



**Untersuchung von Rezeptoren und G-Proteinen  
mittels Einzelmolekülfluoreszenztechniken**

**Investigation of receptors and G-proteins  
using single molecule fluorescence techniques**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Julia Wagner

aus

Weimar

Würzburg, 2015



Eingereicht am: .....

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. M. J. Lohse

2. Betreuer: Dr. K. G. Heinze

3. Betreuer: Prof. Dr. M. Sauer

4. Betreuer: Prof. Dr. R. Benz

Tag des Promotionskolloquiums: .....

Doktorurkunde ausgehändigt am: .....



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Untersuchung von Rezeptoren und G-Proteinen mittels Einzelmolekülfluoreszenztechniken“ eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

---

Julia Wagner

## **Affidavit**

I hereby confirm that my thesis entitled "Investigation of receptors and G-proteins using single molecule fluorescence techniques" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

---

Julia Wagner



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary .....	3
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) .....	5
1.2 G-Proteine.....	5
1.3 Verwendete GPCR und G-Proteine .....	7
1.3.1 $G\alpha_s$ -Proteine und $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren .....	7
1.3.2 $G\alpha_i$ -Proteine und $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren.....	7
1.3.3 $G\beta\gamma$ -Proteine.....	8
1.4 Motivation: Vom Ensemble zum Einzelmolekül .....	9
1.5 Zielsetzung.....	10
<b>2 Materialien .....</b>	<b>11</b>
2.1 Biologisches Material .....	11
2.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen, Kits .....	13
2.3 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software.....	17
<b>3 Methoden .....</b>	<b>21</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	21
3.2 Proteinbiochemische Methoden.....	22
3.3 Zellbiologische Methoden/Zellkultur.....	23
3.4 Methoden der Fluoreszenzmarkierung .....	26
3.4.1 Grundlagen der Fluoreszenz .....	26
3.4.2 Fluoreszierende Proteine .....	29
3.4.3 Fluoreszenzmarkierung mit <i>SNAP/CLIP</i> -Farbstoffen.....	30
3.5 Fluoreszenzverfahren .....	32
3.5.1 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-M).....	32
3.5.2 Einzelmolekülverfolgung.....	33
3.5.2.1 Partikeldetektion .....	33
3.5.2.2 Partikelverfolgung .....	34
3.5.2.3 Charakterisierung der Diffusion .....	35
3.5.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS).....	36
3.5.3.1 FCS-Aufbau .....	37
3.5.3.2 Prinzip der Korrelationsanalyse .....	38
3.5.3.3 Auflösungsvermögen des FCS-Versuchsaufbaus.....	44
3.5.3.4 Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsanalyse .....	44
3.5.3.5 Konfokale versus evaneszente Fluoreszenzanregung für die F(C)CS .....	48
3.5.3.6 Fitfunktionen .....	49
3.5.4 Zusammenfassung .....	51

4	Ergebnisse.....	53
4.1	Fluoreszenzmarkierung von Rezeptoren und G-Proteinen unter Verwendung der SNAP/CLIP-Methode.....	53
4.1.1	Klonierungsstrategie und Funktionalitätstests.....	53
4.1.2	Optimierung der Transfektion.....	53
4.1.3	Markierung mit SNAP/CLIP-Farbstoffen.....	54
4.2	Visualisierung verschiedener Rezeptoren und G-Proteine mittels zeitaufgelöster Einzelmolekülmikroskopie.....	61
4.2.1	Aufbau.....	61
4.2.2	Durchführung der TIRF-Einzelmolekülexperimente.....	61
4.3	Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von Rezeptoren und G-Proteinen mittels maßgeschneiderter Algorithmen zur Einzelmolekülverfolgung.....	62
4.3.1	Bildbearbeitung mit ImageJ.....	62
4.3.2	Datenauswertung mit <i>u-track</i> /Matlab.....	63
4.3.3	Charakterisierung des Diffusionsverhaltens.....	63
4.4	Etablierung eines F(C)CS-Versuchsaufbaus zur Analyse schneller Rezeptordynamiken.....	67
4.4.1	Die konfokale F(C)CS.....	67
4.4.1.1	Aufbau.....	67
4.4.1.2	Kalibrierung des FCS-Systems.....	68
4.4.1.3	Kalibrierung des FCCS-Systems.....	71
4.4.1.4	Aufklärung von Rezeptordynamiken mit konfokaler FCS.....	74
4.4.2	Erweiterung: FCS im TIRF Modus (TIR-FCS).....	80
4.4.2.1	Erweiterter experimenteller Aufbau für die Interne Totalreflexions-Fluoreszenzanregung.....	80
4.4.2.2	Kalibrierung des TIR-FCS Systems.....	80
4.4.2.3	Aufklärung von Rezeptordynamiken mit evaneszenter FCS.....	81
5	Diskussion.....	85
5.1	Diffusionsanalyse mittels bildgebender Einzelmolekülverfolgung.....	85
5.2	Diffusionsanalyse mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.....	87
5.3	Bewertung der verwendeten Verfahren.....	91
5.4	Ausblick.....	93
6	Referenzen.....	95
7	Abkürzungsverzeichnis.....	107
8	Publikationen/Konferenzbeiträge.....	109
8.1	Publikationen.....	109
8.2	Konferenzbeiträge.....	109
9	Danksagung.....	111
10	Curriculum Vitae.....	113





## Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekültechniken zur Untersuchung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und G-Proteinen in der Zellmembran lebender Zellen etabliert und angewendet. GPCR stellen die größte Familie membrangebundener Rezeptoren dar und leiten Signale über heterotrimere G-Proteine in das Zellinnere weiter. Auch wenn jüngst sowohl inaktive, als auch aktive Konformationen von GPCR und G-Proteinen mittels Röntgenstrukturanalyse aufgelöst werden konnten, sind die Dynamiken ihrer Aktivierung und Deaktivierung bisher nur bruchstückhaft bekannt. In der Vergangenheit wurden die Schritte der Signalkaskade, beginnend mit der Bindung des Rezeptorliganden bis hin zur Bildung von sekundären Botenstoffen, erfolgreich mit Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-Techniken aufgeklärt. Diesen experimentell bestimmten Aktivierungszeiten stehen Daten aus Modellierungsstudien gegenüber, die sehr viel schnellere Konformationsänderungen vorhersagen, welche bereits in Studien mittels Kernspinresonanzspektroskopie nachgewiesen werden konnten. Folglich ist anzunehmen, dass die Zeitdomäne, innerhalb der die Aktivierung der GPCR stattfindet, sehr breit gefächert ist.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese mehrere Größenordnungen umfassenden Zeitskalen der GPCR-Aktivierung, welche in der Literatur beschrieben werden, mittels bildgebender Einzelmolekülverfolgung (SPT) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zu untersuchen. Beide Verfahren liefern durch Einzelmolekülspuren oder Korrelationskurven eine Art Fingerabdruck des dynamischen Verhaltens des untersuchten Systems, was jeweils mit Vor- und Nachteilen verbunden ist. Die Stärke der Techniken zeigte sich bei dem vorliegenden Projekt vor allem in ihrer Kombination: Die klassische FCS bietet die Möglichkeit, Dynamiken über einen weiten Zeitraum von Mikrosekunden bis Sekunden auszuwerten, allerdings nur innerhalb eines kleinen, optisch definierten Detektionsvolumens. Die bildgebende Einzelmolekülverfolgung liefert hingegen ein großes Sichtfeld und ermöglicht somit die parallele Analyse vieler Einzelmolekülereignisse über die Zelle verteilt, jedoch auf Kosten der Zeitauflösung.

Durch die Anwendung von SPT und FCS konnte in dieser Arbeit ein Zeitbereich der Rezeptor- (und G-Protein-) Dynamiken von Mikrosekunden bis Sekunden gefunden und diskutiert werden. Um die selektive Anregung der Plasmamembran zu gewährleisten, wurde die Interne Totalreflexionsfluoreszenzanregung verwendet. Diese eignet sich ideal als Grundlage für die spätere Analyse mittels SPT und FCS, welche komplementär nutzbar sind und mit dem gleichen zellulären Assay und unter Verwendung der gleichen Fluoreszenzmarker betrieben werden können.

Die Studie am Beispiel der  $\alpha_{2A}$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren sowie des  $G\alpha_{i1}$ -Proteins demonstrierte das enorme Potential dieser Einzelmolekültechniken für die Untersuchung von GPCR und skizziert die Komplexität deren Dynamik, wie sie auch durch neueste Modellierungsstudien vorhergesagt wird.



## Summary

In this work single molecule techniques for the investigation of G-protein coupled-receptors (GPCR) and G-proteins in living cells were established and applied. GPCR constitute the largest family of membrane bound receptors and transduce extracellular stimuli via heterotrimeric G-proteins. Very recently inactive as well as active conformations of GPCR and G-proteins have been deduced from X-ray crystallography. Nevertheless, only little is known about the dynamics of receptor activation and deactivation. Techniques based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) have allowed for the study of the GPCR signaling cascade from ligand binding up to second messenger generation. However, the reported activation times based on such FRET investigations seem to contradict data from molecular modelling studies which predict much faster conformational changes and are supported by recent Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy data. Thus, the timescale of GPCR activation remains actively debated, and is quite likely widely spread.

One objective of this work was to experimentally probe this orders-of-magnitude broad time scale for GPCR activation reported in the literature using Single Particle Tracking (SPT) and Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). By directly probing the dynamic behavior via both single particle traces and correlation curves, the advantages and disadvantages offered by each technique can be compensated. In combination SPT and FCS pool forces: Classical FCS allows evaluating dynamics within a broad time domain from the microsecond to the second range. The compromised small 'field of observation' comes with the advantage of high temporal resolution. By contrast, SPT allows parallel analysis of many single receptor or G-protein events distributed over at least the dimension of a single cell, however with lower temporal resolution.

In this study the application of FCS and SPT allowed for the detection of receptor (and G-protein) dynamics. Selective illumination of the plasma membrane was achieved by using Total Internal Reflection Fluorescence. Data was subsequently analyzed by SPT as well as FCS, both methods working with the same cellular assay as well as fluorescent probes.

Exemplarily investigating the  $\alpha_{2A}$ - and  $\beta_2$ -adrenergic receptor as well as the  $G\alpha_{i1}$ -protein, uncovers a wide timescale of receptor dynamics from microseconds to seconds, closing the gap between times that already could have been solved with other fluorescent techniques such as FRET. This study reveals the enormous potential of single molecule methods for the investigation of GPCR and delineates the complexity of GPCR dynamics as recently predicted by molecular modelling.



# 1 Einleitung

## 1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) sind Rezeptoren in der Zellmembran, die Signale über heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) in das Innere der Zelle weiterleiten. Sie stellen die größte Familie membrangebundener Rezeptoren dar und sind an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse beteiligt.

GPCR bilden die Zielstruktur verschiedenster Hormone, Peptide sowie Neurotransmitter [1, 2] und transportieren über die nachgeschalteten G-Proteine extrazelluläre Signale, wie beispielsweise Licht-, Geruchs- und Geschmacksreize, weiter in das Innere der Zelle. Aufgrund dieser Komplexität und Vielfalt existiert ein großes Kollektiv an Rezeptorgruppen, die jeweils meist hochspezifisch auf den entsprechenden Stimulus reagieren [3].

In der Vergangenheit wurden GPCR anhand unterschiedlicher physiologischer und struktureller Eigenschaften sowie ihrer Sequenzhomologie und funktioneller Merkmale in verschiedene Klassen unterteilt [4, 5]. Abgeleitet von phylogenetischen Untersuchungen erfolgt die Unterteilung der humanen GPCR in fünf Hauptfamilien (GRAFS-System) [6, 7]:

Die Glutamat-Rezeptor-Familie (15 GPCR), die Rhodopsin-Rezeptor-Familie (701 GPCR), die Adhäsions-Rezeptor-Familie (24 GPCR), die Frizzled/Taste2-Rezeptor-Familie (24 GPCR) und die Sekretin-Rezeptor-Familie (15 GPCR).

Allen GPCR sind eine charakteristische räumliche Struktur sowie der Mechanismus der Signaltransduktion gemeinsam. Jeweils drei extra- und intrazelluläre Proteinschleifen verbinden die insgesamt sieben  $\alpha$ -Helices miteinander, welche den Rezeptor in der Membran verankern. Zudem besitzen GPCR einen extrazellulären Amino- und einen intrazellulären Carboxyl-Terminus. Anhand des Rhodopsin- sowie des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors konnte gezeigt werden, dass GPCR in zumindest zwei gesicherten Konformationen, dem inaktiven sowie dem aktiven Zustand, vorliegen können [8]. Die aktive Rezeptor-Konformation wird durch die Bindung eines Liganden hervorgerufen und bedingt ihrerseits multiple Effektorantworten (siehe Abb. 1.1). Jüngste biophysikalische Studien legen die Vermutung nahe, dass GPCR nicht nur nach einem strengen *on-off*-Prinzip funktionieren, sondern höchst dynamische Proteine darstellen, die in einer Vielzahl funktionell äußerst unterschiedlicher Konformationen vorliegen können [9-13].

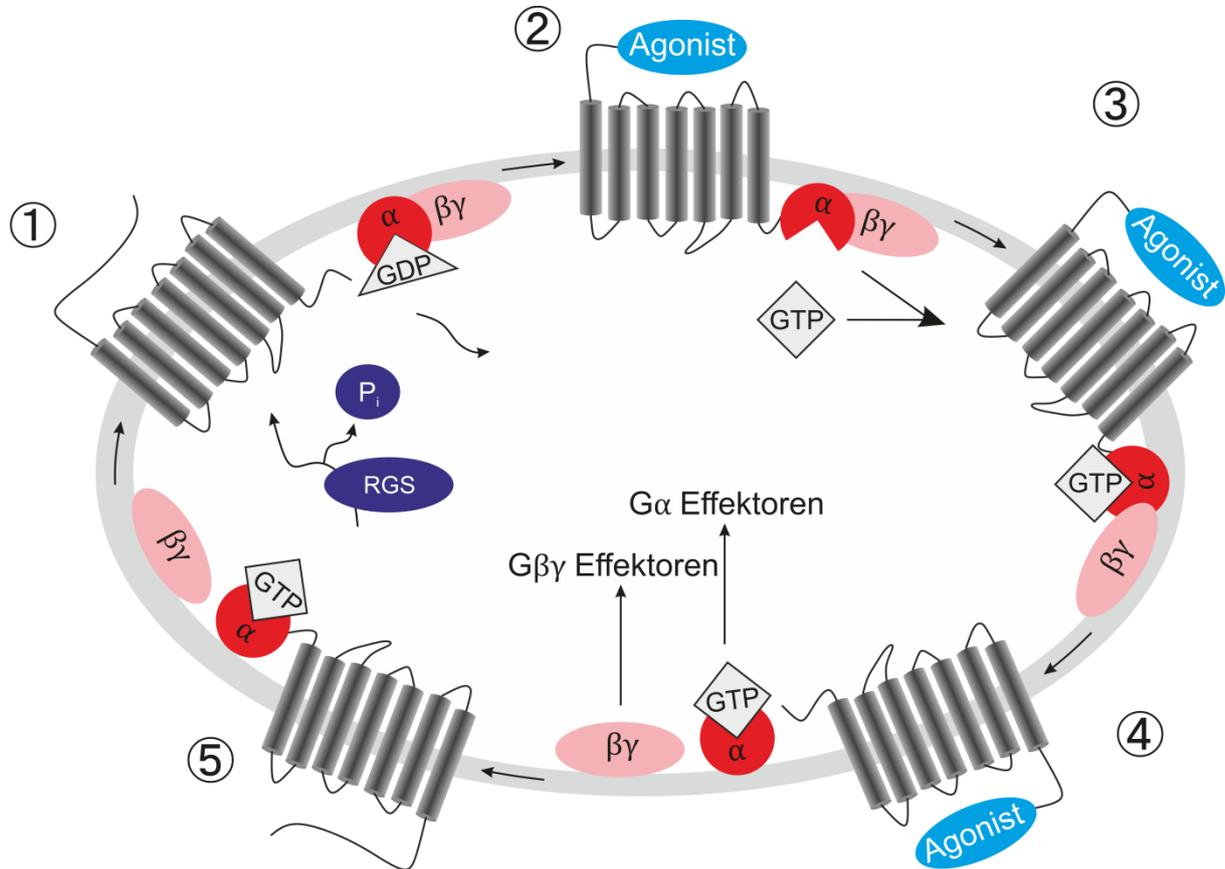
Für die bisher identifizierten Rezeptoren sind detaillierte Beschreibungen in großem Umfang in der Fachliteratur zu finden, auf welche an dieser Stelle verwiesen wird [14-17]. Die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Rezeptoren werden in Kapitel 1.3 vorgestellt.

## 1.2 G-Proteine

Die Bindung eines Liganden an einen GPCR bewirkt eine Konformationsänderung, wodurch die nachgeschalteten G-Proteine aktiviert werden. Diese setzen sich aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammen [18, 19].

Der Zyklus aus G-Protein-Aktivierung und -Recycling erfolgt über verschiedene Schritte (siehe Abb. 1.1): Das inaktive G-Protein trägt an der  $\alpha$ -Untereinheit ein Molekül Guanosindiphosphat (GDP). Nach Aktivierung durch den Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) ersetzt wird [20, 21]. Die  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit [22] und beide regulieren anschließend die Aktivität nachgeschalteter Effektoren [23-26]. Der Zyklus der G-Protein-Aktivierung wird

durch die Dephosphorylierung des gebundenen GTP zurück zum GDP, gefolgt von der Rekonstitution der heterotrimeren Grundstruktur, beendet. Durch Röntgenstrukturanalysen konnten die drei beschriebenen Stadien sehr gut charakterisiert werden [27-31]. Neben einer tatsächlichen Dissoziation der G-Protein-Untereinheiten wird auch eine räumliche Umlagerung der Untereinheiten zueinander diskutiert [32, 33].



**Abb. 1.1: Zyklus der G-Protein-Aktivierung.** (1) Im basalen Zustand trägt die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins ein Molekül GDP. (2) Die Aktivierung des Rezeptors bewirkt eine Konformationsänderung im Molekül, die ihrerseits die Aktivierung des G-Proteins bedingt. Das GDP dissoziiert ab. Agonist, Rezeptor und G-Protein liegen in Form eines trimeren Komplexes vor. (3) Das G-Protein bindet ein Molekül GTP und (4) dissoziiert vom Rezeptor. Beide Untereinheiten stimulieren verschiedenste Effektoren. (5) Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion (RGS-Proteine) katalysieren die Dephosphorylierung des GTP zurück zum GDP. Die drei Untereinheiten rekonstituieren.

Für die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein werden zwei verschiedene Modelle diskutiert: Nach dem *collision coupling*-Modell wird der Rezeptor zunächst durch einen Agonisten aktiviert und bindet dann an das G-Protein [34]. Im *precoupling*-Modell wird dagegen angenommen, dass beide Partner schon vor der Rezeptoraktivierung in Form eines stabilen Komplexes vorliegen [35-37]. Die Unterscheidung dieser beiden Modelle ist essentiell, denn die Kinetiken der G-Protein-Aktivierung werden in hohem Maße durch den Umstand beeinflusst, ob der Rezeptor bereits gekoppelt vorliegt oder ob die Kopplung erst nach der Agonistbindung stattfindet.

Bis heute sind mehr als 40 verschiedene G-Protein-Untereinheiten identifiziert worden, die verschiedene heterotrimere G-Proteine ausbilden und unterschiedliche Signaltransduktionswege beeinflussen [38-40]. Die Einteilung der G-Proteine erfolgt anhand der jeweiligen  $\alpha$ -Untereinheit, wobei aufgrund der spezifischen Aminosäuresequenz vier verschiedene Klassen unterschieden werden [41]. Detaillierte Beschreibungen finden sich in der bestehenden Fachliteratur, wie zum Beispiel bei Sprang [42]. Die in dieser Arbeit verwendeten G-Proteine werden im folgenden Kapitel beschrieben.

