

AiF-Vorhaben-Nr:	
AiF-Antrags-Nr.:	/
Blatt-Nr./BA-Nr.:	/

(wird von der AiF eingesetzt)

Projekt: OPTIMA

Inhaltlicher Abschlussbericht für beide Projektpartner

Projektlaufzeit: 1. 08. 2008 – 31. 07. 2010

Das IGF-Vorhaben OPTIMA, mit der Nr. 15727 N/1 der Forschungsvereinigung F.O.M. wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

1. Forschungsthema

Optische Methoden zum *in vivo* Monitoring von Protein-Interaktionen am Beispiel der Alzheimer Demenz (OPTIMA)

2. Ziel des Projektes

Im Rahmen des Verbundprojektes, welches vom ILM und der Abteilung Neurologie der Universität Ulm gemeinsam durchgeführt wurde, sollte ein neues optisches Verfahren zum *in vivo* FLIM („fluorescence lifetime imaging“) mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung entwickelt werden. Die Untersuchungen sollten auf der sogenannten FLIM/FRET – Methode basieren, bei der die Interaktion zwischen zwei Proteinen über den resonanten Energietransfer (FRET) eines Donormoleküls auf ein Akzeptormolekül, üblicherweise über die Fluoreszenzabklingzeit des Donor-Proteins, beobachtet wird. Die Fluoreszenzabklingzeit sollte in der Zeitdomäne über TCSPC („time-correlated-single-photon-counting“) gemessen werden. Zur Evaluation der Methode sollten Proteinwechselwirkungen, die im Rahmen der Alzheimer Demenz (AD) von Bedeutung sind, mit zellulärer Auflösung beobachtet und analysiert werden.

Als verbesserte Kontrastmethode sollte insbesondere die spektral auflösende FLIM-Technik (SLIM) für *in vivo* Anwendungen optimiert und die Datenerfassung und Datenauswertung beschleunigt und vereinfacht werden. Daher sollte eine schnelle SLIM-Detektion an einem Multiphotonen-Mikroskop realisiert werden. Da durch diese Technik die Abklingzeiten sowohl von Donor, als auch Akzeptor gleichzeitig erfasst werden können, sollte ein neuer Algorithmus entwickelt und implementiert werden, um eine verbesserte FRET-Analyse zu ermöglichen.

3. Arbeitsprogramm

Folgende Arbeitspakete sollten abgearbeitet werden:

- a) Aufbau eines schnellen FLIM/SLIM Systems für *in vivo* Messungen im CAM Modell
- b) Implementierung neuer Auswertalgorithmen für SLIM

- c) Optimierung der idealen „living-color“ Farbkombinationen
- d) Validierung der Methode in neuronalen Zelllinien und primären neuronalen Zellkulturen

4. Ergebnisse

- a) Aufbau eines schnellen FLIM/SLIM Systems für in vivo Messungen im CAM Modell

Die Chorioallantoismembran (CAM) befruchteter Hühnereier ist ein ideales Substrat für Zellen und menschliches Biopsiematerial. Durch Aussähen von Zellen auf die CAM am 8.ten Tag nach Befruchtung oder Aufbringen von Biopsien ist es möglich, ein komplexes in vivo Modell für mikroskopische Arbeiten zur Verfügung zu stellen. Allerdings erfordern die Aufnahmen am CAM Modell eine sogenannte aufrechte mikroskopische Anordnung. Daher musste zunächst das vorhandene inverse Laser Scanning Mikroskop um eine zusätzliche aufrechte Version erweitert werden. Die dazu notwendige Konstruktion eines Spiegelgelenkarmes erfolgte in den eigenen Werkstätten am ILM. Die Variation des Strahlengangs machte es so möglich, frei im Raum zu mikroskopieren. Als einfache Variante wurde eine zweimalige Umlenkung um 90° Grad vorgenommen. In Abbildung 1 ist das Laser Scanning Mikroskop mit dem neuen Spiegelgelenkarm in der Funktion eines aufrechten in vivo Mikroskops zu sehen. Ein geöffnetes befruchtetes Hühnerei konnte damit, wie in Abbildung 1 dargestellt, problemlos gescannt werden.



Abbildung 1: LSM 410 mit neukonstruiertem Spiegelgelenkarm für in vivo FLIM/SLIM am CAM Modell

- b) Implementierung neuer Auswertealgorithmen für SLIM (globale Analyse)

Bei der FLIM-FRET Methode wird die Interaktion zwischen zwei Fluorophoren über den resonanten Energietransfer eines Donormoleküls auf ein Akzeptormolekül, üblicherweise über die Fluoreszenzabklingzeit des Donors, beobachtet. Findet FRET statt, wird die Fluoreszenzabklingzeit (τ) des Donors kürzer, da die Rate für den Energietransfer, wie in Gleichung (1) zu sehen, berücksichtigt werden muss.

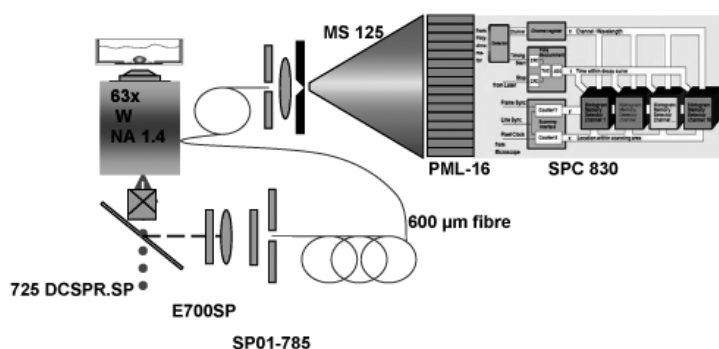
$$\tau = 1 / (k_{FI} + k_{ISC} + k_{ET} + k_{IC}) \quad (1)$$

Die FRET Effizienz (E_{FRET}) wird dann nach Gleichung (2) berechnet. τ_{ET} ist dabei die Abklingzeit des wechselwirkenden Donors, wenn FRET stattfindet, τ_0 die Abklingzeit des ungestörten Donors:

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{ET}}{\tau_0} \quad (2)$$

Die nach Gleichung (2) berechnete FRET Effizienz berücksichtigt nur das Verhalten des Donors, nicht aber das des Akzeptors. Im Rahmen dieses Projektes wurden jedoch Daten aus 16 spektral unterschiedlichen Kanälen gewonnen (siehe Definition: SLIM). Daher sollte durch eine globale Analyse das Datensystem simultan gefittet werden und die darüber gewonnene FRET Effizienz mit derjenigen aus Gleichung (2) verglichen werden. Das Ziel war eine verbesserte FRET Berechnung mit Hilfe der globalen Analyse.

