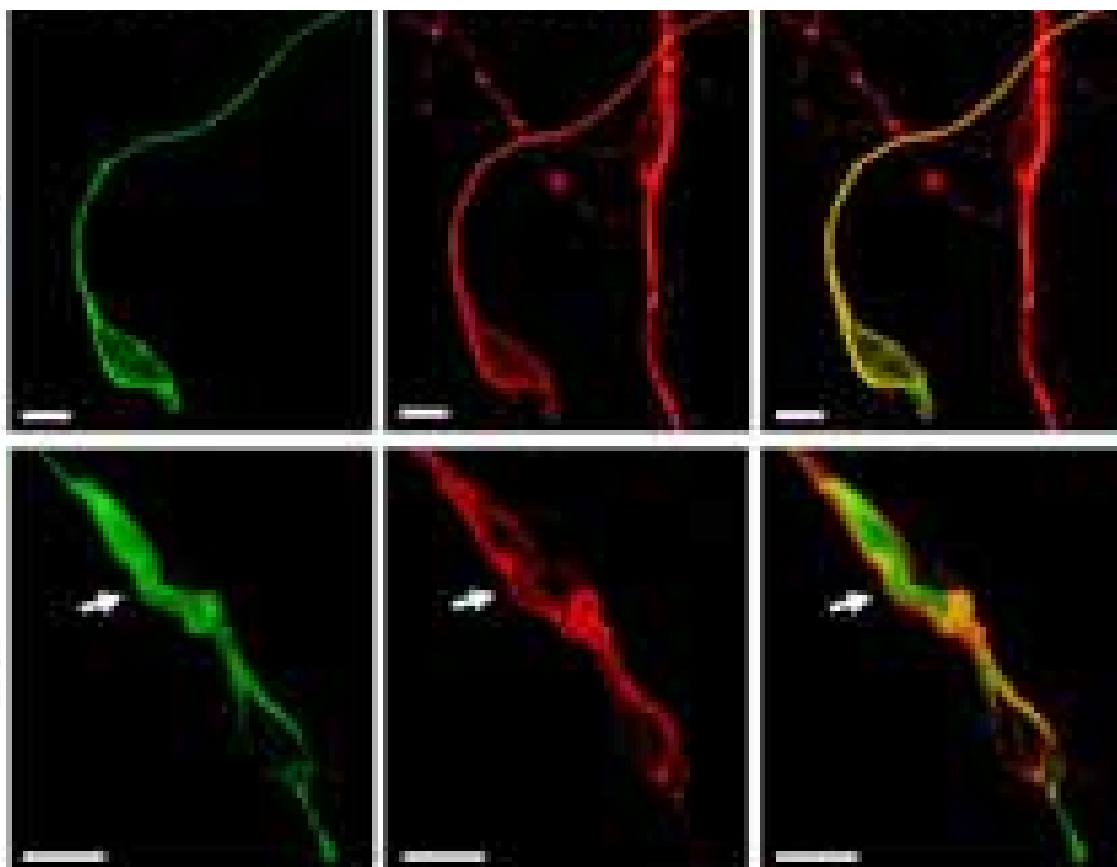


Fred S. Wouters

---

**Molekularphysiologische Untersuchungen  
zellulärer biochemischer Prozesse**

---



Cuvillier Verlag Göttingen

Aus der Arbeitsgruppe zelluläre Biophysik  
European Neuroscience Institute  
Im Fachbereich Physiologie der Universität Göttingen

---

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 <http://dnb.ddb.de> 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](http://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.....	7
Anwendung physiologischer Messmethoden	8
Von der Biochemie zur Physiologie.....	9
Optische Vermessung zellulärer Signaltransduktion .....	14
Fluoreszenz Lebensdauer Imaging Mikroskopie (FLIM) .....	15
Membrangebundene Amplifikation der EGF-Signalisierung.....	17
Apoptotische Signalisierung: Caspase-Aktivierung.....	19
Zelluläre Form- und Funktionsänderungen .....	20
Neuritenwachstum während neuronaler Differenzierung .....	22
Aktinumwandlungsprozesse durch Lipidflottensignalisierung .....	26
Messung der durch Zellmotilität vermittelten Kraft.....	31
Zelltod und Zytoskelett .....	34
Meningitis und Zytoskelett.....	36
Neurodegeneration in Tauopathien.....	39
Proteinfaltung .....	45
Ubiquitin-Proteasom medierter Proteinabbau .....	49
Qualitätskontrollmechanismen bei Proteinaggregaten .....	52
Mikroskopische Technologieentwicklung.....	54
Biotechnologische Verbesserung intramolekularer FRET-Biosensoren	54
Verbesserung von FRET/FLIM Analysen	58
Instrumentationsentwicklungen; Automatisierung und Vereinfachung	59
Zusammenfassung .....	65
Literaturverzeichnis .....	69
Danksagung .....	77



## 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:	Epidermal 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:	Glycosylphosphatidylinositol
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, 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 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 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