## 1.3 Verwendete GPCR und G-Proteine

### 1.3.1 $G\alpha_s$ -Proteine und $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren

Allen  $G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren ist die durch das  $G\alpha_s$ -Protein vermittelte Signalkaskade, die Aktivierung cAMP-abhängiger Signalwege (cAMP-zyklisches Adenosinmonophosphat, *cyclic adenosine monophosphate*), gemeinsam [18, 20, 43]. Nach Aktivierung des G-Proteins (siehe Kap. 1.2) stimuliert die  $G\alpha_s$ -Untereinheit die Adenylylzyklase, welche unter Abspaltung von Pyrophosphat aus Adenosintriphosphat (ATP) cAMP bildet. cAMP ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der im weiteren Verlauf die Proteinkinase A aktiviert. Diese phosphoryliert eine Vielzahl nachgeschalteter Strukturen.

Für diese Arbeit wurde der  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ausgewählt:

- **$\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren**

Der vor allem in den glatten Muskelzellen exprimierte  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ -AR) ist ein Subtyp von drei bekannten  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und vermittelt seine Wirkung über cAMP.  $\beta_2$ -AR sind an der Relaxation der glatten Muskelzellen in Bronchien, Darm und Uterus beteiligt, regulieren pulmonale Funktionen und vermitteln eine Vasodilatation der Gefäße der Skelettmuskulatur [44]. Zudem aktivieren sie die Glukoneogenese und Glykogenolyse in der Leber und stimulieren die Insulinsekretion im Pankreas [45]. Ein endogener Ligand der  $\beta_2$ -AR ist das Adrenalin, zudem ist auch eine Affinität für das *N*-Desmethylderivat Noradrenalin bekannt [46]. Dem Rezeptor ist neben dem  $G\alpha_s$ -Protein auch das  $\beta$ -Arrestin nach Phosphorylierung durch die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-kinase (GRK) nachgeschaltet.

Der  $\beta_2$ -AR ist in vielen biophysikalischen und molekularbiologischen Studien untersucht worden. Im Jahr 2007 gelang die Aufklärung der Kristallstruktur [47-49], die Struktur des mit dem  $G\alpha_s$ -Protein gebildeten Komplexes wenig später [29]. Das verfügbare umfangreiche Wissen macht diesen Rezeptor zu einem prominenten Modellsystem zur Untersuchung weiterer GPCR in Bezug auf Struktur und Funktion [10, 50].

### 1.3.2 $G\alpha_i$ -Proteine und $G\alpha_i$ -gekoppelte Rezeptoren

Die durch  $G\alpha_i$ -Proteine vermittelte Signalkaskade beruht auf der Inhibierung der Adenylylzyklaseaktivität. Durch die Unterdrückung der Bildung von cAMP aus ATP wird die Aktivität cAMP-abhängiger Proteinkinasen herabgesetzt [18, 20, 43].

Die nachfolgenden  $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptoren wurden in dieser Arbeit untersucht:

- **$\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptoren**

Der  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor ( $\alpha_{2A}$ -AR) ist einer von drei  $\alpha_2$ -AR und findet sich typischerweise prä- und postsynaptisch im zentralen und peripheren Nervensystem [51]. In man-

chen Spezies konnten auch vier Subtypen gefunden werden [52]. Die zentralnervösen Wirkungen, die aus der Stimulation des  $\alpha_2$ -AR durch einen seiner physiologischen Agonisten Adrenalin oder Noradrenalin resultieren, sind überwiegend inhibitorischer Natur. Beispielsweise wird neben einer analgetischen und einer sedierenden Wirkung auch die Freisetzung weiterer Neurotransmitter gehemmt. In der Peripherie kommt es nach einer Rezeptoraktivierung zur Vasokonstriktion [45].

- **Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptoren**

Der A<sub>1</sub>-Rezeptor ist einer von vier bekannten Adenosinrezeptoren [53], welcher seine physiologischen Wirkungen, eine negative Inotropie und eine negative Chronotropie, durch die Stimulation mittels Adenosin vermittelt [45].

### 1.3.3 G <sub>$\beta\gamma$</sub> -Proteine

Die G <sub>$\beta\gamma$</sub> -Untereinheit aller G-Proteine stellt strukturell gesehen ein Dimer aus zwei Polypeptiden dar, aus funktioneller Sicht verhält sie sich jedoch wie ein Monomer, da die  $\beta$ - bzw.  $\gamma$ -Untereinheit alleine jeweils nicht funktionsfähig ist [54].

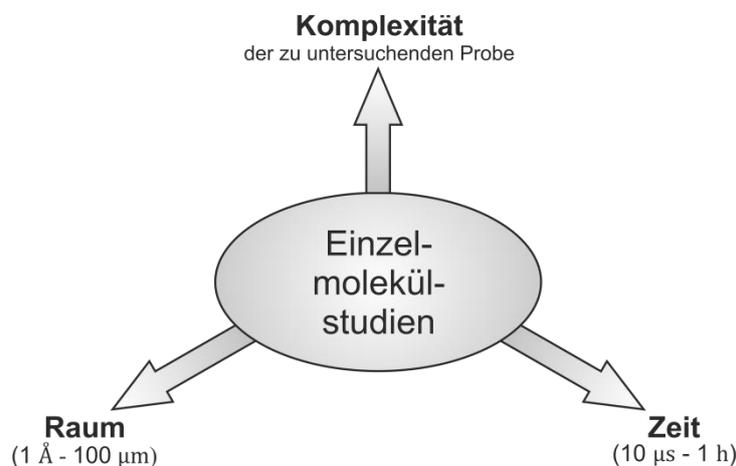
Der G <sub>$\beta\gamma$</sub> -Komplex hat zwei grundlegend unterschiedliche Aufgaben: In Verbindung mit dem G <sub>$\alpha$</sub> -Protein steigert er dessen Affinität für GDP und konserviert das G-Protein somit in seiner inaktiven Form [54]. Nach der Rezeptorstimulation und G-Protein-Aktivierung kann G <sub>$\beta\gamma$</sub>  verschiedene andere, nachgeschaltete Effektoren aktivieren oder inhibieren. So werden unter anderem Ionenkanäle [55] oder die Adenylylzyklaseaktivität reguliert [56].

## 1.4 Motivation: Vom Ensemble zum Einzelmolekül

Trotz ausführlicher früherer Studien, insbesondere biochemische Ansätze, Fluoreszenzverfahren und Röntgenstrukturanalyse [10, 57, 58], sind einige Schlüsselaspekte der GPCR-Signalkaskade noch unverstanden.

Ein Grund für die bisher fehlenden Kenntnisse ist die begrenzte oder fehlende räumlich-zeitliche Auflösung bestehender biochemischer Methoden. Hier wurden Fluoreszenzverfahren basierend auf Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) eingesetzt. Die Aktivierung eines Rezeptors mit einem Vollagonist oder inversen Agonisten wurde dabei entweder über die Konformationsänderung innerhalb einer Transmembranschleife im GPCR oder über die Änderung der Konformation zweier GPCR in einem Dimer gemessen [59-63]. Diesen experimentell bestimmten Aktivierungszeiten stehen Daten aus Modellierungsstudien gegenüber, die sehr viel schnellere zeitliche Dimensionen vorhersagen [16], welche in NMR-Studien nachgewiesen werden konnten [50]. Folglich ist anzunehmen, dass sich die Zeitskala, auf der die Aktivierung von GPCR stattfindet, breit gefächert ist. Allerdings sind Fluoreszenzverfahren, die als sogenannte Ensemblemessung durchgeführt werden, ebenfalls in ihrer Aussagekraft begrenzt, da hier über verschiedenen Proteinpulationen gemittelt wird und so das Risiko einer unvollständigen Beschreibung der Signalkaskadenkinetik besteht.

Der Großteil der heutigen Kenntnisse über die GPCR-Signalkaskade stammt klassischerweise aus solchen Ensemblemessungen. Erst in den vergangenen zehn Jahren haben es vor allem die messtechnischen Fortschritte möglich gemacht, dass Einzelmolekülstudien vermehrt zum Erkenntnisgewinn beitragen konnten (siehe Abb. 1.2). Der Hauptvorteil von Einzelmolekülverfahren resultiert aus der Tatsache, dass hier die Existenz verschiedener Molekülpulationen nachweisbar ist, die bei einer Ensemblemessung durch die Mittelung nicht erfassbar sind [64, 65]. Zusammen mit den Weiterentwicklungen in der Mikroskopie hinsichtlich verbesserter räumlicher und zeitlicher Auflösung sowie deren Vereinbarkeit mit Lebendzelluntersuchungen können nun völlig neue Fragestellungen bearbeiten werden [66]. Konkret konnten so bereits detaillierte Informationen über die Struktur von GPCR und die Dynamiken ihrer Signaltransduktion gewonnen werden, und zwar unter besonderer Berücksichtigung von Subpopulationen und Zwischenzuständen.



**Abb. 1.2: Einzelmolekülstudien.** Die Entwicklung von Einzelmolekülstudien zeigt viele Vorteile auf. Die räumliche und zeitliche Auflösung konnte durch Verbesserung der Mikroskopietechnik stetig erweitert werden. Auch das untersuchte biologische System wurde komplexer. So können Prozesse beispielsweise direkt in lebenden Zellen untersucht werden. Nach Ha, T. [64].

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Einzelmolekülmethoden basierend auf der Internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-M) sowie der Fluoreszenz-(Kreuz-)Korrelations-Spektroskopie (F(C)CS) zu entwickeln beziehungsweise so anzupassen, dass Einzelmolekülstudien zur Untersuchung des Verhaltens von Rezeptoren und G-Proteinen in lebenden Zellen möglich sind.

Im Einzelnen sollten die folgenden Methoden etabliert werden:

- (I) Fluoreszenzmarkierung von Rezeptoren und G-Proteinen unter Verwendung der *SNAP/CLIP*-Methode;
- (II) Visualisierung verschiedener Rezeptoren und G-Proteine mittels zeitaufgelöster Einzelmolekülmikroskopie;
- (III) Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von Rezeptoren und G-Proteinen mittels maßgeschneiderter Algorithmen zur Einzelmolekülverfolgung;
- (IV) Etablierung eines F(C)CS-Versuchsaufbaus zur Analyse schneller Rezeptordynamiken.

## 2 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sind nachstehend aufgeführt. Chemikalien und Reagenzien waren von Analysen- bzw. der bestmöglichen erhältlichen Qualität und wurden von AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bzw. der Apotheke der Universitätsklinik Würzburg (Würzburg, Deutschland) bezogen. Geschützte Warenzeichen wurden hierbei nicht gesondert gekennzeichnet.

### 2.1 Biologisches Material

#### Prokaryote Zellsysteme:

Name	Stamm
<i>E. coli</i>	DH $\alpha$ 5, JM 109

#### Eukaryote Zellsysteme:

Zellsystem	Beschreibung
CHO-K1	Ovarzellen des chinesischen Hamsters
HEK 293ad	Humane embryonale Nierenepithelzellen mit verbesserter Adhärenz
HEK 293T (HEK TSA)	Humane embryonale Nierenepithelzellen, die zusätzlich das ‚SV40 large T-Antigen‘ exprimieren

#### Enzyme:

Name	Bezugsquelle
Vent DNA Polymerase und Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)
Taq DNA Polymerase	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pfu DNA Polymerase	Promega (Madison, WI, USA)
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)
Restriktionsendonukleasen, BSA und Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)
SAP (Alkalische Phosphatase)	New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)
100 bp und 1 kb DNA-Leiter	New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland)

**Plasmid-DNA:**

Das Expressionssystem der nachfolgend aufgeführten DNA-Inserts war der pcDNA3 Vektor.

Name	Position der <i>SNAP/CLIP</i> -Markierung	Referenz
G $\alpha_{i1}$	-	1
G $\alpha_{i1}$ - <i>SNAP</i>	G $\alpha_{i1}$ 1-165 [Linker (SGGG)- <i>SNAP</i> <sup>®</sup> -Linker (SGGG)] 166-355. (C351I PTX-Insensitivität)	1
G $\alpha_{i1}$ - <i>CLIP</i>	G $\alpha_{i1}$ 1-165 [Linker (SGGG)- <i>CLIP</i> <sup>®</sup> -Linker (SGGG)] 166-355. (C351I PTX-Insensitivität)	1
G $\alpha_s$	-	1
G $\alpha_s$ - <i>SNAP</i>	G $\alpha_s$ 1-72 [Linker (GGGS)- <i>SNAP</i> <sup>®</sup> -Linker (SGGG)] 85-392	1
G $\alpha_s$ - <i>CLIP</i>	G $\alpha_s$ 1-72 [Linker (GGGS)- <i>CLIP</i> <sup>®</sup> -Linker (SGGG)] 85-392	1
G $\beta_1$	-	1
G $\beta_1$ - <i>SNAP</i>	<i>N</i> -terminal	1
G $\beta_1$ - <i>CLIP</i>	<i>N</i> -terminal	1
G $\gamma_2$	-	1
G $\gamma_2$ - <i>SNAP</i>	<i>N</i> -terminal	1
G $\gamma_2$ - <i>CLIP</i>	<i>N</i> -terminal	1
A <sub>1</sub> -R	-	1
$\alpha_{2A}$ -AR	-	1
S-FLAG- <i>SNAP</i> - $\alpha_{2A}$ -AR	<i>N</i> -terminal	1
S-FLAG- <i>CLIP</i> - $\alpha_{2A}$ -AR	<i>N</i> -terminal	1
$\beta_2$ -AR	-	1
S-EGFP- $\beta_2$ -AR	<i>N</i> -terminal	1
S-FLAG- <i>SNAP</i> - $\beta_2$ -AR	<i>N</i> -terminal	1
S-FLAG- <i>CLIP</i> - $\beta_2$ -AR	<i>N</i> -terminal	1
S-FLAG- <i>CLIP</i> - <i>SNAP</i> -CD86-R	<i>N</i> -terminal	1
pcDNA3	-	Invitrogen

<sup>1</sup> AG Lohse (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg)

**Toxine:**

Name	Bezugsquelle
$\alpha$ -Hemolysin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland); Calbiochem (La Jolla, CA, USA), zur Verfügung gestellt von R. Benz (Universität Bremen, Deutschland); H. Bayley (University of Oxford, England)
Pneumolysin	A. Iliev (Institut für Pharmakologie, Universität Würzburg)

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen, Kits

### Reagenzien für die Zellkultur:

Name	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium (+4,5 g/L Glucose), DMEM	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMEM + Nährfaktor F12, DMEM/F12	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMEM ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DMEM/F12 ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
DPBS-Puffer	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
L-Glutamin	Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Opti-MEM	Invitrogen, Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt)
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt); Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland); Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Poly-D-Lysin	MP Biomedicals (Heidelberg, Deutschland)
Trypsin-EDTA	Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland)

### Medien und Puffer:

Medium	Zusammensetzung
Kulturmedium für HEK 293ad- und HEK 293T-Zellen	DMEM (+4,5 g/L Glucose) 500 ml FKS 10 % (V/V) L-Glutamin 2 mM Penicillin 100 U/ml Streptomycin 0,1 mg/ml

Materialien

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Kulturmedium für CHO-Zellen	DMEM/F12	500 ml
	FKS	10 % (V/V)
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	0,1 mg/ml
Transfektionsmedium für HEK 293ad- und HEK 293T-Zellen	DMEM ohne Phenolrot	500 ml
	FKS	10 % (V/V)
	L-Glutamin	2 mM
Transfektionsmedium für CHO-Zellen	DMEM/F12 ohne Phenolrot	500 ml
	FKS	10 % (V/V)
Einfrriermedium	Kulturmedium	60 % (V/V)
	FKS	30 % (V/V)
	DMSO	10 % (V/V)
LB-Medium	Hefeextrakt	5 g
	Pepton	10 g
	NaCl	10 g
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l
Lösung für Agar-Zellkulturschalen (1,5 %)	Agar	7,5 g
	LB-Medium	500 ml
LB-Medium/LB-Agar mit Ampicillin	LB-Medium/LB-Agar	1 l
	Ampicillin	100 mg
<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
BBS für Calcium-Transfektion (2x)	BES	50 mM
	NaCl	280 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 mM
	pH 6,95 (20 °C)	
5/2 Puffer	Tris-HCl	5 mM
	EDTA	2 mM
	pH 7,4	
Bindepuffer	HEPES	20 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl <sub>2</sub>	10 mM
	pH 7,4	
TAE-Puffer	EDTA	50 mM
	Eisessig	1 M
	Tris-HCl	2 M
	pH 8,0	

## Materialien

Puffer	Zusammensetzung	
Lösung für Agarosegele	TAE-Puffer	
	Agarose	1 % (M/V)
	Ethidiumbromid	0,1 ‰
DNA-Ladepuffer	EDTA	100 mM
	Glycerol	30 %
	Bromphenolblau	0,05 %
	Xylencyanol	0,05 %
KCM-Puffer (5x)	CaCl <sub>2</sub>	150 mM
	KCl	500 mM
	MgCl <sub>2</sub>	250 mM
FRET-Puffer	HEPES	10 mM
	NaCl	140 mM
	KCl	5,4 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
	pH 7,3	
Intrazellular-Puffer [67]	Kaliumaspartat	100 mM
	KCl	30 mM
	NaCl	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	EGTA	5 mM
	HEPES	10 mM
	pH 7,35	
Permeabilisierungs-Puffer (N. Lambert)	Kaliumgluconat	140 mM
	KCl	5 mM
	HEPES	10 mM
	Kalium-EGTA	1 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,3 mM
	pH 7,2	

### Transfektionsreagenzien:

Name	Bezugsquelle
Effectene	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt)
Influx Pinocytotic Cell-loading Reagent	Molecular Probes, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt)

**Kits:**

Name	Bezugsquelle
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
In vitro Fluorescence Cross-Correlation Standard (488-633 nm)	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
In vivo Fluorescence Cross-Correlation Standard (488-633 nm)	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
KAPA Hifi PCR Kit	VWR, peqlab (Erlangen, Deutschland)
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E. coli</i>	Invitrogen, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt)
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Qiaquick Gel Extraktion Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)

**Rezeptorliganden:**

Name	Bezugsquelle
Adenosin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Brimonidin (UK14304)	TOCRIS Bioscience (Bristol, England)
Clonidin	TOCRIS Bioscience (Bristol, England)
CCPA (2-Chlor-N6-Cyclopentyl-Adenosin)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Isoproterenol	TOCRIS Bioscience (Bristol, England)
Noradrenalin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

**Radiochemikalien:**

Name	Bezugsquelle
[ <sup>35</sup> S]GTPγS	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

## Fluorophore, fluoreszierende Reagenzien und sonstige Farbstoffe:

Die in dieser Arbeit verwendeten BG- und BC-Fluorophore wurden alle von New England Biolabs (Frankfurt a. M., Deutschland) bezogen (siehe Kap. 4.1.3). Des Weiteren wurde verwendet:

Name	Bezugsquelle
Alexa Fluor 488 TFP Ester	Molecular Probes, Life Technologies GmbH Deutschland, (Darmstadt)
Bodipy 630/650-X NHS Ester	Molecular Probes, Life Technologies GmbH Deutschland, (Darmstadt)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid	AppliChem (Darmstadt, Deutschland); Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
rGFP	Hölzel Diagnostika (Köln, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

## 2.3 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien, Geräte, Software

### Gebrauchs- bzw. Verbrauchsmaterialien:

Neben herkömmlichem Labor- und Zellkulturbedarf (sterile Werkbank, Inkubatoren, Wasserbad sowie sterile Pipetten, Pipettenspitzen u. ä.) wurde im Speziellen verwendet:

Name	Bezugsquelle
Attofluor-Kammer	Molecular Probes, Life Technologies GmbH Deutschland (Darmstadt)
Deckgläser (Dicke 0,13-0,16 mm)	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Immersionsöl für die Mikroskopie ( $n = 1,52$ )	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Kryoröhrchen	Nunc, Thermo Fisher Deutschland (Schwerte)
Multi-Fach-Zellkulturschalen	Nunc, Thermo Fisher Deutschland (Schwerte)
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld-Superior, über Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (BD Falconröhrchen)	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Reaktionsgefäße (Eppendorf-Tube)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterilfilter	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland); Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Tücher für Mikroskopie	Kimtech Science, über Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Name	Bezugsquelle
Zellkulturschalen	Nunc, Thermo Fisher Deutschland (Schwerte)
Zellschaber	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

