

---

Zusammenfassung zur Dissertation von:

**M.Sc. Physics Jose, Mini**

**EINSATZ VON FRET-FLIM ZUR BEOBACHTUNG VON PROTEIN-PROTEIN  
WECHSELWIRKUNGEN IN LEBENDEN ZELLEN: EINBLICKE IN  
INTERAKTIONEN DES PRÄSYNAPTISCHEN PROTEINS BASSOON**

**ZUSAMMENFASSUNG**

Försters Resonanz Energie Transfer (FRET) in Verbindung mit Fluoreszenz Lebensdauer Imaging Mikroskopie (FLIM) hat sich in den letzten Jahren zu einem hervorragenden Werkzeug zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden Zellen entwickelt. Im Gegensatz zu in vitro-Methoden, welche geeignet sind, das Potenzial von Proteinen für physikalische Interaktionen aufzuzeigen, liefert eine Kombination der oben genannten Techniken hohe räumliche (Nanometer) und zeitliche (Pikosekunden) Auflösung, um Wechselwirkungen innerhalb von Proteinkomplexen in ihrer natürlichen Umgebung zu beobachten. Für die hier beschriebenen Interaktionsstudien wurde ein komplett neues Mikroskopsystem, einschließlich nicht-scannender Detektoren aufgebaut, welches auf dem Prinzip der zeit- und ortskorrelierten Einzelphotonenzählung basiert. Zeit-basiertes FLIM wurde zum Studium von FRET eingesetzt. Die Auftragung der prä-exponentiellen Faktoren bzw. Beiträge der verschiedenen Lebensdauern von Donor- und Akzeptor-Fluorophoren als Funktion der Wellenlänge, (d.h. die sogenannten Decay associated spectra (DAS)) wurde benutzt, um das Vorhandensein von FRET zu studieren. Darüber hinaus lieferte dieser Ansatz Informationen über die Herkunft der individuellen Lebensdauern, die bei der alleinigen Betrachtung der mittleren Lebensdauern weggemittelt werden.

Die entwicklungsabhängige Verschiebung der Chloridionenkonzentration in Neuronen ist sowohl unter neurobiologischen wie auch unter biophysikalischen Aspekten interessant. Im sich entwickelnden Gehirn ist die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Erregung und Hemmung von besonderer Bedeutung. Ferner werden die biophysikalischen Eigenschaften fluoreszierenden Proben durch diese Änderungen signifikant beeinflusst. Ein ratiometrischer Chloridsensor, Clomeleon, der aus dem Cyan-fluoreszierenden Protein (CFP) und einer Chlorid-sensitiven Varianten des Gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) mit Namen Topaz bestand, wurde verwendet, um Veränderungen in der intrazellulären Chloridkonzentration während der neuronalen Entwicklung zu studieren. Mit Hilfe eines multispektralen Ansatzes, bei dem Donor und Akzeptor der Proben gleichzeitig detektiert und analysiert wurden, konnte Resonanz-Energie-Transfer von anderen Reaktionen im angeregten Zustand innerhalb von lebenden hippokampalen Neuronen während der Entwicklung unterschieden werden. In jungen Neuronen wie auch unter sauren pH Bedingungen zeigten die DAS von ECFP drei Lebensdauern in der multi-exponentiellen Analyse, welche von dem ECFP-Chromophor selbst stammten. Diese Ergebnisse veranlassten uns, ein Modell zu entwickeln, das erklärt, wie unterschiedliches Löschen von zwei Konformeren von ECFP geschehen kann. Derartige zelluläre Effekte, welche die Fluoreszenzeigenschaften beeinflussen, müssen bei Untersuchungen von lebenden Zellen berücksichtigt werden, da eine Verkürzung der mittleren Donorlebensdauer oder das Vorhandensein von zusätzlichen Lebensdauerkomponenten sonst als Energietransfer missdeutet werden kann. Clomeleon wurde als optischer Indikator zur Beobachtung der intrazellulären Chloridkonzentrationen in lebenden Zellen mittels Gleichgewichtsreaktionen und Zeit-aufgelöster Spektroskopie benutzt. Dadurch konnte eine direkte Korrelation von FRET in Clomeleon sowohl mit der allgemeinen Reifung von individuellen Neuronen als auch mit der Entwicklung unterschiedlicher subzellulärer Kompartimente gezeigt werden. Clomeleon wurde sowohl als

---

konventioneller ratiometrischer-Indikator als auch als Lebensdauerindikator verwendet. Mit letzterem konnte erfolgreich die direkte Chloridkonzentration in reifen Neuronen mit hohen pH-Werten gemessen werden. Die Ergebnisse halfen ein kinetisches Modell zu entwerfen, welches die Mechanismen bei gleichzeitigem Auftreten von kompetitiven Auslöschungseffekten und Resonanz Energie Transfer in dem gleichen Molekül beschreibt.