Um spektral und zeitaufgelöste Daten aufzunehmen, wurde an das LSM 410 (siehe Abbildung 1) in sogenannter „descanned“ Anordnung ein Detektionsmodul, bestehend aus einem



Spektrometer (MS 126) und einem 16-Kanal Multianoden Array (PML-16) sowie TCSPC Karte SPC 830, über eine 600 µm Faser, angekoppelt (siehe Abbildung 2). Die Fluoreszenzanregung erfolgte mit einem femtosekunden gepulsten Ti:Sa Laser durch 2-Photonenanregung bei 800 nm. Spektral und zeitaufgelöste

Abbildung 2: Schematischer Aufbau der SLIM Apparatur

Fluoreszenzdaten können mit dieser Anordnung simultan in

16 Frequenzkanälen aufgenommen werden. Zur Auswertung des 16-Kanal Systems wurde ein neuer Algorithmus entwickelt. Dieser wurde mit der sogenannten „Phasor“ Methode von Enrico Gratton (University of California, Irvine, USA) verglichen.

Entwicklung eines Algorithmus zur Berechnung der Wechselwirkung zwischen Donor und Akzeptor für den 16-Kanal Detektor:

Zur Vereinfachung wurde zunächst angenommen, dass alle Donormoleküle mit Akzeptormolekülen wechselwirken. Die Kinetik des angeregten Donors D^* wird dann durch folgende Gleichung beschrieben, die zu einem **monoexponentiellen** Verhalten führt:

$$\frac{d(D^*)}{dt} = -(K_f^D + K_{rl}^D + K_{et}^D)[D^*(t)] \quad \text{Donor mit FRET} \quad (3)$$

kD_f , kD_{rl} , kD_{ET} sind die Raten für den Fluoreszenzübergang, strahlungslosen Übergang sowie Energietransfer des Donors. Die Kinetik des angeregten Akzeptors A^* folgt folgender Gleichung:

$$\frac{d(A^*)}{dt} = K^{D_{et}}[D^*(t)] - (K^{A_f} + K^{A_{rl}})[A^*(t)] \quad \text{Akzeptor} \quad (4)$$

kA_f und kA_{rl} sind die Raten für den Fluoreszenzübergang des Akzeptors sowie strahlungslosen Übergang. Die Kinetik des Akzeptors wird aufgrund des Energietransfers zunächst durch einen Intensitätsanstieg beschrieben, gefolgt von einem exponentiellen Abfall. Die Integration von Gleichung (3) und (4) ergibt:

$$D^*(t) = D_0 \cdot e^{-(K^{D_f} + K^{D_{rl}} + K^{D_{et}}) \cdot t} \quad (5)$$

$$A^*(t) = \frac{K^{D_{et}} \cdot D_0 \cdot (e^{-(K^{A_f} + K^{A_{rl}}) \cdot t} - e^{-(K^{D_f} + K^{D_{rl}} + K^{D_{et}}) \cdot t})}{(K^{D_f} + K^{D_{rl}} + K^{D_{et}}) - (K^{A_f} + K^{A_{rl}})} \quad (6)$$

D_0 ist die Konzentration des angeregten Donors zum Zeitpunkt $t = 0$, unmittelbar nach Anregung. Wird, wie in unserem Falle, die Fluoreszenzintensität mit einem 16-Kanal Multianodenarray, also spektral und zeitaufgelöst detektiert, so kann diese in jedem Frequenzkanal aus der Intensität des Donors und Akzeptors berechnet werden. Dies ist in Gleichung (7) demonstriert. Das Verhältnis aus Donor und Akzeptor wird durch die Amplituden $B^D(\lambda)$ und $B^A(\lambda)$ bestimmt. Diese Proportionalitätskonstanten beinhalten die von der Wellenlänge abhängige Systemantwort, die Quanteneffizienz der Fluorophore sowie die Leistungsdichte der Anregungsquelle. Aus den Gleichungen (5), (6) und (7) erhält man, bei Berücksichtigung von 16 Frequenzkanälen ein Gleichungssystem aus 16 Gleichungen. Damit können die Ratenkonstanten gefittet werden.

$$I(t, \lambda) = B^D(\lambda) \cdot D^*(t) + B^A(\lambda) \cdot A^*(t) \quad (7)$$

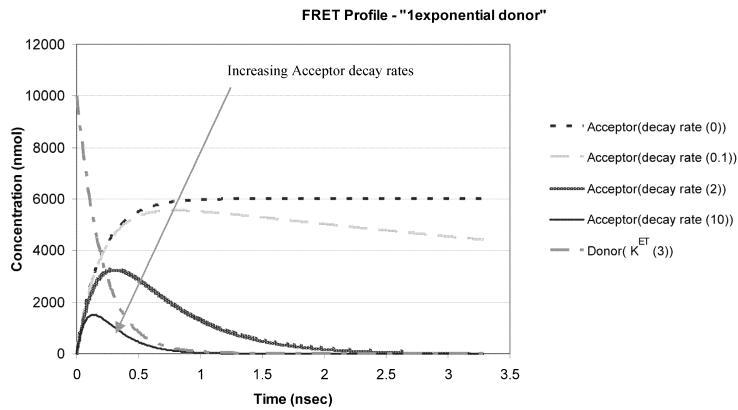


Abbildung 3: Simulation der Fluoreszenzkinetik von Donor und Akzeptor bei Variation der Akzeptorraten und monoexponentiellem Verhalten des Donors.

Setzt man (5) und (6) in (7) ein, erhält man in Gleichung (8) die Fluoreszenzintensität von Donor plus Akzeptor in Abhängigkeit der Wellenlänge λ . In Abbildung 3 ist diese Gleichung für den reinen Donorkanal und reinen Akzeptorkanal durch Simulation der Fluoreszenzkinetik von Donor- und Akzeptorintensität für folgende angenommene Parameter verifiziert: $K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D = 5$; $K_{ET}^D = 3$; $D_0 = 10000$, and $K_f^A + K_{rl}^A = 0, 0.1, 2$ and 10 .

