
**Untersuchung Karbohydrat-bindender
Proteine mit hoher zeitlicher und
räumlicher Auflösung**

Dissertation



Antonia Göhler

geboren in Minden

Würzburg, Oktober 2012

GUTACHTER:

Prof. Dr. Markus Sauer, Lehrstuhl für Biotechnologie & Biophysik

Prof. Dr. Jens Pflaum, Lehrstuhl für experimentelle Physik VI

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die Arbeit bisher oder gleichzeitig keiner anderen Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Würzburg, den 09.10.2012

Antonia Göhler

Zusammenfassung

Das menschliche Genom verschlüsselt 30000 bis 40000 Proteine, von denen ein Großteil kovalent gebundene Karbohydrat-Gruppen an Asparagin-, Serin-, Threonin- oder Hydroxylysin-Resten trägt. Diese sogenannten Glykoproteine sind allgegenwärtige Bestandteile der extrazellulären Matrix von Zelloberflächen. Sie steuern Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikationen, können bei der Proteinfaltung helfen bzw. die Proteinstabilität erhöhen oder Immunantworten regulieren. Die Auslösung von biologischen Prozesse erfordert aber Übersetzer der zuckerbasierten Informationen. Solche Effektoren sind die Lektine, unter ihnen auch die Galektine. Galektine binden spezifisch β -Galaktosen, weisen strukturelle Übereinstimmungen in der Aminosäuresequenz ihrer Zuckererkennungsdomänen (CRDs) auf und zeigen ein „jelly-roll“-Faltungsmuster, bestehend aus einem β -Sandwich mit zwei antiparallelen Faltblättern. Strukturell werden die CRDs in drei verschiedenen, topologischen Formen präsentiert. Proto-Typen existieren als nicht-kovalent verknüpfte Dimere der CRDs, Chimera-Typen besitzen neben der CRD eine Nicht-Lektin-Domäne und bei den Tandem-Repeat-Typen sind zwei verschiedene CRDs über ein kurzes Linker-Peptid kovalent verbunden. Galektine werden sowohl in normalem wie auch pathogenem Gewebe exprimiert und das zunehmende Wissen über die Beteiligung an verschiedenen Krankheiten und Tumorwachstum liefert die Motivation, strukturelle Aspekte und die Vernetzung von Lektinen detailliert, insbesondere im Hinblick auf ihre intrafamiliären Unterschiede, zu untersuchen.

Durch die Kombination verschiedener Spektroskopie-Techniken mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung, basierend auf der Verwendung von Fluorophoren (intrinsisch und extrinsisch), werden in dieser Arbeit die Eigenschaften von Galektinen näher untersucht. Mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Anisotropie-Messungen wird gezeigt, dass eine Liganden-Bindung bei Proto-Typ-Galektinen mit einer Verringerung des hydrodynamischen Radius einhergeht. Bei Tandem-Repeat- und Chimera-Typen bleibt der Radius konstant. Dafür skaliert die Diffusionskonstante von Tandem-Repeat-Typen anormal mit der molaren Masse. Die Anisotropie-Messungen werden parallel zu den FCS-Messungen durchgeführt, um einen Einfluss des Fluoreszenzmarkers auszuschließen. Mit Hilfe dieser Technik wird außerdem gezeigt, dass unterschiedliche Dissoziationskonstanten und Kinetiken für den Bindungsprozess innerhalb der

Proto-Typ-Gruppe möglicherweise auf unterschiedliche Konformationsdynamiken zurückgehen. Der Vergleich von hGal-1 und cG-1B verdeutlicht, dass strukturelle Ähnlichkeiten zwar ein identisches Bindungsverhalten hervorrufen können, der Oxidationsprozess der Proteine aber unterschiedlich ablaufen kann. Beide Methoden können so als sehr sensitive Techniken zur Untersuchung von Strukturmerkmalen bei Galektinen etabliert werden, wobei die Übertragbarkeit auf andere Glykoproteine gewährleistet ist.

Weiterhin gilt Quervernetzung als eine der wichtigsten Eigenschaften von Galektinen, da durch die Vernetzung von Glykoproteinen auf der Zelloberfläche Signalwege aktiviert und Immunantworten reguliert werden. Um die räumliche Organisation und Quervernetzung von hGal-1 auf den Oberflächen von Neuroblastomzellen nachzuweisen, eignet sich das hochauflösende Mikroskopieverfahren *d*STORM sehr gut. Durch Verwendung des photoschaltbaren Fluorophors Alexa647 als spezifischem Marker für hGal-1, einem Standard-Weitfeld-Aufbau und verschiedenen Analyseverfahren, kann eine Clusterformation von hGal-1 auf der Zelloberfläche bestätigt werden. hGal-1 bildet Cluster mit einem mittleren Durchmesser von 81 ± 7 nm aus. Der Durchmesser ist unabhängig von der Konzentration, während die Anzahl der Cluster davon abhängt. Für die Clusterbildung ist ein Startpunkt, also eine minimale Dichte der Galektin-Moleküle, notwendig. Durch Blockierung der CRDs mit Laktose wird die Clusterbildung unterdrückt und die Spezifität der CRDs gegenüber β -Galaktosen erneut hergestellt. Anders als dimeres hGal-1 binden Monomere deutlich schlechter an die Membranrezeptoren. Es werden keine Cluster ausgebildet, eine Quervernetzung von Membranrezeptoren ist nicht möglich. Außerdem kann es durch die Monomere zu einer vollständigen Markierung und damit Abkugellung der Zellen kommen. Möglicherweise wird der Zelltod induziert.

Hochauflösende Mikroskopieverfahren sind durch den Markierungsprozess limitiert. Die bioorthogonale Click-Chemie eröffnet jedoch neue Möglichkeiten zur Markierung und Visualisierung von Biomolekülen, ohne die Notwendigkeit genetischer Manipulationen. Es werden modifizierte Zuckermoleküle in die Zellmembranen eingebaut, über eine 1,3-polare Cycloaddition mit einem Alkin markiert und ihre Verteilung mit Hilfe von *d*STORM untersucht. Es wird nachgewiesen, dass die Zuckermoleküle in Clustern auftreten und Click-Chemie trotz dem Katalysator Kupfer an lebenden Zellen durchführbar ist. Die Bewegung der Gesamtcluster wird mittels Mean Square Displacement aufgeschlüsselt und eine Diffusionskonstante für Cluster im Bereich von 40 - 250 nm bestimmt.

Zusammenfassend stellt die Kombination verschiedener Spektroskopie-Techniken ein gutes Werkzeug zur Untersuchung von Karbohydrat-bindenden Proteinen mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung dar und ermöglicht einen neuen Einblick in die Biologie der Galektine.

Summary

The human genome encodes 30,000 to 40,000 proteins of which the majority have covalently linked carbohydrates at the amino acids asparagine, serine, threonine and hydroxylysine. These so called glycoproteins are embedded in the extracellular matrix and presented on cell surfaces. Glycoproteins are important membrane proteins, which are involved in cell-cell or cell-matrix interactions, protein folding or missfolding and the regulation of immune responses. The glycan chains harbour ideal properties for high-density storage of biological information; they are the basis of the sugar code. To translate its structural information into physiological effects the interplay with endogenous lectins is important. Lectins, among them the family of galectins, translate the sugar-based information into biosignaling. Galectins are carbohydrate-binding proteins that bind β -galactosides. They share a core sequence consisting of 130 amino acids, and a β -sandwich fold with two antiparallel β -sheets. Structurally, they are divided into three groups: proto-types exist as non-covalent dimers of two carbohydrate-recognition domains (CRD). The chimera-types have a lectin and a non-lectin domain and tandem-repeat-types contain of two different CRDs covalently linked by a short peptide. They are differentially expressed by various normal and pathological tissues. Due to the documented relation between lectins and different diseases (tumour growth, immune responses) it is important to study structural properties and their cross-linking ability in solution, especially in view of their intrafamily diversification.

Therefore different spectroscopic techniques are used. Intrinsic and extrinsic fluorophores allow fluorescent measurements with high spatial and temporal resolution. Combining FCS and anisotropy measurements structural information about lectins, glycoproteins and their relations are monitored. For prototype galectins the hydrodynamic radius decrease upon ligand binding. Tandem-repeat- and chimera-types do not change their dimensions whereas their diffusion constants, measured with FCS, scale anomalous with the molar mass. Anisotropy measurements are carried out in parallel. Since an intrinsic fluorophore of the protein (tryptophan) is exploited, no labelling is necessary. With the help of this technique I am able to show that different binding constants and kinetics of the binding process within the galectin-family are caused by various

conformational dynamics. Comparing hGal1 and cG-1B, the oxidation processes reveal differences despite of structural and binding similarities. These two techniques are very sensitive and applicable to study structural characteristics of galectins.

Cross-linking between galectins and glycoproteins on the cell surface have been proposed to function as an „on-off“-switch that regulates cell proliferation, differentiation and immune responsiveness. Direct stochastic optical reconstruction microscopy (*d*STORM) provide an opportunity to study the spatial organization and cross-linking ability of hGal-1 interacting with β -galactose specific receptors on the cell surface of neuroblastoma cells. Alexa647, which can be switched reliable between an on- and a very stable off-state, is used as specific galectin marker. Measurements are done on a standard widefield setup and a spot analysis of single molecules in order to resolve clustering and cross-linking of galectins with a spatial resolution of better than 50 nm. The mean cluster size of hGal-1 molecules on the cell surface of neuroblastoma cells is 81 ± 7 nm. The cluster diameter is independent of the protein concentration, a starting point or minimal galectin density for cluster formation is needed and the specificity of the CRDs for galactosides is underlined. Monomeric hGal-1 molecules show a different binding behaviour. On the one hand there are less localizations detectable and on the other hand I find very densely labelled, spherically shaped cells. This can maybe interpreted as hGal1-induced apoptosis.

Existing labeling strategies limitate the value of super-resolution microscopy. The bioorthogonal click-chemistry creates a new field for labeling and visualizing biomolecules in vivo without the requirement of genetic manipulation. By hijacking a cell's biosynthetic machinery, a metabolic precursor functionalized with a bioorthogonal chemical tag is incorporated into target biomolecules, including glycans, lipids, proteins and nucleic acids. Because of this I combine click-chemistry and the super-resolution technique *d*STORM for specific labeling of metabolized sugar molecules. The cluster formation of sugar molecules on living and fixed cells in the presence of copper is being studied. Copper has no negative influence on the living cells. The mean square displacement decode cluster movement and determine cluster diameters in the range of 40 - 250 nm. In summary, we show that a combination of various temporal and spatial high-resolution fluorescence techniques can be used advantageously to obtain new insights into the biology of galectins.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary	VII
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Glykobiologie	1
1.2 Galektine	2
1.3 Zeit- und Ortsaufgelöste Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie	3
2 Theoretische Grundlagen	7
2.1 Grundlagen der Fluoreszenz	7
2.1.1 Absorption und Emission von Licht	7
2.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute, -lebensdauer und -löschung	13
2.1.3 Fluorophore	15
2.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	16
2.2.1 Diffusion	18
2.2.2 Autokorrelation	19
2.2.3 Kreuzkorrelation	22
2.2.4 Grenzen der FCS	23
2.2.5 Bindungskinetik	23
2.3 Fluoreszenz-Anisotropie	25
2.4 Fluoreszenzmikroskopie	30
2.4.1 Klassische Auflösungsgrenze	30
2.4.2 Weitfeld-Mikroskopie	31
2.4.3 Konfokale Mikroskopie	33
2.4.4 Umgehung der Auflösungsgrenze	34
2.4.5 Photoschaltbare Fluorophore	36
2.5 Glykoproteine und Membraneigenschaften	38
2.5.1 Galektine	39
2.5.2 Lipid-Rafts und Mikrodomänen	42

3	Material und Methoden	45
3.1	Ensemble-Messungen	45
3.1.1	Absorptions- und Emissionsmessungen	45
3.1.2	Anisotropie-Messungen	46
3.1.3	Zeitkorrelierte Einzelphotonen-Messungen	46
3.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	47
3.2.1	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	47
3.2.2	Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie	49
3.2.3	Clusteranalyse	51
3.3	Probenpräparation und Pufferbedingungen	53
3.3.1	Protein-Markierungen, Tryptophan-Lösung	53
3.3.2	Zellmarkierungen, Click-Chemie	54
3.3.3	Sauerstoffentzug	56
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	Hydrodynamische Eigenschaften humaner Galektine	57
4.1.1	Diffusion humaner Galektine	57
4.1.2	Tandem-Repeat-Typen: anormale Skalierung der Diffusionskonstante mit der molaren Masse	60
4.1.3	Bindungsstudie von hGal-1 und Laktose	61
4.1.4	Bindungskinetik von hGal-1 an Laktose	64
4.2	Anisotropie-Studien des hGal-1	67
4.2.1	Spektroskopische Charakterisierung des hGal-1	68
4.2.2	Untersuchung des Bindungsverhaltens	71
4.2.3	Abhängigkeit der Tryptophan-Anisotropie von der Viskosität	73
4.3	Strukturänderungen bei Proto-Typen	76
4.3.1	Auswirkung von Oxidationsprozessen	76
4.3.2	Liganden-Bindung verändert die Anisotropie von cG-1B	81
4.3.3	Chicken-Galektine binden Laktose	83
4.4	Räumliche Organisation von hGal-1 auf Zelloberflächen	87
4.4.1	hGal-1 als Photoschalter	87
4.4.2	Clusterformationen auf den Zelloberflächen	88
4.4.3	Monomeres hGal-1 induziert Apoptose	93
4.5	Click-Chemie zur Charakterisierung von Membranstrukturen	96
4.5.1	Hochauflösung zum Nachweis von modifizierten Zuckern in Zelloberflächen	97
4.5.2	Click-Chemie an lebenden Zellen	100
4.5.3	Charakterisierung der Cluster	104

5 Zusammenfassung und Ausblick	109
Literaturverzeichnis	117
Abbildungsverzeichnis	134
Danksagung	135
Curriculum Vitae	137

Abkürzungsverzeichnis

APD	Avalanche Photodiode
BFP	Hintere Fokalebene, Back-Focal Plane
CRD	Zuckererkennungsdomäne, carbohydrate-recognition domain
cG-1B, -1A, -2	Chicken Galektin-1B, -1A, -2
CMOS	Complementary Metal-Oxid Semiconductor
DC	Dichroidischer Strahlteiler
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSTORM	Direkte stochastische, optische Rekonstruktions-Mikroskopie
DTT	Dithiothreitol
(EM)CCD	(Electron Multiplying) Charge-Coupled Device
EPI	Standard-Weitfeld-Ausleuchtung
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FWHM	Halbwertsbreite einer Gauß-Verteilung
GSDIM	Ground state depletion microscopy
GSH	Glutathion
hGal-1	humanes Galektin-1
HILO	Lichtblatt-Mikroskopie
IAA	Iodacetamid
KOH	Kaliumhydroxid
MEA	β -Mercaptoethylamin
PA/FP	Photo-aktivierbare Proteine/fluoreszierende Proteine
PALM	Photoaktivierte Lokalisations-Mikroskopie
PBS	Phosphat-Puffer
PSF	Punktspreizfunktion

SANS	Small Angle Neutron Scattering
SAXS	Small Angle X-Ray Scattering
SIM	Strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie
STED	Stimulated emission depletion
STORM	Stochastische, optische Rekonstruktions-Mikroskopie
TIR	Totale interne Reflexion
Trp	Tryptophan

1 Einleitung

1.1 Glykobiologie

Für die Codierung von biologischen Informationen eignen sich neben Nukleinsäuren, Glykan-Ketten hervorragend. Sie bilden die Grundlage des Zuckercodes [Gabiuss, 2009]. Während die Untereinheiten von Nukleinsäuren und Proteinen immer gleich durch Phosphat- bzw. Peptidbindungen verknüpft werden, ist der Aufbau von Glykanen deutlich komplexer. Biochemische Grundlage des Zuckercodes sind Kohlenstoff und Wasser im stöchiometrischen Verhältnis $C_n(H_2O)_m$, mit $n \geq m$. Über die Position der Carbonylgruppe, die Gesamtzahl der Kohlenstoffatome und die Chiralität werden Monosaccharide klassifiziert. Oftmals werden sie als platzsparendere Di- oder Oligosaccharide synthetisiert. Verknüpft werden Monosaccharide über eine glykosidische α - oder β -Bindung an verschiedene Kohlenstoffatome des angrenzenden Monosaccharids, wodurch lineare oder verzweigte Makromoleküle entstehen können [Varki *et al.*, 2009]. Die Bindung der Kohlenhydratreste an Proteine erfolgt auf verschiedene Arten. O-glykosidisch wird der Zucker an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin, Hydroxyprolin oder Hydroxylysin im Golgi-Apparat gebunden. Bei der N-glykosidischen Bindung, durchgeführt im endoplasmatischen Retikulum, wird der Zucker an den Stickstoff der freien Säureamidgruppe von Asparagin gebunden. N-Glykoside stellen die bedeutendste Gruppe der Glykoproteine dar, und eine Vielzahl der Plasmaproteine, wie auch membrangebundene Proteine zählen dazu. Die Biosynthese von Glykokonjugaten fasst Abbildung 1.1 zusammen [Bertozzi & Kiessling, 2001]. Exogene Monosaccharide werden in die Zelle geschleust und zu Nukleosid-Zuckern, sogenannten „building blocks“, umgebaut. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat werden sie durch Glykosyltransferasen zu Oligosacchariden verknüpft und glykosiliert. Die fertigen Glykoproteine werden anschließend in die Zellmembran eingebettet und fungieren als Rezeptoren für Liganden anderer Zellen.

Protein-Karbohydrat- und Karbohydrat-Karbohydrat-Wechselwirkungen kontrollieren viele Aspekte intra- und interzellulärer Kommunikation. Die Auslösung biologischer Prozesse erfordert aber Übersetzer der zuckerbasierten Informationen in Biosignale. Solche Effektoren sind die Lektine [Villalobo *et al.*,

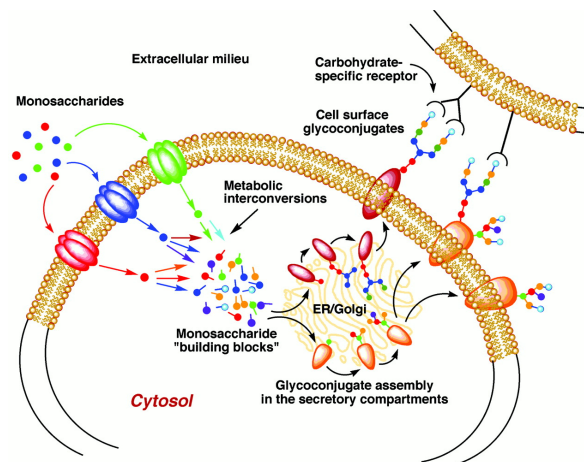


Abbildung 1.1: Biosynthese von Glykokonjugaten. Exogene Monosaccharide werden in die Zelle geschleust und zu Nucleosid-Zuckern („building blocks“) umgebaut. Im endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat werden sie durch Glykosyltransferasen zu Oligosacchariden verknüpft und über eine glykosidische Bindung an Proteine gebunden. Die fertigen Glykoproteine werden in die Zellmembran eingebettet und fungieren als Rezeptoren für Liganden anderer Zellen. Aus [Bertozzi & Kiessling, 2001].

2006], bei denen schon feine strukturelle Modifikationen zu einer veränderten Reaktivität führen, wie exemplarisch für Galektine gezeigt wurde [André *et al.*, 2007]. Das zunehmende Wissen über die Beteiligung von endogenen Lektinen an verschiedenen Krankheiten (Tumorstadium, Immunantworten) [Sperandio *et al.*, 2009] liefert die Motivation, strukturelle Aspekte und die Vernetzung von Lektinen detailliert, insbesondere im Hinblick auf ihre intrafamiliären Unterschiede, zu untersuchen.

1.2 Galektine

Proteine, die Erythrozyten agglutinieren, sind seit Anfang des 19ten Jahrhunderts bekannt. Um 1960 stellte sich heraus, dass sie auch andere Zelltypen agglutinieren und eine hohe Zuckerspezifität aufweisen [Sharon & Lis, 2004b]. Bezeichnet werden sie als Lektine. Sie decken einen weiten Bereich Karbohydrat-bindender Proteine und Glykoproteine bei Viren, Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren ab. Meistens handelt es sich um Homooligomere oder Heterooligomere nicht-kovalent verknüpfter Polypeptid-Untereinheiten mit Karbohydrat-Erkennungsdomänen (CRD) [Vasta, 2009]. Während der spezifischen Liganden-

Bindung ändern sie ihre kovalente Struktur nicht, sie übernehmen keine enzymatischen Aktivitäten [Gabijs *et al.*, 2011]. Lektine haben ein breites Spektrum an Aufgaben [Sharon, 2008] und werden in fünf verschiedene Gruppen unterteilt: C-, I- und P-Typ-Lektine, Pentraxine und die erstmals 1994 definierten Galektine [Barondes *et al.*, 1994a]. Mitglieder der Galektin-Familie zeichnen sich durch zwei Merkmale aus: strukturelle Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz ihrer CRDs und eine hohe Affinität für β -Galaktosen. Bis heute wurden 15 Galektine identifiziert, die durch fortlaufende Nummerierung benannt sind [Barondes *et al.*, 1994b]. Strukturell werden die CRDs der Galektin-Familie in drei verschiedenen topologischen Formen präsentiert. Die Proto-Typen (hGal-1, -2, -5, -7, -10, -13 und -14) existieren als Monomer oder als nicht-kovalentes Dimer einer CRD. Tandem-Repeat-Typen (-4, -6, -8, -9, -12) haben zwei verschiedenen CRDs, die über ein kurzes Peptid verknüpft sind und der Chimera-Typ hGal-3 hat eine CRD und eine Nicht-Lektin-Domäne [Hughes, 2001]. Das bekannteste Mitglied der Familie ist das humane Galektin-1. Es tritt sowohl als Monomer wie auch als nicht-kovalent verknüpftes Dimer in Erscheinung. Das Dimer wird durch Wechselwirkungen an den Berührungsflächen der Monomere und die Ausbildung eines hydrophoben Kerns stabilisiert [López-Lucendo *et al.*, 2004]. hGal-1 zeigt das für Galektine typische „jelly-roll“-Faltungsmuster, bestehend aus einem β -Sandwich mit zwei antiparallelen β -Faltblättern. Ihre Beteiligung in Organismen kann sowohl bei intrazellulären als auch extrazellulären Aufgaben nachgewiesen werden. Sie zeigen Kennzeichen cytosolischer Proteine, einen acetylierten N-Terminus und eine mangelhafte Glykosylierung [Leffler *et al.*, 2002] und tragen zu Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen bei, indem sie an Glykoproteine (z.B. Integrin, Laminin, Fibronectin, CD_x-Rezeptoren oder GM1 Ganglioside) auf der extrazellulären Matrix binden [Camby *et al.*, 2006]. Typische Bindungspartner von hGal-1 sind zum Beispiel Typ I Gal β 1,3GlcNac- oder Typ II Gal β 1,4GlcNac-Einheiten sowie Polylaktosamin-Ketten [Hughes, 2001]. Quervernetzung ist demnach eines der wichtigsten Kennzeichen der Lektin-Aktivität und es ist unerlässlich die Eigenschaften dieser Galektine sowohl *in vitro* als auch auf Zelloberflächen zu untersuchen. Geeignete Analysemethoden kommen dabei aus dem Bereich der Fluoreszenz-Spektroskopie.

1.3 Zeit- und Ortsaufgelöste Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie

In den letzten 20 Jahren hat die Bedeutung und Anwendung von Fluoreszenz-techniken auffallend stark zugenommen. Neben den Bereichen der Biochemie

und Biophysik gibt es immer umfangreichere Anwendungen in der Biotechnologie, Flusszytometrie und bei medizinischen Diagnoseverfahren, da zur zeitlichen und räumlichen Untersuchung biologischer Proben und Prozesse nicht-invasive, hoch sensitive und vor allem selektive Techniken benötigt werden.

Eine zeitaufgelöste Analyse von Ensembleeigenschaften mit Einzelmolekülempfindlichkeit erlaubt zum Beispiel die **Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)**. Diese basiert auf der statistischen Analyse von Fluoreszenzfluktuationen in Systemen im thermischen Gleichgewicht. Spontane Zustandsänderungen des zu untersuchenden Systems oder thermische Fluktuationen können so direkt in der zeitlichen Änderung des Fluoreszenzsignals wahrgenommen werden [Krichevsky & Bonnet, 2002].

Eingeführt wurde die FCS-Technik in den frühen siebziger Jahren, um die Diffusion von Ethidiumbromid-Molekülen und deren Bindung an doppelsträngige DNA zu untersuchen [Elson & Magde, 1974], [Magde, 1978]. Allerdings war die Sensitivität zu diesem Zeitpunkt noch durch große Beobachtungsvolumina und wenig empfindliche Sekundärelektronenvervielfacher als Detektoren begrenzt, so dass hohe Fluorophor-Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Durch die Entwicklung von konfokalen Mikroskopen mit kleineren Beobachtungsvolumina, stabileren Laserquellen und sehr effektiven Einzel-Photonendetektoren, rückte die FCS in den neunziger Jahren wieder mehr in den Vordergrund [Rigler *et al.*, 1993]. So ermöglichen neue Autokorrelationsanalysen heute die Aufklärung von dynamischen Prozessen. Diffusionskonstanten, Konzentrationen, Konformationsänderungen und hydrodynamische Eigenschaften von Biomolekülen, chemische Übergangsraten und Rotationsdynamiken werden untersucht [Schwille, 2004], [Dertinger *et al.*, 2007], [Neuweiler, 2007], [Göhler *et al.*, 2010].

Ein Schwachpunkt bei FCS-Messungen ist jedoch die Notwendigkeit von Fluorophoren. Durch die Ausnutzung intrinsischer Proteineigenschaften wie Tryptophan-Fluoreszenz in Kombination mit alternativer Spektroskopie kann dies jedoch umgangen werden. Eine nützliche Eigenschaft des Tryptophan-Indolrings stellt dabei seine hohe Sensitivität gegenüber der lokalen Umgebung und dem Lösungsmittel dar und der relativ hohe Extinktionskoeffizient [Lakowicz, 2006]. Weiterhin hat der Indolring zwei sehr nahe beieinander gelegene, auf einander senkrecht stehende Übergangsdipolmomente 1L_a und 1L_b [Callis, 1997]. Wird Tryptophan also mit polarisiertem Licht angeregt, dann ist auch die Fluoreszenzemission polarisiert. Bei der Messung der **Fluoreszenz-Polarisation** handelt es sich um eine etablierte Methode zur Untersuchung von Bindungsvorgängen [Kakehi *et al.*, 2001], basierend auf den verschiedenen Übergangsdipolmomenten für Absorption und Emission des Fluorophors.

Beobachtet wurde Polarisation erstmals 1808 von Malus bei der Reflexion von

Licht an einem rotierenden Kalkspat-Kristall. Mit Anisotropie wird demnach die mittlere, winkelabhängige Richtungsänderung des Fluorophor-Dipols, abhängig von der Lebensdauer des angeregten Zustandes und den Übergangsraten, der Viskosität des Lösungsmittels und der Flexibilität des Moleküls an sich, beschrieben [Malus, 1809]. Um 1920 wurde polarisierte Fluoreszenz von Farbstoffen nachgewiesen [Weigert, 1920] und untersucht [Vavilov & Levshin, 1923]. Fluoreszenz-Polarisations-Immunoassays sind die moderne Anwendung von Polarisations-Messungen [Eremin & Smith, 2003], [Jolley *et al.*, 2007]. Auch Denaturierungsvorgänge in Proteinen, Bindungen an andere Makromoleküle und Proteindynamiken können somit untersucht werden [Rami *et al.*, 2003], [Fa *et al.*, 1995].

Zur Untersuchung von zellulären Aspekten, wie der Quervernetzung von Oberflächen, eignen sich FCS- und Anisotropie-Messungen nicht, da ihnen die Möglichkeit der Bildgebung fehlt. Unter dem Namen Lumineszenzmikroskopie wird Anfang des 20. Jahrhunderts ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren eingeführt, das Untersuchungen mit hohem Kontrast erlaubt. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wird das Signal-zu-Rausch-Verhältnis stark verbessert und durch die heutige Vielfalt biologischer Markern ist es möglich, nahezu jede biologische Zielstruktur hochspezifisch zu markieren und somit zu beobachten. Allerdings ist die konventionelle Lichtmikroskopie beugungsbegrenzt, was theoretisch von Abbe [Abbe, 1873] und Rayleigh [Rayleigh, 1896] formuliert wird. Zwei punktförmige Lichtquellen können nur dann getrennt aufgelöst werden, wenn das Airy-Zentrum der PSF eines Objektes in das erste Minimum der PSF des anderen Objektes fällt. Es gilt

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}, \quad (1.1)$$

wobei λ die Wellenlänge und NA die numerische Apertur ist. Bei Arbeiten mit sichtbarem Licht ist es demnach nicht möglich eine Auflösung unter 200 nm zu erreichen. Zelluläre Strukturen und Cluster auf Zelloberflächen liegen im Bereich von 10 - 200 nm [Simons & Van Meer, 1988] sind somit nicht auflösbar. Daher werden seit Mitte des 20sten Jahrhunderts verschiedene Konzepte entwickelt, um die klassische Auflösungsgrenze zu umgehen. Diese beruhen alle auf den photophysikalischen Schalteigenschaften der Fluorophore und können in zwei generelle Klassen eingeteilt werden [Toomre & Bewersdorf, 2010]. Beim ersten Ansatz werden die einzelnen Emitter durch zeitliche und räumliche Einengung direkt separiert. Beispiele hierfür sind die STED-Mikroskopie [Wichmann & Hell, 1994] und die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie [Gustafsson, 2000]. Bei Verfahren wie PALM [Betzig *et al.*, 2006] oder STORM [Rust *et al.*,

2006] findet die räumlich und zeitliche Trennung der Fluorophore statistisch statt. Diesen Methoden liegt eine Weitfeld-Anregung zu Grunde, die Fluoreszenz wird mit einer sensitiven CCD-Kamera detektiert und ein hochaufgelöstes Bild entsteht genau dann, wenn innerhalb der Detektionsfläche nur wenig Fluorophore gleichzeitig emittieren. Die Lokalisationsungenauigkeit hängt dabei von der Helligkeit des Fluorophors ab und bewegt sich im Bereich einiger Nanometer [Thompson *et al.*, 2002], [Yildiz *et al.*, 2003]. Mit geeigneter Lokalisationssoftware können Auflösungen im Bereich von einigen Nanometern erreicht werden [Wolter *et al.*, 2010].

Eine Vereinfachung der STORM-Technik ist **dSTORM** [Heilemann *et al.*, 2008], basierend auf der Verwendung kommerzieller, photoschaltbarer Fluorophore, die direkt zwischen einem langlebigen Dunkelzustand und einem fluoreszenten An-Zustand geschaltet werden können. Diese Technik findet auch hier Anwendung zur bildlichen Veranschaulichung von Wechselwirkungen zwischen hGal-1 und Zelloberflächen von Neuroblastomen. Durch geeigneter Schaltpuffer mit Thiolen (β -Mercaptoethylamin, Glutathion) wird der Triplett-Zustand des Fluorophors reduziert und Radikalanionen, mit Lebenszeiten von Minuten bis hin zu Stunden, generiert. Kontrolliert wird die Lebenszeit des Radikalanions durch Rücktransfer in den Grundzustand entweder durch Oxidation oder direkte Anregung [van de Linde *et al.*, 2011b].

Die Kombination dieser drei unterschiedlichen Techniken, die jedoch alle auf der Verwendung von Fluorophoren (extrinsische oder intrinsische) basieren, erlaubt einen neuen und sehr umfangreichen Blick auf Glykoproteine. Ziel dieser Arbeit ist es, hydrodynamische und Quervernetzungs-Eigenschaften der Adhäsions- und Wachstums-regulierenden Galektine auf verschiedene Arten zu untersuchen und zu klassifizieren. Folgende Fragen sollen beantwortet werden: Können sequenzielle und strukturelle Ähnlichkeiten innerhalb und zwischen zwei verschiedenen Familien auch im Bindungsverhalten und dem Oxidationsprozess nachgewiesen werden? Treten bei der Liganden-Bindung Konformationsänderungen innerhalb des Proteins auf? Wie wirkt sich der Linker in der Struktur von Tandem-Repeat-Typen aus? Kann die Quervernetzungsfähigkeit auf Zelloberflächen von hGal-1 bestätigt werden? Außerdem wird eine moderne Technik, die Click-Chemie [Kolb *et al.*, 2001], als spezifische Markierungsmethode mit der optischen Hochauflösung kombiniert, um die Verteilung von metabolisierten Zuckern [Homann *et al.*, 2010] in der Zellmembran zu untersuchen.

2 Theoretische Grundlagen

Um einzelne Proteine zeitlich und räumlich zu beobachten eignen sich verschiedene, spektroskopische Techniken, wie zum Beispiel Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (Kapitel 2.2) oder bildgebende Mikroskopieverfahren (Kapitel 2.4). Dabei basieren alle diese Techniken auf der Verwendung von Fluorophoren. Auf Grund ihrer hohen Sensitivität und Selektivität, wie auch der Tatsache, dass Fluoreszenzmarker weitestgehend nicht-invasiv sind, gehören sie zu den wichtigsten Werkzeugen zur Untersuchung von biologischen Proben wie zum Beispiel Polymeren, Proteinen, anorganischen Materialien oder Zellen und Gewebe. Das grundlegende Prinzip der Fluoreszenz und ihre besonderen Charakteristika, so wie die verschiedenen spektroskopischen Verfahren sollen hier genauer erklärt werden. Zusätzlich werden in Kapitel 2.5 die Familie der Kohlenhydrat-bindenden Galektine, Membraneigenschaften und Lipid Rafts näher vorgestellt.

2.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Erste Beobachtungen zur Fluoreszenz stammen von Stokes (1852). Er erkannte den Unterschied zwischen Lichtstreuung und Fluoreszenz, als er bei der Bestrahlung von Flussspat mit ultraviolettem Licht „*die dabei stattfindende Veränderung der Lichtwellenlänge bemerkte*“ [Förster, 1982]. Die Verschiebung zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge wird als Stokes-Shift bezeichnet.

2.1.1 Absorption und Emission von Licht

Wechselwirkt Licht mit Materie hat Licht in der klassischen Betrachtungsweise sowohl Welleneigenschaften, wie Beugung und Interferenz, als auch Teilcheneigenschaften, wie Streuung. Diese Doppelnatur des Lichts wird als Welle-Teilchen-Dualismus bezeichnet. Während die Ausbreitung von Elektronen und anderen Teilchen durch die Welleneigenschaften beschrieben wird, müssen für den Austausch von Energie die Teilcheneigenschaften berücksichtigt werden.

Licht als elektromagnetische Welle lässt sich durch seine Frequenz ν bzw. Wellenlänge λ charakterisieren. Die Verknüpfung dieser beiden Größen erfolgt dabei über die Vakuumlichtgeschwindigkeit c . Es gilt:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}. \quad (2.1)$$

Nach Planck und Einstein ist die Energie eines "Lichtteilchens" oder Photons quantisiert und kann sich nur um ganzzahlige Vielfache der Energie ändern. Für die Energie eines Photons gilt:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.2)$$

mit dem Planck'schen Wirkungsquantum h . Aufgelöst wird das Problem des Welle-Teilchen-Dualismus durch die Quantenmechanik, wo jedes Teilchen durch eine Wellenfunktion beschrieben wird. Diese Wellenfunktion ist komplexwertig und somit keine Messgröße. Lediglich das Betragsquadrat der Wellenfunktion liefert eine Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens und kann im Experiment bestimmt werden. Zeitliche Änderungen des Aufenthaltsortes werden dabei durch die Schrödingergleichung angegeben. In vielen Fällen führt aber auch die klassische Betrachtung schon zu korrekten Ergebnissen.

Unabhängig von der Betrachtungsweise kann man einem Teilchen mit endlichem Impuls p eine Wellenlänge, die de Broglie-Wellenlänge λ_B , zuordnen

$$\lambda_B = \frac{h}{p} \quad (2.3)$$

mit dem Impuls $p = h\lambda^{-1} = h\nu c^{-1}$. Licht kann also eindeutig durch seine Frequenz und Wellenlänge beschrieben werden. Dabei wird vom menschlichen Auge nur ein sehr schmaler Bereich zwischen 380 nm und 780 nm wahrgenommen.

Nehmen Atome Licht/Photonen auf, spricht man von Absorption. Für einzelne Atome entstehen durch die Energiequantisierung diskrete Linienspektren. Die Spektren von Molekülen sind dagegen deutlich komplexer. Hier gibt es neben den elektronischen Zuständen noch Schwingungs- und/oder Rotationszustände, deren Besetzung von der absorbierten Energie abhängt. Diese Zustände entstehen durch die Gesamtrotation des Moleküls und der Vibration der einzelnen Atome im Molekül. Um ein Molekül aus dem Grundzustand S_0 in einen höheren, angeregten Zustand S_1 zu überführen, muss es mindestens die Energiedifferenz $\Delta E = E_{S_1} - E_{S_0} = \frac{hc}{\lambda}$ der beiden Zustände aufnehmen. λ ist die

Wellenlänge des absorbierten Photons. Die Energiemengen für die Übergänge unterscheiden sich dabei um mehrere Größenordnungen. Für elektronische Übergänge liegt die erforderliche Energiedifferenz im Bereich von 1-5 eV, für Vibrationsübergänge bei 0,1 - 0,4 eV und für Rotationszustände lediglich bei 10^{-3} eV. Folglich sind bei Raumtemperatur nach Boltzmann bereits höhere Rotationsniveaus besetzt (mit der Boltzmann-Konstante k_B und der Temperatur T gilt $E = k_B T = 0.025 eV$), während Vibrationszustände erst bei viel höheren Temperaturen besetzt werden. Zu jedem Schwingungszustand gehören also mehrere Rotationszustände. In den Absorptionsspektren von Molekülen können demnach breite Absorptionsbanden beobachtet werden.

Nach der Boltzmann-Statistik sind alle weiteren elektronischen Niveaus nahezu unbesetzt:

$$\frac{N_{S_0}}{N_{S_1}} = e^{-\Delta E / k_B T}. \quad (2.4)$$

N_{S_0} und N_{S_1} sind die Moleküle im Grundzustand S_0 und im angeregten Zustand S_1 , k_B ist die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur in Kelvin. Damit ein Molekül ein Photon absorbieren kann, muss es vorübergehend ein Dipolmoment besitzen. Der Feldstärkevektor der elektromagnetischen Welle muss parallel zum elektronischen Übergangsmoment des Moleküls sein. Außerdem sind nur solche Übergänge erlaubt, die sowohl Energie als auch Drehimpuls erhalten. Dies sind sogenannte Dipolübergänge. Quantenmechanisch gilt für die Übergangsrate zwischen den Zuständen nach Fermis Goldener Regel:

$$P_{n \rightarrow m} = \frac{2\pi}{\hbar} |H_{nm}|^2 \rho_m(E) = \frac{2\pi}{\hbar} \rho_m |\langle m | V | n \rangle|^2. \quad (2.5)$$

$P_{n \rightarrow m}$ ist die Übergangsrate vom Zustand $|n\rangle$ in den Zustand $|m\rangle$ mit der Zustandsdichte ρ_m im Endzustand und dem Matrixelement H_{nm} . Dieses lässt sich schreiben als:

$$H_{nm} = \int \varphi_n^*(\vec{r}) e \vec{p} \vec{A} \varphi_m(\vec{r}) dV \quad (2.6)$$

mit dem Impulsoperator \vec{p} und dem Vektorpotential \vec{A} . Wird das Matrixelement H_{nm} nach ebenen Wellen zerlegt, so wird deutlich, dass die Übergangswahrscheinlichkeit für einen Dipolübergang am größten ist. Der Übergang ist verboten, wenn der Dipolterm und damit das Matrixelement verschwindet. Quadrupol-, Oktupol-...-term können aber mit einer geringen Wahrscheinlichkeit noch existieren.

Eine Zusammenfassung aller elektronischen Übergänge, hervorgerufen durch die Absorption von Licht, stellt das Franck-Condon-Prinzip dar (siehe Abbildung 2.1) [Condon, 1928]. Das Molekül wird aus dem elektronischen Grundzustand S_0 mit der Energie E_0 in einen angeregten, energetisch höher gelegenen Zustand S_1 mit der Energie E_1 gehoben, wobei die Zustände durch Potentialkurven beschrieben werden. Diese sind Funktionen der Kern-Kern-Abstände. Aus der Born-Oppenheimer-Näherung folgt, dass elektronische und vibronische Übergänge so schnell stattfinden ($\approx 10^{-15} s$), dass die Änderung der Kernabstände auf Grund von Schwingungen ($\approx 10^{-12} s$) vernachlässigt werden kann.

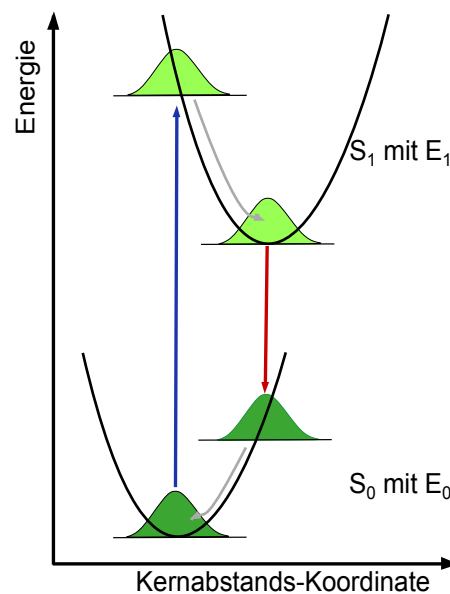


Abbildung 2.1: Nach dem Franck-Condon-Prinzip ist die Potentialkurve des Grundzustandes gegenüber dem angeregten Zustand verschoben, da sich die Elektronenkonfiguration während des Übergangs verändert. Bedingt durch die geringe Masse des Elektrons finden Absorptionsprozesse im Bereich von $10^{-15} s$ statt. In dieser Zeit bleiben die Kernabstände gleich. Eine Anregung erfolgt in senkrechter Linie aus dem Grundzustand in den angeregten Zustand. Im Anschluss finden verschiedene Deaktivierungsprozesse statt.

Übergänge treten am wahrscheinlichsten auf, wenn sich die Kerne an ihren Umkehrpunkten befinden und der Kernabstand während des Übergangs gleich bleibt. Klassisch bedeutet dies, dass die Geschwindigkeit während des Übergangs für beide Zustände gleich sein muss. Die quantenmechanische Beschrei-

bung besagt, dass die Wellenfunktionen so wenig wie möglich verzerrt sind. Aus der Boltzmann-Verteilung folgt, dass elektronische Übergänge immer in senkrechter Linie stattfinden. Für den Grundzustand aus der Mitte, da hier die höchste Besetzung vorliegt und für höher angeregte Zustände ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Elektronen am Rand der Potentialkurven am wahrscheinlichsten. Moleküle in angeregten Energiezuständen sind thermodynamisch nicht stabil. Im Anschluss an die Absorption kommt es zu einer Relaxation des Elektrons in den niedrigsten S_1 -Zustand und danach weiter in den niedrigsten Zustand des Grundzustandes. Dieser Vorgang wird als Emission bezeichnet und kann unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons erfolgen. Relaxationen zurück in den Grundzustand können dabei strahlungslos oder unter Aussendung von Licht stattfinden. Eine vereinfachte Darstellung der elektronischen Übergänge in einem Molekül zeigt das Jablonski-Diagramm (Abbildung 2.2). Rotationsübergänge werden zu Gunsten der Übersichtlichkeit nicht eingezeichnet.

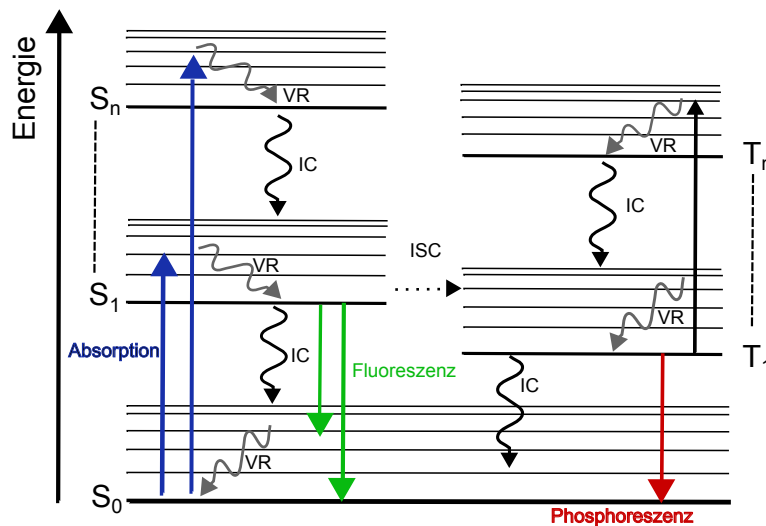


Abbildung 2.2: Das Jablonski-Diagramm veranschaulicht alle möglichen elektronischen Übergänge zwischen den verschiedenen Zuständen eines Moleküls. Nach der Absorption eines Photons kehrt das Molekül aus den angeregten Singulett-Zuständen S_1 und S_2 durch innere Umwandlung IC, Schwingungsrelaxation VR oder Interkombinationsübergänge ISC in den Grundzustand zurück. Dies geschieht entweder unter Aussendung eines Photons (Fluoreszenz) oder strahlungslos. Phosphoreszenz findet aus dem angeregten Triplett-Zustand T_1 statt.

Durch die Absorption eines Photons gelangt das Molekül oder Fluorophor in einen höher angeregten Zustand S_1 oder S_2 . Durch Stöße mit den umgebenden

Lösungsmittelmolekülen relaxiert es in $\sim 10^{-12}s$ in den S_1 - Zustand (Innere Umwandlung IC). Durch Schwingungsrelaxationen (VR) gelangt das Fluorophor dann in den niedrigsten Schwingungszustand des S_1 - Zustandes. Nach der Kasha-Regel kehrt das Fluorophor unter Aussendung eines Photons vom niedrigsten S_1 - Zustand in irgendeinen Schwingungszustand des Grundzustandes zurück, mit anschließender Relaxation in den niedrigsten Schwingungszustand des Grundzustandes. Abbildung 2.1 zeigt bereits, dass die Emissionswellenlänge gegenüber der Absorptionswellenlänge rotverschoben ist. Diese Verschiebung wird als Stokes-Shift bezeichnet und beträgt in der Regel 20 - 50 nm, hervorgerufen durch Energieverluste bei der inneren Umwandlung. Einflüsse der umgebenden Lösung, Reaktionen im angeregten Zustand, sowie Komplexbildungen oder Energietransfer verstärken die Verschiebung.

Durch Interkombinationsübergänge (ISC) kann das Molekül in den Triplett-Zustand übergehen. Während der Elektronenspin bei Fluoreszenzübergängen die ganze Zeit antiparallel orientiert bleibt, ist er bei Interkombinationsübergängen im höchsten besetzten Molekülorbital (HOMO) parallel zum Spin des zweiten Elektrons im niedrigsten besetzten Orbital (LUMO). Die Multiplizität ändert sich von 1 auf 3. Nach dem Pauli-Prinzip ist dies ein spin-verbotener Übergang. Die Besetzung des Triplett-Zustandes T_1 ist aber auf Grund der Spin-Bahn-Kopplung mit einer geringen Wahrscheinlichkeit möglich. Unter erneutem Spin-Umklapp und unter Aussendung eines Photons (Phosphoreszenz) kann das System in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Gekennzeichnet ist die Phosphoreszenz durch langsamere Abklingzeiten im Bereich von $10^{-4} - 1s$. Dieser langlebige Triplett-Zustand ist ein idealer Ausgangspunkt um durch Redox-Reaktionen einen langlebigen Dunkelzustand zu generieren.

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über alle möglichen Deaktivierungsprozesse [Sauer *et al.*, 2011].

Tabelle 2.1: Zeitliche Übersicht über Absorptions- und Emissionsprozesse im Molekül

Übergang	Bezeichnung	Dauer [s]
$S_0 \rightarrow S_1 \dots S_n$	Absorption	10^{-15}
$S_n \rightarrow S_1$	Innere Umwandlung	$10^{-14} - 10^{-10}$
$S_1 \rightarrow S_1$	Schwingungsrelaxation	$10^{-12} - 10^{-10}$
$S_1 \rightarrow S_0$	Fluoreszenz	$10^{-9} - 10^{-8}$
$S_1 \rightarrow T_1$	Interkombinationsübergang	$10^{-10} - 10^{-8}$
$T_1 \rightarrow S_0$	Phosphoreszenz	$> 10^{-6}$

2.1.2 Fluoreszenzquantenausbeute, -lebensdauer und -löschung

Wichtige Größen zur Beschreibung von Emissionsprozessen und der Auswahl möglicher Fluorophore sind die Quantenausbeute ϕ_f und die Lebensdauer τ_f .

Die **Quantenausbeute** eines Fluorophores ist das Verhältnis von emittierten Photonen zu absorbierten Photonen und kann mittels den Raten zur Depopulierung des angeregten S_1 - Zustandes beschrieben werden. k_r beinhaltet die radiativen und k_{nr} alle nicht-radiativen Prozesse, wie die innere Umwandlung, Interkombinationsübergänge und andere Löschprozesse.

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (2.7)$$

Fluoreszenzlöschung kann durch eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen benachbarten Molekülen ausgelöst werden. Dazu zählen jegliche Prozesse, die eine nicht-radiative Depopulierung des angeregten Zustandes und damit eine Reduzierung der Quantenausbeute zur Folge haben ohne das Fluorophor zu zerstören. Es entsteht kurzfristig ein Komplex zwischen dem Fluorophor und dem Löschpartner, wodurch es zu einer Änderung der Energieniveaus und der Emissionswellenlänge kommt. Ist diese neue Molekülverbindung im angeregten Zustand vorübergehend stabil, bevor sie in die Grundzustände der entsprechenden Moleküle zerfällt, wird von einer Exciplexbildung gesprochen. Die unterschiedlichen Prozesse variieren in ihrer Effizienz und sind stark abstandsabhängig. Grundsätzlich gibt es zwei Modelle: statische Löschungen durch Komplexbildungen, die die Gesamtfluoreszenz beeinflusst, und die dynamische Löschungen durch Stöße, die die Gesamtintensität des Ensembles verringern.

Beim Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) wird die Energie eines angeregten Fluorophors (Donor) strahlungsfrei mittels langreichweitiger Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein zweites, sogenanntes Akzeptor-Molekül übertragen [Förster, 1948]. Die FRET-Effizienz hängt dabei vom Abstand zwischen Donor- und Akzeptormolekül ab, der 2 - 10 nm betragen sollte, dem spektralen Überlapp zwischen dem Absorptionsspektrum des Donors und dem Emissionsspektrum des Akzeptors und der Orientierung der jeweiligen Dipolmomente. Ein weiterer Löschmechanismus ist der sogenannte photoinduzierte Elektronentransfer (PET). Es wird ein Elektron von einem angeregten Molekül auf ein zweites Molekül im Grundzustand übertragen. Dabei hängen Transferrichtung, Effizienz und Geschwindigkeit der Übertragung von Faktoren wie den Redoxpotentialen, der relativen Orientierung der Moleküle und deren Abstand ab.

