



HEINRICH HEINE  
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Charakterisierung und Optimierung von FMN-bindenden  
Fluoreszenzproteinen als molekulare Reporterproteine**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Marcus Wingen**

aus Solingen

Düsseldorf, November 2014

aus dem Institut für Molekulare Enzymtechnologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Korreferent: Prof. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2015

## Veröffentlichungen während der Promotion

**Wingen, M., Potzkei, J., Endres, S., Casini, G., Rupprecht, C., Fahlke, C., Krauss, U., Jaeger, K. E., Drepper, T. & Gensch, T. (2014).** The photophysics of LOV-based fluorescent proteins - new tools for cell biology. Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology **13**, 875-883.

**Torra, J., Burgos-Caminal, A., Endres, S., Wingen, M., Drepper, T., Gensch, T., Ruiz-González, R., and Nonell, S. (2014).** Singlet oxygen photosensitisation by the fluorescent protein Pp2FbFP L30M, a novel derivative of *Pseudomonas putida* flavin-binding Pp2FbFP. Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology; *accepted*.

## Posterpräsentationen auf internationalen Tagungen

**Wingen, M., Potzkei, J., Hausmann, S., Drepper, T. and Jaeger, K.-E. (2012):** Enhanced FMN-binding fluorescent proteins. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Tübingen.

**Drepper T., Potzkei J., Rupprecht C., Endres S., Wingen M. and Jaeger, K.-E. (2013):** Novel fluorescent reporter proteins for the *in vivo* analysis of biological processes under O<sub>2</sub> limitation. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Bremen.

## Vorträge während der Promotion

**Drepper T., Potzkei J., Endres S., Wingen M., Krauss U. and Jaeger K.-E. (2012):** Novel fluorescent proteins for the *in vivo* analysis of biological processes. Jülich Biotech Day, Forschungszentrum Jülich, Jülich.

**Drepper, T., Potzkei, J., Rupprecht, C., Endres, S., Wingen, M., Heck, A., Gensch T. and Jaeger, K.-E. (2014).** Novel flavin-binding fluorescent proteins for the *in vivo* analysis of biological processes Biosensors 2014, Melbourne, Australia

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die Überlassung des interessanten wissenschaftlichen Themas, der Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich danke meinen Kooperationspartnern Dr. Thomas Gensch, Dr. Joachim Granzin, Dr. Renu Batra-Safferling, Dr. Georg Schaumann, Dr. Bernd König, Dr. Angel Angelov und Dr. Kersten Rabe für die gute Zusammenarbeit.

Bei meiner Bachelor-Studentin Rebecca Drisch bedanke ich mich für die gute Arbeit im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Drepper für die engagierte und freundliche Betreuung, für die anregenden Diskussionen und die vielen wertvollen Ratschläge während meiner Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des IMET, insbesondere den Kollegen der AG Drepper und des Büros 501, für die tolle Arbeitsatmosphäre.

## Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen während der Promotion .....	II
Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis .....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xi
Abkürzungen .....	xii
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Reporterproteine .....	2
1.2 Enzyme als Reporterproteine .....	3
1.3 Fluoreszenzproteine .....	4
1.3.1 GFP-Derivate und -Homologe .....	5
1.3.2 FMN bindende Fluoreszenzproteine .....	9
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Bakterienstämme .....	16
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	16
2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide.....	16
2.2.1 Vektoren.....	16
2.2.2 Rekombinante Plasmide .....	17
2.3 Oligonukleotide und Sequenzierung .....	21
2.3.1 Verwendete Oligonukleotide.....	21
2.3.2 Sequenzierungen .....	28
2.4 Nährmedien .....	28
2.5 Antibiotika .....	29
2.6 Enzyme.....	29

2.7 Chemikalien .....	30
2.8 Puffer und Lösungen.....	32
2.8.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese.....	32
2.8.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.....	33
2.8.3 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung von Proteinen mittels Ni <sup>2+</sup> -NTA-Säulen	33
2.8.4 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ..	34
2.8.5 Puffer und Lösungen für die Lagerung von Proteinen und die Durchführung von <i>in vitro</i> Versuchen .....	35
2.8.6 Puffer für <i>in vivo</i> Fluoreszenzmessungen .....	36
2.9 Reaktions- und Nachweis – „Kits“ .....	37
2.10 Sonstige Materialien und Geräte.....	37
2.11 Mikrobiologische Methoden .....	38
2.11.1 Mikrobiologische Anzucht von <i>E. coli</i> .....	38
2.11.2 Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	38
2.11.3 Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in <i>E. coli</i> CmpX131 mit Roseoflavin als Chromophor .....	39
2.11.4 Herstellung chemisch transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen (nach Hanahan, 1983) .....	39
2.11.5 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA .....	40
2.12 DNA-Techniken .....	40
2.12.1 Präparation von Plasmid-DNA .....	40
2.12.2 DNA-Konzentrationsbestimmung .....	40
2.12.3 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (nach Smith & Birnstiel, 1976) .....	41
2.12.4 Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989) .....	41
2.12.5 Elution von DNA aus Agarosegelen (nach Vogelstein & Gillespie, 1979) .....	42

2.12.6 Ligation von DNA-Fragmenten (nach Dugaiczky <i>et al.</i> , 1975) .....	42
2.12.7 Fehlerhafte Amplifizierung von DNA mittels Error Prone Polymerasekettenreaktion (epPCR).....	42
2.12.8 Erzeugung von Punktmutationen mittels Overlap extension PCR (nach Ho <i>et al.</i> , 1989) .....	43
2.13 Protein Techniken.....	45
2.13.1 Aufreinigung His-getaggtter Proteine mittels Ni-NTA-Matrix (nach Crowe <i>et al.</i> , 1994) .....	45
2.13.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (nach Laemmli, 1970).....	46
2.13.3 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (nach Merrill, 1990).....	46
2.13.4 Chromophoranalyse mittels HPLC .....	46
2.14 Optische Methoden.....	47
2.14.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976) .....	47
2.14.2 <i>Screening</i> auf erhöhte <i>in vivo</i> Fluoreszenz von FbFPs auf Agarplatten.....	47
2.14.3 Photometrische Fluoreszenzmessung .....	48
2.14.4 Bestimmung der Quantenausbeute .....	48
2.14.5 Berechnung des Extinktionskoeffizienten .....	49
2.14.6 Berechnung der Cofaktor-Beladung .....	49
2.14.7 Messung der Photostabilität von FbFPs .....	50
2.15 Computerprogramme und Datenbanken.....	51
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>
3.1 Charakterisierung bislang etablierter FbFPs.....	52
3.1.1 Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute.....	52
3.1.2 Der Extinktionskoeffizient von FbFPs .....	54
3.1.3 Die Cofaktorbeladung von FbFPs .....	56
3.1.4 Die Photostabilität der FbFPs.....	57

3.1.5 Zusammenfassung der Helligkeitsbestimmenden und photophysikalischen Eigenschaften etablierter FbFPs .....	59
3.2 Generierung neuer Varianten von FMN-bindenden Fluoreszenzproteinen .....	60
3.2.1 Erzeugung neuer Varianten von Pp2FbFP und EcFbFP durch rationales Design.....	61
3.2.2 Zufalls- und ortsgerichtete Mutagenese zur Erzeugung hellerer Varianten von EcFbFP .....	68
3.2.3 Rationales Design zur Erzeugung von rot-verschobenen FbFP-Varianten .....	75
3.3 Roseoflavin als künstlicher Chromophor in FbFPs .....	78
3.3.1 <i>Screening</i> auf Roseoflavin-bindende FbFPs mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften.....	80
3.3.2 Pp1FbFP mit Roseoflavin – die erste rot-verschobene FbFP-Variante .....	81
3.3.2.1 Identifizierung des gebundenen Flavins .....	82
3.3.2.2 Spektrale und photophysikalische Eigenschaften von Pp1FbFP mit RoFMN als Chromophor.....	84
3.3.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese von FbFPs zur Bindung von Roseoflavin.....	86
3.4 Thermostabile FbFPs von LOV-Domänen aus thermophilen Organismen.....	89
3.4.1 Suche nach LOV-Domänen in thermophilen Organismen.....	90
3.4.2 Charakterisierung der Thermostabilität .....	92
3.4.3 Charakterisierung der generellen Fluoreszenzeigenschaften .....	96
3.4.4 Verbesserung der Quantenausbeute von YNP3FbFP .....	98
3.4.5 Zusammenfassung der Eigenschaften der FbFPs aus thermophilen Organismen ..	98
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>100</b>
4.1 Die photophysikalischen Eigenschaften von FbFPs.....	101
4.1.1 Die spektralen Eigenschaften der FbFPs.....	104
4.1.2 Der Extinktionskoeffizient der FbFPs .....	105
4.1.3 Die Quantenausbeute der FbFPs .....	106
4.1.4 Die Cofaktorbeladung der FbFPs .....	107



4.1.5 Die Photostabilität der FbFPs.....	109
4.2 RoFMN bindende Fluoreszenzproteine .....	112
4.2.1 Limitierungen .....	114
4.2.2 Mögliche Anwendungen .....	115
4.2.3 Weitere Entwicklungsmöglichkeiten .....	117
4.3 Thermostabile FbFPs aus thermophilen Organismen .....	119
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>121</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>122</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>123</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>132</b>
8.1 Aminosäure-Sequenzen aller verwendeten FbFPs.....	132
8.2 Plasmidkarten .....	138
8.3 Verwendete Scripts zur Erstellung der Strukturmodelle der FbFPs.....	142
8.4 Verschiedenes.....	144

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1.1: Chromophorbildung bei GFP .....	6
Abb. 1.2: Röntgenkristallstruktur von GFP.....	7
Abb. 1.3: Flavinmononukleotid (FMN) .....	9
Abb. 1.4: Schematische Darstellung des LOV-Photozyklus.....	11
Abb. 1.5: Strukturmodell von EcFbFP.....	12
Abb. 1.6: Anregungs- und Emissionsspektren von EcFbFP und FMN .....	13
Abb. 3.1: Unterschied der Fluoreszenzemission von freiem und gebundenem FMN in EcFbFP bei thermischer Denaturierung des Proteins .....	55
Abb. 3.2: <i>In vitro</i> Photobleaching-Kinetiken von FMN und verschiedenen FbFPs .....	58
Abb. 3.3: Modellierte Struktur der Kernregion von Pp2FbFP .....	62
Abb. 3.4: Emissionsspektren von Pp2FbFP Y112 Varianten.....	64
Abb. 3.5 Emissionsspektren von Pp2FbFP Q116 Varianten .....	65
Abb. 3.6 Emissionsspektren von EcFbFP Q123 Varianten .....	66
Abb. 3.7: Strukturmodell von EcFbFP mit Aminosäureseitengruppen in direkter Nähe des Chromophors.....	69
Abb. 3.8: Beispiel zum <i>Screening</i> auf verbesserte <i>in vivo</i> Fluoreszenz auf Agarplatten.....	71
Abb. 3.9: Verteilung der Fluoreszenzintensität von EcFbFP-Varianten im <i>Screening</i> .....	72
Abb. 3.10: Strukturmodell von Pp1FbFP mit den Aminosäuren L83, L97, und I99 .....	75
Abb. 3.11: Emissionsspektren der Pp1FbFP L83, L97 und I99 Varianten.....	76
Abb. 3.12: Molekülstruktur von Riboflavin und Roseoflavin .....	78
Abb. 3.13: Vergleich der spektralen Absorptionseigenschaften von Riboflavin und Roseoflavin .....	79
Abb. 3.14: <i>In vivo</i> Emissionsspektren der auf Roseoflavinbindung untersuchten FbFPs in <i>E. coli</i> CmpX131.....	81
Abb. 3.15: Gereinigtes Pp1FbFP in Lösung.....	82
Abb. 3.16 : Chromatogramm der HPLC Analyse des Chromophors, das bei der Expression in Gegenwart von Roseoflavin von Pp1FbFP gebunden wird .....	83
Abb. 3.17: Massen- und Absorptionsspektrum der als RoFMN identifizierten Substanz .....	83
Abb. 3.18: Anregungs- und Emissionsspektren von Pp1FbFP mit dem natürlichen Chromophor (grün) und mit RoFMN (orange) .....	84

Abb. 3.19: Strukturmodell von Pp1FbFP mit M73 ..... 86

Abb. 3.20: *In vivo* Anregungs- und Emissionsspektren von Pp2FbFP I73M und EcFbFP L82M in *E. coli* Cmpx131 nach Anzucht in Gegenwart von Roseoflavin ..... 87

Abb. 3.21: Native und korrigierte Schmelzkurven verschiedener FbFPs aus thermophilen Organismen ..... 93

Abb. 3.22: 24stündiger Inkubationstest der FbFPs aus thermophilen Organismen ..... 95

Abb. 3.23: Emissionsspektren von EcFbFP und YNP3FbFP vor und nach 24stündiger Inkubation bei 60 °C ..... 95

Abb. 3.24: Photobleaching-Kinetiken der FbFPs aus thermophilen Organismen..... 97

Abb. 4.1 Spektrale Unterschiede von FbFPs und freiem FMN ..... 104

Abb. 8.1 Alignment der Aminosäure-Sequenzen der verwendeten FbFPs..... 136

Abb. 8.2: *In vivo* Photobleaching von EcFbFP und der Q123T Mutante auf Agarplatten ..... 144

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 2.1: Genotypen der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme .....	16
Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren .....	16
Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide .....	17
Tab. 2.4: Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide .....	21
Tab. 2.5: Verwendete Antibiotika mit der für die jeweilige Anzucht von <i>E. coli</i> empfohlenen Konzentrationsangabe .....	29
Tab. 2.6: Verwendete Enzyme und deren Bezugsfirma .....	29
Tab. 2.7: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsfirma.....	30
Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Reaktions- und Nachweis- „Kits“ .....	37
Tab. 2.9: Übersicht sonstiger verwendeter Materialien und Geräte .....	37
Tab. 3.1: Zusammenfassung der helligkeitsbestimmenden und photophysikalischen Eigenschaften etablierter FbFPs.....	59
Tab. 3.2: Ausgewählte Daten zu Pp2FbFP Varianten aus der vorangegangenen Arbeit (Wingen, Diplomarbeit 2011).....	61
Tab. 3.3: Eigenschaften der Pp2FbFP Varianten Y112L und Q116V sowie EcFbFP Q123T im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp .....	67
Tab. 3.4: Eigenschaften der <i>in vitro</i> charakterisierten EcFbFP-Varianten, die durch epPCR und Sättigungsmutagenese erzeugt wurden .....	73
Tab. 3.5: Photophysikalische Eigenschaften von Pp1FbFP mit RoFMN .....	85
Tab. 3.6: Ausgewählte Daten der LOV-Domänen aus thermophilen Organismen .....	90
Tab. 3.7: Zusammenfassung der Eigenschaften der FbFPs aus thermophilen Organismen....	99
Tab. 4.1: Übersicht der <i>in vitro</i> bestimmten Eigenschaften von FbFPs und Flavinen .....	102
Tab. 8.1 Identitäts-Matrix der Aminosäure-Sequenzen der verwendeten FbFPs .....	137

**Abkürzungen**

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
AIM	Autoinduktionsmedium
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECFP	enhanced cyan fluorescent protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EPG	Eppendorfgesäß
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FP	Fluoreszenzprotein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
h	Stunde(n)

---

His <sub>6</sub>	6-Histidin-Tag
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
IMET	Institut für Molekulare Enzymtechnologie
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
L	Liter
LB	Luria-Bertani Broth
LOV	Light Oxygen Voltage
M	mol/Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoterminus
o.D.580	optische Dichte bei 580 nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde(n)
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Tab.	Tabelle

T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
YFP	yellow fluorescent protein
λ	Wellenlänge

## 1. Einleitung

In der heutigen Wissenschaft spielt die Erforschung biologischer Systeme auf zellulärer und molekularer Ebene eine große Rolle. Dies gilt sowohl für die Medizin und die Entwicklung neuer Behandlungsmethoden, als auch für die industrielle Biotechnologie und die Entwicklung neuer Verfahren zur Herstellung hochwertiger Produkte. Mit modernen Sequenzierungsmethoden können heutzutage ganze Genome innerhalb kurzer Zeit sequenziert werden. Die Aufklärung der Funktion der dabei identifizierten Gene bzw. der codierten Proteine dauert hingegen wesentlich länger. Bis heute gibt es von keinem Lebewesen einen kompletten „Schaltplan“, der den Aufbau und die Funktion aller zellulären Komponenten beinhaltet. Um einen solchen Plan zu erstellen, benötigt man eine Reihe verschiedener Methoden und Werkzeuge. Eine Klasse dieser Werkzeuge sind sogenannte Reporterproteine, die sich dadurch auszeichnen, dass sie ein messbares Signal erzeugen, das Rückschlüsse auf die Genexpression, Proteinlokalisierung oder auch Protein-Protein-Interaktion erlaubt. Eine Gruppe dieser Reporterproteine sind Fluoreszenzproteine. Dies sind Proteine, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer anderen, längeren Wellenlänge emittieren. Einige davon kommen natürlich vor und wurden über fast zwei Jahrzehnte hinweg optimiert, um Varianten mit neuen bzw. verbesserten Eigenschaften hervorzubringen. Die als Reporterproteine verwendeten Fluoreszenzproteine können dabei wiederum in zwei Klassen aufgeteilt werden: (1) Die Klasse der GFP-ähnlichen Fluoreszenzproteine mit dem „Grün Fluoreszierenden Protein“ (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* und seinen zahlreichen Derivaten und Homologen aus verschiedenen *Anthozoa* Spezies, sowie (2) FMN-bindende Fluoreszenzproteine (FbFPs), die aus Blaulichtrezeptoren von Bakterien und Pflanzen entwickelt wurden.

In dieser Arbeit wurde eine Reihe bestehender FbFPs charakterisiert und durch Mutagenese verändert um Varianten mit neuen Eigenschaften hervorzubringen. Zudem wurden mehrere neue FbFPs aus weiteren Blaulichtrezeptoren generiert.



## 1.1 Reporterproteine

Reporterproteine werden in der Grundlagenforschung und auch in der Biotechnologie benutzt um zelluläre Strukturen und Prozesse zu untersuchen. Dazu müssen sie eine Eigenschaft bzw. Aktivität aufweisen, die mit möglichst hoher Genauigkeit nachweisbar ist. Um die Spezifität des Signals zu gewährleisten, darf die Zelle diese Aktivität nicht von sich aus aufweisen. Des Weiteren dürfen sie die Physiologie der Zelle nicht beeinflussen oder gar eine toxische Wirkung auf diese haben (March *et al.*, 2003; Misteli & Spector, 1997).

Bei der Charakterisierung der Genexpression kann das Reporter-gen hinter den Promotor des zu untersuchenden Gens kloniert werden. Dadurch weist dieser Reporter das gleiche Expressionsmuster auf, wie das sogenannte Zielgen. Bei Prokaryoten ist auch die Erzeugung einer Transkriptionsfusion möglich, bei der das Reporter-gen mit einer eigenen Ribosomenbindestelle hinter dem Zielgen auf der gleichen mRNA codiert ist. In beiden Fällen liegen die Proteine getrennt voneinander in der Zelle vor. Zur Proteinlokalisierung hingegen ist es erforderlich, eine Translationsfusion zu generieren, bei der das Zielgen und das Reporter-gen im selben Leserahmen und ohne Stopp-Codon dazwischen auf der mRNA vorliegen, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird. Je nach Zielprotein kann eine N- oder C-terminale Fusion besser funktionieren. Um eine korrekte Faltung zu gewährleisten, ist es zudem oftmals erforderlich, die beiden Proteine über einen sogenannten Linker, bestehend aus 2-10 Aminosäuren, miteinander zu verbinden (Miyawaki *et al.*, 2003; Snapp, 2005). Dieser verhindert die ungewünschte Wechselwirkung von angrenzenden Sekundärstrukturelementen.

## 1.2 Enzyme als Reporterproteine

Enzyme waren die ersten Reporterproteine und werden seit Jahrzehnten als solche verwendet. Die große Anzahl bekannter Enzyme und (modifizierter) Substrate stellt eine gute Basis hierfür dar. Welches Enzym für das jeweilige Experiment geeignet ist, hängt dabei stark von dem zu untersuchenden Organismus und der Fragestellung ab.

Im Folgenden werden einige der gängigsten Enzyme kurz erläutert. Eines der bekanntesten Reporterproteine ist die  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym kann  $\beta$ -glykosidische Bindungen von Disacchariden hydrolytisch spalten. Da die bei der Reaktion entstehenden Monosaccharide allerdings nicht direkt beobachtet werden können, wird für Nachweisreaktionen ein künstliches Substrat verwendet, bei dessen enzymatischer Umsetzung eines der entstehenden Produkte photometrisch nachweisbar ist. Als Substrat kann z.B. ONPG (*o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) verwendet werden, bei dessen Spaltung ein gelber Farbstoff gebildet wird (Letunova *et al.*, 1981). Bei der Spaltung von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-Indoxyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid) wird hingegen ein blauer Farbstoff frei (An *et al.*, 1982).

Die *sekretierte alkalische Phosphatase* (SEPA) ist ein Enzym, das, wie der Name bereits andeutet, ins Medium sekretiert wird und Phosphorsäureester hydrolysiert. Zur Quantifizierung stehen hier ebenfalls verschiedene Substrate zur Verfügung. Die Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) erlaubt einen einfachen Farbnachweis der Produktbildung (McComb & Bowers, 1972), während D-Luziferin-O-Phosphat in Verbindung mit einer *Luciferase* einen hochsensitiven Lumineszenztest ermöglicht (Miska & Geiger, 1987).

Weitere Enzyme, die als Reporterproteine verwendet werden, sind u.a. die  $\beta$ -Glucoronidase (Schmitz *et al.*, 1990), die *Chloramphenicol-Acetyltransferase* (CAT) (Gorman *et al.*, 1982), die *Leuchtkäfer-Luciferase* (de Wet *et al.*, 1987), oder auch das humane Wachstumshormon (hGH) (Selden *et al.*, 1986).

### 1.3 Fluoreszenzproteine

Fluoreszenzproteine sind Proteine, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer längeren Wellenlänge in Form von Fluoreszenz emittieren. Gegenüber Enzymen haben sie damit den großen Vorteil, dass sie kein Substrat benötigen und daher mit relativ geringem Arbeits- und Kostenaufwand quantitativ nachweisbar sind. Da nur sehr wenige Organismen von sich aus über Fluoreszenzproteine verfügen, können sie in den allermeisten Organismen spezifisch eingesetzt werden. Der Nachteil besteht in der geringeren Sensitivität, da das Signal nicht, wie bei der Enzym-vermittelten Substratumsetzung, amplifiziert wird.

Die Fusion des Fluoreszenzproteins mit dem Zielprotein erlaubt es zudem, die Lokalisation dieser Proteine innerhalb der Zelle oder eines Gewebes zu untersuchen, sowie die Dynamik zellulärer Kompartimente sichtbar zu machen (Davis *et al.*, 1995; Gerdes & Kaether, 1996; Tsien, 2009; Voss *et al.*, 2013). Ein weiterer Vorteil gegenüber Enzymen besteht in der nicht-invasiven Detektion, da keine Substratzugabe oder ein Zellaufschluss notwendig sind. Bei einer Bestrahlung mit niedrigen Lichtintensitäten kann die Fluoreszenz somit qualitativ und quantitativ in Echtzeit erfasst werden, ohne das Wachstum oder den Stoffwechsel der Zellen zu beeinflussen. Bei der 4D Mikroskopie (über drei räumliche Achsen und die Zeit) können somit dynamische Prozesse wie die z.B. die Mitose oder auch die Aggregation von Proteinen in Einschlusskörpern dreidimensional dargestellt und strukturelle Änderungen über die Zeit genau verfolgt werden (Gerlich *et al.*, 2001; Lee & Kang, 2012; Spokoini *et al.*, 2013).

Mit Hilfe moderner, supraauflösender Mikroskopiemethoden (engl. „*super resolution microscopy*“) können einzelne Fluoreszenzproteine (auch an Zielproteine fusioniert) innerhalb einer Zelle mit einer Auflösung von bis zu ca. 30 nm detektiert werden (Chozinski *et al.*, 2014; Durisic *et al.*, 2014). Zu diesen Methoden zählen u.a. die „*stimulated emission depletion microscopy*“ (STED) (Klar *et al.*, 2000), die „*stochastic optical reconstruction microscopy*“ (STORM) (Rust *et al.*, 2006) und die „*dual color localisation microscopy*“ (2CLM) (Gunkel *et al.*, 2009).

Die Interaktion zweier Proteine kann über den „Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer“ (FRET) nachgewiesen werden. Dazu werden zwei Fluoreszenzproteine benötigt, bei denen sich das Emissionsspektrum des ersten Proteins, mit dem Anregungsspektrum des zweiten überschneidet (Mitra *et al.*, 1996). Befinden sich diese beiden Proteine nahe beieinander, wird bei Anregung des ersten Fluoreszenzproteins, des sogenannten Donors, ein Teil der

normalerweise als Fluoreszenz emittierten Energie strahlungsfrei (hauptsächlich über Dipol-Dipol Wechselwirkungen) an das zweite Fluoreszenzprotein weitergegeben. Dieser Akzeptor wird dadurch angeregt und fluoresziert (Chapman *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 1996; Takanishi *et al.*, 2006). Die nötige Distanz und die Energietransferrate wurde erstmals von Theodor Förster beschrieben (Förster, 1948), weshalb FRET auch oft als „Förster Resonanz Energie Transfer“ bezeichnet wird.

Fluoreszenzproteine eignen sich sehr gut für Analysen mittels Flusszytometrie. Dabei werden die Zellen in einem feinen Wasserstrahl vereinzelt, wobei sich winzige Tropfen bilden, die jeweils eine Zelle enthalten. Diese Tropfen passieren einen Laserstrahl, durch den die Fluoreszenz angeregt wird, die dann von einem Detektor gemessen werden kann. Mit dieser Methode kann z.B. die Verteilung der Fluoreszenz innerhalb einer Zellpopulation bestimmt werden (Lybarger *et al.*, 1996; Ropp *et al.*, 1995; Yang & Withers, 2009). Außerdem können einzelne Zellen durch eine Weiterentwicklung dieses Systems, dem „*fluorescence activated cell sorting*“ (FACS) von der Population getrennt und nach ihren Fluoreszenzeigenschaften sortiert werden (Carter *et al.*, 2013; Winson & Davey, 2000). Dabei werden die Wassertropfen durch ein elektrisches Feld aus dem Strahl abgelenkt und getrennt aufgefangen, wobei das elektrische Feld von der Software in Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften verändert wird. Diese Technik kann auch benutzt werden, um hellere Varianten von mutierten Fluoreszenzproteinen zu identifizieren und zu isolieren (Cormack *et al.*, 1996). Das Verfahren zeichnet sich dabei durch einen sehr hohen Durchsatz bei verhältnismäßig geringem Arbeitsaufwand aus.

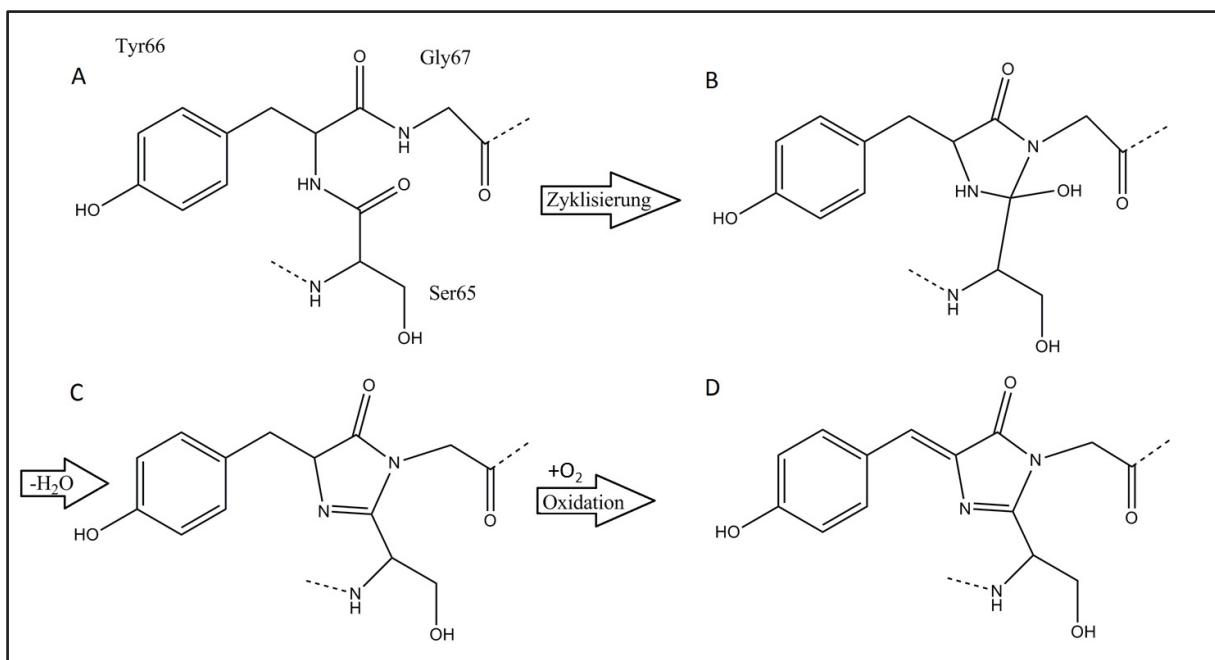
### **1.3.1 GFP-Derivate und -Homologe**

Das „grün fluoreszierende Protein“ (GFP) war das erste als Reporterprotein verwendete Fluoreszenzprotein. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und wurde erstmal von Osamu Shimomura im Jahr 1962 im Zusammenhang mit Aequorin beschrieben, das ebenfalls aus dieser Qualle stammt (Shimomura *et al.*, 1962). Erstmals isoliert und charakterisiert wurde das Protein 1974. GFP absorbiert blaues Licht und hat ein Hauptabsorptionsmaximum bei  $\lambda = 400$  nm und ein weiteres, schwächeres bei  $\lambda = 480$  nm. Es emittiert grünes Licht mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 509$  nm und einer Schulter bei  $\lambda = 540$  nm. Die Quantenausbeute ( $\Phi_F$ ) beträgt 0,72 (Morise *et al.*, 1974).

Das Gen dieses 238 Aminosäuren langen Proteins (ca. 27 kDa) wurde erstmals 1992 isoliert (Prasher *et al.*, 1992). Die erste Demonstration von GFP als Reporterprotein fand im Jahr 1994 statt. Dabei wurde gezeigt, dass GFP auch in *Escherichia coli* und *Caenorhabditis elegans* fluoresziert und keine externen Substrate oder Cofaktoren benötigt (Chalfie *et al.*, 1994). Weitere Tests erfolgten wenige Zeit später in Modellorganismen wie dem Zebrafisch (*Danio rerio*) (Amsterdam *et al.*, 1995), der Taufliege *Drosophila* (Brand, 1995) sowie in Pflanzen (Baulcombe *et al.*, 1995) und humanen Zelllinien (Kaether & Gerdes, 1995) und verliefen alle erfolgreich.

Der Chromophor (ein 4-(*p*-hydroxybenzyliden)-imidazolidin-5-on) wird von dem Protein autokatalytisch durch die Zyklisierung und anschließende Oxidation der Aminosäuren S65, Y66 und G67 gebildet. Der Oxidationsschritt, bei dem molekularer Sauerstoff benötigt wird, ist dabei essentiell, damit der Chromophor fluoreszenzaktiv wird (Heim *et al.*, 1994).

Die Chromophorbildung ist schematisch in Abbildung 1.1 dargestellt.



**Abb. 1.1: Chromophorbildung bei GFP** (nach Cubitt *et al.*, 1995). Bei der Zyklisierung erfolgt ein nukleophiler Angriff der Aminogruppe von G67 auf die Carboxylgruppe von S65 mit anschließender Wasserabspaltung der Zwischenstufe. Diese Form liegt unter anaeroben Bedingungen vor und ist nicht fluoreszent. Nur in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff erfolgt die Oxidation der Hydroxybenzyl-Seitenkette von Y66 zum reifen Chromophor.

1996 wurde die Tertiärstruktur mittels Röntgenkristallographie mit einer Auflösung von 1,9 Angström aufgeklärt (Ormö *et al.*, 1996). Die Struktur ist in Abbildung 1.2 dargestellt und zeigt eine Fass-ähnliche Struktur, bestehend aus elf  $\beta$ -Faltblättern, die eine zentrale  $\alpha$ -Helix

mit dem Chromophor umschließen. Das Protein kann, abhängig von bestimmten Ionen- und Proteinkonzentrationen, Dimere bilden, die sich durch eine verringerte Absorption bei  $\lambda = 475 \text{ nm}$  bemerkbar machen (Cubitt *et al.*, 1995).



**Abb. 1.2:** Röntgenkristallstruktur von GFP (PDB ID: 1EMA) (nach Ormö *et al.*, 1996). Die Fass-ähnliche Struktur besteht aus einer zentralen  $\alpha$ -Helix, die der Chromophor enthält und von elf  $\beta$ -Faltblättern umgeben ist.

Verglichen mit heutigen Varianten besitzt dieses Wildtyp-GFP mehrere Nachteile, wie z.B. eine relativ geringe Helligkeit, bedingt durch einen niedrigen Absorptionskoeffizienten sowie zwei Absorptionsmaxima. Die Dauer der Chromophorreifung betrug bei dem Wildtyp zudem noch mehrere Stunden (Heim *et al.*, 1994; Ormö *et al.*, 1996). Diese und andere Eigenschaften wurden in den vergangenen zwei Jahrzehnten intensiv untersucht und verbessert. Zur Verbesserung kamen dabei sowohl Zufallsmutagenesen als auch ortsgerichtete Mutagenesen auf Grundlage von Strukturinformationen zum Einsatz. Eine der ersten beschriebenen Varianten ist das „blau fluoreszierende Protein“ (BFP), das von Heim *et al.* durch den Austausch des Tyrosins 66 im Chromophor gegen ein Histidin erzeugt wurde und das ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 448 \text{ nm}$  aufweist. Diese spektrale Verschiebung wurde in einer durch Zufallsmutagenese erzeugten Variante mit fünf Mutationen entdeckt. Durch ortsgerichtete Mutagenesen konnte dann gezeigt werden, dass die Y66H Mutation alleine für diesen Effekt verantwortlich ist (Heim *et al.*, 1994). Auf Grundlage der Strukturinformationen wurde von Ormö *et al.* eine weitere Farbvariante erzeugt, die sich durch eine spektrale Verschiebung von ca. 20 nm hin zu längeren Wellenlängen auszeichnet. Dabei wurde nicht der Chromophor selbst, sondern die nahegelegene Aminosäure T203 mutiert. Ein Austausch dieses Threonins gegen die aromatische Aminosäure Tyrosin führt zu einer Stapelung der delokalisierten  $\pi$ -Elektronensysteme („ $\pi$ -Stacking“) des Chromophors

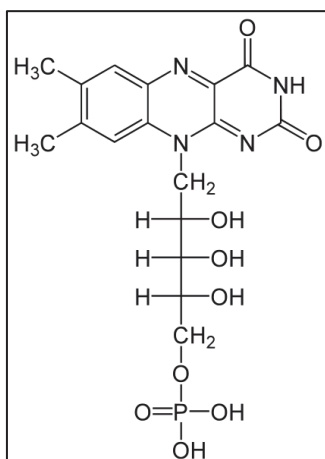
und der Aminosäure, was die spektrale Verschiebung verursacht (Ormö *et al.*, 1996). Eine weitere Mutation in den Aminosäuren, die den Chromophor bilden - S65T - verbesserte sowohl die Helligkeit, als auch die Geschwindigkeit der Chromophorreifung (Cormack *et al.*, 1996; Heim *et al.*, 1995). Als Meilenstein gilt heute die Erzeugung des „Enhanced GFPs“ (EGFP), das sowohl die bereits erwähnte S65T Mutation, als auch die F64L Substitution enthält, die zu einer deutlichen Verbesserung der Proteinreifung bei 37 °C führt. Zusammen mit der Codon-Optimierung für humane Zellen wurde die Expression und die Fluoreszenz in eukaryotischen Zellen somit signifikant verbessert (Cinelli *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1996). Dieses EGFP wird oftmals auch nur als GFP bezeichnet, da es das ursprüngliche GFP als Fluoreszenzreporter praktisch ersetzt hat. Ergänzt wird es mittlerweile durch weitere verbesserte Farbvarianten wie z.B. ECFP („enhanced cyan fluorescent protein“) und EYFP („enhanced yellow fluorescent protein“). Ein rot fluoreszierendes Protein konnte aus dem GFP von *A. victoria* bislang nicht entwickelt werden.

Neben GFP aus *A. victoria* gibt es noch weitere Fluoreszenzproteine aus marinen Organismen, die einen hohen Grad an Homologie zu GFP aufweisen. Das GFP aus der biolumineszenten Seefeder *Renilla reniformis* wurde bereits 1979 beschrieben (Ward & Cormier, 1979), aber aufgrund seiner dimeren Konformation nicht als Fluoreszenzreporter etabliert. In verschiedenen, nicht-biolumineszenten *Anthozoa*-Spezies wurden, einige Jahre nach der Etablierung von GFP als Fluoreszenzreporter, weitere Fluoreszenzproteine entdeckt, die strukturelle, biochemische und photophysikalische Homologien zu dem *A. victoria* GFP aufweisen (Matz *et al.*, 2002; Miyawaki, 2002). Diese Proteine erweitern die zuvor etablierten Fluoreszenzreporter der GFP-Familie, haben aber auch einige Nachteile ihnen gegenüber. Der größte Nachteil der *Anthozoa*-Fluoreszenzproteine ist ihre Tetramerisierung (Bulina *et al.*, 2003; Yanushevich *et al.*, 2002), was sie verhältnismäßig groß macht (ca. 100 kDa als Tetramer). Die Reifung des Chromophors dauert zudem bei einigen der ersten Varianten mit über neun Stunden sehr lange (Verkhusha & Lukyanov, 2004). In *Discosoma sp.* wurde dabei auch das rot fluoreszierende Protein dsFP583 entdeckt, das heute als DsRED bekannt ist (Matz *et al.*, 1999). Von diesem Protein wurden wiederum verbesserte Varianten erzeugt, die sich durch eine erhöhte Helligkeit (z.B. Verkhusha *et al.*, 2001), schnellere Chromophorreifung (z.B. Bevis & Glick, 2002), verschobene Spektren (z.B. Baird *et al.*, 2000) und monomere Konformation (z.B. Campbell *et al.*, 2002) auszeichnen.

Sämtliche Varianten der Fluoreszenzproteine aus *A. victoria* und der Klasse der *Anthozoa* werden aufgrund ihrer vielen Gemeinsamkeiten zur GFP-Familie zusammengefasst. Gemeinsam decken sie das gesamte Spektrum des sichtbaren Lichts ab. Viele der routinemäßig verwendeten Fluoreszenzproteine wurden dabei erst durch intensive Mutagenesestudien zu dem gemacht was sie heute sind: Vielseitige und grundlegende Werkzeuge der modernen Forschung. Die Entdeckung, Charakterisierung und weitere Entwicklung von GFP wurde daher 2008 mit dem Nobelpreis in Chemie ausgezeichnet (Chalfie, 2009; Shimomura, 2009; Tsien, 2009).

### 1.3.2 FMN bindende Fluoreszenzproteine

Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits auf die Abhängigkeit des GFPs von molekularem Sauerstoff eingegangen. Diese Limitierung konnte bislang durch keine der zahlreichen Änderungen an dem Protein überwunden werden. Somit sind Vertreter der GFP-Familie in anaeroben Organismen bzw. Geweben nicht einsetzbar. Es wurde daher nach alternativen Fluoreszenzreportern gesucht, die unabhängig von molekularem Sauerstoff funktionieren. Im Jahr 2007 wurden die „FMN bindenden Fluoreszenzproteine“ (FbFPs) entwickelt (Drepper *et al.*, 2007). Diese Proteine binden Flavinmononukleotid (FMN; siehe Abbildung 1.3) als Chromophor, ein Derivat von Riboflavin (Vitamin B2) das auch von vielen Flavoenzymen unterschiedlichster Organismen, wie z.B. Säugetiere (z.B. Sirivech *et al.*, 1977), Bakterien (z.B. Hayashi *et al.*, 1990), Flagellaten (z.B. Fang & Beattie, 2002) und auch *Archaea* (z.B. Matsumoto *et al.*, 2010), als Redox-Cofaktor dient und als ubiquitär angesehen werden kann.

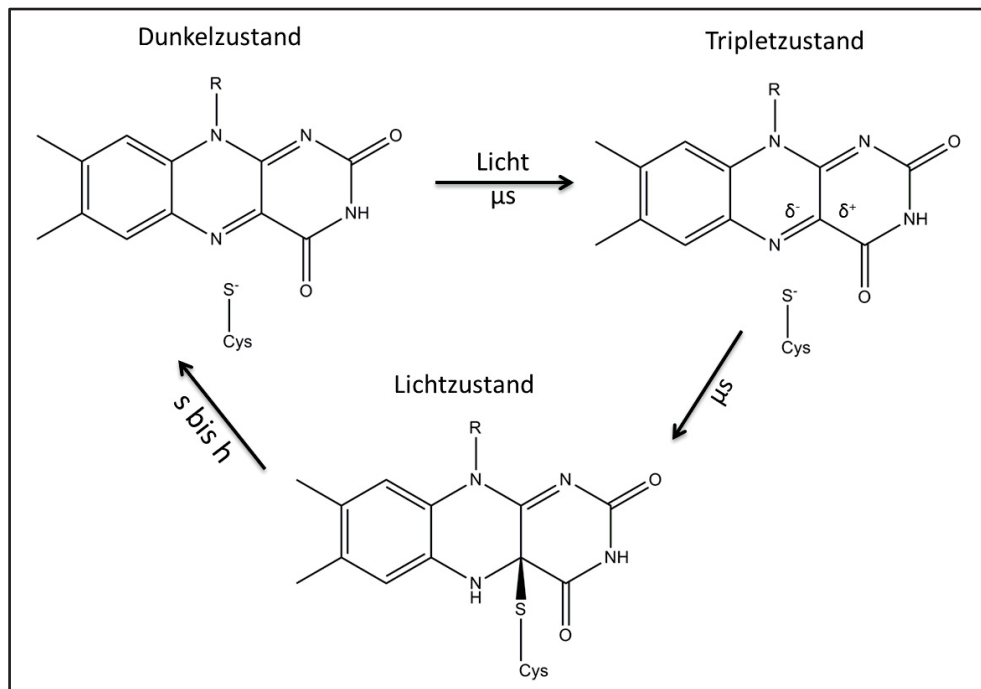


**Abb. 1.3: Flavinmononukleotid (FMN).** FMN besteht aus einem Isoalloxazinring mit delokalisiertem  $\pi$ -Elektronensystem, der für die Fluoreszenzeigenschaften verantwortlich ist, sowie einer Ribitylkette.



FbFPs kommen in der Natur nicht direkt vor. Sie wurden durch Mutagenese aus LOV-Domänen (LOV: Light, Oxygen, Voltage) abgeleitet (Drepper *et al.*, 2007; Chapman *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich um eine Klasse von untereinander hochgradig konservierten Blaulicht-Sensordomänen, die eine Unterklasse der PAS-Superfamilie (PAS: Per Arnt Sim) bilden. Sie wurden ursprünglich in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* entdeckt, wo sie eine zentrale Rolle beim Phototropismus spielen (Christie *et al.*, 1998). Der für den Phototropismus essentielle Photorezeptor Phototropin beinhaltet N-terminal zwei LOV-Domänen zur Blaulichtwahrnehmung sowie eine C-terminale Serin/Threonin Kinase Domäne, die bei Bestrahlung mit Blaulicht autophosphoryliert wird und der Signalweiterleitung dient (Christie *et al.*, 1999; Demarsy & Fankhauser, 2009).

Wenige Jahre später wurde mit dem Blaulichtrezeptor YtvA aus *Bacillus subtilis* die erste LOV-Domäne in Prokaryoten entdeckt (Losi *et al.*, 2002). YtvA besteht aus einer N-terminalen LOV-Domäne und einer C-terminalen STAS-Domäne (Sulfat Transporter und anti-sigma Faktor Antagonist) und ist über die Regulation des Transkriptionsfaktors  $\sigma^B$  an der Regulation der generellen Stressantwort beteiligt (Ávila-Pérez *et al.*, 2006). Bakterielle LOV-Domänen können mit verschiedenen Effektor-Domänen wie z.B. Histidin-Kinasen, Transkriptionsregulatoren oder putativen Phosphodiesterasen fusioniert sein (Crosson *et al.*, 2003; Losi, 2004; Losi & Gärtner, 2011). In Prokaryoten sind zudem einige LOV-Domänen bekannt, die über keine Effektordomäne verfügen und deren physiologische Funktion unbekannt ist (z.B. Jentsch *et al.*, 2009; Krauss *et al.*, 2005). Die Signalumwandlung von dem eingestrahlt Licht in eine physiologische Antwort findet über den Photozyklus statt (siehe Abb. 1.4). Dabei wird die von dem Chromophor absorbierte Lichtenergie genutzt um eine kovalente Bindung zwischen dem C(4 $\alpha$ )-Atom des Isoalloxazinrings des FMN mit einem hochkonservierten Cysteinrest des Proteins zu bilden. Dies führt zu einer Konformationsänderung der LOV-Domäne, die ihrerseits für die Signalweiterleitung an die Effektordomäne verantwortlich ist (Chen *et al.*, 2007; Harper *et al.*, 2004; Zoltowski & Gardner, 2011). Die Konformation dieser kovalenten Bindung ist energetisch ungünstig, so dass sich der ursprüngliche Zustand nach einer gewissen Zeit im Dunkeln wieder einstellt, was je nach Protein wenige Sekunden bis einige Stunden dauern kann (Circolone *et al.*, 2012; Crosson & Moffat, 2001; Losi & Gärtner, 2011).

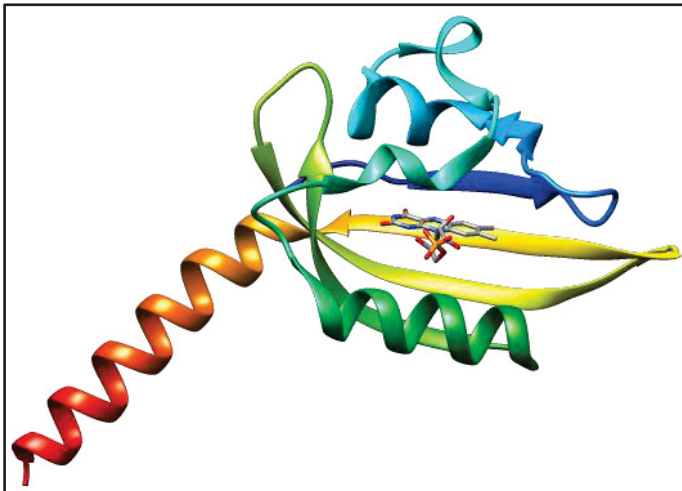


**Abb. 1.4: Schematische Darstellung des LOV-Photozyklus** (Modifiziert nach Swartz *et al.*, 2001). Dargestellt ist der Isoalloxazinring des FMNs mit dem konservierten Cystein des Proteins. Die Ribitylkette ist mit R abgekürzt. Der Dunkelzustand geht bei Bestrahlung mit Blaulicht in einen angeregten Triplet-Zustand über. Dieser geht dann wiederum unter Ausbildung eines Cystinyl-FMN-Addukts in den Lichtzustand über. Beide Reaktionen finden innerhalb von wenigen  $\mu\text{s}$  statt. Dieses Addukt ist energetisch ungünstig und zerfällt innerhalb einer Protein-spezifischen Zeit spontan, so dass der Dunkelzustand wieder hergestellt wird. Diese Rückkehr kann je nach Protein wenige Sekunden, bis mehrere Stunden dauern.

Die aufgenommene Energie bei Absorption eines Photons im Dunkelzustand kann auf verschiedene Arten genutzt bzw. wieder abgegeben werden. Zum einen kann die Energie mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (Triplet-Quantenausbeute) genutzt werden, um das Flavin in den Triplet-Zustand zu überführen, aus dem dann das Photoaddukt hervorgeht (Losi *et al.*, 2002). Zum zweiten kann die aufgenommene Energie über molekulare Vibration in Form von Wärme abgegeben werden. Für die Entwicklung von Fluoreszenzreporterproteinen ist die dritte Möglichkeit entscheidend: Die Abgabe der aufgenommenen Energie als Fluoreszenzemission. Auch hierfür besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, die mit der Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\Phi_F$ ) angegeben wird. Bei LOV-Domänen besteht bei jedem absorbierten Photon die Möglichkeit, dass der Chromophor in den Triplet-Zustand übergeht und den Lichtzustand ausbildet. Da die Proteine im Lichtzustand nicht fluoreszenzaktiv sind, eignen sie sich nicht als Fluoreszenzreporter.

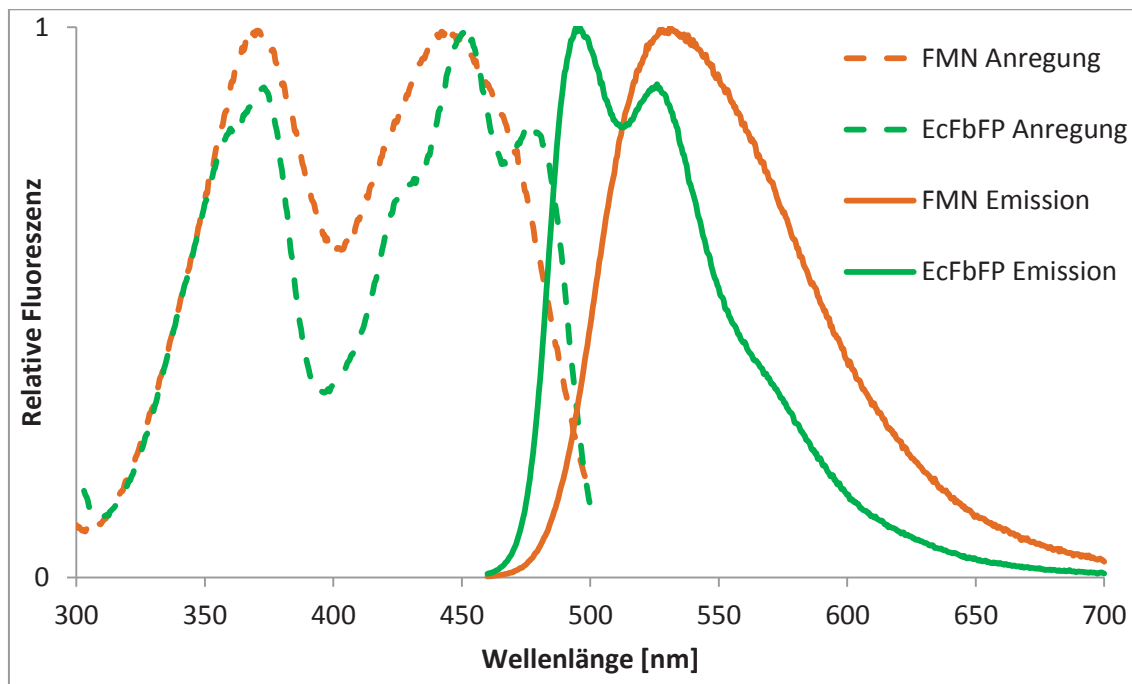
Am Beispiel der LOV-Domänen aus *Avena sativa* Phototropin konnte bereits 2000 gezeigt werden, dass der Austausch des konservierten Cysteins gegen ein Alanin die Bildung eines Photoaddukts verhindert. Die Einlagerung des Chromophors in das Protein wurde dabei nicht beeinflusst (Salomon *et al.*, 2000). Der Photozyklus kann dadurch nicht mehr stattfinden und der Chromophor verbleibt bei Bestrahlung mit Licht im Dunkelzustand.

