

Institute of Biotechnology CAS, Biocev in Vestec bei Prag
Projekt: Photobiology of the non-canonical DNA-binding EL222 protein

1 Vorbereitung und Anreise

Nachdem mir in meinem Bachelorstudium sehr wichtig war, auch etwas Praxis zu sammeln und das am liebsten im Ausland, habe ich mich für das DAAD-Programm beworben. Ich hatte bereits in meiner Schulzeit ein Auslandsjahr in Tschechien verbracht, die Sprache war also kein Problem für mich, Prag war für mich jedoch auch eine neue Erfahrung.

Aus Deutschland benötigt man in Tschechien natürlich kein Visum, ein gültiger Personalausweis reicht. Allerdings hat Tschechien nicht den Euro als Währung, sondern tschechische Kronen.

Angereist bin ich ganz einfach mit dem Bus, von meinem Betreuer wurde ich sogar vor Ort am Busbahnhof abgeholt und zu meinem Wohnort für die nächsten zwei Monate gebracht.

Untergebracht war ich in einer der Unterkünfte auf dem Campus der tschechischen Akademie der Wissenschaften, ungefähr sechs Kilometer vom Institut Biocev entfernt, das von dort mit dem Bus oder dem Rad gut erreichbar war. Das Biocev ist ein Zusammenschluss von sechs Instituten der tschechischen Akademie der Wissenschaften und zwei Fakultäten der Karls-Universität von Prag. Hier arbeiten verschiedenste Arbeitsgruppen der Molekular-, der Strukturbiochemie, der Virologie und der Biophysik an unterschiedlichen Projekten und hin und wieder entstehen Zusammenarbeiten. Ich arbeitete in einer Arbeitsgruppe der Biophysik und in unserem Labor waren lichtsensitive Proteine der Mittelpunkt unseres Interesses. Die Arbeitsgruppe war sehr vielseitig, in meinem Büro saßen ein Grieche, ein Inder, eine Tschechin, ein Chinese, ein Spanier und ich. Auch wissenschaftlich gab es verschiedene Hintergründe und so waren wir eine Mischung aus im Labor und an Messgeräten Arbeitenden und anderen, die Simulationen von Molekülen und Reaktionen am Computer erstellten.

2 Freizeitgestaltung

Neben dem Tourismus in Prag selber bietet sich die Gegend wunderbar für Ausflüge in die Umgebung an. Sowohl die Natur als auch andere kleinere Städte lockten am Wochenende aus der Großstadt hinaus und boten interessante, schöne und kulturell bedeutende Ziele für die Tage, an denen ich nicht arbeitete. Hierzu empfehle ich allen, rechtzeitig vor der Abreise eine ISIC zu beantragen, denn in Tschechien kann man damit zum Viertel des normalen Preises (, was für eine drei- bis vierstündige Zugfahrt dann umgerechnet rund zwei Euro bedeutet,) Zug fahren. Das lohnt sich auf alle Fälle, wenn man vorhat, beispielsweise Český Krumlov, Pilsen, Mělník, das Riesengebirge oder Brno zu besichtigen.

3 Wissenschaftlicher Bericht

In dem Projekt, an dem ich mitarbeiten durfte, geht es um das lichtsensitive Protein EL222. Es kommt ursprünglich in *Erythrobacter litoralis* vor und kann in einem durch Licht aktivierten Zustand DNA binden. Das Protein ist somit ein Transkriptionsfaktor. Die Struktur des inaktiven Zustands ist bereits relativ gut bekannt, das Protein besteht aus drei Regionen: einem Sensor, einem Konnektor und einem Effektor. Der aktivierte Zustand ist noch nicht sehr erforscht und zentrales Thema des Projekts.

Der Sensor ist eine LOV (light-oxygen-voltage)-Domäne, die mehrere α -Helices enthält. Solche Domänen kommen sowohl in Bakterien als auch in Pflanzen und Pilzen als Sensorregion von Proteinen vor. Die LOV-Domäne des EL222 befindet sich am N-Terminus des Proteins. Gebunden an diese Region finden sich Flavin-Kofaktoren, die für die Lichtsensitivität des Proteins verantwortlich sind. Aufgrund dieser Flavine erscheint das Protein in der korrekten und somit FMN (Flavinmononukleotid)-bindenden Konformation gelb, ein praktischer optischer Hinweis während der Proteinaufreinigung, ob das Protein da ist oder nicht.

