung S2). Beim Ersatz von *pcyA* durch *hy2* wird der Phytochromobilin-Chromophor (PΦB) gebildet. Dadurch entsteht ein photoreversibel photochromes Protein, das zwischen  $P_r$  ( $\lambda_{\max} = 663$  nm) und  $P_g$  ( $\lambda_{\max} = 573$  nm) geschaltet werden kann; in

[\*] Dr. J. Zhang,<sup>[a]</sup> X.-J. Wu,<sup>[a]</sup> Z.-B. Wang, Y. Chen, Dipl.-Biol. X. Wang, Prof. M. Zhou, Prof. Dr. K.-H. Zhao  
State Key Laboratory of Agricultural Microbiology  
Huazhong Agricultural University  
Wuhan 430070 (Volksrepublik China)  
Fax: (+86) 27-8754-1634  
E-Mail: khzhao@163.com

X.-J. Wu,<sup>[a]</sup> Y. Chen, Dipl.-Biol. X. Wang, Prof. Dr. K.-H. Zhao  
College of Life Science and Technology  
Huazhong University of Science and Technology  
Wuhan 430074 (Volksrepublik China)

Prof. M. Zhou  
HZAU Biomass and Bioenergy Research Centre  
Huazhong Agricultural University  
Wuhan 430070 (Volksrepublik China)

Prof. Dr. H. Scheer  
Department Biologie 1 – Botanik  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
80638 München (Deutschland)

[\*] Beide Autoren haben gleichen Anteil an dieser Arbeit.

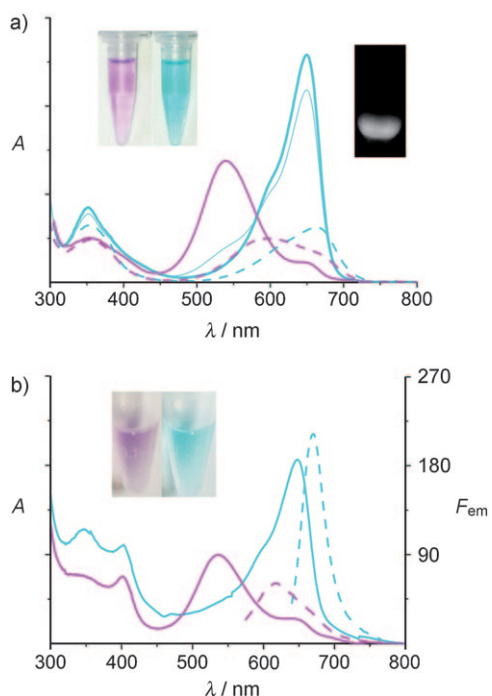
[\*\*] H.S. und K.H.Z. wurden vor der Volkswagen-Stiftung (I/77900) gefördert, H.S. von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 533, TPA1), K.H.Z. und M.Z. von der National Natural Science Foundation of China (30870541 und 30870519). Wir danken R. J. Porra für die kritische Durchsicht des Manuskripts sowie K. Cang, H. H. Hua, J. P. Li, Y. F. Sun und J. G. Xu für technische Assistenz.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201001094> zu finden.

**Tabelle 1:** Absorptions- und Fluoreszenzparameter der dauerhaft fluoreszierenden und der RGS-Biliproteine.<sup>[a]</sup>