Dies wurde genutzt, um aus LOV-Sensordomänen Fluoreszenzreporter zu entwickeln (Drepper *et al.*, 2007). Eines der ersten FbFPs war das von YtvA durch den C62A Austausch abgeleitete BsFbFP, dessen *in vivo* Fluoreszenzintensität gegenüber der Sensordomäne etwa um den Faktor 10 erhöht ist. Es ist momentan das einzige FbFP, das noch eine Effektor-domäne trägt. Im nächsten Schritt wurde diese Effektor-domäne entfernt und die *Codon-Usage* an die von *E. coli* angepasst. Das daraus resultierende Protein wurde EcFbFP genannt. Hierdurch wurde die Größe des Proteins auf 137 Aminosäuren reduziert, womit es nur etwa halb so groß ist wie GFP. Zudem wurde eine weitere Verbesserung der *in vivo* Fluoreszenzintensität um den Faktor 2,5 erreicht (Drepper *et al.*, 2007). Das Strukturmodell von EcFbFP ist in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abb. 1.5: Strukturmodell von EcFbFP** auf Basis der Röntgenkristallstruktur der YtvA LOV-Domäne (PDB ID: 2PR5; Möglich & Moffat, 2007), von der EcFbFP abgeleitet ist. Das Protein bindet FMN über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen innerhalb der LOV-Kernregion. Die C-terminale  $\alpha$ -Helix (hier orange-rot dargestellt) dient in dem Ursprungprotein YtvA der Verbindung mit der Effektor-domäne. Gezeigt ist eine monomere Einheit des Proteins, das Homodimere bildet.

FbFPs absorbieren sowohl blaues Licht ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) als auch UV-Licht ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ ) und emittieren eine cyan-grüne Fluoreszenz mit einem Maximum bei  $\lambda = 495 \text{ nm}$  und einer Schulter bei ca.  $\lambda = 525 \text{ nm}$  (siehe Abb. 1.6). Insbesondere im Emissionsspektrum ergeben sich damit signifikante Unterschiede zu freiem FMN, das über nur einen, sehr breiten Peak bei  $\lambda = 531 \text{ nm}$  verfügt.



**Abb. 1.6: Anregungs- und Emissionsspektren von EcFbFP und FMN** (modifiziert nach Wingen *et al.*, 2014). FMN besitzt ein Anregungsmaximum bei  $\lambda = 444 \text{ nm}$  und ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 531 \text{ nm}$ . Durch die Bindung an das Protein kommt es in FbFPs zu einer charakteristischen Änderung im Anregungsspektrum, bei der sich neben dem Maximum um  $\lambda = 450 \text{ nm}$  zwei Schultern ergeben. Bei der Emission kommt es bei der Bindung an das Protein zu einer deutlichen Änderung des Spektrums und einem Emissionsmaximum um  $\lambda = 495 \text{ nm}$ , mit einer Schulter um  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . Die Anregungsspektren wurden bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 520 \text{ nm}$ , die Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 360 \text{ nm}$  gemessen und jeweils auf das Maximum normiert.

Weitere FbFPs wurden von LOV Domänen aus *Pseudomonas putida* (Drepper *et al.*, 2007) und *Arabidopsis thaliana* (Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012) entwickelt. Das FbFP „iLOV“ (Chapman *et al.*, 2008) wurde von Shu *et al.* durch gerichtete Evolution so verändert, dass es bei Bestrahlung mit Blaulicht große Menge an Singulett-Sauerstoff Radikalen produziert. Diese Variante – „miniSOG“ („*mini Singlet Oxygen Generator*“) – kann durch seine Radikalproduktion die Polymerisierung von Diaminobenzidin katalysieren. Dieses Polymer wiederum ist mittels Elektronenmikroskopie gut detektierbar, so dass die Verteilung und Lokalisation des Proteins in der Zelle mit hoher Auflösung bestimmbar ist (Shu *et al.*, 2011).

Die Anwendbarkeit von FbFPs wurde mittlerweile in einer Reihe von Organismen wie z.B. dem fakultativ anaeroben Purpurbakterium *Rhodobacter capsulatus* (Drepper *et al.*, 2007), den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* (Tielker *et al.*, 2009), dem humanpathogenen, anaeroben Bakterium *Porphyromonas gingivalis* (Choi *et al.*, 2011), und Säugerzellen (Walter *et al.*, 2012) nachgewiesen.

Eines der wichtigsten Charakteristika von Fluoreszenzreportern ist ihre Helligkeit. Sie ist definiert als das Produkt aus dem Extinktionskoeffizienten und der Quantenausbeute (Cubitt *et al.*, 1995). Dabei ergibt sich für das hellste FbFPs (EcFbFP) ein Wert von 4.875 (Daten zur Berechnung aus Drepper *et al.*, 2007). Im Vergleich hierzu ist EGFP mit einem Wert von 33.000 etwa um den Faktor 6 heller (Daten zur Berechnung aus Patterson *et al.*, 2001). *In vivo* wird die Helligkeit noch durch eine Reihe weiterer Aspekte, wie die Expression, Faltung und Chromophor-bindung bzw. –reifung beeinflusst.

Bezüglich der Chromophorreifung konnte gezeigt werden, dass sich FbFPs zur quantitativen Analyse von Expressionsleveln in Echtzeit bei exponentiell wachsenden *E. coli* Kulturen besser eignen als YFP, da die Reifung des YFP-Chromophors unter sauerstofflimitierten Bedingungen stark eingeschränkt ist, wohingegen die FMN Synthese und Inkorporation in das FbFP hiervon unabhängig sind (Drepper *et al.*, 2010). Die unterschiedliche Reifung in Abhängigkeit der Sauerstoffkonzentration führte auch zu der Entwicklung des ersten FRET basierten Biosensors für Sauerstoff, der aus einer Fusion aus EcFbFP und YFP besteht (Pötzkei *et al.*, 2012).

Alles in allem stellen die Vertreter der FbFP-Familie eine wertvolle Ergänzung zu der GFP-Familie dar. Sie fluoreszieren zwar nicht so hell wie die meisten Mitglieder der GFP-Familie, ermöglichen aber aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer Sauerstoffunabhängigkeit die Erforschung von biologischen Systemen, die GFP verschlossen bleiben.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die FbFPs stellen eine vergleichsweise junge und kleine Familie von Fluoreszenzproteinen dar. Durch ihre geringe Größe, schnelle Reifung und ihre Sauerstoffunabhängigkeit bringen sie einige Vorteile gegenüber der größeren GFP-Familie mit sich und ergänzen somit das Repertoire an verfügbaren Fluoreszenzreportern. Ihre speziellen Eigenschaften erlauben es, Systeme zu erforschen, die für Fluoreszenzproteine zuvor unzugänglich waren.

Der größte Nachteil der FbFPs gegenüber den Vertretern der GFP-Familie ist jedoch die geringere Helligkeit. Zudem gibt es von GFP mittlerweile zahlreiche Farbvarianten, wohingegen das Emissionsspektrum aller bisher bekannten FbFPs praktisch identisch ist, so dass es nicht möglich ist, zwei verschiedene Proteine in einer Zelle damit zu fusionieren und farblich zu markieren.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Erzeugung von FbFP-Varianten mit neuen bzw. verbesserten photophysikalischen Eigenschaften. Um dieses Ziel zu erreichen sollten sowohl Zufallsmutagenesen als auch ortsgerichtete Mutagenesen auf Basis von Strukturinformationen durchgeführt werden. Die dabei erzeugten Varianten sollten sowohl auf verbesserte Helligkeit als auch auf Verschiebungen im Emissionsspektrum hin untersucht werden. Von Varianten, die diesbezüglich Verbesserungen zeigten, sollten dann die Fluoreszenz-Quantenausbeute, der Extinktionskoeffizient, die Cofaktor-Beladung und die Photostabilität bestimmt werden. Um diese Werte zuverlässig zu bestimmen, sollten außerdem bisherige Methoden verbessert, bzw. neue entwickelt werden. Mit Hilfe dieser Methoden sollten auch die Eigenschaften bereits beschriebener FbFPs neu bestimmt werden.

Um das mögliche Anwendungsfeld der FbFPs zu erweitern, sollten zudem FbFPs mit einer höheren Thermostabilität entwickelt werden. Hierzu sollte anhand von Sequenzinformationen nach LOV-Domänen in thermophilen Organismen gesucht werden, um daraus FbFPs zu entwickeln, die sich für den Einsatz als Fluoreszenzreporter bei höheren Temperaturen eignen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

#### 2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Tab. 2.1: Genotypen der verwendeten *E. coli*-Stämme (Nomenklatur nach Bachmann, 1990)

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\Delta lacU169$ , 80lacZ $\Delta$ M15, <i>hsdR17</i> , <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA</i> , ( <i>res<sup>-</sup></i> , <i>mod<sup>+</sup></i> ), <i>deoR</i>	(Hanahan, 1983)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup></i> <i>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dem</i> , ( $\lambda$ <i>Its857</i> , <i>indl</i> , <i>Sam7</i> , <i>nin5</i> , <i>lacUV5-T7gene1</i> )	(Studier & Moffatt, 1986)
CmpX131	<i>lacUV5-T7gene1</i> , $\Delta$ <i>ribM</i> , <i>ribC</i>	(Mathes <i>et al.</i> , 2009)

### 2.2 Vektoren und rekombinante Plasmide

#### 2.2.1 Vektoren

Tab. 2.2: Übersicht der verwendeten Vektoren

Vektor	Relevante Eigenschaft	Referenz
pET28a(+)	P <sub>T7</sub> , His <sub>6</sub> -Tag, MCS, <i>lacI</i> , <i>bla</i> , Km <sup>r</sup> pBR322 ori, f1 ori	Novagen
pRhotHi-2	pBBR1mcs ( <i>rep mob</i> Cmr), pET22b (MCS, <i>pelB</i> ), pBSL15 ( <i>aphII</i> ) Orientierung II, PT7, His <sub>6</sub> -Tag	(Katzke <i>et al.</i> , 2010)

## 2.2.2 Rekombinante Plasmide

Tab. 2.3: Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pRhotHi-2-Pp1FbFP	P <sub>T7</sub> , Pp1FbFP ohne His <sub>6</sub> -Tag	Circolone, unveröffentlicht
pET28a-Pp1FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP	Circolone, unveröffentlicht
pET28a-Pp1FbFP L83Y	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83Y	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L97Y	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L97Y	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L97F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L97F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP I99Y	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP I99Y	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP I99F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP I99F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83F, L97F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83F, L97F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83F, L97Y	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83F, L97Y	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83F, I99F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83F, I99F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83Y, L97F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83Y, L97F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83Y, I99F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83Y, I99F	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L83Y, I99Y	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L83Y, I99Y	Diese Arbeit
pET28a-Pp1FbFP L97Y, I99F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp1FbFP L97Y, I99F	Diese Arbeit
pET28a-Pp2FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-3	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP I48T, H61Y	Wingen, Diplomarbeit



Tab. 2.3: Fortsetzung der Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pET28a-Pp2FbFP-4	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP Y112C	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-5	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP I29V, S91G, Y112F, E138G	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-6	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP N26Y	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-7	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP Y43F	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-8	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP Y112H	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-9	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP E12D, H61Y, Y112F, Q143L	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP-10	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP E22K, E71G, K88S, L109V, Q116L	Wingen, Diplomarbeit
pET28a-Pp2FbFP Y112L	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP Y112L	Diese Arbeit
pET28a-Pp2FbFP Q116V	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP Q116V	Diese Arbeit
pET28a-Pp2FbFP I73M	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, Pp2FbFP I73M	Diese Arbeit
pRhotHi-2-BsFbFP	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, BsFbFP	(Drepper <i>et al.</i> , 2007)
pRhotHi-2-EcFbFP	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP	(Drepper <i>et al.</i> , 2007)
pET28a-EcFbFP	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP Q123T	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Q123T	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP L82M	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP L82M	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP G26X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank G26X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP T30X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank T30X	Diese Arbeit

Tab. 2.3: Fortsetzung der Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pET28a-EcFbFP I78X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank I78X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP L82X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank L82X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP N104X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank N104X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP L106X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank L106X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP I108X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank I108X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP G121X	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP Sättigungsmutagenesebank G121X	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP G26S	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP G26S	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP I78C	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP I78C	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP L106I	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP L106I	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epF1	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP G8D, L20P, N84S	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epG2	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP W103V	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epA5	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP D98A, D109V, K128E, E133G, K134E	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epF6	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP W103L	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epG1	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP W103N	Diese Arbeit
pET28a-EcFbFP epH4	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, EcFbFP E35G	Diese Arbeit
pET28a-DsFbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, DsFbFP	Endres, Doktorarbeit
pET28a-miniSOG	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, miniSOG	Endres, Doktorarbeit
pET28a-phiLOV2.1	P <sub>T7</sub> , C-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, phiLOV2.1	Diese Arbeit
pET28a-AcFbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, AcFbFP	Diese Arbeit

Tab. 2.3: Fortsetzung der Übersicht der verwendeten rekombinanten Plasmide

Rekombinante Plasmide	Relevante Eigenschaften	Referenz
pET28a-TeFbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TeFbFP	Diese Arbeit
pET28a-MrFbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, MrFbFP	Diese Arbeit
pET28a-MtFbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, MtFbFP	Diese Arbeit
pET28a-YNP1FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, YNP1FbFP	Diese Arbeit
pET28a-YNP2FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, YNP2FbFP	Diese Arbeit
pET28a-YNP3FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, YNP3FbFP	Diese Arbeit
pET28a-YNP4FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, YNP4FbFP	Diese Arbeit
pET28a-YNP3FbFP Y116F	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, YNP3FbFP Y116F	Diese Arbeit
pET28a-Pf1FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, <i>Pseudomonas fluorescence</i> PF5 C53A	Diese Arbeit
pET28a-Pf2FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, <i>Pseudomonas fluorescence</i> PfO-1 C54A	Diese Arbeit
pET28a-Pf3FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, <i>Pseudomonas fluorescence</i> SWB25 C52A	Diese Arbeit
pET28a-Pp3FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, W619 <i>Pseudomonas putida</i> SB1-like C53A	Diese Arbeit
pET28a-Pp4FbFP	P <sub>T7</sub> , N-terminaler His <sub>6</sub> -Tag, W619 <i>Pseudomonas putida</i> SB2-like C53A	Diese Arbeit

## 2.3 Oligonukleotide und Sequenzierung

### 2.3.1 Verwendete Oligonukleotide

Für die Polymerasekettenreaktion notwendige Startermoleküle (Primer) wurden die in der folgenden Tabelle erwähnten Oligonukleotide verwendet. Diese wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Tab. 2.4: Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
Ec L82M Nfor	ATCTTCCCCATCGGTGATGTCG GCGATATAGGC	75	33	Austausch L82M in EcFbFP
Ec L82M Nrev	CCGGTTCTTTATTTTGCATCGC GGTGCGGATGT	72	33	Austausch L82M in EcFbFP
Ec L82M Cfor	GCACCGCGATGCAAATAAAG AACCGGTCACCGTGC	75	36	Austausch L82M in EcFbFP
Ec L82M Crev	AAGTGTAGCGGTCACGCTGCG CGTAACCACCACA	79	34	Austausch L82M in EcFbFP
PF5 C53A Nfor	ATCGGTGATGTCGGCGATATA GGCGCCAGC	76	29	Austausch C53A in PF5
PF5 C53A Nrev	ATTGCAGGAAGCGCGCATCCT GGTACAGC	76	30	Austausch C53A in PF5
PF5 C53A Cfor	GTGCTGTACCAGGATGCGCGC TTCCTGC	76	28	Austausch C53A in PF5
PF5 C53A Crev	CGCTTAATGCGCCGCTACAGG G	70	22	Austausch C53A in PF5
PFO-1 C53A Nfor	CGATCTTCCCCATCGGTGATGT C	66	23	Austausch C53A in PFO-1
PF O-1 C53A Nrev	ACTGCAGGAAACGCGCATCCT GATAAAG	71	28	Austausch C53A in PFO-1
PF O-1 C53A Cfor	TCCTTTATCAGGATGCGGTTT CCTGCAGTCG	74	32	Austausch C53A in PFO-1

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
PF O-1 C53A Crev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGGC AGCAGCCAACTC	76	33	Austausch C53A in PFO-1
Pp1 L82YF Nfor	ACGATGCGTCCGGCGTAGAG GATCGAGA	75	28	Austausch L82Y bzw. L82F in Pp1FbFP
Pp1 L82YF Nrev	TTGCGATAGTTGCGAWACACT TCGCGGCATGGG	72	33	Austausch L82Y bzw. L82F in Pp1FbFP
Pp1 L82YF Cfor	CCATGCCGCGAAGTGTWTCGC AACTATC	68	28	Austausch L82Y bzw. L82F in Pp1FbFP
Pp1 L82YF Crev	TATTGCTCAGCGGTGGCAGCA GCCAAC	75	27	Austausch L82Y bzw. L82F in Pp1FbFP
Pp1 L97YF Nfor	CCCATCGGTGATGTGCGCGAT ATAGGC	72	27	Austausch L82Y bzw. L97F in Pp1FbFP
Pp1 L97YF Nrev	TTCACCGGCGTGATCGAAWAC TCGTTC	66	27	Austausch L97Y bzw. L97F in Pp1FbFP
Pp1 L97YF Cfor	CTTCTGGAACGAGTWTTGAT CACGCCGGTGAAGAG	73	36	Austausch L97Y bzw. L97F in Pp1FbFP
Pp1 L97YF Crev	TAACCACCACCCCGCCGCGC TTAATGC	76	28	Austausch L97Y bzw. L97F in Pp1FbFP
Pp1 I99YF Nfor	CCCATCGGTGATGTGCGCGAT ATAGGC	72	27	Austausch I99Y bzw. I99F in Pp1FbFP
Pp1 I99YF Nrev	TTCACCGGCGTAWACGACAG CTCGTTC	68	27	Austausch I99Y bzw. I99F in Pp1FbFP
Pp1 I99YF Cfor	CCATGCCGCGAAGTGTWTCGC AACTATC	68	28	Austausch I99Y bzw. I99F in Pp1FbFP
Pp1 I99YF Crev	TATTGCTCAGCGGTGGCAGCA GCCAAC	75	27	Austausch I99Y bzw. I99F in Pp1FbFP
Pp2 I73M Nfor	CCTGCCACCATACCCACGCCG AAACAAG	74	28	Austausch I73M in Pp2FbFP

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
Pp2 I73M Nrev	TTCGCGCATCGCCTCGCGGAT AATTGCGATG	72	31	Austausch I73M in Pp2FbFP
Pp2 I73M Cfor	TTATCCGCGAGGCGATGCGCG AA	65	23	Austausch I73M in Pp2FbFP
Pp2 I73M Crev	CTCAAGACCCGTTTAGAGGCC CCAAGG	72	27	Austausch I73M in Pp2FbFP
Ec G26X Nfor	GGCCTGCCACCATACCCACG CCGAAACAAG	78	31	Sättigungsmutagenese von G26 in EcFbFP
Ec G26X Nrev	TGATGACCACNNNGACGCGC ACGTGATCC	71	29	Sättigungsmutagenese von G26 in EcFbFP
Ec G26X Cfor	ATCACGTGCGCGTCNNNGTG GTCATC	69	26	Sättigungsmutagenese von G26 in EcFbFP
Ec G26X Crev	ACAGGGCGCGTCCCATTGCGC AATCC	76	26	Sättigungsmutagenese von G26 in EcFbFP
Ec T30X Nfor	GGCCTGCCACCATACCCACGC CGAAACAAG	77	30	Sättigungsmutagenese von T30 in EcFbFP
Ec T30X Nrev	TTCCAGCGCGGGATCNNNGAT GACCACG	74	28	Sättigungsmutagenese von T30 in EcFbFP
Ec T30X Cfor	GGCGTGGTCATCNNNGATCCC GCGCTGGAAGATAAC	72	36	Sättigungsmutagenese von T30 in EcFbFP
Ec T30X Crev	AGGAAGGGAAGAAAGCGAAA GGAGCGGGCGCTAGG	79	35	Sättigungsmutagenese von T30 in EcFbFP
Ec I78X Nfor	CCCATCGGTGATGTCGGCGAT ATAGGC	72	27	Sättigungsmutagenese von I78 in EcFbFP
Ec I78X Nrev	TTTGCAGCGCGGTGCGNNNG TTGTC	76	25	Sättigungsmutagenese von I78 in EcFbFP
Ec I78X Cfor	GGAAGTGGACAACNNNCGCA CCGCGCTGCAAATA	69	35	Sättigungsmutagenese von I78 in EcFbFP

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
Ec I78X Crev	TCAAGACCCGTTTAGAGGCC CAAGGGGTTA	69	31	Sättigungsmutagenese von I78 in EcFbFP
Ec L82X Nfor	ATCTTCCCATCGGTGATGTCG GCGATATAG	72	31	Sättigungsmutagenese von L82 in EcFbFP
Ec L82X Nrev	GGTTCTTTATTTGNNNCGCG GTGCGGATGT	74	31	Sättigungsmutagenese von L82 in EcFbFP
Ec L82X Cfor	ACATCCGCACCGCGNNNCAA ATAAAG	69	27	Sättigungsmutagenese von L82 in EcFbFP
Ec L82X Crev	AGGCCCAAGGGGTTATGCTA GTTATTGCT	72	30	Sättigungsmutagenese von L82 in EcFbFP
Ec N94X Nfor	ACCATACCCACGCCGAAACAA GCGCTC	74	27	Sättigungsmutagenese von N94 in EcFbFP
Ec N94X Nrev	CCTTCTGTANNCTGGATCT GCACGGTGAC	66	31	Sättigungsmutagenese von N94 in EcFbFP
Ec N94X Cfor	CCGTGCAGATCCAGNNNTACA AGAAGGAC	70	29	Sättigungsmutagenese von N94 in EcFbFP
Ec N94X Crev	TAACCACCACCCGCCGCGC TTAATG	74	27	Sättigungsmutagenese von N94 in EcFbFP
Ec N104X Nfor	ATCTTCCCATCGGTGATGTCG GCGATATAG	72	31	Sättigungsmutagenese von N104 in EcFbFP
Ec N104X Nrev	GTTCAGTTCNNCCAGAACAT CGTGCCGTCCTT	69	33	Sättigungsmutagenese von N104 in EcFbFP
Ec N104X Cfor	GCACGATGTTCTGGNNNGAA CTG	71	23	Sättigungsmutagenese von N104 in EcFbFP
Ec N104X Crev	CCTCAAGACCCGTTTAGAGG	61	20	Sättigungsmutagenese von N104 in EcFbFP
Ec L106X Nfor	CCATCGGTGATGTCGGCGATA TAGGC	70	26	Sättigungsmutagenese von L106 in EcFbFP

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
Ec L106X Nrev	TCCATCGGATCGATGTTNNNT TCGTTCCAG	68	30	Sättigungsmutagenese von L106 in EcFbFP
Ec L106X Cfor	GGAACGAANNNAACATCGAT CCGATGGAA	66	29	Sättigungsmutagenese von L106 in EcFbFP
Ec L106X Crev	CTCAAGACCCGTTTAGAGGCC CCAA	70	25	Sättigungsmutagenese von L106 in EcFbFP
Ec I108X Nfor	ATCGGTGATGTCGGCGATATA G	63	22	Sättigungsmutagenese von I108 in EcFbFP
Ec I108X Nrev	CGATTTCCATCGGATCNNNGT TCAG	64	25	Sättigungsmutagenese von I108 in EcFbFP
Ec I108X Cfor	GGAACGAACTGAACNNNGAT CCGATGGAA	68	29	Sättigungsmutagenese von I108 in EcFbFP
Ec I108X Crev	CTCAAGACCCGTTTAGAGGCC CCAA	70	25	Sättigungsmutagenese von I108 in EcFbFP
Ec G121X Nfor	CGATATAGGCCGCCAGCAACC	65	20	Sättigungsmutagenese von G121 in EcFbFP
Ec G121X Nrev	TGTCGTTCTGGATNNNGACGA AATAC	62	26	Sättigungsmutagenese von G121 in EcFbFP
Ec G121X Cfor	CGTATTTGTCNNNATCCAGA ACGACATCACCAAG	70	35	Sättigungsmutagenese von G121 in EcFbFP
Ec G121X Crev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGGC AGCAGCCAACTCAG	76	35	Sättigungsmutagenese von G121 in EcFbFP
YNP3 Y116X Nfor	GCCACCATACCCACGCCGAAA CAAG	72	25	Sättigungsmutagenese von Y116 in YNP3FbFP
YNP3 Y116X Nrev	TCTGCACGCCACGAAATGGG TCACTTTG	74	29	Sättigungsmutagenese von Y116 in YNP3FbFP
YNP3 Y116X Cfor	GCAAAGTGACCCATTTTCGTGG GCGTGCAG	75	29	Sättigungsmutagenese von Y116 in YNP3FbFP



Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
YNP3 Y116X Crev	GGGTTATGCTAGTTATTGCTCA GCGGTGGCAGCAG	75	35	Sättigungsmutagenese von Y116 in YNP3FbFP
Ec Q123X Nfor	CTCGATCCCGCGAAATTAATA CGACTCAC	68	29	Sättigungsmutagenese von Q123 in EcFbFP
Ec Q123X Nrev	GATGTCGTTNNGATGCCGAC GAAATAC	66	28	Sättigungsmutagenese von Q123 in EcFbFP
Ec Q123X Cfor	TTCGTCGGCATCNNAACGAC ATCAC	66	26	Sättigungsmutagenese von Q123 in EcFbFP
Ec Q123X Crev	CAACTCAGCTTCCTTCGGGCT TTG	68	25	Sättigungsmutagenese von Q123 in EcFbFP
Pp2 Q116X Nfor	ACGAGTTCTTCTGAGCGGGAC TCTGG	71	26	Sättigungsmutagenese von Q116 in Pp2FbFP
Pp2 Q116X Nrev	TGTGACATCGCGNNGATGCC GATGTAG	73	28	Sättigungsmutagenese von Q116 in Pp2FbFP
Pp2 Q116X Cfor	CTACTACATCGGCATCNNGC CGATGTC	69	28	Sättigungsmutagenese von Q116 in Pp2FbFP
Pp2 Q116X Crev	GGGCTTTGTTAGCAGCCGGAT CTCAG	71	26	Sättigungsmutagenese von Q116 in Pp2FbFP
Pp2 Y112X Nfor	GAGTTCTTCTGAGCGGACTC TGG	68	24	Sättigungsmutagenese von Y112 in Pp2FbFP
Pp2 Y112X Nrev	CTGGATGCCGATNNGTAGG TCAGC	69	25	Sättigungsmutagenese von Y112 in Pp2FbFP
Pp2 Y112X Cfor	CCAGCTGACCTACNNATCGG CATCC	67	26	Sättigungsmutagenese von Y112 in Pp2FbFP
Pp2 Y112X Crev	CAACTCAGCTTCCTTCGGGCT TTG	68	25	Sättigungsmutagenese von Y112 in Pp2FbFP
SWB25 C52A Nfor	GCCACCATACCCACGCCGAAA CAAG	72	28	Austausch C52A in SWB25

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
SWB25 C52A Nrev	GCAGGAAGCGCGCATCCTGGT AGAG	73	25	Austausch C52A in Pf3FbFP
SWB25 C52A Cfor	ATCCTCTACCAGGATGCGCGC TTCCTGCAATCG	77	33	Austausch C52A in SWB25
SWB25 C52A Crev	TCAAGACCCGTTTAGAGGCC CAAGGGGTTATG	75	33	Austausch C52A in SWB25
W619-1 C53A Nfor	TGCCACCATACCCACGCCGAA ACAAG	73	26	Austausch C53A in W619-SB1like
W619-1 C53A Nrev	GCAGGAAACGCGCATCCTGGT AAAGGATCTCGTC	76	34	Austausch C53A in W619-SB1like
W619-1 C53A Cfor	TTTACCAGGATGCGCGTTTCCT GC	69	24	Austausch C53A in W619-SB1like
W619-1 C53A Crev	AAACCCCTCAAGACCCGTTTA GAG	66	24	Austausch C53A in W619-SB1like
W619-2 C53A Nfor	CATCGGTGATGTCCGCGATAT AGGC	69	25	Austausch C53A in W619-SB2like
W619-2 C53A Nrev	GCAGGAAGCGCGCATCCTGAT AGAG	71	25	Austausch C53A in W619-SB2like
W619-2 C53A Cfor	CTCTATCAGGATGCGCGCTTCC TGC	71	25	Austausch C53A in W619-SB2like
W619-2 C53A Crev	GCGCTTAATGCGCCGCTACAG GG	72	23	Austausch C53A in W619-SB2like
pRK-T- pET28_uni_ for	GGGAATTGTGAGCGGATAAC	60	20	Amplifizierung von Genen in der MCS der Vektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pET28a

Tab. 2.4: Fortsetzung der Übersicht der als Primer verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Tm [°C]	Länge [bp]	Verwendung
pRK-T- pET28_uni_ rev	TTAGCAGCCGGATCTCAG	60	18	Amplifizierung von Genen in der MCS der Vektoren pRhokHi-2, pRhotHi-2 und pET28a

### 2.3.2 Sequenzierungen

Die für diese Arbeiten notwendigen Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt.

### 2.4 Nährmedien

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Nährmedien für 20 min bei 200 kPa und 121 °C autoklaviert. Hitzelabile Komponenten wurden mit Millipore-Membranfiltern mit einem Durchmesser von 0,2 µm sterilfiltriert.

#### E. coli LB-Flüssigmedium (Sambrook et al., 1989):

LB Medium Fertigmischung	25,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

#### E. coli LB-Agar:

LB Medium Fertigmischung	25,0 g
Agar	15,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

#### E. coli BL21(DE3) Selektionsagar:

0,2% (w/v) Laktose	2,0 g
E. coli LB-Agar	ad 1000 ml

E. coli Autoinduktionsmedium:

Terrific Broth Fertigmischung	47,5 g
Glycerol	5,0 g
A. dest.	ad 975 ml

Nach dem Autoklavieren hinzuzufügende Zusätze:

20%ige Glukose-Lösung	5 ml
10%ige Laktose-Lösung	20 ml

Zusammensetzung der Zusätze für *E. coli* Autoinduktionsmedium:

20%ige Glukose-Lösung:

D-Glukose	200,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

10%ige Laktose-Lösung:

Laktose	100,0 g
A. dest.	ad 1000 ml

## 2.5 Antibiotika

Tab. 2.5: Verwendete Antibiotika mit der für die jeweilige Anzucht von *E. coli* empfohlenen Konzentrationsangabe

Antibiotikum	Konzentration in <i>E. coli</i> Medien [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Kanamycin (Km)	50

## 2.6 Enzyme

Tab. 2.6: Verwendete Enzyme und deren Bezugsfirma

Enzym	Bezugsfirma
<i>Taq</i> -Polymerase	Thermo Scientific (Schwerte)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Hauseigene Produktion
<i>T4</i> -DNA-Ligase	Thermo Scientific (Schwerte)

Tab. 2.6: Fortsetzung der verwendeten Enzyme und deren Bezugsfirma

Enzym	Bezugsfirma
<i>NdeI</i>	Thermo Scientific (Schwerte)
<i>HindIII</i>	Thermo Scientific (Schwerte)
<i>XhoI</i>	Thermo Scientific (Schwerte)
<i>XbaI</i>	Thermo Scientific (Schwerte)

Die jeweiligen Puffer wurden ebenfalls von Thermo Scientific bezogen.

## 2.7 Chemikalien

Tab. 2.7: Verwendete Chemikalien und deren Bezugsfirma

Chemikalie	Bezugsfirma
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Aceton	Carl Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)-Lösung	Carl Roth
Agar	Gibco BRL, Invitrogen
Agarose	Carl Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
Ammoniumsulfat	Merck
Borat	Merck
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Merck
Casein-Hydrolysat	Carl Roth
Coomassie Brilliant Blau	Serva
D-Glukose	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriummethylenediamintetraacetat ( $\text{Na}_2$ -EDTA)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth

Tab. 2.7: Fortsetzung der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsfirma

<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsfirma</b>
Essigsäure	Merck
Ethanol	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
FAD	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth
Hefeextrakt	Gibco BRL
Imidazol	Carl Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG)	Gerbu
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Serva
L-Glycin	Carl Roth
LB Medium Fertigmischung	Carl Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Calbiochem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Magermilchpulver	Carl Roth
Manganchlorid	Merck
Methanol	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetraethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Carl Roth
Pepton	BD
Polyoxyethylensorbitolmonolaurat (Tween)	Carl Roth
Riboflavin	Sigma-Aldrich
Roseoflavin	Santa Cruz Biotechnology
Salzsäure (HCl)	Carl Roth

Tab. 2.7: Fortsetzung der verwendeten Chemikalien und deren Bezugsfirma

Chemikalie	Bezugsfirma
Thiamin	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Biomol
Trypton	Sigma-Aldrich
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

## 2.8 Puffer und Lösungen

### 2.8.1 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

#### TBE-Puffer:

Tris	89 mM
Borat	89 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	2,5 mM

#### 5-fach DNA-Probenpuffer:

Na <sub>2</sub> -EDTA	100 mM
Glycerol	43 % (v/v)
BPB	0,05 % (w/v)

DNA-Molekulargewichtsstandard „GeneRuler 1kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific):

10000, 8000, **6000**, 5000, 4000,3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500,  
250 bp

Zur besseren Orientierung heben sich die Banden bei 6000, 3000 und 1000 bp im Agarosegel durch eine höhere DNA-Konzentration von den anderen Banden ab.

### 2.8.2 Puffer und Lösungen zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

#### Magnesium-Mix:

MgCl <sub>2</sub>	500 mM
MgSO <sub>4</sub>	500 mM

#### Transformationspuffer 1 (TMF1):

MgCl <sub>2</sub>	100 mM
-------------------	--------

#### Transformationspuffer 2 (TMF2):

CaCl <sub>2</sub>	100 mM
-------------------	--------

### 2.8.3 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung von Proteinen mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säulen

#### Lysepuffer (pH 8,0):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM

#### Waschpuffer (pH 8,0):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	50 mM

#### Elutionspuffer (pH 8,0):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM



### 2.8.4 Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### 5-fach SDS-Probenpuffer (pH 6,8):

Tris-HCl	250 mM
Glycerol	50 % (v/v)
SDS	20 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,15 % (w/v)

#### 10-fach SDS-Elektrophorese-Puffer:

Tris-HCl	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
A. dest.	ad 1000 ml

#### 4-fach Sammelgelpuffer (pH6,8):

Tris-HCl	0,5 M
A. dest.	ad 250 ml

#### 4-fach Trenngelpuffer (pH8,8):

Tris-HCl	1,5 M
A. dest.	ad 250 ml

#### 12% (w/v) SDS-Trenngel (Für zwei Mini-Gele):

4-fach Trenngelpuffer	1,85 ml
A. dest	2,6 ml
Acrylamid-Lösung	3,0 ml
10% (w/v) SDS	0,15 ml
10% (w/v) APS	75 µl
TEMED	7,5 µl

4% (w/v) SDS-Sammelgel (für zwei Mini-Gele):

4-fach Sammelgelpuffer	900 µl
A. dest.	2,15 ml
Acrylamid-Lösung	600 µl
10 % (w/v) SDS	50 µl
10 % (w/v) APS	75 µl
TEMED	7,5 µl

Protein-Größenstandard "PageRuler Prestained Protein Ladder" (Thermo Scientific):

170, 130, 100, **70**, 55, 40, 35, 25, 15, **10** kDa

Zur besseren Orientierung ist die 10 kDa Bande grün und die 70 kDa Bande rot gefärbt.

Coomassie-Blau-Färbelösung:

Ethanol	25% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brillant Blau	0,2 % (w/v)

Entfärber-Lösung:

Ethanol	20% (v/v)
Essigsäure	7% (v/v)

**2.8.5 Puffer und Lösungen für die Lagerung von Proteinen und die Durchführung von *in vitro* Versuchen**

Lagerpuffer (pH 8,0):

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 mM
NaCl	10 mM

Bradford-Reagenz:

Coomassie-Brillant-Blau G-250	100 mg
Methanol	50 ml
Phosphorsäure 85% (v/v)	100 ml
A. dest.	ad 1000 ml

**2.8.6 Puffer für *in vivo* Fluoreszenzmessungen**

PBS-Puffer (pH 8,0):

NaCl	8,18 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,77 g
KCl	0,20 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
A. dest.	ad 1000 ml

**2.8.7 Puffer für die HPLC-Analyse**

Puffer C:

Acetonitril	70% (v/v)
Puffer D	30% (v/v)

Puffer D:

Ammoniumacetat (reinst) pH 6,0	50 mM
--------------------------------	-------

Nach dem Einstellen des pHs mit Salzsäure wurde der Puffer durch einen 0,45 µM Cellulose Nitratfilter gefiltert und für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

## 2.9 Reaktions- und Nachweis – „Kits“

Tab. 2.8: Übersicht der verwendeten Reaktions- und Nachweis- „Kits“

Reaktions – / Nachweis – „Kit“	Bezugsfirma
Silica Bead DNA Gel Extraction Kit	Thermo Scientific (Schwerte)
innuPREP Plasmid Mini Kit	Analytik Jena AG (Jena)

## 2.10 Sonstige Materialien und Geräte

Tab. 2.9: Übersicht sonstiger verwendeter Materialien und Geräte

Gerät	Hersteller
Agarosegel Fotodokumentation Eagle Eye II	Stratagene
Blaulichapparat Vilber Lourmat CN-6	Vilber Lourmat
Blotapparaturen Mini-Transfer Blot Cell	BioRad
Brutroller (Eigenbau)	Ruhr-Universität Bochum
Elektrophoreseapparaturen Mini-PROTEAN Gelkammer II	BioRad
Feinwaage CP224S	Sartorius
Fluoreszenzplattenphotometer Infinite M1000 Pro	Tecan
Fluoreszenzphotometer Quanta Master 40	Photon Technology International
Fluoreszenzphotometer Cary Eclipse	Varian
PCR-Cycler TProfessional Basic Gradient	Biometra
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Mikroskop Zeiss Axioplan 2 imaging	Zeiss
SDS-PAGE und Immunodetektion Fotodokumentation Stella	Raytest
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin
Ultraschallgerät Sonoplus HD2070	Bandelin

Alle hier nicht explizit aufgeführten Geräte entsprechen dem üblichen Laborstandard.

## 2.11 Mikrobiologische Methoden

### 2.11.1 Mikrobiologische Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* wurde entweder auf LB-Agarplatten oder in Flüssigmedium (LB-Medium oder AIM) durchgeführt. Bei der Anzucht von transformierten Stämmen wurde dem Medium zur Stabilisierung des Plasmides und zur Selektion das entsprechende Antibiotikum in der angegebenen Konzentration zugegeben. Übernachtkulturen wurden für 16 bis 20 Stunden in LB-Medium inkubiert. Bei der Anzucht in Erlenmeyerkolben, erfolgte die Inkubation der Kulturen im Inkubationsschüttler bei 120 UpM und 37°C. Das Kulturvolumen betrug 1/10 des Fassungsvermögens des Gefäßes. Alle Glasgefäße für Flüssigkulturen wurden zuvor für mindestens drei Stunden bei 180°C sterilisiert. Bei Anzucht in 2ml-Mikrotiterplatten betrug das Kulturvolumen 800 µl und die Inkubation erfolgte bei 900 UpM bei 37°C.

### 2.11.2 Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in *E. coli* BL21 (DE3)

Bei dem T7 Promotor handelt es sich um den Promotor des Bakteriophagen T7, der ausschließlich von der T7-RNA-Polymerase erkannt wird und in *E. coli* nicht natürlich vorkommt. Die T7 RNA Polymerase weist eine sehr hohe Aktivität auf, wodurch innerhalb kurzer Zeit eine große Menge an mRNA und damit auch Protein gebildet wird (Studier & Moffatt, 1986). Diese steht in *E. coli* BL21 (DE3) unter Kontrolle des lac-Operons, das wiederum von dem lac-Repressor kontrolliert wird. Dieser Repressor wird durch die Bindung von Laktose oder dem nicht verstoffwechselbaren Ersatzstoff IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) inaktiviert, so dass die T7 RNA Polymerase gebildet werden kann und damit auch das P<sub>T7</sub> – kontrollierte Gen transkribiert wird. In Gegenwart von Glukose bleibt der Repressor aktiv, da die Aufnahme von Laktose in die Zelle gehemmt wird, was auch als „Inducer exclusion“ Mechanismus bekannt ist (Inada *et al.*, 1996).

Für die Expression von Genen, die unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen, wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert. Am Tag vor der Überexpression wurde eine Einzelkoloniekultur angesetzt, indem eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Transformationsplatte gepickt wurde und in die Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum zur

Stabilisierung des Plasmids übertragen wurde. Am nächsten Tag wurde daraus eine Expressionskultur mit einer o.D.<sub>580</sub> = 0,05 angesetzt. Bei der Verwendung von LB-Medium wurde die Expression des Gens hinter dem T7-Promotor beim Erreichen einer o.D.<sub>580</sub> = 0,5 durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert. Bei der Verwendung von AIM wurde die Expression des durch den T7-Promotor kontrollierten Gens automatisch nach dem Verbrauch der Glukose induziert.

### **2.11.3 Induzierte Genexpression bei Verwendung des T7-Expressionssystems in *E. coli* CmpX131 mit Roseoflavin als Chromophor**

Am Tag vor der Überexpression wurde eine Einzelkoloniekultur angesetzt, indem eine einzelne Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher von einer Transformationsplatte gepickt wurde und in die Flüssigkultur mit LB-Medium und 50µM Riboflavin und dem entsprechenden Antibiotikum zur Stabilisierung des Plasmids übertragen wurde. Am nächsten Tag wurde daraus eine Expressionskultur mit einer o.D.<sub>580</sub> = 0,05 angesetzt. Bei einer o.D.<sub>580</sub> = 0,5 wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 4000 UpM) und das riboflavinhaltige LB-Medium gegen LB-Medium mit 50µM Roseoflavin, 0,4mM IPTG und dem entsprechenden Antibiotikum ausgetauscht. Anschließend wurde die Inkubationstemperatur von 37°C auf 20°C gesenkt und die Kulturen für 24 Stunden inkubiert.

### **2.11.4 Herstellung chemisch transformationskompetenter *E. coli* Zellen (nach Hanahan, 1983)**

Aus einer *E. coli* Übernachtskultur wurde eine *E. coli* Kultur mit einer o.D.<sub>580</sub>=0,05 in LB-Medium mit 4 % (v/v) Magnesium-Mix angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Sobald diese Kultur die logarithmische Wachstumsphase erreicht hat, was einer o.D.<sub>580</sub>=0,5 – 0,7 entspricht, wurde die Kultur für 5 min bei 4 °C und 4000 UpM zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in ½ Volumen eiskaltem TMF1-Puffer mit einer Pipettenspitze resuspendiert. Die Suspension wurde für 60 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 4 °C und 4000 UpM zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1/10 Volumen eiskaltem TMF2-Puffer mit 20% (v/v)

Glycerol resuspendiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen in Aliquots von je 200 µl in EPG verteilt und bei - 80°C gelagert.

#### **2.11.5 Hitzeschock-Transformation von *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA wurden zunächst 200 µl transformationskompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10µl eines Ligationsansatzes oder mit 1 µl isolierter Plasmid-DNA vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde ein 90 Sekunden langer Hitzeschock bei 42°C durchgeführt. Nach Zugabe von 700 µl LB-Medium wurde der Transformationsansatz zur phänischen Expression der plasmidkodierte Antibiotikaresistenz für 1 bis 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei einer Transformation mit isolierter Plasmid-DNA wurde nach dieser Inkubation ein Volumen von 100 µl des Transformationsansatzes auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten aufgetragen. Bei einer Transformation mit einem Ligationsansatz wurden die Zellen zuerst durch Zentrifugation (1 min, 10.000 UpM) sedimentiert, dann in 100 µl des Überstands resuspendiert und zum Schluss auf die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten aufgetragen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.12 DNA-Techniken**

#### **2.12.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Plasmid-DNA wurde mit dem „innuPREP Plasmid Mini Kit“ der Firma Analytik Jena AG (Jena) entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die einzige Abweichung bestand in der Elution mit A. dest. an Stelle vom mitgelieferten TE-Puffer, um inhibitorische Effekte des im TE-Puffer enthaltenen EDTA auf nachfolgende Enzym- oder Sequenzierungsreaktionen auszuschließen.

#### **2.12.2 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte in Agarosegelen anhand der entsprechenden Banden des Molekulargewichtsstandards (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific). Alle Banden des Molekulargewichtsstandards enthalten eine vom

Hersteller definierte Menge an DNA, woran die DNA-Menge in der Probe ermittelt werden kann.

### **2.12.3 Hydrolytische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen (nach Smith & Birnstiel, 1976)**

Die Hydrolytische Spaltung von DNA wird dazu benutzt, spezifische DNA-Fragmente von einem kompletten DNA-Molekül zu trennen, um diese Fragmente zu isolieren oder das DNA-Molekül anhand der Größe und Anzahl der Fragmente zu identifizieren. Die isolierten Fragmente können zur Klonierung mit einem anderen Vektor ligiert werden. Hierzu werden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die sich dadurch auszeichnen innerhalb einer spezifischen Erkennungssequenz zu schneiden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Restriktionsverdau wurden mit jeweils zwei Restriktionsendonukleasen vom Typ II durchgeführt um unterschiedliche Enden an den Fragmenten zu schaffen und so bei der Klonierung die Orientierung des Fragments im Vektor bestimmen zu können (forcierte Klonierung). Der Puffer wurde so gewählt, dass beide Enzyme laut Herstellerangabe die höchste Aktivität aufweisen. Der Restriktionsverdau wurde für 16 bis 24 Stunden beim Temperaturoptimum der Enzyme inkubiert und durch Zugabe von 0,2 Volumen DNA-Probenpuffer inaktiviert.

### **2.12.4 Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook *et al.*, 1989)**

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von geladenen Molekülen verschiedener Größe im elektrischen Feld. Nukleinsäuren wandern aufgrund ihres konstanten Ladung-zu-Masse-Verhältnisses im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration des Agarosegels und gleicher Stärke des elektrischen Felds vom Molekulargewicht und der Konformation der DNA-Fragmente abhängt. Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Analyse von Restriktionsverdauen, zur Isolierung von DNA-Fragmenten und zur Konzentrationsbestimmung von DNA verwendet. Dazu wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,0 % verwendet. Zum Nachweis der DNA wurde dem Agarosegel 0,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) pro ml Agaroselösung zugesetzt. Dabei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die Helix doppelsträngiger DNA interkaliert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit 0,2 Volumen



DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde in horizontalen Gelkammern bei einer Spannung von maximal 11 Volt pro cm Elektrodenabstand in 0,5-fachem TBE-Puffer durchgeführt.

Die Detektion der DNA nach der Elektrophorese erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 254 - 366 \text{ nm}$ ) mit Hilfe der Videodokumentationsanlage Eagle Eye II von Stratagene.

#### **2.12.5 Elution von DNA aus Agarosegelen (nach Vogelstein & Gillespie, 1979)**

Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen nach einem Restriktionsverdau und zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das „Silica Bead DNA Gel Extraction Kit“ der Firma Thermo Scientific (Schwerte) nach Herstellerangaben verwendet.

#### **2.12.6 Ligation von DNA-Fragmenten (nach Dugaiczky *et al.*, 1975)**

Um ein DNA-Fragment wie z.B. ein Gen in einen Vektor zu klonieren, wurden beide Moleküle durch Restriktionsenzyme hydrolytisch gespalten, gereinigt und anschließend in einem 30  $\mu\text{l}$  Reaktionsansatz durch die T4-DNA-Ligase ligiert. Dabei betrug das molare Verhältnis zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA mindestens 1:3. Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 22°C und anschließend für 10 Minuten bei 65°C zur thermalen Inaktivierung der T4-DNA-Ligase inkubiert.

#### **2.12.7 Fehlerhafte Amplifizierung von DNA mittels Error Prone Polymerasekettenreaktion (epPCR)**

Bei der Polymerasekettenreaktion werden spezifisch DNA-Bereiche *in vitro* aus einem Gemisch von DNA-Molekülen amplifiziert, wobei eine thermostabile DNA-Polymerase, geringe Mengen an Ausgangsmaterial, zwei Primer, die größtenteils komplementär zu den Enden zu amplifizierenden Sequenz sind, sowie DNA-Polymerasepuffer und ein dNTP-Mix benötigt werden. Bei der epPCR wurde die *Taq*-Polymerase zur Amplifizierung der DNA verwendet, die keine Exonukleaseaktivität („*Proofreading*-Funktion“) aufweist. Zur Erhöhung der Fehlerrate der *Taq*-Polymerase wurde dem Reaktionsansatz 0,07 mM Manganchlorid hinzugefügt.

Standardansatz für die epPCR:

Primer I	0,5 µM
Primer II	0,5 µM
Polymerasepuffer	1x Puffer
MnCl <sub>2</sub>	0,07 mM
dNTP-Mix	2,5 mM
DMSO	6 % (v/v)
Matritzen-DNA	50 ng
Polymerase	1,0 U
A. dest.	ad 50 µl

Standardprogramm für die epPCR:

1. Initiale Denaturierung	98 °C,	3 min
2. Denaturierung	98 °C,	30 sec
3. Hybridisierung	T <sub>m</sub> ,	30 sec
4. Elongation	72 °C ,	60 sec/kb
5. Terminale Elongation	72 °C,	5 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden zyklisch 35-mal durchlaufen.

Die Hybridisierungstemperatur T<sub>m</sub> (Richtwert:  $[(T_{m1} + T_{m2})/2] - 5$  °C) richtete sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Primer.