Die Kontrolle von Löschprozessen ist Grundlage hochauflösender Mikroskopietechniken wie STED, STORM, *d*STORM oder GSDIM. Moleküle werden stabil und reversibel zwischen einem fluoreszierenden „An“- und einem nicht-fluoreszierenden „Aus“- Zustand hin- und hergeschaltet [Sauer, 2005]. So wirkt Sauerstoff als Quencher für Triplett-Zustände von organischen Farbstoffen. Sauerstoff tritt in der Natur hauptsächlich in Form eines kovalent gebundenen Homodimers O_2 auf. Der Aufbau dieser Verbindung lässt sich dabei mit der Molekülorbitaltheorie erklären [Meyer-Kuckuk, 1997]. Die s- und p-Orbitale der beteiligten Atome werden vermischt und spalten sich in bindende σ_s und anti-bindende σ_s^* Molekülorbitale auf. Die 1s- und 2s-Orbitale des Sauerstoffatoms werden vollständig mit sechs, der insgesamt 14 vorhandenen, Elektronen aufgefüllt und tragen daher nicht zur Bindung bei. Die 2p-Orbitale werden zu insgesamt sechs, also 3 bindende $\sigma_{p-}, \pi_{x-}, \pi_{y-}$ und 3 anti-bindende $\sigma_{p-}^*, \pi_{x-}^*, \pi_{y-}^*$, Molekülorbitalen mit unterschiedlichen Energien, wobei π - Orbitale gleiche Energien haben. Die letzten acht Elektronen des Sauerstoffs werden dann auf diese Orbitale verteilt: sechs füllen die bindenden und zwei die anti-bindenden auf. Nach den Hund'schen Regeln zur Auffüllung von Molekülorbitalen müssen die Spins der beiden ungepaarten Valenzelektronen parallel sein. Sauerstoff liegt im Grundzustand als Triplett-System 3O_2 vor und ist sehr reaktionsträge, kann aber in den reaktiveren Singulett-Zustand 1O_2 überführt werden. Dies geschieht, indem ein organisches Farbstoffmolekül auf Grund von Interkombinationsübergängen in seinen Triplett-Zustand angeregt wird und dann mit dem Triplett-Sauerstoff reagiert, die Orbitale überlappen und durch Stöße Energie übertragen wird. Sauerstoff geht strahlungslos in den Singulett-Zustand über.

Fluoreszenzlebensdauer τ_f heißt die mittlere Zeit, die ein Fluorophor im angeregten S_1 - Zustand verweilt, bevor es unter spontaner Emission eines Photons wieder in den Grundzustand S_0 zurückkehrt.

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}}. \quad (2.8)$$

Die Besetzungsänderung des S_1 - Zustandes wird durch

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{nr})N(t) \quad (2.9)$$

beschrieben. Wenn die Anzahl der angeregten Moleküle $N(t)$ proportional zur messbaren Fluoreszenzintensität $I(t)$ ist, liefert eine Integration zwischen $t = 0$ und t einen mono-exponentiellen Abfall, wie bei radioaktiven Zerfällen

$$I(t) = I_0 \cdot e^{-(k_r+k_{nr})t} = I_0 \cdot e^{(-\frac{t}{\tau_f})}. \quad (2.10)$$

Die Messung der Lebensdauer erfolgt durch „Zählen“ der emittierten Photonen (TCSPC, engl. *time-correlated single photon counting*). Die Fluorophore werden mit einem gepulsten Laser angeregt, der die Zeitmessung startet. Gestoppt wird sie durch das emittierte Photon. Durch Wiederholung dieser Messung und die zeitliche Korrelation der Photonen entsteht ein Histogramm, indem die Photonen nach ihrer gemessenen Lebenszeit einsortiert werden. Typischen Klassenbreiten sind 1 bis 50 ps. Es ergibt sich ein exponentieller Abfall der Fluoreszenzintensität, aus dem die Lebensdauer bestimmt werden kann [Wahl, 2007]. Im Mittel beträgt sie für kommerzielle Farbstoffe etwa 10 ns [Lakowicz, 2006].

2.1.3 Fluorophore

Allgemein werden zwei Klassen von Fluorophoren unterschieden - intrinsische und extrinsische. Intrinsisch Fluorophore treten natürlich auf. Zu ihnen zählen die aromatischen Aminosäuren, Flavine oder Chlorophyll. Extrinsische Fluorophore werden zu nicht-fluoreszierenden Proben oder solchen, mit nicht passenden, spektralen Eigenschaften, zugegeben, um sie detektieren zu können. Dazu zählen organische Farbstoffe, wie Rhodamine oder Oxazine, fluoreszierende Proteine oder Halbleiter-Nanokristalle.

Generell sind diese Aminosäuren eher selten in Proteinen, da ihre Biosynthese einen hohen metabolischen Aufwand erfordert. In ein Protein ist also meistens nur ein einzelnes Tryptophan-Molekül eingebaut, was die Interpretation der Spektren vereinfacht. Eine nützliche Eigenschaft des Tryptophan-Indolrings ist seine hohe Sensitivität gegenüber der lokalen Umgebung. So hat der Indolring des Tryptophans zwei sehr nahe beieinander gelegene, aufeinander senkrecht stehende Übergangsdipolmomente 1L_a und 1L_b [Callis, 1997]. Das Emissionsspektrum von Tryptophan in Proteinen reicht von einem strukturierten Band bis hin zu einem breiten, verschmierten Spektrum mit Wellenlängenmaxima über einen Bereich von 40 nm. Die Quantenausbeute bewegt sich zwischen 0.35 und fast null. Ist die Proteinstruktur also bekannt, können Konformationsänderungen, Denaturierung, Komplexbildungen mit anderen Proteinen oder Löschung direkt im Emissionsspektrum beobachtet werden [Chen & Barkley, 1998].

Zur Gruppe der extrinsischen Fluorophore zählen organische Farbstoffe wie Cyanine, Rhodamine oder Oxazine. Alle diese Farbstoffe besitzen delokalisierte Elektronen, die in konjugierten Doppelbindungen auftreten. Die spektralen Eigenschaften dieser Farbstoffe werden durch die jeweilige Länge des konjugierten

Systems, bestehend aus aromatischen Ringen oder Doppelbindungen zwischen $C = C$, $C = O$ oder $N = N$, bestimmt. Die Absorption lässt sich mittels dem quantenmechanischen Modell für „Teilchen - in - einer - Box“ berechnen. Es wird angenommen, dass die π - Elektronen delokalisiert sind und sich frei entlang der Ketten bewegen können. Damit die Absorption eines Moleküls im sichtbaren Wellenlängenbereich liegt, muss die Energiedifferenz zwischen Grundzustand und angeregtem Zustand hinreichend niedrig sein. Dies ist der Fall, je länger das konjugierte π - Elektronensystem ist. Zur Quantifizierung und Identifizierung von Fluoreszenzfarbstoffen werden ihre Extinktionskoeffizienten und Quantenausbeuten genutzt. Typischerweise liegt der Extinktionskoeffizient im Bereich von $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für organische Farbstoffe und die Quantenausbeute bei nahezu 100 %. Das Vorhandensein von funktionellen Gruppen, wie der Amino- oder Thiolgruppe, erlaubt kovalente Fluoreszenzmarkierungen von zum Beispiel Proteinen, DNA/RNA oder Antikörpern.

2.2 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Fluoreszenzfluktuationen entstehen, wenn Fluorophore auf Grund von Diffusion in einen Laserfokus ein- und austreten. Durch die Fokussierung des Lasers auf einen beugungsbegrenzten Punkt, ergibt sich das elliptische, entlang der optischen Achse gestreckte, etwa 1 fL große Beobachtungsvolumen. Die Theorie der Korrelations-Analyse wird dann mittels der Poisson-Verteilung beschrieben [Lakowicz, 2006]. Für zufällig auftretende, diskrete Fluktuationen des Fluoreszenzsignals ist die Anzahl der Teilchen im Laserfokus gegeben durch:

$$P(n, N) = \frac{N^n}{n!} e^{-N}, \quad (2.11)$$

wobei $P(n, N)$ der Wahrscheinlichkeit n Fluorophore im Fokus zu haben, wenn die durchschnittliche Anzahl der Moleküle N ist, entspricht. Verändert sich nun diffusionsbedingt, bei sehr geringen Konzentrationen, die Anzahl der Fluorophore im Laserfokus, beginnt das Signal zu fluktuieren. Zu jedem Zeitpunkt der Messung wird die Anzahl der detektierten Photonen bestimmt. Die zeitliche Änderung der Intensität $F(t)$ spiegelt demnach die gesamten Informationen über das System und die beteiligten Prozesse wieder. Die Autokorrelation ist dann definiert als das Produkt aus der Intensität $F(t)$ zu einem Zeitpunkt t und der Intensität $F(t+\tau)$ zu einem späteren Zeitpunkt τ , gemittelt über eine große Anzahl von Messungen. Es wird also eine Verschiebung des Zeitsignals t um τ

betrachtet [Hess, 2002]. Die Zeit t entspricht dem realen Messzeitpunkt im Bereich von Sekunden bis Minuten, die Verschiebung typischerweise 10^{-6} s bis 0.1 s. Durch Mittelung über die Intensitäten zu jedem Zeitpunkt und Normierung ergibt sich für die Autokorrelationsfunktion zweiter Ordnung:

$$g^2(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (2.12)$$

mit $\delta F(t) = \langle F(t) \rangle - F(t)$ dem zeitlich Mittel des Signals. Sie ist also direkt proportional zur Wahrscheinlichkeit ein Photon zur Zeit $t + \tau$ zu detektieren, wenn bereits eines zum Zeitpunkt t detektiert wurde. In der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ ist mit wachsender Zeitverschiebung τ ein Abfall zu beobachten. Der Wendepunkt der Kurve entspricht der Diffusionsgeschwindigkeit τ_D des Moleküls. Eine typische FCS-Kurve zeigt die folgende Abbildung 2.3:

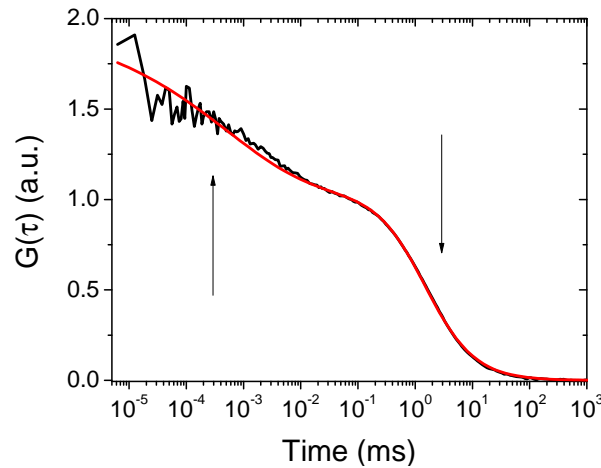


Abbildung 2.3: Mit zunehmender Zeitverschiebung τ ist ein Abfall der FCS-Kurve zu beobachten. Die Daten werden mit dem Diffusionsmodell (Gleichung 2.34) angefitet. Der Wendepunkt entspricht der Diffusionszeit τ_D (rechter Pfeil) und die Amplitude ist proportional zur inversen Teilchenzahl im Fokus. Photo-physikalische Prozesse im Molekül (linker Pfeil) führen zu einem weiteren exponentiellen Abfall.

Grundlage der Autokorrelationsfunktion ist die Diffusionsbewegung von Molekülen. Daher wird zunächst eine kurze Einführung in diffusive Prozesse gegeben, bevor diese näher erläutert wird. Weiterhin wird kurz auf die Grenzen der FCS und Bindungsprozesse/-kinetiken als Anwendungsbeispiel eingegangen.

2.2.1 Diffusion

Die Arbeit „Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen“ von A. Einstein aus dem Jahr 1905 hat das Interesse an Systemen nahe dem thermischen Gleichgewicht geweckt [Einstein, 1905]. Sie liefert Erklärungen zur Brown'schen Molekularbewegung. Diffusion beschreibt dabei die Bewegung von Molekülen oder Ladungsträgern, bedingt durch einen Konzentrationsgradienten $\frac{\delta c(x)}{\delta x}$, der in einem abgeschlossenen System zu einer gleichmäßigen Verteilung bzw. Durchmischung von zwei Stoffen/Teilchenarten führt. Nach dem 1. Fick'schen Gesetz ist die zeitlich konstante Teilchenstromdichte (der Fluss) J durch eine Referenzfläche proportional zum Konzentrationsgradienten entgegen der Diffusionsrichtung:

$$J = -D \frac{\delta c(x)}{\delta x}. \quad (2.13)$$

Die Diffusionskonstante D ist teilchenspezifisch und wird durch die Einstein-Stokes-Gleichung näher bestimmt:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}. \quad (2.14)$$

Der Diffusionskoeffizient D hängt von universellen Konstanten (k_B , 6π), der absoluten Temperatur T , dem Reibungskoeffizienten η der Flüssigkeit und von der Größe des Teilchens R_H ab. Es gilt: je höher die Temperatur, desto größer die kinetische Energie des Teilchens, desto schneller bewegt es sich. Dagegen nimmt die Beweglichkeit des Teilchens mit steigender Viskosität des Mediums oder zunehmender Teilchengröße ab. Der hydrodynamische Radius ist proportional zur Masse des Teilchens: $R_H \approx \sqrt[3]{M}$.

Eine Beziehung zwischen zeitlichen und örtlichen Konzentrationsänderungen folgt aus der Kontinuitätsgleichung (Massenerhaltung) und Gleichung 2.13:

$$\frac{\delta c(t)}{\delta t} = -\frac{\delta J}{\delta x} \rightarrow \frac{\delta c(t)}{\delta t} = \frac{\delta x}{\delta} \left(D \frac{\delta c(x)}{\delta x} \right) \rightarrow \frac{\delta c(t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c(x)}{\delta x^2} \quad (2.15)$$

und für den dreidimensionalen Fall:

$$\frac{\delta C(x, y, z, t)}{\delta t} = D \frac{\delta^2 c(x, y, z)}{\delta x, y, z} = \nabla \cdot (D \nabla c) \quad (2.16)$$

mit ∇ dem sogenannten Nabla-Operator, dessen Komponenten die partiellen Ableitungen in die drei Raumrichtung x , y und z sind. Für diese partielle Differentialgleichung existieren zahlreiche numerische und analytische Lösungen, die von den jeweiligen Anfangs- und Randbedingungen abhängen.

2.2.2 Autokorrelation

Fluktuationen im Fluoreszenzsignal basieren auf Diffusion, chemischen Reaktionen oder Photozerstörung. Jeder dieser Prozesse kann durch Ratengleichungen mit charakteristischen Koeffizienten für die Kinetiken beschrieben werden, die große Auswirkungen auf die Gestalt der Autokorrelationsfunktion $G(t)$ haben. Je nachdem wie viele Prozesse nun an den Änderungen im System beteiligt sind, kann $G(t)$ beliebig komplex werden. Das folgende Kapitel, basierend auf [Krichevsky & Bonnet, 2002], erklärt den Formalismus für diffundierende Teilchen.

In einer idealen, fluoreszierenden Flüssigkeit ist die lokale Fluorophorkonzentration gegeben durch $C(r, t)$, ihr Mittelwert $\bar{C} = \langle C(r, t) \rangle$ und die Varianz $\partial C(r, t) = C(r, t) - \bar{C}$. Dann gilt für frei-diffundierende Teilchen mit dem Diffusionskoeffizienten D , die zusätzlich noch miteinander reagieren können (Gleichgewichtskonstante K), nach 2.16

$$\frac{\delta \partial C(r, t)}{\delta t} = D \nabla^2 \partial C(r, t) + K \partial C(r, t). \quad (2.17)$$

Bei der Anregung von Fluorophoren hängt die Lichtintensität $I(r)$ vom exakten Lichtweg und dem Messaufbau ab. Unter der Annahme, dass die Anzahl der detektierten Photonen $n(t)$ direkt von der Intensität abhängt, ergibt sich:

$$n(t) = \Delta t \int d^3r \cdot I(r) Q C(r, t) \quad (2.18)$$

wobei Q das Produkt aus Absorptionsquerschnitt und Quantenausbeute der Fluorophore darstellt und die Fluoreszenzeigenschaften des Systems widerspiegelt. Schrotrauschen (engl. *shot noise*) wird an dieser Stelle vernachlässigt, da es sich bei diesem Phänomen hauptsächlich um unkorrelierte Signale handelt, die nicht zur Korrelationsfunktion $G(\tau)$ beitragen.

Die Varianz der Photonenzahl $\partial n(t)$ mit dem Mittelwert $\bar{n} = \langle n(t) \rangle$ ist

$$\partial n(t) = n(t) - \langle n(t) \rangle = \Delta t \int d^3r \cdot I(r) Q \partial C(r, t). \quad (2.19)$$

Ist T die Gesamtzahl durchgeführter FCS-Messungen, Δt das zugehörige Zeitintervall ($T \cdot \Delta t$ entspricht dann der Gesamtdauer des Experiments) und t korreliert mit der Verzögerung m des Korrelators, so dass $m = t/\Delta t$ ist, dann ergibt sich die Anzahl der detektierten Photonen in den Messintervallen $t' = i\Delta t$ und $t' + t = (i + m)\Delta t$ zu n_i und n_{i+m} . Durch Mittelung und anschließende Normierung auf \bar{n}^2 der zeitlichen Intensitätsschwankungen folgt für die Korrelationsfunktion $G(t)$:

$$G(t) = \frac{1}{\bar{n}^2 T} \sum_{i=0}^{T-1} \delta n(t') \delta n(t' + t) = \frac{1}{\bar{n}^2 T} \sum_{i=0}^{T-1} (n_i - \bar{n})(n_{i+m} - \bar{n}). \quad (2.20)$$

Unter Verwendung der Ergodizität des Systems kann Gleichung 2.20 zu einem Mittelwert für das Ensemble umformuliert werden:

$$G(t) = \frac{1}{\bar{n}^2} \langle \delta n(0) \delta n(t) \rangle \quad (2.21)$$

und damit folgt dann

$$G(t) = \frac{(\Delta t)^2 \cdot Q^2}{\bar{n}^2} \int \int d^3 r d^3 r' I(r) I(r') \langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle. \quad (2.22)$$

Folglich ist die Korrelationsfunktion für Intensitätsfluktuationen eine Faltung der Auto- oder Kreuz-Korrelationsfunktionen der Konzentrationsänderungen mit dem Anregungsprofil des Laserstrahls.

Ist $\delta C(r, t)$ eine Lösung der Diffusionsgleichung 2.16 mit der Anfangsbedingung $\delta C(r, 0)$ kann das Integral 2.22 durch Fourier-Transformation $\delta \tilde{C}(q, t)$ gelöst werden. Es gilt:

$$\frac{\partial \delta \tilde{C}(q, t)}{\partial t} = -Dq^2 \delta \tilde{C}(q, t). \quad (2.23)$$

Lösung dieser Differentialgleichung sei $\delta \tilde{C}(q, t) = \delta \tilde{C}(q, 0) \cdot \exp(-Dq^2 t)$. Weiterhin folgt aus der Fourier-Transformation von $\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle$:

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle = (2\pi)^{-3/2} \int d^3 q \cdot e^{iqr'} \langle \delta C(r, 0) \delta \tilde{C}(q, t) \rangle \quad (2.24)$$

und aus der Lösung der Differentialgleichung und Gleichung 2.24

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle = (2\pi)^{-3/2} \int d^3 q \cdot e^{iqr'} \cdot e^{-Dq^2 t} \langle \delta C(r, 0) \delta \tilde{C}(q, 0) \rangle. \quad (2.25)$$

Die Rücktransformation liefert dann:

$$\begin{aligned} \langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle &= (2\pi)^{-3} \int d^3 q \cdot e^{iqr'} \cdot e^{-Dq^2 t} \\ &\cdot \int d^3 r'' \cdot e^{iqr''} \langle \delta C(r, 0) \delta \tilde{C}(r'', 0) \rangle. \end{aligned} \quad (2.26)$$

Unter der Annahme, dass zwei Moleküle an verschiedenen Positionen im Detektionsvolumen als unkorreliert betrachtet werden können - ihre Korrelationslänge sei viel kleiner als die Distanz der Moleküle zueinander - lässt sich die obige Gleichung 2.26 vereinfachen zu:

$$\langle \delta C(r, 0) \delta C(r', t) \rangle = (2\pi)^{-3} \bar{C} \int d^3 q \cdot e^{-iq(r-r')} \cdot e^{-Dq^2 t}. \quad (2.27)$$

Mit dieser Vereinfachung kann auch Gleichung 2.22 weiter vereinfacht werden und eine Integration wird möglich:

$$G(t) = \frac{(\Delta t)^2 \cdot Q^2}{\bar{n}^2} \int d^3 q \tilde{I}^2(q) \bar{C} \cdot e^{-Dq^2 t}. \quad (2.28)$$

Dabei ist $\tilde{I}^2(q) = (2\pi)^{-3/2} \int d^3 r \cdot e^{iqr} I(r)$ die Fouriertransformierte des Intensitätsprofils $I(r)$. Die mittlere Anzahl detektierter Photonen ergibt sich dann zu

$$\bar{n} = (2\pi)^{-3/2} \tilde{I}(0) Q \bar{C}. \quad (2.29)$$

Das Intensitätsprofil $I(r)$ kann im Fall eines konfokalen Anregungs-/Detektionsvolumens durch ein Gauss'sches Strahlprofil in den drei Raumrichtung x, y und z angenähert werden:

$$I(r) = I_0 \cdot \exp\left(-\frac{2x^2}{\omega_x^2} - \frac{2y^2}{\omega_y^2} - \frac{2z^2}{\omega_z^2}\right). \quad (2.30)$$

ω_x, ω_y und ω_z beschreiben die maximale Breite des Strahlprofils in der jeweiligen Ausbreitungsrichtung des Lichts, wobei normalerweise $\omega_z > \omega_x, \omega_y$. Für die Fouriertransformierte des Anregungs- bzw. Detektionsprofils folgt:

$$\tilde{I}(q) = \frac{\tilde{I}_0 \omega_x \omega_y \omega_z}{8} \cdot \exp\left(-\frac{\omega_x^2 q_x^2}{8} - \frac{\omega_y^2 q_y^2}{8} - \frac{\omega_z^2 q_z^2}{8}\right). \quad (2.31)$$

und für die Korrelationsfunktion $G(t)$ mit Hilfe dieses Ausdrucks und der mittleren Anzahl detektierter Photonen:

$$G(t) = \frac{(2\pi)^3}{C} \int d^3q \exp\left(-\frac{\omega_x^2 q_x^2}{4} - \frac{\omega_y^2 q_y^2}{4} - \frac{\omega_z^2 q_z^2}{4} - Dt(q_x^2 + q_y^2 + q_z^2)\right). \quad (2.32)$$

Für ein konfokales Volumen $V = \pi^{3/2}\omega_x\omega_y\omega_z$ und die charakteristische Diffusionszeit $\tau_D = \frac{\omega^2}{4D}$ eine Fluorophores in jeder Raumrichtung mit der Diffusionskonstante D und der Annahme, dass für die Ausdehnung $\omega = \omega_z/\omega_{xy}$ in einem Gauss'schen Fokus $\omega_{xy} \ll \omega_z$ gilt, kann die Korrelationsfunktion $G(t)$, bei einer mittlere Teilchenzahl \bar{N} im Detektionsvolumen, durch ein zweidimensionales Diffusionsmodell angenähert werden.

$$G(t) = \frac{1}{\bar{N}}\left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1}. \quad (2.33)$$

Für $G(t=0)$ lässt sich aus der reziproken Amplitude der Korrelationskurve die mittlere Teilchenzahl im Fokus bestimmen.

Unter Berücksichtigung photophysikalischer und chemischer Prozesse muss die Diffusionsgleichung um weitere Terme erweitert werden. Es wird ein konstanter Fluss durch das Detektionsvolumen, die Geschwindigkeit des Flusses, Übergangsraten K und die charakteristische Relaxationszeit τ des Systems zwischen fluoreszenten und nicht-fluoreszenten Zuständen angenommen. Als Ergebnis erhält man das Diffusionsmodell mit einem zusätzlichen, exponentiellen Term, der die Löschkinetik beschreibt, bei dem β als Strecker der exponentiellen Kinetik dient und den Fit im sub-Millisekunden-Bereich verbessert:

$$G(t) = \frac{1}{\bar{N}} \cdot \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot (1 + A \cdot \exp(-k\tau)^\beta). \quad (2.34)$$

2.2.3 Kreuzkorrelation

Detektoren haben charakteristische Totzeiten, in denen sie keine Signale aufnehmen. Für APDs beträgt die Totzeit etwa 100 ns. Auch Afterpulsing stellt ein Problem dar. Mit Hilfe der Kreuzkorrelation können diese Probleme umgangen werden. Das Fluoreszenzlicht wird über einen 50/50-Strahlteiler auf zwei Detektoren aufgeteilt, so dass nicht nur das Signal eines einzelnen Detektors mit sich selber, sondern die Ausgangssignale von zwei Detektoren miteinander korreliert werden. Man spricht hier von Kreuzkorrelation. Diese Methode ermöglicht es, Signale auf Zeitskalen kleiner als $1\mu s$ zu detektieren.

2.2.4 Grenzen der FCS

Durch das sehr kleine, beugungsbegrenzte Detektionsvolumen können Störsignale, wie elastische Streuung und Hintergrundfluoreszenz, gut unterdrückt werden. Mit leistungsstabilen Lasern, photostabilen Farbstoffen, hochwertigen optischen Komponenten und rauscharmen, sensitiven Detektionselektroniken können Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 1:1000 erreicht werden.

Natürliche Grenzen sind der Signalqualität trotzdem gesetzt. Hintergrundphotonen beeinträchtigen die Signalgüte der Autokorrelation, Fluktuationen können nur untersucht werden, wenn die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle im Fokus eine obere Grenze von etwa 1000 nicht überschreitet [Lakowicz, 2006], da sonst die relativen Fluktuationen in der Intensität abnehmen und somit Information verloren geht. Andererseits sollte sie aber auch 0,1 nicht unterschreiten, da sonst die Hintergrundfluoreszenz in den Vordergrund tritt. Auch die Gesamtmesszeit beeinflusst das Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Verrauschte Daten lassen sich durch eine längere Messzeit und eine große Anzahl detektierter Photonen, die von der Anregungsleistung, dem Anregungsquerschnitt, der Quanteneffizienz des Farbstoffs und der Detektionseffizienz des Setups abhängt, verbessern [Koppel, 1974].

Des Weiteren sind negative Einflüsse durch Rayleigh-Streuung des Anregungslichtes, Raman-Streuung durch das umgebende Lösungsmittel und auch die Autofluoreszenz des Lösungsmittels oder von Verunreinigungen der Probe möglichst zu vermeiden, zum Beispiel durch den Einsatz von bestimmten Filtern oder der Vermeidung einer Verunreinigung der Proben. Darüber hinaus begrenzt, insbesondere bei sehr niedrigen Emissionsintensitäten, die Poisson-Statistik der Emission, das so genannte „shot noise“, die Signalqualität der Fluoreszenzkorrelation.

2.2.5 Bindungskinetik

Erstes Anwendungsbeispiel der FCS-Technik war die Untersuchung der Interkation von Ethidumbromid-Molekülen an doppelsträngige DNA. Grundsätzlich basiert die Auswertung von Bindungsexperimenten dabei auf dem Massenwirkungsgesetz. Es gilt für die Konzentrationen von Ligand L und Rezeptor R:



Diese reagieren zu einem Gleichgewichtskomplex $[L \cdot R]$. Die Übergangsraten k_{on} und k_{off} sind die Assoziationsrate in $(Ms)^{-1}$ und die Dissoziationsrate

in s^{-1} . Assoziationsraten liegen im Bereich von 10^3 bis $10^9 M^{-1}s^{-1}$, da die gegenseitige Erkennung der Protein-Bindungsstellen hoch spezifisch nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ erfolgt [Miram & Scharf, 1997]. Bereits Rotationen, um einige wenige Grad, oder Translationen, im Bereich von Ångström, reichen aus, damit keine Bindung mehr stattfindet. Der Quotient der beiden Raten wird als Dissoziationskonstante K_D bezeichnet. Es gilt [Attle, 1995], [Pingoud, 2003]:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[L] \cdot [R]}{[L \cdot R]}. \quad (2.36)$$

Die Dissoziationskonstante gibt an, bei welcher Konzentration des Liganden die Hälfte der Rezeptoren im Gleichgewicht besetzt ist. Üblicherweise wird diese Konstante zur Beschreibung der Affinität zwischen dem Liganden und dem Rezeptor verwendet. Diese Affinitäten werden durch nicht-kovalente, intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Molekülen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen, sowie hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen beeinflusst. Auf Grund der Definition kann die Dissoziationskonstante direkt am Wendepunkt einer Bindungsisotherme abgelesen werden. Ein kleiner Wert für K_D bedeutet daher eine hohe Affinität der Bindungspartner, weil schon eine geringe Menge ausreicht, um die Hälfte der Rezeptoren zu besetzen. Entsprechend ist die Affinität gering, wenn K_D klein ist.

Eine weitere Größe zur Beschreibung von Bindungsprozessen ist die anteilige Menge $r = [L \cdot R]/([L] + [PL])$ an gebundenem Liganden an den Rezeptor [Bligh, 1988]. Zusammen mit dem Ausdruck 2.36 für die Dissoziationsrate K_D , ergibt sich für die Liganden-Konzentration x , das sogenannte Hill-Modell [Hill, 1910]:

$$r = \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{1}{\frac{K_D}{[L]} + 1} \quad \leftrightarrow \quad y(x) = \frac{1}{\frac{K_D}{x} + 1}. \quad (2.37)$$

Für eine Bindungsstudie mit der FCS-Technik wird das Protein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und der Ligand in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben. Die Bindung kann über eine Änderung der Diffusionszeit verfolgt werden. Voraussetzung für Bindungsstudien ist, dass die Konzentration des Rezeptors die des Liganden nicht überschreitet $c_R \ll c_L$ [Gutfreund, 1995].

2.3 Fluoreszenz-Anisotropie

Werden Fluorophore mit polarisiertem Licht angeregt, ist auch die Emission polarisiert. Die Fluoreszenzpolarisation, oftmals als Anisotropie bezeichnet, resultiert aus den Übergangsdipolmomenten für Absorptions- und Emissionsprozesse. Sie entspricht der mittleren, winkelabhängigen Richtungsänderung des Fluorophor-Dipols zwischen Absorption und anschließender Emission eines Photons und hängt von der Lebensdauer des angeregten Zustandes, den Übergangsraten, der Lösungsmittelviskosität und Molekülflexibilität an sich ab. Mit dieser Technik können Denaturierungsvorgänge in Proteinen, Bindungen an andere Makromoleküle und Proteindynamiken untersucht werden [Rami *et al.*, 2003], [Fa *et al.*, 1995]. Die Grundlagen für nicht-zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropiemessungen beinhaltet der folgende Abschnitt [Lakowicz, 2006].

Das Dipolübergangsmoment von Fluorophoren ist mit einem schwingenden, Hertz'schen Dipol vergleichbar, der Energie in Form von elektromagnetischen Wellen abstrahlt, welche eine Lösung der Wellengleichung sind

$$\Delta E = \frac{1}{c^2} \frac{\partial^2 E}{\partial t^2} \quad (2.38)$$

die aus den Maxwell-Gleichungen hergeleitet und mit bestimmten Randbedingungen gelöst werden kann [Demtröder, 2009]. Die Polarisation einer elektromagnetischen Transversalwelle ist durch die Richtung des elektrischen Vektors \vec{E} definiert. Man unterscheidet zwischen linear, zirkular und elliptisch polarisierten Wellen. Linear polarisierte Wellen sind gewöhnliche Sinuswellen, da die Richtung der Schwingung konstant ist. Die Orientierung der Feldvektoren bleibt zeitlich und räumlich konstant. Das Feld von zirkular polarisierten Wellen rotiert mit gleicher Amplitude (konstanter Winkelgeschwindigkeit) um die Ausbreitungsachse und bei der elliptischen Polarisation handelt es sich um eine Mischform, bei der die Auslenkung eine Ellipse beschreibt. In der Regel ist Licht unpolarisiert, die Orientierung der Feldvektoren statistisch verteilt [Meschede, 2009].

Die Anisotropie von Fluorophoren kann experimentell bestimmt werden [Jameson & Ross, 2010]. Dazu wird eine Probe mit vertikal polarisiertem Licht angeregt. Der Feldvektor des Anregungslichts ist parallel zur z-Achse orientiert und die Fluoreszenzintensität I wird durch einen Polarisator gemessen. Über einen Detektor kann dann anteilig die Intensität parallel I_{\parallel} und senkrecht I_{\perp} zur Anregungspolarisation bestimmt werden. Aus den jeweiligen Anteilen können die Polarisation P und die Anisotropie r berechnet werden:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (2.39)$$

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (2.40)$$

mit den Umrechnungsfaktoren $P = 3r \cdot (2 + r)^{-1}$ und $r = 2P \cdot (3 - P)^{-1}$. Beide Größen sind dimensionslos und unabhängig von Gesamtintensität und Konzentration. Gebräuchlicher ist die Anisotropie, da diese Größe auf die Gesamtintensität $I_{\parallel} + 2I_{\perp}$ normiert wird und dadurch viele Vereinfachungen erlaubt.

Zur Bestimmung der maximalen und minimalen Anisotropie-Werte einer Probe ist es notwendig, sich genauer mit der Herleitung dieser zu befassen. Dazu wird ein einzelnes Fluorophor betrachtet, dessen Übergangsmomente für Absorption und Emission parallel sind. Weiterhin sei das Fluorophor unter den relativen Winkeln θ zur z-Achse und ϕ zur y-Achse orientiert. Falls das Anregungslicht parallel zur z-Achse orientiert ist, dann gibt es eine bevorzugte Orientierung der angeregten Population zu dieser Achse. Das Fernfeld der Strahlung kann vollständig mit klassischer Elektrodynamik beschrieben werden. Ziel soll es nun sein, einen Ausdruck für die Anisotropie eines solchen Moleküls, in Abwesenheit von Rotationsdiffusion, herzuleiten. Zusätzlich vereinfacht wird die Herleitung durch die Annahme von parallelen Dipolen, Immobilität der Fluorophore, eine zufällige Orientierung im Grundzustand und Symmetrie bezüglich der z-Achse. Die Intensitätsanteile I_{\parallel} und I_{\perp} sind proportional zur Projektion der Übergangsmomente auf die Achsen, da sie durch das elektrische Feld des Fluorophors erzeugt werden. Das elektrische Feld wird beschrieben durch:

$$E(\theta, \phi) = k \frac{\sin\theta}{r} \hat{\theta} \quad (2.41)$$

wobei k eine Konstante, r der Abstand vom Fluorophor und $\hat{\theta}$ der Einheitsvektor entlang der θ -Koordinate ist. Die Intensität ist gegeben durch das Quadrat des elektrischen Feldes in Ausbreitungsrichtung:

$$I(\theta, \phi) = k^2 \frac{\sin^2\theta}{r^2} \hat{r}. \quad (2.42)$$

Auf dieser Grundlage werden die Intensitätsanteile I_{\parallel} und I_{\perp} eines Dipols mit beliebiger Orientierung bestimmt. Für parallele Übergangsmomente von Absorption und Emission und einem elektrischen Feld tangential zur Oberfläche,

zeigt das elektrische Feld, entlang des Äquators dieser Oberfläche, in Richtung der Übergangsmomente für die Emission. Die Projektion des Feldes auf die z-Achse ist proportional zu $\cos\theta$. Ein ähnlicher Ausdruck folgt für die Projektion auf die x-Achse: $E \approx \sin\theta\sin\phi$ und damit für die parallele Intensität $I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2\theta$ und die senkrechte $I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2\theta\sin^2\phi$.

Für zufällig orientierte Fluorophore, die mit Licht angeregt werden, dass parallel zur z-Achse polarisiert ist, werden alle Fluorophore mit dem Winkel θ zu dieser Achse gleichwahrscheinlich angeregt und ϕ nimmt Werte zwischen 0 und 2π an. Da der Mittelwert von $\langle \sin^2 \rangle = \frac{1}{2}$ ist, ist der senkrechte Anteil der Intensität nicht länger vom Winkel ϕ abhängig. Es ist

$$I_{\parallel}(\theta) = \cos^2\theta \quad (2.43)$$

$$I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2}\sin^2\theta. \quad (2.44)$$

Mit $\sin^2\theta = 1 - \cos^2\theta$ und dem Ausdruck 2.39 folgt für die Anisotropie:

$$r = \frac{3\langle \cos^2\theta \rangle - 1}{2}. \quad (2.45)$$

Die Anisotropie r entspricht dem Mittelwert von $\cos^2\theta$, wobei θ der Winkel des Emissionsdipols relativ zur z-Achse ist. Allerdings gilt dieser Ausdruck nur für Moleküle mit Symmetrie bezüglich der z-Achse. Für Moleküle mit beliebigen Orientierungen θ und ϕ muss ein anderer Ausdruck gefunden werden.

Im Fall vollständig polarisierter Emission parallel zur Transmissionsachse des Polarisators ist $\theta = 0$ und damit $r = 1$. Praktisch ist es jedoch nicht möglich perfekt orientierte, angeregte Populationen zu beobachten. Die gemessene Anisotropie ist immer < 1 . Der Winkel unter dem vollständige Depolarisation auftritt, beträgt $54,7^\circ$, also $\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{1}{3}$, für die Winkelverschiebung zwischen Anregungs- und Emissionsmoment und wird „magischer Winkel“ genannt.

Damit Absorption stattfindet müssen die Übergangsmomente nicht vollständig parallel zum Feldvektor der Anregung sein. Die Wahrscheinlichkeit für eine Anregung ist $\approx \cos^2\theta$, wobei θ dem Winkel, der von z-Achse und Absorptionsmoment eingeschlossen wird, entspricht. Die Übergangsmomente können sowohl entlang der z-Achse als auch in der xy-Ebene liegen. Dieses Phänomen wird als Photoselektion bezeichnet. Für eine zufällige Verteilung der Übergangsmomente im Grundzustand ergibt sich bei 1-Photonen-Anregung $\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{3}{5}$ und damit eine maximale Anisotropie von $r = 0.4$ [Lakowicz, 2006]. Dann sind die

Absorptions- und Emissionsmomente kollinear und es treten keine depolarisierenden Prozesse, wie Streuung oder Reflexion, auf. Die angeregte Population ist hauptsächlich entlang der z-Achse orientiert und $I_{\parallel} = 3I_{\perp}$.

Bei experimentellen Bestimmungen der Anisotropie kommt es aber eher selten vor, dass Werte von $r = 0.4$ gemessen werden. In der Regel sind sie kleiner, auch wenn es keine depolarisierenden Prozesse gibt. Aus diesem Grund wird die fundamentale Anisotropie r_0 , als Produkt aus der Anisotropie-Abnahme durch Photoselektion und der Verschiebung der Dipole zueinander, eingeführt:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right). \quad (2.46)$$

Für die Messung von r_0 muss die Rotationsdiffusion der Moleküle so gering wie möglich sein, was durch Verwendung von Lösungsmitteln wie Propylen-Glykol oder Glycerin erreicht wird. Diese Substanzen bilden bei niedrigen Temperaturen um -60°C verglaste Lösungen und verhindern somit eine Bewegung der Chromophore während der Fluoreszenzlebensdauer. Auf diese Weise lässt sich der Winkel β zwischen den beiden Dipolmomenten messen. Die Änderung der Anisotropie in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge kann als Rotation der Absorptionsmomente in unterschiedlichen Absorptionsbanden verstanden werden, bzw. der Änderung der Beiträge von zwei oder mehr elektronischen Übergängen, wobei jedem ein eigenes β zugeordnet werden kann.

Hauptgrund für Depolarisation ist die Rotationsbewegung des Fluorophors während seiner Lebenszeit. Beschrieben wird sie durch die Perrin-Gleichung:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + 6D\tau. \quad (2.47)$$

τ ist die Fluoreszenzlebensdauer, $\theta = \eta V / RT$ die Rotations-Korrelations-Zeit, bestimmt durch die Lösungsmittel-Viskosität η , die Temperatur T in Kelvin, die Gaskonstante R und dem Volumen V der rotierenden Einheit. D ist der Rotationsdiffusionskoeffizient. Für $\theta \gg \tau$ ist die gemessene Anisotropie gleich der fundamentalen. Für $\theta \ll \tau$ werden die gemessenen Werte 0. Mit dem zeitaufgelösten Abfall der Anisotropie $r(t) = r_0 e^{-t/\theta} = r_0 e^{-6Dt}$ für kugelförmige Moleküle folgt für einen mono-exponentiellen Intensitätsabfall:

$$r = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau}{r_0\theta} = \frac{1}{r_0} + \frac{\tau RT}{r_0 V \eta}. \quad (2.48)$$

Wird die Anisotropie einer Probe bei verschiedenen Viskositäten des Mediums gemessen, die durch Glycerin, Saccharose etc. eingestellt werden können, kann

durch lineare Extrapolation der Perrin-Geraden die fundamentale Anisotropie aus dem y-Achsenabschnitt $1/r_0$ ermittelt werden. Aus der Steigung der Geraden erhält man das Molekylvolumen und damit auch θ und D . Für größere Moleküle ist die Rotations-Korrelations-Zeit abhängig von der molaren Masse des Moleküls, und damit von der Ausdehnung seiner Hydrathülle. Als Folge werden deutlich größere Rotationszeiten gemessen, als erwartet.

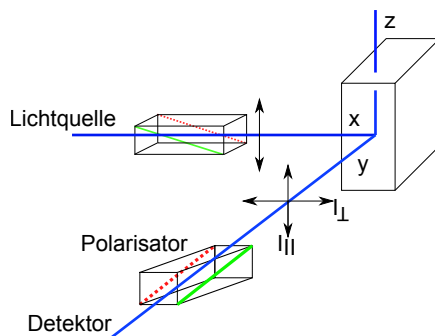


Abbildung 2.4: Schematische Abbildung der L-Format-Methode zur Messung von Fluoreszenz-Anisotropien. MC Monochromator. Auf der rechten Hälfte ist die Gestalt der Verteilung im angeregten Zustand abgebildet.

Gemessen werden Anisotropien mit der „L-Format-Methode“ (Abbildung 2.4), bei der nur ein Kanal zur Detektion der Emission verwendet wird. Die Probe wird zunächst mit vertikal polarisiertem Licht angeregt und die Emission durch einen Monochromator detektiert, mit unterschiedlichen Transmissionseffizienzen für vertikal und horizontal polarisiertes Licht. Infolgedessen kommt es zu einer Änderung der gemessenen Intensitäten $I_{||} = I_{VV}$ und $I_{\perp} = I_{VH}$, auch für unpolarisiertes Licht, wenn der Emissionspolarisator gedreht wird. Bei der Anregung mit horizontal polarisiertem Licht lässt sich im zweiten Schritt nur I_{\perp} ermitteln, da beide Polarisatorstellungen des Detektors nur senkrecht zur Anregung polarisiert sind. Für korrekte Anisotropie-Werte muss zusätzlich noch die Empfindlichkeit des Detektors berücksichtigt werden. Es wird der Gerätefaktor G eingeführt. Diese Größe lässt sich experimentell über die Anregung mit horizontal polarisiertem Licht bestimmen, da hierbei I_{\perp} gemessen wird und berechnet sich über das Verhältnis des vertikalen zum horizontalen Anteil $G = I_{HV}/I_{HH}$. Im Idealfall ist $G = 1$, weicht aber davon ab, da er von der Emissionswellenlänge und den Eigenschaften des Polarisators abhängt. Für die gemessene Anisotropie gilt dann:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}}. \quad (2.49)$$

2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der am häufigsten verwendeten Techniken in der Biologie für nicht-invasive, zeitaufgelöste Bildgebung. Ein Fluoreszenz-Mikroskop besteht dabei im Wesentlichen aus drei Komponenten: einer Lichtquelle, geeigneten optischen Komponenten zur Trennung von Anregungs- und Fluoreszenzlicht und einem Detektor. Allerdings ist die Auflösung, theoretisch formuliert von Abbe [Abbe, 1873] und Rayleigh [Rayleigh, 1896], beugungsbe-grenzt. Eine Möglichkeit zur Umgehung der Auflösungsgrenze, sowie die Grund-lagen der Weitfeld-Mikroskopie zeigt dieses Kapitel auf.

2.4.1 Klassische Auflösungsgrenze

Nach Abbe können zwei Gitterlinien im Abstand d genau dann aufgelöst wer-den, wenn gilt:

$$d_{Abbe} = \frac{\lambda}{2n\sin\alpha} = \frac{\lambda}{2NA}, \quad (2.50)$$

mit der Wellenlänge λ des Lichts, dem Brechungsindex n des Mediums zwi-schen Probe und Objektiv, dessen Öffnungswinkel α und Numerische Apertur $NA = n \cdot \sin\alpha$ ist. Diese Annahme beruht jedoch auf periodischen Strukturen, wohingegen Fluorophore eher punktförmigen Lichtquellen entsprechen. Wird eine Punktlichtquelle durch eine kreisförmige Blende betrachtet, dann ergibt sich ein zentrales Maximum, umgeben von Ringen mit abnehmender Intensität. Die Ringe werden als Beugungsringe (*Airy-Scheibchen*) bezeichnet und das auf dem Detektor abgebildete, laterale Beugungsbild Punktspreizfunktion (PSF). Die Verteilung der Lichtintensität folgt der Funktion

$$I(r) \propto I_0 \left(\frac{J_1(r)}{r} \right)^2. \quad (2.51)$$

J_1 ist die sphärische Bessel-Funktion erster Art, erster Ordnung und r der Ab-stand vom Mittelpunkt der Lichtquelle. Der Abstand r_{Airy} zwischen dem ersten Minimum des Beugungsbildes zum Hauptmaximum beträgt

$$r_{Airy} = 0.61 \frac{\lambda}{NA} = 1.22 \cdot d_{Abbe}. \quad (2.52)$$

Diese Gleichung 2.52 ist das Rayleigh-Kriterium. Zwei punktförmige Lichtquel-len können dann getrennt aufgelöst werden, wenn das Airy-Zentrum der PSF

eines Objektes in das erste Minimum der PSF des anderen Objektes fällt, also ihr lateraler Abstand $\leq r_{Airy}$ ist. Im Beugungsbild der beiden Funktion zeigt sich an dieser Stelle ein deutliches Minimum von etwa 20%. Bis auf einen Vorfaktor stimmen das Rayleigh-Kriterium und die Abbe'sche Auflösungsgrenze also überein.

Die axiale Auflösung, entlang der z-Achse des Mikroskops gemessen, ergibt sich aus dem dreidimensionalen Beugungsbild der PSF [Pawley, 2006]:

$$r_z = \frac{2n\lambda}{NA^2}. \quad (2.53)$$

Die maximale Auflösung ist demnach als der Abstand zwischen dem Zentrum des Beugungsbildes und dem ersten axialen Minimum definiert. Anders als für die laterale Auflösung skaliert die axiale Auflösung mit dem Quadrat der numerischen Apertur. Bei einer numerischen Apertur von $NA = 1.2$, einem Brechungsindex $n = 1.33$ und Anregungslicht einer Wellenlänge von 640 nm ergibt sich eine laterale Auflösung $r_{Airy} \approx 330nm$ und in z-Richtung von $r_z \approx 1200nm$.

2.4.2 Weitfeld-Mikroskopie

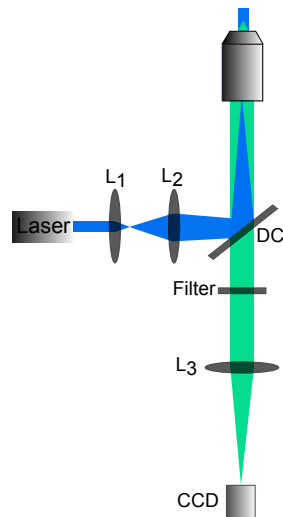


Abbildung 2.5: Weitfeld-Aufbau.

Abbildung 2.5 zeigt einen typischen Weitfeld-Aufbau. Die Anregung der Fluorophore erfolgt mit einer monochromatischen Lichtquelle, in der Regel einem Laser. Mit verschiedenen Linsen (L_1, L_2) wird das Licht aufgeweitet und auf die hintere Fokalebene (BFP) des Objektivs fokussiert. Da das Anregungslicht durch das Objektiv wieder parallelisiert wird, entsteht eine Weitfeld-Ausleuchtung. Mit einem dichroitischen Strahlteilers (DC) kann das Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht separiert werden und das gleiche Objektiv auch zum Einsammeln der Fluoreszenz verwendet werden. Für die Detektion des Fluoreszenzlichtes werden Einzelphotonen-sensitive Kameras mit EMCCD-Chips oder CMOS-Modulen eingesetzt.

Bei der Weitfeld-Ausleuchtung entstehen Probleme, da nicht nur Fluoreszenz aus der Fokalebene detektiert wird, sondern auch aus anderen. Es kommt zu Abbildungsfehlern und hohen Hintergrundsignalen. Verschiedenen Möglichkeiten zur Fokussierung des Anregungslichts zeigt Abbildung 2.6.

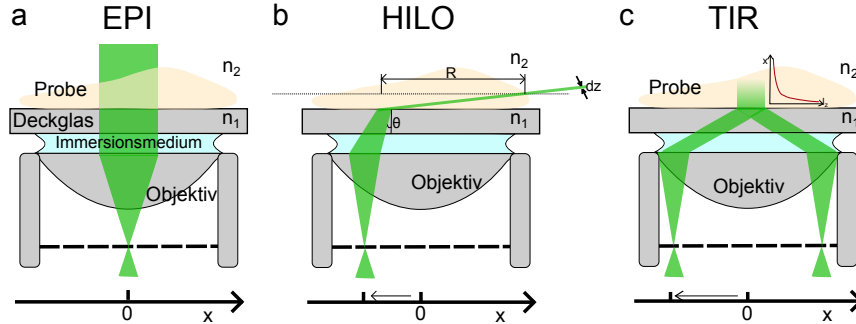


Abbildung 2.6: a) Für EPI-Ausleuchtung wird ein homogener, parallelisierter Strahl zur Beleuchtung der Probe genutzt, während HILO-Ausleuchtung (b) einen achsenfernen, fokussierten Strahl, der knapp unterhalb des kritischen Winkels auf die obere Grenzfläche des Deckglases trifft, verwendet. Es entsteht ein schmales Lichtband der Dicke dz und der Breite d . c) Bei der TIR-Ausleuchtung wird das Objektivs oberhalb des kritischen Winkels getroffen. Dies führt zur Totalreflexion und einem exponentiell gedämpften, evaneszenten Feld in der Probe.

Den einfachsten Ansatz bietet die **Weitfeld-Epifluoreszenz**. Das Anregungslicht durchläuft Linsen und Probe entlang der optischen Achse des Objektivs. Ein homogener, paralleler Lichtstrahl beleuchtet die Probe in einem breiten z -Bereich. Allerdings wird sehr viel Fluoreszenz aus anderen Ebenen eingesammelt und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis ist relativ schlecht.