Der Konnektor ist eine α -Helix. Er verbindet die LOV-Domäne mit dem Effektor, einer HTH (helix-

turn-helix)-Domäne. Sie besteht aus vier α -Helices und in dieser Domäne wird im aktivierten Zustand die DNA gebunden. Im Dunkeln bindet die vierte α -Helix der HTH-Domäne an die LOV-Domäne und verhindert somit eine DNA-Bindung.

Das in der LOV-Domäne gebundene Flavin ist lichtsensitiv im blauen Bereich des sichtbaren Spektrums, bei einer Wellenlänge von rund 450nm. Bei Aktivierung löst sich die LOV- von der HTH-Domäne und es bilden sich EL222-Dimere, die wiederum nun DNA binden können. Die Konformationsänderung ist reversibel und das Protein des Wildtyps kehrt innerhalb weniger Sekunden in den Ausgangszustand zurück. Wie genau diese Dimere und die Struktur im aktivierten Zustand als Monomer aussehen, ist nicht bekannt und dies herauszufinden, das Ziel des Projekts. Außerdem ist bisher nicht erforscht, wie affin sich die Monomere zueinander verhalten, wie wahrscheinlich und wie schnell sich also Dimere bilden.

Wir bemühten uns darum, den aktivierten Zustand beschreiben zu können. Es sind verschiedene Modifikationen im Genom des Bakteriums *Escherichia coli* nötig, um am Ende ein Protein zu erhalten, das sich zu Messungen besonders gut eignet. Man verwendet aufgrund der Handhabung im Labor dieses Bakterium und nicht jenes Meeresbakterium *Erythrobacter litoralis*, das ursprünglich das Gen für das Protein EL222 in seinem Genom hat. Das Gen für das Protein wird also für einfachere Proteingewinnung mithilfe eines Vektors in das Genom des *E.coli* eingefügt. Nachdem dies geschehen ist, werden weitere kleine Veränderungen im EL222-Gen benötigt.

Zum einen werden verschiedene Modifikationen vorgenommen, um das Protein für die Messungen zu markieren. Hierfür bedienen wir uns der Induktion von verschiedenen Aminosäuren an bestimmten Stellen der HTH- und der LOV-Domäne, um anhand dieser später mithilfe von Markermolekülen und des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) Abstände zwischen den beiden Domänen messen zu können. Hierzu ist zunächst die genetische Veränderung des Bakteriums, das anschließend das Protein produzieren soll, nötig, und schließlich im Rahmen der Proteinaufreinigung das Anfügen der Labels an den durch die speziellen Aminosäuren vorherbestimmten Stellen. Hierbei fungiert eines der Labels als Donor, das andere als Akzeptor, angeregt wird der Donor in unserem Fall durch blaues Licht der Wellenlänge 562nm. Dieser aktiviert ohne Emission von Licht wiederum den Akzeptor, dessen Absorptionswellenlänge nahe der Emissionswellenlänge des Donors liegen muss. Über die Effizienz der Energieübertragung (auch Förster-Resonanz-Energie-Transfer genannt) kann man den Abstand zwischen Donor und Akzeptor berechnen. Ich verwendete als Labeling BCN-Konjugate, als Donor CF568 und als Akzeptor CF640R. Die Aminosäure, die an die Stellen der falschen Stopcodons transkribiert wird, ist Azidmethylphenylalanin. Die BCN-Konjugate können an das Azid binden und so als Label fungieren.

Zum anderen wollen wir im Folgenden einen verlangsamten Prozess der Rückumwandlung haben, um den aktivierten Zustand in einem längeren Zeitraum messen zu können. Dazu verwendeten wir die Mutante AQTRIP, die vier Mutationen enthält, die dafür sorgen, dass die Rücktransformation in den inaktiven Zustand bis zu eine Stunde dauert. Dieses mutierte Plasmid kann man allerdings erwerben und ich musste es nicht selbst herstellen.

In den ersten Wochen meines Praktikums beschäftigte ich mich hauptsächlich mit der genetischen Modifikation des Bakteriums und mit der Proteinproduktion für ein anderes Projekt, sodass ich die Vorgänge, die ich später brauchen würde, bereits kennenlernte. In meinem Projekt war das Ziel, drei verschiedene Mutationen nacheinander in das Proteingen zu induzieren und am Ende ein Protein mit einem Azidmethylphenylalanin an der Stelle der 29. Aminosäure in der HTH- und einem an 225. Stelle in der LOV-Domäne zu erhalten. Die inkorporierte Aminosäure Azidmethylphenylalanin ist dazu bestimmt, dass Labels an die Azidgruppe binden können, die im FRET Rückschlüsse auf den Abstand zwischen den zwei Domänen ermöglichen. An diesen Stellen fügten wir fälschliche Stopcodons (TAG) ein, um die später zugegebene, künstliche Aminosäure einzubauen. Zusätzlich ist ein Phenylalanin statt des ursprünglichen Tryptophans an 31. Stelle nötig, um die alleinige Interaktion der beiden

Labels miteinander zu garantieren und mögliche Interferenzen mit dieser Stelle im AQTRIP-EL222 zu vermeiden. Das Tryptophan würde womöglich einen Teil der durch den Donor emittierten Energie absorbieren und somit das Messergebnis verfälschen.