Wie zu erkennen, nimmt die Fluoreszenzintensität des Akzeptors aufgrund des Energietransfers zunächst zu, um dann entsprechend den Eigenschaften des Akzeptors abzuklingen.

$$I(t, \lambda) = B^D(\lambda) \cdot D_0 \cdot e^{-(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D)t} + B^A(\lambda) \cdot \frac{K_{ET}^D \cdot D_0 \cdot (e^{-(K_f^A + K_{rl}^A)t} - e^{-(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D)t})}{(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D) - (K_f^A + K_{rl}^A)} \quad (8)$$

Ein monoexponentieller Donor, wie in Gleichung (3) angenommen, ist eine starke Vereinfachung. In der Realität werden nicht alle Donormoleküle wechselwirken, so dass mindestens von einem **biexponentiellen** Ansatz ausgegangen werden muss. Dies ist in Gleichung (9) demonstriert. K_2^D , die Konstante des Donors ohne FRET ist dabei die Summe aus $K_f^D + K_{rl}^D$.

$$\frac{d[D^*(t)]}{dt} = -(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D) \cdot [D^*(t)] - K_2^D \cdot [D^*(t)] \quad (9)$$

Die Integration des Donors ergibt:

$$D^*(t) = D_0 \cdot [C \cdot e^{-(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D)t} + (1 - C) \cdot e^{-K_2^D t}] \quad (10)$$

C ist der wechselwirkende Anteil der Donormoleküle. Wenn C null ist, verhält sich der Donor monoexponentiell mit der Konstante K_2^D , ebenso wenn C eins ist (alle Donormoleküle interagieren). Da nur der Anteil C der Donormoleküle zum Energieübertrag auf den Akzeptor fähig ist, ergibt sich für die Integration des Akzeptors:

$$A^*(t) = C \cdot K_{ET}^D \cdot D_0 \cdot \left[\frac{(e^{-(K_f^A + K_{rl}^A)t} - e^{-(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D)t})}{(K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D) - (K_f^A + K_{rl}^A)} \right] \quad (11)$$

Setzt man (10) und (11) in (7) ein, erhält man die Fluoreszenzintensität von Donor plus Akzeptor in Abhängigkeit der Wellenlänge λ , für biexponentielles Verhalten des Donors. In Abbildung 4 ist diese Gleichung für den reinen Donorkanal und reinen Akzeptorkanal durch Simulation der Fluoreszenzkinetik von Donor- und Akzeptorintensität für $C = 1/2$ für folgende angenommene Parameter verifiziert: $K_f^D + K_{rl}^D + K_{ET}^D = 5$; $K_{ET}^D = 3$; $K_f^D = 2$; $D_0 = 10000$; $K_f^A + K_{rl}^A = 0, 0.1, 2$ and 10 .

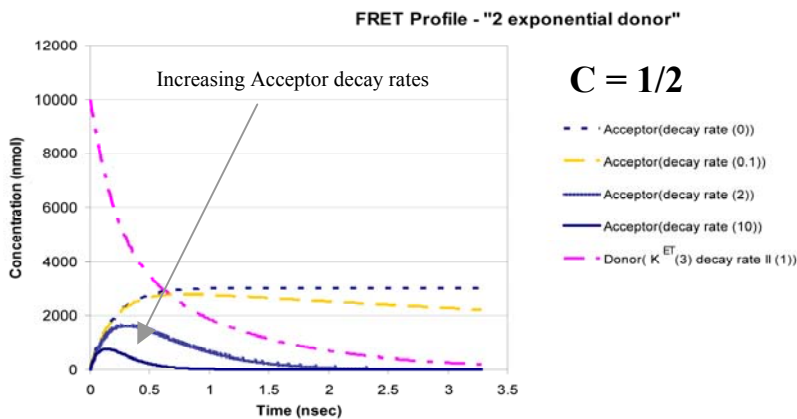


Abbildung 4: Simulation der Fluoreszenzkinetik von Donor und Akzeptor bei Variation der Akzeptorraten und biexponentiellem Verhalten des Donors.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, ist die Konzentration des angeregten Akzeptors aufgrund der Tatsache, dass nicht alle Donor Moleküle zum Energietransfer fähig sind, geringer als bei monoexponentiellem Verhalten des Donors.

Wie bereits erwähnt wird im Rahmen einer globalen Analyse Gleichung (7) für bis zu 16 spektrale Kanäle als Gleichungssystem simultan gefittet. Von der Wellenlänge abhängig sind dabei die Amplituden $B^D(\lambda)$ und $B^A(\lambda)$, während sämtliche Ratenkonstanten invariant sind. Damit sind auch die Fluoreszenzabklingzeiten von der Wellenlänge unabhängig. Im Rahmen der Arbeitspakete c) und d) wurden verschiedene Berechnungen angestellt und die FRET Ergebnisse verglichen (siehe Beschreibung zu c) und d)).

Die „Phasor“ Methode nach Enrico Gratton als alternative globale Analyse

Im Rahmen der „Phasor“ Methode, die von Enrico Gratton als globale Analyse von FLIM Daten entwickelt wurde, wird ein sogenannter FRET „Trajector“ oder eine FRET-Kurve konstruiert, mit welcher FRET aus multispektralen FLIM Daten ermittelt werden kann. Ursprünglich wurde die Methode für Daten, die in der „frequency domain“ gewonnen wurden,

angewandt, lässt sich aber problemlos auf die „time domain“, wie im Falle der TCSPC Technik, anwenden. Jede abklingende Komponente wird als Vektor im Einheitskreis mit Radius $\frac{1}{2}$ dargestellt. Endet der Vektor oder Phasor auf dem Einheitskreis, handelt es sich um ein monoexponentiell abklingendes Molekül, multiexponentiell abklingende Komponenten befinden sich innerhalb des Einheitskreises, da sie quasi Mischungen aus verschiedenen Abklingkomponenten darstellen. Verschiedene Mischungen derselben Abklingkomponenten liegen auf einer Linie. In jedem spektralen Kanal wird ein Ergebnis gemessen, das durch Gleichung (7) bestimmt ist und durch genau einen Phasor repräsentiert wird. Da jeder Kanal aus unterschiedlichen Mischungen von Donor und Akzeptor besteht, liegen die Phasor Endpunkte auf einer Linie. Der Phasor des reinen, ungestörten Donors hingegen liegt nicht auf dieser Linie. Je kürzer die Abklingzeit wird, um so kleiner wird der Winkel. Aus der Anordnung der „Phasors“ der multispektralen Messung, kann der FRET Trajektor konstruiert werden. Der Phasor des Akzeptors, der durch den Donor angeregt wird, liegt außerhalb des Einheitskreises. Die Phasor Methode hat den Vorteil, sehr schnell zu sein und keinen Fit zu benötigen.

c) Optimierung der idealen „living-color“ Farbkombinationen

Der GFP-mRFP - FRET Sensor und die globale Analyse

In Abbildung 5 sind Neuroblastomzellen dargestellt, die zum einen mit dem reinen Donor EGFP und dem reinen Akzeptor mRFP transfiziert sind, zum anderen mit einem FRET-Konstrukt, welches aus EGFP und mRFP besteht (EGFP-LYIPVAT-mRFP). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, verkürzt sich die Abklingzeit des Donors aufgrund von FRET im Mittel von 2.3 ns auf 2.0 ns, die Abklingzeit des Akzeptors verlängert sich von 1.7 ns auf 1.9 ns (im Mittel). Die angegebenen Abklingzeiten wurden nach biexponentieller Anpassung als τ_{mean} berechnet.