Das Verständnis der Abweichungen in den photophysikalischen Eigenschaften von fluoreszierenden Proben legte die Basis für ähnliche Studien von Proteinen, die am Aufbau eines synaptischen Gerüsts beteiligt sind. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf dem präsynaptischen Protein Bassoon, einem Gerüstprotein der Cytomatrix an der aktiven Zone (CAZ). Gegenwärtig wird angenommen, dass vorgefertigte Komplexe, bestehend aus präsynaptischen Gerüstproteinen einschließlich Bassoon, am trans-Golgi Netzwerk zusammengesetzt werden und via elektronendichten Vesikeln (Dense core Vesikeln) zu den Präsynapsen transportiert werden. Mit Hilfe der Immunfluoreszenztechnik konnten wir zeigen, dass ein zentrales Fragment von Bassoon (Bsn1692-3263), welches zur Präsynapse in Neuronen von Primärkulturen transportiert wird, gleichzeitig CAZ-assoziierte Moleküle wie CtBP1 und CAST zu denselben molekularen Komplexen rekrutiert. Die Aufnahme von Zeitserien weisen auf einen Co-Transport dieser Proteine in neuronalen Axonen und Wachstumskegeln zu möglichen Synapsen hin. Ausgehend von unseren vorherigen Beobachtungen, dass sich Ionenänderungen während der neuronalen Entwicklung auf die Eigenschaften der fluoreszierenden Proben signifikant auswirken und aufgrund der Tatsache, dass FRET-Effizienzen ebenfalls stark durch die Anwesenheit von endogenen Interaktionspartnern beeinflusst werden, wurde zunächst eine heterologe Expression in COS-7 Zellen benutzt, um die Beteiligung von Bassoon bei der Bildung von makromolekularen Komplexen einschätzen zu können. Neuronen sind hochspezialisierte Zellen, deren dynamische Natur Schwierigkeiten bei tiefer-gehenden Untersuchungen bereitet, andererseits macht sie dieser Umstand um so interessanter.

Um die Bassoon abhängige Rekrutierung von CtBP1 an unterschiedliche subzelluläre Kompartimente zu untersuchen, wurden die Untersuchungen auf die Beobachtung einer direkten physikalischen Assoziation dieser Proteine mittels einer Kombination von FRET und FLIM in COS-7 Zellen und im trans-Golgi Netzwerk und Synapsen in lebenden Neuronen ausgedehnt. Bei diesen Untersuchungen wurde anstelle des konventionellen FRET-Paares mit Cyan und Gelb fluoreszierendem Protein (CFP-YFP), welche sehr empfindlich auf Umwelteinflüsse reagieren, die kürzlich entwickelten photostabilen Mutanten, nämlich Cerulean und Citrine (Griesbeck et al., 2001; Rizzo et al., 2004), als Donor und Akzeptor verwendet. Obwohl FRET in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten von Zellen beobachtet wurde, ergaben die Ergebnisse Unterschiede in ihrer Transferrate in Abhängigkeit von den Komplexen, mit welchen sie interagierten. Im Gegensatz zu einem publizierten monoexponentiellem Charakter (Rizzo et al., 2004), zeigte Cerulean jedoch ein biexponentielles Abklingverhalten, wenn es in lebenden Zellen exprimiert wurde. Es wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzeigenschaften des Donors signifikant durch die Eigenschaft der fusionierten Proteinkomponente beeinflusst wird. Das Fehlen von jeglichen Abweichungen in den biophysikalischen Eigenschaften von der Donorprobe allein während der neuronalen Entwicklung bestätigte die Photostabilität von Cerulean bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen, was beweist, dass es sich hierbei um einen optimalen FRET Donor handelt.

Obwohl FRET-FLIM Studien in lebenden Neuronen eine große Herausforderung aufgrund der unterschiedlichen zellulären Einflüsse darstellt, ergab die Zeit-aufgelöste Beobachtung unter optimalen Bedingungen mit korrekter Charakterisierung eine enorme Menge an Information im Hinblick auf die zellulären Signalwege, die durch keine andere existierende Methode erreicht werden kann. Daher wurde eine tiefgehende Untersuchung zur Bearbeitung von Fragen bezüglich der photophysikalischen Effekte von ionalen

---

Veränderungen während der neuronalen Entwicklung, sowie der Interaktionen von synaptischen Proteinen, die an der Synaptogenese beteiligt sind, durchgeführt. Diese beinhalteten den Aufbau eines hoch-komplexen Mikroskopsystems wie auch die Charakterisierung von biophysikalischen und biochemischen Eigenschaften von den beteiligten Proteinen, wobei mikroskopische, spektroskopische, biochemisch-molekularbiologische Techniken und Computertechniken zum Einsatz kamen.