Eine Verkleinerung der z -Ausleuchtung wird durch **Totalreflexionsmikroskopie** (TIR) erreicht. Durch Totalreflexion an der Grenzfläche werden hauptsächlich Fluorophore in einem Bereich von etwa 100 nm Entfernung von der Glasoberfläche angeregt [Axelrod, 2001]. Das Brechungsverhalten eines Lichtstrahls an einer Grenzfläche zwischen zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes n_i kann dabei mit dem Brechungsgesetz von Snellius beschrieben werden: $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$, mit θ_i den Einfallswinkel und Ausfallswinkel relativ zur optischen Achse [Tipler & Mosca, 1994]. Für Übergänge vom optisch dichteren (n_2) zum optisch dünneren Medium (n_1) und große Winkel θ_2 , überschreitet der Einfallswinkel den kritischen Winkel $\gamma = \arcsin(n_2 n_1^{-1})$ und es kommt zur Totalreflexion. Auf Grund der Welleneigenschaften von Licht dringt in diesem Reflexionsfall nur ein evaneszentes Feld in die Probe ein. Die Intensität I_z dieses Feldes nimmt exponentiell in axialer Richtung ab. I_0 ist die Intensität an der Probenoberfläche und d die Eindringtiefe der Welle mit der Wellenlänge λ

$$I(z) = I_0 e^{-z/d}, \quad \text{mit} \quad d = \frac{\lambda}{4\pi} (n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2)^{-\frac{1}{2}}. \quad (2.54)$$

Die Eindringtiefe nimmt mit wachsendem Winkel zu. Ein offensichtlicher Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass nur die unterste Probenebene beleuchtet werden kann. Biologische Proben weisen im Regelfall jedoch eine gewisse Dicke auf [Hinterdorfer & van Oijen, 2009]. Um dieses Problem zu umgehen, kann eine andere Art der Beleuchtung gewählt werden. Es wird ein **geneigtes Lichtband** (HILO, engl. highly inclined and laminated optical sheet) zur Beleuchtung verwendet. Der Laserstrahl wird nicht am äußersten Rand, jedoch deutlich zur optischen Achse verschoben, leicht unterhalb des kritischen Winkels auf die Grenzfläche fokussiert, wodurch ein dünnes Lichtband der Dicke dz , das die Probe auf einer Breite von R unter dem Winkel θ durchstrahlt, entsteht. Die geringe Dicke des Lichtbandes verkleinert das Anregungsvolumen, wodurch das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert wird. Die Dicke des Lichtbandes wird mit $d_z = R(\tan\theta)^{-1}$ abgeschätzt. Typische Dicken betragen $\geq 4 \mu\text{m}$ [Tokunaga *et al.*, 2008]. Die Intensitätsdichte des Anregungslichts wird erhöht.

2.4.3 Konfokale Mikroskopie

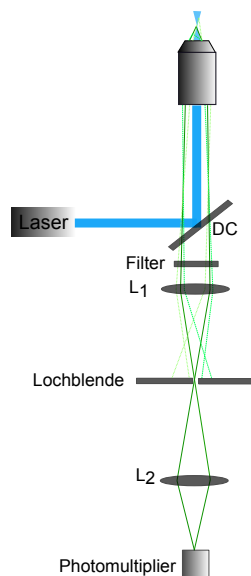


Abbildung 2.7: Anregungs- und Detektionsvolumen werden durch eine Lochblende eingeschränkt.

Neben der Weitfeld-Mikroskopie existiert eine weitere Art der Mikroskopie, die konfokale Mikroskopie. Dabei wird das Anregungs- und Detektionsvolumen in seiner Ausdehnung auf wenige fL begrenzt [Minsky, 1961]. Die Abbildung 2.7 zeigt schematisch einen konfokalen Aufbau. Über das Objektiv wird der parallele Laserstrahl in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem gleichen Objektiv eingesammelt und mit einem dichroitischen Strahlteiler (DC) vom Anregungslicht getrennt, auf eine Lochblende fokussiert und am Detektor registriert. Durch die Lochblende wird lediglich das Fluoreszenzlicht aus dem Laserfokus, also aus dem zentralen Maximum der Airy-Scheibchen, und

nicht aus anderen Ebenen, sehr effizient detektiert. Sie ist demnach mit einem räumlichen Filter vergleichbar und erhöht die räumliche Auflösung um den Faktor $\sqrt{2}$ [Pawley, 2006]. Die Verwendung von Objektiven mit hoher numerischer Apertur ermöglicht eine Auflösung in lateraler Richtung von etwa 200 nm und in axialer Richtung von 500 nm [Claxton *et al.*, 2005]. Anders als bei der Weitfeld-Mikroskopie, wo Raman- und Rayleigh-Streulicht ein Problem darstellen und ihre Interferenzsignale trotz Emissionsfiltern nicht vollständig herausgefiltert werden, verringert die Einschränkung des Detektionsvolumens bei konfokalen Aufbauten die Raman-Streuung drastisch. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird besser.

2.4.4 Umgehung der Auflösungsgrenze

Die Dicke und Organisation biologischer Proben umfasst mehrere Größenordnungen, die mit klassischer, beugungsbegrenzter Weitfeld-Mikroskopie nicht betrachtet werden können. Konzepte zur Umgehung der Auflösungsgrenze basieren alle auf den photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore. Das kontrollierte, quasi binäre An- und Ausschalten dieser wird ausgenutzt. Es gibt zwei generelle Konzepte [Toomre & Bewersdorf, 2010]: zum einen durch gezieltes Verändern der PSF, wodurch die Ausdehnung des Bildes verringert wird. Bei der STED-Mikroskopie werden durch stimulierte Emission lokal alle Fluorophore ausgeschaltet [Wichmann & Hell, 1994], indem die Probe mit zwei synchronisierten, überlagerten Lasern gescannt wird. Mit dem ersten werden die Fluorophore angeregt und mit dem zweiten, rotverschobenen „STED-beam“ zur stimulierten Emission gezwungen. Je höher die Intensität des „STED-beams“, desto mehr Moleküle werden ausgeschaltet und desto größer ist die Auflösungserhöhung [Hell, 2007]. Eine weitere deterministische Methode stellt die strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM) dar [Gustafsson, 2000]. Bei den stochastischen Anwendungen wird das Fluoreszenzbild durch zufällige, räumlich separierte Schaltprozesse erzeugt. Diese Art der Auflösungserhöhung bildet die Grundlage für die „photoaktivierte Lokalisationsmikroskopie“ (PALM, FPALM) [Betzig *et al.*, 2006], [Hess *et al.*, 2006] und die „stochastic optical reconstruction microscopy“ (STORM, dSTORM) [Rust *et al.*, 2006], [Heilemann *et al.*, 2008].

Diese Arbeit basiert auf der dSTORM-Technik, die eine Vereinfachung von STORM darstellt. Es muss kein Farbstoffpaar, bestehend aus Aktivator und Photoschalter, verwendet werden. Konventionelle Farbstoffe, die direkt schaltbar sind, kommen zum Einsatz [Heilemann *et al.*, 2008].

Punktförmige Emittoren erscheinen im Fluoreszenzbild als verschmierte Punkte, wobei das Zentrum dieses Bildes mit deutlich höherer Genauigkeit, als die Breite

bestimmt werden kann [Thompson *et al.*, 2002]. Die Ausdehnung des Fluoreszenzbildes $I(x, y)$ eines Punktemitters $O(x, y)$ ergibt sich durch Faltung mit der PSF des Mikroskops

$$I(x, y) = O(x, y) * PSF(x, y). \quad (2.55)$$

Durch Annäherung der aufgenommenen PSF des Moleküls mit einer zweidimensionalen Gauß-Funktion bei konstantem Hintergrundsignal B , kann das Zentrum der Intensitätsverteilung eines einzelnen Spots sehr genau bestimmt werden:

$$f(x_c, y_c, A, B) = \frac{A}{2\pi\sigma_x\sigma_y} \exp\left(-\frac{1}{2}\left(\frac{x-x_c}{\sigma_x}\right)^2 - \frac{1}{2}\left(\frac{y-y_c}{\sigma_y}\right)^2\right) + B, \quad (2.56)$$

mit der Amplitude A der Intensitätsverteilung, x_c und y_c als Mittelpunktskoordinaten der Gaußverteilung, sowie deren Standardabweichung in den jeweiligen Raumrichtungen σ_x und σ_y . Die Lokalisationsgenauigkeit des Maximums der Gaußverteilung wird durch die Anzahl der detektierten Photonen bestimmt. Auf Grund der endlichen Pixelgröße a des Kamerachips, können Photonen von ein und demselben Emitter über mehrere Pixel verteilt sein. Neben diesem Pixelrauschen, muss aber auch noch das Schrot- und Hintergrundrauschen b von Signalen außerhalb der Fokusebene und die Detektoreigenschaften an sich, berücksichtigt werden. Die Lokalisationsgenauigkeit für jede Dimension ergibt sich dann zu [Thompson *et al.*, 2002]:

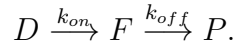
$$\mu_z = \sqrt{\frac{\sigma^2 + a^2/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a^2 N^2}}, \quad (2.57)$$

mit der Standardabweichung σ der PSF und der Bedingung, dass $a \leq \sigma$. Für hohe Photonenzahlen N , verliert störender Hintergrund an Bedeutung und die Lokalisationsgenauigkeit kann durch σ/\sqrt{N} angenähert werden. Um eine hohe Lokalisationsgenauigkeit zu erreichen, darf während der Bildaufnahme in der beugungsbegrenzten Fläche nur ein Fluorophor emittieren, so dass nur eine PSF detektiert wird. Andernfalls käme es zu einer Überlagerung der PSFs und die Fluorophore wären untrennbar. Über die zeitliche Modulation der Emission, z.B. durch gezieltes Schalten der Fluorophore, ist es möglich, dass nur eine Subpopulation im An-Zustand ist [Heilemann *et al.*, 2002].

2.4.5 Photoschaltbare Fluorophore

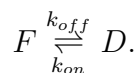
Die Verwendung molekularer Photoschalter verbindet all diese Hochauflösungsverfahren. Photoschalter können mit Hilfe von Strahlung entweder photoaktiviert oder reversibel, photogeschaltet werden. Der ideale Photoschalter hat zwei spektral gut trennbare, thermisch stabile Zustände, eine hohe Schaltzuverlässigkeit, also möglichst viele Schaltzyklen und modifizierbare Schaltraten [Heilemann *et al.*, 2009a]. Die prominentesten Varianten sind irreversibel photoaktivierbare oder -konvertierbare fluoreszente Proteine (PA-FPs) [Wiedenmann *et al.*, 2004], [Ando *et al.*, 2002], wie sie für PALM oder FPALM Verwendung finden; kommerziell erwerbliche organische Farbstoffe für *d*STORM, die reversibel geschaltet werden können [Heilemann *et al.*, 2008], [Heilemann *et al.*, 2009b]; oder Paare organischer Fluorophoren, die Kombinationen aus Aktivator und Reporter-Farbstoff bilden (STORM) [Rust *et al.*, 2006]. Zwei generelle Mechanismen können unterschieden werden:

Irreversibel photoaktivierbare Moleküle werden aus einem Dunkelzustand D mit einer Konvertierungs-/Aktivierungsrate k_{on} in einen fluoreszierenden Zustand F überführt und durch Photobleaching mit einer Ausschalttrate k_{off} in einen irreversiblen Aus-Zustand P gebracht:



Zu Beginn der Messung befinden sich im Idealfall alle Fluorophore in ihrem Dunkelzustand und sind nicht detektierbar. Nach der Messung sind wieder alle ausgeschaltet/photozerstört. Damit es nicht zum Überlappen der PSFs durch zu hohe Spotdichten kommt, müssen die Schaltraten kontrolliert werden [Hess *et al.*, 2006]. Allerdings sind PAs oftmals weniger photostabil, als konventionelle, organische Farbstoffe. Des Weiteren sind sie relativ groß, wodurch es zu einer ungenauen Auflösung der untersuchten Struktur kommt.

Bei **reversibel photoschaltbaren Molekülen** ist die optische Auflösung direkt proportional zur Anzahl der emittierten Photonen. Zu Beginn einer Messung liegen alle Fluorophore in ihrem An-Zustand F vor. Um eine hohe Auflösung zu erreichen, muss die Mehrzahl aller Fluorophore mit der Rate k_{off} in einen metastabilen Dunkelzustand D gebracht werden, aus dem sie mit einer Rate k_{on} in den fluoreszierenden Zustand zurückgeholt werden können:



Es darf lediglich ein Fluorophor in einer beugungsbegrenzten Region emittieren, während alle anderen in einem sehr langlebigen Dunkelzustand sind. Die Schaltraten hängen von der Anregungsleistung des Lasers, den Reduktionsbedingungen, thermischer Stabilität und intrinsischen Eigenschaften ab.

Der Schaltmechanismus von Standardfluorophoren, wie Rhodaminen oder Oxazinen, basiert darauf, dass diese elektronisch angeregten Moleküle durch die Kollision oder Kontakt mit starken Elektronendonatoren, wie den Aromaten Guanosin oder Tryptophan, reduziert werden. Thiole wie β -Mercaptoethylamin (MEA) oder Glutathion (GSH) sind zwar weniger starke Elektronendonatoren, aber die Reduktionseffizienz kann im pH-Bereich von 7.5 - 9.0 erhöht werden, da das Thiolat-Anion (RS^-) die reduzierende Spezies ist.

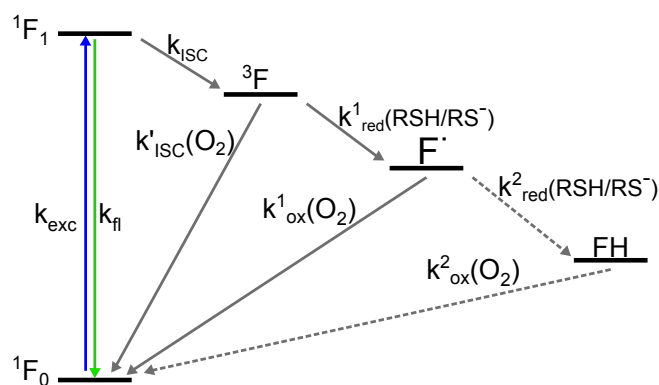


Abbildung 2.8: Mit einer geringen Wahrscheinlichkeit gelangt das Fluorophor vom Singulett-Zustand 1F_1 in den Triplettzustand 3F und von dort, durch Reaktion mit dem Thiolat des Lösungsmittels in energetisch niedrigere Radikalanion-Dunkelzustände F^\bullet . Das Radikalanion wird durch Sauerstoff oxidiert und kehrt in den Grundzustand zurück. Aus [van de Linde *et al.*, 2011a].

Abbildung 2.8 zeigt den Reduktionsvorgang durch Thiole für einen Farbstoff in wässriger Lösung. Das Fluorophor wird mit einer Rate k_{exc} vom Grundzustand 1F_0 in den ersten elektronisch angeregten Zustand 1F_1 angeregt und kehrt von dort entweder mit einer Rate k_{fl} fluoreszent in den Grundzustand zurück oder gelangt durch Interkombinationsübergänge mit einer Rate k_{ISC} in den Triplett-Zustand 3F . Dieser kann mit Sauerstoff reagieren ($k'_{ISC}(O_2)$) und den Grundzustand wiederbevölkern, wobei Singulett-Sauerstoff 1O_2 produziert wird oder aber mit einer Rate $k^1_{red}(RSH/RS^-)$ mit dem Thiol reagieren und über Ladungsaustausch semi-reduzierte Fluorophor-Radikale (F^\bullet) und das Thiyl-Radikal (RS^-) bilden. Dementsprechend verlängert sich die Lebensdauer des Aus-Zustandes bei einer Sauerstoff-reduzierten Umgebung. In wässriger Lösung reagieren Radikal-Anionen sehr schnell weiter: entweder wird mit einer Rate

$k_{red}^2(RSH/RS^-)$ ein zweites Elektron aufgenommen und ein Leuco-Zustand gebildet (FH) oder es erfolgt mit der Rate $k_{ox}^1(O_2)$ eine Reaktion mit Sauerstoff und die Rückkehr in den fluoreszenten Singulett-Zustand unter Bildung von superoxiden Radikalen ($O_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid ($O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). In einem letzten Schritt kann aus der farblosen Form mit Sauerstoff (mit einer Rate $k_{ox}^2(O_2)$) wieder die ursprüngliche Form gebildet werden [van de Linde *et al.*, 2011b].

Viele Radikalanionen zeigen Absorption im Bereich um ~ 400 nm. Die Rückkehr des Radikalanions in den An-Zustand kann durch Einstrahlung von blauem Licht erleichtert werden. Über die An- und Aus-Schaltraten, die MEA-Konzentration, den pH-Wert, die Einstrahlung von kurzwelligem Licht und die Intensität des Anregungslichts, können die Fluorophore so geschaltet werden, dass nur einige im An-Zustand sind und räumlich so verteilt, dass die jeweiligen PSFs noch vollständig aufgelöst werden können.

2.5 Glykoproteine und Membraneigenschaften

Das Wort Protein wurde erstmals 1839 von Mulder benutzt [Mulder, 1839] und bedeutet sinngemäß „an erster Stelle stehend“, wodurch ihre zentrale Bedeutung und Vielfältigkeit zum Ausdruck gebracht wird. Proteine erfüllen Transportfunktionen und enzymatische Aktivitäten, sind an Signalleitungen, Muskelaufbau und dem Schutz vor Toxinen beteiligt.

Proteine oder Polypeptide sind lineare Kettenmoleküle aus Aminosäuren, die über Peptidbindungen zwischen Carboxyl- und Amino-Gruppen verknüpft sind. An ein zentrales Kohlenstoffatom sind eine Amino-Gruppe ($-NH_2$), eine Carboxyl-Gruppe ($-COOH$), ein Wasserstoffatom ($-H$) und ein für die Aminosäure typischer, organischer Rest ($-R$) gebunden. Die funktionellen Seitenketten bestimmen die dreidimensionale Struktur und die chemische Reaktivität eines Proteins. Als Primärstruktur eines Proteins wird die lineare Abfolge der Aminosäuren und ihre kovalente Verknüpfung über Peptidbindungen bezeichnet. Durch Wasserstoffbrücken stabilisiert, können regelmäßige Faltungen (Sekundärstruktur) der Polypeptidkette entstehen. Der lokale Ausbildungsort der Wasserstoffbrückenbindung, zum Beispiel zwischen benachbarten Aminosäureresten, ist für die Bildung von räumlichen Motiven, wie α -Helices, β -Faltblättern oder -schleifen, oder ungeordneten, sogenannten "Random-Coil"-Strukturen, verantwortlich. Die gesamte dreidimensionale Struktur des Proteins wird Tertiärstruktur genannt. Sie wird durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den organischen Resten stabilisiert. Auch schwache Wechselwirkungen

wie Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Interaktionen und van-der-Waals-Wechselwirkungen verleihen zusätzliche Stabilität. Zahlreiche funktionelle Proteine bestehen aus Aggregaten mehrerer Polypeptidketten, wobei es sich um gleichartige oder verschiedene Ketten handeln kann (Quarternärstruktur). Oftmals erreicht das Protein erst so seine volle Funktionsfähigkeit, da die Tertiärstruktur zu flexibel ist, um eine spezifische Bindung eines anderen Proteins oder Regulatormoleküls zu ermöglichen [Murray *et al.*, 2003].

Zuckerreste können bei der Proteinfaltung helfen bzw. die Stabilität von Proteinen erhöhen [Rudd *et al.*, 2001]. Proteine, die zusätzlich kovalent gebundene Kohlenhydratgruppen (Oligosaccharide) besitzen, werden als Glykoproteine bezeichnet [Varki *et al.*, 2009]. Die Bindung der Oligosaccharide an das Protein kann auf verschiedene Arten erfolgen: O-glykosidisch (über die OH-Gruppe des Serins oder Threonins), N-glykosidisch (über die Amid-Gruppe des Asparagins) oder über Phosphatreste. Im Organismus kommen sie zum Beispiel als Strukturproteine in Zellmembranen, als Membranproteine bei Zellinteraktionen oder als Bestandteile des Immunsystems vor. Insgesamt spielen in menschlichen Glykoproteinen acht Zucker eine bedeutende Rolle. Dazu zählt auch die Galaktose und das N-Acetylgalaktosamin (GalNAc).

2.5.1 Galektine

Kohlenhydrat-bindende Proteine, die Zellen agglutinieren oder Glykokonjugate präzipitieren, heißen Lektine. Eine Vielzahl von Lektinen kann selbst als Glykoprotein bezeichnet werden. Lektine haben im Allgemeinen zwei spezifische Bindestellen für Zucker. Diese Bindestellen heißen Kohlenhydrat-Erkennungs-Domäne (engl. *carbohydrate recognition domain*, CRD). Sie ermöglichen eine Bindung an Zellmembranen und damit eine Auslösung von chemischen Reaktionen, haben jedoch selber keine enzymatische Aktivität. Sie ändern ihre kovalente Struktur nicht [Gabius *et al.*, 2011]. Dokumentiert ist ihr Einfluss bei der Zellmigration und -teilung, Signalleitung und im Immunsystem [Rabinovich *et al.*, 2002]. Erstmals entdeckt wurden Lektine in Pflanzen und Mikroben, aber heute kennt man auch viele Lektine die tierischen oder menschlichen Ursprungs sind [Sharon & Lis, 2004a]. Diese werden in fünf Familien (C-, I- und P-Typ-Lektine, Pentraxine, Galektine) unterteilt.

Galektine sind Lektine, die spezifisch β -Galaktose bzw. Glykokonjugate, die β -Galaktose-Motive besitzen, binden und strukturelle Ähnlichkeiten in den CRDs aufweisen und sowohl in normalem als auch pathogenem Gewebe exprimiert werden. Bis heute wurden 15 Mitglieder dieser Familie identifiziert. Während einige davon nur eine CRD besitzen und als Monomere biologisch aktiv sind

(Galektin-5, -7, und -10), existieren andere als Homodimer (Galektin-1, -2, -11, -13, -14, und -15) oder Oligomer (Galektin-3, -4, -6, -8, -9, und -12). Sie werden in Proto-, Tandem-Repeat- und Chimera-Typen eingeteilt [Camby *et al.*, 2006]. Abbildung 2.9 zeigt die verschiedenen Typen und ihre Unterscheidungsmerkmale. Proto-Typen besitzen eine CRD pro Untereinheit, wobei die Untereinheiten nicht-kovalent verknüpft sind. Bei der Tandem-Repeat-Form werden zwei unterschiedliche CRDs über ein kurzes Linker-Peptid kovalent verbunden und der Chimera-Typ besteht aus einer CRD und einer nicht-Lektin-Domäne. Die Entdeckung weiterer Galektine ist wahrscheinlich, da in der Literatur bereits von Homologen die Rede ist [Cooper & Barondes, 1999]. Alle weiteren Nicht-Säugetier-Galektine werden nach dem Organismus benannt, in dem sie gefunden werden, und ebenfalls in die Unterfamilien eingeteilt [Vasta, 2009].

Galektine erfüllen nicht nur intrazelluläre, sondern auch extrazelluläre Aufgaben. Sie zeigen Kennzeichen cytosolischer Proteine und haben einen acetylierten N-Terminus und eine mangelhafte Glykosylierung [Leffler *et al.*, 2002], [Camby *et al.*, 2006]. Indem sie an Glykoproteine (z.B. Integrin, Laminin, Fibronectin, CD_x -Rezeptoren, GM1 Ganglioside) auf der extrazellulären Matrix binden tragen zu Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen bei oder vernetzen benachbarte Zellen [Hughes, 2001], [Camby *et al.*, 2006]. Die Bildung von Galektin-Glykoprotein-Gittern auf den Zelloberflächen kann Signalwege aktivieren und damit zelluläre Funktionen steuern. Im Immunsystem werden auf diese Weise Entzündungsreaktionen, Wirt-Pathogen-Interaktionen so wie allergische Reaktionen, die Reifung/Differenzierung von B-Zellen und die Apoptose von T-Zellen reguliert. Des Weiteren sind Galektine für die Regulierung des Zellwachstums verantwortlich und an der Migration von Zellen beteiligt.

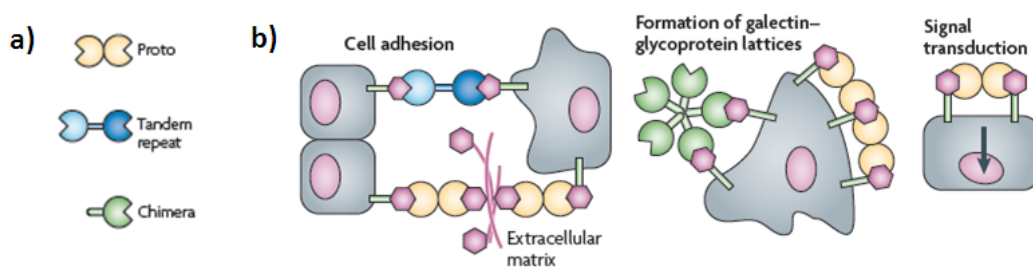


Abbildung 2.9: a) Es wird zwischen Proto-, Chimera- und Tandem-Repeat-Typen unterschieden. Die CRDs werden durch die ovale Aussparung symbolisiert. b) Galektine binden an Glykoproteine in der Zellmembran und ermöglichen so Zelladhäsion, die Ausbildung von Galektin-Glykoprotein-Clustern und die Aktivierung von Signalwegen. Aus [Vasta, 2009].

Das erste entdeckte Galektin ist Galektin-1 (Gal-1). Es existiert sowohl als Monomer wie auch als nicht-kovalent verknüpfte Dimerform mit zwei CRDs, die jeweils 14.5 kDa wiegen. Wie bei den meisten Galektine besteht ihre Kernsequenz aus 130 Aminosäuren und ist in Form eines β -Sandwiches gefaltet. Die konkave Seite des Sandwiches mit der Furche für die CRDs, wird aus 6 parallelen β -Strängen (S1-S6) und die konvexe Seite aus 5 antiparallelen β -Strängen (F1-F5) gebildet (vgl. Abbildung 2.10). Die N- und C-Termini jeder Untereinheit befinden sich an den Berührungsflächen zwischen den Monomeren. Die beiden CRD sind an den äußersten Enden des Proteins lokalisiert und umfassen die β -Stränge S4-S6a. Sie enthalten die hoch konservierten Aminosäurereste His44, Asn46, Arg48, Val59, Asn61, Trp68, Glu71 und Arg73. Diese Aminosäuren sind an der Bindung des β -Galactosids beteiligt, indem z.B. die Seitenketten von Asparagin, Histidin, Arginin und Glutamin Wasserstoffbrückenbindungen mit Sauerstoffatomen des Disaccharids ausbilden. Der Tryptophan-Rest 68 sorgt mit Hilfe von C-H/ π -Interaktionen zu den Kohlenstoffatomen des Galaktose-Rings für die korrekte Anordnung des Disaccharides in der Bindetasche, wodurch die hohe Bindespezifität erreicht wird. An der Berührungsfläche zwischen den Monomeren treffen jeweils die beiden β -Stränge S1 und F1 aus den N- und C-terminalen Bereichen aufeinander, die über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Außerdem sorgen hydrophobe Interaktionen zwischen den Seitenketten einiger unpolarer Aminosäurereste aus S1 und F1 für den Zusammenhalt des Dimers [López-Lucendo *et al.*, 2004].

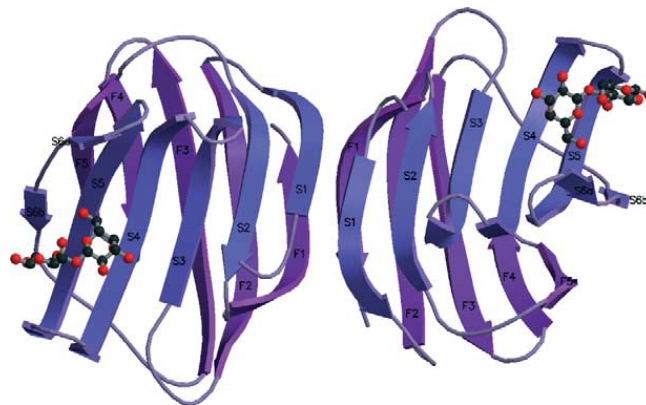


Abbildung 2.10: Kristallstruktur des homodimeren hGal-1. Die parallelen und antiparallelen Stränge sind gezeigt wie auch die CRDs mit Laktose-Molekül. Aus [López-Lucendo *et al.*, 2004].

Aktuell orientiert sich die Lektinforschung zunehmend an den Galektinen anderer Tiergruppen, bei denen weniger Mitglieder bekannt sind. Chicken Galektine

haben sich als attraktive Modelle für die Untersuchung der divergenten Evolution von Proto-Typen erwiesen, da diese Gruppe aus nur drei Mitgliedern besteht (cG-1A, -1B und -2). Die Verwandtschaft von cG-1A und -1B mit hGal-1 reicht bis zur Trennung der phylogenetischen Linien von Vögeln und Säugern durch Genduplikation zurück [López-Lucendo *et al.*, 2009]. Diese drei Proto-Typen zeigen sehr ähnliche Aminosäuresequenzen im Bereich der CRDs und die Oxidation von Cystein-Resten führt zu einer Strukturänderung, in Folge dessen ihre Zuckerbindeaktivität verändert wird [Hirabayashi & Kasai, 1991].

CG-14 hat drei Cysteinreste. Auf Grund der exponierten Lage im N-terminalen Bereich, kommt es nur zwischen Cys2 und Cys7 zur Ausbildung von Disulfidbrücken. Der lokale Torsionswinkel und die Position des N-Terminus verändern sich. Die gesamte Struktur erscheint kompakter und CG-14 bekommt einen monomer-ähnlichen Charakter. Bei CG-16 werden die CRDs durch die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke zwischen Cys16 und Cys88 verzerrt. Die Bindeaktivität geht durch die Oxidation der Thiolgruppen zu Sulfinaten und Sulfinaten verloren [Varela *et al.*, 1999], [Sakakura *et al.*, 1990].

hGal-1 bildet durch Oxidation drei intramolekulare Disulfidbrücken zwischen Cys2-Cys130, Cys16-Cys88 und Cys42-Cys60 aus [Inagaki *et al.*, 2000]. Es kommt zu gravierenden Strukturänderungen im Bereich der CRDs und der Berührungsfäche zwischen den Monomer-Untereinheiten. Die Bindeaktivität geht verloren und das Homodimer zerfällt und bildet höhere Oligomere aus. Diese können mit Gelelektrophorese und Filtration nachgewiesen werden [Hirabayashi & Kasai, 1991], [Scott *et al.*, 2009], [Whitney *et al.*, 1986]. Der Oxidationsprozess wird durch die Anwesenheit eines Liganden verlangsamt [Levi & Teichberg, 1981], [Cho & Cummings, 1995], [Stowell *et al.*, 2009]. Kovalente Modifikation der SH-Gruppen (Cys2/Cys130) durch Iodacetamid verhindert die Oxidation vollständig [Whitney *et al.*, 1986], [Clerch *et al.*, 1988], der mutagene Austausch von Cystein durch ein Serin ebenfalls [Cho & Cummings, 1995], [Abbott & Feizi, 1991], [Hirabayashi & Kasai, 1991], [Nishi *et al.*, 2008]. Oxidiertes hGal-1 kann Karbohydrat-unabhängige Aktivitäten auslösen, z.B. die Regeneration von Axonen [Inagaki *et al.*, 2000], [Horie *et al.*, 2005] oder die Auslösung des Zelltods [Wells & Mallucci, 1991], [Yamaoka *et al.*, 1991].

2.5.2 Lipid-Rafts und Mikrodomänen

Biologische Membranen bilden eine Trennschicht zwischen verschiedenen Bereichen innerhalb einer lebenden Zelle und ihrer äußeren Umgebung. Die Struktur der Membran wird durch Lipide, eingebaute Proteine und Kohlenhydrate bestimmt. Es entsteht eine Lipid-Doppelschicht (Abbildung 2.11, a). Der Einbau

von Membranproteinen ermöglicht einen selektiven Transport von Molekülen durch die Membran und zwischen Kompartimenten. Zum Membranaufbau tragen hauptsächlich drei Lipidtypen bei: die Phospholipide, die Sphingolipide und das Cholesterol. Je nach Zusammensetzung der Membran aus unterschiedlichen Membranproteinen kann diese verschiedene Aufgaben übernehmen, wobei die Lipide als Lösungsmittel für die Membranproteine dienen [Tan *et al.*, 2008]. Das Flüssig-Mosaik-Modell beschreibt die Membran dabei als zweidimensionale Flüssigkeit, in der alle Lipide und Proteine mehr oder weniger freibeweglich in der zweidimensionalen Ebene diffundieren können [Singer & Nicolson, 1972]. Diese Dynamik bildet die Voraussetzung für die Auslösung von Signalketten.

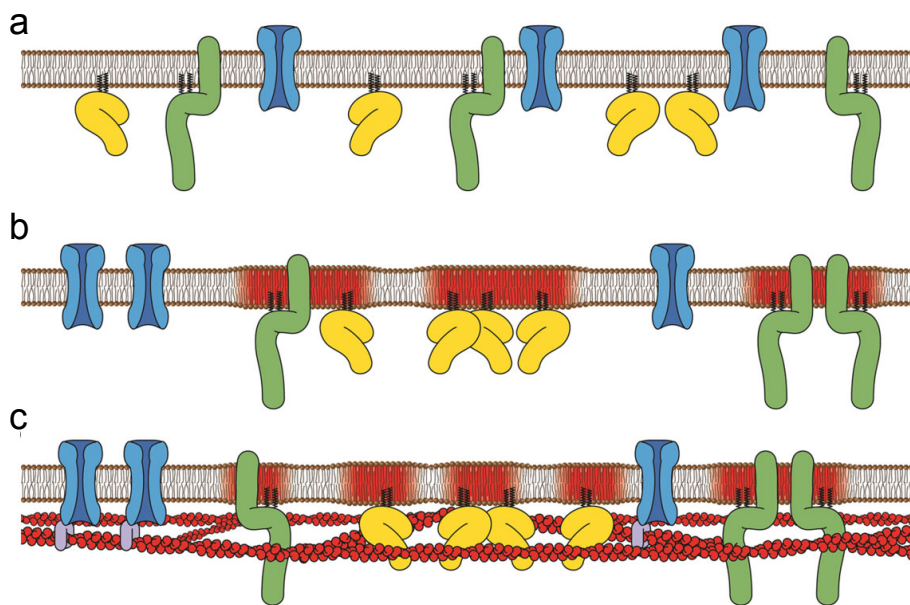


Abbildung 2.11: a) zeigt das Lipid-Doppelschicht-Modell von Singer und Nicolson mit einer zufälligen Verteilung der Membranproteine. b) Nach der klassischen Lipid-Raft-Hypothese gibt es in der Membran große, geordnete Bereiche, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind. Sie dienen als Plattform für bestimmte Membranproteine und zelluläre Prozesse. c) Moderne Interpretation der Lipid-Raft-Hypothese: es gibt ein Zusammenspiel kleiner, hoch-dynamischer Domänen und dem darunter liegenden kortikal Aktin-Netzwerk. Aus [Owen *et al.*, 2012].

Die 1988 aufgestellte Hypothese zur Existenz von „Lipid Rafts“ innerhalb der Membran besagt, dass Lipidmoleküle und Glykoproteine nicht gleichmäßig in der Membran verteilt sind [Simons & Van Meer, 1988]. Lipid Rafts sind klassisch als heterogene, hoch-dynamische Mirkodomänen, die reich an Cholesterolen und Sphingolipiden sind, zelluläre Prozesse steuern und diese voneinander abgrenzen.

zen, definiert (Abbildung 2.11, b). Durch Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen kann es zum Zusammenschluss kleinerer Domänen zu größeren Clustern kommen. Die Clustergrößen variieren im Bereich von 10 - 200 nm [Pike, 2006]. Die Clusterbildung ist Ausgangspunkt für Signalleitungen, Transportprozesse, die Organisation des Zytoskeletts an sich und sogar für den Eintritt von Krankheitserregern in den Organismus [Munro, 2003]. Lipid Rafts sind in einem ständigen Prozess der Auflösung und Neubildung begriffen [Jacobson *et al.*, 2007], [Pike, 2003] und werden durch das Cytoskelett stabilisiert. Aktin-Filamente ermöglichen eine Verknüpfung bzw. Kommunikation von kleineren Domänen (Abbildung 2.11, c). Eine Zerstörung des Zellgerüst oder die Entfernung von Cholesterol, verringert die Anzahl/Größe der Rafts [Owen *et al.*, 2012]. Die Verknüpfung zwischen Aktin-Cytoskelett einer Zelle und der extrazellulären Membran erfolgt über sogenannte fokale Adhäsionen [Rottner & Stradal, 2011]. Diese verankernden Zellverbindungen sind dynamisch und werden durch eine ganze Reihe von räumlichen und zeitlichen Wechselwirkungen zwischen Molekülen auf und in der Zellmembran vermittelt. Fokale Adhäsionen können sich aus über 50 verschiedenen Proteinen zusammensetzen [Zamir & Geiger, 2001] und sind auf klar abgegrenzte Bereiche der Zelle beschränkt [Zaidel-Bar *et al.*, 2004]. Sie steuern die Gewebeformation, Signalübertragungen und Migrationen der Zelle selbst.

3 Material und Methoden

3.1 Ensemble-Messungen

3.1.1 Absorptions- und Emissionsmessungen

Beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz wird die Lichtintensität geschwächt. Die Intensitätsschwächung mit der Konzentration c der absorbierenden Substanz und der Weglänge d beschreibt das Gesetz von Lambert-Beer:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon cd. \quad (3.1)$$

Hierbei ist A die gemessene Absorption bei einer festen Wellenlänge, I_0 und I die Intensitäten vor und nach dem Durchgang durch die absorbierende Substanz und ϵ ist der Extinktionskoeffizient in $M^{-1}cm^{-1}$. Für geringe Farbstoff- ($\sim 0.5 \mu M$) oder Proteinkonzentrationen ($< 20 \mu M$), ist die gemessene Absorption direkt proportional zur Konzentration, da Reabsorption und FRET-Effekte ausgeschlossen werden können.

Die Absorptionsmessungen werden mit einem Standard-UV/VIS-Photometer (V-650; Jasco, Gross-Umstadt, Detuschland) in $500 \mu L$ Quartzglas-Küvetten (Hellma, Mühlheim, Deutschland), bei denen der Hersteller eine Transmission von über 80 % bei Wellenlängen von 190 - 2500 nm garantiert, durchgeführt. Der Markierungsgrad der Proteine wird nach der Vorschrift für AlexaFluor-Dyes bestimmt [Invitrogen, 2006]:

$$DOL = \frac{A_{650} \cdot \epsilon_{p,280}}{(A_{280} - CF \cdot A_{650}) \cdot \epsilon_{F,max}}. \quad (3.2)$$

$\epsilon_{P,280}$ ist der Extinktionskoeffizient des Proteins bei 280 nm, gegeben mit $\epsilon_{P,280} = 15700$ [Dam *et al.*, 2005], A_{280} und A_{650} die Absorptionen bei 280 bzw. 650 nm, $\epsilon_{F,max}$ der Extinktionskoeffizienten des verwendeten Farbstoffs und $CF = 0.035$ der Korrekturfaktor des verwendeten Farbstoffes Alexa647.

Fluoreszenz-Spektren werden mit einem Fluoreszenz-Spektrometer aufgenommen (FP-6500; ebenfalls Jasco). Eine Korrektur der Emissionsspektren auf den Detektoreinfluss und den optischen Weg ist nicht nötig. Lediglich der Raman-Streulicht-Peak wird durch parallele Messungen mit reiner Pufferlösung und identischen Einstellungen herausgerechnet. Über den Vergleich der gemessenen Werte für Absorption (A) und Emission (E) der markierten Proteine (P) mit einer Farbstoff-Referenz (F) wird die Quantenausbeute bestimmt:

$$Q = \frac{A_F \cdot E_P}{A_P \cdot E_F}. \quad (3.3)$$

3.1.2 Anisotropie-Messungen

Für die „steady-state“-Anisotropie-Messungen mit Tryptophan (Sigma, München, Deutschland) und hGal-1 wird ein kommerzielles L-Format-Fluorometer (FP-6500; Jasco, Gross-Umstadt, Deutschland) verwendet. Die Polarisationsfilter transmittieren zum einen zwischen 200 und 700 nm (UV-Polarisatoren) und zum anderen zwischen 320 und 750 nm (VIS-Polarisatoren) mit einer Effizienz von $< 1 : 100$. Die Bandbreite von Anregungs- und Emissionsstrahl beträgt 10 nm. Folgende Paarungen werden für die Anregungs-/Emissionswellenlänge verwendet: 300/350 nm und 340/425 nm. Für jede einzelne Messung wird der G-Faktor bestimmt und auf Grund seiner Sensitivität gegenüber Streulicht, das von Aggregaten oder Verunreinigungen stammt, als Qualitätsmerkmal verwendet. Mittels einer Makro-Routine von Jasco und Gleichung 2.49 lassen sich aus den verschiedenen Kombinationen für die Anregungs-/Emissions-Polarisationen, die Anisotropie-Werte berechnen.

Für die Polarisationsmessungen werden die Filter in die am Gerät bereits vorhandenen Halterungen montiert. Manuell kann anschließend die Polarisationsrichtung zwischen 0° und 90° variiert werden. Durchgeführt werden die Messungen in Quarzglas-Küvetten mit einem Volumen von 1 mL bei 20°C . Die Detektorspannung variiert zwischen 300 - 500 V. Eine Fehlerabschätzung erfolgt über die Bestimmung von Mittelwert und Standardabweichung/Standardfehler.

3.1.3 Zeitkorrelierte Einzelphotonen-Messungen

Die Lebensdauern von Tryptophan, in einer Konzentration von 10 mM, und hGal-1 (1 mg/mL) werden mit einem zeitauflösenden Fluoreszenz-Spektrometer (FluoTime 200; PicoQuant, Berlin, Deutschland) in Kombination mit gepulsten LEDs der Wellenlängen 300 und 340 nm (PLS300, PLS340; PicoQuant

GmbH) durchgeführt. Die Temperatur wird auf 20°C geregelt. Die Laserpulsseigenschaften können durch Bestimmung der Antwortfunktion des Gerätes (IRF) auf diesen Puls mit einer Ludox-Lösung (Sigma, München, Deutschland) im Vorfeld vermessen werden. Um diese IRF werden die Histogramme der Proben korrigiert. Durchgeführt werden die Messungen in 1 mL Quartzglas-Küvetten, bei einer maximalen Repetitionsrate von 10 MHz und einer Leistung von 0.8 bzw. 1.0 μW der Dioden PLS-300 bzw. PLS-340. Die erhaltenen Daten werden mit einem exponentiellen Fit mit drei Exponenten ausgewertet.

3.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

3.2.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

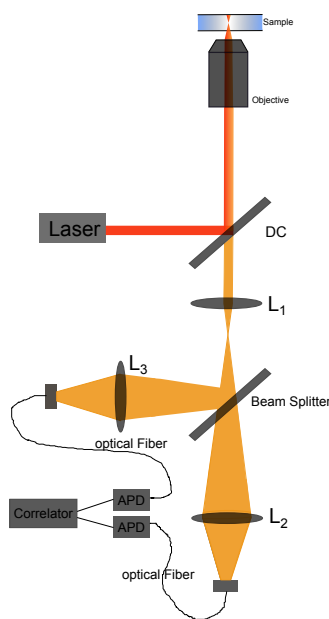


Abbildung 3.1: FCS-Aufbau.

Abbildung 3.1 zeigt den konfokale FCS-Aufbau. Anregungslichtquelle ist zum einen ein Helium-Neon-Laser (Coherent, Auburn, USA) und zum anderen ein Diodenlaser (Cube 635; Coherent, Dieburg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 633 nm bzw. 641 nm. Der Helium-Neon-Laser wird in der TEM_{00} -Mode im Dauerstrichbetrieb eingesetzt und zeigt nach einer Anlaufphase von einer Stunde Leistungsschwankungen von $<2\%$. Ein dichroitischer Strahlteiler (645DLRP; Omega Optics; Brattleboro, VT) koppelt den kollimierten Laserstrahl in das Öl-Immersion-Objektiv (63x, NA 1.4; Zeiss, Jena, Deutschland) des inversen Fluoreszenzmikroskops (Axiovert-100, Zeiss, Jena, Deutschland) ein. Das Fluoreszenzlicht wird mit dem gleichen Objektiv wieder eingesammelt. Zusätzlich ist noch ein Bandpassfilter (700DF75; Omega Optics; Brattleboro, VT) verbaut. Über einen kubischen, nicht-polarisierenden 50/50-Strahlteiler (Linos, Göttingen, Deutschland) wird das Signal in optische Fasern mit einem Durchmesser von $\sim 100\ \mu\text{m}$ eingekoppelt und auf die aktive Fläche von zwei Einzel-Photonen sensitiven Avalanche Dioden (AQR-14; Perkin Elmer; Dumberry, Kanada) abgebildet. Der Fasereingang fungiert als Lochblende, das Detektionsvolumen wird auf wenige

Femtoliter beschränkt. Die Maximalzählrate der Detektoren beträgt 10 MHz, die Dunkelzählrate 50 Hz und die Totzeiten etwa 50 ns. Über eine Hardwarekorrelatorkarte (ALV-6010; ALV GmbH, Langen, Deutschland) werden die Signale in Echtzeit über Kreuzkorrelation verarbeitet. Die Zeitauflösung der Karte beträgt 6,25 ns. Zusätzlich hat der Messaufbau eine selbstgebaute Objektivheizung. Über einen angelegten Kupferring, der über eine Wasserkühlung beheizt wird, können die Proben auf einer konstanten Temperatur im Bereich von 5 bis 55 °C gehalten werden.

Bindungsvorgänge werden in der Diffusionszeit wiedergespiegelt. Sie kann aus dem zweidimensionalen Diffusionsmodell (Gleichung 2.33) bestimmt werden. Photophysikalische Kinetiken des Moleküls werden in diesem Modell berücksichtigt und mit angefügt, um Informationsverluste bzw. Ungenauigkeiten bei der Datenanalyse zu vermeiden. Den Parametern β , τ und A werden feste Werte zugeordnet und dienen als Qualitätskontrolle. Die Diffusionszeit und Teilchenzahl wird jeweils durch den Fit ermittelt.

Um Unsicherheiten in den Ergebnisse zu vermeiden und eine Vergleichbarkeit der Daten unabhängig vom Messtag zu gewährleisten, wird anstelle der Diffusionszeit die Diffusionskonstante $D = k_B T / 6\pi\eta R_h$ berechnet. Auch der Labelgrad kann mit der FCS-Technik bestimmt werden. Die mittlere, detektierte Fluoreszenzintensität $\langle I(t) \rangle$ geteilt durch die Anzahl der Teilchen im Fokus ergibt die Helligkeit pro Teilchen (B) und damit ein Maß, wie viele Fluorophore pro Protein gebunden sind

$$B = \frac{\langle I(t) \rangle}{N}. \quad (3.4)$$

Die Dissoziationskonstanten werden aus den Änderungen der Diffusionskonstanten $D(c_L)$ als Funktion von der Liganden-Konzentration c_L ermittelt. Die Datenkurven werden mit dem Hill-Modell angefügt:

$$D(c_L) = D_{Gal} + (D_{Gal,L} - D_{Gal}) \frac{c_L^n}{K_D^n + c_L^n}. \quad (3.5)$$

$D_{Gal,L}$ und D_{Gal} sind die Diffusionskonstanten von gebundenem und frei-diffundierendem Galektin, $K_D = c_{Gal}c_L/c_{Gal,L}$ die Dissoziationsrate und n ist ein Maß für die Anzahl der beteiligten Bindungsstellen.

3.2.2 Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die *d*STORM-Messungen wird ein Weitfeld-Aufbau verwendet. Das inverse Mikroskop (IX-71; Olympus, Hamburg, Deutschland) ist auf einem schwingungsgedämpften Optiktisch (Linos, Göttingen, Deutschland) aufgebaut und mit einem Öl-Immersions-Objektiv (NA 1.45, 60x; PlanApo, Olympus) und zur Minimierung von Drifteffekten mit einer Nosepiece Stage (IX2-NPS, Olympus) ausgestattet. Es kann sowohl für TIR- als auch für HILO-Beleuchtung genutzt werden. Für die Durchlichtmikroskopie wird eine 100 W Halogenlampe verwendet. Der schematische Aufbau ist in Abbildung 3.2 gezeigt.

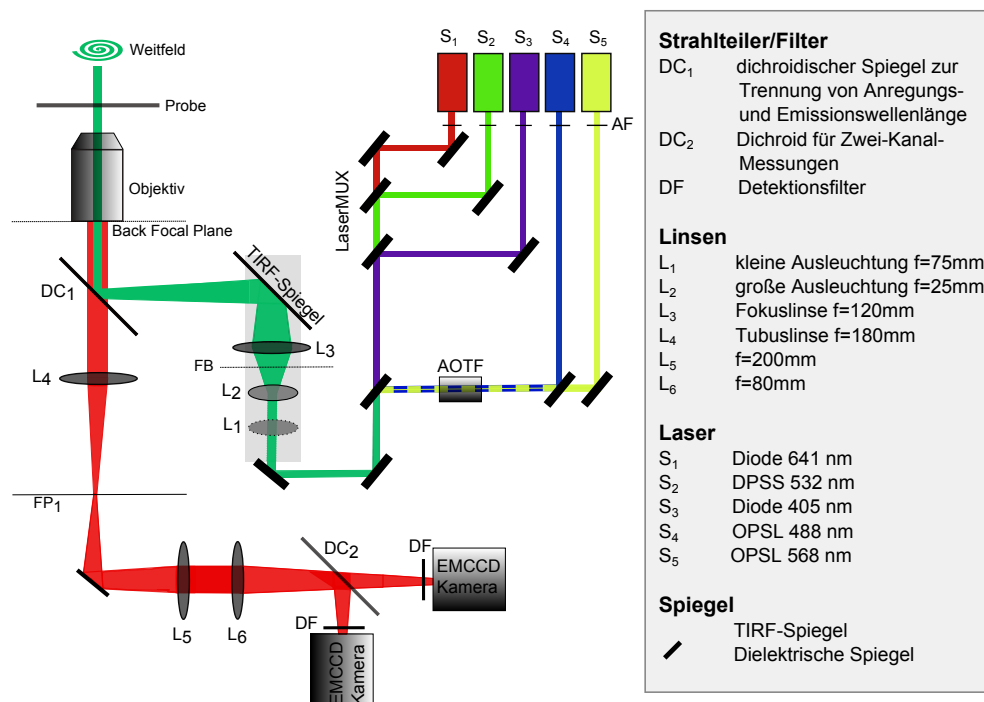


Abbildung 3.2: Der Weitfeld-*d*STORM-Aufbau hat 5 verschiedene Laserlinien zur Anregung, die durch Linsen aufgeweitet und auf die BFP abgebildet werden. Mechanisch kann zwischen TIR und EPI gewechselt werden. Zudem können auch Zwei-Farben-Messungen durchgeführt werden.

Der Anregungsarm besteht aus fünf verschiedenen Festkörperlasern mit Wellenlängen im Bereich von 404 bis 641 nm (vgl. Tabelle 3.1), deren Ausgangsleistung (gepulst oder Dauerstrich-Betrieb) durch entsprechende Software oder einen akustooptischen Kristall (AOTF) geregelt werden kann. Alle Anregungslinien werden mit Bandpassfiltern (Laser Diode Clean-Up; Semrock, Rochester,

NY) in einem Fenster von 10 nm aufgereinigt. Die räumliche Überlagerung der verschiedenen Wellenlängen erfolgt mittels LaserMUX-Filtern (Semrock). Vor der Fokussierung auf die hintere Fokalebene des Objektivs, wird der Strahlengang noch über Linsen aufgeweitet. Ausleuchtungsintensität bzw. Leistungsdichte können über die Brennweiten der Linsen bestimmt werden. Über einen Spiegel kann außerdem zwischen TIR- und HILO-Beleuchtung gewechselt werden.

Tabelle 3.1: Übersicht über die verwendeten Laser zur Anregung.

