



**HAL**  
open science

## **A Versatile Synthetic Affinity Probe Reveals Inhibitory Synapse Ultrastructure and Brain Connectivity\*\***

Vladimir Khayenko, Clemens Schulte, Sara L Reis, Orly Avraham, Cataldo Schietroma, Rafael Worschech, Noah F Nordblom, Sonja Kachler, Carmen Villmann, Katrin G Heinze, et al.

► **To cite this version:**

Vladimir Khayenko, Clemens Schulte, Sara L Reis, Orly Avraham, Cataldo Schietroma, et al.. A Versatile Synthetic Affinity Probe Reveals Inhibitory Synapse Ultrastructure and Brain Connectivity\*\*. *Angewandte Chemie*, 2022, 134 (30), 10.1002/ange.202202078 . hal-04252753

**HAL Id: hal-04252753**

**<https://hal.science/hal-04252753>**

Submitted on 21 Oct 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Fluoreszenzsonden Hot Paper

Zitierweise:

Internationale Ausgabe: doi.org/10.1002/anie.202202078

Deutsche Ausgabe: doi.org/10.1002/ange.202202078

# Eine vielseitige synthetische Affinitätssonde zur hochaufgelösten Visualisierung hemmender Synapsen und neuronaler Netzwerke\*\*

Vladimir Khayenko, Clemens Schulte<sup>+</sup>, Sara L. Reis<sup>+</sup>, Orly Avraham, Cataldo Schietroma, Rafael Worschech, Noah F. Nordblom, Sonja Kachler, Carmen Villmann, Katrin G. Heinze, Andreas Schlosser, Ora Schueler-Furman, Philip Tovote, Christian G. Specht,\* und Hans M. Maric\*

Den Menschen in der Ukraine gewidmet.

**Abstract:** Die Visualisierung von inhibitorischen Synapsen erfordert auf Sondentypen und das jeweilige bildgebende Verfahren abgestimmte Protokolle und beruht in der Regel auf genetischer Manipulation oder der Verwendung von Antikörpern, die bei Gewebefärbungen unter ihrer geringen Eindringtiefe leiden. Abgestimmt auf das Gephyrin Protein, einem universellen Marker der inhibitorischen Synapse, haben wir eine kompakte, hochaffine und hochselektive peptid-basierte Sonde entwickelt. Durch Anpassung der multivalenten Architektur und des Farbstoffs haben wir "Sylites" erhalten; eine Sonde die Färbungen mit hervorragendem Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ermöglicht, und die Antikörper bei der Anwendung im Gewebe aufgrund von schneller und effizienter Penetration, Minderung von Färbefaktoren und vereinfachter Handhabung deutlich übertrifft. In hochauflösenden Mikroskopieverfahren lokalisiert Sylite präzise die hemmende Synapse und ermöglicht so Messungen im Nanometermaßstab. Darüber hinaus zeigen wir, dass Sylite mit viralen Färbemethoden kombinierbar ist und dass auf diese Weise nicht nur die synaptische Konnektivität, sondern auch die Identität und Größe der hemmenden Postsynapsen aufgelöst werden kann.

## Einleitung

Sonden, die zuverlässig Synapsen sichtbar machen, sind wertvolle neurowissenschaftliche Werkzeuge.<sup>[1]</sup> Hemmende Synapsen im zentralen Nervensystem (ZNS) sind entweder glycinerg oder GABAerg und werden üblicherweise mit mehreren Markerproteinen wie dem vesikulären GABA-Transporter<sup>[2,3]</sup> der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (GABA<sub>A</sub>R)  $\gamma$ 2-Untereinheit<sup>[4,5]</sup> für GABAerge Synapsen, oder der Glycinrezeptor (GlyR)  $\alpha$ 1-Untereinheit für glycinerge Synapsen,<sup>[6]</sup> identifiziert und sichtbar gemacht. Demgegenüber fungiert das postsynaptische Gerüstprotein Gephyrin als ein gemeinsamer pan-inhibitorischer Synapsenmarker, der sowohl an glycinergen als auch an GABAergen Synapsen vorhanden ist.<sup>[7]</sup> Gephyrin fungiert als Gerüstprotein für GlyRs und GABA<sub>A</sub>Rs an der postsynaptischen Dichte,<sup>[8,9]</sup> und seine Konzentration korreliert mit der Anzahl der inhibitorischen Rezeptoren und damit der synaptischen Transmissionsstärke.<sup>[2,10-12]</sup>

Gephyrin wird häufig durch genetisch kodierte Anhängsel (Tags) visualisiert. Insbesondere eGFP, mCherry, mEos2 aber auch andere fluoreszierende Proteine wurden mit Gephyrin fusioniert und durch Transfektion oder Infektion in Zellen exprimiert.<sup>[6,13,14]</sup> Solche fluoreszierenden Gephyrin-Chimären wurden erfolgreich für Studien an Synapsen

[\*] V. Khayenko, C. Schulte, R. Worschech, N. F. Nordblom, S. Kachler, Dr. K. G. Heinze, Dr. A. Schlosser, Dr. H. M. Maric Rudolf-Virchow-Zentrum; Center for Integrative and Translational Bioimaging; Universität Würzburg Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg (Deutschland) E-mail: hans.maric@uni-wuerzburg.de

S. L. Reis, Dr. C. Villmann, Dr. P. Tovote Institut für klinische Neurobiologie, Universitätskrankenhaus Würzburg Versbacher Str. 5, 97078 Würzburg (Deutschland)

Dr. O. Avraham, Dr. O. Schueler-Furman Institut für Mikrobiologie und Molekulare Genetik, Institut für medizinische Forschung Israel-Canada, Hebräische Universität, Hadassah Medizinschule Jerusalem 91120 (Israel)

Dr. C. Schietroma Abbelight 191 Avenue Aristide Briand, 94230 Cachan (Frankreich)

Dr. P. Tovote Zentrum für Seelische Gesundheit, Universitätsklinikum Würzburg Margarete-Höppel-Platz 1, 97080 Würzburg (Deutschland)

Dr. C. G. Specht Erkrankungen und Hormone des Nervensystems, Inserm U1195, Université Paris-Saclay 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre (Frankreich) E-mail: christian.specht@inserm.fr

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] Eine frühere Version dieses Manuskripts ist auf einem Preprint-Server hinterlegt worden (<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.20.444651v2>).

© 2022 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

sowohl in fixierten als auch in lebenden Zellkulturen,<sup>[6,13,14]</sup> sowie bei der konditionalen Expression in transgenen Tieren<sup>[15]</sup> verwendet. Ein inhärenter Nachteil der induzierten sekundären Gephyrin-Expression sind die daraus resultierenden morphologischen und funktionellen Veränderungen in Zellen.<sup>[15–17]</sup> Um diese Nachteile zu umgehen, wurden zwei alternative Methoden der genetischen Markierung angewendet. Die erste Methode umfasst Knock-in-Mäuse, die mRFP-Gephyrin exprimieren, wobei die Expressionsniveaus, die subzelluläre Verteilung des endogenen Proteins und die synaptische Funktion weitgehend erhalten bleiben.<sup>[6,12]</sup> Die zweite Methode ist die intrazelluläre Expression von eGFP-fusionierten Anti-Gephyrin-Nanokörpern (sog. Nanobodies: rekombinantes, Antikörper-ähnliches, leichtes Protein), das die hemmenden Synapsen in fixierten und lebenden Zellen sichtbar macht.<sup>[18]</sup> Dieser Ansatz kann insbesondere dann effektiv sein, wenn er mit einem transkriptionellen Kontrollsystem kombiniert wird, das das Expressionsniveau des Protein-Tags mit dem seines endogenen Ziels abgleicht, wodurch etwaige Fehlmarkierung und unerwünschte funktionelle Effekte minimiert werden sollen.<sup>[19]</sup> Zusammengefasst lässt sich sagen, dass genetische Markierungsmethoden eine gründliche Analyse und Bewertung der Auswirkungen der genetischen Störung auf das Modell erfordern. Die Verfügbarkeit der genannten genetischen Tiermodelle, insbesondere der Knock-in-Tiere, ist begrenzt, und es gibt aufgrund des breiten Anregungs- und Emissionsbereichs fluoreszierender Proteine nur wenige Möglichkeiten für die Anwendung von Multiplexverfahren. Ein effektiverer Ansatz, der einige der Einschränkungen der genetischen Markierung umgeht, ist die Immunfärbung von endogenen Proteinen, eine Technik, die leicht auf Post-vivo-Proben anwendbar ist. Mehrere Antikörper sind zum "Goldstandard" für die Gephyrin-Markierung geworden und werden seit fast vier Jahrzehnten verwendet.<sup>[2,20–22]</sup> Die Größe der Antikörper und ihre Tendenz, die jeweiligen Zielproteine zu vernetzen, können jedoch die Markierungsleistung beeinträchtigen, was insbesondere in Geweben und komplexen Probenpreparationen auftritt.<sup>[23,24]</sup> In den vergangenen Jahren wurden daher insbesondere für die Immunhistochemie und die hochauflösende Bildgebung mehrere Antikörperal-

ternativen entwickelt, um die Antikörperfärbung zu ersetzen oder zu ergänzen.<sup>[25,26]</sup> Kürzlich wurde die Verwendung von Nanobodies als Immunmarker für verschiedene neuronale Proteine, darunter Gephyrin, gezeigt. Am Beispiel von Homer1, einem Marker für erregende Synapsen, wurde dabei demonstriert, dass Nanobodies erfolgreich zur Gewebefärbung eingesetzt werden können und die räumliche Auflösung in hochauflösenden Mikroskopieverfahren verbessern können.<sup>[18]</sup>

