Fred S. Wouters

# Molekularphysiologische Untersuchungen zellulärer biochemischer Prozesse





### MOLEKULARPHYSIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZELLULÄRER BIOCHEMISCHER PROZESSE

Habilitationsschrift (kumulatives Verfahren) zum Erlangen der *Venia legendi* am Fachbereich Physiologie der Georg-August-Universität zu Göttingen

> Von Fred S. Wouters Göttingen (2005)

#### **Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <u>http://dnb.ddb.de</u> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2005 Zugl.: Göttingen., Habil.-Schrift, 2005 ISBN 3-86537-573-1

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2005 Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen Telefon: 0551-54724-0 Telefax: 0551-54724-21 www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen. 1. Auflage, 2005 Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-86537-573-1

#### Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Einleitung	7
Die Zelle als Informationsträger Anwendung physiologischer Messmethoden	7 8
Von der Biochemie zur Physiologie	9
Optische Vermessung zellulärer Signaltransduktion14	1
Fluoreszenz Lebensdauer Imaging Mikroskopie (FLIM) 15	5
Membrangebundene Amplifikation der EGF-Signalisierung17	7
Apoptotische Signalisierung: Caspase-Aktivierung19	9
Zelluläre Form- und Funktionsänderungen 20	0
Neuritenwachstum während neuronaler Differenzierung 22	2
Aktinumwandlungsprozesse durch Lipidflottensignalisierung 20	5
Messung der durch Zellmotilität vermittelten Kraft	1
Zelltod und Zytoskelett	4
Meningitis und Zytoskelett	6
Neurodegeneration in Tauopathien	9
Proteinfaltung	5
Ubiquitin-Proteasom mediierter Proteinabbau 49	9
Qualitätskontrollmechanismen bei Proteinaggregaten52	2
Mikroskopische Technologieentwicklung54 Biotechnologische Verbesserung intramolekularer FRET-Biosensoren Verbesserung von FRET/FLIM Analysen Instrumentationsentwicklungen; Automatisierung und Vereinfachung	4 54 58 59
Zusammenfassung	5
Literaturverzeichnis	9
Danksagung7	7

## Abkürzungsverzeichnis

nsL-TP:	non-specific Lipid Transfer Protein
SCP2/X:	Sterol Carrier Protein
GFP:	Green Fluorescent Protein
CFP:	Cyan Fluorescent Protein
YFP:	Yellow Fluorescent Protein
VFP:	Visible Fluorescent Protein
FRET:	Förster Resonance Energy Transfer
FRAP:	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FLIM:	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
Cy:	Indocyanine dye
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR:	Eipidermal Growth Factor Receptor
TCSPC:	Time-correlated Single Photon Counting
NGF:	Nerve Growth Factor
GEF:	Guanine Exchange Factor
GAP:	GTPase- activating Protein
REACh:	Resonance Energy Accepting Chromoprotein
PC12:	Pheochromocytoma cells
PIP2:	Phosphatidyl Inositol 4,5 Bisphosphate
GPI:	Glycosylphosphatidylinisotol
ERM:	Ezrin/Radixin/Moesin
N-WASP:	Neural Wiscott-Aldrich Syndrome Protein
cdYFP:	Chaperone-dependent Yellow Fluorescent Protein
Hsp:	Heat-shock Protein
BAG1:	Bcl2-associated Anthanogen-1
CHO:	Chinese Hamster Ovary Cells
SOD:	Super-oxide Dismutase
LEGO:	Linear Extensions for Good Orientation
TOF:	Time-of-Flight
AOM:	Acousto-optical Modulator
CW:	Continuous wave
CCD:	Charge-coupled Device
CMOS:	Complementary Metal Oxide Semiconductor
LED:	Light-emitting Diode

#### Einleitung

Das tiefere Verständnis für die Funktionsweise der Zelle ist ein wichtiges Ziel in der modernen Zellbiologie. Viele Genprodukte wurden nach der Sequenzierung kompletter Genome katalogisiert, sowie Protein-Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben und unter verschiedenen Bedingungen identifiziert. Die nächste bedeutende Herausforderung ist die Aufklärung der Funktion und der Zusammenhänge dieser einzelnen Bestandteile, die die zelluläre Maschinerie bilden. Im Gegensatz zur dem großen, aber direkten Aufwand ihrer Identifizierung, setzt die Bestimmung ihrer zellulären Rolle voraus, dass die Messungen in lebendigen Zellen und unter physiologisch relevanten Konditionen und Reizen ausgeführt werden. Diese Information ist von großer Bedeutung, was Behandlungsmöglichkeiten bei Krankheiten angeht.

Während der letzten zehn Jahren ist aus der Kombination der klassisch analytischen Biochemie und Histologie/Zellmikroskopie eine neue Disziplin entstanden, deren Ziel es ist, physiologisch relevante molekulare Ereignisse auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Die "molekulare Zellphysiologie" nutzt zunehmend innovative, nichtinvasive spektralmikroskopische Messverfahren und zeichnet sich des Weiteren darin aus, dass die Abbildung relevanter Prozesse immer mehr auf quantitativer Basis interpretiert werden kann. Diese Technologisierung und Fokussierung auf Quantifizierung der biologischen Forschung wird in dieser Habilschrift beispielhaft am wissenschaftlichen Werdegang des Autors geschildert.

#### Die Zelle als Informationsträger

Eine der wichtigsten Eigenschaften der Zelle ist, dass es eine Vielfalt an zellulären Antworten. wie z.B. Differenzierung, Zellteilung, Energiehaushalt und Signalübertragung auf diverse extrazelluläre Signale und verändernde Milieukonditionen geben kann. Diese Antworten müssen kontinuierlich angepasst und mehrere Signale müssen integriert werden, damit die Zelle eine adäquate Antwort produziert. Diese Signalverarbeitung, auch Signaltransduktion genannt, wird von einer hochkomplizierten intrazellulären Maschinerie durchgeführt. Hierbei spielt die regulierte Beteiligung mehrerer Komponenten, über zeitlich und räumlich regulierte Assoziationen, Veränderungen und Aktivitäten eine wichtige Rolle. Die Messung physiologisch relevanter Prozesse setzt voraus, dass die Funktionen in lebendigen Zellen ermittelt werden, damit kausale Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Ereignissen geknüpft werden können. Des Weiteren kann somit eine Beteiligung von verschiedenen Funktionen untersucht werden, während die Zelle den relevanten extrazellulären Einflüssen unterworfen wird. Seit langem gaben klassische analytische, biochemische oder elektrophysiologische Verfahren die einzigen Einblicke in die Wirkungsweise der zellulären Maschinerie.

#### Anwendung physiologischer Messmethoden

Diese Untersuchungen sind aber nicht im Stande, die ganze Palette der zellulären Signaltransduktionsmaschinerie abzudecken. Die Elektrophysiologie, zum Beispiel, beschränkt sich auf Komponenten, die an der Schnittstelle zwischen der Zelle und ihrer Umgebung, der Plasmamembran, aktiv sind. Außerdem sind die Messungen nur in einem beschränkten Zeitfenster anwendbar. Weiterhin erlauben elektrophysiologische Messungen Einzelzell- oder Zell-Ensemble-Observationen, ohne die Möglichkeit, direkt mehrere Zellen simultan zu vergleichen. Auf der anderen Seite ist die analytische Biochemie nur imstande Mischergebnisse vieler Zellen abzutasten, ohne die Möglichkeit diese Ergebnisse zwischen Zellen oder mit anderen Observierungen zu korrelieren. Deswegen beschränken diese Messungen sich primär auf einem Ereignis, anstatt mehrere Parameter abzutasten. Durch innovative optische Methoden werden diese Lücken in letzter Zeit immer mehr aufgefüllt. Insbesondere hat die Entdeckung und Entwicklung von autofluoreszenten Proteinen aus der atlantischen Qualle und einer Reihe von anderen Meeresspezies, wie Korallen und Anemonen, zu einer "Renaissance" in der Fluoreszenzmikroskopie geführt. In Kombination mit standardmolekularbiologischen Techniken ist es jetzt möglich, fast jedes Protein als fluoreszentes Fusionsprotein in einer Vielzahl von Zelltypen und sogar in transgenen Tieren zu exprimieren. Dies erlaubt erstmals, das Verhalten von Proteinen in der Zelle über längere Zeit zu verfolgen. Außerdem erlaubt der Einsatz mehrerer spektral getrennter Varianten dieser Fluoreszensproteine, mehrere Proteine gleichzeitig zu beobachten. Mittels dieser Technologie ist es z.B. gelungen nachzuweisen, was mit den verschiedenen Zellorganellen während der Zellteilung passiert, bzw. es konnte die Aktivität verschiedener Signalketten anhand der stimulusinduzierten Translokation bestimmter angefärbter Proteine in lebendigen Zellen nachgewiesen werden. Die Nützlichkeit zellulärer Bildaufnahmen wurde noch durch den Einsatz von photophysikalischen Prinzipien erweitert, die es dem Experimentator erlauben, gezielte optische Biosensoren für den Nachweis von zellulären Metaboliten oder Botenstoffen zu entwickeln. Aber auch die Beteiligung verschiedener biochemischer Reaktionen in den Signalwegen und die strukturellen Veränderungen von multimolekularen Signalkomplexen (*Signalosomen*) sind jetzt mittels Biosensoren quantitativ nachzuweisen. Mit diesem Gesamtpaket an mikroskopischen Möglichkeiten wächst die neue Disziplin der zellulären molekularen Physiologie (siehe Bunt, 2004; Lange, 2004; Wouters, 2001).

#### Von der Biochemie zur Physiologie

Ziel meiner Doktorarbeit war die Erforschung der physiologischen Funktion des lipidbindenden Proteins "non-specific Lipid Transfer Protein/Sterol Carrier Protein 2" (nsL-TP/SCP2). Dieses Protein liegt in Zellen in zwei Formen vor, einmal als 14 kDa nsL-TP/SCP2, und einmal als N-terminale Fusion mit einer größeren Proteindomäne mit Thiolase-Enzym-Signatur als 58kDa Protein (SCPx). Das nsL-TP Protein wurde zu der Zeit in Utrecht seit zehn Jahren biochemisch auf seine Lipidpräferenz untersucht. Dieses Protein war unglücklich benannt, denn es zeigte eine klare Präferenz für synthetische Phospholipide mit kurzen Fettsäurenketten an sn-2 Position (je kürzer, umso höher die Affinität) und besaß keine messbare Affinität für Sterole in physiologisch relevanten Konzentrationen (Gadella, 1991).

Eins der Projekte bestand darin, die vorgeschlagene Funktion der größeren nsL-TP-Form auf die Darmresorption von in Nahrungsmitteln enthaltenen Sterolen zu überprüfen (Lipka, 1995). Anhand immunzytochemischer und proteinbiochemischer Untersuchungen des Bürstensaums des Darmepithels auf die Lokalisation des nsL-TP/SCPx konnte zwar eine mit Fettmetabolismus übereinstimmende Anreicherung des SCPx in der am aktivsten lipidabsorbierenden, proximalen Region des Darmes (Carey, 1983) mittels Western-Blots wahrgenommen werden. Die Immunoreaktivität des nsL-TP/SCPx ließ sich allerdings nicht an der Darmoberfläche, sondern in punktierter Form in einer klar von der Oberfläche getrennten Zone der Epithelzellen nachweisen (Wouters, 1995). Diese Verteilung kolokalisierte mit peroxisomalen Markern. Damit war eine direkte Rolle bei der Fettresoption ausgeschlossen.

Weitere Untersuchungen an der größeren Form mit eigens zur Erkennung der 44 kDa C-terminalen Thiolase-Domäne hergestellten Antikörpern zeigten, dass die kleinere nsL-TP Form und das SCPx noch auf andere Weise verknüpft waren; eine unbekannte zelluläre Protease spaltet SCPx in ein nsL-TP Fragment, was in Peroxisomen importiert wird, und das 44 kDa Fragment, was daraufhin zur Plasmamembran transportiert wird (Wouters, 1997).

Der Durchbruch der Untersuchung der physiologischen Rolle von nsL-TP/SCPx kam, als während meiner Doktorarbeit am Atheroskleroseinstitut in Münster (Dr. Udo Seedorf) eine transgene Knockoutmaus hergestellt wurde. Der erwartete Phänotyp basierte auf der angeblich sterolbindenden Aktivität. Aber nachdem die Fütterung mit hohen Sterolkonzentrationen keinen Effekt ergab, wurden die Untersuchungen eingestellt. Ich postulierte anhand der bekannten peroxisomalen Lokalisation des Proteins, der Bindungspräferenz für kurzkettigen (sn-2) Phospholipide und der Verbindung mit Thiolase-Enzymaktivität, dass die wahrscheinliche Rolle des nsL-TP darin bestand, peroxisomspezifische Fettsäuren der Enzymkette der peroxisomalen  $\beta$ -Fettsäureoxidation anzubieten. Des Weiteren wurde hypothetisiert, dass diese Präsentationsfunktion innerhalb von SCPx eine Rolle für die peroxisomale Enzymfunktion spielt. Um diese Hypothesen zu testen wurden drei Versuche geplant:

Die Mäuse bekamen die pflanzlichen Vorläufer Phytol im Futter zugemischt, die zur seitenkettenenthaltenen Fettsäure Phytansäure metabolisiert wird. Phytol und Phytansäure sind normalerweise nicht im Standardfutter vorhanden. Seitenkettenenthaltende und sehr langkettige Fettsäuren (>C24) werden ausschließlich in Peroxisomen abgebaut. Nach Zugabe von Phytansäure wurde ein dramatischer Phänotyp sichtbar. Die Mäuse starben alle innerhalb 24 Stunden mit schweren neurologischen Defekten, die den Symptomen bekannter Fettsäure-Speicherkrankheiten entsprachen. Die Mäuse wurden daraufhin ins Labor von Prof. Dr. R.W.A. Wanders am Akademisch Medizinischen Zentrum in Amsterdam überführt. Dieses Labor war spezialisiert auf Prüfungen differenzierter peroxisomaler Enzymaktivitäten aus Gewebebiopsien, die essenziell für die korrekte Diagnosestellung dieser seltenen aber fast immer letal verlaufenden Ursache Erkrankungen ist. Meist liegt die in einer gestörten Proteinimportmaschinerie der Peroxisomen. Als Vorbilder sind das Zellweger's Syndrom und Rhyzomelic Chondrodysplasia Punctata (RCDP) zu nennen. Die Analyse ergab, dass der SCPx-Knockout mit einer deutlichen Reduktion der peroxisomalen Thiolaseaktivität korrelierte. Damit waren die enzymatische Aktivität des SCPxes und deren eindeutige Identifizierung als essentielles Enzym für die β-Fettsäurenoxidation geklärt. Aus diesen Aktivitäten der drei zusammengebrachten Gruppen ist eine Anzahl von Publikationen entstanden (Wanders, 1997; Wanders, 1998; Seedorf, 1998).

Die Bindungsaffinität von nsL-TP für verschiedene peroxisomspezifische verzweigte Fettsäuren sehrlangkettige und wurde in einen In-vitro-Fluoreszenzassay überprüft. Dieser Assay basierte auf einem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen dem Tryptophanrest des nsL-TPs und anthroyloder pyrenenthaltenden Fettsäuren. FRET ist die direkte Übertragung von Energie eines angeregten Fluorophors (Donor genannt, hier: Tryptophan) auf ein zweites Fluorochrom in unmittelbare Nähe (Akzeptor genannt, hier die Anthroyl- oder Pyrengruppe). Diese Übertragung ist extrem abstandsabhängig; es liegt eine Abhängigkeit 6ter Ordnung vor, die bedingt, dass FRET nur bis 10 Nanometer Trennungsabstand zwischen beiden Farbstoffen messbar ist. Der Nachweis von FRET bedeutet folglich, dass sich die fluoreszierenden Biomoleküle in direktem Kontakt befinden. Das Auftreten von FRET bedeutet, dass die Intensität des Donors abnimmt und dass Fluoreszenzemission vom Akzeptor messbar ist, obwohl

ausschließlich der Donor angeregt wird. In puren spektroskopischen Versuchen sind diese Veränderungen eindeutig zu messen, weil die gesamte spektrale Information vorliegt.

Die Messungen wurden entweder mit direkt fluoreszenzmarkierten Fettsäuren oder durch Kompetition dieser Fettsäuren mit unmarkierten Fettsäuren ausgeführt. Es wurde eine Abhängigkeit der Bindungsaffinität von der Kettenlänge und Verzweigung der Fettsäuren nachgewiesen. Daraus konnte die Funktion von nsL-TP in der Abgabe von Substraten und der Wiederaufnahme vom Produkten (Wirtz, 1998; Seedorf, 1998; Dansen, 1999) in der peroxisomalen Enzymkette geschlossen werden und die essentielle Rolle von nsL-TP für den Substrattransport in der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation gezeigt werden.

Der endgültige Test für die Funktion des nsL-TPs war der Nachweis einer direkten Interaktion des Proteins mit den Enzymen der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation. Diese konnte mittels Affinitätschromatographie und FRET in Zellen gezeigt werden (Wouters 1998). Die Affinitätschromatographie wurde über eine Säule aus Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose konjugiert mit gereinigtem, rekombinant hergestelltem nsL-TP ausgeführt. Ein mittels Gradientzentrifugation an Peroxisomen angereichertes Rattenleberhomogenat wurde über die Säule gegeben und der verzögerte Durchfluss von peroxisomalen Enzymen im Vergleich mit peroxisomalen Kontrollproteinen mittels Western-Blots nachgewiesen.

Zur Analyse der Interaktion von nsL-TP mit den jeweiligen  $\beta$ -Oxidationsenzymen wurde wiederum die FRET-Mikroskopie genutzt. Hierfür wurde nsL-TP chemisch mit Cy3 konjugiert, in Fibroblastenzellen mikroinjiziert und die Zellen nach Fixieren mit direkt Cy5-konjugierten Antikörpern gegen die jeweiligen  $\beta$ -Oxidationsenzyme und Kontrollproteine inkubiert. FRET musste mangels spektraler Information in der Mikroskopie in diesem Fall über die Photobleichungszeit des Donors gemessen werden. Diese Untersuchungen fanden im Labor von Prof. Dr. T. Jovin (Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) statt. Die Methode beruht auf der FRET-induzierten Protektion des Donorfarbstoffs vor Photobleichung durch Verlust der Anregungsenergie, die eine photochemische Reaktion auslösen könnte. Die pro Zeiteinheit verbleibende Energiemenge im angeregten Zustand wird verringert, und damit die Chance auf Photobleichung proportional verringert. Zur Messung wird der Donorfarbstoff mit einer stabilen Lichtquelle beleuchtet und in regelmäßigen Abständen die Fluoreszenzintensität gemessen. Die zeitliche Reduktion der Fluoreszenzausbeute wird auf Pixel-zu-Pixel-Basis einer exponentiellen Funktion angepasst, um die Bleichungszeitkonstante für jeden Bildpunkt zu errechnen (die dem präexponentiellen Faktor entspricht). Die Verringerung der Bleichungszeitkonstante ist indikativ für das Auftreten von FRET. Die inverse Bleichungskonstante ist linear abhängig von der Effizienz des FRET-Prozesses. So konnte eine klare Interaktion von nsL-TP mit den Enzymen gezeigt werden, die die von nsL-TP gebundenen Fettsäuren produzieren.

Während dieser Untersuchungen stießen wir auf einen Effekt, der inzwischen als Standard-FRET-Methode eingesetzt wird. In einigen Proben nahm nach Beleuchtung des Donors die Emission zu, bevor sie durch Photobleichung exponentiell abfiel. Wir konnten nachweisen, dass bei hoher FRET-Effizienz und relativer Photolabilität des Akzeptors (was bei Cy5 gegenüber Cy3 gegeben ist), der Akzeptor schneller als der Donor durch Photobleichung entfernt wird. Der resultierende Akzeptorverlust induziert eine Abnahme von FRET, wodurch der Donor seine Energie nicht mehr abgeben und mit uneingeschränkter Emissionsstärke leuchten kann. Unsere Überlegung war, dass man relativ einfach die FRET-Effizienz messen könnte, indem man nach Aufnahme der von FRET betroffenen Donoremission den Akzeptor spezifisch und vollständig durch Beleuchtung mit korrekter Wellenlänge für Akzeptoranregung bleicht und erneut die dann von FRET befreite Donoremission misst. Die Ratio beider Donorbilder entspricht direkt der FRET-Effizienz (Bastiaens, 1997; Wouters, 1998).

Diese Methode, die wir "acceptor photobleaching" nannten, wird momentan häufig wegen ihrer Einfachheit in der Instrumentation und ihrer Artefaktunabhängigkeit genutzt. Nach Erlangen des Doktortitels wurde die wissenschaftliche Arbeit auf die zelluläre optische Messung von biochemischen Prozessen mittels FRET-Mikroskopie ausgeweitet.

#### **Optische Vermessung zellulärer Signaltransduktion**

Gegenstand meiner Postdocarbeit war es, den Mechanismus der EGF-Rezeptoraktivierung mit gegensätzlichen Befunden in der Literatur in Einklang zu bringen. Insbesondere die dogmatische Dimerisierung der Rezeptoren als stabiler Kern der nachfolgenden Signaltransduktion (Gadella, 1995) und die Möglichkeit autokriner und parakriner Aktivierung durch membranständige EGF-Vorläufer (Singh, 2005) waren Gegenstand meiner Untersuchungen. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich verschiedene EGF-Familienmitglieder durch kombinatorische Beeinflussung modulieren können und welchen physiologischen Sinn so eine Modulation haben könnte. Die letzte Frage ist weiterhin Gegenstand der Forschung in meinem ehemaligen Labor.

Zentrales Ziel des Projektes war die Entwicklung eines optischen Verfahrens zum Nachweis der EGF-Rezeptoraktivierung, welches durch Messung der gegenseitigen Autophosphorylierung ligandengebundener Rezeptoren mittels FRET gelöst werden konnte. Dieser Schritt ist das erste definierbare Signal, das der darunter ablaufenden Kinasenkaskade voraus geht.

Die Messung wurde zuerst mit Hilfe der "acceptor photobleaching" FRET-Methode ausgeführt, wofür ein Fusionskonstrukt aus einem C-terminal an den EGF-Rezeptor klonierten GFP generiert wurde. Die Funktion des Fusionsproteins wurde in der NR6 Fibroblastenzelllinie überprüft, die nativ keine EGF-Rezeptoren exprimiert. Nach Zugabe von EGF waren in den NR6-Zellen "Membrane-Ruffles' und eine erhöhte Motilität nachweisbar. In Abwesendheit von EGF-Ligand war außerdem keine im Western-Blot detektierbare Tyrosinphosphorylierung nachweisbar, wobei nach Zugabe eine Phosphorylierung im erwarteten Zeitverlauf gezeigt werden konnte.

Die Methode zur Untersuchung der Autophosphorylierung beruhte auf der direkten Messung der Fluoreszenzlebensdauer des GFP-Donors. Die Fluoreszenzlebensdauer ist die Zeit, die zwischen Aufnahme der Energie in Form von Lichtabsorption und Abgabe der im angeregten Zustand gespeicherten Energie in Form von Fluoreszenzemission liegt. Die Absorption muss dabei den Energieunterschied zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand füllen. Die emittierte Wellenlänge ist aufgrund des geringeren Energiegehalts rotverschoben. Diese Lebensdauer wird durch den molekularen Aufbau des Farbstoffes bedingt und ist somit unabhängig von trivialen Einflüssen, wie Säuregrad oder Salzkonzentration. Des Weiteren ist die Lebensdauer unabhängig von der Farbstoffkonzentration oder der Länge des Lichtwegs, da die Produktionsdauer der Emissionsphotonen, und nicht deren Menge gemessen wird. Diese Eigenschaften erklären, warum Fluoreszenzlebensdauermessungen für die Mikroskopie an Zellen optimal geeignet sind.

#### Fluoreszenz Lebensdauer Imaging Mikroskopie (FLIM)

Dabei liegt der Lebensdauerverringerung der Donorfluoreszenz derselbe Mechanismus wie dem Schutz vor Photobleichung zugrunde; der FRET Prozess entzieht Anregungsenergie vom Donor und zwingt damit das Fluorophor aus dem angeregten Zustand in den Ruhezustand zurück. Hierdurch verringert sich die mittlere Fluoreszenzlebensdauer einer Donorfarbstoffpopulation. Diese Verringerung ist proportional mit der FRET-Effizienz, und damit optimal geeignet für quantitative Messungen von FRET.

Da die Emission von Fluoreszenzphotonen stochastisch verläuft, beschreibt die Fluoreszenzlebensdauer die durchschnittliche Zeit, die benötigt wird um die Anregungsenergie in Fluoreszenzphotonen umzuwandeln. Deswegen kann die Fluoreszenzlebensdauer auch als die Abklingzeit der Fluoreszenz nach einem Anregungspuls definiert werden. Weil die Photonenemission stochastisch verläuft, wird ein exponentiell abfallender Verlauf definiert, deren präexponentieller Faktor gleich der Fluoreszenzlebensdauer ist. Auf diese Art kann die Lebensdauer durch hohe Repetionsraten bei extrem kurzen Anregungspulsen (Femtosekunden) gemessen werden, wobei entweder nur das erste emittierte Photon registriert wird, oder alle nach einem Puls generierten Photonen in Zeitbereichen gesammelt werden. Die erste Methode wird "Zeit-Korrelierte Einzelphotonzählung" (time-correlated single photon counting, TCSPC), die letztere Methode "Zeitsortierung (time-gating)" genannt. Die Zeitsortierung ist ungenauer, weil mehrere Photonen in Sammelbereiche zusammengefügt werden, aber schneller, weil der Photonendurchsatz höher ist. Während meiner Postdocarbeit wurde zusätzlich eine weitere Methode benutzt, die sich wegen höherer Zeitauflösung besser für Messungen an lebendigen Zellen eignet (Frequenz-Domäne FLIM). Bei dieser Methode wird das Anregungslicht nicht pulsiert, sondern kontinuierlich in Intensität moduliert. Meist wird das Anregungslicht durch Einsatz eines optoakustischen Modulators in eine Sinuswelle im Megahertzbereich umgewandelt, die damit einem zeitlich kodierten, gut bekannten Signal entspricht. Die Präsenz einer endlichen Lebensdauer bedingt eine Zeitverzögerung in der resultierenden Fluoreszenzemission. Diese Verzögerung bewirkt eine Verzerrung des zeitlich kodierten Signals, indem eine Phasenverschiebung und ein Amplitudenverlust des modulierten Fluoreszenzsignals gegenüber dem Anregungssignal sichtbar werden. Die Aufgabe besteht darin, diese Verzerrung zu messen. In Gegensatz zu den oben erklärten Messmethoden, die vom Prinzip her Punktmessungen sind, d.h. das Bild wird mittels eines x-y-Galvanometers Linie für Linie abgetastet (z.B. in einem konfokalen Mikroskop). Die Datenverarbeitung besteht deswegen aus einer seriellen Punktverarbeitung, während bei der Frequenz-Domäne-Methode gleichzeitig das komplette Bild (wide-field) bearbeitet wird. Dies ist der Grund für die höhere Zeitauflösung der Lebensdauer gegenüber den anderen Methoden. Die Verzerrung des Emissionssignals wird durch den Einsatz eines Multikanalplattenbildverstärkers ermöglicht, der im Wesentlichen das zeitmoduliert emittierte Fluoreszenzsignal mit dem Anregungsmuster multipliziert und das zeitintegrierte Ergebnis abbildet. Die im resultierenden Bild anwesenden Intensitätsunterschiede sind von der Verteilung der Farbstoffe in der Zelle, aber auch von Phasenverschiebung und Amplitudenverlust

Alle oben genannten Methoden zum Nachweis der Fluoreszenzlebensdauer werden als

abhängig und können auf diese Weise errechnet werden.

ausführlich beschrieben worden in (Esposito, 2004 und in den darin enthaltenen Referenzen).

#### Membrangebundene Amplifikation der EGF-Signalisierung

Für die Messung der EGF-Rezeptoraktivierung wurde eine neue Assaymethode des "dirty" Akzeptors ausgearbeitet. Die Tyrosinphosphorylierung wurde mittels FRET zwischen dem GFP-Farbstoff am genetisch veränderten EGF-Rezeptor und einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper nachgewiesen (Wouters, 1999). Diese Anordnung wird als "dirty" betitelt, weil der Antikörper neben dem aktivierten EGF-Rezeptor auch alle anderen phosphotyrosinenthaltenen Proteine erkennt. In serumdeprivierten Zellen ist dies hauptsächlich die "Focal Adhesion Kinase". In EGF-aktivierten Zellen wird nach Rezeptoraktivierung eine Signalkette aktiviert, die hauptsächlich auf Kinasekaskaden beruht und damit große Mengen an tyrosinphosphorylierten Proteinen produziert. Dennoch kann wegen der extremen Abstandsabhängigkeit des FRET-Prozesses mit Sicherheit die gegenseitige Phosphorylierung der EGF-Rezeptoren bestimmt werden, weil sich die anderen Proteine außerhalb des Operationsradius von FRET mit den EGF-Rezeptoren befinden. Dies bedingt wiederum, dass man die Konzentration des Antikörpers so hoch wählen kann, dass alle Phosphoepitope am EGF-Rezeptor gesättigt sind, ohne auf den Färbungshintergrund achten zu müssen. Dementsprechend ist der Assay extrem sensitiv für die Autoaktivierung der EGF-Rezeptoren.

Diese Methode wurde weiter verbessert, indem man nach der Lebensdauermessung eine gezielte Photobleichung des Akzeptors vornahm und in Analogie mit der "acceptor photobleaching"-Methode eine Kontrolle generiert, wo kein FRET stattfindet. Hiermit ist eine Punkt-für-Punkt Kontrolle für Artefakte, wie die Hintergrundfluoreszenzbeimischung gegeben, wodurch eine hohe Genauigkeit erreicht wird (Wouters, 1999). Nach Etablierung der Methode wurde die fokale Stimulation der Rezeptoren bei Zell-Zell-Kontakt über membranständige EGF-Vorläufer oder aber die polarisierte Ligandbesetzung membranöser EGF-Rezeptoren unter chemotaktischer Zellbewegung in Richtung steigender Ligandkonzentrationen studiert. Eine notwendige methodische Erweiterung war die so genannte "Globale Analyse". Diese beruht auf der Realisierung, dass nicht die FRET-Effizienz oder die Donorfluoreszenzlebensdauer in einem molekularen Erkennungskomplex die biologische Information enthält, sondern vielmehr die relative Konzentration (die Fraktion) der Moleküle, die mit dieser FRET-Effizienz eine Interaktion eingehen. Eine Globale Analyse funktioniert unter der Annahme, dass es in einem FRETenden System nur zwei Lebensdauern gibt; eine Lebensdauer für die nicht akzeptorgebundenen Donormoleküle, und eine mit einer gewissen (aber grundsätzlich arbiträren) FRET-Effizienz und verringerten Lebensdauer. Des Weiteren wird bei Globaler Analyse angenommen, dass die an jedem Punkt gemessene Lebensdauer durch lineare Kombination von diesen zwei grundsätzlichen Lebensdauern gegeben wird, und dass diese lokalisationsunabhängig sind, d.h. dass es keine unterschiedlichen Einflüsse innerhalb der Zellen gibt, die an bestimmten Stellen die Lebensdauern verändern können.

Die fokale Stimulation wurde durch Inkubation von GFP-markierten EGF-Rezeptorexprimierenden Zellen mit 1 Mikrometer großen Kügelchen, die kovalent mit dem EGF-Ligand konjugiert worden waren, erzeugt. Der Durchschnittsabstand der EGF Moleküle auf den Kügelchen betrug etwa 5 Nanometer, so dass zu erwarten war, dass die EGF-Rezeptoren, die die für Aktivierung notwendige Dimerisierung ausführen können. Erstaunlicherweise erfolgte direkt unterhalb der Kügelchen eine Rezeptoraktivierung, die sich in Sekundengeschwindigkeit wellenförmig über die nicht EGF-besetzten Rezeptoren der ganzen Zelle ausbreitete. Nach einer Minute Stimulation, auch mit nur einem Kügelchen pro Zelle, wurde mittels Globaler Analyse festgestellt, dass die gesamte Population der Rezeptoren aktiviert worden war. Koexpression eines (unmarkierten) EGF-Rezeptor- Familienmitglieds, das keine aktive Kinasedomäne enthielt, ErbB3, konnte die vollständige Aktivierung der GFPmarkierten EGF-Rezeptoren nicht aufhalten. Diese Resultate lassen zwei Aussagen zu: i) EGF-Rezeptoren können auch ohne Ligandenstimulation aktiviert werden, und ii) die für die Aktivierung notwendige Dimerisierung muss reversibel sein, da sonst ein Teil der GFP-markierten EGF-Rezeptoren durch irreversible Interaktion mit dem zugegebenen kinaseinaktivierten ErbB3 vor Aktivierung geschützt sein würde. Der Mechanismus dieser Aktivierungswelle entfernt von kugelbeladenen Membranoberflächen wurde weiter untersucht. Es konnte ausgeschlossen werden, dass eine unterhalb des EGF-Rezeptors gelegene Kinase durch "inside-out" Aktivierung die intrazelluläre Domäne der EGF-Rezeptoren phosphorylierte. Sogar permeabilisierte deren zytoplasmatischer Inhalt entfernt worden war, zeigten Zellen, die Aktivierungswelle, und die pharmakologische Inhibition der Src-Kinasen, dem wahrscheinlichsten Kandidaten für so eine Umkehraktivierung, zeigte keine Wirkung. Inhibition der intrazellulären Phosphatasen führte dagegen zu einer verstärkten Aktivierungswelle (Verveer, 2000). Der Mechanismus dieser "lateralen Signaltransduktion", der dem ersten Amplifikationsschritt des EGF-Signalwegs entspricht, beruht somit auf einem durch intrazelluläre Phosphatasen eingestellten Schwellenwert. Wenn diese aktivierungsinhibierende Aktivität aber durch fokale Aktivierung lokal aufgehoben wird, wird eine Membrankaskade induziert, die nicht mehr aufzuhalten ist. Diese Aktivierungmethode ist für die Effekte von EGF auf Wachstum und Differenzierung ideal, ruft aber Fragen bezüglich Chemotaxis auf. Wenn die Zelle innerhalb einer Minute "vergisst", woher die Stimulation kam; was passiert innerhalb der kritischen ersten Momente, in denen die Zelle eine polarisierte Motilität etabliert? Diese Frage ist bisher ungelöst. Am ehesten bedingt die ligandenstabilisierte Dauer der Dimerisierung bei hohen Ligandenkonzentrationen, dass nur bestimmte Effektoren und Adapterproteine rekrutiert werden.

#### Apoptotische Signalisierung: Caspase-Aktivierung

Des Weiteren wurde an der Entwicklung neuer FRET-Biosensoren für die Vermessung von biochemischen Veränderungen von Zellen bei Apoptose mitgearbeitet. Diese Sensoren waren mit die ersten, die in einem Sensormolekül sowohl Donor- als auch Akzeptorfarbstoffe in einer Eins-zu-Eins-Stöchiometrie enthielten. In diesem Fall wurden caspasenerkennende Sequenzen zwischen cyanen und gelben spektralen Varianten des GFPs platziert, so dass diese Konstrukte FRET verlieren, wenn diese apoptotischen Proteasen aktiviert werden. Die genauen spektralen Konditionen in solchen Konstrukten macht sie momentan sehr populär, weil spektrale Kontaminationen bei einfachen, intensitätsbasierten FRET-Mikroskopiemethoden konstant gehalten werden können. Für uns war diese Ausnahmesituation ideal geeignet,

um ein neues FRET-Verfahren zu etablieren und zu validieren. Eine Bedingung bei der Auswahl geeigneter Kombinationen von FRET-Farbstoffen ist, dass die im angeregten Zustand des Donors anwesenden Energiemenge, die mittels FRET abgegeben werden können, mit der energetischen Kapazität des Akzeptorgrundzustands übereinkommt. Spektral heißt dies, dass das Emissionsspektrum des Donors (was die Mengen an verfügbarer Energie widerspiegelt) sich mit dem Exzitationsspektrum des Akzeptors überlappt. Weil die genetisch kodierten Farbstoffe der GFP-Familie relativ breite Fluoreszenzspektren bei nur geringer Rotverschiebung der Fluoreszenz besitzen (kleiner "Stoke's shift"), bedeutet dies, dass man nicht gleichzeitig die Konditionen einer optimalen Überlappung und spektral getrennten Wahrnehmung des Donors erreichen kann. Die aktuell benutzten Sensoren enthalten deswegen fast immer die Kompromisslösung CFP-YFP. Unsere Methode beruht darauf, dass man die gesamte Mischfluoreszenz von Donor und Akzeptor misst, so dass man Paare mit größerer spektraler Überlappung wählen kann, die damit eine höhere FRET-Effizienz besitzen. Die Mischfluoreszenz eines solchen GFP-YFP-Paares zeigt eine deutlich identifizierbare Erhöhung der Lebensdauer, wie sie mit spektral getrennten FRET-Paaren nicht zu erreichen ist (Harpur, 2001). Diese neue Methode wurde in einem "proof-of-principle" Experiment eingesetzt, wobei die zeitliche Heterogenität der Caspaseaktivierung in einer Population Zellen unter Aktivierung des Fas-Todesrezeptors nachgewiesen werden konnte.

Eine weitere Verbesserung dieser Grundidee war Gegenstand der jetzigen Forschungsaktivitäten und wird hierunter beschrieben.

#### Zelluläre Form- und Funktionsänderungen

Nervenzellen sind besonders stark polarisiert und bilden deswegen ein ideales Versuchsmodell für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Form und Funktion. Die zelluläre Form wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel von Zytoskelett und Aktinomyosin-Motorsystem bestimmt. Das Zytoskelett besteht aus hauptsächlich zwei Komponenten, die beide ständig als Antwort auf veränderte Umweltkonditionen umgewandelt werden; das Aktinsystem bildet das Grundgerüst der Zelle und bewirkt die Anheftung myosinbasierter Motoren, die es der Zelle erlauben, individuelle Aktinfasern ("Stress fibers") gegeneinander zu verschieben. Damit wird Kraft aufgebaut, die es der Zelle erlaubt, neue Membranterritorien auswachsen zu lassen und sich entlang dieses neu gewonnen Terrains zu bewegen. Das Aktinfasersystem adaptiert sich und folgt im Aufbau den Kraftlinien, die in der Zelle herrschen, vergleichbar dem Skelettbalkenaufbau. Die Punkte, an denen die Zelle sich strukturell anhaftet, befinden sich auf den Kreuzungen dieser Kraftlinien, den so die morphologisch oft genannten Tensegritätspunkten, mit spezialisierten Membrangebilden, den fokalen Adhäsionen zusammenfallen. Die primäre Aufgabe des Mikrotubulisystems besteht darin, motormediierten Transport von Vesikeln und Organellen zu peripher gelegenen Zellgebieten zu ermöglichen, da es die dafür notwendigen "Schienen" darstellt. Die einzig bekannte große Umwandlung des Mikrotubulisystems geschieht während der Zellteilung, wobei stabilisierte und gebündelte Mikrotubulifasern die Chromosomen auseinander ziehen, um sie auf die Tochterzellen zu verteilen (Rieder, 2004). Diese Konstellation ist in adulten, ausdifferenzierten Nervenzellen physiologisch nicht vorhanden.

Die Wechselwirkung zwischen beiden Systemen ist notwendig, um z.B. neue Membrandomänen mit Proteinen und Organellen zu versorgen. In Nervenzellen ist das Auswachsen von Neuriten, d.h. ein langes Axon und viele Dendriten, ein Merkmal der Differenzierung und stellt damit eine extreme Umwanderung der Zelle da. Die Funktionstrennung beider Systeme ist bei axonaler (Re-)Generation am besten zu beobachten; die Mikrotubuli befinden sich in der Mitte des Axons und bilden damit die Grundlage für effizienten Transport über, im Vergleich zur Zellgröße, extrem lange Abstände. Am wachsenden Ende fächert sich das Axon in den so genannten Wachstumskegel ("growth cone") aus. Hier bleiben die Mikrotubuli im zentralen Bereich, während in peripheren Bereichen ein dichtes Geflecht von Aktinfasern gebildet wird. In diesem System, aber auch erkennbar in analogen Konditionen, vollzieht sich die Mikrotubuli-Depolymerisierung immer gleichzeitig mit der Aktinpolymerisierung (Gallo, 2004).

Die Zielsetzungen der Gruppe sind die Identifikation und das Studium der Signaltransduktionswege zur Umwandlung oder veränderten Wechselwirkung dieser Zytoskelettsysteme. Hierbei wird auf verschiedenen Ebenen gearbeitet: i) Neuritenwachstum während neuronaler Differenzierung, ii) Zelluläre Motilität und iii) Neurodegeneration.