Biliprotein	Ausbeute [mg L <sup>-1</sup> Kultur]	Absorption				Fluoreszenz			
		$\lambda_{\text{max}}$ [nm]		$\epsilon$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ] × 10 <sup>-4</sup> <sup>[b]</sup>		$\lambda_{\text{max}}$ [nm]		$\Phi_{\text{f}}$	
		15Z	15E	15Z	15E	15Z	15E	15Z	15E
<b>Durch Licht schaltbar (RGS)</b>									
PCB-GAF3:HO1:PcyA <sup>[c]</sup>	2.2	648	536	9.7	4.7	670	617	0.07	0.04
PCB-GAF3 (RGS) <sup>[c]</sup>	3.2	650	539	9.3	5.0	672	616	0.06	0.03
PΦB-GAF3 <sup>[c]</sup>	n.b.	663	573	9.1	4.5	685	631	0.04	0.03
PΦB-GAF3:HO1:HY2 <sup>[d]</sup>	n.b.	661	560	–	–	680	625	0.01	0.006
<b>Dauerhaft fluoreszierend</b>									
PCB-ApcA:HO1:PcyA <sup>[c]</sup>	0.10	617, 635 <sup>[e]</sup>	–	5.9	–	638	–	0.14	–
PCB-ApcE(1-258):HO1:PcyA <sup>[c]</sup>	0.15	658	–	9.9	–	672	–	0.15	–
PΦB-ApcE(1-258):HO1:HY2 <sup>[d]</sup>	n.b.	670	–	–	–	680	–	0.005	–

[a] Die Spektren wurden in Kaliumphosphat-Puffer (20 mM, pH 7.0) aufgenommen. Angegeben sind jeweils Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten. [b] Bei der Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von PΦB-Chromoproteinen wurde angenommen, dass der molare Extinktionskoeffizient bei 675 nm in saurem Harnstoff (8 M, pH 1.5) mit dem von PCB-Chromoproteinen bei 660 nm identisch ist ( $\epsilon = 35\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ). [c] Spektren von His<sub>6</sub>-markierten Chromoproteinen nach Aufreinigung durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie. [d] Spektren von den Überständen unmarkierter Chromoproteine. [e] Die Spektren unterscheiden sich von denen von natürlichem  $\alpha$ -APC, weil keine Lyase vorhanden war.



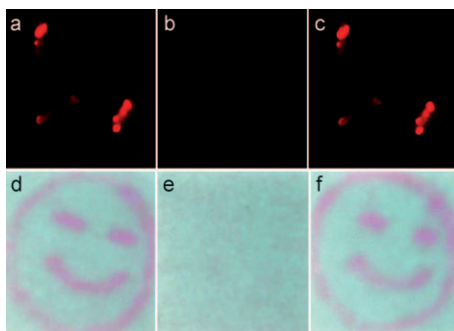
**Abbildung 1.** Photochromie von His<sub>6</sub>-markierten RGS-Biliproteinen. a) PCB-GAF3. Absorptionsspektren des nativen Biliproteins im P<sub>z</sub>-Zustand (15Z-Chromophor, —), erhalten durch Belichtung bei 500 nm, im P<sub>g</sub>-Zustand (15E-Chromophor, —), erhalten durch Belichtung bei 650 nm, der durch Belichtung mit Weißlicht erhaltenen Mischung (vorwiegend 15Z, —) und von denaturiertem P<sub>z</sub> (----) und P<sub>g</sub> (----). Linker Einschub: Röhrchen mit P<sub>z</sub> (grün) und P<sub>g</sub> (rosa); rechter Einschub: Zn<sup>2+</sup>-induzierte Fluoreszenz des SDS-PAGE-Gels. b) PCB-GAF3:HO1:PcyA: Absorptions- (—) und Fluoreszenzemissionsspektren (----) des P<sub>z</sub>-Zustands (15Z-Chromophor), der durch Belichtung bei 500 nm erhalten wurde (Fluoreszenzanregung 620 nm), und des P<sub>g</sub>-Zustands (15E-Chromophor), erhalten durch Belichtung bei 650 nm (Absorption — und Fluoreszenz ---- bei Anregung 550 nm). Der Einschub zeigt Röhrchen mit P<sub>g</sub> (links) und P<sub>z</sub> (rechts). Alle Proben wurden über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Spektren der nativen Biliproteine wurden in Kaliumphosphat-Puffer (20 mM, pH 7.0, 0.5 M NaCl) aufgenommen, die der denaturierten Biliproteine in saurem Harnstoff (8 M, pH 1.5).

diesem Fall sind beide Zustände mäßig fluoreszierend (Tabelle 1).