Lasertyp	Spezifikation	Laserausleistung [mW]	Firma
404 nm Diode	Cube 405-100C	103	Coherent
488 nm OPSL	Sapphire 488 LP	110	Coherent
532 nm NdYAG	Nano250	110	Linos
568 nm OPSL	Sapphire 568 LP	110	Coherent
641 nm Diode	Cube 640-100C	103	Coherent

Das Fluoreszenzlicht wird mit demselben Objektiv wieder eingesammelt und über einen dichroitischen Strahlteiler vom Anregungslicht getrennt. Eine spektrale Filterung erfolgt über einen Langpass und/oder Bandpassfilter. Über eine Tubuslinse wird das Fluoreszenzsignal auf die EMCCD-Kamera (EMCCD Camera Ixon DU897, Andor, Belfast, UK) abgebildet. Das gesamte optische System im Detektionsarm ermöglicht eine 150-fache Vergrößerung. Ein Pixel auf der Kamera entspricht 106,67 nm in der Probe.

Für die Rekonstruktion des hochaufgelösten Bildes ist es notwendig eine Serie von Bildern (typischerweise zwischen 4000 und 50000), in denen jeweils andere Fluorophore im An- oder Aus-Zustand sind, aufzunehmen. Die Anzahl hängt von der untersuchten Struktur, den Schaltkinetiken und den Labeldichten ab [van de Linde *et al.*, 2010]. Zur Auswertung wird die Software `rapi dSTORM` verwendet [Wolter *et al.*, 2010]. Die Software wertet jedes Einzelbild aus. Es werden die Schwerpunktskoordinaten jedes detektierten Fluorophors mit einer 2D-Gauß-Verteilung ermittelt und anschließend in einem zweidimensionalen Pixelgitter (ein Pixel entspricht 10 nm im hochaufgelösten Bild) aufsummiert. Eine Farbkodierung gibt dabei Aufschluss über die Anzahl und die Positionen der Lokalisationen und damit innerhalb eines gewissen Fehlerintervalls auch über die Verteilung der Fluorophore in der Probe. Über Amplituden- und Asymmetrie-Filter der PSF kann eine Steigerung der Lokalisationsgenauigkeit erreicht und Doppel- oder Multispots herausgefiltert werden. Des Weiteren ist eine Driftkorrektur möglich.

3.2.3 Clusteranalyse

Morphologische Clusteranalyse

Allgemein ist eine Clusteranalyse ein Verfahren zur Entdeckung von ähnlichen Strukturen oder Mustern in Datensätzen. Die Gruppen von ähnlichen Daten werden als Cluster bezeichnet. In den hochaufgelösten Zellbildern können Akkumulationen von Lokalisationen beobachtet und als Cluster bezeichnet werden. Für die Untersuchung dieser Cluster auf den Zelloberflächen wird ein auf MatLab (kommerzielle Software) basierendes Makro verwendet [Malkusch, 2011]. Damit können aus den `rapidSTORM`-Rohdaten Informationen über die Fläche, den Umfang und den Radius von Clustern, so wie die Anzahl der Lokalisationen innerhalb des Clusters und die Zirkularität der Fläche gewonnen werden. Die Auswertung beruht dabei auf einer morphologischen Clusteranalyse. Zunächst wird dem Farbcode eine Grau-Skalierung zugewiesen und ein Gauß'scher Blur auf die Daten angewendet. Die gefundenen Cluster werden dadurch „ausgeschmiert“, die Konturen unschärfer. Anschließend kann die Anzahl der „weißen“ Pixel, also Pixel die eine Lokalisation beinhalten, gezählt werden und daraus, auf Grund von bekannten Pixelgrößen und Auflösungserhöhungen, die Cluster-radien ermittelt und in einem Histogramm graphisch veranschaulicht werden.

Mean-Square Displacement

Die Analyse von Bewegungstrajektorien einzelner, kleiner Partikel in zwei Dimensionen basiert auf der Auswertung der jeweiligen, beobachteten Teilchenposition in einem Bild der aufgenommenen Filme. Jedem Punkt der Trajektorie in der x-y-Ebene wird eine zeitliche Koordinate zugeordnet $r(t) = [x(t), y(t)]$. Um den statistischen Charakter der Diffusionsbewegung in d Dimensionen zu erhalten eignet sich die mittlere, quadratische Verschiebung (MSD, *mean-square displacement*) der Trajektorie sehr gut [Schweizer, 2007]. Es gilt:

$$\langle r^2(\Delta t) \rangle = \frac{1}{n}((\Delta r_1(\Delta t))^2 + (\Delta r_2(\Delta t))^2 + (\Delta r_3(\Delta t))^2 + \dots) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n r_i^2(\Delta t). \quad (3.6)$$

Gleichung 3.6 beschreibt die Verschiebung für genau einen Zeitpunkt Δt . Es fehlt demnach noch die Aufsummierung über alle Zeitpunkte Δt_j , um die gesamte, zeitliche Bewegung zu erfassen.

Insgesamt werden fünf Arten von Diffusion und MSD-Trajektorien unterschieden (vgl. Tabelle 3.2) [Jue, 2009]. α ist der anormale Diffusions-Exponent und beschreibt den Anteil der anormalen Diffusion an der Gesamtbewegung. Für $\alpha = 1$ handelt es sich um klassische, Brown'sche Diffusion, die proportional

zur Zeit und einem konstanten Diffusionskoeffizient ist. Ist $0 < \alpha < 1$ ist die Bewegung anormal [Tejedor *et al.*, 2010].

Tabelle 3.2: MSD als Funktion der Zeit für die verschiedenen Arten der Diffusionsbewegung. $\langle r^2(t) \rangle$ ist die MSD, t die Zeit, d die Dimension, D_0 der Diffusionskoeffizient bei unendlicher Verdünnung, D der Diffusionskoeffizient, Γ und τ Konstanten, α der anormale Diffusions-Exponent, ν die Geschwindigkeit und $\langle r^2(t) \rangle_0$ das Quadrat des Radius einer Domäne.

Normal, random-walk	$\langle r^2(t) \rangle = 2dD_0t$
Gehindert-Normal	$\langle r^2(t) \rangle = 2dDt, D < D_0$
Anormal	$\langle r^2(t) \rangle = 2\Gamma t^\alpha, \alpha < 1$
Direkt, gerichtet	$\langle r^2(t) \rangle = 2dDt + \nu^2 t^2$
Beschränkt (Confined)	$\langle r^2(t) \rangle \cong \langle r^2(t) \rangle_0 [1 - \exp(-t/\tau)]$

Wird für einen Cluster der Massenschwerpunkt, durch Mittelung über alle Lokalisationen bestimmt, dann kann auch hier eine Diffusionsbewegung verfolgt werden. Die Rohdaten der Lokalisationen werden mit Hilfe eines *sliding window* zeitlich in Sets gefiltert. Ein Set besteht aus jeweils 100 Bildern, die einen Überlapp von 50 Bildern mit dem nächsten Set haben. Aus diesen Rohdaten wird der Massenschwerpunkt bestimmt und mittels MSD anschließend der Diffusionskoeffizient des Clusters.

Die üblichen Diffusionsbewegungen von Partikeln zeigt Abbildung 3.3. Im Fall von normaler Diffusion ergibt sich eine Gerade für das MSD aufgetragen gegen die Zeit. Bei der anormalen-beschränkten Diffusion ist die Teilchenbewegung auf eine gewisse Fläche geschränkt, die MSD-Kurve „knickt“ ab. Im Fall von „hopping“ bewegt sich das Teilchen nur temporär und verweilt immer wieder an einem Ort.

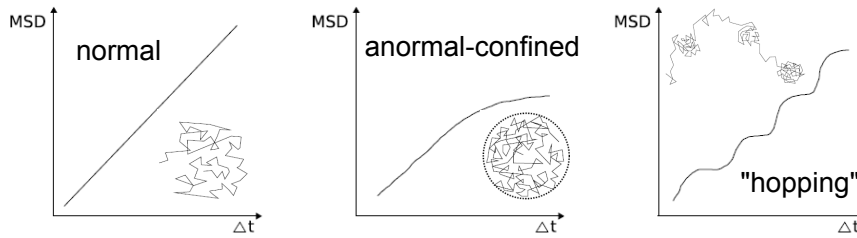


Abbildung 3.3: Verschiedene Arten des Random-Walks und die zugehörigen MSD-Kurven. Von links nach rechts: Isotroper, beschränkter und teilweise beschränkter („hopping“) Random-Walk.

3.3 Probenpräparation und Pufferbedingungen

Die Lektin-Herstellung erfolgt rekombinant. Aufgereinigt werden sie durch Affinitäts-Chromatographie über laktosilierte Sepharose 4B. Als Qualitäts- und Reinheitskontrolle werden Gelfiltrationen, Massenspektrometrie- und Zirkulardichroismus-Messungen durchgeführt. Des Weiteren wird die Proteinaktivität mittels Hämagglutinationsstudien, *solid-phase*/Zell-Bindungsstudien und isothermer Titrationskalometrie kontrolliert. Um die SH-Gruppen der Proteine vor Oxidation zu schützen, werden die Cysteine kovalent durch Iodacetamid (IAA), dass während der Aufreinigung gebunden wird, geschützt. Aufbewahrt werden sie in PBS-Puffer bei -20° (vgl. [Göhler *et al.*, 2010]).

3.3.1 Protein-Markierungen, Tryptophan-Lösung

Die Fluoreszenzmarkierung der Galektine wird durch Kopplung des amino-reaktiven Fluorophors Alexa647-NHS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) an exponierte Lysin-Reste auf der Proteinoberfläche durchgeführt. Es werden $100\ \mu\text{g}$ des reaktiven Farbstoffs in $50\ \mu\text{L}$ Dimethylformamid gelöst. Für die Markierung werden $100\ \text{mg}$ Galektin in $20\ \mu\text{L}$ Phosphatpuffer (PBS; Sigma, Munich, Deutschland) und $20\ \mu\text{L}$ NaHCO_3 -Lösung (steril filtriert, $100\ \text{mM}$, $\text{pH}\ 8.4$) gelöst und anschließend mit einem zweifachen Farbstoffüberschuss gemischt. Diese Lösung aus Farbstoff und Protein wird für $1.5\ \text{h}$ bei Raumtemperatur inkubiert, um einen Labelgrad von $0.7 - 1.0$ zu erreichen. Für höhere Markierungsgrade wird das Verhältnis von Protein zu Farbstoff, wie auch die Inkubationszeit, erhöht. Für die Aufreinigung via Größenausschluss-Chromatographie werden selbstgegossene Gelsäulen (HW-40F; Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Deutschland) mit PBS als Eluent verwendet. Die aufgereinigten Proteine können bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die FCS-Bindungsstudien wird das jeweilige fluoreszenzmarkierte Galektin in nanomolarer Konzentration vorgelegt und der Ligand in einem Konzentrationsbereich von $10^{-9}\ \text{M}$ bis $10^{-2}\ \text{M}$ zutitriert. Die Bindung zwischen beiden erfolgt innerhalb von $30\ \text{min}$. Gemessen wird in Glasmulden (Roth, Deutschland; Gesamtvolumen $100\ \mu\text{L}$) und als Puffer PBS ($\text{pH}\ 7.4$) mit $0.05\ \%$ Tween20 (Sigma, München, Deutschland) verwendet, um Adsorption der Proteine auf der Glasoberfläche zu vermeiden.

Die Anisotropie-Messungen werden in $500\ \mu\text{L}$ Quartzglas-Küvetten mit PBS-Puffer durchgeführt. Die Konzentration der unmarkierten Proteine wird unter $20\ \mu\text{M}$ gehalten und Tryptophan-Lösungen (Sigma, Munich, Deutschland) un-

ter 1 mM eingesetzt. Als Ligand für die Bindungsstudien wird das Disaccharid Laktose (Sigma, Munich, Deutschland) benutzt.

Für die Lösungen mit Glycerin (Sigma) werden die Viskositätswerte aus der Literatur entnommen [Sheely, 1932]. Es werden Viskositätsreihen mit Tryptophan und hGal-1 durchgeführt. Als Stammlösungen dient eine 80 %-ige Glycerin-PBS-Lösung (w/w). Durch Verdünnung mit PBS können Viskositäten im Bereich von 0 - 75 % (w/w) eingestellt werden. Für die Messreihe von hGal-1 in Anwesenheit von Laktose, wird das Protein zunächst mit 5 mM Laktose für eine Stunde inkubiert und anschließend in die viskosen Lösungen von Glycerin gegeben und die Anisotropie-Werte bestimmt.

Für die Oxidationsuntersuchungen muss das Reduktionsmittel Dithiothreitol (DTT) aus den Proteinproben entfernt werden. Dies kann mit Hilfe von Entsalzungs-Säulen (PD25 Mini-Trap; GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) mittels Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden. Es werden der genaue Zeitpunkt des Lösens festgehalten, dann das DTT über die Gelsäulen entfernt (Protokoll der Firma [Healthcare, 2011]) und anschließend Anisotropie-Zeitreihen gemessen (innerhalb der ersten vier Stunden werden alle 20 - 30 min 5 - 10 Werte aufgenommen, danach in Abständen von 1 bis 2 Stunden). Durch Zugabe des Reduktionsmittels Kupfersulfat (2.5 bis 7.5 μM) kann der Zerfallsprozess beschleunigt werden.

3.3.2 Zellmarkierungen, Click-Chemie

SK-N-MC Neuroblastomzellen

Aus der Literatur ist bereits bekannt, das hGal-1 mit bestimmten Rezeptoren auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen interagiert und das Zellwachstum reguliert [Kopitz *et al.*, 2001]. Die Neuroblastomzellen wachsen in Standard-Kulturflaschen (T25, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO_2 . Als Kulturmedium wird RPMI-1640 (PAA, Cölbe, Deutschland) mit 10 % FCS (PAA) eingesetzt. Neben Phenolrot als Indikator für den pH-Wert, enthält das Medium noch 4 mmol Glutamin (PAA) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (PAA). Eine Subkultur wird bei etwa 70 % Konfluenz angelegt. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wird für 10 min eine PBS-Lösung mit 0.05% Trypsin und 0.02% EDTA (PAA) verwendet.

Zellfärbungen mit hGal-1

Um Membranrezeptoren mit hGal-1 anzufärben werden Neuroblastomzellen in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen pro 1 mL in Lab-Tek2-Kammern (Nunc, Thermo FischerScientific, Langenselbold, Deutschland) kultiviert. Dort müssen

sie für zwei Tage anwachsen, bevor die eigentliche Markierung stattfinden kann. Dazu werden die fluoreszenzmarkierten Proteine in einer Konzentration von 0.01 - 1 μM für eine Stunde auf die Zellen gegeben und bei 37°C inkubiert. Vorher werden die LabTek-Oberflächen mit 2.5 % BSA (Sigma, München, Deutschland) für 30 min geblockt, um Glasadsorption zu vermeiden. Nach der Färbung wird vorsichtig für 3 mal je 5 min mit PBS gewaschen, dann für 10 min mit 4 % Formaldehyd fixiert und erneut für 4 mal je 5 min mit PBS gewaschen.

Click-Chemie

Das Konzept der Click-Chemie basiert auf der Idee, Reaktionen von Heteroatombindungen (C-X-C) sehr schnell und zielgerichtet durchzuführen. Die Reaktion muss modular und breit anwendbar sein, zu sehr hohen Ausbeuten führen und darf keine störenden Nebenprodukte liefern. Außerdem sind die Reaktionen unempfindlich gegenüber Oxidation, Reduktion und Hydrolyse und in wässriger Umgebung durchführbar [Kolb *et al.*, 2001]. Ein Paradebeispiel einer Click-Reaktion ist die 1,3-polare Cycloaddition, bei der ein 1,3-dipolares Molekül an ein Azid oder Alkin addiert wird. Katalysiert wird die Reaktion durch Kupfersulfat, Natriumascorbat und TBTA (Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin)). TBTA verhindert dabei die Disproportionierung und Oxidation von Kupfer [Meldal & Tornøe, 2008]. Eine Kopplungsstelle für Farbstoffe bieten Stickstoffe [Rostovtsev *et al.*, 2002]. In Zelloberflächen werden diese von Glykoproteinen, in denen die Sialinsäure vorkommt, bereitgehalten. Durch die Synthese spezieller Zucker, die im Zellzyklus metabolisiert werden, ist es möglich diese Zucker mit einer Click-Reaktion sehr effektiv und spezifisch mit einem Fluorophor zu markieren (vgl. Abbildung 3.4) [Sawa *et al.*, 2006], [Beatty *et al.*, 2006], [Beatty *et al.*, 2005]. Färbungen sind an lebenden Zellen möglich [Soriano del Amo *et al.*, 2010] und können ohne Kupfer durchgeführt werden [Baskin *et al.*, 2007].

Die Neuroblastom-Zellen werden in LabTeks im Standardmedium kultiviert. Zusätzlich zum Medium werden noch Zuckerlösungen, wie in [Homann *et al.*, 2010] beschrieben, mit einer Endkonzentration von 25 μM zugefüttert. Die Metabolisierung des Zuckers dauert zwei Tage. Danach werden sie mit dem Farbstoff Alexa647-Alkin in Konzentrationen zwischen 10 nM bis 100 μM gefärbt. Dieser wird, nach dem Blocken der Glasoberfläche mit 2.5 % BSA für 30 min, für eine Stunde mit 200 μM Kupfersulfat und 1 mM Natriumascorbat, auf die lebenden Zellen in den LabTeks, bei 37°C gegeben. Auf die Zugabe von TBTA wird verzichtet, da es für die Reaktion nicht notwendig ist und sich nachteilig auswirkt. Anschließend werden die Zellen für 3 mal je 5 min mit PBS gewaschen, dann entweder mit 4 % Formaldehyd für 10 min fixiert oder lebend vermessen. Nach dem Fixieren (entweder direkt nach der Färbung oder nach der Messung)

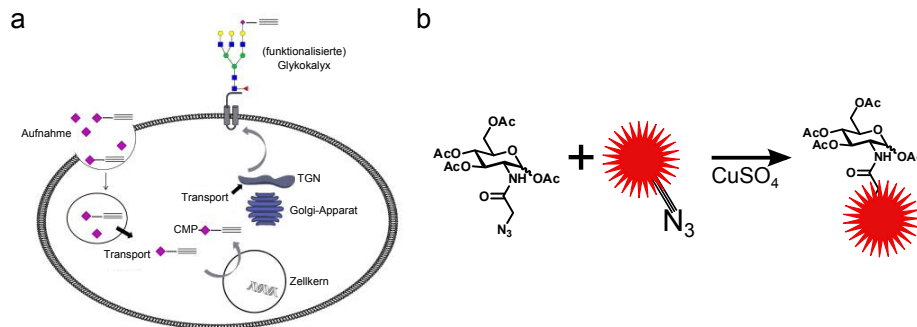


Abbildung 3.4: a) Möglicher metabolischer Weg: Der Zucker wird von der Zelle aufgenommen, durch die Zelle geschleust und in die Zellmembran eingebaut (Glykokalyx). Aus [Homann *et al.*, 2010]. b) Über eine N_3 -Gruppe kann der Zucker mit dem Fluorophor Alexa647-Alkin gekoppelt werden.

wird erneut für 4 mal je 5 min mit PBS gewaschen. Aufbewahrt werden die Proben bei 4°C . Um Bewegungen der Membranproteine auszuschließen, wird zusätzlich eine Fixierung mit 4 % Formaldehyd und 0.02 % Glutaraldehyd für 90 min durchgeführt. Das restliche Färbeprotokoll bleibt unverändert.

3.3.3 Sauerstoffentzug

Der hier verwendete Farbstoff Alexa647-NHS bzw. Alexa647-Alkin ist ein Derivat der Cyaninfarbstoffe. Um diese reversibel schalten zu können, braucht man ein System, das der Lösung den Sauerstoff entzieht [Benesch & Benesch, 1953], [Englander *et al.*, 1987]. Der Schaltpuffer bei den *d*STORM-Experimenten mit fixierten Zellen beinhaltet: 73 mM β -mercaptoethylamine (MEA-HCl; M6500, Sigma) als Reduktionsmittel mit pH 7.4, 50 Units/mL Katalase (Sigma), 1mg/mL Glucose-Oxidase (Sigma) und 10 % (w/v) Glucose-Lösung. Die Glucose wird durch Glucose-Oxidase zu Gluconolacton und H_2O_2 oxidiert, welches von der Katalase zu H_2O und O_2 umgesetzt wird. Beide Bestandteile sind alleine aktiv, es wird kein zusätzlicher Aktivator benötigt. Die mit diesem Puffer versetzte Probe muss mit einem Deckgläschen (Roth) luftdicht verschlossen werden.

Im Cytosol der Zelle kommt Glutathion (GSH) in Konzentrationen von 1 - 11 mM vor [van de Linde *et al.*, 2012]. Im Schaltpuffer bei den Experimenten mit lebenden Zellen kann MEA durch 100 mM GSH ersetzt. Zu 550 μL pH-Indikator-freiem Zellkulturmedium kommen 250 μL Glucose (5 %), 200 μL GSH mit einer Konzentration von 0.5 M und 50 U Enzymlösung. Der pH-Wert wird auf 7.4 eingestellt und die Kammern wieder mit einem Deckglas verschlossen.

4 Ergebnisse und Diskussion

Es werden verschiedene zeit- und orts aufgelöste Fluoreszenz-Techniken verwendet, um Galektine zu untersuchen. Mit FCS- und Anisotropie-Messungen werden hydrodynamische Eigenschaften, bedingt durch die Proteinstruktur an sich und durch Bindevorgänge an Liganden, genauer untersucht. Räumliche Bindungsvorgänge an Zelloberflächen und die Quervernetzungsfähigkeit von Galektinen werden mit Hilfe des bildgebenden Verfahrens *d*STORM beobachtet. Mit Hilfe der Click-Chemie werden Glykoprotein-Cluster näher charakterisiert.

4.1 Hydrodynamische Eigenschaften humaner Galektine

Strukturuntersuchungen von hGal-1 und -3_{tr} wurden bereits mit Gelfiltrationen, Ultrazentrifugationen und SANS/SAXS durchgeführt [Morris *et al.*, 2004]. Der Gyrationradius von hGal-1 wird durch die Laktose-Bindung verringert [He *et al.*, 2003]. Tandem-Repeat-Typen wurden noch nicht untersucht, woraus zwei generelle Fragen resultieren: beeinflusst der Linker die hydrodynamischen Eigenschaften von Tandem-Repeat-Typen? Und ist eine Verringerung des Gyrationradius bei der Ligandenbindung ein generelles Phänomen bei homologen Galektinen? Mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie werden fünf Mitglieder aller Struktur-Typen (hGal-1, -3, -4, -8 und -9), hGal-3_{tr}, eine mutierte Form des hGal-3, bei der die N-terminale Domäne für Phosphorylierungen und das Kollagenase-sensitive Verbindungsstück abgeschnitten wurde [Kübler *et al.*, 2008]) sowie eine linkerlose Form des hGal-4 untersucht [Göhler *et al.*, 2010].

4.1.1 Diffusion humaner Galektine

Die Aminosäuresequenz von humanem Galektin-1 hat pro Untereinheit 7 Lysin-Reste [López-Lucendo *et al.*, 2004], von denen einige exponiert auf der Proteinoberfläche angeordnet sind (Abbildung 4.1, a). Mindestens eins davon sollte für eine kovalente Markierung mit dem amino-reaktiven Farbstoff Alexa647 zugänglich sein. Der Labelgrad nach Gleichung 3.2 liegt bei 0.7 bis 1.0.

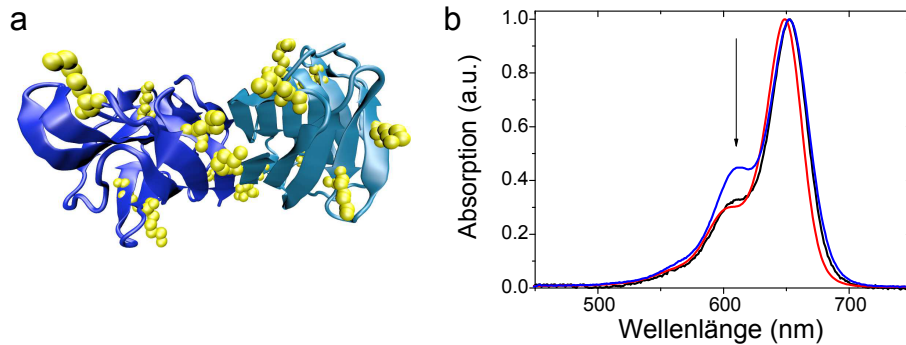


Abbildung 4.1: a) Kristallstruktur der Untereinheiten von hGal-1 (PDB-Code: 1gzv), dargestellt mit VMD in hell- und dunkelblau. Die Lysin-Reste sind als van der Waals-Kugeln gezeigt. b) Absorptionsspektren von hGal-1, fluoreszenzmarkiert mit Alexa647 mit einem Labelgrad von ~ 1.0 (schwarz), im Vergleich zu einem Labelgrad von ~ 1.3 (blau) und freiem Farbstoff (rot). Bei höheren Labelgraden kommt es zur Ausbildung einer Dimerschulter (Pfeil).

Die Absorptionsspektren von hGal-1 (2-facher Farbstoffüberschuss, 1.5 h Inkubationszeit) und frei-diffundierendem, hydrolysiertem Farbstoff (Abbildung 4.1, b) sehen quasi identisch aus. Für einen höheren Labelgrad (Farbstoffüberschuss > 2 -fach, Inkubationszeit > 2 h) bildet sich eine zusätzliche Schulter bei 610 nm aus. Diese spektralen Besonderheiten deuten auf eine Dimerbildung zwischen den Fluorophoren hin. Durch die Dimerbildung kommt es zu einer Reduzierung des Fluoreszenzsignals (Quantenausbeute). Für die FCS-Messungen werden also nur Proteine verwendet, die keine Dimerschulter im Spektrum zeigen. Insgesamt werden für den Labelgrad keine Werte von > 1.5 erzielt. Aus der Symmetrie des Homodimers folgt, dass nur ein Lysin-Rest pro Untereinheit reaktiv und für den Farbstoff zugänglich ist. Demnach muss sich die markierte Fraktion hauptsächlich aus Proteinen mit exakt einem Farbstoff-Molekül und einigen mit zwei Fluorophoren zusammensetzen. Anhand der FCS-Daten können die Werte für den Labelgrad und die Behauptung, dass im Mittel ein Fluorophor pro Protein gebunden hat, bestätigt werden. Gleichung 3.4 liefert über den Vergleich der Helligkeiten pro Teilchen von freiem Farbstoff mit hGal-1 einen Mittelwert mit Standardfehler von $B_{Gal}/B_{Alexa647} = 1.3 \pm 0.3$.

Abbildung 4.2, a, zeigt eine typische FCS-Kurve für hGal-1. Die Daten können sehr gut mit Gleichung 2.34 und festen Werten ($A = 0.88$, $\beta = 0.31$, $\tau = 5 \cdot 10^{-4} s^{-1}$) für die Fluktuationen im μs -Bereich angefitet werden. Damit die Messungen vergleichbar sind, wird das Objektiv, nachdem der Laserspot auf die Glasoberfläche fokussiert wurde, um exakt $40 \mu m$ in die Probe verfahren,

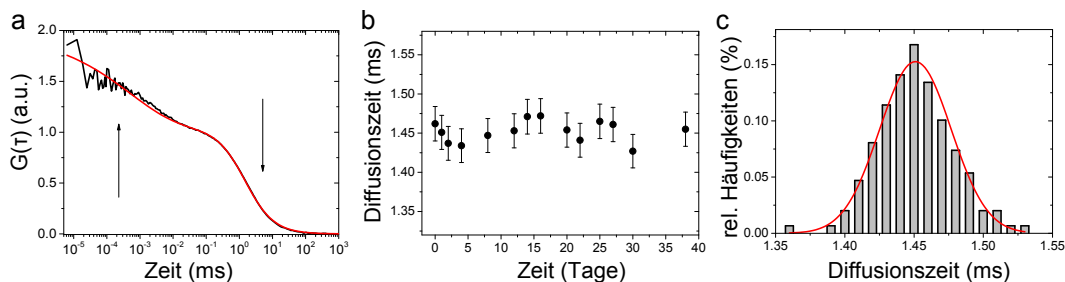


Abbildung 4.2: **a)** zeigt die typische FCS-Kurve von hGal-1, markiert mit Alexa647-NHS. Gefittet werden die Daten mit Gleichung 2.34, die neben dem diffusiven auch den photophysikalischen Abfall berücksichtigt. **b)** Langzeitstabilität von hGal-1-Proben über einen Zeitraum von etwa 40 Tagen. **c)** Insgesamt wird die Diffusionszeit von hGal-1 149 mal über einen Zeitraum von sechs Monaten gemessen. Ein Gauß-Fit liefert eine mittlere Diffusionszeit mit einer Standardabweichung von $\tau_D = (1.451 \pm 0.036)$ ms. Der Fehler beträgt $< 2\%$.

die Laserleistung ($200 \mu W$) so gewählt, dass keine Photozerstörung des Farbstoffes auftritt und Glasadsorption durch die Zugabe von 0.02% Tween20 zum PBS-Puffer unterdrückt. Bei einer Messdauer von 5 min sind die Kurven ausreichend glatt.

Ein Vergleich der Diffusionszeiten von hGal-1 über einen Zeitraum von sechs Monaten für verschiedene Labelansätze und Proteinchargen bestätigt mit einer Messunsicherheit von $< 2\%$, die Reproduzierbarkeit der Diffusionszeiten. Abbildung 4.2, c, zeigt das Histogramm dieser. Eine Auswertung mit einem Gaußmodell liefert einen Mittelwert mit Standardabweichung von $\tau_D = (1.451 \pm 0.036)$ ms. Die absoluten Diffusionskonstanten können durch eine Kalibration mit dem frei-diffundierenden Farbstoff ATTO655, dessen Diffusionskonstante bekannt ist ($D^{25^\circ} = (4.28 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) [Dertinger *et al.*, 2007], ermittelt werden. Dazu wird mit der gemessenen Diffusionszeit und dem Literaturwert für ATTO655 der Fokusbereich berechnet. Über den Fokusbereich kann dann die Diffusionskonstante der Proteine ermittelt werden. Eine Langzeitmessreihe von hGal-1 über knapp 40 Tage (vgl. Abbildung 4.2, a) zeigt, dass die Proben in diesem Zeitfenster im Rahmen ihrer Messunsicherheit stabil sind. Die Diffusionszeit hat sich nicht verändert. Auf dieser Grundlage ist eine systematische Untersuchung der Diffusionskonstanten in Lösung bei 20° möglich. Für nanomolare Konzentrationen von hGal-1 können Aggregationen ausgeschlossen und eine Diffusionskonstante von $D = (1.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und damit ein effektiver, hydrodynamischer Radius von ~ 2 nm ermittelt werden, was in Einklang mit früheren Abschätzungen ist [He *et al.*, 2003]. Da die Kristallstruktur von hGal-1 bekannt ist (PDB-Code 1gzw, [López-Lucendo *et al.*, 2004]), können

mit HydroPRO Diffusionskonstanten berechnet werden. Grundlage der Berechnungen ist die molare Masse, die Kristallstruktur und die Annahme, dass das Protein in Lösung als Kugel angenähert werden kann. Es ergibt sich ein kleiner Wert von $D^{Hydro} = 0.83 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Messungen mit dynamischer Lichtstreuung an einer Variante vom Rind ergaben $0.79 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ [He *et al.*, 2009], [He *et al.*, 2003]. Für hGal-3_{tr}, das halb so schwer ist wie hGal-1, ergibt sich eine gemessene Diffusionskonstante von $D = (1.20 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ und via HydroPRO $1.01 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ (PDB-Code 2nmo, [Collins *et al.*, 2007]). Zwischen den Werten von hGal-1 und hGal-3_{tr} liegt eine Differenz von ~ 0.8 und von $\sim 20\%$ zwischen experimentellen und errechneten. Der Unterschied von $\sim 20\%$ zwischen den beiden Proteinen kann bestätigt werden, wenn die Diffusionskonstante nur über die Proteinmassen berechnet wird ($D^{-1} \sim \sqrt[3]{M}$). Ein Kontrollexperiment mit zwei-Fokus-FCS-Messungen bestätigt die gemessenen Diffusionskonstanten bis auf wenige Prozent, wodurch ein systematischer Fehler ausgeschlossen werden kann. Folglich müssen die Unterschiede aus einer Abweichung vom kugelförmigen Erscheinungsbild der Proteine in Lösung oder aus mangelhaften Parametereinstellungen bei HydroPRO resultieren. Alle Messungen zeigen jedoch, dass FCS sensitiv genug ist, um hydrodynamische Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen. Es müsste möglich sein, Tandem-Repeat-Typen und den Einfluss des Linkers auf die Gestalt, Konformationsdynamiken und die Bindung zu klassifizieren.

4.1.2 Tandem-Repeat-Typen: anormale Skalierung der Diffusionskonstante mit der molaren Masse

Zur Untersuchung der Tandem-Repeat-Typen werden zunächst hGal-4 mit dem linkerlosen Analog hGal-4_{PT} verglichen und im Anschluss die drei Tandem-Repeat-Typen hGal-4, -8 und -9 miteinander.

Die gemessene Diffusionskonstante von hGal-4 ist um 11% kleiner als die der linkerlosen Variante. Das Linker-Peptid beeinflusst demnach die hydrodynamische Ausdehnung des Moleküls. Durch den Linker vergrößert sich die Proteinmasse um $\sim 13\%$, weshalb eigentlich für hGal-4 eine größere Diffusionskonstante als für hGal-4_{PT} erwartet wird. hGal-4 muss demnach kompakter als die linkerlose Variante sein. Die Positionierung bzw. Ausrichtung der CRDs wird durch die hydrodynamische Ausdehnung bedingt durch den Linker verändert. Eine Untersuchung der anderen Tandem-Repeat-Proteine unterstützt die Behauptung, dass die Ausdehnung durch den Linker geringer wird. Alle gemessenen Diffusionskonstanten sind deutlich größer als die der Proto-Typen, auch wenn ihre Massen vergleichbar sind. Durch die Einfügung des Linker-Peptids kommt es zu

einem gegensätzlich Verhalten zwischen Diffusionskonstante und molarer Masse. Leider liegen für die Tandem-Repeat-Typen keine Kristalldaten vor, so dass lediglich ein Vergleich mit den molaren Massen möglich ist, welche mit MALDI und ESI-Massenspektrometrie bestimmt wurden [Dam *et al.*, 2005]. Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über alle untersuchten Galektine, gemessene und errechnete Diffusionskonstanten, so wie ihre Massen und Typ-Zuordnungen. Die Diffusionskonstante kann demnach als Parameter zur Charakterisierung von strukturellen Merkmalen genutzt werden.

Tabelle 4.1: Diffusionskonstanten, Massen und Typ-Zuordnung der humanen Galektine. PT - Proto-Type; PT-like - Proto-Typ ähnlich (ohne Linker); Ch - Chimera; TR - Tandem-Repeat-Type. Die gemessenen D^{exp} und errechneten D^{Hydro} Diffusionskonstanten sind in ($10^{-6}cm^2s^{-1}$) angegeben. Die Fehler der Diffusionskonstanten repräsentieren den Standardfehler vom Mittelwert.

Protein	Typ	Masse [kDa]	D^{exp}	D^{Hydro}
hGal-1	PT	29	1.05 ± 0.01	0.83 ± 0.01
hGal-3	Ch	29	0.93 ± 0.02	-
hGal-3 _{tr}	Ch	15	1.20 ± 0.01	1.01 ± 0.01
hGal-4	TR	36	1.02 ± 0.01	-
hGal-4 _{PT}	PT-like	32	0.92 ± 0.01	-
hGal-8	TR	36	1.15 ± 0.01	-
hGal-9	TR	36	1.10 ± 0.01	-

4.1.3 Bindungsstudie von hGal-1 und Laktose

SANS-Messungen zeigen, dass der Gyrationradius von hGal-1 bei der Bindung von Laktose signifikant abnimmt [He *et al.*, 2003]. Eine Bindungsstudie zwischen hGal-1 und Laktose zeigt die Sensitivität der FCS-Anlage erneut. Es wird fluoreszenzmarkiertes hGal-1 in nanomolaren Konzentrationen vorgelegt und Laktose in einem Bereich von $0.5 \mu M$ bis 10 mM zutitriert. Dabei ist zu beachten, dass die Zugabe von Zuckern in millimolaren Konzentrationen sowohl den Brechungsindex als auch die Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst und damit auch die gemessenen Diffusionskonstanten der Proteine. Um Fehlinterpretationen auszuschließen, wird der Einfluss der Laktosekonzentration auf die Diffusionszeit von freiem Alexa647 Farbstoff getestet. Abbildung 4.3 zeigt, dass die gemessene Diffusionszeit bis zu einer Konzentration von ~ 5 mM nicht verändert wird. Für höhere Konzentrationen ist ein linearer Anstieg zu beob-

achten mit einer Geradensteigung von $(0.48 \pm 0.01) \text{ msM}^{-1}$. Diese entspricht dem Korrekturfaktor für die Diffusionszeiten.

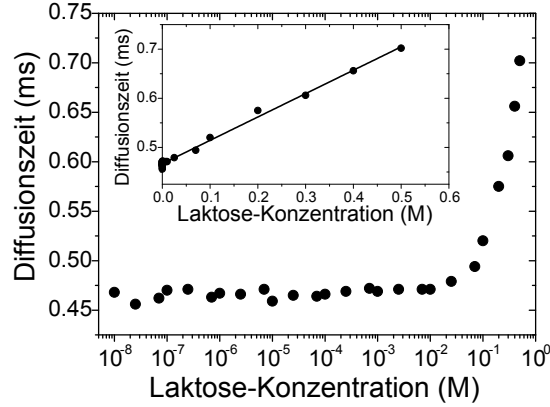


Abbildung 4.3: Bis zu einer Laktosekonzentration von 10 mM können keine signifikanten Änderungen der Diffusionszeit von Alexa647 beobachtet werden. Der Inset zeigt die gleichen Daten mit einer linearen Skalierung. Ein linearer Fit liefert eine Geradensteigung von $(0.48 \pm 0.01) \text{ msM}^{-1}$ und einen Off-Set von $(0.467 \pm 0.001) \text{ ms}$ für Laktosekonzentrationen zwischen 10 mM und 0.5 M. Für jeden Datenpunkt kann ein Standardfehler von 0.5 % angenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieses Korrekturfaktors wird eine deutliche Zunahme von 5.6 % der Diffusionskonstante von hGal-1 von $(1.05 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ auf $(1.11 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ während der Laktosebindung beobachtet. Diese Änderung ist in Abbildung 4.4, a, veranschaulicht. Weiterhin zeigt sie, dass die Helligkeit pro Teilchen während des Bindungsprozesses konstant bleibt. Der Farbstoff wird nicht durch das Tryptophan im hGal-1 gelöscht. Die Massenzunahme durch die Laktose kann vernachlässigt werden, der hydrodynamische Radius verringert sich bzw. die Diffusionskonstante nimmt zu. Dieses Ergebnis stimmt vollständig mit SANS-Abschätzungen des Gyrationradius überein. Dieser verringert sich für hGal-1 von $R_G = (1.91 \pm 0.01) \text{ nm}$ auf $R_G = (1.82 \pm 0.01) \text{ nm}$ bei der Laktosebindung, hervorgerufen durch Konformationsdynamiken im Protein, so dass die CRDs näher zusammenrücken. Gleichbedeutend bestätigt es die Annahme, dass sich Gyration- und hydrodynamischer Radius, der invers zur Diffusionskonstante ist, in der gleichen Art und Weise verändern. Abschätzungen mit HydroPRO über die Kristallstruktur von hGal-1 mit und ohne Laktose zeigen keine Änderung der Diffusionskonstanten, was erkennen lässt, dass Konformationsänderungen in Lösung nicht durch Kristallstrukturen erklärbar sind. Auf Grund der Sensitivität der FCS-Technik bietet es sich an, auch andere Galektine auf die gleiche Art und Weise zu testen.

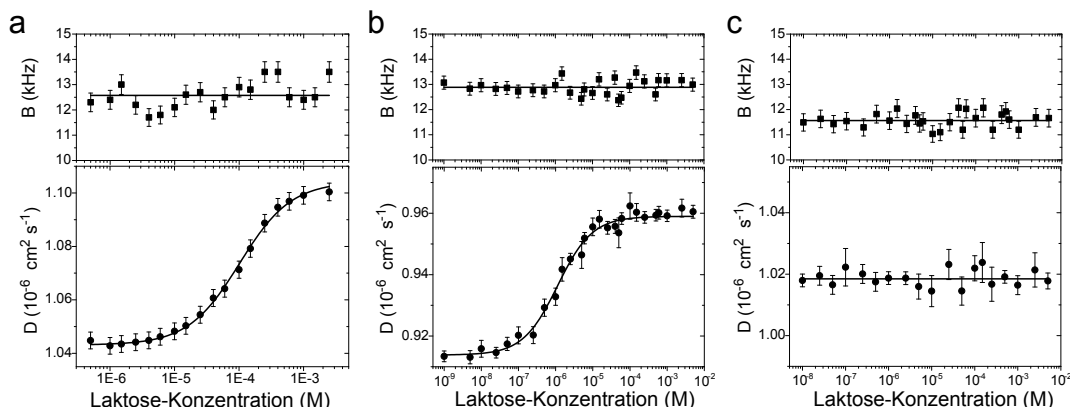


Abbildung 4.4: **a)** Die Diffusionskonstante von hGal-1 nimmt mit steigender Laktosekonzentration zu. Die Bindungskurve kann mit dem Hill-Modell angefitet werden und liefert eine Dissoziationskonstante $K_D = (99 \pm 4) \mu M$. Die Bindungskurve für hGal-4_{PT} (**b**) folgt ebenfalls dem Hill-Modell mit $K_D = (1.1 \pm 0.1) \mu M$, während für hGal-4 (**c**) keine Änderung beobachtet wird (linearer Fit). **Oben:** Die durchschnittliche Helligkeit pro Teilchen B, abgeschätzt aus den jeweiligen FCS-Kurven, ändert sich mit der Laktosekonzentration nicht. Der lineare Fit entspricht dem Mittelwert von B. Alle Fehlerbalken sind mit 0.5% abgeschätzt.

Eine ähnliche Änderung der Diffusionskonstanten von $\sim 5\%$ kann auch für hGal-4_{PT} festgestellt werden (Abbildung 4.4, b, zeigt die FCS-Bindungsstudie). Die Diffusionskonstante ändert sich von $(0.92 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ auf $(0.96 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Die Massenzunahme durch die Laktose ist vernachlässigbar. Die Bindung führt aber zu einer deutlichen Verkleinerung des hydrodynamischen Radius bzw. einer Erhöhung der Diffusionskonstanten.

Die Bindungskurven können für hGal-1 und -4_{PT} mit einem Hill-Modell angenähert werden. Aus den Fits ergeben sich Werte für die Dissoziationskonstante K_D und die Anzahl der beteiligten Bindungsstellen n an der Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand bei 20° C . Für hGal-1 ist $K_D = (99 \pm 4) \mu M$. Dieser Wert stimmt mit früheren Ergebnissen aus isothermer Titrationskalorimetrie ($k_D^{ITC} = (170 \pm 60) \mu M$) [López-Lucendo *et al.*, 2004] und einer Bindungsstudie zwischen hGal-1 und LacNAc ($K_D = (100 \pm 7) \mu M$) [Dam *et al.*, 2005] überein. Die Dissoziationskonstante für hGal-4_{PT} ist mit $K_D = (1.1 \pm 0.1) \mu M$ deutlich geringer als die des hGal-1 und hGal-4 (für hGal-4 und LacNAc ist $K_D = (35 \pm 3) \mu M$ bekannt [Dam *et al.*, 2005]). Die Werte für n sind ungefähr eins (vgl. Tabelle 4.2). Wenn die Bindungskurven ein bimolekulares Verhalten für Protein und Ligand veranschaulichen, dann wird deutlich, dass die Konformationsänderungen bei der Bindung des Liganden an die erste CRD erfolgen.

Obwohl beide Proteine zwei CRDs besitzen und aktive Quervernetzer sind, ruft die Bindung eines zweiten Liganden keine weiteren Konformationsänderungen hervor, zu mindestens solche, die über die Diffusionskonstante beobachtbar wären. In diesem Fall, und unter der Annahme, dass beide CRDs gleich gut zugänglich sind bzw. durch die Laktose besetzt werden, müssten die erhaltenen Dissoziationskonstanten um einen Faktor zwei größer sein, da beide Proteine zwei CRDs besitzen.

Tabelle 4.2: Überblick über die Ergebnisse aus den Bindungsstudien für hGal-1 und hGal-4_{PT}. Die Diffusionskonstanten in Abwesenheit D^{exp} und Anwesenheit D_{Lac}^{exp} von Laktose sind in ($10^{-6}cm^2s^{-1}$) angegeben. Die ermittelten Dissoziationskonstanten K_D^{Lac} unterscheiden sich um zwei Größenordnungen.

Protein	D^{exp}	D_{Lac}^{exp}	K_D^{Lac} (μM)	n
hGal-1	1.05 ± 0.01	1.11 ± 0.01	99 ± 4	1.09 ± 0.05
hGal-4 _{PT}	0.92 ± 0.01	0.96 ± 0.01	1.1 ± 0.1	0.93 ± 0.07

Bei der natürlichen Form des hGal-4 und den anderen Tandem-Repeat- so wie auch den Chimera-Typen war keine hydrodynamische Änderung zu erkennen. Die Bindung von Kohlenhydraten muss also nicht zwangsläufig Konformations- oder hydrodynamische Änderungen innerhalb einer Proteinfamilie hervorrufen. Im Fall des hGal-3_{tr} kommt es zwar bei der Ligandenbindung zu einer Umordnung der Rückgratschleifen, wie NMR-Spektroskopie gezeigt hat [Diehl *et al.*, 2009], [Umamoto *et al.*, 2003], allerdings weisen diese Daten darauf hin, dass derartige strukturelle Änderungen zu klein sind, um einen Einfluss auf die hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins zu haben.

4.1.4 Bindungskinetik von hGal-1 an Laktose

Die Kinetik des Bindungsprozesses spiegeln die Assoziations- und Dissoziationsraten wieder. Es werden FCS-Messungen in einem Intervall von fünf Minuten, beginnend nach der Laktosezugabe ($10 \mu M$ - $5 mM$), wiederholt und jeweils die Diffusionszeit bestimmt. Die Diffusionskonstante von freiem hGal-1 (1.05 ± 0.01) $\cdot 10^{-6}cm^2s^{-1}$ steigt innerhalb weniger Minuten exponentiell auf den Wert des Laktose-beladenen Galektins von (1.11 ± 0.01) $\cdot 10^{-6}cm^2s^{-1}$ an (Abbildung 4.5, a). Für den mono-exponentiellen Anstieg ergibt sich eine charakteristische Relaxationszeit k_{rel} , die mit der Laktosekonzentration variiert. Werden die Relaxationsraten gegen die Laktosekonzentrationen aufgetragen, dann ist der Bereich, der kleiner als die Dissoziationskonstante ist ($c_{Lac} \ll$

$100 \mu\text{M}$), linear. Es kann ein Bindungsprozess erster Ordnung angenommen werden, da die Laktose viel höher konzentriert eingesetzt wird als das Protein ($c_{Lac} > 10^{-5}M \gg c_{Gal} \approx 10^{-9}M$), woraus folgt: $k_{rel} = k_{as}c_{Lac} + k_{dis}$ [Dettmann *et al.*, 2000]. Die Assoziationsrate entspricht demnach der Steigung der Geraden $k_{as} = (2.0 \pm 0.6) s^{-1}M^{-1}$ und die Dissoziationsrate dem Offset $k_{dis} = (5.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}s^{-1}$. Es ergibt sich eine Dissoziationskonstante $K_D = k_{dis}/k_{as} = (285 \pm 90) \mu\text{M}$. Unabhängige SPR-Messungen liefern für Galektin-1 vom Rind eine Dissoziationsrate von $k_{dis} = (5 \pm 2) \cdot 10^{-4}s^{-1}$ [Dettmann *et al.*, 2000], was sehr gut mit dem hier gemessenen Wert übereinstimmt.

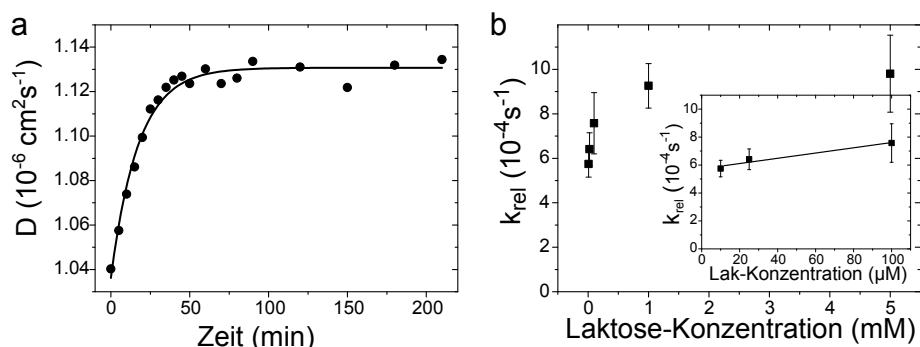


Abbildung 4.5: a) Nach der Zugabe von 5 mM Laktose nimmt die Diffusionskonstante von hGal-1 (Punkte) innerhalb weniger Minuten exponentiell zu. Ein mono-exponentieller Fit (Linie) liefert eine Relaxationsrate von $(9.6 \pm 0.7) \cdot 10^{-4} s^{-1}$. b) Experimentell bestimmte Relaxationsraten k_{rel} als Funktion der Laktosekonzentration (Quadrate). Die Fehler entsprechen den Unsicherheiten aus dem Origin-Fit. Der **Inset** zeigt den linearen Teil der Relaxationsraten für $c_{Lac} \ll K_D$. Die Steigung entspricht der Assoziationsrate $k_{as} = (2.0 \pm 0.6) s^{-1}M^{-1}$ und der Offset der Dissoziationsrate $k_{dis} = (5.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} s^{-1}$.

Normalerweise wird die Assoziationsrate durch intermolekulare Stöße beeinflusst, die durch Diffusion, Molekül-Umorientierungen und -Rotationen sowie Konformationsdynamiken ausgelöst werden. Für diffusions-limitierte Bindungsprozesse werden Assoziationsraten von $\sim 7 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ erwartet. Verlangsamt wird die Rate um etwa sieben Größenordnungen, wenn eine korrekte Ausrichtung des Liganden innerhalb der Bindungstasche durch zufällige Stöße erreicht werden muss [Northrup & Erickson, 1992]. Dies legt für hGal-1 die Vermutung nahe, dass die Einnahme der korrekten Bindungsposition/-ausrichtung noch wesentlich komplexer ist, als Computersimulationen vorschlagen. Die Rate ist weitere 2 - 3 Größenordnungen langsamer. Konformationsänderungen oder signifikante Änderungen schneller Konformationsdynamiken scheinen die Ligandbindung zu verlangsamen, bedingt durch die hydrodynamischen Veränderungen

während des Bindungsprozesses. Strukturelle Kompaktheit und das Einfrieren von Konformationsänderungen kann die Assoziation verlangsamen und eine Erklärung für die erhaltene Rate liefern [Monod *et al.*, 1965], [Koshland, 1958].

