

Liane Jatsch
Dr. med.

Green Fluorescent Protein (GFP), ein Molekül mit Eigenfluoreszenz ~ zur Etablierung eines *in vivo* Reporters für zell- und molekularbiologische Untersuchungen

Geboren am 12.04.1967 in Ulm
Reifeprüfung am 21.05.1990 in Heidelberg
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis SS 2000
Physikum am 24.08.1993 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 26.10.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. med. G. Darai

Seit einigen Jahren steigt quer durch alle naturwissenschaftlichen Fachbereiche das Interesse für ein kleines autofluoreszierendes Protein der Tiefseequalle *A. victoria*: **GFP** („*Green fluorescent protein*“).

Das rekombinante Protein (238 AS; 27 kDa) zeigt eine äußerst kompakte Tertiärstruktur, die ihm eine hohe Stabilität gegenüber den unterschiedlichsten chemischen und physikalischen Einflüssen verleiht. Für seine Biosynthese benötigt es keine speziesspezifischen Substrate, weshalb es in den verschiedensten heterologen Systemen exprimierbar ist. Durch temperatursensitive, posttranslationale Modifikation des Chromophors und verschiedene intramolekulare, nicht-kovalente Bindungen und Wechselwirkungen entsteht ein Fluorophor, welches für die Autofluoreszenz des Proteins mit seinem spezifischen Absorptions- und Emissionsspektrum verantwortlich ist. Das GFP eignet sich als Reportermolekül für *in vitro* und *in vivo* Studien von Zellprozessen ohne vorherige Fixierung der Zellen oder Substratzugabe, wie das bei den bisher üblichen Systemen der Fall ist. Neben dem zuerst beschriebenen und allgemein als wt bezeichneten GFP stehen heute eine Vielzahl von Mutanten mit verbesserten biochemischen und spektralen Eigenschaften zur Verfügung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten wir ein Expressionssystem, bei dem das wt-GFP und die stärker fluoreszierende Mutante *S65T* als Reporter unter der Kontrolle eines humanen Hitzeschockpromotors (humaner hsp70B-Promotor) stehen, um auf diese Weise die Proteinexpression zeitlich zu kontrollieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, ein beliebiges Protein in Fusion mit dem C-terminalen Ende des GFP's zu exprimieren. Auf der Basis des käuflichen Vektors pGFP-C1 entstanden die Plasmide pC hsp G und pC hsp G Δ für die zytoplasmatische, und das Plasmid pC hsp HGN, das N-terminal ein Motiv für sechs Histidine („H“) und C-terminal eine Kernlokalisationssequenz („N“) enthält, für die nukleäre wt-GFP-Expression. Auf der Basis des Vektors pBL entstand das Plasmid pB hsp HG(N), das aufgrund einer fehlerhaften PCR-Amplifikation des Ursprungsplasmids eine nicht funktionsfähige Kernlokalisationssequenz enthält und bei dem wir somit eine zytoplasmatische Expression erwarteten. Für die funktionellen Studien konnten wir parallel zu diesen Konstrukten auf vergleichbare Plasmide, die unter der Kontrolle eines CMV-Promotors stehen, zurückgreifen. Die Sequenzierung des hsp-Promotors zeigte die fehlerfreie Sequenz der für die Aktivierung notwendigen vier Hitzeschock-Elemente. Zum Austesten der Bedingungen zur

Promotoraktivierung etablierten wir die hsp-Konstrukte pB hsp Luc (HE) und pB hsp Luc (S), in denen statt des GFP's das Reportermolekül Luziferase inkloniert wurde und mit denen bei der gewählten Hitzeinduktionsmethode (3 Std, 42,5°C) eindeutige Luziferase-Aktivitäten als Beweis für die Promotoraktivierung nachweisbar waren.

Untersuchungen zur *in vivo* GFP-Fluoreszenz in Säugerzellen (*HeLa*), die mit den hsp-wt-GFP-Plasmiden bzw. CMV-wt-GFP-Plasmiden transfiziert worden waren, war bei einer Kulturtemperatur von 30°C sehr schwach, bei 37°C war sie nicht eindeutig nachweisbar. Angaben zur Lokalisation der Fluoreszenz innerhalb der Zelle waren nicht möglich. Auch die Anzahl der fluoreszierenden Zellen war mit weniger als 2% aller Zellen extrem gering. Identische Studien mit dem CMV-S65T-GFP-Plasmid zeigten für beide Kulturtemperaturen eine starke, scharf abgrenzbare Fluoreszenz von Zellkern und Zytoplasma, wohingegen das vergleichbare hsp-S65T-GFP-Konstrukt nach Transfektion nicht nachweisbar war.

Da unser Fluoreszenzmikroskop mit dem Filter HQ-GFP der Fa. Olympus nicht den in der Literatur angegebenen Anforderungen für eine optimale Fluoreszenz-Detektion entspricht, entwickelten wir ein *in vitro* GFP-Testsystem, um eine stärkere GFP-Expression in den Zellen nachzuweisen, als das nach den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu vermuten war. Unter den gewählten Versuchsbedingungen war ein Nachweis des exprimierten Proteins in Zellextrakten mittels Antikörpern gegen GFP oder den His-Rest im Western-Blot nicht möglich. Mittels der indirekten Immunfluoreszenz konnten wir in parallelen Experimenten für beide Kulturtemperaturen in deutlich mehr Zellen als zuvor mit der direkten Fluoreszenz eine starke Expression des Fusionsproteins im Zytoplasma nachweisen. Da aber der uns zur Verfügung stehende polyklonale anti-GFP Antikörper bei dieser Methode unspezifisch reagierte, konnte dieser Nachweis nur indirekt über den His-Anteil erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß eine Expression des GFP's in Säugerzellen unter der Kontrolle des humanen Hitzeschockpromotors hsp70B grundsätzlich möglich ist, daß aber die hier gewählten Versuchsbedingungen für den experimentellen Einsatz noch optimiert werden können. Hierzu gehören apparative Verbesserungen wie die Ausstattung des Fluoreszenzmikroskops mit inzwischen kommerziell erhältlichen Filterrädern, um für die jeweils verwendete GFP-Mutante die bestmögliche Wahl eines Exzitations- und Emissionsfilter-Paars zu ermöglichen. Des weiteren bieten neuartige GFP-Mutante mit erhöhter Translationsrate und Löslichkeit wie z.B. *EGFP* und erhöhter Temperaturrestistenz wie z.B. *GFP5* oder *SI47P* vielfältige Möglichkeiten. Die Klonierung sollte nach dem hier verwendete Konzept durchgeführt werden, d.h. nacheinander hsp70B-Promotor / codierende Sequenz für 6 Histidine / GFP-Mutante / Kernlokalisationssequenz, wobei die Kernlokalisationssequenz unter Erhalt eines Stop-Codons herausgeschnitten werden kann. In der gleichen Art und Weise sollten zwei Plasmide entstehen, die statt dem hsp-Promotor einen CMV-Promotor, evtl. in Verbindung mit einem SP6 RNA Polymerase Promotor, enthalten. Damit stünden vier Plasmide zur Verfügung, die die Möglichkeit bieten, in vergleichenden Studien die Expression eines Fusionsproteins sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern *in vivo* zu verfolgen.