Diese Gebiete werden nachfolgend beschrieben. Neurodegeneration bietet Einblicke in die gestörte Koordinierung des Zytoskelettsystems. Die verschiedenen Modellsysteme für neurodegenerative Erkrankungen, die wir im Labor etabliert haben, verschaffen uns den Vorteil, die Signalisierungsabläufe unterhalb der von uns eingebrachten, definierten Erkrankungsstimuli studieren zu können.

#### Neuritenwachstum während neuronaler Differenzierung

PC12-Zellen werden als Modellsystem für neuronale Differenzierung benutzt, weil das mit Differenzierung assoziierte Neuritenwachstum auf einfache Weise zu induzieren ist. Inkubation der Zellen in der Anwesendheit von "Nerve Growth Factor" (NGF), einem neuronspezifischem Wachstumsfaktor, führt zu starkem Neuritenwachstum innerhalb weniger Tage. Wie oben besprochen, ist hierfür folgendes notwendig: i) Aktinfasern müssen gebildet werden, um die Membran auszustülpen, ii) Mikrotubuli müssen zurückgebildet werden, um die Aktinpolymerisierung zu ermöglichen. Logischerweise sind für die Bildung langer Neuriten auch neue Membranlipide notwendig, die an der richtigen Stelle inkorporiert werden müssen. Aus Hefe ist bekannt, dass Membranaddierung über den so genannten Exozystkomplex verläuft, einem makromolekulären Komplex bestehend aus acht individuellen Komponenten, Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 und Exo84. Dieser Komplex wird über Mikrotubuli an Membranstellen transportiert, wo er Membranareale markiert, an denen neue Membran addiert werden soll (Clandinin, 2005; EauClaire, 2003). Ob dieses System, was hochkonserviert in fast allen Zelltypen mehrerer Spezies vorliegt, in Nervenzellen die gleiche Rolle spielt, ist unklar. Bekannt ist, dass die Differenzierung von Fettzellen (Adipozyten), die mit der Membranexposition des Glukosetransporters korreliert, dem Exozyst unterliegt (Inuoue, 2003). Auch wurde beschrieben, dass der Exozyst für die Neuritogenese notwendig ist, der genaue Mechanismus bleibt aber weiterhin unklar (Vega, 2001).

Überexpression verschiedener Anteile des Exozysts führte bei Exo70 zu deutlicher Filopodienbildung. Auch war Exo70 eindeutig membrangebunden. Wir vermuteten deswegen, dass Exo70 allein für die Initiierung des Membranauswachsens ausreicht. Differenzierung Exo70-exprimierender PC12-Zellen mittels NGF-Zugabe führte zu massivem Membranauswachsen, indem die zelluläre Oberfläche zunahm und sich viele Filopodien und längere Neuriten bildeten. Deletion einer kleinen Domäne am C-Terminus konnte diesen Phänotyp vollständig aufhalten. Färbung der Mikrotubuli und Aktinfasern zeigte eine kortikale Rückbildung der Mikrotubuli und eine Auffüllung dieser geräumten Bereiche mit polymerisiertem Aktin. Solche Zytoskelettumwandlungen korrelieren fast immer mit der Aktivierung kleiner membrangebundener GTPasen. Die GTPasen bilden einen molekularen Schalter, indem sie in zwei funktionell unterschiedlichen Formen auftreten können, einmal mit gebundenem GDP in der inaktiven Form und einmal mit gebundenem GTP in der aktiven Form. In der GTP-beladenen Form erlaubt die GTPase die Bindung spezifischer Effektorproteine, die die Kaskade zur Zytoskelettumwandlungsmaschinerie initiieren. Die Aktivierung der GTPasen erfolgt über den Austausch von GDP durch "Guanine Exchange Faktoren" (GEFs), die unmittelbar unter der Kontrolle membranständiger Rezeptorsysteme steht. Die GEFs vermitteln deswegen die Interpretation veränderter Umweltfaktoren in biochemische Signalketten. Die Inaktivierung erfolgt durch "GTPAse aktivierende Proteine (GAPs)" über Stimulation der intrinsischen GTPase-Aktivität der GTPasen, was das gebundene GTP wieder zu GDP abbaut. Aufgrund von Literaturinformationen erwarteten wir die Beteiligung von GTPasen der TC10-Familie (bestehend aus einer α- und β-Form). Der Effekt der Überexpression von dominant-negativen und konstitutiv-aktiven Formen dieser TC10-GTPasen führte in beiden Fällen zu einer Reprimierung des Membranauswachsens. Der Membranwachstumsphänotyp wurde mittels einer morphometrischen Analyse objektiv quantifiziert, indem der zelluläre Umriss mit der Oberfläche verglichen wurde. Gezieltes "Mistargeting" der GTPasen durch Deletion des Membranankers führte ebenfalls zu einer signifikanten Reprimierung.



Abbildung 1: Interaktion zwischen TC10 und Exo70 wurde mittels FRET Bilder nachgewiesen. Die zeigen Kontrollproben ohne Akzeptorexpression (links), und representative Beispiele der verschiedenen Konditionen (rechts). Nur nach Zugabe von NGF interagieren beide Proteine (niederige Lebensdauer, blaue Farben). Die Kurven zeigen die kumulative Verteilung der Lebensdauern und die daraus errechneten FRET-Effizienzen von 10 Zellen. Die Konditionen entsprechen den im oberen Bereich angegebenen Ziffern.

Diese Resultate erlauben die Interpretation, dass überexprimierte TC10-Varianten zu einem Mistargeting führen, so dass das Exo70 seine korrekte Funktion nicht an der korrekten Stelle an der Plasmamembran ausführen kann. Dies bedeutet wiederum, dass es bestimmte bevorzugte Membrandomänen gibt, an denen diese Stimulation stattfindet. Der eindeutige Beweis, dass TC10 die verantwortliche GTPase ist, folgte aus der Beobachtung, dass mittels FRET eine NGF-abhängige Interaktion von fluoreszenzmarkiertem Exo70 mit fluorezenzmarkiertem TC10 und konstitutiv-aktivem TC10 nachgewiesen werden konnte (Abb. 1). Die Spezifität folgt aus der fehlenden Interaktion mit der dominant-negativen Form des TC10. Neben der NGF-induzierten Interaktion ist somit die richtige molekuläre Umgebung notwendig, um den weiteren Signalisierungsablauf zur Membranausstülpung zu ermöglichen.

Es gibt zwei bekannte Membrandomänen, die bei der Signalübertragung unterschiedliche Funktionen hervorrufen können; so genannte Lipidflotten ("lipid rafts") und Domänen, die prenylierte Proteine enthalten. Die erste Art der Membrandomänen ist am besten untersucht worden. Lipidflotten enthalten Rezeptoren, aktinbindende Proteine, GTPasen und andere Effektoren, insbesondere solche, die einen direkten Effekt auf kortikale Aktinumwandlung haben. Die Flotten sind in der äußeren Membranschicht mit Cholesterin und Gangliosiden angereichert, und an der inneren Seite reich an Phosphatidylinositol-Bisphosphat-Phospholipiden (PIP<sub>2</sub>). Proteine können über eine Acylierungsreaktion, d.h. das kovalente Anheften von Lipiden, in diesem Fall ein GPI- ("Phosphatidylinositol glycane") Anker, in die äußere Schicht eingebaut werden. Proteine können auch über Acylierung, in diesem Fall hauptsächlich mit Palmitat und Myristoylat, oder Interaktion mit Lipidflottenproteinen, in die innere Membranschicht eingebaut werden. Die große Menge an möglichen membraninkorporierbaren Proteinen und der intrinsisch kleine Durchmesser der Lipidflotten (<10 Nanometer), bedingt, dass diese Lipidflotten in Bezug auf den Proteingehalt heterogen sind. Dies wiederum bedingt, dass Flotten in der zellulären Signaltransduktion zwei wichtige Funktionen erfüllen; i) Die Konzentration von Rezeptoren und Effektoren auf kleiner Fläche hilft, die Reaktionsgeschwindigkeit der Signalosomen zu steigern, weil keine Diffusion der einzelnen Komponenten der Signalmaschinerie stattfinden muss, also eine Verstärkerfunktion, und ii) die unterschiedlichen Kombinationen von Komponenten sorgt für eine lokale Spezifität für eine bestimmte Signalkaskade, also eine Filterfunktion.

Die erste Untersuchung der möglichen Beteiligung von Membrandomänen war die Messung von FRET zwischen CFP- und YFP-markiertem Exo70. Es konnte eine deutliche Interaktion gezeigt werden, die durch Cholesterinentfernung mittels Inkubation der Zellen mit  $\beta$ -Cyclodextrin nicht beeinträchtigt wurde. Die letztgenannte Behandlung zerstört Lipidflotten und sorgt für eine Verteilung der Proteine aus den Lipidflotten über die ganze Membran. Die Interaktion zwischen Exo70-Molekülen durch Oligomerisierung und/oder der Konzentration innerhalb kann der Membrandomäne erklärt werden. Bei Prenylierungsdomänen und Lipidflotten ist bekannt, dass die lokale Konzentration an Proteinen so hoch ist, dass "Konzentrations-FRET" auftreten kann (Zacharias, 2002), eine Ausnahmesituation, die nur erreicht wird, weil ein aktiver Konzentrationsprozess vorliegt, der viele Moleküle in die zweidimensionale Fläche der Membran "presst". Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde FRET zwischen CFP-Exo70 und doppelt myristoyliertem/palmitoyliertem YFP oder prenyliertem YFP gemessen. Nur wenig FRET wurde mit Myr/Palm-YFP gefunden, dagegen aber viel mit dem prenylierten YFP. Die Schlussfolgerung ist, dass das Exo70 sich hauptsächlich in prenylierten Domänen befindet.

Der N-WASP-Komplex vermittelt Aktinpolymerisierung an der Membran. Wir konnten nachweisen, dass dominant-negatives N-WASP das Membranauswachsen effektiv supprimierte. Des Weiteren wurde ein FRET-basierter Biosensor für N-WASP-Aktivierung eingesetzt, um zu zeigen, dass der Exo70-TC10 Komplex, der unterhalb der NGF-Stimulation gebildet wird, tatsächlich N-WASP aktiviert. Dieser Biosensor besteht aus dem N-WASP-Protein, flankiert von CFP- und YFP. N-WASP ist durch interne Interaktion zwischen N- und C-terminalen Domänen autoinaktiviert. Nach Bindung durch GTP-enthaltende (aktive) GTPasen öffnet sich der Biosensor und N-WASP entfaltet seine enzymatische aktinpolymerisierende Aktivität. Die Empfindlichkeit dieses Biosensors gegenüber TC10 wurde überprüft, indem in Zellen konstitutiv-aktive und dominant-negative Formen der TC10-GTPasen überexprimiert wurden. Interessanterweise reagierte der Biosensor in umgekehrter Weise auf TC10 und andere GTPasen, wie Rac und Cdc42, die auch nach Differenzierung aktiviert werden. Dies ermöglichte es uns, die spezifische Aktivierung von N-WASP durch die Signalkette NGF-Exo70-TC10-NWASP zu beweisen (Pommereit, 2005).

#### Aktinumwandlungsprozesse durch Lipidflottensignalisierung

Mechanismen der Beteiligung Die grundlegenden von Lipidflotten am Membranzuwachs durch Aktinumwandlungsprozesse wurden mittels FRET-Mikroskopie und spezieller Biosensoren untersucht. Aufgrund verschiedener Beobachtungen an Immunsynapsen zwischen B- und T-Zellen (Viola, 1999; Burack, 2002) und Zell-Zell-Kontakt-mediierter Fusionierung von Zellerkennungsrezeptoren (Malhotra, 1998) ist anzunehmen, dass unter bestimmten Konditionen Lipidflotten fusionieren können, um neue Signalaktivitäten in der Zelle auszulösen. Dabei werden kleine so genannte non-Rezeptor-Kinasen aktiviert, beziehungsweise kortikale Aktinverflechtungen erzeugt, die als so genannter "Konnektorkomplex" die strukturelle Stabilität zweier aneinander haftender Zellen gewährleistet.

Die strukturelle Individualität der Lipidflotten wird durch eine direkte Interaktion membrangebundener Proteine mit der Plasmamembran innerhalb der Lipidflotten gewährleistet (Sheetz, 2001). So wird zum Beispiel das PIP<sub>2</sub> als Anker für die Kopplung an Proteine der ERM (Ezrin, Radixin, Moesin) Familie benutzt, und bindet Proteine wie Ankyrin und Transmembranproteine. Außerdem ist bekannt, dass bei axonaler Regeneration und EGF-mediierter Zellmotilität in Lipidflotten PIP<sub>2</sub> gebundene Aktinspaltungs- und Aktindepolymerisierungsenzyme vorhanden sind. Bei axonaler Regeneration ist der erste Schritt, der der Aktinpolymerisierung vorausgeht, die Freisetzung der aktivierten Aktinprotease Calpain (Spira, 2003). Dagegen wird bei EGF-Stimulation außerdem das aktindepolymerisierende ADF/Cofilin und das aktinfaserspaltende Gelsolin freigesetzt (Azuma, 1998). Diese Vorgänge sind unerwartet, wenn bedacht wird, dass das Ziel der Signalsaktivierung eine massive Aktinpolymerisierung ist. Es wird angenommen, dass der Grund für diesen Aktinabbau darin zu sehen ist, dass freie Enden an Aktinfasern generiert werden, worauf die aktive Aktinpolymerisierungsmaschinerie neue Aktinmonomere anbauen kann. Wir vermuteten, dass dies außerdem die individuellen Lipidflotten von deren Aktinzytoskelettverankerung freisetzen könnte. Da die Erstehung der Lipidmikrodomäne auf dem physischen Prozesses der Phasentrennung der beinhalteter Lipidarten beruht, ist zu erwarten, dass eine Entkopplung zur spontanen Fusion führt. Wie schon besprochen, können Lipidflotten als membranständige Signalverstärker und -filter betrachtet werden. Die Bildung größerer Flottenareale in der Membran ist deswegen wahrscheinlich an verstärkte und weniger spezifische Signalisierung gekoppelt, die zum Beispiel zur Aktinpolymerisierung führen (Abb. 2). Die Wiederherstellung der Aktinkopplung von Lipidflotten durch gesteigerte Konzentration von polymerisiertem Aktin und die Aktivität des Aktinomyosinmotorsystems würde diesen Fusionsprozess zeitlich begrenzen, weil es die vergrößerten Lipidflotten zerreißen würde. Die enthaltenen Komponenten würden sich auf Grund ihrer gegenseitigen Bindungsaffinität wieder auf die neu gebildeten, individuellen Lipidflotten verteilen.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Lipidflottenfusionierung unter Einwirkung aktiv freigestetzter aktin-dissoziierender Enzyme und gleichzeitige Proteinentkopplung von membranständigem PIP<sub>2</sub>. Unter Ruhebedingungen sind Lipidflotten mittels zytoskelettärer Verankerungen von der Fusionierung ausgeschlossen und bewirken eine lokale Signalisierung (oben). Nach Fusionierung werden Lipidflottenareale mit veränderter Signalisierungswirkung gebildet (unten).

Um diese Hypothese zu testen haben wir einen Biosensor entwickelt, um Fusion der Lipidflotten in Zellen abbilden zu können. Dieser Sensor beruht auf ausgewählten Paaren Lipidflotten-"getargeter" Proteine, die mit CFP und YFP markiert wurden. Die Paare, die unter Ruhebedingungen keinen nachweisbaren FRET aufwiesen, befinden sich also in individuellen, physisch von einander getrennten Lipidflotten, weil der vorher beschriebene "Konzentrationseffekt" sie soweit zusammengedrückt hätte, das FRET zu messen wäre (Zacharias, 2002). Wenn Fusion stattfindet, finden sich diese Markerproteine zusammen und können FRET eingehen. Diese Messungen wurden mit der vorher erwähnten FLIM-Methodik ausgeführt. Geeignete Paare wurden sowohl für die Innen- wie die Außenseite der Flottenmembran definiert: Flottilin2 und myristolyliertes/palmitoyliertes VFP (visuelles Fluoreszenzprotein) in Kombination mit der non-Rezeptor-Kinase Fyn für die Innenseite und GPI-GFP mit der Alexa548-Choleratoxine-β-Untereinheit. Der letzte Marker bindet Ganglioside und vermittelt keine biologischen Effekte, die das Holotoxin erzeugen würde.

Diese Paare wurden in ruhenden und EGF-stimulierten Zellen gemessen. Es stellte sich heraus, dass alle Kombinationen der drei intrazellulären Markerproteine nach EGF-Stimulation FRET zeigten, d.h. dass die anfangs getrennten Lipidflotten fusioniert hatten. Da die drei Proteine sehr unterschiedliche Funktionen haben, und das Myr-Palm-VFP ein völlig synthetisches Produkt ohne physiologische Relevanz darstellt, ist es wahrscheinlich, dass die Lipidflottenfusion ein fundamentales Ereignis ist, das unterhalb von EGF Stimulation abläuft. Tatsächlich war die Fusionierung von kurzer Dauer, da maximaler FRET nach einer Minute auftrat, was in Übereinstimmung mit der Ausbreitungsgeschwindigkeit der vorher beschriebenen EGF-Rezeptorstimulation steht. Nach zwei Minuten verringerte sich der FRET und war nach vier Minuten nicht mehr nachweisbar. Interessanterweise reagierten die äußeren Membranmarker während dieser Stimulation nicht.

Die Mechanismen dieser Fusionierung wurden durch Inkubation der Zellen mit den Antibiotikum Neomycin weiter untersucht. Neomycin sättigt durch hohe Affinität für PIP<sub>2</sub> alle Bindungsstellen für aktinbindende Proteine an der Innenseite und durch PIP<sub>2</sub>-Interaktion inhibierte Aktindegradierungsenzyme. Die Membran wird vom Aktinzytoskelett losgelöst und die aktindegradierenden Enzyme werden in aktiver Form freigesetzt. Diese doppelte Funktion müsste also die Fusionierung auch in Abwesendheit eines physiologisch relevanten Stimulus erzeugen können, wenn Aktinverankerung der Mechanismus der Lipidflottentrennung ist. Tatsächlich wurde eine transiente FRET-Interaktion von Flotillin-2 und Myr-Palm-VFP mit dem gleichen zeitlichen Ablauf wie nach EGF-Stimulation nachgewiesen. Dies verlief parallel mit dem korrelierten lokalen Auswachsen von größeren Membranflächen zwischen präexistierenden Filopodien (Abb. 3). Wiederum konnte bei Markern für die Außenseite keine Fusionierung nachgewiesen werden.



Abbildung 3: Die neomyzininduzierte Fusionierung von Lipidflotten kann in der inneren Membranschicht mittels FRET zwischen MyrPalm-CFP und Flotillin2-YFP (oben, links), und in der äußeren Membranschicht zwischen GPI-GFP und Alexa594-CTB (oben, rechts) nachgewiesen werden. Die Fusionierung ist nur in der äußeren Schicht insbesondere an der Plasmamembran und zeitlich begrenzt wahrzunehmen. Der gleiche zeitliche Ablauf kann für neomyzininduzierte Membranausstülpung gezeigt werden (untere Panels).

Der letzte Befund könnte auf das unterschiedliche Verhalten der beiden Membranschichten der Lipidflotten hinweisen.

auf In jeden Fall deuten diese Ergebnisse eine fundamental neue Signalisierungsreaktion (Ruonala, 2005). In Analogie mit der lateralen Amplifikation der EGF-Rezeptoren an der Plasmamembran, ist die Lipidflottenfusionierung ein früher und autonomer Amplifikationsschritt für nachgeschaltete Signalwege. Die Plasmamembran scheint also mehr zu sein, als die statische Hülle der Zellen, wo Signalisierung zwangsläufig anfängt. Vielmehr beteiligt sie sich aktiv an der ersten Interpretation der eingegangenen Umweltsignale, entweder durch kollisionsvermittelte, ligandfreie Aktivierung aller in der Membran enthaltenen EGF-Rezeptoren oder durch Sensitivierung größerer Membranareale für aktinbasiertes Membranwachstum.

#### Messung der durch Zellmotilität vermittelten Kraft

Von Zellen ausgestülpte Membranfortsätze werden grundsätzlich durch Integrinerkennung der extrazellulären Matrix stabilisiert. Die Zelle benutzt an Integrinrezeptoren gebundene Aktinfasern, um über Aktivierung des Aktinomysinsystems Kraft auszuüben. Diese Prozesse sind wichtig für Zellmotilität, -haftung und fortsatzbildung. Der genaue Ablauf dieser Prozesse ist wegen fehlender Messmöglichkeit der hierbei erzeugten Kraft weitgehend unbekannt.

Die herkömmlichen Methoden beruhen auf der Verzerrung einer flexiblen Membran, die anhand der Bildung von Falten oder durch Verlagerung eingebetteter fluoreszenter Mikrokügelchen wahrgenommen wird. Das Problem bei diesen Methoden ist, dass Zellen haptotaktisch auf den Untergrund reagieren, d.h. dass sie starre Untergründe flexiblen vorziehen. Des Weiteren erlauben diese Messungen keine kontinuierliche Abbildung der Kraft, da die spatielle Auflösung auf die Dichte der eingebetteten Kügelchen oder gebildeten Falten beschränkt ist.

Wir haben uns deshalb überlegt, das physiologische Substrat der extrazellulären Matrix so fluoreszent zu modifizieren, dass Verzerrungen im Nanometerbereich wahrgenommen werden können. Die Lösung bestand darin, das natürliche Matrixprotein Fibronektin mit einem geeigneten Donor (Cy3), beziehungsweise Akzeptor (Cy5) zu markieren und diese Mischung zu benutzen, um eine extrazelluläre Matrix zu generieren. Die Beschichtung von Glasoberflächen wurde so ausgeführt, dass innerhalb der Matrix 50% FRET vorhanden war, um zu garantieren, dass die Sensitivität gegenüber Verzerrungen so hoch wie möglich war.

Zellen wurden auf diese neue FRETende Matrix ausplattiert. Wie erwartet fand sich eine Veränderung der homogenen FRET-Effizienz in den Gebieten, wo Fortsätze gebildet wurden, und diese entsprach einer erhöhten FRET-Effizienz, wie sie zu erwarten wäre, wenn eine Zelle an den Fibronektinmolekülen zieht und diese sich so entlang der Kraftpotentiallinien kompaktieren (Abb. 4). Diese Kraftstellen stimmten mit Tensegritätspunkten überein, meistens in Form von fokalen Adhäsionen. Die Kraftpunkte lagen immer am distalen Ende der Aktin-Stressfasern, wie es für Kraftlinien zu erwarten ist. Diese Korrelationen sind messbar, weil sich die Fluoreszenz der Matrix im roten Spektalbereich und außerhalb der Zellen befindet, so dass die Zellen immer noch mit GFP-Fusionsproteinen, wie GFP-Aktin oder dem fokalen Adhäsionsprotein GFP-Zyxin, zu transfizieren sind.

Bei frisch ausgesäten Zellen war weiterhin festzustellen, dass während des ersten Schritts nach Kontakt mit der extrazellulären Matrix, dem symmetrischen Ausbreiten der Zellen, noch keine Kraft ausgeübt wurde. Erst nach einer Weile, wenn Polarität etabliert und direktionell Lamellopodien ausgestülpt wurden, korrelierten die Membranerweiterungen mit messbarer Kraft. Auch wurde festgestellt, das Kraftaufbau der Aktinpolymerisierung oft voraus geht. Dies bedeutet, dass die Initiierung von Membranausstülpung. insbesondere bei symmetrischer Ausbreitung. ohne actinomyosinmediierte Prozesse stattfinden kann. Wahrscheinlich wird das kortikale Aktinzytoskelett lokal abgebaut, um eine schwache Stelle an der Plasmamembran zu generieren. An diesem Punkt bricht die Membran unter dem hydrostatischen Druck des Zellinneren durch. Die Ausstülpung wird hauptsächlich durch Integrine an der extrazellulären Matrix verankert. Wie vorher hypothetisiert würden bei solchen Ereignissen die Lipidflotten fusionieren können und aktive Aktinpolymerisierung hervorrufen. Der Nachweis der korrelierten Kraft- und Lipidflottenfusion muss noch ausgeführt werden. An den Kontaktstellen zwischen Zelle und Untergrund werden dann Aktinfasern angebaut und Kraft aufgebaut, um die Zelle auf das neu erworbene Territorium zu ziehen. Wir haben auch gesehen, dass es zwei unterschiedliche Formen von Kontaktpunkten gibt; transiente Kraftgebiete und sich zeitlich linear aufbauende Kraftgebiete. In beiden Fällen findet gleichzeitig Aktinpolymerisierung statt. Die transienten Kontaktstellen dienen wahrscheinlich der Zwischenhaftung an Stellen, wo nicht über längere Zeit Kraft, d.h. Tensigrität gebraucht wird.

Durch Expression von dominant-negativem Rho-A wurde eine ausschließliche Bildung kurzzeitiger Kraftpunkte erreicht, während bei Expression einer konstitutiv-aktiven Form von Rho-A überwiegend stabile Kraftpunkte vorlagen.

Die optische Kraftmessung wird momentan mit FRET-basierten Biosensoren für Rho-GTPase und N-WASP Aktivität kombiniert, um die räumlichen und zeitlichen Zusammenhänge der biochemischen und physischen Prozesse studieren zu können. Weiter wird diese Methode bei der Untersuchung der morphologischen Veränderungen bei Zelltod in verschiedenen Modellsystemen für neurologische Erkrankungen eingesetzt werden. Es ist relativ wenig über die Prozesse bekannt, die zu pathologischen Formveränderungen führen. Diese Information ist wichtig, um zwischen verschiedenen Formen von Zelltod unterscheiden zu können. Wichtige Rückschlüsse könnten bezüglich der Beteiligung verschiedener Komponenten des Zytoskelett-Motorsystems der erkrankten Zelle gezogen werden, die auf übliche Weise nur schwierig zu definieren sind.



**Abbildung 4:** Panel A und B zeigen die Fluoreszenzintensitätsverteilungen des jeweils mit Cy3beziehungsweise Cy5-gefärbten Fibronektins. Panel C zeigt den Quotient beider Bilder. Die durch Verzerrung des FRETenden Matrix generierten FRET-Muster bilden den Kontrast. Panel D zeigt eine "interne reflektionsmikroskopische" Aufnahme, wobei die dunklen Stellen der Kulturoberfläche am nächsten sind, d.h. die zellulären Kontaktstellen anzeigen.

#### Zelltod und Zytoskelett

Zelltod verläuft im Allgemeinen über mehrere nicht immer klar definierte Wege. Am besten definiert ist der so genannte apoptotische Zelltod. Apoptose, oder programmierter Zelltod, findet physiologisch während der Entwicklung statt und hat als Gewebe zu strukturieren. Ziel. Organe und Apoptose ist ein aktiver energieverbrauchender Prozess, bei dem Zellen unter minimaler Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes sterben. Zu jeder Zeit ist deswegen die strukturelle Integrität der Plasmamembran gewährleistet, so dass die Inhalte der Zelle nicht freigesetzt werden. Typisch für Apoptose ist, dass der Zellkern sich kompaktiert und die darin enthaltende DNS verdaut wird. Kleine Membranbläschen werden abgeschnürt, die im Gewebe aufgenommen und entsorgt werden. Die zellulären Komponenten sind dabei durch Proteasen zu leicht abbaubaren Teilen zerlegt worden. Die finale Beseitigung der Zelle ist für jede Form von Zelltod auf Proteasen angewiesen. Bei Apoptose ist eine Klasse von Proteasen, die so genannten Caspasen, verantwortlich für die notwendige Verdauung zellulärer Komponenten, aber die aktivierten Caspasen spielen auch bei der Aktivierung weiterer Signalwege eine Rolle, die für Apoptose notwendig sind (Artal-Sanz, 2005). Bekannte Substrate für Caspasen sind strukturelle Komponenten des Zytoskelettsystems, wie zum Beispiel das mikrotubulistabilisierende Protein Tau, Aktin und N-WASP, das von seiner Autoinhibition befreit wird. Ein anderes Indiz für den engen Zusammenhang zwischen Zytoskelett und Apoptose ist die umgekehrte Beobachtung, dass Apoptose durch Destabilisierung des Zytoskeletts ausgelöst werden kann. Diese Form von Zelltod wird Amorphose genannt. Auch der Verlust von Zell-Matrix Interaktion ist ein Auslöser einer spezifischen Variante der Apoptose, der so genannten Anoikis. Bei Apoptose ist auch eine andere Proteasenklasse involviert, das Calpain. Calpain ist eine membranständige Protease, die das kortikale Aktinzytoskelett abbaut. Physiologisch spielt Calpain bei axonaler Regeneration eine Rolle und es könnte einer der Mediatoren für motilitätsabhängige Lipidflottenfusionierung sein.

Maximale Aktivierung von Calpainen ist bei der anderen Extremform des Zelltods zu beobachten: der so genannten Nekrose (Artal-Sanz, 2005). Nekrose ist eine unkontrollierte Art des Zelltods, die keine Energie kostet und wobei sich die Zelle samt ihres Inhalts im Umfeld auflöst. Dies führt zu einer immunologischen Gegenreaktionen, die bei der Apoptose nicht stattfindet. Mittlerweile wird allgemein akzeptiert, dass es eine Übergangszone zwischen Apoptose und Nekrose gibt und dass die Trennung nicht immer mechanistisch gültig ist, so dass auch programmierte Formen von Zelltod zwischen beiden Extremen möglich sind (Syntichaki, 2002), die Nekroptose genannt werden. Bei Nekrose wird der finale Zelltod von lysosomalen Cathepsin-Proteasen ausgeführt. Während der Nekrose geht die strukturelle Stabilität von Lysosomen verloren, was Cathepsine ins Zytoplasma freisetzt. Diese Proteasen sind relativ unspezifisch und zerstören deswegen wichtige strukturelle und funktionelle Proteinsysteme (Artal-Sanz, 2005).

Obwohl einige Signalisierungsschritte zur Initiierung des Zelltodes bekannt sind, wie z.B. Schlüsselereignisse wie Cytochrom-C-Oxidase-Austritt aus Mitochondrien oder lysosomale Permeabilisierung, und obwohl die unterschiedlichen Proteaseklassen beschrieben sind, ist wenig über Zusammenspiel und Koordinierung von biochemischen und morphologischen Todesprozessen bekannt. Ironischerweise sind die Vorgänge bei relativ unspezifischen Auslösern von Zelltod, wie UV- oder radioaktiver Bestrahlung, Ischämie (Hypoxie) oder Sauerstoffradikalbelastung, relativ gut untersucht worden (Lipton, 1999). Es fehlen aber genauere Informationen bei Erkrankungen mit meist gut verstandenen und molekular identifizierten Defekten. Wegen der essentiellen Funktionen, extremen Morphologie und terminal differenzierten Natur von Neuronen gilt dieses Problem insbesondere für neurologische Erkrankungen.

In den nächsten Teilen werden zwei Klassen von neurologischen Erkrankungen aufgeführt, bei denen es zu einer Beteiligung des Zytoskeletts kommt: einmal die (externe) bakterielle Infektion mit Pneumokokken, die zur Hirnhautentzündung (Meningitis) führt, und die so genannten Aggregopathien, die zur Demenz und Motorstörungen führen und die in einigen Fällen auf genetisch vererbbare Proteinfaltungsstörungen zurückzuführen sind.
## Meningitis und Zytoskelett

Bei Meningitis dringen opportunistische Bakterien, wie z.B. Pneumokokken ins Gehirn Dies geschieht häufig ein. durch septische Ausbreitung einer Pneumokokkenpneumonie, per continuitatem bei Innenohrentzündungen oder durch direkten Befall des Gehirns. Die Mortalität ist hoch und überlebende Patienten leiden oft an schweren neurologischen Schäden. Bei Meningitis kann man zwei gleichzeitig auftretende pathologische Prozesse trennen; einerseits ruft die Entzündungsreaktion eine immunologische Reaktion hervor, die das Gewebe schädigt, andererseits greifen die Bakterien direkt und gezielt die Nervenzellen an (Nau, 2002). Die gleichzeitige Evolution von Bakterien und höheren Organismen hat dazu geführt, dass Bakterien Strategien zum Eindringen und Fortpflanzen im Wirtsorganismus entwickeln konnten. Diese Strategien beruhen fast immer auf der Modulation des Zytoskeletts (Aktories, 2005), so dass Bakterien auf pseudophagozytosische Weise aufgenommen werden oder die zelluläre Aktinpolymerisierungsmaschinerie benutzen, um sich fortbewegen zu können. Die Bakterien bringen entweder analoge Aktinumwandlungsenzyme mit oder "entführen" zelluläre Maschinerien, um ihre Ziele zu erreichen. Vorbilder der letzten Strategie sind die enzymatische Modifizierung von Rho-GTPasen, um diese in eine konstitutiv-aktive Form zu bringen.

*Streptococcus pneumoniae* bedient sich einer einzigartigen Strategie, um ins Gehirn einzudringen. Die Pneumokokken autolysieren, um ein möglichst großes Infiltrat zu bilden (Nau, 2002). Die Autolyse setzt die inneren Komponenten der Bakterien ins interneuronale Gewebe frei. Der stärkste Pathogenitätsfaktor ist das Toxin Pneumolysin, das die neuronale Plasmamembran angreift und perforiert. Pneumolysin liegt im Inneren des intakten Bakteriums in monomerer, inaktiver Form vor. Bindung dieser Monomere an Cholesterin in der äußeren Membranschicht der Neurone ruft eine Oligomerisierung hervor. Große Aggregate zerreißen die Membran und formen calciumpermeable Poren. Das Pneumolysin gehört deswegen zur Obergruppe der Zytolysine.

Wenn Neurone in Zellkultur mit Pneumolysin in einer Konzentration inkubiert werden, die im Liquor von Patienten nachzuweisen ist, findet massiver Zelltod statt, dem ein Aufrunden der Zellen vorausgeht. Dies deutet auf die Beteiligung zytoskelettärer Veränderungen hin. In Patienten überwiegt aber die funktionelle Schädigung und nicht der Zelltod (Nau, 2004). Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Nervenzellen im Gehirn ein kompaktes Gewebe bilden. Deswegen haben wir uns auf die frühen zellulären Veränderungen konzentriert, die dem Zelltod vorausgehen (Iliev, 2005a). Aufgrund der Präferenz der Bakterien für Aktinumwandlung, haben wir das Aktinzytoskelett untersucht und herausgefunden, dass vermehrt Stressfasern gebildet wurden. Diese verstärkte Aktinpolymerisierung konnte pharmakologisch mittels eines "ROCK" (Rho-assoziierte Kinase) Inhibitors aufgehalten werden. Eine erhöhte Aktivierung der Rho-A-GTPase konnte biochemisch bestätigt werden. Dies zeigt, dass das Pneumolysin über Rho-Signalwege das Aktinzytoskelett beeinflusst, wie es auch von anderen bakteriellen Toxinen bekannt ist. Initial konnte eine Bündlung und Stabilisierung von Mikrotubuli nachgewiesen werden, die mit verringerter Mitochondrientransportgeschwindigkeit, biochemischer Stabilisierung durch Tubulinacetylierung und mit "Verdrehungen" der stabilisierten Mikrotubulibündel einherging. Die Stabilisierung konnte auch in Patientenmaterial und in Kaninchengehirnen, in die Pneumokokken intrazerebral injiziert worden war, nachgewiesen werden (Abb. 5).



unbehandelt

experimentelle Meningitis

Abbildung 5: Injektion von *Streptococcus pneumoniae* in die *Cisterna magna* von Kaninchen zeigt eine deutliche Stabilisierung der Mikrotubuli in Zellkörpern und Axonen von Nervenzellen der tieferen kortikalen Schichten (rechts), in Vergleich zu kontrollinjizierten Tieren (links). Die Stabilisierung wurde als acetyliertes Tubulin (braune Farbe) immunzytochemisch in den kortikalen Hirnschnitten nachgewiesen.

Diese Bündelung konnte nicht auf die gleiche Weise wie Stressfasern aufgehalten werden. Des Weiteren trat diese Bündlung deutlich vor der Permeabilisierung auf, was durch gleichzeitige Vermessung der Membranpermeabilität mittels fluoreszentem Propidiumjodid und Calcein festgestellt werden konnte. Außerdem konnte ein möglicher Einfluss durch einströmendes Calcium ausgeschlossen werden, weil Calciumionophore keine Bündelung von Mikrotubuli hervorrufen konnten, sondern eher zu einer Destabilisierung führten. Auch eine andere mögliche Regulation der Bündelung mittels einer kürzlich beschriebenen Ebi-1-vermittelten Stabilisierung konnte mittels Koexpression dominant-negativer Formen dieser Effektoren ausgeschlossen werden (Wen, 2004).

Wir vermuten, dass das Pneumolysin einen Signalweg aktiviert, der während der Zellteilung zur Trennung der Chromosomen führt, weil dies das einzig beschriebene Vorbild von Mikrotubulibündelung darstellt (Rieder, 2004). Der Aktivierungsmechanismus ist nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Plasmamembrancholesterin in der Filipinfärbung von einer homogenen in eine stark punktierte Form umverteilt. Wie bereits besprochen, bildet Cholesterin die Bindungsstelle, die von einer spezialisierten Domäne des Toxins erkannt wird und dient stöchiometrischen der Membraninserierung. Präinkubation des Toxins mit Konzentrationen Cholesterin inhibiert vollständig Bündelung und Zelltod. Wie schon besprochen ist Cholesterin in signalisierungssensitivierten Lipidflotten angereichert. Wir vermuten, dass die Umverteilung und Fusionierung von Lipidflotten eine Signalkaskade aktiviert, die zur Bündelung führt. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen mit fluoreszent gefärbtem Pneumolysin unterstützt. Das Toxin wird nach Anhaften an der Plasmamembran schnell internalisiert, wobei eine deutliche Polarität der Zelle wahrzunehmen ist. Dies stimmt zeitlich mit cholesterinabhängiger Endozytose aus Lipidflotten überein. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass in unmittelbare Nähe der internalisierten toxinenthaltenden Vesikel die Bündelung anfing. Die Internalisierung hat deswegen wahrscheinlich zum Ziel, das Signal zur Bündelung so dicht wie möglich an die tiefen intrazellulären Effektoren zu bringen.

Was könnte die Funktion der Aktin- und Mikrotubuliveränderungen sein? Zuerst wird die Form der Zelle dramatisch verändert, indem die Nervenzellen in Kultur deutlich

aufrunden. Im Hirngewebe könnte dies zu verbesserten Infiltrationsmöglichkeiten führen. Andererseits tritt in diesem Fall möglicherweise eine Form der Amorphose auf, was wiederum gezielt Zellen im bakteriellen Durchdringungsweg entfernen könnte. Die Beteiligung apoptotischer Prozesse konnte anhand des mitochondrialen Membranpotenzials unmittelbar nach Beginn der Mikrotubulibündelung und vor Permeabilisierung der Plasmamembran nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass dies gleichzeitig mit der vorher beschriebenen Freisetzung von mitochondrialer Cytochrom-C-Oxidase auftritt, einem frühen Merkmal der Apoptose. Tatsächlich konnte der Membranpotenzialverlust durch antiapoptotische Pharmaka und durch einen JNK-Kinase-Inhibitor aufgehalten werden. JNK-Kinase-Signalwege sind oft in unspezifischer Weise in Stress- und Zelltodvorgänge involviert.

Ein tieferes Verständnis in die vom Pneumolysin benutzten Signalwege könnte nicht nur für Linderung der schwer therapierbaren Hirnhautentzündung und ihrer Spätfolgen wertvoll sein, sondern auch wertvolle Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der Zytoskelettregulation in Bezug zur zellulären Funktion erlauben.

### Neurodegeneration in Tauopathien

Neurodegenerative Erkrankungen beruhen häufig auf Proteinaggregationsstörungen. Vorbilder sind das Huntingtin-Protein, das in aggregiertem Zustand in Huntingtinkörperchen beim Morbus Huntington vorkommt, das  $\alpha$ -Synuclein-Protein, das in Form der Lewyschen Körperchen beim Morbus Parkinson nachweisbar ist, die Superoxid-Dismutase, die in aggregierter Form bei Amyotropher Lateralsklerose vorkommt und das Tau-Protein, was in aggregierter Form als neurofibrilläre Verknotung beim Morbus Alzheimer vorliegt (Ross, 2004).