Für hGal-4_{PT} ergeben sich ähnlichen Kinetiken (Abbildung 4.6) mit $k_{as} = (1.7 \pm 0.2) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und $k_{dis} = (12 \pm 1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Damit erfolgt die Assoziation drei Größenordnungen schneller als bei hGal-1. Ursache sind möglicherweise besser zugängliche Bindungstaschen im hGal-4_{PT}-Molekül, bedingt durch veränderte Konformationsdynamiken. Für die Dissoziationskonstante ergibt sich $K_D = k_{dis}/k_{as} = (0.71 \pm 0.01) \mu\text{M}$, was erneut sehr gut mit den FCS-Messungen übereinstimmt.

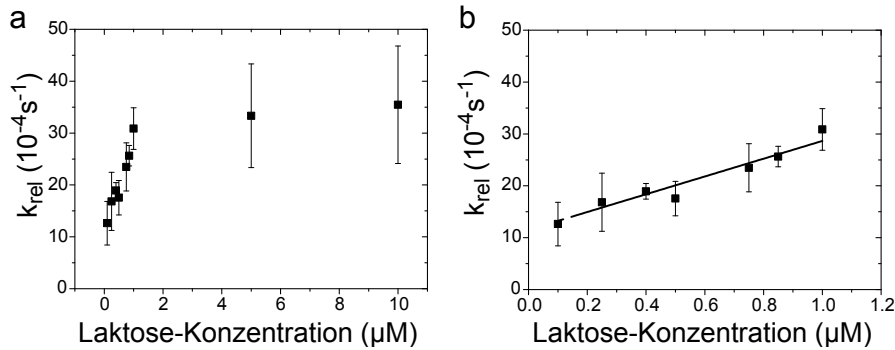


Abbildung 4.6: **a)** Relaxationsraten k_{rel} als Funktion der Laktosekonzentration (Quadrate) für hGal-4_{PT}. Die Fehler entsprechen dem Origin-Fit. **b)** Die Steigung des linearen Teils entspricht der Assoziationsrate $k_{as} = (1.7 \pm 0.2) \cdot 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ und der Offset der Dissoziationsrate $k_{dis} = (12 \pm 1) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.

Zusammengefasst werden die Ergebnisse der Bindungsstudien in Abbildung 4.7. Hydrodynamische Änderungen bedingt durch die Laktosebindung zeigen sich nur für die Proto-Typen hGal-1 und -4_{PT}. Beide Proteine werden kompakter. Ein Vergleich der Dissoziationskonstanten zeigt Unterschiede im Bereich von etwa zwei Größenordnungen möglicherweise bedingt durch veränderte Konformationsdynamiken in den Bindungstaschen von hGal-4_{PT}. Der Linker führt bei den Chimera- und Tandem-Repeat-Typen zu einer weniger flexiblen Struktur. Die CRDs werden in ihrer Position gehalten und hydrodynamische Änderungen sind nicht nachweisbar. Insgesamt kann festgehalten werden, dass die FCS-Technik hervorragend eignet ist, um strukturelle Eigenschaften der Wachstums-/Adhäsions-regulierenden Galektine zu untersuchen. Trotz ihrer Einfachheit ist diese Technik sensitiv genug, um geringe hydrodynamische Änderungen zu detektieren. Sie bietet also eine gute Möglichkeit bzw. Ergänzung zu SANS/SAXS-Untersuchungen Proteine in Lösung, also in ihrer natürlichen Umgebung, zu

untersuchen.

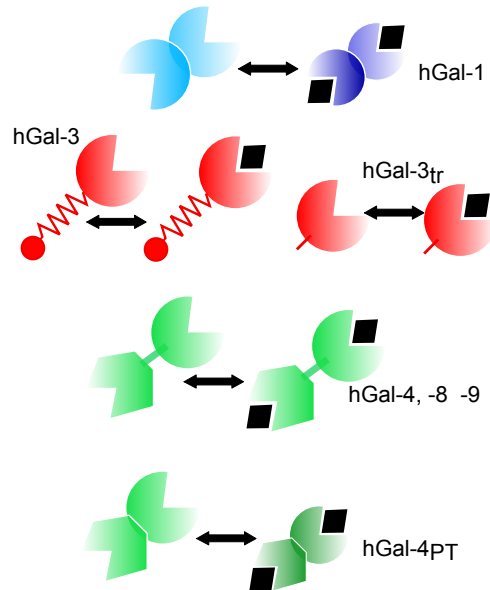


Abbildung 4.7: Schematische Darstellung der drei untersuchten Galektin-Typen und ihrer hydrodynamischen Eigenschaften während der Laktosebindung (schwarze Vierecke) an die CRDs. Der Proto-Typ hGal-1 verringert bei der Ligandenbindung seinen hydrodynamischen Radius (dunklere Farbe), das Molekül wird kompakter. Der Chimera-Typ hGal-3, die verkürzte Variante hGal-3_{tr} und die Tandem-Repeat-Typen hGal-4, -8, und -9 zeigen keine Strukturänderungen. Nur das proto-typ-ähnliche hGal-4_{pT} ist auf Grund des fehlenden Linkers flexibel genug, um eine kompaktere Struktur durch die Laktose-Bindung zu erreichen.

4.2 Anisotropie-Studien des hGal-1

Fluoreszenz-Polarisation ist eine etablierte Methode, um Bindungsvorgänge zu untersuchen [Kakehi *et al.*, 2001]. Tryptophan (Trp) kann als intrinsischer Sensor, basierend auf seinem relativ hohen Extinktionskoeffizienten und der Sensitivität seiner Fluoreszenzeigenschaften gegenüber der lokalen Umgebung und dem Lösungsmittel, verwendet werden. Eine Fluoreszenzmarkierung der Proteine wird überflüssig. Bei der Bindung von Pflanzen-Lektinen an Zucker ändert sich die Fluoreszenz-Polarisation und es gibt spektroskopische Hinweise auf eine Wechselwirkung zwischen Trp und Galaktose [Stein & Heehn, 1980]. So zeigt Trp zwar eine außergewöhnliche räumliche Flexibilität, aber die korrekte Ausrichtung des Zuckers muss für eine Bindung gegeben sein [Sujatha *et al.*, 2004].

hGal-1 hat einen Trp-Rest in jeder CRD (Position 68) [Villalobo *et al.*, 2006], [López-Lucendo *et al.*, 2004]. Abbildung 4.8 zeigt diese Position innerhalb der Proteinstruktur. Mit Hilfe dieses Trp-Rests sollen die spektroskopischen Besonderheiten, das Bindungsverhalten und Konformationsänderungen während der Bindung näher charakterisiert werden. Auf Grund von strukturellen Ähnlichkeiten mit anderen Mitgliedern der Familie müsste diese Fallstudie übertragbar sein und so ein Modell entstehen, mit dem auch andere Proteine getestet werden können [Göhler *et al.*, 2011].

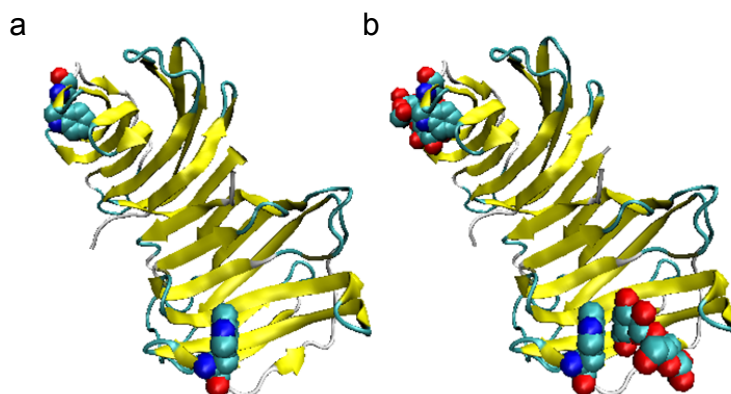


Abbildung 4.8: Die Position und Orientierung des Trp-Restes in der dreidimensionalen Struktur des hGal-1 (hier: C2S-Mutante), **a**) ohne und **b**) mit Laktose, wird durch die Laktose nicht beeinflusst. Laktose und Trp sind in der Van-der-Waals-Darstellung mittels VMD gezeigt. PDB-Datei: 1W6N (**a**) und 1W6O (**b**).

4.2.1 Spektroskopische Charakterisierung des hGal-1

Ein großer Vorteil bei der Interpretation der spektroskopischen Daten ist, dass hGal-1 nur einen Trp-Rest pro Untereinheit enthält und die Trp-Fluoreszenz derartig stark ist, dass sie die Signale von Tyrosin und Phenylalanin überlagert. Abbildung 4.9 zeigt das Absorptions- (a), Anregungs- (b) und Emissionsspektrum (c) von hGal-1 und reinem Trp in PBS-Lösung bei 20° C sowohl in Anwesenheit wie auch Abwesenheit von Laktose.

Die Absorptionsspektren haben jeweils ein Maximum bei 280 nm, wobei die Kurve des Proteins welliger ist, bedingt durch die Anwesenheit anderer Aromaten. Beide zeigen aber die typischen Kennzeichen der ${}^1L_a/{}^1L_b$ -Übergangsmomente [Callis, 1997]. Beim Lektin trägt der 1L_a -Übergang stärker bei. Im roten

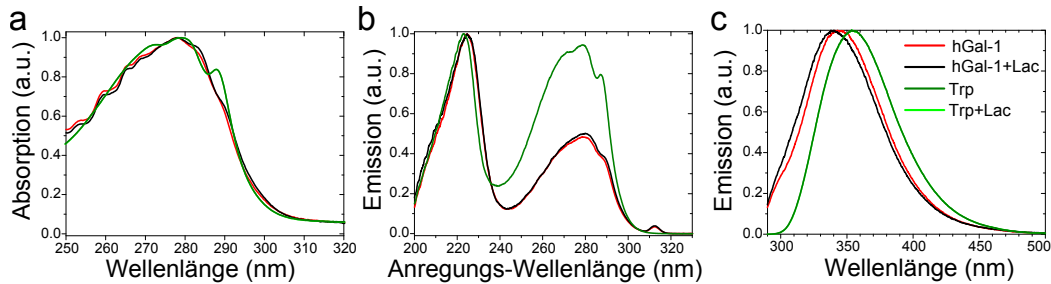


Abbildung 4.9: Spektren der Tryptophan-Absorption (a), -Anregung (b) und -Emission (c) für reines Tryptophan und hGal-1 in PBS in Abwesenheit und Anwesenheit von 5 mM Laktose. Für das Anregungsspektrum wird die Emissionswellenlänge auf 350 nm festgesetzt, für die Emissionsspektren wird bei 280 nm angeregt. Alle Daten werden auf das jeweilige Maximum normiert. Die Legende ist bei allen Abbildungen identisch.

Bereich fehlt dagegen ein Peak, der beim Tryptophan vorhanden ist. Das Absorptionsverhalten von hGal-1 und Trp bleibt von der Laktosebindung unbeeinflusst. Die Fluoreszenzemission der Proben bei einer festen Detektionswellenlänge von 350 nm, als Funktion der Anregungswellenlänge (200 - 300 nm) zeigt neben dem Absorptionsmaximum bei 280 nm einen zweiten Peak bei 223 nm. Dieser konnte in den Absorptionsspektren nicht beobachtet werden, da es in diesem Bereich zu stark ausgeprägten unspezifischen Absorptionen durch den Puffer und die Küvetten kam. Die Höhe des Peaks bei 280 nm ist jedoch für freies Trp und hGal-1 unterschiedlich. Das Protein weist eine nur halb so starke Intensität auf. Für die Emissionsspektren werden beide Proben mit einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und die resultierende Fluoreszenz im Bereich von 295 nm bis 500 nm aufgenommen. Die Position des Maximums von hGal-1 (344 nm) ist gegenüber reinem Trp (355 nm) blau-verschoben. Ursache dieser Verschiebung sind die unterschiedlichen lokalen Umgebungen der beiden Trps. Das reine Trp ist in einem polaren Lösungsmittel (PBS) gelöst, das Wasserstoffbrückenbindungen mit der Iminogruppe des Indolrests ermöglicht. Die Emission geht damit überwiegend auf den 1L_a -Zustand zurück. Der Trp-Rest des hGal-1 ist in der Bindungstasche lokalisiert, seine Umgebung weniger polar. Es kommt zu einer Verschiebung des Peaks zu kleineren Wellenlängen. Weiterhin wird beobachtet, dass es durch die Zugabe von Laktose zu einer weiteren Blau-Verschiebung des hGal-1-Maximums um 5 nm kommt. Beobachtet wurde dieser Effekt bereits für Gal-1 vom Schaf bei einer Anregung mit 295 nm [Iglesias *et al.*, 1998]. Es kommt durch die Wechselwirkung mit Laktose zu einer Änderung der Umgebungspolarität des Trp-Rests. Damit ist auch die Reaktivität des Lektins bestätigt und Trp kann als Sensor für strukturelle Untersuchungen des

Proteins während eines Bindungsvorgangs verwendet werden. Die Messungen sind mit Standard-VIS-Polarisatoren und -Analysatoren durchführbar. Bei einer Anregungs-/Detektionswellenlänge von 340/425 nm wird Raman-Streulicht und Signale der anderen Aromaten verringert. Die höchsten Anisotropie-Werte werden erreicht, wenn selektiv nur der 1L_a -Dipol angeregt wird. Da selbiger um 90° zu 1L_b rotiert ist, können ab einer Anregungswellenlänge von 295 nm Anteile von 1L_b ausgeschlossen werden [Callis, 1997].

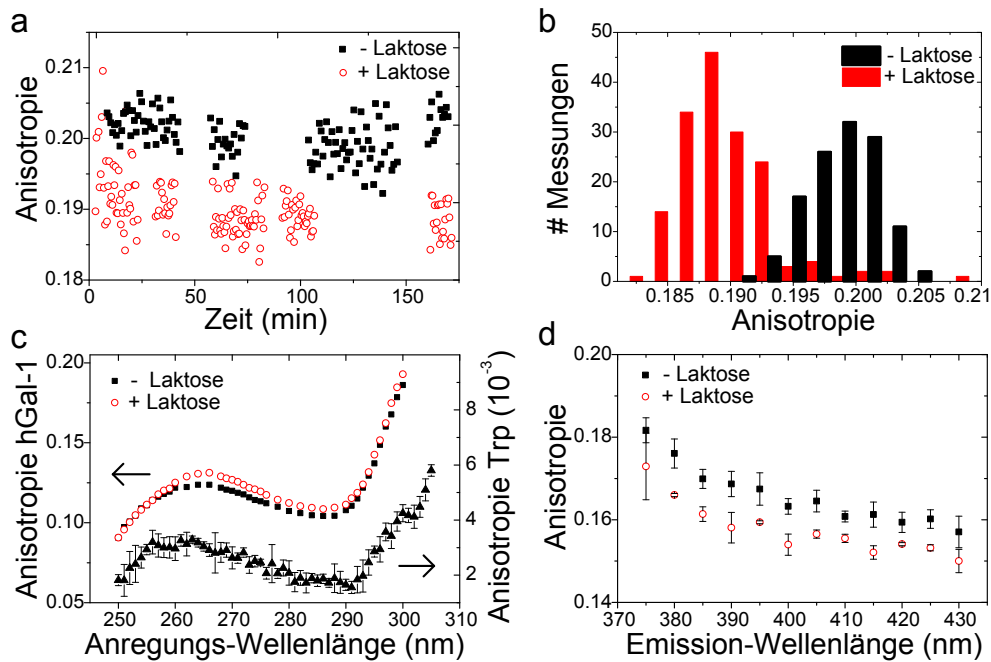


Abbildung 4.10: a) Anisotropie von hGal-1 in Anwesenheit (Kreise) und Abwesenheit (Quadrate) von 5 mM Laktose, bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 425 nm. Die Werte sind über mehrere Stunden konstant. b) Histogrammierte Daten aus a) mit einem Mittelwert von 0.199 ± 0.003 (ohne Laktose, schwarz, 123 Messwerte) und von 0.190 ± 0.004 (mit Laktose, rot, 162 Messwerte). Die Anisotropie ändert sich um $\sim 5\%$. c) Anisotropie-Werte von hGal-1 mit (Kreise) und ohne Laktose (Quadrate), so wie freiem Tryptophan (Dreiecke) als Funktion von der Anregungswellenlänge bei fester Emissionswellenlänge von 350 nm. Beide zeigen die gleichen Reaktionen auf die Änderung der Anregungswellenlänge. d) Anisotropie-Werte für hGal-1 mit (Kreise) und ohne (Quadrate) Laktose bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm als Funktion der Emissionswellenlänge. Alle Fehler entsprechen der Standardabweichung vom Mittelwert aus 5 - 10 Messungen. Sie liegen teilweise in der Gleichgrößenordnung wie das Symbol.

Für gelöstes hGal-1 (3 - 17 μM) beträgt die mittlere Anisotropie 0.2 (Abbildung 4.10, a und b). Die fundamentale Anisotropie von Proteinen ist auf Werte von < 0.3 limitiert [Lakowicz *et al.*, 1983], [Weber, 1960b], [Valeur & Weber, 1977]. Der ermittelte Wert liegt demnach im richtigen Bereich. Für ein entsprechend hohes Intensitätssignal (> 100 Units) an den beiden Polarisationskanälen, kann der Fehler der gemessenen Anisotropie mit 2 % abgeschätzt werden. Über einen Zeitraum von 10 Tagen blieben die Werte konstant. Bei Zugabe von 5 mM Laktose sinkt die Anisotropie um 5 %.

Bei einer festen Emissionswellenlänge von 350 nm kann der Zusammenhang zwischen der Anisotropie und der Änderung der Anregungswellenlänge untersucht werden. Es zeigt sich das für Indol typische Minimum zwischen 285 nm und 290 nm [Weber, 1960a], da die Absorption hier zum größten Teil aus dem 1L_b -Zustand erfolgt, während die Emission auf den 1L_a -Zustand zurückgeht. Die Anisotropie wird minimal, da die Übergangsmomente um 90° verschoben sind. Des Weiteren kann ein lokales Maximum um 260 nm und ein Anstieg ab einer Wellenlänge von 290 nm verzeichnet werden. Diese entstehen, wenn Absorption und Emission aus demselben Zustand stammen. Ab 305 nm steigen für Trp und auch für hGal-1 die Werte stark an, da die Emission bei 350 nm durch Raman-Streuung verfälscht/erhöht wird. Der Kurvenverlauf ist für freidiffundierendes und in den CRDs gebundenes Trp nahezu identisch. Lediglich die absoluten Anisotropie-Werte unterscheiden sich, bedingt durch verschiedene Rotationsfreiheitsgrade im freien bzw. gebundenen Zustand. Weiterhin fällt auf, dass die Anisotropieänderung durch Laktose von der Anregungswellenlänge abhängt (c und d). Eine Ursache für die Umkehr der Richtungsänderung bei der Laktosebindung (bei einer Anregungswellenlänge von 300 nm steigt die Anisotropie (c), bei einer Wellenlänge von 350 nm nimmt sie ab (d)) könnte die Anregung eines oxidierten Trp-Rests sein mit einer Fluoreszenz über 400 nm [Ronsein *et al.*, 2008], [Ronsein *et al.*, 2008]. Für Elektrolektin wird bereits in der Literatur darauf verwiesen, dass es sehr sensitiv gegenüber oxidiertem Trp ist [Levi & Teichberg, 1981].

4.2.2 Untersuchung des Bindungsverhaltens

Eine Laktosebindung kann mit dieser Technik nachgewiesen werden. Änderungen auf Grund von Viskositätszunahmen liegen bis 10 mM unter 1 % und können demnach vernachlässigt werden. Für die Anisotropie als Funktion der Laktosekonzentration (nach einer Inkubationszeit von > 0.5 h) ergibt sich ein sigmoidaler Zusammenhang, der mit dem Hill-Modell angefitet werden kann (Abbildung 4.11, a). Die Richtung der Anisotropieänderung hängt dabei von

den verwendeten Kombinationen für Anregungs-/Emissionswellenlänge ab. Für die Wellenlängenkombination 300/350 nm kann eine Zunahme der Anisotropie von $\sim 5\%$ und für die Kombination 340/425 nm eine Abnahme von $\sim 5\%$ beobachtet werden. Die Werte für die Dissoziationskonstante K_D und die Anzahl der beteiligten Bindungsstellen n stimmen sowohl untereinander wie auch mit früheren FCS-Messungen in etwa überein. Tabelle 4.3 zeigt die expliziten Werte. Die Fehler entstammen dem Origin-Fit.

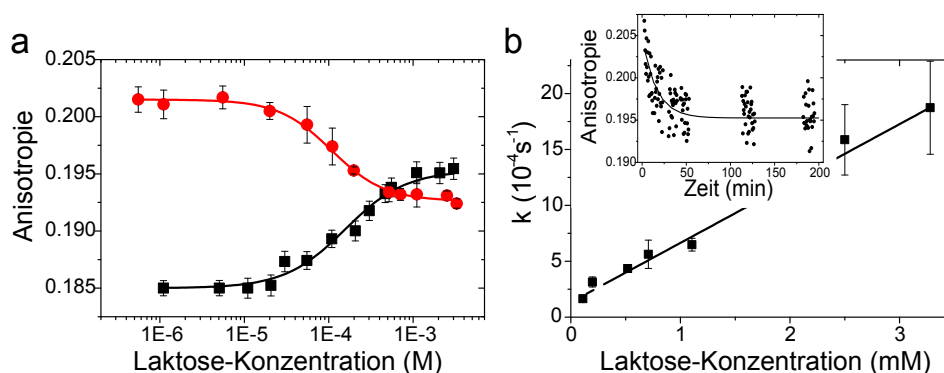


Abbildung 4.11: a) Bindungsstudie für hGal-1 und Laktose mit 300/350 nm (rot) bzw. mit 340/425 nm (schwarz) für die Anregung/Detektion. Die Richtungsänderung der Anisotropie hängt von der Trp-Fluoreszenz ab. Beide Kurven sind mit dem Hill-Modell angefitet. Der Fehler entspricht der Standardabweichung von mindestens 40 Wiederholungen. b) Zeitabhängige Änderung der Anisotropie nach Zugabe von 1 mM Laktose (**Inset**), gemessen mit der Kombination 340/425 nm. Der exponentielle Abfall liefert charakteristische Relaxationsraten k in Abhängigkeit von der Laktosekonzentration. Assoziations- und Dissoziationsraten können bestimmt werden. Die Fehler entstammen der Origin-Routine.

Auch für die N-terminale Domäne des mausartigen Galektin-4, kann über Fluoreszenzintensitätsänderungen für den Laktosebindungsprozess eine Dissoziationskonstante von $(157 \pm 20) \mu M$ bestimmt werden, wenn ein Modell für eine Bindungsstelle zu Grunde gelegt wird [Krejčíříková *et al.*, 2011]. Weiterhin können durch die Beobachtung der Anisotropie-Änderung über die Zeit, die Assoziations- und Dissoziationsraten für den Bindungsvorgang ermittelt werden. Dazu werden alle 30 s für ein Intervall von 5 min über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde die Anisotropie-Werte für die jeweilige Laktosekonzentration in einem Bereich von $100 \mu M$ bis 10 mM gemessen. Beispielhaft zeigt der Inset von Abbildung 4.11 die exponentielle Anisotropieabnahme (340/425 nm) über die Zeit für 1 mM Laktose. Die Relaxationsraten sind linear (Abbildung 4.11, b) und ergeben eine Assoziationsrate von $k_{as} = (0.5 \pm 0.1) s^{-1} M^{-1}$

und eine Dissoziationsrate $k_{dis} = (1.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-4} s^{-1}$. Diese Werte weichen um einen Faktor fünf von den FCS-Daten ab [Göhler *et al.*, 2010].

Tabelle 4.3: Dissoziationskonstanten K_D für hGal-1 und Laktose.

Methode	K_D (μM)	n
Anisotropie, (300/350), Titration, 20°	156 ± 11	1.2 ± 0.1
Anisotropie, (350/425), Titration, 20°	112 ± 9	1.2 ± 0.1
FCS, Titration, 20°	99 ± 4	1.1 ± 0.1
Anisotropie, (300/350), Kinetiken, 20°	251 ± 40	-
FCS, Kinetiken, 20°	280 ± 90	-

Eine Erklärung für diesen Unterschied liefert ein Blick auf die jeweils verwendeten Proteinkonzentrationen. Bei den FCS-Messungen wird hGal-1 in einer Konzentration von ~ 1 nM eingesetzt, während die Konzentration bei den Anisotropie-Messungen im Bereich von ~ 10 μM liegt, also vier Größenordnungen höher. Damit ist die Bedingung, dass die Proteinkonzentration während einer Bindungsstudie deutlich unterhalb der Ligandenkonzentration liegen soll ($c_{Gal} \ll c_L$) nicht vollständig erfüllt. Tabelle 4.3 zeigt aber, dass die aus der Assoziations- und Dissoziationsraten errechneten Werte für die Dissoziationskonstante innerhalb des Fehlers mit den FCS-Werten und ITC-Messungen mit $K_D = (244 \pm 6) \mu M$ übereinstimmen.

4.2.3 Abhängigkeit der Tryptophan-Anisotropie von der Viskosität

Durch Rotationsdiffusion und diffusions-unabhängige Prozesse kann es zur Depolarisation der Fluoreszenzemission kommen. Um diesen Anteil zu quantifizieren, wird die Anisotropie in Abhängigkeit von der Viskosität des Lösungsmittels (durch Zugabe von Glycerin) untersucht. Eine Wechselwirkung zwischen Glycerin und hGal-1 ist unwahrscheinlich, es sollte lediglich die Diffusionsbewegung beeinflusst werden. Die Auswertung der Viskositätsreihe erfolgt mit Hilfe der Perrin-Gleichung (2.48). Wird die inverse Anisotropie r^{-1} von hGal-1 gegen die inverse Viskosität η^{-1} aufgetragen, ergibt sich ein linearer Zusammenhang (Abbildung 4.12). Die Anisotropie ändert sich trotz einer ~ 30 fachen Zunahme der Viskosität um lediglich 10 % und hängt demnach kaum von der Viskosität ab. Die Geradensteigung beträgt (0.45 ± 0.03) mPA s in Abwesenheit von Laktose und (0.38 ± 0.03) mPA s bei vorheriger Inkubation mit 5 mM Laktose. Der y-Achsenabschnitt liefert mit (4.90 ± 0.02) einen relativ großen Wert mit einer

fundamentalen Anisotropie von $r_0 = (0.204 \pm 0.001)$. Dieser Wert bleibt deutlich unter den Erwartungen von $r_0 = 0.25 - 0.3$ für Trp bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 300/350 nm zurück [Lakowicz, 2006]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass der Hauptanteil der Depolarisation nicht von der Rotationsbewegung des Proteins während der Lebensdauer des angeregten Zustandes stammt. In niedrig-viskosen Medien findet kaum Drehung statt. Die geringe Erhöhung der Anisotropie in hoch-viskosem Medium wird sowohl durch eine weitere Verlangsamung der geringen Drehbewegung des Proteins als auch durch eingeschränkte Konformationsdynamiken des Trps verursacht.

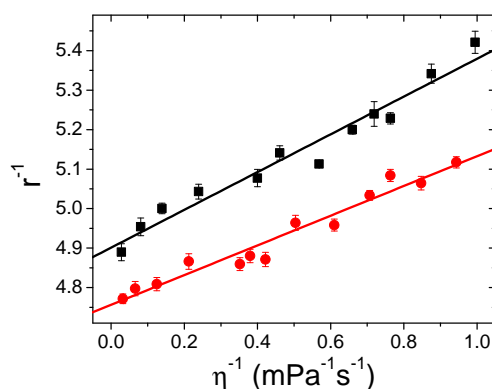


Abbildung 4.12: Für die inverse Anisotropie von hGal-1 in Abwesenheit (schwarz) und Anwesenheit (rot) von 5 mM Laktose, gemessen mit einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 300/350 nm, als Funktion der inversen Viskosität von Glycerin ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Die jeweiligen Fehler entsprechen dem Standardfehler vom Mittelwert aller Messungen.

Theoretische Abschätzungen mittels HydroPRO aus den Kristallstrukturdaten ergeben eine Rotationskorrelationszeit $\theta = 18$ ns (20° , $\eta=1$ cP in wässriger Lösung). Diese Dauer ist mehr als zehnmal so groß wie die Fluoreszenz-Lebensdauer des Tryptophans im hGal-1. Aus TCSPC-Messungen kann eine Hauptrelaxationszeit von $\tau = 1.5$ ns bestimmt werden. Die Abklingkurven sind in Abbildung 4.13 gezeigt. Angefittet werden sie mit einem multi-exponentiellen Abfall (3 Exponenten). Tabelle 4.4 zeigt die Anteile der jeweiligen Zeiten. Zeitlich betrachtet ist die Reorientierung des Moleküls nach der Rotation durch den Rotationsdiffusionskoeffizienten gegeben. Zusammen mit der Perrin-Gleichung folgt aus dem Zusammenhang $r_0/r = 1 + \tau/\theta$ zwischen Lebensdauer τ und Rotationskorrelationszeit θ für die Anisotropie-Rate $r_0/r = 1.08$. Die Anisotropie r nimmt relativ zur fundamentalen Anisotropie r_0 um 8 % ab. Dies bestätigt die Viskositätsreihen mit hGal-1, bei denen die Änderung 10 % beträgt.

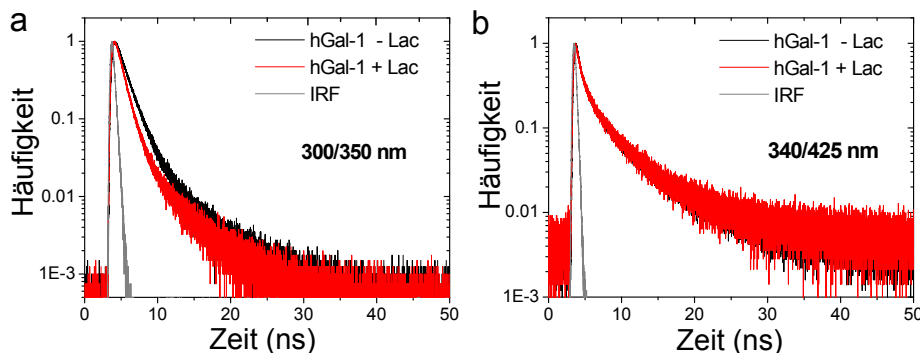


Abbildung 4.13: Zeitaufgelöste Abklingkurven der Fluoreszenz mit 300/350 nm (a) und 340/425 nm (b) als Anregungs-/Emissionswellenlängen für hGal-1 in PBS (schwarz), hGal-1 mit 5 mM Laktose in PBS (rot) und die IRF gezeigt.

Tabelle 4.4: Fitparameter für die TCSPC-Abklingkurven der Tryptophan-Fluoreszenz des hGal-1 mit jeweils drei Exponenten.

Anregungs-/Emissionswellenlänge	ohne Laktose	mit Laktose
300/350	4.96 ns - 4 %	4.45 ns - 3 %
	1.46 ns - 78 %	1.05 ns - 77 %
	0.44 ns - 18 %	0.35 ns - 20 %
340/425	6.16 ns - 5 %	6.67 ns - 5 %
	1.62 ns - 19 %	1.76 ns - 19 %
	0.23 ns - 76 %	0.26 ns - 76 %

Die Viskositätsreihe mit 5mM Laktose liegt insgesamt über der von hGal-1 alleine, da es durch die Laktosebindung an sich schon zu einer Erhöhung der Anisotropie kommt. Diese Zunahme bleibt aber während der gesamten Messung konstant, hat also keinen Einfluss auf die Geradensteigung. Zwischen den Steigungen ist ein deutlicher Unterschied von 29 % zu verzeichnen. Die fundamentale Anisotropie ändert sich um 3 % auf $r_0^{Lac} = 0.21 \pm 0.001$. Ursache dieser Änderung ist eine Abnahme der Fluoreszenzlebensdauer von ~ 27 % bei der Laktosebindung. Durch die Laktosebindung verringert sich, wie bereits gezeigt, der hydrodynamische Radius des Proteins. Eine derartige Änderung hat sowohl einen Einfluss auf die Diffusions- wie auch Rotationsbewegung und würde eine Verringerung der Anisotropie erwarten lassen. Die erhaltenen Daten zeigen jedoch ein gegenteiliges Verhalten. Die Änderungen müssen auf eine weitere Ursache neben der Verringerung des hydrodynamischen Radius zurückführbar sein. Lokale oder segmentelle Bewegungen des Trp68 müssen parallel stattfinden und die Ligand-induzierten Änderungen des hydrodynamischen Radius und

der Lebensdauer kompensieren. Passenderweise wurden genau solche Bewegungen mit NMR-Spektroskopie aus der Strukturanalyse von hGal-1 nachgewiesen und aus molekulardynamischen Simulationen hat sich gezeigt, dass Trp68 in Ligand-freiem hGal-1 in Richtung des Lösungsmittels orientiert ist und bei Ligandenkontakt in Richtung der CRDs [Nesmelova *et al.*, 2010].

Diese Fallstudie zeigt, dass Bindungsvorgänge und segmentelle Bewegungen über intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz nachgewiesen werden können. Sie ist bequem auf andere Lektine mit Tryptophan in den CRDs übertragbar.

4.3 Strukturänderungen bei Proto-Typen

Oxidationsprozesse, die die Proteinstruktur beeinflussen, können mit Trp als Reporter beobachtet werden. hGal-1 und das Ortholog cG-1B können infolge der Anordnung von Cystein-Resten in ihrer Sequenz zueinander, durch Oxidation, Disulfidbrücken ausbilden und ihre Bindungsaktivität verringern oder verlieren. Problematisch für die Untersuchungen könnte der zweite Trp-Rest in der Bindetasche von cG-1B sein, dessen Indolring gegensätzlich zum Ring eines Prolins ausgerichtet ist [López-Lucendo *et al.*, 2009]. Das Oxidations- und Bindungsverhalten sowie die zugehörigen Kinetiken der Proto-Typen hGal-1, cG-1B, -1A und -2 werden sowohl durch Anisotropie- wie auch FCS-Messungen verglichen [Göhler *et al.*, 2012].

4.3.1 Auswirkung von Oxidationsprozessen

Das Lektin kann auch durch Dithiothreitol (DTT) geschützt werden, welches später durch Gelfiltration abgetrennt werden kann. Durch die Entfernung unterliegt das Cystein einem Oxidationsprozess. Wie aus der Literatur bekannt [Cho & Cummings, 1995], verliert hGal-1 in einen Zeitraum von 12 - 16 Stunden seine Hämagglutinationsfähigkeit. Experimentell kann dies durch eine exponentielle Abnahme der Anisotropie auf einen Endwert von 0.130 ± 0.002 bestätigt werden (Abbildung 4.14, a, schwarze Punkte). Danach bleiben die Werte bis zu 5 Tage konstant. Die Monomere aggregieren nicht. Alle Messungen werden mit den Kombinationen 300/350 nm und 340/425 nm für die Anregungs-/Emissionswellenlänge durchgeführt. Kovalent mit IAA geschütztes hGal-1 hat über einen Zeitraum von 10 Tagen konstante Anisotropie-Werte (4.2.1), die Quarternärstruktur des Proteins bleibt unverändert (Abbildung 4.14, a, offene Quadrate). Es ergibt sich eine mittlere Anisotropie von 0.185 ± 0.001 . Eine

detaillierte Analyse der Anisotropieabnahme an verschiedenen Tagen und für verschiedene Galektin-Proben, liefert für einen mono-exponentiellen Zerfallsprozess eine mittlere Relaxationszeit von $t = (6.5 \pm 0.5)$ h. In Anwesenheit von 5 mM Laktose kann der Zerfall des Dimeres verlangsamt werden. Es ergibt sich eine Relaxationszeit von $t^{Lac} = (46.8 \pm 2.5)$ h. Nichtsdestotrotz wird der Zerfall des Dimeres nicht unterdrückt, sondern nur um einen Faktor 7 verlangsamt. Nach Erreichen des Zerfallsniveaus (24.5 h) können die Monomere keine Zuckerbindung mehr eingehen. Die Anisotropie-Werte bleiben, trotz Zugabe von 3 mM Laktose, konstant auf einem Niveau von 0.130 ± 0.002 , während eine Laktosebindung die Anisotropie um $\sim 5\%$ erhöhen sollte [Göhler *et al.*, 2011].

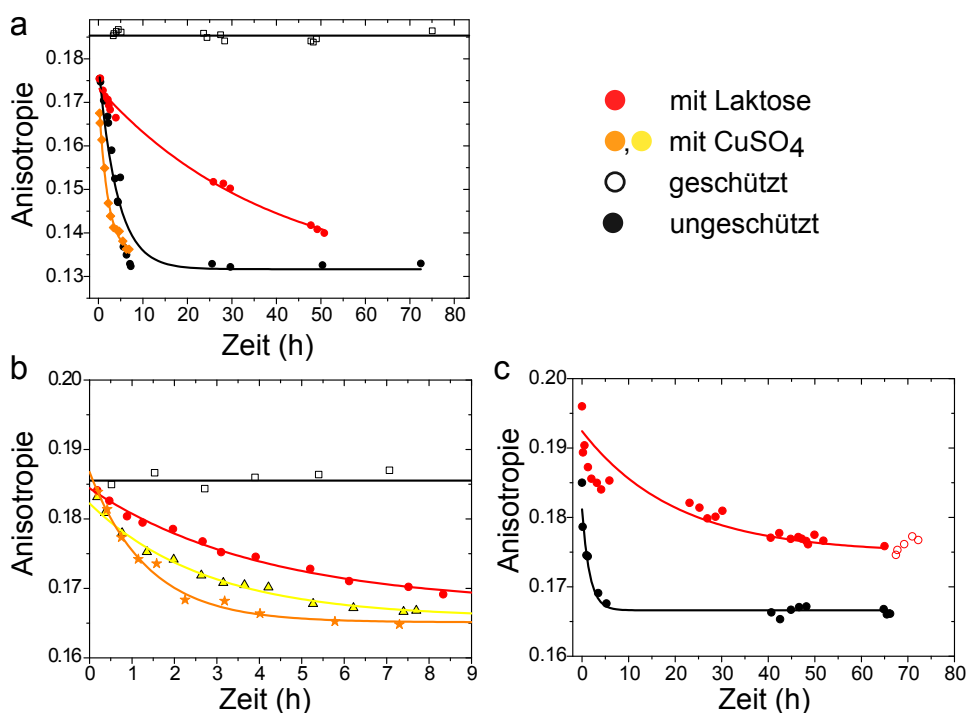


Abbildung 4.14: Der zeitliche Verlauf der Anisotropie (mit 300/350 nm) von hGal-1 (a) und cG-1B (b,c) nach der Entfernung des Reduktionsmittels in Abwesenheit von Laktose (rote Punkte) und in Anwesenheit von Laktose (schwarze Punkte) und Kupfersulfat (orange, gelb) im Vergleich mit kovalent geschütztem hGal-1/cG-1B (offne Quadrate). Für hGal-1 werden 5 mM Laktose und 2 μM CuSO_4 eingesetzt. Messungen mit cG-1B werden in Gegenwart von 2.5 μM und 7.5 μM CuSO_4 durchgeführt (b). Es wird zu Beginn der Messung (rote Punkte)/nach 65 h (rote Kreise) 3 mM Laktose zugegeben (c). Die Datenpunkte entsprechen jeweils den Mittelwerten aus mindestens drei Messungen, die Fehlerbalken liegen in der gleichen Größenordnung wie das Symbol.

Durch Zugabe des Oxidationsmittels Kupfersulfat ($CuSO_4$) [Büchner, 2011], kann der Zerfallsprozess beschleunigt werden. Die Konzentration ist jedoch durch die Ausbildung von Kupferphosphat-Präzipitaten nach oben auf $7.5\mu M$ limitiert. Nach Zugabe von $CuSO_4$ wird der Endwert von 0.130 ± 0.002 weiterhin erreicht. Abbildung 4.15, a, veranschaulicht den linearen Zusammenhang zwischen der Zerfallsrate aus den exponentiellen Fits und der Kupferkonzentration. Der Zerfall kann maximal um einen Faktor 5 beschleunigt werden.

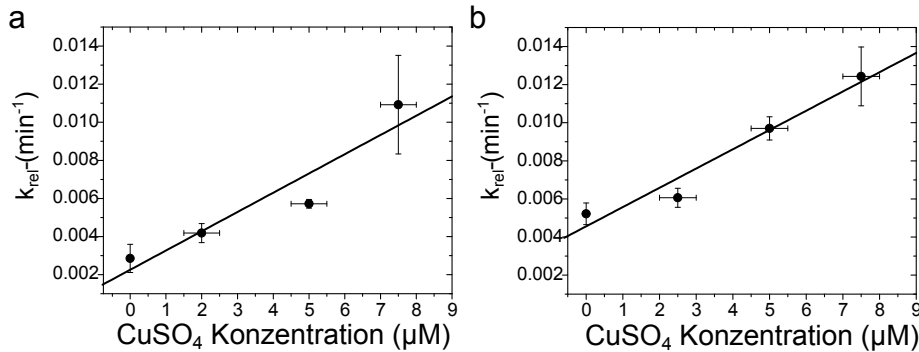


Abbildung 4.15: Die inversen Raten der exponentiellen Abfälle nehmen linear mit der Kupfersulfat-Konzentration für **a)** hGal-1 und **b)** cG-1B zu. Die Datenpunkte entsprechen den Mittelwerten aus mindestens drei Messreihen und die Fehler werden durch die Standardabweichung vom Mittelwert gegeben. Die Unsicherheit in der Kupferkonzentration ist mit $0.5\mu M$ abgeschätzt.

Unter den gleichen Bedingungen wird die Oxidation von cG-1B untersucht. Für die IAA-geschützte Variante ist die Anisotropie mit 0.186 ± 0.002 über mehrere Tage konstant (Abbildung 4.14, b, offene Quadrate). Dieser Wert stimmt sehr gut mit dem von hGal-1 überein. Ungeschütztes cG-1B erreicht in Anwesenheit (Abb. 4.14, b, orange/gelb) und Abwesenheit (Abb. 4.14, c, schwarze Punkte) von $CuSO_4$ einen Endwert von 0.165 ± 0.002 und bleibt anschließend konstant. Aggregate in Folge der Oxidation treten nicht auf. Anders als bei hGal-1 (Änderung um 0.055) beträgt die Gesamtänderung der Anisotropie von cG-1B nur 0.021. Dies ist ein erster Hinweis, dass es durch die Oxidation des Cysteins im cG-1B nicht zu einem „echten“ Zerfall des Dimers kommt, sondern lediglich zu redoxabhängigen Konformationsänderungen in der Proteinstruktur.

In Anwesenheit von 3 mM Laktose beginnt die Anisotropieabnahme bei einem $\sim 6\%$ höheren Wert von 0.196 ± 0.002 . Die oxidationsbedingte Abnahme der Werte folgt einem bi-exponentiellen Fit mit den Relaxationszeiten $t_1 = 0.5$ h/ $t_2 = 59.3$ h (Abb. 4.14, c). In den ersten Stunden fallen die Werte relativ schnell auf etwa 0.184. Danach verlangsamt sich dieser Prozess deutlich, was auch durch die sehr unterschiedlichen Relaxationszeiten veranschaulicht wird.

Wird nach 65 h Laktose zu bereits oxidiertem cG-1B gegeben, kann ein erneuter Anstieg um $\sim 6\%$ auf 0.177 ± 0.002 registriert werden. Anders als hGal-1 bindet cG-1B auch nach der Oxidation noch Laktose. Die Zuckeraktivität des Lektins wird durch die Oxidation nicht zerstört.

Auch die Reaktion des Proteins auf die unterschiedlichen Kupferkonzentrationen ist anders als bei hGal-1 (vgl. Abb. 4.15, b). Die Geschwindigkeit der Anisotropieabnahme kann maximal verdoppelt werden, was die Hinweise aus Sedimentations-Messungen bestätigt [López-Lucendo *et al.*, 2009]. cG-1B unterliegt beim Übergang von der reduzierten zur oxidierten Form lediglich Strukturänderungen, dissoziiert aber nicht. Der Oxidationsprozess von hGal-1 und cG-1B verläuft demnach unterschiedlich, auch wenn nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass hGal-1 nach der Oxidation weiter als Dimer vorliegt. Hinweise hierfür liefern Gelfiltrationsmessungen mit hGal-1 und Gal-1 von Ratten [Whitney *et al.*, 1986] und Denaturierungsexperimente mit Gal-1 von Rind und Schaf [Surolia *et al.*, 1997], [Schwarz *et al.*, 1998]).

Eine weitere Möglichkeit oxidative Strukturänderungen zu untersuchen, sind FCS-Messungen. Ein Zerfall des Homodimers hGal-1 durch die Oxidation würde eine Halbierung der Proteinmasse implizieren. Demnach sollten sich die Diffusionskonstanten verändern. Die Ergebnisse der FCS-Messungen für hGal-1 und cG-1B zeigt Abbildung 4.16.

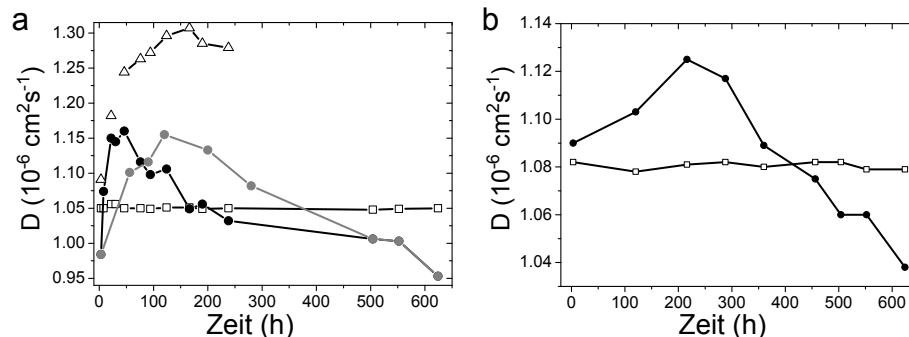


Abbildung 4.16: Oxidative Strukturänderungen von hGal-1 (a) und cG-1B (b) können mit der FCS-Technik detektiert werden. Die Diffusionskonstante von geschütztem hGal-1/cG-1B (offene Quadrate) bleibt über einen Zeitraum von 26 Tagen konstant. Die ungeschützten Proben (Punkte) zeigen innerhalb der ersten 10 Tage eine deutliche Zunahme der Diffusionskonstante mit anschließender Abnahme, bedingt durch die Ausbildung von Aggregaten. Zu hGal-1 wird nach der Oxidation zusätzlich 2 mM DTT zugegeben, so dass die Bildung von Aggregaten unterdrückt werden kann (Dreiecke). Die Fehler liegen im Bereich der Symbole. Für jeden Datenpunkt werden 10 - 20 Einzelmessungen durchgeführt.

Für DTT-geschützte Proben von hGal-1 und cG-14 werden über einen Zeitraum von 26 Tagen konstante Diffusionskonstanten gemessen. Die Diffusionskonstante von hGal-1 $D = (1.050 \pm 0.002) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ stimmt mit vorherigen Messungen mit IAA-geschützten Proben sehr gut überein [Göhler *et al.*, 2010]. Für die ungeschützte Probe wird bereits zu Beginn der Messung eine geringere Diffusionskonstante von $\sim 0.97 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ gemessen, was auf eine Aggregation der Proteine hindeutet. Sie nimmt aber wieder zu und erreicht nach 4 Tagen (bei 20° C) bzw. 2 Tagen (bei 35° C) ein Maximum von $\sim 1.17 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Oxidativen Strukturänderungen sind also temperaturabhängig und erhöhen die Diffusionskonstante um 17 %. Anschließend kann eine erneute Abnahme beobachtet werden, bedingt durch die Ausbildung von Aggregaten. Ein Vergleich mit berechneten Diffusionskonstanten (Abschätzung über die Molekülmasse) für ein Monomer liefert eine Diffusionskonstante von $\sim 1.32 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, was einer Zunahme von 26 % entspricht. Dieser Wert wird experimentell erreicht, wenn 5 Stunden nach der DTT-Entfernung wieder 2 mM DTT zu den Galektinen gegeben wird. Ungeschützten Proben bestehen demnach von Anfang an aus einem Gemisch von Monomeren und Aggregaten, wobei der Anteil der Aggregate nach dem Zerfall zunimmt und die Diffusionskonstante somit ab. Bestätigt werden die Aggregationen durch einen Vergleich der Helligkeiten pro detektiertem Teilchen. Während für die geschützte Kontrolle und die Probe mit zusätzlichem DTT über die Zeit eine konstante Helligkeit von ~ 1 beobachtet werden kann, schwankt sie für die ungeschützte Probe stark. Bereits zu Beginn werden hier doppelt so hohe Werte wie für die IAA-Probe berechnet. Beim Maximalwert geht sie auf 1.4 zurück und am Ende werden wieder Werte > 2 beobachtet, was auf eine Aggregation hinweist.

Für die geschützten Proben wird bei Zugabe von 5 mM Laktose eine Zunahme der Diffusionskonstante beobachtet [Göhler *et al.*, 2010]. Bei den oxidierten Proteine bleibt sie dagegen konstant. Die FCS-Messungen bestätigen somit das Ergebnis der Anisotropie-Messungen, dass hGal-1 durch die Oxidation zu Monomeren zerfällt und keine Zuckeraktivität mehr zeigt. Anders als bei den Anisotropie-Messungen finden die Auswirkungen der Oxidation aber auf einer anderen Zeitskala statt und es kann eine Aggregation der Monomere nachgewiesen werden. Dies könnte aus deutlich geringeren Proteinkonzentrationen während der Messung und der Tatsache, dass die Anisotropie-Messungen nicht länger als 10 Tage durchgeführt werden konnten, Aggregationen aber erst nach diesem Zeitraum auftreten, resultieren.

Für ungeschütztes cG-1B (Abbildung 4.16, b) ist ebenfalls eine Änderung der Diffusionskonstanten zu beobachten. Die IAA-/DTT-geschützte Kontrolle hat eine Diffusionskonstante von $D = (1.080 \pm 0.002) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Das ungeschützte cG-1B erreicht einen Maximalwert von $D = (1.132 \pm 0.002) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Mit

knapp 4 % ist diese Änderung deutlich kleiner als bei hGal-1, erfolgt aber in etwa im gleichen Zeitintervall von 9 Tagen (bei 20° C). Im Anschluss nimmt die Diffusionskonstante wieder zu, was auf Aggregaten hindeutet. Eine Laktosebindung konnte über den gesamten Zeitraum von 26 Tagen sowohl für die geschützten wie auch die ungeschützten Proben nachgewiesen werden. Die Zuckerbindefähigkeit von cG-1B bleibt erhalten. Es zerfällt nicht zu einem Monomer, sondern unterliegt lediglich Strukturänderungen, die es kompakter erscheinen lassen.

4.3.2 Liganden-Bindung verändert die Anisotropie von cG-1B

cG-1B hat einen zweiten Trp-Rest nahe dem C-Terminus. Diese Tatsache könnte die Messungen verkomplizieren, da FRET-bedingte Depolarisation zwischen den Trp-Resten in der Bindungsgegend nicht ausgeschlossen werden kann. Abbildung 4.14, c zeigt bereits, dass die Laktosebindung eine Zunahme der Anisotropie um $\sim 6\%$ (mit 300/350 nm) bedingt. Mit der Kombination von 340/425 nm nimmt die Anisotropie um 5.4 % ab (Abbildung 4.17).