Eine vielversprechende Alternative zu genetisch codierten Sonden und Antikörpern sind synthetische Affinitäts-sonden wie von Nukleinsäuren abgeleitete Aptamere, Peptide und kleine Moleküle.<sup>[27]</sup> Die vielleicht bekanntesten Beispiele für synthetische Sonden sind die DNA-Farbstoffe DAPI und Hoechst, welche es seit einem halben Jahrhundert gibt und die in der Lichtmikroskopie noch immer weit verbreitet sind.<sup>[28]</sup> Neue synthetische Sonden wurden als Standard-Referenzmarker entwickelt und kommerzialisiert, wobei SiR-Aktin/Tubulin für das Zytoskelett die bekannteste ist.<sup>[29]</sup> Diese Sonden haben Ähnlichkeiten mit Nanobodies, wie die geringe Größe, die das Eindringen in Gewebe erleichtert und die räumliche Auflösung verbessert, aber im Gegensatz zu antikörperähnlichen Sonden, die zufällig gegen ein Proteinfragment generiert werden, können synthetische Sonden rational entwickelt werden, um spezifische Isoformen oder Aktivitätszustände des Zielproteins zu visualisieren.<sup>[30]</sup> Die Visualisierungsmethoden für hemmende Synapsen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Hier beschreiben wir die Entwicklung einer neuen, synthetischen, Gephyrin-bindenden Sonde und demonstrieren ihre Anwendung in Zellkultur und in Geweben als vielseitiges Werkzeug zur Visualisierung neuronaler Strukturen auf verschiedenen Skalen, in makro- bis nanoskopischen Untersuchungen des Gehirns.

**Tabelle 1:** Zusammenfassung publizierter Gephyrin Markierungsmethoden.

Class	Type	Examples	Cell imaging	Tissue imaging	Live imaging	Super-Resolution	Notes
Affinity probes	Protein based	mAb7a <sup>[6,35]</sup>	Yes	Restricted	No	Yes, depends on a secondary antibody	Isoform- and phosphoselective
		mAb3B11 <sup>[15]</sup>	Yes	Restricted	No	Yes, depends on a secondary antibody	Indiscriminate for active neuronal isoforms
	Synthetic	TMR2 <sup>[31]</sup> Sylite	Yes	Yes	No	No	Low selectivity and contrast
Genetic tags	Fused tags	eGFP <sup>[13,15]</sup>	Yes	Yes, with additional anti-eGFP staining	Yes	Yes (dSTORM)*	Binds active neuronal isoforms
		mEos2 <sup>[6]</sup> mRFP <sup>[6,12,14]</sup>	Yes	Not tested	Yes	Not tested	Secondary gephyrin expression
	Intrabodies	GPHN-FingR-GFP <sup>[19]</sup>	Yes	Not tested	Yes	Yes (PALM)*	Secondary gephyrin expression
		GC52-EGFP <sup>[18]</sup>	Yes	Not tested	Yes	Restricted (SRRF)**	Knock-in mouse
			Yes	Not tested	Yes	Not tested	Integrated expression regulation, fibronectin III-based probe
			Yes	Not tested	Yes	Not tested	Single monomeric variable camelid antibody domain

\*dSTORM und photoaktivierte Lokalisierungsmikroskopie (PALM) sind Einzelmolekül-Lokalisierungstechniken, die spezifische Fluorophore erfordern, die unter bestimmten Bedingungen ein stochastisches Blinkverhalten aufweisen.  $\approx 20$  nm durchschnittliche Auflösung.<sup>[41]</sup> \*\*Superauflösungs-Radialfluktuationen (SRRF) ist ein Fluorophor-unabhängiger Superauflösungsalgorithmus, der Bildsequenzen einer Probe analysiert, um ein Superauflösungsbild mit einer durchschnittlichen Auflösung von  $\approx 110$  bis  $\approx 200$  nm zu erzeugen.<sup>[42]</sup>

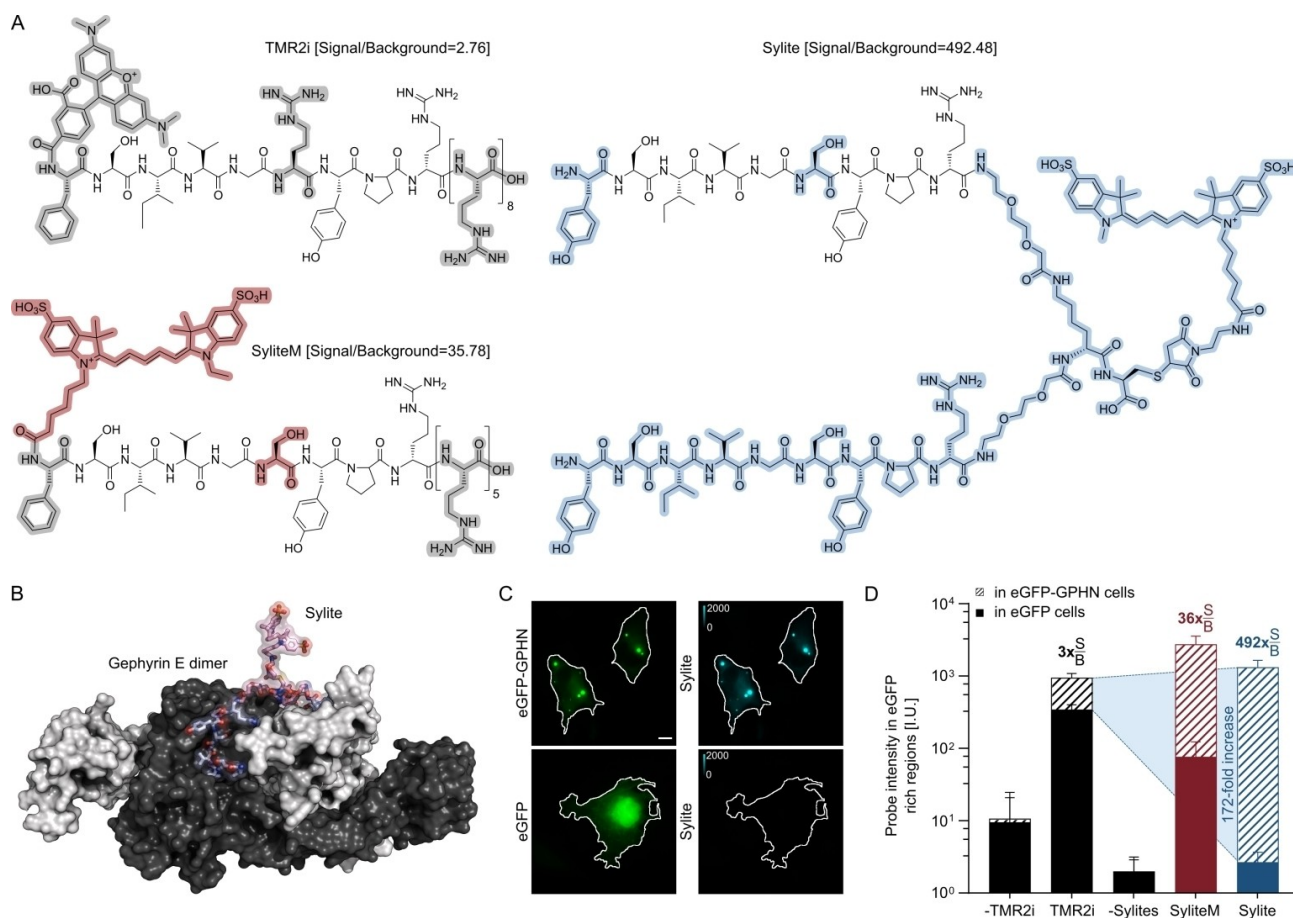
## Ergebnisse und Diskussion

## Entwicklung Synthetischer Gephyrin-Sonden

TMR2i ist die einzige synthetische Sonde, die erfolgreich zur Markierung von Gephyrin eingesetzt wurde.<sup>[31]</sup> Diese Peptidsonde basiert auf der intrazellulären Schleife der GlyR- $\beta$ -Untereinheit, dem stärksten endogenen Binder der universellen Rezeptor-Bindungstasche von Gephyrin.<sup>[32,33]</sup> Peptid-Mikroarray-basierte Untersuchungen halfen uns, vielversprechende Bindungssequenzen und optimale Multimerisierungsarchitekturen zu bestimmen (Abbildung S1, Tabellen S1,2). Zunächst bestimmten wir die Aminosäuren, die die Bindung der Kernsequenz der GlyR- $\beta$ -Schleife an natives Gephyrin verstärken können (Abbildung S1) und identifizierten dann die erfolgreichsten Sonden durch zellbasierte

Mikroskopie Untersuchungen einer Reihe verschiedener fluoreszierender mono- und multivalenter Gephyrin-Binder (Tabelle S3).