### F(C)CS-Aufbau mit konfokaler und evaneszenter Anregung:

Bauteil	Beschreibung	Bezugsquelle
AOTF	AA.AOTF.nC-T 643	AAOpto-Electronic (Orsay, Frankreich)
Detektoren	SPCM-AQR-15-FC	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)
Dichroitische Spiegel	Dual Line Strahlteiler (zt488/640 rpc) Multiphoton SP-Strahlteiler Strahlteiler T 635 LPXR	AHF (Tübingen, Deutschland)
Fasern	460 HP HPSC 25-Custom FG050 LGA FG105-LCA	Thorlabs GmbH Deutschland (Dachau/München)
Fluoreszenzfilter	ET 685/70 HC 525/50	AHF (Tübingen, Deutschland)
Fluoreszenzfilterwürfel	DFM/M	Thorlabs GmbH Deutschland (Dachau/München)
Funktionsgeneratoren	HM8130	Hameq (Mainhausen, Deutschland)
Inverses Mikroskop	Olympus IX 71	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Kollimatoren	F-H10-VIS-FC oder ähnlich  A 20/0,35 M-20x	Newport Spectra-Physics GmbH (Darmstadt, Deutschland) Hund (Wetzlar, Deutschland) Newport Spectra-Physics GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kurzpassfilter		AHF (Tübingen, Deutschland)
Laser	Ti:Sa Chameleon Vision II Cube 640/40 mW	Coherent Deutschland GmbH (Dieburg)
Linsen	Achromatische Doublet-Linse (12,7/31,8) 40 cm Linse	Newport Spectra-Physics GmbH (Darmstadt, Deutschland) Thorlabs GmbH Deutschland (Dachau/München)
Objektive	UPlanSApo 60x/1,2 UPlanSApo 100x/1,4 UAapoN 100x/1,49 TIRF	Olympus (Hamburg, Deutschland)

<b>Bauteil</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Scanning-Tisch	MS 2000	ASI (Eugene, OR, USA)
SHG	Harmonic Generator	Coherent Deutschland GmbH (Dieburg)
Strahlaufweiter	BE03M-A 3X	Thorlabs GmbH Deutschland (Dachau/München)
Translator	x,y,z	Newport Spectra-Physics GmbH (Darmstadt, Deutschland)

**Software:**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Corel DRAW X5	Corel Corporation (Ottawa, Ontario, Kanada)
Graph Pad Prism (V 5)	GraphPad software, Inc. (La Jolla, CA, USA)
ImageJ (V 1.48)	Wayne Rasband, NIH ( <a href="http://rsbweb.nih.gov/ij">http://rsbweb.nih.gov/ij</a> )
Matlab	The Mathworks (Natick, MA, USA)
Origin Pro (9.0)	Origin Lab (Northampton, NA, USA)
<i>PyCorrFit</i> (0.8.7)	<a href="https://github.com/paulmueller/PyCorrFit">https://github.com/paulmueller/PyCorrFit</a> [68]
SymPhoTime 64	Picoquant (Berlin, Deutschland)
<i>u-track</i>	<a href="http://lccb.hms.harvard.edu/software.html">http://lccb.hms.harvard.edu/software.html</a>



# 3 Methoden

## 3.1 Molekularbiologische Methoden

### Standardmethoden

Die folgende Aufstellung zeigt die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Standardmethoden auf. Für weitergehende Informationen wird auf Mülhardt [69] verwiesen.

- **Prokaryote Zellkultur**
- **DNA-Transformation in *E. Coli* nach der KCM-Methode**
- **Test auf Transformationseffizienz**
- **DNA-Präparation**
- **DNA-Konzentrationsbestimmung**
- **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**
- **Agarose-Gelelektrophorese**
- **DNA-Extraktion aus Agarosegelen**
- **Restriktionsverdau von DNA**
- **Ligation von DNA-Fragmenten**

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### Standardmethoden

Das folgende Kapitel stellt eine kurze Zusammenfassung der verwendeten proteinbiochemischen Standardmethoden dar. Eine ausführliche Beschreibung findet sich bei Rehm und Letzel [70].

- **Membranpräparation**

Zellmembranen wurden aus transfizierten HEK293-Zellen (80 % konfluent, 10 cm Zellkulturschale) gewonnen. Nach Abnehmen des Mediums und zweifachem Waschen mit DPBS-Puffer wurden die Zellen mit 5 ml eiskaltem 5/2 Puffer versetzt, mit einem Zellschaber abgelöst und aufgebrochen (Ultra-TURRAX T25, IKA-Werke). Zentrifugation bei 150 x g, 4 °C, 3 min (Rotina 48R, Hettich) trennte Zellmembranen von Zellkernen und intakten Zellen. Die Zellmembranen konnten anschließend durch Ultrazentrifugation bei 119.000 x g, 4 °C, 40 min aus dem Überstand gewonnen werden (Avanti J-25, Beckman). Das so erhaltene Pellet wurde in 1,0 ml Bindepuffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

- **Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch unter Zuhilfenahme des Protein Assays von Bio-Rad nach der Bradford-Methode.

- **[<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindungsassay**

Um zu überprüfen, ob die verwendeten Rezeptor- und G-Protein-Konstrukte physiologisch vollständig aktiv sind, wurde der [<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindungsassay nach Sternweis und Robishaw [71] angewendet. Eine detaillierte Beschreibung der Methode ist bei Kara *et al.* [72] sowie bei Strange zu finden [73].

### 3.3 Zellbiologische Methoden/Zellkultur

#### Standardmethoden

Die folgende Aufzählung stellt kurz die in dieser Arbeit verwendeten Standardmethoden in der Zellkultur dar. Eine detaillierte Beschreibung dieser Techniken liefert Schmitz [74].

- **Lagerung und Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**  
Eukaryotische Zellen wurden zum Zwecke ihrer Langzeitlagerung, suspendiert in Einfriermedium und aliquotiert in Kryoröhrchen, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, die kurzfristige Lagerung erfolgte bei -80 °C. Für die Kultivierung wurden die Zellen rasch im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in dem der jeweiligen Zelllinie entsprechenden, vorgewärmten Komplettmedium suspendiert. Die Dauerkultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C und Begasung mit 5 bzw. 7 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank.
- **Zellpassage**  
Die Zellen wurden, je nach Konfluenz, mehrmals pro Woche mit DPBS-Puffer gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und dem jeweiligen Komplettmedium im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert.
- **Bestimmen der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer**
- **Mykoplasmentest**  
Der Nachweis wurde mittels Amplifikation der Mykoplasmen-DNA durch PCR und anschließende Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

#### Spezifische Methoden

Des Weiteren wurden folgende spezifische Methoden verwendet:

- **Reinigung von Deckgläsern**  
Einzelmolekülexperimente erfordern die Minimierung von Hintergrundfluoreszenz. Deckgläser mit einem Durchmesser von 24 mm wurden hierfür dem von Sungkaworn *et al.* [75] beschriebenen Reinigungsprotokoll unterzogen. Dabei wurden alle Arbeiten, soweit nicht anders angegeben, unter einer sterilen Werkbank ausgeführt:
  - Einsetzen der einzelnen Deckgläser in einen speziellen Deckglashalter mit Hilfe einer sterilen Pinzette
  - Überführen des Deckglashalters in ein steriles Becherglas
  - Befüllen des Becherglases mit Chloroform bis zum vollständigen Überschichten der Deckgläser
  - Reinigung im Ultraschallbad für 1 h bei Raumtemperatur
  - Entnahme der Deckgläser und dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser
  - Trocknen der Deckgläser
  - Befüllen des Becherglases mit 5 M NaOH bis zum vollständigen Überschichten der Deckgläser
  - Reinigung im Ultraschallbad für 1 h bei Raumtemperatur
  - Entnahme der Deckgläser und dreimaliges Waschen mit destilliertem Wasser

- Aufbewahrung der Deckgläser in Ethanol in mit Parafilm versiegelten Glasschalen
- **Beschichten von Deckgläsern mit Poly-D-Lysin**

Um die Adhärenz von HEK 293-Zellen auf Deckgläsern und in Multi-Fach-Schalen zu verbessern, wurden diese mit Poly-D-Lysin beschichtet. Poly-D-Lysin ist ein Polypeptid bestehend aus positiv geladenen Aminosäuren. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Ionen der Zellmembran kann so das ungewollte Ablösen der Zellen von der Deckglas-Oberfläche während der Experimente verringert werden.

Die komplette Oberfläche (Deckgläser, Multi-Fach-Schale, o. ä.) wurde unter Lichtausschluss mit einer entsprechenden Menge Poly-D-Lysin in DPBS-Puffer (0,1 mg/ml) benetzt, für 20 min bei 37 °C inkubiert, die Lösung vorsichtig abgesaugt und die Oberfläche mit DPBS-Puffer gewaschen.
- **Passagieren von Zellen auf Deckgläser**

Die vorbehandelten sterilen Deckgläser wurden in eine 6-Fach-Zellkulturschale platziert und die Zellen auf die Gläser ausgesät, um die Probe für die Mikroskopie vorzubereiten. Nur im Fall der HEK 293-Zellen wurde die zuvor beschriebene Poly-D-Lysin Beschichtung vorgenommen. Die Zellen sollten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 70-80 % aufweisen. Dies wurde beispielsweise erhalten, indem 24 h vor der Transfektion 300.000 Zellen pro Fach ausplattiert wurden [75].
- **Transiente Transfektion**

Um die DNA-Passage durch die Plasmamembran eukaryotischer Zellen zu ermöglichen, wurden die folgenden Transfektionsreagenzien eingesetzt:

  - Effectene für die Transfektion von HEK 293-Zellen:

Die cDNA des zu untersuchenden Zielproteins wurde mit Hilfe des Effectene Transfektionskits (siehe Kap. 2) in HEK 293-Zellen transfiziert. Dabei wurde die Menge an eingesetztem Puffer, Enhancer und Effectene sowie die Transfektionszeit in Abhängigkeit vom geplanten Experiment bestimmt.
  - Calciumchlorid-Methode nach Chen *et al.* [76] für die Transfektion von HEK 293-Zellen.
  - Lipofectamine 2000 für die Transfektion von CHO-Zellen:

Diese Methode wird in Kapitel 4.1.2 detailliert besprochen und zusammengefasst.
- **Permeabilisierung der Zellmembran**

Die Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Strukturen mit Zellmembran-impermeablen Fluorophoren erforderte eine Permeabilisierung der Zellmembran. Hierfür wurden die nachfolgend aufgeführten Substanzen getestet. Die Ergebnisse der Permeabilisierung sind in Kapitel 4.1.3 beschrieben.

  - **Saponine** sind pflanzliche oberflächenaktive Substanzen, welche bereits in der Vergangenheit für die Permeabilisierung von Membranen verwendet wurden [77]. Die eingesetzten Konzentrationen wurden im Bereich von 0,005 bis 0,05 % (M/V)

in Intrazellular-Puffer variiert. Die Inkubationszeiten wurden im Sekunden- bis Minutenbereich getestet.

- **Pneumolysin** ist ein porenbildendes Toxin aus *Streptococcus pneumoniae* [78, 79]. Es wird in Konzentrationen von 0,1 bis 0,2 µg/ml zu Permeabilisierungszwecken eingesetzt und verursacht Poren in der Zellmembran, die einen Durchmesser von ca. 260 Å aufweisen [80].  
Suspendiert in Intrazellular-Puffer wurden verschiedene Konzentrationen an Pneumolysin sowie unterschiedliche Inkubationszeiten getestet.
- **Digitonin**, ein Steroid-Glycosid welches natürlich in den Samen von *Digitalis purpurea* vorkommt, wurde in der Vergangenheit ebenfalls erfolgreich zur Permeabilisierung von Zellmembranen eingesetzt. In der Literatur werden Konzentrationen zwischen 5 µg/ml und 25 µg/ml angegeben [81-83].
- **α-Hemolysin** wird von *Staphylococcus aureus* gebildet und ist ebenfalls ein porenbildendes Toxin. Die Poren sind jedoch Anionen-selektiv und besitzen einen Durchmesser von ca. 1,4 nm. Die Anwendung dieses Toxins zur Zellmembranpermeabilisierung wurde von Qin *et al.* [84] beschrieben.

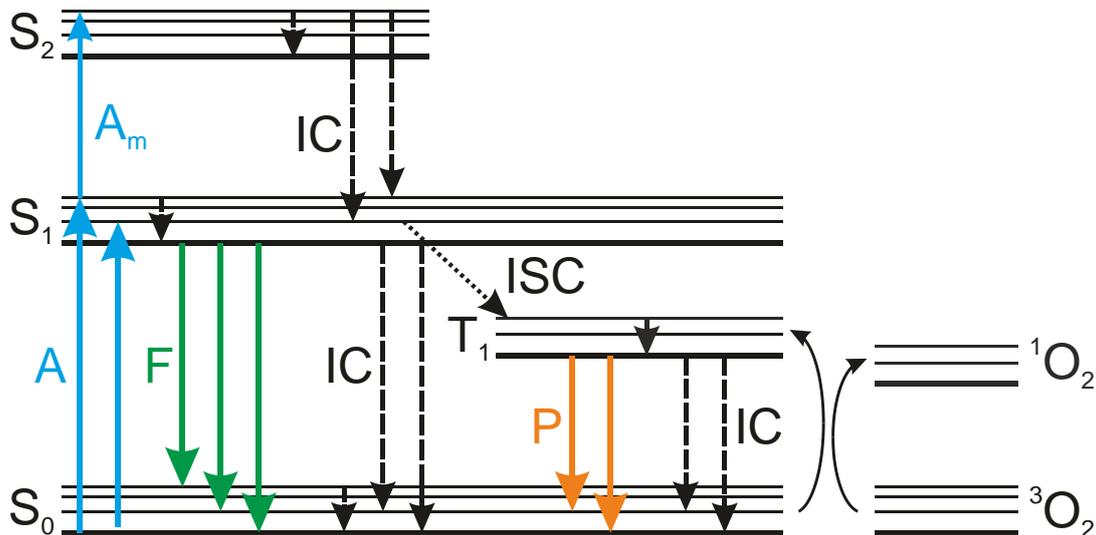
### 3.4 Methoden der Fluoreszenzmarkierung

Durch stetige Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden lässt sich heute ein Großteil von Zielproteinen fluoreszenzmarkieren. Dabei kann das zu untersuchende Protein entweder direkt mit einem fluoreszierenden Protein (FP) fusioniert, oder die dem Zielprotein zugrunde liegende DNA-Information um eine bestimmte Basensequenz erweitert werden, welche für eine spezifische Bindestelle kodiert. In einem zweiten Schritt ist es möglich, diese mit einem Fluorophor zu koppeln.

#### 3.4.1 Grundlagen der Fluoreszenz

Fluoreszenz ist „die Leuchterscheinung mancher Stoffe während sie mit Licht bestrahlt werden“ [85]. Im Jahr 1852 gelang Stokes die Aufklärung der Fluoreszenz: Er zeigte, dass das von einem Molekül absorbierte Licht eine kleinere Wellenlänge besitzt als das emittierte und formulierte die im Anschluss nach ihm benannte Stokes'sche Regel [86].

Das Prinzip der Fluoreszenz lässt sich im Jablonski-Termschema anschaulich darstellen [87-90] (siehe Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Jablonski-Termschema.** Ein Molekül kann durch Anregung ( $A$ , Multiphotonenanregung  $A_m$ ) aus dem Grundzustand  $S_0$  in einen der angeregten Zustände  $S_1$  oder  $S_2$  angehoben werden. Der Übergang zurück in den  $S_0$ -Zustand kann über die Emission von Fluoreszenz ( $F$ ) oder durch interne Umwandlung ( $IC$ ) unter Abgabe von Strahlung erfolgen. Vom angeregten Singulett- in den ersten angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  wird der Übergang als Interkombination ( $ISC$ ) bezeichnet. Der Übergang von  $T_1$  zu  $S_0$  kann über Abgabe der Energie in Form von Phosphoreszenz ( $P$ ) erfolgen. Außerdem kann es zu einer Reaktion mit ebenfalls im Triplett-Zustand befindlichen Sauerstoffmolekülen  $^3O_2$  kommen. Hierbei entsteht der Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$ , welcher für die Oxidation der Fluorophore verantwortlich sein kann. Ähnlich wie in Nishiyama *et al.* [90].

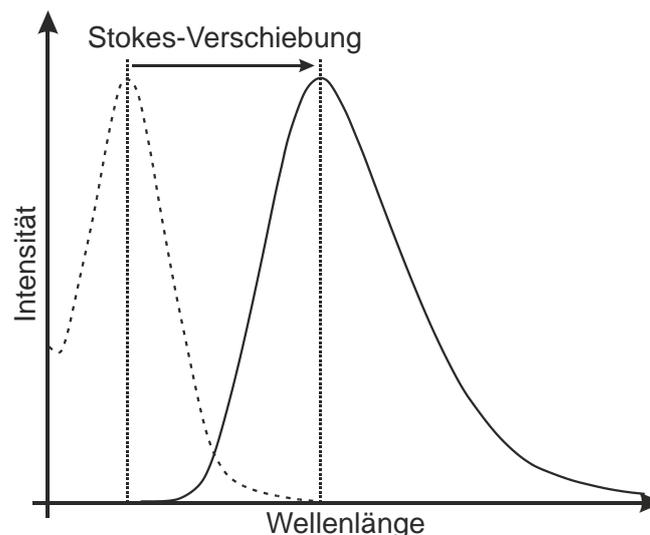
Hat ein Molekül elektromagnetische Strahlung absorbiert, wird sein Elektronensystem aus dem Singulett-Grundzustand  $S_0$  in den angeregten Singulett-Zustand  $S_n$  angehoben. Um in den Grundzustand zurückzukehren, muss wiederum Energie strahlungslos oder unter Emission eines Photons abgegeben werden. Bei strahlungslosen Übergängen wird wie folgt unterschieden:

- **Interkombination** (*intersystem crossing, ISC*)  
Übergang aus dem angeregten Singulett- in einen angeregten, metastabilen Triplett-Zustand unter Umkehr des Elektronenspins. Dieser Vorgang ist für das typische Fluoreszenzblinken verantwortlich. Hier oszilliert der Fluorophor zwischen Singulett- und Triplett-Zustand, wobei der Triplett-Zustand dunkel ist.
- **Interne Umwandlung** (*internal conversion, IC*)  
Übergang aus einer höheren Schwingungsebene des angeregten Singulett- oder Triplett-Zustandes in den ersten angeregten Singulett- oder Triplett-Zustand ohne Umkehr des Elektronenspins. Dieser Übergang macht die charakteristische Breite des Emissions- und Absorptionsspektrums eines Fluorophors aus.

Bei den Übergängen unter Photoemission wird entsprechend unterschieden:

- **Fluoreszenz**  
Übergang aus dem angeregten Singulett-Zustand  $S_n$  in den Grundzustand  $S_0$  unter spontaner Emission eines Photons. Typische Fluoreszenzabklingzeiten liegen dabei im Nanosekunden-Bereich.
- **Phosphoreszenz**  
Übergang aus dem metastabilen Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand unter Emission eines Photons. Typische Relaxationszeiten liegen hier im Millisekunden- bis Stunden-Bereich. Dieser Vorgang findet zugunsten der Fluoreszenz kaum statt, ist folglich nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird nur zur Vollständigkeit erwähnt.

Aufgrund der angeführten strahlungslosen Übergangsmöglichkeiten ist die emittierte Fluoreszenz immer rotverschoben. Dieser Effekt wird auch als Stokes-Verschiebung (*stokes shift*) bezeichnet (siehe Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Stokes-Verschiebung.** Schematische Darstellung von Anregungs- und Emissionsspektrum eines Fluorophors. Aufgrund verschiedener strahlungsloser Übergangsmöglichkeiten ist die emittierte Fluoreszenz energieärmer und somit längerwelliger als die Anregung [86].