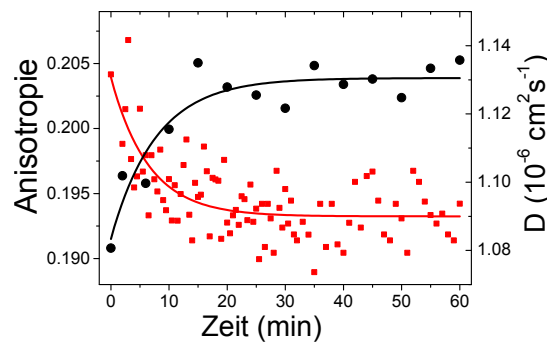


Abbildung 4.17: Zeitlicher Verlauf der Anisotropiewerte bei Zugabe von 1 mM Laktose für cG-1B. Nach der Laktosezugabe sinkt die Anisotropie des Proteins (340/425 nm). Die Diffusionskonstante aus FCS-Messungen nimmt zu. Für die FCS-Messungen wird ~ 1 nM Protein und bei den Anisotropie-Messungen $18 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Daten werden mit einem mono-exponentiellen Fit angenähert.

Die Besetzung der Bindungstasche durch Laktose hat für cG-1B den gleichen Einfluss auf depolarisierende Prozesse, wie Rotationsdiffusion, segmentelle Bewegungen und die Lebensdauer. Durch den zweiten Trp-Rest entsteht keine zusätzliche Depolarisation und es ergibt sich eine Laktose-Dissoziationskonstante von $K_D = (101 \pm 5) \mu\text{M}$. Den zeitlichen Verlauf des Bindungsprozesses zeigt Abbildung 4.17. Die Anisotropie, gemessen in Intervallen von 5 Minuten über einen Zeitraum von einer Stunde, nimmt nach der Zugabe von 1 mM Laktose,

gemessen mit einer Wellenlängenkombination von 340/425 nm, exponentiell zu und kann mit einem mono-exponentiellen Fit sehr gut angenähert werden. Aus den Relaxationsraten, aufgetragen gegen die Laktosekonzentration (Abbildung 4.18, a) können die Assoziations- und Dissoziationsraten ermittelt werden.

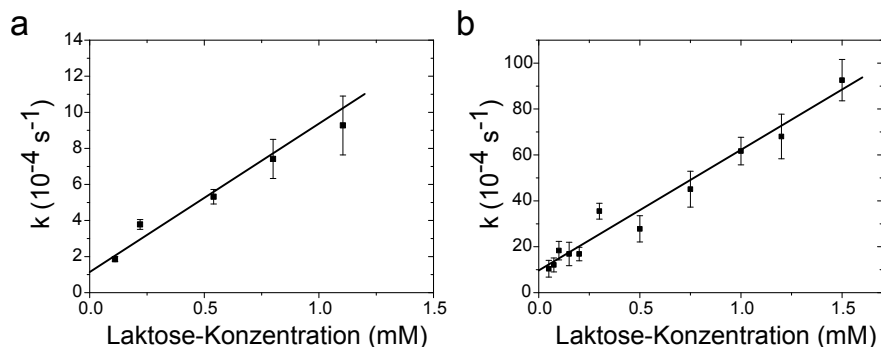


Abbildung 4.18: Sowohl über die Anisotropie (a) wie auch mit FCS-Messungen (b) können die Kinetiken des Bindungsprozesses von cG-1B untersucht werden. Die Raten (vgl. Abbildung 4.17) werden als Funktion der Laktose-Konzentration aufgetragen. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang, der die Assoziations- und Dissoziationsraten für den Bindungsprozess liefert (vgl. Tabelle 4.5). Die gezeigten Fehler entsprechen den Ungenauigkeiten der Origin-Fitroutine.

cG-1B verhält sich wie hGal-1 während der Laktose-Bindung. Die Werte für die Dissoziationskonstante K_D , die Anzahl der beteiligten Bindungsstellen n , die Assoziations- und Dissoziationsraten stimmen überein. Offensichtlich verhalten sie sich, trotz ihrer strukturellen Unterschiede innerhalb der Bindungstasche und ihren verschiedenen Reaktionen auf die Oxidation der Cystein-Reste, bei der Untersuchung der Laktosebindung identisch. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über alle Werte des Bindungsprozesses.

Tabelle 4.5: Dissoziationskonstanten und Raten für cG-1B und Laktose. K_D wird aus der Anisotropie-Bindungskurve bestimmt, K_D^{Raten} ergibt sich aus den Assoziations- und Dissoziationsraten (in $\cdot 10^{-4}$ angegeben).

	K_D (μM)	n	k_{as} ($s^{-1}M^{-1}$)	k_{dis} M^{-1}	K_D^{Raten} (μM)
cG-1B	101 ± 5	1.29 ± 0.08	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.2	138 ± 20
hGal-1	112 ± 9	1.09 ± 0.05	0.5 ± 0.1	1.3 ± 0.3	260 ± 40

Um Fehler in den Bindungsdaten auf Grund der hohen, eingesetzten Proteinkonzentration ($c_{cG-1B} = 18 \mu M \cong K_D = 1 \mu M$) auszuschließen, werden die Bindungsstudien mit FCS-Messungen wiederholt.

4.3.3 Chicken-Galektine binden Laktose

Bei der Fluoreszenzmarkierung von cG-1B werden wie für hGal-1 kurze Inkubationszeiten (~ 1.5 h) und ein zweifacher Farbstoffüberschuss, zur Vermeidung von Dimerbildung, gewählt. Sowohl durch Ensemble- als auch durch FCS-Messungen kann ein Labelgrad von ~ 1 nachgewiesen werden. Die Markierung von cG-2 und cG-1A erfolgt analog. Die FCS-Kurven sind alle mit dem zweidimensionalen Diffusionsmodell für eine einzelne, diffundierende Spezies mit festgehaltenen Parametern K , β und τ auswertbar. Um die Validität des Messaufbaus zu gewährleisten, werden Parallel-Experimente mit hGal-1 durchgeführt. Für cG-1B ergibt sich eine Diffusionskonstante von $(1.08 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Diese ist nur geringfügig größer als für hGal-1 [Göhler *et al.*, 2010]. Anisotropiemessungen deuten bereits darauf hin, dass Laktose die strukturellen Eigenschaften des Proteins beeinflusst. Für Laktosekonzentrationen < 10 mM kann eine Zunahme der Diffusionskonstanten um 5.6 % beobachtet werden. Der hydrodynamische Radius von cG-1B nimmt ab. Die Bindungskurve ist in Abbildung 4.19 (Mitte) zu sehen. Der Hill-Fit liefert eine Dissoziationskonstante von $K_D = (114 \pm 7) \mu\text{M}$. Unter den gleichen Bedingungen ($c_{\text{cG-1B}} \ll c_{\text{Lak}}$) werden die Raten des Bindungsprozesses ermittelt (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Dissoziationskonstanten und Raten für cG-1B und hGal-1 gemessen mit FCS. K_D wird aus der Bindungskurve mit dem Hill-Modell bestimmt, K_D^{Raten} ist eine Berechnung aus den Assoziations- und Dissoziationsraten (in $\cdot 10^{-4}$).

	K_D (μM)	n	k_{as} ($\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$)	k_{dis} M^{-1}	K_D^{Raten} (μM)
cG-1B	114 ± 7	1.10 ± 0.08	5.3 ± 0.5	(10 ± 2)	190 ± 40
hGal-1	99 ± 4	1.09 ± 0.05	2.0 ± 0.6	(5.7 ± 0.2)	280 ± 90

Nicht nur die Dissoziationskonstanten von hGal-1 und cG-1B sind in etwa identisch, sondern auch die Reaktionen der Struktur auf die Laktosebindung. Beide Proteine verringern ihren hydrodynamischen Radius und erscheinen kompakter. Der lineare Zusammenhang zwischen den Raten und der Konzentration, bleibt auch bei den FCS-Messungen weiterhin bestehen (Abbildung 4.18) und die Kinetik-Raten sind mit hGal-1 vergleichbar. Diese Ergebnisse unterstreichen demnach die Idee, dass Proto-Typen auf die Laktose-Bindung mit einer Verringerung ihres hydrodynamischen Radius reagieren. Daher werden weitere Proto-Typen der chicken Galektin-Familie (cG-1A und -2) untersucht. Leider konnten keine weiteren Proteine der humanen Familie (hGal-2 und -7) vermessen werden, da eine Fluoreszenzmarkierung wie auch eine Untersuchung mittels Anisotropie auf Grund von Aggregationen nicht möglich war.

Aus den Daten folgt, dass cG-1A einen effektiven hydrodynamischen Radius von etwa 2 nm hat, wenn eine sphärische Ausdehnung angenommen wird. Die Diffusionskonstante von cG-2 ist mit $(1.31 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ deutlich größer (Tabelle 4.7), was darauf hindeutet, dass die Proteinstruktur kompakter ist als die anderer chicken Galektine. Dies ist vor allem in Hinblick auf die FCS-Messungen mit oxidiertem hGal-1 und cG-1B sehr interessant. Oxidiertes, monomeres hGal-1 erreicht eine Diffusionskonstante von $1.32 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, die oxidierte, dimere Form von cG-1B lediglich eine Diffusionskonstante von $1.13 \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. cG-2 ist also mit monomerem hGal-1 vergleichbar. Bereits in Geschwindigkeitsmessungen bei Sedimentations-Experimenten und bei Gel-filtrationsanalysen unter Druck hat sich cG-2 auffällig verhalten und es ergaben sich Hinweise für eine andere Ausdehnung [Kaltner *et al.*, 2008]. Eine strukturelle Reaktion auf die Laktose-Bindung von cG-1A ist nicht erkennbar, während sich die Diffusionskonstante von cG-2, anders als bei cG-1B und hGal-1, um 3.8 % verringert. Es kommt bei der Adaption von Laktose zu einer Ausdehnung des Proteins. Die gemessenen Dissoziationskonstanten, Assoziations- und Dissoziationsraten der FCS- und Anisotropie-Messungen zeigt Tabelle 4.8.

Tabelle 4.7: Übersicht über die Massen, Diffusionskonstanten und prozentuale Änderung der chicken Galektine in Anwesenheit und Abwesenheit von Laktose.

	M (kDa)	$D^{exp} (10^{-6} \text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	$D_{Lac}^{exp} (10^{-6} \text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	
cG-1B	30	1.08 ± 0.02	1.14 ± 0.02	+ 5.6 %
cG-1A	29	1.11 ± 0.02	1.11 ± 0.02	-
cG-2	30	1.31 ± 0.02	1.26 ± 0.02	- 3.8 %
hGal-1	29	1.05 ± 0.01	1.11 ± 0.02	+ 5.6 %

Mittels Anisotropie können die FCS-Daten bestätigt und ein Einfluss des Markierungsprozesses und der Proteinkonzentration auf die unterschiedlichen Konstanten ausgeschlossen werden. Während cG-1B und hGal-1 ein identisches Verhalten zeigen, ergeben sich für cG-1A und -2 Unterschiede im Bereich von mehreren Größenordnungen. Die Dissoziationskonstanten liegen im nanomolaren Bereich, die Laktoseaffinität erhöht sich um fünf Größenordnungen und die Assoziationsraten im Bereich von $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ sind auch deutlich größer. Sie liegen nahe dem Bereich für diffusionslimitierte Assoziation. Die Unterschiede müssen durch unterschiedliche Konformationsdynamiken in den Proteinen, trotz ihrer Homologie, hervorgerufen werden, wodurch die CRDs möglicherweise besser für das Laktose-Molekül zugänglich sind. Auch die relativen Änderungen der Diffusionskonstanten bzw. der Anisotropie-Werte unterscheiden sich von cG-1B und hGal-1. Für cG-1A werden mittels FCS keine Änderungen beobachtet, während

Tabelle 4.8: Übersicht über Bindungs-, Assoziations- und Dissoziationsraten für die chicken Galektine. Der obere Teile der Tabelle wurde mit der FCS-Technik bestimmt, der untere zeigt die Ergebnisse aus den Anisotropie-Messungen.

Observable	cG-1B	cG-1A	cG-2
K_D (M)	$(114 \pm 7) \cdot 10^{-6}$	-	$(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-9}$
n	1.10 ± 0.08	-	1.09 ± 0.05
k_{as} ($M^{-1}s^{-1}$)	5.3 ± 0.5	-	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^6$
k_{dis} (s^{-1})	$(10 \pm 2) \cdot 10^{-4}$	-	$(13 \pm 2) \cdot 10^{-4}$
K_D^{Raten} (M)	$(190 \pm 40) \cdot 10^{-6}$	-	$(1.0 \pm 0.2) \cdot 10^{-9}$
K_D (M)	$(101 \pm 5) \cdot 10^{-6}$	$(15 \pm 4) \cdot 10^{-9}$	$(1.35 \pm 0.01) \cdot 10^{-9}$
n	1.29 ± 0.08	0.6 ± 0.1	1.30 ± 0.07
k_{as} ($M^{-1}s^{-1}$)	0.8 ± 0.1	$(1.2 \pm 0.2) \cdot 10^6$	$(7.0 \pm 0.7) \cdot 10^6$
k_{dis} (s^{-1})	$(1.1 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}$	$(3.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-4}$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}$
K_D^{Raten} (M)	$(138 \pm 20) \cdot 10^{-6}$	$(25 \pm 7) \cdot 10^{-9}$	$(2.6 \pm 1.0) \cdot 10^{-9}$

sich die Anisotropie-Werte um $\sim 2\%$ ändern. Hydrodynamische Änderungen auf Grund der Liganden-Bindung sind demnach so klein, dass sie mit FCS-Messungen nicht beobachtbar sind, während die Anisotropie die Mobilität des Trp-Rests in der Bindungstasche misst und somit eine Laktosebindung nachweist. Für cG-2 ergänzen sich die beiden Methoden sehr gut. Die Bindungsstudien zeigt Abbildung 4.19. Bemerkenswert an den Anisotropie-Bindungsstudien für cG-2 und -1A ist, dass Änderungen in den Parametern beobachtet werden, obwohl die Bedingung $c_{Lac} \gg c_{Gal}$ nicht erfüllt ist. Die Laktose wird in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-11}$ M und 1 mM zutitriert, während das Protein in μ M-Konzentrationen vorliegt. Es gilt in weiten Teilen der Bindungsstudie: $c_{Lac} \ll c_{Gal}$ und nur jedes tausendste Protein hat ein Laktose-Molekül gebunden. Dies unterstreicht erneut die Sensitivität des Trps als Reporter für Bindungsvorgänge und segmentelle Veränderungen. Gleichzeitig könnte dies aber auch eine Erklärung für die geringe Amplitudenänderung bei den Anisotropie-Messungen sein, da ein Gemisch aus Proteinen mit und ohne gebundener Laktose vermessen wird und somit nicht alle Trp-Reste eine veränderte Bewegung zeigen. Die erwartete Gesamtänderung der Anisotropie müsste demnach größer sein. Weiterhin kann so erklärt werden, warum bei den FCS-Messungen keine Änderung beobachtet wird. Hier ist $c_{Lac} \cong c_{Gal}$, wodurch eine Änderung der Diffusionskonstanten zu gering ist, um beobachtet zu werden.

Als Vertreter der Chimera-Typen werden cG-3 und die verkürzte Form cG-3_{tr} getestet. Ihre Diffusionskonstanten stimmen in etwa mit denen der humanen Orthologen überein ($D^{cG-3} = (0.99 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ und $D^{cG-3_{tr}} =$

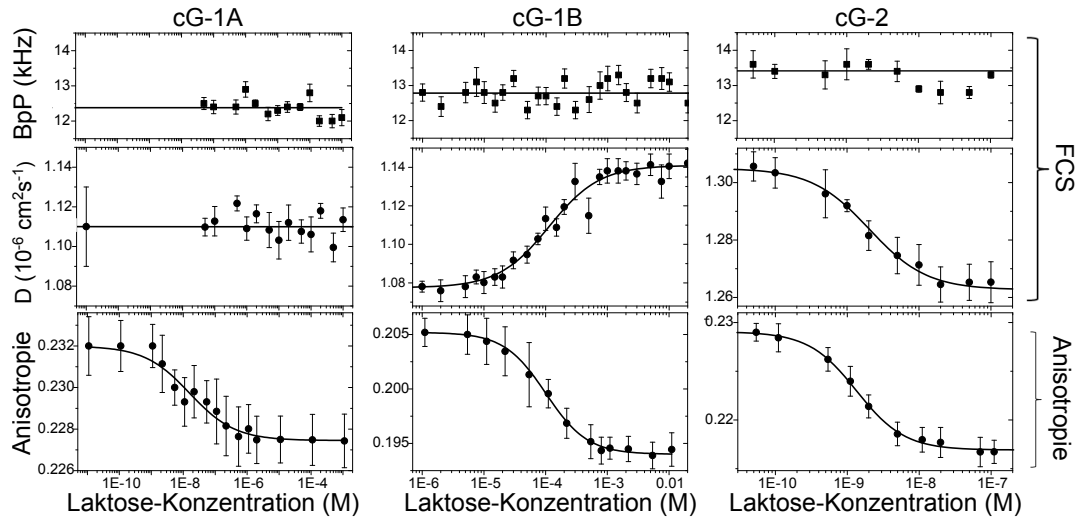


Abbildung 4.19: Von links nach rechts sind die Bindungsstudien der Proto-Typen cG-1A, -1B und -2 gezeigt, gemessen mit FCS und Anisotropie. Die Bindungsstudien sind mit dem Hill-Modell angenähert und die Fehler entsprechen den Standardfehlern vom Mittelwert aus 6 - 9 Einzelmessungen pro Datenpunkt.

$(1.21 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$). Durch Zugabe von Laktose ändert sich die Diffusionskonstanten nicht. Die Tandem-Repeat-Typen werden durch cG-8 mit unterschiedlich langen Linkern und einer Variante, die nur aus der N-terminalen Domäne besteht, repräsentiert. Bei zunehmender Linkerlänge nimmt die Diffusionskonstante ab. cG-8I hat bei einer Masse von 34 kDa eine Diffusionskonstante von $D^{cG-8I} = (1.12 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ und die, durch einen verlängerten Linker um 2 kDa schwerere Form cG-8II von $D^{cG-8II} = (0.98 \pm 0.02) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Je länger der Linker, desto weniger kompakt erscheint das Protein. Für das N-terminale Protein cG-8N ergibt sich eine Diffusionskonstante von $D^{cG-8N} = (1.17 \pm 0.01) \cdot 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Ihr Bindungsverhalten ist mit den humanen Formen vergleichbar. Es können keine hydrodynamischen Änderungen durch die Laktose-Adaption beobachtet werden.

Sequenzhomologie bei Proto-Typen ist also nicht gleichbedeutend mit identischem Oxidations- und Bindungsverhalten. Chimera- und Tandem-Repeat-Typen zeigen dagegen vergleichbare Reaktionen. Diese Unterschiede könnten die verschiedenen, physiologischen Bedeutungen der Proteine erklären.

4.4 Räumliche Organisation von hGal-1 auf Zelloberflächen

Schlüssel der hochauflösenden Mikroskopie sind kommerzielle, photoschaltbare Fluorophore, wie Alexa647 [Heilemann *et al.*, 2008]. hGal-1 kann mit diesem Fluorophor markiert werden. Durch die zwei CRDs des Moleküls besteht die Möglichkeit, dass Galektin-Ketten oder -Cluster entlang von Glykoproteinen mit β -Galaktose-Motiv auf der Zelloberfläche ausgebildet werden [Salatino *et al.*, 2008]. Mit der hochauflösenden *d*STORM-Technik soll diese Quervernetzbarkeit von fluoreszenzmarkiertem hGal-1 untersucht werden.

4.4.1 hGal-1 als Photoschalter

hGal-1 wird mit dem photoschaltbaren Fluorophor Alexa647 über eine NHS-Kopplung markiert (s. Kapitel 4.1). Der Labelgrad beträgt ~ 1.0 , um auszuschließen, dass Membranrezeptoren von unmarkiertem Galektin-1 (DOL < 1) besetzt werden und damit das Bindungsmuster verfälschen oder es durch Dimerbildung (DOL > 1) zu einer Reduzierung des Fluoreszenz-Signals kommt. Um die optimalen Schaltbedingungen für hGal-1 festzulegen, wird markiertes hGal-1 in nanomolarer Konzentration bei unterschiedlichen pH-Werten des Puffers, eingestellt über eine KOH-Lösung, vermessen. Die Anzahl der Photonencounts ist im pH-Bereich von 7.4 - 7.7 maximal (Abbildung 4.20, a), wie auch für den freien Farbstoff Alexa647 [van de Linde *et al.*, 2011a].

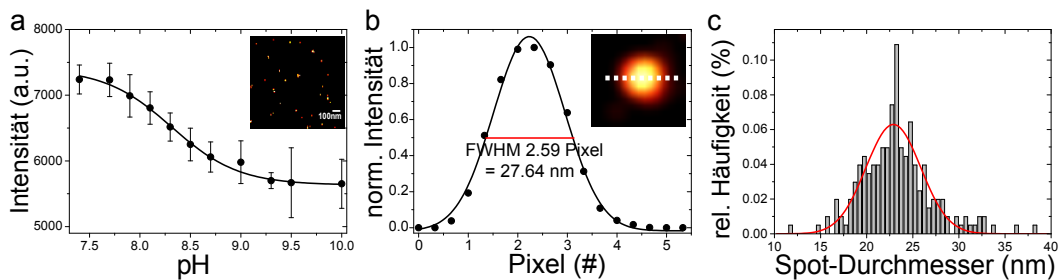


Abbildung 4.20: a) Die Anzahl der Photonencounts ist für hGal-1, fluoreszenzmarkierte mit Alexa647, im pH-Bereich von 7.4 - 7.7 maximal. Der **Inset** zeigt das rekonstruierte Bild von hGal-1-Molekülen auf einer Glasoberfläche. b) Der Durchmesser eines einzelnen Spots (**Inset**) wird über die Halbwertsbreite einer Gaußfunktion bestimmt. c) Durch Histogrammierung von 210 Einzelmessungen ergibt sich ein Spot-Durchmesser von 23 ± 6 nm für ein einzelnes Molekül.

Ein einzelnes hGal-1-Molekül hat einen Durchmesser von 1.9 nm [He *et al.*, 2003]. Die Kopplung mit dem Farbstoff Alexa647 vergrößert diesen um etwa 1.0 nm. Um die tatsächliche Proteingröße im hochaufgelösten Bild zu bestimmen, werden hGal-1-Moleküle auf einer Glasoberfläche vermessen (Integrationszeit 10 ms, Anregungsleistung 100 mW bei 641 nm mit einer Leistungsdichte von 1 - 5 kW/cm², 15000 Einzelbilder). Der Schwellwert für eine Lokalisation bei der Bildrekonstruktion (Abbildung 4.20, a, Inset) wird auf 3000 Counts festgelegt. Es können einzelne Spots (b) mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ herausgegriffen und deren Halbwertsbreite (FWHM) über einen Gauß-Fit bestimmt werden. Der hier gezeigte Galektin-Spot hat eine Halbwertsbreite von 2.59 Pixeln. Dies entspricht einem Spotdurchmesser von 27.64 nm, wenn jedes Pixel auf dem Kamerachip 106.7 nm groß ist und bei der Bildrekonstruktion eine Auflösungserhöhung von 10 zu Grunde gelegt wird. Durch Vermessung von 210 Einzelspots und anschließender Histogrammierung (c) folgt, dass ein einzelnes Galektin-Molekül einen Durchmesser von 23±6 nm im rekonstruierten Bild hat, was in etwa ein Faktor 10 mehr ist, als die tatsächliche Größe des Moleküls. Diese Größe kann als Abschätzung für Cluster verwendet werden. Lokalisationen auf der Zelloberfläche, die einen Durchmesser von ≥ 40 nm haben, resultieren nicht von einzelnen Molekülen, sondern werden durch eine Akkumulation dieser bedingt und werden im Folgenden als Cluster bezeichnet.

4.4.2 Clusterformationen auf den Zelloberflächen

Fluoreszenzmarkiertes hGal-1 wird in verschiedenen Konzentrationen zu den Neuroblastomzellen gegeben und das Lokalisationsmuster in den rekonstruierten Bildern analysiert. Abbildung 4.21 zeigt das typische Färbeergebnis für 1 μ M hGal-1. Die Zellen werden erst nach der Färbung fixiert, damit die Membraneigenschaft nicht durch den Fixierungsprozess verändert werden.

Aus dem Standard-Weitfeld-Fluoreszenzbild (Abbildung 4.21,a, Inset) sind keine Details über die Galektin-Verteilung auf der Zelloberfläche zu erkennen. Es wird lediglich deutlich, dass hGal-1 nicht gleichmäßig verteilt ist und an Glykoproteine auf der Zellmembran bindet. Das rekonstruierte Bild (a) ist hingegen deutlich detailreicher (15000 Einzelbildern, Integrationszeit 20 ms, Leistungsdichte von 1 - 5 kW/cm² bei 641 nm). Die Auflösungserhöhung wird um einen Faktor 10 erhöht, der Photonenschwellwert auf 600 Counts festgesetzt, da gebundenes Galektin dunkler ist als das auf einer Oberfläche fixierte. Möglicherweise kommt es durch die Bindung der Rezeptoren an die CRDs zu einer Umorientierung des Trp-Restes, wie die Anisotropie-Bindungsstudie mit Laktose gezeigt haben und so zu einer Verringerung des Fluoreszenzsignals.

Eine genauere Betrachtung des hochaufgelösten Bildes (c) zeigt, dass es unterschiedliche Spots auf der Oberfläche gibt. Diese variieren nicht nur in ihrer Intensität, dargestellt durch die unterschiedliche Farbcodierung im Bild, sondern auch im Durchmesser. Der Durchmesser lässt sich durch Anfitzen des Intensitätsprofils mit einer Gaußfunktion über die Halbwertsbreite bestimmen (beispielhaft in d gezeigt). Es ergeben sich Durchmesser im Bereich von 20 bis 160 nm (in anderen Bildausschnitten bis hin zu 500 nm). Auf Grund der Spezifität der CRDs gegenüber β -Galaktose-Motiven veranschaulicht das hochaufgelöste Bild die Verteilung dieser Zucker auf der Zelloberfläche. Es scheint, also ob sie nicht einzeln vorkommen, sondern in Cluster auftreten oder eine Clusterformation durch die Dimer-Eigenschaft des hGal-1 hervorgerufen wird.

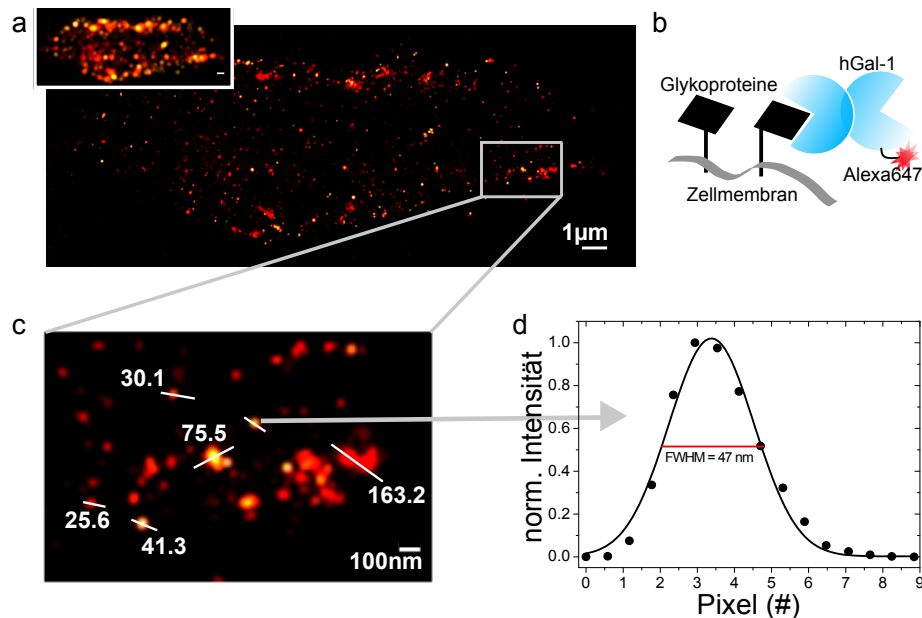


Abbildung 4.21: Räumliche Organisation von hGal-1 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen. **a)** Rekonstruiertes, hochaufgelöstes Bild. Inset: Weitfeld-Fluoreszenzbild der gleichen Zelle. Die Längenskalen entsprechen jeweils $1 \mu\text{m}$. **b)** veranschaulicht die Labelprozedur. Fluoreszenzmarkiertes hGal-1 wird an Glykoproteine mit einem β -Galaktose-Motive auf der Zellmembran gebunden. **c)** ist eine Vergrößerung des in a) gekennzeichneten Bereichs. Es sind verschiedene Spotdurchmesser im Bereich von 20 bis 160 nm eingezeichnet. Aus der Intensitätsverteilung eines Spots (**d**) kann der Clusterdurchmesser bestimmt werden.

Im nächsten Schritt werden die Cluster genauer charakterisiert. Mit einer Math-Lab Makro-Routine können die Cluster-Radien und die Anzahl der Lokalisationen innerhalb eines Clusters aus den *rapidSTORM*-Rohdateien für jede ver-

messene Zelle ermittelt werden. Die Anzahl der jeweiligen Durchmesser wird histogrammiert (Abbildung 4.22). Bei einer Klasseneinteilung von 10 nm werden zwei verschiedene Fraktionen sichtbar. Es gibt einen Bereich mit Durchmessern ≥ 40 nm mit einer scharfe Abgrenzung zu kleineren Durchmessern von ≤ 40 nm. Bei 30 nm ist ein Minimum zuerkennen. Unter Berücksichtigung der Größe eines einzelnen Galektin-Moleküls von etwa 23 nm im hochaufgelösten Bild, zeigt dieses Minimum die Unterscheidung zwischen Einzellokalisation und geclusterten Galektinen bzw. Zuckerrezeptoren an. Der Bereich um 25 ± 5 nm entspricht einer einzelnen Rezeptor-Ligand-Bindung auf der Zelloberfläche, während die Klasse von 35 ± 5 nm anteilig deutlich weniger stark im Histogramm vertreten ist. Allerdings verschwindet sie nicht vollständig, da es auf Grund von Lokalisationsungenauigkeiten immer noch Moleküle mit einem Spotdurchmesser in diesem Bereich gibt oder ein Cluster aus zwei Molekülen kleiner als der doppelte Galektin-Durchmesser ist. Die Daten zeigen aber eindeutig, dass eine klare Trennung zwischen einzelnen Molekülen, also Galektinen bzw. Glykoproteinen mit β -Galaktose-Motiv und geclusterten Lokalisationen möglich ist. Der Abfall der Clustergröße folgt einer mono-exponentiellen Kurve und die „Halbwertszeit“ des Fits liefert für diesen speziellen Fall eine mittlere Clustergröße von ~ 78 nm. Ein quasi identischer Wert von 76 ± 42 nm konnte für das C-Typ-Lektin DC-SIGN ermittelt werden [Itano *et al.*, 2012].

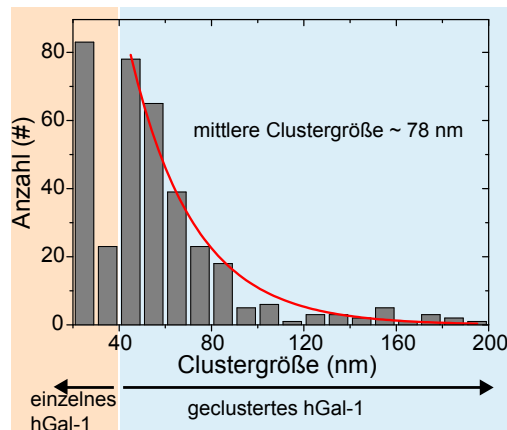


Abbildung 4.22: Die Histogrammierung der Spotdurchmesser zeigt, dass eine deutliche Trennung zwischen einzelnen Lokalisationen und Clustern möglich ist. Die Abnahme der Clustergröße folgt einem mono-exponentiellen Abfall und liefert in diesem speziellen Fall einen mittleren Durchmesser von 78 nm.

Um den Einfluss der Proteinkonzentrationen auf die Clusterformation zu untersuchen, wird diese im Bereich von 10 nM bis 1 μ M variiert und in Anwesenheit

von 50 mM Laktose ($1 \mu\text{M}$ hGal-1 für 30 min mit 50 mM Laktose inkubiert) gemessen. Höhere Proteinkonzentrationen können nicht getestet werden, da die einsetzbare Menge durch den Markierungsansatz mit einer Konzentration von maximal $10 \mu\text{M}$ und einem Volumen von 0.1 mL (für die Markierung einer Kammer werden mindestens 0.13 mL benötigt) limitiert ist. Die Bilder (Abbildung 4.23 a - c) zeigen, dass die Anzahl der Lokalisationen mit abnehmender Proteinkonzentration ebenfalls zurückgeht. Insgesamt werden knapp 500 Zellen pro Konzentration mit identischen Einstellungen vermessen, rekonstruiert und über die Anzahl der Lokalisation gemittelt, mit dem Ergebnis, dass es zu einer Reduzierung der Gesamtzahl an Lokalisationen um eine Größenordnung zwischen der höchsten und der geringsten Konzentration kommt. Die Anzahl der Lokalisationen enthält Tabelle 4.9. Die Auswertung der Histogramme (e), exemplarisch für die Zellbilder a - d, mit einem mono-exponentiellen Modell zeigt, dass der mittlere Clusterdurchmesser für alle Konzentrationen ~ 80 nm beträgt.

Wird hGal-1 in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ mit 50 mM Laktose abgesättigt, kann die Vermutung, dass die CRDs spezifisch Laktose erkennen und binden, bestätigt werden. Die Bildern enthalten kaum noch Lokalisationen und die Gesamtzahl der Lokalisationen liegt in der gleichen Größenordnung wie für 10 nM hGal-1. Die Bindung an Membranrezeptoren wird deutlich verringert.

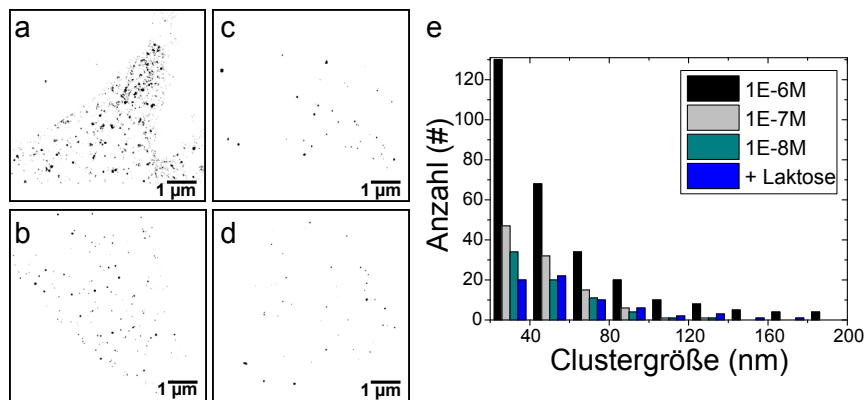


Abbildung 4.23: Mit abnehmender Galektin-Konzentration (**a**) $1 \cdot 10^{-6}$ M, **b**) $1 \cdot 10^{-6}$ M + 50 mM Laktose, **c**) $1 \cdot 10^{-7}$ M, **d**) $1 \cdot 10^{-8}$ M) nimmt auch die Anzahl der Lokalisationen im hochaufgelösten Bilder der Zelloberfläche ab. Die Längenskalen entsprechen jeweils $1 \mu\text{m}$. **e**) veranschaulicht die Clusterdurchmesser von a - d mit einem Binning von 20 nm.

Die verwendete MathLab-Routine erlaubt einen Vergleich von Lokalisationen innerhalb eines Clusters und Einzeln auf der Membran. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ändert sich das Verhältnis. Bei einer Konzentration von

1 μM sind anteilig etwa 40 % aller Lokalisationen in Clustern gesammelt. Mit abnehmender Konzentration bzw. bei Inhibition durch Laktose werden anteilig mehr einzelne Lokalisationen detektiert, also weniger Cluster ausgebildet.

Tabelle 4.9: Mit der Proteinkonzentration nimmt die Anzahl der Lokalisationen ab. Die mittlere Clustergröße bleibt konstant, der Anteil der Einzellokalisationen innerhalb des Bildes nimmt zu.

Konzentration (M)	Lokalisationen (#)	Clusteranteil (%)	Clustergröße (nm)
$1 \cdot 10^{-6}$	48000±10000	41±4	81±7
$5 \cdot 10^{-7}$	15000±4000	35±4	83±8
$2 \cdot 10^{-7}$	7000±1200	32±4	79±6
$1 \cdot 10^{-7}$	4200±800	29±4	85±8
$1 \cdot 10^{-8}$	3500±900	23±4	78±4
$1 \cdot 10^{-6}$ + Lak	3900±700	18±4	83±5

Insgesamt kann festgehalten werden, dass die mittlere Clustergröße von der Proteinkonzentration unabhängig ist, die Anzahl der gezählten Cluster jedoch nicht, ebenso der Anteil der Lokalisationen innerhalb eines Clusters. Die Ausbildung von Clustern wird demnach durch die Galektin-Konzentration gesteuert. Dimeres hGal-1 ermöglicht eine Ausbildung von Clustern bzw. eine Vernetzung von Zuckern mit β -Galaktose-Motiv auf Zelloberflächen. Die Tatsache, dass für Galektin-Konzentrationen $1 \cdot 10^{-7}$ M anteilig mehr Proteine in Clustern lokalisiert werden, als bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ M bei gleichbleibender Gesamtzahl der Lokalisationen, deutet daraufhin, dass ein Ausgangspunkt für die Clusterbildung notwendig ist. Erst ab einer bestimmten Galektin-Dichte bzw. Abstand zwischen Galektinen können Cluster ausgebildet werden. Die Einzelspots im Bereich von 30 - 40 nm könnten eine Vorstufe von Clustern sein. Dies verdeutlicht auch eine Histogrammierung mit einer Klassenbreite von 10 nm. Die klare Abgrenzung zwischen Einzellokalisationen und Clustern verschwindet (Abbildung 4.24, Pfeil). Im Bereich von 20 - 30 nm können konzentrationsunabhängig in etwa gleich viele Cluster gezählt werden. Während für 1 μM eine klare Abgrenzung existiert, und der Bereich um 40 nm genauso viele Einträge wie bei 20 nm enthält, werden bei geringeren Konzentrationen deutlich weniger gezählt als für 20 nm. Demnach ist es wahrscheinlich, dass die Cluster erst mit steigender Proteinkonzentration gebildet werden, da vorher kein Kontakt zwischen verschiedenen Membranrezeptoren durch hGal-1 hergestellt werden kann. hGal-1 muss also die Fähigkeit besitzen Oberflächen querzuvernetzen oder bewegliche Membranproteine in Clustern anzusammeln. Schematisch zeigt Abbildung 4.24, b, die Vernetzung. Unterstützt wird diese Vermutung weiter-

hin durch die Versuche mit Laktose-inhibierten Galektinen. Auf Grund von blockierten CRDs werden Membran-Proteine nicht mehr vernetzt. Erwartungsgemäß hätte hier noch weniger Signal detektiert werden sollen. Die 18 % Lokalisationen in den Clustern lassen sich durch unspezifische Wechselwirkungen mit Galaktose-ähnlichen Zuckern erklären. Durch die Dynamik des Bindungsprozesses der Laktose werden statistisch betrachtet immer wieder Bindungsstellen frei, so dass eine Wechselwirkung mit Membranrezeptoren möglich wäre. Außerdem können Fehllokalisationen, Doppelspots und zu geringe Abstände zwischen den Galektin-Molekülen zu Cluster-ähnlichen Strukturen führen. Als Ergebnis bleibt aber bestehen, dass einzelne Lokalisationen eine Vorstufe von Clustern bilden.

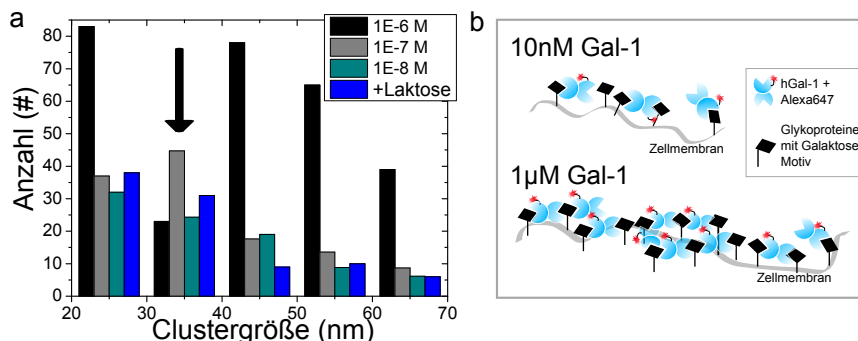


Abbildung 4.24: a) Konzentrationsabhängig verschwindet die klare Abgrenzung zwischen einzelnen Lokalisationen und Proteinen in Clustern (> 40 nm). b) Erst ab einer bestimmten Proteinkonzentration findet eine Quervernetzung von Membranrezeptoren statt bzw. die Bewegung dieser innerhalb der Membran wird durch hGal-1 dermaßen eingeschränkt, dass sich Cluster ausbilden.

4.4.3 Monomeres hGal-1 induziert Apoptose

Bei der Aufreinigung von exprimiertem hGal-1 kann auf den Oxidationsschutz durch DTT verzichtet werden, so dass die Proteine zu Monomeren zerfallen (kontrolliert mit Gelfiltrationen, Daten nicht gezeigt). Diese können ebenfalls mit dem Farbstoff Alexa647 markiert, die Proteinkonzentration ($\leq 20 \mu M$) und der Labelgrad (0.5 - 0.9) mit Hilfe von Ensemblemessungen bestimmt und mit FCS-Messungen kontrolliert werden. Es ergibt sich für die markierten Proteine eine Diffusionskonstante zwischen $0.94 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$ und $1.17 \cdot 10^{-6} cm^2 s^{-1}$, abhängig von der Proteinkonzentration nach der Aufreinigung und der Zeit nach der Markierung. Dieses Intervall deckt den Bereich der aggregierten, oxidierten Galektine (Kapitel 4.3.3) sehr gut ab. Wird nach der Markierung wieder 2 mM

DTT zugefügt, kann die Aggregation unterdrückt und Diffusionskonstanten $> 1.23 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ gemessen werden. Zellmarkierungsexperimente werden sowohl mit aggregierten wie auch reinen Monomeren durchgeführt. Die hochaufgelösten Bilder sehen aber identisch aus. Daher wird im Weiteren nur noch von Monomeren gesprochen und nicht weiter zwischen Aggregaten aus monomeren hGal-1 und der „echten“ Monomerform unterschieden. Insgesamt sind bei der Markierung der Neuroblastomzellen mit Monomeren zwei sehr gegensätzliche Muster erkennbar, die nacheinander diskutiert werden.

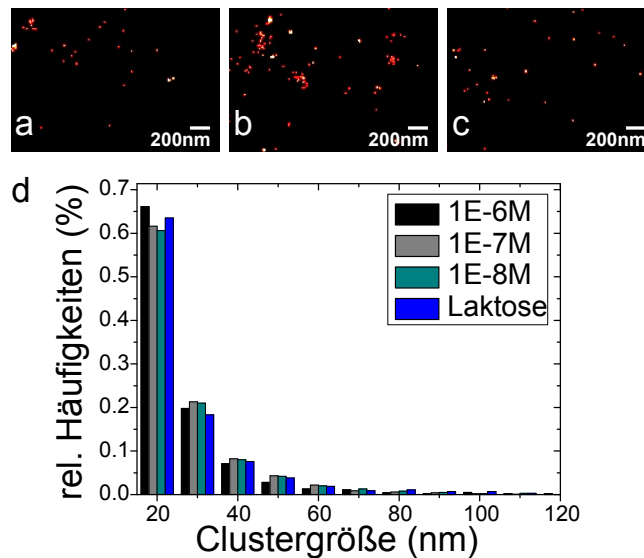


Abbildung 4.25: Monomeres hGal-1 bindet sehr schlecht an Zellmembranen. Die Anzahl der Lokalisationen ist von der Konzentration und Laktose-Inhibition unabhängig. **a)** $1 \cdot 10^{-6}$ M, **b)** $1 \cdot 10^{-8}$ M, **c)** $1 \cdot 10^{-6}$ M + Laktose. **d)** 80 % der Spots haben einen Durchmesser von < 40 nm und können demnach einzelnen Rezeptoren zugeordnet werden. Cluster werden nur geringfügig ausgebildet.

Im ersten Fall sind in den hochaufgelösten Bildern kaum Lokalisationen zu finden (Abbildung 4.25, a -c), wenn sie mit den gleichen Einstellungen wie für Dimere aufgenommen werden. Auch ein Herabsetzen des Photonenschwellwert ändert daran nichts. In einem Bereich zwischen $1 \cdot 10^{-6}$ M und $1 \cdot 10^{-8}$ M, so wie bei Inhibition durch 50 mM Laktose können konzentrationsunabhängig maximal 7000 Lokalisationen pro Bild registriert werden (pro Konzentration 150 - 250 Bilder analysiert). Abbildung 4.25, a - c zeigt die *rapidSTORM*-Bilder für verschiedene Konzentrationen. Alle Bilder sehen in etwa gleich aus. Ein Vergleich von einzelnen und geclusterten Lokalisationen zeigt, dass nur noch maximal 11 % in den Clustern vorkommen. Bei der Histogrammierung der Spotdurchmesser

(d) liegen $> 80\%$ aller Spots in einem Bereich von $< 40\text{ nm}$. Für monomeres hGal-1 wird auf Grund der Struktur erwartet, dass es keine Cluster mehr ausbilden kann bzw. in der Lage ist, Strukturen zu vernetzen, da es lediglich eine CRD besitzt. Die gefundenen „Cluster“ resultieren aus einem geringen Abstand zwischen den markierten Membranrezeptoren, da die Auflösung einzelner Moleküle trotz der Hochauflösungstechnik immer noch begrenzt ist.

In der gleichen Probenkammer werden aber auch Zellen mit einer sehr hohen Markierung gefunden (Abbildung 4.26, $1 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ hGal-1), die insgesamt eher kugelig aussehen. Sie zeigen sowohl sehr helle Bereiche, die umgeben sind von kleineren „Punkten“, wie auch Bereiche die vollständig unmarkiert sind. Die Anzahl der Lokalisationen pro Bild schwankt stark zwischen 50000 und 300000. Je höher die Monomerkonzentration desto mehr runde Zellen können beobachtet werden. Für Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ sind bis zu 50% aller Zellen rund, während bei $1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ maximal 30% betroffen sind. Bei Zugabe von 50 mM Laktose kann keine signifikante Tendenz festgestellt werden. Aus den Oxidationsmessungen mit hGal-1 ist jedoch schon bekannt, dass monomere Formen keine Laktose mehr binden. Folglich sollte keine Inhibition stattfinden und es entsteht das gleiche Bild wie für Monomere alleine. Innerhalb des Fehlers (Standardabweichung vom Mittelwert) stimmen die Werte für die Versuche mit und ohne Laktose überein.

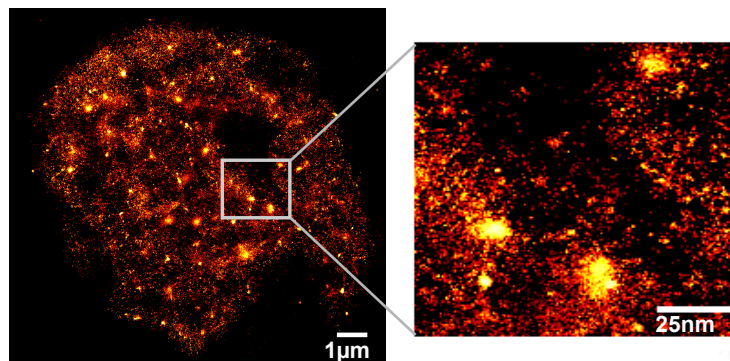


Abbildung 4.26: Monomeres hGal-1 färbt Zellen mehr oder weniger flächig an. Eine vergrößerte Darstellung des Ausschnitts links zeigt allen Formen von Lokalisationen: Cluster, Einzelspots und unmarkierte Flächen.

Weiterhin sind in den Bildern wieder Cluster beobachtbar, allerdings variieren die Anteile von einzelnen und geclusterten Lokalisationen stark. Die einzelnen Spots werden mit abnehmender Proteinkonzentration wieder mehr (wie bei Dimeren), allerdings ist der Fehler sehr groß (vgl. Tabelle 4.10). Die mittlere Clustergröße kann nicht bestimmt werden, da der Markierungsgrad der Zellen

nicht vergleichbar ist und die Zuordnung von Lokalisationen, die zum Cluster gehören bzw. schon nicht mehr, nicht möglich ist.

Tabelle 4.10: Der Anteil der Lokalisationen in Clustern variiert stark. Der Fehler entspricht dem Standardfehler vom Mittelwert aus 80 - 150 vermessenen Zellen.

Konzentration (M)	Clusteranteil (%)
$1 \cdot 10^{-6}$	67 ± 15
$1 \cdot 10^{-7}$	51 ± 21
$1 \cdot 10^{-8}$	43 ± 14
$1 \cdot 10^{-6} + \text{Lak}$	53 ± 9

Die dSTORM-Technik gibt einen Einblick in das Bindungsbild von hGal-1 an Membran-Rezeptoren. Dimeres hGal-1 bildet Cluster bzw. induziert die Clusterbildung, wie Konzentrationsreihen und Messungen mit Laktose gezeigt haben. Monomeres hGal-1 zeigt ein sehr gegensätzliches Verhalten. Durch die Zugabe von monomerem hGal-1 zu den lebenden Zellen können eventuell Signalwege in der Zelle aktiviert werden, die zum Zelltod, erkennbar an der kugeligen Zellform, führt. Die Fixierung führt dann zu einer Momentaufnahme von verschiedenen Stadien der Apoptose, was die unterschiedlichen Markierungsgrade erklärt.

4.5 Click-Chemie zur Charakterisierung von Membranstrukturen

Monoklonale Antikörper haben die Biowissenschaften des 20sten Jahrhunderts geprägt. Sie sind hochspezifisch gegenüber bestimmten Strukturen und binden diese mit hoher Affinität. Aber ihre Verwendbarkeit ist auf die extrazelluläre Umgebung beschränkt, sie können nicht in lebende Zellen eindringen. Die Bioorthogonale Chemie, zu der auch das Konzept der Click-Chemie zählt, umgeht dieses Problem. Metabolisch, enzymatisch und genetisch können funktionelle Gruppen kovalent, effizient, selektiv und sehr schnell in Zellen und lebenden Organismen markiert werden [Kolb *et al.*, 2001], [Baskin & Bertozzi, 2007]. Um Glykoproteine oder -lipide auf Zelloberflächen zu lokalisieren und ihre Aufgaben näher zu untersuchen, werden spezielle Zucker entwickelt, die metabolisch in die Zellmembranen eingebaut und anschließend fluoreszent mittels Click-Chemie sichtbar gemacht werden. Eine genaue Analyse der Zuckerverteilung auf der Zelloberfläche von Neuroblastomzellen ermöglicht die dSTORM-Technik.

4.5.1 Hochauflösung zum Nachweis von modifizierten Zuckern in Zelloberflächen

Acetylierte Monosaccharide wie 2-Azidoacetyl-amino-2-Desoxy-1,3,4,6-Tetraacetyl- β -D-Glucopyranosid ($Ac_4GlcNAz$) können durch die Zellmembran diffundieren [Vocadlo *et al.*, 2003]. Die modifizierten Zucker werden dem normalen Zellkulturmedium zugesetzt und der Einbau in die Glykoproteine und -lipide der Zellmembranen erfolgt innerhalb von zwei Tagen. Dabei findet eine Deacetylierung im Cytoplasma statt [Homann *et al.*, 2010].