### **2.12.8 Erzeugung von Punktmutationen mittels Overlap extension PCR (nach Ho *et al.*, 1989)**

Um Punktmutationen zu erzeugen werden bei der Overlap extension PCR Primer verwendet, die an der gewählten Position die gewünschten Basen enthalten. Im ersten Schritt werden in zwei separaten Ansätzen der 5'-Teil und der 3'-Teil des Gens (relativ zur Position der Mutation) amplifiziert. Durch die Primer werden dabei in die Reaktionsprodukte die gewünschten Mutationen eingebaut. Die Primer sind dabei so gewählt, dass beide Teile einen Überlappungsbereich haben, so dass der 5'-Teil im zweiten Schritt, nach einer Aufreinigung der Produkte aus dem ersten Schritt, als Primer für den 3'-Teil dienen kann und

umgekehrt. Der jeweils komplementäre Strang wird dann von der DNA-Polymerase vervollständigt. Das entstehende Produkt wird dann nochmals amplifiziert.

Standardansatz für den 1. Schritt der Overlap extension PCR:

Primer I	0,5 µM
Primer II	0,5 µM
Polymerasepuffer	1x Puffer
dNTP-Mix	2,5 mM
DMSO	3 % (v/v)
Matritzen-DNA	50 ng
Polymerase	1,0 U
A. dest.	ad 50 µl

Standardansatz für den 2. Schritt der Overlap extension PCR:

Polymerasepuffer	1x Puffer
dNTP-Mix	2,5 mM
DMSO	3 % (v/v)
5'- Fragment	20 ng
3'- Fragment	20 ng
Polymerase	1,0 U
A. dest.	ad 40 µl

Nach 15 Zyklen werden die Primer (je 0,5 µM) zur Amplifizierung des Produkts hinzugefügt und weitere 35 Zyklen durchgeführt.

Standardprogramm für die Overlap extension PCR:

1. Initiale Denaturierung	95 °C,	3 min
2. Denaturierung	95 °C,	30 sec
3. Hybridisierung	T <sub>m</sub> – 5°C,	30 sec
4. Elongation	72 °C ,	120 sec/kb
5. Terminale Elongation	72 °C,	5 min

## 2.13 Protein Techniken

### 2.13.1 Aufreinigung His-getaggtter Proteine mittels Ni-NTA-Matrix (nach Crowe *et al.*, 1994)

Die Gene der zu reinigenden Proteine wurden vor oder hinter eine Sequenz kloniert, die für 6 Histidine, einen so genannten His-Tag codiert. Dadurch wurde bei der Expression ein Protein mit einem His-Tag gebildet. Die Aufreinigung beruht auf der nicht-kovalenten Bindung der Histidinreste des Proteins an die Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die über die Nitrilo-3-Essigsäure an die Säulenmatrix gebunden sind. Dabei binden die getaggtten Proteine mit einer wesentlich höheren Affinität an die Matrix als andere Proteine, die größtenteils durch das Waschen der Säule entfernt werden.

Zur Aufreinigung wurden die Zellen der Expressionskultur zunächst durch Zentrifugation (15 min, 4 °C, 5.000 UpM) sedimentiert und anschließend für mindestens 60 Minuten bei -20°C tiefgefroren. Daraufhin wurden die Zellen in 30 ml Lysepuffer resuspendiert und nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für fünf Minuten mit Ultraschall behandelt (Bandelin Sonoplus HD60 mit Spitze KE72). Unlösliche Bestandteile des Lysats wurden durch Zentrifugation (45 min, 4°C, 17.000 UpM) sedimentiert. Der klare Überstand wurde dann auf eine zuvor mit 5 Volumen (ausgehend vom Volumen der Matrix) Lysepuffer equilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Flussrate wurde durch die Peristaltikpumpe „LKB Pump P-1“ der Firma Pharmacia eingestellt und betrug während der Bindung der Proteine 4 ml/min und für alle anderen Schritte 6 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 10 Volumen Waschpuffer gewaschen, um andere Proteine zu entfernen. Das zu reinigende Protein wurde durch Zugabe von Elutionspuffer von der Säule gelöst und aufgefangen. Dabei konkurriert das Imidazol im Elutionspuffer mit dem Histidin um die Bindestellen an der Matrix und führt aufgrund seiner höheren Konzentration zu einer Verdrängung des Proteins.

Der Elutionspuffer wurde nach der Aufreinigung durch Lagerpuffer ersetzt. Dazu wurde eine VivaCell Druckluftzelle mit einem 10 kDa Filter der Firma Satorius verwendet. Dabei wird die Flüssigkeit durch Überdruck von bis zu 3 bar durch den Filter gedrückt, wobei die Proteine mit einem Molekulargewicht über 10 kDa den Filter nicht durchdringen können. Das Eluat wurde so oft mit Lagerpuffer verdünnt und filtriert bis die Imidazol-Konzentration bei weniger als 1 mM lag. Das Protein wurde bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### **2.13.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (nach Laemmli, 1970)**

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts. Durch die Zugabe von SDS wird ein negativ geladener Protein-SDS-Komplex gebildet, bei dem die Ladung der Aminosäuren überlagert wird und proportional zur Masse ist. Durch diese negative „Überladung“ der Proteine wandern diese in einem elektrischen Feld mit einer Geschwindigkeit, die proportional zum Molekulargewicht des Proteins, und reziprok proportional zum Vernetzungsgrad des Polyacrylamidgels ist, zur Anode. Bei der Herstellung der diskontinuierlichen Polyacrylamidgele, bestehend aus einem 12%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel, wurde zuerst das Trenngel in der Mini-PROTEAN Gelkammer II gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisierung des Trenngels wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Elektrophorese wurde in 1-fach SDS-Laufpuffer mit einer Spannung von 100 Volt gestartet. Sobald die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung auf 180 Volt erhöht.

### **2.13.3 Coomassie-Färbung zur Proteindetektion (nach Merril, 1990)**

Die SDS-PAGE-Gele wurden ca. 30 – 40 Minuten in Coomassie Brillant Blau-Färbelösung unter langsamem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt und ein Zellulosetuch zum Binden des freien Farbstoffes mit in die Schale gelegt.

### **2.13.4 Chromophoranalyse mittels HPLC**

Zur Identifizierung der gebundenen Flavinspezies wurden HPLC Analysen durchgeführt. Um die Chromophormoleküle freizusetzen, wurden 200 µl Proteinprobe mit 50 µl Puffer D (2.8.7) gemischt und für 10 Minuten bei 99 °C inkubiert. Denaturiertes Protein wurde anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 14.000 UpM). Der klare Überstand wurde durch einen Microcon-Mini-Konzentrator (YM3) mit einem Molekulargewichtsausschluss von 3000 Da gefiltert. Der Durchfluss wurde in ein HPLC-Vial überführt. Als Säule diente eine CC 125/4 Nucleodur 100-5 C18ec, Ser. Nr.: E8092609, Kat. Nr.: 761350.40 mit

der Vorsäulenkartusche CC 8/4 mit dem oben angegebenen Material der Firma Macherey&Nagel (Düren).

Als Mobile Phase diente ein Gemisch aus 95 % Puffer D und 5 % Puffer C für 16 Minuten, anschließend 60 % Puffer D und 40 % Puffer C, bei einer Flussrate von 0,63 ml/min. Die Säulenofentemperatur betrug 35 °C.

## 2.14 Optische Methoden

### 2.14.1 Proteinkonzentrationsbestimmung (nach Bradford, 1976)

Die Konzentration von Proteinen wurde durch den Bradford-Test photometrisch ermittelt. Dabei nutzt man die Komplexbildung des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau G-250 mit den hydrophoben und positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm nach 595 nm verschiebt.

### 2.14.2 Screening auf erhöhte *in vivo* Fluoreszenz von FbFPs auf Agarplatten

Zur Identifizierung von heller fluoreszierenden FbFP-Varianten, wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den Mutantenbanken transformiert. Diese Zellen wurden auf Agarplatten mit 0,2 % Laktose (zur Induktion der T<sub>7</sub>-vermittelten Genexpression) ausplattiert. Als Referenz wurden auf einem definierten Bereich der Agarplatte zusätzlich *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit dem Wildtyp-FbFP ausplattiert. Die platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Agarplatten in den Blaulichtapparat Vilber Lourmat CN-6 gelegt und mit UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) bestrahlt um die Fluoreszenz anzuregen. Die Agarplatten wurden mit einer Spiegelreflexkamera fotografiert und die Bilder mit Hilfe des Computerprogramms ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Dabei wurde im ersten Schritt der Hintergrund abgezogen, um die Autofluoreszenz der Petrischale zu minimieren. Anschließend wurde für den grün-gelben Farbraum ein Schwellenwert gesetzt, wobei alle Bereiche des Bildes, die diesen Wert überschreiten, farblich markiert werden. Dadurch wurden einzelne Kolonien markiert. Der Schwellenwert wurde dabei entsprechend der Fluoreszenzintensität der Referenz angepasst. Dieser Schwellenwert muss für Kolonien am Rand der Agarplatte angepasst werden, da die Hintergrundfluoreszenz der Petrischale in diesem Bereich besonders hoch ist.

### 2.14.3 Photometrische Fluoreszenzmessung

Zur spektralen Fluoreszenzmessung von *in vivo* und *in vitro* Proben wurde entweder das Fluoreszenzspektrometer Cary Eclipse der Firma Varian, das Quanta Master 40 der Firma Photon Technology International oder das Fluoreszenzplattenphotometer Infinite M1000 Pro der Firma Tecan verwendet. Für *in vivo* Messungen wurde eine Zellmenge einer o.D.<sub>580</sub> = 0,5 entsprechend in PBS-Puffer verwendet. Die genaue Absorption wurde im Photometer kontrolliert, um die Fluoreszenzintensität auf eine o.D.<sub>580</sub> = 1 zu normieren. Für *in vitro* Messungen wurde die Probe, wenn nicht anders angegeben, auf eine Absorption<sub>450</sub> ≤ 0,1 verdünnt. Dadurch werden interne Filter- und Reabsorptionseffekte innerhalb der Probe minimiert. Sofern nicht anderes angegeben wurden alle Proben bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$  angeregt.

### 2.14.4 Bestimmung der Quantenausbeute

Die Quantenausbeute eines Fluoreszenzproteins gibt an, wie viele Quanten pro Anzahl absorbierter Quanten in Form von Fluoreszenz emittiert werden. Sowohl die Anzahl der absorbierten als auch der emittierten Quanten kann in einem geeigneten Fluoreszenzphotometer mit Hilfe einer Integrationskugel gemessen werden. In dieser Arbeit wurde dazu das Fluoreszenzphotometer Quanta Master 40 der Firma Photon Technology International verwendet. Die zu messende Probe wurde auf eine Konzentration entsprechend einer Absorption bei dem Anregungsmaximum von < 0,1 eingestellt, um interne Filtereffekte und Reabsorption zu minimieren. Von der Probe wurden 4 ml in eine Makro-Quarzküvette gefüllt. Zur Messung der emittierten Quanten wurde ein vollständiges Emissionsspektrum der Probe und einer geeigneten Leerprobe aufgenommen. Zur Messung der absorbierten Quanten wurde ein Scan der Probe und der Leerprobe im Bereich der Anregungswellenlänge von  $\pm 10 \text{ nm}$  aufgenommen. Da hierbei das Licht der Lampe auf den Detektor fällt, welches deutlich stärker ist als die Fluoreszenz der Probe, wurden hierbei Breitband-Filter verwendet. Die Verringerung des gemessenen Signals hierdurch wurde durch einen vorgeschalteten Detektor gemessen und in die korrigierten Spektren von der Software automatisch eingerechnet. Die Verstärkung sowie die „Slits“ am Photometer wurden so eingestellt, dass das Signal des Anregungs-Scans der Leerprobe einen Peak-Wert zwischen 800.000 und 1.000.000 Zählern (Quanten pro Sekunde) erreicht. Dadurch soll eine

Sättigung des Detektors vermieden und gleichzeitig eine gute Signalqualität gewährleistet werden.

Die Quantenausbeute wurde mit Hilfe von Formel 1 berechnet:

$$\Phi_F = \frac{\int_{\lambda_{Em1}}^{\lambda_{Em2}} Probe - \int_{\lambda_{Em1}}^{\lambda_{Em2}} Blank}{\int_{\lambda_{Ex-10}}^{\lambda_{Ex+10}} Blank - \int_{\lambda_{Ex-10}}^{\lambda_{Ex+10}} Probe}$$

**Formel 1: Berechnung der Fluoreszenzquantenausbeute ( $\Phi_F$ ).** Das Integral der Fluoreszenzemission der Probe von der ersten ( $\lambda_{Em1}$ ) bis zur letzten Wellenlänge ( $\lambda_{Em2}$ ) abzüglich des Integrals des Leerwerts (Blank) stellt die Anzahl emittierter Quanten dar. Die Differenz der Integrale der Anregungs-Scans ( $\lambda_{Ex} \pm 10$  nm), des Leerwerts und der Probe stellen die Anzahl absorbierter Quanten dar. Der Quotient aus der Anzahl emittierter Quanten und der Anzahl absorbierter Quanten ist die Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )

### 2.14.5 Berechnung des Extinktionskoeffizienten

Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) ist ein Maß für die Lichtabsorption eines Stoffes. Er ist von zentraler Bedeutung für Fluoreszenzproteine, da das Produkt aus der Quantenausbeute und des Extinktionskoeffizienten die Helligkeit des Proteins bestimmt. Im Fall von FbFPs ist eine direkte Messung dieses Wertes mit einer bestimmten Menge an Protein nicht möglich, da nicht davon ausgegangen werden kann, dass jedes Protein ein Flavin als Cofaktor gebunden hat. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine indirekte Methode entwickelt, um diesen Wert zu bestimmen. Bei dieser Messung wird die Absorption des Cofaktors einer Probe in proteingebundenem und freiem Zustand gemessen. Der Quotient der Absorption in gebundenem und freiem Zustand, multipliziert mit dem Extinktionskoeffizienten von freiem FMN (12.200 (Whitby, 1953)) ergibt den Extinktionskoeffizienten des gebundenen Cofaktors. Zur Freisetzung des Chromophors wird die Probe drei Minuten lang bei 95°C inkubiert und anschließend sofort gemessen. Die Freisetzung des Cofaktors kann dabei fluoreszenzphotometrisch kontrolliert werden, da sich die Emissionsspektren von freiem und gebundenem Flavin deutlich unterscheiden.

### 2.14.6 Berechnung der Cofaktor-Beladung

Die Cofaktor-Beladung gibt den Proteinanteil an, der ein Flavin gebunden hat. Er kann photometrisch bestimmt werden, wenn der Extinktionskoeffizient des Cofaktors in gebundenem Zustand und der Extinktionskoeffizient des Apoproteins bekannt sind. Dazu



wird die Konzentration des Proteins und des Cofaktors in einer Probe anhand der Absorption und des zuvor berechneten Extinktionskoeffizienten bestimmt. Für die Berechnung des Extinktionskoeffizienten des Apoproteins bei  $\lambda = 280$  nm wurde das Programm ProtParam von ExPASy verwendet. Da Flavine ebenfalls Licht bei  $\lambda = 280$  nm absorbieren, muss dieser Wert bei der Berechnung der Proteinkonzentration abgezogen werden. Der Quotient aus Cofaktor- und Proteinkonzentration ergibt die Cofaktor-Beladung. Die gesamte Berechnung ist in Formel 2 zusammengefasst.

$$\text{Cofaktorbeladung} = \frac{\frac{AT_{1,\lambda_1}}{AT_{2,\lambda_1}} \times \varepsilon(\text{FMN}_{\lambda_1})}{\left( AT_{2,\lambda_2} - \left( \frac{AT_{1,\lambda_2}}{AT_{2,\lambda_2}} \times \varepsilon(\text{FMN}_{\lambda_2}) \right) \right) \times \left( \frac{AT_{1,\lambda_1}}{AT_{2,\lambda_1}} \times \varepsilon(\text{FMN}_{\lambda_1}) \right)}{\varepsilon(\text{Apoprotein}_{\lambda_2})}$$

**Formel 2: Berechnung der Cofaktorbeladung.** A: Absorption, T1: 20°C, T2: 95°C,  $\lambda_1$  = Anregungsmaximum des FbFPs,  $\lambda_2 = 280$  nm,  $\varepsilon$  = Extinktionskoeffizient. Der Term über dem Bruchstrich stellt die Cofaktorkonzentration dar, während der untere Term die Proteinkonzentration darstellt, für deren Berechnung die Absorption durch den Cofaktor mit einberechnet werden muss. Der Quotient aus der Cofaktorkonzentration und der Proteinkonzentration ergibt die Cofaktorbeladung.

### 2.14.7 Messung der Photostabilität von FbFPs

Die Photostabilität beschreibt die Eigenschaft eines Fluorophores bei Bestrahlung mit Licht auszubleichen. Als Maß wird hierzu die Bleaching-Halbzeit verwendet, die die Zeit angibt, nach der die Fluoreszenzemission bei Bestrahlung auf 50 % des Ausgangswertes gefallen ist. Um diese Zeit zu messen wurden Kinetiken im „Varian Cary Eclipse“ bei  $20 \pm 2$  °C aufgenommen. Eine 700  $\mu$ l Probe mit einer Absorption von 0,1 bei  $\lambda = 450$  nm wurde in einer Halbmikro-Quarzküvette in dem Küvettenhalter platziert. Die Bestrahlung erfolgt durch eine „high-power LED“ (LUXEON Rebel LXML PR01 0425 royalblue; Philips Lumileds, San Jose, CA, USA) mit einer 20 mm Linse (Abstrahlwinkel: 12°) bei einer Leistung von 350 mA und einer Lichtleistung von 180 mW cm<sup>-2</sup> (Emissionswellenlänge laut Hersteller: 448 nm). Die LED mit der Linse wurde direkt auf der Küvette platziert. Die Kinetiken wurden mit einem Datenintervall von einer Sekunde aufgenommen und der erste Datenpunkt unter 50 % wurde als Bleaching-Halbzeit genommen.

## 2.15 Computerprogramme und Datenbanken

Klonierungen wurden mit Hilfe des Programms „Clone Manager“ in der Version 7.03 (Scientific & Educational Software) geplant.

Die Auswertung von fluoreszenzphotometrischen Daten erfolgte mit Hilfe von „Microsoft Excel 2010“ der Firma Microsoft.

Zur Modellierung von molekularen Graphiken der Proteine (3D-Modelle) wurde das Programm MODELLER (Sali & Blundell, 1993) verwendet.

Die Bilder von 3D-Modellen wurden erstellt dem UCSF Chimera Paket (Pettersen *et al.*, 2004) erstellt.

Sequenz-Alignments wurden mit dem Programm BioEdit (Thomas Hall; <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) ausgewertet.

Für die Datenbankrecherchen und Sequenzanalysen im Internet wurden folgende Adressen verwendet:

National Center for Biotechnological Information (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
IMG/M	<a href="http://img.jgi.doe.gov/m/doc/about_index.html">http://img.jgi.doe.gov/m/doc/about_index.html</a>
ExPASy Molecular Biology Server	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>
Protein Data Bank	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>
Clustal Omega	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>

---

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung bislang etablierter FbFPs

Die ersten beschriebenen FbFPs waren BsFbFP, EcFbFP und PpFbFP (Drepper *et al.*, 2007). Bs- und EcFbFP wurden beide aus *B. subtilis* YtvA entwickelt, während PpFbFP aus PpSB2-LOV von *P. putida* entwickelt wurde. PpFbFP wurde in Pp2FbFP umbenannt, nachdem ein weiteres FbFP aus PpSB1-LOV erzeugt und als Pp1FbFP bezeichnet wurde (siehe auch Wingen *et al.*, 2014). Von dem aus *A. thaliana* stammenden iLOV (Chapman *et al.*, 2008) wurde die Variante phiLOV2.1 entwickelt, die sich durch eine verbesserte Photostabilität auszeichnet (Christie *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurden die photophysikalischen und helligkeitsbestimmenden Eigenschaften von BsFbFP, EcFbFP, Pp1FbFP, Pp2FbFP und phiLOV2.1 neu bestimmt. Dies hatte zwei Gründe: Zum einen wurden im Rahmen dieser Arbeit neue und verbesserte Methoden etabliert, um die Fluoreszenz-Quantenausbeute, den Extinktionskoeffizienten und die Cofaktorbeladung der FbFPs zu bestimmen. Diese Methoden erlauben eine exakte spektroskopische Analyse der photophysikalischen Eigenschaften der Proteine. Der zweite Grund ist die einheitliche und vollständige Charakterisierung der oben aufgeführten Parameter für alle FbFPs unter den gleichen Bedingungen. Da in den bisherigen Publikationen in den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Methoden für die Charakterisierung der FbFPs benutzt wurden und auch nicht zu jedem Protein alle oben aufgeführten Eigenschaften angegeben wurden (vgl. Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012; Drepper *et al.*, 2007), stellen die hierbei gewonnenen Daten eine wichtige Basis für den Vergleich und die Verbesserung verschiedener FbFPs dar.

#### 3.1.1 Bestimmung der Fluoreszenz-Quantenausbeute

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute ( $\Phi_F$ ; im Folgenden als Quantenausbeute bezeichnet) gibt an, wie viele Photonen pro Anzahl absorbierter Photonen emittiert werden. Sie ist daher von entscheidender Bedeutung für die Helligkeit eines Fluorophors. Die gängige Methode zur Bestimmung der Quantenausbeute eines Fluoreszenzproteins ist die relative Bestimmung anhand des Vergleichs der auf die Absorption normierten Fluoreszenzemission des Proteins mit der einer Referenzsubstanz mit bekannter Quantenausbeute. Für GFP-Derivate wird

dabei üblicherweise der Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein verwendet (z.B. Heim *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 1997), da sein Emissionsspektrum dem von GFP ähnelt. Für FbFPs wurde bislang hingegen FMN verwendet (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ermittelt, dass die Verwendung von entweder Fluorescein oder FMN für die relative Bestimmung der Quantenausbeute der FbFPs (mit dem hierzu verwendeten und gängigen „Varian Cary Eclipse“ Fluoreszenzspektrometer) zu unterschiedlichen Werten für die Quantenausbeute führt. Bei der Kreuzreferenzierung der Quantenausbeute von Fluorescein mit Riboflavin als Referenz (angenommene  $\Phi_F = 0,25$ ) ergab sich hierbei ein Wert von  $\Phi_F = 1,15$  für Fluorescein (korrekter Wert:  $\Phi_F = 0,93$ ; s.u.). Dies ist physikalisch unmöglich, da ein Fluorophor nicht mehr Photonen emittieren kann, als absorbiert werden. Der Grund für diese Abweichungen liegt in den spektralen Unterschieden der Substanzen und der fehlenden Kalibrierbarkeit des verwendeten Instruments, um diese Unterschiede zu kompensieren. Riboflavin besitzt ein sehr breites Emissionsspektrum, das sich über den Bereich von  $\lambda = 470$  nm bis  $\lambda = 650$  nm erstreckt (siehe Abb. 1.6). Die Sensitivität des Detektors im Fluoreszenzphotometer ist dabei nicht für Licht aller Wellenlängen identisch, sondern nimmt materialbedingt gerade bei höheren Wellenlängen (Photonen niedrigerer Energie) im roten Spektralbereich ab. Somit wirken sich spektrale Verschiebungen des Emissionsspektrums der Probe und der Referenz auf die jeweilige, gemessene Emissionsintensität aus und verfälschen die daraus berechnete Quantenausbeute. Mit dem „QuantaMaster 40“ Fluoreszenzphotometer der Firma Photon Technology International, bei dem solche Unterschiede durch die Software kompensiert werden, konnten die Quantenausbeuten der FbFPs und der Standards unter Verwendung einer sogenannten Integrationssphäre in dieser Arbeit auf absolute Weise, d.h. ohne dass eine Referenz nötig ist, mit hoher Genauigkeit bestimmt werden. Diese Methode ist in 2.14.4 detailliert beschrieben.

Zur Verifizierung des Setups und zur Einschätzung der Präzision der Methode wurden die Quantenausbeuten von drei Fluorophoren bekannter Quantenausbeute gemessen. Die Quantenausbeute des sehr gut charakterisierten Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein wurde in 0,1 M NaOH(aq) mit  $\Phi_F = 0,931 \pm 0,008$  bestimmt (Literaturwerte: zwischen  $\Phi_F = 0,91$  und  $\Phi_F = 0,95$ ; Brouwer, 2011). Für Riboflavin wurde ein Wert von  $\Phi_F = 0,247 \pm 0,007$  ermittelt (Literaturwert:  $\Phi_F = 0,26$ ; Weber & Teale, 1957) und für das sehr schwach fluoreszierende Riboflavinderivat FAD ein Wert von  $\Phi_F = 0,032 \pm 0,0004$  (Literaturwert:  $\Phi_F = 0,03$ ; Wahl *et*

*al.*, 1974). Somit konnte gezeigt werden, dass sich diese Methode sehr gut eignet, um die Quantenausbeute verschiedener Stoffe mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften und sehr unterschiedlichen Quantenausbeuten mit hoher Genauigkeit zu bestimmen.

Daraufhin wurden die Quantenausbeuten der etablierten FbFPs mit dieser Methode bestimmt. Die höchste Quantenausbeute wurde dabei für EcFbFP mit  $\Phi_F = 0,44$  gemessen. BsFbFP liegt mit einem Wert von 0,39 leicht darunter. Pp1FbFP liegt mit  $\Phi_F = 0,27$  im mittleren Bereich der hier gemessenen Quantenausbeuten. Pp2FbFP ( $\Phi_F = 0,22$ ) und phiLOV2.1 ( $\Phi_F = 0,2$ ) zählen zu den am wenigsten hellen FbFPs.

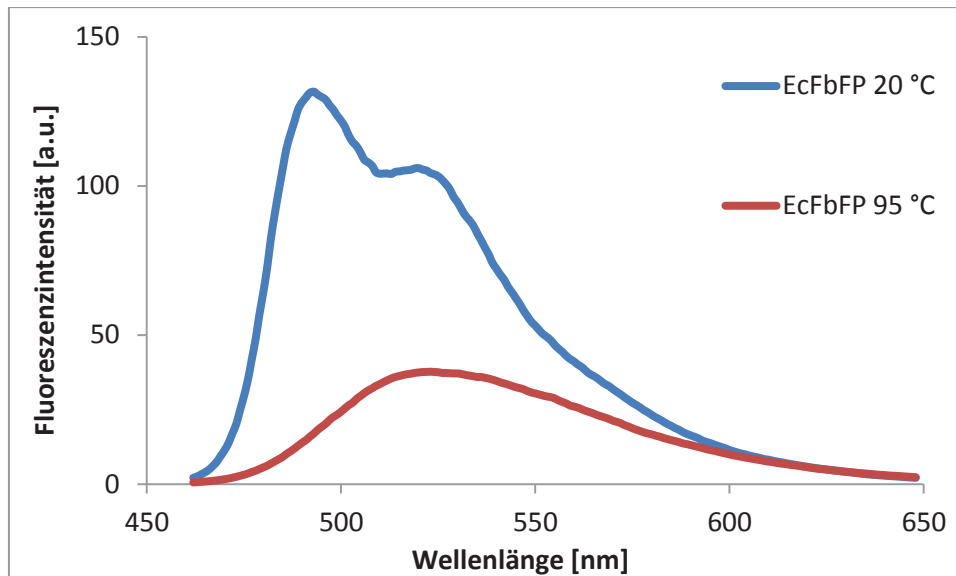
Sowohl für Ec- als auch für Pp2FbFP wurden damit höhere Werte gemessen, als in der Literatur publiziert sind (Drepper *et al.*, 2007), was auf die unterschiedliche Messmethodik zurückzuführen ist. Für BsFbFP, Pp1FbFP und phiLOV2.1 wurden zuvor keine Quantenausbeuten publiziert.

### 3.1.2 Der Extinktionskoeffizient von FbFPs

Der Extinktionskoeffizient ist ein Maß für die Reduktion elektromagnetischer Strahlungsintensität durch einen Stoff bei einer bestimmten Wellenlänge. Diese Reduktion kann im Allgemeinen sowohl durch Absorption, als auch durch Streuung stattfinden, wobei beide Effekte kumulativ wirken. Da die Streuung durch eine Lösung von gereinigtem Protein vernachlässigbar ist, wird der Extinktionskoeffizient allgemein als ein Maß für die Lichtabsorption von Fluoreszenzproteinen angegeben. In früheren Studien wurde für den Extinktionskoeffizienten der FbFPs und LOV-Domänen der Wert von freiem FMN angenommen (vgl. z.B. Drepper *et al.*, 2007; Losi *et al.*, 2002), da keine Methode zu dessen Berechnung zur Verfügung stand.

Eine solche Methode wurde in dieser Arbeit entwickelt und ist in Kapitel 2.14.5 ausführlich beschrieben. Die Methode beruht auf dem Vergleich der Absorption des Chromophors in gebundenem und ungebundenem Zustand, wobei die Freisetzung durch eine thermische Denaturierung des Proteins erfolgt. Dabei wird das Verhältnis dieser beiden Absorptionswerte mit dem Extinktionskoeffizienten von freiem FMN multipliziert, um den Extinktionskoeffizienten des gebundenen FMNs zu berechnen. Die Freisetzung des

Chromophors wird im Fluoreszenzphotometer überprüft und ist aufgrund der spektralen Unterschiede von freiem und gebundenem FMN deutlich sichtbar (vgl. Abb. 1.6). In Abbildung 3.1 ist dies exemplarisch für EcFbFP dargestellt.



**Abb. 3.1: Unterschied der Fluoreszenzemission von freiem und gebundenem FMN in EcFbFP bei thermischer Denaturierung des Proteins.** Bei 20 °C zeigt EcFbFP das für FbFPs typische Emissionsspektrum mit einem Maximum bei  $\lambda = 495$  nm und einer Schulter um  $\lambda = 525$  nm. Nach fünfminütiger Inkubation bei 95 °C gleicht das Emissionsspektrum dem von freiem FMN (vgl. Abb. 1.6) mit einem Maximum bei ca.  $\lambda = 530$  nm. Ab dem Zeitpunkt, ab dem dieses Spektrum konstant bleibt, kann angenommen werden, dass der Cofaktor vollständig aus dem Protein herausgelöst wurde.

Bei diesen Messungen wurde für EcFbFP ein Wert von  $14.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ermittelt, was in etwa 20 % höher ist als der von freiem FMN publizierte Extinktionskoeffizient von  $12.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Whitby, 1953). Die Werte für die anderen FbFPs sind sehr ähnlich und liegen für Bs- und Pp1FbFP bei jeweils  $13.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und für Pp2FbFP bei  $14.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Für phiLOV2.1 konnte mit dieser Methode kein Extinktionskoeffizient berechnet werden, da das Protein bei der thermischen Denaturierung ausfiel, was zu einer starken Streuung im Photometer führte.

### 3.1.3 Die Cofaktorbeladung von FbFPs

Die Cofaktorbeladung der FbFPs gibt den Teil des Gesamtproteins an, der mit einem Cofaktor bzw. Chromophor beladen ist. Ohne einen gebundenen Cofaktor zeigen FbFPs keine spezifische Fluoreszenz. In früheren Arbeiten wurde eine einfache UV/VIS Ratio der Absorption bei  $\lambda = 272$  nm (Absorption der aromatischen Aminosäuren) und 447 nm (Absorption des Cofaktors) gebildet, um Rückschlüsse auf die Cofaktorbeladung von FbFPs und LOV-Domänen zu ziehen (z.B. Drepper *et al.*, 2007; Losi *et al.*, 2005). Der dabei ermittelte Wert erlaubt allerdings keinen direkten Vergleich zwischen zwei Proteinen mit unterschiedlichen aromatischen Aminosäuren, da diese zu einer anderen Ratio führen.

In dieser Arbeit wurde daher der Extinktionskoeffizient des gebundenen FMNs benutzt, um die Cofaktorkonzentration in einer Lösung mit einem FbFP anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes zu bestimmen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen wurde der berechnete Extinktionskoeffizient des jeweiligen Apoproteins bei  $\lambda = 280$  nm verwendet, wobei von der gemessenen Absorption noch die Absorption des Cofaktors bei dieser Wellenlänge subtrahiert werden muss. Dieser Schritt erfolgt ebenfalls entsprechend dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Aus dem Verhältnis dieser beiden Konzentrationen ergibt sich die Cofaktorbeladung. Die Methode ist detailliert in 2.14.6 beschrieben.

Nur für BsFbFP wurde dabei eine vollständige Beladung ermittelt. Der berechnete Wert lag hier bei 112 % und damit über dem theoretischen Maximum. Dies zeigt, dass bei dieser Methode mit einem Fehler von mehr als 10 % gerechnet werden muss. Dieser Fehler setzt sich aus den technisch nicht vermeidbaren Fehlern in der Konzentrationsbestimmung des Proteins und des Cofaktors zusammen. Für das sehr ähnliche EcFbFP wurde eine Beladung von 66 % ermittelt. Pp1FbFP und Pp2FbFP weisen eine geringere Beladung auf und liegen mit 41 und 36 % sehr nah beieinander. Da für phiLOV2.1 kein Extinktionskoeffizient errechnet werden konnte (s.o.), wurde der Mittelwert aller in dieser Arbeit bestimmten Werte von ca.  $14.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet. Dabei ergab sich für phiLOV2.1 eine Cofaktorbeladung von 52 %.

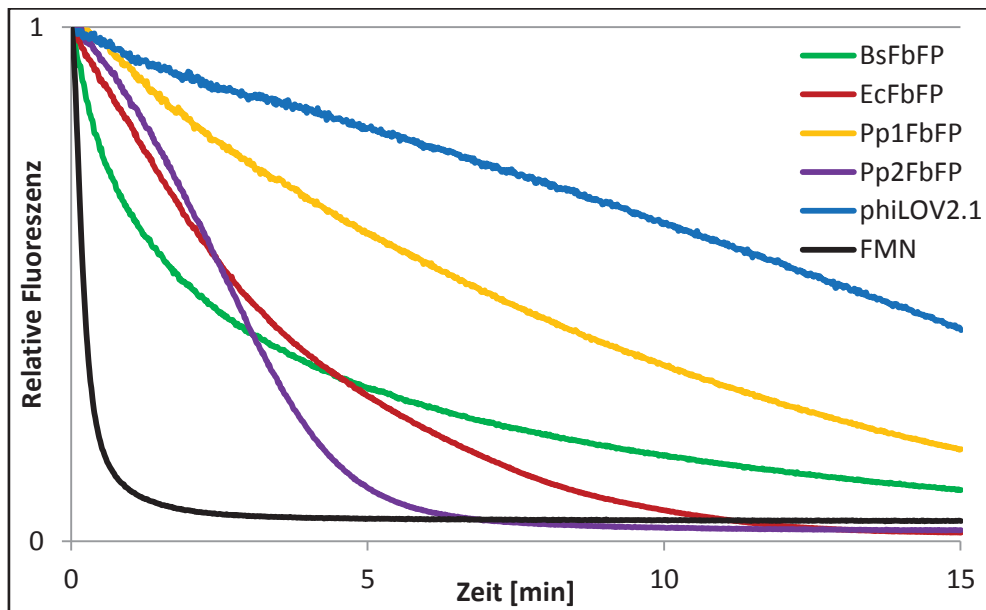
### 3.1.4 Die Photostabilität der FbFPs

Die Photostabilität gibt an, wie schnell ein Fluorophor bei Bestrahlung mit Licht ausbleicht, d.h. seine Fluoreszenz verliert. Für die meisten bildgebenden Anwendungen sind Fluorophore mit einer hohen Photostabilität von Vorteil. Durch eine gleichbleibende Fluoreszenzemission über die Zeit können Proben so länger untersucht werden.

Als Maß für die Photostabilität von Fluoreszenzproteinen wird die Bleaching-Halbzeit benutzt. Sie gibt die Zeit an, nach der die Fluoreszenzemission bei Belichtung mit einer definierten Wellenlänge und Lichtintensität auf 50 % des Ausgangswertes gefallen ist. Die Messung ist in 2.14.7 beschrieben.

Die Kinetiken des *in vitro* Photobleaching-Verhaltens der etablierten FbFPs sind in Abb. 3.2 dargestellt. Darin erkennt man, dass sich die Photostabilität der FbFPs stark unterscheidet. Während freies FMN innerhalb von ca. 20 Sekunden die Hälfte seiner Fluoreszenz verliert, dauert dies in gebundenem Zustand in FbFPs deutlich länger. Bei Bs- Ec- und Pp2FbFP ist dabei eine stark exponentielle Abnahme der Fluoreszenz mit Bleaching-halbzeiten von ca. 2 (BsFbFP) bis 2,8 Minuten (EcFbFP) zu beobachten. Bei Pp1FbFP und insbesondere bei phiLOV2.1 ist die Fluoreszenzabnahme deutlich geringer. Für Pp1FbFP wurde eine Bleaching-Halbzeit von 6,7 Minuten gemessen. Bei phiLOV2.1 liegt sie mit etwa 13 Minuten etwa doppelt so hoch.





**Abb. 3.2:** *In vitro* Photobleaching-Kinetiken von FMN und verschiedenen FbFPs. Gemessen wurde die Abnahme der Fluoreszenz bei  $\lambda = 495$  nm einer Probe mit gereinigtem Protein über die Zeit bei intensiver Bestrahlung mit Blaulicht ( $\lambda = 448$  nm; Lichtintensität:  $180 \text{ mW cm}^{-2}$ ) durch eine LED (siehe 2.14.7). FMN verliert innerhalb von ca. 20 Sekunden die Hälfte seiner Fluoreszenz, während die FbFPs deutlich stabiler sind. Die Fluoreszenz nimmt dabei bei den meisten FbFPs exponentiell ab. Bs- Ec- und Pp2FbFP zeigen Bleaching-Halbzeiten zwischen 2 und 3 Minuten, wohingegen Pp1FbFP (6,7 Minuten) und phiLOV2.1 (13 Minuten) wesentlich stabiler sind. Bei phiLOV2.1 ist zudem eine näherungsweise lineare Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten.

### 3.1.5 Zusammenfassung der Helligkeitsbestimmenden und photophysikalischen Eigenschaften etablierter FbFPs

Die hier ermittelten Daten zu den einzelnen FbFPs und FMN (als Referenz) sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Darin erkennt man eine große Diversität der Quantenausbeute, der Cofaktorbeladung und insbesondere der Photostabilität. Der Extinktionskoeffizient hingegen beträgt bei allen FbFPs in etwa  $14.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Auch die Anregungs- und Emissionsmaxima sind bei diesen FbFPs praktisch identisch.

**Tab. 3.1: Zusammenfassung der Helligkeitsbestimmenden und photophysikalischen Eigenschaften etablierter FbFPs.** Bei den verschiedenen FbFPs gibt es große Unterschiede in der Quantenausbeute, der Cofaktorbeladung und der Bleaching-Halbzeit. Die berechnete Cofaktorbeladung unterliegt einer messtechnisch bedingten Ungenauigkeit von über 10%, weshalb für BsFbFP ein Wert von über 100 % berechnet wurde. Dieses Protein ist wahrscheinlich vollständig beladen. Der Extinktionskoeffizient von phiLOV2.1 konnte nicht bestimmt werden, da das Protein bei Erhitzung ausfiel. Für die Berechnung der Cofaktorbeladung wurde in diesem Falle ein Durchschnittswert von  $14.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  verwendet. Die angegebenen Werte für den Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeute und die Bleaching-Halbzeit sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung. Referenz a: (Whitby, 1953)

Name	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-Halbzeit [min]
BsFbFP	449	495	$13.900 \pm 400$	$0,39 \pm 0,01$	112	$1,97 \pm 0,05$
EcFbFP	448	496	$14.500 \pm 200$	$0,44 \pm 0,01$	66	$2,81 \pm 0,1$
Pp1FbFP	450	496	$13.900 \pm 500$	$0,27 \pm 0,01$	41	$6,75 \pm 0,83$
Pp2FbFP	449	495	$14.200 \pm 50$	$0,22 \pm 0,01$	36	$2,68 \pm 0,19$
phiLOV2.1	450	497	n.b.	$0,20 \pm 0,01$	52	$12,97 \pm 0,74$
FMN	444	531	$12.200^a$	$0,25 \pm 0,01$	-	$0,325 \pm 0,04$

### 3.2 Generierung neuer Varianten von FMN-bindenden Fluoreszenzproteinen

FbFPs sind eine relativ neue Klasse von Fluoreszenzproteinen. Sie wurden etabliert, da sie im Gegensatz zu Fluoreszenzproteinen der GFP-Familie sauerstoffunabhängig sind. GFP und seine Derivate wurden innerhalb der letzten Jahrzehnte umfangreich studiert und durch Mutagenese verändert, wobei zahlreiche neue und verbesserte Varianten hervorgebracht wurden. Die Methoden, die hierzu verwendet wurden, können in zwei experimentelle Vorgehensweisen unterteilt werden:

Dazu zählt zum einen die Zufallsmutagenese, bei der an zufälligen Positionen des Gens Mutationen eingefügt werden. Eine der am häufigsten verwendeten Methoden ist hierbei bis heute die „*error prone PCR*“ (epPCR) (McCullum *et al.*, 2010; Tee & Wong, 2013). Dabei wird die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet, die keine Fehlerkorrekturfunktion besitzt und daher eine höhere Fehlerquote (0,001 - 0,02% pro Nukleotid) als andere DNA-Polymerasen aufweist. Die Fehlerquote kann z.B. durch Variation der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, der Zugabe von MnCl<sub>2</sub>, sowie unterschiedlichen Konzentrationen der vier dNTPs in der PCR beeinflusst werden (McCullum *et al.*, 2010; Pritchard *et al.*, 2005). Diese Methode führt in der Regel zu sehr großen Mutantenbanken, die dann in einem anschließenden *Screening* im Hochdurchsatzverfahren auf eine bestimmte Eigenschaft hin analysiert werden müssen. Allgemein führen die meisten Mutationen zu keiner Verbesserung oder haben sogar einen negativen Einfluss auf die untersuchte, oder auch andere Eigenschaften des Proteins. Es kann auch vorkommen dass die primär untersuchte Eigenschaft verbessert wird, dafür aber andere Eigenschaften des Proteins verschlechtert werden.

Die zweite experimentelle Vorgehensweise, das rationale Design, setzt Informationen über die Struktur des Proteins voraus. Dabei wird im ersten Schritt die Struktur des Proteins oder eines computergenerierten Modells analysiert und nach Schlüsselpositionen gesucht. An diesen Schlüsselpositionen werden dann im zweiten Schritt einzelne Aminosäuren gegen eine oder mehrere andere ausgetauscht. Es ist auch möglich, eine Aminosäure in einem Schritt gegen alle anderen möglichen Aminosäuren auszutauschen. Bei diesem, als Sättigungsmutagenese bezeichneten Vorgang, wird ein ganzes Basentriplett (Codon) in einer PCR durch spezielle Primer gegen alle möglichen Codons ausgetauscht (Steffens & Williams, 2007; Zheng *et al.*, 2004). Im Vergleich zur Zufallsmutagenese entstehen so verhältnismäßig kleine Mutantenbanken, die mit deutlich geringerem Aufwand an Zeit und Geld analysiert

werden können. Sowohl aus diesem Grund, als auch weil die weltweite Sammlung an Strukturinformationen immer größer wird und Computerprogramme zur Strukturanalyse immer weiter entwickelt werden, wird das rationale Design immer häufiger eingesetzt (Lutz, 2010). Im Falle der FbFPs stehen mehrere Strukturen von LOV-Domänen zur Verfügung (z.B. Christie *et al.*, 2012; Circolone *et al.*, 2012; Möglich & Moffat, 2007), die für Analysen oder die Modellierung von Strukturen anderer LOV-Domänen und FbFPs genutzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden FbFPs durch Mutagenese verändert, um auch diese Klasse von Fluoreszenzreportern zu verbessern. Dabei kam sowohl rationales Design zur Erzeugung von Sättigungsmutationen an definierten Positionen innerhalb des Proteins zum Einsatz, als auch die Zufallsmutagenese mittels epPCR.

### 3.2.1 Erzeugung neuer Varianten von Pp2FbFP und EcFbFP durch rationales Design

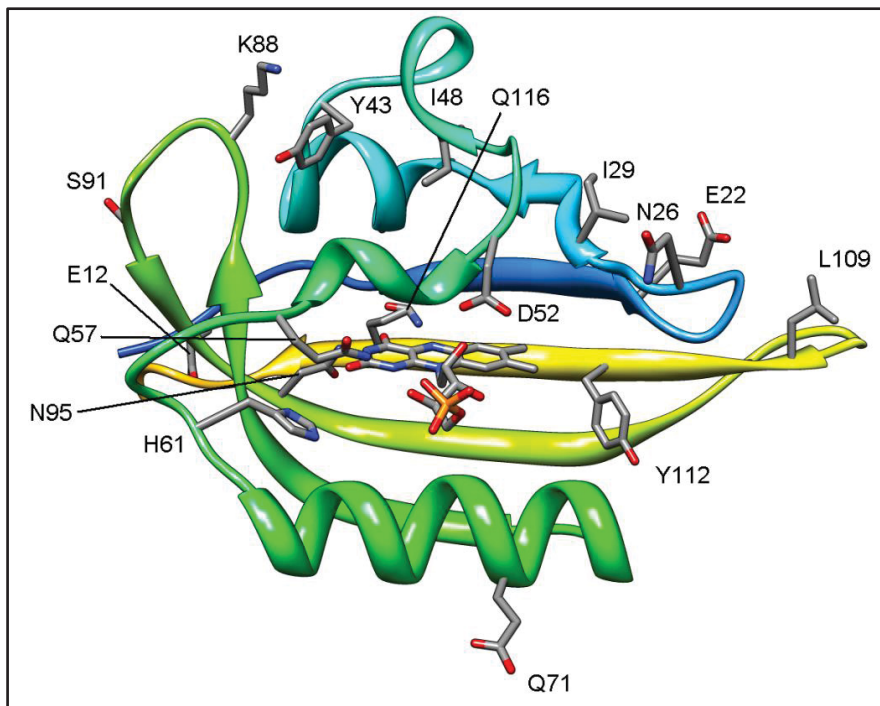
Der erste hier genutzte Ansatz zur Erzeugung von verbesserten FbFP-Varianten beruht auf der Analyse von Strukturinformationen. Als Startpunkt diente hierbei eine Reihe zuvor charakterisierter Varianten von Pp2FbFP (Wingen, Diplomarbeit 2011). Diese Varianten trugen größtenteils mehrere Mutationen und zeigten deutlich veränderte Fluoreszenzeigenschaften. Zur Übersicht sind die für diese Arbeit relevanten Daten dieser Varianten aus der vorangegangenen Arbeit in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Lage der Mutationen ist in dem Strukturmodell in Abb. 3.3 dargestellt.

**Tab. 3.2: Ausgewählte Daten zu Pp2FbFP Varianten aus der vorangegangenen Arbeit (Wingen, Diplomarbeit 2011).** Die Varianten Pp2FbFP-4, -5, -8 und -9 verfügen über eine ca. 1,3fach erhöhte Quantenausbeute gegenüber dem Wildtyp. Pp2FbFP-10 weist eine spektrale Verschiebung von 10 nm auf. Die in dieser Tabelle angegebenen Quantenausbeuten wurden 2011 mit einer mittlerweile veralteten Methode bestimmt und sollten daher nur relativ zueinander innerhalb dieser Tabelle betrachtet werden. Erzeugt wurden die Varianten 1-10 von Dr. Sascha Hausmann, evocatal GmbH, Monheim.

Name	Mutation	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	<i>In vivo</i> Fluoreszenz [%]	Quanten- ausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktor- beladung [%]
Pp2FbFP	-	450	495	100	0,17	31
Pp2FbFP-1	D52G	450	495	41	0,09	29
Pp2FbFP-2	A36T, Q57H, N95I	450	495	41	0,14	16
Pp2FbFP-3	I48T, H61Y	450	495	105	0,17	62

Tab. 3.2: Fortsetzung der ausgewählten Daten zu Pp2FbFP Varianten aus der vorangegangenen Arbeit (Wingen, Diplomarbeit 2011)

Name	Mutation	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	<i>In vivo</i> Fluoreszenz [%]	Quanten- ausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktor- beladung [%]
Pp2FbFP-4	Y112C	450	495	120	0,23	15
Pp2FbFP-5	I29V, S91G, Y112F, E138G	450	495	125	0,23	47
Pp2FbFP-6	N26Y	450	495	105	0,15	37
Pp2FbFP-7	Y43F	450	495	107	0,15	20
Pp2FbFP-8	Y112H	450	495	115	0,23	31
Pp2FbFP-9	E12D, H61Y, Y112F, Q143L	450	495	162	0,22	13
Pp2FbFP-10	E22K, E71G, K88S, L109V, Q116L	440	485	118	0,17	17

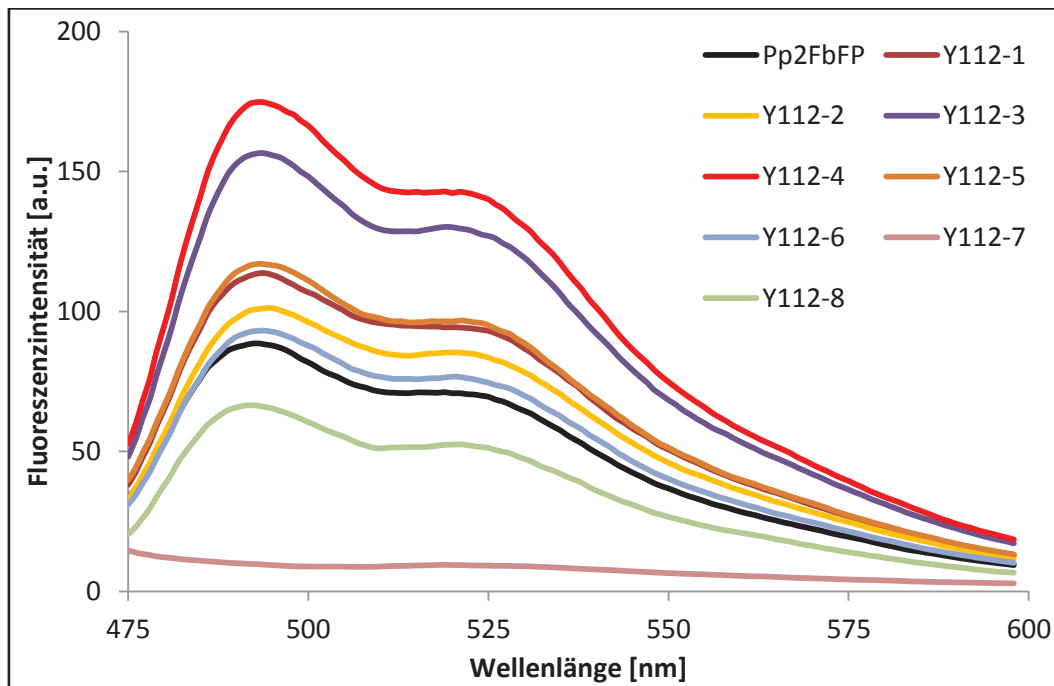


**Abb. 3.3: Modellierter Struktur der Kernregion von Pp2FbFP.** Als Grundlage für die Berechnung dieses Homologiemodells diente die Kristallstruktur der YtvA-LOV-Domäne (PDB ID: 2PR5; Möglich & Moffat, 2007). Gezeigt sind die Aminosäuren, die in den Varianten Pp2FbFP-1 -10 mutiert sind. Y112 ist in vier Varianten mutiert, die alle eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Quantenausbeute besitzen. Q116 ist eine von fünf Mutationen in Pp2FbFP-10, wobei alle anderen an der Oberfläche des Proteins lokalisiert sind, was einen Einfluss auf die spektralen Eigenschaften weniger wahrscheinlich macht.