Da die Aggregation dieser Proteine mit dem klinischen Erscheinungsbild der Erkrankungen einhergeht, wird angenommen, dass es einen kausalen Zusammenhang zwischen Aggregation und Erkrankung gibt. Es wird vermutet, dass nicht die morphologisch identifizierbaren Aggregate, sondern vielmehr kleinere oligomere Formen die Auslöser der Zellschädigungen sind. Die großen Aggregate repräsentieren wahrscheinlich einen zellulären Schutzmechanismus, der zum Ziel hat, die oligomeren, toxischen Formen in ein pathophysiologisch inertes Aggregat im Zytoplasma zu sequestrieren. In der Tat gibt es Befunde, die auf diese Möglichkeit hinweisen; eine Korrelation der morphologischen Aggregate von polyglutaminexpandierten Fluoreszenzproteinen mit Zelltod ergab, dass die Anwesenheit der Aggregate mit längeren Überlebenszeiten korrelierte (Arrasate, 2004). In einem induzierbaren transgenen Maussystem, in welchem die mit hereditärer Tau-Demenz assoziierte mutierte Form des Tau-Proteins produziert wird, konnte durch Abschalten der Tau-Produktion die Einbindung von vorhandenem Tau in die neurofibrillären Verknotungen nicht aufgehalten werden, aber die kognitiven Funktionen der Maus verbesserten sich signifikant (Santacruz, 2005). Dies lässt darauf schließen, dass die Einbindung der oligomeren Formen in Aggregate, positive Auswirkung auf den Krankheitsphänotyp haben.

Für die meisten dieser Erkrankungen sind zelluläre Modellsysteme vorhanden, aber insbesondere bei Tauopathien wie dem Morbus Alzheimer sind die bekannten genetischen Mutationen aus vererbbaren Krankheitsfällen nicht imstande, in Zellen in kurzer Zeit zu aggregieren und diese zu schädigen. Man muss realisieren, dass Neurone ein Leben lang altern, und der Morbus Alzheimer eine typische altersbedingte Erkrankung ist. Tatsächlich zeigen transgene Mäuse mit mutiertem Tau auch erst im hohen Alter klinische Befunde.

Gegenstand unserer Forschung war es, die Pathophysiologie aggregierten Taus, insbesondere mit Hinblick auf Zytoskelettveränderungen zu untersuchen. Das erste Ziel war deswegen die Generierung eines auf mutiertem Tau basierenden zellulären Modellsystems, dass die bekannten Merkmale der Erkrankung widerspiegelt.

Die physiologische Funktion von Tau ist die mechanische Stabilisierung der Mikrotubuli und wahrscheinlich die Definition des Abstands zwischen individuellen Fasern (von Bergen, 2005). Dies ist in Axonen wichtig, wo viele Fasern dicht aufeinander liegen und dennoch effizienten Transport von Proteinen über Mikrotubulimotoren gewährleistet werden muss. Weiter gehört Tau zu einer wachsenden Familie von erst seit kurzem identifizierten Proteinen, die entweder völlig unstrukturiert vorliegen, oder große unstrukturierte Domänen enthalten (Tompa, 2005). Dies widerspricht dem Dogma, das Faltung die Funktion der Proteine definiert. Deswegen wird auch angenommen, dass unstrukturierte Proteine optimal für Funktionen geeignet sind, bei denen eine stabile Faltung eher ungünstig wäre. Diese Funktionen fallen in zwei Kategorien: i) entropische Ketten oder Bürsten und ii) erkennungsspezialisierte Proteine. Proteine der ersten Kategorie nutzen ihre unstrukturierte Domäne, indem sie Energie speichern können. Beispiele sind Tau, das auf der Oberfläche der Mikrotubuli Transportkomplexe vorbeilaufen lassen muss (Bürste) und das Muskelprotein Titin, das durch Verformung Energie speichern und als Feder wieder abgeben kann. Proteine der zweiten Kategorie sind imstande, sich gegenüber strukturell unterschiedlichen Bindungspartnern anzupassen. Beispiele sind Chaperone, Proteine die andere Proteine bei deren Faltung durch Bindung an korrekte Zwischenformen unterstützen oder durch Erkennung die Proteine vor Entfaltung schützen.

Tau ist einzigartig, weil es während Aggregation in hochstrukturierten Aggregaten vorliegt, die hauptsächlich von  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen geprägt sind. Außerdem ist Tau nicht völlig unstrukturiert, weil kleinere Peptide von Tau selbständig aggregieren und damit schon eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur besitzen (von Bergen, 2000). Es scheint, dass intrinsische Faltungsstrukturen kontinuierlich durch den Rest des Proteins energetisch verhindert werden. Dies erlaubt es dem Tau-Protein, sich an definierten Bindungsstellen auf Mikrotubuli energetisch zu stabilisieren, weil die stark strukturierten Mikrotubuli Stabilität auf Tau übertragen.

Diese Mikrotubulibindungsstellen entsprechen im Tau-Molekül vier Wiederholungen einer Kassette. Es ist bekannt, dass sich dieser Bereich innerhalb der Aggregate befindet. Die N-terminale Domäne wird Projektionsdomäne genannt, weil es vom Miktotubulus wegprojiziert. Dies ermöglicht die entropische Bürstenfunktion, die die Mikrotubulifasern flexibel/elastisch auf einem gewissen Durchschnittsabstand hält.

Innerhalb dieser mikrotubulibindenden Wiederholungsdomäne haben wir Peptidsequenzen identifiziert, die der Grund für deren unstabile Faltung sein könnten: kleine Reihen von abwechselnd polaren und apolaren Aminosäuren, getrennt durch einige musterunterbrechende Aminosäuren, gefolgt von noch einer Reihe der abwechselnden Residuen. Diese Polaritätsmuster sind dafür bekannt, dass sie durch gegenseitige Wasserstoffbrückenbildung eine  $\beta$ -Faltblattstruktur annehmen können (West, 1999). Die unterbrechenden Zwischensequenzen und die Anwesendheit größerer unstrukturierter Gebiete im Protein verhindern aber eine stabile β-Faltblattbildung. Vielleicht induziert Mikrotubulibindung eine Stabilisierung dieser Domäne, aber weil auch andere Teile des Proteins an der Bindung beteiligt sind, ist es wahrscheinlicher, dass sie nur einen Teil der Bindungsoberfläche darstellen. Sie sind aber außerordentlich gut für Autoaggregation geeignet, wenn die Tau-Proteine über genügend Zeit verfügen, bei erkrankten Neuronen. Die Aufgabe wurde gelöst, indem die Aktivierungsbarriere für Autoaggregation mittels minimaler Punktmutationen in den unterbrechenden Gebieten so verringert wurde, dass eine lange, kontinuierlich mustergemäß laufende Sequenz in mehreren Wiederholungsgebieten resultierte. Diese strukturelle Optimierung entspricht keiner bekannten vererbbaren Mutationen, obwohl sich diese nahe an den optimierten Gebieten befinden. Andererseits ist es aufgrund der Toxizität unwahrscheinlich, dass natürlich anwesende und vererbbare Mutationen die optimale Situation für Aggregation hervorrufen würden, weil sie evolutionär sehr schnell aussortiert werden würden. Es ist tatsächlich gezeigt worden, dass diese alternierenden Polaritätsmuster in Proteindatenbanken am seltensten vorkommen, wenn man verschiedene Reihenfolgen mit gleichen Aminosäuren auf Frequenz sortiert (Broome, 2000).

Unsere Optimalisierung führte zu verschiedenen Tau-Mutanten bei denen jeweils ein, zwei oder drei Wiederholungsgebiete angepasst wurden (Iliev, 2005b). Expression dieser Mutanten führte im Verhältnis zum Grad der Optimierung zum Zelltod. Die meisten Untersuchungen wurden an der maximal optimierten Mutante ausgeführt, weil diese den gewünschten Phänotyp am stärksten zeigt. Verglichen mit Wildtyp-Tau exprimierenden Zellen starben ungefähr 50% der Zellen innerhalb von 48 Stunden.

Auffällig war die Lokalisation des Tau-Proteins, die mittels GFP-Fusion oder mit Hilfe von tauspezifischen Antikörpern gezeigt wurde. Die normale Verteilung von Tau auf Mikrotubuli geht nach sechs Stunden verloren und wird in den darauf folgenden 18 Stunden durch eine von drei Erscheinungsformen ersetzt; i) drahtige dicke Kabel, die der ehemaligen Verteilung der Mikrotubuli ähneln, ii) eine amorphe subplasmalemmale Schicht oder iii) verschieden große, runde Einschlusskörper.

Schon nach sechs Stunden konnte mittels der Methode der Fluoreszenzerholung nach Photobleichung (FRAP) gezeigt werden, dass die Tau-Proteine abhängig vom Expressionsniveau immobil waren. Bei dieser Methode wird fluoreszenzmarkiertes Tau in einem kleinen Bereich der Zelle gebleicht, um die nachfolgende Erholung der Fluoreszenz im Bleichungsgebiet zu beobachten, die durch Austausch mit ungebleichtem Protein verursacht wird. Eine schnelle Fluoreszenzerholung deutet auf eine hohe Diffusionsrate hin, während Immobilität auf Aggregation hindeutet. Im Verlauf wurde eine Reduktion der Fluoreszenzerholung beobachtet, und nach 12 Stunden waren alle in der Zelle vorhandenen Proteine in Aggregate eingebunden.

Die nächste Frage war, ob unsere aggregationsoptimierte Mutante imstande ist, das restliche in der Zelle vorhandene Wildtyp-Tau in Aggregate aufzunehmen. Anders gesagt: Kann die für Interaktion optimierte Konformation auf nicht optimierte Proteine übertragen werden, wie es zum Beispiel bei Prionerkrankungen der Fall ist? Dafür wurde mutiertes und physiologisches Tau mit spektral unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen markiert und zusammen in eine Zelle transfiziert. Die unterschiedlichen Farben beider Proteine erlaubte die Bestimmung der individuellen Motilität. Überraschenderweise wurde nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip entweder das Wildtyp-Tau in Aggregate eingeschlossen oder völlig unbeeinflusst gelassen. Der Unterschied zwischen diesen zwei Typen der zellulären Reaktionen ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass Zellen mit hochregulierten Chaperonen imstande sind, das weniger optimal passende Wildtyp-Tau-Protein vor Aggregation zu bewahren, oder die Aggregate abzuschirmen. Wir bearbeiten diese Frage momentan mittels eines Chaperonaktivitäts-Biosensors, der später erläutert wird.

Tau zeigt im erkrankten Gehirn spezifische posttranslationelle Modifikationen, die auch klinisch benutzt werden, um Tauopathien eindeutig zu diagnostizieren. Diese Modifikationen beinhalten eine Anzahl von Phosphorylierungsstellen und eine konformationelle Änderung (http://www.alzforum.org/res/com/mut/tau/table1.asp). Diese Veränderungen können mittels Immunofluoreszenz und Western-Blots nachgewiesen werden. Verschiedene Antikörper zeigten eine Erhöhung der Anzahl immunpositiver Zellen für die Tau-Mutante im Vergleich mit dem Wildtyp. Weil unser Modellsystem die Benutzung kultivierbarer, und deswegen teilender Zelllinien beinhaltet, sind einige dieser Epitope auch als Hintergrund anwesend. In den Zellen konnte aber immer eine statistisch signifikante Erhöhung der Färbungsintensität, d.h.

eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration der modifizierten Proteine nachgewiesen werden. Dies ist derzeit der stringenteste Nachweis für pathophysiologisch korrekt ablaufende Biochemie.

Die mögliche Beteiligung apoptotischer Prozesse konnte mittels Antikörperfärbung für aktivierte Caspasen, Kernverdichtung, und TUNEL-Färbung von verdauter genomischer DNS gezeigt werden. Die Anzahl von deutlich apoptotischen Zellen erklärt aber nicht den massiven Zelltod, was auf die Anwesenheit nekrotischer Prozesse schließen lässt. Wir konnten weiterhin nachweisen, dass bei Caspasenaktivierung Tau und Mikrotubuli abgebaut wurden. Die Aggregate wurden als letztes proteolytisch entfernt.

Die Taumutante induzierte in Axonen und Dendriten der Neurone deutliche morphologische Abweichungen des Mikrotubulus-Zytoskeletts. Insbesondere wurde häufig ein großes Aggregat gefunden, dass unmittelbar an der proximalen Seite des Axons im Axonhügel lag (Abb. 6). Die Mikrotubuli überlappten nicht mit den Tau-Aggregaten, sondern wurden vielmehr aus diesen Aggregaten verdrängt. Der gleiche Verdrängungseffekt von Mikrotubuli nahe der Tauaggregate wurde auch in nichtneuronaler Zellkultur wahrgenommen und sowohl räumlich wie zeitlich mit wahrnehmbarer Aggregation korreliert.

In Übereinstimmung mit der Literatur bezüglich der kausalen toxischen Form von Tau, konnte in unserem Modellsystem kein Hinweis auf Fibrillen gefunden werden.

Fibrillen können spezifisch mit  $\beta$ -Faltblatt-erkennenden Fluoreszenzfarbstoffen wie Kongo-Rot und Thioflavinen angefärbt werden, die in unseren Zellen nicht nachweisbar waren. Fibrillen werden spezifisch mittels Sarkosyl aus Zellen und Geweben extrahiert. Slot-Blot-Analysen von extrahierten Zellen zeigten keine Tau-Immunoreaktivität. Schließlich wurde die Ultrastruktur der tauenthaltenden Strukturen mittels Immunoelektronenmikroskopie untersucht. Es wurden nur unstrukturierte, kleinere Aggregate gefunden und niemals die als pathologisch beschriebenen gedrehten oder geraden Fibrillen.

Dies kann durch die schnelle Bildung der Aggregate erklärt werden, die es den Zellen unmöglich macht, die Aggregate in unschädliche Fibrillen umzuformen. Es ist auch möglich, dass für die korrekte Fibrillenbildung andere pathologische Prozesse notwendig sind, die in unserem Modellsystem nicht vorhanden sind. Diskutiert werden Entzündungsmediatoren oder extrazellulär aggregiertes  $\beta$ -Amyloid (Ferrari, 2003), das oft beim Morbus Alzheimer mit der Tau-Pathologie korreliert. Andererseits tritt beim Alzheimer oft die sogenannte "pre-Tangle"-Form auf, ohne dass Tau-Verknotungen nachweisbar sind (Tiraboschi, 2004). In jedem Fall weisen unsere Befunde darauf hin, dass die oligomeren Formen toxische Intermediatprodukte des Zelltodes sind.



Abbildung 6: Mutiertes Tau verursacht große Aggregate im proximalen Axon. Im Gegensatz zum Wildtyp-tau überlappt das Mikrotubulisystem nicht mit dem Aggregat.

# Proteinfaltung

Die Proteinfaltung spielt eine wichtige Rolle bei der dynamischen Regulation des Proteoms, insbesondere bei sich schnell verändernden äußeren Einflüssen in beschränkten zellulären Gebieten, wie z.B. im proliferierenden Wachstumskegel. Die lokale Proteinkonzentration kann auf mehrere Arten reguliert werden; i) Transport von Proteinen in oder aus dem gewünschten Bereich, ii) Translation von Proteinen durch die Ribosomen, iii) proteolytischer Proteinabbau im Proteasom oder Autophagosom/Lysosom. Die erste Regulationsmöglichkeit ist nur über kleinere Abstände denkbar, die letzten zwei Möglichkeiten repräsentieren Systeme, die nicht einfach systemisch zu regulieren sind und wobei die Spezifität für einzelne Proteine nicht einfach zu gewährleisten ist. Der logischste akute Regulierungsvorgang ist durch die zelluläre Faltungsmaschinerie gegeben, d.h. über die Chaperonmaschinerie. Es ist bekannt, dass ein signifikanter Anteil der neu gebildeten Proteine direkt durch das werden. Diese Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut offensichtliche Energieverschwendung hat wahrscheinlich das Ziel, über Faltung die Produktion korrekt gefalteter aktiver Proteine steigern zu können. Eine Voraussetzung für einen solchen Regulationsmechanismus ist, dass die Chaperone Informationen über den gesteigerten Bedarf an bestimmten Proteinen bekommen. Das heißt wiederum, dass die Chaperone in einen von den Membranrezeptoren ausgehenden Signalweg eingebettet sein müssen. Momentan ist wenig über eine solche Verbindung bekannt. Diese Kenntnislücke kommt daher, dass Chaperone auch eine weniger spezifische Rolle in der Beschützung von Proteinen vor Modifikation oder Abbau unter zellulären Stresssituationen haben. Diese Funktion ist am meisten untersucht worden, weshalb diese Klasse von faltungsmediierenden Proteinen auch nach dem bekanntesten Auslöser für deren Schutzfunktion benannt wurden; die Hitze-Schock-Proteine.

Die physiologische Rolle ist daran zu erkennen, dass der Wachstumskegel nicht nur Ribosomen und Proteasomen enthält, sondern auch mit Chaperonen angereichert ist. Das Chaperon- und Proteasomsystem erfüllt neben der besser bekannten "Qualitätskontrollfunktion" bezüglich Korrektur oder Entfernung inadäquat gefalteter Proteine auch eine direkte Rolle bei der Produktion notwendiger funktioneller Proteine. Die intrazelluläre Vermessung der Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems wird im nächsten Teil beschrieben.

Gegenstand der Forschung war die Identifizierung eines solchen signalabhängigen Chaperon-Regulationsmechanismuses und die optische Messung der Chaperonaktivität. Ein geeigneter Kandidat für signalabhängige Regulierung von Chaperonen leitet sich aus der Pathophysiologie ab. Das Ko-Chaperon Bcl-2-assoziiertes Anthanogen 1 (Bag-1) ist in die antiapoptotische Signalkaskade eingebettet und signalisiert selber über Raf-Kinasen (Takayama, 2001; Song, 2001). Transgene Bag-1 überexprimierende Mäuse zeigen nach Induktion zerebraler Ischämie eine signifikant kleinere Hirnschädigung (Kermer, 2003) und Überexpression von Bag-1 in neuronalen Zelllinien führt zu beschleunigter Differenzierung (Kermer, 2002). Im Gegensatz zur protektiven Funktion im Ischämiemodell, wurde Bag-1 initial als negativer Regulator von "Heatshock Protein 70" (Hsp-70) beschrieben (Takayama, 1997). Hierbei muss erwähnt werden, dass später auch mehrfach eine positive Regulierungsfunktion nachgewiesen werden konnte (Gassler, 2001; Terada, 2000). Das Problem war, dass es keinen geeigneten Assay zur Messung der Chaperonaktivität gab. Die meisten experimentellen Protokolle werden an Zellhomogenaten ausgeführt und beschreiben indirekte Effekte, die auf Chaperonaktivität schließen lassen, wie z.B. den ATP-Verbrauch des Hsp70.

Wir realisierten, dass die Faltung von Fluoreszenzproteinen stark chaperonabhängig ist 2001). Dies hat in der kommerziellen Entwicklung (Sachetti, dieser Fluoreszenzproteine dazu geführt, dass faltungsoptimierte und speziesoptimierte Varianten hergestellt werden konnten. Das bedeutet einerseits, dass die Faltung dieser Fluoreszenzproteine beeinflussbar ist, und andererseits, dass wir diese Optimierung in einfach zu untersuchenden Organismen ausführen konnten. Wir haben deshalb die gelbe Variante der GFP-Familie, YFP, randomisierten das einem Mutagenisierungsprotokoll unterworfen. Die einzelnen Mutanten wurden visuell in Bakterienkolonien auf Wachstumsplatten beurteilt. Von mehreren zehntausend Kolonien wiesen 17 einen typischen Phänotyp auf, der mit Faltungsstörungen korrelierte. Diese Kolonien enthielten nur teilweise fluoreszente Bakterien, die in einer marmorartigen Verteilung vorlagen. Die Erklärung ist, dass die hohe intrazelluläre Konzentration schlecht gefalteten YFPs die bakterielle Chaperonaktivität hochregulieren kann. Weil die Kolonie nicht nur am Rand, sondern auch innerhalb der Kolonie wächst, sorgten die entstehenden Kräfte zu einer drehenden Verzerrung der fluoreszenten Subpopulation. Diese 17 Mutanten wurden anhand des Grads der Faltungsstörung eingestuft; die Anzahl der unterschiedlichen Helligkeitsstufen lässt auf mehrere Zwischenfaltungsformen schließen und garantieren einen hohen dynamischen Bereich. Die Position des Anfangs der fluoreszenten Streifen im Vergleich zur Koloniemitte zeigte an, wie lange die Bakterien brauchen, um die richtige Faltungslösung zu finden. Die Chaperonabhängigheit wurde quantifiziert, indem flüssige Kulturen der die Mutanten enthaltenden Bakterien in eiskaltem, 5% Ethanol enthaltenden Medium inkubiert wurden. Diese Behandlung ist eine etablierte Methode, um die meisten bakteriellen Chaperone zu aktivieren. Die Fluoreszenzzunahme durch diese Behandlung zeigt deswegen den maximalen Effekt, der durch Chaperone erzeugt werden kann. Eine der Mutanten mit mehreren Fluoreszenzstufen und frühem Beginn in der Kolonie zeigte eine 50-fache Zunahme der Fluoreszenzintensität und wurde für die weiteren Experimente benutzt.

Der chaperonabhängige Mutant, cdYFP, wurde in Säugerzellen exprimiert und zeigte unter Kultivierung bei niedriger Temperatur (25°C) eine deutliche Fluoreszenzzunahme. Proteinfaltung schwierig zu faltender Proteine ist bei niedriger Temperatur durch Erhöhung der Chaperonaktivität gesteigert, andererseits werden Proteine bei niedriger Temperatur langsamer und sorgfältiger gefaltet.

Die Beteiligung von Chaperonen wurde durch Koexpression von cdYFP mit Hsp70, das mit einer spektral unterschiedlichen CFP-Variante markiert war, nachgewiesen. Die Mengen an transfiziertem CFP-Hsp70 konnten auf diese Weise mit der Faltung von cdYFP korreliert werden. Um die Faltung von cdYFP konzentrationsunabhängig wahrnehmen zu können, wurde ein HA-Immunepitop an cdYFP hinzugefügt. Das HA-Epitop wurde mittels fluoreszenzmarkierter (Cy5) Antikörper detektiert und repräsentiert die Konzentration von sowohl gefaltetem als auch ungefaltetem cdYFP. Der Quotient der durch Faltung generierten YFP-Fluoreszenz und des Cy5-Signals ergab die Faltungseffizienz des cdYFPs. Die gleiche Kontrolle kann erzeugt werden, indem zusammen mit faltungssensitivem cdYFP, faltungskompetentes CFP koexprimiert wird. Die Korrelation von CFP-Hsp70 und cdYFP Faltungseffizienz zeigte eine lineare Abhängigkeit, was die Abhängigkeit von Hsp70 beweist.

Bag-1 enthält am C-terminus die so genannte Bag-Domäne, die für Bindung an Hsp70 (und Hsc70) verantwortlich ist (Sondermann, 2001). Stabile Zelllinien, die Bag-1 oder Bag-1 mit deletierter Bag-Domäne (Bag $\Delta$ C) exprimieren, wurden mit nichtexprimierenden Zelllinien auf Chaperonaktivität verglichen. Sowohl neuronale CSM und nicht-neuronale CHO-Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Chaperonaktivität gegenüber der basalen Faltungsaktivität untransfizierter Zellen (bis zur 10-fachen Steigerung). Die Bag∆C exprimierenden Zellen zeigten sogar eine leichte Verringerung der Chaperonaktivität. Diese direkte Vermessung der zellulären Chaperonaktivität konnte also die positive Regulation der Bindung von Bag-1 an Hsp70 beweisen (Liman, 2005a).

Beteiligung von Bag-1 über apoptotische Signalwege führt also zu der erwarteten und gewünschten Protektion der Proteinstabilität und möglicherweise auch zur Produktion neuer Proteine.

# Ubiquitin-Proteasom mediierter Proteinabbau

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist verantwortlich für den Abbau schlecht gefalteter Proteine oder anderer Proteine, deren Lebensdauer dynamisch reguliert werden muss (Orlowski, 2003). Zum Abbau bestimmter Proteine werden diese von einer E3-Ubiquitinligase erkannt. Die E3-Ligase enthält eine spezifische Bindungsdomäne, während eine andere Domäne die konservierte Ligase-Domäne enthält. Diese bindet aktiviertes Ubiquitin kovalent an Lysin-Aminogruppen des Zielproteins. Wenn einmal ein Ubiquitinmolekül angebaut wurde, wird dieses zur Bindung weiterer Molekülen benutzt, so dass eine Polyubiquitinkette am Zielprotein entsteht. Das 8 kDA kleine Ubiquitinmolekül wird zur Konjugation durch Bindung und Aktivierung an E1 und E2 Ligasen vorbereitet, die den E3 Ligasen das aktivierte Ubiquitin anbietet. Wegen der zunehmenden Spezifität in dieser Aktivierungskette, gibt es nur wenige E1, mehrere E2, aber viele E3 Ligasen. Die am Zielprotein angeheftete Ubiquitinkette wird vom Proteasom erkannt und in den proteolytischen Kanal gezogen, nachdem das Zielprotein auf der Oberfläche des Kanals entfaltet wurde.

Wenn Chaperone nicht imstande sind, die falschgefalteten Proteine zu korrigieren, werden größere Aggregate gebildet (Corboy, 2005). Dies ist nicht nur als pathologische Kondition bei neurodegenerativen Erkrankungen bekannt (Dimakopoulos, 2005), sondern auch bei der bakteriellen Proteinproduktion. Hierbei kann es bei übermäßiger Proteinproduktion, die die Faltungsmaschinerie überlastet, zur Bildung so genannter Einschlusskörper kommen.

Von neurodegenerativen Aggregaten wird vermutet, dass sie das Proteasom in deren Funktion inhibieren, weil sie zu groß für den proteolytischen Kanal des Proteasoms sind ("bite and chew" Modell). Tatsächlich liegt bei diesen Erkrankungen das aggregierende Protein ubiquitiniert vor. Für ein tieferes Verständnis der Todesabläufe ist es also wichtig, die proteasomale Aktivität in Zellen abbilden zu können.

Die Vermessung der Proteinubiquitinierung mittels FRET stellt im Prinzip eine einfache Aufgabe da. Ein mit einem geeigneten Donor markiertes Zielprotein würde durch Konjugation mit einem geeignet markierten Ubiquitinakzeptormoleküle in der Lage sein, die Donorexzitationsenergie an eines der vielen Akzeptormoleküle abzugeben. Hierbei ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich ein optimal orientiertes Paar im Komplex befindet und die FRET Effizienz sollte dementsprechend hoch sein. Das Problem ist, dass für eine FLIM-Messung kein optimales Donor-Akzeptor-Paar existiert (beschrieben in (Bunt, 2004)). Wie schon erklärt, entspricht die Kombination von CFP und YFP eher eine Kompromisslösung. Für die Messung der Proteinubiquitinierung ist ein möglichst sensitiver Assay gewünscht. Das CFP ist aus mehreren Gründen nicht optimal; i) es überlappt nicht völlig mit YFP, ii) es zeigt eine Absorption (Extinktionskoeffizient) und Fluoreszenzausbeute geringere (Quantum effizienz), und iii) es fluoresziert in einem spektralen Bereich, in dem sich die meiste Autofluoreszenz (NAD(P)H und Flavoproteine) befindet. GFP ist ein spektral besserer Farbstoff und würde mit seiner Emission optimal mit der Absorption des YFPs überlappen. Wie besprochen ist diese Kombination im Prinzip als FRET-Paar zu benutzen, aber unter der Bedingung, dass sie sich beiden am gleichen Molekül befinden. Diese Situation ist hier nicht gegeben, weil sich ungebundene Zielproteine und Ubiquitinmoleküle in der Zelle befinden werden. Deswegen haben wir uns zum Ziel gesetzt, dass YFP so zu mutagenisieren, dass es weiter als Akzeptor der Donerenergie fungiert, aber die aufgenommene Energie nicht mehr als Emission abgibt. So eine YFP-Mutante würde nicht mehr fluoreszieren, sondern die aufgenommene Energie über Umweltinteraktionen (Wärme) nicht-radiativ abgeben. Wenn dies schnell genug geschieht, wird kein Photon mehr abgegeben, weil für die Bildung von Photonen Zeit benötigt wird (genauer gesagt, die Akzeptor-Fluoreszenzlebensdauer). Dieser Prozess der "schnellen internen Konversion" tritt normalerweise in geringem Maße bei fluoreszenten Farbstoffen auf und verringert die Fluoreszenzausbeute.

Bei Fluoreszenzproteinen ist zu beachten, dass sie eine sehr kompakte Struktur besitzen, die von mehreren  $\beta$ -Platten gebildete so genannte  $\beta$ -Tonne. Die Außenseite dieser Tonne besteht aus einem "Peptid-Rückgrat", indem sich alle Seitenketten der Aminosäuren an der Innenseite befinden. Dies sorgt für einen molekularen Füllungsgrad der Tonne, der so hoch ist, dass es keinen Platz für Wassermoleküle lässt. Die Innenseite ist also als apolares "Lösungsmittel" zu betrachten, dass den durch autokatalytische Oxidierung dreier Seitenketten entstandenen Farbstoff umgibt und ermöglicht, effizient zu fluoreszieren. Dies ist auch bei synthetisch hergestelltem GFP-Farbstoff zu beobachten; in polaren Lösungsmitteln fluoresziert dies nicht, aber in apolaren Lösungsmitteln ist die "schnelle interne Konversion" mit Ladungsträgern effektiv aufgehoben.

Die Fluoreszenz des YFP Moleküls ist zu verringern, indem man den Fluorophoren Platz gibt, um über Kollisionen die Anregungsenergie an die Umwelt abzugeben. In anderen Worten: Durch gezieltes Ersetzen der größeren, hydrophoben Seitenketten in unmittelbare Nähe des Fluorophors durch kleinere wird die Energieaufnahme nicht beeinträchtigt, aber die Anregungsenergie geht verloren.

Wir haben durch zwei Punktmutationen im YFP-Molekül diese Situation hergestellt. Das Produkt ist ein farbiges Protein, das nur noch eine vernachlässigbare Restfluoreszenz von circa 1% besitzt. Der Mechanismus der "schnellen internen Konversion" wurde durch Vermessung der restlichen Lebensdauer nachgewiesen, die wie erwartet von  $\pm 3$  Nanosekunden auf  $\pm 100$  Picosekunden absinkt. Die Absorption war vergleichbar mit nicht mutiertem YFP. Wir nannten dieses neue Chromoprotein REACh (für Resonanzenergie akzeptierendes Chromoprotein).

Vorteile dieser Kombination sind nicht nur die hervorragende spektrale Überlappung, sondern auch die durch die "schnelle interne Konversion" bedingte Fluoreszenzlebensdauer, die zur Folge hat, dass der nur kurzfristig angeregte Akzeptor einer signifikant verringerten Photobleichung unterliegt und der "Durchfluss" der Energieübergabe mittels FRET bei hoher Anregungswahrscheinlichkeit des Donors nicht durch die Lebensdauer des Akzeptors begrenzt wird ("frustrierter FRET"). Hierdurch wird aus dem normalerweise bichromatischen Assay eine monochromatische Messung, was wiederum die Möglichkeit bietet, im freien Spektralbereich andere Farbstoffe einzusetzen. Die letzte Möglichkeit der Parallelisierung oder "Multiplexing" der FRET-Messung mit fluoreszentem Nachweis anderer Proteine erlaubt hochkomplizierte zelluläre Messungen, z.B. den Nachweis korrelierender Ereignisse.

Es wurde mittels Western-Blots nachgewiesen, dass das REACh-markierte Ubiquitin von Ubiquitinligaseketten als Substrat akzeptiert wurde, da die markierten Ubiquitinmoleküle in längeren Ketten vorlagen. Des Weiteren konnte die Kolokalisation des REACh-Ubiquitin mit Proteasomen mittls einem eine PEST-Sequenz enthaltenden GFP gezeigt werden.

Die PEST-Sequenz wird effizient von der Ubiquitinierungsmaschinerie erkannt und erfüllt eine physiologische Rolle beim schnellen Umsatz von kurzlebigen Proteinen.

Die kovalente Ubiquitinierung dieses Testsubstrates konnte mittels FRET/FLIM nachgewiesen werden. Eine stark verkürzte Lebensdauer des PEST-markierten GFPs ist in perinukleären Proteasomen sichtbar.

Diese Methode eignet sich damit für den Nachweis ubiquitinierter GFP-markierter Proteine (Ganesan, 2005b).

# Qualitätskontrollmechanismen bei Proteinaggregaten

Die vorher beschriebenen Faltungs- und Ubiquitinierungsassays werden in Zusammenarbeit mit dem Aggregopathiekonsortium des Göttinger DFG Forschungszentrum für Molekulare Physiologie des Gehirns eingesetzt, um die Beteiligung und Beeinflussung dieser Qualitätskontrollmechanismen in neurodegenerativen Erkrankungen zu untersuchen (Abb. 7). In diesem Konsortium sind mehrere Modellsysteme für humane Erkrankungen etabliert. Im Falle vom Morbus Huntington und der amyotrophen Lateralsklerose wurde schon nachgewiesen, dass die Aggregation der jeweils beteiligten Proteine, d.h. glutamin-expandiertes Huntingtin und Superoxid-Dismutase (SOD) eine starke Steigerung der zellulären Chaperonaktivität hervorruft. Diese Situation spiegelt die durch Faltungsstress induzierte Situation in Bakterien wieder, die wir zur Identifizierung geeigneter faltungssensitiver Fluoreszenzproteine eingesetzt haben. Der genaue Mechanismus der Induktion ist bislang unklar. Die Zelle versucht die Aggregation zu verhindern, indem sie entweder die Oberfläche des Aggregats vor weiterem Zuwachs schützt oder versucht, die fehlgefalteten Proteine erneut zu falten.

Bei SOD konnte nachgewiesen werden, dass die stärkste Chaperoninduktion nicht von der schnell aggregierenden aktivitätsdeletierten Form des Proteins, sondern vom Wildtyp-Protein ausging. Dies lässt darauf schließen, dass die schnelle Bildung der Aggregate die Proteine sequestriert und damit die Möglichkeit der zellulären Anpassung verhindert. Dies würde bedeuten, dass Aggregate pathophysiologisch wünschenswert sind, da sie für die Zellen inerte Objekte darstellen. Die letztere Schlussfolgerung ist konsistent mit dem Befund, dass sich die aktivitätsdeletierten SOD-Moleküle der Ubiquitinierung entziehen. Die schnell gebildeten Aggregate waren verglichen mit dem stark ubiquitinierten Wildtyp-Protein nur geringfügig ubiquitiniert.

Das Zusammenspiel beider Qualitätskontrollmechanismen konnte anhand des chaperonregulierenden Bag-1 gezeigt werden. Bag-1 induziert Chaperonaktivität zum Teil durch eine Konzentrationssteigerung der in der Zelle vorhandenen Chaperone. Außerdem wird die Bag-1 $\Delta$ C-Mutante, aber nicht das Wildtyp-Bag-1 stark ubiquitiniert und zum Proteasom transportiert. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung von Bag-1 an Hsps eine gegenseitige Beschützung vor proteasomalem Abbau hervorruft. Fehlt Hsp-bindungsfähiges Bag-1, dann würden die Hsps vermehrt abgebaut. Fehlt Hsp-Substrat für die Binding an Bag-1, dann würde der Überfluss an Bag-1 weiter herunterreguliert. So ein Regulationsmechanismus enthielte einen Rückkopplungsschritt, der zu hoher Sensitivität führen könnte. Der Nachweis dieser Regulation wird zurzeit bearbeitet.

# Mikroskopische Technologieentwicklung

# Biotechnologische Verbesserung intramolekularer FRET-Biosensoren

Nach der Einführung der FRET-Methode in die moderne Zellbiologie -- etwa vor zehn Jahren -- fast zeitgleich mit der Entdeckung der Fluoreszenzproteine, hat es drei "Anwendungswellen" gegeben. Initial wurde hauptsächlich die Interaktion zwischen einzelnen fluoreszenzmarkierten Proteinen untersucht. Spektrale Kontamination bei



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Todesvorgänge bei neurologischen Erkrankungen, die auf aggregierenden Proteinen basieren (Aggregopathien). Die verschiedenen Schritte und möglichen Detoxifizierungsmechanismen sind angegeben.

Intensitätsmessungen waren problematisch, weil sie bei den Messungen zu erheblichem Hintergrund führte. Andererseits gibt es verschiedene Beispiele in der Literatur, wo FRET problemlos zwischen Proteinen mittels FLIM gemessen wurde. Für die meisten Anwendungen wurden die zu untersuchenden Proteine oder Proteinfragmente zu einem einzigen Konstrukt mit den beiden jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffen vereinigt. Diese intramolekularen Konstrukte zeigen zwar auch spektrale Probleme, die jedoch innerhalb eines Konstruktes konstant sind, so dass über Emissionsveränderungen direkt FRET nachweisbar ist. Dies vereinfacht die Messungen und hat zur großen Popularität der Einzelketten-Biosensoren geführt. Bekannte Vorbilder sind die Kalziumsensoren, die aus einer Kette von zwei Fluoreszenzproteinen bestehen, Calmodulin und das M13-Peptid, wobei unter Einfluss der Kalziumbindung an Calmodulin die Affinität für das M13-Peptid steigt. Kalzium bewirkt damit eine Konformationsänderung in der Sensorenkette, die als verändertes FRET-Signal zu messen ist. Es existieren andere Beispiele für gleichartige Aktivitätssensoren, wie den der Rho-Familie GTPasen. Diese beruhen auf der Erkennung von GTP-enthaltenden (aktivierten) Rho-GTPasen durch die spezifische Bindung von Domänen der Proteine, die in der Zelle zu aktivierten GTPasen rekrutiert werden. Auch Proteinkinase-Sensoren sind nach dem gleichen Prinzip konzipiert worden; ein Kinasesubstrat wird nach der Phosphorylierung von einem phosphospezifischen Bindungsmodul erkannt. Für einen Überblick dieser Sensoren, siehe (Bunt, 2004; Lange, 2004). Diese Sensoren sind sehr präzise, weil sie zelleigene Komponenten für die Bestimmung von Aktivitäten von Signalwegen benutzen. Sie sind aber nur beschränkt einsetzbar, weil es oft zu einer unvollständigen Antwort bei der Nutzung von Proteindomänen führt. Das Fehlen von anderen Domänen des gleichen Proteins kann z.B. zur Abwesenheit von Regulationsschritten führen, die normalerweise über diese anderen Domänen reguliert werden, oder die Einzeldomänen bewirken eine falsche intrazelluläre Verteilung der Sensoren im Vergleich mit dem intakten Protein. Des Weiteren können diese Domänen auch andere tertiäre/quaternäre Strukturen zeigen, wodurch Sensoren sterisch behindert werden können. Es gibt Beispiele von Phosphorylierungssensoren, die ihre Empfindlichkeit für eine Inaktivierung durch phosphatasebedingte Dephosphorylierung verloren haben und

unnatürlich lange im phosphorylierten Zustand bleiben. Die Lösung für ein solches Problem ist, so viel wie möglich an intakten Proteinen als Biosensor einzusetzen, um die natürliche physiologische Regulation der zu messenden Prozesse zu gewährleisten. Dies setzt voraus, dass die Biosensoren wiederum als einzelne, getrennte Elemente vorliegen müssen.

Es gibt aber durchaus Beweggründe diese intramolekularen Biosensoren einzusetzen. Die Beschränkung auf eine Domäne eines Effektormoleküls bedeutet meistens, dass ein so konstruierter Reporter keine physiologische Rolle mehr übernimmt. Vielmehr ermöglicht es die Analyse eines scharf definierten Signalvorgangs ohne durch Überexpression des Sensors die physiologische Maschinerie zu verändern. Sensoren beteiligen sich nur peripher an den Signalkaskaden und werden, abgesehen von einer möglichen Pufferung der aktivierten Signaleffektoren, den Ablauf dieser Kaskaden nicht grundsätzlich ändern.