Ein Fluorophor wird durch die folgenden Parameter charakterisiert:

- **Fluoreszenzlebensdauer**

Die mittlere Zeit, in welcher sich ein Molekül in einem angeregten Zustand befindet, bis es durch Emission eines Photons in seinen Grundzustand zurückfällt, wird als Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_L$  bezeichnet. Bezeichnet  $k_F$  die Geschwindigkeitskonstante der Fluoreszenz und  $k_S$  die der strahlungslosen Deaktivierung, so gilt [91]:

$$\tau_L = \frac{1}{k_F + k_S}. \quad (3.1)$$

Beschreibt  $I_A$  die Fluoreszenzintensität des Moleküls unmittelbar nach seiner Anregung und  $t$  die Zeit, so gilt für die detektierte Fluoreszenzintensität  $I(t)$  des Moleküls in einem inerten Lösungsmittel die folgende monoexponentielle Zerfallskinetik:

$$I(t) = I_A e^{-\frac{t}{\tau_L}}. \quad (3.2)$$

- **Quantenausbeute** (auch Fluoreszenzausbeute oder Quanteneffizienz,  $QE$ )

Die Quantenausbeute eines Fluorophors gibt das Verhältnis zwischen absorbierten ( $N_a$ ) und emittierten Photonen ( $N_e$ ) an und lässt sich berechnen nach:

$$QE = \frac{N_e}{N_a} = \frac{k_S}{k_F + k_S}. \quad (3.3)$$

- **Extinktionskoeffizient**

Der molare Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  ist eine wellenlängenabhängige Stoffkonstante die angibt, wie viel Licht von einem Fluorophor absorbiert werden kann. Abgeleitet aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist er definiert nach:

$$\epsilon = \frac{E}{cd}, \quad (3.4)$$

wobei  $E$  die Extinktion,  $c$  die Konzentration und  $d$  die Schichtdicke ist [92].

- **Photobleichen/Photostabilität**

Der Begriff Photobleichen bezeichnet den irreversiblen Übergang eines Fluorophors aus dem angeregten in einen Dunkelzustand. Infolgedessen kann das Molekül kein Photon mehr aussenden, es ist „geblichen“. Dies ist ein dynamischer Prozess, der von der Intensität des Anregungslichts abhängt.

Die Photostabilität eines Fluorophors ist dabei von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. So ist zunächst die Art des Fluorophors und speziell seine Molekularstruktur entscheidend. Als äußere Faktoren sind nicht nur die Intensität des Anregungslichts, sondern auch die chemische Umgebung des Fluorophors von Bedeutung. So kann beispielsweise ein Fluorophor in Anwesenheit von Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  oxidiert und nachfolgend nicht mehr zur Fluoreszenz angeregt werden [93]. Wie Abbildung 3.1 zeigt, können Fluorophore im Triplett-Zustand mit ebenfalls im Triplett-Zustand befindlichen

Sauerstoffmolekülen  $^3\text{O}_2$  reagieren. Während der Fluorophor dabei in seinen Grundzustand zurückfällt, entsteht eben dieser Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$ .

Diese Vorgänge beeinflussen die mittlere Anzahl von Anregungs- und Emissionszyklen eines Fluorophors vor seiner Inaktivierung durch Photobleichen. Die Zahl schwankt dabei erheblich zwischen einigen wenigen und mehreren Millionen Zyklen.

Photobleichen ist für die (Einzelmolekül-) Fluoreszenzmikroskopie nachteilig, da es hierdurch zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses kommt [94].

- **Signal-Rausch-Verhältnis**

Das Verhältnis aus der Intensität des gewünschten Signals und dem des unerwünschten (auto-) fluoreszierenden Hintergrundes wird als Signal-Rausch-Verhältnis bezeichnet und berechnet sich nach [95]:

$$\frac{S}{N} = \frac{I_M - I_B}{\sigma}, \quad (3.5)$$

wobei  $I_M$  die Intensität des Moleküls,  $I_B$  die Intensität des Hintergrundes und  $\sigma$  die Standardabweichung von  $I_B$  beschreibt.

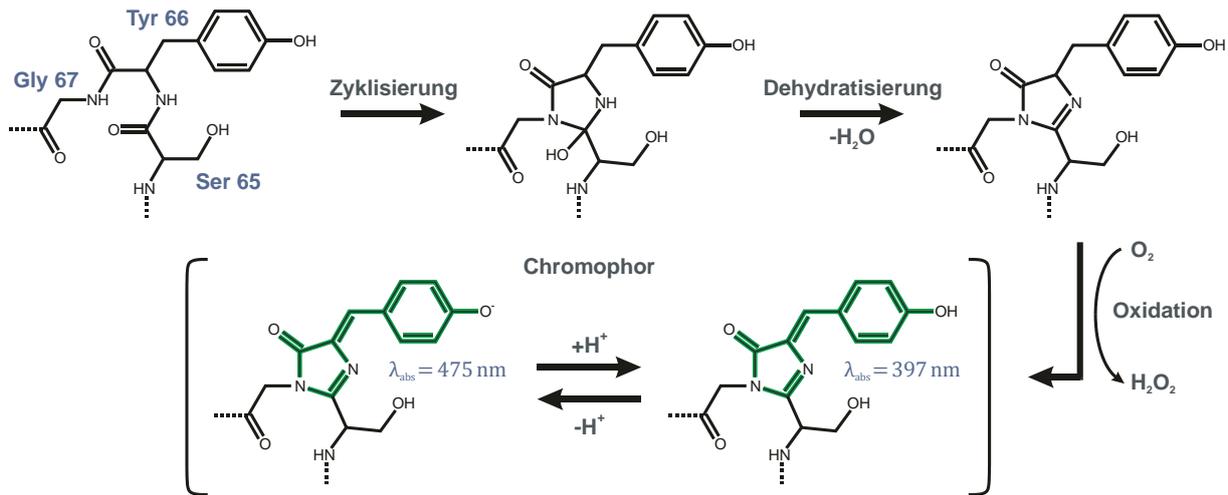
Alle genannten Eigenschaften sollten bei der Auswahl eines geeigneten Fluorophors berücksichtigt werden.

### 3.4.2 Fluoreszierende Proteine

Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) zählt zu den am häufigsten eingesetzten molekularbiologischen Fluoreszenzmarkern [96, 97]. Das aus 238 Aminosäuren bestehende, 27 kDa schwere Protein wurde aus der Qualle *Aequoria victoria* isoliert und 1962 erstmals durch Shimomura *et al.* [98] beschrieben. Die Aufklärung der Struktur sowie des Fluoreszenzmechanismus erfolgte in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts [99, 100]. Die Analyse der Kristallstruktur zeigt eine Fass-ähnliche Struktur aus elf  $\beta$ -Faltblättern mit einem mittig liegenden Fluorophor [101, 102]. Dieser ist ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon, welches durch Zyklisierung, Dehydratisierung und anschließende Oxidation der Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 gebildet wird (siehe Abb. 3.3) [97, 103]. Durch die Fusion der Gensequenz des GFP mit der DNA des zu untersuchenden Proteins konnte gezeigt werden, dass sich so gut wie jedes Protein fluoreszenzmarkieren lässt, ohne Wachstum und Zellfunktion des exprimierenden Organismus einzuschränken [103, 104].

Seit seiner Entdeckung wurden kontinuierlich GFP-Varianten entwickelt, die sich einerseits durch eine verbesserte pH-Stabilität und stärkere Helligkeit auszeichnen, andererseits auch solche, die sich in den Anregungs- und Emissionswellenlängen unterscheiden [105]. Eine bedeutende Mutante ist hierbei das *enhanced GFP* (eGFP), bei welchem durch die Punktmutationen Phe64Leu und Ser65Thr eine verbesserte Proteinfaltung und eine höhere Fluoreszenzintensität erreicht werden konnte [96, 106]. Die Erweiterung des Farbspektrums von grün auf blau (BFP), cyan (CFP) und gelb (YFP) [96] wurde nach der Entdeckung des rot fluoreszierenden Proteins (RFP) in Korallen der Gattung *Discosoma* und dessen Weiterentwicklung bis in den Bereich von rot und tiefrot ergänzt [107-109].

## Methoden



**Abb. 3.3: Der GFP-Chromophor.** Im Inneren der elf  $\beta$ -Faltblätter des GFP bildet sich aus den Aminosäuren Ser65, Tyr66 und Gly67 autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Chromophor aus. Nach Frommer *et al.* [97].

Für die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie sind die fluoreszierenden Proteine aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften nur bedingt geeignet. Sie besitzen im Vergleich zu anderen, kommerziell erhältlichen Farbstoffen eine signifikant geringere Fluoreszenzquantenausbeute und sind wenig photostabil.

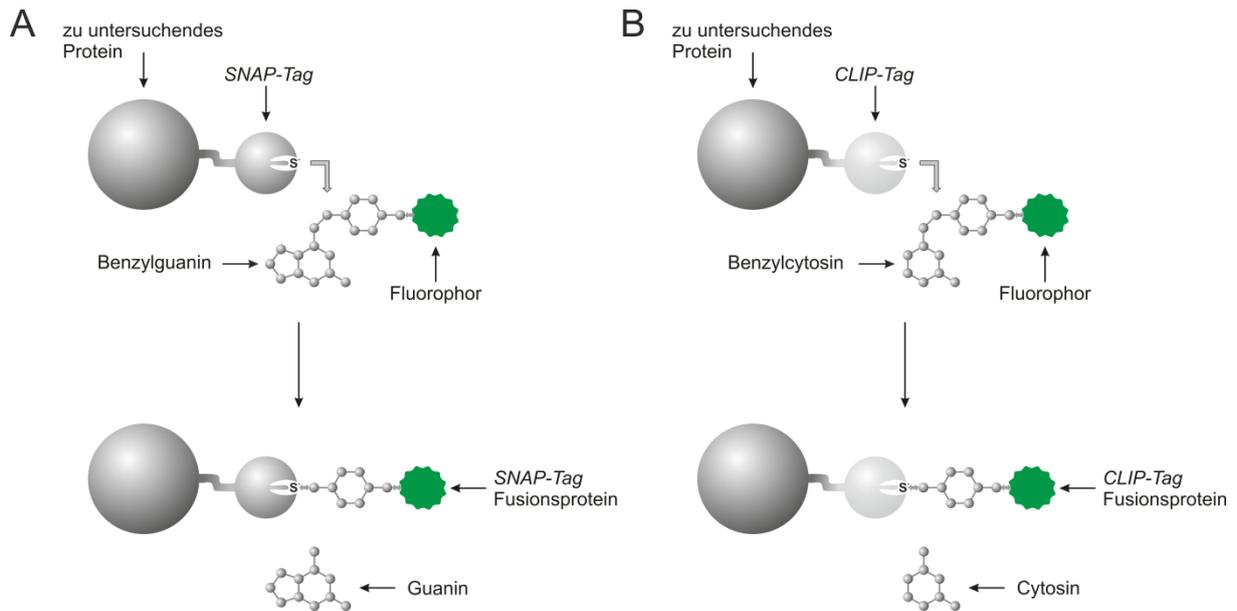
Erstes wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher eine Methode zu etablieren, um Rezeptoren und G-Proteine mit biokompatiblen, photostabilen Fluorophoren mit hoher  $QE$  und großen Extinktionskoeffizienten zu markieren. Hierdurch sollte ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis während der Messungen erreicht werden (siehe auch Kap. 4.1).

### 3.4.3 Fluoreszenzmarkierung mit SNAP/CLIP-Farbstoffen

Eine weitere Möglichkeit der Fluoreszenzmarkierung, neben der Expression als fluoreszierendes Fusionsprotein, besteht in der Anbindung eines Fluoreszenzfarbstoffs über einen sogenannten *Protein-Tag*. In diesem Fall wird nur das zu untersuchende Protein gemeinsam mit der Bindestelle für einen Farbstoff exprimiert. Das so entstandene Fusionsprotein ist folglich noch nicht farbig. In einem zweiten Schritt wird das Farbstoffmolekül an diese Bindestelle gekoppelt.

In dieser Arbeit wurde der *SNAP-Tag*, ein 19,4 kDa großes Polypeptid, verwendet [110]. Seine Struktur basiert auf einem DNA-Reparaturprotein, der humanen  $\text{O}^6$ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase [111]. Als Substrate für den *SNAP-Tag* dienen Fluorophore, die an ein Benzylguanin konjugiert sind. Es sind sowohl kommerzielle Substrate erhältlich, die extrazellulär an den *SNAP-Tag* binden, als auch solche, die die Zellmembran überwinden können und daher Bindestellen erreichen, die sich im Inneren einer Zelle befinden. Somit wird auch das Markieren intrazellulärer Strukturen möglich. In der eigentlichen Markierungsreaktion wird die substituierte Benzylgruppe des Substrates kovalent an den *SNAP-Tag* gebunden (siehe Abb. 3.4 A).

In Analogie zum *SNAP-Tag* steht der *CLIP-Tag*. Er wurde durch gezielte Manipulation der Substratspezifität des *SNAP-Tags* erhalten, wodurch er spezifisch mit  $\text{O}^2$ -Benzylcytosin-Derivaten reagiert [112]. Der Reaktionsmechanismus der Färbereaktion verläuft analog zu dem des *SNAP-Tags* (siehe Abb. 3.4 B).



**Abb. 3.4: Fluoreszenzmarkierung mit der SNAP/CLIP-Methode.** Das zu untersuchende Protein wird als Fusionsprotein mit dem SNAP- (A) bzw. CLIP-Tag (B) exprimiert. Durch eine kovalente Bindungsreaktion mit einem Benzylguanin bzw. Benzylcytosin-Fluorophor wird das Protein fluoreszenzmarkiert. Nach New England Biolabs [113].

In dieser Arbeit wurde das Protokoll der SNAP/CLIP-Markierung erweitert und für die Anwendung an Rezeptoren und G-Proteinen angepasst. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt in Kapitel 4.1.

## 3.5 Fluoreszenzverfahren

### 3.5.1 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-M)

Um Rezeptoren und G-Proteine in der Zellmembran mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis darstellen zu können, bietet die Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF-M) Vorteile gegenüber der Konfokalmikroskopie. Die Fluoreszenzanregung erfolgt gezielt im Bereich der basalen Zellmembran, während weiter entfernte Strukturen nicht angeregt werden (siehe Abb. 3.5). Im Nachfolgenden wird das zugrunde liegende Prinzip der TIRF-M erläutert, die Anwendung zur Untersuchung von Rezeptoren und G-Proteinen ist in Kapitel 4.2 beschrieben.

Die Interne Totalreflexionsfluoreszenz (TIRF) wurde erstmals von Ambrose [114] beschrieben, die TIRF-M von Axelrod *et al.* etabliert und ausführlich charakterisiert [115-117]. Grundlage der TIRF-M bildet dabei die folgende physikalische Gesetzmäßigkeit:

Geht ein Lichtstrahl von einem optisch dichteren (Brechungsindex  $n_2$ , Immersionsöl und Deckglas) in ein optisch dünneres Medium (Brechungsindex  $n_1$ , Probe) über, wird dieser an der Grenzfläche gebrochen. Nach dem Snellius'schen Brechungsgesetz berechnet sich in Abhängigkeit von den einzelnen optischen Dichten  $n_1$  und  $n_2$  ( $n_2 > n_1$ ) ein kritischer Winkel  $\theta_c$  [118]:

$$\theta_c = \sin^{-1} \frac{n_1}{n_2}. \quad (3.6)$$

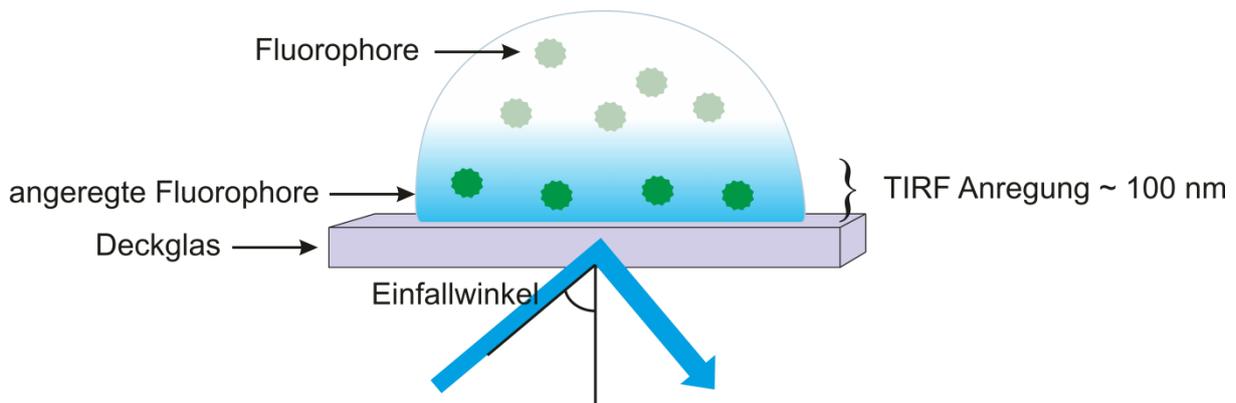
Wird dieser Winkel überschritten, kommt es zu Totalreflexion des Lichts am optisch dünneren Medium und es bildet sich ein abklingendes, sogenanntes evaneszentes Feld aus. Dessen Intensität  $I$  nimmt exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche ( $z$ ) ab und kann für jede Position von  $z$  wie folgt beschrieben werden [116]:

$$I(z) = I_0 e^{\frac{-z}{d_{eva}}}. \quad (3.7)$$

Hier beschreibt  $I_0$  die Intensität des evaneszenten Feldes an der Grenzfläche bei  $z = 0$  und  $d_{eva}$  die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes, welche genau der Entfernung zur Grenzfläche entspricht, bei der die Anregungsintensität auf  $1/e$  gesunken ist [119]. Dabei ist  $d_{eva}$  definiert als:

$$d_{eva} = \frac{\lambda_0}{4\pi} (n_2^2 \sin^2 \theta - n_1^2)^{-\frac{1}{2}}, \quad (3.8)$$

wobei  $\lambda_0$  die Anregungswellenlänge im Vakuum und  $\theta$  der Einfallswinkel in die Probe ist. Bei Anregung im sichtbaren Spektralbereich liegen typische Eindringtiefen in die Probe zwischen 100 und 200 nm. Daher werden nur die Moleküle zur Fluoreszenz angeregt, die sich nahe am Deckglas befinden. Die Hintergrundfluoreszenz ist stark reduziert, woraus ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis resultiert.



**Abb. 3.5: Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie.** Durch Totalreflexion des Lichtstrahls an der Grenzfläche zwischen Deckglas und zu untersuchender Probe entsteht ein evaneszentes Feld. Die Lichtintensität sinkt mit zunehmender Eindringtiefe ab. Daher werden Moleküle in der basalen Zellmembran zur Fluoreszenz angeregt, das Hintergrundrauschen aus dem Zellinneren wird stark reduziert.

### 3.5.2 Einzelmolekülverfolgung

Die alleinige bildliche Darstellung von Rezeptoren und G-Proteinen mittels Einzelmolekülaufklärung erlaubt noch keine Aussage über Dynamiken und spezielle molekulare Mechanismen. Um Daten aus TIRF-M-Experimenten interpretieren zu können, fand die Methode der Einzelmolekülverfolgung (*single particle tracking*, SPT) Anwendung. Sie beschreibt ein physikalisches Verfahren der Bewegungsanalyse einzelner Partikel in einem Medium (z. B. Lösung, Zytosol, Plasmamembran) [120-122]. Die jeweiligen  $x, y, z$ -Koordinaten einer einzelnen Partikel detektiert über einen definierten Zeitraum werden hierbei als Trajektorie (*trajectory*) bezeichnet. Neben der direkten Lokalisierung einzelner Moleküle wird somit auch die Beobachtung ihrer Bewegung möglich.