Anhand dieses Strukturmodells wurde untersucht, ob den mutierten Aminosäuren bestimmte Effekte zugeordnet werden können. Dabei fiel vor allem die Aminosäure Y112 auf, die in Pp2FbFP-4, -5, -8 und -9 verändert ist, die alle eine ca. 1,3fach erhöhte

Quantenausbeute besitzen. Bei der Analyse der Variante Pp2FbFP-10, deren Anregungs- und Emissionsspektrum um jeweils 10 nm hin zu kürzeren Wellenlängen verschoben sind, fiel die Aminosäure Q116 auf, da dies die einzige Mutation dieser Variante ist, die in der Nähe des Chromophors liegt. Zudem ist der Chromophor dem Modell nach über eine Wasserstoffbrückenbindung mit Q116 verbunden, die in der beobachteten Mutante durch den Q116L Austausch nicht gebildet werden kann.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Aminosäure in Pp2FbFP an Position 112 zu der höchsten Fluoreszenzintensität führt und ob eine einzelne Mutation an Position 116 ausreichend ist, um das Anregungs- und Emissionsspektrum zu verschieben. Dazu wurden an den einzelnen Positionen Sättigungsmutagenesen (2.12.8) durchgeführt und die dabei entstandenen Varianten in den T<sub>7</sub>-Expressionsvektor pET28a kloniert. Diese Vektoren wurden benutzt um *E. coli* BL21(DE3) Zellen zu transformieren (2.11.5), die dann auf LB-Agarplatten ausplattiert wurden, die 0,2 % Laktose enthielten, um die Expression zu induzieren. Zusätzlich wurden in einem abgetrennten Bereich der Platte Zellen mit Wildtyp-Pp2FbFP ausplattiert, die als Referenz dienten. Die Fluoreszenzintensität der gebildeten Kolonien wurde visuell unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) analysiert und Kolonien, die eine erhöhte Fluoreszenzintensität zeigten, wurden benutzt um Übernacht-Flüssigkulturen anzupflanzen, von denen am Folgetag Expressionskulturen in Autoinduktionsmedium in 100 ml Erlenmeyerkolben wie in 2.11.2 beschrieben angeimpft wurden. Nach 24stündiger Inkubation wurde die Fluoreszenz dieser Kulturen gemessen (2.14.3). Die Emissionsspektren dieser Varianten sind in Abb. 3.4 dargestellt.

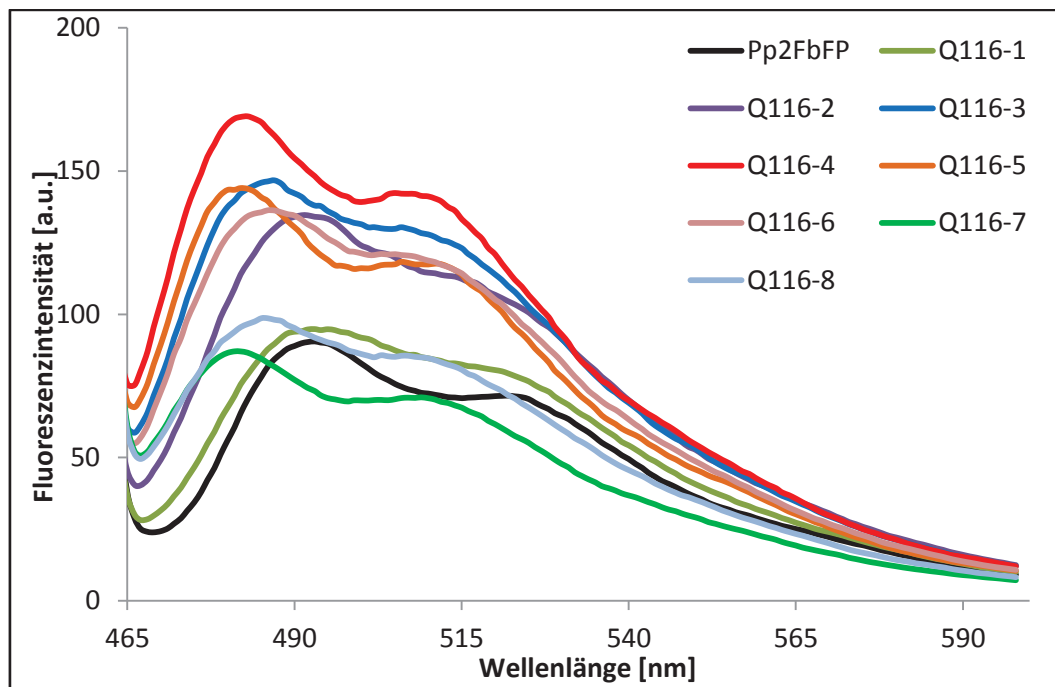


**Abb. 3.4: Emissionsspektren von Pp2FbFP Y112 Varianten.** Die *in vivo* Fluoreszenz wurde in *E. coli* BL21(DE3) nach 24stündiger Inkubation in Autoinduktionsmedium wie in 2.14.3 beschrieben gemessen. Bei sechs Varianten wurde dabei eine erhöhte *in vivo* Fluoreszenz festgestellt. Die Variante Pp2FbFP Y112-4 zeigte eine etwa doppelt so hohe *in vivo* Fluoreszenz wie Pp2FbFP und trägt ein Leucin an Position 112.

Dabei zeigten sechs Kulturen eine höhere *in vivo* Fluoreszenz als Pp2FbFP, wobei die hellste Variante (Pp2FbFP Y112-4; in Rot dargestellt) etwa doppelt so hell war. Bei der nachfolgenden Sequenzierung wurde bei dieser Variante an Position 112 ein Leucin gefunden. Die zweithellste Variante (Y112-3) trug ein Alanin an dieser Position und die dritthellste (Y112-5) ein Asparagin. Für die *in vitro* Charakterisierung wurde die hellste Variante (Pp2FbFP Y112L) ausgewählt. Dabei wurde die Quantenausbeute wie in 2.14.4 beschrieben gemessen und mit  $\Phi_F = 0,30$  bestimmt. Diese Variante weist damit eine 1,36fach erhöhte Quantenausbeute gegenüber dem Wildtyp mit 0,22 auf. Die Varianten mit den Austausch Y112C (Pp2FbFP-4), Y112F (in Pp2FbFP-5 und Pp2FbFP-9) und Y112H (Pp2FbFP-8) zeigen ebenfalls eine etwa 1,3fache Erhöhung der Quantenausbeute (vgl. Tab. 3.2). Daher ist anzunehmen, dass das Tyrosin an dieser Position einen Quenchingeffekt auf die Fluoreszenz hat. Da bereits der Austausch gegen das strukturell ähnliche Phenylalanin diesen Quenchingeffekt aufzuheben scheint, ist dieser Effekt wahrscheinlich auf die Hydroxyl-Gruppe des Tyrosins zurückzuführen.

Bei der Sättigungsmutagenese von Q116 erfolgte das *Screening* wie bereits für die Position Y112 beschrieben, nur dass in diesem Fall auf den Agarplatten Kolonien ausgewählt wurden,

die eine leicht unterschiedliche Fluoreszenzfarbe zeigten. Die spektrale Verschiebung von 10 nm bei Pp2FbFP-10 ist ausreichend, um diese Variante visuell von anderen FbFP-exprimierenden *E. coli* Kolonien zu unterscheiden. Von den acht visuell ausgewählten Klonen, zeigten sechs in der nachfolgenden Fluoreszenzmessung der Expressionskulturen eine spektrale Verschiebung hin zu kürzeren Wellenlängen. Die Emissionsspektren dieser Varianten sind in Abb. 3.5 dargestellt.



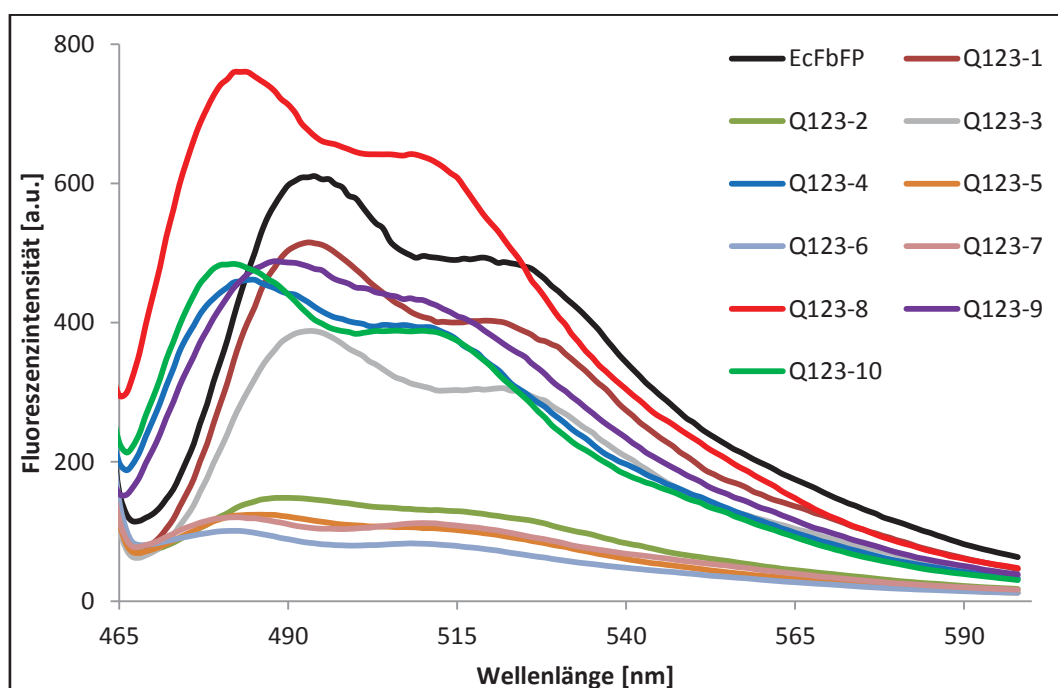
**Abb. 3.5 Emissionsspektren von Pp2FbFP Q116 Varianten.** Die *in vivo* Fluoreszenz wurde in *E. coli* BL21(DE3) nach 24stündiger Inkubation in Autoinduktionsmedium wie in 2.14.3 beschrieben gemessen. Bei sechs Varianten wurde dabei eine spektrale Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen beobachtet, sowie eine teilweise deutlich höhere Fluoreszenzintensität. Die hellste dieser Varianten – Q116-4 – trägt ein Valin an dieser Position.

Die Varianten Q116-4, -5 und -7 zeigten dabei die stärkste Verschiebung mit einem *in vivo* Fluoreszenzmaximum bei ca.  $\lambda = 482$  nm. Bei den Varianten Q116-3, -6 und -8 war die Verschiebung mit einem Emissionsmaximum bei ca.  $\lambda = 487$  nm weniger stark ausgeprägt. Die drei Varianten mit den am weitesten verschobenen Spektren, sowie die hellste der Varianten mit den weniger weit verschobenen Spektren wurden anschließend sequenziert. Bei der hellsten und am weitesten verschobenen Variante Q116-4 wurde ein Valin an Position 116 identifiziert. Bei der zweithellste Variante (Q116-5) wurde ein Leucin, und bei der deutlich schwächer fluoreszenten Variante Q116-7 ein Serin gefunden. Die weniger weit verschobene Variante Q116-3 trägt ein Threonin an dieser Position. Für die *in vitro* Charakterisierung wurde auch hier die hellste Variante (Pp2FbFP Q116V) ausgewählt. *In vitro*



wurde bei dieser Variante ein Anregungsmaximum von  $\lambda = 439$  nm, und ein Emissionsmaximum von  $\lambda = 485$  nm ermittelt. Die Quantenausbeute ist mit 0,26 ca. 20 % höher als bei Pp2FbFP.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine einzige Mutation ausreichend ist, um die spektralen Eigenschaften von Pp2FbFP zu verändern. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf EcFbFP übertragbar ist, dass an dieser relativen Position zum Chromophor ebenfalls ein Glutamin enthält, wurde auch für EcFbFP eine Sättigungsmutagenese dieses Glutamins an Position 123 durchgeführt. Die Vorgehensweise erfolgte analog zu Pp2FbFP. Die Emissionsspektren der in Flüssigkulturen übertragenen Klone sind in Abb. 3.6 dargestellt.



**Abb. 3.6 Emissionsspektren von EcFbFP Q123 Varianten.** Die *in vivo* Fluoreszenz wurde in *E. coli* BL21(DE3) nach 24stündiger Inkubation in Autoinduktionsmedium wie in 2.14.3 beschrieben gemessen. Bei sieben Varianten wurde dabei eine spektrale Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen beobachtet, von denen vier eine ähnliche Fluoreszenzintensität wie der Wildtyp aufwiesen. Die Q123-8 Variante enthält ein Threonin an dieser Position.

Dabei wurden auch für EcFbFP Varianten gefunden, die eine spektrale Verschiebung von ca. 10 nm aufweisen. Bei vier dieser Varianten konnte nur eine verhältnismäßig geringe Fluoreszenz gemessen werden, weshalb diese Varianten nicht weiter bearbeitet wurden. Die vier hellsten, spektral verschobenen Varianten (Q123-8, -10, -4 und -9) wurden sequenziert. Bei Q123-4 und -8 wurde ein Threonin an Position 123 identifiziert, bei Q123-9 ein Isoleucin und bei Q123-10 ein Leucin. Die beiden Aminosäuren Threonin und Leucin wurden auch in den spektral verschobenen Varianten von Pp2FbFP gefunden. Die Aminosäuren Leucin,

Isoleucin und Valin (Pp2FbFP Q116-4) zeichnen sich zudem alle durch rein aliphatische Seitengruppen aus, wodurch sie biochemisch sehr ähnlich sind. Dies ist ein Hinweis dafür, dass dieser Effekt innerhalb der Gruppe der FbFPs konserviert ist. Für die *in vitro* Charakterisierung wurde die EcFbFP Q123T Variante ausgewählt. Dabei wurde ein Anregungsmaximum von  $\lambda = 440$  nm, und ein Emissionsmaximum von  $\lambda = 484$  nm ermittelt, was den spektralen Eigenschaften der Pp2FbFP Q116V Variante entspricht. Die Quantenausbeute dieser Variante entspricht mit 0,44 der von EcFbFP.

Auffällig an dieser Variante ist zudem das extrem schnelle Photobleaching mit einer Bleaching-Halbzeit von nur 9 Sekunden, gegenüber 169 Sekunden bei EcFbFP und ca. 20 Sekunden bei freiem FMN. In nahezu allen bislang bekannten FbFPs wird der Chromophor innerhalb der LOV-Domäne bei Bestrahlung mit Licht vor dem Ausbleichen geschützt. EcFbFP Q123T stellt bislang die einzige Variante dar, bei der das Photobleaching beschleunigt wird. Die *in vitro* bestimmten Charakteristika der drei Varianten sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

**Tab. 3.3: Eigenschaften der Pp2FbFP Varianten Y112L und Q116V sowie EcFbFP Q123T im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp.** Y112 wurde in Pp2FbFP als Schlüsselaminosäure für die Beeinflussung der Quantenausbeute identifiziert. Der Austausch eines in Pp2- und EcFbFP konservierten Glutamins führte in beiden Fällen zu Varianten mit einer spektralen Verschiebung von 10 nm. Die angegebenen Werte für den Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeute und die Bleaching-Halbzeit sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung.

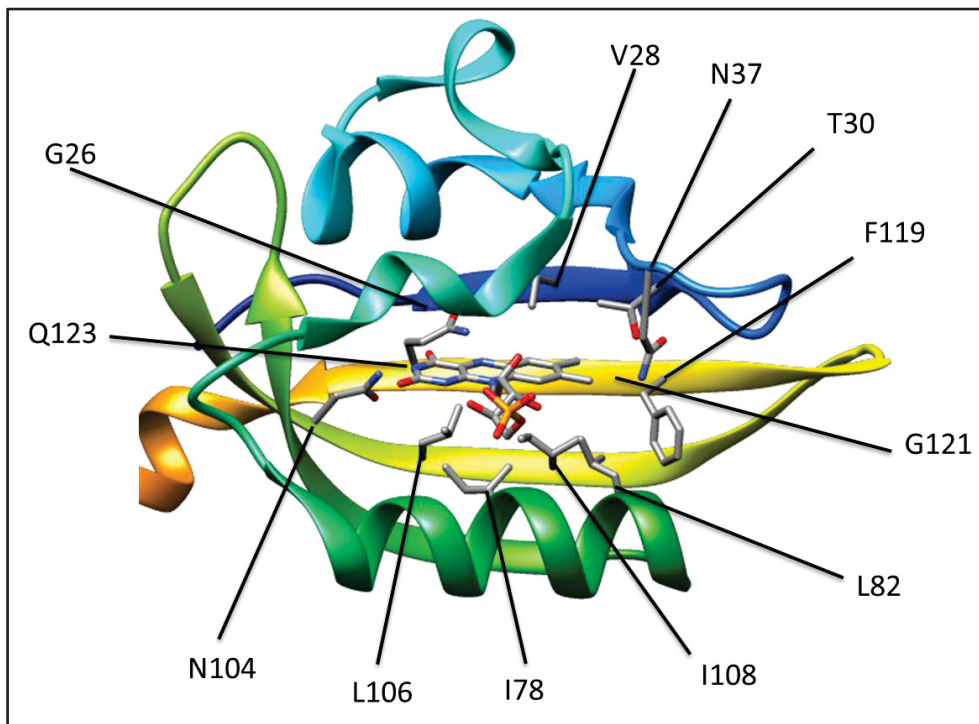
Protein	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient $[M^{-1}cm^{-1}]$	Quantenausbeute ( $\Phi_f$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-Halbzeit [min]
Pp2FbFP	449	495	14.200 $\pm 100$	0,22 $\pm 0,01$	36	2,68 $\pm 0,19$
Pp2FbFP Y112L	449	495	14.000 $\pm 100$	0,3 $\pm 0,01$	17	1,52 $\pm 0,09$
Pp2FbFP Q116V	439	485	15.100 $\pm 300$	0,26 $\pm 0,01$	16	1,17 $\pm 0,04$
EcFbFP	448	496	14.500 $\pm 200$	0,44 $\pm 0,01$	66	2,81 $\pm 0,1$
EcFbFP Q123T	440	484	14.800 $\pm 200$	0,44 $\pm 0,01$	29	0,15 $\pm 0,02$

### 3.2.2 Zufalls- und ortsgerichtete Mutagenese zur Erzeugung hellerer Varianten von EcFbFP

Anhand der Mutagenesen von Pp2FbFP konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzeigenschaften der FbFPs stark beeinflusst werden können. Dabei konnten sowohl hellere Varianten mit erhöhten Quantenausbeuten, als auch Varianten mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften erzeugt werden. Trotz der verbesserten Helligkeit einiger Pp2FbFP-Varianten sind diese noch nicht so hell wie EcFbFP, das über eine Quantenausbeute von 0,44 verfügt. Es wurde daher versucht, durch Zufallsmutagenese mittels epPCR, als auch durch ortsgerichtete Mutagenese von Aminosäuren in der Nähe des Chromophors, Varianten von EcFbFP zu erzeugen, die eine höhere Quantenausbeute oder einen höheren Extinktionskoeffizienten aufweisen. Da diese Eigenschaften nur *in vitro* bestimmt werden können, wurde zunächst nach Varianten mit einer erhöhten *in vivo* Fluoreszenzintensität gesucht. Zwar fließen in die *in vivo* Fluoreszenzintensität noch andere Faktoren wie die z.B. die Proteinakkumulation und die Cofaktor-Beladung ein, allerdings stellt ein *in vivo Screening* die einzige Möglichkeit dar, die große Anzahl der erzeugten Varianten zu untersuchen.

Um an zufälligen Positionen von EcFbFP Mutationen einzufügen, wurden epPCRs wie in 2.12.7 beschrieben durchgeführt. Durch die Verwendung der *Taq*-Polymerase, die keine „*proof-reading*“ Funktion besitzt, wurde eine Mutantenbank mit EcFbFP-Varianten im T<sub>7</sub>-Expressionsvektor pET28a erzeugt.

Anhand eines Strukturmodells von EcFbFP wurde des Weiteren untersucht, welche Aminosäuren in der Nähe des Chromophors liegen und sich daher für eine Sättigungsmutagenese eignen. Durch die direkte Änderung der chemischen Umgebung des Chromophors sollten Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften erreicht werden. Wie aus Abb. 3.7 ersichtlich ist, konnten dabei zwölf Aminosäuren identifiziert werden, die im Zentrum des Proteins liegen und deren Reste dem Chromophor zugewandt sind. Von der Position Q123 wurde bereits eine Sättigungsmutagenese durchgeführt (3.2.1). Basierend auf den Daten der Pp2FbFP Y112 Varianten wurde zudem angenommen, dass das Phenylalanin an dieser relativen Position in EcFbFP (F119) wahrscheinlich keinen negativen Einfluss auf die Quantenausbeute hat. An den übrigen zehn Positionen wurden Sättigungsmutagenesen durchgeführt. Die dabei entstandenen Mutantenbanken wurden ebenfalls in den T<sub>7</sub>-Expressionsvektor pET28a kloniert.



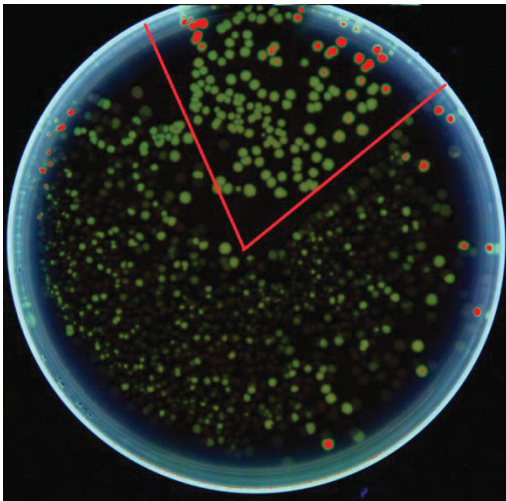
**Abb. 3.7: Strukturmodell von EcFbFP mit Aminosäureseitenketten in direkter Nähe des Chromophors.** Das Modell basiert auf der YtvA-LOV-Domäne (PDB ID: 2PR5, Möglich & Moffat, 2007). Die Aminosäuren liegen alle im Zentrum des Proteins und ihre Seitengruppen sind dem Chromophor zugewandt. Durch ihre Mutagenese sollte die chemische Umgebung und damit die Fluoreszenzeigenschaften des Chromophors beeinflusst werden. Für Q123 wurde dies bereits in Kapitel 3.2.1 durchgeführt und für F119 wurde aufgrund der Daten in Kapitel 3.2.1 auf eine Mutagenese verzichtet.

Ein erstes *Screening* sowohl der durch epPCR, als auch der durch Sättigungsmutagenese erzeugten Mutantenbanken wurde in Kooperation mit Dr. Georg Schaumann (IBG-2, Forschungszentrum Jülich) mittels FACS-Analyse durchgeführt. Diese Methode zeichnet sich durch einen sehr hohen Durchsatz aus und erlaubt es, verbesserte Varianten von der Zellpopulation zu isolieren (Carter *et al.*, 2013; Winson & Davey, 2000). Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen einmal mit EcFbFP und einmal mit einer Mutantenbank transformiert, um daraus Expressionskulturen anzuzüchten (2.11.2). Im Falle der Mutantenbank wurden die Zellen zum Animpfen einer Übernachtskultur von der Agarplatte gespült, gemischt und verdünnt. Aus den Expressionskulturen wurden Proben entnommen, in PBS-Puffer verdünnt und im FACS auf ihre Fluoreszenzintensität hin analysiert. Anhand des Wildtyps wurde dabei ein Raster angelegt, um hellere Zellen der Mutantenbank automatisch von der Zellpopulation zu trennen und aufzufangen. Dieser Versuch wurde zweimal durchgeführt, wobei die Zellen beim ersten Mal in Mikrotiterplatten mit LB-Medium sortiert, und beim zweiten Mal auf LB-Agarplatten vereinzelt wurden. Beide Male wurden ca. 100-200 Zellen

vereinzelt, die eine erhöhte *in vivo* Fluoreszenz zeigten. In beiden Fällen waren nur ca. 10-20 % der Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, bzw. zu einer Kultur heranzuwachsen. Die Fluoreszenz dieser Kolonien und der Zellen aus den Flüssigkulturen wurde visuell unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) analysiert. Dabei wurde bei der Mehrheit ein vollständiger Fluoreszenzverlust beobachtet. Die Fluoreszenzintensität noch fluoreszierender Klone war gegenüber der Referenz auf ca. 30 % und weniger verringert. Die Gründe für diese Divergenz der Fluoreszenzintensität im initialen FACS-Screening und der nachfolgenden Analyse sind unbekannt. Eine mögliche Erklärung ist das Auftreten genetischer oder auch zellmorphologischer Anomalien, die zu einer starken Erhöhung der Proteinexpression bzw. -akkumulation führen, die allerdings nicht stabil, bzw. letal sind. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Zellen durch die Anregung mit dem Laser im FACS indirekt Schaden nehmen. Es ist bekannt, dass FbFPs bei Bestrahlung mit Blaulicht Sauerstoffradikale produzieren (Endres, Doktorarbeit, 2013; Shu *et al.*, 2011). Es ist theoretisch möglich, dass die Lichtintensität des Lasers im FACS ausreichend ist, um die DNA der Zellen auf diesem Wege irreparabel zu beschädigen.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde als alternative *Screening*-Methode ein zweistufiges *Screening*-System mit initialer Fluoreszenzintensitätsanalyse auf Agarplatten und anschließender Fluoreszenzmessung in Flüssigkulturen gewählt, wie es auch schon in 3.2.1 verwendet wurde. Dazu wurden *E. coli* BL21(DE3) Zellen mit den Mutantenbanken transformiert und auf Laktose haltigem LB-Agar ausplattiert. Als Referenz wurde der Stamm mit dem Wildtyp-EcFbFP transformiert und ausplattiert. Die erste Runde des *Screenings* fand auf diesen Agarplatten statt, wobei die FbFP-vermittelte Fluoreszenz durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) angeregt wurde. Zusätzlich zu der visuellen Analyse wurden die Platten fotografiert und die Fluoreszenzhelligkeit der Klone wurde mit dem Programm ImageJ ausgewertet (siehe 2.14.2). In Abb. 3.8 ist exemplarisch eine dieser Platten abgebildet. In dem oberen, durch die roten Linien eingegrenzten Bereich wurden *E. coli* BL21(DE3) mit Wildtyp-EcFbFP als Referenz ausplattiert. Die übrigen Kolonien wurden mit der Mutantenbank transformiert und zeigen deutliche Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, wobei viele Klone nur noch eine sehr geringe Fluoreszenz aufweisen. Bei der Datenauswertung wurden alle Pixel, die einen definierten Schwellenwert in der Intensität im grün-gelben Farbraum überschreiten, in Rot dargestellt, um hellere Klone zu

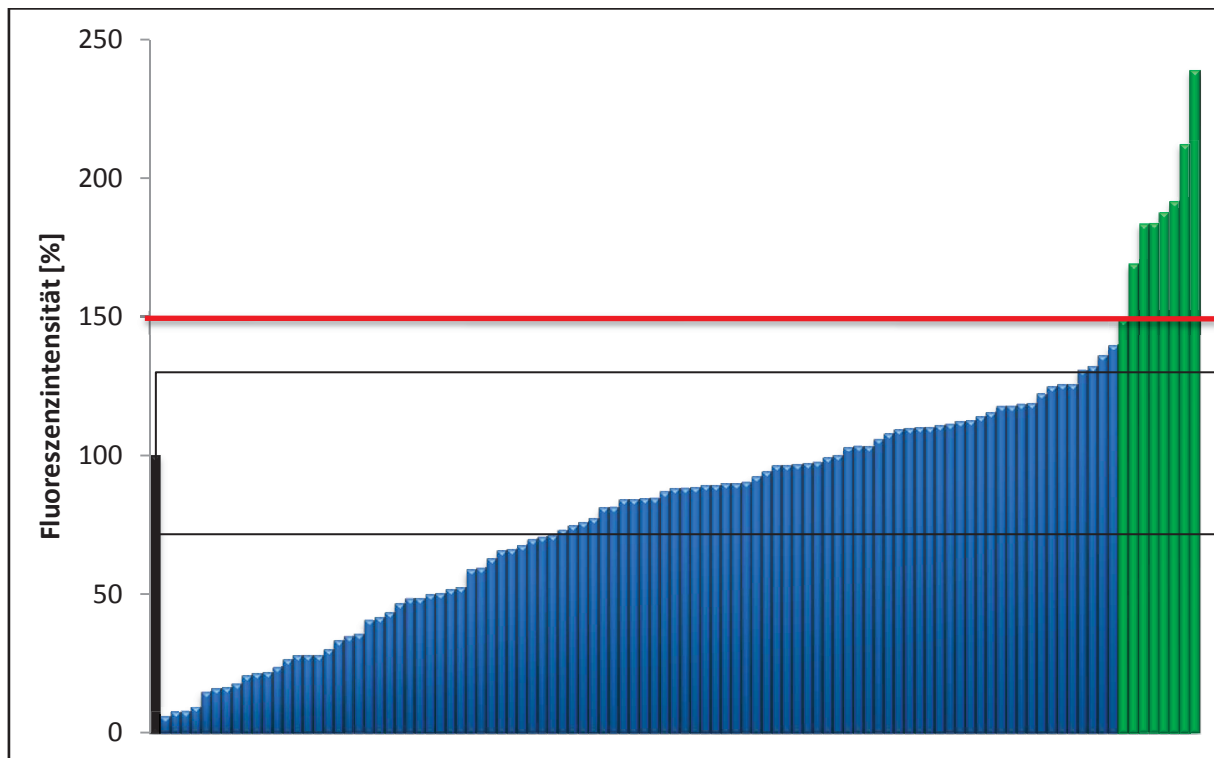
identifizieren. Aufgrund der Hintergrundfluoreszenz der Petrischale erscheinen Kolonien am Rand der Platte heller, weshalb hier vermehrt Kolonien rot markiert sind (auch bei der Referenz). Durch eine weitere Erhöhung des Schwellenwertes kann dieser Effekt ausgeglichen werden. In diesem Fall sollten allerdings nur noch die Kolonien im Randbereich verglichen werden, da ansonsten hellere Kolonien im inneren Bereich der Agarplatte übersehen werden können.



**Abb. 3.8: Beispiel zum Screening auf verbesserte *in vivo* Fluoreszenz auf Agarplatten.** Gezeigt ist eine typische Agarplatte mit *E. coli* BL21(DE3) mit Wildtyp-EcFbFP (rot abgegrenzter Bereich oben) und EcFbFP-Mutanten unter UV-Licht ( $\lambda = 365$  nm). Klone die einen definierten Schwellenwert in der Helligkeit im grün-gelben Farbraum überschreiten, wurden mit Hilfe des Programms ImageJ rot markiert. Am Rand der Petrischale kommt es dabei aufgrund der Hintergrundfluoreszenz der Petrischale zu Fehlsignalen, was anhand der rot markierten Kolonien der Referenz zu sehen ist.

Insgesamt wurden ca.  $5 \times 10^4$  Klone analysiert, von denen bei der epPCR 48, und bei den Sättigungsmutagenesen 60 Klone für die zweite Runde des *Screenings* ausgewählt wurden.

Diese 108 Klone, sowie die Referenz, wurden in Übernacht-Flüssigkulturen im Mikrotitermaßstab überführt, um von diesen am nächsten Tag Expressionskulturen in Autoinduktionsmedium anzupflanzen (siehe 2.11.1 und 2.11.2). Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Fluoreszenz der Kulturen wie in 2.14.3 beschrieben gemessen. Um auch mögliche spektrale Verschiebungen zu detektieren, wurden von allen Proben Emissions- und Exzitationsspektren aufgenommen. Dabei konnten allerdings keine spektralen Unterschiede zum Wildtyp beobachtet werden. Die Verteilung der Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 495$  nm relativ zum Wildtyp ist in Abb. 3.9 dargestellt.



**Abb. 3.9: Verteilung der Fluoreszenzintensität von EcFbFP-Varianten im *Screening*.** Dargestellt ist die relative *in vivo* Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 495$  nm der EcFbFP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp (dreifach bestimmt; in schwarz dargestellt; Messparameter: Siehe 2.14.3) in *E. coli* BL21(DE3) nach 24stündiger Inkubation in Mikrotiterplatten mit Autoinduktionsmedium (2.11.1). Der Bereich der dreifachen Standardabweichung des Wildtyps ist durch die dünnen, schwarzen Linien gekennzeichnet. Varianten, die eine mindestens 1,5fach höhere Fluoreszenz aufwiesen als der Wildtyp und damit deutlich außerhalb der dreifachen Standardabweichung lagen, sind in grün dargestellt und wurden für die weitere Charakterisierung ausgewählt.

Die Fluoreszenzintensität der Klone relativ zum Wildtyp (in Schwarz dargestellt) weicht sowohl nach oben, als auch nach unten deutlich ab. Bei insgesamt 23 Varianten liegt die Fluoreszenz deutlich unter 50 %. Sechs Varianten aus der epPCR und zwei aus den Sättigungsmutagenesen zeigten in dieser zweiten Runde des *Screenings* eine mindestens 1,5fach höhere Fluoreszenz (in grün dargestellt). Die Plasmide dieser mindestens 1,5fach helleren Klone wurden isoliert und sequenziert.

Wie anfangs bereits erwähnt wurde, war es das Ziel dieser Untersuchungen, Varianten mit einer erhöhten Quantenausbeute oder einem höheren Extinktionskoeffizienten zu finden. Das *in vivo Screening* diente dabei der Vorauswahl, da es die Analyse einer wesentlich größeren Anzahl Varianten erlaubt, als dies *in vitro* möglich wäre. Zur weiteren Analyse wurden daher sechs der acht unterschiedlichen Mutanten gereinigt und *in vitro* charakterisiert. Die Position W103 war in drei Einzelmutanten (W103L, W103N und W103V)



verändert, von denen nur die W103N-Variante *in vitro* auf eine veränderte Quantenausbeute untersucht wurde. Die Fluoreszenzeigenschaften dieser sechs Varianten sind in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die Bezeichnung der Varianten enthält das Präfix „ep“ für Varianten die mittels epPCR erzeugt wurden, oder „Sat“ für Varianten die mittels Sättigungsmutagenese erzeugt wurden, sowie die alphanumerische Bezeichnung des „Wells“ der Mikrotiterplatte, in dem die Variante vorlag.

**Tab. 3.4: Eigenschaften der *in vitro* charakterisierten EcFbFP-Varianten, die durch epPCR und Sättigungsmutagenese erzeugt wurden.** Alle Varianten zeigten eine mindestens 1,5fach erhöhte *in vivo* Fluoreszenz im Screening. Die Quantenausbeuten und Extinktionskoeffizienten dieser Varianten zeigen größtenteils nur geringe Abweichungen gegenüber dem Wildtyp. Die angegebenen Werte für den Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeute und die Bleaching-Halbzeit sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung.

Protein	Mutationen	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-Halbzeit [min]
EcFbFP	-	448	496	14.500 $\pm 200$	0,44 $\pm 0,01$	66	2,81 $\pm 0,1$
EcFbFP epA5	D98A D190V K128E E133G K134E	450	496	15.100 $\pm 200$	0,40 $\pm 0,01$	74	1,84 $\pm 0,15$
EcFbFP epF1	D8G L20P N84S	447	496	15.400 $\pm 500$	0,39 $\pm 0,01$	76	1,54 $\pm 0,06$
EcFbFP epG1	W103N	449	495	15.400 $\pm 500$	0,40 $\pm 0,03$	71	0,93 $\pm 0,19$
EcFbFP epH4	E35G	450	496	16.100 $\pm 200$	0,40 $\pm 0,03$	74	2,48 $\pm 0,22$
EcFbFP SatA6	G26S	449	496	14.100 $\pm 800$	0,37 $\pm 0,01$	36	1,82 $\pm 0,27$
EcFbFP SatB8	I78C	450	495	15.300 $\pm 600$	0,34 $\pm 0,01$	44	2,03 $\pm 0,16$

Die Variante mit den meisten Mutationen - epA5 - zeigte im *Screening* eine *in vivo* Fluoreszenz von 212 % relativ zum Wildtyp. Die Quantenausbeute dieser Variante liegt mit 0,4 hingegen leicht unter der des Wildtyps und der Extinktionskoeffizient mit  $15.100 M^{-1}cm^{-1}$  minimal darüber. Der berechnete Wert für die Cofaktorbeladung liegt mit 74 % gegenüber dem Wildtyp (66 %) ebenfalls unwesentlich höher. Da die Cofaktorbeladung aus den zuvor

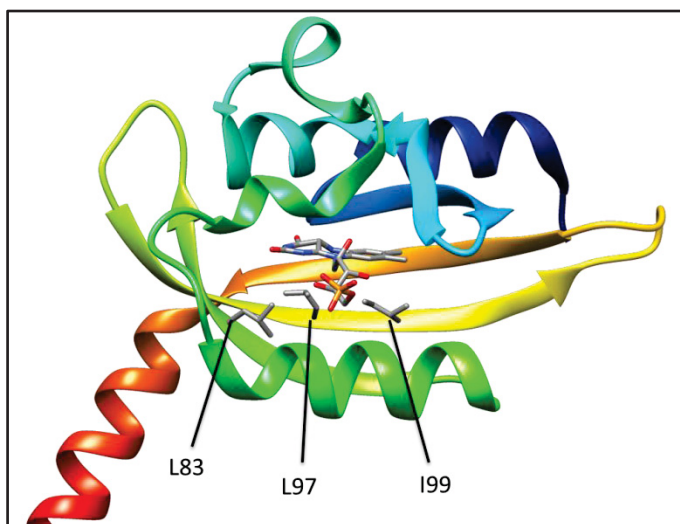


berechneten Werten des Extinktionskoeffizienten des Chromophors und des Apoproteins berechnet wird, und bereits bei den zuvor berechneten Werten mit einer gewissen, verfahrensbedingten Ungenauigkeit zu rechnen ist (siehe 3.1.3), wird eine Differenz in der Cofaktorbeladung von weniger als 10 % hier nicht als signifikant eingestuft. Die *in vitro* bestimmten Eigenschaften der übrigen Varianten sind ähnlich und zeigen ebenfalls keine signifikante Verbesserung gegenüber dem Wildtyp.

Somit weist überraschenderweise im Gegensatz zur Pp2FbFP-Mutagenese keine der EcFbFP-Varianten eine höhere Quantenausbeute als der Wildtyp auf. Der Extinktionskoeffizient weicht um maximal 11 % nach oben ab, was hier nicht als signifikant eingestuft wird. Auch bei der Cofaktor-Beladung ist keine signifikante Verbesserung zu beobachten. Da die einzelnen Proteine nicht heller sind als der Wildtyp, ist die einzige verbleibende Erklärung für die höhere gemessene Fluoreszenzintensität *in vivo* somit eine verbesserte Expression, Faltung bzw. eine erhöhte Proteinstabilität, die in der Zelle letztendlich zu einer erhöhten Akkumulation fluoreszenzaktiven Proteins führen könnte.

### 3.2.3 Rationales Design zur Erzeugung von rot-verschobenen FbFP-Varianten

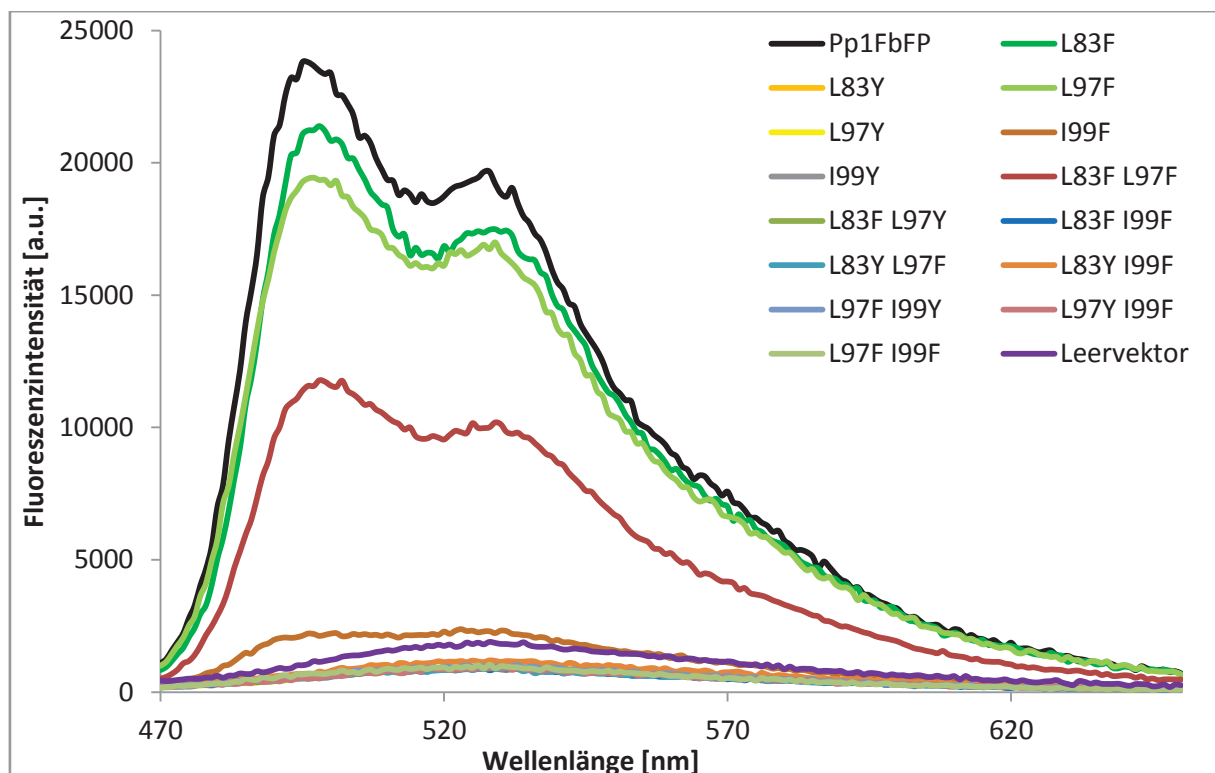
Neben der Erzeugung hellerer FbFP-Varianten wurde ebenfalls versucht, eine Variante mit einer spektralen Verschiebung in den roten Spektralbereich zu erzeugen. Bei GFP konnte eine solche Verschiebung erreicht werden, indem das  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors durch den Einbau einer aromatischen Aminosäure in der Nähe des Chromophors erweitert wurde (Ormö *et al.*, 1996). Dabei handelt es sich um ein sogenanntes „ $\pi$ - $\pi$ -Stacking““. In Kooperation mit Dr. Joachim Granzin (ICS-6, Forschungszentrum Jülich) wurden anhand der Kristallstruktur der ursprünglichen LOV-Domäne PpSB1-LOV (Circolone *et al.*, 2012) in Pp1FbFP drei Positionen identifiziert, die einzeln oder in Kombination miteinander für einen solchen Austausch in Frage kommen. Wie in Abb. 3.10 zu sehen ist, handelt es sich dabei um die drei aliphatischen Aminosäuren L83, L97 und I99, die sterisch alle nah beieinander liegen und dem Chromophor zugewandt sind.



**Abb. 3.10: Strukturmodell von Pp1FbFP mit den Aminosäuren L83, L97, und I99.** Das Strukturmodell basiert auf der Röntgenkristallstruktur von PpSB1-LOV (PDB ID: 3SW1; Circolone *et al.*, 2012), aus dem Pp1FbFP entwickelt wurde. Diese Aminosäuren liegen so zum Chromophor, dass ihr Austausch gegen eine der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin theoretisch zu einer Erweiterung des  $\pi$ -Elektronensystems führen könnte.

Jede dieser drei Aminosäuren wurde sowohl gegen Tyrosin als auch gegen Phenylalanin ausgetauscht. Dabei wurden die Einzel- und Doppelmutanten mittels „Overlap extension-PCR“ (2.12.8) erzeugt. Bei der ersten Runde des *Screenings* auf Agarplatten wurden für jede erzeugte Variante mehrere hundert Klone betrachtet. Der Großteil dieser Klone zeigte unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) keine erkennbare Fluoreszenz. Zur weiteren Analyse wurden fluoreszierende, als auch nicht-fluoreszierende Klone in Flüssigkulturen überführt, um die *in*

*in vivo* Exzitations- und Emissionsspektren zu messen. Dabei zeigten nur die Varianten Pp1FbFP L83F, L97F, I99F und die Doppelmutante L83F L97F noch eine Fluoreszenz, die spektral aber dem Wildtyp gleicht. Bei allen anderen Varianten konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Zur Überprüfung der Mutagenese und um unerwünschte Mutationen auszuschließen, wurden insgesamt 54 Sequenzierungen durchgeführt, wobei 14 der 18 möglichen Varianten identifiziert wurden. Unerwünschte Mutationen wurden nicht gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass der in den meisten Varianten beobachtete Fluoreszenzverlust durch die gezielt eingefügten Mutationen hervorgerufen wird. Bei den vier nicht in den Sequenzierungen enthaltenen Varianten handelt es sich um Doppelmutanten die an beiden Positionen ein Tyrosin tragen. Da aus der Analyse der positiv sequenzierten Varianten hervorgeht, dass bereits ein einzelnes Tyrosin an einer der drei Positionen zu einem vollständigen Fluoreszenzverlust führt, wurden keine weiteren Bemühungen unternommen, diese Varianten zu isolieren. In Abb. 3.11 sind die Emissionsspektren aller verschiedenen, sequenzierten Pp1FbFP-Varianten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.



**Abb. 3.11: Emissionsspektren der Pp1FbFP L83, L97 und I99 Varianten.** Die Varianten L83F, L97F, I99F und die Doppelmutante L83F L97F zeigen noch eine Fluoreszenz, wohingegen alle anderen Austausche zu einem vollständigen Verlust der Fluoreszenz führen. Spektrale Verschiebungen konnten nicht beobachtet werden. Eine Basalfluoreszenz im Bereich um  $\lambda = 530$  nm ist auch beim Leervektor zu beobachten und auf Rückstände von Autoinduktionsmedium in den Proben zurückzuführen.

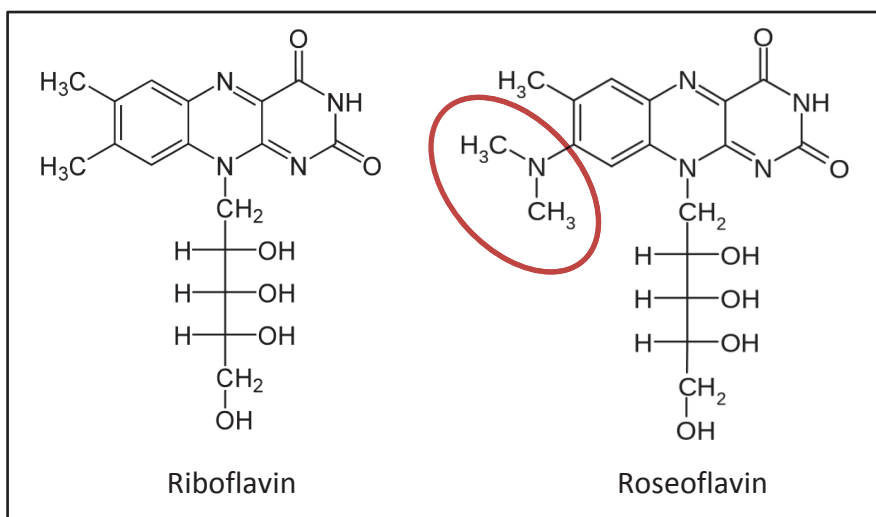
An den Positionen 83 und 97 hat der Austausch gegen Phenylalanin offensichtlich keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität. An Position 99 hingegen führt diese Aminosäure zu einem fast vollständigen Verlust der Fluoreszenz. Der Einbau eines Tyrosins an einer der drei Stellen führt bereits bei den Einzelmutanten zu einem Kompletterlust der Fluoreszenz. Eine spektrale Verschiebung konnte bei keiner der Varianten beobachtet werden. Die acht möglichen Dreifachmutanten wurden als Genbank synthetisiert (MWG Operon, Ebersberg). Aus dieser Bank wurden 95 Klone (ca. 12-fache Abdeckung der Bankgröße) in einer Mikrotiterplatte analysiert, wobei kein einziger fluoreszierender Klon identifiziert werden konnte.

Die wahrscheinlichste Erklärung für den Verlust der Fluoreszenz ist die Einbringung einer Aminosäure mit deutlich größerer Seitengruppe in das Zentrum des Proteins. Dies hat wahrscheinlich einen sterisch-inhibitorischen Effekt auf die Bindung des Chromophors. Tyrosin hat zudem noch eine polare Hydroxylgruppe am Phenylring, wohingegen die natürlichen Aminosäuren an diesen Stellen (Leucin und Isoleucin) rein hydrophob sind.

### 3.3 Roseoflavin als künstlicher Chromophor in FbFPs

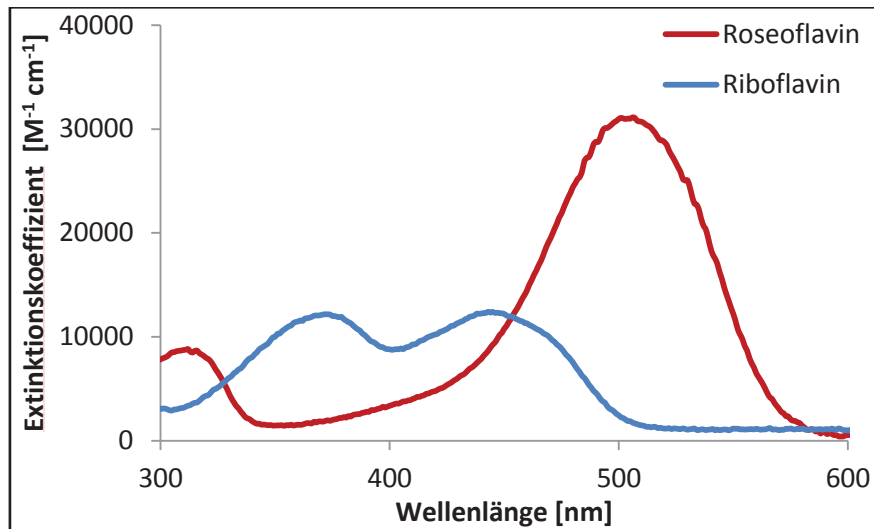
Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels verschiedener Mutagenesemethoden versucht, das Emissionsspektrum der FbFPs zu verändern. Dies gelang wie bereits in 3.1.2 beschrieben im Falle von Pp2FbFP und EcFbFP mit einer Verschiebung von 10 nm in den blauen Spektralbereich. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums in den roten Spektralbereich war bislang nicht möglich. Daher wurde im weiteren Verlauf der Arbeit untersucht, ob es möglich ist, das Emissionsspektrum der FbFPs durch den Austausch der natürlichen Chromophore (FMN, FAD oder Riboflavin) gegen Roseoflavin zu verschieben.