Ein weiterer Vorteil ist die relativ einfache Handhabung dieser Sensoren. Sowohl das Design, als auch die Messung ist logisch und einfach. Eine geeignete Reporterdomäne wird zwischen Donor und Akzeptor eingebettet. Die spektralen Veränderungen können auch in Anwesendheit konstanter spektraler Kontamination auf einfache Art und Weise mikroskopisch in den zwei Emissionskanälen gemessen und durch Teilung dargestellt werden. Zwar geht hierbei weitgehend die Quantifizierung verloren, aber diese Sensoren sind gut für Fragen der Kontrastdarstellung, z.B. ob eine Reaktion überhaupt, oder nur in begrenzten zellulären Regionen auftritt geeignet. Aus diesem Grund wird das FRET-Biosensor-Design noch längere Zeit wertvolle Information geben. Andererseits ist der Einsatz momentan durch den niedrigen dynamischen Bereich begrenzt. Das Problem ist, dass Donor- und Akzeptor-Fluoreszenzproteine immer relativ nahe aneinander liegen, wie am Vorbild der oben besprochenen Rho-Biosensoren. Die Rhotekindomäne streckt sich durch Bindung an aktives, GTPenthaltendes Rho etwas aus. Diese Konformationsänderung kann eigentlich nicht über eine pure Abstandserweiterung im FRET-Konstrukt gemessen werden, weil die Veränderung relativ zu dem fusionsbedingten Trennungsabstand keine starke Signalveränderung hervorrufen würde. Es ist auch bekannt, dass kleine Veränderungen in Linkersequenzen oder das Austauschen der Donor- und Akzeptorposition in solchen

Biosensoren zu starken Signalveränderungen führen können. Hieraus wird klar, dass in solchen FRET-Biosensoren nicht der Trennungsabstand, sondern vielmehr die relative Orientierung der Fluoreszenzproteine die Signalgröße bestimmt. Da FRET auf einer Resonanzreaktion der im Paar enthaltenen Energie beruht, spielt die Orientierung der Energieverteilung eine große Rolle. Wenn die Energiedipole senkrecht aufeinander stehen, kann zum Beispiel unabhängig vom Fluorophorabstand keine Energie übertragen werden. Leider gibt es statistisch in der statisch-räumlichen Verteilung der Dipole viel mehr ungünstige als günstige Orientierungen (siehe Esposito, 2004). Willkürlich gewählte Fusionen in dem Entwurf solcher FRET-Biosensoren führen deshalb meist zu unsensitiven Resultaten. Die Lösung besteht darin, die Linkersequenzen randomisiert zu mutieren, bis ein Sensor entsteht, der einen möglichst großen Kontrast zwischen Anfangssituation und veränderter Konformation zeigt. Das heißt auch, dass es fast immer noch bessere Lösungen geben würden.

Um dieses Problem zu lösen, beziehungsweise um eine rationelle Strategie zur Optimierung zu ermöglichen, haben wir zehn Adaptersequenzen definiert, die eine bekannte und stabile Drehung kodieren (Mitkovski, 2005b). Diese Adaptoren basieren auf einer kleinen, wasserstabilen I-Helix, bestehend aus den Aminosäuren Alanin und Lysin. Addierung einer Aminosäure an so eine Helix ruft eine Drehung von 100 Grad hervor. Ausgehend von der kleinsten bekannten stabilen Helix kann in Schritten von zehn Einzeladdierungen mit ungefähr 30 Grad Präzision eine ganze Umdrehung durchgeführt werden. Diese Strategie, die wir LEGO, für "Lineare Extension für Gute Orientierung" getauft haben, könnte also den Entwurf von Einzelkettensensoren maßgebend vereinfachen. Wir haben unsere Strategie am Vorbild der Rhotekinbasierten Rho-Aktivitätsbiosensoren getestet. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse großer Zellzahlen konnte eine deutliche Periodizität in der FRET-Antwort von zehn unterschiedlich adaptierten Sensoren nachgewiesen werden. Hierbei existieren LEGO-Adaptoren, die einen maximalen Unterschied zwischen dominantnegativ und konstitutiv-aktiv exprimierenden Rho-Formen in Zellen nachweisen. Die Periodizität entspricht dem von der α-Helix bestimmtem Drehmoment von 3.5 Aminosäuren und zeigt außerdem den korrekten Einfluss der Kettenverlängerung durch Einzeladdition an der Grundhelix.

Diese Optimalisierungsstrategie wird benutzt, um optimale Biosensoren für Isomeraseinduzierte Konformationsänderungen in Teilen des Tau-Proteins zu generieren.

#### Verbesserung von FRET/FLIM Analysen

Wegen der Möglichkeit zur Messung komplexer Signalkaskaden durch die physiologische Einbettung von signalproteinbasierten FRET-Assays gibt es in der letzten "Inkarnation" der FRET-Sensoren einen Trend zurück zu *inter*molekularen FRET-Messungen. Zum anderen gibt es den Trend, strukturelle Richtungen aufzuzeigen, d.h. dynamische, molekulararchitektonische Untersuchungen, anstatt isolierter Aktivitätsbestimmungen. Die verbesserte Technik, insbesondere die FLIM-Technologie, ermöglicht immer mehr quantitative und zuverlässige Messungen, unabhängig von Bildgebungsartefakten, wie spektraler Kontaminationen.

Das größte Problem hierbei ist, dass die Quantifizierung der Lebensdauer an sich biologisch bedeutungslos ist. Die gemessene Lebensdauer korreliert zwar quantitativ mit dem Auftreten von FRET. Sie wird aber in jedem Bildpunkt durch Mischung von Antworten mehrerer Moleküle bestimmt. Obwohl bei FRET angenommen werden kann, dass es zwei Situationen gibt, einmal ein Donormolekül was kein FRET untergeht, und einmal eins das FRET untergeht, befinden sich tausende von unterschiedlich reagierenden Molekülen in jedem optisch auflösbaren Bildpunkt. Der durch die Bestimmung der Durchschnittslebensdauer dieser Population enstehende Kontrast ist die eigentliche biologische Information nicht in der FRET-Effizienz enthalten, sondern in der Fraktion der sich am FRET-Prozess beteiligenden Proteine. In scannenden FLIM-Anwendungen kann im Prinzip aus der exponentiellen Anpassung die Größe dieser Fraktionen mit größerem Photonenaufwand errechnet werden. Wie besprochen gibt es für "wide-field Frequenz-Domänen-FLIM" das Verfahren der "Globalen Analyse", wodurch unter der Annahme zweier räumlich-invarianter Lebensdauern diese zwei Populationsgrößen berechnet werden können.

Die Gültigkeit dieser Annahme ist aber nicht immer gewährleistet, und die Methode kann wegen Verletzung des zugrunde liegenden mathematischen Modells große Fehler verursachen. Das größte Problem ist, dass die Annahme zweier diskreter Lebensdauern nicht gültig ist, wenn es zum Beispiel in der molekularen Interaktion mehrere unterschiedliche Konformationen gibt, die ihre eigene, leicht unterschiedliche, Lebensdauer hervorrufen. Hierbei muss man annehmen, dass es zwei Durchschnittslebensdauern mit gewisser Verteilung gibt. Unter den experimentellen Konditionen der oben beschriebenen EGF-Rezeptoraktivierung waren die Bedingungen für die Globale Analyse erfüllt, weil alle Phosphoepitope gleichzeitig vom Antikörper besetzt werden und der Unterschied gegenüber dem unphosphorylierten Rezeptor so groß war, dass eine kleine Abweichung der FRET-Lebensdauer zu vernachlässigen war.

Die richtige Annahme ist aber, dass es zwei Situationen gibt, die beide eine gewisse durch die molekulare Umgebung oder intrinsische Interaktionsvariabilität bedingte Verteilung um zwei diskrete Lebensdauern ergeben.

Um diese Situation mathematisch beschreiben zu können, wurde auf die Definition der Momente einer statistischen Verteilung zurückgegriffen. Der FRET-Prozess wurde so als Begriff von Lebensdauer und Varianz beschrieben. Dieser neue Formalismus erlaubt uns i) biologische Heterogenität bei FRET an Proben quantitativ zu beschreiben, und ii) die durch die Frequenz-Domäne gegebenen zwei unterschiedlichen Lebensdauerbestimmungen mathematisch zuzuordnen und durch eine analytische Lösung die Populationsgröße des FRET-Prozesses zu bestimmen (Esposito, 2005). Dies war mit traditionellen Analysemethoden unmöglich.

Wir haben die neue Analysemethode bei der Bestimmung der relativen Sortierung von Proteinen in Lipidflotten eingesetzt und werden sie jetzt als Standardanalyseverfahren einsetzen.

# Instrumentationsentwicklungen; Automatisierung und

# Vereinfachung

Die intrinsischen Vorteile der FLIM-Methodologie; die quantitative Natur, Robustheit gegenüber Artefakten und die Möglichkeit, molekulare biochemische Ereignisse in Zellen zu messen, eignen sich hervorragend zur Untersuchung in Screeningverfahren. Die extreme Abstandsabhängigkeit sorgt dafür, dass es bei FLIM kaum falschpositive Resultate geben kann. Dennoch ist die Methodologie zu aufwändig, um in breiter Anwendung eine Routinemessung zu erlauben. Sowohl in der Herstellung, als auch in der Handhabung und Benutzung sind spezielle Kenntnisse und Erfahrungen notwendig. Des Weiteren gibt es kaum kommerzielle Anbieter der FLIM-Methode, insbesondere bezüglich der Frequenz-Domänen-Variante. Dieser letzte Teil beschreibt die Entwicklung von einer screeningfähigen FLIM-Instrumentation und die Entwicklung einer neuen, alternativen FLIM-Kamera, die durch einfache Bedienung und niedrige Kosten eine weitere Translation in die "Life Sciences" unterstützen kann. Die beschriebenen Anpassungen zur Anwendung der FLIM-Methode in Hochdurchsatz-Screening wurden mit dieser neuen Kamera kombiniert und versprechen eine breite Akzeptanz dieser analytischen Technologie.

### Automatisierung

Unser Frequenz-Domänen-FLIM basiert auf einem invertierten Zeiss Axiovert-200-M Mikroskop, ausgestattet mit einem Multikanalbildverstärker, gekoppelt an eine CCD-Kamera. Der "Gain" des Bildverstärkers wird durch einen Hochfrequenz-Signalgenerator getrieben, der auch die externe Lichtmodulation kontrolliert. Das modulierte Licht entsteht entweder durch schnelle Schaltung einer Laserdiode, oder durch das Durchspeisen des Lichtes eines CW- (continuous wave) Gaslasers durch einen akustooptischen Modulator (AOM). Bei der letztgenannten Methode wird das Licht durch das Resonanzkristall in ein Diffraktionsmuster über mehrere Ordnungen gespalten. In diesen Ordnungen, die mittels eines Diaphragmas selektiert werden, ist das durchtretende Licht mit der harmonischen Grundresonanz des Kristalls moduliert. In unserem Fall benutzten wir eine Radiofrequenzmodulation von 80 Megahertz, um die Nanosekundendauer der Fluoreszenzlebensdauer erfassen zu können. Die Messung besteht darin, das emittierte Fluoreszenzbild im Bildverstärker mit dem Anregungssignal des Signalgenerators (und AOM) zu multiplizieren. Aus dieser Multiplikation kann die Verzerrung des zeitlich kodierten Signals durch die Verzögerung anhand der Lebensdauer errechnet werden.

Die Automatisierung besteht darin, dass die Kalibrierung der Apparatur, die Fokussierung, die Bestimmung der Beleuchtungszeit und die Aufnahmesequenz einer

Bildoberfläche automatisch generiert wird. Diese Automatisierung wird von einer selbst entwickelten Software gesteuert und verarbeitet. Hierfür arbeiten zwei Rechner zusammen, der erste steuert die FLIM-Bildaufnahmen und lenkt einen automatischen Objekttisch so, dass mit mehreren leicht überlappenden Aufnahmen eine Bildoberfläche beliebiger Größe abgetastet werden kann. Der andere Rechner verarbeitet die Bilder in Echtzeit. Dieser Rechner bestimmt für jedes Bild die Position der einzelnen Objekte, deren Lebensdauer und kann auch eine Anzahl morphologischer Parameter bestimmen (Diameter, Form, etc.). Auch Objekte, die aneinander liegen, können durch Einsatz bestimmter Bildverarbeitungsverfahren in ihre einzelnen Komponenten getrennt werden. Die Aufnahmegeschwindigkeit konnte durch Optimierung der Apparatursteuerung von ungefähr 1 Hertz auf 10 Hertz gesteigert werden.

Es gibt mehrere Anwendungsmodi für automatisierten FLIM:

- i) Hochdurchsatz-Screening an flüssigen Proben in Multiwellplatten, bakteriellen Kolonien auf Wachstumsplatten oder Zellen auf beliebigen anderen Oberflächen. Ziel solcher Messungen ist, mit großer Reproduzierbarkeit einen möglichst hohen Durchsatz zu gewährleisten. Unser Gerät hat in allen oben genannten Vorbildern die Kriterien des ultrahohen Durchsatzes geschafft, was einer Million Assays am Tag entspricht.
- Erfassung seltener Ereignisse. Ziel ist es, abweichende Zellen oder Proben auf dem Hintergrund vieler nicht interessanter Objekte zu finden. Hierbei kann zwischen zwei Modi geschaltet werden. Das Suchen wird mit niedriger Vergrößerung und hoher Geschwindigkeit ausgeführt. Positive Objekte können nach Erfassung mit höherer Vergrößerung näher untersucht werden.
- iii) Bestimmung der Heterogenität einer zellulären Kondition. Wenn mittels geeigneter Biosensoren gezielt das Auftreten einer biochemischen Kondition nachgewiesen werden kann, kann im Screeningverfahren die genaue prozentuale Anzahl positiver Zellen in einer beliebig großen Population bestimmt werden. Diese Anzahl kann dann über die Zeit verfolgt werden. Diese Art des Screenings eignet sich besonders für die Bestimmung

der Todesabläufe in Erkrankungsmodellsystemen und erlaubt weiterhin die Korrelation interessanter Ereignisse and anderer messbarer zellulärer Parameter, um auf kausale Zusammenhänge schließen zu können.

 iv) Histologisches Screening. In diesem Modus wird in Quasi-Echtzeit ein histologisches Pr\u00e4parat durchlaufen, wobei die anatomische Information und der in der FLIM-Messung erhaltene Kontrast biochemisch relevanter Ereignisse korreliert werden k\u00f6nnen.

#### Eine vereinfachte FLIM-Kamera

Die kritische Komponente beim Frequenz-Domänen-FLIM ist der Bildverstärker. Dieses Gerät bedarf aufwendiger Elektronik, hat eine relativ geringe Photoneneffizienz und räumliche Auflösung, und leidet unter "Hühnergitter" Abbildungsartefakten, die durch die Faserankopplung am Phosphorschirm verursacht werden. Des Weiteren kann die Photokathode des Geräts durch hohen Photonenflux irreversibel beschädigt werden. Die Notwendigkeit des Bildverstärkers verhindert die Kommerzialisierung und den breiten Einsatz von FLIM als Routineverfahren.

Vor kurzen wurde eine neue Art Kamera entwickelt, die diesen Nachteil aufheben könnte. Sie wurde für Echtzeitaufnahmen von dreidimensionalen Bildern entwickelt und benutzt dabei den gleichen Vorgang, wie beim Frequenz-Domänen-FLIM. Das Prinzip dieser Kamera ist die so genannte "Photonenflugzeit-Bestimmung" (Time of Flight, TOF). Im TOF Verfahren wird sinusmoduliertes Licht von einem Infrarot-LED-Array an der Kamera abgegeben und auf die dreidimensionale "Szene" gestrahlt. Das vom Objekt reflektierte Licht wird von der Kamera aufgenommen und die verzögerungsbedingte Phasenverschiebung wird mittels eines Lock-in-Verfahrens gemessen. Lock-in-Methoden sind sehr empfindlich. Sie basieren, wie bei FLIM, auf der Multiplizierung der ausgehenden und aufgefangenen Signale. Bei einer Phasenverschiebung von null Grad liefert diese Multiplizierung das maximal erreichbare Signal (d.h. das beleuchtete Objekt befindet sich der in Abstandsbestimmung unmittelbar vor der Kamera, beim FLIM würde dies einer Fluoreszenzlebensdauer von null Nanosekunden entsprechen). Eine Verschiebung von einer halben Periode sorgt für ein komplettes Auslöschen des Signals, weil die beiden

Signale eine umgekehrte Polarität haben. Alle Phasenverschiebungen dazwischen liefern ein phasenabhängiges Ergebnis der Multiplikation. Der einzige Unterschied bei der FLIM-Anwendung ist, das anstatt der Reflektionsverzögerung die Fluoreszenzlebensdauer die Phasenverschiebung bestimmt. Da Licht sich mit etwa drei Nanosekunden pro Meter bewegt und diese Kamera eine räumliche Genauigkeit von Zentimetern besitzt, ist sie ideal geeignet, die Nanosekundenbruchteile der Fluoreszenzlebensdauer zu messen, die typischerweise bei FRET mit üblichen biologischen Farbstoffen nachzuweisen sind.

Die Vermessung der Phasenverschiebung gelingt mit der Kamera, weil die einzelnen Photorezeptoren auf dem CCD/CMOS Detektorchip so konzipiert sind, dass die in Silica generierten Photoelektronen nicht einfach aufaddiert werden, sondern dass sie noch im Silicasubstrat über mehrere spezielle Bereiche sortiert werden. Diese Sortierung wird durch Spannungsunterschiede gesteuert, die identisch mit der Modulationsfrequenz des Lichtes über diesen Bereichen angelegt werden. Hierbei ist der Phasenunterschied zwischen zwei Paaren von Sammelbereichen immer 90 Grad. Die Elektronik der Kamera liest nach der Aufnahme diese Bereiche aus und generiert damit simultan Bilder bei verschiedenen Phasenzuständen.

Die Anpassung der Kamera für FLIM bestand darin, die LED-Anordnung zu entfernen und das Gehäuse von einem Rechnerventilator zu kühlen. Der bei der Lebensdauer zusätzlich auftretende Amplitudenverlust wird im dreidimensionalen Verfahren nicht benutzt, ist aber für FLIM verfügbar.

In eine Reihe von Versuchen konnten wir die grundsätzliche Tauglichkeit der Kamera für Nanosekunden-Lebensdauermessungen zeigen. Zwar fehlt ein Faktor 20 an optischer Empfindlichkeit für die Messung zellulärer Expressionsmengen von Fluoreszenzproteinen, aber diese Differenz kann über Verbesserungen am Kameraprinzip erreicht werden. Die wichtigste Modifikation ist das Nachbessern der Elektronik, so dass eine rauscharme Detektion erreicht werden kann. Hierfür ist es auch notwendig, dass der Sensorchip aktiv mit Peltierelementen gekühlt wird.

Die Vorteile dieser Kamera sind: i) sie ist kostengünstig, ii) einfach an jedes "widefield" Mikroskop anzuschließen, iii) die CCD-Oberfläche besitzt eine hohe räumliche Auflösung und Sensitivität, iii) sie ist robust und nicht von hohem Photonenflux beeinträchtigt. Der wichtigste und grundsätzliche Unterschied zu herkömmlichen Verfahren ist, dass die für FLIM benötigten phasenabhängigen (durch Lock-in generierten) Bilder simultan, und nicht wie üblich, sequentiell erfasst werden. Wir konnten deswegen auch zeigen, dass bei sich schnell bewegenden Objekten keine Bewegungsartefakte in der Lebensdauerbestimmung auftreten. Wenn zwischen den Aufnahmen mehrerer Bilder eine Bewegung auftritt, ist der räumliche Intensitätszusammenhang verloren und aus der Sequenz kann dem Objekt keine Lebensdauer mehr zugeordnet werden. Wenn die Bilder aber simultan aufgebaut werden, wird noch die korrekte Lebensdauer bestimmt, wenn auch an einem räumlich verzerrten Objekt. In unseren Händen ist die Kamera imstande in Echtzeit (24 Hertz) Lebensdauer zu generieren und zu verarbeiten. Die Steuerung der Beleuchtungssignale, die Lock-in-Verarbeitung in den Sensoren, Auslesen und Interpretation der Signale wird durch die interne Elektronik der Kamera erledigt. Wir haben mit dem internen Signalgenerator der Kamera sowohl den AOM für externe Lichtmodulation, eine Laserdiode und eine billige "lichtemittierende Diode" (LED) mit zufrieden stellenden FLIM-Resultaten betreiben können.

Mit dieser Kamera in ihrer verbesserten Form, die später dieses Jahr verfügbar sein wird, kann für einen Bruchteil des jetzigen Preises und Aufwand -also in jedem Labor-FLIM betrieben werden.

# Zusammenfassung

In den letzten Jahren ist eine neue bioanalytische Disziplin entstanden, welche die inhärenten Möglichkeiten der analytischen Biochemie und der Fluoreszenzmikroskopie vereint. Diese Disziplin der molekularen Physiologie zeichnet sich dadurch aus, dass biochemische Ereignisse auch in einzelnen Zellen räumlich und zeitlich erfasst werden können.

Sie macht dabei Gebrauch von der gleichzeitigen Entwicklung biologischer Fluoreszenzmarkierungen, hauptsächlich in Form von genetischen Fusionen mit autofluoreszenten Proteinen, und hierauf abgestimmter optischer Messverfahren. Hierbei ist wichtig anzumerken, dass die Messungen meist quantitativer Natur sind, was der Sicherheit und biologischen Relevanz der gewonnenen Daten zugute kommt. Die molekulare Physiologie erlaubt es, ganze zelluläre Systeme im physiologischen Umfeld zu untersuchen.

Bei der Etablierung dieser Verfahren ist einerseits der Einsatz immer avancierterer optischer Technologien und andererseits die Anwendung immer aussagekräftigerer analytischer Methoden essentiell gewesen. Eine weitere Entwicklung in diese Richtung ist abzusehen. Der Autor dieser Habilschrift war seit den Anfängen an dieser Entwicklung beteiligt. Sein wissenschaftlicher Werdegang, der in dieser Habilschrift geschildert wird, zeigt deswegen eine weite Bandbreite an Anwendungen der neuen optischen Technologien.

So konnte durch FRET-basierten quantitativen Nachweis von relativen Bindungsaffinitäten und direkten Enzyminteraktionen die Hypothese bestätigt werden, dass das nsL-TP-Protein die metabolisch veränderten Intermediärprodukte der peroxisomalen Fettsäure- $\beta$ -Oxidation zwischen den zuständigen Enzymen austauscht.

Auch wurde mittels eines FRET-basierten Assays der Aktivierungsstatus von EGF-Rezeptoren untersucht und ein neuer Signalamplifikationsschritt der ligandunabhängigen Autophosphorylierung an der Plasmamembran beschrieben.

Ein vergleichbarer Amplifikationsmechanismus scheint auch für die lipidflottenbasierte EGF-Rezeptor-Signalverarbeitung zu gelten. Hier bewirkt eine Entkopplung der Lipidflotten vom unterliegenen kortikalen Aktinzytoskelett eine messbare Fusionierung der Lipidflotten, die lokal zu einem schnellen Membranauswachsen führt. Auch konnte durch die Nutzung der FRET-Technologie und der morphometrischen Statistik die durch NGF-Rezeptoren ausgelöste Aktivierung der TC10-GTPase durch Bindung von Exo70 gezeigt werden, die zu dramatischem Membranauswachsen in Form von neuritenartigen Fortsätzen führt. Des Weiteren konnte die Signalkaskade vom Rezeptor bis zum aktinpolymerisierenden Effektor N-WASP beschrieben werden, indem N-WASP-Aktivität mittels FRET gemessen wurde.

Eine ebenfalls FRET-basierte Methode, welche die Messung generierter Kräfte an der extrazellulären Matrix während Membranauswachsens ermöglicht, ist ein vielversprechendes Instrument für die detaillierte Untersuchung solcher wichtigen zellformbestimmenden Ereignisse.

Ein weiterer Schritt zu einer Vertiefung des Verständnisses bezüglich signalregulierter zellulärer Formveränderung wird in Form zweier Modelssysteme für neurodegenerative Erkrankungen geliefert. Im Pneumolysin-basierten Meningitis-Modell tritt unter molekular definierter Intervention sowohl eine Stabilisierung des Aktinzytoskeletts und des Mikrotubulizytoskeletts auf. Diese Ereignisse können jetzt mit den gleichen in dieser Habilschrift beschriebenen technologischen Entwicklungen untersucht werden. Strukturmechanistische Einblicke in die Funktionsweise des miktotubulibindenden Tau-Proteins ermöglichten die Etablierung eines strukturell-optimierten Taus, dessen Aktivierungsenergieschwelle für spontane Aggregation überwunden wurde. Dieses Protein aggregiert sofort nach Expression in Zellen und wird momentan auf mit Aggregaten interagierenden Proteinen mittels der FRET-Technologie untersucht. Eine der von Aggregaten aktivierten Signalkaskaden bewirkt die Modellierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts.

Die Entwicklung eines optischen Biosensors für die Aktivitätsmessung zellulärer Chaperone ermöglichte die Identifizierung von Bag-1 als positiven Regulator von Hsp70.

Zusammen mit der Entwicklung eines Biosensors für die Ubiquitinierungsmaschinerie verschaffen diese Verfahren einzigartige Einblicke in die Fehlregulation von Qualitätskontrollmechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen. Sie sind ebenfalls für die Untersuchung dieser als korrigierend eingeschätzter Prozesse auf den Aufbau und die Stabilisierung der zellulären Morphologie wertvoll.

Letztendlich ist die weitere Entwicklung in Richtung der "transparenten" Zelle nicht ohne instrumentelle, biotechnologische und analytische Enwicklungen möglich. Einige dieser Entwicklungen sind in dieser Habilschrift aufgeführt worden. Der Einsatz neuer maßgeschneiderter Varianten der Fluoreszenzproteine, die rationelle Einbindung solcher Fluoreszenzreporter in Biosensorkonstrukte, die quantitative Beschreibung der FRET-beteiligten Molekülfraktion, die Automatisierung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen und die Entwicklung einer kostengünstigeren, einfacheren und schnelleren FLIM-Kamera erlauben größere Schritte in Richtung der Entdeckung der Wirkungsweise der zellulären Machinerie.



# Literaturverzeichnis

- Aktories K, Barbieri JT. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol.* **3**(5):397-410.
- Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*. 431(7010):805-10.
- Artal-Sanz M, Tavernarakis N.(2005) Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Lett.* **579**(15):3287-96.
- Azuma, T., W. Witke, T.P. Stossel, J.H. Hartwig, and D.J. Kwiatkowski, (1998). Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *Embo J.* **17**(5): 1362-70.
- Bastiaens, P.I.H., Wouters, F.S. & Jovin, T.M. (1997) Imaging the molecular state of proteins in cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Sequential photobleaching of Förster donor-acceptor pairs. *Hamamatsu Proceedings*. 77-82.
- Broome BM, Hecht MH. (2000) Nature disfavors sequences of alternating polar and non-polar amino acids: implications for amyloidogenesis. *J Mol Biol.* **296**(4):961-8.
- Bunt G & Wouters FS. (2004) Visualisation of molecular activities inside living cells with fluorescent labels. *International J. Cytology*, **237**, 205-277.
- Burack, W.R., K.H. Lee, A.D. Holdorf, M.L. Dustin, and A.S. Shaw (2002). Cutting edge: quantitative imaging of raft accumulation in the immunological synapse. *J Immunol.* **169**(6): 2837-41.
- Carey MC, Small DM, Bliss CM. (1983) Lipid digestion and absorption. *Annu Rev Physiol.* **45**:651-77.
- Clandinin TR. (2005) Surprising twists to exocyst function. Neuron. 46(2):164-6.
- Corboy MJ, Thomas PJ, Wigley WC.(2005) Aggresome formation. *Methods Mol Biol.* **301**:305-27.
- Dansen TB, Westerman J, Wouters FS, Wanders RJ, van Hoek A, Gadella TW Jr, Wirtz KWA. (1999) High-affinity binding of very-long-chain fatty acyl-CoA esters to

the peroxisomal non-specific lipid-transfer protein (sterol carrier protein-2). *Biochem J* **339**:193-9.

- Dimakopoulos AC. (2005) Protein aggregation in Alzheimer's disease and other neoropathological disorders. *Curr Alzheimer Res.* **2**(1):19-28.
- EauClaire S, Guo W. (2003) Conservation and specialization. The role of the exocyst in neuronal exocytosis. *Neuron*. **37**(3):369-70.
- Esposito A & Wouters FS. (2004) Fluorescence Lifetime Imaging (Unit 4.14).
- Esposito, A., Gerritsen, H.C. and Wouters, F.S. (2005) Fluorescence lifetime heterogeneity resolution in the frequency domain by Lifetime Moments Analysis (LiMA). *Biophysical Journal*, in press.
- Ferrari A, Hoerndli F, Baechi T, Nitsch RM, Gotz J. (2003) beta-Amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture. *J Biol Chem.* 278(41):40162-8.
- Gadella TW Jr, Jovin TM. (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J Cell Biol.* 129(6):1543-58.
- Gadella TW Jr, Wirtz KW.(1991) The low-affinity lipid binding site of the non-specific lipid transfer protein. Implications for its mode of action. *Biochim Biophys Acta*. 1070(1):237-45.
- Gallo, G. and P.C. Letourneau, (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J Neurobiol.* **58**(1): 92-102.
- Ganesan S, Ameer-beg SM, Ng T, Ruonala M, Vojnovic B & Wouters FS (2005b) A YFP-based Resonance Energy Accepting Chromoprotein (REACh) for efficient FRET with GFP. (eingereicht bei *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*)
- Liman, J., Ganesan, S., Dohm, C.P., Krajewski, S., Reed, J.C., Bähr, M., Wouters, F.S. & Kermer, P. (2005) Interaction of BAG1 and HSP70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3715-3725.
- Gassler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B, Mayer MP. (2001) Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem.* **276**(35):32538-44.

- Harpur AG, Wouters FS & Bastiaens PIH (2001). Imaging FRET between spectrally similar GFP molecules in single cells. *Nature Biotechnology*, **19**:167-169.
- Iliev, A.I., Djannatan, J.R., Opazo, F, Gerber, J., Mitchell, T.J., Nau, R. & Wouters, F.S. (2005a) Rho-GTPase –mediated stress fiber formation and extensive microtubule stabilization by the pneumococcal neurotoxin pneumolysin. (eingereicht bei *J. Cell Biol.*)
- Iliev, A.I., Ganesan, S., Bunt, G. & Wouters, F.S. (2005b) Instantly aggregating tau mutant produces Alzheimer's disease-like tau pathology and toxicity in cell culture. (eingereicht bei *Nat. Struct. Mol. Biol.*)
- In Current Protocols in Cell Biology, supplement 7. J. Wiley & Sons, NY, USA.
- In Current Protocols in Cell Biology. J. Wiley & Sons, NY, USA
- Inoue M, Chang L, Hwang J, Chiang SH, Saltiel AR. (2003) The exocyst complex is required for targeting of Glut4 to the plasma membrane by insulin. *Nature*. **422**(6932):629-33.
- Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, Zapata JM, Krajewska M, Stenner-Liewen F, Takayama S, Krajewski S, Lipton SA, Reed JC. (2003) BAG1 over-expression in brain protects against stroke. *Brain Pathol.* **13**(4):495-506.
- Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Krajewski S, Reed JC. (2002)
  Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ*.
  9(4):405-13.
- Lange, D. & Wouters, F.S. (2004) FRET-Mikroskopie: Einblicke in die Wirkungsweise der zellularen Maschinerie. *Neuroforum* **2**, 180-185.
- Lipka G, Schulthess G, Thurnhofer H, Wacker H, Wehrli E, Zeman K, Weber FE, Hauser H. (1995) Characterization of lipid exchange proteins isolated from small intestinal brush border membrane. *J Biol Chem.* **270**(11):5917-25.
- Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev. 79(4):1431-568.
- Malhotra, J.D., P. Tsiotra, D. Karagogeos, and M. Hortsch (1998). Cis-activation of L1-mediated ankyrin recruitment by TAG-1 homophilic cell adhesion. *J Biol Chem.*273(50): 33354-9.
- Mitkovski, M. Bunt, G. & Wouters, F.S. (2005a) Real-time continuous visualisation of cell-induced traction force in focal contacts using a FRET ing extracellular matrix. (*in Vorbereitung*)
- Mitkovski, M., Esposito, A. & Wouters, F.S. (2005b) Rational optimization of linkersequences in FRET biosensors by controlled insertion of rotational bias. (*in Vorbereitung*)
- Nau R, Bruck W. (2002) Neuronal injury in bacterial meningitis: mechanisms and implications for therapy. *Trends Neurosci.* **25**(1):38-45.
- Nau R, Gerber J, Bunkowski S, Bruck W. (2004) Axonal injury, a neglected cause of CNS damage in bacterial meningitis. *Neurology*. **62**(3):509-11.
- Orlowski M, Wilk S. (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys.* **415**(1):1-5.
- Pommereit D, Ruonala, M & Wouters, FS. Exo70-induced neuritogenesis upon NGFmediated neuronal maturation is mediated by a signaling complex at the plasma membrane that includes TC10, N-WASP and Arp2/3. (*In Vorbereitung*)
- Rieder CL, Maiato H. (2004) Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev Cell*. **7**(5):637-51.
- Ross CA, Poirier MA.(2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med.* **10** Suppl:S10-7.
- Ruonala, M. and Wouters, F.S. EGF-induced cellular motility involves fusion of plasma membrane lipid microdomain markers. (*In Vorbereitung*)
- Sacchetti A, Cappetti V, Marra P, Dell'Arciprete R, El Sewedy T, Crescenzi C, Alberti S. (2001) Green Fluorescent Protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells. *J Cell Biochem.* 81(S36):117-128.
- Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. (2005) Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. **309**(5733):476-81.
- Seedorf U, Raabe M, Ellinghaus P, Kannenberg F, Fobker M, Engel T, Denis S, Wouters FS, Wirtz KW, Wanders RJ, Maeda N, Assmann G. (1998) Defective

peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x gene function. *Genes Dev* **12**(8) 1189-201.

- Sheetz, M.P. (2001) Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nature reviews* **2**, 302-396.
- Singh AB, Harris RC. (2005) Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal*. **17**(10):1183-93.
- Sondermann H, Scheufler C, Schneider C, Hohfeld J, Hartl FU, Moarefi I. (2001) Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. *Science*. **291**(5508):1553-7.
- Song J, Takeda M, Morimoto RI. (2001) Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol.* **3**(3):276-82.
- Spira, M.E., R. Oren, A. Dormann, and D. Gitler, (2003). Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured Aplysia neurons. *J Comp Neurol.* 457(3) 293-312.
- Syntichaki P, Tavernarakis N. (2002) Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep.* **3**(7):604-9.
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC. (1997) BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J.* **16**(16):4887-96.
- Takayama S, Reed JC.(2001) Molecular chaperone targeting and regulation byBAG family proteins. Nat Cell Biol. 3(10):E237-41.
- Terada K, Mori M. (2000) Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. *J Biol Chem.* **275**(32):24728-34.
- Tiraboschi, P., Sabbagh, M.N., Hansen, L.A., Salmon, D.P., Merdes, A., Gamst, A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L.J. Corey-Bloom, J. (2004) Alzheimer disease without neocortical neurofibrillary tangles: a second look. *Neurology*, 62(7): 1141-1147.
- Tompa P. (2005) The interplay between structure and function in intrinsically unstructured proteins. *FEBS Lett.* **579**(15):3346-54.

- Vega IE, Hsu SC. (2001) The exocyst complex associates with microtubules to mediate vesicle targeting and neurite outgrowth. *J Neurosci.* **21**(11):3839-48.
- Viola, A., S. Schroeder, Y. Sakakibara, and A. Lanzavecchia (1999). T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 283(5402): 680-2.
- von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. (2005) Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta*. **1739**(2-3):158-66.
- von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. (2000) Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**(10):5129-34.
- Wanders RJ, Denis S, Wouters F, Wirtz KW, Seedorf U. (1997) Sterol carrier protein X (SCPx) is a peroxisomal branched-chain beta-ketothiolase specifically reacting with 3-oxo-pristanoyl-CoA: a new, unique role for SCPx in branched-chain fatty acid metabolism in peroxisomes. *Biochem Biophys Res Commun* **236**(3):565-9
- Wanders, RJ, Denis, S, van Berkel, E, Wouters, FS, Wirtz, KW, Seedorf, U. (1998) Identification of the newly discovered 58 kDa peroxisomal thiolase SCPx as the main thiolase involved in both pristanic acid and trihydroxycholestanoic acid oxidation: implications for peroxisomal beta-oxidation disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **21**(3): 302-5.
- Wen Y, Eng CH, Schmoranzer J, Cabrera-Poch N, Morris EJ, Chen M, Wallar BJ, Alberts AS, Gundersen GG. (2004) EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 6(9):820-30.
- West MW, Wang W, Patterson J, Mancias JD, Beasley JR, Hecht MH. (1999) De novo amyloid proteins from designed combinatorial libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(20):11211-6.
- Wirtz KWA, Wouters FS, Bastiaens PIH, Wanders RJ, Seedorf U, Jovin TM. (1998) The non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) acts as a peroxisomal fatty acyl-CoA binding protein. *Biochem Soc Trans* 26:374-8.

- Wouters FS & Bastiaens PIH (1999). Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells. *Curr. Biol.* **9**: 1127-1130.
- Wouters FS, Bastiaens PIH., Wirtz KWA. & Jovin TM. (1998) FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes. *EMBO J.* **17**: 7179-7189.
- Wouters FS, Markman M, de Graaf P, Hauser H, Tabak HF, Wirtz KWA, Moorman AF. (1995) The immunohistochemical localization of the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) in rat small intestine enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1259** (2): 192-6.
- Wouters FS, Verveer PJ & Bastiaens PIH (2001). Imaging biochemistry inside cells. *Trends Cell Biol.*, **11**:203-11.
- Verveer PJ, Wouters FS, Reynolds AR & Bastiaens PIH (2000). Quantitative imaging of lateral ErbB1 receptor signal propagation in the plasma membrane. *Science* 290:1567-1570.
- Wouters, F.S. (1997) nsL-TP and peroxisomal beta-oxidation. *Ph. D. Thesis*, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
- Wouters, FS & Bastiaens, PIH (2000). Imaging protein-protein interactions by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy (Unit 17.1)
- Zacharias, D.A., J.D. Violin, A.C. Newton, and R.Y. Tsien (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science*. 296(5569) 913-6.

# Danksagung

Die vorgestellten Arbeiten wurden im Jahre 1995 in der Abteilung für Membranbiochemie im Labor von Prof. Dr. Karel Wirtz an der Universität Utrecht begonnen. Die Arbeiten wurden dann in der Abteilung molekulare Biologie des Max-Planck Instituts für biophysikalische Chemie, Göttingen, im Labor von Prof. Dr. Tom Jovin, im Imperial Cancer Research Fund, London, England, und später im European Molecular Biology Laboratory im Labor von Dr. Philippe Bastiaens weitergeführt. Die Arbeiten wurden dann im European Neuroscience Institute der Universität Göttingen fortgesetzt, wo ich seit 2001 eine unabhängige Nachwuchsgruppe leite.

Mein besonderer Dank gilt all meinen vorherigen Vorgestezten, die es mir erlaubt und mich dazu motiviert haben, meine Karriere so zu gestalten, wie es hier beschrieben ist.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Diethelm Richter und Prof. Dr. Erwin Neher für ihr Engagement bei der Etablierung des "ENI". Diethelm, ich danke dir für deine Betreuung und Unterstützung.

Mein Dank gilt auch besonders Dr. Christoph Dohm. Danke dir für deinen nimmermüden Einsatz beim kritischen Lesen dieser Habilschrift. Ich freue mich über die weitere Zusammenarbeit.

Meinen Kollegen und Mitarbeitern danke ich für die produktive Zusammenarbeit und den Enthusiasmus bei der Überlegung neuer Fragestellungen und Herangehensweisen. Ich schätze mich glücklich bei der Zusammensetzung meines Teams und direkten wissenschaftlichen Umfelds. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt dabei Gertrude Bunt. Truusje, je weet wat je voor me betekent, zonder jou zou ik dit niet hebben gered. Jij bent de volgende!

Und an jeden, der auf eine andere Weise zu meiner Arbeit beigetragen hat: Danke!

# FRET microscopy demonstrates molecular association of non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes

# Fred S.Wouters<sup>1,2,3</sup>, Philippe I.H.Bastiaens<sup>2,3</sup>, Karel W.A.Wirtz<sup>1</sup> and Thomas M.Jovin<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Centre for Biomembranes and Lipid Enzymology, Institute of Biomembranes, Utrecht University, Padualaan 8, NL-3584 CH, Utrecht, The Netherlands and <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, D-37077, Göttingen, Germany

<sup>3</sup>Present address: Cell Biophysics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, P.O. Box 123, Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK

<sup>4</sup>Corresponding author e-mail: tjovin@mpc186.mpibpc.gwdg.de

The fate of fluorescently labeled pre-nsL-TP (Cy3-prensL-TP) microinjected into BALB/c 3T3 fibroblasts was investigated by confocal laser scanning microscopy. The protein exhibited a distinct punctate fluorescence pattern and colocalized to a high degree with the immunofluorescence pattern for the peroxisomal enzyme acyl-CoA oxidase. Proteolytic removal of the C-terminal leucine of the putative peroxisomal targeting sequence (AKL) resulted in a diffuse cytosolic fluorescence. These results indicate that microinjected Cy3-pre-nsL-TP is targeted to peroxisomes. The association of nsL-TP with peroxisomal enzymes was investigated in cells by measuring fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the microinjected Cy3-pre-nsL-TP and Cy5-labeled antibodies against the peroxisomal enzymes acyl-CoA oxidase, 3-ketoacyl-CoA thiolase, bifunctional enzyme, PMP70 and catalase. The technique of photobleaching digital imaging microscopy (pbDIM), used to quantitate the FRET efficiency on a pixel-by-pixel basis, revealed a specific association of nsL-TP with acyl-CoA oxidase, 3-ketoacyl-CoA thiolase and bifunctional enzyme in the peroxisomes. These observations were corroborated by subjecting a peroxisomal matrix protein fraction to affinity chromatography on Sepharose-immobilized pre-nsL-TP. Acyl-CoA oxidase was retained. These studies provide strong evidence for a role of nsL-TP in the regulation of peroxisomal fatty acid β-oxidation, e.g. by facilitating the presentation of substrates and/ or stabilization of the enzymes.