HO1 gibt in vivo sein Produkt, BV, wahrscheinlich direkt an PcyA weiter („substrate channeling“).<sup>[14]</sup> Deshalb wurden die entsprechenden Gene fusioniert und das *ho1:pcyA*-Konstrukt zusammen mit einem zweiten Plasmid in *E. coli* eingeführt, welches das Apoprotein-Gen *gaf3* enthält. Diese Zellen produzieren das Chromophor tragende RGS in ähnlicher Ausbeute (70–90 %, Tabelle 1) wie die mit den getrennten Plasmiden transformierten, und die beiden Produkte sind spektroskopisch identisch. Schließlich wurde das für das Apoprotein kodierende *gaf3*-Gen über das 5'-Ende mit dem *ho1:pcyA*-Konstrukt fusioniert. *E. coli*-Zellen, die dieses Drei-Gen-Konstrukt *gaf3:ho1:pcyA* exprimieren, fluoreszieren rot (Abbildung 1) und produzieren in guter Ausbeute Chromophor tragendes RGS:HO1:PcyA (Tabelle 1). Seine spektroskopischen Eigenschaften gleichen wiederum denen des RGS (Abbildung 1b, Tabelle 1), und es behält seine Photochromie in einem PVA-Film (Abbildung 2). Auch in diesem Fall wird durch Ersatz von *pcyA* durch *hy2* ein photochromes Chromoprotein gebildet, das PΦB als Chromophor trägt und entsprechend rotverschobene, aber ansonsten vergleichbare Spektren zeigt (Tabelle S1, Abbildung S3).

Der Genfusions-Ansatz kann auch zur Bildung dauerhaft fluoreszierender Proteine nach Transformation mit einem einzigen Plasmid genutzt werden. In einem ersten Beispiel wurde das GAF3-Apoprotein durch die Chromophor-Domäne (AS 1-258) des Phycobilisom-Kern-Membran-Linkers ApcE ersetzt, welche den Chromophor autokatalytisch bindet.<sup>[15]</sup> Mit *apcE(1-258):ho1:pcyA* transformierte *E. coli*-Zellen zeigten eine stabile rote Fluoreszenz (Tabelle 1, Abbildung S4). Ein zweites dauerhaft rot fluoreszierendes Protein wurde durch Ersatz von *apcE(1-258)* durch *apcA* erhalten, welches die  $\alpha$ -Untereinheit des Allophycocyanins kodiert (Tabelle 1).

Bei Nutzung des ubiquitären endogenen Häms als Ausgangsprodukt des Bilin-Chromophors reicht offensichtlich die Einführung eines einzigen Multigen-Konstrukts aus, um in



**Abbildung 2.** Photochromie von His<sub>6</sub>-markiertem PCB-GAF3:HO1:PcyA in *E. coli*-Zellen und im PVA-Film. Die Fluoreszenzmikrophotos wurden a) nach Belichtung mit grünem Licht (Bandenfilter 540–555 nm) unter Verwendung eines 665–715 nm-Fluoreszenzfilters aufgenommen, b) nach Belichtung mit rotem Licht (640–660 nm) unter Verwendung eines 685–735 nm-Fluoreszenzfilters und c) nach einer weiteren Belichtung mit Grünlicht (wie oben). Die lächelnde Sonne (d) wurde mit einem roten Laser-Pointer (650 nm) auf einen PCB-GAF3:HO1:PcyA-haltigen PVA-Film gezeichnet; das Bild wurde durch Grünlicht gelöscht (e) und dann erneut mit dem Laser-Pointer gezeichnet (f).

situ chromophorylierte Biliproteine zu erzeugen, welche, abhängig vom verwendeten Apoprotein, entweder dauerhaft fluoreszieren oder durch Licht reversibel zwischen zwei Zuständen schaltbar sind. Obwohl der Chromophor, anders als bei den Proteinen vom GFP-Typ, nicht aus dem Protein gebildet wird,<sup>[1]</sup> sollten Konstrukte dieses Typs als Reporter in vielen Organismen einsetzbar sein. In *E. coli* gab es keine Hinweise auf Störungen durch „Abzweigen“ des Häm für die Biogenese des Bilin-Chromophors; aber dies müsste von Fall zu Fall abgesichert werden.