Meine Arbeit bestand in der Phase der Mutationsinduktion zunächst aus folgenden Schritten. Als erstes erfolgte eine Mutagenese, um die Mutation in das Zielplasmid zu induzieren. Um die Mutagenese-Probe von noch alter und unveränderter DNA zu bereinigen, benutzt man das Enzym DpnI, das noch methylierte ursprüngliche DNA aus dem Organismus verdaut. Die modifizierten Plasmide werden in diesem Schritt nicht zerstört, da sie keine Methylierung mehr aufweisen. Mit den Plasmiden wird im Folgenden eine Transformation durchgeführt. Meistens machte ich diese mit einer chemischen Manipulation von chemisch kompetenten Zellen mithilfe eines Hitzeschocks. Eine Alternative ist die Elektroporation von elektrokompetenten Zellen. Hier wird das gewünschte Insert durch eine elektrische Manipulation der Bakterienzellmembran in die Zelle gebracht. Abschließend werden Bakterienkolonien mithilfe einer Antibiotikaresistenz, in meinem Fall gegen Carbenicillin, Kanamycin oder Spectinomycin selektioniert und deren DNA sequenziert, um schließlich die richtige Mutante klonen zu können und das Protein zu produzieren. Die Antibiotikaresistenz liegt im Plasmid, das aufgenommen werden soll und dient damit als Selektionskriterium.

Wenn ein korrektes Plasmid isoliert ist, produziert man mithilfe von *E.coli* das gewünschte Protein. Das Prozedere der Proteingewinnung war ziemlich aufwendig und bediente sich verschiedenster Techniken und Methoden, die unterschiedlich effektiv waren. Zunächst wird das Gen des gewünschten Proteins im *E.coli*-Stamm mit der gewünschten Modifikation des Proteins überexprimiert. Danach müssen Zellbestandteile und DNA vom Protein getrennt werden. Das geschieht durch Sonikation, die Tötung der Bakterienzellen durch Schallwellen, und Zentrifugation. In den darauffolgenden Schritten wird das Protein von anderen Proteinen getrennt, herausgefiltert und mit Labels versehen. Über mehr als einen Tag lang erfolgt eine Dialyse, danach verschiedene Zentrifugationen durch Filter, Gelfiltration und schließlich die finale Purifikation in einem speziellen mit einem Filter ausgestatteten Röhrchen. Um die Proteine für Messungen bereitzuhalten, werden verschiedene Verdünnungen des Proteinkonzentrats für Massenspektroskopie, SDS-Page, und FRET bei -80°C eingefroren.

Oft stellten sich die Mutationen als nicht sofort erfolgreich heraus und wir versuchten auf verschiedene Arten, das Genom zu modifizieren. Ich sollte die Reihenfolge der induzierten Mutationen variieren, außerdem sowohl Elektroporation als auch chemisch kompetente Zellen verwenden. Zudem bestand eine andere Möglichkeit in der Veränderung des Experiments. Mit zwei Stämmen mit jeweils nur einer beziehungsweise zwei Mutation könnte man den intermolekularen Abstand eines Dimers messen, statt den intramolekularen Abstand der Domänen eines Monomers mit drei Mutationen. Wenn in dem einen Protein die eine Domäne und im anderen die andere markiert ist, gäbe dies Aufschluss auf die Struktur des Dimers und die Abstände der in ihnen vorkommenden Monomere zueinander. Auch die Kombi von nur LOV- oder nur HTH-Domänen markierten Proteinen zogen wir in Erwägung.

Die Doppelmutation A29TAG und W31F – also das Einfügen eines falschen Stopcodons an 29. Stelle und eines Phenylalanins anstelle eines Tryptophans an 31. Stelle – glückte bald und auch die Mutante I225TAG konnte ich nach vier Wochen isolieren. Damit ich innerhalb meines Aufenthaltes eventuell auch Messungen vornehmen konnte, konzentrierte ich mich nun auf die Proteinproduktion dieser Mutanten, um wenigstens intermolekulare Messungen vornehmen zu können. Des Weiteren versuchte ich, die Tripelmutante herzustellen. Mit ihr könnte man schließlich die intramolekularen Abstände im aktiven Zustand des EL222 AQTRIP Proteins messen. Nach sechs Wochen konnte ich auch diese isolieren.