In der Vergangenheit sind verschiedene Algorithmen für die Einzelmolekülverfolgung entwickelt worden. Methoden der automatisierten Objekterkennung und -verfolgung sind vielfach beschrieben und wurden von Cheezum *et al.* [95] und Chenouard *et al.* [123] zusammengefasst und hinsichtlich der wichtigsten Parameter verglichen.

Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz zur Datenauswertung stammt von Jaqaman *et al.* [124] und wurde von Calebiro *et al.* [125] um weitere Algorithmen ergänzt. Die Grundlagen werden im Folgenden vorgestellt.

#### 3.5.2.1 Partikeldetektion

Die Lokalisation einer einzelnen beugungslimitierten Partikel im Subpixel-Bereich lässt sich berechnen, indem eine zweidimensionale (2D) Gauß-Funktion mit der Standardabweichung der Punktspreizfunktion des Mikroskops an das gemessene Intensitätsprofil angepasst wird [125-127]. Die Gleichung einer 2D-Gauß-Kurve in ihrer allgemeingültigen Form lautet [95]:

$$f(x, y) = Ae^{\left[-\frac{(x-x_0)^2+(y-y_0)^2}{B}\right]}, \quad (3.9)$$

wobei  $A$  und  $B$  Konstanten sind. Im einfachsten Fall entspricht das Zentrum der Gauß-Funktion  $(x_0, y_0)$  dem Peak der Punktspreizfunktion und damit dem Ort der Punktlichtquelle. Die Exaktheit der Lokalisation hängt vom gemessenen Intensitätsprofil ab, seine Minimalanforderung kann aus dem *Nyquist-Shannon-Abtasttheorem* abgeleitet werden [128]. Die Auswahl der lokalen Intensitätsmaxima, an welche die Gauß-Funktion angepasst werden soll, ist insbesondere bei niedrigem Signal-Rausch-Verhältnis von großer Bedeutung. Das *Rayleigh-Kriterium*

$$r = 0,61 \frac{\lambda}{NA} \quad (3.10)$$

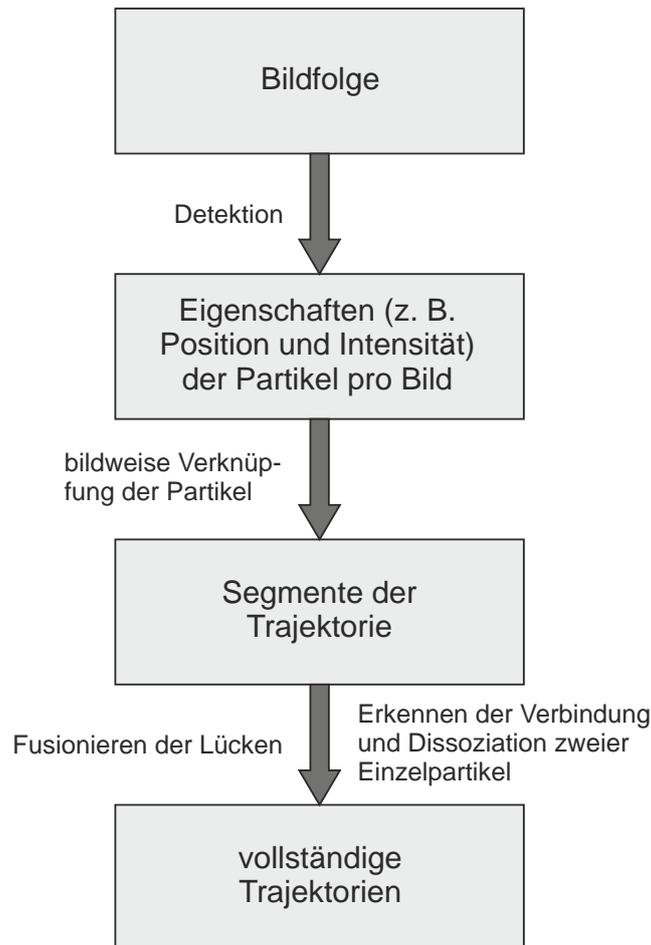
muss erfüllt sein, um zwei Punktlichtquellen als räumlich getrennte Partikel zu detektieren [129]. Hierbei bezeichnet  $r$  den Abstand zweier punktförmiger Objekte,  $\lambda$  die Anregungswellenlänge und  $NA$  die Numerische Apertur des Objektivs.

### 3.5.2.2 Partikelverfolgung

Um eine Partikel im zeitlichen Verlauf verfolgen zu können (*tracking*), müssen die zuvor bestimmten einzelnen Koordinaten zu einer Trajektorie zusammengefügt werden. Der Ansatz nach Jaqaman *et al.* [124] basiert auf der Idee des Multi-Hypothesen-Ansatzes zur Partikelverfolgung (*multiple-hypothesis tracking*, MHT) [130]. Er beruht darauf, dass die für jede Partikel detektierten  $x, y$ -Koordinaten in jedem einzelnen Bild zu allen möglichen (unter Berücksichtigung des zu erwartenden Partikelverhaltens) Trajektorien innerhalb der gesamten Bildfolge verknüpft werden. Dabei werden nur die Trajektorien verwendet, die zu keinem Zeitpunkt die gleiche Partikel verknüpft haben wie andere; alle anderen werden aussortiert. Diese Lösung wird als räumlich-zeitlich global optimal bezeichnet. Das Vorgehen ist mit einem außerordentlich hohen Rechenaufwand verbunden, weshalb Algorithmen entwickelt wurden, die effizienter sind und ein hinreichend an den Multi-Hypothesen-Ansatz angenähertes Ergebnis der Partikelverfolgung liefern [124]. Sie wurden unter anderem von Cheezum *et al.* [95] und Chenouard *et al.* [123] zusammengefasst, auf deren Arbeiten hier verwiesen wird.

Der von Jaqaman *et al.* [124] beschriebene Algorithmus verwendet das lineare Zuordnungsproblem (*linear assignment problem*, LAP) [131], um die in anderen Algorithmen beobachteten Probleme beheben zu können (vgl. Abb. 3.6): Zunächst werden die detektierten Partikel zwischen direkt aufeinanderfolgenden Bildern einer Bildfolge miteinander zu Teilstücken der Trajektorie verknüpft. In einem zweiten Schritt werden diese Teilstücke in räumlich-zeitlicher Nähe zusammengefügt, um Lücken zu schließen (*gap closing*). Dies ist für die Untersuchung von Rezeptoren und G-Proteinen hilfreich, da sie in der Membran verankert sind. Aber auch Vorgänge wie das Verbinden oder das Dissoziieren zweier Partikel können detektiert werden, was es erlaubt, die Rezeptor-Dimerisierung oder die Interaktion eines Rezeptors mit seinem nachgeschalteten G-Protein zu erkennen. Auch der umgekehrte Fall, die Trennung von dimerisierten Rezeptoren bzw. die Dissoziation des Rezeptor-G-Protein-Komplexes, ließe sich so aufklären. Des Weiteren kann das Erscheinen einer neuen oder das Verschwinden einer zuvor detektierten Partikel innerhalb der Bildfolge erkannt werden [125]. Dies würde beispielsweise dem Herein- oder Heraustreten eines markierten Rezeptors oder G-Proteins in das Detektionsvolumen oder einem Bleichereignis entsprechen.

## Methoden



**Abb. 3.6: Partikeldetektion und -verfolgung.** Jedes Einzelbild einer Bildfolge wird analysiert und die Einzelmoleküle detektiert. Diese Einzelmoleküle werden in einem nächsten Schritt bildweise verknüpft. Die so erhaltenen Trajektoriensegmente werden zusammengefügt. In diesem Schritt wird auch die Erkennung von Verbindungs- und Dissoziationsprozessen ermöglicht. Nach Jaqaman *et al.* [124].

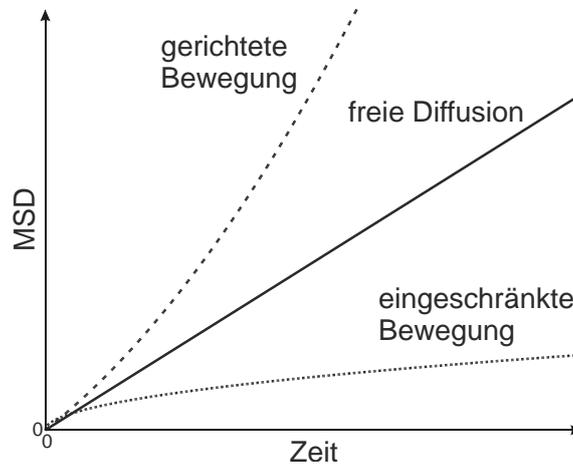
### 3.5.2.3 Charakterisierung der Diffusion

Um die Diffusionskoeffizienten bestimmen zu können, muss zunächst analysiert werden, welche Strecke ein Molekül im Mittel über eine definierte Zeit  $\Delta t$  zurücklegt. Diese sogenannte mittlere quadratische Verschiebung (*mean square displacement*, MSD) berechnet sich nach:

$$MSD(\Delta t) = \frac{1}{N_S} \sum_{i=1}^{N_S} [(x_{i+\Delta t} - x_i)^2 + (y_{i+\Delta t} - y_i)^2]. \quad (3.11)$$

Hier bezeichnet  $N_S$  die Anzahl der ausgewerteten Schritte,  $x, y$  sind die  $x, y$ -Koordinaten des Moleküls in dem jeweiligen Bild mit dem Index  $i$ . Die Art der Bewegung der Moleküle in der Membran kann durch die Betrachtung der MSD über die Zeit und einem entsprechenden Kurvenfit bestimmt werden. Klassischerweise lassen sich so Brown-Molekularbewegungen (freie Diffusion) von nicht-Brown-Molekularbewegungen unterscheiden [122]. Wie Abbildung

3.7 zeigt, ist ein annähernd linearer Zusammenhang ein Hinweis auf freie Diffusion, während ein parabelförmiger Verlauf eine gerichtete Bewegung andeutet. Zeigt die Funktion eine monotone Steigung mit dem prinzipiellen Verlauf ähnlich dem einer Wurzelfunktion, so deutet dies auf eine eingeschränkte Bewegung hin [132].



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung der MSD als Funktion über die Zeit. Detaillierte Beschreibung siehe Text. Nach Martin-Fernandez & Clarke [132].

Wie von Calebiro *et al.* [125] gezeigt werden konnte, verhalten sich die MSD der Rezeptoren aufgetragen über die Zeit linear, das heißt es kann von freier Diffusion ausgegangen werden. Daher lassen sich die Diffusionskoeffizienten direkt aus der MSD berechnen [122]:

$$MSD = 4Dt. \quad (3.12)$$

### 3.5.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS)

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine weitere räumlich und vor allem zeitlich hochauflösende spektroskopische Technik, welche die Untersuchung von Rezeptoren in der Zellmembran erlaubt. Im Gegensatz zu bildgebenden Fluoreszenzverfahren ist hier jedoch nicht die Fluoreszenzintensität selbst von Bedeutung, sondern die statistische Auswertung spontan auftretender Intensitätsfluktuationen in einem submikrometergroßen Detektionsvolumen. So lassen sich beispielsweise Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten, aber auch inter- sowie intramolekulare Reaktionen von fluoreszenzmarkierten Rezeptoren und G-Proteinen untersuchen [133].

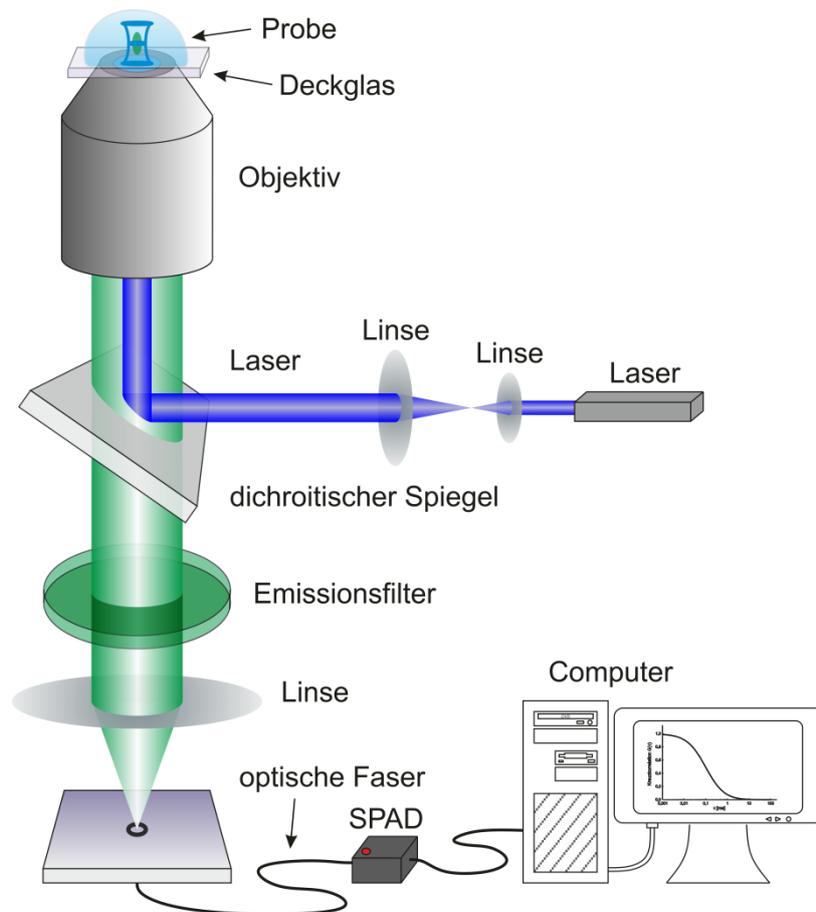
Die FCS wurde 1972 von Magde *et al.* [134] erstmals beschrieben und in den darauffolgenden Jahren stetig weiterentwickelt [135-138]. Die Anwendungsmöglichkeiten der FCS sind heute breit gestreut. Neben Diffusionsmessungen in Lösung können dynamische Prozesse auch in Zellen beobachtet werden, wobei sowohl Vorgänge im Zytosol [139], als auch in der Zellmembran [140, 141] analysiert werden können. Auch die Anwendung an mehrzelligen Organismen wurde beschrieben [142]. Diese Fortschritte wurden durch zahlreiche technische Erweiterungen wie der *scanning* FCS [143], der Zweiphotonen-

anregung [144, 145], der TIR-FCS [146-149] oder der STED-FCS [150, 151] ermöglicht. Eine ausführliche Zusammenfassung dieser Techniken ist bei Ries *et al.* [133] zu finden.

Nachstehend werden die grundlegenden Prinzipien der F(C)CS besprochen. Die Etablierung eines Zweifarben-Aufbaus mit konfokaler und evaneszenter Anregung sowie die Anwendung zur Untersuchung von Rezeptoren und G-Proteinen werden in Kapitel 4.4 beschrieben.

### 3.5.3.1 FCS-Aufbau

Um das für die FCS grundlegend benötigte Detektionsvolumen im Submikrometer-Maßstab zu erzeugen, wird üblicherweise auf einen konfokalen Mikroskopie-Aufbau zurückgegriffen (siehe Abb. 3.8) [133].



**Abb. 3.8: Schematische Darstellung eines konfokalen FCS-Aufbaus.** Über einen dichroitischen Spiegel wird das Anregungslicht rückseitig in ein Objektiv hoher Numerischer Apertur eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv eingesammelt und passiert den dichroitischen Spiegel sowie einen Emissionsfilter. Über eine optische Faser wird das Fluoreszenzlicht auf den Detektor fokussiert. Die ankommenden Photonen werden in digitale Pulse umgewandelt und mittels computergesteuerter Korrelationselektronik ausgewertet. Ähnlich wie in Schwille und Haustein [152].

In der Konfokalmikroskopie wird, im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie, nur ein sehr kleiner Bereich der Probe beleuchtet und die emittierte Fluoreszenz detektiert. Den instrumentellen Grundkörper bildet ein gewöhnliches inverses Lichtmikroskop. Dem Prinzip der Epi-

Illumination folgend wird paralleles Laserlicht über einen dichroitischen Spiegel rückseitig in ein Objektiv mit hoher Numerischer Apertur eingekoppelt und auf die Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Fluoreszenzsignal wird anschließend von demselben Objektiv eingesammelt und durch den dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt. Das Fluoreszenzlicht kann dann entweder nach der Passage der Tubuslinse und der Lochblende oder durch Einkopplung unter Zuhilfenahme einer optischen Faser konfokal auf einem Detektor abgebildet werden. Dieser registriert die ankommenden Photonen, wandelt sie in digitale Pulse um und gibt diese an eine computergesteuerte Korrelationselektronik weiter. Bei der anschließenden Datenauswertung wird nun nicht die Fluoreszenzintensität per se, sondern deren Fluktuation im Volumenelement untersucht. Die hierfür verwendete mathematische Operation ist die zeitliche Korrelationsanalyse.

### 3.5.3.2 Prinzip der Korrelationsanalyse

Aufgrund der Fluktuation der Teilchenzahl bzw. der Konzentration an fluoreszenzmarkierten Molekülen in dem beschriebenen Volumenelement, kommt es zu Fluktuationen im Fluoreszenzsignal  $F(t)$ , die wie folgt beschrieben werden können:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle, \quad (3.13)$$

mit

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T_{ges}} \int_0^T F(t) dt, \quad (3.14)$$

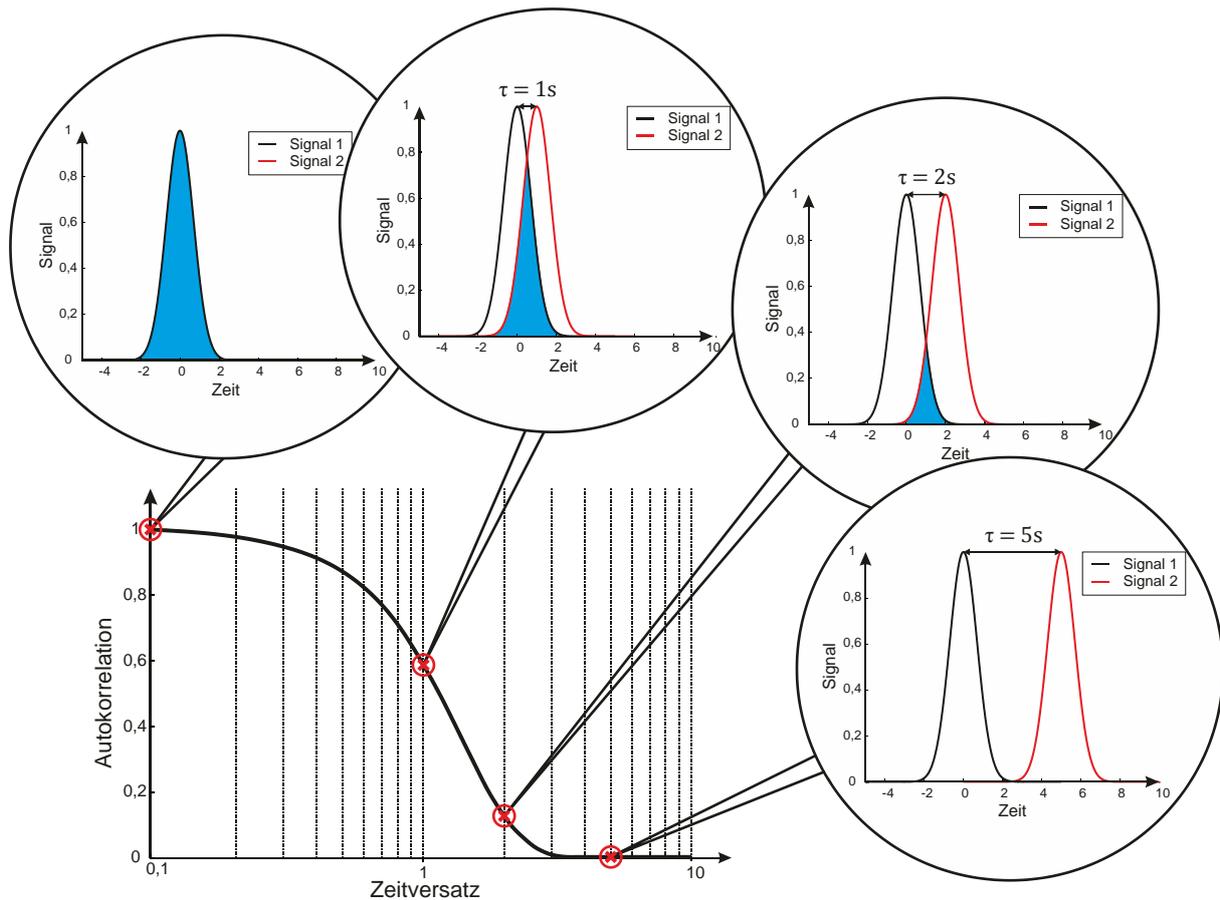
wobei  $T_{ges}$  die Gesamtzeit der Datenerfassung beschreibt [153].