*Keywords*: acyl-CoA oxidase/fluorescence resonance energy transfer/3-ketoacyl-CoA thiolase/ PMP70/sterol carrier protein-2

# Introduction

The non-specific lipid transfer protein (nsL-TP, also called sterol carrier protein 2, SCP<sub>2</sub>) is a basic (pI 8.5–9) protein of 14 kDa which catalyzes the transfer *in vitro* of glycerophospholipids, glycolipids and sterols (Bloj and

Zilversmit, 1977, 1981; Crain and Zilversmit, 1980; Chanderbhan et al., 1982; Gadella and Wirtz, 1991). By virtue of this transfer activity, nsL-TP stimulates a number of enzyme activities related to cholesterol metabolism (Billheimer and Reinhart, 1990; Ossendorp et al., 1994). nsL-TP is synthesized on cytoplasmic polyribosomes as a 15 kDa protein containing a 20-amino-acid pre-sequence (Trzeciak et al., 1987; Fujiki et al., 1989) and a C-terminal tripeptide Ala-Lys-Leu. This tripeptide corresponds to the PTS1 consensus sequence (Ser/Ala/Cys)-(Lys/Arg/His)-Leu for peroxisomal targeting (Gould et al., 1987, 1989, 1990) and accounts for the peroxisomal localization of nsL-TP established by various immunocytochemical and biochemical techniques (Van der Krift et al., 1985; Tsuneoka et al., 1988; Keller et al., 1989). The function of the presequence remains unknown, but it has been presumed to be involved in mitochondrial targeting (Keller et al., 1989; Billheimer et al., 1990; Moncecchi et al., 1991). After synthesis in the cytoplasm, pre-nsL-TP is imported into the peroxisomes via a receptor-mediated process (reviewed by Subramani, 1998) and converted into nsL-TP by cleavage of the presequence (Fujiki et al., 1989; Suzuki et al., 1990).

The in vivo function of nsL-TP has been a matter of extensive research and contention. The predominantly peroxisomal localization seems to exclude a role in intracellular lipid transport. This conclusion is supported by the lack of an involvement of nsL-TP in the intracellular trafficking of lysosomal cholesterol (Johnson and Reinhart, 1994). Moreover, there does not seem to be any clear correlation between intracellular levels of nsL-TP and the metabolism of cholesterol in situ (Van Heusden et al., 1985, 1992; Geelen et al., 1987). In contrast, there are various indications for a role of nsL-TP in peroxisomal fatty acid β-oxidation. The 58 kDa protein (also called SCPx) containing the complete sequence of pre-nsL-TP at the C-terminus is 50% homologous to peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase (Ossendorp et al., 1991; Seedorf and Assmann, 1991). Recently, it has been shown that SCPx possesses a 3-ketoacyl-CoA thiolase activity operating on medium-chain fatty acids (octanoyl-CoA) (Seedorf et al., 1994) and, in contrast to the peroxisomal Type I thiolase, branched chain intermediates (Antonenkov et al., 1997; Wanders et al., 1997). It has been suggested that the presence of 3-ketoacyl-CoA thiolase and lipid transfer activity in a single protein results from gene fusion (Baker et al., 1991) and may denote an interdependence of the two activities. Disruption of the nsL-TP gene encoding both nsL-TP and SCPx leads to a severe deficiency of the peroxisomal  $\beta$ -oxidation of pristanic acid in mice (Seedorf et al., 1998). The yeast analog of nsL-TP, PXP18, is expressed in peroxisomes provided the cells are grown on oleic acid (Tan et al., 1994). Recently, Niki et al. (1994) demonstrated an interaction of PXP18 in vitro with yeast

# F.S.Wouters et al.

peroxisomal acyl-CoA oxidase. PXP18 protected acyl-CoA oxidase against heat-induced denaturation, suggesting that PXP18 might function as a molecular chaperone maintaining the integrity of peroxisomal proteins.

In the present study, we assessed the peroxisomal import of microinjected fluorescently labeled rat liver pre-nsL-TP (Cy3-pre-nsL-TP) by confocal laser scanning microscopy (CLSM) in the living cell. Proteolytic removal of the C-terminal leucine established the functionality of the putative peroxisomal targeting. The association of Cy3nsL-TP imported into the peroxisomes with enzymes of the fatty acid  $\beta$ -oxidation pathway was determined by fluorescence resonance energy transfer (FRET) between Cy3-nsL-TP and Cy5-labeled antibodies raised against the various enzymes. These interactions were investigated in parallel by affinity chromatography of peroxisomal matrix proteins on columns of Sepharose-bound pre-nsL-TP.

# Results

# Fluorescent labeling and characterization

Purified pre-nsL-TP was labeled with the sulfoindocyanine dye Cy3 and the various antibodies to peroxisomal enzymes were labeled with Cy5. Under the conditions of labeling, a Cy3:pre-nsL-TP molar ratio of 0.7 and Cy5:antibody molar ratios of 5–7.5 were obtained. Cy3pre-nsL-TP was incubated with a rat liver M-fraction to remove the pre-sequence by proteolysis (Ossendorp *et al.*, 1992). As a result of this treatment, the molecular mass of Cy3-pre-nsL-TP shifted from 15 kDa (Figure 1, lane 1) to 14 kDa (Figure 1, lane 2), a position corresponding to nsL-TP. Transillumination with UV demonstrated that the Cy3 fluorescence was restricted to pre-nsL-TP and nsL-TP (Figure 1, lanes 3 and 4). In the latter case, no fluorescence was observed in the front, indicating that free dye was absent and the pre-sequence was unlabeled.

# Targeting of Cy3-pre-nsL-TP to peroxisomes

After microinjection of Cy3-pre-nsL-TP in BALB/c 3T3 cells, CLSM images revealed a punctate fluorescence pattern distributed throughout the cytoplasm and indicative of peroxisomes (Figure 2A). Upon import of pre-nsL-TP in peroxisomes the presequence is removed; processing is substantial at 17 min and complete within 45 min (Fujiki *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1990). Since the Cy3 probe was located on the mature part of the protein (Figure 1), we infer that the fluorescence signals associated with peroxisomes corresponded to processed Cy3-nsL-TP.

The peroxisomal localization of the microinjected Cy3labeled pre-nsL-TP was further confirmed by digestion with carboxypeptidase A to remove leucine from the Cterminal alanine-lysine-leucine (AKL), the putative peroxisomal targeting sequence. Digestion of unlabeled pre-nsL-TP under these conditions was assessed by determination of the molecular mass using electrospray mass spectrometry (Figure 3). The peak shifted from 15 166 mass units for pre-nsL-TP (Figure 3A) to 15 053 mass units for the treated protein (Figure 3B), indicating that the digestion was complete and specific for the C-terminal leucine. Upon microinjection, the truncated Cy3-pre-nsL-TP exhibited a diffuse labeling in the cell (Figure 2B), attesting to the essential role of the C-terminal AKL sequence in prensL-TP as a peroxisomal targeting signal. The Cy3



**Fig. 1.** Characterization of Cy3-pre-nsL-TP. Total protein staining with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1–2) and UV transillumination Cy3 fluorescence (lanes 3–4). Lane 1, Cy3 labeled rat liver pre-nsL-TP (1  $\mu$ g); lane 2, Cy3 labeled rat liver pre-nsL-TP (10  $\mu$ g) incubated with rat liver M-fraction (75  $\mu$ g) as described in Materials and methods; lane 3, fluorograph of lane 1; lane 4, fluorograph of lane 2.

fluorescence in the punctate structures was also unambiguously assigned to peroxisomes by colocalization with the immunofluorescence patterns of the peroxisomal marker protein acyl-CoA oxidase (Figure 2C and D). The Cy3 fluorescence observed in the nucleus reflects unimported pre-nsL-TP. In order to estimate the amount of micro-injected protein relative to endogenous nsL-TP, the immunofluorescence intensities of Cy5-labeled anti-nsL-TP antibodies (Cy5-8602) were compared in injected and control cells on the same coverslip. The amount of microinjected protein was ~1.6  $\pm$  0.9 times that of the endogenous nsL-TP.

# FRET by pbDIM

The complexation of nsL-TP with peroxisomal fatty acid oxidation enzymes was assessed by *in situ* FRET experiments. After microinjection of Cy3-pre-nsL-TP, cells were fixed and incubated with Cy5-labeled antibodies directed against the following peroxisomal enzymes: acyl-CoA oxidase, bifunctional enzyme, 3-ketoacyl-CoA thiolase, catalase and PMP70, the first three of which are involved in  $\beta$ -oxidation of fatty acids. The range over which FRET between a donor (Cy3) and an acceptor (Cy5) fluorescent molecule varies in a sensitive manner is dictated by the spectral parameter  $R_0$ , i.e. the distance at which the FRET efficiency is 50%.  $R_0$  for the Cy3–Cy5 system is 5 nm (Bastiaens and Jovin, 1996, 1998). Due to the sixth-power dependency on distance, the FRET efficiency with this



Fig. 2. Peroxisomal import of Cy3-pre-nsL-TP. After microinjection into BALB/c 3T3 cells, (A) Cy3-pre-nsL-TP and (B) Cy3-pre-nsL-TP lacking the C-terminal leucine were examined by CSLM in living cells. Colocalization between (C) microinjected Cy3-pre-nsL-TP and (D) Cy5-labeled antibody against acyl-CoA oxidase in fixed cells. Color bar: intensities are represented in black (low) to white (high).

donor-acceptor pair is <10% beyond 7.2 nm. The rationale of the experiments was that FRET between Cy3-nsL-TP and a Cy5-labeled antibody would occur with detectable efficiency only for those cases in which intimate interactions between the respective proteins were present.

The first enzyme tested by FRET for its association with Cy3-nsL-TP was acyl-CoA oxidase using the combined approach of acceptor and donor pbDIM (Bastiaens *et al.*, 1996; Bastiaens and Jovin, 1998; see Materials and methods). Cells microinjected with Cy3-pre-nsL-TP were incubated with Cy5-anti-acyl-CoA oxidase antibodies, and the corresponding FRET efficiencies determined by the CLSM acceptor photobleaching technique (Figure 4A). The first acquired image (D1) is the fluorescence intensity distribution of the donor Cy3-nsL-TP directly excited at

543 nm. The second image (A1) represents the fluorescence intensity distribution of the acceptor Cy5-anti-acyl-CoA oxidase excited at 633 nm. The acceptor fluorophore was subsequently photobleached in part of the field (demarcated by a white rectangle in A2) by repeated scanning with the 633 nm laser line, thereby abolishing FRET. A second donor fluorescence image (D2) was obtained with 543 nm excitation. An increase of donor fluorescence intensity would be expected in the region of acceptor photobleaching only in those cellular structures exhibiting FRET. This effect was apparent exclusively in the peroxisomal punctate structures containing Cy3-nsL-TP (Figure 4B, donor difference image D2–D1), indicating the existence of a complex between nsL-TP and acyl-CoA oxidase in peroxisomes. The FRET efficiency throughout



Fig. 3. Electron spray mass spectrographs of carboxypeptidase A-treated pre-nsL-TP. (A) Purified recombinant rat liver pre-nsL-TP. (B) Carboxypeptidase A-treated pre-nsL-TP. The indicated mass units are identical to the calculated mass units.

the cell was calculated by a simple image arithmetic operation (Figure 4B, [D2–D1]/D2). As expected, the FRET efficiency outside the white rectangle (Figure 4B, upper panel) was near zero.

A second independent assessment of FRET in the cells was made from the donor photobleaching kinetics (Figure 4C). The part of the cell in which the acceptor was photodestroyed (Figure 4D, white rectangle) and thus FRET was abolished served as the reference. The average donor photobleaching time  $(\tau_r)$  in the reference region was used to calculate FRET elsewhere in the image. That is, the donor photobleaching time increased at sites where FRET was operative (Bastiaens and Jovin, 1996). This effect is seen in Figure 4D, which depicts the computed time constants  $\tau$  for every pixel in pseudocolor. Noteworthy are the longer  $\tau$  values indicative of FRET in punctate structures outside the reference region. The  $\tau$ values for the non-imported Cy3-nsL-TP, observed as a diffuse staining in the cytoplasm and nucleus, were comparable to those within the reference region, demonstrating that FRET was only evident for Cy3-nsL-TP imported into peroxisomes.

The FRET efficiency was calculated for every pixel outside the reference region according to Equation 2 (Materials and methods; Figure 4E). The highest efficiencies were restricted to punctate structures. The specificity of the phenomenon was evident from the saturation of the FRET efficiency with increasing amounts of Cy5-labeled antibody (Figure 4E). At the highest dilutions (3200- and 1600-fold) no FRET was evident, while at a dilution of 600-fold, the FRET efficiency was substantial, ~30%, a value which did not increase further at still lower dilutions (higher concentrations). This finding confirmed that the observed complexes were specific, as was also apparent from the relative distribution of  $\tau$  values (and the corresponding FRET efficiencies), within and outside the reference regions. Based on these results, the 600-fold dilution was used in all further experiments. The concentrations of the other antibodies were adjusted so as to obtain Cy5fluorescence intensities equivalent to that of the 600-fold diluted anti-acyl-CoA oxidase.

The same technique was used to investigate possible associations of the other peroxisomal proteins to nsL-TP (Figure 5). Column 1 depicts the donor (Cy3-nsL-TP) fluorescence intensity distribution in the cells, and column

2 the corresponding acceptor (Cy5-labeled antibody) signal; the white rectangle denotes the location of the acceptor-free region after Cy5 photodestruction. The FRET efficiencies were calculated from the acceptor photobleaching method by division of the donor fluorescence intensity images before and after Cy5 photodestruction (Equation 1, Materials and methods; Figure 5, column 3) and by analyzing the donor photobleaching kinetics (Figure 5, column 4). FRET was restricted to punctate structures and was substantial with antibodies raised against bifunctional enzyme, 3-ketoacyl-CoA thiolase and PMP70, but negligible with the antibodies against catalase (Figure 5, row 4), the values for which were comparable to those in the absence of antibody. From these observations we conclude that acyl-CoA oxidase, 3-ketoacyl-CoA thiolase, bifunctional enzyme and PMP70 are in close molecular proximity to nsL-TP, but not to catalase. The structures exhibiting FRET matched the peroxisomal staining by Cy3-nsL-TP. That is, the extraperoxisomal Cy3-pre-nsL-TP did not produce a finite FRET signal, as already noted above.

Statistical evaluations were made of the FRET data in the various confocal images (Table I; Materials and methods). The mean  $\pm$  SD estimations from the donor and acceptor photobleaching experiments on regions from single cells were consistent (within experimental error). The combined mean FRET efficiencies for the various peroxisomal target proteins increased in the order: catalase  $\approx 0 <$  bifunctional enzyme (0.13) < PMP70 (0.24)  $\approx$ acyl-CoA oxidase (0.24) < 3-ketoacyl-CoA thiolase (0.33). The projected area/peroxisome was quite similar for all the target proteins.

During fluorescent detection of microinjected and endogenous nsL-TP and peroxisomal marker enzymes it was observed that nsL-TP and the marker enzymes did not invariably display the same pattern. nsL-TP was always detected in globular peroxisomes in both live and fixed cells, whereas the marker enzymes were also detected in elongated peroxisomes (Figure 5, columns 1 and 2). Such a heterogeneity in morphology and protein composition has been reported previously (Schrader *et al.*, 1995, 1996; Wilcke *et al.*, 1995).

# Affinity chromatography of peroxisomal matrix proteins

The complexation of peroxisomal  $\beta$ -oxidation enzymes with nsL-TP was further investigated by affinity chromatography of rat liver peroxisomal matrix proteins on a prensL-TP–Sepharose column. As a control for nonspecific binding, the matrix proteins were also applied to bovine serum albumin (BSA)- and lysozyme–Sepharose columns. Lysozyme was selected because the protein is small and basic, like nsL-TP.

Under high salt conditions (120 mM KCl), acyl-CoA oxidase eluted from the nsL-TP column in two peaks (Figure 6A). The immunoreactive bands at 71 and 52 kDa corresponded to the A and B subunits of acyl-CoA oxidase, respectively (Osumi *et al.*, 1980). The first peak (fractions 3–12) was recovered in the run-through. The second peak (fractions 17–26) was retained on the column, showing an interaction of acyl-CoA oxidase with nsL-TP. The biphasic elution pattern was also observed when smaller amounts of matrix proteins were applied to the column,

### Association of nsL-TP with $\beta$ -oxidation enzymes



**Fig. 4.** Interaction between nsL-TP and acyl-CoA oxidase monitored by FRET between Cy3-nsL-TP and Cy5-labeled anti-acyl-CoA oxidase antibodies. Cy3-pre-nsL-TP microinjected BALB/c 3T3 fibroblasts were incubated with Cy5-labeled  $\alpha$ -acyl-CoA oxidase antibodies. (**A**) Sequence of events to obtain FRET efficiency maps from acceptor photobleaching. A donor image D1 (Cy3-nsL-TP fluorescence intensity image) and acceptor image A1 (Cy5-labeled  $\alpha$ -acyl-CoA oxidase fluorescence intensity image) are acquired. The acceptor is photobleached in a specific portion of the cell by continuous scanning with the 633 nm laser line (A2). The intracellular reference regions created by Cy5 photodestruction are enclosed in white rectangles. After photodestruction of Cy5 a second donor image D2 is obtained. (**B**) Calculated FRET efficiency maps ([D2–D1]/D2) and difference image (D2–D1). The upper image shows the FRET efficiency calculated for the whole field, and the lower image an enlarged area of the difference image (top half) and FRET efficiency (bottom half) where Cy5 was photobleached. (**C**) First nine images of a donor photobleaching series with the same cell as in (A). (**D**) Calculated photobleaching time map ( $\tau$ ) and photobleaching time ( $\tau_{\tau}$ ) marked by a white arrow. The red curve in the histogram provides the mapping from  $\tau$  values to FRET efficiencies. Bar: 10  $\mu$ m. (**E**) Lower panel, FRET efficiency map outside reference region calculated from donor photobleaching kinetics; upper panel, average FRET efficiency in peroxisomes as a function of Cy5-labeled  $\alpha$ -acyl-CoA oxidase antibody dilution.

F.S.Wouters et al.



**Fig. 5.** Detection of molecular interaction between Cy3-nsL-TP and peroxisomal proteins by acceptor/donor photobleaching FRET microscopy. BALB/c 3T3 mouse fibroblasts were microinjected with Cy3-pre-nsL-TP and counterstained with Cy5-labeled antibodies directed against peroxisomal enzymes. Vertical columns from left to right: column 1, fluorescence of microinjected Cy3-nsL-TP (donor); column 2, fluorescence of Cy5-labeled antibody against peroxisomal protein (acceptor). The region in which the acceptor was photobleached is marked by a white rectangle. The following antibodies were tested: 3-ketoacyl-CoA thiolase (THIO), bifunctional enzyme (BIF), peroxisomal membrane protein 70 kDa (PMP70) and catalase (CAT). Column 3, FRET efficiencies calculated from the ratio of the pre- and post-Cy5 photobleaching donor fluorescence images. Column 4, FRET efficiencies calculated from donor photobleaching kinetics. Bar: 10 μm.

indicating that the two pools may have represented different forms of acyl-CoA oxidase. In support of this conclusion, acyl-CoA oxidase present in the run-through was not retained when again applied to the nsL-TP–Sepharose column. The acyl-CoA oxidase bound to neither the lysozyme- nor the BSA–Sepharose control columns (Figure 6B and C). A further finding was that 3-ketoacyl-CoA thiolase (Figure 6D) and catalase (Figure 6E) were not retained on the nsL-TP–Sepharose column. The affinities of  $\beta$ -oxidation enzymes for nsL-TP were also determined upon application of the peroxisomal matrix proteins to the affinity columns under low salt conditions (25 mM KCl). Acyl-CoA oxidase was quantitatively retained, whereas 3-ketoacyl-CoA thiolase or bifunctional enzyme showed no interaction. Under these low salt conditions, the bulk of acyl-CoA oxidase again exhibited no binding to the lysozyme– or BSA–Sepharose columns.

# Discussion

We have demonstrated that the targeting sequence AKL in pre-nsL-TP is active in living BALB/c 3T3 fibroblasts (Figure 2A). Since the protein is synthesized on free polyribosomes in the cytoplasm, we expected that fluores-

Table I. Mean FRET efficiencies in peroxisomes from donor and acceptor photobleaching in single cells										
Target protein	Donor photobleaching			Acceptor photobleaching						
	<e></e>	Eval. area	<area/>	<e></e>	Eval. area	<area/>				
no Ab	$0.02 \pm 0.10$	2080	4							
CAT	$0.00 \pm 0.11$	3113	22	$0.03 \pm 0.18$	2019	21				
BIF	$0.19 \pm 0.11$	1039	27	$0.07 \pm 0.10$	2250	33				
PMP70	$0.21 \pm 0.19$	777	11	$0.28 \pm 0.15$	1353	21				
AOX	$0.26 \pm 0.08$	1528	27	$0.19 \pm 0.13$	2230	24				
THIO	$0.32\pm0.15$	1050	18	$0.35 \pm 0.12$	1478	20				

Table I. Mean FR	ET efficiencies in	peroxisomes f	from donor and	acceptor	photobleaching in single cells

Donor, Cy3-pre-nsL-TP; acceptor, Cy5-labeled antibodies to target proteins. <E>, mean ± SD for the FRET signal within the mask; Eval. area, number of pixels used in the evaluation (from  $\ge 1$  cell); <area>, area (pixels) per peroxisome. From the mask images, the number of peroxisomes was in the range 70–150. One pixel corresponds to 0.35  $\mu$ m.

cently labeled pre-nsL-TP (Cy3-pre-nsL-TP) microinjected in the cytoplasm would be likely to follow the same import route as natively expressed protein. This expectation was fulfilled. The destruction of the peroxisomal targeting signal resulted in abolishment of peroxisomal import.

Using a similar approach, it was shown that firefly luciferase containing the C-terminal PTS1 SKL motif and human serum albumin conjugated to a peptide carrying SKL are transported to peroxisomes upon microinjection into BALB/c 3T3 cells (Walton et al., 1992). Coinjection of SKL-bearing peptides prevented peroxisomal import of firefly luciferase, demonstrating that the process was saturable. Interestingly, microinjected protein started to appear in peroxisomes 2 h post-injection and reached maximal import at 18 h. This time scale of import was significantly longer than the 30 min which we observed in the case of pre-nsL-TP, for which there was no further increment at longer times. Furthermore, distinct structures were absent after carboxypeptidase treatment of the protein (Figure 2B). We obtained no evidence (in mouse fibroblasts) for a function of the pre-sequence in mitochondrial targeting (Keller et al., 1989; Billheimer et al., 1990; Moncecchi et al., 1991).

There was a punctate distribution of fluorescence intensity in the cells after microinjection of Cy3-pre-nsL-TP (Figure 2A) and after incubation of cells with Cy5-labeled antibodies against nsL-TP, i.e. the endogenous protein (data not shown). Using the Cy5-labeled antibodies against the other peroxisomal enzymes, elongated bodies were observed next to the punctate structures. The existence of a heterogeneous peroxisomal morphology was reported in HepG2 cells fixed with formaldehyde (Schrader et al., 1995, 1996), and found to be dependent on the degree of confluency of the cells. In subconfluent cells, peroxisomes were almost exclusively elongated. Although the fibroblasts in our study were maintained subconfluent in order to facilitate microinjection, we never observed elongated peroxisomes containing nsL-TP. Different peroxisomal shapes in primary Leydig cells have been reported using immunofluorescence specific for catalase, acyl-CoA oxidase and 3-keto-acyl-CoA thiolase (Litwin and Bilinska, 1995). Irregular shapes are also present in regenerating rat liver (Yamamoto and Fahimi, 1987).

Using pbDIM, we were able to detect association of nsL-TP and the peroxisomal fatty acid oxidation enzymes acyl-CoA oxidase, 3-ketoacyl-CoA thiolase and bifunctional enzyme (Figures 4 and 5; Table I). The mean values



Fig. 6. Affinity chromatography of rat liver peroxisomal matrix fraction on pre-nsL-TP Sepharose: high stringency binding and high stringency elution. Peroxisomal matrix fraction (30 µg of protein) was loaded onto Sepharose 4B columns containing covalently coupled prensL-TP, lysozyme or BSA (7 mg protein/ml resin, 0.7 ml resin) and eluted with high salt buffer. Fractions (0.23 ml) were collected and subjected to Western blotting. Fraction numbers are indicated above the figure, and molecular weight markers are indicated in kDa. Separation of peroxisomal protein on [(A), (D) and (E)] a pre-nsL-TP Sepharose column, (B) a lysozyme Sepharose column and (C) a BSA Sepharose column. Blots were incubated with [(A), (B) and (C)] antiacyl-CoA oxidase antibody, (D) anti-thiolase antibody or (E) anticatalase antibody.

of the FRET efficiencies for the various target proteins were in the range 0.13–0.33. The variations might have reflected: (i) inherent differences in the three-dimensional structure of the individual complexes; (ii) different labeling and binding stoichiometries of the antibodies; and/or (iii) differential accessibilities of the antibodies. We attribute the spread in the FRET efficiency values, indicated by the SD values (Table I), to an actual distribution of values within the peroxisomes and not merely to measurement error. Data analysis based on two-dimensional histograms (not shown) demonstrated no correlation between the FRET values and the fluorescence intensities of the donor or the acceptor, with the exception of PMP70 for which the FRET efficiency increased with acceptor concentration. The latter phenomenon is consistent with the planar distribution of PMP70. On the basis of the FRET and biochemical data we propose that the direct peroxisomal protein partners of nsL-TP are present in the form of a multi-enzyme complex, or alternatively, that nsL-TP forms complexes with the individual enzymes as free species in the peroxisomal matrix. These two options could be addressed by a FRET approach using pairs of specific antibodies or Fabs directed against the individual β-oxidation enzymes labeled with donor/acceptor fluoro-

## F.S.Wouters et al.

phores. However, this strategy is disadvantageous due to the anticipated large size of the resultant complex, leading to the separation between donors and acceptors exceeding the critical Förster distance,  $R_0$ .

The specific nature of the energy transfer signal was confirmed by the fact that the FRET efficiency was saturable with increasing amounts of Cy5-labeled antibodies. This was checked for the Cy5-acyl-CoA oxidase antibody by donor photobleaching kinetic analysis (Figure 4E). That the observed associations were specific was also apparent from the distribution of  $\tau$  values within and external to the control region of the FRET experiments.

Unexpectedly, an apparent complexation of PMP70 to nsL-TP was detected using the two independent pbDIM techniques. It is known that nsL-TP can occur in a membrane-bound form (m-nsL-TP) (Van Heusden et al., 1990; Van Haren et al., 1992), especially in extrahepatic tissues. Thus, a complex with PMP70 might be explained by a membrane-association of Cy3-nsL-TP upon import. On the other hand, we note that PMP70 is the only protein tested that is geometrically restricted within the peroxisome, i.e. is confined to the peroxisomal membrane. The sixth-order dependency of FRET on the separation distance holds for a single donor-acceptor pair. In the case of PMP70, the acceptor is distributed in a plane and the distance dependency of FRET would be reduced to fourth order were this protein to function as an acceptor (Bastiaens et al., 1990). Thus, the observed 'association' might reflect this reduced distance dependency and/or the (small) dimensions of the peroxisome. Other proteins known to be localized in the peroxisomal matrix, presumably in a random distribution, should not exhibit this phenomenon.

The identification of an nsL-TP-protein complex inferred from the FRET measurements was confirmed biochemically by nsL-TP-affinity chromatography of a rat liver peroxisomal matrix preparation. Using this technique, specific binding of acyl-CoA oxidase to nsL-TP was detected (Figure 6). However, binding of 3-ketoacyl-CoA thiolase and of bifunctional enzyme to nsL-TP was not demonstrated. The apparent discrepancy between the FRET measurements and the results of affinity chromatography may indicate that 3-ketoacyl-CoA thiolase and bifunctional enzyme bind to nsL-TP indirectly via another protein, possibly acyl-CoA oxidase. The distance between nsL-TP and these enzymes would still fall within the limits of FRET detection, i.e.  $\simeq R_0$ . Affinity chromatography is not ideally suited for detecting indirect interactions (Phizicky and Fields, 1995). It is conceivable that the particular binding conditions of the affinity chromatography experiments (ionic, concentrations, absence of other factors) were unfavorable for the binding of 3-ketoacyl-CoA thiolase and bifunctional enzyme. In short, negative results in such experiments are not conclusive.

Our findings offer support for the notion that nsL-TP is involved in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation rather than acting as a lipid-transfer (sterol carrier) protein. One can reconcile the earlier observations of lipid-binding exhibiting low affinity and broad specificity with a presumed role in fatty acid oxidation by invoking a shuttle function for nsL-TP. The protein would serve to transport fatty acyl-CoA through the chain of fatty acid oxidizing enzymes, presenting the substrate to the respective active

sites and thereby transiently increasing the local concentration. The binding of fatty acyl-CoA to nsL-TP has been reported (Frolov et al., 1996). We have also demonstrated the high-affinity binding of CoA esters of very long fatty acids (C24:0, C24:1, C26:0, C26:1) to this protein (unpublished data) and the binding of fatty acid  $\beta$ -oxidation intermediates and branched-chain fatty acyl substrates, with affinities decreasing in the order palmitoyl-CoA >palmitenoyl-CoA >> 3-hydroxypalmitoyl-CoA, 3-oxopalmitoyl-CoA, phytanoyl-CoA > pristanoyl-CoA (Wouters, 1997). Fast binding kinetics were only observed when the substrates were presented as monomers, i.e. in  $\beta$ -cyclodextrin, corresponding to a function in fatty acid uptake from a  $\beta$ -oxidation enzyme hydrophobic pocket. In the case of SCPx containing the complete sequence of pre-nsL-TP at the C-terminus and shown by Seedorf et al. (1994) to contain both a 3-ketoacyl-CoA thiolase activity and lipid transfer activity, the interaction between a lipidmetabolizing enzyme and nsL-TP was achieved physically by a fusion of the two genes. The findings of *in vitro* stimulation of several cholesterol-metabolizing activities by nsL-TP would implicate the low-affinity lipid-binding site in the presentation of the lipid substrate. In a recent report, the yeast analogue of nsL-TP, PXP18, was shown to protect acyl-CoA oxidase against heat-induced denaturation in vitro (Niki et al., 1994). The authors suggested that nsL-TP might help to stabilize acyl-CoA oxidase and 3-ketoacyl-CoA thiolase, thereby increasing the lifetime of these enzymes. Furthermore, a novel peroxisomal nonspecific lipid transfer protein was shown to co-purify with peroxisomal acyl-CoA oxidase in yeast (Ceolotto et al., 1996). The finding that nsL-TP is associated with acyl-CoA oxidase, 3-ketoacyl-CoA thiolase and bifunctional enzyme raises the possibility that the  $\beta$ -oxidation enzymes in peroxisomes are organized in a functional complex, leading to an efficient transfer of the lipid intermediates between the enzymes. Functional compartmentalization would seem to be a prevailing principle of intracellular organelles.

# Materials and methods

### Materials

Recombinant rat pre-nsL-TP was expressed and purified to homogeneity as described in Ossendorp et al. (1992). Polyclonal rabbit antisera against rat liver acyl-CoA oxidase, rat liver 3-ketoacyl-CoA thiolase, bovine liver catalase and the C-terminal 26 kDa ABC-binding cassette fragment of recombinant rat liver PMP70 were kindly provided by Prof. Dr H.F.Tabak (Dept of Biochemistry, Academical Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands) and against rat liver bifunctional enzyme by Prof. Dr W.W.Just (Institut für Biochemie I, University of Heidelberg, Germany). Monofunctional succinimide esters of sulfoindocyanine fluorescent dyes Cy3.29 OSu (Cy3) and Cy5.29 OSu (Cy5) (Southwick et al., 1990) were from Amersham (Buckinghamshire, UK), Microcon and Centricon concentration units from Amicon (Beverly, MA), carboxypeptidase A from Sigma (St Louis, MO) and P10DG Econopac columns and protein assay kit from Bio-Rad (Hercules, CA). Protifar non-fat dried milk powder was from Nutricia (Zoetermeer, The Netherlands), and Protran nitrocellulose (0.45 µm) from Schleicher & Schuell (Dassel, Germany). Horseradish peroxidase conjugated goat-anti-rabbit antibodies (GARPO) were from Nordic Immunology (Tilburg, The Netherlands). Renaissance enhanced chemoluminescence reagents were from Dupont NEN (Boston, MA). CNBr-activated Sepharose 4B was from Pharmacia (Uppsala, Sweden).

### Preparation of subcellular fractions

Mitochondrial (M) and light mitochondrial (L) fractions were isolated from a rat liver homogenate by differential centrifugation according to

Völkl and Fahimi (1985). An enriched peroxisomal fraction was prepared by loading the L fraction onto a 30% Nycodenz cushion followed by centrifugation for 45 min at 132 000 g. The pellet enriched in peroxisomes was gently resuspended in a buffer consisting of 0.25 M sucrose, 5 mM MOPS–NaOH pH 7.2, 1 mM EDTA and 0.1% ethanol, and stored at  $-80^{\circ}$ C. The matrix proteins (0.17 mg) were isolated from this peroxisomal fraction using the Triton X-114 phase separation method (Bordier, 1981).

## Fluorescent labeling of pre-nsL-TP and antibodies

Pre-nsL-TP (4.2 mg/ml) stored at  $-20^{\circ}$ C in 25 mM Tris–HCl pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol, 50% glycerol. An aliquot (250 µg) was transferred to labeling buffer [50 mM Bicine–NaOH pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 120 mM KCl, 10% (v/v) glycerol] by four cycles of concentration and subsequent redilution in a Centricon YM10 concentrator at 4°C up to a final concentration of 1 mg/ml. The labeling reaction was initiated by adding 1 µl of Cy3 reagent in dry DMF (60 mM) to 0.1 ml of pre-nsL-TP (0.1 mg) in labeling buffer. The reaction mixture was incubated for 30 min at room temperature and the reaction was stopped by the addition of glycine (final concentration of 10 mM). The labeled protein was separated from the unconjugated dye by gel permeation chromatography on a P10DG column equilibrated in the buffer used for microinjection [50 mM Tris–HCl pH 7.4, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 120 mM KCl, 10% (v/v) glycerol].

IgG fractions of polyclonal rabbit antisera were obtained by Protein-G affinity chromatography and were transferred to 0.1 M bicine–NaOH pH 9.0 using a Centricon YM30 concentrator. The IgG fractions were labeled with the Cy5 reagent (10- to 30-fold molar excess) for 30 min at room temperature as described for pre-nsL-TP. Unconjugated dye was removed by chromatography on a P10DG column equilibrated in phosphate-buffered saline (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

Dye to protein molar ratios were determined spectrophotometrically from  $\varepsilon_{554} = 150$ /mM/cm for Cy3 and  $\varepsilon_{650} = 250$ /mM/cm for Cy5, and protein concentrations by the Bio-Rad protein assay kit with BSA as standard.

### Proteolytic removal of the presequence

The presequence of Cy3-pre-nsL-TP (1  $\mu$ g) was proteolytically removed by overnight incubation with a rat liver M fraction (75  $\mu$ g) at 37°C in 0.1 ml 50 mM Tris–HCl pH 7.0, 2 mM EDTA, 10 mM 2-mercapthoethanol as described by Ossendorp *et al.* (1992). The cleavage products were identified by applying the total reaction mixture to a 15% SDS– polyacrylamide gel. The gel was transilluminated by UV to detect Cy3 and stained for total protein by Coomassie Brilliant Blue.

### Proteolysis of the C-terminus by carboxypeptidase A

Proteolysis of Cy3-pre-nsL-TP by carboxypeptidase A (10 units/ $\mu$ mol) was performed in 6.25 mM Tris–HCl pH 7.4, 0.6 mM EDTA, 12.5% (v/v) glycerol for 30 min at 25°C. Carboxypeptidase A was added from a crystalline stock solution and subsequently removed by filtration on an YM100 concentrator. After the incubation, the treated Cy3-pre-nsL-TP was transferred to the buffer used for microinjection as described in the Fluorescent labeling section.

The extent and specificity of carboxypeptidase A proteolysis was assessed by using unlabeled pre-nsL-TP. The characterization of the product was carried out by Dr W.D.van Dongen (Department of Analytical Molecule Spectrometry, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands) using electrospray mass spectrometry.

### Microinjection and immunolabeling

Microinjection was carried out on BALB/c 3T3 mouse fibroblasts grown at 37°C on Eppendorf Cellocator coverslips in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Prior to microinjection the cells were placed on medium supplemented with 20 mM HEPES-NaOH pH 7.4, and the solution containing Cy3-pre-nsL-TP was centrifuged for 5 min at 100 000 g in a Beckman Airfuge. Cells were microinjected using an Eppendorf microinjector equipped with Eppendorf femtotip glass capillaries at an injection pressure of 80 hPa for 0.3 s. After injection the cells were allowed to recover for 30 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. At this point the cells were either prepared for live observation or fixed and prepared for immunofluorescence. Coverslips with live cells were mounted in a temperature-controlled cell chamber and observed by CLSM under a continuous flow of DMEM without the pH indicator phenol red and supplemented with 10% FCS and 20 mM HEPES-NaOH pH 7.4.

### Association of nsL-TP with β-oxidation enzymes

For immunofluorescence, the cells were fixed with 4% w/v paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, washed in PBS, quenched in 100 mM Tris–HCl pH 7.5, 50 mM NaCl for 5 min, permeabilized in 0.1% (v/v) Triton X-100 for 5 min and after washing with PBS incubated for 1 h with Cy5-labeled antibody in PBS containing 1% (w/v) BSA. After incubation, the cells were washed four times in PBS and mounted on glass slides using Mowiol 4.81 (Hoechst). All incubations were performed at room temperature. The antibodies used were anti-acyl-CoA oxidase (0.6  $\mu$ g/ml) anti-bifunctional enzyme (0.3  $\mu$ g/ml), anti-3-ketoacyl-CoA thiolase (0.3  $\mu$ g/ml), anti-PMP70 (1.4  $\mu$ g/ml) and anti-catalase (1.8  $\mu$ g/ml). At these concentrations, the fluorescence signals were comparable.

### Imaging techniques

Fluorescence images of cells were acquired on a confocal laser scanning microscope (CLSM; Zeiss LSM 310). Cy3 was excited with a 543 nm external He–Ne laser and detected using a 575 nm long-pass filter or, if incubated with Cy5-antibodies, using an Omega 590  $\pm$  30 nm band pass filter. Cy5 was excited with a 633 nm He–Ne laser and detected using a 665 nm long-pass filter. The images were taken with a 40×1.3 NA oil immersion Plan-Neofluar objective.