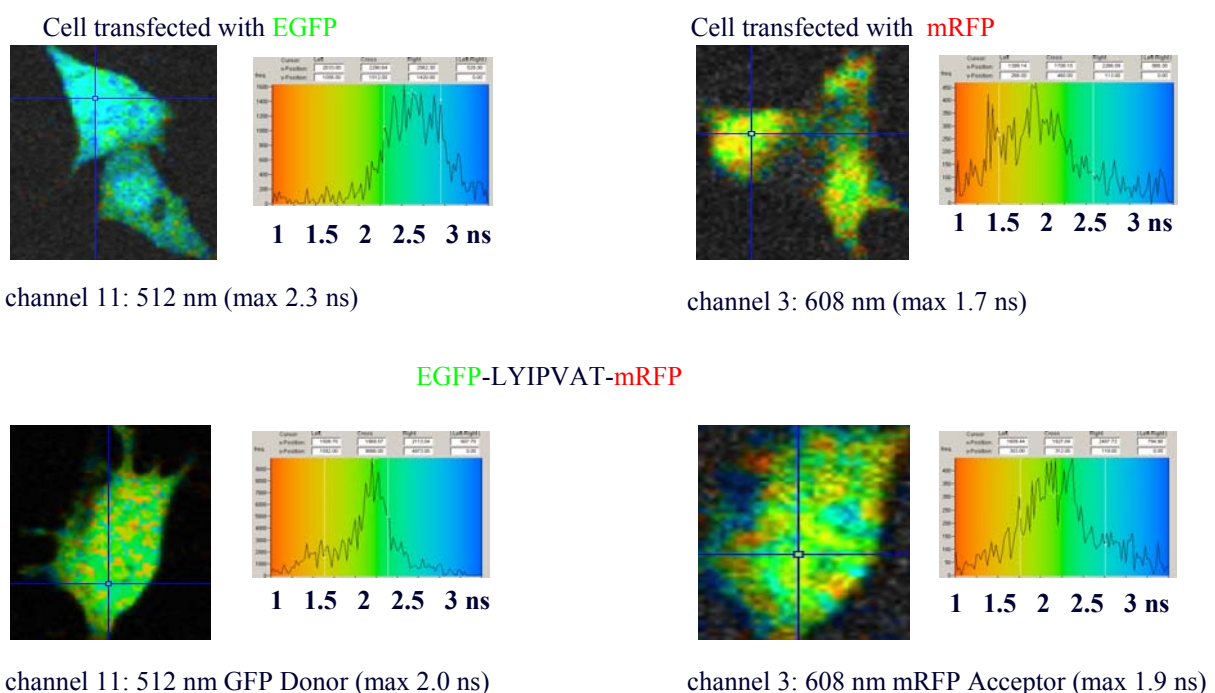


Abbildung 5: Obere Zeile: Neuroblastomzellen transfiziert mit EGFP (links, dargestellt ist der EGFP Kanal) und transfiziert mit mRFP (rechts, dargestellt ist der mRFP Kanal).
Untere Zeile: Zellen transfiziert mit EGFP-LYIPVAT-mRFP (links, EGFP Kanal, rechts mRFP Kanal)

Im ersten Schritt wurde die FRET Effizienz nur über die Abklingzeit des Donors nach Gleichung (2) berechnet. Berücksichtigt wurde ausschließlich das Messergebnis in Kanal 11, d.h. in einem spektralen Bereich von 512 ± 6 nm. Das exprimierte Protein ist so konstruiert, dass FRET sehr wahrscheinlich ist. Verschiedene Fits wurden durchgeführt, bis möglichst eine Gauss-Verteilung im FRET Histogramm erreicht wurde. Dies gelang besonders gut unter der Annahme, dass der ungestörte Donor im Mittel mit 2.8 ns (fixed τ_2 in Abbildung 6) abklingt und der Donor unter FRET biexponentielles Verhalten zeigt. Für FRET ergab sich die Verteilung in Abbildung 6 und eine mittlere FRET Effizienz von ungefähr 55% aus dem Fit nach Becker und Hickl.

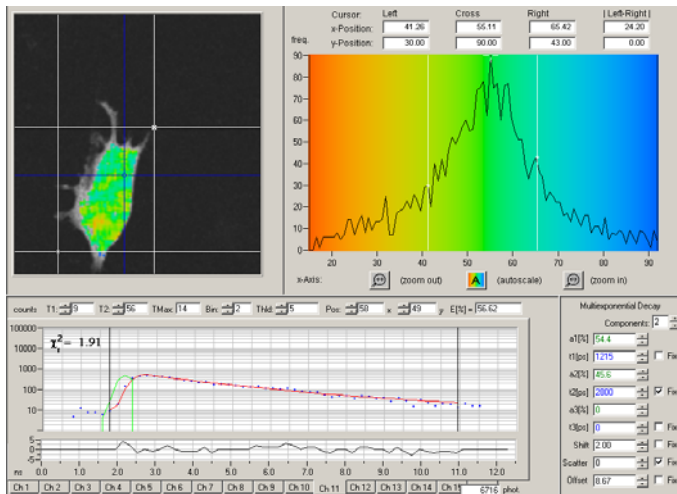


Abbildung 6: Histogramm und zelluläre Verteilung der FRET Effizienz einer EGFP-LYIPVAT-mRFP transfizierten Zelle

Zur Vereinfachung der Berechnung wurden $K_f^D + K_{rl}^D$ aus Zellen gewonnen, die nur mit EGFP transfiziert waren. Die Werte wurden im multispektralen Fit fixiert. FRET wurde für einen Bereich, bestehend aus 3×3 Pixeln, berechnet. Beim Fit des Gleichungssystems wurden außerdem die Amplituden $B(\lambda)$ für EGFP konstant gehalten. Diese wurden zuvor aus