In RGS wird die rote Fluoreszenz durch sättigende Rot- und Grünlicht-Pulse an- bzw. wieder abgeschaltet. Da die spektrale Überlappung der beiden Zustände sehr gering ist ( $\Delta\lambda = 110$  nm), können Breitbandfilter für die Belichtung und Detektion genutzt werden. In vielen Phytochromen und Cyanobacteriochromen ist einer der Zustände (in der Regel P<sub>fr</sub> mit dem 15E-Chromophor) metastabil und revertiert auch thermisch, was für bestimmte Anwendungen in der Mikroskopie vorteilhaft ist.<sup>[3]</sup> Mit den Chromophor-Domänen bekannter Cyanobacteriochrome und Phytochrome wird der sichtbare Spektralbereich nahezu vollständig abgedeckt (430–750 nm),<sup>[7,9]</sup> und Erweiterungen dieses Bereichs sind durch neue natürliche Chromoproteine, durch Mutagenese der Apoproteine oder durch Auswahl geeigneter Reduktasen zu erwarten. Dadurch sind auch weitergehende Änderungen der photophysikalischen Eigenschaften möglich, z. B. der Fluoreszenzausbeuten in den beiden Zuständen, der Richtung und Stärke der spektralen Verschiebungen von Absorption und Fluoreszenz oder der thermischen Stabilität des 15E-Zustands (Tabelle 1).

Derzeit erfolgt die Mutagenese von Biliproteinen im Hinblick auf erwünschte spezielle biophysikalische Eigenschaften noch weitgehend nach dem Prinzip von Versuch und Irrtum, aber bereits jetzt sind einige Prinzipien erkennbar, und es ist zu erwarten, dass sich der gezielte Zugang in naher Zukunft verbessern wird. Eine offensichtliche Erweiterung ist die Herstellung von Biliproteinen, welche den Chromophor

nicht autokatalytisch binden, was durch die zusätzliche Fusion von Lyasen zur Anknüpfung der Chromophore möglich sein dürfte.<sup>[12]</sup> Nicht zuletzt sind fusionierte Biosynthese-Gene wie *ho1:pcyA* auch interessant für einen Synthonansatz beim Studium der Phycobilisom-Assemblierung.

## Experimentelles

Das *gaf3*-DNA-Fragment von *slr1393* wurde aus genomischer DNA von *Synechocystis* sp. PCC6803 durch PCR vervielfältigt und entweder in pET30 inseriert oder in pCDF für die Cotransformation mit pET-*ho1:pcyA*. Das *Arabidopsis*-Gen *hy2* wurde von Tair (<http://www.arabidopsis.org/>) bezogen und zur Erzeugung von pACYC-*ho1-hy2* in pACYC-*ho1*<sup>[16]</sup> subkloniert. Zur Überexpression wurde *E. coli* Tuner (DE3) (Novagen) mit den Expressionsvektoren transformiert. Die Sequenzen aller Konstrukte wurden verifiziert.

Mikrophotos von Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen, das reversible Schalten zwischen den Zuständen des Chromoproteins erfolgte über die Mikroskopbeleuchtung mit roten (640–660 nm) oder grünen Bandenfiltern (540–555 nm).