#### **Autokorrelationsfunktion**

Aus den Fluktuationen im Fluoreszenzsignal lässt sich nun, wie in Abbildung 3.9 gezeigt, eine Autokorrelationskurve entwickeln.

Befindet sich zum Zeitpunkt  $t$  ein fluoreszenzmarkiertes Molekül am Punkt A und ist  $\tau$  die Verzögerungszeit, so lässt sich mit Hilfe der sogenannten Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  die Wahrscheinlichkeit beschreiben, dieses zum Zeitpunkt  $t + \tau$  am Punkt A' detektieren zu können:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1 = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}. \quad (3.15)$$



**Abb. 3.9: Schema der Entwicklung einer Korrelationskurve.** Die Fluktuationen im Fluoreszenzsignal können durch zeitliche Autokorrelation der detektierten Signalintensitäten quantifiziert werden. Das Ergebnis ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit des Signals. Zu Beginn der Messung ( $\tau = 0$ ) überdecken sich die Originalkurve und die zeitversetzte Kurve zeitlich komplett, es herrscht maximale Selbstähnlichkeit. Im weiteren Zeitversatz werden die beiden Kurven zeitlich weiter getrennt, das Auslesen von charakteristischen Diffusionszeiten wird ermöglicht. Sind beide Kurven zeitlich vollständig getrennt, fällt die Autokorrelationskurve auf einen Wert von 0 ab. Nach Schwille und Haustein [152].

Wird  $G(\tau)$  einfach logarithmisch über die Zeit aufgetragen, resultiert eine Kurve, wie sie in Abbildung 3.10 dargestellt ist. Anhand dieser lassen sich nun zwei charakteristische Parameter analysieren, die zugrunde liegende molekulare Mobilität über den hyperbolischen Abfall der Korrelationsfunktion (Dynamik der Fluktuation) und die mittlere Anzahl der Moleküle über die Amplitude der Autokorrelationsfunktion (Stärke der Fluktuationen). Ist das Volumenelement bekannt und konstant, ist außerdem eine Konzentrationsbestimmung möglich.

- **Dynamik der Fluktuation:** Die Zeit, welche die Moleküle benötigen, um durch das Anregungsvolumen zu diffundieren, wird als Diffusionszeit  $\tau_D$  durch das Volumenelement bezeichnet. Ist die Größe des Volumenelements genau bestimmt worden, ist es möglich, den Diffusionskoeffizienten des Moleküls zu berechnen (siehe Kap. 4.4).

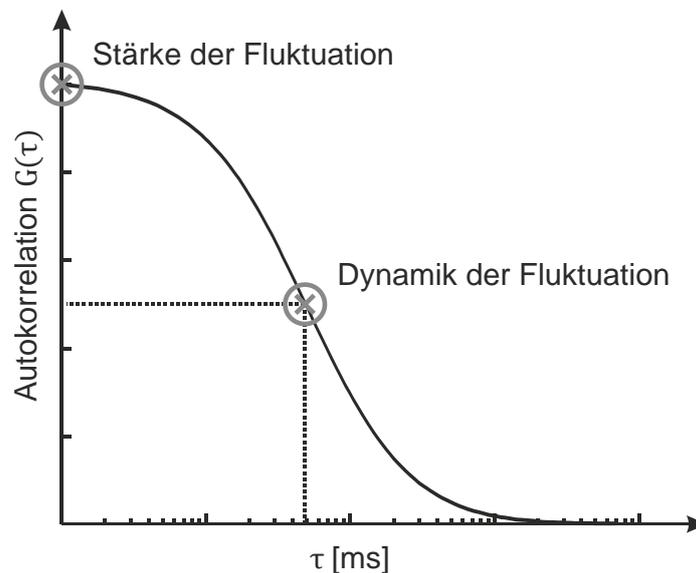
- **Stärke der Fluktuation:** Die Amplitude  $G(0)$  entspricht bei einem konstanten Volumenelement der mittleren Konzentration der detektierten Moleküle. Im Speziellen sind die Fluktuationen Poisson-verteilt, d. h. die Varianz ist gleich dem Erwartungswert selbst:

$$W(N) = \frac{\nu^N}{N!} e^{-\nu}. \quad (3.16)$$

Hierbei entspricht der diskrete Parameter  $N$  der Molekülzahl und  $\nu$  der erwarteten Anzahl von Molekülen im Beobachtungszeitraum.

Für  $\tau = 0$  entspricht die Amplitude der Korrelationsfunktion somit der reziproken Molekülzahl:

$$G(0) = \frac{\langle \delta N^2(t) \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{\langle N \rangle}{\langle N \rangle^2} = \frac{1}{\langle N \rangle}. \quad (3.17)$$



**Abb. 3.10: Die Autokorrelationskurve.** Beispielhafte Darstellung einer Autokorrelationskurve frei diffundierender fluoreszierender Moleküle in wässriger Lösung. Der hyperbolische Abfall der Kurve erlaubt die Charakterisierung der Mobilität der Moleküle und das Auslesen von Diffusionszeiten  $\tau_D$ . Die Amplitude ist ein direktes Maß für die Stärke der Fluktuationen und ermöglicht die Bestimmung der mittleren Molekülzahl  $N$ .

### Diffusion

Ausgehend von der Brown-Molekularbewegung als Ursache für die auftretenden Fluoreszenzfluktuationen können diese durch räumliche Integration der Konzentrationsänderung  $\delta c(\vec{r}, t)$ , multipliziert mit der Wahrscheinlichkeitsfunktion  $\Phi(\vec{r})$ , bestimmt werden [154]:

$$\delta F(t) = \iiint_V \Phi(\vec{r}) \delta c(\vec{r}, t) dV. \quad (3.18)$$

Die Konzentrationsschwankungen lassen sich durch das Zweite Fick'sche Gesetz beschreiben [154, 155]:

$$\frac{\partial \delta c(\vec{r}, t)}{\partial t} = D \vec{\nabla}^2 \delta c(\vec{r}, t). \quad (3.19)$$

Die Wahrscheinlichkeitsfunktion  $\Phi(\vec{r})$ , auch als Moleküldetektionsfunktion (*molecule detection function*, MDF) bezeichnet, ist zeitunabhängig und legt die Ausdehnung des Beobachtungsvolumens fest. Diese kann als Lorentz-förmig in axialer und gaußförmig in radialer Richtung beschrieben werden [137]. Für die konfokale Anregung konnte gezeigt werden, dass diese bei kleinen Lochblenden mit einer dreidimensionalen (3D) Gauß-Funktion angenähert werden kann [137, 152, 156, 157]:

$$\Phi(\vec{r}) = e^{-2\frac{(x^2+y^2)}{\omega_0^2}} e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}}. \quad (3.20)$$

Hierbei entspricht  $\omega_0$  der radialen und  $z_0$  der axialen Ausdehnung, bei der die Intensität der approximierten Gauß-Funktion auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Dabei ist  $\omega_0$  abhängig von der Größe des Laserfokus' und damit von der  $NA$  des verwendeten Objektivs,  $z_0$  von der Größe der Lochblende vor dem Detektor. Beide Größen lassen sich zu dem Strukturparameter  $\kappa$  zusammenfassen:

$$\kappa = \frac{z_0}{\omega_0}. \quad (3.21)$$

Unter der Annahme, dass nur *eine* Molekülspezies durch das Volumenelement hindurch diffundiert, lässt sich die Autokorrelationsfunktion wie folgt beschreiben [137, 154, 158, 159]:

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} = G(0) Di. \quad (3.22)$$

$G(0)$  entspricht hierbei der Amplitude zum Zeitpunkt  $\tau = 0$  und somit, nach Gleichung (3.17), der reziproken Molekülzahl  $N$ . Diese lässt sich berechnen nach:

$$N = c V_{eff}, \quad (3.23)$$

wobei  $c$  der Konzentration und  $V_{eff}$  dem effektiven Volumenelement entspricht, welches nach [152] berechnet werden kann:

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z. \quad (3.24)$$

Die Diffusionszeit  $\tau_D$  ist abhängig vom Radius  $\omega_0$  in der  $x, y$ -Ebene und steht mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  in folgendem Zusammenhang:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D}. \quad (3.25)$$

Setzt sich das zu untersuchende System jedoch aus *mehreren* verschiedenen Molekülspezies zusammen, die nicht miteinander wechselwirken und die eine identische Fluoreszenzcharakteristik besitzen, ergibt sich die globale Korrelationsfunktion des Systems  $G_{tot}(\tau)$  aus der Summe der Korrelationsfunktionen der einzelnen Spezies [160-162]:

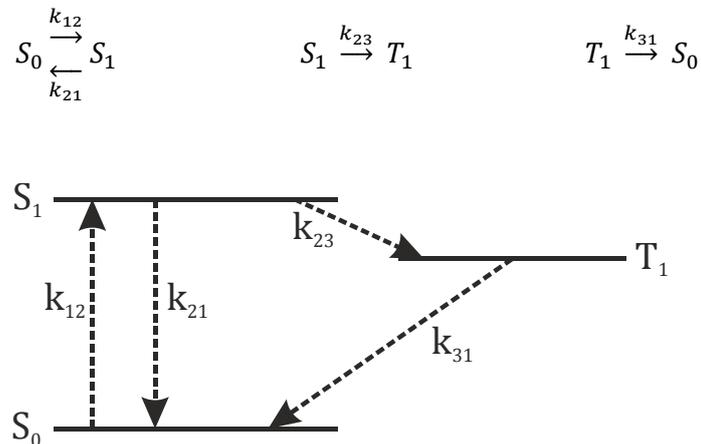
$$G_{tot}(\tau) = \sum_i G_{Di}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^Z \frac{N_i}{N_{tot}} Di, \quad (3.26)$$

mit  $Di$  aus Gleichung (3.22),  $\tau_i$  dem Diffusionszeit nach Gleichung (3.25) für die entsprechende Molekülspezies  $i$  und  $\frac{N_i}{N_{tot}}$  dem Anteil dieser an der gesamten Molekülzahl  $N_{tot}$ .

### Photodynamik

Fluktuationen im Fluoreszenzsignal werden nicht ausschließlich durch die Diffusion von Molekülen durch das Volumenelement verursacht. Auch andere Prozesse wie Triplett-Zustände oder Photobleichen, welche eine Änderung der Fluoreszenzintensität hervorrufen können, werden in der FCS detektiert [163].

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben kann das Elektronensystem eines Moleküls, welches sich in einem angeregten Singulett-Zustand befindetet, unter Umkehr seines Spins strahlungslos in einen angeregten Triplett-Zustand übergehen. Dieser Vorgang ist zwar quantenmechanisch verboten, tritt aber dennoch, wenn auch sehr langsam, auf. Die Geschwindigkeitskonstanten der verschiedenen Übergänge können wie folgt beschrieben werden [164] (siehe Abb. 3.11):



**Abb. 3.11: Vereinfachtes Jablonski-Termschema mit Darstellung der jeweils relevanten Übergänge.** Nach Widengren *et al.* [164].

Während der Übergangsabfolge  $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $S_1 \rightarrow T_1$ ,  $T_1 \rightarrow S_0$  kann ein Molekül nicht angeregt werden. Die Verweilzeit im Triplett-Zustand  $\tau_T$  ergibt sich nach [164, 165]:

$$\tau_T = \left( k_{31} + \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12} + k_{21}} \right)^{-1}. \quad (3.27)$$

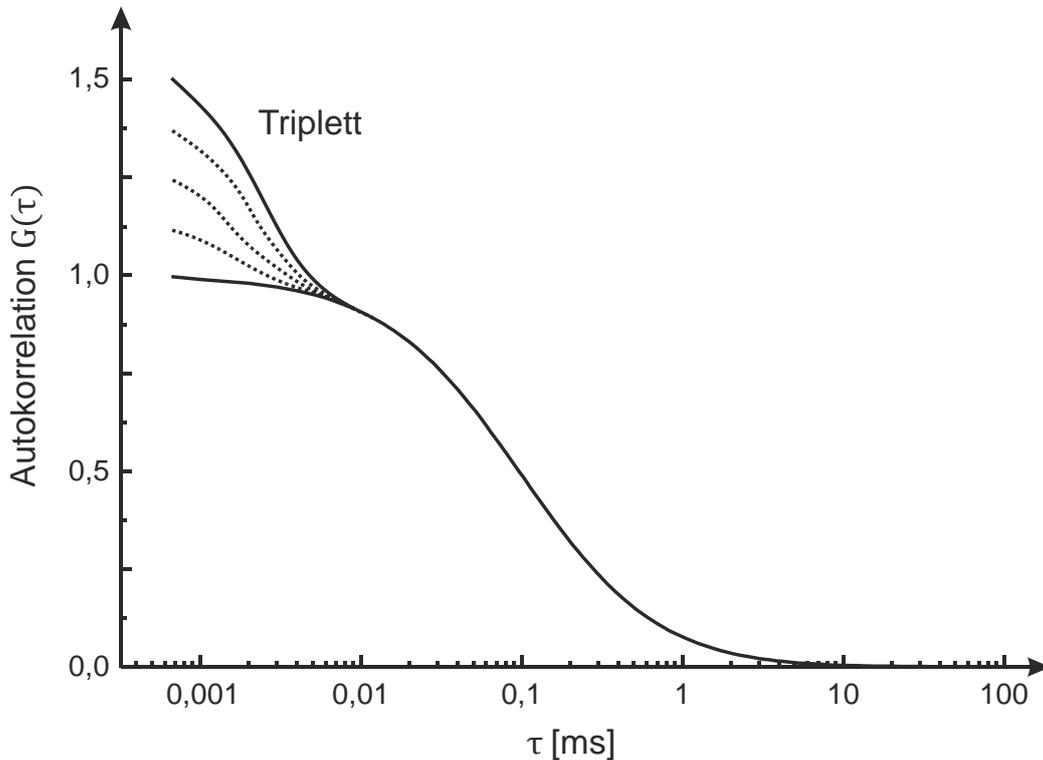
Der Anteil an nicht-fluoreszierenden Molekülen berechnet sich nach [164, 165]:

$$T = \frac{k_{12}k_{23}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{31}(k_{21} + k_{23})}. \quad (3.28)$$

Die Korrelationsfunktion mit Triplett-Anteil muss somit um einen exponentiellen Term erweitert werden [164]:

$$G(\tau_T) = G(\tau) \left( 1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} \right), \quad (3.29)$$

mit  $G(\tau)$  aus Gleichung (3.22). Eine typische Autokorrelationskurve mit Triplett-Anteil zeigt Abbildung 3.12.



**Abb. 3.12: Triplett-Prozesse in der FCS.** Schematische Darstellung einer Autokorrelationsfunktion fluoreszierender Moleküle mit konstanter Diffusionsgeschwindigkeit und unterschiedlichen Triplett-Anteilen ( $T$ ). Angelehnt an Chmyrov *et al.* [166].

Die mathematische Zusammenfassung der drei verschiedenen, die Intensitätsfluktuationen beeinflussenden Terme (Molekülkonzentration, -diffusion sowie Triplett-Zustände), ergibt:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 - T + T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}\right). \quad (3.30)$$

### 3.5.3.3 Auflösungsvermögen des FCS-Versuchsaufbaus

Da FCS-Messungen auf Fluoreszenzfluktuationen einzelner Moleküle beruhen, ist es wichtig die molekulare Helligkeit  $\eta$  genau zu kennen. Dieser Parameter lässt sich aus der durchschnittlichen Fluoreszenz-Zählrate  $F(t)$  und der Molekülzahl  $N$  berechnen nach [152]:

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{N}. \quad (3.31)$$

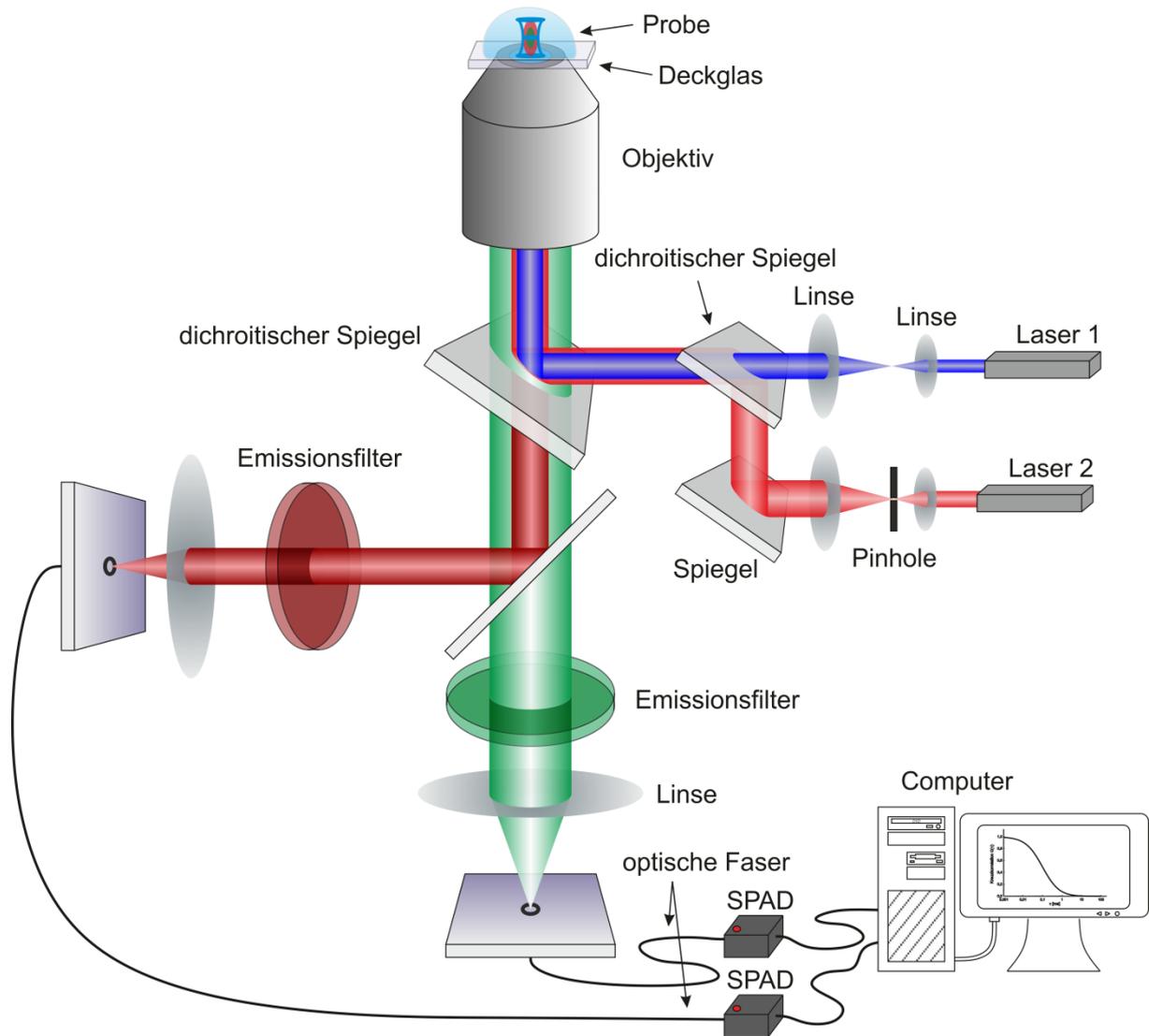
Die molekulare Helligkeit  $\eta$  ist abhängig von dem Absorptionskoeffizient und der Quantenausbeute des Fluorophors, der Anregungsintensität des Lasers sowie dem Versuchsaufbau (Eigenschaften von Objektiv und Filter) [167] und wird in cpms (Photonen pro Molekül pro Sekunde, *counts per molecule per second*) angegeben. Es konnte gezeigt werden, dass die molekulare Helligkeit in direktem Verhältnis zum Signal-Rausch-Verhältnis steht und somit auch eine Aussage über die Qualität der FCS-Messung ermöglicht [168-170].