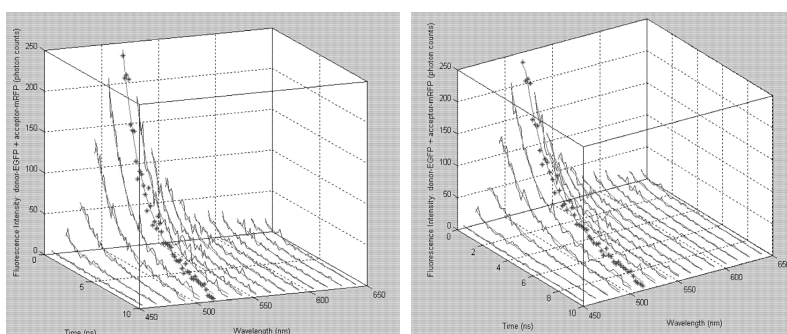


Abbildung 7: Simultaner Fit eines 3x3 Pixel Bereichs einer EGFP-LYIPVAT-mRFP transfizierten Zelle in 16 spektralen Kanälen (links monoexponentieller Donor, rechts biexponentieller Donor).

im Rahmen der Becker und Hickl Software errechnet wurde (siehe Abbildung 6). In Abbildung 7 ist das Ergebnis des globalen Fits graphisch dargestellt (links für monoexponentielles Verhalten des Donors, rechts für biexponentielles).

Als nächstes wurde das multispektrale Gleichungssystem global gefittet und die verschiedenen FRET Effizienzen verglichen. Zunächst wurde, wie in Gleichung (8) beschrieben, der Donor monoexponentiell betrachtet. Es wurden verschiedene Fits durchgeführt, die eine unterschiedliche Anzahl an Frequenzkanälen berücksichtigten.

Alle anderen Parameter waren variabel. In Tabelle 1 ist das Ergebnis des globalen Fits aus 16 Frequenzkanälen dargestellt. Für den Donor wurde biexponentielles Verhalten angenommen. Eine FRET Effizienz von 53,4 % und eine Abklingzeit von 1.2 ns für den wechselwirkenden Donor ist das Ergebnis. Dies entspricht sehr gut demjenigen, welches

Tabelle 1: Globaler Fit einer EGFP-mRFP transfizierten Zelle

Global fitting, 16 channels, using a donor-acceptor model, assuming a 2-exponential behaviour of the donor with free fitting acceptor amplitudes and decay rates and fixed donor amplitudes and decay rates				
Sample name	Channel (wavelength range)	Parameter name	Fitted Parameter value	Goodness of fit χ^2- statistic
donor- EGFP + acceptor- mRFP	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (650 – 450 nm)	D_0	123.6468	1.6971
		K_f^D	FIXED 0.16 (from Table 1a)	
		K_{rl}^D	FIXED 0.25 (from Table 1a)	
		K_2^D	0.3139	
		K_{ET}^D	0.4164	
		K_f^A	2.0334	
		K_{rl}^A	2.0334	
		τ^{DA} donor lifetime with acceptor present	1.2 ns	
		FRET efficiency	53.4 % (if $\tau^D \sim 2.6$ ns)	

Alternativ zum Fit des multidimensionalen Gleichungssystems wurde der „FRET Trajektor“ nach der „Phasor“ Methode konstruiert. In Abbildung 8 ist dies für die Zelle, die mit EGFP transfiziert ist und die Zelle, die mit dem Konstrukt EGFP-LYIPVAT-mRFP (in Abbildung 8

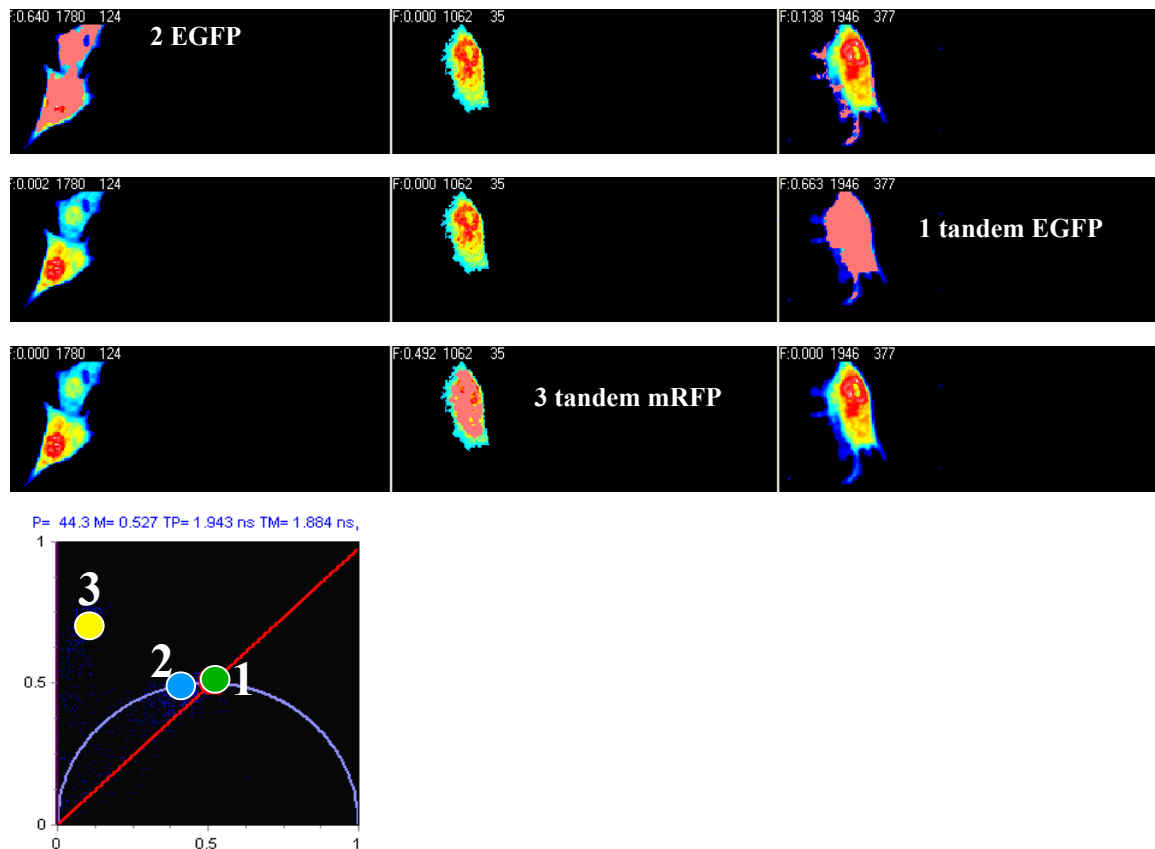


Abbildung 8: „Phasor“ des ungestörten EGFP (2), des wechselwirkenden EGFP (1) und des Akzeptors mRFP (3).

als tandem EGFP, bzw. tandem mRFP bezeichnet) transfiziert ist, demonstriert. In der ersten Zeile in Abbildung 8 sind alle Pixel, die mit Phasor 2 (siehe Halbkreis in Abbildung 8 unten) korrelieren, pink eingefärbt. Phasor 2 stimmt damit im wesentlichen mit dem ungestörten, nicht wechselwirkenden EGFP überein. In der zweiten Zeile ist Phasor 1, der dem wechselwirkenden EGFP entspricht, in pink betont, in der dritten Zeile Phasor 3 des Akzeptors mRFP. Wie zu erkennen, liegt der Akzeptor außerhalb des Einheitskreises.