Die His<sub>6</sub>-markierten Chromoproteine wurden durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie über chelatisierende Sepharose gereinigt. Bei der spektroskopischen Bestimmung des Chromophorgehalts in saurem Harnstoff (8 M, pH 1.5) wurde der Extinktionskoeffizient von Protein-gebundenem PCB<sup>[17]</sup> zugrundegelegt, bei der Bestimmung der Fluoreszenzquantenausbeute diente Phycocyanin aus *Nostoc* als Standard.<sup>[18]</sup> Photoreaktionen wurden mithilfe einer faseroptischen Kaltlichtquelle und geeigneter Interferenzfilter induziert.<sup>[19]</sup>

Chromoproteine wurden in PVA-Filmen durch Mischen einer wässrigen PVA-Lösung (7 %) mit dem gleichen Volumen einer Probenlösung (0.7 mM in 20 mM KPB, 0.5 M NaCl, pH 7.0) immobilisiert.<sup>[20]</sup>

Weitere Details sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 23. Februar 2010

Online veröffentlicht am 25. Juni 2010

**Stichwörter:** Cyanobacteriochrom · Fluoreszenzmarkierung · Häm-Oxygenase · Photochromie · Schaltbare Fluoreszenz

- [1] R. Y. Tsien, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 5721; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 5612.
- [2] E. A. Souslova, D. M. Chudakov, *Microsc. Res. Tech.* **2006**, *69*, 207.
- [3] M. Andresen, A. C. Stiel, J. Fölling, D. Wenzel, A. Schönle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, S. Jakobs, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1035.
- [4] F. Zhang, L. P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, *Nature* **2007**, *446*, 633.
- [5] R. H. Kramer, D. L. Fortin, D. Trauner, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2009**, *19*, 544.
- [6] H. Scheer in *Light Reaction Path of Photosynthesis* (Hrsg.: F. K. Fong), Springer, Berlin, **1982**, S. 7–45.
- [7] Y. Hirose, T. Shimada, R. Narikawa, M. Katayama, M. Ikeuchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9528.
- [8] S. E. Braslavsky, A. R. Holzwarth, K. Schaffner, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 670; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 656.
- [9] S.-L. Tu, J. C. Lagarias in *Handbook of Photosensory Receptors* (Hrsg.: W. R. Briggs, J. L. Spudis), Wiley, Weinheim, **2005**, S. 121–149.
- [10] G. A. Gambetta, J. C. Lagarias, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 10566.
- [11] A. J. Tooley, A. N. Glazer, *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 4666.

- [12] H. Scheer, K.-H. Zhao, *Mol. Microbiol.* **2008**, 68, 263.
  - [13] N. Blot, X. J. Wu, J. C. Thomas, J. Zhang, L. Garczarek, S. Böhm, J. M. Tu, M. Zhou, M. Ploscher, L. Eichacker, F. Partensky, H. Scheer, K. H. Zhao, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 9290.
  - [14] T. Dammeyer, N. Frankenberg-Dinkel, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, 7, 1121.
  - [15] K. H. Zhao, P. Su, S. Böhm, B. Song, M. Zhou, C. Bubenzer, H. Scheer, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, 1706, 81.
  - [16] K.-H. Zhao, P. Su, J. M. Tu, X. Wang, H. Liu, M. Plösch, L. Eichacker, B. Yang, M. Zhou, H. Scheer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 14300.
  - [17] A. N. Glazer, S. Fang, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 659.
  - [18] Y. A. Cai, J. T. Murphy, G. J. Wedemayer, A. N. Glazer, *Anal. Biochem.* **2001**, 290, 186.
  - [19] M. Storf, A. Parbel, M. Meyer, B. Strohm, H. Scheer, M. Deng, M. Zheng, M. Zhou, K.-H. Zhao, *Biochemistry* **2001**, 40, 12444.
  - [20] W. W. Wang, G. K. Knopf, A. S. Bassi, *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2008**, 7, 249–256.
  - [21] Unveröffentlichte Ergebnisse.
-