### 3.5.3.4 Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse ist nur dann zur Untersuchung eines Systems bestehend aus mehr als einer Molekülart geeignet, wenn sich die einzelnen Spezies hinsichtlich der Größe signifikant unterscheiden. Nur in diesem Fall können sie aufgrund ihrer verschiedenen Diffusionszeiten durch das Volumenelement differenziert werden. Liegt jedoch ein Mehrkomponentensystem vor, ist die einfarbige Korrelationsanalyse nur noch bedingt geeignet, um die entsprechenden Dynamiken simultan erfassen zu können. Die klassische Autokorrelationsanalyse muss dann durch die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsanalyse entsprechend erweitert werden [171, 172].

Im Gegensatz zur Autokorrelationsanalyse werden nun nicht mehr die Fluoreszenzfluktuationen innerhalb einer Molekülspezies untersucht, sondern die Fluoreszenzsignale zweier unterschiedlicher Detektionskanäle korreliert. Der konfokale Aufbau wird derart erweitert, dass zwei Anregungs-Laserlinien rückseitig in das Objektiv eingekoppelt werden (siehe Abb. 3.13).

Die beiden Anregungsvolumina sollten dabei räumlich möglichst vollständig übereinanderliegen, um ein gemeinsames Volumenelement ausbilden zu können. Zur Detektion werden die beiden Fluoreszenzsignale spektral getrennt und die unterschiedlichen Detektionskanäle anschließend miteinander korreliert. Wurde also im Rahmen der Autokorrelationsanalyse das Fluoreszenzsignal zu verschiedenen Zeiten mit sich selbst korreliert, um eine Aussage über die Selbstähnlichkeit des Systems treffen zu können, werden jetzt mehrere Signale zu unterschiedlichen Zeitpunkten miteinander verglichen, um die verschiedenen Dynamiken des zu untersuchenden Systems oder ihre Wechselwirkungen untereinander charakterisieren zu können.



**Abb. 3.13: Schematische Darstellung eines konfokalen FCCS-Aufbaus.** Zur Erzeugung zweier spektral verschiedener Anregungsvolumina wird das Anregungslicht zweier Laser rückseitig in das Objektiv eingekoppelt. Das Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv eingesammelt und passiert einen dichroitischen Spiegel. Ein zweiter dichroitischer Spiegel trennt das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorophore. Das Licht wird gefiltert und mittels optischer Fasern auf zwei verschiedene Detektoren fokussiert. Ähnlich wie in Schwille und Haustein [152].

Die Fluoreszenz-Kreuzkorrelationsanalyse ist eine überaus spezifische Methode, denn die Kreuzkorrelationskurve kann nur dann ausgebildet werden, wenn die zwei verschiedenen Molekülspezies gemeinsam durch das Volumenelement diffundieren [171, 172]. Es sind zahlreiche Anwendungen zur Untersuchung molekularer Wechselwirkungen von Biomolekülen beschrieben [138, 139, 173-176]. Auch in der Rezeptor-Forschung ist dieser Ansatz von großem Interesse [177-179]: Unter anderem kann die Rezeptoraktivierung durch einen fluoreszenzmarkierten Agonisten direkt erfasst [180] oder die Interaktion des Rezeptors mit dem entsprechenden nachgeschalteten G-Protein untersucht werden (siehe Abb. 3.14). Die Voraussetzung ist allerdings jeweils, dass die Interaktionspartner mit Farbstoffen markiert worden sind, die sich in ausreichendem Maße spektral unterscheiden.

Hierdurch können die Fluoreszenzsignale der jeweiligen einzelnen Komponenten autokorreliert werden und es ist eine Aussage über ihre unterschiedlichen Dynamiken möglich. Des Weiteren können die Fluoreszenzsignale auch miteinander kreuzkorreliert werden, um die Wechselwirkungen der beiden zu untersuchenden (Bio-) Moleküle zu charakterisieren.

Unter der Annahme, dass die Interaktionen zwischen zwei Molekülpopulationen 1 und 2 während der Messung sehr schnell stattfinden, die entstehende Bindung quasi irreversibel ist und die Anregungsvolumina exakt übereinander liegen, ergibt sich das Kreuzkorrelationssignal allein aus dem Fluoreszenzsignal des gemeinsam diffundierenden Komplexes (1-2):

$$G_{1-2}(\tau) = \frac{\langle \delta F_1(t) \delta F_2(t + \tau) \rangle}{\langle F_1(t) \rangle \langle F_2(t) \rangle}, 1 \neq 2. \quad (3.32)$$

In der Praxis wird jedoch zumeist der Umstand beobachtet, dass neben dem Komplex 1-2 mit der dazugehörigen Konzentration  $C_{1-2}$  auch Moleküle der Spezies 1 und 2 mit den Konzentrationen  $C_1$  bzw.  $C_2$  durch das Anregungsvolumen hindurch diffundieren. Unter der weiteren Annahme, dass die beiden Anregungsvolumina exakt deckungsgleich sind, lässt sich für die Molekülspezies 1 und 2 jeweils die Autokorrelationsfunktion [152]

$$G_{1,2}(\tau) = \frac{(\langle C_{1,2} \rangle D i_{1,2} + \langle C_{1-2} \rangle D i_{1-2})}{V_{eff} (\langle C_{1,2} \rangle + \langle C_{1-2} \rangle)^2} \quad (3.33)$$

und für den Komplex 1-2 die Kreuzkorrelationsfunktion [152]

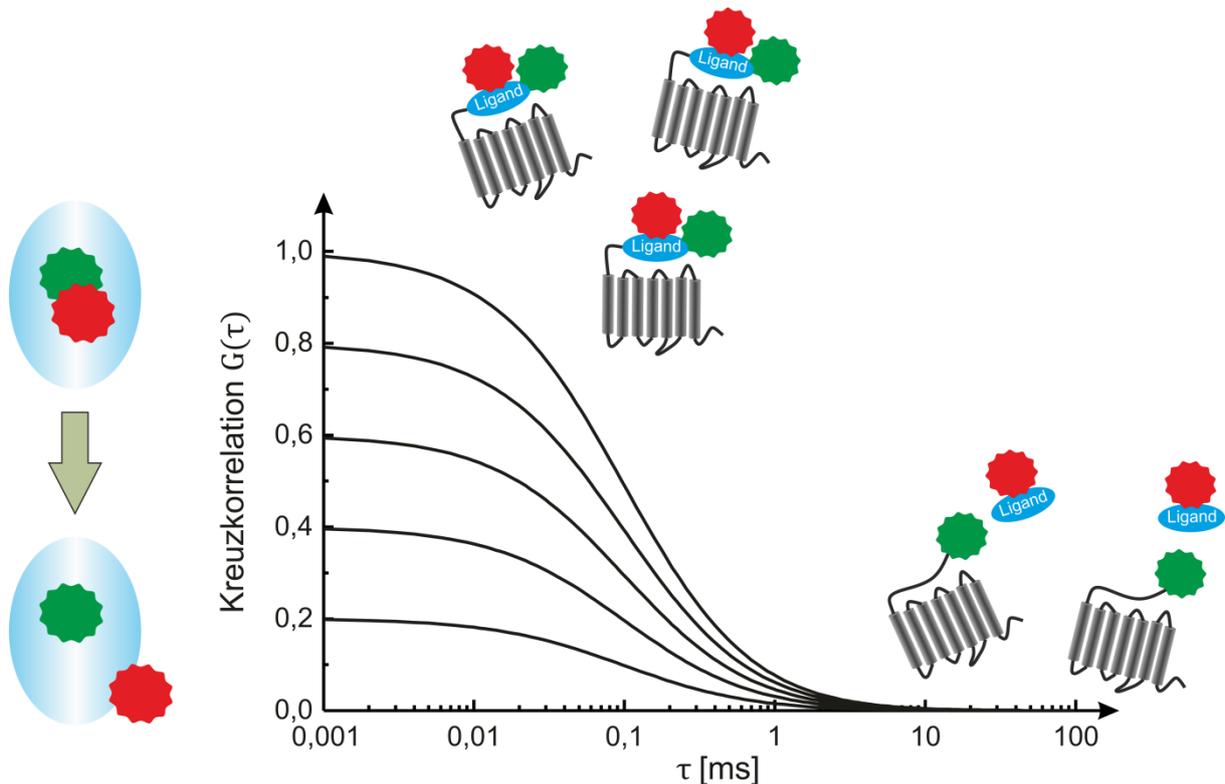
$$G_{1-2}(\tau) = \frac{\langle C_{1-2} \rangle D i_{1-2}}{V_{eff} (\langle C_1 \rangle + \langle C_{1-2} \rangle) (\langle C_2 \rangle + \langle C_{1-2} \rangle)} \quad (3.34)$$

ableiten ( $Di$  aus Gleichung (3.22)).

Ein weiterer Vorteil der Kreuzkorrelationsanalyse besteht darin, dass die Konzentration der zweifach fluoreszenzmarkierten Partikel in direkter Proportionalität zur Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion steht [152]:

$$\langle C_{1-2} \rangle = \frac{G_{1-2}(0)}{G_1(0) G_2(0) V_{eff}}. \quad (3.35)$$

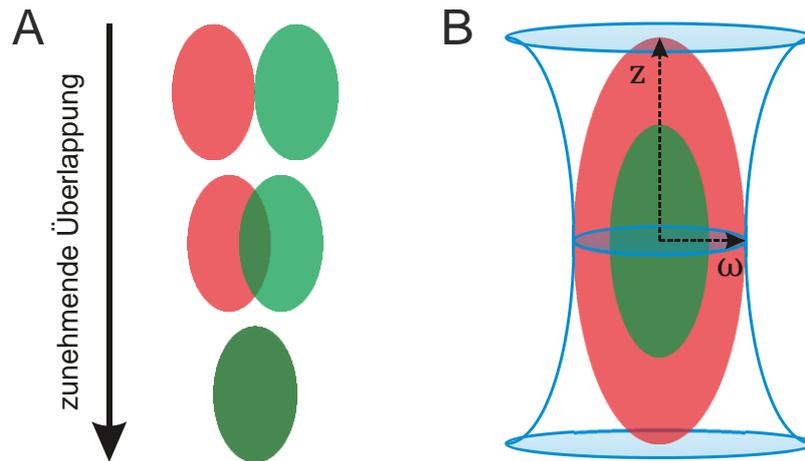
Die in den Gleichungen (3.33), (3.34) und (3.35) eingesetzten effektiven Volumenelemente  $V_{eff}$  erfordern exakt deckungsgleiche Detektionsvolumina. Tatsächlich beeinflussen aber die unterschiedlichen Detektionswellenlängen die Punktspreizfunktion der Detektion, sodass sich zwei verschiedene Gauß-Verteilungen ergeben. Dies wirkt sich letztendlich auf Größe und Form des gemeinsamen Volumenelements der Kreuzkorrelationsanalyse aus [181]. Da die Detektionsvolumina nicht deckungsgleich sind, verkleinert sich in Konsequenz die Amplitude, und die Form der Kreuzkorrelationskurve ändert sich [173, 175]. Daher ist es wichtig, die Detektionsvolumina so deckungsgleich wie möglich zu halten.



**Abb. 3.14: Die Kreuzkorrelationskurve.** Schematische Darstellung von Kreuzkorrelationskurven in einem idealen Aufbau. Umso größer der Anteil an zweifach markierten Molekülen im Fokalvolumen, desto höher ist die Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion. Nach Bacia und Schwille [173].

Des Weiteren wurde davon ausgegangen, dass die Anregungsvolumina gleich groß und exakt deckungsgleich sind. In der Kreuzkorrelationsanalyse ist es jedoch notwendig, dass die beiden Fluorophore spektral ausreichend verschieden sind. Das bedingt wiederum, dass die Anregungswellenlängen und damit auch die Anregungsvolumina unterschiedlich sind. Wie von Bacia *et al.* [173] beschrieben, ist das Volumenelement der Anregung mit der größeren Wellenlänge (z. B. rot) stets größer als jenes, das mit einer kürzeren Wellenlänge (z. B. grün) angeregt wird (siehe Abb. 3.15). Die „rote“ Autokorrelationskurve besitzt eine kleinere Amplitude als die „grüne“. Bei einer angenommenen Bindungsstöchiometrie von 1:1 kann die Amplitude der Kreuzkorrelation maximal die Amplitude der kleineren Autokorrelationskurve erreichen (grün), selbst wenn von 100 % Kreuzkorrelation ausgegangen wird. Andere Fälle wurden von Kim *et al.* [182] beschrieben. Um dies zu korrigieren, ist es beispielsweise möglich, das Anregungsvolumen der größeren Anregungswellenlänge durch Überfüllen der Rückapertur des Objektivs mit einem Teleskopsystem anzupassen und die Detektionsvolumina mit Hilfe von Lochblenden zu regulieren [172, 173].

Außerdem kann das effektive Volumenelement  $V_{eff}$  in Abhängigkeit der zwei verschiedenen Gauß-Verteilungen angepasst und die Kreuzkorrelationsfunktion Volumen-korrigiert werden [175].



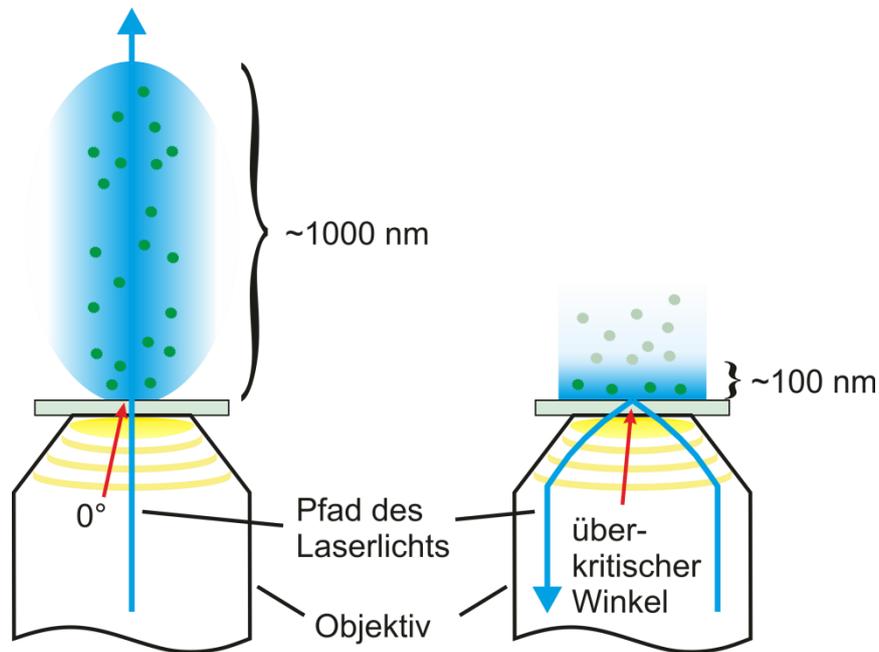
**Abb. 3.15: Anregungsvolumina in der FCCS.** Für die Durchführung einer Kreuzkorrelationsanalyse ist die Geometrie sowie die Überlagerung der beiden spektral verschiedenen Anregungsvolumina essentiell: (A) zeigt die zunehmende Überlagerung der Anregungsvolumina ausgehend von gleicher Größe, (B) einen realistischen Kompromiss für die Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen.

### 3.5.3.5 Konfokale versus evaneszente Fluoreszenzanregung für die F(C)CS

Die konfokale Anregung in der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie leistet bereits einen großen Beitrag, um störendes Streulicht oder die durch Eigenfluoreszenz hervorgerufenen Hintergrundsignale zu reduzieren. Durch die Verwendung von Objektiven mit einer hohen Numerischen Apertur und einer Lochblende in der Bildebene, welche die axiale Auflösung weiter verbessert, kann so ein Volumenelement mit einer Größe von 0,2 bis 1,0 Femtoliter und einer ellipsoiden Form mit einem Länge-Durchmesser-Verhältnis von 3 bis 5 erreicht werden [183].

Trotz der bereits sehr geringen Größe dieses Volumenelementes kann es bei bestimmten Anwendungen zu Problemen kommen, beispielsweise dann, wenn nur sehr wenige der zu untersuchenden Moleküle vorhanden sind und somit das Signal-Rausch-Verhältnis sehr ungünstig ist. Dies ist auch bei der Untersuchung von membranständigen Rezeptoren und G-Proteinen der Fall: Der zu untersuchende Bereich, die Zellmembran, nimmt, bedingt durch ihre Dicke von wenigen Nanometern, nur einen Bruchteil des Anregungsvolumens ein. Große Anregungsvolumina fördern jedoch das Bleichen, insbesondere unter Berücksichtigung der relativ langen Diffusionszeiten der Rezeptoren und G-Proteine innerhalb der Membran. Hierdurch können Artefakte in den gemessenen Korrelationskurven entstehen. Weiterhin kann das Signal-Rausch-Verhältnis durch Eigenfluoreszenz aus dem Hintergrund der Zelle oder frei diffundierender Moleküle ober- bzw. unterhalb der Membran ungünstig beeinflusst werden.

Lieto *et al.* [148] schlugen erstmals eine Lösung für dieses Problem vor und kombinierten die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit einer evaneszenten Fluoreszenzanregung. Wie bereits in Kapitel 3.5.1 beschrieben, liegen die typischen Eindringtiefen in die Probe bei ungefähr 100 bis 200 nm, was einer enormen Verkleinerung des Volumenelements auf die Membranregion bedeutet. Einen typischen TIR-FCS-Aufbau im Vergleich zur konfokalen Anregung zeigt Abb. 3.16.



**Abb. 3.16: Konfokale versus evaneszente Fluoreszenzanregung.** Ähnlich wie in Konopka *et al.* [184].

### 3.5.3.6 Fitfunktionen

Die dem zu untersuchenden System zugrunde liegenden Dynamiken werden typischerweise mit Hilfe einer Fitfunktion nach dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus [185, 186] aus der Auto/Kreuzkorrelationsfunktion ausgelesen. Die Auswahl der geeigneten Fitfunktion erfolgt hierbei anhand der Charakteristiken des zu untersuchenden Systems, also nach seinen zugrunde liegenden physikalischen Eigenschaften, die zu den gemessenen Fluktuationen führen. Hierfür sind mehrere Modelle beschrieben worden, um die jeweils verschiedenen individuellen Umstände zu charakterisieren [68]. Neben der Bestimmung von Konzentrationen und Diffusionszeiten kann so erkannt werden, ob Moleküle einzeln vorliegen, zu einem Komplex zusammengelagert sind [187] oder beispielsweise mit zellulären Strukturen wechselwirken [160]. Auch photophysikalische Effekte können Fluktuationen verursachen und müssen entsprechend berücksichtigt werden. Hier sind vor allem die bereits besprochenen Triplett-Zustände [164, 165] sowie das Auftreten von Photon-Antibunching [188, 189] zu nennen.

In dieser Arbeit fanden, je nach Versuchsaufbau, die nachfolgend genannten Modelle Anwendung [68]. Der Term des Triplett-Anteils wurde mit dem Faktor  $(1 - T)$  normalisiert [165, 190].  $N_G$  erfasst dadurch nicht mehr ausschließlich die fluoreszierenden Moleküle, sondern auch die sich im Triplett-Zustand befindlichen „dunklen“ Moleküle.