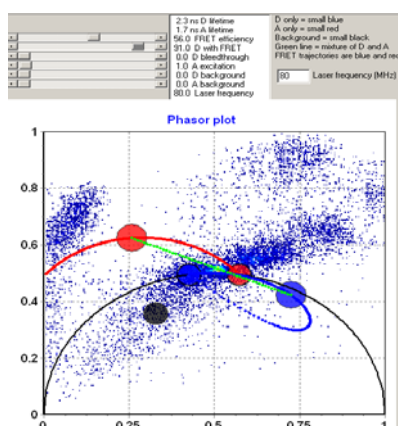


Abbildung 9: Konstruktion des FRET Trajektors.

Kennt man die Endpunkte der „Phasors“ in allen spektralen Kanälen, lässt sich daraus der „FRET Trajektor“, und damit FRET im multispektralen System bestimmen. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt. Wie erwähnt, liegen die Phasor Endpunkte der Kanäle mit unterschiedlichen Donor/Akzeptor Mischungen alle auf einer Linie. Der Phasor des reinen, ungestörten Donors hingegen liegt nicht auf dieser Linie. Nimmt man an, dass 91 % aller

Konstrukte in der Lage sind einen FRET Effekt zu zeigen, errechnet sich eine mittlere FRET Effizienz von 56 %. Artefakte werden herausgemittelt oder sind nicht mehr relevant. Dieser Wert entspricht demjenigen, den wir sowohl im Rahmen des Becker und Hickl Fits, als auch des globalen Fits ermittelt haben. Eine globale Analyse unter Berücksichtigung der spektralen und zeitlichen Eigenschaften der Fluorophore führt damit zu einem FRET Ergebnis, welches mit den anderen Berechnungen vergleichbar ist.

Alternativ zu mRFP wurde ein weiteres rot fluoreszierendes Protein, als potentieller Akzeptor für EGFP untersucht. Die Fluoreszenz dieses neuen und als mKate bezeichneten Proteins ist im Vergleich zu mRFP rot verschoben (Fluoreszenzmaximum 635 nm, anstelle 605 nm). Zellen wurden mit einem Tandem, bestehend aus EGFP und mKate transfiziert und die Fluoreszenzabklingzeit des Donors bestimmt. Die Abklingzeit von EGFP war deutlich zu 1.7 ns verkürzt, EGFP-mKATE ist damit als FRET Paar im Rahmen von FLIM Messungen verwendbar. Das Ergebnis für die FRET Effizienz ist in Abbildung 10 dargestellt.

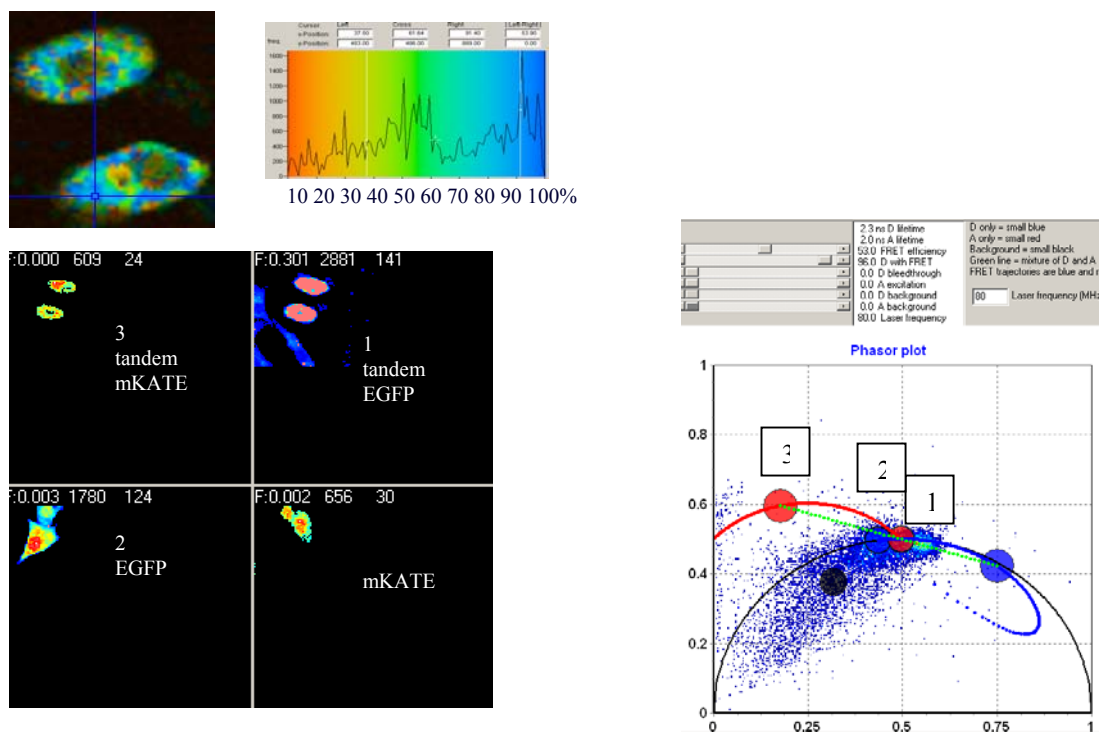


Abbildung 10:
obere Zeile: Histogramm und zelluläre Verteilung der FRET Effizienz einer EGFP-mKATE transfizierten Zelle
untere Zeile: „Phasor“ des ungestörten EGFP (2), des wechselwirkenden EGFP (1) und des Akzeptors mKATE (3), sowie die Konstruktion des FRET Trajektors (rechts).