Gegen Ende meines Aufenthaltes wurde die Zeit für das geplante Experiment, nämlich FRET an der isolierten Tripelmutante des Proteins EL222 zu messen, sehr knapp. Bei der Proteingewinnung lief nicht alles wie geplant und ich musste einige Schritte wiederholen und verlor wertvolle Tage.

Vor allem während der Suche nach einem Vorgehen für die Mutagenese, das Erfolg brächte, wurde mir bewusst, wie zufällig manchmal die Zielfindung in der Forschung ist. Wenn ein Vorhaben im Labor einfach nicht zu realisieren ist, müssen andere Methoden in Erwägung gezogen werden und so beeinflussen Dinge, die man schwer vorhersagen kann – wie beispielsweise, ob die Stelle im Genom, die man sich für die Mutation ausgesucht hat, eine gute Stelle ist – das Ergebnis eines ganzen Projekts. Auch die Proteinproduktion funktioniert nicht bei jeder modifizierten Version des Proteins gleich gut. Alle Schritte müssen angepasst und optimiert werden, bis man eine Vorgehensweise gefunden hat, die ein gutes Ergebnis zur Folge hat.

Eine weitere Schwierigkeit meines Projekts war die Planung, denn die Proteinproduktion nahm sechs bis sieben Tage in Anspruch und manchmal purifizierte ich verschiedene mutierte Formen des Proteins zeitgleich in verschiedenen Schritten des Protokolls. Insgesamt habe ich also sehr viel lernen können, was Planung, Experimentdurchführung und Flexibilität in der Versuchsidee betrifft.

Leider hat am Ende die Zeit nicht gereicht, Fluoreszenzmessungen zu machen, trotzdem waren die acht Wochen sehr spannend und lehrreich.

Während meines Praktikums fand ein dreitägiger Ultrafast Spectroscopy User Workshop am im Nachbarort gelegenen ELI (extreme light infrastructure) Beamlines Komplex statt, an dem ich teilnehmen konnte. Im Rahmen dessen gab es Vorträge und Führungen und ich konnte etwas wie Konferenzluft schnuppern. Es war sehr interessant, einen Einblick in die unterschiedlichen Forschungsfelder der Biologie, Physik und Chemie zu bekommen. Außerdem konnte ich das sich noch im Bau befindende neue „Biolab“ sehen, das in Zukunft mit meiner Arbeitsgruppe am Biocev zusammenarbeiten wird.

4 Fazit

Abschließend kann ich sagen, dass ich das Praktikum trotz teils sehr langer Arbeitstage und einiger Rückschläge bezüglich der Laborergebnisse sehr genossen habe. Ich habe nicht nur sehr viel gelernt, sondern bin auch in den Genuss gekommen, viele nette Menschen kennenzulernen und in einem wunderbaren Arbeitsklima echte Forschung mitzuerleben und zu gestalten. Die Möglichkeiten, einmal selber den Weg in die Forschung einzuschlagen und sich gegebenenfalls sogar eine Promotion zuzutrauen, nahmen deutlich realere Formen an und das Praktikum hat mich nicht nur fachlich sondern auch persönlich weitergebracht. Es hat viel Spaß gemacht, selbstständig im Labor zu arbeiten und sich den Plan eines gesamten Experiments größtenteils eigens zu überlegen. Die Freiheit dazu ergab sich auch daraus, dass mein Chef für knappe drei Wochen im Urlaub war und ich so nach drei Wochen mehr oder weniger auf mich allein gestellt war. Erhofft hatte ich mir lediglich etwas mehr Zeit an spannenden Messgeräten, doch einige werden erst in diesem Jahr geliefert werden und dann auch verwendbar sein. Zudem waren zwei Monate sehr kurz, um innerhalb des eigenen Projekts zu vorbereiteten Proben und Messergebnissen zu kommen. In meinen letzten Wochen wurde es ziemlich stressig und wir versuchten alles, damit ich möglicherweise nach zwei Monaten ein paar Ergebnisse erhalten konnte. Länger war mir jedoch nicht möglich und ich würde es jedem weiterempfehlen, ein solches Praktikum zu machen, auch wenn es nur für acht Wochen ist.