Sylite, eine dimere Sonde mit 9 Aminosäuren langen Bindungssequenzen und einem funktionellen Cystein-modifizierten Linker, der die Maleimid-Cy5-Konjugation ermöglichte, zeigte das höchste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (SHV) und Kollokalisierung mit Gephyrin (Abbildung S2, Abbildung S3A, B), während SyliteM das beste monovalente Gegenstück war (Abbildung 1A). Um den Bindungsmodus von Sylite und seine Überlegenheit gegenüber anderen Dimeren zu verstehen, verwendeten wir eine In-silico-Modellierung der Sylite-Gephyrin-Wechselwirkung. Das Modell bestätigt die gleichzeitige Bindung an zwei Gephyrinproteine und definiert die minimale Bindungsarmlänge, die



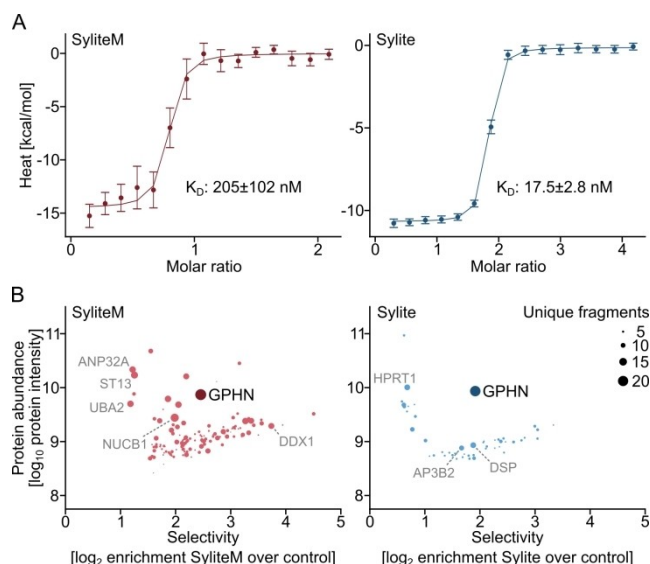
**Abbildung 1.** Entwicklung peptidbasierter Gephyrinsonden. A) Chemische Strukturen von TMR2i, SyliteM und Sylite. Die schrittweise Evolution des TMR2i zu Sylite beinhaltet eine Anpassung des Fluorophors mit Änderungen der Bindungssequenz, was zu einer Verbesserung um eine Größenordnung im SHV führt (SyliteM, in Rot sind die Änderungen, in Grau sind die ursprünglichen Komponenten). Dimerisierung, zusätzliche Sequenzänderungen und die Verschiebung des Fluorophors zum C-Terminus führen zu einer weiteren Verbesserung der SHVs um eine Größenordnung (Sylite, blau). B) Rosetta FlexPepDock Strukturmodell von Sylite, gebunden an das E-Domänen-Dimer von Gephyrin (GPHN). In Hellblau ist die Bindungssequenz, in Pink der Linker und das Fluorophor; die beiden Gephyrin-E-Domänen sind in Schwarz und Weiß dargestellt. Sylite kann gleichzeitig zwei Gephyrinmoleküle binden. C) Fixierte COS-7-Zellen, die entweder eGFP-Gephyrin oder eGFP (grün) exprimieren, gefärbt mit 50 nM Sylite (Cyan). Maßstabsleiste 10  $\mu$ m. D) Markierungs- und Kontrastverhältnisse der synthetischen Peptidsonden. Die logarithmische Y-Achse repräsentiert die durchschnittliche Signalintensität der Sonde in eGFP-reichen Regionen der COS-7-Zellen. Sylite und SyliteM haben 492 bzw. 36 Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse (gerundet). TMR2i hat ein Target-zu-Off-Target-Kennzeichnungsverhältnis von  $\approx$  3. Die Negativkontrolle (unmarkierte Zellen) im roten Kanal wird als "-TMR2i" angezeigt, die im dunkelroten Kanal als "-Sylites".  $N \geq 8$  Stichproben pro Bedingung. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

die divalente Wechselwirkung ermöglicht, eine Voraussetzung, die nur von Sylite erfüllt wird (Abbildung 1B).

Unser nächstes Ziel war die Bewertung von TMR2i, SyliteM und Sylite für die Gephyrin-Visualisierung. COS-7-Zellen, die entweder eGFP-Gephyrin oder eGFP allein exprimieren, wurden fixiert und mit den fluoreszierenden Sonden gefärbt. Das dimere Sylite zeigte sowohl eine vollständige Korrelation mit Gephyrin als auch eine bemerkenswerte SHV von 492, eine 172-fache Steigerung gegenüber TMR2i und eine 14-fache Steigerung gegenüber SyliteM (Abbildung 1C, D, Abbildung S3C). Als nächstes bestimmten wir unter Verwendung isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) mit der gereinigten Gephyrin-E-Domäne einen  $K_D$  von 17.5 nM für Sylite, eine 11-fache Affinitätssteigerung gegenüber dem monomeren SyliteM ( $K_D$  von 205 nM), was auf eine hohe Sondenaffinität hinweist und die erwartete 1 zu 2 Bindungsstöchiometrie der Sonde, in Übereinstimmung mit ihrem dimeren Design (Abbildung 2A), bestätigt. Darüber hinaus bestätigte die massenspektrometrische Analyse des Interaktoms von Sylite ihre hohe Selektivität für Gephyrin innerhalb des gesamten Gehirnproteoms. Gephyrin war das einzige Protein das mit hoher Häufigkeit und Anreicherung und repräsentiert durch mehrere einzigartige Peptidfragmente an Sylite bindet. (Abbildung 2B, Tabelle S4). Die monovalente SyliteM-Sonde behielt mehrere zusätzliche Proteine bei, was zeigt, dass die Sondendimerisierung nicht nur die Affinität, sondern auch die Bindungselektivität erhöhte.

### Sylite Bindet Neuronal Aktive Gephyrin Isoformen

Gephyrin ist ein multifunktionales Protein mit zahlreichen Isoformen und posttranslationalen Modifikationen, von denen einige spezifisch für Neuronen sind, wohingegen andere Isoformen Funktionen haben, die unabhängig von der Neurotransmissions-Funktion sind, wie z. B. die Molybdän-Cofaktor-Biosynthese in nicht-neuronalen Geweben.<sup>[34]</sup> Im Gegensatz zu Antikörpern, die definierte Proteinabschnitte binden, die nicht notwendigerweise mit spezifischer Proteinaktivität in Zusammenhang stehen, ist Sylite eine funktionelle Sonde, die entwickelt wurde, um rezeptorbindende Gephyrin-Isoformen zu binden, d. h. Isoformen, die funktionelle Rollen in Neuronen spielen (Abbildung 3A). Der Vergleich der Bindungsprofile von elf Gephyrin-Isoformen (Tabelle S5, Anhang 1), die in HEK293-Zellen exprimiert wurden, ergab, dass sowohl Sylite als auch SyliteM, aber nicht die getesteten Antikörper, ausschließlich Gephyrin-Isoformen markieren, die GlyR- und GABA<sub>A</sub>R-Bindungs-kapazität haben (Abbildung 3B, C, Abbildung S4). Dies deutet darauf hin, dass Sylite ideal geeignet ist, um aktive Synapsen nachzuweisen und funktionell relevante Rezeptorbindungsstellen zu quantifizieren. Interessanterweise wurde mit dem weit verbreiteten mAb7a-Antikörper in HEK293-Zellen keine Gephyrin-Markierung beobachtet, wahrscheinlich aufgrund des Phosphorylierungszustands von Gephyrin in den Zellen. Die Mikroarray-Profilierung der mAb7a-Bindung (Abbildung S5, Tabelle S6) bestätigte, dass die mAb7a-Bindung im Gegensatz zu Sylite vom Vorhanden-