Wird nur die Abklingzeit des Donors für die Berechnung der FRET Effizienz verwendet, ergibt sich die Situation in Abbildung 10 oben. Neben einer sehr hohen FRET Effizienz von über 90%, was wahrscheinlich ein Artefakt ist, findet man bei rund 50% ein Maximum. Allerdings ist die FRET Effizienz inhomogen verteilt. Eine globale Analyse nach der „Phasor“ Methode führt zu einem genaueren Ergebnis. In Abbildung 10 unten ist der FRET Trajektor im Phasendiagramm konstruiert. Daraus ergibt sich eine mittlere FRET Effizienz von 53%, unter der Annahme, dass 96% der Konstrukte in der Lage sind, eine Wechselwirkung einzugehen. Insgesamt scheint sich das Paar EGFP-mKATE besser für FRET Beobachtungen zu eignen als

EGFP-mRFP. Dennoch wurden die nachfolgenden Messungen für Alzheimer relevante Proteine mit mRFP als Akzeptor durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt mehr Erfahrungen mit mRFP vorlagen.

d) Validierung der Methode in neuronalen Zelllinien und primären neuronalen Zellkulturen für Alzheimer relevante Proteine

Vor der Validierung in primären neuronalen Zellkulturen wurde die Methode für Alzheimer relevante Proteine in U373 Glioblastomzellen etabliert. Im Rahmen dieses Projektes interessierte insbesondere, ob eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinen BASE und GGA durch SLIM in lebenden Zellen nachgewiesen werden kann. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die Sekretase BASE zusammen mit dem Amyloid-Vorläuferprotein APP unter Mitwirkung der im Golgi lokalisierten Proteine GGA in den Trans-Golgi transportiert und

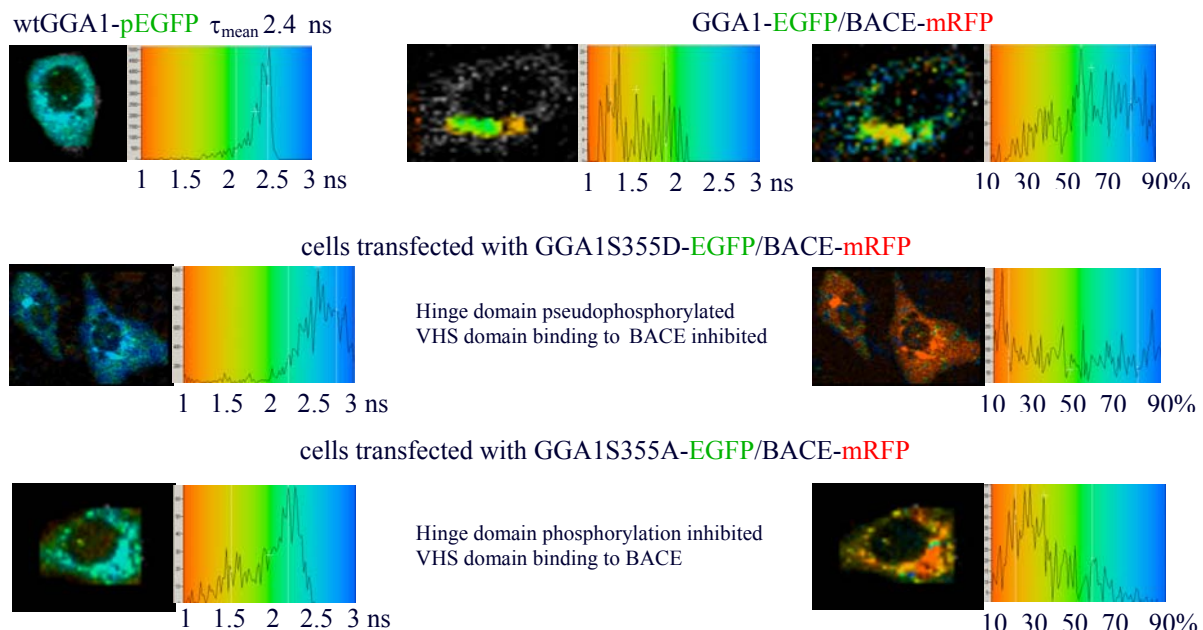


Abbildung 11: Obere Zeile: Glioblastomzellen transfiziert mit wtGGA1-EGFP (links, dargestellt ist der EGFP Kanal) und transfiziert mit GGA1-EGFP/ BACE-mRFP (rechts, dargestellt ist der EGFP Kanal).

mittlere Zeile: Zellen transfiziert mit GGA1S355D-EGFP/ BACE-mRFP (links: Abklingzeit, rechts: FRET)

untere Zeile: Zellen transfiziert mit GGA1S355A-EGFP/ BACE-mRFP (links: Abklingzeit, rechts: FRET)

anschließend zu A β prozessiert wird. In Abbildung 11 sind Zellen dargestellt, die mit GGA1-EGFP transfiziert, mit GGA1-EGFP/BASE-mRFP cotransfiziert, sowie den GGA1-Mutanten S355D und S355A und BASE-mRFP ebenfalls cotransfiziert sind. Wie zu erkennen, wird die Abklingzeit durch die Wechselwirkung zwischen GGA1 und BASE signifikant verkürzt, was zu einer FRET Effizienz, teilweise um 60% führt. Berücksichtigt man nur die Abklingzeit des Donors, so scheint es für die Mutante S355D zu keiner Wechselwirkung zu kommen, wohl aber für die Mutante S355A.

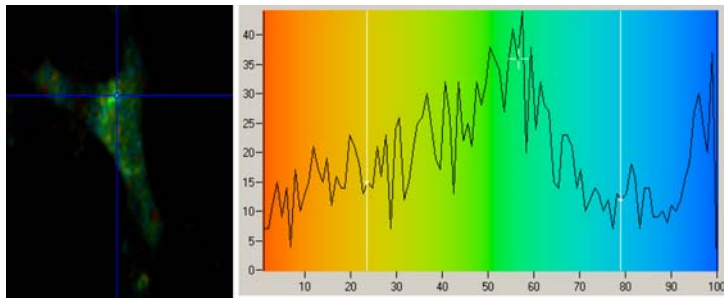


Abbildung 12: Histogramm und zelluläre Verteilung der FRET Effizienz einer GGA1-EGFP/BACE-mRFP transfizierten Zelle

Im späteren Verlauf des Projektes wurden alternativ zu den Glioblastomzellen die neuronalen Neuroblastomzellen (N2A) mit Alzheimer relevanten Proteinen transfiziert und die globale Analyse an medizinisch interessanten Zellmodellen getestet. In Abbildung 12 ist das Histogramm der FRET Effizienz einer GGA1-EGFP/BACE-mRFP cotransfizierten Zelle dargestellt. Die FRET Effizienz wurde hier nach Becker und Hickl nur über die Berücksichtigung der Abklingzeit des Donors im Kanal 11 berechnet.