FRET in donor-labeled cells was determined in a microscope by the combined acceptor and donor photobleaching methods (pbDIM) (Jovin and Arndt-Jovin, 1989; Gadella and Jovin, 1995; Bastiaens and Jovin, 1996, 1998; Bastiaens *et al.*, 1996) according to the following sequence. (i) A pre-photobleach Cy3 (donor) image was acquired by scanning with 543 nm light in the CLSM. (ii) An intracellular region of interest (ROI) was selected and rendered free of Cy5 (acceptor) by repeated scanning with the 633 laser until all Cy5 was photodestructed. (iii) A second post-photobleach Cy3 image was acquired by scanning with a 543 nm laser. (iv) After correction for image registration (Bastiaens *et al.*, 1996), the FRET efficiencies ( $E_i$ ) in pixel *i* in the ROI were calculated from image arithmetic of the two (pre-photobleach,  $I_{pre,i}$  and post-photobleach,  $I_{post,i}$ ) Cy3 images.

$$E_{\rm i} = \frac{I_{\rm post,i} - I_{\rm pre,i}}{I_{\rm post,i}} \tag{1}$$

A second FRET determination in the complementary part of the ROI in the cells was performed by time-resolved donor photobleaching on a Zeiss Axioplan microscope equipped with a 100 W Hg lamp. The images were taken with a  $40 \times 1.3$  NA oil immersion Plan-Neofluar objective. The fluorescent Cy3 label on the pre-nsL-TP was photobleached by excitation with 546 nm light (Zeiss 546BP12 bandpass filter) for 30 min. At 30 s intervals Cy3 fluorescence images were obtained by 10-25 s exposure with a cooled CCD camera (Photometrics Series 200) using FT580 dichroic (Zeiss) and SS600 Corion bandpass filters. Images were recorded until the signal was ~80% bleached and the sequence was fitted pixel-by-pixel to a single exponential decay and offset model by the program DECAY (Gadella and Jovin, 1995, 1997). The latter vielded the photobleaching time constant  $\tau_i$ , amplitude  $a_i$  and offset  $c_i$  for each pixel *i*. FRET efficiencies for every pixel *i* ( $E_i$ ) were then calculated from the ratio of photobleaching time  $(\tau_i)$  and the average photobleaching time  $(\langle \tau_r \rangle)$  in the ROI in which Cy5 was photodestroyed:

$$E_{\rm i} = 1 - \frac{\langle \tau_{\rm r} \rangle}{\tau_{\rm i}} \tag{2}$$

Statistical analyses averaged over the peroxisomal compartment of single cells were obtained by a sequence of image processing operations using IPLab (Signal Analytics), as follows. The local background contributions around the individual peroxisomes were estimated by applying a morphological filter to the confocal gray value data (erosion, i.e. minimum estimation, over a  $5 \times 5$  neighborhood), and subtracting the result from the original images. A global threshold was used to generate binary masks for isolating the peroxisomes. The estimated parameters are defined and given in Table I.

### Affinity chromatography

Pre-nsL-TP, lysozyme and BSA were dissolved in coupling buffer (100 mM Bicine–NaOH pH 8.3, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA) at a concentration of 5 mg/ml. The protein solutions (1 ml) were added to CNBr-activated Sepharose 4B (0.7 ml) and allowed to react by incubation overnight at 4°C. Coupling efficiency exceeded 95% as estimated by protein determination. After coupling, the beads were incubated for 1 h at room temperature in 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 1 mM EDTA to block the reactive groups and were washed by four cycles of 100 mM sodium

### F.S.Wouters et al.

acetate pH 4.0, 1 mM EDTA and coupling buffer to remove unconjugated protein. The beads were loaded in glass columns  $(0.5 \times 4 \text{ cm})$  and equilibrated in elution buffer (20 mM K-phosphate pH 6.4, 120 mM KCl, 1 mM EDTA). Non-specific protein binding sites were blocked by washing the affinity columns with 1 ml elution buffer containing 4 mg BSA.

The peroxisomal matrix fraction was transferred to elution buffer and concentrated to 0.4 mg/ml using an YM20 Centricon. Aliquots of these fractions (30  $\mu$ g of protein) were applied to the column and 0.23 ml fractions were collected. Fractions were precipitated by trichloro-acetic acid, heated at 95°C for 5 min in sample buffer and subjected to SDS– polyacrylamide electrophoresis on 12.5% acrylamide gels according to Laemmli (1970).

Gels were electroblotted to nitrocellulose according to Kyhse-Andersen (1984) for 1 h at 1 mA/cm<sup>2</sup>. After transfer, the nitrocellulose was stained for total protein with Coomassie Brilliant Blue. The blots were washed for 5 min with PBS and blocked in 2% (w/v) skimmed milk powder in PBS-Tween (PBS supplemented with 0.5% Tween-20) for 1 h. The blots were then incubated with primary antiserum diluted 1:2000 in 0.2% (w/v) non-fat dried milk powder in PBS-Tween for 1 h, washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween, incubated with GARPO diluted 1:15 000 in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and washed three times for 10 min in 0.2% milk powder in PBS-Tween for 1 h and w

# Acknowledgements

We thank Teunis B.H.Geijtenbeek for providing purified recombinant pre-nsL-TP. This research was carried out under auspices of The Netherlands Foundation for Chemical Research (SON) and with financial aid from The Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) and a grant from the Federation of European Biochemical Sciences (FEBS).

# References

- Antonenkov, V.D., Van Veldhoven, P.P., Waelkens, E. and Mannerts, G.P. (1997) Substrate specificities of 3-oxoacyl-CoA thiolase A and sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase purified from normal rat liver peroxisomes. Sterol carrier protein 2/3-oxoacyl-CoA thiolase is involved in the metabolism of 2-methyl-branched fatty acids and bile acid intermediates. J. Biol. Chem., 272, 26023–26031.
- Baker, M.E., Billheimer, J.T. and Strauss, J.F., III (1991) Similarity between the amino-terminal portion of mammalian 58-kD sterol carrier protein (SCPx) and *Escherichia coli* acetyl-CoA acyltransferase: evidence for a gene fusion in SCPx. *DNA Cell Biol.*, **10**, 695–698.
- Bastiaens,P.I.H. and Jovin,T.M. (1996) Microspectroscopic imaging tracks the intracellular processing of a signal transduction protein: fluorescent-labeled protein kinase C β I. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 8407–8412.
- Bastiaens, P.I.H. and Jovin, T.M. (1998) Fluorescence resonance energy transfer microscopy. In Celis, J.E. (ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook.* 2nd edn, Vol. 3. Academic Press, New York, NY, pp. 136–146.
- Bastiaens, P.I.H., DeBeus, A., Lacker, M., Somerharju, P., Vauhkonen, M. and Eisinger, J. (1990) Resonance energy transfer from a cylindrical distribution of donors to a plane of acceptors. Location of apo-B100 protein on the human low-density lipoprotein particle. *Biophys. J.*, 58, 665–675.
- Bastiaens, P.I.H., Majoul, I.V., Verveer, P.J., Soeling, H.D. and Jovin, T.M. (1996) Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J.*, **15**, 4246–4253.
- Billheimer, J.T. and Reinhart, M.P. (1990) Intracellular trafficking of sterols. Subcell. Biochem., 16, 301–331.
- Billheimer, J.T., Strehl, L.L., Strauss, J.F., III and Davis, L.G. (1990) Characterization of a cDNA encoding rat sterol carrier protein 2. DNA Cell Biol., 9, 159–165.
- Bloj,B. and Zilversmit,D.B. (1977) Rat liver proteins capable of transferring phosphatidylethanolamine. Purification and transfer activity for other phospholipids and cholesterol. J. Biol. Chem., 252, 1613–1619.
- Bloj,B. and Zilversmit,D.B. (1981) Accelerated transfer of neutral glycosphingolipids and ganglioside GM1 by a purified lipid transfer protein. J. Biol. Chem., 256, 5988–5991.

- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J. Biol. Chem., 256, 1604–1607.
- Ceolotto, C., Flekl, W., Schorsch, F.J., Tahotna, D., Hapala, I., Hrastnik, C., Paltauf, F. and Daum, G. (1996) Characterization of a non-specific lipid transfer protein associated with the peroxisomal membrane of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**, 71–78.
- Chanderbhan, R., Noland, B.J., Scallen, T.J. and Vahouny, G.V. (1982) Sterol carrier protein-2. Delivery of cholesterol from adrenal lipid droplets to mitochondria for pregnenolone synthesis. J. Biol. Chem., 257, 8928–8934.
- Crain,R.C. and Zilversmit,D.B. (1980) Two nonspecific phospholipid exchange proteins from beef liver. I. Purification and characterization. *Biochemistry*, **19**, 1433–1439.
- Frolov, A., Cho, T.H., Billheimer, J.T. and Schroeder, F. (1996) Sterol carrier protein-2, a new fatty acyl coenzyme A-binding protein. J. Biol. Chem., 271, 31878–31884.
- Fujiki,Y., Tsuneoka,M. and Tashiro,Y. (1989) Biosynthesis of nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) on free polyribosomes as a larger precursor in rat liver. J. Biochem., 106, 1126–1131.
- Gadella,T.W.J.,Jr and Jovin,T.M. (1995) Oligomerization of epidermal growth factor receptors on A431 cells studied by time-resolved fluorescence imaging microscopy. A. stereochemical model for tyrosine kinase receptor activation. *J. Cell Biol.*, **129**, 1543–1558.
- Gadella,T.W.J.,Jr and Jovin,T.M. (1997) Fast algorithms for the analysis of single and double exponential decay curves with a background term. Application to time-resolved imaging microscopy. *Bioimaging*, **5**, 5–39.
- Gadella, T.W.J., Jr and Wirtz, K.W.A. (1991) The low-affinity lipid binding site of the non-specific lipid transfer protein. Implications for its mode of action. *Biochim. Biophys. Acta*, **1070**, 237–245.
- Geelen, M.J.H., Beynen, A.C. and Wirtz, K.W.A. (1987) Cholesterol metabolism and sterol carrier protein-2 (non-specific lipid transfer protein). *Int. J. Biochem.*, **19**, 619–623.
- Gould,S.J., Keller,G.A. and Subramani,S. (1987) Identification of a peroxisomal targeting signal at the carboxy terminus of firefly luciferase. *J. Cell Biol.*, **105**, 2923–2931.
- Gould,S.J., Keller,G.A., Hosken,N., Wilkinson,J. and Subramani,S. (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. J. Cell Biol., 108, 1657–1664.
- Gould,S.J., Keller,G.A., Schneider,M., Howell,S.H., Garrard,L.J., Goodman,J.M., Distel,B., Tabak,H.F. and Subramani,S. (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *EMBO J.*, 9, 85–90.
- Johnson,W.J. and Reinhart,M.P. (1994) Lack of requirement for sterol carrier protein-2 in the intracellular trafficking of lysosomal cholesterol. *J. Lipid Res.*, **35**, 563–573.
- Jovin, T.M. and Arndt-Jovin, D.J. (1989) FRET microscopy: digital imaging of fluorescence resonance energy transfer. Application in cell biology. In Kohen, E., Ploem, J.S. and Hirschberg, J.G. (eds), *Cell Structure and Function by Microspectrofluorometry*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 99–117.
- Keller,G.A., Scallen,T.J., Clarke,D., Maher,P.A., Krisans,S.K. and Singer,S.J. (1989) Subcellular localization of sterol carrier protein-2 in rat hepatocytes: its primary localization to peroxisomes. J. Cell Biol., 108, 1353–1361.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. Biochem. Biophys. Methods, 10, 203–209.
- Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Litwin, J.A. and Bilinska, B. (1995) Morphological heterogeneity of peroxisomes in cultured mouse Leydig cells. *Folia Histochem. Cytobiol.*, **33**, 255–258.
- Moncecchi, D., Pastuszyn, A. and Scallen, T.J. (1991) cDNA sequence and bacterial expression of mouse liver sterol carrier protein-2. J. Biol. Chem., 266, 9885–9892.
- Niki, T., Bun-Ya, M., Hiraga, Y., Muro, Y. and Kamiryo, T. (1994) Nearstoichiometric interaction between the non-specific lipid-transfer protein of the yeast *Candida tropicalis* and peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase prevents the thermal denaturation of the enzyme *in vitro*. *Yeast*, **10**, 1467–1476.
- Ossendorp,B.C., Van Heusden,G.P.H., De Beer,A.L.J., Bos,K., Schouten,G.L. and Wirtz,K.W.A. (1991) Identification of the cDNA clone which encodes the 58-kDa protein containing the amino acid sequence of rat liver non-specific lipid-transfer protein (sterol-carrier

#### Association of nsL-TP with β-oxidation enzymes

protein 2). Homology with rat peroxisomal and mitochondrial 3-oxoacyl-CoA thiolases. *Eur. J. Biochem.*, **201**, 233–239.

- Ossendorp,B.C., Geijtenbeek,T.B.H. and Wirtz,K.W.A. (1992) The precursor form of the rat liver non-specific lipid-transfer protein, expressed in *Escherichia coli*, has lipid transfer activity. *FEBS Lett.*, **296**, 179–183.
- Ossendorp,B.C., Snoek,G.T. and Wirtz,K.W.A. (1994) Intracellular phospholipid transfer proteins. *Curr. Topics Membr.*, 40, 217–259.
- Osumi, T., Hashimoto, T. and Ui, N. (1980) Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. J. Biochem., 87, 1735–1746.
- Phizicky, E.M. and Fields, S. (1995) Protein–protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.*, 59, 94–123.
- Schrader, M., Baumgart, E., Völkl, A. and Fahimi, H.D. (1994) Heterogeneity of peroxisomes in human hepatoblastoma cell line HepG2. Evidence of distinct subpopulations. *Eur. J. Cell Biol.*, 64, 281–294.
- Schrader, M., Baumgart, E. and Fahimi, H.D. (1995) Effects of fixation on the preservation of peroxisomal structures for immunofluorescence studies using HepG2 cells as a model system. *Histochem. J.*, 27, 615–619.
- Schrader, M., Burkhardt, J.K., Baumgart, E., Lüers, G., Spring, H., Völkl, A. and Fahimi, H.D. (1996) Interaction of microtubules with peroxisomes. Tubular and spherical peroxisomes in HepG2 cells and their alterations induced by microtubule-active drugs. *Eur. J. Cell Biol.*, 69, 24–35.
- Seedorf, U. and Assmann, G. (1991) Cloning, expression and nucleotide sequence of rat liver sterol carrier protein 2 cDNAs. J. Biol. Chem., 266, 630–636.
- Seedorf, U., Brysch, P., Engel, T., Schrage, K. and Assmann, G. (1994) Sterol carrier protein X is peroxisomal 3-oxoacyl coenzyme A thiolase with intrinsic sterol carrier and lipid transfer activity. J. Biol. Chem., 269, 21277–21283.
- Seedorf, U. *et al.* (1998) Defective peroxisomal catabolism of branched fatty acyl coenzyme A in mice lacking the sterol carrier protein-2/ sterol carrier protein-X gene function. *Genes Dev.*, **12**, 1189–1201.
- Southwick, P.L., Ernst, L.A., Tauriello, E.W., Parker, S.R., Mujumdar, R.B., Mujumdar, S.R., Clever, H.A. and Waggoner, A.S. (1990) Cyanine dye labeling reagents—carboxymethylindocyanine succinimidyl esters. *Cytometry*, **11**, 418–430.
- Subramani,S. (1998) Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover and movement. *Physiol. Rev.*, 78, 171–188.
- Suzuki, Y., Yamaguchi, S., Orii, T., Tsuneoka, M. and Tashiro, Y. (1990) Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) defective in patients with deficient peroxisomes. *Cell Struct. Funct.*, **15**, 301–308.
- Tan,H., Bun-ya,M., Hirata,A. and Kamiryo,T. (1994) Predominant localization of non-specific lipid-transfer protein of the yeast *Candida tropicalis* in the matrix of peroxisomes. *Yeast*, **10**, 1065–1074.
- Trzeciak, W.H., Simpson, E.R., Scallen, T.J., Vahouny, G.V. and Waterman, M.R. (1987) Studies on the synthesis of sterol carrier protein-2 in rat adrenocortical cells in monolayer culture. Regulation by ACTH and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP. J. Biol. Chem., 262, 3713–3717.
- Tsuneoka, M., Yamamoto, A., Fujiki, Y. and Tashiro, Y. (1988) Nonspecific lipid transfer protein (sterol carrier protein-2) is located in rat liver peroxisomes. J. Biochem. (Tokyo), 104, 560–564.
- Van der Krift,T.P., Leunissen,J., Teerlink,T., Van Heusden,G.P.H., Verkleij,A.J. and Wirtz,K.W.A. (1985) Ultrastructural localization of a peroxisomal protein in rat liver using the specific antibody against the non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2). *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 387–392.
- Van Haren,L., Teerds,K.J., Ossendorp,B.C., Van Heusden,G.P.H., Orly,J., Stocco,D.M., Wirtz,K.W.A. and Rommerts,F.G. (1992) Sterol carrier protein 2 (non-specific lipid transfer protein) is localized in membranous fractions of Leydig cells and Sertoli cells but not in germ cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1124**, 288–296.
- Van Heusden,G.P.H., Souren,J., Geelen,M.J.H. and Wirtz,K.W.A. (1985) The synthesis and esterification of cholesterol by hepatocytes and H35 hepatoma cells are independent of the level of nonspecific lipid transfer protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 846, 21–25.
- Van Heusden, G.P.H., Bos, K. and Wirtz, K.W.A. (1990) The occurrence of soluble and membrane-bound non-specific lipid transfer protein (sterol carrier protein 2) in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **1046**, 315–321.
- Van Heusden,G.P.H., Van Beckhoven,J.C.R.M., Thieringer,R., Raetz,C.R.H. and Wirtz,K.W.A. (1992) Increased cholesterol synthesis in Chinese hamster ovary cells deficient in peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1126**, 81–87.

- Völkl,A. and Fahimi,H.D. (1985) Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats. *Eur. J. Biochem.*, 149, 257–265.
- Walton,P.A., Gould,S.J., Feramisco,J.R. and Subramani,S. (1992) Transport of microinjected proteins into peroxisomes of mammalian cells: inability of Zellweger cell lines to import proteins with the SKL tripeptide peroxisomal targeting signal. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 531–541.
- Wanders, R.J.A., Denis, S., Wouters, F.S., Wirtz, K.W.A. and Seedorf, U. (1997) Sterol carrier protein X (SCPx) is a peroxisomal branchedchain β-ketothiolase specifically reacting with 3-oxo-pristanoyl-CoA: a new, unique role for SCPx in branched-chain fatty acid metabolism in peroxisomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 236, 565–567.
- Wilcke,M., Hultenby,K. and Alexson,S.E. (1995) Novel peroxisomal populations in subcellular fractions from rat liver. Implications for peroxisome structure and biogenesis. J. Biol. Chem., 270, 6949–6958.
   Wouters,F.S. (1997) nsL-TP and peroxisomal β-oxidation. PhD thesis.
- University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.
- Yamamoto, K. and Fahimi, H.D. (1987) Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver: evidence of interconnections between heterogeneous segments. J. Cell Biol., 105, 713–722.

Received May 13, 1998; revised August 27, 1998; accepted October 12, 1998

# Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells

Fred S. Wouters and Philippe I.H. Bastiaens

We report a highly specific fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) method for monitoring epidermal growth factor receptor (EGFR) phosphorylation in cells based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). EGFR phosphorylation was monitored using a green fluorescent protein (GFP)-tagged EGFR and Cy3-conjugated anti-phosphotyrosine antibodies. In this FRET-based imaging method, the information about phosphorylation is contained only in the (donor) GFP fluorescence lifetime and is independent of the antibodyderived (acceptor) fluorescence signal. A pixel-by-pixel reference lifetime of the donor GFP in the absence of FRET was acquired from the same cell after photobleaching of the acceptor. We show that this calibration, by acceptor photobleaching, works for the GFP-Cy3 donor-acceptor pair and allows the full quantitation of FRET efficiencies, and therefore the degree of exposed phosphotyrosines, at each pixel. The hallmark of EGFR stimulation is receptor dimerisation [1–4] and concomitant activation of its intracellular tyrosine kinase domain [5-7]. Trans-autophosphorylation of the receptor [8,9] on specific tyrosine residues couples the activated dimer to the intracellular signal transduction machinery as these phosphorylated residues serve as docking sites for adaptor and effector molecules containing Src homology 2 (SH2; reviewed in [10]) and phosphotyrosine-binding (PTB) [11] domains. The time-course and extent of EGFR phosphorylation are therefore important determinants of the underlying pathway and resulting cellular response. Our results strongly suggest that secondary proteins are recruited by activated receptors in endosomes, indicating that these are active compartments in signal transduction.

Address: Cell Biophysics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, 44 Lincoln's Inn Fields, London WC2A 3PX, UK.

Correspondence: Philippe I.H. Bastiaens E-mail: p.bastiaens@icrf.icnet.uk

Received: 5 July 1999 Revised: 11 August 1999 Accepted: 2 September 1999

Published: 27 September 1999

Current Biology 1999, 9:1127-1130

0960-9822/99/\$ – see front matter © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

# **Results and discussion**

GFP was fused to the carboxyl terminus of the EGFR (EGFR–GFP) via a six-glycine linker (see Supplementary

material) to enable monitoring of intracellular binding events by FRET (Figure 1). The integrity of the expressed protein was confirmed by western blotting of transfected Cos-7 cells and immunodetection with anti-GFP antibodies. A single ~200 kDa polypeptide was detected, indicating that the expressed fusion protein is proteolytically stable in the cells (data not shown). Receptor function in response to EGF stimulation was verified by following its distribution by conventional immunofluorescence. Serumstarved cells showed a homogeneous plasma-membrane distribution of EGFR-GFP. Occasionally, EGFR-GFP accumulated in compartments of the protein synthesis pathway in cells expressing high levels of the fusion protein. Stimulation with 100 ng/ml EGF caused aggregation of the EGFR-GFP associated with the plasma membrane, followed by receptor internalisation at longer stimulation times. Proper EGF binding was shown by the colocalisation of Cy3-labeled EGF and EGFR-GFP at the plasma membrane and, after endocytosis, on endosomes (data not shown). The presence of a GFP moiety on the EGFR has previously been shown not to interfere with its proper functioning in cells [12,13].

Total EGF-dependent phosphorylation of EGFR–GFP was indicated by immunoprecipitation of the EGFR–GFP with an anti-GFP antibody and subsequent detection with an anti-phosphotyrosine antibody. Negligible phosphorylation was detected before EGF stimulation in quiescent Cos-7 cells. Upon stimulation with 100 ng/ml EGF, the EGFR–GFP was rapidly phosphorylated and this phosphorylation level was sustained throughout the 30 minute stimulation period (Figure 2a). Quiescent Cos-7 cells were stimulated with EGF, fixed and incubated with Cy3-labeled anti-phosphotyrosine antibodies (see Supplementary material and [14]).

Frequency domain FLIM [15–17] was used to map the fluorescence lifetimes of the GFP moiety of the EGFR–GFP in cells at different time points during EGF stimulation. The fluorophores GFP and Cy3 form a favourable Förster donor–acceptor pair with an  $R_0$  value (defined as the distance at which 50% of the excited donor molecules transfer energy by FRET) of 6 nm [18]. This allows for efficient detection of FRET at inter-chromophore distances of up to approximately 9 nm. The fluorescence lifetime of EGFR–GFP decreases because of FRET to Cy3. As FRET occurs over distances that are in the same order of magnitude as protein dimensions, detectable FRET efficiencies can be interpreted as a direct interaction between phosphorylated EGFR–GFP



Schematic representation of FRET determination by acceptor photobleaching. (a) The GFP fluorescence lifetime ( $\tau_{DA}$ ) or emission intensity ( $F_{DA}$ ) is acquired in the presence of Cy3-labeled antibodies. (b) The Cy3 is completely photobleached by continuous illumination (FLIM) or repeated scanning (confocal microscopy) with 633 nm light. (c) The GFP  $\tau_D$  or  $F_D$  is again acquired. (d) From the measurements in (a,c), FRET efficiencies (E) can be calculated.

and Cy3-labeled anti-phosphotyrosine antibodies. Complete photobleaching of the Cy3 acceptor by continuous illumination provides a pixel-by-pixel reference GFP donor fluorescence lifetime for the calculation of FRET efficiencies (Figure 1). An alternative readout for EGFR–GFP phosphorylation is provided by determining FRET from the recovery of GFP fluorophore (donor) emission intensity after photobleaching of the acceptor [19]. The latter is performed in a confocal microscopy set-up in which FRET is determined in a defined region of the cell where the Cy3 acceptor is photobleached by repeated scanning.

The EGFR-GFP showed a plasma membrane distribution when expressed in quiescent Cos-7 cells, and nascent protein was located in compartments of the secretory pathway (Figure 2b). Upon EGF stimulation, EGFR-GFP translocated from the plasma membrane to punctate structures that represent vesicles in various stages of endocytosis (Figure 2b,3). In quiescent cells, the corresponding Cy3-labeled anti-phosphotyrosine antibody distribution (Figure 2c) was limited to punctate structures and the cell perimeter, a distribution that corresponds to phosphorylation sites that are independent of growth factor stimulation, for example, those located at focal adhesions. Despite colocalisation of the EGFR-GFP at the plasma membrane and the phosphotyrosines at focal adhesions, the fluorescence lifetime image showed no FRET at these sites (Figure 2d, time 0), confirming that the FRETbased imaging approach only reports on phosphotyrosine residues on the EGFR-GFP. Upon EGF stimulation, the anti-phosphotyrosine antibody staining largely colocalised with the EGFR-GFP distribution, with particularly high phosphorylation levels in membrane ridges and additional punctate structures (Figure 2c). Although, as expected, short lifetimes were generally associated with high levels of anti-phosphotyrosine staining, there were significant differences. Structures with high phosphotyrosine content were seen that exhibited low FRET efficiencies at the plasma membrane and in punctate structures after 5 and

10 minutes of EGF stimulation (Figure 2d). These sites must therefore contain phosphorylated proteins other than the EGFR-GFP, for example, recruited EGFR tyrosinekinase substrates. Furthermore, EGFR-GFP in the secretory pathway provided an internal control for the FRET measurements because it should have been unresponsive to EGF stimulation. Indeed, this can be seen at all timepoints measured: no energy transfer was detected for the nascent receptor in the perinuclear region. The presence of FRET in other structures was confirmed by photobleaching of the Cy3 acceptor, which resulted in a homogeneous distribution of GFP fluorescence lifetimes similar to those seen in the unstimulated situation (Figure 2e,g). These results show that acceptor photobleaching can indeed be used to calibrate FRET determinations via donor lifetime measurements. The reference GFP lifetime maps obtained after Cy3 acceptor photobleaching enabled the pixel-by-pixel calculation of FRET efficiency maps (Figure 2f). An alternative procedure was used to obtain FRET efficiencies on a confocal microscope by unquenching GFP donor emission after Cy3 photodestruction by repeated scanning. In Cos-7 cells expressing EGFR-GFP, the FRET efficiencies obtained this way after 5 minutes of EGF stimulation were comparable (0.2-0.25) to those obtained by FLIM (Figure 3). As can be seen by comparing Figures 2 and 3, the confocal acceptor-photobleaching method yields noisier FRET maps and furthermore proper image registration is essential. The FLIM approach is inherently more sensitive and does not suffer from photobleaching of the donor because the fluorescence lifetime is an intrinsic property of the fluorophore and therefore independent of emission intensity.

The GFP fluorescence lifetimes at later time points during EGF stimulation (from 20 minutes) revert to the distribution seen in the absence of FRET (Figure 2d,g). The phosphotyrosine staining at these time points decreased compared to earlier time points of stimulation, but still showed punctate structures. As phosphorylation of the

### Figure 2

FRET determination of the degree of phosphorylation of EGFR-GFP by FLIM. (a) Western blot of anti-phosphotyrosine immunostaining of anti-GFP immunoprecipitates from Cos-7 cells stimulated with EGF for the indicated times. (b) GFP fluorescence intensity distribution at different time points during EGF stimulation. Areas within the cells with saturated intensities were excluded from the analysis (black). (c) Cy3-anti-phosphotyrosine antibody fluorescence intensity distribution in the same cells as shown in (b). (d,e) Colourcoded GFP fluorescence lifetime maps (d) before and (e) after photobleaching of the acceptor. (f) FRET efficiency maps calculated by division of the images in (d) by the images in (e) (see Supplementary material). Calibration bars below show values for GFP fluorescence lifetime ( $\langle \tau \rangle$ ) and FRET efficiency (E). (g) Two-dimensional histograms of the fluorescence lifetimes determined from phase shift  $(\tau_{\phi})$  and demodulation  $(\tau_{M})$  of the GFP emission



EGFR-GFP persisted, as judged by immunoprecipitation (Figure 2a), this loss of FRET can only be accounted for by the shielding of epitopes by proteins recruited to the activated receptors in endosomes. These results were also consistently reproduced in NR6 fibroblasts that are devoid of endogenous EGFR and in MCF-7 breast carcinoma cells (data not shown). In all cells tested, the observed effect was independent of EGFR-GFP expression level. This pattern of EGF-dependent phosphorylation can also be seen in the two-dimensional histograms (Figure 2g), in which the phase lifetime  $(\tau_{\phi})$  and modulation lifetime  $(\tau_{M})$ values for each pixel are plotted. Before stimulation, the distribution of lifetimes after acceptor photobleaching (red) showed a stable homogeneous distribution that overlapped the distribution of lifetimes measured in the presence of acceptor (green; overlap is yellow). Upon EGF stimulation for 5 minutes, FRET was seen as a shortening in both lifetimes, giving rise to a new population with shorter lifetimes (green). A significant 'tail' of pixels with even shorter lifetimes was present after 10 minutes of EGF stimulation, indicating the presence of highly phosphorylated EGFR-GFP species. At later time points, the lifetime distributions in the presence and absence of acceptor converged again, indicating a loss of FRET. A number of studies have indeed suggested recruitment of Grb2, Shc, the Grb2-Shc-mSOS complex and Ras-GAP to the phosphorylated EGFR in endosomes [20]. Furthermore, the molecules involved in the MAP-kinase signal transduction pathway have been identified in endosomes [21]. Internalisation is generally viewed as an attenuation mechanism. The cytosolic orientation of the

EGFR phosphotyrosine residues, however, implies that the complex of associated signaling molecules can be brought into close proximity of other cytosolic targets by receptor endocytosis and thereby provides an attractive alternative scenario for sustained signal transduction [22].

As can be seen from the differences between the phosphotyrosine and FRET distributions, conventional colocalisation studies do not accurately report on phosphorylated species when other tyrosine-phosphorylated proteins are also present in the same location. Although the use of antibodies specific for the phosphorylated EGFR could alleviate this problem, such antibodies are restricted to a single phosphotyrosine epitope and for many phosphorylated proteins, antibodies are not yet available. Most importantly, antibody staining does not provide a quantitative measure of the extent of phosphorylation, in contrast to the FRET determination. Because FRET is measured on the donor fluorophore independently of the acceptor fluorescence, non-specific interaction of the anti-phosphoaminoacid antibody is of no consequence to the measurement. This means that serine phosphorylation could also be measured by this approach as anti-phosphoserine antibodies are usually not as specific as anti-phosphotyrosine antibodies. For the same reason, the relative intensities of the GFP fluorescence and the immunolabeling have no effect on the measurements, enabling detection of phosphorylation in cells with low expression levels of the GFP protein, even in the presence of extensive immunolabeling. This allows selectivity to be sacrificed in favour of achieving higher epitope occupancy with higher antibody





Confocal acceptor-photobleaching FRET imaging of phosphorylated EGFR–GFP in Cos-7 cells after 5 min of EGF stimulation. (a,b) EGFR–GFP fluorescence (a) before and (b) after photobleaching of the acceptor. (c,d) Cy3–anti-phosphotyrosine antibody fluorescence (c) before and (d) after photobleaching of the region of the cell marked by a white rectangle. (e) FRET efficiency map of the cell, calculated by division of the image in (a) by the image in (b).

concentrations. Acceptor photobleaching to abolish FRET is a simple operation that allows the unequivocal assignment of decreased lifetimes to FRET by providing a pixelby-pixel calibration in the *same* cell, and effectively reducing inter-sample variation. This type of imaging assay is generally applicable to other systems, in which a GFPtagged protein and antibodies against a binding candidate are available.

### Supplementary material

Supplementary material including additional methodological detail is available at http://current-biology.com/supmat/supmatin.htm.

## **Acknowledgements**

This work was supported by a long-term fellowship from the European Molecular Biology Organisation to F.S.W. We would like to thank W. Gullick of the Receptor Biology Laboratory (RBHH) of the ICRF Molecular Oncology Unit for providing the human EGFR cDNA.

### References

- Mohammadi M, Honegger A, Sorokin A, Ullrich A, Schlessinger J, Hurwitz DR: Aggregation-induced activation of the epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase. *Biochemistry* 1993, 32:8742-8748.
- Yarden Y, Schlessinger J: Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 1987, 26:1443-1451.
- Cochet C, Kashles O, Chambaz EM, Borrello I, King CR, Schlessinger J: Demonstration of epidermal growth factor-induced receptor dimerization in living cells using a chemical covalent cross-linking agent. J Biol Chem 1988, 263:3290-3295.
- Zhou M, Felder Š, Rubinstein M, Hurwitz DR, Ullrich A, Lax I, et al.: Real-time measurements of kinetics of EGF binding to soluble EGF receptor monomers and dimers support the dimerization model for receptor activation. *Biochemistry* 1993, 32:8193-8198.
- Hunter T, Ling N, Cooper JA: Protein kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane. *Nature* 1984, 311:480-483.
- Carpenter G, Cohen S: Epidermal growth factor. Annu Rev Biochem 1979, 48:193-216.
- Schlessinger J: Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase. J Cell Biol 1986, 103:2067-2072.

- Honegger AM, Kris RM, Ullrich A, Schlessinger J: Evidence that autophosphorylation of solubilized receptors for epidermal growth factor is mediated by intermolecular crossphosphorylation. *Proc Natl Acad Sci* 1/54, 1089, 86:925,929.
- phosphorylation. Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:925-929.
  9. Yarden Y, Schlessinger J: Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry* 1987, 26:1434-1442.
- Pawson T: Non-catalytic domains of cytoplasmic protein-tyrosine kinases: regulatory elements in signal transduction. *Oncogene* 1988, 3:491-495.
- Kavanaugh WM, Williams LT: An alternative to SH2 domains for binding tyrosine-phosphorylated proteins. *Science* 1994, 266:1862-1865.
- Brock R, Hamelers IHL, Jovin TM: Comparison of fixation protocols for adherent cultured cells applied to a GFP fusion protein of the epidermal growth factor receptor. *Cytometry* 1999, 35:353-362.
- Carter RE, Šorkin A: Endocytosis of functional epidermal growth factor receptor-green fluorescent protein chimera. *J Biol Chem* 1998, 273:35000-35007.
- Bastiaens PIH, Jovin TM: Fluorescence resonance energy transfer microscopy. In *Cell biology, a Laboratory Handbook*. Edited by Celis JE. New York: Academic Press; 1998:136-146.
- Gadella TWJ Jr, Jovin TM, Clegg RM: Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) – spatial resolution of microstructures on the nanosecond time-scale. *Biophys Chem* 1993, 48:221-239.
- Lakowicz JR, Berndt K: Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera. *Rev Sci Instrum* 1991, 62:1727-1734.
- Squire A, Bastiaens PIH: Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy. *J Microsc* 1999, 193:36-49.
- Ng T, Squire A, Hansra G, Bornancin F, Prevostel C, Hanby A, et al.: Imaging protein kinase C alpha activation in cells. *Science* 1999, 283:2085-2089.
- Bastiaens PIH, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM: Imaging the intracellular trafficking and state of the Ab(5) quaternary structure of cholera-toxin. *EMBO J* 1996, 15:4246-4253.
- Di Guglielmo GM, Baass PC, Ou WJ, Posner BI, Bergeron JJ: Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J* 1994, 13:4269-4277.
   Pol A, Calvo M, Enrich C: Isolated endosomes from quiescent rat
- Pol A, Cálvo M, Enrich C: Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery. Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment. *FEBS Lett* 1998, 441:34-38.
- Baass PC, Di Guglielmo GM, Authier F, Posner BI, Bergeron JJM: Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol* 1995, 5:465-470.

# Supplementary material

## S1

# Fluorescence lifetime imaging of receptor tyrosine kinase activity in cells

Fred S. Wouters and Philippe I.H. Bastiaens Current Biology 27 September 1999, 9:1127–1130

# Supplementary materials and methods

EGFR-GFP construction

A unique *Pvu*l restriction site and six glycine residues were introduced directly upstream of EGFP by ligation of a linker (formed by annealing GATCGGTGGAGGTGGAGGAGGC and CCTCCTCCACCTCCAC-CGATCG oligonucleotides) into the unique *Xcm*l site of pEGFP-N3. The 2927 bp *Nhel–Bgl*l fragment of human EGFR (Genbank accession number X00588) was subcloned into the respective sites in the modified pEGFP-N3. The 3' part of the EGFR cDNA was obtained by PCR with primers designed to include the *Bgl*ll site (GAGTTGATGAC-CTTTGGATCCAAGCCATA) and to introduce a unique *Pvu*l site (TGGCTAGCGACGAGGTTATTTAAGTGACGAACAC). The full-length construct was obtained by ligation of the 929 bp *Bgl*l–*Pvu*l fragment of the PCR product into the respective sites of the host vector and was confirmed by sequence analysis.

### Immunoprecipitation

Cos-7 cells were transfected with EGFR–GFP by lipofection (Fugene, Boehringer Mannheim) for 24–36 h and were starved for 12 h. The Cos-7 cells were stimulated for the indicated times with 100 ng/ml mouse submaxillary gland EGF (Sigma) and were lysed in modified RIPA buffer (1% Triton X-100, 0.5% NaDoC, 0.1% SDS, 0.2% NaN<sub>3</sub>, 0.04% NaF, 2 mM NaVO<sub>3</sub> and 1× complete protease inhibitor mix (Boehringer Mannheim)) for 20 min at 4°C. EGFR–GFP was immuno-precipitated with 15 µg of anti-GFP monoclonal antibody (3E1) and protein A sepharose (Biorad). The immunoprecipitate was electrophoresed, transferred to nitrocellulose by western blotting and phosphotyrosine antibody (PY72) by enhanced chemiluminescence (ECL; NEN/Dupont).

### Fluorescence lifetime imaging microscopy

Cos-7 cells expressing EGFR–GFP were fixed in 4% formaldehyde + 1 mM NaVO<sub>3</sub> and then permeabilised with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline for 10 min. The cells were incubated with 15  $\mu$ g/ml Cy3-labeled (Cy3:protein ratio = 8) PY72 antibody and mounted in 0.1 M Tris–HCl, 25% (wt/vol) glycerol, and 10% (wt/vol) Mowiol 4-88 (Hoechst).

FLIM was performed on a Zeiss Axiovert 135 TV microscope equipped with a 100×/NA 1.4 plan-apochromat objective. EGFR–GFP was excited at 488 nm using a Coherent Innova Argon/Krypton laser modulated at 80.244 MHz. GFP emission was detected using a 505 LP dichroic mirror (Chroma) and a 514/10 BP emission filter (Delta Lys & Optik). A series of phase-dependent images was acquired as described in [S1] and used to determine GFP lifetimes from phase shift ( $\tau_{o}$ ) and demodulation ( $\tau_{m}$ ) on a pixel-to-pixel basis.

Energy transfer efficiency maps were calculated from fluorescence lifetime maps according to:  $E=1-(<\tau>_{DA}/<\tau>_{D})$  where  $<\tau>_{DA}$  is the average of the lifetimes determined from the phase shift  $(\tau_{\varphi})$  and demodulation  $(\tau_m)$  of the donor emission in presence of the acceptor and  $<\tau>_{D}$  after photobleaching of the acceptor.

## Confocal acceptor-photobleaching FRET imaging

Acceptor-photobleaching imaging was performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope with 488 nm (Argon laser) GFP and 633 nm (Helium/Neon laser) Cy3 excitation. GFP emission was detected using a BP 505–530 nm filter and Cy3 using a BP 560–605 nm filter.

In this approach the quenching of donor fluorescence intensity by FRET was utilised by acquisition of a donor (GFP) image before and after photobleaching of the acceptor, essentially as described in [S2]. Acceptor photobleaching unquenches GFP fluorescence since FRET is abolished and enables the determination of the FRET (quenching) efficiency by:  $E = 1 - (F_{DA}/F_D)$  where  $F_{DA}$  is the donor image in presence of acceptor and  $F_D$  in the absence of acceptor.

## Supplementary references

- S1. Squire A, Bastiaens PIH: Three dimensional image restoration in fluorescence lifetime imaging microscopy. J Microsc 1999, 193:36-49.
- S2. Bastiaens PIH, Majoul IV, Verveer PJ, Soling HD, Jovin TM: Imaging the intracellular trafficking and state of the Ab(5) quaternary structure of cholera-toxin. *EMBO J* 1996, 15:4246-4253.

# Quantitative Imaging of Lateral ErbB1 Receptor Signal Propagation in the Plasma Membrane

# Peter J. Verveer,<sup>1\*</sup> Fred S. Wouters,<sup>1\*</sup> Andrew R. Reynolds,<sup>2\*</sup> Philippe I. H. Bastiaens<sup>1,2</sup>†

Evidence for a new signaling mechanism consisting of ligand-independent lateral propagation of receptor activation in the plasma membrane is presented. We visualized the phosphorylation of green fluorescent protein (GFP)-tagged ErbB1 (ErbB1-GFP) receptors in cells focally stimulated with epidermal growth factor (EGF) covalently attached to beads. This was achieved by quantitative imaging of protein reaction states in cells by fluorescence resonance energy transfer (FRET) with global analysis of fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) data. The rapid and extensive propagation of receptor phosphorylation over the entire cell after focal stimulation demonstrates a signaling wave at the plasma membrane resulting in full activation of all receptors.