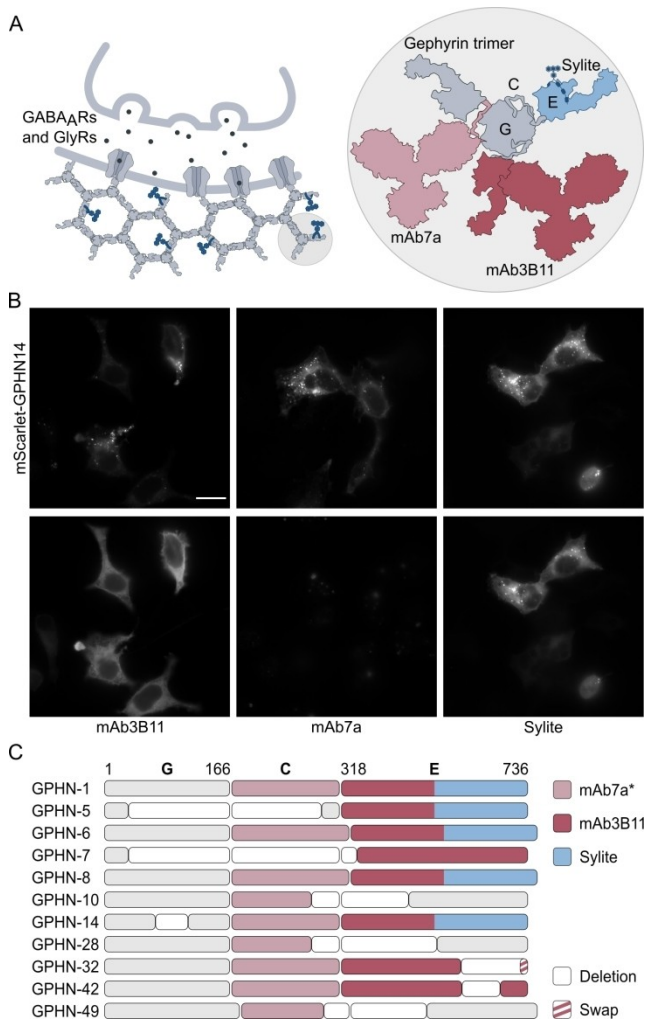


**Abbildung 2.** Die Sondendimerisierung verstärkt die Affinität und Selektivität für Gephyrin. A) Wärmesignatur von Sylite und SyliteM im ITC, titriert mit Gephyrin E-Domäne. Beide Sonden weisen eine nanomolare Affinität auf, wobei das dimere Sylite eine 10-fache Affinitätssteigerung gegenüber dem Monomer aufweist.  $N = 3$ . Fehlerbalken wurden von der NitPic-Software generiert und zeigen die Standardabweichung. B) Quantitative massenspektrometrische Analyse von Sylite- und SyliteM-Pulldowns. Nicht fluoreszierende Versionen von Sylite und SyliteM wurden verwendet, um Proteine aus Mausgehirn-Homogenat herauszuziehen. Die Proteinfraktionen wurden anschließend verdaut und mit LC-MS/MS analysiert. Die Größe der Kreise entspricht der Anzahl einzigartiger Peptide, die für jedes Protein identifiziert wurden. Links: SyliteM bindet zusätzliche Proteine, die eine hohe Intensität haben und reichlich im Pool vertreten sind, obwohl Gephyrin das prominenteste ist. In Grau sind mehrere repräsentative Proteine mit über 10 Fragmenten gezeigt, die ihre Identität bestätigen. ANP32A: saures Leucinreiches Kern-Phosphoprotein 32-Familienmitglied A, regulatorisches Protein; ST13: Unterdrückung der Tumorigenität 13, Adapterprotein; UBA2: Ubiquitin-ähnlicher Modifikator, der Enzym 2 aktiviert, posttranslationale Modifikation von Proteinen; NUCB1: Nucleobindin 1, Calcium-bindendes Protein; DDX1: DEAD-Box-Helikase 1, RNA-Helikase. Rechts: Gephyrin ist das einzige Protein mit hoher Häufigkeit, Selektivität und mehreren Fragmenten im Sylite-Pulldown. HPRT1: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, erzeugt Purinnukleotide; AP3B2: Clathrin-assoziiertes Adapterproteinkomplex 3, beteiligt an der Erzeugung von synaptischen Vesikeln; DSP: Desmoplakin, Zelladhäsionsprotein.

sein eines phosphorylierten (pSer270) Epitops in der Linker-Region von Gephyrin abhängt.<sup>[35]</sup> Somit markiert mAb7a nur eine Subpopulation von synaptischen Gephyrin-Isoformen und Phosphorylierungsvarianten.

### Mehrfarbige Sonden zur Visualisierung Inhibitorischer Synapsen

In der Fluoreszenzmikroskopie ist zur Beurteilung einer biologischen Fragestellung typischerweise die simultane Abbildung von zwei oder mehr Spektralkanälen notwendig. Flexibilität bei der Wahl des Fluorophors und des spektralen Kanals ist vorteilhaft, da dies häufig Zeit und Ressourcen spart, die beispielsweise notwendig wären, ein bestehendes

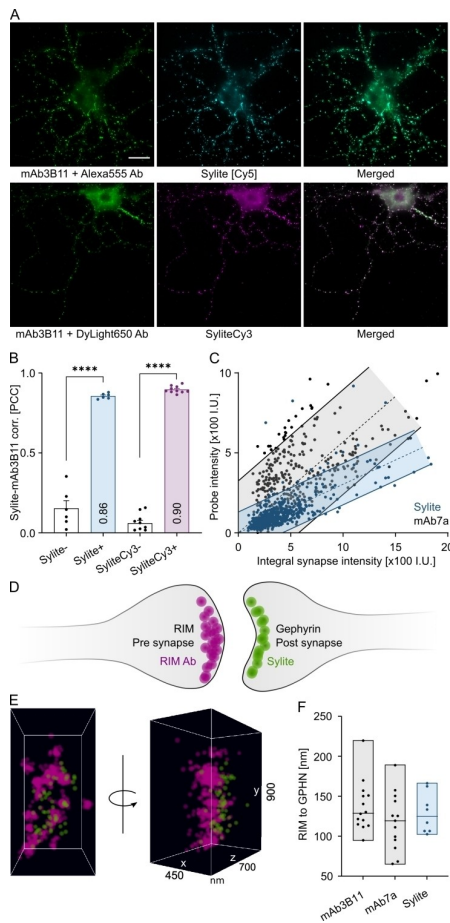


**Abbildung 3.** Sylite markiert spezifisch Gephyrin-Isoformen mit Rezeptorbindungsfähigkeit. A) Gephyrin verankert GlyRs und GABA<sub>A</sub>Rs an der Post-Synapse. Das Protein besteht aus drei Regionen: G-Domäne, unstrukturierte C-Linker-Region, E-Domäne, in der sich die Rezeptorbindungstasche befindet und auf die Sylite abzielt. Antikörper werden gegen Proteinfragmente gezüchtet, die nicht unbedingt mit spezifischen Proteinfunktionen zusammenhängen. B) Repräsentative Bilder der Markierung der Isoform Gephyrin (GPHN) mit Sylite und Gephyrin-Antikörpern. Oben: Fixierte HEK293-Zellen, die mScarlet-Gephyrin-Isoform 14 exprimieren. Unten: Co-Markierung von Gephyrin mit entweder mAb3B11, mAb7a oder Sylite. mAb3B11 färbt Gephyrin in den transfizierten Zellen, löst aber nicht die im oberen Bild sichtbaren feinen Punkte auf. mAb7a markiert kein rekombinantes Gephyrin in HEK293-Zellen. Sylite markiert spezifisch mScarlet-Gephyrin und löst die feinen Punkte auf, wo sich das rekombinante Protein ansammelt. Maßstabsbalken 10 μm. C) Wechselwirkung von Sonden mit verschiedenen Gephyrin-Isoformen. Die Isoform GPHN-1 repräsentiert die Primärstruktur von Gephyrin.<sup>[36]</sup> Leere Kästchen zeigen Deletionen an, längliche Kästchen Insertionen, gestreifte Kästchen Substitutionen. Sylite bindet Isoformen, die eine Rezeptorbindungstasche in der E-Domäne enthalten. Die Antikörper zielen sowohl auf Rezeptor-clustering-kompetente als auch auf bindingsdefiziente Isoformen ab. mAb7a (Rose) bindet ein kurzes lineares \*Ser270-phosphoryliertes Epitop in der Linker-Region (C), während mAb3B11 (Rot) mit einem Epitop in der E-Domäne interagiert. Sylite (blau) bindet ausschließlich Gephyrin-Isoformen mit einer Rezeptorbindungstasche in der E-Domäne.

experimentelles Verfahren neu anzupassen. Wir haben daher die funktionelle Sonde SyliteCy3 hergestellt, die im roten Spektrum emittiert den Spektralbereich von Syliten erweitert und sich vergleichbar zu Sylite verhält: Die Kolo-kalisierungsanalyse in Säugetierzellen, die eGFP-Gephyrin exprimieren, zeigte eine enge lineare Beziehung zwischen der Sonde und Gephyrin, während in Zellen, die nur eGFP exprimieren, keine Korrelation beobachtet wurde (Abbildung S6), was die Selektivität der Sonde für Gephyrin bestätigt. Als nächstes testeten wir Sylites in primären Neuronen. Sowohl Sylite als auch SyliteCy3 visualisieren die hemmenden Synapsen und das diffuse Gephyrin in neuronalen Zellkörpern, wie durch die Co-Färbung von primären Hippocampus-Neuronen mit Gephyrin-3B11-Antikörper bestätigt wurde (Abbildung 4A, B). Interessanterweise war die Kolo-kalisation von Sylite mit mAb7a geringer als mit mAb3B11 (Abbildung S7A, B), was uns veranlasste, die Art der Interaktion von Sylite und mAb7a mit Gephyrin in Neuronen zu untersuchen. Wir färbten kortikale Neuronen, die Gephyrin-mEos2-Fluoreszenzprotein-Chimäre exprimieren, mit Sylite und mAb7a. Anschließend führten wir eine Kolo-kalisierungsanalyse durch und verglichen die mEos2-Intensität einzelner Synapsen mit der von Sylite oder mAb7a (erkannt mit einem sekundären Antikörper). Obwohl beide Sonden gut mit rekombinanten Gephyrin in Neuronen co-lokalisieren (Abbildung S7C, D), ergab die lineare Regressionsanalyse der Fluoreszenzintensitäten synaptischer Puncta ein zweifach engeres Vorhersageintervall für Sylite im Vergleich zu mAb7a, was auf eine lineare und viel engeren Korrelation zwischen Sylite und den mEos2-Gephyrin-Signalen (Abbildung 4C) hindeutet. Die bei mAb7a beobachtete stärkere Streuung legt andererseits nahe, dass die Antikörperfärbung eine nichtlineare Skalierung mit synaptischem Gephyrin aufweist, in Übereinstimmung mit unserer früheren Feststellung, dass der mAb7a-Antikörper spezifisch auf eine phosphorylierte Variante von Gephyrin abzielt. Zusammengefasst zeigen unsere Daten eine lineare, stöchiometrische Beziehung zwischen Sylite und Gephyrin, wodurch es für die quantitative Mikroskopie geeignet ist.<sup>[6]</sup>

