



Doctoral Thesis

## **Folding and stability of the green fluorescent protein and circularly permuted variants**

**Author(s):**

Topell, Simon

**Publication Date:**

2003

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004649527> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 15117

**Folding and stability of the green fluorescent  
protein and circularly permuted variants**

A dissertation submitted to the  
**Swiss Federal Institute of Technology Zürich**

for the degree of  
**Doctor of Natural Sciences**

Presented by

**Simon Topell**

Dipl. Biochem., Eberhard-Karls Universität Tübingen, Germany

born on April 1, 1971

Federal Republic of Germany

Accepted on the recommendation of:

Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner

Prof. Dr. Nenad Ban, co-examiner

2003

## 2 Abstract

The green fluorescent protein from the jellyfish *Aequorea victoria* has become the most widely used reporter molecule in the life sciences over the past few years. While new applications of GFP for monitoring *in vivo* processes employing the protein are developed continuously, almost nothing is known about the intricate folding behavior of the protein and the reason for its exceptional stability.

In this thesis, the folding behavior of the cycle 3 mutant of GFP (GFPuv) was investigated, employing a wide range of experimental techniques from circular permutation experiments to kinetic investigations of the folding and unfolding reactions.

In the first part of the work, the tolerance of GFPuv towards introduction of new termini in its primary structure by circular permutation was investigated. All GFPuv variants with termini introduced in strands of the  $\beta$ -barrel structure, and a significant number of variants with new termini in loop regions connecting the  $\beta$ -strands, were unable to fold to the mature fluorescent form of the protein, indicating a much lower tolerance towards circular permutations than reported for all other proteins investigated so far. Also unusual is the fact that those variants that were able to develop fluorescence and exhibit a spectroscopic behavior identical to the wild-type, showed an almost identical stability as the wild-type, while circular permutation is generally destabilizing in other proteins. Obviously, the exceptional stability of the protein is mainly caused by its unusual chromophore and its position in the centre of the  $\beta$ -barrel of the protein where it can act as a brace that stabilizes the overall protein structure.

---

To investigate this in more detail, the stability and the folding of GFPuv were examined in the second part of the work. For the first time unfolding conditions were found that enabled productive and complete refolding of the protein and therefore allowed a detailed investigation of the folding and unfolding reactions of GFPuv. Unfolding of GFPuv is the slowest unfolding reaction ever reported for a monomeric protein. Even after incubation for 400 days in guanidine hydrochloride (GuHCl) solutions the unfolding equilibrium was not yet attained. This confirms the view that the GFP structure is extremely rigid and unfolding can only proceed if a transition state of unusually high energy is passed. This is presumably due to the stabilization of the protein structure through the interactions between the chromophore and the surrounding  $\beta$ -barrel structure.

To test the influence of the chromophore on GFPuv stability, the folding and unfolding of GFPuv molecules with chemically reduced, non-planar chromophore was investigated. Reduced GFPuv indeed showed a significantly decreased overall solubility and stability of the protein.

Finally the refolding reaction of GFPuv was observed for the first time by stopped-flow fluorescence experiments on a time-scale that allowed detection of a lag-phase in the refolding reaction, which is indicative of a consecutive kinetic folding pathway. The kinetic data obtained so far indicate the presence of at least two folding reactions, presumably due to the presence of an inhomogeneous ensemble of unfolded structures.

### **3 Zusammenfassung**

Das grün fluoreszierende Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* ist in den letzten Jahren zum am häufigsten benutzten Reportermolekül in den biologischen Wissenschaften geworden. Während fortwährend neue Anwendungen entwickelt werden um mit GFP *in vivo* Prozesse zu untersuchen, ist nur sehr wenig über das Faltungsverhalten des Proteins und die Gründe für seine aussergewöhnliche Stabilität bekannt. In dieser Arbeit wurde das Faltungsverhalten der cycle 3 Mutante von GFP (GFPuv) unter Anwendung einer Reihe von Methoden von der Zirkularpermutation bis zu kinetischen Untersuchungen der Faltungs- und Entfaltungsreaktionen untersucht.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Toleranz von GFPuv gegenüber der Einführung neuer Termini in seine Primärstruktur durch Zirkularpermutation untersucht. Alle GFPuv-Varianten mit neuen Termini in Strängen der  $\beta$ -barrel Struktur und eine bedeutende Anzahl von Varianten mit neuen Termini in Loop-Regionen die einzelne  $\beta$ -Stränge miteinander verbinden waren unfähig, zu der ausgereiften fluoreszierenden Form des Proteins zu falten, was auf eine deutlich niedrigere Toleranz von GFP gegenüber zyklischen Permutationen im Vergleich zu anderen in dieser Art untersuchten Proteinen hinweist. Ebenfalls ungewöhnlich ist die Tatsache, dass diejenigen Varianten, die in der Lage waren, Fluoreszenz auszubilden und ein spektroskopisches Verhalten aufweisen, das demjenigen des Wildtyps gleicht, eine vergleichbare Stabilität wie dieser aufweisen, wohingegen zyklische Permutationen in anderen Proteinen im allgemeinen destabilisierend wirken. Offensichtlich beruht die aussergewöhnliche Stabilität des Proteins vor allem auf seinem ungewöhnlichen

---

Chromophor und dessen Position im Zentrum der  $\beta$ -Barrel-Struktur des Proteins, wo er als „Verstrebung“ dient, die die gesamte Struktur des Proteins stabilisiert.

Um dies genauer zu erforschen, wurde die Stabilität und die Faltung von GFPuv im zweiten Teil der Arbeit untersucht. Zum ersten Mal konnten Entfaltungsbedingungen gefunden werden, die eine produktive und vollständige Rückfaltung des Proteins ermöglichen und daher eine detaillierte Untersuchung der Faltung und Entfaltung von GFPuv erlaubten. Die Entfaltung von GFPuv ist die langsamste Entfaltungsreaktion über die jemals im Falle eines monomeren Proteins berichtet wurde. Sogar nach Inkubationszeiten von 400 Tagen in Guanidin Hydrochlorid-haltigen Lösungen wurde das Entfaltungsgleichgewicht nicht erreicht. Dies bestätigt die Ansicht, dass die Struktur von GFP ausgesprochen unflexibel ist und Entfaltung nur dann eintreten kann, wenn ein Übergangszustand von aussergewöhnlich hoher Energie überschritten wird. Dies beruht vermutlich auf der Stabilisierung der Proteinstruktur durch die Wechselwirkungen zwischen dem Chromophor und der umgebenden  $\beta$ -barrel-Struktur.

Um den Einfluss des Chromophors auf die Stabilität von GFPuv zu bestimmen, wurden die Faltung und Entfaltung von GFPuv-Molekülen mit chemisch reduziertem, nicht-planarem Chromophor untersucht. Reduziertes GFPuv zeigte in der Tat eine deutlich verminderte Löslichkeit und Stabilität des Proteins.

Zuletzt wurde zum ersten Mal die Rückfaltungsreaktion von GFPuv mit Stopped-Flow Experimenten auf einer Zeitskala beobachtet, die es ermöglichte, das Vorhandensein einer Lag-Phase zu registrieren, was auf einen konsekutiven kinetischen Faltungsweg hindeutet. Die bisher erhaltenen kinetischen Daten weisen auf das Vorhandensein von mindestens zwei Faltungsreaktionen hin, was vermutlich auf der Existenz einer inhomogenen Population an entfalteten Strukturen beruht.