Ligand-driven ErbB1 activation is generally thought to occur through the formation of stable receptor dimers (1-5). The proximity of the two ErbB1 receptors in the stable dimer allows subsequent transactivation by cross-phosphorylation of target tyrosine residues by the receptor tyrosine kinase domain, both located in the cytoplasmic tail of the receptor (6, 7). Signal transduction then proceeds through recruitment to the receptors of phosphotyrosine-binding adaptor and effector

\*These authors contributed equally to this work. †To whom correspondence should be addressed. Email: philippe.bastiaens@embl-heidelberg.de proteins, such as Grb2, SHC, and p85 (8–10). We provide evidence for a different ErbB1 signaling mechanism of ligand-independent lateral propagation of receptor activation in the plasma membrane where the activated receptor dimer is a transient rather than a stable feature. To show this, we induced local activation of ErbB1-GFP by applying EGF covalently attached to beads (EGF-beads) and monitored the phosphorylation state of the receptors across the whole cell. The extent of ErbB1 receptor phosphorylation was mapped by measuring FRET between ErbB1-GFP and a Cy3-labeled antibody to phosphotyrosine (Cy3/PY72).

The occurrence of FRET causes the fluorescence lifetime of the phosphorylated receptor to decrease (11-13), which is detected using FLIM (14-17). Efficient FRET will

occur only when the Cy3 acceptor is brought within nanometer range of the GFP donor by binding of the antibody to the phosphorylated receptor (11). A global FLIM analysis technique was developed (18) that uses the understanding that the receptor exists in two states, phosphorylated or unphosphorylated, each with a unique associated fluorescence lifetime (Fig. 1A). As a result, quantitative maps of the populations of each state are obtained (Fig. 1B). In addition, the lifetime of each state is determined, from which the true FRET efficiency in the receptor-antibody complex can be calculated. This approach allows quantitative and precise mapping of the relative concentration of phosphorylated protein in cells, whereas earlier approaches were qualitative (12, 19).

To study the lateral propagation of ErbB1-GFP phosphorylation, the population distribution of phosphorylated receptors in cells after focal stimulation with 0.8-µm diameter EGF-beads (20, 21) was compared with the distribution after exposure to a saturating dose (0.1 µg/ml) of soluble EGF. Groups of MCF7 cells expressing ErbB1-GFP were microinjected with Cy3-labeled Fab fragments (22) of a phosphotyrosine-specific antibody (Cy3/FabPY72) and stimulated. Average ErbB1-GFP expression levels in MCF7 cells  $(5 \times 10^5)$  were half that of A431 cells, as judged by the fluorescence intensity of receptor-bound Cy3-EGF. Cells treated with soluble EGF showed a homogeneous phosphorylation pattern at the plasma membrane that was maximal 15 min after stimulation (Fig. 2A). Cells stimulated with EGF-beads (red dots, Fig. 2A) also exhibited an extended phosphorylation pattern, to the same extent as found after stimulation with soluble EGF, indicative of extensive lateral spreading of ErbB1 phosphorylation.

In these experiments, the kinetics of anti-

www.sciencemag.org SCIENCE VOL 290 24 NOVEMBER 2000

1567

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Cell Biology and Cell Biophysics Program, European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg, Germany. <sup>2</sup>Cell Biophysics Laboratory, Imperial Cancer Research Fund, 44 Lincoln's Inn Fields, London, WCZA 3PX, UK.

body binding are rate-limiting, and steric hindrance after antibody binding can slow the phosphorylation reaction. To properly capture the initial phosphorylation in the proximity of the bead and the subsequent propagation across the plasma membrane, cells were stimulated with Cy5-labeled EGF-beads for short periods (10 to 60 s) and immediately fixed and incubated with Cy3/PY72 antibody. By controlled manipulation, we were able to retain the majority of the ErbB1bound EGF-beads at their original location, as verified by microscopy. Indeed, soon after stimulation (10 to 30 s), phosphorylated



Fig. 1. Quantitative imaging of ErbB1 phosphorylation using FLIM coupled with global analysis techniques. (A) FRET between the GFP on ErbB1 and Cy3 on antibodies to phosphotyrosine can be detected through a shortening of the GFP fluorescence lifetime  $(\tau)$  measured by FLIM (11-13). Efficient FRET will only occur when the Cy3 acceptor is brought within nanometer range of the GFP donor by binding of the antibody to the phosphorylated receptor. The high signal specificity of these binding events arises from the measurement of FRET through the donor lifetime exclusively, even when the acceptor-carrying antibody is not specific for its epitope or present in excess (11), enabling the use of generic antibodies to phosphotyrosine. Two receptor states, bound and unbound to antibody, exist at every spatially resolvable image element (pixel), each associated with a unique spatially invariant fluorescence lifetime corresponding to the presence  $(\tau_2)$  or absence  $(\tau_1)$  of FRET. However, the parameters of interest are the populations of the two protein states in each pixel. (B) Global analysis (33) of FLIM data (18) uses the understanding that only two protein states, with their spatially invariant fluorescence lifetimes are present in each pixel. All pixels are simultaneously analyzed giving the two lifetimes and the population maps ( $\alpha_1$  and  $\alpha_2$ ) that show the relative concentrations of molecules in each state. The true FRET efficiency in the protein complex  $(E_c)$ is calculated by  $E_c = 1 - \tau_2/\tau_1$ . Global analysis can be applied to large collections of sets, thereby greatly improving accuracy and precision. From an error analysis, we calculated that the errors of the populations in each pixel ranged from 5 to 10%.

ErbB1 was found in a patch containing the EGF-bead, clearly demonstrating lateral spreading of receptor activation originating from the point of stimulation (Fig. 2B). At 60 s, a homogenous activation pattern encompassing the whole plasma membrane was observed, demonstrating that lateral signal spreading is a rapid process.

To determine the evolution of ErbB1 phosphorylation precisely in time, a comparison between responses to stimulation with soluble EGF (Fig. 3A) and EGF-beads (Fig. 3B) was performed on large sets of cells. Soon after exposure, the cells stimulated with soluble EGF already showed a homogenous phosphorylation pattern as opposed to the patches of phosphorylated receptor found after EGFbead stimulation (Fig. 3, A and B). Later, the extent of ErbB1 phosphorylation for both focal and homogenous stimulation was indistinguishable. Receptor internalization was

Fig. 2. Phosphorylation of ErbB1-GFP in response to EGF-bead stimulation. (A) Populations of phosphorylated ErbB1-GFP receptors in live cells. MCF7 cells growing on glass-bottom culture dishes were starved in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 0.5% serum for 5 hours before transfer to phenol red and riboflavin-free. low-bicarbonate DMEM medium supplemented with 25 mM Hepes, pH 7.4, before microinjection with Cy3/ FabPY72. Left panel, stimulation with EGF (in minutes); right panel, stimulation with EGF-beads (red dots, top left panel). Top panels, ErbB1-GFP and Cy3/FabPY72 fluorescence intensity images; lower panels, images of the ErbB1-GFP phosphorylation state. Color bars represent population values. A single global analysis of all FLIM data sets (n = 12) yielded fluorescence lifetimes of  $\tau_1 = 2.2$  ns and  $\tau_2 = 0.56$  ns ( $E_c = 75\%$ ). (**B**) Correlation between phosphorylated ErbB1-GFP and the

R



position of EGF-beads (red dots, top row). Cells were fixed with 4% formaldehyde after incubation with Cy5-labeled EGF-beads on the indicated time points to capture the initial phosphorylation wave. Permeabilization and incubation with antibody were performed under controlled conditions that maintain the position of the bead throughout the procedure as verified by microscopic observation. Top row, ErbB1-GFP fluorescence intensity (green) overlaid with Cy5-labeled EGF-bead fluorescence (red); middle row, Cy3/PY72 fluorescence intensity images; bottom row, Population of phosphorylated ErbB1-GFP receptors. Color bars represent population values. A single global analysis of all FLIM data sets (n = 55) yielded fluorescence lifetimes of  $\tau_1 = 2.4$  ns and  $\tau_2 = 0.94$  ns ( $E_c = 61\%$ ).

observed within the whole cell after 20 to 30 min for both types of stimuli, thus providing independent evidence for the existence of activated receptors not bound to EGF ligand. This occurrence of endocytosis was also confirmed by confocal microscopy of ErbB1-GFP in live MCF7 cells stimulated with Cy3-labeled EGF-beads, clearly showing the uptake of vesicular structures inside the cell. For both stimulation conditions, plasma membrane populations of phosphorylated receptor locally approached 100%.

Generally, lower population sizes of phosphorylated receptor were found in the center of the cell because of the presence of ErbB1-GFP that was not exposed to the extracellular stimulus; either de novo receptor in transit to the plasma membrane, or receptors participating in endocytosis before stimulation. The average populations of phosphorylated ErbB1 for EGF and EGF-bead stimulation for each

### REPORTS

time point are shown in Fig. 3C, computed in each case from a global analysis of the FLIM measurements of several hundred cells. Soon after stimulation (<1 min), the average population of phosphorylated receptors is significantly lower for bead-stimulated cells because of the presence of phosphorylated receptor in patches. After a 1-min incubation with EGF or EGF-beads, the average populations of phosphorylated receptors are indis-



**Fig. 3.** Time course of phosphorylation of ErbB1-GFP receptors in MCF7 cells stimulated with EGF and EGF-beads. Fixation and antibody incubation were performed as described previously (13). (A) Populations of phosphorylated ErbB1-GFP receptors after stimulation with EGF. A single global analysis of all FLIM data sets (n = 97) returned fluorescence lifetimes of  $\tau_1 = 2.2$  ns and  $\tau_2 = 0.84$  ns ( $E_c = 62\%$ ). A single representative cell is shown out of a set of 10 measurements for each time point. Top panels, ErbB1-GFP fluorescence intensity; middle panels, Cy3/PY72 fluorescence intensity; lower panels, populations of phosphorylated ErbB1-GFP after local stimulation with EGF-beads. A single global calculation of all FLIM data sets (n = 81) yielded fluorescence lifetimes of  $\tau_1 = 2.2$  ns and  $\tau_2 = 0.83$  ns ( $E_c = 62\%$ ). (C) Average population of phosphorylated FrbB1-GFP receptors plotted as a function of incubation time with soluble EGF (filled circles) or EGF-beads (filled squares). Also plotted are average populations of phosphorylated ErbB1-GFP receptors in EGF-bead–stimulated MCF7 cells incubated with the Src family kinase inhibitor PP2 (open squares). (D) EGF dose-response curve of ErbB1-GFP receptor phosphorylated ErbB1-GFP in the absence (circles) and presence (squares) of 1  $\mu$ M phosphatase inhibitor PAO is plotted as a function of EGF concentration.

tinguishable and reach the maximal level. These populations then decrease over longer stimulation periods because of shielding of the phosphorylated tyrosine residues by recruitment of proteins to internalized ErbB1-GFP (*13*).

Spreading of phosphorylation after focal stimulation implies dissociation of activated receptors from dimers and subsequent activation of receptors without ligands located outside the area stimulated by the EGF-bead. Fluorescence recovery after photobleaching (FRP) was performed to exclude the possibility of ligand-induced spreading of ErbB1 phosphorylation by diffusion and exchange with bead-bound receptors. The high GFP fluorescence intensity observed around the bead did not reappear after photobleaching, showing that receptors underneath the bead are tightly bound and do not exchange on the time scale in which spreading of phosphorylation is observed (Fig. 4). In addition, diffusion of the ErbB1 receptors as calculated from FRP data (legend to Fig. 4) was considerably slower



Fig. 4. FRP experiments. Cells incubated for 10 min with Cy3-labeled EGF-beads were imaged with a Zeiss LSM 510 confocal microscope. A region of interest was photobleached with a 488-nm argon laser at full power. Fluorescence recovery was monitored at 2-s intervals using a 488-nm argon laser (GFP channel, LP505 emission filter) and a 543-nm HeNe laser (Cy3 channel, LP530 emission filter). Shown are red/ green overlays of the intensities of ErbB1-GFP (green) and Cy3-labeled EGF-beads (red) for four images out of a series of 120 (2-s interval). Before GFP photobleaching of a circular region (2.3-µm radius), the intensities of all beads on the cell strongly correlated to those of ErbB1-GFP (yellow dots), indicating a high quantity of ErbB1-GFP receptors binding to the EGF-beads. After photobleaching, only the Cy3 signal (red) remained on the beads in the bleached region. At 1 min, most ErbB1-GFP fluorescence has recovered by diffusion, except at the bead positions, showing that the photobleached ErbB1-GFP is bound to the bead. The diffusion constant of ErbB1-GFP in the plasma membrane was 0.032  $\pm$  0.010  $\mu$ m<sup>2</sup>/s, calculated from 10 independent experiments with the method described in (34).

than the lateral signal propagation. The relative immobility of the beads observed in these measurements also precludes largescale movements of the beads as a cause for extended distribution of phosphorylated ErbB1.

Independent evidence that dissociation of activated receptors induces lateral spreading of phosphorylation was obtained by using intrinsically kinase-dead (23) ErbB3-GFP (24) cotransfected with ErbB1 at low ErbB1to-ErbB3-GFP expression ratios. When dimers are indeed a transient feature, activated ErbB1 receptors should be able to phosphorylate multiple neighboring ErbB3-GFP receptors that, on their own, are not able to propagate the signal, and the proportion of phosphorylated ErbB3-GFP receptors should exceed that of ErbB1. An average population of 43  $\pm$  8% (n = 13 cells) phosphorylated ErbB3-GFP was found when the expression ratio of ErbB1 to ErbB3-GFP was 1:10, after a 5-min incubation with 0.1 µg/ml EGF. This is significantly more than the fraction of ErbB1 receptors (10%), strongly corroborating transient dimerization as a key feature of the propagation of phosphorylation.

Control cells expressing only ErbB3-GFP did not show EGF-induced phosphorylation. To exclude inside-out signaling by a cytosolic tyrosine kinase instead of ErbB1 transphosphorylation, two additional experiments were performed. Cells were permeabilized with streptolysin O (25), to remove soluble protein from the cytosol before stimulation (5 min) with EGF or EGF-beads. The same wholecell activation pattern was observed, showing that no soluble protein factor is involved in the lateral signaling process. Also, to exclude the involvement of Src-type tyrosine kinases in the ErbB1 transphosphorylation process, the cells were also stimulated with EGFbeads after incubation with 50 nM of PP2, an inhibitor of the SRC family kinases (Calbiochem, San Diego, California). Again, full and extended phosphorylation of ErbB1-GFP in the plasma membrane was seen (Fig. 3C). Owing to inhibition of Src-type kinases by PP2, delayed internalization of ErbB1 was observed (26), which resulted in sustained measured phosphorylation levels (13) (Fig. 3C).

To investigate the role of receptor tyrosine phosphatases (27) in ErbB1 lateral signaling, we compared average ErbB1 phosphorylation levels at different EGF concentrations in the presence and absence of the phosphatase inhibitor phenylarsine oxide (PAO, Sigma). The steep dependence of receptor phosphorylation on EGF concentration was lost after addition of PAO, resulting in maximal ErbB1 activation (Fig. 3D). These results indicate that ErbB1 kinase activity is suppressed by phosphatase activity in resting cells that must be overcome to initiate lateral signal propagation.

Evidence of ErbB1 dimerization as a

mechanism of activation has been provided in the past by in vivo cross-linking experiments (4, 28, 29). In these studies, only a minor fraction of ErbB1 receptors was separated as dimers by gel electrophoresis, which was explained by inefficient cross-linking. In our view, this observed dimer band was minor owing to the small steady-state population of transient dimers in the lateral signaling process after growth factor stimulation. Lateral ErbB1 signaling is also supported by previous immunoprecipitation studies on cells coexpressing different ErbB family members. Paradoxical ErbB1-ErbB2 dimers were detected after stimulation with the ErbB3/ ErbB4 ligand heregulin (HRG) and ErbB2-ErbB3/ErbB4 dimers after stimulation with the ErbB1-ligand EGF (30, 31).

These findings also corroborate an activation mechanism involving transient rather than stable receptor dimers. Signal propagation at the plasma membrane provides an early amplification mechanism, preceding that in the extensively investigated axial direction. This mechanism will spread the signal of localized ErbB stimulation events, for example, in the case of cell-cell contact between ErbB1-bearing cells and cells exposing membrane-bound ligands (pre-EGF, pretransforming growth factor- $\alpha$  or heparinbound EGF).

The existence of this mode of ErbB1 receptor activation further implies that local threshold concentrations of growth factors can fully activate ErbB1-linked growth regulatory signal cascades. This threshold is set for each cell individually by its specific intrinsic phosphatase activity. A possible initiation mechanism for ErbB1 activation is that ligand-induced receptor aggregation locally increases the kinase activity sufficiently to overcome phosphatase action. Lateral signal propagation then proceeds via a phosphorylation-induced increase in kinase activity of ErbB1 or by phosphorylation-dependent inhibition of phosphatases. In either case, the cell is committed to a phosphorylation cascade that is no longer dependent on growth factor. As the ErbB growth factor receptor family has been implicated in the development and progression of human cancers (32), lateral signal transduction might represent an attractive target for pharmacological intervention of malignant ErbB activation at an early and accessible stage in the signaling process.

### **References and Notes**

- 1. A. Weiss, J. Schlessinger, Cell 94, 277 (1998).
- M. Mohammadi et al., Biochemistry **32**, 8742 (1993).
   Y. Yarden, J. Schlessinger, Biochemistry **26**, 1443 (1987).
- 4. C. Cochet *et al.*, *J. Biol. Chem.* **263**, 3290 (1988).
- 5. M. Zhou et al., Biochemistry **32**, 8193 (1993).
- Y. Yarden, J. Schlessinger, *Biochemistry* 26, 1434 (1987).
  - A. M. Honegger, R. M. Kris, A. Ullrich, J. Schlessinger, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 925 (1989).

- 8. I. Alroy, Y. Yarden, FEBS Lett. 410, 83 (1997).
- 9. T. Pawson, Oncogene **3**, 491 (1988).
- 10. W. M. Kavanaugh, L. T. Williams, Science 266, 1862
- (1994). 11. P. I. H. Bastiaens, A. Squire, *Trends Cell Biol.* **9**, 48 (1999).
- 12. T. Ng et al., Science 283, 2085 (1999).
- F. S. Wouters, P. I. H. Bastiaens, Curr. Biol. 9, 1127 (1999).
- A. Squire, P. I. H. Bastiaens, J. Microsc. **193**, 36 (1999).
   J. R. Lakowicz, K. Berndt, *Rev. Sci. Instrum.* **62**, 1727 (1991).
- T. W. J. J. Gadella, T. M. Jovin, R. M. Clegg, *Biophys. Chem.* 48, 221 (1993).
- 17. Images were taken with a Zeiss plan-Apochromat 100X/1.4 NA PH3 oil objective at a modulation frequency of 80 MHz. GFP was excited by using a 488-nm Argon laser line, and the fluorescence was detected using a dichroic beamsplitter (Q 505 LP; Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT) and a narrow-band emission filter (BP514/10; Lys & Optik). Cy3 images were recorded using a 100 W Mercury arc lamp (Zeiss Attoarc) with a high Q Cy3 filter set (exciter:HQ, 535/50; dichroic:Q, 565 LP; emitter:HQ, 610/75 LP; Chroma Technology Corp.). Live cell imaging was performed at 37°C.
- P. J. Verveer, A. Squire, P. I. H. Bastiaens, *Biophys. J.* 78, 2127 (2000).
- 19. Y. Nagai et al., Nature Biotechnol. 18, 313 (2000). 20. Carboxyl-modified polystyrene beads (Sigma) were incubated for 15 min in 50 mM MES, pH 6.1, supplemented with 2 mM 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide-HCL (EDAC) and 5 mM N-hydroxysuccinimide (NHS) at room temperature. The reaction was stopped with 20 mM 2-mercaptoethanol and washing with MES buffer. The beads were reacted with EGF in MES buffer (at 10  $\mu$ g/ $\mu$ l dry beads) for 2 hours at room temperature, followed by 15 hours at 4°C. Beads were quenched for 15 min in 10 mM hydroxylamine and washed with phosphate-buffered saline. Approximately 10<sup>5</sup> EGF molecules were bound per bead. For stimulation times up to 1 min, coverslips with cells were drained and overlaid with 25  $\mu$ l (4 imes10<sup>5</sup> beads per microliter) suspension. For longer stim ulation times, 25  $\mu$ l (2  $\times$  10<sup>5</sup> beads per microliter) suspension was added to coverslips in 24-well culture dishes (0.25 ml medium) amounting to 2 to 5 beads per cell.
- Supplementary material is available to Science Online subscribers www.sciencemag.org/cgi/content/ full/290/5496/1567/DC1.
- F. S. Wouters, P. I. H. Bastiaens, in *Current Protocols in Cell Biology*, J. S. Bonifacino, M. Dasso, J. Lippin-cott-Schwartz, J. B. Harford, K. M. Yamada, Eds. (Wiley, New York, 2000), vol. 17.1, pp. 17.1.1–17.1.15.
- P. M. Guy, J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione, K. L. Carraway III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8132 (1994).
- 24. Constructed similarly to ErbB1-GFP (13).
- L. Buday, J. Downward, Mol. Cell. Biol. 13, 1903 (1993).
- 26. A. Wilde et al., Cell **96**, 677 (1999).
- F. U. Weiss, H. Daub, A. Ullrich, Curr. Opin. Genet. Dev. 7, 80 (1997).
- O. Kashles, Y. Yarden, R. Fischer, A. Ullrich, J. Schlessinger, *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1454 (1991).
- A. Sorokin, M. A. Lemmon, A. Ullrich, J. Schlessinger, J. Biol. Chem. 269, 9752 (1994).
- M. M. Marques, N. Martinez, I. Rodriguez-Garcia, A. Alonso, *Exp. Cell. Res.* 252, 432 (1999).
- D. C. Gamett, G. Pearson, R. A. Cerione, I. Friedberg, J. Biol. Chem. 272, 12052 (1997).
- D. S. Salomon, R. Brandt, F. Ciardiello, N. Normanno, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19, 183 (1995).
- 33. J. M. Beechem, Methods Enzymol. 210, 37 (1992).
- 34. D. M. Soumpasis, Biophys. J. 41, 95 (1983).
- 35. ErbB1 in pcDNA3.1 was a gift from C. Dickson (Imperial Cancer Research Fund, London). P.J.V. and F.S.W. were supported by long-term fellowships from the European Molecular Biology Organization. We thank E. Karsenti and A. Squire at EMBL for critically reading the manuscript and making useful suggestions.

11 September 2000; accepted 12 October 2000

# Interaction of BAG1 and Hsp70 Mediates Neuroprotectivity and Increases Chaperone Activity†

Jan Liman,<sup>1</sup>† Sundar Ganesan,<sup>2</sup>† Christoph P. Dohm,<sup>1</sup> Stan Krajewski,<sup>3</sup> John C. Reed,<sup>3</sup> Mathias Bähr,<sup>1</sup> Fred S. Wouters,<sup>2</sup>\*‡ and Pawel Kermer<sup>1</sup>\*‡

Neurologische Klinik, Universität Göttingen,<sup>1</sup> and Cell Biophysics Group, European Neuroscience Institute Göttingen,<sup>2</sup> Göttingen, Germany, and The Burnham Institute, La Jolla, California<sup>3</sup>

Received 17 September 2004/Returned for modification 20 October 2004/Accepted 19 January 2005

It was recently shown that Bcl-2-associated athanogene 1 (BAG1) is a potent neuroprotectant as well as a marker of neuronal differentiation. Since there appears to exist an equilibrium within the cell between BAG1 binding to heat shock protein 70 (Hsp70) and BAG1 binding to Raf-1 kinase, we hypothesized that changing BAG1 binding characteristics might significantly alter BAG1 function. To this end, we compared rat CSM14.1 cells and human SHSY-5Y cells stably overexpressing full-length BAG1 or a deletion mutant (BAG $\Delta$ C) no longer capable of binding to Hsp70. Using a novel yellow fluorescent protein-based foldase biosensor, we demonstrated an upregulation of chaperone in situ activity in cells overexpressing full-length BAG1 but not in cells overexpressing BAG $\Delta$ C compared to wild-type cells. Interestingly, in contrast to the nuclear and cytosolic localizations of full-length BAG1, BAG $\Delta$ C was expressed exclusively in the cytosol. Furthermore, cells expressing BAG $\Delta$ C were no longer protected against cell death. However, they still showed accelerated neuronal differentiation. Together, these results suggest that BAG1-induced activation of Hsp70 is important for neuroprotectivity, while BAG1-dependent modulation of neuronal differentiation in vitro is not.

Bcl-2-associated athanogene 1 (BAG1) is the first identified member of the BAG protein family, which consists of at least six different members identified in mammals to date. With the exception of BAG5, all BAG family members share the highly conserved BAG domain near the C terminus (37). The BAG family proteins differ in various other domains, allowing interactions with cellular binding partners and differential subcellular targeting. BAG1 binds to the ATPase domain of the 70-kDa heat shock protein (Hsp70) and its cognate protein Hsc70 (hereafter referred to as Hsp70), which are chaperones, through the BAG domain, thereby serving as a cochaperone and modulating chaperone activity (37-39). Moreover, multiple functions of BAG1 have been proposed; these include interaction and activation of the serine/threonine-specific protein kinase Raf-1 via its N-terminal domain (34, 45) as well as binding to steroid hormone and other receptors (2, 45, 50). Many studies dealing with BAG1 function revealed that it increases resistance to death stimuli when overexpressed in vitro, including in neuronal cells (19, 31, 35, 38, 43, 44). The neuroprotective effects were confirmed in vivo with transgenic mice overexpressing BAG1. Explanted primary neurons displayed increased resistance against glutamate toxicity. Moreover, BAG1 proved to be neuroprotective against stroke induced by middle cerebral artery occlusion in these mice (18).

Apart from its antiapoptotic effects, BAG1 also accelerates differentiation when overexpressed in neurons (19). In fact, BAG1<sup>-/-</sup> mice die during embryogenesis due to failed neurogenesis (46; unpublished observations), indicating an important role for the BAG1 gene in neuronal differentiation, neuronal survival, or both in vivo. It has been proposed that these multifunctional properties of BAG1 depend on its interactions with cellular binding partners. For example, there is evidence for a balance between BAG1 binding to Raf-1 or Hsp70 (34). This scenario raises the possibility that BAG1 promotes cell growth by binding to and stimulating the activity of Raf-1, whereas its antiapoptotic effects are modulated by its interaction with Hsp70. Thus, BAG1 may serve as a molecular switch, encouraging cells to proliferate and differentiate under permissive conditions and allowing survival under nonpermissive conditions (34, 37, 45). Moreover, conflicting data have been reported regarding the modulation of chaperone activity by BAG1. While BAG1 was originally characterized as an inhibitor of Hsp70 activity in vitro, recent evidence suggests that BAG1 can act as a stimulatory or an inhibitory cochaperone, depending on cell type, cofactor expression, and concentration (10, 41).

To resolve the question of how the interaction of BAG1 and Hsp70 influences chaperone activity in single neuronal cells, we generated a chaperone-dependent yellow fluorescent protein (YFP) folding mutant (cdYFP) and measured its refolding in rat nigral CSM14.1 and human SHSY-5Y neuroblastoma cells stably overexpressing full-length BAG1 or a truncated BAG1 construct (BAG $\Delta$ C) lacking the ability to bind Hsp70. Cells overexpressing BAG $\Delta$ C were also characterized and compared to those containing full-length BAG1 (19) with re-

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address for Fred S. Wouters: Cell Biophysics Group, European Neuroscience Institute Göttingen, Waldweg 33, 37075 Göttingen, Germany. Phone: 0049-551-3912368. Fax: 0049-551-3912346. E-mail: fred.wouters@gwdg.de. Mailing address for Pawel Kermer: Neurologische Klinik, Universität Göttingen, Robert-Koch-Str. 40, 37075 Göttingen, Germany. Phone: 49-551-394927. Fax: 49-551-3914302. E-mail: pkermer@gwdg.de.

<sup>†</sup> Supplemental material for this article may be found at http://mcb.asm.org/.

<sup>‡</sup> J.L., S.G., F.S.W., and P.K. contributed equally to this work.

### 3716 LIMAN ET AL.

gard to neuronal differentiation and susceptibility to apoptosis. Here we show for the first time, using intact cells of different species, that BAG1 is a potent inducer of Hsp70 chaperone activity in neurons and that BAG1 neuroprotectivity is dependent on this cochaperone effect. In contrast, the ability of BAG1 to promote neuronal differentiation is independent of Hsp70 binding and cochaperone activity.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cloning of constructs and development of cdYFP.** Detailed information on constructs can be found in the supplemental material. cdYFP was generated by a single round of random mutagenesis of enhanced YFP, and folding-impaired mutants were selected by visual inspection of the bacterial colony phenotype. The selected mutants, showing fluorescent and nonfluorescent pools of bacteria within one colony, were further selected on the basis of early folding and high fluorescence recovery criteria. The remaining mutants were subjected to bacterial chaperone induction to gauge the dynamic range of the folding response shown by fluorescence and were purified for further spectroscopic characterization.

Fluorescence-based folding assay. Cell lines (CHO, CSM14.1, and SHSY-5Y) grown to  $\pm 40\%$  confluence on 25-mm coverslips in six-well tissue culture plates were transfected with 0.5 µg of cdYFP or hemagglutinin (HA)-cdYFP per well of a six-well tissue culture plate by using magnet-assisted transfection according to the supplier's protocol (IBA GmbH, Göttingen, Germany) and were allowed to express the protein overnight. Cells were fixed with 4% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min, washed three times with PBS, and quenched for 10 min with 50 mM Tris (pH 7.5)-100 mM NaCl. For the quantitation of folding efficiency, pECFP (BD Biosciences Clontech) was coexpressed with cdYFP or cells expressing HA-cdYFP were subjected to anti-HA antibody immunofluorescence analysis after permeabilization of fixed cells with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min. Cells were blocked with 5% bovine serum albumin in PBS prior to incubation for 2 h with a 1:1,000 dilution of the primary anti-HA monoclonal antibody (Covance Research Products, Columbia, Mo.) and subsequent incubation for 1 h with a 1:300 dilution of the Cy5-labeled goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine). Cells were mounted in Mowiol. Three 5-min washes with PBS were performed between the steps.

Cells were imaged by using a Leica SP2 confocal laser scanning microscope equipped with an AOBS acoustooptical beam splitter, allowing custom selection of emission detection bands. For the detection of YFP fluorescence, cells were excited with the 514-nm argon laser line, and emission was recorded at 525 to 600 nm. For the detection of cyan fluorescent protein (CFP) fluorescence, excitation was done with the 458-nm argon laser line, and emission was recorded at 465 to 520 nm. For the detection of Cy5 fluorescence, excitation was done with the 633-nm HeNe laser line, and emission was recorded at 640 to 750 nm. Photomultiplier tube gains were kept constant for each emission range throughout the acquisitions. CFP or Cv5 fluorescence serves as an inert concentration reference for the total concentration of cdYFP. The folding efficiency was retrieved by simple image arithmetic (YFP fluorescence/reference fluorescence) by using ImageJ software (http://rsb.info.nih.gov/ij/). The image intensity values were corrected for the various laser power settings needed to obtain proper photon statistics under the various conditions. The laser power settings were shown to be linearly calibrated by comparison of the fluorescence intensities of fluorescent beads at various settings. The ratio images were masked based on threshold fluorescence intensities in the CFP or Cy5 channel to remove noise in the noncellular background. The folding ratios were always normalized to the first, partial folding peak in wild-type cells (see Results), so that the effects on the folding response were expressed in units of native folding activity. Folding ratio frequency histograms were obtained from masked images of 10 cells for each condition, unless indicated otherwise. For the Cy5 masking, the nucleus was also masked on the basis of its lower Cy5 signals, which represent incomplete penetration of the labeled antibody, a situation that would alter the folding statistics. Folding ratio frequency histograms were analyzed by using the Igor analysis package. Individual histograms were summed, and cumulative histograms were normalized to the integrated counts, i.e., to the number of observed pixels per experimental data set.

**Stable transfection.** The rat nigrostriatal cell line CSM14.1, immortalized by introduction of the temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen, and SHSY-5Y cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA, Pasching, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA), 1 mM



FIG. 1. BAG constructs. (A) The BAG $\Delta$ C mutant was generated by deletion of 29 C-terminal residues of p29 mouse BAG1, truncating the BAG domain. BAG $\Delta$ C was N-terminally tagged with a myc epitope tag; full-length BAG1 was N-terminally tagged with a FLAG epitope tag. The N-terminal ubiquitination domain is represented by a black box. (B) Immunoprecipitation (IP) with respective antibodies against the epitope tags and development with an antibody against BAG1 reveal strong expression of stably transfected proteins. Endogenous BAG1 present in all protein lysates served as an endogenous control. CSM, CMS14.1 cells; WT, wild type. (C) Stable expression of BAG1 in human SH-SY5Y cells. Note that the BAG antibody did not react with endogenous human BAG1.

L-glutamine, 100 U of penicillin/ml, and 100 µg of streptomycin sulfate/ml at either 32°C (permissive temperature) or 39°C (nonpermissive temperature) for CSM14.1 cells (49) and at 37°C for SHSY-5Y cells. For stable transfection, 50 to 70% confluent cells in six-well plates were incubated with Lipofectamine 2000 according to the supplier's protocol (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) in serum-free medium containing 3  $\mu$ g of pcDNA3.1(+) plasmid DNA (Invitrogen) expressing a myc tag-encoding fragment subcloned with HindIII/EcoRI and the  $BAG\Delta C$ DNA subcloned with EcoRI/XhoI, representing a 5:1 ratio of specific plasmid to puromycin resistance plasmid (pBabe-puro). After 3 h at 32°C, serum-containing medium was added, and the cells were incubated overnight. SHSY-5Y cells were transfected only with 3 µg of pCI-neo plasmid DNA (Promega, Madison, Wis.) containing a FLAG tag subcloned with XhoI/SalI and mBAG1 DNA subcloned with SalI/NotI. Finally, the transfection agent was replaced with medium containing 10% fetal bovine serum. Selection with 4  $\mu g$  of puromycin (CSM14.1 cells) or 250 µg of G418 (SHSY-5Y cells) in complete medium was started on the next day. After 5 days, cells were placed in 96-well plates (0.5 cell per well) with selection medium; 3 to 4 weeks later, wells containing single clones were identified by light microscopy. Cells were transferred to larger plates for expansion and further processing.

Empty vector-transfected cells as well as nontransfected CSM14.1 cells, both referred to as wild-type cells, served as control groups for the cell experiments.

Cell death, cell division assays, and measurement of neurite outgrowth. Cell death in the various stable cell lines was induced with either staurosporine or thapsigargine. For staurosporine-induced cell death, cells were plated on 96-well plates at a density of 10,000 cells per well and maintained at 32°C for 1 day prior to the experiment. Next, staurosporine was added at various concentrations (0.05, 0.1, and 1  $\mu$ M) and incubated for 48 h. For thapsigargine-induced cell death, cells were plated on 96-well plates at a density of 5,000 cells per well, maintained at 39°C for 8 days, and incubated with 3  $\mu$ M thapsigargine for 48 h.



FIG. 2. Stable expression of BAG $\Delta$ C. Representative photomicrographs were taken at magnifications of ×152 (A, B, E, and F) and ×304 (C, D, G, and H). Wild-type (WT) cells (A, C, E, and G) and cells overexpressing BAG $\Delta$ C (B and F) or BAG1 (D and H) were stained with anti-BAG antiserum (A to D), anti-myc antibody (E and F), or anti-FLAG antibody (G and H). Note the cytoplasmic distribution of BAG $\Delta$ C. The baseline fluorescence in wild-type cells stained with anti-BAG antiserum (A and C) is caused by the endogenous expression of BAG1, which is not present in cells stained with anti-FLAG antibody (G).

Cell survival was assessed by crystal violet staining. Data collection was performed with a spectrophotometer at a wavelength of 550 nm.

Doubling times were determined during logarithmic growth on 24-well plates. A total of  $10^4$  cells were plated, and daily cell counts were obtained with a trypan blue exclusion assay for 1 week. All experiments were repeated at least six times.

The length of outgrowing neurites was assessed on day 8 at  $39^{\circ}$ C in three independent experiments with 70 randomly picked cells in each group by using KS400 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). Statistics were performed with a two-tailed Student *t* test.

To assess Hsp70 neuroprotectivity, cells were transiently transfected with rat pECFP-C1-Hsp70 or pECFP-C1 (BD Biosciences, Franklin Lakes, N.J.) as described above 24 h prior to staurosporine treatment (see above). Vital and dead cells were counted under a fluorescence microscope in a blinded fashion by two investigators.

For the investigation of caspase activation in our model, cells were treated with 0.1  $\mu$ M staurosporine. After 12 h of incubation, caspase 3 activity was measured by using a Caspase Glo 3/7 detection system (Promega) according to the manufacturer's protocol.

Immunoblot and immunofluorescence analyses. Cell lysates were prepared at various times with HKME buffer as described previously (19). Briefly, proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Blocking was done with 5% skim milk-2% bovine serum albumin in 10 mM Tris (pH 7.5)-142 mM NaCl-0.1% Tween 20 at room temperature for 2 h. Next, the blots were incubated in the same solution with polyclonal primary antibody BUR1680 against the BAG protein (1:1,000; described in detail in references 19 and 38) as well as monoclonal antibodies against myc (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) and phosphorylated mitogen-activated protein kinase Erk1/2 and mitogen-activated protein kinase Erk1/2 (1:1,000; Cell Signaling, Beverly, Mass.), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (Bio-Rad, Hercules, Calif.) secondary antibodies. Bound antibodies were visualized by using an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham, Freiburg, Germany). The binding of BAG1 to Hsp70 as well as the lack of Hsp70 binding by BAGAC was shown previously multiple times (32, 34, 37).

For immunofluorescence analysis, wild-type cells and those stably transfected with BAG $\Delta$ C were trypsinized and placed on chamber slides. Cells were maintained at either 32 or 39°C until further processing. After various times, cells were washed with PBS and fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature, followed by several washes with PBS. Permeabilization was performed with 0.5% Triton X-100–PBS for 10 min; subsequent preblocking was done with PBS containing 2% normal goat serum. Cells were incubated in blocking solution containing the following primary antibodies: BUR1680 (1: 1,000), anti-myc (1:250; Santa Cruz), and anti-NeuN (1:200; Chemicon, Temecula, Calif.). After three washes with PBS and incubation with fluorescein isothiocyanate- or Cy3-conjugated secondary anti-mouse or anti-rabbit antibodies (1:500; Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature, the slides were covered with Vectashield mounting medium containing 1.5  $\mu$ g of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, Calif.)/ml

and sealed with Cytoseal 60 mounting medium (Stephens Scientific, Riverdale, N.J.).

### RESULTS

**Overexpression of BAG1 and BAG** $\Delta$ **C in neuronal cells.** The C-terminal region of the BAG1 protein contains the Hsp70 binding BAG domain. We therefore compared the effects of full-length BAG1 and of a mutant lacking this C-terminal domain. CSM14.1 neuronal cells (51) were stably transfected with a plasmid encoding full-length BAG1 (19) or myc-tagged mouse BAG $\Delta$ C (residues 1 to 190 of full-length BAG1) driven by the cytomegalovirus promoter (Fig. 1A). Moreover, SHSY-5Y cells were stably transfected with full-length BAG1. By immunoblotting, we found strong expression of BAG $\Delta$ C in CSM14.1 cells (Fig. 1B) as well as BAG1 in SHSY-5Y cells (Fig. 1C), with BAG $\Delta$ C migrating in gels slightly faster than endogenous BAG1 (Fig. 1B).

Immunofluorescence microscopy revealed an extensively cytosolic localization in cells stably overexpressing BAG $\Delta$ C (Fig. 2B and F). This result was markedly different from that obtained for wild-type cells (Fig. 2A and C) and cells overexpressing full-length BAG1, where we observed both nuclear expression and cytosolic expression in undifferentiated cells under control conditions (Fig. 2D and H). No staining was observed in CSM14.1 control cells when anti-myc antibody was used (Fig. 2E and G). Omission of the first antibody served as an additional control (data not shown).