### Hochpräzise Prä- bis Postsynaptische Distanzmessungen mittels Sylite

Jüngste Arbeiten zeigten, dass das Protein RIM der präsynaptischen aktiven Zone (AZ) mit Gephyrin transsynaptische Nanosäulen bildet.<sup>[37]</sup> Um den Abstand zwischen den neuronalen prä- und postsynaptischen Elementen zu bestimmen, markierten wir Gephyrin und RIM in kortikalen Neuronen und bildeten dann die Synapse mit direkter stochastischer optischer Rekonstruktionsmikroskopie (dSTORM) ab, einer supraauflösenden Mikroskopietechnik, die auf Einzelmoleküldetektion basiert (Abbildung 4D,E). Die RIM-Markierung wurde mit primärem Anti-RIM1/2 und CF680-konjugierten sekundären Antikörpern und Gephyrin durchgeführt, welches entweder mit Sylite oder mit kommerziellen Antikörpern und AF647-konjugierten sekundären Antikörpern markiert wurde. Zweifarbiges 3D-



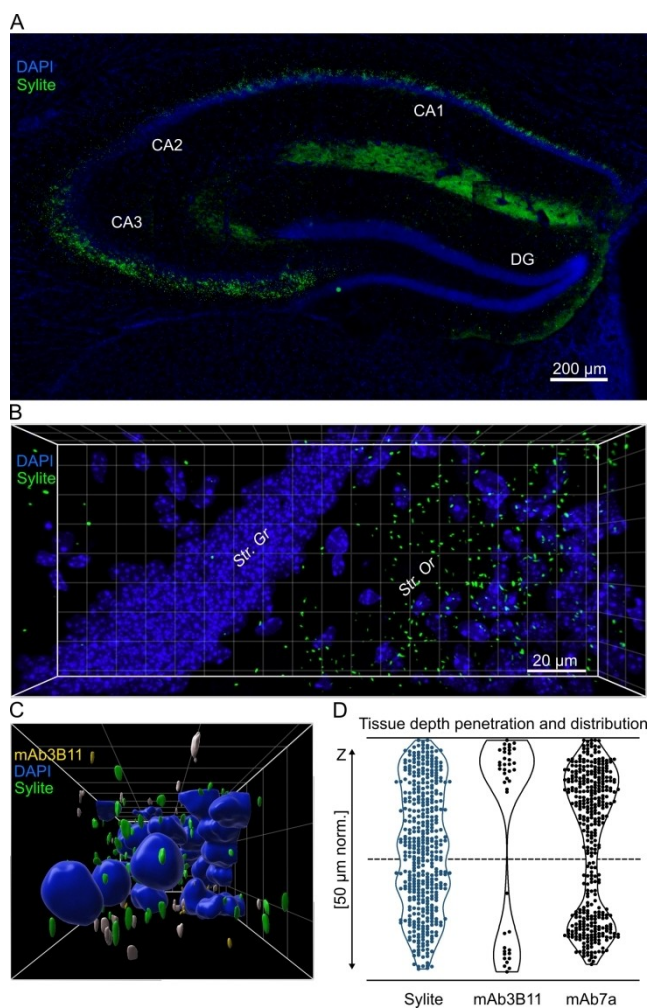
**Abbildung 4.** Mehrfarbige Sonden für hochaufgelöste mikroskopische Studien inhibitorischer Synapsen. A) Primäre Hippocampus-Neuronen vom Wildtyp, fixiert und gefärbt mit Sylite oder SyliteCy3. Oben: Co-Markierung mit mAb3B11 und einem sekundären Alexa 555-konjugierten Antikörper (grün) und mit Sylite (cyan). Unten: Anti-Gephyrin-mAb3B11 und sekundärer DyLight650-konjugierter Antikörper (grün) und SyliteCy3-Co-Färbung (magenta). Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . B) Pearsons Korrelationskoeffizienten (PCC) von mAb3B11- und Sylite-Signalen bestätigen ein hohes Maß an Kolo-kalisierung. Die Negativkontrolle im dunkelroten Kanal (unbeschriftet) wird entweder durch “SyliteCy3-” für nur mit SyliteCy3 markierte Zellen oder durch “Sylite-” für nur mit mAb3B11 und Alexa555-Sekundärantikörper markierte Zellen angezeigt. Signifikanz bestimmt mit Welch’s t-Test.  $P < 0.0001$ . C) Intensitätsabhängigkeit der Synapsenmarkierung mit mAb7a oder Sylite im Vergleich zum internen Referenzsignal mEos2-Gephyrin in infizierten Neuronen. Eine höhere Signalstreuung wird bei mAb7a (grau) beobachtet, während Sylite (blau) ein konstantes und weniger variables lineares Markierungsverhalten aufweist. Schattierte Bereiche zeigen das 90%-Vorhersageintervall an. Für jede Sonde wurden 10 Bildpaare verwendet. D)–F) Hochauflösende Bildgebung und nanometrische Messungen mit Sylite. D) Schematische neuronale Synapse zur Veranschaulichung der präsynaptischen RIM1/2-Markierung mit einem sekundären CF680-Antikörper (magenta) und der postsynaptischen Gephyrin-Markierung mit Sylite (grün). E) Zweifarbige dSTORM-Visualisierung von Einzelmoleküldetektionen unter Verwendung von spektraler Entmischung wird als planare Projektion und En-Face-Ansicht einer einzelnen Synapse gezeigt. F) RIM-zu-Gephyrin-Massenmittelpunktsabstandsmessungen mit RIM1/2-CF680 und Gephyrin Antikörpern sowie Sylite. In allen Fällen wurde eine durchschnittliche Distanz von  $\approx 130$  nm ermittelt. Balken zeigen die gesamte Bandbreite der Einzelmessungen an, die In-Bar-Linie zeigt den Medianwert an.

dSTORM-Bildgebung mit spektraler Entmischung zeigte, dass die Sylite-Signale eng mit der Verteilung von RIM in der AZ übereinstimmen, was die enge Assoziation zwischen subsynaptischen Domänen, die RIM und Gephyrin enthalten, bestätigt.<sup>[2,37]</sup> Der gemessene mittlere euklidische Abstand zwischen Sylite- und RIM1/2-CF680-Detektionen betrug  $129 \pm 24$  nm (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung), in Übereinstimmung mit den geschätzten Molekülgrößen, die die beiden Proteine trennen.<sup>[37]</sup> Der direkte Vergleich mit der mAb7a- und mAb3B11-Gephyrin-Markierung bestätigte, dass Sylite eine äußerst präzise Lokalisation des synaptischen Gephyrin-Gerüsts und der Rezeptorbindungsstellen an inhibitorischen Synapsen ermöglicht (Abbildung 4F).

#### Sylite Zeigt eine Überlegene Gewebedurchdringung Gegenüber Gephyrin-Antikörpern und Visualisiert Hippocampus-Synapsen in 2D und 3D

Die Gewebefärbung von inhibitorischen Synapsen ist ein aufwendiges und zeitintensives Verfahren, das im Allgemeinen auf dünne Hirnschnitte ( $\leq 16 \mu\text{m}$ ) beschränkt ist, um eine zuverlässige Färbung zu erhalten.<sup>[7]</sup> Hier demonstrieren wir, dass Sylite 50  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte effektiv durchdringt und innerhalb von nur einer Stunde eine kontrastreiche Markierung unter Verwendung eines standardmäßigen immunhistochemischen Protokolls erreicht. Wir visualisierten hemmende Synapsen und ihre Verteilung mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit 20-facher Vergrößerung, was uns einen Makroüberblick über die Verteilung hemmender Synapsen im Hippocampus ermöglichte (Abbildung 5A). Als nächstes inkubierten wir die Hippocampus-Schnitte für 1, 24 und 72 Stunden mit Sylite und entweder mAb3B11 oder mAb7a, bildeten die Schnitte dann mit einem konfokalen Mikroskop ab, und rekonstruierten daraus 3D-Bilder. Durch Sylite sichtbar gemachte Synapsen wurden im *Stratum Oriens* der CA3-Region des ventralen Hippocampus beobachtet, einem Bereich, der dicht mit hemmenden Interneuronen gefüllt ist<sup>[38]</sup> (Abbildung 5B, Video S1).