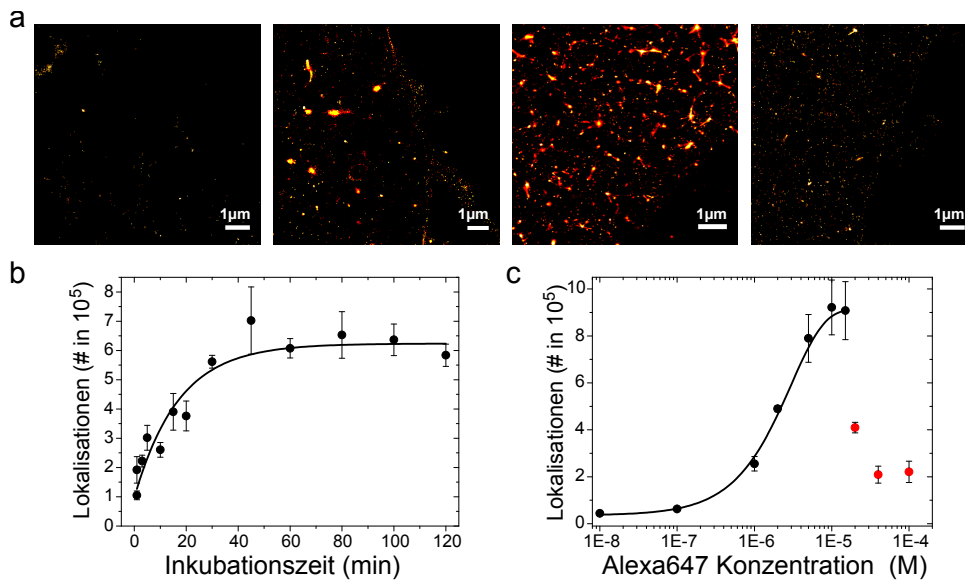


Abbildung 4.27: Die metabolisierten Zucker können mit dem Fluorophor Alexa647-Alkin angefärbt werden. **a)** Mit steigender Farbstoffkonzentration (von links nach rechts: 0,01, 1, 10 und 100 μM) sind im hochauflösenden Bild mehr Spots zu erkennen. **b)** Das optimale Signal wird bei einer Inkubationszeit > 45 min erreicht. Die Daten folgen einem mono-exponentiellen Verlauf mit einer Zeitkonstante von 16 ± 4 min. Der Fehler resultiert aus der Origin-Fit-Routine. **c)** Bei zu hohen Konzentrationen kommt es zur gegenseitigen Löschung der Fluorophore. Das Signal nimmt exponentiell ab (rote Punkte). Vorher können die Daten mit einem sigmoidalen Modell angenähert werden. Die Fehler entsprechen dem Standardfehler vom Mittelwert aus mindestens 50 Einzelmessungen.

Um die Anordnung der Zucker auf der Zellmembran zu untersuchen, wird Alexa647-Alkin in verschiedenen Konzentrationen zu den lebenden Zellen gegeben und über eine 1,3-polare Cycloaddition an die Stickstoff-Reste der metabolisierten Zucker gekoppelt. Anschließend werden die Zellen fixiert, der Schaltput-

fer zugefügt und die Probe vermessen (15000 Einzelbilder, Integrationszeit 20 ms, Leistungsdichte von 1 - 5 kW/cm² bei 641 nm) und mit *rapi d*STORM analysiert. Der Photonenschwellwert wird auf 1000 festgesetzt. In Abbildung 4.27, a, sind die hochaufgelösten Bilder für verschiedene Farbstoff-Konzentrationen in einem Bereich von 0.01 - 100 μM zu sehen. Graphisch verdeutlicht (c), dass die Anzahl der Lokalisationen mit steigender Farbstoffkonzentration bis 15 μM zunimmt. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus jeweils mindestens 50 Zellbildern gezeigt und der Kurvenverlauf mit einem sigmoidalen Modell angenähert. Die Kurve geht in Sättigung, da alle Zucker auf der Oberfläche markiert sind, oder die Zucker zu dicht sitzen, um noch auflösbar zu sein bzw. keine gegenseitige Löschung der Farbstoffe hervorzurufen. Löschung tritt bei Konzentrationen $> 15 \mu M$ auf. Die Kurve fällt exponentiell ab (rote Punkte). Der Ausgangswert der geringsten Konzentration wird aber nicht erreicht, da auf Grund der hohen Farbstoff-Konzentration einzeln vorkommende Zucker wahrscheinlicher markiert werden, als bei geringen Konzentrationen.

Weiterhin hängt die Anzahl der Lokalisationen von der Inkubationszeit mit dem Farbstoff ab. Für eine Farbstoff-Konzentration von 10 μM ist der Bereich von 1 - 120 min in Abbildung 4.27, b, dargestellt. Die Lokalisationen nehmen mit der Inkubationszeit exponentiell zu. Die Zeitkonstante beträgt 16 ± 4 min. Um lange Wartezeiten zu vermeiden, aber gleichzeitig ein optimales Ergebnis zu erhalten, werden alle nachfolgenden Experimente mit einer Inkubationszeit von 60 min durchgeführt und eine Farbstoffkonzentration von 10 μM verwendet.

Insgesamt ist aus diesen Bildern schon zu erkennen, dass es nicht zu einer gleichmäßigen bzw. flächigen Einfärbung der Zelloberflächen kommt. Das „Aussehen“ der Lokalisationen verändert sich dabei mit steigender Farbstoffkonzentration. Während bei Konzentrationen $\leq 0.1 \mu M$ hauptsächlich punktförmige Lokalisationen beobachtet werden, treten bei Konzentrationen $\geq 1 \mu M$ vermehrt länglich oder sternförmig aussehende Lokalisationen auf, als ob es einen Startpunkt für die Ausbildung gibt oder eine Bewegung, die durch die Fixierung eingefroren wird. Eine genauere Darstellung der Clusterformen zeigt Abbildung 4.28. Es sind sowohl Lokalisationen mit Durchmessern im Bereich von 25 - 40 „Sternschweife“ in einem Bild in unterschiedliche Richtungen weisen, kann ausgeschlossen werden, dass sie durch Drift der Probe oder des Setups hervorgerufen werden. Die Anzahl der Lokalisationen pro Pixel in x- und y-Richtung (Abbildung 4.28 b, c) ist im Zentrum des Clusters am höchsten. Diese Dichte korreliert mit der höchsten Intensität im hochaufgelösten Bild und nimmt nach außen hin ab (rot entspricht der höchsten, blau der geringsten Dichte). (b) zeigt einen ausgeschmierten Spot. Im Schweif des Clusters werden deutlich weniger Lokalisationen detektiert (blau), während das Intensitätsmaximum auch dem Dichtemaximum (rot) entspricht.

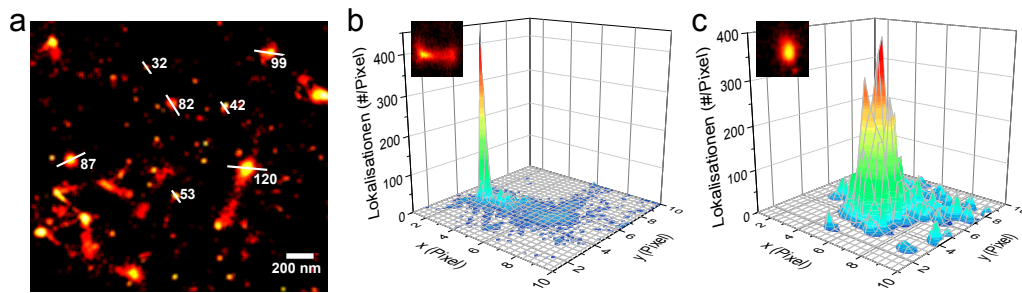


Abbildung 4.28: a) Die metabolisierten Zucker sind nicht gleichmäßig in der Zellmembran verteilt. Es gibt runde Spots im Bereich von 25 - 100 nm und solche, die einen länglichen Schweif haben und Sternen ähneln. Der Durchmesser der Spots wird aus der Halbwertsbreite der Intensitätsverteilung mittels Gauß-Fit bestimmt. b), c) zeigt die Dichteverteilung innerhalb eines Clusters (von rot nach blau abnehmend). Beide Clusterformen zeigen eine nach außen hin abnehmende Anzahl von Lokalisationen pro Pixel.

Um die Spezifität des Markierungsprozesses bzw. der Clusterformation zu untersuchen, werden verschiedene Kontrollmessungen durchgeführt. Dafür werden die Zellen mit dem Zucker GlcNAc (N-Acetylglucosamin), der zwar einbaubar, aber nicht markierbar ist und mit dem Zucker GlcNAz (Tetraacetyliertes N-Azidoacetylglucosamin), der nicht metabolisiert, dafür aber markiert werden kann, gefüttert. Zum Nachweis unspezifischer Bindungen zwischen Farbstoff und Zelloberfläche werden Kontrollen ohne Ac_4GlcNAz angesetzt. In den hochaufgelösten Bildern lässt sich die deutlich ineffizientere Metabolisierung bzw. Markierung der beiden Zucker erkennen, der Spotdurchmesser beträgt 20 - 40 nm und die Spots an sich erscheinen alle eher punktförmig. Cluster werden kaum noch beobachtet. Die Anzahl und Formen der Lokalisationen sind mit den Farbstoffkontrollen ohne Ac_4GlcNAz vergleichbar. Tabelle 4.11 zeigt vergleichend die Anzahl der registrierten Lokalisationen für die verschiedenen Zucker und die Kontrolle mit Farbstoff alleine. Bis zu einer Konzentration von $0.1 \mu\text{M}$ stimmen die Werte für alle vier Proben überein. Für höhere Farbstoffkonzentrationen können bei den Zuckerproben mehr Lokalisationen als für den Farbstoff alleine registriert werden. Dabei stimmen die Werte für GlcNAc und GlcNAz in etwa überein. Ac_4GlcNAz hebt sich deutlich von den Kontrollen ab, es können mehr als sechs Mal so viele Lokalisationen gezählt werden. Der Hintergrund bzw. Fehllokalisationen werden quasi durch die Farbstoffkontrolle alleine abgeschätzt. Während selbiger für die beiden Kontrollzucker bei mindestens 70 % für die höchste Farbstoffkonzentration liegt, können für den Ac_4GlcNAz -Zucker nur etwa 10 - 15 % des Signals Fehllokalisationen zugeordnet werden. Die angegebenen Werte für die Lokalisationen entsprechen dabei jeweils den Mittelwerten

und Standardabweichungen von mindestens 150 einzeln vermessenen Zellen, an verschiedenen Messtagen und für verschiedene Markierungsansätze.

Tabelle 4.11: Anzahl der Lokalisationen aus den *rapid*STORM-Bildern für die verschiedenen Kontrollen mit nicht bzw. schlecht bindenden Zuckern und dem Farbstoff Alexa647-Alkin alleine im Vergleich mit dem Ac₄GlcNAz-Zucker. Die verwendete Farbstoffkonzentration variiert zwischen 0.01 und 10 μ M. Die Anzahl der Lokalisation ist in 10⁴ angeben. Es sind die Standardabweichungen und Mittelwerte aus mindestens 150 Einzelmessungen angegeben.

Alexa647 (μ M)	GlcNAc	GlcNAz	Ac ₄ GlcNAz	ohne Zucker
0.01	4.3±0.7	4.6±0.9	4.4±0.6	4.2±0.5
0.1	4.9±0.4	5.9±1.1	6.3±0.6	4.8±0.4
1.0	7.3±2.5	8.3±2.8	25.53±3.1	6.4±2.5
10.0	13.2±3.5	14.9±4.5	87.6±29.5	9.7±4.9

4.5.2 Click-Chemie an lebenden Zellen

Um eine Bewegung der Zuckermoleküle selbst oder des gesamten Clusters zu untersuchen, werden die bisherigen Experimente an lebenden Zellen wiederholt. Problematisch für *in vivo* Experimente ist jedoch die Verwendung von Kupfer als Katalysator. Der Ligand TBTA ist schlecht wasserlöslich, so dass hohe Kupferkonzentrationen (0.2 - 1 mM) eingesetzt werden müssen, um entsprechend schnelle Reaktionskinetiken zu erhalten. Die lethale Dosis von Kupfersalzen, wie Kupfersulfat, liegt bei 0.4 - 200 mg/kg Körpergewicht [WHO, 1993]. Freie Kupferionen begünstigen aber die Entstehung von reaktivem Sauerstoff und verschiedenen Stickstoffspezien, die cytotoxisch wirken [Gaetke & Chow, 2003]. Daher werden *in vivo* Experimente entweder unter Verwendung von anderen Liganden wie BTES [Soriano del Amo *et al.*, 2010] oder THPTA [Hong *et al.*, 2010] durchgeführt. Eine andere Möglichkeit bieten kupfer-freie Click-Reaktionen [Baskin *et al.*, 2007], [Chang *et al.*, 2010], [Almeida *et al.*, 2012]. Hier werden alle Experimente in Gegenwart von 200 μ M Kupfersulfat durchgeführt. Lediglich auf die Verwendung des Liganden TBTA wird verzichtet. Eine Messreihe mit unterschiedlichen Kupferkonzentration für die Click-Reaktion im Bereich von 2 nM bis 200 μ M hat gezeigt, dass sich die Anzahl der registrierten Lokalisationen im hochaufgelösten Bild bis zu einer Konzentration von 2 μ M nicht verringert. Für Konzentrationen < 2 μ M nimmt das Signal ab und die Kurve folgt einem sigmoidalen Modell, wie Abbildung 4.29 veranschaulicht. Eingebettet sind beispielhaft für einige Kupferkonzentrationen die hochaufgelösten

Bilder, die für 2 und 200 μM Kupfersulfat identisch aussehen. Bei geringeren Konzentrationen werden weniger Lokalisationen und Cluster detektiert.

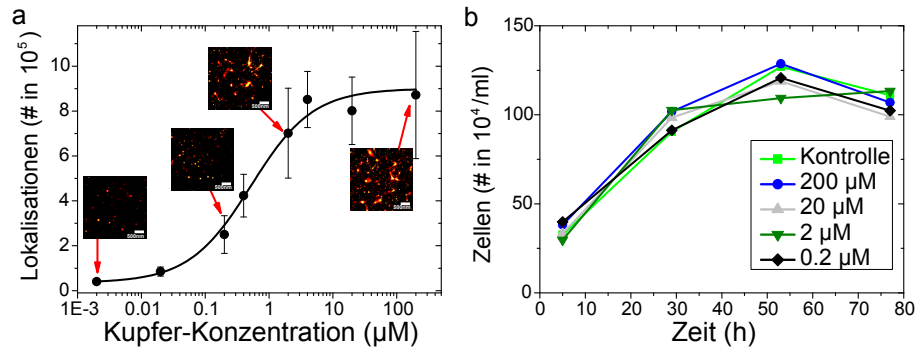


Abbildung 4.29: a) Bis zu einer Kupferkonzentration von $2 \mu\text{M}$ kann die Click-Reaktion ohne Signalverluste (Anzahl der Lokalisationen) durchgeführt werden. Werden die registrierten Lokalisationen gegen die Kupferkonzentration aufgetragen, dann ergibt sich ein sigmoidaler Verlauf mit einem Wendepunkt bei $0.6 \mu\text{M}$. Beispielhaft sind für einige Konzentrationen die hochauflösten Bilder gezeigt. b) Im Konzentrationsbereich, in dem eine Click-Reaktion stattfindet, ist Kupfer nicht toxisch für die Zellen. Sie zeigen in etwa ein exponentielles Wachstum.

Zum Nachweis einer möglichen Toxizität der eingesetzten Kupferkonzentration werden Lebend-Zell-Experimente in 24-Kammer-Platten durchgeführt. Die Zellen werden in einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL angesetzt, zwei Tage mit dem Zucker Ac_4GlcNAz inkubiert und anschließend, wie bei der Click-Reaktion, für jeweils eine Stunde unterschiedlichen Kupferkonzentrationen zwischen 0.2 und $200 \mu\text{M}$ ausgesetzt und im Anschluss gezählt. Abbildung 4.29, b, zeigt, dass das Zellwachstum sowohl bei den kupferbehandelten Zellen wie auch bei einer unbehandelten Kontrollprobe gleich stark und exponentiell zunehmend ist. Die Anzahl der gezählten Zellen stimmt für alle Proben in etwa überein. Auch der Anteil der toten Zellen wird jeweils bestimmt. Er beträgt für jede Probe, an jedem gezählten Tag, maximal 13 % und unterscheidet sich für die verschiedenen Kupferkonzentrationen nicht. Auch die Toxizität des verwendeten Farbstoffs wird auf die gleiche Art und Weise getestet. Es werden für eine Kupferkonzentration von $200 \mu\text{M}$ Farbstoffkonzentrationen von 10 nm bis $10 \mu\text{M}$ in Gegenwart des Ac_4GlcNAz -Zuckers getestet. Hier kann ebenfalls ein identisches, exponentielles Zellwachstum, unabhängig von der Probe, beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Demnach sollte es möglich sein die obigen Experimente an lebenden Zellen unter den gleich Bedingungen ($10 \mu\text{M}$ Alexa647, $200 \mu\text{M}$ Kupfersulfat und 1 mM Natriumascorbat) zu wiederholen. Weiterhin wird auf den Einsatz des Liganden TBTA verzichtet. Eventuell wird so die toxische

Wirkung des Kupfers unterdrückt, da so keine freien Kupferionen, die reaktiven Sauerstoff produzieren, aus der Koordinationssphäre des TBTA austreten. Die Ergebnisse der Lebend-Zell-Experimente zeigt Abbildung 4.30.

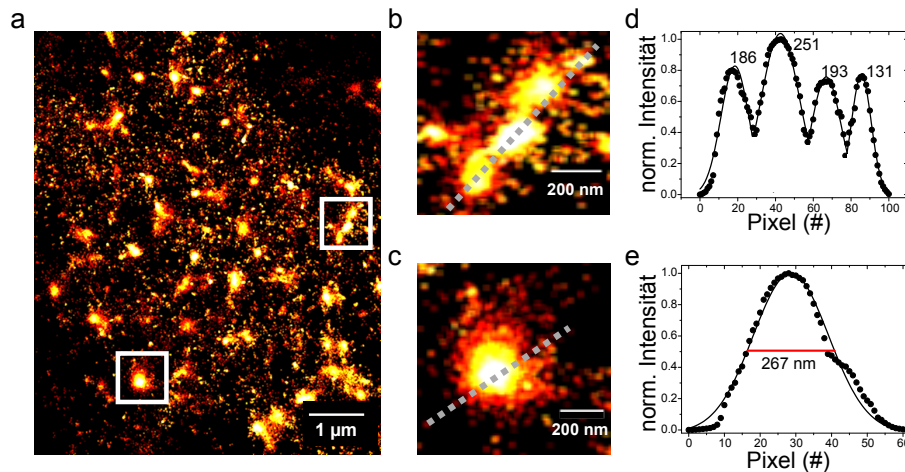


Abbildung 4.30: Zuckermarkierungen mit Click-Reaktionen können auch an lebenden SK-N-MC-Zellen durchgeführt werden. a) Das Gesamtbild der Zucker-
verteilung gleicht dem fixierter Zellen. Die Längenskala entspricht $1 \mu\text{m}$. b) und
c) sind die Vergrößerung der weißen Vierecke in a, mit einer Längenskala von 200
nm. Zusammen mit den jeweiligen Intensitätsverteilungen (d, e) zeigen sie, dass
die Cluster größer bzw. ausgeschmierter sind und häufiger ineinander übergehen.
Die Halbwertsbreiten des Gauß-Fits nehmen zu. Trotzdem können auch einzelne
Spots im Größenbereich von 25 - 35 nm detektiert werden.

Auf den ersten Blick unterscheiden sich die hochaufgelösten Bilder nicht von denen für fixierte Zellen. In den hochaufgelösten Bildern sind sowohl einzelne Lokalisationen der metabolisierten Zucker als auch runde, verschmierte oder sternförmige Cluster zu sehen. Eine vergrößerte Darstellung der Cluster (b, c) und die Vermessung der Intensitätsprofile (d, e) über die Halbwertsbreite eines Gauß-Fits, zeigt jedoch, dass selbige insgesamt einen größeren Durchmesser haben. Sie wirken ausgeschmierter. Spots mit einem Durchmesser von 25 - 35 nm sind seltener geworden und die Cluster gehen oftmals ineinander über. Ursache hierfür ist die Bewegung der Glykoproteine- und lipide in der Zellmembran, an die der Zucker gekoppelt wird. Drifteffekte können an dieser Stelle ausgeschlossen werden, da die Ausschmierungen der beobachteten Cluster in unterschiedliche Richtungen erfolgen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Zucker in den Membranen von lebenden Zellen einem ständigen Bewegungsprozess unterliegen, bedingt durch den kontinuierlichen Auf- und Abbau der Cluster. Der mittlere Spotdurchmesser eines einzelnen, markierten Zuckermoleküls bei

fixierten Zellen beträgt 17 ± 5 nm. Insgesamt werden 250 einzelne Spots, für Farbstoffkonzentrationen $\leq 1 \mu\text{M}$, im hochaufgelösten Bild mit ImageJ vermessen und die Halbwertsbreiten bestimmt. Die mittlere Clustergröße lässt sich für die fixierten Zellen mittels MatLab-Software bestimmen und kann unter der Annahme, dass zwei Spots einen Cluster bilden, mit 102 ± 8 nm abgeschätzt werden. Insgesamt werden mehr als 50 hochaufgelöste Bilder ausgewertet. Die Verteilung der Clusterdiameter fixierter Zellen zeigt Abbildung 4.31.

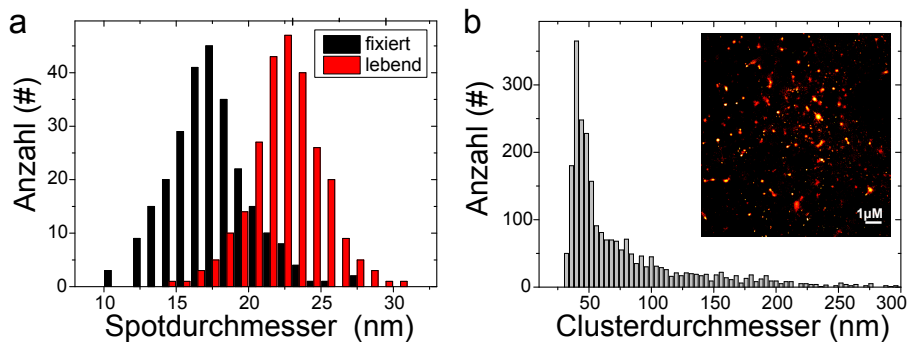


Abbildung 4.31: a) Histogrammierte Spotdurchmesser von Zuckermolekülen, markiert mit $\leq 1 \mu\text{M}$ Alexa647-Alkin, auf der Oberfläche von fixierten (schwarz) und lebenden (rot) Neuroblastomzellen. Bewegungsbedingt können die Moleküle unterschiedlich genau lokalisiert werden. b) zeigt die Anzahl der jeweiligen Clusterdiameter einer fixierten Zelle. Insgesamt ergibt sich ein mittlerer Clusterdiameter von 102 ± 8 nm.

Für Messungen an lebende Zellen kann bei gleicher Farbstoffkonzentration eine Verschiebung der Spotgröße hin zu 22 ± 4 nm im Histogramm 4.31, a, beobachtet werden. Die mittlere Clustergröße wird nicht bestimmt, da die Zuckermoleküle sich in der Membran bewegen und somit die Berechnung des Durchmesser nicht der Realität entsprechen würde. Die eigentlichen Cluster (ohne Bewegung) wären kleiner bzw. sollten genauso groß wie für fixierte Zellen sein. Anschließende Fixierung der lebend vermessenen Zellen zeigt, dass weder der Fixierungsprozess noch die Verwendung des GSH-Schaltpuffers einen Einfluss auf die Messungen hat. Die Anzahl der Gesamtlokalisationen stimmt mit Messungen an direkt fixierten Zellen überein und die hochaufgelösten Bilder zeigen die verschiedenen Clusterformen. Die mittleren Einzelspot und Clustergrößen stimmen wieder überein. Als Kontrolle werden die Lebend-Experimente auch mit dem MEA-Puffer durchgeführt. Es sind keine Unterschiede zu beobachten, sowohl während der Lebend-Messung, wie auch bei der späteren Fixierung und Bildanalyse.

4.5.3 Charakterisierung der Cluster

Membrandomänen werden durch das Cytoskelett stabilisiert und enthalten oftmals Cholesterol. Durch 10 mM Cyclodextrin, das das Aktinskelett der Zelle angreift, und durch Entfernung der Cholesterole mit 1 Unit/mL des Enzym Cholesteroxidase, können Lipid-Rafts zerstört werden [Eggeling *et al.*, 2009]. Abbildung 4.32 zeigt, dass die Zugabe von 1 - 5 Units/mL Cholesteroxidase in PBS-Puffer für 30 Minuten, sowohl vor als auch nach der Markierung mit Alexa647-Aktin, keinen Einfluss auf die Clusterbildung hat. Es können immer noch punktförmige Lokalisationen im Bereich von 25 - 35 nm, größere runde Cluster mit einem Durchmesser ≤ 100 nm und ausgeschmierte, sternförmige Cluster beobachtet werden. Die metabolisierten Zucker wechselwirken demnach in keiner Form mit Cholesterolen bzw. werden nicht an diese angebaut.

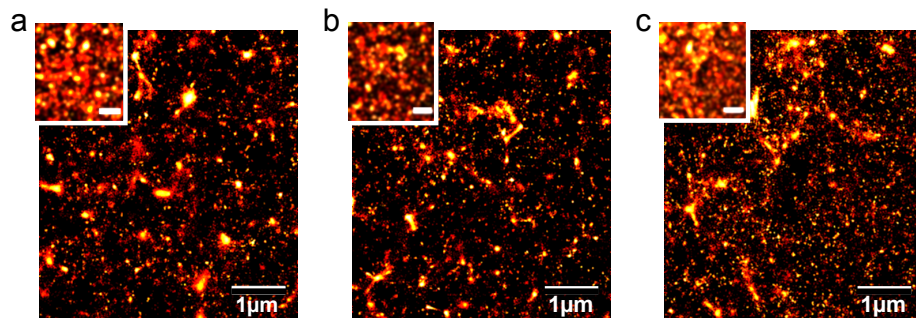


Abbildung 4.32: Durch Zugabe von (a) 1 Unit/mL, (b) 2 Units/mL und (c) 5 Units/mL Cholesteroxidase werden die bisher beobachteten Cluster nicht zerstört. Die Membranstrukturen, gebildet durch die Zuckermoleküle, sehen in den hochauflösten Bilder identisch aus. Der Inset zeigt die Standard-Weitfeld-Fluoreszenzbilder. Die Längenskalen entsprechen jeweils 1 μm .

Durch 30-minütige Zugabe von Cyclodextrin, gelöst in PBS-Puffer, können die Cluster aufgelöst werden (Abbildung 4.33). Für 5 mM Cyclodextrin (a) sind noch größere, sternförmige Cluster beobachtbar. Der Anteil der Einzellokalisationen hat aber schon zugenommen. Bei 10 mM Cyclodextrin werden nur noch Lokalisationen mit einem Durchmesser ≤ 25 nm registriert. Die Zelloberflächen scheinen flächig markiert zu sein. Die Anzahl der Gesamtlokalisationen bleibt aber konstant. Die eingebauten Zucker bzw. die Glykoproteine, die die Zucker beinhalten, werden nicht länger in Cluster gehalten, da diese durch die Zerstörung des Cytoskeletts zerfallen. Weiterhin ist es möglich, dass die Cluster durch die Zerstörung des Cytoskeletts nicht mehr nachgebildet werden. Der Transport von Proteinen und Lipiden an die Zelloberfläche erfolgt in Vesikeln entlang der

Aktinfilamente und wird durch die Zugabe von Cyclodextrin gestoppt. Entspricht ein Cluster nun der Verschmelzung zwischen Zellmembran und Vesikel, dann können keine neuen Cluster mehr entstehen, wenn der Transportweg aufgelöst wird. Es werden nur noch einzelne Proteine lokalisiert (~ 20 nm), da sich die vorhandenen Cluster diffusionsbedingt auflösen und die Proteine auf der Membran entlang wandern.

Wird die Cyclodextrin-Konzentration weiter erhöht (c, 25 mM), kommen in der Probenkammer nur noch Zellfetzen vor, die flächig markiert sind.

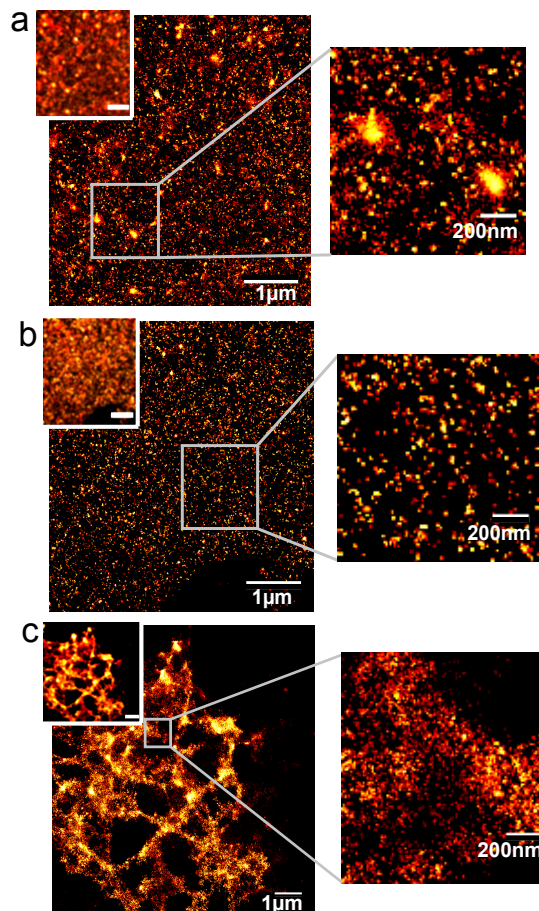


Abbildung 4.33: a) Bei Zugabe von 5 mM Cyclodextrin können noch sternförmige Cluster beobachtet werden, der Anteil einzelner Spots hat aber zugenommen. b) Für 10 mM werden nur noch punktförmige Lokalisationen im Bereich von 15 - 25 nm beobachtet. c) Bei 25 mM entstehen mit Einzellokalisationen flächig-markierte Zellfetzen. Die Zellen werden vollständig zerstört. Die Längenskalen betragen jeweils 1 μm und die Insets zeigen die Weitfeld-Aufnahmen. Graumarkiert ist jeweils der vergrößerte Ausschnitt, mit einer Längenskala von 200 nm.

Für lebende Zellen sollte es möglich sein, die Bewegung der Zuckermoleküle bzw. die Gesamtbewegung des Cluster zu verfolgen. Dazu werden die Rohdaten mit Hilfe eines *sliding windows* in zeitlichen Sets ausgewertet. Ein Set besteht aus jeweils 100 Bildern, die einen Überlapp von 50 Bildern mit dem nächsten Set haben. Der Massenschwerpunkt des Clusters wird für jedes Set (2 Sekunden bei 20 ms Integrationszeit) bestimmt, so dass die Bewegung gleichmäßig verfolgt werden kann. Ein explizites Beispiel ist in Abbildung 4.34 veranschaulicht. Anschließend wird aus den MSD-Daten der Diffusionskoeffizient ermittelt.

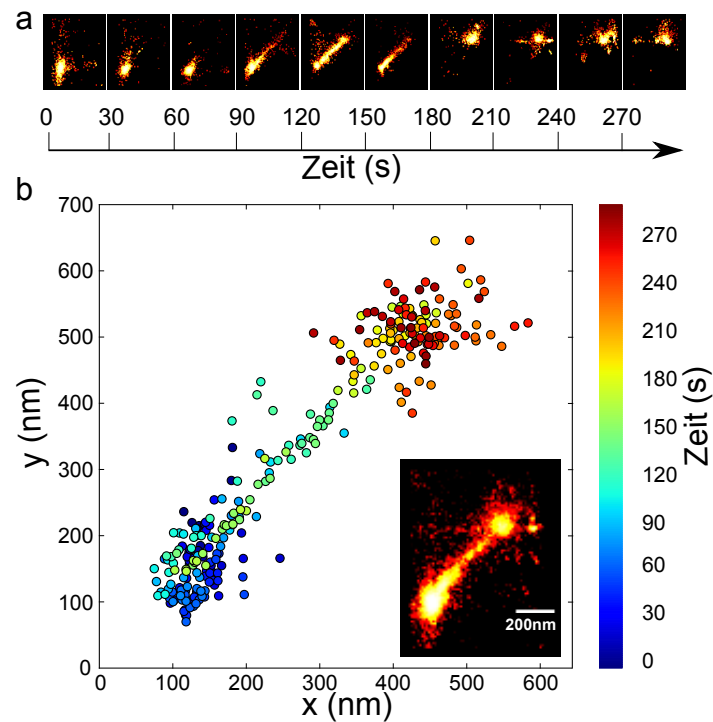


Abbildung 4.34: Die Bewegung der Clusterschwerpunkte kann über die Zeit verfolgt werden. **a)** Die hochauflösten Bilder (1500 Einzelbilder, 30 sec Intervalle) zeigen jeweils eine andere „Clusterform“ von punktförmig zu Beginn, über gestreckt bis hin zu einem neuen, punktförmigen Cluster (nach 300 Sekunden) an einer anderen Position. **b)** Durch die Bestimmung des Clusterschwerpunktes (Sliding Window, 100 Bilder pro Set, Überlapp von 50 Bildern) kann die Bewegung zeitlich (von blau nach rot zunehmend) in x- und y-Koordinaten aufgeschlüsselt werden. Der Inset zeigt das gesamte hochauflöste Bild (15000 Einzelbilder).

Bereits in den Bildern in (a), die eine Mittelung der jeweiligen Lokalisationen aus einem Zeitraum von 30 Sekunden (1500 Einzelbilder) sind, ist zu sehen, dass der ausgewählte Cluster weder in seiner Form noch in seiner Position konstant

bleibt. Im Gesamtbild (Inset in b) scheint er aus zwei einzelnen Clustern zu bestehen, die nicht optimal getrennt aufgelöst werden können oder ausgeschmiert sind. Die Mittelung über die Massenschwerpunkte der 2-Sekunden-Intervalle zeigt die Bewegung des Clusters in der x- und y-Ebene. Insgesamt wird in x-Richtung eine Strecke von 400 nm und in y-Richtung von 500 nm zurückgelegt. Die Bewegung erscheint auf den ersten Blick linear.

Aus den x-/y-Koordinaten und der zeitlichen Zuordnung des jeweiligen Schwerpunktes kann anschließend die mittlere, quadratische Verschiebung berechnet werden. Für das obige Beispiel zeigt die MSD-Trajektorie in Abbildung 4.35, a, dass die Bewegung des Clusters, anders als zunächst angenommen, nicht linear ist. Die MSD-Kurve besteht aus mehreren Stufen. Es handelt sich um eine sogenannte „Hopping“-Bewegung. Der Cluster bewegt sich demnach eine Zeitlang, verweilt dann an einem Ort, wodurch in der Kurve eine Stufe entsteht (gekennzeichnet durch den waagerechten, schwarzen Balken) und bewegt sich dann nach einiger Zeit wieder.

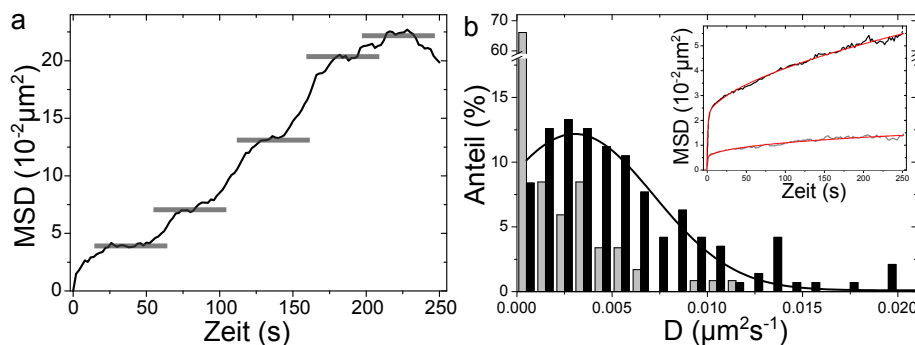


Abbildung 4.35: a) MSD für den in Abbildung 4.34 Cluster bzw. dessen zeitaufgeschlüsselte Massenschwerpunkte. Die Bewegung ist nicht linear sondern zeigt Stufen (gekennzeichnet mit schwarzen Balken). Der Inset in b) zeigt die gemittelten MSD-Trajektorien für fixierte (118 Cluster ausgewertet) und lebende Zellen (134 Datensätze). Die Bewegungen entsprechen einer Kombination aus anormaler und beschränkter Diffusion. Das Histogramm zeigt die zugehörigen Diffusionskoeffizienten. Es gibt einen deutlichen Unterschied zwischen Bewegungen auf lebenden (schwarz) und fixierten (grau) Zellen. Der Diffusionskoeffizient unterscheidet sich um eine Größenordnung.

Weiterhin liefern die MSD-Trajektorien eine mittlere Diffusionskonstante für Clustergrößen im Bereich von 40 bis 250 nm. Es werden die Trajektorien von 134 Einzelclustern, gemessen auf lebenden Zelloberflächen, ausgewertet, histogrammiert (vgl. Abbildung 4.35, b) und mit einem Gauß-Fit angenähert. Als mittlere Diffusionskonstante ergibt sich $(0.0030 \pm 0.0004) \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, wobei der Fehler durch

den Origin-Fit gegeben wird. Der Diffusionskoeffizient für ErbB1 angereicherte Membrandomänen mit Durchmessern im Bereich von 60 - 250 nm, bestimmt mit PCM an lebenden Zellen, beträgt im Mittel $D = (0.0054 \pm 0.0064) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [Rong & Reinhard, 2012]. Dieser Wert stimmt sehr gut mit der Diffusionskonstante der hier untersuchten Cluster überein.

Die gemittelte MSD-Kurve der 134 Einzelcluster (schwarz) setzt sich aus einer anormalen Diffusionsbewegung und auf einer Bewegung, die auf eine gewisse Fläche beschränkt ist, zusammen und wird durch die Funktion $y(x) = K(1 - \exp(-x\tau)) + \Gamma x^\alpha$ beschrieben. K , τ und Γ sind Konstanten und α ist der anormale Diffusions-Exponent. Beim Vergleich mit der gemittelten MSD-Kurve (118 ausgewertete Datensätze) für Zellen, die mit Glutaraldehyd fixiert werden, fällt auf, dass sich die Zuckermoleküle und damit die gesamten Cluster auch auf fixierten Zelloberflächen bewegen, die Bewegung aber deutlich langsamer erfolgt. Die Diffusionskonstante mit $(0.00023 \pm 0.00002) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ist eine Größenordnung langsamer. Dieses Phänomen ist bereits aus der Literatur bekannt. Es ist nicht möglich membranständige Proteine oder Lipide vollständig zu fixieren, lediglich der Anteil bzw. die Geschwindigkeit der Bewegung kann durch die richtige Fixierung reduziert werden [Tanaka *et al.*, 2010]. Fixierungen mit 4 % Formaldehyd unterstreichen diese Vermutung. Die Diffusionskonstante liegt hier in der gleichen Größenordnung wie bei den Lebend-Zell-Experimenten.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass es möglich ist, die Click-Reaktion in Kombination mit einem hochauflösenden Mikroskopie-Verfahren zur Untersuchung von Membranstrukturen einzusetzen. Die metabolisierten Zucker können spezifisch mit dem Fluorophor Alexa647-Alkin über den N_3 -Rest markiert werden. Ihre Verteilung bzw. die Verteilung der Glykoproteine und -lipide, in die sie eingebaut werden, kann bildlich dargestellt werden, sowohl bei fixierten wie auch lebenden Zellen. Ein toxischer Einfluss des Kupfer ist nicht nachweisbar. Die markierten Zuckermoleküle kommen sowohl als einzelne Moleküle wie auch geclustert auf der Zelloberfläche vor. Die Clusterformen variieren von rund über länglich bis hin zu sternförmig, bedingt durch den Verschmelzungsgrad zwischen Transportvesikel und Zellmembran. Ihre Bewegung kann mit Hilfe der mittleren quadratischen Verschiebung aufgeschlüsselt, über ein sogenanntes *sliding window* bildlich verfolgt und die mittlere Diffusionskonstante berechnet werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit werden nicht-invasive, Einzelphotonen-sensitive Spektroskopie-Techniken, die zum einen μs -genaue, zeitliche und zum anderen nm-genaue, räumliche Auflösung garantieren, verwendet. Alle basieren auf dem Einsatz von Fluoreszenzmarkern. Bei Anisotropie-Messungen wird die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz ausgenutzt, während bei FCS- und dSTORM-Messungen ein kommerzieller Fluoreszenz-Farbstoff (Alexa647-NHS, Alexa647-Alkin) an die untersuchten Glykoproteine gekoppelt wird.

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie erlaubt eine sehr genaue Bestimmung von Diffusionskonstanten mit Fehlern von $< 2\%$. Für 149 Messungen verschiedener Galektin-1-Proben über einen Zeitraum von sechs Monaten ergibt die Auswertung des Histogramms 5.1, a, mit einem Gauß-Fit, eine mittlere Diffusionszeit mit der Standardabweichung von (1.451 ± 0.036) ms. Der Standardfehler ist eine weitere Größenordnung kleiner (± 0.003 ms). Diese Genauigkeit ermöglicht es, die hydrodynamischen Eigenschaften der Wachstums-/Adhäsions-regulierenden Galektine zu untersuchen und bietet eine gute Ergänzung zu SANS- und SAXS-Untersuchungen.

Mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie werden systematisch fünf Mitglieder aller strukturellen Galektin-Gruppen (-1, -3, -4, -7 und -8), einschließlich einer verkürzten Form des hGal-3 (hGal-3_{tr}) und einer linkerlosen Variante des hGal-4 (hGal-4_{PT}), vermessen. Der Einfluss der Liganden-Bindung und des Linker-Peptides bei Tandem-Repeat-Typen wird untersucht. Hydrodynamische Strukturänderungen bedingt durch die Liganden-Bindung können lediglich für Proto-Typen (hGal-1) bzw. Proto-Typ-ähnliche Formen (hGal-4_{PT}) beobachtet werden. Die Diffusionskonstanten nehmen zu (siehe Abbildung 5.1, b). Durch die Verringerung des hydrodynamischen Radius rücken die CRDs näher zusammen und das Protein erscheint kompakter. Bedingt durch die Anwesenheit eines Linkers bei den Tandem-Repeat- und Chimera-Typen geht diese Flexibilität der Untereinheiten verloren, die Positionen der CRDs bleiben während der Laktose-Bindung unverändert. Trotz sequenzieller Gemeinsamkeiten ist die strukturelle Reaktion der Proteine auf die Liganden-Bindung unterschiedlich. Für die Proto-Typen liegen die Dissoziationskonstanten im Bereich von 1 - 100 μM , die Assoziationsraten zwischen 1 - $10^3 M^{-1}s^{-1}$ und Dissoziationsraten in

der Größenordnung von 10^{-4}s^{-1} . Unterschiede in den Raten gehen möglicherweise auf unterschiedliche Konformationsdynamiken innerhalb der Proteine zurück. Die Anwesenheit des Linker-Peptids bei den Tandem-Repeat-Typen führt außerdem zu einer anormalen Skalierung der Diffusionskonstanten mit der Masse. Im Vergleich mit dem gleich oder ähnlich schweren hGal-1 ist ihre Bewegung schneller. Sie erscheinen also kompakter, als ihre Massen vermuten lassen.

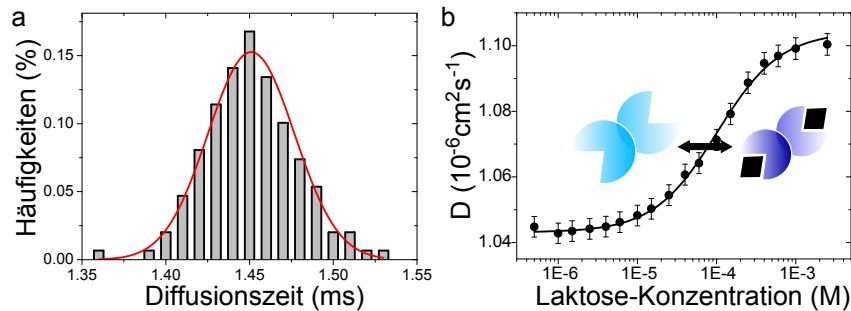


Abbildung 5.1: FCS-Messungen sind derart sensitiv, dass hydrodynamische Änderungen von Proto-Typ-Galektinen über die Zunahme der Diffusionskonstante um $\sim 5\%$ nachweisbar sind. **a)** Histogrammierte Diffusionszeiten von hGal-1. Aus der Anpassung mit einer Gauß-Funktion kann die Diffusionszeit auf (1.451 ± 0.036) ms abgeschätzt werden. Damit ergibt sich ein Fehler von $< 2\%$. **b)** Die Bindungskurven können mit dem Hill-Modell angenähert werden. Dissoziationskonstanten, Assoziations- und Dissoziationsraten der Bindungskinetik werden bestimmt. Proto-Typ-Strukturen werden durch die Laktose-Bindung kompakter.

Um störende Einflüsse des Fluoreszenzmarkers auf die Ergebnisse auszuschließen, werden alle Bindungsstudien mit Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen, die grundlegende Proteineigenschaften ausnutzen und breit anwendbar sind, wiederholt. Als erstes wird das klinisch relevante hGal-1 getestet. Dieses hat in jeder CRD einen Tryptophan-Rest. Dessen intrinsisches Fluoreszenz-Signal kann sehr gut ausgenutzt werden, um Bindungsprozesse zu beobachten, da es relativ sensibel gegenüber der lokalen Umgebung und dem Lösungsmittel ist. Für hGal-1 ändert sich die Anisotropie r bei der Laktosebindung um $\sim 5\%$. Eine detaillierte Analyse der Depolarisation weist auf schnelle Konformationsdynamiken innerhalb der CRDs hin. Die zugrundeliegenden segmentellen Bewegungen des Tryptophan-Rests limitieren die Assoziationsrate. Diese Fall-Studie mit hGal-1 hat gezeigt, dass Fluoreszenz-Anisotropie sehr gut geeignet ist, um strukturelle Änderungen mit Einfluss auf die Rotationsdiffusion, segmentelle Bewegungen und die Fluoreszenzlebensdauer von Proteinen, zu untersuchen. Der Tryptophan-Rest in der Bindungstasche wird hierbei als Reporter verwendet.

Die Kombination von Anisotropie- und FCS-Messungen erlaubt die genaue zeitliche Untersuchung des Oxidationsprozesses von hGal-1 und dem Proto-Typen cG-1B. Ein Vergleich unterstreicht, dass sich strukturell ähnliche Proteine sehr unterschiedlich verhalten können. Das Homodimer hGal-1 zerfällt durch die Oxidation des Cys2-Restes zu einem Monomer und verliert seine Zuckerbindefähigkeit, während cG-1B als deutlich kompakteres Dimer bestehen bleibt und weiterhin Laktose bindet. Bei beiden Proteinen können neben den Monomeren/monomer-ähnlichen Formen mittels FCS auch Aggregate nachgewiesen werden. Trotz unterschiedlicher Auswirkungen des Oxidationsprozesses auf die Proteinstruktur, ist ihre Reaktion auf die Laktose-Bindung aber identisch. Ihre Dissoziationskonstanten, Assoziations- und Dissoziationsraten stimmen überein. Für die Proto-Typen cG-2 und -1A ergeben sich deutlich höhere Bindungsaffinitäten. Die Assoziationsraten sind sechs Größenordnungen besser als von hGal-1/cG-1B, vermutlich bedingt durch eine andere Ausrichtung der Bindungstasche und damit eine bessere Zugänglichkeit für das Laktose-Molekül. Von der strukturellen Seite her betrachtet, fällt cG-2 aus der Gruppe der Proto-Typen heraus. Die hydrodynamische Ausdehnung ist deutlich geringer, es konnte eine monomer-ähnliche Diffusionskonstante bestimmt werden. Bei der Laktose-Bindung vergrößert es seinen hydrodynamischen Radius.

Durch die Markierung von hGal-1 mit dem kommerziellen Fluorophor Alexa647 entsteht ein Photoschalter, der unter bestimmten Bedingungen reversibel zwischen einem fluoreszierenden An- und einem stabilen, nicht-fluoreszierenden Aus-Zustand geschaltet werden kann. Aus den Blink-Kinetiken der Galektin-Moleküle werden mit der *rapidSTORM*-Software hochaufgelöste Bilder der räumlichen Protein-Verteilung rekonstruiert. Mittels morphologischer Clusteranalyse folgt, dass die Dimerstruktur des Proteins eine Quervernetzung von Rezeptoren und die Ausbildung von Clustern ermöglicht. Eine Konzentrationsreihe bestätigt, dass für die Clusterformation Startpunkte bzw. eine minimale Protein-Dichte auf den Zelloberflächen notwendig ist. Die mittlere Clustergröße von ~ 80 nm ist konzentrationsunabhängig. Durch die Zugabe von Laktose kann die Ausbildung von Cluster unterdrückt werden, was die Spezifität der CRDs von hGal-1-Molekülen erneut unterstreicht.

Ein anderes, zweigeteiltes Bild zeigt sich für monomeres hGal-1. Zum einen werden die Zellen quasi gar nicht angefärbt, die Monomere binden deutlich schlechter an die Rezeptoren und können, bedingt durch das Fehlen der zweiten CRD, keine Cluster mehr ausbilden. Andererseits können vollständig angefärbte, kugelige Zellen, mit Clustern, Einzellokalisierung und völlig ungefärbten Bereichen, gefunden werden. Die Monomere haben demnach einen anderen Einfluss auf die Zellen und induzieren womöglich den Zelltod, der durch einen, bisher fehlen-

den, Toxizitätstest nachweisbar wäre. Eine Zusammenfassung der *d*STORM-Messungen mit monomerem und dimerem hGal-1 beinhaltet Abbildung 5.2.

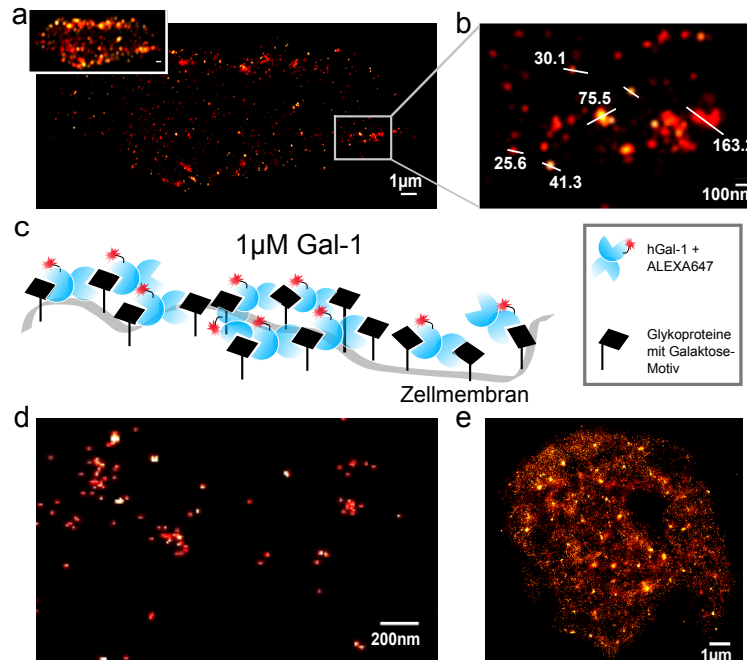


Abbildung 5.2: a) Im Standard-Weitfeldbild (Inset) ist bereits zu erkennen, dass die Zelloberfläche nicht flächig durch hGal-1 angefärbt wird. Das hochaufgelöste Bild und die Vergrößerung (Viereck) in (b) zeigen Proteincluster mit Durchmesser im Bereich von 25 - 160 nm. c) enthält eine modelhafte Darstellung der Vernetzung von Zelloberflächen durch dimeres hGal-1. d) Monomeres hGal-1 besitzt nicht die Fähigkeit Glykane zu vernetzen. Im hochaufgelösten Bild können keine Cluster mehr beobachtet werden. e) „Spezialfall“ der Monomere: flächig markierte Zellen, die sich von der Glasoberfläche der Probenkammern abkugeln. Eventuell induzieren Monomere den Zelltot.