Bei Roseoflavin handelt es sich um ein Flavinanalogon, das in der Natur von dem Bakterium *Streptomyces davawensis* synthetisiert wird (Grill *et al.*, 2008; Otani *et al.*, 1974). Strukturell unterscheidet es sich von Riboflavin durch den Austausch der Methylgruppe am C8-Atom des Isoalloxazinrings gegen eine Dimethylamino-Gruppe (siehe Abb. 3.12). Es weist eine antibiotische Wirkung auf, da seine von den Zellen synthetisierten Derivate Roseoflavin-5'-monophosphat (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) von Flavoenzymen gebunden werden können, die dann keine oder nur noch eine sehr geringe Aktivität aufweisen (Grill *et al.*, 2008).



**Abb. 3.12: Molekülstruktur von Riboflavin und Roseoflavin.** Die beiden Flavine unterscheiden sich in der Restgruppe am C8-Atom des Isoalloxazinrings. Bei den meisten natürlichen Flavinen befindet sich hier eine Methylgruppe, während Roseoflavin an dieser Position eine Dimethylamino-Gruppe aufweist (rot markiert).

Die spektralen Unterschiede von Roseoflavin und Riboflavin sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Roseoflavin unterscheidet sich von Riboflavin durch eine signifikante Verschiebung des Absorptionsspektrums mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 505$  nm und einen deutlich höheren Extinktionskoeffizienten von  $31.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bei  $\lambda = 505$  nm (Otto *et al.*, 1981).



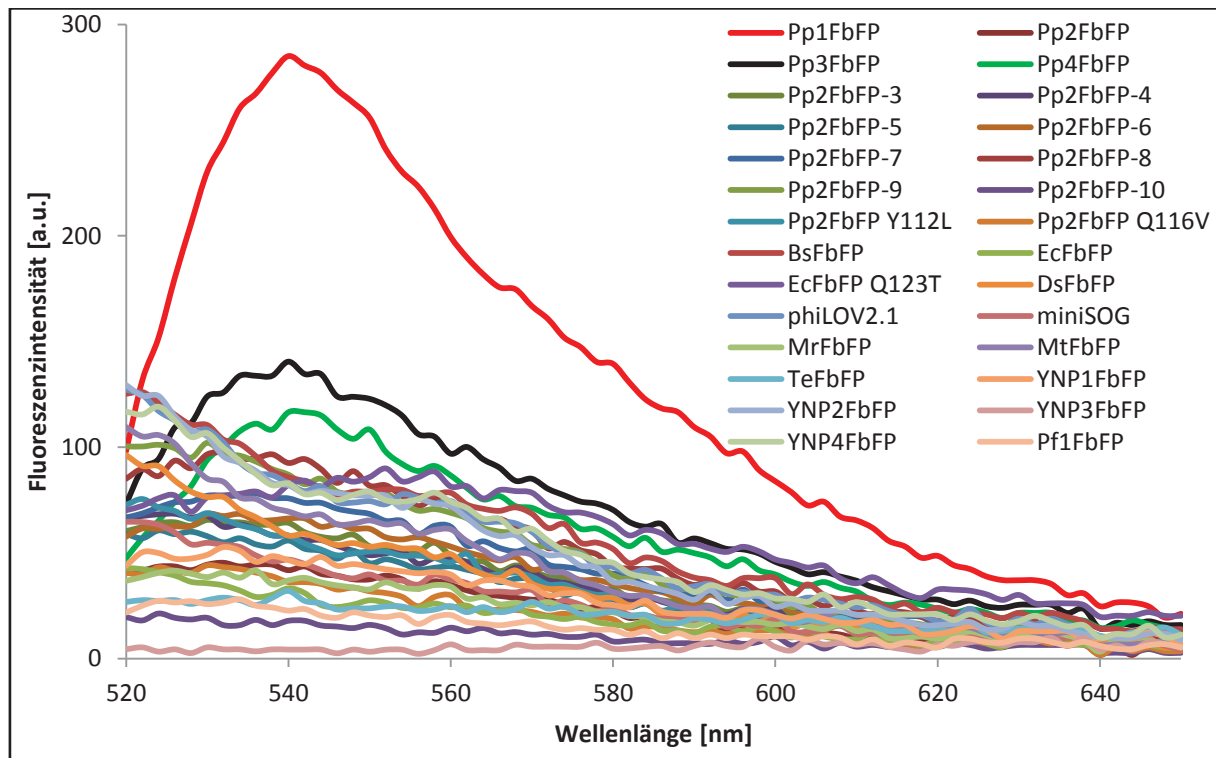
**Abb. 3.13: Vergleich der spektralen Absorptionseigenschaften von Riboflavin und Roseoflavin.** Die Absorptionsspektren beider Stoffe wurden bei einer Absorption von 0,1 am Maximum gemessen und auf den jeweils in der Literatur publizierten Extinktionskoeffizienten normiert. Der Austausch der Methylgruppe am C-8 Atom des Isoalloxazinrings gegen eine Dimethylamino-Gruppe führt zu einer Verschiebung des Absorptionsspektrums ( $\lambda_{\text{max}} = 505$  nm) und einem etwa 2,5mal so hohen Extinktionskoeffizienten an der Spitze.

Während Riboflavin eine Fluoreszenzemission mit einer Quantenausbeute von 0,25 und einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 531$  nm aufweist, zeigt Roseoflavin nur eine sehr geringe Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 540$  nm und einer Quantenausbeute, die bei normalen Messparametern (2.14.4) unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Es wird daher angenommen, dass die Quantenausbeute von Roseoflavin  $\Phi_{\text{F}} < 0,01$  beträgt.

Aus der Arbeit von Mathes *et al.* ist bereits bekannt, dass die BLUF-Domäne Slr1694 Roseoflavin, RoFMN und RoFAD bindet und dabei eine messbare Fluoreszenz zeigt, die deutlich höher ist, als die von freiem Roseoflavin (Mathes *et al.*, 2009). Dabei wurde ebenfalls gezeigt, dass die LOV-Domäne Phot-LOV1 aus *Chlamydomonas reinhardtii* in der Lage ist, RoFMN, das während der Anzucht der Zellen von *E. coli* aus Roseoflavin synthetisiert wird, zu binden. Vor dem Hintergrund von restlichem gebundenem FMN konnte hierbei allerdings nur eine sehr schwache Fluoreszenzemission des RoFMNs beobachtet werden.

### 3.3.1 Screening auf Roseoflavin-bindende FbFPs mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften

Um zu überprüfen ob, bzw. welche FbFPs in der Lage sind Roseoflavin, RoFMN oder RoFAD zu binden, wurde der *E. coli* Stamm CmpX131 (Mathes *et al.*, 2009) ausgewählt, der sich dadurch auszeichnet, dass er Riboflavin auxotroph ( $\Delta ribC$ ) ist, allerdings den Flavintransporter RibM aus *Corynebacterium glutamicum* besitzt. Dadurch kann der Flavinegehalt der Zellen durch Zugaben im Medium gesteuert werden. Zum Zeitpunkt der Induktion wurde hierzu das riboflavinhaltige LB-Medium gegen LB-Medium mit Roseoflavin und IPTG ausgetauscht (2.11.3). Als Kontrolle diente hierbei jeweils eine Kultur in riboflavinhaltigem LB-Medium. Nach 24 Stunden wurden den Kulturen Proben zur Fluoreszenzmessung entnommen und die Proben auf spektrale Unterschiede untersucht. Hierbei wurde insbesondere nach rot-verschobenen Spektren gesucht. Abbildung 3.14 zeigt die Emissionsspektren aller 28 untersuchten FbFPs bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 500$  nm. Bei Pp3-, Pp4FbFP handelt es sich, ebenso wie bei dem in Abb. 3.14 aufgeführten Pf1FbFP um FbFPs die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls von LOV-Domänen aus *Pseudomonas putida* bzw. *Pseudomonas fluorescens* erzeugt wurden. Die LOV-Domänen selbst wurden von Dr. Katrin Jentzsch am IMET der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert und kloniert. Da die Eigenschaften dieser FbFPs dem Durchschnitt entsprechen, werden sie in dieser Arbeit nicht gesondert aufgeführt. Die hier aufgeführten Mr-, Mt, Te- sowie YNP1-4-FbFP werden in Kapitel 3.4 behandelt. Bei den meisten FbFPs zeigt sich dabei nur eine geringe Basalfluoreszenz, ohne erkennbares Spektrum. Pp1FbFP hingegen zeigt ein klar definiertes Emissionsspektrum, mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 540$  nm. Pp3- und Pp4FbFP zeigen den gleichen spektralen Verlauf, allerdings ist die Fluoreszenzintensität dieser Proteine deutlich geringer, weshalb sie im Folgenden nicht näher untersucht wurden.



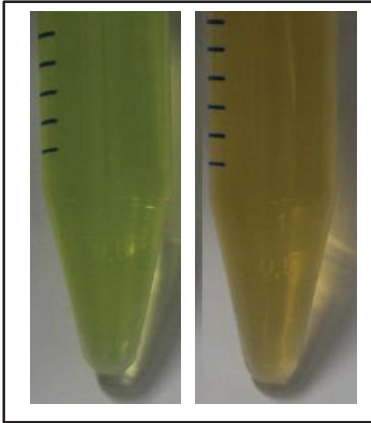
**Abb. 3.14:** *In vivo* Emissionsspektren der auf Roseoflavinbindung untersuchten FbFPs in *E. coli* CmpX131. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert einer Doppelbestimmung, bei der der Wert der Leervektor-Kontrolle abgezogen wurde. Die Proben wurden bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 500$  nm angeregt, was dem Absorptionsmaximum von Roseoflavin entspricht. Pp1-, Pp3- und Pp4FbFP zeigen alle ein Emissionsspektrum mit einem Maximum bei ca.  $\lambda = 540$  nm, wobei Pp1FbFP die höchste Fluoreszenzintensität zeigt. Bei allen anderen FbFPs ist hier kein spezifisches Emissionsspektrum detektierbar. Eine Restfluoreszenz mit dem FbFP-typischen Spektrum kann auch durch Reste von Riboflavin, FMN und FAD im LB-Medium und den Zellen hervorgerufen werden, wodurch es bei den übrigen FbFPs nicht zu einer flachen Basallinie kommt.

### 3.3.2 Pp1FbFP mit Roseoflavin – die erste rot-verschobene FbFP-Variante

Bei Pp1FbFP handelt es sich um eines von vier FbFPs, die von LOV-Domänen aus *P. putida* abgeleitet sind. Es basiert auf dem PpSB1-LOV Protein, einer LOV-Domäne ohne Effektor-domäne (Circolone *et al.*, 2012), bei dem das konservierte Cystein, das für die Bindung des FMNs während des Photozyklus verantwortlich ist, gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Das Protein unterscheidet sich in seinen spektralen Fluoreszenzeigenschaften mit dem natürlichen Cofaktor nicht von anderen FbFPs. Um die Fluoreszenzeigenschaften dieses Proteins mit Roseoflavin näher zu charakterisieren, wurde das Gen wie unter 2.11.3 beschrieben in roseoflavinhaltigem Medium exprimiert und das Protein wie unter 2.13.1 beschrieben gereinigt.



Wie in Abb. 3.15 rechts zu sehen ist, zeichnet sich das gereinigte Protein durch eine orange-gelbe Fluoreszenz aus, die sich deutlich von der grünen Fluoreszenz bei Bindung des normalen Chromophors (links im Bild) unterscheidet.

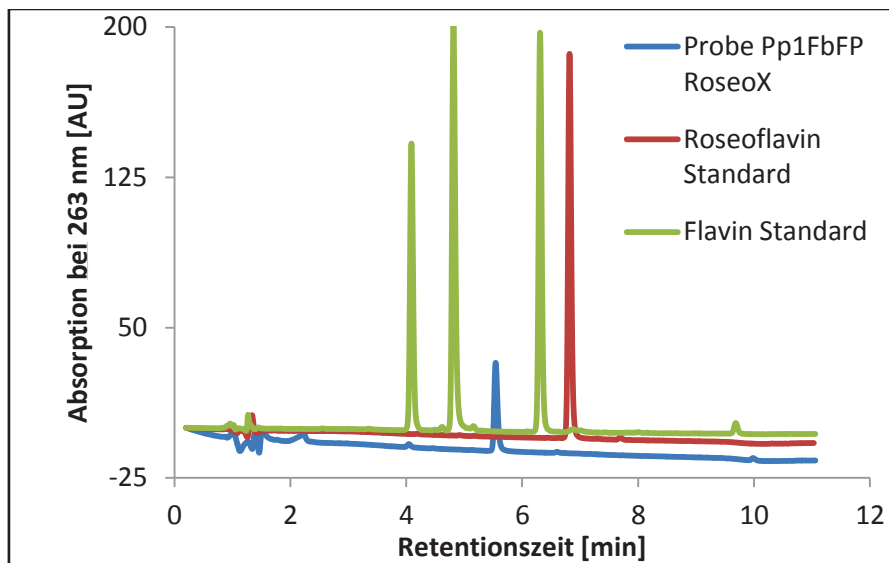


**Abb. 3.15: Gereinigtes Pp1FbFP in Lösung.** Links: Mit dem natürlichen Chromophor. Rechts: Nach Anzucht mit Roseoflavin in *E. coli* Cmpx131. Die unterschiedlichen Chromophore führen zu visuell deutlich erkennbaren Unterschieden in der Fluoreszenzfarbe.

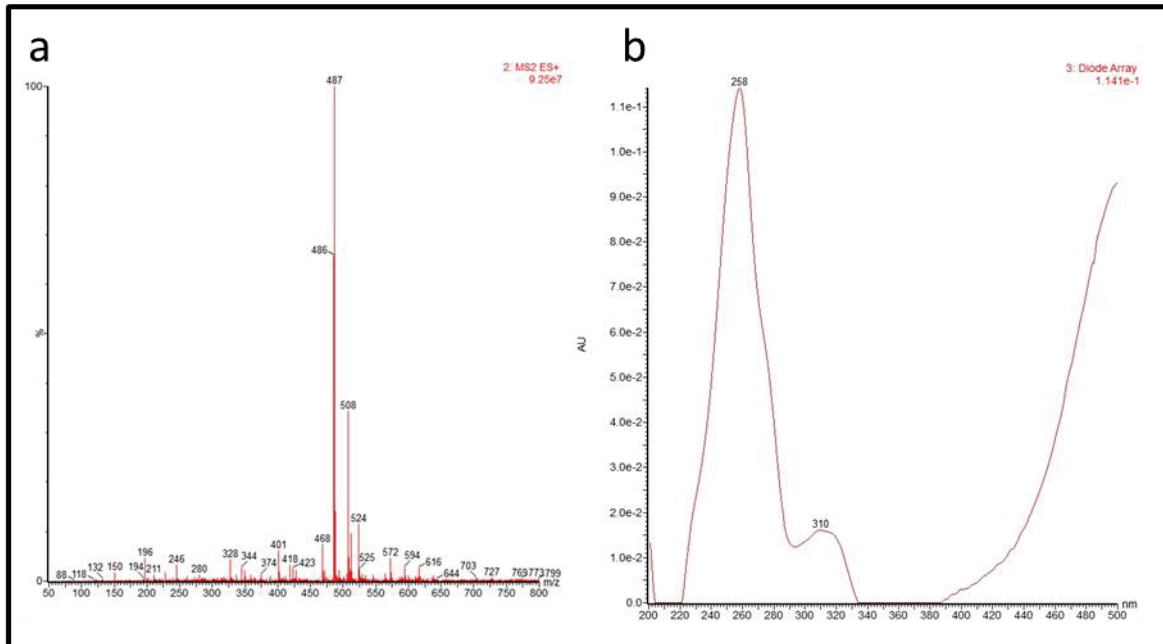
### 3.3.2.1 Identifizierung des gebundenen Flavins

Um zu überprüfen, zu welchem Anteil Roseoflavin im Protein vorliegt, bzw. ob neben Roseoflavin noch Riboflavin, FMN, FAD oder die Roseoflavinderivate RoFMN oder RoFAD gebunden sind, wurde eine HPLC-Analyse (2.13.4) sowie eine HPLC-MS-Analyse (Zentralanalyseeinheit im Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Durch die HPLC-Analyse konnte ermittelt werden, dass nur eine Flavinspezies in dem Protein vorliegt. Anhand der Retentionszeit von 5,5 min (siehe Abb. 3.16) erkennt man, dass es sich dabei nicht um Roseoflavin (Retentionszeit: 6,8 min) selbst handelt. Die Differenz der Retentionszeit von der Probe und Roseoflavin (1,3 min) ähnelt der Differenz der Retentionszeit von FMN zu Riboflavin (1,5 min), was ein Indiz dafür ist, dass es sich bei der Probe um RoFMN handeln könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein Massenspektrum (Abb. 3.17 A) und ein Absorptionsspektrum (Abb. 3.17 B) der Substanz gemessen. Dabei erkennt man im Massenspektrum ein klares Signal bei 487 Da, was der Masse von RoFMN (485,39 Da, zuzüglich der durch die Ionisation hinzugefügten Masse von +1) entspricht. Im dazugehörigen Absorptionsspektrum erkennt man zudem eine deutliche Absorption bei  $\lambda = 500$  nm, wie es bei Roseoflavin bekannt und bei seinen Derivaten zu erwarten ist.

Somit kann mit hoher Sicherheit gesagt werden, dass Pp1FbFP RoFMN bindet.



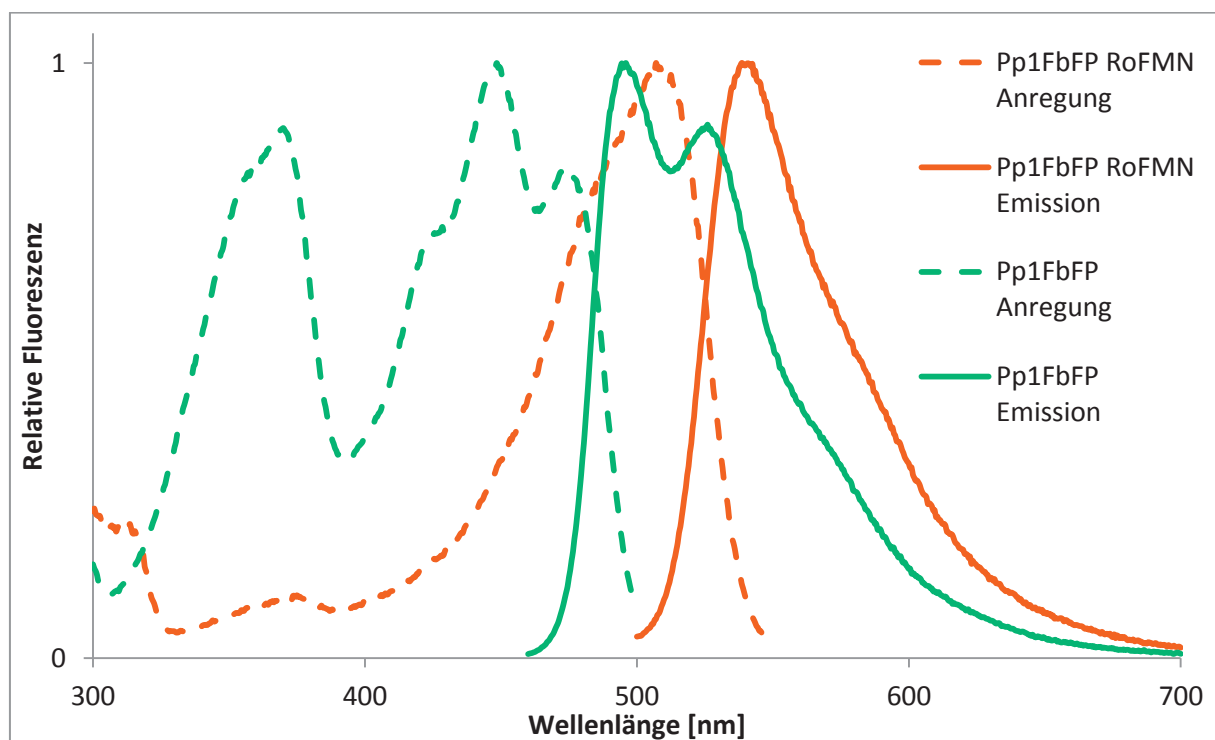
**Abb. 3.16 :** Chromatogramm der HPLC Analyse des Chromophors, das bei der Expression in Gegenwart von Roseoflavin von Pp1FbFP gebunden wird. Der Flavin Standard besteht aus den Substanzen FAD (4,1 min), FMN (4,8 min) und Riboflavin (6,3 min). Die Differenz der Retentionszeit von Roseoflavin (6,8 min) und der gemessenen Probe Pp1FbFP RoseoX (5,5 min) ähnelt der Differenz von Riboflavin zu FMN.



**Abb. 3.17: Massen- und Absorptionsspektrum der als RoFMN identifizierten Substanz.**  
 A: Massenspektrum mit deutlichen Signalen bei 486 und 487 Da, was der Masse von RoFMN (485,39 Da, zuzüglich der durch die Ionisation hinzugefügten Masse von +1) entspricht. B: Absorptionsspektrum der dazugehörigen Substanz mit deutlicher Absorption bei  $\lambda = 500$  nm, wie es bei Roseoflavin bekannt und bei seinen Derivaten zu erwarten ist. Eine Messung bei Wellenlängen von mehr als  $\lambda = 500$  nm war technisch bedingt nicht möglich.

### 3.3.2.2 Spektrale und photophysikalische Eigenschaften von Pp1FbFP mit RoFMN als Chromophor

Die prominenteste Eigenschaft von Pp1FbFP mit RoFMN ist das rot-verschobene Anregungs- und Emissionsspektrum. Wie in Abb. 3.18 dargestellt ist, liegt das Anregungsmaximum bei 507 nm, was einer Verschiebung von 57 nm verglichen mit dem natürlichen Chromophor entspricht. Zudem besitzt das Protein mit RoFMN nur eine sehr geringe Absorption im UV-Bereich um 360 nm. Das Emissionsspektrum ist durch ein Maximum bei 540 nm charakterisiert und besitzt keine Schulter, wie dies beim Einbau des natürlichen Chromophors der Fall ist.



**Abb. 3.18:** Anregungs- und Emissionsspektren von Pp1FbFP mit dem natürlichen Chromophor (grün) und mit RoFMN (orange). Pp1FbFP zeigt mit dem natürlichen Chromophor ein für FbFPs typisches Anregungsspektrum mit einem Maximum bei  $\lambda = 450$  nm und einem weiteren deutlichen Peak bei ca.  $\lambda = 360$  nm. Das Emissionsspektrum zeigt ebenfalls den typischen Verlauf mit einem Maximum bei  $\lambda = 495$  nm und einer Schulter bei  $\lambda = 520$  nm. Bei der Bindung von RoFMN weist das Protein nur ein Anregungsmaximum bei  $\lambda = 507$  nm auf und nur eine sehr geringe Absorption im UV-Bereich um  $\lambda = 360$  nm. Das Emissionsspektrum ist durch ein Maximum bei  $\lambda = 540$  nm gekennzeichnet und enthält keine Schulter. Die Anregung der Proben erfolgte für die Aufnahme der Emissionsspektren bei Pp1FbFP bei  $\lambda = 360$  nm und bei Pp1FbFP RoFMN bei  $\lambda = 480$  nm. Zur Aufnahme der Anregungsspektren wurde die Fluoreszenzemission von Pp1FbFP bei  $\lambda = 520$  nm und von Pp1FbFP RoFMN bei  $\lambda = 570$  nm gemessen. Alle Spektren wurden auf das jeweilige Maximum normiert.

Die Eigenschaften von Pp1FbFP mit RoFMN sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. RoFMN war zum Zeitpunkt der Arbeit nicht kommerziell erhältlich, weshalb nur Roseoflavin als Referenz benutzt werden konnte. Die Cofaktorbeladung ist mit 27 % etwas geringer als bei der Beladung mit FMN, was darauf hindeutet, dass die Affinität des Proteins für RoFMN niedriger ist, als für FMN. Der Extinktionskoeffizient ist mit  $44.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ca. 40% höher als der von freiem Roseoflavin und etwa dreimal so hoch wie der von FbFPs mit FMN, was eine deutliche Steigerung der Helligkeit zur Folge hat. Die Quantenausbeute von Pp1FbFP mit RoFMN liegt mit 0,2 mindestens um den Faktor 20 höher als bei freiem Roseoflavin ( $\Phi_F < 0,01$ ), damit allerdings immer noch im unteren Bereich der bislang charakterisierten FbFPs. Aufgrund des deutlich höheren Extinktionskoeffizienten besitzt Pp1FbFP mit RoFMN trotz der relativ niedrigen Quantenausbeute die höchste Helligkeit aller FbFPs (die Helligkeit von Fluoreszenzproteinen ist definiert als das Produkt aus Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute) und ist mit einem Wert von 8920 ca. 1,4mal heller als EcFbFP, das hellste FbFP mit natürlichem Chromophor (Helligkeitswert 6380).

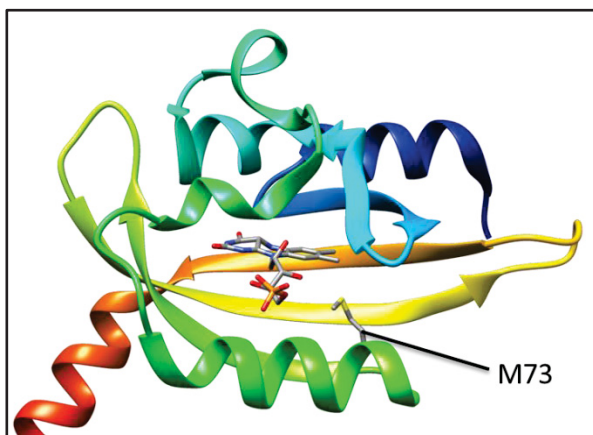
**Tab. 3.5: Photophysikalische Eigenschaften von Pp1FbFP mit RoFMN**

Mit RoFMN als Cofaktor besitzt Pp1FbFP ein signifikant rot-verschobenes Absorptions- und Emissionsspektrum. Die Quantenausbeute ist mit 0,2 etwas niedriger als bei Bindung des typischen Flavins. Durch den ca. 3mal so hohen Extinktionskoeffizienten ist das Protein in dieser Form mit RoFMN die hellste bislang charakterisierte FbFP-Variante. Referenzen: (a: Whitby, 1953); (b: Otto *et al.*, 1981); RoFMN war kommerziell nicht erhältlich, daher wurde Roseoflavin als Referenz verwendet.

Protein / Cofaktor	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktorbeladung [%]
Pp1FbFP	450	496	$13.900 \pm 500$	$0,27 \pm 0,01$	41
Pp1FbFP RoFMN	507	540	$44.600 \pm 4000$	$0,20 \pm 0,01$	27
FMN	444	531	$12.200^a$	$0,25 \pm 0,01$	-
Roseoflavin	505	540	$31.000^b$	$< 0,01$	-

### 3.3.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese von FbFPs zur Bindung von Roseoflavin

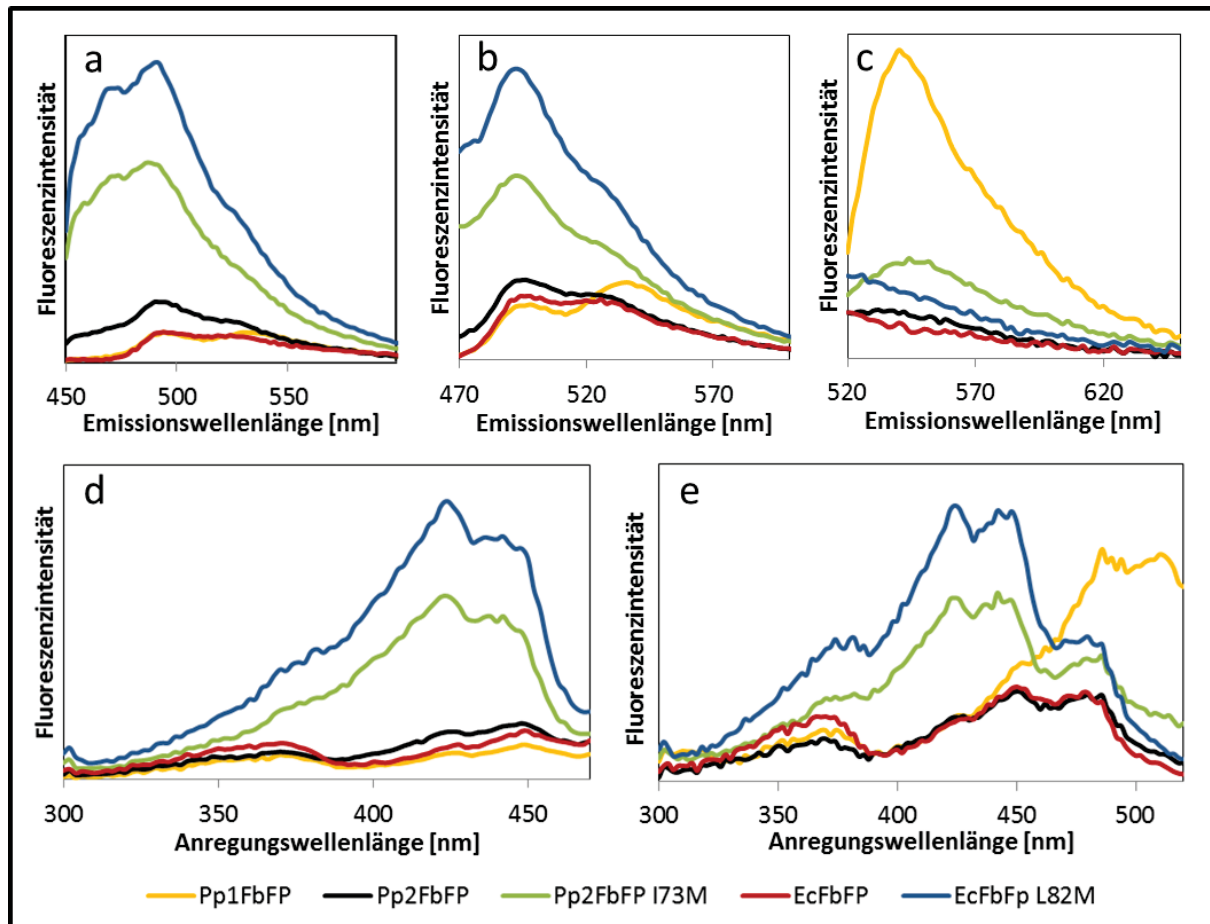
Von den 28 FbFP-Varianten, die auf Roseoflavin-Bindung untersucht wurden, zeigten nur drei eine Fluoreszenz; zwei davon sehr schwach. Daher wurde eine komparative Strukturanalyse von Pp1FbFP und den anderen 27 FbFPs durchgeführt. Das Ziel dabei war, Aminosäuren im Zentrum des Proteins zu identifizieren, die für die RoFMN Bindung relevant sind. Generell sind die Aminosäuren im Zentrum von LOV-Domänen hochgradig konserviert, so dass speziell nach funktionell unterschiedlichen Seitengruppen in Pp1FbFP gesucht wurde. Hierbei wurde lediglich eine Aminosäure an Position 73 identifiziert (siehe Abb. 3.19). Außer in Pp1FbFP befindet sich in allen anderen in dieser Arbeit untersuchten FbFPs an dieser relativen Position entweder ein Leucin, Isoleucin oder ein Valin, die alle sehr ähnliche biochemische Eigenschaften aufweisen. In Pp1FbFP hingegen befindet sich an dieser Position ein Methionin. Die Seitengruppe dieser Aminosäure befindet sich in sterischer Nähe zu der Dimethylamino-Gruppe am C8-Atom des gebundenen RoFMN und könnte sowohl einen Einfluss auf die Bindung, als auch auf die Fluoreszenzeigenschaften dieses Cofaktors haben.



**Abb. 3.19: Strukturmodell von Pp1FbFP mit M73.** Als Grundlage für die Erstellung des Modells diente die Kristallstruktur der LOV-Domäne PpSB1-LOV (PDB ID: 3SW1; Circolone *et al.*, 2012), von der Pp1FbFP abgeleitet ist. An Position 73 befindet sich bei Pp1FbFP ein Methionin, wohingegen sich in den Strukturmodellen aller anderen in dieser Arbeit untersuchten FbFPs ein Leucin, Isoleucin oder Valin an dieser relativen Position befindet. Da sich die Seitengruppe dieser Aminosäure in sterischer Nähe zu der Dimethylamino-Gruppe des RoFMN befindet, ist es möglich dass diese Aminosäure eine Schlüsselrolle in der Bindung von RoFMN spielt, bzw. für die veränderten spektralen Eigenschaften verantwortlich ist.

Um zu überprüfen ob dieses Methionin die Bindung bzw. Fluoreszenz von RoFMN in FbFPs ermöglicht, wurde an den entsprechenden Positionen in Pp2FbFP (I73) und EcFbFP (L82) ein Methionin eingebaut. Diese Varianten wurden zusammen mit dem jeweiligen Wildtyp und

Pp1FbFP in Roseoflavin-haltigem Medium exprimiert und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Die Anregungs- und Emissionsspektren sind in Abbildung 3.20 dargestellt.



**Abb. 3.20:** *In vivo* Anregungs- und Emissionsspektren von Pp2FbFP I73M und EcFbFP L82M in *E. coli* Cmpx131 nach Anzucht in Gegenwart von Roseoflavin. Alle Spektren wurden auf eine o.D.580 = 1 normiert. a) Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 420$  nm; EcFbFP L82 und Pp2fbFP I73M zeigen bei dieser Anregungswellenlänge ein deutliches Fluoreszenzsignal, während die jeweiligen Wildtypen und Pp1FbFP nur ein sehr schwaches Signal zeigen. b) Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 450$  nm; Bei der für FbFPs typischen Anregungswellenlänge zeigen die Wildtypen Pp2- und EcFbFP ein typisches Spektrum, wie es bei der Bindung von FMN auftritt. Dies ist aufgrund von restlichem Flavin im Medium zu erwarten. Pp1FbFP zeigt ein Mischspektrum mit Peaks bei  $\lambda = 495$  und  $540$  nm. Die Fluoreszenzintensität der beiden Mutanten ist deutlich höher und hat ein Maximum bei  $\lambda = 495$  nm. c) Emissionsspektren bei einer Anregungswellenlänge von  $\lambda = 500$  nm; Pp1FbFP zeigt hier aufgrund des gebundenen RoFMNs ein deutliches Fluoreszenzsignal, wohingegen die anderen Wildtypen keine signifikante Fluoreszenzemission zeigen. Bei Pp2FbFP I73M ist ein schwaches Fluoreszenzspektrum zu erkennen, was auf eine partielle RoFMN-Beladung hinweist. d) Anregungsspektrum bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 495$  nm; Die beiden Mutanten zeigen hier ein deutliches Spektrum, während die Wildtypen alle nur sehr schwache Spektren ohne signifikante Peaks aufweisen. Das Anregungsmaximum der beiden Mutanten liegt bei  $\lambda = 420$  nm, mit einer Schulter bei  $\lambda = 440$  nm. e) Anregungsspektrum bei einer Emissionswellenlänge von  $\lambda = 540$  nm; Pp1FbFP zeigt hier erwartungsgemäß ein Anregungsspektrum mit dem Maximum bei ca.  $\lambda = 500$  nm. Die beiden Mutanten zeigen auch hier Anregungsmaxima bei  $\lambda = 420$  nm und  $440$  nm, sowie weit entfernte Schultern bei  $\lambda = 380$  nm und  $480$  nm. Die FMN bindenden Wildtypen von Pp2- und EcFbFP zeigen hier aufgrund des geringen FMN-Anteils im Medium nur eine geringe Restfluoreszenz.

Anhand dieser Spektren lässt sich sagen, dass Pp2FbFP I73M und EcFbFP L82M Roseoflavin bzw. RoFMN oder evtl. auch RoFAD binden und fluoreszenzaktiv sind. Die spektralen Eigenschaften dieser beiden Varianten unterscheiden sich allerdings deutlich von Pp1FbFP mit RoFMN und auch von ihren beiden Wildtypen. Das Anregungsmaximum dieser Varianten liegt bei 420 nm, mit einer Schulter bei 440 nm (Abb. 3.20 d) und das Emissionsmaximum liegt bei 495 nm (Abb. 3.20 a). Eine Anregung mit  $\lambda = 500$  nm resultiert nur in einer sehr geringen Fluoreszenz, wobei bei Pp2FbFP I73M ein Spektrum wie bei Pp1FbFP mit einem Maximum bei  $\lambda = 540$  nm zu erkennen ist (Abb. 3.20 c). Aus dem Vergleich der Emissionsspektren in a und c ist ersichtlich, dass die beiden Mutanten EcFbFP L82M und Pp2FbFP I73M bei  $\lambda = 420$  nm angeregt werden können, ohne Pp1FbFP anzuregen und dass selbiges bei  $\lambda = 500$  nm angeregt werden kann, ohne EcFbFP L82M und Pp2FbFP I73M stark anzuregen. Die Emissionsspektren bei der jeweiligen Anregung überlappen bei Wellenlängen über  $\lambda = 520$  nm, wobei die Fluoreszenzintensität beider Mutanten hier gering ist und stetig abfällt. Durch die Wahl geeigneter Filter kann daher theoretisch im Mikroskop eine Unterscheidung von Pp1FbFP und EcFbFP L82M oder auch Pp2FbFP I73M erreicht werden. Pp2FbFP I73M zeigt in Abbildung a ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 495$  nm und in Abbildung c ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 540$  nm. Das Emissionsmaximum eines Fluorophors ist generell unabhängig von der Wellenlänge des Anregungslichts. Eine mögliche Erklärung für die beiden verschiedenen Emissionsmaxima dieser Variante ist die Bindung verschiedener Flavine. Über die spektralen Eigenschaften der Roseoflavinderivate, RoFMN und RoFAD ist bislang nichts publiziert und die Stoffe sind kommerziell nicht erhältlich (Stand Mai 2014). Diese Flavine könnten – insbesondere in gebundenem Zustand – zu unterschiedlichen spektralen Eigenschaften führen. Während für Pp1FbFP nur RoFMN als Cofaktor gefunden wurde, könnte Pp2FbFP I73M womöglich zum Teil mit RoFMN und Roseoflavin bzw. RoFAD beladen sein. Zur Überprüfung dieser Theorie wäre eine Aufreinigung des Proteins mit anschließender HPLC-MS Analyse notwendig. Die Aminosäureposition von M73 in Pp1FbFP konnte anhand dieser Ergebnisse als Schlüsselaminosäure für die Bindung bzw. die Fluoreszenzaktivität von Roseoflavin oder seinen Derivaten in FbFPs identifiziert werden.

### 3.4 Thermostabile FbFPs von LOV-Domänen aus thermophilen Organismen

Das obere Wachstumslimit für eukaryotische Zellen liegt bei etwa 60 °C (Tansey & Brock, 1972). Zahlreiche Prokaryoten und Archaea können hingegen bei deutlich höheren Temperaturen wachsen. Diese thermophilen Mikroorganismen können in (moderat) Thermophile (optimale Wuchstemperatur  $T_{\text{opt}}$  50 - 64 °C), extrem Thermophile ( $T_{\text{opt}}$  65 - 79 °C) und Hyperthermophile ( $T_{\text{opt}} \geq 80$  °C) eingeteilt werden (Wagner & Wiegel, 2008). Die bislang bekannte obere Temperaturgrenze für Leben liegt bei ca. 122 °C (unter erhöhtem Druck) (Takai, 2008).

Die hohe Temperatur in den natürlichen Habitaten dieser Organismen wird oft von einer geringen Sauerstoffkonzentration oder anaeroben Bedingungen begleitet. Dies ist zum einen durch die Lage dieser Habitate bedingt (wie z.B. in der Nähe sogenannter „Schwarzer Raucher“, hydrothermalen Quellen in der Tiefsee) und zum anderen physikalisch, da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser mit steigender Temperatur abnimmt (Weiss, 1970). Es ist daher nicht überraschend, dass die bislang bekannten Thermophilen hauptsächlich anaerob oder fakultativ anaerob sind (Wagner & Wiegel, 2008). Um diese Organismen *in vivo* zu untersuchen sind geeignete Werkzeuge erforderlich, die unter diesen extremen Bedingungen funktionieren.

Von GFP sind zwei Varianten bekannt, die sich bei hohen Temperaturen korrekt falten. Dazu gehört einmal das „Superfolder GFP“, das ursprünglich entwickelt wurde, um ein schneller reifendes GFP zu erhalten (Pédelacq *et al.*, 2006). Von dieser Variante konnte auch gezeigt werden, dass sie in *Thermus thermophilus* bei 70 °C funktionell exprimierbar ist (Cava *et al.*, 2008). Die zweite Variante ist eCGP123, eine Variante die auf ihre Stabilität gegenüber denaturierenden Bedingungen optimiert wurde. Die Fluoreszenzemission dieser Variante zeigt dabei jedoch eine hohe Temperaturabhängigkeit und ist bei 60 °C nur noch ungefähr halb so hoch wie bei 30 °C (Kiss *et al.*, 2009).

Bisher etablierte FbFPs sind temperatursensitiv und zeigen einen deutlichen Fluoreszenzverlust bei erhöhten Temperaturen. Um das mögliche Anwendungsgebiet der FbFPs auf thermophile Organismen zu erweitern, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezielt nach LOV-Domänen in thermophilen Organismen gesucht. Daraus sollten dann FbFPs entwickelt werden, die eine höhere Temperaturstabilität aufweisen, als FbFPs die von LOV-Domänen aus mesophilen Organismen abgeleitet sind.



### 3.4.1 Suche nach LOV-Domänen in thermophilen Organismen

Zur Identifizierung von LOV-Domänen in thermophilen Organismen wurde eine Literatur- und Datenbanksuche durchgeführt. Mithilfe einer BLAST-Suche (Altschul *et al.*, 1990; Mount, 2007), bei der die Aminosäuresequenz von Pp2FbFP als Referenz verwendet wurde, konnten vier LOV-Domänen-codierende Sequenzen in thermophilen Organismen identifiziert werden (Stand: Februar 2012). Eine Sequenz wurde im Genom von *Acidithiobacillus caldus* identifiziert, einem extrem acidophilen und moderat thermophilen Gamma-Proteobacterium, das bei Temperaturen von bis zu 55 °C wächst (Valdes *et al.*, 2009). Eine weitere Sequenz wurde im Genom des thermophilen Pilzes *Myceliophthora thermophila* identifiziert, der bei 48 °C wächst (Beeson *et al.*, 2011). Die dritte Sequenz stammt aus dem Genom von *Meiothermus ruber*, einem Gram-negativen, thermophilen Bakterium, das bei Temperaturen von 37 bis 70 °C wächst, mit einem Optimum bei 60 °C (Tindall *et al.*, 2010). Die vierte Sequenz wurde im Genom von *Thermosynechococcus elongatus* identifiziert, einem thermophilen Cyanobakterium, das sein Wuchsoptimum bei ca. 55 °C hat (Nakamura *et al.*, 2002).

Vier weitere LOV-Domänen metagenomischen Ursprungs aus dem Yellowstone Nationalpark wurden von Pathak *et al.* in einer Liste aufgeführt, die die weltweite Verteilung von LOV-Domänen in Metagenomproben zeigt (Pathak *et al.*, 2012). Diese vier Metagenomproben wurden aus heißen Quellen bei ca. 50 °C entnommen. Die Eckdaten dieser acht LOV-Domänen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

**Tab. 3.6: Ausgewählte Daten der LOV-Domänen aus thermophilen Organismen.** Detaillierte Informationen über die Proteine können bei der jeweiligen Datenbank im Internet unter Angabe der „Accession Nr.“ gefunden werden. Die Identität zu Pp2FbFP ist für den homologen Bereich des Proteins angegeben. AS: Aminosäuren.

Ursprung	Datenbank / Accession Nr.	Identität zu Pp2FbFP	Gesamte Proteinlänge	Annotierte Funktion(en)
<i>A. caldus</i> SM-1	NCBI / AEK56883	40 %	913 AS	Diguanylatcyclase/Phosphodiesterase mit PAS/PAC und GAF Sensor(en)
<i>T. elongates</i> BP-1	NCBI / BAC07582	51 %	380 AS	Zwei-Komponenten Hybrid-Sensor und Regulator
<i>M. ruber</i> DSM 1279	NCBI / ADD28021	48 %	578 AS	PAS/PAC Sensor Signaltransduktion / Histidinkinase

Tab. 3.6: Fortsetzung ausgewählter Daten der LOV-Domänen aus thermophilen Organismen

Ursprung	Datenbank / Accession Nr.	Identität zu Pp2FbFP	Gesamte Proteinlänge	Annotierte Funktion(en)
<i>M. thermophila</i> ATCC 42464	NCBI / XP_00366549 3	33 %	1033 AS	Hypothetisches Protein; 3 PAS Motive, 1 Zink-Finger-DNA-Bindedomäne
YNP Metagenom- Projekt („White Creek Site 3“; 50°C)	IMG/M / 2013535112	46 %	595 AS	„PAS domain S-box“
YNP Metagenom- Projekt („White Creek Site 3“; 50°C)	IMG/M / 2013552098	48 %	157 AS	Diguanylatcyclase/Phosphodiesterase mit PAS/PAC Sensor(en)
YNP Metagenom- Projekt („Chocolate Pots“; 52.9°C)	IMG/M / 2014365872	43 %	205 AS	„PAS domain S-box“
YNP Metagenom- Projekt („Chocolate Pots“; 52.9°C)	IMG/M / 2014376749	45 %	217 AS	„PAS domain S-box“

Um die Aminosäuren zu identifizieren, die zu der LOV-Domäne selbst und nicht zu eventuellen Effektor-domänen gehören, wurden Homologie-Strukturmodelle auf Basis der YtvA-LOV-Domäne (PDB ID: 2PR5, Möglich & Moffat, 2007) erstellt. Alle identifizierten Sequenzen wurden daraufhin in ihrer Länge an die YtvA-LOV-Domäne angepasst. Zur Synthese der Gene wurde die „Codon-usage“ an die von *E. coli* angepasst und eine Mutation eingefügt, um das photoaktive Cystein der LOV-Domäne gegen ein Alanin auszutauschen. Anschließend wurden die Gene zur P<sub>T7</sub>-abhängigen Expression und zum Anfügen eines N-terminalen His<sub>6</sub>-Tags in den Expressionsvektor pET28a kloniert. Die Proteinsequenzen dieser FbFPs sind im Anhang aufgeführt (8.1).

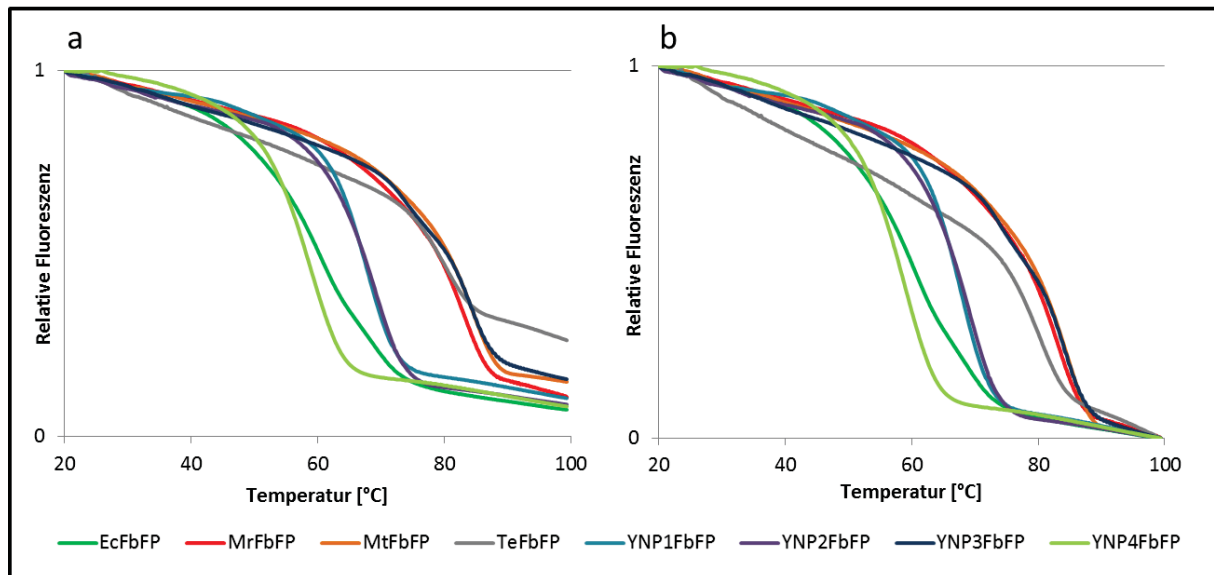
Entsprechend der bisherigen Nomenklatur wurden die Proteine nach ihren Ursprungsorganismen benannt: AcFbFP für das Protein aus *A. caldus*, MtFbFP für das aus *M. thermophila*, MrFbFP für das aus *M. ruber*, TeFbFP für das aus *T. elongatus* und YNP1-4 FbFP für die Proteine aus den Metagenomproben im Yellowstone Nationalpark.

### 3.4.2 Charakterisierung der Thermostabilität

Alle acht\* FbFPs konnten in *E. coli* BL21(DE3) funktionell exprimiert werden und zeigten das für FbFPs charakteristische Fluoreszenzspektrum mit einer maximalen Emission um  $\lambda = 495$  nm und einer Schulter um  $\lambda = 525$  nm. Im Falle von AcFbFP war die *in vivo* Fluoreszenzemission sehr gering, so dass dieses Protein nicht weiter bearbeitet wurde. Die übrigen sieben\* Proteine wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (2.13.1) und *in vitro* charakterisiert.

Um die Thermostabilität der Proteine zu vergleichen, wurde im Fluoreszenzphotometer eine Temperatur-abhängige Fluoreszenzkinetik mit einer konstanten Heizrate von 1 °C/min aufgenommen und die Fluoreszenz der Probe über die Zeit gemessen. Als Referenz wurde EcFbFP verwendet, das von der YtvA-LOV-Domäne aus dem mesophilen Bakterium *B. subtilis* abgeleitet ist. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abb. 3.21 a dargestellt. Die Fluoreszenz bei  $\lambda = 495$  nimmt mit steigender Temperatur ab, wobei diese Abnahme anfangs (Phase 1) relativ gering ist und näherungsweise linear verläuft. Dies ist voraussichtlich primär auf ein Quenching der Fluoreszenz durch die erhöhte Interaktion mit dem Lösungsmittel (bedingt durch die erhöhte Temperatur) zurückzuführen. Ab einer bestimmten, proteinspezifischen Temperatur nimmt die Fluoreszenzabnahme exponentiell zu (Phase 2), bis sich die Fluoreszenz einem Basalwert annähert (Phase 3). Die exponentielle Fluoreszenzabnahme in Phase 2 ist höchstwahrscheinlich auf die Freisetzung des Chromophors zurückzuführen. Die weitere Abnahme der Fluoreszenz in Phase 3 wird voraussichtlich durch ein temperaturbedingtes Quenching der Fluoreszenz des freien Flavins verursacht. Sechs\* der sieben\* Proteine zeigen dabei eine höhere Schmelztemperatur als EcFbFP. Als Schmelztemperatur wird hier die Temperatur bezeichnet, bei der die Fluoreszenzemission bei  $\lambda = 495$  nm auf 50 % des Ausgangswertes gesunken ist. Da FbFPs ihr Emissionsmaximum bei dieser Wellenlänge haben und freie Flavine ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 530$  nm haben und bei  $\lambda = 495$  nm nur noch ca. 10 % ihrer Fluoreszenz emittieren, kann hierdurch die Freisetzung des Chromophors vom Protein beobachtet werden.