Sylite detektierte synaptische Cluster im gesamten Abschnitt, was auf ein vollständiges Eindringen der Sonde bereits nach 1 Stunde Inkubation hindeutet (Film S2,3). Erstaunlicherweise beobachteten wir sogar nach 72 Stunden Inkubation mit Sylite keine signifikante Hintergrundfluoreszenz (Film S4,5). Im Gegensatz dazu schien die Antikörperverteilung nach 24 Stunden ein “Sandwich”-ähnliches Muster aufzuweisen, mit starker Markierung in der Nähe der Oberflächen der Schnitte, während die Mitte weitgehend unmarkiert blieb (Abbildung 5C, D, Film S1, 6). Nach 72 Stunden schienen die Antikörper ihre Bindungsspezifität zu verlieren (Abbildung S8, Film S4,5). Dies zeigt sich am Abfall der Voxellüberlappung zwischen Antikörper- und Sylite-Markierung von  $\approx 0.4$  für sowohl mAb7a- als auch mAb3B11-Antikörper nach 24 Stunden auf  $\approx 0.1$  nach 72 Stunden (Abbildung S8B). Schließlich zeigte die mit Sylite erzeugte 3D-Visualisierung von Synapsen glatte und gut definierte Formen unterschiedlicher Größe, in Übereinstimmung mit der bekannten Vielfalt hemmender Synapsen im ZNS.<sup>[39]</sup> Nach 24 Stunden produzierten die Antikörper so-



**Abbildung 5.** Kartierung hemmende Synapsen im Gehirngewebe auf Makro- und Mikroebene mittels Sylites. A) Weitfeld-2D-Bild des dorsalen Hippocampus-Abschnitts, gefärbt mit DAPI-Kernfärbung (blau) und Sylite (grün). In CA1- und insbesondere in CA3-Regionen ist eine hohe Dichte ausgeprägter synaptischer Punkte sichtbar. B) 3D-konfokale Mikroskopie von Sylite (24 Stunden)-Färbung in einem ventralen Hippocampus-Schnitt. Synapsen treten im *Stratum Oriens* auf. Str. Or – *Stratum Oriens*; Str. Gr – *Stratum Granulosum*. C) Volumetrische 3D-Darstellung von Zellkernen und hemmenden Synapsen. Seitenansicht eines gerenderten Bildstapels aus einem Schnitt, der 24 Stunden lang zusammen mit mAb3B11 und mit Sylite für Gephyrin markiert wurde. Grün – Sylite, gelb – mAb3B11, blau – DAPI-Kernfärbung. Mit Sylite und mAb3B11 co-markierte Synapsen sind in Weiß dargestellt. Quadrate zeigen ein  $10 \times 10 \mu\text{m}$ -Raster. D) Verteilung von Sylite und Antikörpermarkierung entlang der Z-Achse (Tiefe) in  $50 \mu\text{m}$  dicken Maus-Hippocampus-Schnitten nach 24-stündiger Färbung. Die oberen und unteren schwarzen Linien zeigen die Abschnittsenden an, die gestrichelte Linie die Mitte. Violinen-Darstellung der Verteilung der detektierten Cluster. Die Sanduhrform der Antikörpermarkierung weist auf eine verzerrte Antikörperverteilung hin zu den Oberflächen der Schnitte hin und damit auf eine begrenzte Eindringungseffektivität.

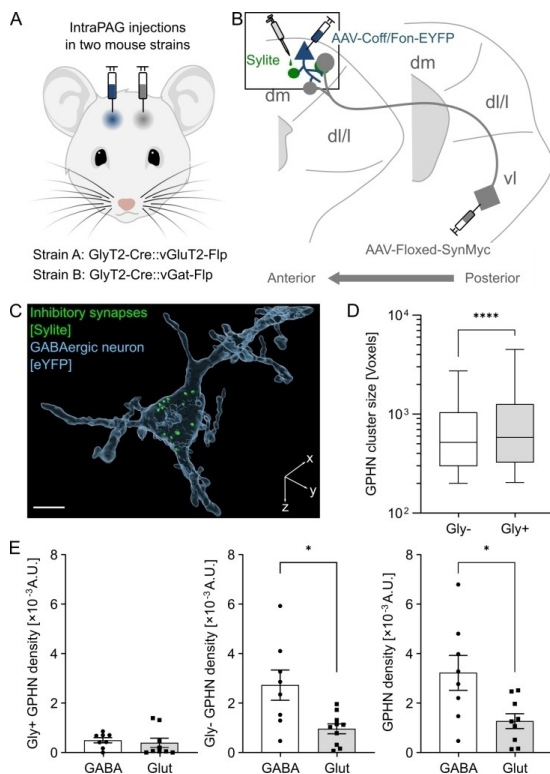
wohl glatte als auch amorphe Cluster, und nach 72 Stunden änderte sich dieses Muster zu hauptsächlich amorphen Clustern und damit hin zu einem Verlust spezifischer Färbung (Film S7,8).

### Sylite Visualisiert Lokale Inhibitorische Netzwerke in der Periaquäduktalen Grauen Region des Mittelhirns

Das Nervensystem von Säugetieren besteht aus einem komplexen Netzwerk spezialisierter synaptischer Verbindungen, die den neuronalen Informationsfluss koordinieren. Das periaquäduktale Grau (PAG) ist eine Mittelhirnregion, die eine wichtige Rolle bei der Orchestrierung der Abwehrreaktion als Reaktion auf eine wahrgenommene Bedrohung spielt. Es wurde postuliert, dass Intra-PAG-Schaltkreise die Integration mehrerer Abwehrkomponenten unterstützen, wie z.B. das Umschalten zwischen aktiven und passiven Verhaltens-Bewältigungsmustern.<sup>[40]</sup> Die genauen Schaltkreismechanismen und ihre neuroanatomischen Substrate müssen jedoch noch aufgeklärt werden. Um die mutmaßliche Rolle lokaler inhibitorischer glycinergener Neuronen im ventrolateralen PAG (vlPAG) zu beleuchten, versuchten wir ihre Intra-PAG-Konnektivität auf anatomischer Ebene mit Sylite zu klären. Wir verwendeten die zelltypspezifische, viral vermittelte Expression von Immunmarkern für Synaptophysin, wodurch wir glycinerge präsynaptische Terminals identifizieren konnten. Wir haben beobachtet, dass diese Neuronen lokal vom ventrolateralen (vl) zum dorsomedialen (dm) Teil des PAG projizieren (Abbildung S9).

Als nächstes zielten wir darauf ab, die Zielausgangszellen der glycinergen vlPAG-Neuronen zu identifizieren und die inhibitorische Postsynapse zu charakterisieren. Zu diesem Zweck markierten wir entweder glutamaterge oder GABAerge Neuronen durch viral vermittelte Expression von fluoreszierenden Proteinen im dmPAG und verwendeten Sylite, um hemmende postsynaptische Stellen zu identifizieren (Abbildung 6A–C, Abbildung S10). Zuerst haben wir die Größe der von Sylite visualisierten postsynaptischen Dichten analysiert. Gephyrin-Cluster, die von glycinergischem vlPAG prä-synapsen kontaktiert wurden, waren größer als jene mit nicht-glycinergischer inhibitorischer Eingabe (Figure 6D). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung größerer Gephyrin-Cluster im Rückenmark, einer Region, die reich an glycinergen Neuronen ist, im Vergleich zu kleineren Clustern im Kortex, die hauptsächlich GABAerg sind.<sup>[6]</sup> Als nächstes untersuchten wir glycinerge vlPAG-Projektionen zu dmPAG und identifizierten die glycinergen Präsynapsen in der Nähe von sowohl glutamatergen als auch GABAergen dmPAG-Gephyrinstellen (Abbildung 6E, links), was darauf hindeutet, dass vlPAG-glycinerge Neuronen inhibitorische Wirkungen in den zwei funktionell unterschiedlichen dmPAG-Neuronenklassen ausüben können. Interessanterweise war die Gephyrindichte in dmPAG-GABAergen im Vergleich zu glutamatergen Neuronen höher (Abbildung 6E, Mitte und rechts), was darauf hindeutet, dass GABAerge dmPAG-Neuronen insgesamt stärkere inhibitorische Inputs erhalten. Zusammengefasst demonstrieren unsere Daten die Nützlichkeit von Sylite, um Zielausgangszellen spezifischer inhibitorischer Neuronen zu identifizieren und die genaue Lage und Größe ihrer Synapsen weiter zu bestimmen.





**Abbildung 6.** Kartierung und Charakterisierung von inhibitorischen Inputs im periaquäduktalen Grau. A) Rekombinanten GlyT2-Cre::vGluT2-Flp- oder GlyT2-Cre::vGat-Flp-Mäusen wurde in posteriores vlPAG Adeno-assoziiertes Virus (AAV) injiziert, das ein Plasmid mit einer Cre-Rekombinase-abhängigen Synaptophysin-Myc-Chimären-codierenden Region enthielt (grau). Eine zusätzliche Injektion wurde in das dmPAG mit AAV durchgeführt, das ein Plasmid mit einer Cre-off-Flippase (Flp)-Rekombinase-auf-eYFP-kodierenden Region für das fluoreszierende Protein trug (blau). B) Anatomisches Schema mit Injektionen und Expressionslokalisationen im periaquäduktalen Grau. Glycinerge Neuronen projizieren von vlPAG zu dmPAG (grau). In dmPAG exprimieren je nach Maus-Genotyp entweder GABAerge oder glutamaterge Neuronen lösliches eYFP (blau). PAG-Gehirnschnitte beider Mäusestämme wurden mit Syllite (grün) gefärbt. Box – Imaging- und Rekonstruktionsbereich. C) Volumetrische 3D-Rekonstruktion eines einzelnen dmPAG GABAergen Neuronenzellkörpers (hellblau, transparent) aus einem Gehirnschnitt. Im Soma befinden sich mehrere Gephyrin-Cluster (grün). Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . D) Glycinerge Synapsen sind im Durchschnitt größer als nicht-glycinerge Synapsen in dmPAG. Box- (25. bis 75. Perzentile) und Whiskers (5. bis 95. Perzentile)-Plot, die die Clustergrößenverteilung von Gephyrin (GPHN) darstellen. Signifikanz bestimmt mit ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur,  $p < 0.0001$ . E) Höhere inhibitorische Synapsendichte wird in GABAergen Neuronen in dmPAG beobachtet. Hemmende Synapsendichten: Das gesamte In-Neuronen-Gephyrinvolumen (Voxel) wurde durch das gesamte Neuronenvolumen (Voxel) in jedem Gewebeschnitt von dmPAG dividiert und aufgetragen, Mittelwert  $\pm$  SEM. Die Dichte der inhibitorischen Synapsen mit glycinergen Input (Gly+) unterscheidet sich nicht zwischen GABAergen und glutamatergen Neuronen (links), während bei GABAergen Neuronen (Mitte) eine höhere nicht-glycinerge (Gly-) Synapsendichte beobachtet wird. Die gesamte inhibitorische Synapsendichte in GABAergen Neuronen ist höher als in glutamatergen Neuronen (rechts). Die Datensätze wurden mit dem D'Agostino-Pearson-Test auf Normalität überprüft. Ein einzelner Ausreißer wurde mit der Methode von Grubbs mit  $\alpha = 0.05$  entfernt. Signifikanz bestimmt mit ungepaartem t-Test mit Welch-Korrektur,  $p < 0.05$ , 8 (4 pro Tier) Gehirnschnitte von GlyT2-Cre::vGat-Flp-Mäusen und 9 (3 pro Tier) Schnitte von GlyT2-Cre::vGluT2-Flp Mäuse wurden verwendet.