Ein biexponentieller Fit wurde durchgeführt und die Donorabklingzeit in Abwesenheit des Akzeptors bei 2.7 ns fixiert. Es sind Bereiche in der Zelle mit einer signifikanten FRET Effizienz von rund 56% zu erkennen. Das Ergebnis des globalen Fits aus 16 Kanälen bei biexponentiellem Verhalten des Donors ist Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Globaler Fit einer GGA1-EGFP/BACE-mRFP transfizierten Zelle

Global fitting, 16 channels, using a donor-acceptor model, assuming a 2-exponential behaviour of the donor with fixed donor amplitudes and decay rates and free fitting acceptor amplitudes and decay rates.				
Sample name	Channel (wavelength range)	Parameter name	Fitted Parameter value	Goodness of fit χ^2- statistic
donor-GGA1-EGFP + acceptor-BACE-mRFP	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 (650 – 450 nm)	D_0	40.8589	1.6488
		K_f^D	FIXED 0.15 (from Table 6a)	
		K_{rl}^D	FIXED 0.22 (from Table 6a)	
		K_{ET}^D	0.2500	
		K_f^A	0.1251	
		K_{rl}^A	0.1167	
		τ^{DA} donor lifetime with acceptor	1.6 ns	
		FRET efficiency	38 % (if $\tau^D \sim 2.66$ ns)	

Wie zu erkennen ist die FRET Effizienz bei globalem Fit kleiner (38% gegenüber rund 56%). Möglicherweise wird die FRET Effizienz durch den Donor allein nicht korrekt berechnet, d.h. die Situation ist zu komplex, um auf die übrigen Kanäle zu verzichten.

In Abbildung 13 wurde die „Phasor“ Methode als Alternative angewandt. Bereiche, die dem „Phasor“ für EGFP entsprechen, sind in pink hervorgehoben. Wie zu erkennen, kommt es nur für das Konstrukt EGFP-mRFP zu einer signifikanten Verkürzung der Abklingzeit in der gesamten Zelle. Bei GGA1-EGFP/BASE-mRFP cotransfizierten Zellen (mittlere Zeile rechts) kommt es zu keiner sichtbaren Veränderung der Abklingzeit, auch nicht für die S355a und S355d Mutanten (untere Zeile), im Gegensatz zu den in Abbildung 11 präsentierten Glioblastomzellen. Möglicherweise sind die wechselwirkenden Bereiche so klein, dass sie mit der Phasor Methode nicht dargestellt werden können. Hier scheint der globale Fit aus 16 Kanälen überlegen zu sein. Für einzelne Bereiche konnte eine FRET Effizienz berechnet werden (siehe Tabelle 2).

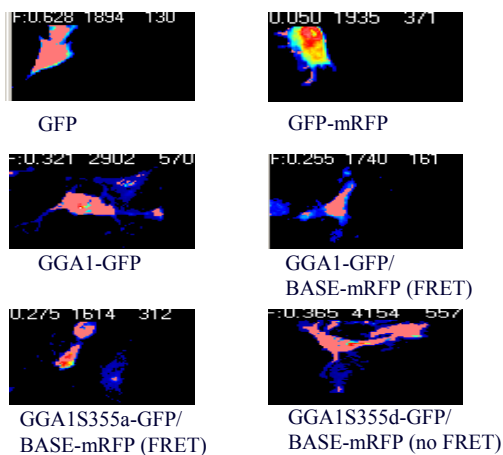


Abbildung 13: „Phasor“ des ungestörten EGFP (pink) und des wechselwirkenden EGFP (rechts, oben) in N2A Zellen, transfiziert mit unterschiedlichen Proteinen.

Die Etablierung primärer neuronaler Zellen erwies sich als sehr schwierig. Nur in fixierten Zellen konnten Ergebnisse erzielt werden. Globale Analysen lebender Zellen können leider nicht präsentiert werden.

5. Umsetzung des Arbeitsprogramms

Die Arbeiten und Ziele sind formal im Plan. Globale Analysen lebender primärer neuronaler Zellen konnten allerdings wegen der schwierigen Gewinnung und Kultivierung der Zellen nicht präsentiert werden. Die Verteilung der Arbeiten auf das wissenschaftliche und technische Personal entsprechen den Vertragsvorgaben. Eine Mittelumwidmung von Investitionsmitteln in Personalmittel wurde 2009 beantragt und genehmigt.

6. Besprechungen

Es fand ein großes Meeting mit dem gesamten projektbegleitenden Ausschuss am 1.12.2008 statt. Alle anderen Treffen waren bi- oder trilateraler Art. In 2009 fand ein Treffen mit der Firma JenLab am 17.12.2009 am ILM statt. Außerdem gab es 2009 mehrere Meetings mit der Firma Becker & Hickl (insgesamt 4) und der Firma Fluoron (insgesamt 2). 2010 gab es zwei weitere Treffen mit Becker & Hickl. Ein intensiver telefonischer Austausch bestand mit der Firma OptiSoft bezüglich einer nutzerfreundlichen Oberfläche der globalen Analyse des 16 Kanaldetektors. Mit Fluoron wurde vereinbart, dass ein Modell zur altersbedingten Makuladegeneration (AMD), basierend auf dem CAM Modell und RPE (retinales Pigmentepithel) Zellen in Zukunft am ILM untersucht werden soll.

7. Publikationen

Ergebnisse des Projektes wurden auf der Photonics West im Januar 2009 und 2010 in San Jose, bzw. San Francisco präsentiert. In diesem Zusammenhang wurden Proceedingartikel angefertigt, z.B.:

A. Rueck, F. Dolp, B. v. Einem, C. A. F. v. Arnim, and D. Strat, “Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging: New developments and applications”, SPIE Proceedings Photonics West 2010, 7569-30

Eine wichtige Publikation in einem international renommierten Journal wird im Februar 2011 publiziert:

D. Strat, F. Dolp, B. von Einem, C. Steinmetz, C.A.F. von Arnim and A. Rueck „Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging microscopy (SLIM): FRET Global Analysis with a one- and two-exponential donor model”, JBO (2011), in press

8. Unterschrift des Projektleiters

Dr. Angelika Rück