**Chaperone foldase activity sensor cdYFP.** To assess the impact of BAG1 and BAG $\Delta$ C on chaperone activity in intact cells, we generated cdYFP. This chaperone foldase activity sensor was identified from a random mutagenesis screen of YFP by visual inspection of the bacterial phenotype of the colonies (see the supplemental material). The typical and obvious heterogeneous distribution of fluorescence in the colonies expressing foldase-sensitive mutants (Fig. 3A) is explained by the spontaneous upregulation of the bacterial chaperone program due to the presence of high concentrations of unfolded YFP in the bacterial cytoplasm (16). It is known that green fluorescent protein folding in vivo involves chaperones



FIG. 3. Characterization of cdYFP folding efficiencies in bacterial and mammalian expression systems. (A) Bacterial folding phenotype, as observed in BL21(DE3) bacterial colonies of retransformed cdYFP mutant cDNA. The marble-like distribution of fluorescent bacteria in the background of bacteria with low or no fluorescence is caused by the induction of the bacterial chaperone program, which is transferred to daughter cells. (B) Cold ethanol shock increases the generation of fluorescence in liquid bacterial cultures by a factor of 40. Red trace, cold ethanol shock; green trace, untreated cells. Excitation was performed at 480 nm, and the emission spectrum for the indicated spectral range is shown. AU, arbitrary units. (C) Distribution of fluorescence expression in CHO cells maintained at 37°C (green trace) or 25°C (red trace). Shown is the cumulative histogram for 10 cells for both traces. The curves were normalized to the sum area of the cells investigated, so that the area under the curve is equal to one. cdYFP fluorescence was normalized so that the maximum emission of cdYFP at 25°C is equal to one. (D) Generation of fluorescent cdYFP by foldase activity in representative cells grown at 37°C. (E) Generation of fluorescent cdYFP emission in a representative cell grown at 25°C. Color coding is shown in the bar; fluorescence emission normalization is equal to that in panel C.

and that green fluorescent protein variants follow different folding trajectories (29). The increased dependence of cdYFP folding on chaperone activity was confirmed by the fact that the fluorescence yield was greatly increased by the induction of chaperones in liquid bacterial cultures after cold ethanol shock (42), which gave rise to an  $\sim$ 40-fold increase in fluorescence yield (Fig. 3B) and the appearance of a clear peak at the YFP chromophoric position (514 nm) in the absorption spectrum of the treated bacteria that was undetectable under noninduction conditions (data not shown).

To allow expression in mammalian cells, cdYFP was subcloned under the control of the cytomegalovirus promoter. Transient expression at 37°C in CHO cells resulted in the homogeneous distribution of low fluorescence intensities in different cells (Fig. 3C, green trace, and Fig. 3D). This finding shows that the overexpression of poorly folded cdYFP by itself is not sufficient to significantly upregulate mammalian chaperone activity. Expression at a low temperature (25°C), in order to relax folding constraints, resulted in a three- to fourfold increase in fluorescence (Fig. 3C, red trace, and Fig. 3E). This finding confirms the impaired folding pathway of cdYFP.

Sequencing analysis of cdYFP selected for our study revealed a glycine-to-serine substitution at amino acid position 32 of YFP. This position is located near the end of the second  $\beta$  strand of the barrel. The 11- $\beta$ -strand barrel surrounding the central  $\alpha$  helix that contains the chromophore represents a difficult folding task. The correct conformation of the second  $\beta$ -strand end and presumably the transition into the third  $\beta$ strand through only a small loop are apparently critical for the correct formation of the entire barrel, which shields the chromophore and provides the proper amino acid side chain context for the chemical formation of the chromophore. Chaperone-mediated folding at this critical initial part of the YFP polypeptide corrects the gross structural defect in the barrel and allows the YFP structure to settle into a form that can accommodate fluorescence. To determine the concentrationindependent folding efficiency of cdYFP under various experimental conditions, a concentration reference fluorophore was introduced. In one implementation, an HA epitope was introduced at the cdYFP C terminus to yield HA-cdYFP. The total concentrations of expressed fluorescent cdYFP and nonfluorescent cdYFP can be determined from the fluorescence emission intensity of a Cy5-labeled secondary antibody. This method is used to obtain the distribution and relative concentration of folded cdYFP by image division. In an alternative implementation of the folding sensor, CFP is coexpressed to serve as a reference fluorophore. The advantage over antibody staining is that this assay can be used in living cells, but at the cost of quantification accuracy, as the levels of translated CFP and cdYFP cannot be precisely controlled. We used the quasiquantitative coexpression method of magnet-assisted transfection and found essentially identical results for the measurements described below, but with higher noise contents and cell-to-cell variations (data not shown). For the antibody reference, the reference is on the same molecule as the folding fluorophore, giving rise to robust and sensitive signals.

To show the sensitivity of the HA-cdYFP folding biosensor to the major mammalian chaperone Hsp70, we compared the folding efficiency of the sensor in wild-type CHO cells with that obtained upon transient coexpression of CFP-Hsp70. In wildtype cells, a single prominent folding peak was observed (Fig. 4A, green trace, and Fig. 4C). Coexpression of Hsp70 in CHO cells resulted in a dramatic increase in the folding ratio (Fig. 4A, red trace, and Fig. 4D), with a skewed distribution to a very high ratio. The use of CFP-Hsp70 allowed us to relate the levels of expression of Hsp70 to the folding efficiency on a cell-by-cell basis. The emission of CFP-Hsp70 can be collected without interference from the higher-wavelength fluorophores used with the foldase sensor (YFP and Cy5) and provides a measurement of the levels of expression of the chaperone. The distributions of folding activity and the levels of expression were plotted against each other to reveal a clearly correlated relationship (Fig. 4B). This experiment demonstrates that the foldase assay reports on the level of Hsp70 chaperone foldase activity in intact cells.

**BAG1-mediated folding response.** We next proceeded to compare the effects of stable overexpression of BAG1 and its C-terminal deletion mutant, BAG $\Delta$ C, in CSM14.1 nigral cells (Fig. 5). Wild-type CSM14.1 cells exhibit the same narrow distribution of relatively low cdYFP fluorescence as untreated wild-type CHO cells (Fig. 3C, green trace). The overexpression

Vol. 25, 2005



FIG. 4. Dependence of cdYFP folding in mammalian cells on Hsp70. (A) Generation of fluorescent cdYFP in wild-type CHO cells (green trace) and CHO cells transiently expressing Hsp70 (red trace). Shown is the cumulative histogram for 16 cells for both traces. The curves were normalized to the sum area of the cells investigated, so that the area under the curve is equal to one. cdYFP folding efficiency, as expressed by the ratio of cdYFP fluorescence to Cy5-labeled anti-HA antibody immunofluorescence, was normalized to the position of the major folding peak representing partially folded cdYFP in wildtype, untreated cells, as identified by comparison with other experiments. This intermediate can be seen as a separate peak in the red trace and a high-end shoulder in the green trace at a folding efficiency of one. (B) Two-dimensional histogram of the distribution of folding efficiency versus the distribution of CFP-Hsp70 expression, as judged by the fluorescence emission of the conjugated CFP fluorophore, on a cell-by-cell basis for all 16 cells used to construct the red trace in panel A. AU, arbitrary units. (C) cdYFP folding efficiency in a representative wild-type CHO cell. (D) cdYFP folding efficiency in a representative cell expressing Hsp70. Color coding is shown in the bar; folding efficiency normalization is equal to that in panel A.

of full-length BAG1 protein dramatically changed this distribution; a new, broad, and high folding efficiency distribution was detected in CSM14.1 cells (Fig. 5A, red trace). The majority of folded cdYFP exhibited an ~2.5-fold increase in fluorescence, but the folding efficiency ranged to as much as a 7-fold increase over that seen in the wild-type situation. The same effect held true for human SHSY-5Y cells stably transfected with BAG1 (Fig. 6, red trace) compared to wild-type SHSY-5Y cells (green trace). This shift was comparable in magnitude to the effect obtained with transient, high-level overexpression of Hsp70, indicating the physiological significance of the regulatory effect of BAG1 on Hsp70. This broad folding efficiency distribution is due to the presence of differently folded intermediates in the analyzed cells. The inset in Fig. 5A shows the presence of discrete distributions among BAG1-overexpressing cells that contain cdYFP, indicative of different equilibria between folding intermediates generated by variations in foldase activities between cells. These consist of species with  $\sim$ 2-fold (Fig. 5A, inset, blue curves),  $\sim$ 3- to 4-fold (green curves), and  $\sim$ 4- to 5-fold (red curves) average increases in folding activities. The BAG $\Delta$ C mutant, lacking Hsp70 binding capacity, failed to produce this increased folding response in stably expressing CSM14.1 cells (Fig. 5A, blue trace). This result demonstrates the critical importance of the



FIG. 5. The cdYFP folding sensor demonstrates the increase in chaperone activity caused by the overexpression of BAG1 in CSM14.1 cells. (A) Generation of fluorescent cdYFP in wild-type CSM14.1 cells (green trace), CSM14.1 cells stably expressing BAG1 (red trace), and CSM14.1 cells stably expressing BAG $\Delta$ C (blue trace). Shown is the cumulative histogram for 10 cells for all traces. Normalization of folding efficiency and frequency is the same as that in Fig. 4. The inset shows the individual traces for the 10 cells that were used to construct the red trace. These traces were color coded to discriminate cells exhibiting lower folding (blue), intermediate folding (green), and high folding (red) activities in the population of CSM14.1 cells stably expressing BAG1. (B) cdYFP folding efficiency in a representative wildtype CSM14.1 cell. (C) cdYFP folding efficiency in a representative CSM14.1 cell stably expressing BAG1. (D) cdYFP folding efficiency in a representative CSM14.1 cell stably expressing BAGAC. Color coding is shown in the bar; folding efficiency normalization is equal to that in panel A.

integrity of the BAG binding domain for the chaperone activity of BAG1. In fact, the folding efficiency distribution of the BAG $\Delta$ C mutant showed a bimodal distribution, with a small peak overlapping the positions of untreated and wild-type cells (green traces in Fig. 3C and 5A) and a new, major peak at a lower folding efficiency (~0.8).

We assign the recurring prominent peak in untreated and native cells to a stable folding intermediate towards properly folded cdYFP (which we normalized to 1). The new low-efficiency peak observed in the BAG $\Delta$ C mutant, which is also present as a shoulder in the untreated and native folding traces, represents the most poorly folded intermediate that can be assigned in cells. We assign folding ratios of >2 to more fully folded forms. These forms are observed only upon active induction of cellular folding activities, indicating that the endogenous chaperone activity apparently does not suffice to process cdYFP beyond the first partial folding step. The foldase activity needed for further folding obviously exceeds that which is natively present. Upon induction of chaperone activity, both by Hsp70 overexpression or by modulation of endogenous Hsp70 via BAG1 overexpression, the folding pathway apparently diverges to allow for graded "tuning" of folding



FIG. 6. The cdYFP folding sensor demonstrates the increase in chaperone activity caused by the overexpression of BAG1 in SHSY-5Y cells. The graph shows the generation of fluorescent cdYFP in wild-type SHSY-5Y cells (green trace) and SHSY-5Y cells stably expressing BAG1 (red trace). Shown is the cumulative histogram for 10 cells for all traces. Normalization of folding efficiency and frequency is the same as that in Fig. 4 and 5. The inset shows a representative wild-type cell (left) and a representative transfected cell stably expressing BAG1 (right). Color coding is shown in the bar; folding efficiency normalization is equal to that in the graph.

forms, giving rise to a broad folding efficiency spectrum with various forms possessing low, intermediate, and high folding efficiencies.

Only  $\sim 25\%$  of cdYFP is partially folded in BAG $\Delta$ C-expressing cells, in comparison to >90% for wild-type cells. This finding implies that truncation of the BAG domain generates a strong dominant-negative phenotype with respect to folding, since folding activity is almost completely impaired.

BAGAC abolishes BAG1-dependent neuroprotection. Having established the BAG1-dependent induction of chaperone activity in rat CSM14.1 and SHSY-5Y cells, we were interested in how the phenotype of these cells is changed when they stably express the deletion mutant BAG $\Delta$ C, which is no longer capable of inducing this activity (see above). We first examined BAG1 neuroprotectivity. Treatment of CSM14.1 cells with the phospholipid- and calcium-dependent protein kinase inhibitor staurosporine induces mainly apoptotic cell death. At 24 to 48 h, 20 to 40% of wild-type cells survived staurosporine treatment (Fig. 7A). CSM14.1 cells stably overexpressing BAG $\Delta$ C did not exhibit increased cell survival rates, whereas overexpression of full-length BAG1 significantly protected against staurosporine-induced cell death (Fig. 7B), as shown previously for serum deprivation (19). In a second experimental approach, we applied thapsigargine, a potent IP3-independent intracellular calcium releaser which is known to induce apoptosis. At 48 h, approximately 60% of wild-type cells had undergone apoptosis, which was effectively prevented in cells stably overexpressing BAG1. In contrast, stable expression of BAG $\Delta$ C did not yield any significant difference in cell survival compared to that seen in wild-type CSM14.1 cells (Fig. 7B). Therefore, BAG1 neuroprotectivity strongly correlates with its ability to induce chaperone activity in intact cells. Because we hypothesized that Hsp70 is a major chaperone mediating BAG1 neuroprotectivity, we examined whether Hsp70 exerts protectivity in our model. To this end, we transiently transfected CSM14.1 cells either with an empty CFP expression vector or with a plasmid containing rat Hsp70 tagged with CFP at the N terminus. As illustrated in Fig. 7, Hsp70 substantially inhibited staurosporine toxicity.

Since it is still a matter of debate and controversy whether BAG1 neuroprotectivity is dependent on the inhibition of caspase activation, we finally wanted to know whether BAG1 overexpression—being highly protective in our model—is accompanied by decreased levels of activity of caspase 3, one of the main effectors of apoptosis in neurons. Surprisingly, we found no difference in caspase 3 activation 12 h after staurosporine treatment in BAG1-overexpressing cells compared to their wild-type counterparts (Fig. 7D).

BAG $\Delta$ C still accelerates the differentiation of CSM14.1 cells. As described previously for cells overexpressing fulllength BAG1, we observed morphological changes in BAG $\Delta$ Coverexpressing cells already at the permissive temperature of 32°C. In contrast to the small and round shape of wild-type cells, BAG $\Delta$ C-overexpressing cells are larger and display a more polarized shape, suggesting an increased cytosol/nucleus ratio. To induce differentiation in our stable cell lines, we switched the culture temperature from 32 to 39°C (19, 51).

To further explore the effects of BAG $\Delta$ C on neuronal differentiation, we first measured the length of axon-like processes. After 8 days of culturing at the nonpermissive temperature, only a few wild-type cells had grown processes. BAG1- and BAG $\Delta$ Coverexpressing cells had consistently grown long processes and formed nests with axon-like networks. Measurement of the lengths of these processes revealed a highly significant increase in these cells compared to wild-type cells (P < 0.001) (Fig. 8A).

Second, we evaluated the doubling times of CSM14.1 cell transfectants expressing BAG1 or BAG $\Delta$ C. As in BAG1-overexpressing cells (19), there was a highly significant difference in the generation times of BAG $\Delta$ C-expressing cells and wild-type cells at 32°C (P < 0.001). BAG $\Delta$ C-transfected cells were less proliferative, with an average generation time of 41 h, similar to BAG1-overexpressing cells. In contrast, wild-type CSM14.1 cells doubled, on average, every 25 h (Fig. 8B).

Third, to correlate these changes in axon length and proliferation with neuronal differentiation, we also investigated the expression of the NeuN neuronal differentiation marker in these cells. Again, in agreement with findings for cells expressing full-length BAG1, we detected positive NeuN staining after 22 days of culturing at the nonpermissive temperature in most cells overexpressing BAG $\Delta$ C, while NeuN staining remained absent in CSM 14.1 control cells (Fig. 8C). We conclude therefore that BAG $\Delta$ C retains its ability to promote neuronal differentiation, despite lacking cochaperone activity.

One may speculate that these observations are a consequence of the interaction of BAG1 with Raf-1 kinase. Thus, we finally checked whether BAG $\Delta$ C, like BAG1 (18), still induces Raf-1-dependent Erk phorphorylation. As shown in



FIG. 7. BAG $\Delta$ C does not protect against staurosporine (STS)- or thapsigargine-induced cell death, while Hsp70 is highly neuroprotective. (A) CSM14.1 cells were treated with increasing concentrations of staurosporine for 48 h (n = 6; mean  $\pm$  standard error of the mean [SEM]; double and triple asterisks indicate *P* values of <0.01 and <0.001, respectively). Overexpression of full-length BAG1 resulted in highly significant protection against staurosporine-induced toxicity, while cells overexpressing BAG $\Delta$ C were not protected but showed a trend toward even higher susceptibility to staurosporine toxicity than wild-type (WT) cells. (B) CSM14.1 cells were treated with 0.3  $\mu$ M thapsigargine for 48 h (n = 6; mean  $\pm$  standard deviation [SD]; triple asterisks indicate a *P* value of <0.001). While BAG1-overexpressing cells exhibited strong resistance against ER stress, cells overexpressing BAG $\Delta$ C and wild-type cells did not. (C) CSM14.1 cells were transiently transfected with ECFP-Hsp70, and cell survival was assessed after treatment with staurosporine as described for panel A. A total of 1,000 green cells from three independent experiments were evaluated by two investigators as vital or dead (mean  $\pm$  SEM; triple asterisks indicate a *P* value of <0.001). Hsp70 overexpression proved to be highly protective. (D) Caspase 3 activity was measured in a fluorogenic assay for CSM14.1 (CSM) wild-type and BAG1-expressing cells with or without 0.1  $\mu$ M staurosporine challenge for 12 h (n = 4; mean  $\pm$  SD). While staurosporine treatment induced marked caspase 3 activity, no significant difference between wild-type and BAG1-expressing cells could be documented. AU, arbitrary units; ctrl, control.

Fig. 8D, phosphorylated Erk1/2 levels were similarly increased in cells overexpressing BAG1 and BAG $\Delta$ C compared to wild-type cells.

## DISCUSSION

BAG1 has been characterized as a regulator and marker of neuronal differentiation exhibiting neuroprotective properties in vitro as well as in a transgenic mouse model in vivo (18, 19). This multifunctionality has been suggested to be dependent on the binding partners interacting with BAG1 (37). To explore the influence of the known binding partner Hsp70 on the above-mentioned features of BAG1, in the present study we stably overexpressed BAG $\Delta$ C, which was previously reported to lack Hsp70 binding capacity (34). We used CSM14.1 cells, which originate from rat nigrostriatal neurons immortalized by expression of the temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen. These cells show a high proliferation rate at a permissive temperature, while the inactivation of large T antigen at a non-permissive temperature induces neuronal differentiation (51).

**BAG1 but not BAG** $\Delta$ **C increases chaperone activity in living cells.** It is known that chaperones interact with misfolded or partially folded polypeptides in order to prevent interactions that would result in aggregation. Chaperones belonging to the Hsp70 family process the majority of substrates within the eukaryotic cytosol. The main function of these chaperones is to fold newly synthesized proteins or to refold proteins after



FIG. 8. BAG $\Delta$ C still induces neuronal differentiation in vitro. (A) Measurement of neurite extension in BAG $\Delta$ C-overexpressing versus BAG1-overexpressing and wild-type (WT) cells (70 cells measured in three independent experiments; mean  $\pm$  standard deviation [SD]). Note that neurites in BAG $\Delta$ C- and full-length BAG1-overexpressing cells were significantly longer than those in wild-type cells (triple asterisks indicate a P value of <0.001). (B) Generation time assessed by counting cell numbers during logarithmic growth at a permissive temperature (32°C) over 1 week (n = 6). Average generation time (mean  $\pm$  SD) was significantly longer in BAG $\Delta$ C- and full-length BAG1overexpressing cells than in wild-type cells (triple asterisks indicate a P value of <0.001). (C) BAG $\Delta$ C-overexpressing cells (left and middle panels; magnifications, ×200 and ×400, respectively) and wild-type cells (right panels; magnification, ×200) after 22 days at a nonpermissive temperature were stained with fluorescein isothiocyanate-labeled NeuN and counterstained with DAPI. BAGAC-overexpressing cells displayed nuclear expression of the differentiation marker NeuN, which was absent in wild-type cells. (D) Cells overexpressing BAG1 or BAG $\Delta$ C showed similarly elevated levels of phosphorylated Erk1/2 expression compared to wild-type cells.

MOL. CELL. BIOL.

stress denaturation through ATP binding and hydrolysis (6, 12, 48). The subcellular localization and the substrates of such chaperones are predominantly determined by a number of regulatory or accessory cochaperones. In general, such cochaperones consist of a chaperone binding domain and other domains involving different activities or localizations within cells. BAG1 is one of those known cochaperones. It has a C-terminal BAG domain which binds mainly by electrostatic interactions to Hsp70 (33). BAG1 binds to the ATPase domain of Hsp70, resulting in a potent acceleration of ATPase activity (13). Further investigations revealed that this acceleration is due to the stimulation of ADP release via opening of the nucleotide binding cleft of the Hsp70 ATPase domain (10, 13, 33). BAG1 thereby acts as a nucleotide exchange factor for Hsp70, triggering substrate unloading from the chaperone. Although the mechanism of the BAG1-Hsp70 interaction has been studied extensively, the influence of BAG1 on chaperone foldase activity is still a subject of controversy and debate. While some studies suggested BAG1 to be an inhibitor of ATP-dependent Hsp70 activity (11, 36, 49), others presented strong opposing evidence for BAG1 as a stimulatory cochaperone (10, 41). These opposing findings were attributed to differences in cofactor expression but also to the expression of various BAG1 isoforms, with the short forms of BAG1 acting as positive regulators and the longer forms acting as negative regulators of chaperone foldase activity (22).

In this study, we demonstrated that the short isoform of mouse BAG1 dramatically increases chaperone foldase activity in neurons. This effect is species independent, since we observed it in rodent and human neuronal cells. To our knowledge, we are the first to demonstrate and quantify BAG1dependent chaperone activity directly inside single cells in situ. These results were achieved by the generation of a novel folding-impaired YFP mutant whose folding dependence on chaperones is tuned such that it can be used as an effective sensor for cellular foldase activity. This cdYFP indicator protein can leave its intrinsically misfolded, nonfluorescent state upon correct refolding by cellular chaperones, thereby regaining detectable fluorescence. As an example, we showed the responsiveness of the cdYFP folding reaction to the major chaperone Hsp70. Other chaperones, such as Hsc70, which has also been implicated as a regulatory target for BAG1, are likely to contribute to correct cdYFP folding in case they are upregulated by BAG1 overexpression. By use of a spectrally different fluorescent concentration reference, a sensitive and reproducible sensor for cellular chaperone activity was achieved. This sensor allowed departure from conventional "artificial" extracellular activity assays, with all their procedural pitfalls, to observe chaperone activity through the microscope in intact cells in situ. The applicability of this novel sensor is underscored by our observation of discrete equilibria of the process of refolding of a misfolded protein in single cells. We therefore believe that the cdYFP sensor can be generally used for protein folding and refolding analyses beyond the scope of the present study.

In our experimental paradigm, wild-type rat CSM14.1 and human SHSY-5Y cells, as well as CHO cells, show a single prominent peak of folding activity. By comparison of the dif-
ferent treatments, this peak could be assigned to a stable folding intermediate. Experiments with BAGAC-expressing cells showed the presence of a further folding intermediate with a lower efficiency. In retrospect, the lower-efficiency shoulders of the folding efficiency distributions of wild-type and untreated cells could be seen to contain a fraction of this poorly folded "base" condition of the sensor (Fig. 4A, green trace versus red trace, and Fig. 5A). Wild-type cells are not able to overcome the "second" step in protein refolding. In contrast, cells stably overexpressing BAG1 or Hsp70 directly show a prominent high-efficiency distribution indicating further advanced protein refolding. This distribution is broader and less symmetrical than the poorly and initially folded distribution. These highfolding activity distributions, when compared on a cell-by-cell basis, demonstrate the progressive dependence on the folding threshold on Hsp70 expression levels (Fig. 4B) and on discrete fine-tuning steps at more advanced refolding activities, e.g., upon BAG1 overexpression (Fig. 5A, inset). Surprisingly, BAGAC, which lacks the Hsp70 binding C terminus, does not yield results similiar to those seen in wild-type CSM14.1 cells but seems to impair protein refolding even further. This observation is in line with results obtained by Gassler et al. (10), who measured the influence of BAG1 and a C-terminal deletion mutant of BAG1 on Hsp70 ADP turnover. They found an  $\sim$ 900-fold increase in ADP turnover in cells transfected with BAG1, whereas cells transfected with the deletion mutant displayed a 4-fold decrease (10). This effect was explained by the presence of an additional domain which is situated in an Nterminal location relative to the BAG domain, which is apparently important for the binding and activation of chaperones, and which acts in a dominant-negative manner on chaperone foldase activity.

An interaction between Hsp70 and BAG1 is necessary for the neuroprotective effect but not for neuronal differentiation. The results discussed above posed the question of how BAG1 exerts its antiapoptotic activity and which protein interactions are necessary. It has been suggested that the linkage of BAG1 to the proteasome and its interaction with Hsp70 are important for cell survival in breast cancer cells and cardiomyocytes (43, 44).

In our study, CSM14.1 cells overexpressing BAG $\Delta$ C, like wild-type cells but unlike BAG1-overexpressing cells, remained sensitive to apoptotic stimuli induced by staurosporine and thapsigargine. Since BAGAC cannot bind to Hsp70 and lacks chaperone activity, it is likely that the neuroprotective effect of full-length BAG1 in neurons is the result of the modulation of Hsp70 chaperone activity. Obviously, we cannot rule out the possibility that chaperones other than Hsp70 are bound and activated through the BAG domain of BAG1 and contribute to BAG1 neuroprotectivity. However, if the cytoprotective effect of BAG1 depends on Hsp70 activation, then Hsp70 by itself should exert neuroprotectivity in our experimental paradigm. In accordance with this notion, we show here that Hsp70 substantially blocks staurosporine toxicity. A proposed mechanism for the antiapoptotic effect of BAG1 via Hsp70 is suggested by other experiments, where it was found that the interaction of Hsp70 with Apaf-1 prevents the formation of the apoptosome, thereby averting the enforcement of the intrinsic apoptosis pathway (3, 30). However, the precise mechanism by which apoptosis is abolished still remains to be elucidated, and

it may not be assigned to the action of a single protein, such as Apaf-1. For example, Hsp70 has also been shown to protect cells from enforced caspase 3 expression. This finding indicates that Hsp70 is also able to block apoptosis downstream of apoptosome-dependent caspase activation (14). In line with the latter results, we did not observe significant differences in caspase 3 activation 12 h following staurosporine treatment in wild-type and BAG1-overexpressing cells.

Since we demonstrated a highly significant upregulation of chaperone foldase activity in this study, we suggest that the interaction of BAG1 and Hsp70 is the key mechanism for delivering the neuroprotective effect of BAG1 by serving as a positive regulator of Hsp70 foldase activity in neurons. In this regard, not only is Hsp70 known to be a neuroprotectant in the context of ischemic neuronal death (8, 17, 21, 26, 27, 40), but also it is known to suppress neuropathology in mouse models of polyglutamine repeat diseases, including spinocerebellar ataxia (7) and Huntington's disease (15), as well as in amyotrophic lateral sclerosis (5, 46). Since the three-dimensional structure of the BAG1-Hsp70-ATPase domain complex has been solved (33) and critical contact sites have been mapped for BAG1 binding and cochaperone activities (4), it is conceivable that small-molecule drugs that would have neuroprotective properties and that would occupy the BAG1 binding site on the ATPase domain of Hsp70 could be identified. These drugs would act as BAG1 mimics, thereby enhancing Hsp70 function. Additionally, BAG1 cDNAs might be considered for use in gene therapy applications for neurological diseases where cell loss represents the underlying pathological event.

Apart from the interaction of BAG1 with Hsp70, multiple BAG1 functions and interaction partners have been ascertained; these include the binding and activation of Raf-1 kinase, the regulation of proteasomal degradation, and differentiation-accelerating effects (1, 9, 19, 34, 38, 45). It appears that an additional feature of the BAG1 protein is regulation of the cell cycle and proliferation. BAG1-overexpressing neurons, as well as human breast cancer cells, show signs of a prolonged cell cycle, with reduced proliferation but increased differentiation (19, 20, 23, 28, 34). Moreover, it has been suggested that BAG1 is of importance for the developing nervous system. The p29 BAG1 isoform used in this study has been reported to localize mostly to the nucleus (19, 24). However, there is a characteristic shift from mainly nuclear expression in proliferating neurons to mostly cytosolic expression in differentiating neurons in the mouse brain and in cell cultures (18), with BAG $\Delta$ C being exclusively found in the cytosol (this study). Furthermore, BAG1<sup>-/-</sup> mice died by embryonic day 13 and showed marked disturbances of cortical layering (47).

Thus, in the present study, we were also interested in the influence of the Hsp70-BAG1 interaction on cellular differentiation. We assessed neuronal differentiation in CSM14.1 cells expressing BAG $\Delta$ C, wild-type cells, and cells overexpressing full-length BAG1. Interestingly, the accelerating effect of BAG1 on neuronal differentiation was independent of its binding to Hsp70. These cells displayed identical features of neuronal differentiation. One may speculate that these observations are a consequence of the interaction of BAG1 with Raf-1 kinase. Raf-1 kinase is crucially involved in cellular proliferation and differentiation (25) and has been shown to slow pro-

## 3724 LIMAN ET AL.

liferation and increase differentiation in certain cell lineages, particulary neuronal progenitors and tumor-derived cells (32). BAG1 binds to Raf-1 kinase and increases its activity (34, 45). In this study, we showed that the levels of Raf-1-mediated Erk phosphorylation were similarly elevated in cells overexpressing full-length BAG1 or BAG $\Delta$ C. Thus, Raf-1 kinase appears to be a promising focus for future experimental efforts to further dissect the cellular pathways modulated by BAG1.

## ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by a starter grant from the University of Goettingen (to P.K.), the graduate college GRK 723 Spatio-Temporal Signal Processes in Neurons and Cellular Biophysics (to S.G.), the DFG Research Center Molecular Physiology of the Brain (to P.K. and F.S.W.), and CA67329 (to J.C.R.).

## REFERENCES

- Alberti, S., J. Demand, C. Esser, N. Emmerich, H. Schild, and J. Hohfeld. 2002. Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. J. Biol. Chem. 277:45920–45927.
- Bardelli, A., P. Longati, D. Albero, S. Goruppi, C. Schneider, C. Ponzetto, and P. M. Comoglio. 1996. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. EMBO J. 15:6205–6212.
- Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Tailor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen, and D. R. Green. 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nat. Cell Biol. 2:469–475.
- Briknarova, K., S. Takayama, L. Brive, M. L. Havert, D. A. Knee, J. Velasco, S. Homma, E. Cabezas, J. Stuart, D. W. Hoyt, A. C. Satterthwait, M. Llinas, J. C. Reed, and K. R. Ely. 2001. Structural analysis of BAG1 cochaperone and its interactions with Hsc70 heat shock protein. Nat. Struct. Biol. 8:349– 352.
- Bruening, W., J. Roy, B. Giasson, D. A. Figlewicz, W. E. Mushynski, and H. D. Durham. 1999. Up-regulation of protein chaperones preserves viability of cells expressing toxic Cu/Zn-superoxide dismutase mutants associated with amyotrophic lateral sclerosis. J. Neurochem. 72:693–699.
- Bukau, B., and A. L. Horwich. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell 92:351–366.
- Cummings, C. J., Y. Sun, P. Opal, B. Antalffy, R. Mestril, H. T. Orr, W. H. Dillmann, and H. Y. Zoghbi. 2001. Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. Hum. Mol. Genet. 10:1511–1518.
- Currie, R. W., J. A. Ellison, R. F. White, G. Z. Feuerstein, X. Wang, and F. C. Barone. 2000. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal Hsp70 and prolonged astrogliosis with expression of Hsp27. Brain Res. 863:169–181.
- Demand, J., S. Alberti, C. Patterson, and J. Hohfeld. 2001. Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/ proteasome coupling. Curr. Biol. 11:1569–1577.
- Gassler, C. S., T. Wiederkehr, D. Brehmer, B. Bukau, and M. P. Mayer. 2001. Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. J. Biol. Chem. 276:32538–32544.
- Gebauer, M., M. Zeiner, and U. Gehring. 1997. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity. FEBS Lett. 417:109–113.
- Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. Science 295:1852–1858.
- Hohfeld, J., and S. Jentsch. 1997. GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. EMBO J. 16:6209–6216.
  Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Egeblad. 1998.
- Jaattela, M., D. Wissing, K. Kokholm, T. Kallunki, and M. Egeblad. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. EMBO J. 17:6124–6134.
- Jana, N. R., M. Tanaka, G. Wang, and N. Nukina. 2000. Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. Hum. Mol. Genet. 9:2009–2018.
   Jurgen, B., H. Y. Lin, S. Riemschneider, C. Scharf, P. Neubauer, R. Schmid,
- Jurgen, B., H. Y. Lin, S. Riemschneider, C. Scharf, P. Neubauer, R. Schmid, M. Hecker, and T. Schweder. 2000. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in Escherichia coli glucose-limited fed-batch fermentations. Biotechnol. Bioeng. 70:217–224.
- Kelly, S., A. Bieneman, K. Horsburgh, D. Hughes, M. V. Sofroniew, J. McCulloch, and J. B. Uney. 2001. Targeting expression of hsp70i to discrete neuronal populations using the Lmo-1 promoter: assessment of the neuroprotective effects of hsp70i in vivo and in vitro. J. Cereb. Blood Flow Metab. 21:972–981.

- Kermer, P., M. H. Digicaylioglu, M. Kaul, J. M. Zapata, M. Krajewska, F. Stenner-Liewen, S. Takayama, S. Krajewski, S. A. Lipton, and J. C. Reed. 2003. BAG1 over-expression in brain protects against stroke. Brain Pathol. 13:495–506.
- Kermer, P., M. Krajewska, J. M. Zapata, S. Takayama, J. Mai, S. Krajewski, and J. C. Reed. 2002. Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. Cell Death Differ. 9:405–413.
- Kudoh, M., D. A. Knee, S. Takayama, and J. C. Reed. 2002. Bag1 proteins regulate growth and survival of ZR-75-1 human breast cancer cells. Cancer Res. 62:1904–1909.
- Lee, S. H., M. Kim, B. W. Yoon, Y. J. Kim, S. J. Ma, J. K. Roh, J. S. Lee, and J. S. Seo. 2001. Targeted hsp70.1 disruption increases infarction volume after focal cerebral ischemia in mice. Stroke 32:2905–2912.
- Luders, J., J. Demand, O. Papp, and J. Hohfeld. 2000. Distinct isoforms of the cofactor BAG-1 differentially affect Hsc70 chaperone function. J. Biol. Chem. 275:14817–14823.
- Matsuzawa, S., S. Takayama, B. A. Froesch, J. M. Zapata, and J. C. Reed. 1998. p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. EMBO J. 17:2736–2747.
- Nollen, E. A., J. F. Brunsting, J. Song, H. H. Kampinga, and R. I. Morimoto. 2000. Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity. Mol. Cell. Biol. 20:1083–1088.
- O'Neill, E., and W. Kolch. 2004. Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. Br. J. Cancer 90:283–288.
- Rajdev, S., K. Hara, Y. Kokubo, R. Mestril, W. Dillmann, P. R. Weinstein, and F. R. Sharp. 2000. Mice overexpressing rat heat shock protein 70 are protected against cerebral infarction. Ann. Neurol. 47:782–791.
- Rokutan, K., T. Hirakawa, S. Teshima, Y. Nakano, M. Miyoshi, T. Kawai, E. Konda, H. Morinaga, T. Nikawa, and K. Kishi. 1998. Implications of heat shock/stress proteins for medicine and disease. J. Med. Investig. 44:137–147.
  Roth, W., C. Grimmel, L. Rieger, H. Strik, S. Takayama, S. Krajewski, R.
- Roth, W., C. Grimmel, L. Rieger, H. Strik, S. Takayama, S. Krajewski, R. Meyermann, J. Dichgans, J. C. Reed, and M. Weller. 2000. Bag-1 and Bcl-2 gene transfer in malignant glioma: modulation of cell cycle regulation and apoptosis. Brain Pathol. 10:223–234.
- Sacchetti, A., V. Cappetti, P. Marra, R. Dell'Arciprete, T. El Sewedy, C. Crescenzi, and S. Alberti. 2001. Green fluorescent protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells. J. Cell. Biochem. 81:117– 128.
- Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins, and E. S. Alnemri. 2000. Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. Nat. Cell Biol. 2:476–483.
- 31. Schulz, J. B., D. Bremen, J. C. Reed, J. Lommatzsch, S. Takayama, U. Wullner, P. A. Loschmann, T. Klockgether, and M. Weller. 1997. Cooperative interception of neuronal apoptosis by BCL-2 and BAG-1 expression: prevention of caspase activation and reduced production of reactive oxygen species. J. Neurochem. 69:2075–2086.
- Sippel, R. S., and H. Chen. 2002. Activation of the ras/raf-1 signal transduction pathway in carcinoid tumor cells results in morphologic transdifferentiation. Surgery 132:1035–1039.
- Sondermann, H., C. Scheufler, C. Schneider, J. Hohfeld, F. U. Hartl, and I. Moarefi. 2001. Structure of a Bag/Hsc70 complex: convergent functional evolution of Hsp70 nucleotide exchange factors. Science 291:1553–1557.
- Song, J., M. Takeda, and R. I. Morimoto. 2001. Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. Nat. Cell Biol. 3:276–282.
- 35. Takaoka, A., M. Adachi, H. Okuda, S. Sato, A. Yawata, Y. Hinoda, S. Takayama, J. C. Reed, and K. Imai. 1997. Anti-cell death activity promotes pulmonary metastasis of melanoma cells. Oncogene 14:2971–2977.
- Takayama, S., D. N. Bimston, S. Matsuzawa, B. C. Freeman, C. Aime-Sempe, Z. Xie, R. I. Morimoto, and J. C. Reed. 1997. BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. EMBO J. 16:4887–4896.
- Takayama, S., and J. C. Reed. 2001. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. Nat. Cell Biol. 3:E237–E241.
- Takayama, S., T. Sato, S. Krajewski, K. Kochel, S. Irie, J. A. Millan, and J. C. Reed. 1995. Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2binding protein with anti-cell death activity. Cell 80:279–284.
- Takayama, S., Z. Xie, and J. C. Reed. 1999. An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. J. Biol. Chem. 274: 781–786.
- Tanaka, S., K. Kitagawa, T. Ohtsuki, Y. Yagita, K. Takasawa, M. Hori, and M. Matsumoto. 2002. Synergistic induction of HSP40 and HSC70 in the mouse hippocampal neurons after cerebral ischemia and ischemic tolerance in gerbil hippocampus. J. Neurosci. Res. 67:37–47.
- Terada, K., and M. Mori. 2000. Human DnaJ homologs dj2 and dj3, and bag-1 are positive cochaperones of hsc70. J. Biol. Chem. 275:24728–24734.
- Thomas, J. G., and F. Baneyx. 1996. Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant Escherichia coli cells overexpressing Heat-shock proteins. J. Biol. Chem. 271:11141–11147.
- Townsend, P. A., R. I. Cutress, C. J. Carroll, K. M. Lawrence, T. M. Scarabelli, G. Packham, A. Stephanou, and D. S. Latchman. 2004. BAG-1 proteins protect cardiac myocytes from simulated ischemia/reperfusion-induced ap-

optosis via an alternate mechanism of cell survival independent of the proteasome. J. Biol. Chem. **279:**20723–20728.

- 44. Townsend, P. A., R. I. Cutress, A. Sharp, M. Brimmell, and G. Packham. 2003. BAG-1 prevents stress-induced long-term growth inhibition in breast cancer cells via a chaperone-dependent pathway. Cancer Res. 63:4150–4157.
- Wang, H. G., S. Takayama, U. R. Rapp, and J. C. Reed. 1996. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7063–7068.
- 46. Watanabe, M., M. Dykes-Hoberg, V. C. Culotta, D. L. Price, P. C. Wong, and J. D. Rothstein. 2001. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. Neurobiol. Dis. 8:933–941.
- 47. Wiese, S., R. Gotz, W. Rossoll, U. Schweizer, S.Takajama, M. Berzaghi, S. Jablonka, B. Holtmann, J. C. Reed, U. R. Rapp, and M. Sendtner. 2002.

Essential role for BAG-1 in differentiation and survival of neurons, CD-ROM program no. 618.4. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, Washington, D.C.

- Young, J. C., I. Moarefi, and F. U. Hartl. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. J. Cell Biol. 154:267–273.
- Zeiner, M., M. Gebauer, and U. Gehring. 1997. Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. EMBO J. 16:5483–5490.
- Zeiner, M., and U. Gehring. 1995. A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:11465–11469.
- Zhong, L. T., T. Sarafian, D. J. Kane, A. C. Charles, S. P. Mah, R. H. Edwards, and D. E. Bredesen. 1993. bcl-2 inhibits death of central neural cells induced by multiple agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4533–4537.