## Zusammenfassung

Durch systematische Verbesserungen der Bindungssequenz, Maßschneidern von Fluoreszenzfarbstoffen und der Dimerisierungsarchitektur, um die gleichzeitige Bindung an zwei Gephyrinmoleküle zu ermöglichen, haben wir eine hochselektive und hochaffine Sonde für die inhibitorische Synapse hergestellt. Im Gegensatz zu Antikörpern, die gegen Proteinfragmente gerichtet sind, die sich im Allgemeinen nicht auf eine spezifische Proteinfunktion beziehen, wurde Syllite von GlyR abgeleitet, einem endogenen Liganden von neuronalem Gephyrin, welches Gephyrin-Isoformen bindet, die aktiv Rezeptoren an der Synapse verankern. Syllite hat einen Linker mit Cystein, der Flexibilität für die Konjugation von Maleimid-haltigen Farbstoffen ermöglicht, wodurch eine einfache Derivatisierung eines wirksamen Binders an eine fluoreszierende Sonde ermöglicht wird, wobei die Bildgebungsfähigkeiten vom Fluorophor abhängig sind. Der beobachtete erhebliche Einfluss des Farbstoffs auf die Bindungseigenschaften einer kurzen Peptidsonde (Abbildung S2, S3), weist darauf hin, dass eine Validierung, wie für SylliteCy3 beschrieben (Abbildung S6), für neue Farbstoffe erforderlich ist.

Syllite lässt sich leicht in standardmäßige immunzytochemische und immunhistochemische Assays implementieren, wo es als Ersatz für oder zusammen mit Antikörpern verwendet werden kann, um hemmende Synapsen in einer einstufigen Anwendung ähnlich der direkten Immunmarkierung sichtbar zu machen. Syllite, konjugiert mit dem Cy5-Fluorophor, ist besonders nützlich für die Super-Resolution-Mikroskopie, die Studien der inhibitorischen Synapse im Nanomaßstab ermöglicht, wie die hier durchgeführten Prä-Post-Synapsenabstandsmessungen. In Gewebe erzielt Syllite vermutlich aufgrund seiner geringen Größe eine zuvor unerreichte Färbefeffizienz und ermöglicht eine stark vereinfachte und beschleunigte Gewebeverarbeitung ohne Bildartefakte, die häufig bei Antikörpern beobachtet werden. Syllite kann somit für fortschrittliche und gebündelte anatomische Tracing-Techniken eingesetzt werden, die zelltyp- und projektionsspezifische Konnektivität als Teil von schaltkreiszentrierten Ansätzen zur Gehirnfunktion adressieren. Im Großen und Ganzen liefern Techniken, die auf viralen Abgabesystemen beruhen, keine spezifischen Informationen über die postsynaptische Stelle, wie etwa die Identität der Zellstrukturen, ihre Größe und Organisation. Aufgrund seiner hohen Markierungseffizienz im Gewebe kann Syllite daher wesentlich dazu beitragen, hemmende postsynaptische Dichten und deren Größe einfacher und zuverlässiger zu identifizieren. Neben der Identifizierung von Zielzellen und synaptischen Größen spezifischer Projektionswege, wie hier hervorgehoben, hat Syllite das Potenzial, Studien zur funktionellen Bedeutung einer präzisen, d.h. subzellulären, synaptischen Lokalisierung voranzutreiben. Die immer komplexer werdende neurowissenschaftliche Forschung zusammen mit den technologischen Fortschritten in der Gewebebildung und der hochauflösenden Mikroskopie erzeugen eine starke Nachfrage nach neuen Sonden für Multiplex-Untersuchungen des Gehirns im Mikro- und Nanomaßstab.<sup>[1,43]</sup> Wir erwarten, dass die in dieser Studie

angewandte rationale Sondenentwicklung, d. h. die Entwicklung eines endogenen aktivitätsbezogenen Liganden hin zu einem kompakten synthetischen hochaffinen Binder, Sondenmultimerisierung für erhöhte Avidität, Affinität und Selektivität sowie Fluorophor-Screening und -Anpassung, zu neuen kompakten Affinitätssonden für andere Schlüsselkomponenten des Nervensystems, wie dem exzitatorischen postsynaptischen Gerüstprotein PSD-95 oder dem präsynaptischen Gerüstprotein Bassoon führen wird. Zukünftig könnten Sylite-Derivate auch synergistisch mit neuartigen Zellpenetrationstechniken verwendet werden<sup>[44,45]</sup> die die Bildung lebender Zellen und funktionelles Targeting, In vivo-Anwendungen und pharmakologische Forschung erleichtern könnten. Dem müssen jedoch detaillierte Biokompatibilitäts- und Biotoxizitätsstudien, einschließlich metabolischer und chemischer Stabilität, vorausgehen. Nach unseren vorläufigen Daten bleibt Sylite bei Lagerung als gefrorene Lösung mindestens 12 Monate voll funktionsfähig und chemisch stabil (Anhang 5).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse Sylite als leistungsstarkes, vielseitiges und zuverlässiges Bildgebungswerkzeug für die Neurowissenschaften etablieren. Zu den Vorteilen gegenüber herkömmlicher Affinitäts-sonden gehören die selektive Markierung funktioneller inhibitorischer Synapsen, schnelle und unkomplizierte Gewebefärbung sowie die Kompatibilität mit hochauflösender Mikroskopie. In Kombination mit fortschrittlichen Bildgebungsverfahren eröffnen synthetische Sonden wie Sylite neue Forschungswege in den Neurowissenschaften, da sie Multiplex-Studien ermöglichen und eine bessere Lokalisierungspräzision, Auflösung und Gewebefärbung erzielen.

## Danksagung

Wir danken Dr. Jens Vanselow, Stephanie Lamer und Alvaro Ciudad für die Unterstützung der massenspektrometrischen Studien und Analysen. Wir danken Prof. Eric Allemand und Dr. Fabrice Ango für die Bereitstellung von Gephyrin-Isoform-Konstrukten. Und wir danken Dr. Katharina Hemmen, Dr. Hanna Heil, Mike Friedrich und Jürgen Pinnecker für ihre Anleitung in der 3D-Bildanalyse und Lichtmikroskopie. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG MA6957/1-1) an H.M.M. unterstützt; Agence Nationale de la Recherche (InVivoNanoSpin, ANR-20-CE11-0002-02) an C.G.S.; Deutsche Forschungsgemeinschaft (Projekt-ID 424778381 – TRR 295), Heisenberg-Proffessur und Projektmittel an P.T. (BIS 1124); Promotionsstipendium der Fundação para a Ciência e a Tecnologia an S.L.R. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

## Interessenkonflikt

H.M.M. und V.K. sind Inhaber eines Gebrauchsmusters Nr. 20 2021 002 515 auf Sylites. Sylite werden von NanoTag Biotechnologies GmbH, Cat.#P4001 vertrieben. Ca.S. ist bei Abbelight beschäftigt.

## Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

**Stichwörter:** Dimerisierung · Fluoreszsonden · Hochauflösende Mikroskopie · Neurowissenschaften · Peptide

- [1] D. Choquet, M. Sainlos, J.-B. Sibarita, *Nat. Rev. Neurosci.* **2021**, *22*, 237–255.
- [2] K. C. Crosby, S. E. Gookin, J. D. Garcia, K. M. Hahm, M. L. Dell'Acqua, K. R. Smith, *Cell Rep.* **2019**, *26*, 3284–3297.e3.
- [3] T. W. Lin, Z. Tan, A. Barik, D.-M. Yin, E. Brudvik, H. Wang, W.-C. Xiong, L. Mei, *J. Neurosci.* **2018**, *38*, 2533–2550.
- [4] H. Bannai, F. Niwa, M. W. Sherwood, A. N. Shrivastava, M. Arizono, A. Miyamoto, K. Sugiura, S. Lévi, A. Triller, K. Mikoshiba, *Cell Rep.* **2015**, *13*, 2768–2780.
- [5] J. M. Lorenz-Guertin, M. J. Bambino, T. C. Jacob, *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00265>.
- [6] C. G. Specht, I. Izeddin, P. C. Rodriguez, M. ElBeheiry, P. Rostaing, X. Darzacq, M. Dahan, A. Triller, *Neuron* **2013**, *79*, 308–321.
- [7] E. M. Schneider Gasser, C. J. Straub, P. Panzanelli, O. Weinmann, M. Sassoè-Pognetto, J. M. Fritschy, *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1887–1897.
- [8] S. K. Tyagarajan, J.-M. Fritschy, *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 141–156.
- [9] Y. T. Liu, C. L. Tao, X. Zhang, W. Xia, D. Q. Shi, L. Qi, C. Xu, R. Sun, X. W. Li, P. M. Lau, Z. H. Zhou, G. Q. Bi, *Nat. Neurosci.* **2020**, *23*, 1589–1596.
- [10] C. Charrier, P. MacHado, R. Y. Tweedie-Cullen, D. Rutishauser, I. M. Mansuy, A. Triller, *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 1388–1395.
- [11] G. G. Gross, C. Straub, J. Perez-Sanchez, W. P. Dempsey, J. A. Junge, R. W. Roberts, L. A. Trinh, S. E. Fraser, Y. De Koninck, P. De Koninck, B. L. Sabatini, D. B. Arnold, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 673–678.
- [12] S. A. Maynard, P. Rostaing, N. Schaefer, O. Gemin, A. Candat, A. Dumoulin, C. Villmann, A. Triller, C. G. Specht, *eLife* **2021**, *10*, 1–22.
- [13] C. E. Flores, I. Nikonenko, P. Mendez, J.-M. Fritschy, S. K. Tyagarajan, D. Muller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E65–E72.
- [14] M. Calamai, C. G. Specht, J. Heller, D. Alcor, P. Machado, C. Vannier, A. Triller, *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 7639–7648.
- [15] S. Kim, M. Kang, D. Park, A.-R. Lee, H. Betz, J. Ko, I. Chang, J. W. Um, *iScience* **2021**, *24*, 102037.
- [16] W. Yu, M. Jiang, C. P. Miralles, R. wen Li, G. Chen, A. L. de Blas, *Mol. Cell. Neurosci.* **2007**, *36*, 484–500.
- [17] W. Yu, A. L. D. Blas, *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 830–845.
- [18] J.-X. Dong, Y. Lee, M. Kirmiz, S. Palacio, C. Dumitras, C. M. Moreno, R. Sando, L. F. Santana, T. C. Südhof, B. Gong, K. D. Murray, J. S. Trimmer, *eLife* **2019**, *8*, 1–25.
- [19] G. G. Gross, J. A. Junge, R. J. Mora, H.-B. Kwon, C. A. Olson, T. T. Takahashi, E. R. Liman, G. C. R. Ellis-Davies, A. W. McGee, B. L. Sabatini, R. W. Roberts, D. B. Arnold, *Neuron* **2013**, *78*, 971–985.
- [20] G. Feng, H. TINTRUP, J. Kirsch, M. C. Nichol, J. Kuhse, H. Betz, J. R. Sanes, *Science* **1998**, *282*, 1321–1324.
- [21] H. Bannai, S. Lévi, C. Schweizer, T. Inoue, T. Launey, V. Racine, J. B. Sibarita, K. Mikoshiba, A. Triller, *Neuron* **2009**, *62*, 670–682.
- [22] F. Pfeiffer, R. Simler, G. Grenningloh, H. Betz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7224–7227.

- [23] I. Chamma, M. Letellier, C. Butler, B. Tessier, K. H. Lim, I. Gauthereau, D. Choquet, J. B. Sibarita, S. Park, M. Sainlos, O. Thoumine, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10773.
- [24] L. Berglund, E. Björling, P. Oksvold, L. Fagerberg, A. Asplund, C. A. K. Szgyarto, A. Persson, J. Ottosson, H. Wernérus, P. Nilsson, E. Lundberg, Å. Sivertsson, S. Navani, K. Wester, C. Kampf, S. Hobert, F. Pontén, M. Uhlén, *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 2019–2027.
- [25] J. Ries, C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi, H. Ewers, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 582–584.
- [26] T. Fang, X. Lu, D. Berger, C. Gmeiner, J. Cho, R. Schalek, H. Ploegh, J. Lichtman, *Nat. Methods* **2018**, *15*, 1029–1032.
- [27] V. Khayenko, H. M. Maric, *BIOspektrum* **2021**, *27*, 709–712.
- [28] J. Kapuscinski, *Biotech. Histochem.* **1995**, *70*, 220–233.
- [29] G. Lukinavičius, L. Reymond, E. D'Este, A. Masharina, F. Göttfert, H. Ta, A. Güther, M. Fournier, S. Rizzo, H. Waldmann, C. Blaukopf, C. Sommer, D. W. Gerlich, H. D. Arndt, S. W. Hell, K. Johnsson, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 731–733.
- [30] G. Blum, G. von Degenfeld, M. J. Merchant, H. M. Blau, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 668–677.
- [31] H. M. Maric, T. J. Hausrat, F. Neubert, N. O. Dalby, S. Doose, M. Sauer, M. Kneussel, K. Strømgaard, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 153–160.
- [32] H.-M. Maric, J. Mukherjee, V. Tretter, S. J. Moss, H. Schindelin, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 42105–42114.
- [33] H. M. Maric, V. B. Kasaragod, T. J. Hausrat, M. Kneussel, V. Tretter, K. Strømgaard, H. Schindelin, *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5767.
- [34] J. M. Fritschy, R. J. Harvey, G. Schwarz, *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 257–264.
- [35] J. Kuhse, H. Kalbouneh, A. Schlicksupp, S. Mükusch, R. Nawrotzki, J. Kirsch, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30952–30966.
- [36] P. Prior, B. Schmitt, G. Grenningloh, I. Pribilla, G. Multhaup, K. Beyreuther, Y. Maulet, P. Werner, D. Langosch, J. Kirsch, H. Betz, *Neuron* **1992**, *8*, 1161–1170.
- [37] X. Yang, H. Le Corronc, P. Legendre, A. Triller, C. G. Specht, *EMBO Rep.* **2021**, *22*, e52154.
- [38] N. L. M. Cappaert, N. M. Van Strien, M. P. Witter, *The Rat Nervous System*, Academic Press, New York, **2015**.
- [39] A. Santuy, J. R. Rodríguez, J. DeFelipe, A. Merchán-Pérez, *eNeuro* **2018**, *5*, ENEURO.0377-17.2017.
- [40] C. Silva, N. McNaughton, *Prog. Neurobiol.* **2019**, *177*, 33–72.
- [41] I. M. Khater, I. R. Nabi, G. Hamarneh, *Patterns* **2020**, *1*, 100038.
- [42] S. Culley, K. L. Tosheva, P. Matos Pereira, R. Henriques, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *101*, 74–79.
- [43] L. A. Chu, C. H. Lu, S. M. Yang, Y. T. Liu, K. L. Feng, Y. C. Tsai, W. K. Chang, W. C. Wang, S. W. Chang, P. Chen, T. K. Lee, Y. K. Hwu, A. S. Chiang, B. C. Chen, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4762.
- [44] A. F. L. Schneider, M. Kithil, M. C. Cardoso, M. Lehmann, C. P. R. Hackenberger, *Nat. Chem.* **2021**, *13*, 530–539.
- [45] A. F. L. Schneider, L. S. Benz, M. Lehmann, C. P. R. Hackenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 22075–22080; *Angew. Chem.* **2021**, *133*, 22246–22252.

Manuskript erhalten: 8. Februar 2022

Akzeptierte Fassung online: 14. April 2022

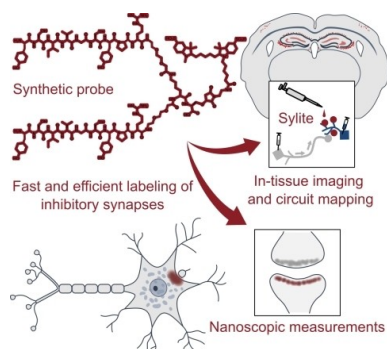
Endgültige Fassung online: ■ ■ ■ ■

## Forschungsartikel

## Fluoreszenzsonden

V. Khayenko, C. Schulte, S. L. Reis,  
O. Avraham, C. Schietroma, R. Worschech,  
N. F. Nordblom, S. Kachler, C. Villmann,  
K. G. Heinze, A. Schlosser, O. Schueler-  
Furman, P. Tovote, C. G. Specht,\*  
H. M. Maric\* \_\_\_\_\_ **e202202078**

Eine vielseitige synthetische Affinitäts-  
sonde zur hochauflösenden Visualisierung hem-  
mender Synapsen und neuronaler Netzwer-  
ke



Es wird eine kompakte synthetische Fluoreszenzsonde zur vereinfachten und kontrastreichen Visualisierung von inhibitorischen Synapsen in Neuronenkulturen und Gehirngewebe vorgestellt. Die Sonde kann flexibel sowohl für die volumetrische Weitfeld- als auch für die konfokale 3D-Visualisierung von Synapsen eingesetzt werden. Darüber hinaus wird ihr Einsatz für die Kartierung von inhibitorischen neuronalen Schaltkreisen im Gewebe und für die hochauflösende Bildgebung von Synapsen demonstriert.