\*Nach Abgabe dieser Arbeit wurde festgestellt, dass es bei MtFbFP zu einer Verwechslung kam. Das für MtFbFP gehaltene Plasmid enthielt tatsächlich das Gen für MrFbFP. Bei dem hier als MrFbFP bezeichneten Protein selbst lag keine Verwechslung vor. MtFbFP wurde im Anschluss an diese Arbeit als nicht-fluoreszent identifiziert.



**Abb. 3.21: Native und korrigierte Schmelzkurven verschiedener FbFPs aus thermophilen Organismen.**

a) Native Schmelzkurven; Die Proben wurde mit einer Rate von 1°C/min erhitzt und die Fluoreszenzintensität bei  $\lambda = 495$  nm gemessen. Alle Werte wurden auf den jeweiligen Ausgangwert bei 20 °C normiert. Die Fluoreszenz nimmt mit steigender Temperatur anfangs linear, später exponentiell ab. Bis auf YNP4FbFP haben alle FbFPs thermophilen Ursprungs eine höhere Temperaturstabilität als EcFbFP. b) Korrigierte Schmelzkurven; Aufgrund der unterschiedlichen Restfluoreszenz durch freies Flavin bei 100 °C in a), wurde der letzte Datenpunkt als null festgelegt und die kumulative Differenz der vorherigen Datenpunkte aus a) eingezeichnet. Hieraus ergeben sich etwas niedrigere, aber genauere Schmelztemperaturen.

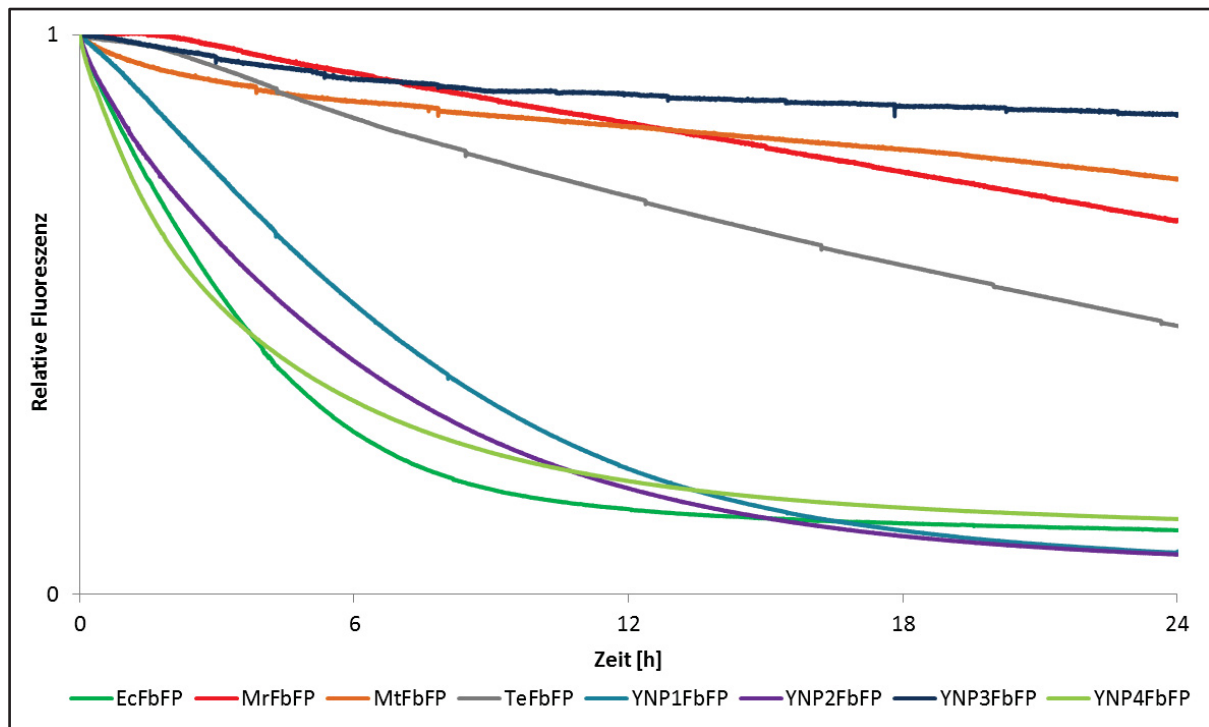
Auffällig an diesen Schmelzkurven ist die unterschiedliche Restfluoreszenz bei 100 °C. Hierbei handelt es sich um die Fluoreszenz des freien Flavins, das aus dem Protein herausgelöst wurde. Durch die Freisetzung des Chromophors ändert sich dessen Quantenausbeute. In Abhängigkeit der Differenz der Quantenausbeute in gebundenem und in freiem Zustand, ergibt sich ein teilweise deutlicher Unterschied in der Restfluoreszenz relativ zur Anfangsfluoreszenz. Um diesen Effekt zu korrigieren wurde der letzte Datenpunkt auf null gesetzt und die kumulative Differenz der vorherigen Datenpunkte eingezeichnet, um die korrigierten Schmelzkurven zu erhalten, die in Abbildung 3.21 b dargestellt sind. Die deutlichste Änderung der Schmelztemperatur durch diese Korrektur ist bei TeFbFP zu beobachten, da es mit  $\Phi_F = 0,13$  die niedrigste bislang beschriebene Quantenausbeute aller FbFPs aufweist (s.u.). Hier ergibt sich eine Schmelztemperatur von 73 statt 79 °C. Bei allen anderen Proteinen verringert sie sich hingegen nur um etwa 1 bis 3 °C. Die im Folgenden angegebenen Schmelztemperaturen beziehen sich immer auf die korrigierten Schmelzkurven.

EcFbFP besitzt eine Schmelztemperatur von 59 °C und ist damit für Anwendungen in Thermophilen wahrscheinlich nicht geeignet. YNP4FbFP zeigt mit 58 °C etwa die gleiche

Schmelztemperatur und ist damit die am wenigsten thermostabile Variante dieser sieben neuen FbFPs. Die Thermostabilität der übrigen FbFPs aus thermophilen Organismen liegt deutlich höher. Mt-, Mr- und YNP3FbFP stellen dabei die stabilsten Varianten dar. Sie liegen mit Schmelztemperaturen von 76 – 78 °C sehr nah beieinander. Sie zeichnen sich zudem dadurch aus, dass sie bei 60 °C noch ca. 80 % ihrer Fluoreszenz relativ zu ihrer Fluoreszenz bei Raumtemperatur behalten.

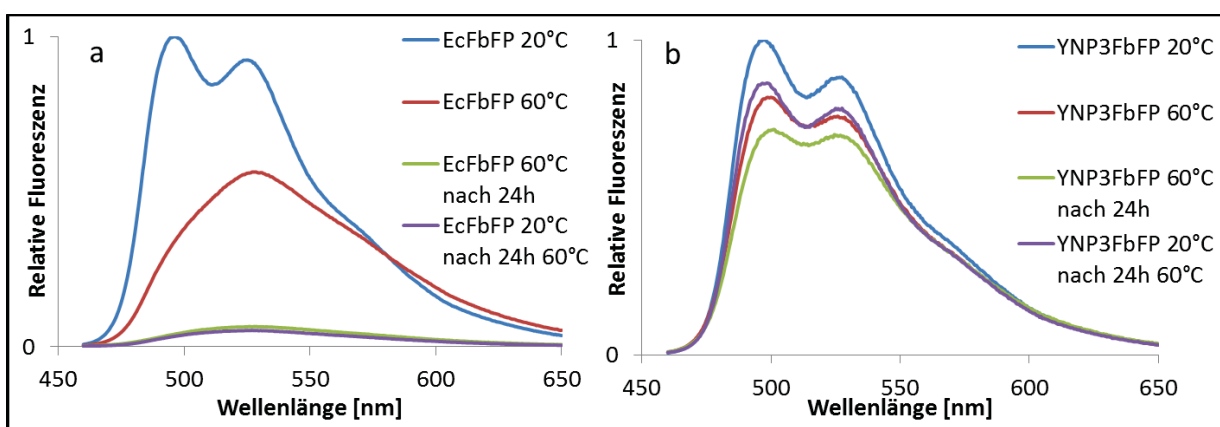
Die Schmelztemperatur gibt Aufschluss darüber, wie thermostabil ein Protein ist, bzw. wie stark seine Fluoreszenzintensität von der Temperatur abhängt. Für die praktische Anwendung als Reporter ist darüber hinaus auch die Stabilität bei einer hohen Temperatur über einen längeren Zeitraum entscheidend. Daher wurden die Proteine einem 24stündigen Inkubationstest bei 60 °C unterzogen, einer Temperatur die für die Anzucht vieler verschiedener thermophiler Mikroorganismen geeignet ist (Wagner & Wiegel, 2008). Dazu wurde die Fluoreszenz der Proteine bei 60 °C über einen Zeitraum von 24 Stunden beobachtet. Vor dem Start der 24stündigen Kinetik wurden die Proben mit einer Rate von 1 °C/min auf 60 °C erhitzt und für fünf Minuten bei dieser Temperatur inkubiert um einen verlässlichen Anfangswert zu erhalten. Die Kinetiken des Tests sind in Abb. 3.22 dargestellt. Bei EcFbFP ist ein starker, exponentieller Rückgang der Fluoreszenz über die Zeit zu beobachten. Dieser beträgt innerhalb der ersten sechs Stunden ca. 12 %/h und flacht dann deutlich ab. YNP1-, YNP2- und YNP4FbFPs zeigen einen ähnlich starken Fluoreszenzverlust mit einem Rückgang zwischen 8 und 10 %/h, innerhalb der ersten sechs Stunden. Die Fluoreszenzintensität von TeFbFP nimmt über den gesamten Zeitraum hinweg mit einer Rate von ca. 2,2 %/h näherungsweise linear ab, womit dieses Protein bereits deutlich stabiler ist. Mr- und MtFbFP\* sind mit Raten von ca. 1,5 bzw. 0,8 %/h noch stabiler. YNP3FbFP erwies sich mit einem Fluoreszenzrückgang von nur 0,5 %/h und einer Restfluoreszenz von über 85 % am Ende der 24 Stunden in diesem Test als das stabilste Protein.

\* siehe S. 92



**Abb. 3.22: 24stündiger Inkubationstest der FbFPs aus thermophilen Organismen.** Die Proteine wurden für 24 Stunden bei 60 °C inkubiert und die Fluoreszenz bei  $\lambda = 495$  nm gemessen. Alle Proben wurden mit 1 °C/min auf 60 °C erhitzt und vor der Messung noch fünf Minuten bei dieser Temperatur inkubiert um einen verlässlichen Startwert zu erhalten. YNP3-, Mt\*- und MrFbFP sind dabei die drei stabilsten Proteine, wohingegen EcFbFP die geringste Stabilität aufweist. \* siehe S. 92

Bislang wurde bei der Stabilität nur die Fluoreszenz bei  $\lambda = 495$  nm betrachtet. Um zu überprüfen ob, bzw. wie sich das Spektrum bei höheren Temperaturen ändert, wurden am Anfang und am Ende des 24stündigen Inkubationstests Emissionsspektren aufgenommen. In Abb. 3.23 sind exemplarisch die Spektren von EcFbFP und YNP3FbFP dargestellt.



**Abb. 3.23: Emissionsspektren von EcFbFP und YNP3FbFP vor und nach 24stündiger Inkubation bei 60 °C.** EcFbFP (a) zeigt bereits direkt nach dem Erhitzen auf 60 °C ein Spektrum, dass fast vollständig dem von freiem Flavin entspricht und es ist kein Peak bei  $\lambda = 495$  nm mehr zu erkennen. Nach 24 Stunden bei 60 °C ist ein Großteil dieses Flavins degradiert und auch die Abkühlung auf 20 °C führt nicht zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz. YNP3FbFP (b) hingegen zeigt nur einen geringen Rückgang der Fluoreszenzintensität und kaum spektrale Unterschiede, was die hohe Thermostabilität des Proteins bestätigt.

Aus den Emissionsspektren von EcFbFP in Abb. 3.23 a geht deutlich hervor, dass die Erhitzung dieses Proteins auf 60 °C eine Freisetzung des Chromophors zur Folge hat, da das Spektrum bei 60 °C dem von freiem Flavin entspricht. Dieses freie Flavin wird während der 24 Stunden degradiert und ist anschließend nicht mehr fluoreszenzaktiv. Die Abkühlung auf 20 °C im Anschluss zeigt keinen Effekt, was bedeutet, dass dieser Fluoreszenzverlust irreversibel ist. Bei YNP3FbFP hingegen erkennt man in Abb. 3.23 b bei der Erhitzung auf 60 °C lediglich einen leichten Rückgang der Fluoreszenzintensität auf etwa 85 %. Am Ende der 24 Stunden erkennt man hier ein etwas vermindertes Verhältnis der Fluoreszenz bei  $\lambda = 495$  und 525 nm. Dies deutet darauf hin, dass während der Inkubation geringe Mengen an Flavin freigesetzt werden. Da der Peak bei  $\lambda = 495$  nm noch höher ist als bei  $\lambda = 525$  nm, ist davon auszugehen, dass immer noch der mit Abstand größte Teil des Flavins gebunden vorliegt.

### 3.4.3 Charakterisierung der generellen Fluoreszenzeigenschaften

Analog zu den zuvor charakterisierten FbFPs, wurden auch für die neu entwickelten FbFPs aus thermophilen Organismen die für Fluoreszenzreporter wichtigen Eigenschaften *in vitro* charakterisiert. Die Quantenausbeute von TeFbFP liegt dabei mit einem Wert von 0,13 am untersten Ende der von FbFPs bekannten Quantenausbeuten. Mr- und MtFbFP\* liegen mit Werten von 0,22 bzw. 0,25 im mittleren Bereich. YNP1- YNP2- und YNP4FbFP hingegen verfügen über Quantenausbeuten von jeweils knapp über 0,3 und liegen damit bereits im oberen Bereich der bekannten FbFPs (vgl. Tab. 1).

Die Extinktionskoeffizienten entsprechen mit Werten zwischen  $13.300$  und  $15.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  dem Durchschnitt der bislang bekannten FbFPs. Für Mt- Te- und YNP2FbFP konnte kein Extinktionskoeffizient bestimmt werden, da die Proteine beim Herauslösen des Chromophors bei 95 °C aggregierten (Bestimmung des Extinktionskoeffizienten siehe 2.14.5), was auch schon bei phiLOV2.1 beobachtet wurde (siehe 3.1). Für die Berechnung der Cofaktorbeladung wurde in diesen Fällen der durchschnittliche Extinktionskoeffizient aller bislang charakterisierten FbFPs von  $14.200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  benutzt. Obwohl dadurch mit einem höheren Fehler bei dem berechneten Wert gerechnet werden muss, kann durch diese Methode dennoch ein Richtwert ermittelt werden. YNP4- und TeFbFP weisen mit jeweils 69 % einen relativ hohen Wert auf, was die sehr niedrige Quantenausbeute von TeFbFP *in vivo* teilweise kompensiert.

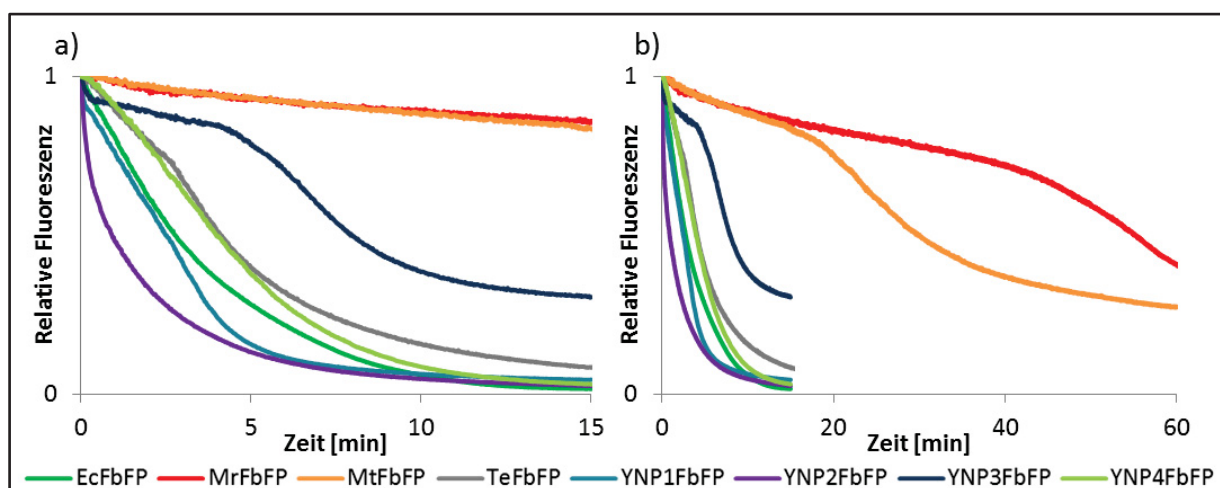
\* siehe S. 92



Relativ dazu weist YNP3FbFP mit 28 % eine geringe Beladung auf.

Bei der Photostabilität gibt es zwischen den Varianten extreme Unterschiede. YNP2FbFP weist eine relativ geringe Photostabilität auf und verliert innerhalb von einer Minute die Hälfte seiner Fluoreszenz. YNP1FbFP liegt mit 2,6 Minuten im Bereich der Referenz von EcFbFP mit 2,8 Minuten und YNP4- und TeFbFP liegen mit 4,0 bzw. 4,1 Minuten etwas darüber. YNP3FbFP zeigt eine deutlich höhere Stabilität und ist mit 7,2 Minuten etwa 2,5mal so photostabil wie EcFbFP. Die Photostabilität von MtFbFP\* ist mit 29,6 Minuten nochmal um den Faktor 4 höher und MrFbFP weist mit einer Bleaching-Halbzeit von 55,7 Minuten eine um den Faktor 20 höhere Photostabilität auf als EcFbFP.

Mr- und MtFbFP\* stellen damit die beiden mit Abstand photostabilsten FbFPs dar, die bislang charakterisiert wurden. Die hierzu ermittelten Kinetiken sind in Abb. 3.24 dargestellt. Die meisten FbFPs zeigen dabei einen exponentiellen Fluoreszenzverlust bei intensiver Bestrahlung mit Blaulicht. Bei YNP3-, Mr- und MtFbFP\* tritt während der ersten Minuten der Bestrahlung nur ein sehr geringer, näherungsweise linearer Rückgang der Fluoreszenz ein, der dann nach einer bestimmten Zeit exponentiell ansteigt und dann wieder abflacht, wobei sich die Restfluoreszenz einem Basalwert annähert. Bei YNP3FbFP tritt diese exponentielle Abnahme nach etwa 5 Minuten ein. Für Mr- und MtFbFP\* musste die standardmäßig auf 15 Minuten begrenzte Aufnahme verlängert werden, um diesen Bereich zu erfassen. Er liegt bei MtFbFP\* bei ca. 20 Minuten und bei MrFbFP ca. 40 Minuten.



**Abb. 3.24: Photobleaching-Kinetiken der FbFPs aus thermophilen Organismen.** Alle Messungen wurden wie in 2.14.7 beschrieben durchgeführt. a) Die Fluoreszenz der meisten FbFPs verringert sich bei intensiver Bestrahlung mit Blaulicht exponentiell und bleicht innerhalb weniger Minuten aus. YNP3-, Mr- und MtFbFP\* sind durch eine anfangs sehr geringe, fast lineare Abnahme der Fluoreszenz gekennzeichnet, die erst später exponentiell zunimmt. b) Erweiterung der Zeitachse von a) um die Kinetiken von Mr- und MtFbFP\* abzubilden.

\* siehe S. 92



#### **3.4.4 Verbesserung der Quantenausbeute von YNP3FbFP**

Die Quantenausbeute von dem thermostabilen YNP3FbFP ist mit 0,2 relativ niedrig. Da gerade dieses Protein sich als sehr thermostabil erweist, wurde nach Möglichkeiten gesucht, die Helligkeit des Proteins zu verbessern. Dabei wurde an Position 116 ein Tyrosin identifiziert, wobei diese Position relativ zum Chromophor gesehen, der Position des Y112 in Pp2FbFP entspricht (vgl. Alignment in Abb. 8.1), von dem aus Kapitel 3.2.2 bereits bekannt ist, dass es einen Quenchingeffekt auf die Fluoreszenz besitzt. Daher wurde Y116 in YNP3FbFP mutagenisiert, um eine höhere Quantenausbeute bei diesem Protein zu erreichen. Dabei wurde anders als in 3.2.2 keine Sättigungsmutagenese verwendet, sondern ein gezielter Austausch gegen ein Phenylalanin gewählt, um die strukturellen Eigenschaften und die Thermostabilität so gut wie möglich zu erhalten. YNP3FbFP Y116F ist mit einer Quantenausbeute von 0,2630 % heller als der Wildtyp und weist dabei gleichzeitig mit einer Fluoreszenzschmelztemperatur von 75 °C eine ähnlich hohe Temperaturstabilität wie der Wildtyp mit 78 °C auf. Es konnte damit eine gute Steigerung der Helligkeit, bei einer geringfügigen Beeinflussung anderer Faktoren erreicht werden.

#### **3.4.5 Zusammenfassung der Eigenschaften der FbFPs aus thermophilen Organismen**

Die ermittelten Eigenschaften der FbFPs aus thermophilen Organismen sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst. Die Proteine Mr-, Mt- und YNP3FbFP haben sich dabei mit Schmelztemperaturen von über 75 °C als besonders thermostabil erwiesen, was sie zu vielversprechenden Kandidaten für den Einsatz als Fluoreszenzreporter in Thermophilen macht.

Zuvor gewonnene Erkenntnisse über den Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Fluoreszenzeigenschaften (siehe 3.2) konnten erfolgreich auf YNP3FbFP transferiert werden. Dabei wurde die Helligkeit dieses Proteins durch den gezielten Austausch Y116F um den Faktor 1,3 erhöht. Alle anderen untersuchten Faktoren wurden dabei nur geringfügig beeinflusst.

Mt- und MrFbFP weisen zusätzlich zu ihrer Thermostabilität eine extrem hohe Photostabilität auf, die die anderer FbFPs um ein Vielfaches übertrifft. Diese Proteine sollten sich daher auch für bildgebende Fluoreszenzanwendungen bei Raumtemperatur, bei denen

die Proben oft, bzw. lange, intensiv belichtet werden müssen, besser eignen als bisherige FbFPs.

**Tab. 3.7: Zusammenfassung der Eigenschaften der FbFPs aus thermophilen Organismen.** Mr- Mt- und YNP3FbFP weisen eine signifikant höhere Schmelztemperatur auf als die Referenz. Mr- und MtFbFP\* zeichnen sich zusätzlich durch eine sehr hohe Photostabilität aus. Die angegebenen Werte für den Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeute und die Bleaching-Halbzeit sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung. Die mit <sup>1</sup> gekennzeichneten Werte der Cofaktorbeladung wurden mit dem mittleren Extinktionskoeffizienten aller FbFPs berechnet; n.b.: nicht bestimmt.

Protein	Schmelztemperatur [°C]	Molekulare Masse [kDa]	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_f$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-Halbzeit [min]
EcFbFP	59 ± 0,6	15,1	448	496	14.900 ± 200	0,44 ± 0.01	66	2,8 ± 0,1
MrFbFP	77 ± 0,4	16,4	448	498	15.200 ± 500	0,22 ± 0.01	33	55,7 ± 2,3
MtFbFP*	78 ± 0,2	16,4	449	498	n.b.	0,25 ± 0.01	53 <sup>1</sup>	29,6 ± 4,7
TeFbFP	73 ± 3,1	18,3	445	494	n.b.	0,13 ± 0.01	69 <sup>1</sup>	4,1 ± 0,2
YNP1FbFP	66 ± 0,6	17,4	446	496	13.300 ± 400	0,31 ± 0.01	67	2,6 ± 0,3
YNP2FbFP	66 ± 0,6	13,6	449	497	n.b.	0,33 ± 0.01	64 <sup>1</sup>	1,0 ± 0,3
YNP3FbFP	76 ± 1,7	15,4	449	498	14.200 ± 300	0,20 ± 0.02	28	7,2 ± 0,9
YNP3FbFP Y116F	75 ± 1,3	15,4	449	498	13.800 ± 100	0,26 ± 0,01	28	5,4 ± 0,5
YNP4FbFP	58 ± 0,2	15,1	446	496	14.300 ± 200	0,33 ± 0.01	69	4,0 ± 0,4

\* siehe S. 92

## 4. Diskussion

Fluoreszenzproteine haben sich durch ihre einfache, nicht-invasive, optische Nachweisbarkeit über die letzten zwei Jahrzehnte hinweg zu einem nicht mehr wegzudenkenden Werkzeug in der Erforschung biologischer Systeme entwickelt. Im Jahr 2007 kam mit den FbFPs eine neue Klasse von Fluoreszenzproteinen hinzu (Drepper *et al.*, 2007), von der mittlerweile ebenfalls verschiedene Varianten beschrieben wurden. Dabei wurden sowohl verschiedene LOV-Domänen benutzt um neue Fluoreszenzproteine zu erzeugen (Chapman *et al.*, 2008), als auch bestehende FbFPs verbessert (Christie *et al.*, 2012).

In dieser Arbeit wurden bislang verwendete Methoden zur Charakterisierung dieser FbFPs weiterentwickelt und neue Methoden etabliert. Um neue FbFPs mit unterschiedlichen Eigenschaften hervorzubringen, wurden mehreren FbFPs durch Mutagenese verändert. Dabei konnten neue, verbesserte Varianten von Pp2FbFP, EcFbFP und YNP3FbFP erzeugt werden, die sich durch verbesserte Helligkeit und zum Teil durch spektrale Verschiebungen auszeichnen. Die Erzeugung von Farbvarianten wie bei GFP war bislang nicht möglich. Daher wurde in einem alternativen Ansatz nach FbFPs gesucht, die ein Chromophor mit einem rotverschobenen Spektrum binden können.

Um thermostabile FbFPs zu entwickeln, wurden LOV-Domänen aus thermophilen Organismen benutzt, da es als wahrscheinlich angesehen wurde, dass sie von sich aus eine höhere Thermostabilität besitzen, als LOV Domänen aus mesophilen Organismen.

## 4.1 Die photophysikalischen Eigenschaften von FbFPs

Um Fluoreszenzproteine effektiv einsetzen zu können und das für die jeweilige Anwendung am besten geeignete Protein auswählen zu können, sind detaillierte und vergleichbare Informationen über die Eigenschaften der zur Verfügung stehenden Proteine essentiell. Neben den spektralen Eigenschaften stellen dabei die Quantenausbeute, der Extinktionskoeffizient und die Photostabilität die wichtigsten Daten dar. Die bisher veröffentlichten Daten zu FbFPs wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen mit teilweise unterschiedlichen Methoden und Instrumenten bestimmt. Außerdem liegen nicht zu allen bislang beschriebenen FbFPs alle oben genannten Daten vor (vgl. Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012; Drepper *et al.*, 2007). Es war daher eines der Ziele dieser Arbeit eine vollständige Liste aller oben genannten photophysikalischen Eigenschaften der FbFPs zu erstellen. Dazu wurden auch zuvor verwendete Methoden überarbeitet und neue Methoden etabliert (siehe 3.1 und auch Wingen *et al.*, 2014). Insbesondere wurde eine Methode entwickelt, um den Extinktionskoeffizienten der FbFPs zu bestimmen (2.14.5 und 3.1.2). Außerdem wurde zur Messung der Quantenausbeute der FbFPs erstmals eine Integrationssphäre benutzt, um die Quantenausbeute auf absolute Weise zu bestimmen (2.14.6 und 3.1.1).

Diese Daten erlauben den direkten Vergleich verschiedener FbFPs und stellen ebenfalls eine gute Basis für die Entwicklung weiterer FbFPs dar. Die *in vitro* bestimmten Eigenschaften aller in Kapitel 3 aufgeführten FbFPs, sowie deren durch Mutagenese erzeugten Varianten, sind zur Übersicht in Tabelle 4.1 noch einmal zusammengefasst. Die Diskussion und Interpretation dieser Daten erfolgt entsprechend der jeweiligen Eigenschaft in den folgenden Unterkapiteln.

**Tab. 4.1: Übersicht der *in vitro* bestimmten Eigenschaften von FbFPs und Flavinen**

Die Werte werden in den Kapiteln 4.1.1 – 4.1.5 diskutiert. Die angegebenen Werte für den Extinktionskoeffizienten, die Quantenausbeute und die Bleaching-Halbzeit sind jeweils Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der Standardabweichung. n.b.: nicht bestimmt. Referenzen: a: (Whitby, 1953), b: (Otto *et al.*, 1981), c: (Christie *et al.*, 2012).

Bezeichnung	Mutationen	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-halbzeit [min]	Schmelztemperatur [°C]
BsFbFP	-	449	495	13.900 $\pm$ 400	0,39 $\pm$ 0,01	112	1,97 $\pm$ 0,05	n.b.
EcFbFP	-	448	496	14.500 $\pm$ 200	0,44 $\pm$ 0,01	66	2,81 $\pm$ 0,1	59 $\pm$ 0,6
EcFbFP Q123T	Q123T	440	484	14.800 $\pm$ 200	0,44 $\pm$ 0,01	29	0,15 $\pm$ 0,02	n.b.
EcFbFP epA5	D98A D190V K128E E133G K134E	450	496	15.100 $\pm$ 200	0,40 $\pm$ 0,01	74	1,84 $\pm$ 0,15	n.b.
EcFbFP epF1	D8G L20P N84S	447	496	15.400 $\pm$ 500	0,39 $\pm$ 0,01	76	1,54 $\pm$ 0,06	n.b.
EcFbFP epG1	W103N	449	495	15.400 $\pm$ 500	0,40 $\pm$ 0,03	71	0,93 $\pm$ 0,19	n.b.
EcFbFP epH4	E35G	450	496	16.100 $\pm$ 200	0,40 $\pm$ 0,03	74	2,48 $\pm$ 0,22	n.b.
EcFbFP SatA6	G26S	449	496	14.100 $\pm$ 800	0,37 $\pm$ 0,01	36	1,82 $\pm$ 0,27	n.b.
EcFbFP SatB8	I78C	450	495	15.300 $\pm$ 600	0,34 $\pm$ 0,01	44	2,03 $\pm$ 0,16	n.b.
Pp1FbFP	-	450	496	13.900 $\pm$ 500	0,27 $\pm$ 0,01	41	6,75 $\pm$ 0,83	n.b.
Pp1FbFP RoFMN	-	507	540	44.600 $\pm$ 4000	0,20 $\pm$ 0,01	27	n.b.	n.b.
Pp2FbFP	-	449	495	14.200 $\pm$ 100	0,22 $\pm$ 0,01	36	2,68 $\pm$ 0,19	58
Pp2FbFP Y112L	Y112L	449	495	14.000 $\pm$ 100	0,3 $\pm$ 0,01	17	1,52 $\pm$ 0,09	n.b.
Pp2FbFP Q116V	Q116V	439	485	15.100 $\pm$ 300	0,26 $\pm$ 0,01	16	1,17 $\pm$ 0,04	n.b.
Pp3FbFP	-	450	495	14.900 $\pm$ 100	0,27 $\pm$ 0,01	31	3,24 $\pm$ 0,31	n.b.

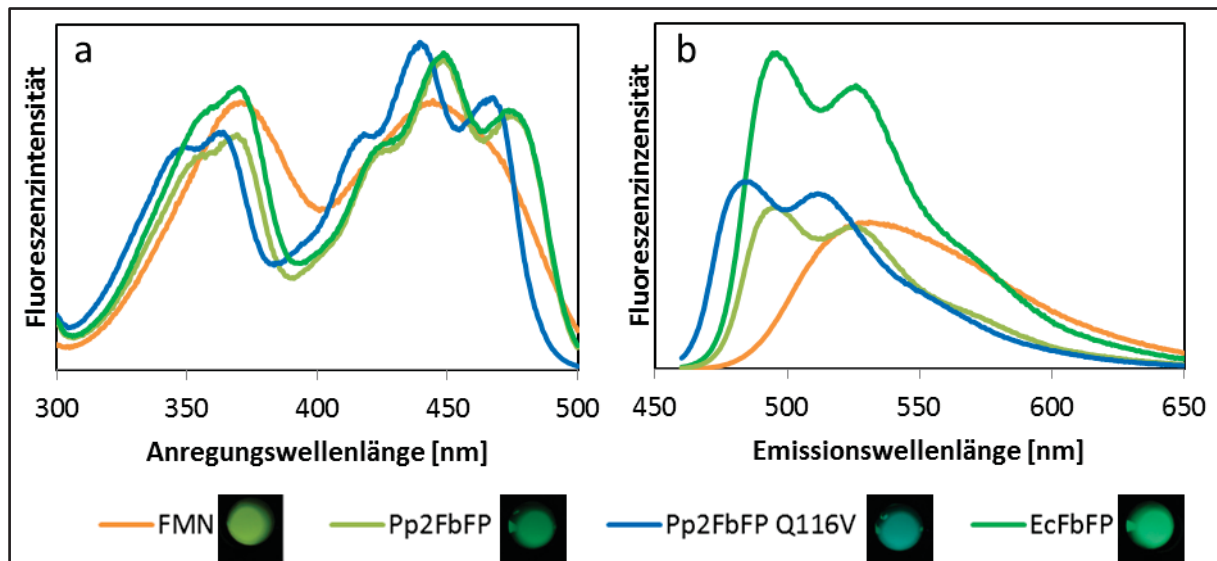
Tab 4.1: Fortsetzung der Zusammenfassung der *in vitro* bestimmten Eigenschaften von FbFPs und Flavinen

Bezeichnung	Mutationen	Anregung $\lambda_{max}$ [nm]	Emission $\lambda_{max}$ [nm]	Extinktionskoeffizient [ $M^{-1}cm^{-1}$ ]	Quantenausbeute ( $\Phi_F$ )	Cofaktorbeladung [%]	Bleaching-Halbzeit [min]	Schmelztemperatur [°C]
Pp4FbFP	-	450	495	13.700 $\pm$ 200	0,19 $\pm$ 0,02	20	4,07 $\pm$ 0,8	n.b.
phiLOV2.1 <sup>c</sup>	-	450	497	n.b.	0,20 $\pm$ 0,01	52	12,97 $\pm$ 0,74	n.b.
MrFbFP	-	448	498	15.200 $\pm$ 500	0,22 $\pm$ 0,01	33	55,7 $\pm$ 2,3	77 $\pm$ 0,4
MtFbFP*	-	449	498	n.b.	0,25 $\pm$ 0,01	53*	29,6 $\pm$ 4,7	78 $\pm$ 0,2
TeFbFP	-	445	494	n.b.	0,13 $\pm$ 0,01	69*	4,1 $\pm$ 0,2	73 $\pm$ 3,1
YNP1FbFP	-	446	496	13.300 $\pm$ 400	0,31 $\pm$ 0,01	67	2,6 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 0,6
YNP2FbFP	-	449	497	n.b.	0,33 $\pm$ 0,01	64*	1,0 $\pm$ 0,3	66 $\pm$ 0,6
YNP3FbFP	-	449	498	14.200 $\pm$ 300	0,20 $\pm$ 0,02	28	7,2 $\pm$ 0,9	76 $\pm$ 1,7
YNP3FbFP Y116F	Y116F	449	498	13.800 $\pm$ 100	0,26 $\pm$ 0,01	28	5,4 $\pm$ 0,5	75 $\pm$ 1,3
YNP4FbFP	-	446	496	14.300 $\pm$ 200	0,33 $\pm$ 0,01	69	4,0 $\pm$ 0,4	58 $\pm$ 0,2
Riboflavin	-	444	531	12.000 $\pm$ 500	0,247 $\pm$ 0,0074	-	0,219 $\pm$ 0,02	-
FMN	-	444	531	12.200 <sup>a</sup>	0,246 $\pm$ 0,0024	-	0,325 $\pm$ 0,04	-
FAD	-	444	531	10.900 $\pm$ 400	0,032 $\pm$ 0,0004	-	n.b.	-
Roseoflavin		505	540	31.000 <sup>b</sup>	< 0,01	-	n.b.	-

\* siehe S. 92

#### 4.1.1 Die spektralen Eigenschaften der FbFPs

Die spektralen Eigenschaften der FbFPs werden maßgeblich durch das als Chromophor gebundene FMN bestimmt. Unterschiede des Anregungs- und Emissionsspektrum können sich durch die chemische Umgebung des Chromophors innerhalb der Bindedomäne des Proteins ergeben. Diese Unterschiede sind in Abb. 4.1 dargestellt.



**Abb. 4.1 Spektrale Unterschiede von FbFPs und freiem FMN.** a) Anregungsspektren von gereinigten FbFPs und FMN. Gemessen wurde die Fluoreszenzemission bei  $\lambda = 520$  nm und alle Werte wurden auf den Extinktionskoeffizienten des Proteins oder von FMN normiert. b) Fluoreszenzemissionsspektren von FbFPs und FMN. Alle Spektren wurden auf eine Absorption von 0,1 bei  $\lambda = 450$  nm eingestellt, so dass das Integral der Spektren proportional zur Quantenausbeute ist. Die spektralen Eigenschaften aller hier untersuchten FbFPs sind sehr ähnlich. Eine Verschiebung von 10 nm im Anregungs- und Emissionsspektrum konnte bei mehreren gezielt erzeugten Mutanten beobachtet werden, von denen Pp2FbFP Q116V hier exemplarisch dargestellt ist. In der Legende ist jeweils eine visuelle Repräsentation von FMN bzw. dem gereinigten Protein unter UV-Licht ( $\lambda = 365$  nm) gezeigt.

Im Anregungsspektrum entstehen dadurch neben dem Anregungsmaximum bei ca.  $\lambda = 450$  nm zwei Schultern bei ca.  $\lambda = 425$  und  $475$  nm. Im Emissionsspektrum ergibt sich ein Maximum bei ca.  $\lambda = 495$  nm und eine Schulter um  $\lambda = 525$  nm. Diese Eigenschaften sind typisch für alle bislang beschriebenen FbFPs (Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012; Drepper *et al.*, 2007). In Kapitel 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass der Austausch eines konservierten Glutamins in Pp2FbFP (Q116) und EcFbFP (Q123) gegen ein Leucin, Valin, Isoleucin oder auch Threonin zu einer spektralen Verschiebung von ca. 10 nm führt. Dieser Unterschied genügt, um die Varianten *in vitro* und auch *in vivo* visuell von den jeweiligen Ausgangsproteinen zu unterscheiden. Eine klare Unterscheidung der Varianten durch

Fluoreszenzfilter ist aufgrund der spektralen Überlappung allerdings nicht möglich. Die Erzeugung dieser Varianten geht auf die ursprünglich mittels epPCR erzeugte Variante Pp2FbFP-10 (vgl. Tab. 3.2) zurück, die neben der Q116L Mutation noch vier weitere Mutationen aufwies. Analog dazu wurde auch BFP, eine der ersten Farbvarianten von GFP, mittels epPCR erzeugt und enthielt ursprünglich fünf Mutationen, von denen sich in der weiteren Analyse nur eine als essentiell für die spektrale Verschiebung herausstellte (Heim *et al.*, 1994). Spektrale Verschiebungen von mehr als 10 nm sind bei FbFPs bislang nicht beschrieben worden.

#### 4.1.2 Der Extinktionskoeffizient der FbFPs

Für die Helligkeit sind der Extinktionskoeffizient und die Quantenausbeute von zentraler Bedeutung. Sie bestimmen, wieviel des eingestrahlten Lichts absorbiert und wieder als Fluoreszenz emittiert wird. In früheren Studien wurde für den Extinktionskoeffizienten der FbFPs und LOV-Domänen der Wert von freiem FMN angenommen (vgl. z.B. Drepper *et al.*, 2007; Losi *et al.*, 2002), da keine Methode zu dessen Berechnung zur Verfügung stand. Eine solche Methode wurde in dieser Arbeit entwickelt und ist in 2.14.5 ausführlich beschrieben. Die Methode beruht auf dem Vergleich der Absorption des Chromophors in gebundenem und ungebundenem Zustand, wobei die Freisetzung durch eine thermische Denaturierung des Proteins direkt im Photometer erfolgt.

Die Extinktionskoeffizienten aller hier charakterisierten FbFPs sind sehr ähnlich und liegen im Bereich zwischen 13.200 und 16.100  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , mit einem Mittelwert von ca. 14.200  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Im Vergleich dazu ist der Extinktionskoeffizient von freiem FMN mit 12.200  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Whitby, 1953) etwa 15 % niedriger. Die hier angegebenen Extinktionskoeffizienten beziehen sich immer auf die Wellenlänge des Anregungsmaximums. Dies liegt in der Regel bei  $\lambda = 450 \text{ nm}$ , bei den beiden Varianten EcFbFP Q123T und Pp2FbFP Q116V hingegen bei  $\lambda = 440 \text{ nm}$ .

Die Erzeugung einer Variante mit deutlich höherem Extinktionskoeffizienten erscheint, in Anbetracht der geringen Variabilität in den bekannten Varianten, wenig wahrscheinlich. Bei GFP-Derivaten gibt es beträchtliche Unterschiede der Extinktionskoeffizienten. Die beschriebenen Extinktionskoeffizienten liegen hier beispielsweise bei ECFP („*enhanced cyan fluorescent protein*“) bei 26.000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  und bei EYFP („*enhanced yellow fluorescent protein*“) bei 84.000  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Patterson *et al.*, 2001). Diese Unterschiede sind allerdings auch



auf direkte Änderungen im Chromophor, bzw. Austausch der Aminosäuren die den Chromophor bilden, zurückzuführen. Ein Austausch des Chromophors in Pp1FbFP von FMN zu RoFMN führte wie in 3.3.2 beschrieben zu einer ähnlich drastischen Erhöhung des Extinktionskoeffizienten um etwa den Faktor 3, was auch ungefähr der Relation von ECFP und EYFP entspricht. Dies stellt bei FbFPs jedoch einen Sonderfall dar.

#### 4.1.3 Die Quantenausbeute der FbFPs

In bisherigen Arbeiten wurde FMN als Referenzsubstanz für die relative Bestimmung der Quantenausbeute von FbFPs benutzt (Chapman *et al.*, 2008; Drepper *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde allerdings ermittelt, dass die Verwendung von FMN als Referenzsubstanz aufgrund seines sehr breiten Emissionsspektrums zu falschen Werten führen kann (siehe 3.1.1). Es wurde daher nach Alternativen gesucht um die Quantenausbeute der FbFPs zu bestimmen. Mit Hilfe einer Integrationskugel in einem geeigneten Fluoreszenzspektrometer lässt sich sowohl das Integral der Fluoreszenzemission als auch der Absorption einer Probe messen (Wurth *et al.*, 2010). Der Quotient aus dem Integral der Fluoreszenzemission und der Absorption stellt die Quantenausbeute dar, weshalb bei dieser Methode keine Referenzsubstanz benötigt wird. Die Präzision der Messungen mit der Integrationskugel wurde anhand von drei Referenzsubstanzen bestätigt (siehe 3.1.1).

Bei der Quantenausbeute der verschiedenen FbFPs gibt es im Gegensatz zum Extinktionskoeffizienten deutliche Unterschiede. Die Spanne der hier gemessenen Quantenausbeuten reicht dabei von  $\Phi_F = 0,13$  (TeFbFP) bis 0,44 (EcFbFP), wobei die meisten Werte zwischen 0,2 und 0,4 liegen (vgl. Tab. 4.1). Für Pp2FbFP wurde mit Hilfe der Integrationskugel ein Wert von  $\Phi_F = 0,22$  gemessen (Literaturwert: 0,17; Drepper *et al.*, 2007), was einem relativen Unterschied von ca. 30 % entspricht. Für EcFbFP lag diese Differenz hingegen mit ca. 13 % deutlich niedriger (gemessene  $\Phi_F = 0,44$ ; Literaturwert aus Drepper *et al.*, 2007: 0,39). Ein einfacher Korrekturfaktor zur Umrechnung zwischen den beiden Methoden lässt sich daher nicht berechnen.

Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass sich die Quantenausbeute von FMN ( $\Phi_F = 0,25$  in wässriger Lösung) durch die Proteinumgebung wesentlich stärker modifizieren lässt als der Extinktionskoeffizient. In Pp2- und YNP3FbFP konnte dabei mit dem Austausch eines

einzelnen Tyrosins im Zentrum des Proteins eine relative Steigerung der Quantenausbeute von etwa 30% erreicht werden (vgl. Tab. 4.1).

Bei der Mutagenese von EcFbFP wurde explizit nach helleren Varianten gesucht. Dabei wurden im *Screening* mehrere Varianten identifiziert, die eine erhöhte *in vivo* Fluoreszenz aufwiesen. Die Quantenausbeuten dieser Varianten (vgl. Tab. 4.1) lagen allerdings ebenfalls bei etwa  $\Phi_F = 0,4$ . Analog hierzu wurde die Quantenausbeute von iLOV, einem LOV-basierten Fluoreszenzprotein aus *Arabidopsis thaliana*, das bereits durch mehrere Runden gerichteter Evolution verbessert wurde, ebenfalls mit  $\Phi_F = 0,44$  angegeben (Chapman *et al.*, 2008). Ob damit bereits die obere Grenze für FbFPs erreicht ist, lässt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Bei dem hier in Kapitel 3.2 verwendeten Ansatz, die Aminosäuren in der direkten Umgebung des Chromophors mittels Sättigungsmutagenese auszutauschen, wurden jedoch keine Varianten mit einer erhöhten Quantenausbeute gefunden. Es ist theoretisch möglich, dass Austausche weiter weg vom Chromophor strukturelle Änderungen mit sich bringen, die zu einer höheren Quantenausbeute führen würden. Hierfür wären weitere Zufallsmutagenesen erforderlich. Zudem ist es auch möglich, dass bei den Mutagenesen Varianten mit einer höheren Quantenausbeute entstanden sind, allerdings im *Screening* nicht erkannt wurden, da sie andere Eigenschaften aufweisen, die die *in vivo* Fluoreszenz negativ beeinflussen (z.B. eine schlechtere Cofaktorbeladung oder eine verminderte Proteinakkumulation). Ein direktes *Screening* auf die Quantenausbeute ist nicht möglich, da *in vivo* nur die Summe aller Helligkeitsbestimmenden Eigenschaften quantifiziert werden kann.

#### 4.1.4 Die Cofaktorbeladung der FbFPs

Die Cofaktorbeladung stellt bei FbFPs einen weiteren Helligkeitsbeeinflussenden Faktor dar, der aber möglicherweise einer gewissen Variabilität in Abhängigkeit der Expressionsbedingungen unterliegen kann. Unter identischen Expressions- und Reinigungsbedingungen kann man jedoch davon ausgehen, dass sie ein Maß für die Affinität des Proteins zum Cofaktor darstellt. Das einzige FbFP, für das in dieser Arbeit eine vollständige Beladung errechnet wurde, ist BsFbFP, das im Gegensatz zu dem daraus entwickelten EcFbFP, noch die Effektor-domäne des ursprünglichen LOV-Proteins enthält. Hierfür wurde eine Beladung von  $112 \pm 6 \%$  berechnet, was auch bereits zeigt, dass bei der

Berechnungsmethode (siehe 2.14.6) mit einem Fehler von über 10 % gerechnet werden muss. Dieser Fehler setzt sich aus den (technisch nicht vermeidbaren) Abweichungen in der Bestimmung der Cofaktor- und der Proteinkonzentration zusammen.

Ausgehend von der Information, dass BsFbFP bei den hier verwendeten Expressionsbedingungen (2.11.2) vollständig beladen vorliegt, kann geschlussfolgert werden, dass der verwendete *E. coli* Stamm BL21(DE3) in der Lage ist, genügend FMN zu synthetisieren, um FbFPs auch bei einer solchen Überexpression des Proteins vollständig zu beladen, und keinen limitierenden Faktor darstellt. Dabei muss die Zelle ein vielfaches der physiologisch typischen Flavinmenge synthetisieren, was wiederum die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich bei der Flavinsynthese in *E. coli* um einen autoregulatorischen Prozess handelt und die Konzentration an freiem Flavin in der Zelle entsprechend konstant gehalten wird. Von der *Riboflavin Kinase* und der *FAD Diphosphatase* wird angenommen, dass sie die intrazelluläre Konzentration von Flavinen regulieren (Powers, 2003). Außerdem ist z.B. von der *Riboflavin Synthase* aus *A. thaliana* bekannt, dass sie das Produkt mit einer relativ hohen Affinität ( $K_d = 1,1 \mu\text{M}$ ) bindet und dadurch produktinhibiert wird (Fischer *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Regulationsmechanismen sollte auch das Expressionslevel, bzw. der Anteil an korrekt gefaltetem Protein in der Zelle einen untergeordneten Einfluss auf die Cofaktorbeladung spielen. Das allgemeine Nährstoffangebot und die Stoffwechselrate der Zelle können natürlich einen Einfluss auf die Effizienz der Flavinsynthese haben, so dass die Cofaktorbeladung nur unter identischen Expressionsbedingungen vergleichbar ist. Vor der Bestimmung der Cofaktorbeladung liegt zudem die Reinigung des Proteins, die ebenfalls einen Einfluss auf die ermittelte Cofaktorbeladung haben kann. Bei der Bindung des Cofaktors handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, deren Gleichgewicht weit auf der Seite des gebundenen Cofaktors liegt. Unterschiede in der Reinigung des Proteins, die in diesem Fall mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt wurde, könnten beispielsweise durch signifikante Unterschiede in der Länge des Waschschrilles dazu führen, dass sich die ermittelte Cofaktorbeladung ändert. Diese Bedingungen wurden daher für alle FbFPs konstant gehalten.

YNP1-, YNP2-, YNP4-, Te-, sowie EcFbFP und dessen Varianten epA5, epF1, epG1 und epH4 sind zu ca. 2/3 beladen, so dass nicht von einer optimalen, aber einer hohen Affinität dieser Proteine zu dem Cofaktor ausgegangen werden kann. Bei Pp2-, Mr-, YNP3- und EcFbFP Q123T liegt hingegen nur etwa 1/3 des Proteins in beladener Form vor, was auf eine

geringere Affinität schließen lässt. Die schlechtesten Beladungen weisen die beiden Pp2FbFP-Varianten Y112L und Q116V mit jeweils unter 20 % auf.

