

## ***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, nicht-invasive 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 Fluoreszenzproteine, 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 Immunreaktivität 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 Fettresorption 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 seitenkettenenthaltenden 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 Erkrankungen ist. Meist liegt die Ursache 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  $\beta$ -Fettsäureoxidation 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 sehrlangkettige und verzweigte Fettsäuren wurde in einen In-vitro-Fluoreszenzassay überprüft. Dieser Assay basierte auf einem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zwischen dem Tryptophanrest des nsL-TPs und anthroyl- oder 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 reinen spektroskopischen Versuchen sind diese Veränderungen eindeutig zu messen, weil die gesamte spektrale Information vorliegt.

Die Messungen wurden entweder mit direkt fluoreszenzmarkierten Fettsäuren oder durch Konkurrenz 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 Gradientenzentrifugation 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 Artefakt-unabhängigkeit genutzt.

Nach Erlangen des Dokortitels 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 Abwesenheit 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