Zur allgemeineren Analyse von Membranstrukturen bzw. -zusammensetzungen eignet sich sehr gut die *d*STORM-Technik in Kombination mit der Click-Chemie als Markierungswerkzeug. Über die Click-Reaktion werden sehr schnell und effizient N_3 -Reste metabolisierter $Ac_4GlcNAz$ -Zucker mit dem Farbstoff Alexa647-Alkin markiert (Abbildung 5.3, a). Kontrolllexperimente mit freiem Farbstoff und anderen, schlechter einbaubaren bzw. markierbaren Zuckern unterstreichen die Spezifität der Markierung. Die über die Zucker visualisierten Glykoproteine und -lipide sind sowohl in Clustern, mit einem mittleren Durchmesser von 102 ± 8 nm, als auch einzeln auf der Membran lokalisierbar. Die Clusterformen variieren von rund über länglich, ausgeschmiert bis hin zu sternförmig (b). Die höchste

Lokalisationsdichte liegt im Clusterzentrum vor und stimmt mit der höchsten Intensität im hochaufgelösten Bild überein. Die Cluster könnten dabei eine Verschmelzung von Vesikeln, die mit den markierten Glykoproteinen/-lipiden gefüllt sind, mit der Zellmembran darstellen. Je nach Stadium der Verschmelzung ergeben sich unterschiedliche Clusterformen. Zu Beginn sind sie rund, laufen diffusionsbedingt aber nach einiger Zeit auseinander, da die Proteine und Lipide abtransportiert werden, wodurch sternförmige Cluster bzw. ausgeschmiert erscheinende Formen entstehen. Durch die Zerstörung des Cytoskeletts mit Cyclodextrin verschwinden die Cluster vollständig. Das Cyclodextrin zerstört das Aktinskelett der Zelle, so dass kein Transport von neuen Vesikeln an die Zellmembran erfolgen kann. Die alten, zum Zeitpunkt der Cyclodextrin-Zugabe bereits vorhandenen Cluster, lösen sich diffusionsbedingt auf und die Proteine und Lipide verteilen sich über die Zellmembran, was die gleichmäßige Färbung und Spottedurchmesser von etwa 20 nm erklärt (Abbildung 5.3, c).

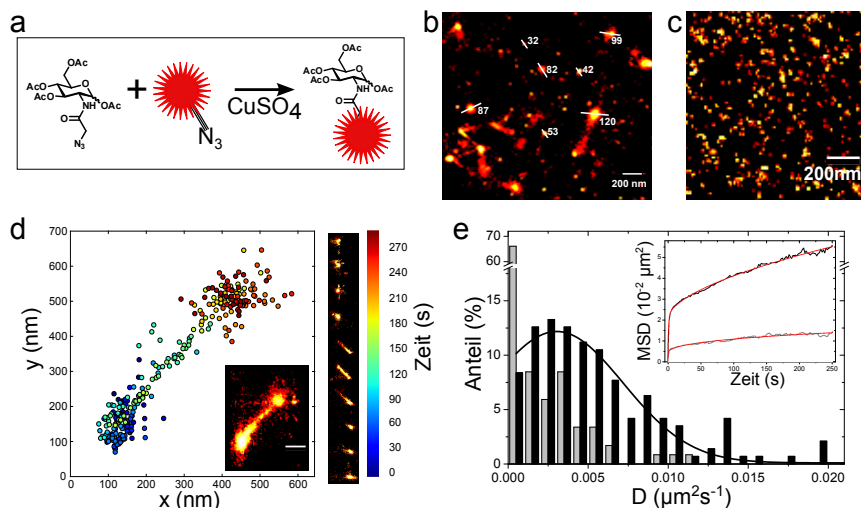


Abbildung 5.3: a) Click-Reaktion: an den Zucker wird über einen N_3 -Rest der Farbstoff Alexa647-Alkin gebunden. b) Die metabolisierten Zucker kommen sowohl einzeln wie auch in runden, sternförmigen oder ausgeschmiert erscheinenden Clustern vor. c) Durch Zugabe von Cyclodextrin wird das Aktinskelett der Zelle aufgelöst. Es können keine Cluster mehr nachgebildet werden und durch die diffusionsbedingte Verteilung der Moleküle aus den bereits vorhandenen Clustern, erscheint die Zelle flächig markiert. d) Die Bewegung der Clusterschwerpunkte wird mit Hilfe eines *sliding windows* verfolgt und e) aus der mittleren quadratischen Verschiebung der Schwerpunkte können Diffusionskoeffizienten für lebende und fixierte Zellen bestimmt werden. Die Gesamtbewegung (Inset) setzt sich dabei aus einer anormalen und einer eingeschränkten Diffusionsbewegung zusammen.

Zellstudien mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen bestätigen, dass die Experimente sowohl an lebenden wie auch fixierten Zellen durchführbar sind. Die Zugabe von Kupfer ohne den Liganden TBTA hat keinen toxischen Einfluss auf die Zellen. Anhand dieser Lebend-Zell-Experimente kann die Bewegung der geclusterten Glykoproteine und -lipide verfolgt werden (Abbildung 5.3, d). Aus den Rohdaten der Blink-Kinetiken werden Sets aus 100 Einzelbildern, mit einem Überlapp von 50 Bildern zum nächsten Set, gebildet und anschließend aus mittleren quadratischen Verschiebung des jeweiligen Massenschwerpunkts die Diffusionskonstanten bestimmt. Für die beobachteten Cluster im Größenbereich von 40 bis 250 nm ergibt sich eine mittlere Diffusionskonstante von $(0.0030 \pm 0.0004) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (e). Es hat sich gezeigt, dass die Bewegung der Moleküle in der Zellmembran auch durch die Fixierung nicht vollständig unterbunden werden kann. Allerdings ist die Diffusionskonstante der Clusterschwerpunkte bei fixierten Zellen eine ganze Größenordnung langsamer. Die Bewegungen entsprechen immer einer Kombination aus anormaler und beschränkter Diffusion (e, Inset).

Die Charakterisierung der Membranstrukturen ist damit aber noch nicht vollständig abgeschlossen. Es stellt sich die Frage, ob die Clusterformation, insbesondere die Ausbildung der großen, sternförmigen Cluster zeitlich aufgelöst werden kann, sprich von ihrer Entstehung bis zum diffusionsbedingten auseinanderlaufen der Cluster. Dazu werden hier erste Ergebnisse in Abbildung 5.4 gezeigt, bei denen unterschiedliche Metabolisierungs-Zeitpunkte durch die Fixierung quasi eingefroren werden. Die Dauer zwischen Zuckerzugabe und Markierung wird im Bereich von 1,5 bis 73 Stunden variiert. Nach 1,5 Stunden sind in den hochaufgelösten Bildern kaum Lokalisationen zu finden, nimmt mit der Zeit jedoch zu. Im Bereich um 12 Stunden nach der Zuckerzugabe ist das Signal bzw. die Anzahl der sternförmigen Cluster auf der Zellmembran am stärksten ausgeprägt. Fast die gesamten Zelloberflächen ist bedeckt. Das Verhältnis zwischen punkt- und sternförmigen Clustern pendelt sich mit der Zeit auf ein konstantes Niveau ein, dass dem bisherigen Bild für 48 Stunden Inkubationszeit entspricht. Damit ergeben sich eine Vielzahl von Fragen: Wie kann dieses Muster erklärt werden? Folgt der Einbau der Zucker in Glykoproteine und -lipide bzw. ihr Transport an die Zellmembran einer Art dämpften Schwingung und ist vom Zellzyklus abhängig? Handelt es sich um eine Reaktion der Zelle auf das Zuckerangebot, also je mehr Zucker am Anfang da ist, desto mehr wird eingebaut und das Signal nimmt nur ab, weil die Zugabe von $25 \mu\text{M}$ Zucker nicht ausreichend ist, um dauerhaft die gleiche Menge Cluster nachzuproduzieren? Kleinschrittigere Versuche könnten hier eine Erklärung liefern. Interessant ist auch die Tatsache, dass nach Entfernung der Zucker aus dem Kulturmedium, das Signal wieder abnimmt bzw. fast nur noch punktförmige Cluster beobach-

tet werden, wodurch sich weitere Fragen ergeben. War die Zuckerkonzentration doch nicht zu gering bis zum Zeitpunkt von 48 Stunden und der Zuckereinbau pendelt sich auf einem konstanten Niveau ein? Wie lässt sich erklären, dass nach 73 Stunden zwar noch runde, aber keine sternförmigen Cluster mehr beobachtet werden? Stoppt die Zelle nach Entfernung der Zucker die Verschmelzung der Vesikel mit der Membran? Eventuelle Antworten könnten Versuche mit Cyclodextrin geben, oder die Zugabe eines Zellgiftes, das lediglich den Transportprozess stoppt, das Aktinskelett aber intakt bleibt. Auch die regelmäßige Zugabe von neuem Zucker zum Kulturmedium könnte Antworten liefern. Auch eine Quantifizierung der Cluster muss noch erarbeitet werden.

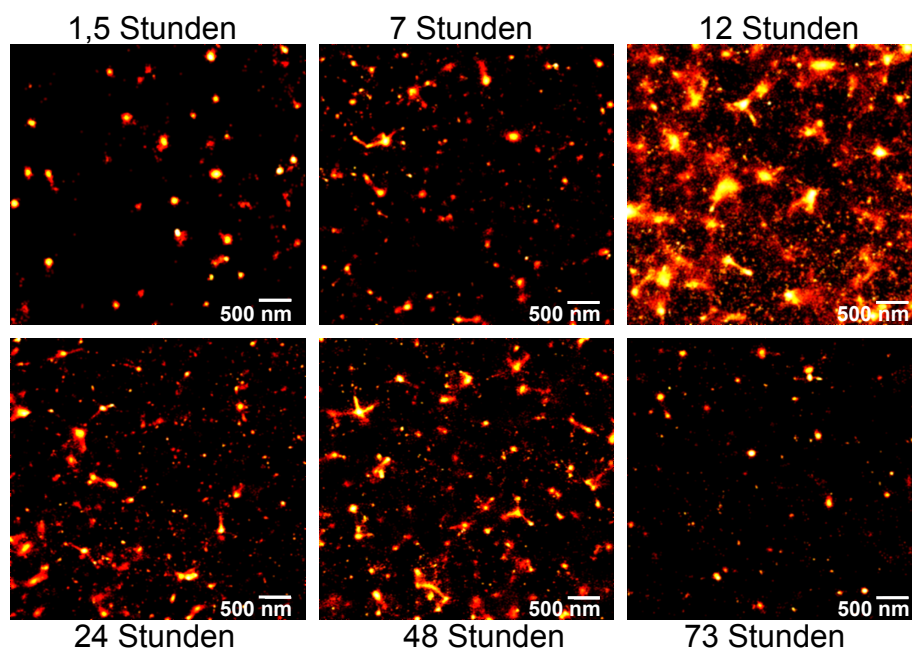


Abbildung 5.4: Je nach Zeitpunkt nach der Zuckerzugabe sind unterschiedlich viele Cluster bzw. unterschiedliche Clusterformen auf der Membranoberfläche zu beobachten. Nach 12 Stunden wird ein Maximum erreicht, das nicht bestehen bleibt. Es wird anschließend ein geringeres, aber über viele Stunden konstantes Niveau gehalten. Wird das Medium gewechselt, also der Zucker entfernt (73 Stunden) werden nur noch punktförmige Cluster beobachtet.

Ein Zusammenhang zwischen den hier beobachteten Clustern und klassischen Lipid Rafts konnte bis jetzt weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Um Informationen über mögliche Parallelen zwischen diesen aufzuzeigen, bieten sich Zwei-Farben-*d*STORM-Messungen an. Die Cholera-Toxin-B Untereinheit bindet den Rezeptor GM₁, der ein klassischer Marker für Lipid Rafts ist [Chinnapen

et al., 2012]. Es wurde bereits gezeigt, dass Cholera-Toxin einen Cholesterol-abhängigen Zusammenschluss von Mikrodomänen des GM₁-Moleküls induziert [Lingwood *et al.*, 2008], [Kaiser *et al.*, 2009]. Die Untereinheit B kann direkt mit einem Fluorophor markiert oder indirekt über einen Antikörper identifiziert [Mikhalyov & Samsonov, 2011] und so Lipid Rafts nachgewiesen werden. Hängen die hier beobachteten Cluster mit Lipid Rafts zusammen oder sind derartige Mikrodomänen, dann müsste dieser Zusammenhang über Co-Lokalisationen in den Zwei-Farben-Experimenten offensichtlich werden.

Auch hGal-1 kann möglicherweise mit der Click-Reaktion weiter untersucht werden. Es könnten Laktose-Moleküle für die Click-Reaktion eingesetzt werden, die anschließend spezifisch mit fluoreszenzmarkiertem hGal-1 angefärbt werden. Mit diesen Experimenten könnte erneut die Quervernetzungsfähigkeit von hGal-1 gezeigt werden und die bereits bestehenden Ergebnisse bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

- Abbe, E. 1873. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, **9**, 411–468.
- Abbott, W. M., & Feizi, T. 1991. Soluble 14-kDa beta-galactoside-specific bovine lectin. Evidence from mutagenesis and proteolysis that almost the complete polypeptide chain is necessary for integrity of the carbohydrate recognition domain. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(9), 5552–5557.
- Almeida, G., Sletten, E. M., Nakamura, H., Palaniappan, K. K., & Bertozzi, C. R. 2012. Thiacycloalkynes for Copper-Free Click Chemistry. *Angewandte Chemie International Edition*, **51**(10), 2443–2447.
- Ando, R., Hama, H., Yamamoto-Hino, M., Mizuno, H., & Miyawaki, A. 2002. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(20), 12651–12656.
- André, S., Kozar, T., Schuberth, R., Unverzagt, C., Kojima, S., & Gabius, H.-J. 2007. Substitutions in the N-Glycan Core as Regulators of Biorecognition: The Case of Core-Fucose and Bisecting GlcNAc Moieties. *Biochemistry*, **46**(23), 6984–6995.
- Attle, A. 1995. Analysis of Receptor-Ligand Interactions. *PNAS*, **2**, 119–124.
- Axelrod, D. 2001. Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy in Cell Biology. *Traffic*, **2**, 764–774.
- Barondes, S. H., Castronovo, V., Cooper, D. N., Cummings, R. D., Drickamer, K., Feizi, T., Gitt, M. A., Hirabayashi, J., Hughes, C., & Kasai, K. 1994a. Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, **76**, 597–598.
- Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A., & Leffler, H. 1994b. Galectins: Structure and function of a large family of animal lectins. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(33), 20807–20810.

- Baskin, J. M., & Bertozzi, C. R. 2007. Bioorthogonal Click Chemistry: Covalent Labeling in Living Systems. *QSAR & Combinatorial Science*, **26**(11-12), 1211–1219.
- Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., & Bertozzi, C. R. 2007. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *PNAS*, **104**, 16793–16797.
- Büchner, C. 2011. *Untersuchung von Galektinen mit Methoden der Fluoreszenzspektroskopie*. M.Phil. thesis, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Beatty, K. E., Xie, F., Wang, Q., & Tirrell, D. A. 2005. Selective Dye-Labeling of Newly Synthesized Proteins in Bacterial Cells. *Journal of the American Chemical Society*, **127**(41), 14150–14151.
- Beatty, K. E., Liu, J. C., Xie, F., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., Wang, Q., & Tirrell, D. A. 2006. Fluorescence Visualization of Newly Synthesized Proteins in Mammalian Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, **45**(44), 7364–7367.
- Benesch, R. E., & Benesch, R. 1953. Enzymatic removal of oxygen for polarography and related methods. *Science*, **118**, 447–448.
- Bertozzi, C. R., & Kiessling, L. L. 2001. Chemical Glycobiology. *Science*, **291**(5512), 2357–2364.
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacio, J. S., Davidson, M. W., Lippincott-Schwartz, J., & Hess, H. F. 2006. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, **313**, 1642–1645.
- Bligh, P. H. 1988. Ligand Binding - A Primer. *Biochemical Education*, **16**(4), 186–195.
- Callis, P. R. 1997. 1La and 1Lb transitions of tryptophan: applications of theory and experimental observations to fluorescence of proteins. *Methods Enzymol*, **278**, 113–150.
- Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., & Kiss, R. 2006. Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, **16**(11), 137–157.
- Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., Lo, A., & Bertozzi, C. R. 2010. Copper-free click chemistry in living animals. *PNAS*, **107**(5), 1821–1826.

- Chen, Y., & Barkley, M. D. 1998. Toward Understanding Tryptophan Fluorescence in Proteins. *Biochemistry*, **37**, 9976–9982.
- Chinnapen, D. J., Hsieh, W. T., Te Welscher, Y. M., Saslowsky, D. E., Kaoutzani, L., Brandsma, E., D’Auria, L., Park, H., Wagner, J. S., Drake, K. R., Kang, M., Benjamin, T., Ullman, M. D., Costello, C. E., Kenworthy, A. K., Baumgart, T., Massol, R. H., & Lencer, W. I. 2012. Lipid Sorting by Ceramide Structure from Plasma Membrane to ER for the Cholera Toxin Receptor Ganglioside GM1. *Developmental Cell*, **23**(3), 573 – 586.
- Cho, M., & Cummings, R. D. 1995. Galectin-1, a b-Galactoside-binding Lectin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry*, **270**(10), 5198–5206.
- Claxton, N., Fellers, T., & Davidson, M. 2005. Laser Scanning Confocal Microscopy. *Zeiss Introductions*.
- Clerch, L. B., Whitney, P., Hass, M., Brew, K., Miller, T., Werner, R., & Massaro, D. 1988. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*, **27**, 692–699.
- Collins, P. M., Hidari, K. I. P. J., & Blanchard, H. 2007. Slow diffusion of lactose out of galectin-3 crystals monitored by X-ray crystallography: possible implications for ligand-exchange protocols. *Acta Crystallographica Section D*, **63**(3), 415–419.
- Condon, E. U. 1928. Nuclear Motions Associated with Electron Transitions in Diatomic Molecules. *Phys. Rev.*, **32**, 858–872.
- Cooper, D. N. W., & Barondes, S. H. 1999. God must love galectins; He made so many of them. *Glycobiology*, **9**(10), 979–984.
- Dam, T. K., Gabius, H.-J., André, S., Kaltner, H., Lensch, M., & Brewer, C. F. 2005. Galectins Bind to the Multivalent Glycoprotein Asialofetuin with Enhanced Affinities and a Gradient of Decreasing Binding Constants. *Biochemistry*, **44**(37), 12564–12571.
- Demtröder, W. 2009. *Experimentalphysik 2 - Elektrizität und Optik*. Vol. Fünfte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer-Lehrbuch.
- Dertinger, T., Pacheco, V., von der Hocht, I., Hartmann, R., Gregor, I., & Enderlein, J. 2007. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New

- Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem*, **8**(3), 433–443.
- Dettmann, W., Grandbois, M., Andre, S., Benoit, M., Wehle, A. K., Kaltner, H., Gabius, H.-J., & Gaub, H. E. 2000. Differences in Zero-Force and Force-Driven Kinetics of Ligand Dissociation from b-Galactoside-Specific Proteins (Plant and Animal Lectins, Immunoglobulin G) Monitored by Plasmon Resonance and Dynamic Single Molecule Force Microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **383**(2), 157–170.
- Diehl, C., Genheden, S., Modig, K., Ryde, U., & Akke, M. 2009. Conformational entropy changes upon lactose binding to the carbohydrate recognition domain of galectin-3. *Journal of Biomolecular NMR*, **45**, 157–169.
- Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V. N., Hein, B., von Middendorff, C., Schonle, A., & Hell, S. W. 2009. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature*, **457**(7233), 1159–1162.
- Einstein, A. 1905. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik*, **322**, 549–560.
- Elson, E. L., & Magde, D. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*, **13**, 1–27.
- Englander, S. W., Calhoun, D. B., & Englander, J. J. 1987. Biochemistry without oxygen. *Anal. Biochemistry*, **161**, 300–306.
- Eremin, S. A., & Smith, D. S. 2003. Fluorescence polarization immunoassays for pesticides. *Comb Chem High Throughput Screen*, **6**, 257–266.
- Fa, M., Karolin, J., Aleshkov, S., Strandberg, L., Johansson, L.B., & Ny, T. 1995. Time-resolved polarized fluorescence spectroscopy studies of plasminogen activator inhibitor type 1: conformational changes of the reactive center upon interactions with target proteases, vitronectin and heparin. *Biochemistry*, **34**, 13833–13840.
- Förster, T. 1948. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, **437**, 55–75.
- Förster, T. 1982. *Fluoreszenz organischer Verbindungen*. Vandenhoeck & Ruprecht.

- Gabius, H.-J. 2009. *The sugar code*. Wiley-VCH.
- Gabius, H. J., André, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., & Solís, D. 2011. From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code. *Trends in Biochemical Sciences*, **36**, 298–313.
- Gaetke, L. M., & Chow, C. K. 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, **189**(1-2), 147–163.
- Göhler, A., André, S., Kaltner, H., Sauer, M., Gabius, H.-J., & Doose, S. 2010. Hydrodynamic Properties of Human Adhesion/Growth-Regulatory Galectins Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal*, **98**(12), 3044–3053.
- Göhler, A., Büchner, C., André, S., Doose, S., Kaltner, H., & Gabius, H.-J. 2011. Sensing ligand binding to a clinically relevant lectin by tryptophan fluorescence anisotropy. *Analyst*, **136**, 5270–5276.
- Göhler, A., Büchner, C., André, S., Doose, S., Kaltner, H., & Gabius, H.-J. 2012. Analysis of homodimeric avian and human galectins by two methods based on fluorescence spectroscopy: Different structural alterations upon oxidation and ligand binding. *Biochimie*, in press.
- Gustafsson, M. G. L. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, **198**(2), 82–87.
- Gutfreund, H. 1995. *Kinetics for the Life Sciences: Receptors, Transmitters and Catalysts*. Cambridge University Press.
- He, L., André, L., Siebert, H.-C., Helmholz, H., Niemeyer, B., & Gabius, H.-J. 2003. Detection of Ligand- and Solvent-Induced Shape Alterations of Cell-Growth-Regulatory Human Lectin Galectin-1 in Solution by Small Angle Neutron and X-Ray Scattering. *Biophysical Journal*, **85**(1), 511–524.
- He, L., André, S., Garamus, V. M., Siebert, H. C., Chi, C., Niemeyer, B., & Gabius, H.-J. 2009. Small angle neutron scattering as sensitive tool to detect ligand-dependent shape changes in a plant lectin with b-trefoil folding and their dependence on the nature of the solvent. *Glycoconjugate Journal*, **26**, 111–116.
- Healthcare, GE. 2011. *Produktinformation PD-25-Mini-Trap-Säulen*.

- Heilemann, M., Herten, D. P., Heintzmann, R., Cremer, C., Müller, C., Tinnefeld, P., Weston, K. D., Wolfrum, J., & Sauer, M. 2002. High-resolution colocalization of single dye molecules by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Anal Chem*, **74**, 3511–3517.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttelpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., & Sauer, M. 2008. Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition*, **47**(33), 6172–6176.
- Heilemann, M., Dedeker, P., Hofkens, J., & Sauer, M. 2009a. Photoswitches: Key molecules for subdiffraction-resolution fluorescence imaging and molecular quantification. *Laser and Photonics Rev.*, **3**, 182–202.
- Heilemann, M., van de Linde, S., Mukherjee, A., & Sauer, M. 2009b. Super-Resolution Imaging with Small Organic Fluorophores. *Angewandte Chemie International Edition*, **48**(37), 6903–6908.
- Hell, S. W. 2007. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science*, **316**, 1153–1158.
- Hess, S. 2002. Biological and Chemical Applications of Fluorescence Correlation Spectroscopy: A review. *Biochemistry*, **41**, 697–705.
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., & Mason, M. D. 2006. Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy. *Biophysical Journal*, **91**(11), 4258 – 4272.
- Hill, A. V. 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol*, **40**, 4–7.
- Hinterdorfer, P., & van Oijen, A. 2009. *Handbook of Single-Molecule Biophysics*. Springer.
- Hirabayashi, J., & Kasai, K. 1991. Effect of amino acid substitution by sited-directed mutagenesis on the carbohydrate recognition and stability of human 14-kDa beta-galactoside-binding lectin. *Journal of Biological Chemistry*, **266**(35), 23648–23653.
- Homann, A., Qamar, R., Serim, S., Dersch, P., & Seibel, J. 2010. Bioorthogonal metabolic glycoengineering of human larynx carcinoma (HEp-2) cells targeting sialic acid. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **6**, 24.

- Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M., & Finn, M. G. 2010. Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Click Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, **21**(10), 1912–1916.
- Horie, H., Kadoya, T., Sango, K., & Hasegawa, M. 2005. Oxidized Galectin-1 is an Essential Factor for Peripheral Nerve Regeneration. *Current Drug Targets*, **6**, 375–383.
- Hughes, R. C. 2001. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*, **83**, 667–676.
- Iglesias, M. M., Rabinovich, G. A., Ivanovic, V., Sotomayor, C., & Wolfenstein-Todel, C. 1998. Galectin-1 from ovine placenta. *European Journal of Biochemistry*, **252**(3), 400–407.
- Inagaki, Y., Sohma, Y., Horie, H., Nozawa, R., & Kadoya, T. 2000. Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *European Journal of Biochemistry*, **267**(10), 2955–2964.
- Invitrogen. 2006 (9). *Alexa Fluor 647 Microscale Protein Labeling Kit (A30009)*.
- Itano, M. S., Steinhauer, C., Schmied, J. J., Forthmann, C., Liu, P., Neumann, A. K., Thompson, N. L., Tinnefeld, P., & Jacobson, K. 2012. Super-Resolution Imaging of C-Type Lectin and Influenza Hemagglutinin Nanodomains on Plasma Membranes Using Blink Microscopy. *Biophysical Journal*, **102**(7), 1534–1542.
- Jacobson, K., Mouritsen, O. G., & Anderson, R. G. W. 2007. Lipid rafts: at a crossroad between cell biology and physics. *Nature Cell Biology*, **9**(1), 7–14.
- Jameson, D. M., & Ross, J. A. 2010. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chemical Reviews*, **110**(5), 2685–2708.
- Jolley, M. E., Nasir, M. S., Surujballi, O. P., Romanowska, A., Renteria, T. B., De la Mora, A., Lim, A., Bolin, S. R., Michel, A. L., Kostovic, M., & Corrigan, E. C. 2007. Fluorescence polarization assay for the detection of antibodies to *Mycobacterium bovis* in bovine sera. *Veterinary Microbiology*, **120**(1-2), 113–121.
- Jue, T. 2009. *Fundamental Concepts in Biophysics*. Totowa, NJ: Humana Press.

- Kaiser, H.-J., Lingwood, D., Levental, I., Sampaio, J. L., Kalvodova, L., Rajendran, L., & Simons, K. 2009. Order of lipid phases in model and plasma membranes. *PNAS*, **106**(39), 16645–16650.
- Takehi, K., Oda, Y., & Kinoshita, M. 2001. Fluorescence Polarization: Analysis of Carbohydrate-Protein Interaction. *Analytical Biochemistry*, **297**(2), 111–116.
- Kaltner, H., Solís, D., Kopitz, J., Lensch, M., Lohr, M., Manning, J. C., Mürnseer, M., Schnölzer, M., André, S., Sáiz, J. L., & Gabius, H.-J. 2008. Prototype chicken galectins revisited: characterization of a third protein with distinctive hydrodynamic behaviour and expression pattern in organs of adult animals. *Biochem J*, **409**(2), 591–599.
- Kübler, D., Hung, C.-W., Dam, T. K., Kopitz, J., André, S., Kaltner, H., Lohr, M., Manning, J. C., He, L., Wang, H., Middelberg, A., Brewer, C. F., Reed, J., Lehmann, W.-D., & Gabius, H.-J. 2008. Phosphorylated human galectin-3: Facile large-scale preparation of active lectin and detection of structural changes by CD spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1780**(4), 716–722.
- Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. 2001. Click-Chemie: diverse chemische Funktionalität mit einer Handvoll guter Reaktionen. *Angewandte Chemie*, **113**(11), 2056–2075.
- Kopitz, J., von Reitzenstein, C., André, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M., & Gabius, H.-J. 2001. Negative Regulation of Neuroblastoma Cell Growth by Carbohydrate-dependent Surface Binding of Galectin-1 and Functional Divergence from Galectin-3. *Journal of Biological Chemistry*, **276**(38), 35917–35923.
- Koppel, D. 1974. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A*, **10**, 1938–1945.
- Koshland, D. E. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *PNAS*, **44**, 98–104.
- Krejčíříková, V., Páchl, P., Fábry, M., Malý, P., Řezáčová, P., & Brynda, J. 2011. Structure of the mouse galectin-4 N-terminal carbohydrate-recognition domain reveals the mechanism of oligosaccharide recognition. *Acta Crystallographica Section D*, **67**(3), 204–211.

- Krichevsky, O., & Bonnet, G. 2002. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, **65**, 251–297.
- Lakowicz, J. R. 2006. *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer.
- Lakowicz, J. R., Maliwal, B. P., Cherek, H., & Balter, A. 1983. Rotational freedom of tryptophan residues in proteins and peptides. *Biochemistry*, **22**, 1741–1752.
- Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y., & Poirier, F. 2002. Introduction to galectins. *Glycoconjugate Journal*, **19**, 433–440.
- Levi, G., & Teichberg, V. I. 1981. Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *The Journal of Biological Chemistry*, **256**(11), 5735–5740.
- Lingwood, D., Ries, J., Schwille, P., & Simons, K. 2008. Plasma membranes are poised for activation of raft phase coalescence at physiological temperature. *PNAS*, **105**(29), 10005–10010.
- López-Lucendo, M. F., Solís, D., André, S., Hirabayashi, J., Kasai, K., Kaltner, H., Gabius, H.-J., & Romero, A. 2004. Growth-regulatory Human Galectin-1: Crystallographic ... *Journal of Molecular Biology*, **343**(4), 957 – 970.
- López-Lucendo, M. F., Solís, D., Sáiz, J. L., Kaltner, H., Russwurm, R., André, S., Gabius, H.-J., & Romero, A. 2009. Homodimeric Chicken Galectin CG-1B (C-14): Crystal Structure and Detection of Unique Redox-Dependent Shape Changes Involving Inter- and Intrasubunit Disulfide Bridges by Gel Filtration, Ultracentrifugation, Site-Directed Mutagenesis, and Peptide Mass Fingerprinting. *Journal of Molecular Biology*, **386**(2), 366 – 378.
- Magde, D. 1978. Fluorescence correlation spectroscopy ii, an experimental realization. *Biopolymers*, **17**, 361–376.
- Malkusch, S. 2011. *Makro zur Clusteranalyse*. MathLab-Makro-Routine.
- Malus, E.-L. 1809. -. *Nouv. Bull. Soc. Philomatique*, **1**, 266.
- Meldal, M., & Tornøe, C. W. 2008. Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chemical reviews*, **108**(8), 2952–3015.
- Meschede, D. 2009. *Gehrtsen Physik*. Vol. 5.Auflage. Springer-Verlag.

- Meyer-Kuckuk. 1997. *Atomphysik*. 5., durchgesehene und erweiterte Auflage. Teubner Studienbücher.
- Mikhalyov, I., & Samsonov, A. 2011. Lipid raft detecting in membranes of live erythrocytes. *BBA - Biomembranes*, **1808**(7), 1930–1939.
- Minsky, Marvin. 1961. *Patent for confocal microscope*. US patent.
- Miram, W., & Scharf, K.-H. 1997. *Biologie heute S II - Ein Lehr- und Arbeitsbuch*. Schroedel.
- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. 1965. On nature of allosteric transitions - a plausible model. *J. Mol. Biol.*, **12**, 88–118.
- Morris, S., Ahmad, N., André, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., Brenowitz, M., & Brewer, F. 2004. Quaternary solution structures of galectins-1, -3, and -7. *Glycobiology*, **14**(3), 293–300.
- Mulder, G. J. 1839. Ueber die Zusammensetzung einiger thierischen Substanzen. *Journal für Praktische Chemie*, **16**(1), 129–152.
- Munro, S. 2003. Lipid Rafts: Elusive or Illusive? *Cell*, **115**(4), 377 – 388.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., & Rodwell, V. W. 2003. *Harpers Illustrated Biochemistry, Twenty-Sixth Edition*. 26 edn. Lange Medical Books/McGraw-Hill, Medical Publishing Division.
- Nesmelova, I. V., Ermakova, E., Daragan, V. A., Pang, M., Menéndez, M., Lagartera, L., Solís, D., Baum, L. G., & Mayo, K. H. 2010. Lactose Binding to Galectin-1 Modulates Structural Dynamics, Increases Conformational Entropy, and Occurs with Apparent Negative Cooperativity. *Journal of Molecular Biology*, **397**(5), 1209–1230.
- Neuweiler, H. 2007. Dynamics of Unfolded Polypeptide Chains in Crowded Environment Studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *JMB*, **356**, 856–869.
- Nishi, N., Abe, A., Iwaki, J., Yoshida, H., Itoh, A., Shoji, H., Kamitori, S., Hirabayashi, J., & Nakamura, T. 2008. Functional and structural bases of a cysteine-less mutant as a long-lasting substitute for galectin-1. *Glycobiology*, **18**(12), 1065–1073.
- Northrup, S. H., & Erickson, H. P. 1992. Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *PNAS*, **89**, 3338–3342.

- Owen, D. M., Magenau, A., Williamson, D., & Gaus, K. 2012. The lipid raft hypothesis revisited - New insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *BioEssays*, 1–9.
- Pawley, J. B. 2006. *Handbook of biological confocal microscopy*. New York, NY: Springer.
- Pike, L. J. 2003. Lipid rafts. *Journal of Lipid Research*, **44**(4), 655–667.
- Pike, L. J. 2006. Rafts defined: a report on the Keystone symposium on lipid rafts and cell function. *Journal of Lipid Research*, **47**(7), 1597–1598.
- Pingoud, A. 2003. *Biochemical Methods*. Vol. 1. Neuauflage. Wiley-VCH.
- Rabinovich, G. A., Rubinstein, N., & Fainboim, L. 2002. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**(5), 741–752.
- Rami, B. R., Krishnamoorthy, G., & Udgaonkar, J. B. 2003. Dynamics of the Core Tryptophan during the Formation of a Productive Molten Globule Intermediate of Barstar. *Biochemistry*, **42**, 7986–8000.
- Rayleigh. 1896. On the theory of optical images, with special reference to the microscope. *Philosophical Magazine Series*, **42**, 167–195.
- Rigler, R., Mets, U., Widengren, J., & Kask, P. 1993. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*, **22**, 169–175.
- Rong, G., & Reinhard, B. M. 2012. Monitoring the Size and Lateral Dynamics of ErbB1 Enriched Membrane Domains through Live Cell Plasmon Coupling Microscopy. *PLoS ONE*, **7**(3), e34175.
- Ronsein, G. E., Oliveira, M. C. B., Miyamoto, S., Medeiros, M. H. G., & Di Mascio, P. 2008. Tryptophan Oxidation by Singlet Molecular Oxygen]: Mechanistic Studies Using ¹⁸O-Labeled Hydroperoxides, Mass Spectrometry, and Light Emission Measurements. *Chemical Research in Toxicology*, **21**(6), 1271–1283.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. 2002. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective Ligation of Azides and Terminal Alkynes. *Angewandte Chemie International Edition*, **41**(14), 2596–2599.

- Rottner, K., & Stradal, T. E. B. 2011. Actin dynamics and turnover in cell motility. *Current Opinion in Cell Biology*, **23**(5), 569–578.
- Rudd, P. M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I. A., & Dwek, R. A. 2001. Glycosylation and the Immune System. *Science*, **291**(5512), 2370–2376.
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, **3**, 793–796.
- Sakakura, Y., Hirabayashi, J., Oda, Y., Ohyama, Y., & Kasai, K. 1990. Structure of chicken 16-kDa beta-galactoside-binding lectin. *Journal of Biological Chemistry*, **265**(35), 21573–21579.
- Salatino, M., Croci, D. O., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Toscano, M. A., & Rabinovich, G. A. 2008. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, **8**(1), 45–57.
- Sauer, M. 2005. Reversible molecular photoswitches: A key technology for nanoscience and fluorescence imaging. *PNAS*, **102**(27), 9433–9434.
- Sauer, M., Hofkens, J., & Enderlein, J. 2011. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. Wiley-VCH.
- Sawa, M., Hsu, T., Itoh, T., Sugiyama, M., Hanson, S. R., Vogt, P. K., & Wong, C. 2006. Glycoproteomic probes for fluorescent imaging of fucosylated glycans in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(33), 12371–12376.
- Schwarz, F. P., Ahmed, H., Bianchet, M. A., Amzel, L. M., & Vasta, G. R. 1998. Thermodynamics of Bovine Spleen Galectin-1 Binding to Disaccharides: Correlation with Structure and Its Effect on Oligomerization at the Denaturation Temperature. *Biochemistry*, **37**(17), 5867–5877.
- Schweizer, Jakob C. 2007 (1). *Practical Course: Single-Particle-Tracking*. Biophysics - Schwille Lab.
- Schwille, Haustein. 2004. *Fluorescence Correlation Spectroscopy - An introduction to its Concepts and Applications*. Online Biophysics Textbook,.
- Scott, S. A., Bugarcic, A., & Blanchard, H. 2009. Characterisation of oxidized recombinant human galectin-1. *Protein & Peptide Letters*, **16**, 1249–1255.

- Sharon, L., & Lis, H. 2004a. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14**, 53–62.
- Sharon, N. 2008. Lectins: Past, present and future. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 1457–1460.
- Sharon, N., & Lis, H. 2004b. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **14**(11), 53R–62R.
- Sheely, M. L. 1932. Viscosity. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 1060–1064.
- Simons, K., & Van Meer, G. 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry*, **27**(17), 6197–6202.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720–731.
- Soriano del Amo, D., Wang, W., Jiang, H., Besanceney, C., Yan, A. C., Levy, M., Liu, Y., Marlow, F. L., & Wu, P. 2010. Biocompatible Copper(I) Catalysts for in Vivo Imaging of Glycans. *Journal of the American Chemical Society*, **132**(47), 16893–16899.
- Sperandio, M., Gleissner, C. A., & Ley, K. 2009. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological Reviews*, **230**(1), 97–113.
- Stein, P. J., & Heehn, K. C. 1980. Fluorescence polarization studies of saccharide binding to Wheat germ agglutinin and lysozyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **95**(2), 547–552.
- Stowell, S. R., Cho, M., Feasley, C. L., Arthur, C. M., Song, X., Colucci, J. K., Karmakar, S., Mehta, P., Dias-Baruffi, M., McEver, R. P., & Cummings, R. D. 2009. Ligand reduces galectin-1 sensitivity to oxidative inactivation by enhancing dimer formation. *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 4989–4999.
- Sujatha, M. S., Sasidhar, Y. U., & Balaji, P. V. 2004. Energetics of galactose- and glucose-aromatic amino acid interactions: Implications for binding in galactose-specific proteins. *Protein Science*, **13**(9), 2502–2514.
- Surolia, A., Swaminathan, C. P., Ramkumar, R., & Podder, S. K. 1997. Unusual structural stability and ligand induced alterations in oligomerization of a galectin. *FEBS Letters*, **409**(3), 417–420.
- Tan, S., Tan, H. T., & Chung, M. C. M. 2008. Membrane proteins and membrane proteomics. *PROTEOMICS*, **8**(19), 3924–3932.

- Tanaka, K. A., Suzuki, K. G., Shirai, Y. M., Shibutani, S. T., Miyahara, M. S., Tsuboi, H., Yahara, M., Yoshimura, A., Mayor, S., Fujiwara, T. K., & Kusumi, A. 2010. Membrane molecules mobile even after chemical fixation. *Nature Methods*, **7**(11), 856–860.
- Tejedor, V., Bénichou, O., Voituriez, R., Jungmann, R., Simmel, F., Selhuber-Unkel, C., Oddershede, L. B., & Metzler, R. 2010. Quantitative Analysis of Single Particle Trajectories: Mean Maximal Excursion Method. *Biophysical Journal*, **98**(7), 1364–1372.
- Thompson, R. E., Larson, D. R., & Webb, W. W. 2002. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophysical journal*, **82**(5), 2775–2783.
- Tipler, P. A., & Mosca, G. 1994. *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure*. 3. auflage edn. Spektrum, Akad. Verl.
- Tokunaga, M., Imamoto, N., & Sakata-Sogawa, K. 2008. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods*, **5**, 159–161.
- Toomre, D., & Bewersdorf, J. 2010. A New Wave of Cellular Imaging. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **26**(1), 285–314.
- Umemoto, K., Leffler, H., Venot, A., Valafar, H., & Prestegard, J. H. 2003. Conformational Differences in Liganded and Unliganded States of Galectin-3. *Biochemistry*, **42**(13), 3688–3695.
- Valeur, B., & Weber, G. 1977. Resolution of the Fluorescence Excitation Spectrum of Indol into the 1La and 1Lb Excitation Bands. *Photochemistry and Photobiology*, **25**(5), 441–444.
- van de Linde, S., Wolter, S., Heilemann, S., & Sauer, M. 2010. The effect of photoswitching kinetics and labeling densities on super-resolution fluorescence imaging. *Journal of Biotechnology*, **149**(4), 260 – 266. <ce:title>BioImaging - Contributions from Biology, Physics and Informatics</ce:title>.
- van de Linde, S., Löschberger, A., Klein, T., Heidbreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., & Sauer, M. 2011a. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat. Protocols*, **6**(7), 991–1009.
- van de Linde, S., Krstic, I., Prisner, T., Doose, S., Heilemann, M., & Sauer, M. 2011b. Photoinduced formation of reversible dye radicals and their impact

- on super-resolution imaging. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **10**, 499–506.
- van de Linde, S., Heilemann, M., & Sauer, M. 2012. Live-Cell Super-Resolution Imaging with Synthetic Fluorophores. *Annual Review of Physical Chemistry*, **63**(1), 519–540.
- Varela, P. F., Solís, D., Díaz-Mauriño, T., Kaltner, H., Gabius, H.-J., & Romero, A. 1999. The 2.15 Å crystal structure of CG-16, the developmentally regulated homodimeric chicken galectin. *Journal of Molecular Biology*, **294**(2), 537–549.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G. W., & Etzler, M. E. 2009. *Essentials of Glycobiology, 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vasta, G. 2009. Roles of galectins in infection. *Nature*, **7**, 424–438.
- Vavilov, S. J., & Levshin, W. L. Z. 1923. -. *Phys.*, **16**, 135.
- Villalobo, A., Nogales-Gonzalez, A., & Gabius, H.-J. 2006. A guide to signaling pathways connecting protein-glycan interaction with the emerging versatile effector functionality of mammalian lectins. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **18**, 1–37.
- Vocadlo, D. J., Hang, H. C., Kim, E.-J., Hanover, J. A., & Bertozzi, C. R. 2003. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *PNAS*, **100**(16), 9116–9121.
- Wahl, Michael. 2007. *Technical Note - Time-Correlated Single Photon Counting*. PicoQuant.
- Weber, G. 1960a. Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in proteins. *Biochem J.*, **75**, 345–352.
- Weber, G. 1960b. Fluorescence-polarization spectrum and electronic-energy transfer in tyrosine, tryptophan and related compounds. *Biochem J.*, **75**, 335–345.
- Weigert, F. 1920. Über polarisierte Fluoreszenz. *Verh. d.D. Phys. Ges.*, **23**, 100.
- Wells, V., & Mallucci, L. 1991. Identification of an autocrine negative growth factor: Mouse b-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. *Cell*, **64**(1), 91–97.

- Whitney, P. L., Powell, J. T., & Sanford, G. L. 1986. Oxidation and chemical modification of lung beta-galactoside-specific lectin. *Biochem Journal*, **238**, 683–689.
- WHO. 1993. *Guidelines for Drinking Water Quality*. Second edition edn. Vol. 2. Geneva: World Health Organisation.
- Wichmann, J., & Hell, S. W. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, **19**(11), 780–782.
- Wiedenmann, J., Ivanchenko, S., Oswald, F., Schmitt, F., Röcker, C., Salih, A., Spindler, K.-D., & Nienhaus, G. U. 2004. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *PNAS*, **101**(45), 15905–15910.
- Wolter, S., Schüttpelz, M., Tscherepanow, M., van de Linde, S., Heilemann, M., & Sauer, M. 2010. Real-time computation of subdiffraction-resolution fluorescence images. *J Microsc*, **237**, 12–22.
- Yamaoka, K., Ohno, S., Kawasaki, H., & Suzuki, K. 1991. Overexpression of a b-galactoside binding protein causes transformation of BALB3T3 fibroblast cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **179**(1), 272–279.
- Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., & Selvin, P. R. 2003. Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization. *Science*, **300**(5628), 2061–2065.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., & Geiger, B. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.*, **32**, 416–420.
- Zamir, E., & Geiger, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, **114**(20), 3583–3590.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Biosynthese von Glykokonjugaten und Zelladhäsion	2
2.1	Franck-Condon-Prinzip	10
2.2	Jablonski-Diagramm	11
2.3	Typische FCS-Kurve	17
2.4	Schematische Abbildung der L-Format-Methode	29
2.5	Weitfeld-Mikroskop	31
2.6	Verschiedene Beleuchtungsmodi bei der Weitfeldmikroskopie . .	32
2.7	Aufbau eines konfokalen Mikroskops	33
2.8	Prinzip reversibel photoschaltbarer Moleküle	37
2.9	Aufgaben von Galektinen	40
2.10	Kristallstruktur von hGal-1	41
2.11	Membranstrukturen	43
3.1	Aufbau der FCS	47
3.2	<i>d</i> STORM-Messaufbau	49
3.3	Verschiedene Random Walks und deren MSD-Plot	52
3.4	Metabolisierung der Zucker und Click-Reaktion	56
4.1	Struktur und Absorptionsspektrum von hGal-1	58
4.2	Charakterisierung der FCS	59
4.3	Einfluss der Laktoseviskosität auf die Diffusionszeit	62
4.4	Bindungsstudie zwischen Proto-Typen und Laktose	63
4.5	Kinetiken für den Bindungsprozess hGal-1 + Laktose	65
4.6	Kinetiken für den Bindungsprozess hGal-4 _{PT} + Laktose	66
4.7	Zusammenfassung der hydrodynamischen Eigenschaften huma- ner Galektine	67
4.8	Positionierung des Trp-Rests im hGal-1	68
4.9	Spektroskopische Eigenschaften von hGal-1	69
4.10	Anisotropie-Messungen mit hGal-1	70
4.11	Bindungsstudien und Kinetik-Messungen	72
4.12	Fundamental-Anisotropien von hGal-1 in Abhängigkeit von der Viskosität	74

4.13	TCSPC-Messungen mit hGal-1	75
4.14	Änderung der Anisotropie auf Grund von Oxidationsprozessen .	77
4.15	Abhängigkeit der Raten von der Kupfer-Konzentration	78
4.16	FCS-Studien zum oxidativen Zerfall der Prototypen	79
4.17	Zeitliche Laktose-Bindung für cG-1B	81
4.18	Vergleich der Kinetiken von cG-1B	82
4.19	cChicken Galektine im Vergleich	86
4.20	Lokalisationsgenauigkeit eines einzelnen hGal-1-Moleküls	87
4.21	Räumliche Organisation von hGal-1 auf der Oberfläche von Neuroblastomzellen	89
4.22	Clusterdurchmesser hGal-1	90
4.23	Konzentrationsabhängige Cluster-Bildung	91
4.24	Konzentrationsabhängige Cluster-Bildung	93
4.25	Fall 1: monomeres hGal-1 zeigt keine Cluster-Bildung	94
4.26	Fall 2: monomeres hGal-1 verändert die Zellform	95
4.27	Bedingungen für die Zuckermarkierungen	97
4.28	Lokalisationsverteilung in einem Cluster	99
4.29	Toxizität von Kupfersulfat für lebende Zellen	101
4.30	Click-Markierungen an lebenden Zellen	102
4.31	Spot- und Clusterdurchmesser fixierter und lebender Zellen . . .	103
4.32	Cholesteroxidase beeinflusst die beobachteten Cluster nicht . .	104
4.33	Cyclodextrin zerstört die Cluster	105
4.34	Bewegung der Clusterschwerpunkte	106
4.35	MSD für lebende und fixierte Zellen	107
5.1	Nachweis hydrodynamischer Änderungen mittels FCS	110
5.2	Zusammenfassung der dSTORM-Messungen an hGal-1	112
5.3	Click-Chemie und dSTORM ermöglichen eine Analyse von Membranstrukturen	113
5.4	Ausblick: Zeitlich Auflösung der Clusterformation und des Zuckeraustrags	115

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich noch allen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit, auf die ein oder andere Weise, beigetragen haben und mich in den letzten Jahren unterstützt haben.

Mein Dank gilt als erstes Prof. Dr. Markus Sauer für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe vor über vier Jahren und die Möglichkeit an diesem spannenden Forschungsgebiet mitzuarbeiten.

Für die Betreuung meiner Arbeit, viele interessante Gespräche und Diskussionen, sowie die vielen kleinen, aber überaus praktischen Tipps bei der experimentellen Durchführung möchte ich mich bei Dr. Sören Doose bedanken. Danke für dein offenes Ohr und auch dein Wissen!

Bei Prof. Dr. Hans-Joachim Gabius (LMU München) und der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jürgen Seibel (Uni Würzburg), insbesondere Nadja Bertleff und Elisabeth Memmel, danke ich für die oftmals sehr spontane Bereitstellung der Galektine und Farbstoffe für die Click-Chemie-Messungen.

Für die Hilfe rund um die Zell-Experimente danke ich Petra Geßner und Lisa Pließ, Sebastian van de Linde und Thorge Holm für ihre Bereitschaft mir bei Fragen rund um die *d*STORM-Messungen zu helfen, Christian Franke, für die Auswertungen der Clusterbewegungen und kritischen Kommentare, bei Hannes Neuweiler für das überaus hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und Ratschläge. Danke euch allen!

Weiterhin geht mein Dank an die gesamte Arbeitsgruppe des Lehrstuhls für „Biotechnologie und Biophysik“ für das angenehme Arbeitsklima und die vielen kleinen und großen Aufmunterungen. Vielen Dank für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb der Universität.

Für ihre aufbauenden Worte, kritischen Kommentare, Rücksichtnahme und Fresspakete gilt mein besonderer Dank Daniela, Lena, Johannes, Ines, Katrin, Dominique, Annette, Evelyn, Lucas, Roberto und natürlich meinen Eltern und Geschwistern. Danke das Ihr immer für mich da wart und es auch noch seit :-)

Danke Euch allen!