In früheren Arbeiten wurde eine einfache UV/VIS Ratio der Absorption bei  $\lambda = 272$  und  $447$  nm gebildet um Rückschlüsse auf die Cofaktorbeladung zu ziehen (Drepper *et al.*, 2007; Losi *et al.*, 2005), wobei eine Ratio von 4,2 für YtvA bzw. BsFbFP ermittelt und als vollständig beladen angesehen wurde (dabei gilt: Je kleiner die Ratio, desto höher die Cofaktorbeladung). Für das hier als vollständig beladen charakterisierte BsFbFP ergibt sich nach den Daten aus dieser Arbeit eine Ratio zwischen  $\lambda = 280$  nm und  $450$  nm von 2,6. Diese zuvor in der Literatur beschriebene Methode führte damit offensichtlich nicht zu einer korrekten Einschätzung der Beladung und erlaubte zudem nicht den Vergleich verschiedener Proteine, da die Absorption der Apoproteine je nach Anzahl der aromatischen Aminosäuren erhebliche Unterschiede aufweisen kann.

Um die Affinität der FbFPs für Flavine noch besser zu charakterisieren, ist es möglich die Bindungskonstanten der Proteine für die einzelnen Cofaktoren (Riboflavin, FMN und FAD) mittels isothermaler Titrationscalorimetrie zu bestimmen (Perozzo *et al.*, 2004). Bei diesem *in vitro* Experiment werden Temperaturänderungen der Messzelle mit der Proteinprobe bei Zugabe kleiner Mengen des Chromophors in Relation zu einer Referenzzelle gemessen. Diese Temperaturänderungen sind proportional zu der Menge des Cofaktors, der bei dem jeweiligen Titrationsschritt gebunden wird. Mit dieser Methode kann jeglicher Einfluss der Expressionsbedingungen auf die Affinität eines FbFPs zu einem Chromophor ausgeschlossen werden. In Kooperation mit Dr. Bernd König vom ICS-6 im Forschungszentrum Jülich, wurden hierzu bereits vorläufige Tests mit partiell beladenem Protein durchgeführt, die zeigen, dass diese Methode für die Bestimmung der Bindungskonstanten der FbFPs grundsätzlich geeignet ist. Um korrekte Werte zu erhalten, müssen die Messungen in zukünftigen Arbeiten mit komplett unbeladenem Protein durchgeführt werden.

#### **4.1.5 Die Photostabilität der FbFPs**

Die Photostabilität eines Fluoreszenzproteins ist von zentraler Bedeutung bei bildgebenden Analysen wie der Fluoreszenzmikroskopie. Dabei werden die Proteine oftmals mit einer hohen Lichtintensität angeregt, um ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Um eine qualitativ hochwertige Aufnahme zu gewährleisten, sollte die Fluoreszenzintensität

---

der Reporterproteine während der Aufnahme der Bilder, oder auch eines Films, möglichst konstant bleiben. Für alle FbFPs wurden daher *in vitro* Tests durchgeführt, um die Stabilität der Fluoreszenzemission bei andauernder Bestrahlung mit Starklicht zu messen.

Riboflavin und seine Derivate selbst sind extrem lichtempfindlich und bleichen innerhalb kurzer Zeit (ca. 20s) aus, so dass keine Fluoreszenzemission mehr detektierbar ist. Freies FMN wird dabei unter Abspaltung der Ribitylkette zu Lumichrom degradiert (Treadwell & Metzler, 1972). Ob dieser Prozess auch in gebundenem Zustand in den FbFPs abläuft, ist bislang nicht bekannt. In FbFPs ist sowohl der Isoalloxazinring, als auch die Ribitylkette über mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein verbunden. Dies könnte theoretisch auch einen stabilisierenden Effekt auf das FMN haben, der eine solche Abspaltung energetisch ungünstig macht. Aus Untersuchung an der LOV2-Domäne mit der C450A Mutation (Unterbrechung des Photozykluses wie bei FbFPs) von Phototropin aus *Avena sativa* geht hervor, dass bei Bestrahlung mit Blaulicht ein reduziertes Flavin-Semichinon-Radikal entsteht (Kay *et al.*, 2003). Für dieses Semichinon wurde von Kay *et al.* eine deutliche Verringerung der Absorption im blauen Spektralbereich beschrieben, allerdings wurden über die Fluoreszenzeigenschaften keine Angaben gemacht. Es ist theoretisch möglich, dass die Ausbildung des Radikals aufgrund der Veränderung im  $\pi$ -Elektronensystem des Chromophors bereits zu einem Verlust der Fluoreszenz führt. Es ist auch möglich, dass dieses Radikal mit benachbarten Aminosäuren reagiert und erst das dabei entstehende Produkt nicht mehr fluoreszenzaktiv ist.

Für iLOV und phiLOV2.1 wurde das Photobleaching bislang ausschließlich *in vivo* beschrieben, wobei festgestellt wurde, dass es in beiden Fällen vollständig reversibel ist (Chapman *et al.*, 2008; Christie *et al.*, 2012). Für EcFbFP und EcFbFP Q123T wurden in dieser Arbeit analoge Versuche auf Agarplatten durchgeführt, die zeigen, dass das Photobleaching auch bei diesen Proteinen *in vivo* vollständig reversibel ist. Dabei korreliert die Zeit zum Ausbleichen mit der Zeit zur Wiederherstellung der Fluoreszenz (siehe Abb. 8.2 im Anhang). Das Photobleaching der gereinigten Proteine hingegen ist irreversibel. Welche zellulären Faktoren bzw. Komponenten für die Wiederherstellung der Fluoreszenz verantwortlich sind ist bislang nicht bekannt.

Als Kenngröße um die Stabilität zu beschreiben, wird bei Fluoreszenzproteinen die Zeit angegeben, nach der die Fluoreszenz auf 50 % des Ausgangswertes gefallen ist. Diese Bleaching-Halbzeit ( $t_{b1/2}$ ) ist bei den meisten FbFPs um ein vielfaches höher als bei freien

Flavinen. Die EcFbFP Q123T Variante ( $t_{\text{bl}/2} = 0,15$  min.) ist die einzige bislang bekannte Variante, bei der die Photostabilität niedriger ist, als bei freiem FMN ( $t_{\text{bl}/2} = 0,325$  min.). Bei der Ausgangsvariante EcFbFP liegt sie mit  $t_{\text{bl}/2} = 2,81$  min. fast 20mal so hoch, was deutlich macht, wie sensitiv diese Eigenschaft gegenüber Änderungen in der chemischen Umgebung des Chromophors ist. Die Mutationen Y112L und Q116V verursachen in Pp2FbFP ebenfalls etwa eine Halbierung der Bleaching-Halbzeit. Von den bislang publizierten FbFPs besitzt das aus iLOV gezielt auf Photostabilität hin evolvierte phiLOV2.1 (Christie *et al.*, 2012), mit einer hier gemessenen  $t_{\text{bl}/2} = 12,97$  min. die höchste Photostabilität.

In dieser Arbeit wurden zwei neue FbFPs identifiziert, die eine noch wesentlich höhere Photostabilität aufweisen. Diese beiden FbFPs – Mt- und MrFbFP – wurden im Rahmen der Suche nach thermostabilen Fluoreszenzreportern identifiziert und zeichnen sich sowohl durch eine hohe Thermostabilität, als auch durch eine sehr hohe Photostabilität aus. MtFbFP\* weist dabei eine Bleaching-Halbzeit von  $t_{\text{bl}/2} = 29,6$  min. auf. Bei MrFbFP liegt der Wert mit  $t_{\text{bl}/2} = 55,7$  min. nochmal etwa doppelt so hoch. Damit ist MrFbFP etwa viermal so stabil wie phiLOV2.1 und 20mal so stabil wie EcFbFP. Gegenüber freiem FMN wird die Bleaching-Halbzeit dabei um über 17.000 % erhöht. Diese beiden Varianten sollten sich für bildgebende Messungen, bei denen die Proben über eine längere Zeit hinweg intensiv belichtet werden, besser eignen als bislang etablierte FbFPs.

Die mittlere Bleaching-Halbzeit aller in Tab. 4.1 aufgeführten FbFPs liegt bei  $6,56 \pm 12,07$  min, wobei die meisten Proteine wesentlich schneller ausbleichen und die extrem hohe Standardabweichung dieses Wertes hauptsächlich durch Mt- und MrFbFP verursacht wird. Ohne Mt- und MrFbFP ergibt sich ein Durchschnittswert von  $3,29 \pm 2,83$  min, der die Bleaching-Halbzeit der übrigen FbFPs wesentlich genauer beschreibt und gleichzeitig auch die starke Varianz der Photostabilität widerspiegelt.

Ein Vergleich der Bleaching-Halbzeit mit publizierten Daten anderer Fluoreszenzproteine ist nicht möglich, da die Werte nur vergleichbar sind, wenn sie unter identischen Belichtungsbedingungen aufgenommen werden. Um zukünftig einen Vergleich der Photostabilität von FbFPs, auch unter verschiedenen Belichtungsbedingungen zu ermöglichen, wurde in dieser Arbeit auch die Bleaching-Halbzeit von FMN ( $t_{\text{bl}/2} = 0,325$  min.) bestimmt und angegeben. Dieser Wert kann dann als Referenz verwendet werden, um den prozentualen Unterschied der FbFPs zu dieser Substanz zu vergleichen.

\* siehe S. 92

## 4.2 RoFMN bindende Fluoreszenzproteine

Die Fluoreszenzproteine der GFP-Familie umfassen zahlreiche Farbvarianten, die den gesamten Bereich des sichtbaren Lichts abdecken (Tsien, 2009). Mit diesen Varianten können mehrere verschiedene zelluläre Proteine auf einmal fusioniert und dann im Mikroskop, durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfilter, unterschieden werden. Dies ermöglicht es, die Lokalisation, Dynamik und Interaktion mehrerer verschiedener Proteine innerhalb einer Zelle gleichzeitig zu verfolgen. Mit FbFPs ist dies bislang nicht möglich. Mit den beiden Varianten Pp2FbFP Q116V und EcFbFP Q123T konnten zwei Varianten erzeugt werden, deren Anregungs- und Emissionsspektrum um jeweils 10 zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben ist. Allerdings ist die spektrale Überlappung so groß, dass eine Unterscheidung mittels Fluoreszenzfilter nicht möglich ist (vgl. Abb. 4.1). Die ersten GFP-Farbvarianten entstanden durch Mutationen der Aminosäuren, die den Chromophor bilden (Cubitt *et al.*, 1995; Heim *et al.*, 1994). Da FbFPs einen externen Cofaktor als Chromophor binden, ist diese Vorgehensweise bei FbFPs nicht möglich. Es wurde allerdings bereits in der Literatur beschrieben, dass es Flavin-bindende Proteine der BLUF- („blue-light sensors using FAD“) und LOV-Familie gibt, die in der Lage sind statt ihrem natürlichen Cofaktor auch Roseoflavin zu binden (Mathes *et al.*, 2009). Bei Roseoflavin handelt es sich dabei um ein Flavinanalogon, das von dem Bakterium *Streptomyces davawensis* synthetisiert wird und sich strukturell nur durch den Austausch einer Methylgruppe am C8-Atom des Isoalloxazinrings gegen eine Dimethylamino-Gruppe unterscheidet (siehe Abb. 3.12). Durch diesen Austausch kommt es zu einer signifikanten Verschiebung des Absorptionsspektrums in den roten Spektralbereich (siehe Abb. 3.13). In dieser Arbeit wurden 28 FbFP-Varianten auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Roseoflavin oder auch RoFMN oder RoFAD zu binden und ein klares Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Dabei wurden insgesamt drei FbFPs identifiziert, die alle aus *P. putida* stammen (siehe Abb. 3.14). Aufgrund der geringen Fluoreszenzintensität von zwei dieser Proteine, wurde nur Pp1FbFP weiter untersucht. Dabei wurde ermittelt, dass Pp1FbFP das Roseoflavinderivat RoFMN bindet, das der verwendete *E. coli* Stamm CmpX131 (Mathes *et al.*, 2009) aus dem im Medium enthaltenen Roseoflavin synthetisieren kann. Das Emissionsspektrum ist *in vivo* deutlich messbar und hat ein Maximum bei  $\lambda = 540$  nm. Das Anregungsmaximum liegt bei  $\lambda = 507$  nm und weist damit ebenfalls eine signifikante Rotverschiebung von 57 nm gegenüber dem natürlichen Cofaktor auf (siehe Abb. 3.18).



Die Quantenausbeute des RoFMN wird bei der Bindung an das Protein (voraussichtlich) deutlich erhöht und wurde in Pp1FbFP mit  $\Phi_F = 0,20$  bestimmt. Während RoFMN nicht kommerziell erhältlich war, um den Wert zu vergleichen, wurde die Quantenausbeute von dem sehr ähnlichen Roseoflavin mit  $\Phi_F < 0,01$  bestimmt. Da sich RoFMN von Roseoflavin, genauso wie FMN von Riboflavin, nur durch den Austausch der Hydroxylgruppe am Ende der Ribitylkette durch eine Phosphatgruppe unterscheidet und Riboflavin und FMN identische Quantenausbeuten besitzen, wird (solange kein reines RoFMN erhältlich ist) angenommen, dass auch die Quantenausbeute von RoFMN kleiner als 0,01 ist.

Eine ebenfalls deutliche Erhöhung bei Bindung an das Protein wurde für den Extinktionskoeffizienten beobachtet. Dieser liegt bei freiem Roseoflavin bei  $31.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Otto *et al.*, 1981) und bei Pp1FbFP-gebundenem RoFMN bei  $44.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Dieser Wert liegt mehr als dreimal so hoch wie bei der Bindung von FMN ( $13.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) und führt zu einer signifikant höheren Helligkeit, die mit einem Wert von 8920 etwa 40 % höher ist als bei dem hellsten FbFP mit FMN als Cofaktor (EcFbFP; Helligkeit: 6380). Insgesamt konnte damit gezeigt werden, dass Änderungen des Chromophors bei FbFPs, ähnlich wie bei GFP, sowohl zu spektralen, als auch zu photophysikalischen Veränderungen des Fluoreszenzproteins führen.

Für die LOV-Domäne von YtvA wurde bereits gezeigt, dass der natürliche Cofaktor *in vitro* durch chemisch modifizierte Flavine ausgetauscht werden kann, was zu Unterschieden im Photozyklus des Proteins führt (Mansurova *et al.*, 2011; Silva-Junior *et al.*, 2013). Dabei wurde von Silva-Junior *et al.* auch gezeigt, dass der Einbau von 1-deaza-FMN in YtvA zu einem rotverschobenen Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei ca.  $\lambda = 530 \text{ nm}$  und einem Fluoreszenzmaximum um  $\lambda = 600 \text{ nm}$  führt, die Quantenausbeute dieser Fluoreszenz allerdings mit  $\Phi_F = 0,008$  extrem niedrig ist und mit einer Messmethode für Fluoreszenzmessungen im pikosekunden-Bereich bestimmt wurde. Bei dem Einbau von 5-deaza-FMN wurde in der gleichen Arbeit nur von dem Photoaddukt ein Emissionsspektrum beschrieben, dessen Maximum bei etwa  $\lambda = 450 \text{ nm}$  liegt und damit eine deutliche Blauverschiebung gegenüber FMN zeigt. Die Quantenausbeute ist dabei mit  $\Phi_F = 0,45$  sehr hoch, was auf die höhere Quantenausbeute von freiem 5-deaza-FMN ( $\Phi_F = 0,52$ ) zurückzuführen ist (Silva-Junior *et al.*, 2013).

Welche Fluoreszenzeigenschaften dieses FMN-Derivat in nicht-kovalent gebundenem Zustand (wie dies in FbFPs der Fall wäre) hat, ist bislang nicht bekannt.



Mathes *et al.* gelang, wie schon beschrieben, der Einbau von RoFMN *in vivo* in Phot-LOV1 aus *C. reinhardtii*, allerdings war dabei kein Fluoreszenzspektrum erkennbar (Mathes *et al.*, 2009), was sich mit den Beobachtungen der meisten hier untersuchten FbFPs deckt. Pp1FbFP mit RoFMN stellt somit das erste FbFP dar, bei dem der Austausch des natürlichen Flavins gegen ein Flavinanalogon zu einem rotverschobenen Fluoreszenzsignal mit einer für Fluoreszenzreporter annehmbaren Quantenausbeute führt.

#### 4.2.1 Limitierungen

Fluoreszenzreporter sollten im Allgemeinen in möglichst vielen Organismen einsetzbar sein, ohne dass dafür Modifikationen an dem jeweiligen Expressionswirt erforderlich sind. Die Bindung von RoFMN als alleinigem Cofaktor von Pp1FbFP war hier *in vivo* möglich, da der verwendete *E. coli* Stamm CmpX131 (Mathes *et al.*, 2009) eine Deletion des *Riboflavin Synthase* Gens *ribC*, aufweist und damit nicht mehr in der Lage ist Riboflavin zu bilden, aus dem auch die Derivate FMN und FAD synthetisiert werden. Zur Anzucht des Stammes muss daher zum einen Riboflavin im Medium vorhanden sein, und zum anderen muss dieses Flavin in die Zelle transportiert werden, was bei CmpX131 über den Flavintransporter RibM aus *C. glutamicum*, dessen Gen in das Genom dieses Stammes integriert wurde, gewährleistet wird. Die Aufnahme von Roseoflavin erfolgte hier nach einem Wechsel des riboflavinhaltigen Mediums gegen roseoflavinhaltiges, zum Zeitpunkt der Induktion der Genexpression von Pp1FbFP. Hierdurch sind nur noch geringe Mengen an nutzbarem Riboflavin im Medium vorhanden, das die Zellen benutzen können um FMN und FAD als Cofaktoren für wichtige Enzyme der Atmungskette zu bilden. RoFMN und RoFAD führen als Cofaktor dieser Enzyme zu einer beträchtlichen Aktivitätsverminderung oder sogar einem Aktivitätsverlust (Grill *et al.*, 2008). Dadurch kann das weitere Wachstum der Zellen stark beeinträchtigt werden. Eine solche Beeinträchtigung ist für Fluoreszenzreporter nicht gewünscht, da die damit gewonnenen Erkenntnisse dann von dem physiologisch normalen Zustand abweichen können.

Während für *E. coli* ein heterologer Flavintransporter nötig ist um Roseoflavin aufzunehmen, besitzen andere Organismen, wie z.B. *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* von sich aus Flavintransporter (Mathes *et al.*, 2009), so dass keine Co-Expression nötig wäre. Würde man allerdings Pp1FbFP in einem solchen

Organismus exprimieren und Roseoflavin im Überschuss ins Medium geben, würde durch die zelleigene Flavinsynthese voraussichtlich immer noch zumindest ein Teil des Proteins mit FMN beladen sein. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, dass während der thermalen Denaturierung des Proteins, im Rahmen der Messung des Extinktionskoeffizienten, eine wesentlich schnellere Herauslösung des Chromophors beobachtet wurde, wenn das Protein mit RoFMN beladen war. Dies deutet auf eine geringere Affinität des Proteins zu RoFMN im Vergleich zu FMN hin. Die etwas geringere gemessene Cofaktorbeladung von 27 % mit RoFMN gegenüber 41 % mit FMN ist ein weiterer Hinweis für diese Annahme. Allgemein ist bei LOV-Domänen davon auszugehen, dass die Affinität zu dem natürlicherweise gebundenen Cofaktor evolutionsbedingt am höchsten ist. Der Einsatz von Pp1FbFP mit RoFMN als Fluoreszenzreporter innerhalb der Zellen ist daher unter normalen Bedingungen nicht möglich.

#### **4.2.2 Mögliche Anwendungen**

Da die Anwendung als Reporter innerhalb der Zelle unter normalen Bedingungen nicht möglich ist, bleibt damit noch die Anwendung als Reporter außerhalb des Zellinneren. Eine mögliche Anwendung ist dabei der Einsatz als Sekretionsmarker. Bakterien exportieren und sekretieren zusammen etwa 20 % der von ihnen synthetisierten Polypeptide, wobei definitionsgemäß exportierte Proteine mit der Zelle verbunden bleiben (an die äußere Zellmembran an- oder in diese eingelagert) und sekretierte Proteine in das umgebende Milieu abgegeben werden (Pugsley, 1993). Es gibt bei Bakterien verschiedene Wege der Sekretion, von denen hier nur der Sec-abhängige Sekretionsweg behandelt wird, über den die meisten Proteine sekretiert und exportiert werden (Pugsley, 1993; Tjalsma *et al.*, 2000). Hierbei ist es wichtig zu wissen, dass die Proteine in ungefaltetem Zustand aus dem Cytoplasma transportiert werden und erst danach ihre native Faltung ausbilden (Tjalsma *et al.*, 2000). Ein großer Teil der sekretierten Proteine sind Hydrolasen, die dem Abbau von Makromolekülen dienen, damit diese als Nährstoffquelle genutzt werden können (Currie *et al.*, 2014; Filloux, 2011).

Auch in der industriellen Biotechnologie ist die Sekretion von Enzymen von großer Bedeutung. Bei der Herstellung von reinen Enzymen entfällt ein Großteil der Produktionskosten auf die Reinigung des jeweiligen Enzyms. Dabei ist es von großem

Kostenvorteil, wenn das zu reinigende Protein im Medium vorliegt (in dem sich verhältnismäßig wenige andere Proteine befinden) und nicht in den Zellen, die große Mengen anderer Proteine, DNA, Lipide und sonstige Zellbestandteile enthalten und zudem zur Gewinnung des Proteins erst aufgeschlossen werden müssen (Schallmeyer *et al.*, 2004). Die heterologe Expression und Sekretion in den verwendeten Produktionsstämmen ist allerdings ein Prozess, der bei vielen Proteinen Probleme birgt (Jaeger & Eggert, 2002).

Die Idee zur Verwendung von Pp1FbFP mit RoFMN als Sekretionsmarker ist dabei die folgende: Pp1FbFP würde an ein Protein fusioniert werden, das über den Sec-Weg sekretiert wird. Die Expression würde in einem Wirt erfolgen, der in der Lage ist Riboflavin zu synthetisieren, aber keinen Flavintransporter besitzt. Proteine, die in der Zelle gefaltet und nicht sekretiert werden, würden das von der Zelle synthetisierte FMN binden und ein Fluoreszenzsignal bei  $\lambda = 495$  nm innerhalb der Zelle erzeugen. Die Proteine, die in ungefaltetem Zustand sekretiert werden, würden nach der korrekten Faltung das dem Medium zugesetzte RoFMN binden und ein entsprechendes Fluoreszenzsignal bei  $\lambda = 540$  nm erzeugen. Erfolgt die Sekretion bei Gram-negativen Bakterien ins Periplasma, sollte man im Mikroskop einen orange-roten Ring um die Zellen erkennen, sowie eine eventuelle grüne Fluoreszenz innerhalb dieses Rings aus dem Zytoplasma (dies gilt unter der Voraussetzung, dass die äußere Membran für RoFMN permeabel ist). Bei Gram-positiven Bakterien würde die Sekretion direkt ins Medium erfolgen. Hier würde das freie RoFMN aufgrund der relativ hohen Konzentration im Vergleich zum Protein zu einer Hintergrundfluoreszenz führen. Ob diese aufgrund der extremen Unterschiede in der Quantenausbeute der freien und der gebundenen Form (voraussichtlich mindestens Faktor 20; bestimmt für Roseoflavin – s.o.) ein Problem für eine Messung darstellen würde, bleibt abzuwarten. Es wäre aber möglich, das freie Protein in der Lösung durch eine einfache Filtration von niedermolekularen Substanzen wie dem RoFMN zu trennen, bevor die Fluoreszenz quantifiziert wird. Das Verhältnis der grünen Fluoreszenz in den Zellen und der orange-roten Fluoreszenz im Periplasma oder im Medium würde dabei ein einfach zu messendes und quantifizierbares Signal zur Beurteilung der Sekretionseffizienz ergeben. Anhand dieses Verhältnisses könnten verschiedene Expressionsparameter oder auch Signalsequenzen zur Sekretion auf einfache Weise verglichen werden, um die Sekretion des Zielproteins zu optimieren, was für die biotechnologische Produktion von Enzymen in großem Maßstab von entscheidender Bedeutung ist.

Die hier genannten Versuche wurden alle mit Roseoflavin durchgeführt, da RoFMN wie bereits erwähnt, kommerziell nicht erhältlich war. Da in der HPLC-Analyse aber nur RoFMN als Cofaktor von Pp1FbFP nachgewiesen werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass Roseoflavin nicht, oder nur deutlich schlechter, von dem Protein gebunden wird. Um Pp1FbFP auf die beschriebene Weise als Sekretionsmarker zu nutzen, müsste zuerst RoFMN synthetisiert werden. Dies ist z.B. durch die enzymatische Phosphorylierung von Roseoflavin zu RoFMN durch die humane Flavokinase möglich und bereits beschrieben (Pedrolli *et al.*, 2011).

#### **4.2.3 Weitere Entwicklungsmöglichkeiten**

Anhand einer komparativen Strukturanalyse von Pp1FbFP wurde ein Methionin im Zentrum des Proteins identifiziert, das bei den 28 hier untersuchten FbFP-Varianten an dieser relativen Position nur in Pp1FbFP vorkommt. Bei den anderen FbFPs befindet sich an dieser Position ein von den chemischen Eigenschaften her konserviertes Leucin, Isoleucin oder Valin. Sowohl bei Pp2- als auch bei EcFbFP konnte durch den Austausch der Aminosäure an dieser Position gegen ein Methionin jeweils eine Variante erzeugt werden, die in der Lage ist, eine Roseoflavin-Spezies zu binden und ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erzeugen. Beide Varianten haben bei Bindung eines Roseoflavins ein Anregungsmaximum bei  $\lambda = 420$  nm und ein Emissionsmaximum bei  $\lambda = 495$  nm. Bei der Bindung des natürlichen Cofaktors hingegen zeigen die beiden Varianten keine spektralen Unterschiede zu anderen FbFPs. Zur weiteren Analyse müssten diese Varianten zuerst gereinigt werden, um anschließend die von den Proteinen gebundene Roseoflavin-Spezies zu identifizieren. Die zentrale Fragestellung dabei ist, ob verschiedene Roseoflavinderivate in FbFPs zu unterschiedlichen spektralen Eigenschaften führen. Bei den natürlichen Flavinen Riboflavin, FMN und FAD ist dies nicht der Fall (Drepper *et al.*, unveröffentlicht).

Die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden Varianten Pp2FbFP I73M und EcFbFP L82M unterscheiden sich von denen von Pp1FbFP so stark, dass eine Unterscheidung der Proteine sowohl im Fluoreszenzphotometer als auch im Mikroskop mit geeigneten Filtern möglich wäre (siehe Abb. 3.20). Bei Sekretionsanalysen könnten somit zwei zu sekretierende Proteine in einem Experiment markiert, und außerhalb des Zytoplasmas quantifiziert werden.

Die sehr gute Überlappung der Emissionsspektren von Pp2FbFP I73M und EcFbFP L82M mit dem Anregungsspektrum von Pp1FbFP sollte theoretisch einen Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) zwischen diesen Proteinen erlauben, wenn sie sich in direkter Nähe zueinander befinden. Darüber könnten auch Interaktionen von Proteinen im Periplasma oder im Medium nachgewiesen werden.

FbFPs wurden auch bereits benutzt, um die Infektion von humanen Zellen mit obligat anaeroben Bakterien zu untersuchen (Choi *et al.*, 2011). Über den eben beschriebenen FRET wäre es theoretisch auch möglich, Rückschlüsse auf die bei der Infektion beteiligten Proteine zu ziehen. Dazu müssten Proteine an der Zelloberfläche der anaeroben Bakterien und entsprechenden Wirtszellen mit den FbFPs fusioniert werden. Ein möglicher Einfluss dieser Fusion auf die Interaktion ist dabei theoretisch nicht auszuschließen und muss im jeweiligen Einzelfall geklärt werden. Ob die FbFPs dabei unterschiedliche oder identische Roseoflavin-Spezies binden, ist nur dann entscheidend, wenn ein FbFP verschiedene Roseoflavine binden kann und dies zu spektralen Unterschieden führt. Dem Medium können theoretisch alle Flavine zugesetzt werden.

Zur Erzeugung weiterer Farbvarianten könnte beispielsweise in EcFbFP die Q123T Mutation, die bei der Bindung von FMN für eine spektrale Verschiebung von 10 nm verantwortlich ist, mit der L82M Mutation kombiniert werden. An der Position dieses konservierten Glutamins befindet sich in Pp1FbFP ein Asparagin (N95), was dem Glutamin sehr ähnlich ist und als funktionell konserviert angesehen werden kann. Analog zu EcFbFP und Pp2FbFP könnte eine entsprechende Farbvariante von Pp1FbFP erzeugt und auf ihre Roseoflavin-bindenden Eigenschaften hin untersucht werden.

Die Untersuchung von FbFPs auf die Bindung eines bestimmten Flavins ist durch die Verwendung des *E. coli* Stammes CmpX131 mit geringem Aufwand möglich. Somit könnten auch weitere Flavinderivate bzw. Analoga, die chemisch synthetisiert werden, auf ihre Eignung als Cofaktor der FbFPs (in Sekretionsanalysen) untersucht werden.

### 4.3 Thermostabile FbFPs aus thermophilen Organismen

FbFPs wurden entwickelt, um das Anwendungsgebiet von Fluoreszenzproteinen auf anaerobe Organismen bzw. Bedingungen zu erweitern und damit eine wichtige Lücke zu schließen. Ein weiteres Gebiet, in dem die Anwendung von Fluoreszenzproteinen schwierig ist, sind thermophile Organismen. Diese leben bei hohen Temperaturen, mit einem Temperaturoptimum oberhalb von 50 °C (Wagner & Wiegel, 2008). Diese Organismen sind für die Biotechnologie interessant, da sie über Enzyme verfügen, die bei diesen hohen Temperaturen aktiv und stabil sind. Diese Enzyme haben ein großes Potenzial als Biokatalysatoren für biotechnologische Prozesse, die bei erhöhten Temperaturen ablaufen. Zu den Vorteilen solcher Anwendungen gehören u.a. die Minimierung von Limitierungen durch Diffusion, vorteilhafte thermodynamische Reaktionsbedingungen für endotherme Reaktionen und ein verringertes Risiko mikrobieller Kontaminationen (insbesondere in der Nahrungsmittel- und Arzneimittelherstellung) (Unsworth *et al.*, 2007). Eine der bekanntesten Anwendungen eines thermostabilen Enzyms ist die Verwendung der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* für die PCR (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988). Die thermophilen Organismen selbst können beispielsweise genetisch so modifiziert werden, dass sie in der Lage sind, aus Pflanzenmaterial (Zellulose) fermentativ den Biokraftstoff Ethanol herzustellen, wobei man sich Produktionsvorteile von der erhöhten Temperatur erhofft (Blumer-Schuetz *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2014).

Es gibt bislang zwei GFP-Derivate, von denen beschrieben ist, dass sie thermostabil genug sind um in Thermophilen angewendet zu werden (Cava *et al.*, 2008; Kiss *et al.*, 2009). Die natürlichen Habitate dieser Organismen weisen neben der hohen Temperatur aber oftmals auch sauerstoffarme oder anaerobe Bedingungen auf (Wagner & Wiegel, 2008), unter denen GFP-Derivate nur eingeschränkt, bzw. nicht nutzbar sind.

Da bislang etablierte FbFPs temperatursensitiv sind, wurden in dieser Arbeit FbFPs aus LOV-Domänen entwickelt, die aus thermophilen Organismen stammen und daher eine intrinsische Thermostabilität aufweisen. Die drei Varianten Mr-, Mt- und YNP3FbFP weisen alle Schmelztemperaturen zwischen 75 und 80 °C auf. Sie sind damit deutlich stabiler als Pp2- und EcFbFP, die eine Schmelztemperatur von knapp unter 60 °C aufweisen (siehe Tab. 4.1). Auch bei einer längeren Inkubation über 24 Stunden bei 60 °C, einer für viele Thermophile typischen Wuchstemperatur (Wagner & Wiegel, 2008), zeigten Mr-, Mt- und YNP3FbFP nur einen geringfügigen Rückgang in der Fluoreszenzintensität von 0,5 bis 1,5 %/h

(siehe Abb. 3.22). Die Proteine behalten dabei ihre spektralen Eigenschaften über die gesamte Dauer der Inkubation. Aus den hier gewonnenen Daten der *in vitro* Charakterisierung kann geschlussfolgert werden, dass diese neu entwickelten FbFPs theoretisch für den Einsatz als Fluoreszenzreporter in thermophilen Organismen geeignet sind. Allerdings muss beachtet werden, dass die Bedingungen *in vitro* und *in vivo* unterschiedlich sind. So ist z.B. die Ionenkonzentration in dem verwendeten Puffer (10 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8) nicht mit der im Zytoplasma vergleichbar, was einen Einfluss (sowohl positiv als auch negativ) auf die Proteinstabilität haben kann.

Testexpressionen dieser FbFPs werden in den thermophilen Modellorganismen *Thermus thermophilus* (in Kooperation mit Dr. Angel Angelov; Technische Universität München) und *Geobacillus thermoglucosidasius* (in Kooperation mit Dr. Kersten Rabe; Karlsruher Institut für Technologie) durchgeführt und dauern zurzeit noch an.

Gegen Ende der Arbeiten an diesem Projekt wurde von Song *et al.* eine Studie zur Verbesserung der Thermostabilität von EcFbFP durch gerichtete Evolution veröffentlicht. Dabei wurden in mehreren Runden gerichteter Evolution 23 Varianten erzeugt, von denen die stabilste mit einer Schmelztemperatur von 74,9 °C angegeben ist (Song *et al.*, 2013).

Dieser Wert kann allerdings nicht direkt mit den hier ermittelten verglichen werden, da die Versuchsbedingungen in der Arbeit von Song *et al.* signifikante Unterschiede zu dieser Arbeit aufweisen. So wurde u.a. keine konstante Heizrate verwendet, sondern eine Inkubation der Proteine bei einer bestimmten Temperatur für mehrere Minuten, in Abständen von mehreren Grad Celsius. Außerdem wurden in dem Artikel keine Angaben zu dem verwendeten Puffer gemacht, in dem die Versuche durchgeführt wurden.

## 5. Zusammenfassung

Über die letzten zwei Jahrzehnte hinweg haben sich Fluoreszenzproteine zu einem Grundpfeiler in der modernen Erforschung biologischer Systeme entwickelt. Sie können verwendet werden, um zum Beispiel Genexpressionen, Proteinlokalisationen oder komplexe zellphysiologische Prozesse zu studieren. Die größte Klasse von Fluoreszenzproteinen bildet die GFP-Familie, deren zahlreiche Varianten von Proteinen aus der Qualle *A. victoria* und verschiedenen *Anthozoa*-Spezies abgeleitet sind. FMN-bindende Fluoreszenzproteine (FbFPs), die vor wenigen Jahren aus blaulichtsensitiven LOV-Domänen, die in Pflanzen und vielen Bakterien bekannt sind, entwickelt wurden, bilden eine weitere Klasse von Fluoreszenzproteinen, die die Sammlung der vorhandenen Fluoreszenzproteine durch ihre Unabhängigkeit von molekularem Sauerstoff komplementiert.

In dieser Arbeit wurden neuartige FbFP Varianten erzeugt und charakterisiert, die neue und einzigartige Eigenschaften aufweisen. Die beiden etablierten Proteine EcFbFP und Pp2FbFP wurden durch Zufalls- und ortsgerichtete Mutagenese verbessert, um Varianten mit erhöhter *in vivo* Fluoreszenz, blauverschobenen Spektren und – im Falle von Pp2FbFP – mit einer erhöhten Fluoreszenz-Quantenausbeute hervorzubringen.

Um FbFPs mit rotverschobenen Emissionsspektren hervorzubringen, wurden alle verfügbaren FbFPs auf die Fähigkeit hin untersucht, das Flavinanalogon Roseoflavin zu binden und ein rotverschobenes Fluoreszenzsignal zu erzeugen. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Pp1FbFP RoFMN effizient binden kann, wodurch ein helles Fluoreszenzsignal mit einem Emissionsmaximum bei  $\lambda = 540$  nm erzeugt wird, was eine signifikante Rotverschiebung verglichen mit FbFPs mit FMN darstellt. Die Fähigkeit des Proteins, zwei verschiedene Chromophore mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften zu binden, macht es zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung eines FbFP-basierten Sekretionsmarkers.

Um die Anwendbarkeit von Fluoreszenzproteinen auf das Gebiet der oftmals anaerob lebenden thermophilen Organismen auszuweiten, wurde eine Reihe neuartiger FbFPs aus LOV-Domänen entwickelt, die in solch Thermophilen gefunden wurden. Mit Schmelztemperaturen von  $> 75$  °C weisen diese Proteine eine signifikant höhere Thermostabilität als andere FbFPs auf und sollten theoretisch stabil genug für die Anwendung als Fluoreszenzreporter in thermophilen Organismen sein.



## 6. Summary

Over the course of the last two decades, fluorescent reporter proteins have become a cornerstone of modern biological research. They can be used to study for example gene expression, protein localization or complex cell physiological processes. The largest class of fluorescent proteins is formed by the GFP-family with its numerous variants derived from proteins found in the jellyfish *A. victoria* and various *Anthozoa* species.

FMN-binding fluorescent proteins (FbFPs), which were developed in recent years from blue light sensing LOV-domains found in plants and many bacteria, form another class of fluorescent proteins that complements the toolkit of available fluorescent proteins due to their independence of molecular oxygen.

In this work, novel FbFP variants which exhibit new and unique properties have been developed and characterized. The two existing proteins EcFbFP and Pp2FbFP have been improved by random and site-directed mutagenesis to yield variants with enhanced *in vivo* fluorescence, blue shifted spectra and – in case of Pp2FbFP – an increased fluorescence quantum yield.

To yield FbFPs with red shifted emission spectra, all available FbFPs were screened for the ability to bind the Flavin analog roseoflavin and produce a red shifted fluorescence signal. In these studies Pp1FbFP has been shown to efficiently bind RoFMN and to produce a bright fluorescence with an emission maximum of  $\lambda = 540$  nm, which represents a significant red shift compared to FbFPs with FMN. The proteins ability to bind two different chromophores with dissimilar spectral characteristics renders it a promising candidate for the development of an FbFP-based secretion marker.

In order to further expand the applicability of fluorescent proteins to the field of thermophilic organisms that often live under anaerobic conditions, a set of novel FbFPs has been developed from LOV-domains found in such thermophiles. With melting temperatures of  $> 75$  °C, these proteins exhibit significantly higher thermostabilities than other FbFPs and should theoretically be stable enough for the application as fluorescent reporters in thermophilic organisms.

## 7. Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amsterdam, A., Lin, S. & Hopkins, N. (1995). The *Aequorea victoria* green fluorescent protein can be used as a reporter in live zebrafish embryos. *Dev Biol* **171**, 123-129.
- An, G., Hidaka, K. & Siminovitch, L. (1982). Expression of bacterial *beta-galactosidase* in animal cells. *Mol Cell Biol* **2**, 1628-1632.
- Ávila-Pérez, M., Hellingwerf, K. J. & Kort, R. (2006). Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* **188**, 6411-6414.
- Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**, 130-197.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-11989.
- Baulcombe, D. C., Chapman, S. & Santa Cruz, S. (1995). Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections. *Plant J* **7**, 1045-1053.
- Beeson, W. T. t., Iavarone, A. T., Hausmann, C. D., Cate, J. H. & Marletta, M. A. (2011). Extracellular *aldonolactonase* from *Myceliophthora thermophila*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 650-656.
- Bevis, B. J. & Glick, B. S. (2002). Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* **20**, 83-87.
- Blumer-Schuette, S. E., Brown, S. D., Sander, K. B., Bayer, E. A., Kataeva, I., Zurawski, J. V., Conway, J. M., Adams, M. W. & Kelly, R. M. (2014). Thermophilic lignocellulose deconstruction. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 393-448.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brand, A. (1995). GFP in *Drosophila*. *Trends Genet* **11**, 324-325.
- Brouwer, A. M. (2011). Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* **83**, 2213-2228.
- Bulina, M. E., Verkhusha, V. V., Staroverov, D. B., Chudakov, D. M. & Lukyanov, K. A. (2003). Hetero-oligomeric tagging diminishes non-specific aggregation of target proteins fused with *Anthozoa* fluorescent proteins. *Biochem J* **371**, 109-114.
- Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7877-7882.
- Carter, A. D., Bonyadi, R. & Gifford, M. L. (2013). The use of fluorescence-activated cell sorting in studying plant development and environmental responses. *International Journal of Developmental Biology* **57**, 545-552.
- Cava, F., de Pedro, M. A., Blas-Galindo, E., Waldo, G. S., Westblade, L. F. & Berenguer, J. (2008). Expression and use of superfolder green fluorescent protein at high temperatures *in vivo*: a tool to study extreme thermophile biology. *Environ Microbiol* **10**, 605-613.
- Chalfie, M. (2009). GFP: Lighting up life. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 10073-10080.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

- Chapman, S., Faulkner, C., Kaiserli, E., Garcia-Mata, C., Savenkov, E. I., Roberts, A. G., Oparka, K. J. & Christie, J. M. (2008). The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20038-20043.
- Chapman, S., Oparka, K. J. & Roberts, A. G. (2005). New tools for *in vivo* fluorescence tagging. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 565-573.
- Chen, E., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A. & Kliger, D. S. (2007). A LOV story: the signaling state of the phot1 LOV2 photocycle involves chromophore-triggered protein structure relaxation, as probed by far-UV time-resolved optical rotatory dispersion spectroscopy. *Biochemistry* **46**, 4619-4624.
- Choi, C. H., Deguzman, J. V., Lamont, R. J. & Yilmaz, Ö. (2011). Genetic Transformation of an Obligate Anaerobe, *P. gingivalis* for FMN-Green Fluorescent Protein Expression in Studying Host-Microbe Interaction. *PLoS One* **6**, e18499.
- Chozinski, T. J., Gagnon, L. A. & Vaughan, J. C. (2014). Twinkle, twinkle little star: Photoswitchable fluorophores for super-resolution imaging. *FEBS Lett* **588**, 3603-3612.
- Christie, J. M., Hitomi, K., Arvai, A. S., Hartfield, K. A., Mettlen, M., Pratt, A. J., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (2012). Structural tuning of the fluorescent protein iLOV for improved photostability. *J Biol Chem* **287**, 22295-22304.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. & Briggs, W. R. (1998). *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698-1701.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8779-8783.
- Chung, D., Cha, M., Guss, A. M. & Westpheling, J. (2014). Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8931-8936.
- Cinelli, R. A., Ferrari, A., Pellegrini, V., Tyagi, M., Giacca, M. & Beltram, F. (2000). The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level. *Photochem Photobiol* **71**, 771-776.
- Circolone, F., Granzin, J., Jentsch, K., Drepper, T., Jaeger, K. E., Willbold, D., Krauss, U. & Batra-Safferling, R. (2012). Structural basis for the slow dark recovery of a full-length LOV protein from *Pseudomonas putida*. *J Mol Biol* **417**, 362-374.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
- Crosson, S. & Moffat, K. (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: insights into light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2995-3000.
- Crosson, S., Rajagopal, S. & Moffat, K. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* **42**, 2-10.
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D. & Henco, K. (1994). 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods Mol Biol* **31**, 371-387.
- Cubitt, A. B., Heim, R., Adams, S. R., Boyd, A. E., Gross, L. A. & Tsien, R. Y. (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**, 448-455.

- Currie, D. H., Guss, A. M., Herring, C. D., Giannone, R. J., Johnson, C. M., Lankford, P. K., Brown, S. D., Hettich, R. L. & Lynd, L. R. (2014). Profile of Secreted *Hydrolases*, Associated Proteins, and SlpA in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* during the Degradation of Hemicellulose. *Appl Environ Microbiol* **80**, 5001-5011.
- Davis, I., Girdham, C. H. & O'Farrell, P. H. (1995). A nuclear GFP that marks nuclei in living *Drosophila* embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. *Dev Biol* **170**, 726-729.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **7**, 725-737.
- Demarsy, E. & Fankhauser, C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 69-74.
- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauss, U., Guterl, J. K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W. & Jaeger, K. E. (2007). Reporter proteins for *in vivo* fluorescence without oxygen. *Nat Biotechnol* **25**, 443-445.
- Drepper, T., Huber, R., Heck, A., Circolone, F., Hillmer, A. K., Büchs, J. & Jaeger, K. E. (2010). Flavin mononucleotide-based fluorescent reporter proteins outperform green fluorescent protein-like proteins as quantitative *in vivo* real-time reporters. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5990-5994.
- Dugaiczky, A., Boyer, H. W. & Goodman, H. M. (1975). Ligation of *EcoRI* endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol* **96**, 171-184.
- Durisic, N., Cuervo, L. L. & Lakadamyali, M. (2014). Quantitative super-resolution microscopy: pitfalls and strategies for image analysis. *Curr Opin Chem Biol* **20**, 22-28.
- Fang, J. & Beattie, D. S. (2002). Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: isolation and characterization. *Biochemistry* **41**, 3065-3072.
- Filloux, A. (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Frontiers in microbiology* **2**, 155.
- Fischer, M., Haase, I., Feicht, R., Schramek, N., Köhler, P., Schieberle, P. & Bacher, A. (2005). Evolution of vitamin B2 biosynthesis: riboflavin synthase of *Arabidopsis thaliana* and its inhibition by riboflavin. *Biol Chem* **386**, 417-428.
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **6. Folge. Band 2**.
- Gerdes, H. H. & Kaether, C. (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology. *FEBS Lett* **389**, 44-47.
- Gerlich, D., Beaudouin, J., Gebhard, M., Ellenberg, J. & Eils, R. (2001). Four-dimensional imaging and quantitative reconstruction to analyse complex spatiotemporal processes in live cells. *Nat Cell Biol* **3**, 852-855.
- Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express *chloramphenicol acetyltransferase* in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **2**, 1044-1051.
- Grill, S., Busenbender, S., Pfeiffer, M., Köhler, U. & Mack, M. (2008). The bifunctional *flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase* from *Streptomyces davawensis* produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin. *J Bacteriol* **190**, 1546-1553.
- Gunkel, M., Erdel, F., Rippe, K., Lemmer, P., Kaufmann, R., Hörmann, C., Amberger, R. & Cremer, C. (2009). Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. *Biotechnol J* **4**, 927-938.

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Harper, S. M., Christie, J. M. & Gardner, K. H. (2004). Disruption of the LOV-Jalpha helix interaction activates phototropin kinase activity. *Biochemistry* **43**, 16184-16192.
- Hayashi, M., Hasegawa, K., Oguni, Y. & Unemoto, T. (1990). Characterization of FMN-dependent NADH-quinone reductase induced by menadione in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1035**, 230-236.
- Heim, R., Cubitt, A. B. & Tsien, R. Y. (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.
- Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12501-12504.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-59.
- Inada, T., Kimata, K. & Aiba, H. (1996). Mechanism responsible for glucose-lactose diauxie in *Escherichia coli*: challenge to the cAMP model. *Genes Cells* **1**, 293-301.
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.
- Jentzsch, K., Wirtz, A., Circolone, F., Drepper, T., Losi, A., Gärtner, W., Jaeger, K. E. & Krauss, U. (2009). Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **48**, 10321-10333.
- Kaether, C. & Gerdes, H. H. (1995). Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein. *FEBS Lett* **369**, 267-271.
- Katzke, N., Arvani, S., Bergmann, R., Circolone, F., Markert, A., Svensson, V., Jaeger, K. E., Heck, A. & Drepper, T. (2010). A novel T7 RNA polymerase dependent expression system for high-level protein production in the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Protein Expr Purif* **69**, 137-146.
- Kay, C. W., Schleicher, E., Kuppig, A., Hofner, H., Rudiger, W., Schleicher, M., Fischer, M., Bacher, A., Weber, S. & Richter, G. (2003). Blue light perception in plants. Detection and characterization of a light-induced neutral flavin radical in a C450A mutant of phototropin. *J Biol Chem* **278**, 10973-10982.
- Kiss, C., Temirov, J., Chasteen, L., Waldo, G. S. & Bradbury, A. R. (2009). Directed evolution of an extremely stable fluorescent protein. *Protein Eng Des Sel* **22**, 313-323.
- Klar, T. A., Jakobs, S., Dyba, M., Egnér, A. & Hell, S. W. (2000). Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8206-8210.
- Krauss, U., Losi, A., Gärtner, W., Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2005). Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Phys Chem Chem Phys* **7**, 2804-2811.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, S. & Kang, S. H. (2012). Integrated optical molecular imaging system for four-dimensional real-time detection in living single cells. *Biosens Bioelectron* **31**, 393-398.
- Letunova, E. V., Tikhomirova, A. S., Shiian, S. D., Markin, V. A. & Khorlin, A. (1981). [Purification and properties of beta-galactosidase from *Alternaria tenuis*]. *Biokhimiia* **46**, 911-919.



- Losi, A. (2004).** The bacterial counterparts of plant phototropins. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 566-574.
- Losi, A. & Gärtner, W. (2012).** The Evolution of Flavin-Binding Photoreceptors: An Ancient Chromophore Serving Trendy Blue-Light Sensors. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 49-72.
- Losi, A., Ghiraldelli, E., Jansen, S. & Gärtner, W. (2005).** Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA. *Photochem Photobiol* **81**, 1145-1152.
- Losi, A., Polverini, E., Quest, B. & Gärtner, W. (2002).** First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes. *Biophys J* **82**, 2627-2634.
- Lutz, S. (2010).** Beyond directed evolution--semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol* **21**, 734-743.
- Lybarger, L., Dempsey, D., Franek, K. J. & Chervenak, R. (1996).** Rapid generation and flow cytometric analysis of stable GFP-expressing cells. *Cytometry* **25**, 211-220.
- Mansurova, M., Scheercousse, P., Simon, J., Kluth, M. & Gärtner, W. (2011).** Chromophore Exchange in the Blue Light-Sensitive Photoreceptor YtvA from *Bacillus subtilis*. *Chembiochem* **12**, 641-6.
- March, J. C., Rao, G. & Bentley, W. E. (2003).** Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Appl Microbiol Biotechnol* **62**, 303-315.
- Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J. & Hegemann, P. (2009).** *In vivo* generation of flavoproteins with modified cofactors. *J Mol Biol* **385**, 1511-1518.
- Matsumoto, K., Mukai, Y., Ogata, D., Shozui, F., Nduko, J. M., Taguchi, S. & Ooi, T. (2010).** Characterization of thermostable FMN-dependent NADH azoreductase from the moderate thermophile *Geobacillus stearothermophilus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1431-1438.
- Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., Markelov, M. L. & Lukyanov, S. A. (1999).** Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat Biotechnol* **17**, 969-973.
- Matz, M. V., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A. (2002).** Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow. *Bioessays* **24**, 953-959.
- McComb, R. B. & Bowers, G. N., Jr. (1972).** Study of optimum buffer conditions for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. *Clin Chem* **18**, 97-104.
- McCullum, E. O., Williams, B. A., Zhang, J. & Chaput, J. C. (2010).** Random mutagenesis by error-prone PCR. *Methods Mol Biol* **634**, 103-109.
- Merril, C. R. (1990).** Gel-staining techniques. *Methods Enzymol* **182**, 477-488.
- Miska, W. & Geiger, R. (1987).** Synthesis and characterization of *Luciferin* derivatives for use in bioluminescence enhanced enzyme immunoassays. New ultrasensitive detection systems for enzyme immunoassays, I. *J Clin Chem Clin Biochem* **25**, 23-30.
- Misteli, T. & Spector, D. L. (1997).** Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nat Biotechnol* **15**, 961-964.
- Mitra, R. D., Silva, C. M. & Youvan, D. C. (1996).** Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* **173**, 13-17.
- Miyawaki, A. (2002).** Green fluorescent protein-like proteins in reef *Anthozoa* animals. *Cell Struct Funct* **27**, 343-347.
- Miyawaki, A., Sawano, A. & Kogure, T. (2003).** Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol Suppl*, S1-7.
- Möglich, A. & Moffat, K. (2007).** Structural basis for light-dependent signaling in the dimeric LOV domain of the photosensor YtvA. *J Mol Biol* **373**, 112-126.

- Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. & Winant, J. (1974). Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656-2662.
- Mount, D. W. (2007). Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *CSH protocols* **2007**, pdb top17.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350.
- Nakamura, Y., Kaneko, T., Sato, S., Ikeuchi, M., Katoh, H., Sasamoto, S., Watanabe, A., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res* **9**, 123-130.
- Ormö, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. & Remington, S. J. (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S. & Miura, R. (1974). Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *The Journal of antibiotics* **27**, 86-87.
- Otto, M. K., Jayaram, M., Hamilton, R. M. & Delbruck, M. (1981). Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of *Phycomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 266-269.
- Pathak, G. P., Losi, A. & Gärtner, W. (2012). Metagenome-based screening reveals worldwide distribution of LOV-domain proteins. *Photochem Photobiol* **88**, 107-118.
- Patterson, G., Day, R. N. & Piston, D. (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**, 837-838.
- Patterson, G. H., Knobel, S. M., Sharif, W. D., Kain, S. R. & Piston, D. W. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**, 2782-2790.
- Pédélecq, J. D., Cabantous, S., Tran, T., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. (2006). Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **24**, 79-88.
- Pedrolli, D. B., Nakanishi, S., Barile, M., Mansurova, M., Carmona, E. C., Lux, A., Gärtner, W. & Mack, M. (2011). The antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-amino-riboflavin from *Streptomyces davawensis* are metabolized by *human flavokinase* and *human FAD synthetase*. *Biochem Pharmacol* **82**, 1853-1859.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res* **24**, 1-52.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C. & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-1612.
- Potzkei, J., Kunze, M., Drepper, T., Gensch, T., Jaeger, K. E. & Büchs, J. (2012). Real-time determination of intracellular oxygen in bacteria using a genetically encoded FRET-based biosensor. *BMC Biol* **10**, 28.
- Powers, H. J. (2003). Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am J Clin Nutr* **77**, 1352-1360.
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.
- Pritchard, L., Corne, D., Kell, D., Rowland, J. & Winson, M. (2005). A general model of error-prone PCR. *J Theor Biol* **234**, 497-509.

- Pugsley, A. P. (1993).** The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **57**, 50-108.
- Ropp, J. D., Donahue, C. J., Wolfgang-Kimball, D., Hooley, J. J., Chin, J. Y., Hoffman, R. A., Cuthbertson, R. A. & Bauer, K. D. (1995).** *Aequorea* green fluorescent protein analysis by flow cytometry. *Cytometry* **21**, 309-317.
- Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. (2006).** Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* **3**, 793-795.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable *DNA polymerase*. *Science* **239**, 487-491.
- Sali, A. & Blundell, T. L. (1993).** Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**, 779-815.
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U. & Briggs, W. R. (2000).** Photochemical and mutational analysis of the FMN-binding domains of the plant blue light receptor, phototropin. *Biochemistry* **39**, 9401-9410.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schallmeyer, M., Singh, A. & Ward, O. P. (2004).** Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can Journal Microbiol* **50**, 1-17.
- Schmitz, U. K., Lonsdale, D. M. & Jefferson, R. A. (1990).** Application of the *beta-glucuronidase* gene fusion system to *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **17**, 261-264.
- Selden, R. F., Howie, K. B., Rowe, M. E., Goodman, H. M. & Moore, D. D. (1986).** Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol Cell Biol* **6**, 3173-3179.
- Shimomura, O. (2009).** Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 5590-5602.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962).** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239.
- Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T. J., Qi, Y., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Jin, Y., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. (2011).** A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol* **9**, e1001041.
- Silva-Junior, M. R., Mansurova, M., Gärtner, W. & Thiel, W. (2013).** Photophysics of Structurally Modified Flavin Derivatives in the Blue-Light Photoreceptor YtvA: A Combined Experimental and Theoretical Study. *Chembiochem* **14**, 1648-1661.
- Sirivech, S., Driskell, J. & Frieden, E. (1977).** *NADH-FMN oxidoreductase* activity and iron content of organs from riboflavin and iron-deficient rats. *J Nutr* **107**, 739-745.
- Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic Acids Res* **3**, 2387-2398.
- Snapp, E. (2005).** Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 21**, Unit 21 24.
- Song, X., Wang, Y., Shu, Z., Hong, J., Li, T. & Yao, L. (2013).** Engineering a More Thermostable Blue Light Photo Receptor *Bacillus subtilis* YtvA LOV Domain by a Computer Aided Rational Design Method. *PLoS Comput Biol* **9**, e1003129.
- Spokoini, R., Shamir, M., Keness, A. & Kaganovich, D. (2013).** 4D imaging of protein aggregation in live cells. *J vis Exp*.



- Steffens, D. L. & Williams, J. G. (2007).** Efficient site-directed saturation mutagenesis using degenerate oligonucleotides. *J Biomol Tech* **18**, 147-149.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189**, 113-130.
- Swartz, T. E., Corchnoy, S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R. & Bogomolni, R. A. (2001).** The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J Biol Chem* **276**, 36493-36500.
- Takai, K. (2008).** Methanogenesis at 122 degrees C renews the upper temperature limit for life and the stable carbon isotopic fractionation of microbial methanogenesis. *Geochim Cosmochim Acta* **72**, A926-A926.
- Takanishi, C. L., Bykova, E. A., Cheng, W. & Zheng, J. (2006).** GFP-based FRET analysis in live cells. *Brain Res* **1091**, 132-139.
- Tansey, M. R. & Brock, T. D. (1972).** The upper temperature limit for eukaryotic organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2426-2428.
- Tee, K. L. & Wong, T. S. (2013).** Polishing the craft of genetic diversity creation in directed evolution. *Biotechnol Adv* **31**, 1707-1721.
- Tielker, D., Eichhof, I., Jaeger, K. E. & Ernst, J. F. (2009).** Flavin mononucleotide-based fluorescent protein as an oxygen-independent reporter in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**, 913-915.
- Tindall, B. J., Sikorski, J., Lucas, S., Goltsman, E., Copeland, A., Glavina Del Rio, T., Nolan, M., Tice, H., Cheng, J. F., Han, C., Pitluck, S., Liolios, K., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Fahnrich, R., Goodwin, L., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y. J., Jeffries, C. D., Rohde, M., Goker, M., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H. P. & Lapidus, A. (2010).** Complete genome sequence of *Meiothermus ruber* type strain (21). *Stand Genomic Sci* **3**, 26-36.
- Tjalsma, H., Bolhuis, A., Jongbloed, J. D., Bron, S. & van Dijk, J. M. (2000).** Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev : MMBR* **64**, 515-547.
- Treadwell, G. E. & Metzler, D. E. (1972).** Photoconversion of riboflavin to lumichrome in plant tissues. *Plant Physiol* **49**, 991-993.
- Tsien, R. Y. (2009).** Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 5612-5626.
- Unsworth, L. D., van der Oost, J. & Koutsopoulos, S. (2007).** Hyperthermophilic enzymes-- stability, activity and implementation strategies for high temperature applications. *FEBS J* **274**, 4044-4056.
- Valdes, J., Quatrini, R., Hallberg, K., Dopson, M., Valenzuela, P. D. & Holmes, D. S. (2009).** Draft genome sequence of the extremely acidophilic bacterium *Acidithiobacillus caldus* ATCC 51756 reveals metabolic versatility in the genus *Acidithiobacillus*. *J Bacteriol* **191**, 5877-5878.
- Verkhusha, V. V. & Lukyanov, K. A. (2004).** The molecular properties and applications of *Anthozoa* fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol* **22**, 289-296.
- Verkhusha, V. V., Otsuna, H., Awasaki, T., Oda, H., Tsukita, S. & Ito, K. (2001).** An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J Biol Chem* **276**, 29621-29624.
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979).** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-619.

- Voss, U., Larrieu, A. & Wells, D. M. (2013). From jellyfish to biosensors: the use of fluorescent proteins in plants. *Int J Dev Biol* **57**, 525-533.
- Wagner, I. D. & Wiegel, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. *Ann N Y Acad Sci* **1125**, 1-43.
- Wahl, P., Achet, J. C., Visser, A. J. & Müller, F. (1974). Time resolved fluorescence of flavin adenine dinucleotide. *FEBS letters* **44**, 67-70.
- Walter, J., Hausmann, S., Drepper, T., Puls, M., Eggert, T. & Dihné, M. (2012). Flavin Mononucleotide-Based Fluorescent Proteins Function in Mammalian Cells without Oxygen Requirement. *PLoS One* **7**, e43921.
- Ward, W. W. & Cormier, M. J. (1979). An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the *Renilla* green-fluorescent protein. *J Biol Chem* **254**, 781-788.
- Weber, G. & Teale, F. W. J. (1957). Determination of the absolute quantum yield of fluorescent solutions. *Transactions of the Faraday Society* **53**, 646-655.
- Weiss, R. F. (1970). Solubility of Nitrogen, Oxygen and Argon in Water and Seawater. *Deep-Sea Res* **17**, 721-&.
- Whitby, L. G. (1953). A new method for preparing flavin-adenine dinucleotide. *Biochem J* **54**, 437-442.
- Wingen, M., Potzkei, J., Endres, S., Casini, G., Rupprecht, C., Fahlke, C., Krauss, U., Jaeger, K. E., Drepper, T. & Gensch, T. (2014). The photophysics of LOV-based fluorescent proteins - new tools for cell biology. *Photochem Photobiol Sci* **13**, 875-883.
- Winson, M. K. & Davey, H. M. (2000). Flow cytometric analysis of microorganisms. *Methods* **21**, 231-240.
- Wurth, C., Lochmann, C., Spieles, M., Pauli, J., Hoffmann, K., Schuttrigkeit, T., Franzl, T. & Resch-Genger, U. (2010). Evaluation of a commercial integrating sphere setup for the determination of absolute photoluminescence quantum yields of dilute dye solutions. *Appl Spectrosc* **64**, 733-741.
- Yang, G. & Withers, S. G. (2009). Ultrahigh-throughput FACS-based screening for directed enzyme evolution. *Chembiochem* **10**, 2704-2715.
- Yang, T. T., Cheng, L. & Kain, S. R. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* **24**, 4592-4593.
- Yanushevich, Y. G., Staroverov, D. B., Savitsky, A. P., Fradkov, A. F., Gurskaya, N. G., Bulina, M. E., Lukyanov, K. A. & Lukyanov, S. A. (2002). A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. *FEBS Lett* **511**, 11-14.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res* **32**, e115.
- Zoltowski, B. D. & Gardner, K. H. (2011). Tripping the light fantastic: blue-light photoreceptors as examples of environmentally modulated protein-protein interactions. *Biochemistry* **50**, 4-16.

---

## 8. Anhang

### 8.1 Aminosäure-Sequenzen aller verwendeten FbFPs

Im Folgenden sind die Aminosäure-Sequenzen aller verwendeten Wildtyp-FbFPs im FASTA-Format angegeben. Die Aminosäureaustausche der verwendeten Mutanten sind in Tabelle 4.1 angegeben.

>BsFbFP

```
MASFQSFQIPGQLEVIKKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTG
YETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGMT
FWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEKLEDSLTEITALSTPIV
PIRNGISALPLVGNLTEERFNSIVCTLTNILSTSKDDYLIIDLSGLAQVN
EQTADQIFKLSHLLKLTGTELIITGIKPELAMKMNKLDANFSSLKTYSNV
KDAVKVLPIM
```

>EcFbFP

```
MASFQSFQIPGQLEVIKKALDHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMT
GYETEEILGKNARFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGT
MFWNELNIDPMEIEDKTYFVGIQNDITKQKEYEKL
```

>Pp1FbFP

```
MINAQLLQSMVDASNDGIVVAEKEGDDTILYVNAAFEYLTGYSRDEILY
QDARFLQGDDRDLGRARIRKAMAEGRPCREVLNRNYRKDGSAFWNELSIT
PVKSDFDQRTYFIGIQKDVSRQVELERELAELRARPKPDERA
```

>Pp2FbFP

```
MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPAPERLTGYCADDILY
QDARFLQGEDHDQPGIAIIREAIREGRPCQVLRNYRKDGSLFWNELSIT
PVHNEADQLTYIIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQQGQAKH
```

---

>Pp3FbFP

MINAQLLQSMVDASNDGIVVAEQEGDDTILYVNPAPERLTGYSRDEILY  
QDARFLQGGDRDQLARARIRKALAEGRPCREVLNRNYRKDGSAFWNELSIT  
PVKCDADHRTYFIGIQKDVSQRQVELERELAEMHVRRNFDKRPEPSA

>Pp4FbFP

MIDAKLLQLMVEASNDGIVIAEQEGNDSILYVNPAPERLTGYAADDILY  
QDARFLQGGDHDQEALDAIRQAIRDGRPCQVLRNYRKDGSLFWNELSIS  
PIRNEADQLTYIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAQLRRQLDDRDS

>Pf1FbFP

MINAHLQRMINASNDGIVVAEQEGEDNIVYVNPAPERLTGYSADDEVLY  
QDARFLQSGDRDQPGLEVIRQALRQGRPCREVLNRNYRKDGSHFWNELSIT  
PVFNDSQLTYFIGVQKDVSVQVKAQQRLLQLEQQLAEVQAELAALKATS  
GH

>Pf2FbFP

MINASLMQMVINASNDGIVVAEREGKDDNILYVNPAPERLTGYTSEEIL  
YQDARFLQSGDRDQENLALIRDALRNNGSCREILNRNYRKDGTPFWNELSL  
STVKNVDDGQTYFVGQKDVTVQVKAQQRVAQLEAQVAALEAELAALKAT  
NGANKTAN

>Pf3FbFP

MINAKLMQLVINASNDGIVVAEREGKDKPLIYVNPAPERLTGYTLDEILY  
QDARFLQSGDRDQPALMAIRETLESGGACREILNRNYRKDGSHFWNELSLS  
TVYNEADKQTYFVGQKDVTLQVKAQQRVGQLEAELNQVKAELAALKATS  
GFNKI

>phiLOV2.1

MEKSFVITDPRLPDYPIIFASDGFLELTEYSREEIMGRNARFLQGPETDQ  
ATVQKIRDAIRDQRETTVQLINYTKSGKKFWNLLHLQPVRDRKGGGLQYFI  
GVQLVGSDDL

---

>AcFbFP

MAPNREQVRLLESIAAVIADVLFQEERDGRDRCFAAALRAIDEGVVLTD  
EQRVYANPAFLRLSGYELADILGKNARFLQGPDTDPATRQSLHDLAEG  
RVFHGDILNYRRDGTPEFWNALNISPVRDAQGHITHFVSVQRDVTLSRTE  
QELRLSAQ

>MrFbFP

MCADVPAKALQGEFSVRDEIFRIAVETILAGVVITDAQLPDYPIVYCNP  
GVVQLTGYPSSEVLGRNARFLQGPATNPETVARLRRRAIHEGRPAHVLL  
LNRYRKDGQPFWDLRIAPVRDVEGRLTHFVGIQSDVSAKVEGVRLL  
EQALE

>MtFbFP

MLRALFVYVATRNPTVEIGAVDLSCAFLVTDVTLNDCPIIYVSDNFQ  
NLTYNRHEIIGKNARFLQSPDGEVEAGSRREFVANDAVLKLKNAVTEG  
KEIQQLSLINRKGKPFLLNLLTIPIPWDSDEIKYFIGFQIDLVECPE  
AI

>TeFbFP

MHDRQGGQLIGFLESVDITDKKQIEAALRLRERAIISTNGIVITDYR  
QPDNPVIYVNPAPERMTGYRATEVIGKNARFLQGSDRHQPGATAIRN  
AIKKGQSCRVLRNYRKNQQLFWNELAISPIYNEFGEITHYIGIQSDV  
TERQRAQLFLQQQVKRT

>YNP1FbFP

MHDITERKKVEESLRLSERAIASSNGIVITDAKQPHNPIIYVNPAPER  
ITGYTAAEEVIGKNARFLQGNDTQQPQLAVLRSIAKEGRECHVVLSN  
YRKDGQQFWNDLYVAPVFNERGELSNFVGVTNITQQIEADRELRA  
SEERLRTILSM

>YNP2FbFP

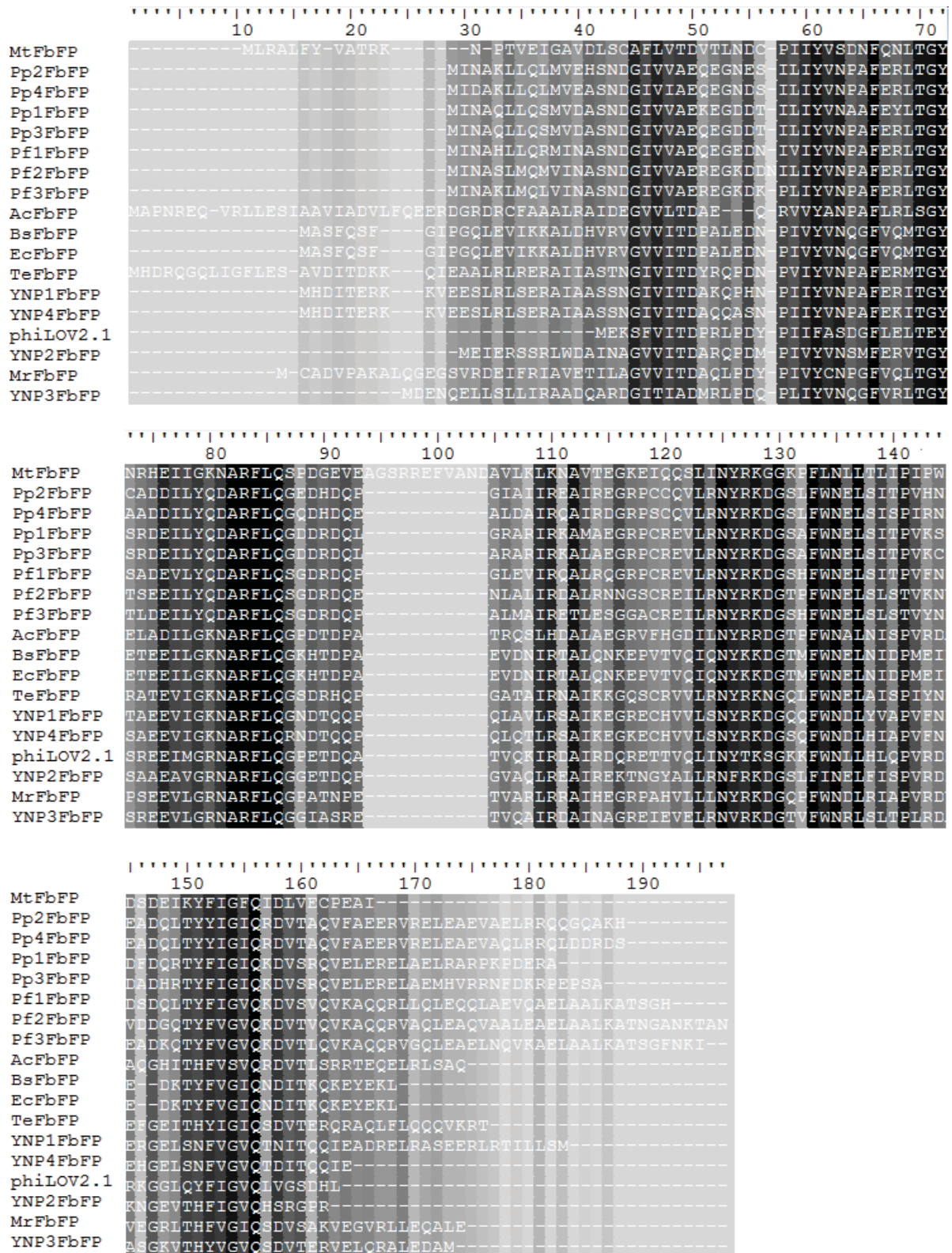
MEIERSRLWDAINAGVVITDARQPDMPIVYVNSMFERVTGYSAAE  
AVGRNARFLQGGGETDQPGVAQLREAIREKTNGYALLRNFRKDGSL  
FINELFISPVDRDKNGEVTHFIGVQHSRGPR

>YNP3FbFP

MDENQELLSLLIRAADQARDGITIADMRLPDQPLIYVNQGFVRLTGYSRE  
EVLGRNARFLQGGIASRETVQAIRDAINAGREIEVELRNVRKDGTVFWNR  
LSLTPLRDASGKVTHYVGVQSDVTERVELQRALEDAM

>YNP4FbFP

MHDITERKKVEESLRLSERAI AASSNGIVITDAQQASNPIIYVNP AFEKI  
TGYS AEEVIGKNARFLQRNDTQQPQLQTLRSAI KEGKECHVVLSNYRKDG  
SQFWNDLHIAPVFNEHGELSNFVGVQTDITQQIE



**Abb. 8.1** Alignment der Aminosäure-Sequenzen der verwendeten FbFPs. Das Alignment wurde mit Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) erstellt und mit dem Programm BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) ausgewertet. Die Schattierung variiert in Abhängigkeit des Konservierungsgrades der Aminosäuren an der jeweiligen Position. Je höherer der Grad der Konservierung, desto dunkler ist die Schattierung. Dabei werden auch funktionell bzw. chemisch ähnliche Aminosäuren berücksichtigt.



**Tab. 8.1 Identitäts-Matrix der Aminosäure-Sequenzen der verwendeten FbFPs.** Die Zahlenwerte geben den Anteil identischer Aminosäuren der jeweiligen FbFPs an. Die Farbskala von rot (geringe Identität) nach grün (hohe Identität) dient der Verdeutlichung diese Unterschiede. Eine besonders hohe Identität ist bei den FbFPs aus *P. putida* und *P. fluorescens* zu beobachten (Pp1-, Pp2- und Pf1-3FbFP). Bs- und EcFbFP zeigen eine Identität von 1, da für BsFbFP die Effektor-domäne nicht in das Alignment mit einbezogen wurde. Die durchschnittliche Identität beträgt 0,374 mit einer Standardabweichung von 0,138. ID: Identisch.

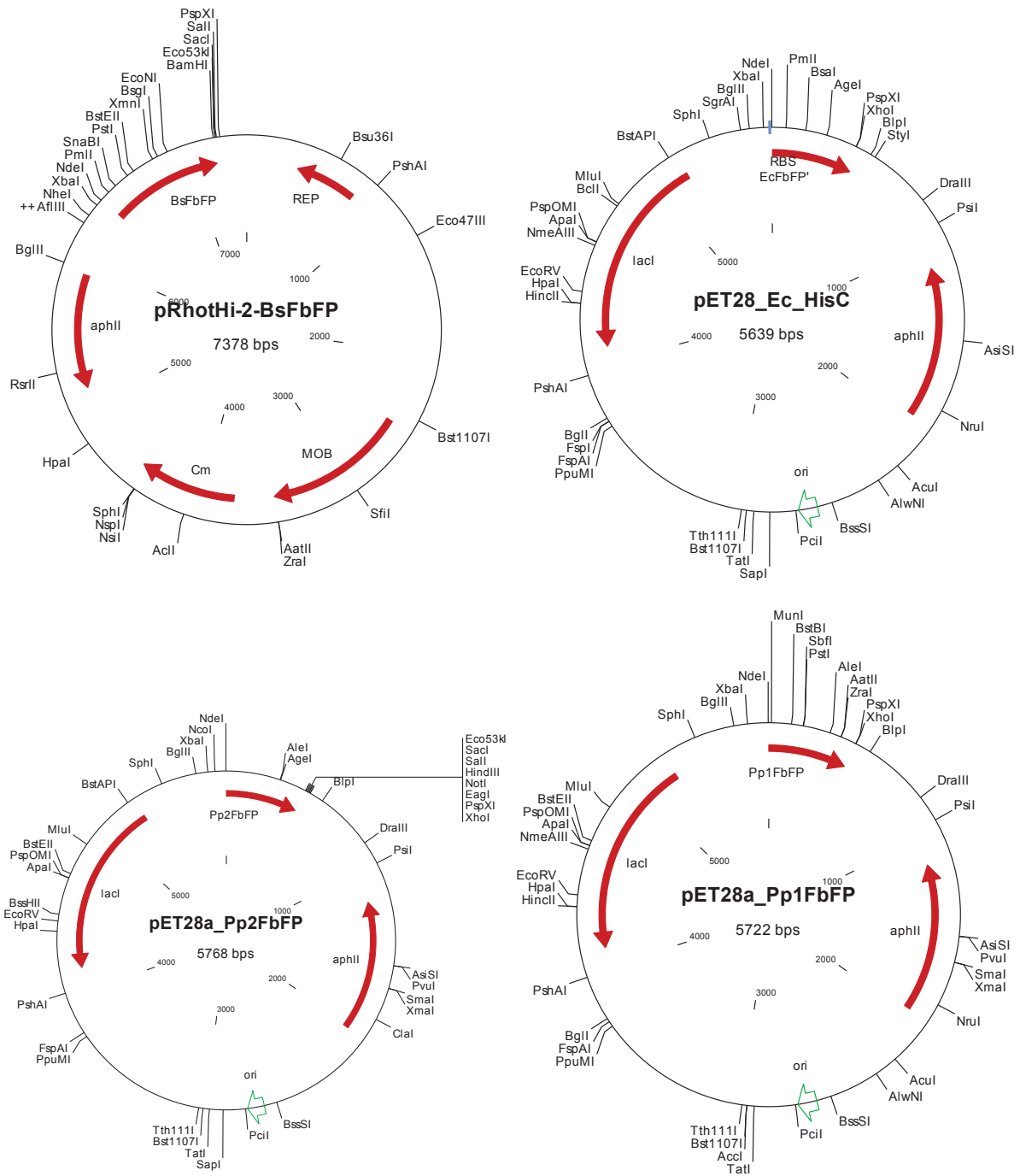
	MtFbFP	Pp2FbFP	Pp4FbFP	Pp1FbFP	Pp3FbFP	Pf1FbFP	Pf2FbFP	Pf3FbFP	AcFbFP
MtFbFP	ID	0,228	0,233	0,254	0,254	0,234	0,22	0,224	0,215
Pp2FbFP	0,228	ID	0,837	0,641	0,648	0,644	0,55	0,58	0,268
Pp4FbFP	0,233	0,837	ID	0,601	0,614	0,618	0,55	0,587	0,274
Pp1FbFP	0,254	0,641	0,601	ID	0,863	0,631	0,537	0,529	0,278
Pp3FbFP	0,254	0,648	0,614	0,863	ID	0,638	0,537	0,561	0,294
Pf1FbFP	0,234	0,644	0,618	0,631	0,638	ID	0,689	0,716	0,262
Pf2FbFP	0,22	0,55	0,55	0,537	0,537	0,689	ID	0,772	0,254
Pf3FbFP	0,224	0,58	0,587	0,529	0,561	0,716	0,772	ID	0,252
AcFbFP	0,215	0,268	0,274	0,278	0,294	0,262	0,254	0,252	ID
BsFbFP	0,246	0,286	0,299	0,311	0,309	0,273	0,269	0,262	0,329
EcFbFP	0,246	0,286	0,299	0,311	0,309	0,273	0,269	0,262	0,329
TeFbFP	0,273	0,36	0,377	0,355	0,347	0,386	0,318	0,346	0,347
YNP1FbFP	0,278	0,373	0,36	0,359	0,365	0,401	0,333	0,351	0,323
YNP4FbFP	0,315	0,348	0,341	0,342	0,339	0,382	0,309	0,333	0,316
phiLOV2.1	0,321	0,25	0,27	0,281	0,273	0,263	0,246	0,225	0,254
YNP2FbFP	0,25	0,337	0,331	0,345	0,335	0,342	0,284	0,296	0,298
MrFbFP	0,276	0,308	0,314	0,339	0,337	0,295	0,273	0,248	0,409
YNP3FbFP	0,275	0,342	0,368	0,39	0,386	0,365	0,345	0,339	0,31

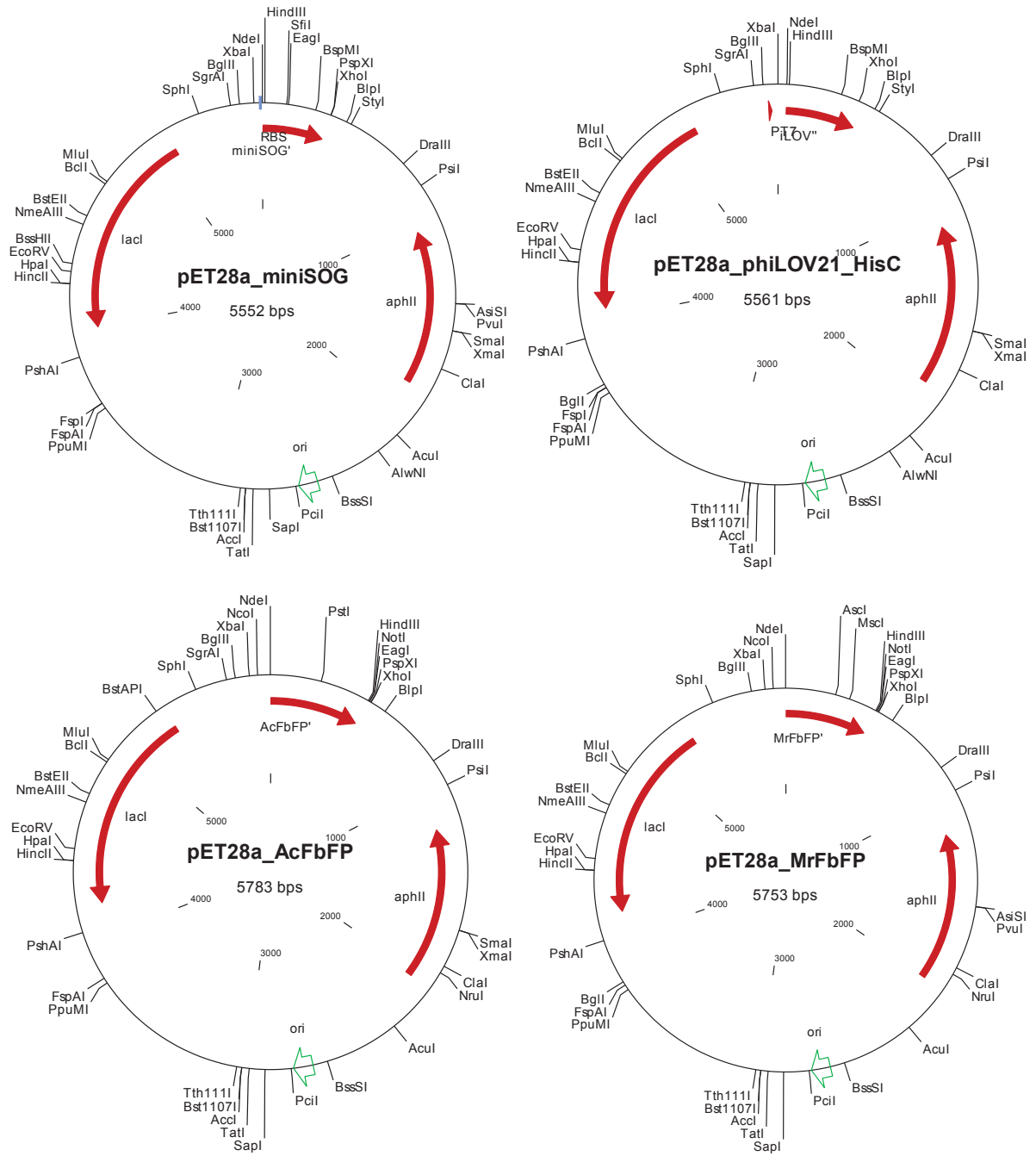
  

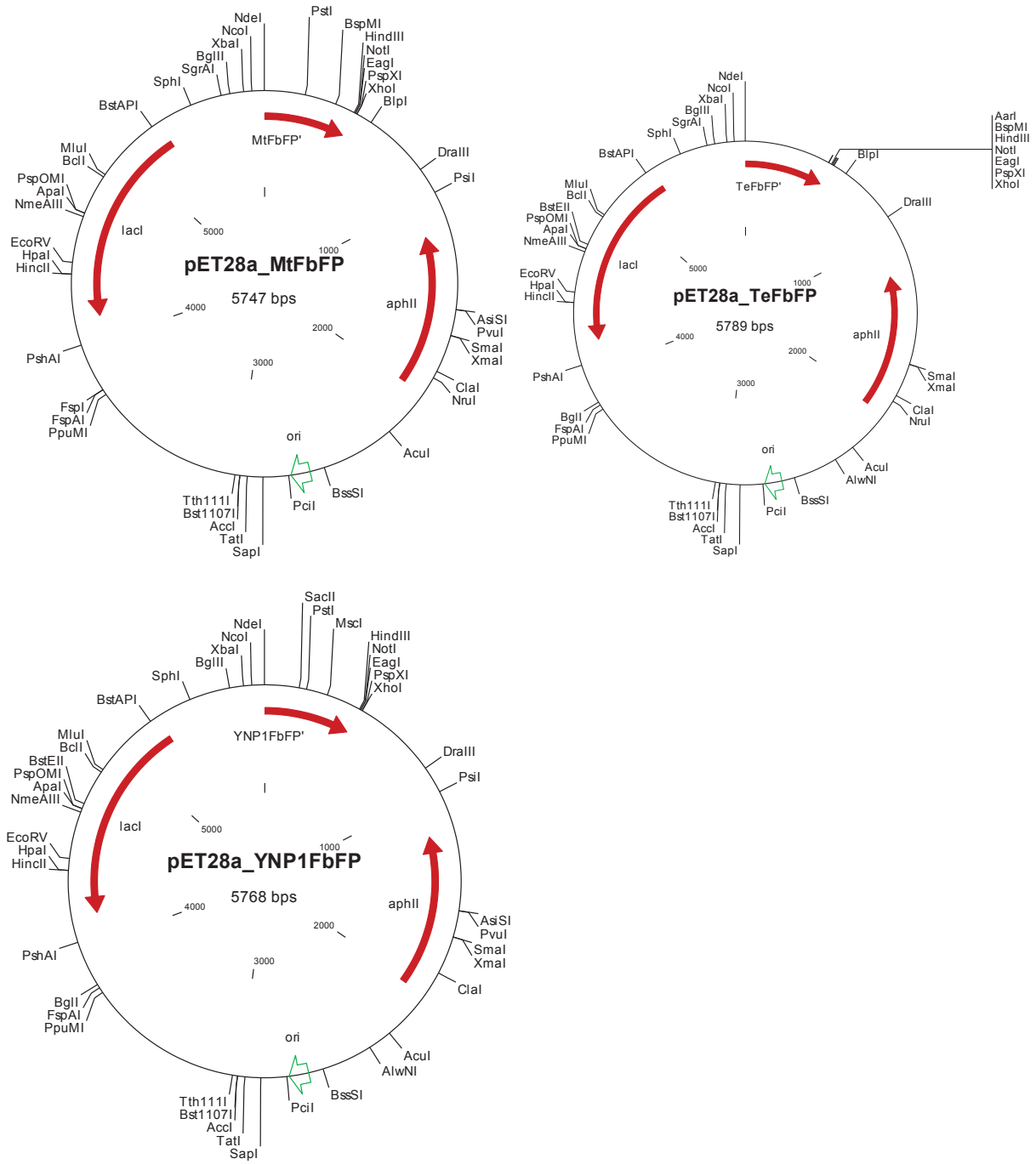
	BsFbFP	EcFbFP	TeFbFP	YNP1FbFP	YNP4FbFP	phiLOV2.1	YNP2FbFP	MrFbFP	YNP3FbFP
MtFbFP	0,246	0,246	0,273	0,278	0,315	0,321	0,25	0,276	0,275
Pp2FbFP	0,286	0,286	0,36	0,373	0,348	0,25	0,337	0,308	0,342
Pp4FbFP	0,299	0,299	0,377	0,36	0,341	0,27	0,331	0,314	0,368
Pp1FbFP	0,311	0,311	0,355	0,359	0,342	0,281	0,345	0,339	0,39
Pp3FbFP	0,309	0,309	0,347	0,365	0,339	0,273	0,335	0,337	0,386
Pf1FbFP	0,273	0,273	0,386	0,401	0,382	0,263	0,342	0,295	0,365
Pf2FbFP	0,269	0,269	0,318	0,333	0,309	0,246	0,284	0,273	0,345
Pf3FbFP	0,262	0,262	0,346	0,351	0,333	0,225	0,296	0,248	0,339
AcFbFP	0,329	0,329	0,347	0,323	0,316	0,254	0,298	0,409	0,31
BsFbFP	ID	1	0,318	0,339	0,384	0,343	0,35	0,412	0,368
EcFbFP	1	ID	0,318	0,339	0,384	0,343	0,35	0,412	0,368
TeFbFP	0,318	0,318	ID	0,497	0,487	0,256	0,368	0,349	0,388
YNP1FbFP	0,339	0,339	0,497	ID	0,784	0,3	0,379	0,42	0,374
YNP4FbFP	0,384	0,384	0,487	0,784	ID	0,343	0,425	0,412	0,379
phiLOV2.1	0,343	0,343	0,256	0,3	0,343	ID	0,401	0,364	0,386
YNP2FbFP	0,35	0,35	0,368	0,379	0,425	0,401	ID	0,405	0,394
MrFbFP	0,412	0,412	0,349	0,42	0,412	0,364	0,405	ID	0,459
YNP3FbFP	0,368	0,368	0,388	0,374	0,379	0,386	0,394	0,459	ID

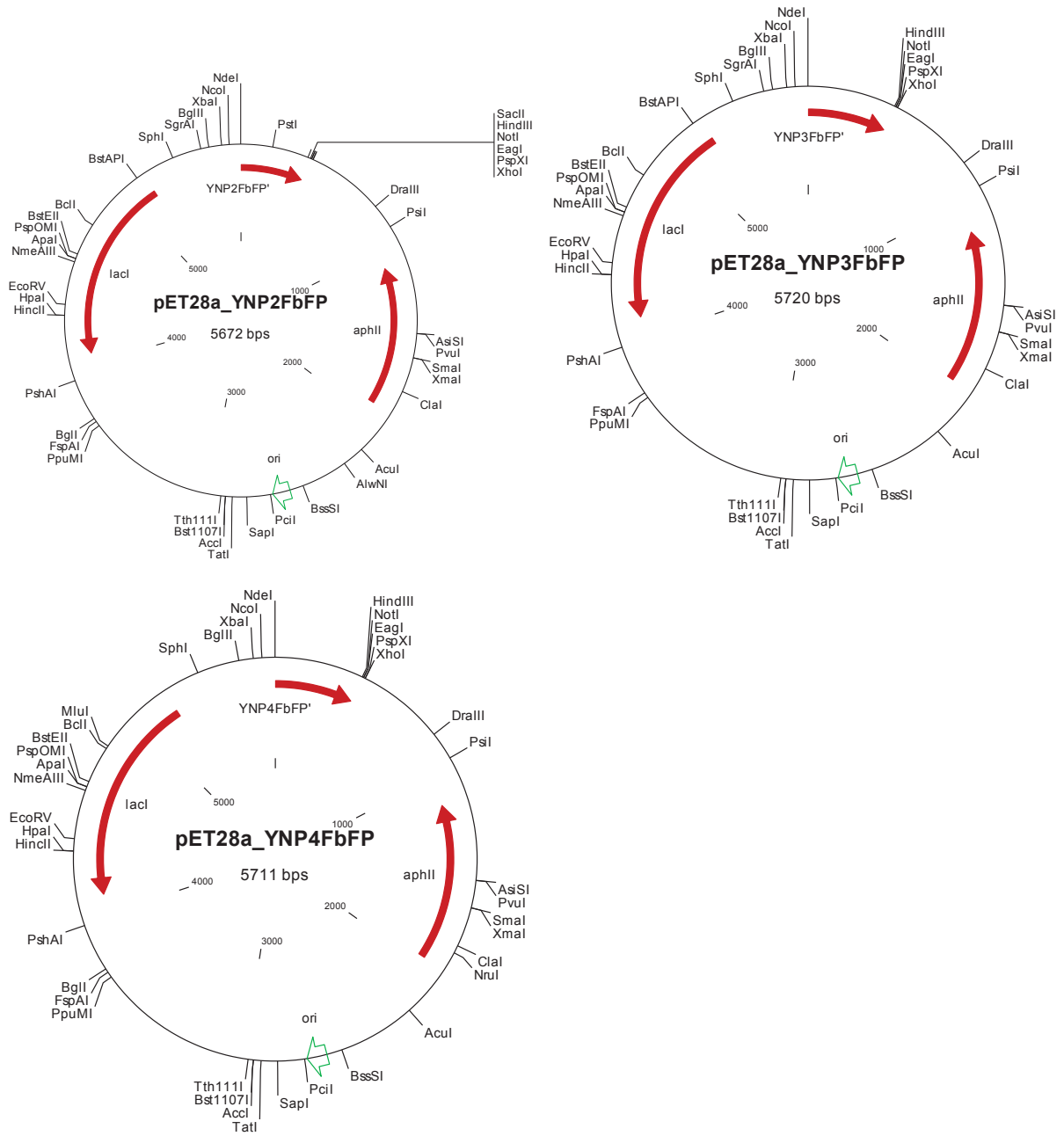


## 8.2 Plasmidkarten









### 8.3 Verwendete Scripts zur Erstellung der Strukturmodelle der FbFPs

Das Programm MODELLER verwendet zur Berechnung der Strukturmodelle eine Reihe von Dateien mit Informationen über die zu modellierende Sequenz und die dabei zu verwendenden Parameter. Die Sequenz wird im ersten Schritt mit einer Referenz („*template*“) verglichen („*alignment*“). Diesem *Alignment* werden dann manuell die manuell die Informationen hinzugefügt, welche „Heteroatome“ der *Template*-Datei, mit der gelösten Kristallstruktur, mit in die Berechnung aufgenommen werden sollen (in diesem Fall nur FMN). Daraus wird dann das Modell berechnet. Exemplarisch sind hier die *Scripts* von der Modellierung der Struktur von Pp2FbFP aufgeführt. Bei anderen Modellierungen wurde entsprechend eine andere Sequenzdatei verwendet.

#### Sequenzdatei:

```
>P1;Pp2FbFP_Dimer
sequence:Pp2FbFP_Dimer:::::0.00: 0.00
MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPAPERLTGYCADDILY
QDARFLQGEDHDQPGIAIIREAIREGRPCCQVLRNYRKDGSLFWNELSIT
PVHNEADQLTYIIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQQGQAKH/
MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPAPERLTGYCADDILY
QDARFLQGEDHDQPGIAIIREAIREGRPCCQVLRNYRKDGSLFWNELSIT
PVHNEADQLTYIIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQQGQAKH *
```

#### Templatedatei:

```
2PR5.pdb
```

#### Alignmentscript:

```
from modeller import *
env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='2PR5', model_segment=('FIRST:A','LAST:B'))
aln.append_model(mdl, align_codes='2PR5', atom_files='2PR5.pdb')
aln.append(file='Pp2FbFP_Dimer.ali', align_codes='Pp2FbFP_Dimer')
aln.align2d()
aln.write(file='Pp2Dimer-2PR5AB.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='Pp2Dimer-2PR5AB.pap', alignment_format='PAP')
```

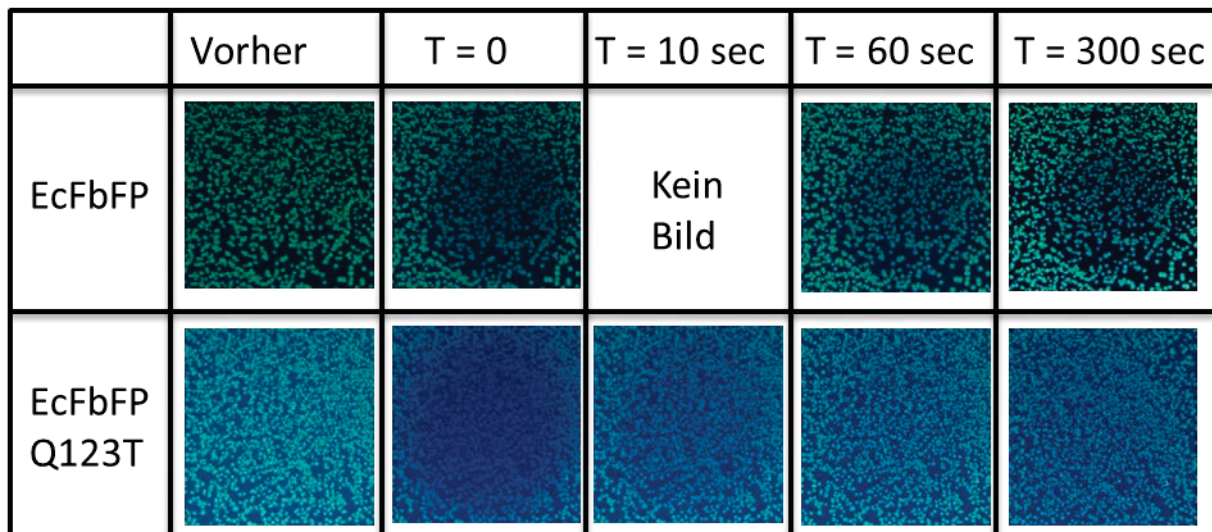
**Alignementdatei:**

```
>P1;2PR5
structureX:2PR5.pdb: 21 :A:+710 :B:MOL_ID 1; MOLECULE BLUE-LIGHT PHOTORECEPTOR;
CHAIN A, B; FRAGMENT RESIDUES 20-147; ENGINEERED YES:MOL_ID 1;
ORGANISM_SCIENTIFIC BACILLUS SUBTILIS; ORGANISM_TAXID 1423; GENE PFYP;
EXPRESSION_SYSTEM ESCHERICHIA COLI BL21; EXPRESSION_SYSTEM_TAXID 511693;
EXPRESSION_SYSTEM_STRAIN BL21; EXPRESSION_SYSTEM_VECTOR_TYPE PET28;
EXPRESSION_SYSTEM_PLASMID PAM001: 1.45: 0.19 -----
DHVRVGVVITDPALEDNPIVYVNQGFVQMTGYETEEILGK
NCRFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDGTMFWNELNIDPMEIE—DKT
YFVGIQNDITKQ---KEYEKLLDSLTE-----ITA----LS/DHVRVGVVITDPALEDNPIVY
VNQGFVQMTGYETEEILGKNCRFLQGKHTDPAEVDNIRTALQNKEPVTVQIQNYKKDG
TMFWNELNIDPMEIE--DKTYFVGIQNDITKQKEYEKLLDSLTEITAL-----
/.....
.....
.....*
>P1;Pp2FbFP_Dimer
sequence:Pp2FbFP_Dimer:  ::  ::: 0.00: 0.00
MINAKLLQLMVEHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPTFERLTGYCADDILYQDARFLHGEDHDQPGIAIIRE
AIREGRPCCQVLRNRYRKDGSLFWIELSITPVHNEADQLTTYIGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQ
QGQAKH/MINAKLLQLMV-EHSNDGIVVAEQEGNESILYVNPTFERL
TGycADDILYQDARFLHGEDHDQPGIAIIREAIREGRPCCQVLRNRYRKDGSLFWIELSITPVHNEADQLTTY
IGIQRDVTAQVFAEERVRELEAEVAELRRQGGQAKH/.....
.....
.....*
```

**Modellscript:**

```
from modeller import *
from modeller.automodel import *
log.verbose()
env = environ()
env.io.atom_files_directory = ['.', './atom_files']
env.io.hetatm = True
env.io.water = True
a = automodel(env, alnfile = 'Pp2Dimer-2PR5AB.ali',
  knowns = ('2PR5'), sequence = 'Pp2FbFP_Dimer')
a.starting_model = 1
a.ending_model = 10
a.make()
```

## 8.4 Verschiedenes



**Abb. 8.2: *In vivo* Photobleaching von EcFbFP und der Q123T Mutante auf Agarplatten.** *E. coli* BL21(DE3) wurden mit dem jeweiligen Expressionsvektor transformiert und auf Laktose-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Fluoreszenz wurde mit UV-Licht ( $\lambda = 365$  nm) angeregt und die Platten mit einer Spiegelreflexkamera fotografiert. Ein Bereich der Platte wurde für jeweils 15 Sekunden mit einer Blaulicht-LED ( $\lambda = 448$  nm) im Abstand von 10 cm bestrahlt. Direkt im Anschluss (T = 0) wurde das nächste Bild aufgenommen. Bei EcFbFP erfolgte die Aufnahme weiterer Bilder jede Minute, wobei eine langsame Wiederherstellung der ursprünglichen Fluoreszenz zu beobachten ist. Bei der EcFbFP Q123T Variante, die wesentlich stärker ausbleicht, ist bereits nach 10 Sekunden eine fast vollständige Wiederherstellung der Fluoreszenz zu beobachten. Die Zeit des Photobleachings und die Zeit zur Wiederherstellung der Fluoreszenz zeigen eine positive Korrelation.

## Lebenslauf

Marcus Wingen

Diplom Biologe

Geboren: 20.11.1985 in Solingen

### Schulische Ausbildung

---

08/1992 – 07/1996: Grundschule Erholungsstraße in Solingen

08/1996 – 06/2005: Geschwister-Scholl-Gesamtschule in Solingen  
Abschluss mit Abitur

### Zivildienst

---

07/2005 – 03/2006: Zivildienst als Hausmeister bei DiFA e.V., Solingen

### Hochschullaufbahn

---

10/2006 – 03/2011: Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf; Abschluss mit Diplom  
Thema der Diplomarbeit: „Erzeugung und Charakterisierung neuer Varianten FMN-basierter Fluoreszenzreporter“

04/2011 – 07/2011: Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Seit 08/2011: Promotion im Fach Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

### Sprachkenntnisse

---

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (fließend)



Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

---

Marcus Wingen