

Thema:- Einblicke in die molekularen Mechanismen zur Regulierung der Aktivität von Multidomain Proteinen in lebenden Zellen mit Hilfe von FRET-FLIM Untersuchungen

ZUSAMMENFASSUNG

Assoziation und Dissoziation von Makromolekülen sind Schlüsselereignisse in der subzellulären Organisation unterhalb der optischen Auflösungsgrenze. Der Förster/Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) gehört in Verbindung mit der bildgebenden Fluoreszenz Lebensdauer Mikroskopie (FLIM) zu den besten quantitativen Methoden, um diese Ereignisse auf subzellulärer Ebene zu untersuchen. Die FRET-Dynamiken von Tandem Konstrukten, die auf Verbindungen des grün fluoreszierenden Protein (GFP) basierten, wurden in lebenden Zellen mit Hilfe einer Kombination aus FLIM und Fluoreszenz Lebensdauer Mikro-Spektroskopie (FLMS) untersucht mit einer zeitlichen Auflösung von Pikosekunden und einer Spektralaufösung im Nanometerbereich. Die simultane Detektion und Analyse der Intensitätsabnahme von Donor und Akzeptor, die ein System gekoppelter angeregter Energiezustände darstellen, gestattete es, individuelle Lebensdauern zu identifizieren, die bei der Energieübertragung beteiligt waren. Mit dieser Methode war es möglich, die Beteiligung multipler Konformationen des cyan fluoreszierenden Proteins (CFP) bei der Energieübertragung zu dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) nachzuweisen. Hierzu wurden die präexponentiellen Faktoren der einzelnen Lebensdauern über der Wellenlänge aufgetragen; dies führte zu einem sogenannten ‚Decay assoziiertes Spektrum‘ (DAS). Ein Vorzeichenwechsel bei den präexponentiellen Faktoren von positiv nach negativ am Emissionsmaximum des Akzeptors bestätigte FRET bei der multiexponentiellen Lebensdauer Analyse. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnten intramolekulare Energie Transfer Dynamiken von Tandem-Konstrukten unterschieden werden, die sich im Abstand in acht Aminosäuren unterschieden. Diese Ergebnisse gestatteten ein kinetisches Modell für FRET von dem multiexponentiellen CFP zu dem monoexponentiellen YFP zu entwickeln. Dieses bildete die Basis für die Interpretation der Ergebnisse innerhalb verschiedener biologischer Anwendungen mit denselben Fluorophoren im wie zum Beispiel Proteinfaltungen und Konformationsänderungen.

Die Lymphozyten spezifische Protein Kinase (Lck) ist eines der ersten Proteine, welches zu der immunologischen Synapse transportiert wird, was auf eine besondere Bedeutung bei T-Zell Signalkaskaden hindeutet. Ergebnisse aus FRET-FLIM Untersuchungen gestatteten die Hypothese aufzustellen, dass in ruhenden T-Lymphozyten LCK im Gleichgewicht zwischen einer offenen und einer geschlossenen Konformation vorliegt. Die strukturelle Vorhersage aus den FRET-FLIM Untersuchungen befand sich in Übereinstimmung mit der bisherigen Hypothese bezüglich der Struktur von Src Kinasen. Nach Stimulation zeigte Lck in T-Lymphozyten eine vorübergehende reversible Änderung in seiner Konformation vom geschlossenen zum offen Zustand. Diese vorübergehende Änderung korrelierte direkt mit der beschriebenen Kinase Aktivität von Lck, wobei ein initialer Anstieg in der Kinase Aktivität innerhalb der ersten Momente der Bildung einer immunologischen Synapse beobachtet wurde, der innerhalb von 20 Minuten auf die Ausgangswerte zurückkehrte.

Membran assoziierte Guanylatkinasen (MAGUKs) sind Multi-Domain Moleküle von besonderer Bedeutung für die Architektur von verschiedenen Zelladhäsionsgrenzflächen. Das Synapsen-assoziierte Protein 97/human Discs Large (SAP97/hDlg) interagiert mit der SH3-Domäne von Lck mittels einer prolinreichen Region am N-terminalen Ende des Proteins. Das Exon, welches diese prolinreiche Region kodiert, unterliegt alternativem Splicing. Bei Abwesenheit von Lck, sowie bei Expression eines Proteins, dem diese prolinreiche Region fehlte, wurde eine Beeinträchtigung der Lokalisation von SAP97/hDlg an der Grenzfläche zwischen Zelle und stimulierendem Bead in T-Lymphozyten beobachtet. Die Änderungen

Thema:- Einblicke in die molekularen Mechanismen zur Regulierung der Aktivität von Multidomain Proteinen in lebenden Zellen mit Hilfe von FRET-FLIM Untersuchungen

von intramolekularem FRET in der konservierten SH3-HOOK-GUK Einheit am C-terminalen Ende von verschiedenen MAGUKs (SAP97/hDlg und SAP90/PSD95) als Antwort auf erhöhte Ca-Konzentrationen wurde untersucht. Die beobachteten Änderungen wurden als Bildung von parallelen oder anti-parallelen Dimeren beschrieben, welche ein starres molekulares Netzwerk zytoplasmatischer Strukturproteine bilden.

Mittels einer Kombination aus anspruchsvoller mikroskopischer Methoden und zellbiologischer sowie molekularer Modellbildung, wurde die aktivitätsabhängige strukturelle Regulierung und die intramolekulare Assoziation von Multi-Domain Proteinen während der initialen Phase von Zellerkennungsereignissen untersucht. Die vorübergehenden Konformationsänderungen und die aktivitätsabhängige Verteilung von Lck und MAGUKs könnten ein zentraler Schritt im Signaltransduktionsgeschehen sein, welcher die Signale innerhalb der immunologischen Synapse effizient verteilt und gleichzeitig an der Vorbereitung einer dynamischen molekularen Plattform zur Assemblierung von Strukturproteinen in der Nähe der Membran beteiligt ist.