**3D-Modell für konfokale FCS-Messungen in Lösung (eine Komponente):**

$$G(\tau) = A_0 + \frac{1}{N_G} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 + \frac{T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1-T}\right) \quad (3.36)$$

mit:

 $A_0$  – Offset, Nullpunktversatz**2D-Modell für konfokale FCS-Messungen in Zellmembranen (zwei Komponenten):**

$$G(\tau) = A_0 + \frac{1}{N_G} \left[ \left(1 + \frac{T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1-T}\right) \left( \frac{1-F}{1 + \frac{\tau}{\tau_{2D1}}} + \frac{F}{1 + \frac{\tau}{\tau_{2D2}}} \right) \right] \quad (3.37)$$

mit:

 $F$  - Fraktion der Spezies 2 $\tau_{2D1}$  - Diffusionszeit frei diffundierender Moleküle der Fraktion 1 $\tau_{2D2}$  - Diffusionszeit frei diffundierender Moleküle der Fraktion 2**3D-Modell für TIR-FCS-Messungen in Lösung (eine Komponente):**

$$G(\tau) = \frac{1}{c} \frac{\psi^2}{\pi(R_0^2 + 4D_{3D}\tau)} \left(1 + \frac{T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1-T}\right) \left( \sqrt{\frac{D_{3D}\tau}{\pi}} + \frac{1 - 2D_{3D}\tau\psi^2}{2\psi} w(i\sqrt{D_{3D}\tau}\psi) \right) \quad (3.38)$$

mit:

 $c$  - Molekülkonzentration im Detektionsvolumen $\psi$  - Abklingkonstante des evaneszenten Feldes $R_0$  - Laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens $D_{3D}$  - Diffusionskoeffizient frei diffundierender Partikel $w$  - Faddeeva-Funktion (komplexe Fehlerfunktion) $i$  - Imaginäre Einheit**3D-2D-Modell für TIR-FCS-Messungen in Zellmembranen (zwei Komponenten):**

$$G(\tau) = A_0 + \frac{1}{N_G(1-F+\alpha F)^2} \left(1 + \frac{T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{1-T}\right) \left[ \frac{1-F}{1 + 4D_{2D}\frac{\tau}{R_0^2}} + \frac{\alpha^2 F \psi}{1 + 4D_{3D}\frac{\tau}{R_0^2}} \left( \sqrt{\frac{D_{3D}\tau}{\pi}} + \frac{1 - 2D_{3D}\tau\psi^2}{2\psi} w(i\sqrt{D_{3D}\tau}\psi) \right) \right] \quad (3.39)$$

mit:

 $\alpha$  – Relative molekulare Helligkeit der Molekülspezies ( $\alpha = q_{3D}/q_{2D}$ ) $D_{2D}$  – Diffusionskoeffizient membrangebundener Moleküle

### **3.5.4 Zusammenfassung**

Sämtliche hier besprochenen (Fluoreszenz-) Techniken sind überaus geeignet, um Einzelmoleküle zu untersuchen. Dabei sind nicht nur Messungen in Lösung möglich. Mit allen Methoden können Rezeptoren und G-Proteine in der lebenden Zelle auf Einzelmolekülbasis untersucht werden. Dabei kann, außer unter evaneszenter Anregung, sowohl die basale, als auch die apikale Membran untersucht werden. Somit ist die Charakterisierung der Dynamiken einzelner Rezeptoren und G-Proteine möglich, ohne dass Mittelungen basierend auf Ensemblemessungen durchgeführt werden müssen.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Fluoreszenzmarkierung von Rezeptoren und G-Proteinen unter Verwendung der SNAP/CLIP-Methode

#### 4.1.1 Klonierungsstrategie und Funktionalitätstests

Alle in dieser Arbeit verwendeten SNAP/CLIP-markierten Rezeptor- und G-Protein-Konstrukte sind in Kapitel 2.1 aufgeführt.

Nach der Expression in lebenden Zellen und der Fluoreszenzmarkierung mit einem Fluorophor-BG/BC zeigte sich die zu erwartende Membranfärbung. Die klonierten Konstrukte wurden in ersten [<sup>35</sup>S]-GTPγS-Bindungsstudien hinsichtlich ihrer physiologischen Funktionalität getestet und zeigten eine dem Wildtypkonstrukt vergleichbare Aktivierbarkeit.

#### 4.1.2 Optimierung der Transfektion

Die Expression der SNAP/CLIP-markierten Konstrukte für die Anwendung im hier durchgeführten Einzelmolekülexperiment erforderte die Weiterentwicklung der Transfektionsbedingungen in mehreren Schritten. Abhängig von der experimentellen Zielsetzung sowie dem verwendeten Plasmid und der jeweiligen Zelllinie, wurden verschiedene Konditionen untersucht. Der Arbeit mit CHO-Zellen lag dabei das folgende Transfektionsprotokoll für Zellen auf *einem* Deckglas zugrunde, welches in der Arbeitsgruppe um D. Calebiro entwickelte wurde:

- Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurden in zunächst zwei verschiedenen Reaktionsgefäßen je 500 µl Opti-Mem-Medium vorgelegt. In das eine Gefäß wurde anschließend 2,2 µl Plasmid-DNA (1 µg/µl), in das andere 6,6 µl Lipofectamine 2000 (L2000) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde der Inhalt beider Gefäße vereinigt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Der Mediumüberstand in der zu transfizierenden Zellkultur wurde abgenommen und durch 1,0 ml des Transfektionsmediums für CHO-Zellen ersetzt. Nach Zugabe des Transfektionsgemisches wurde über einen Zeitraum von ~12 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Dieses Protokoll beschreibt die Transfektion eines Plasmids. Zur Untersuchung der Diffusionskonstanten von Rezeptoren und G-Proteinen sowohl im basalen, als auch im stimulierten Fall, war es nun notwendig alle benötigten Konstrukte zu exprimieren. Dabei wurde nicht nur die zu untersuchende G-Protein-Untereinheit transfiziert, sondern alle Untereinheiten, sodass das vollständige G-Protein vorlag. Durch den heterotrimeren Aufbau der G-Proteine war demnach die parallele Transfektion von vier verschiedenen Plasmiden notwendig (α, β, γ-Untereinheit sowie Rezeptor).

Es wurden unterschiedliche Protokolle entwickelt und angewendet, bei welchen die eingesetzten Mengen an cDNA variierten. Das Verhältnis Gesamt-cDNA zu L2000 wurde dabei stets bei 1+3 belassen.

Für die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten (siehe Kap. 4.3) wurde die in Tabelle 4.1 angegebene cDNA-Zusammensetzung gewählt, wobei die angegebenen Mengen der Transfektion von Zellen in einem Fach einer 6-Fach-Zellkulturschale entsprechen.

**Tab. 4.1: Verwendete cDNA-Mengen für die Transfektion von Zellen in einem Fach einer 6-Fach-Zellkulturschale.**

cDNA	Volumen
GPCR (1 µg/µl)	0,8-0,9 µl
Gα (1 µg/µl)	0,8 µl
Gβ (1 µg/µl)	0,5 µl
Gγ (1 µg/µl)	0,3 µl

Das Protokoll für die Transfektion eines einzelnen Plasmides wurde ebenfalls weiterentwickelt und spezifiziert [75].

#### 4.1.3 Markierung mit *SNAP/CLIP*-Farbstoffen

Nach der Transfektion der entsprechenden cDNA in die Zellen musste ein geeigneter Fluorophor an die exprimierte Zielstelle der Rezeptoren und G-Proteine gebunden werden. Das grundlegende Protokoll für die Fluoreszenzmarkierung von *N*-terminal *SNAP/CLIP*-markierten Rezeptoren, welches in der Gruppe um D. Calebiro entwickelt und in modifizierter Form bereits publiziert wurde [75], ist nachfolgend beschrieben. Die eingesetzten Fluorophormengen beziehen sich auf die Fluoreszenzmarkierung von Zellen auf *einem* Deckglas.

- **Fluoreszenzmarkierung von Rezeptoren mit Zellmembran-impermeablen Fluorophoren**

Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und durch einen Membranfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Dies diente der Entfernung von Verunreinigungen, die zu einer Streuung des Lichtes und damit zu einem erhöhten Hintergrundrauschen führen könnten.

Der gewünschte Fluorophor-BG/BC wurde entsprechend des Herstellerprotokolls in DMSO gelöst (Konzentration der so erhaltenen Stammlösung: 1 mM) und bei -20 °C gelagert. 0,5 µl dieser Fluorophor-BG-DMSO-Stammlösung wurden in 1,0 ml phenolrotfreiem CHO-Medium (+10 % FKS (V/V)) suspendiert. Für den eigentlichen Färbeschritt wurden die auf dem Deckglas kultivierten Zellen mit DPBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1,0 ml Fluorophor-BG-Medium (0,5 µM) für exakt 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Fluorophor-BG-Medium vorsichtig entfernt, die Zellen zweimal mit je 1,0 ml sterilfiltriertem phenolrotfreiem Medium (+10 % FKS (V/V)) gewaschen, und weitere 5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese zwei Waschschrte mit anschließender Inkubation wurden nochmals wiederholt, bevor das Deckglas vorsichtig mit einer sterilen Pinzette aus der 6-Fach-Zellkulturschale entnommen und in eine Attofluor-Kammer eingesetzt wurde. Nun erfolgte ein dreimaliges Waschen mit sterilfiltriertem FRET-Puffer (300 µl), der auch als Messpuffer für die folgenden fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen diente.

Obwohl die eingesetzte Fluorophor-BG/BC-Menge geringer und die Inkubationszeit kürzer (0,5 µM, 20 min) als vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlen (5 µM, 30 min) war, stellte das oben beschriebene Protokoll bereits einen sehr guten Kompromiss zwischen hoher Markierungseffizienz und niedriger unspezifischer Anlagerung von Farbstoffmolekülen

dar. Da das auftretende Hintergrundrauschen für einzelne Fluorophore leicht schwankte, wurde die Menge an eingesetztem Farbstoff jeweils entsprechend optimiert (0,1 bis 0,5  $\mu\text{M}$ ). Fluorophore, die sich für diese *SNAP/CLIP*-Färbung auf der Oberfläche einer Zelle besonders eignen, sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt.

G-Proteine sind membranständige Proteine, welche im Gegensatz zu Rezeptoren keine extrazelluläre Domäne aufweisen. Die *SNAP/CLIP*-Bindestelle der G-Proteine befindet sich im Inneren der Zelle, was für die Fluoreszenzmarkierung eine besondere Herausforderung darstellt, da der Fluorophor die Zellmembran der lebenden Zelle passieren muss.

Zwei Strategien sollen hier aufgegriffen werden, die einerseits modifizierte Fluorophore und andererseits eine modifizierte Zellmembran als Ausgangspunkt haben:

- **Fluoreszenzmarkierung von G-Proteinen mit Zellmembran-permeablen Fluorophoren**

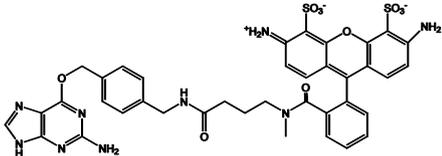
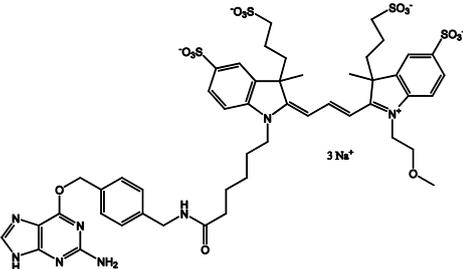
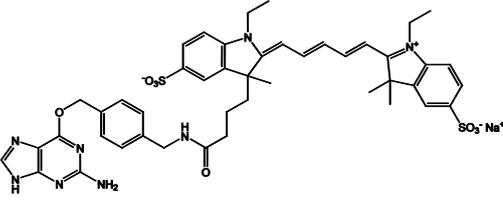
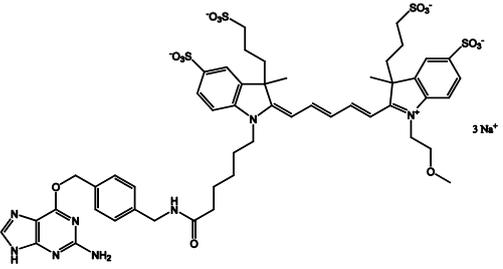
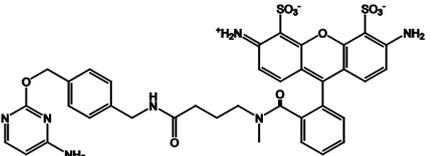
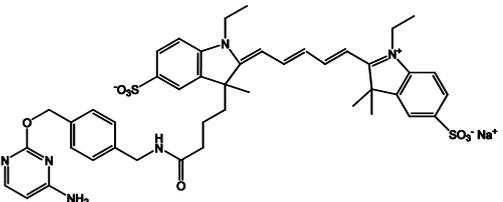
Es sind verschiedene Zellmembran-permeable Fluorophore für *SNAP/CLIP*-Markierungen kommerziell erhältlich. Die in Tabelle 4.3 zusammengestellten Fluorophore wurden für die Anwendung an G-Proteinen untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst wie beschrieben transfiziert. Für die Fluoreszenzmarkierung wurden sowohl die vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlene Fluorophor-BG/BC-Menge (5  $\mu\text{M}$ ), als auch die in der Gruppe um D. Calebiro für die Markierung von Rezeptoren optimierte Menge (0,5  $\mu\text{M}$ ) getestet, die Inkubationszeit lag jeweils bei 20 min. Anschließend wurde mittels konfokaler Mikroskopie und TIRF-M ausgewertet.

In Abbildung 4.1 sind die Ergebnisse dreier getesteter Fluorophore exemplarisch zusammengestellt.

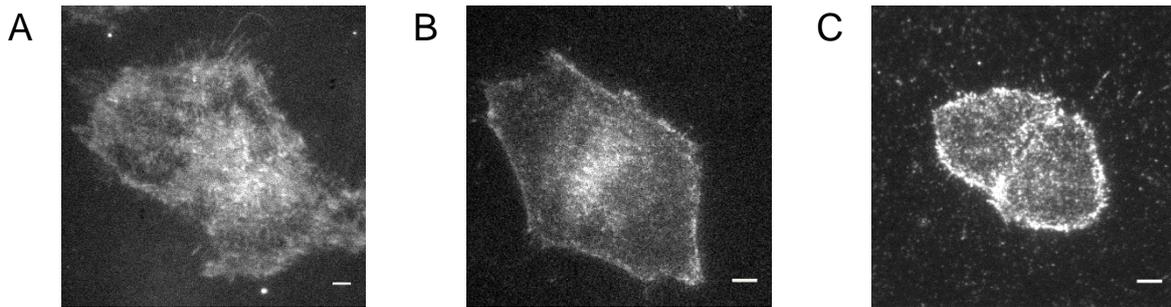
*SNAP-Cell Fluorescein* zeigte eine sehr gute molekulare Helligkeit, bleicht allerdings zu schnell, wodurch eine Detektion der so markierten Proteine in längeren Bildfolgen nicht möglich ist. Ähnliches gilt für *CLIP-Cell Fluorescein*. Für *SNAP-Cell 430* war der fluoreszierende Hintergrund in der Zelle sehr hoch und die spezifische Detektion der zu untersuchenden Einzelmoleküle schwierig. *SNAP-Cell TMR-Star* ist der derzeit am besten geeignete Farbstoff und wurde daher für die nachfolgenden Messungen ausgewählt. Hier war eine homogene Membranfärbung gegeben und die Einzelmoleküle waren mit einem ausreichenden Signal-Rausch-Verhältnis detektierbar. *CLIP-Cell TMR-Star* hatte zu *SNAP-Cell TMR-Star* vergleichbare Eigenschaften und wurde daher in den folgenden Experimenten ebenfalls berücksichtigt. *CLIP-Cell 505* zeigte eine geringe Markierungseffizienz in der Zelle. Der Fluorophor scheint die Zellmembran schlechter passieren zu können.

**Tab. 4.2: Fluorophore für die Markierung extrazellulärer SNAP/CLIP-Bindestellen.**

Quelle: New England Biolabs [191].

Name	Molekulargewicht [g/mol]	Anregung (Max.) [nm]	Emission (Max.) [nm]	Struktur
SNAP-Surface 488	841,9	506	526	
SNAP-Surface Alexa Fluor 546	-*	558	574	-*
SNAP-Surface 549	1195,2	560	575	
SNAP-Surface 647	917,0	660	673	
SNAP-Surface Alexa Fluor 647	-*	652	670	-*
SNAP-Surface 649	1221,3	655	676	
CLIP-Surface 488	801,8	506	526	
CLIP-Surface 647	877,0	660	673	

\* Noch nicht veröffentlicht



**Abb. 4.1: Zellmembran-permeable Farbstoffe.** CHO-Zellen wurden mit einem *SNAP/CLIP-Tag* fusionierten G-Protein transfiziert und mit verschiedenen Fluorophoren markiert (5  $\mu\text{M}$ , 20 min). (A) *SNAP-Cell 430* (B) *CLIP-Cell Fluorescein*, (C) *SNAP-Cell TMR-Star*. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

Im Vergleich zur Markierung an extrazelluläre Bindungsstellen lieferte die Markierung intrazellulärer Strukturen ein größeres Hintergrundrauschen in der Bildgebung, wobei die Ursache in einer höheren Rate an unspezifischer Bindung zu suchen ist. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Während der Inkubation mit dem membrangängigen Fluorophor tritt eine Vielzahl von Molekülen durch die Membran. Neben dem Farbstoffanteil, der spezifisch an die *SNAP/CLIP*-Bindestelle bindet, besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit für das Verbleiben ungebundenen Farbstoffs im Zytosol. Im Gegensatz zu ungebundenem Farbstoff auf der Außenseite der Membran kann dieser durch übliche Waschschritte nur schwer entfernt werden. Zudem schwankte der Anteil an unspezifischem Hintergrund eines Fluorophors von Charge zu Charge. Um diesen zu reduzieren, wurde die Menge an eingesetztem Farbstoff so optimiert (0,1  $\mu\text{M}$  bis 0,5  $\mu\text{M}$ ), dass die G-Proteine auf Einzelmolekülebene bei minimalem Hintergrundrauschen mikroskopiert werden konnten.

- **Zellmembranpermeabilisierung zur Fluoreszenzmarkierung mit Zellmembran-impermeablen Fluorophoren**

Typischerweise sind nicht-membrangängige Farbstoffe für *SNAP/CLIP*-Markierungen hinsichtlich ihrer photophysikalischen Eigenschaften besser für die Einzelmolekül-Zeitreihenexperimente geeignet als membrangängige. So gehören zu den ersteren etablierte Fluorophore mit hohem Extinktionskoeffizienten und hoher Quantenausbeute sowie hoher Photostabilität, wie beispielsweise die Alexa-Fluorophore. Daher wurde in einem zweiten Ansatz versucht, die G-Proteine *nach* bzw. *während* des Permeabilisierens der Zellmembran mit Fluorophor-BG/BC-Derivaten zu markieren, die nicht membrangängig sind. Um die Membran durchlässig zu machen, wurden je zwei verschiedene Detergenzien (Saponin, Digitonin) und Toxine (Pneumolysin,  $\alpha$ -Hemolysin) getestet (vgl. Kap. 3.3), allerdings mit mäßigem Erfolg:

Mit Saponin in Intrazellular-Puffer (0,005 bis 0,05 % (M/V)) war es möglich, die Zellmembran zu permeabilisieren und dies mittels der Trypanblau-Färbung nachzuweisen. Leider war ein Großteil der Zellen nach der Behandlung nicht mehr adhärent sondern von kugeliger Gestalt, was auf großen Zellstress bzw. -tod hinweist. Auch eine Verringerung der Saponinkonzentration war letztendlich nicht zielführend, da die G-Proteine nach der Permeabilisierung immobil waren. Dies lässt vermuten, dass die Zellmembran durch Saponin zu schwer beschädigt war, um Messungen unter annähernd physiologischen Bedingungen durchzuführen (siehe Abb. 4.2).

**Tab. 4.3: Fluorophore für die Markierung intrazellulärer SNAP/CLIP-Bindestellen.**

Quelle: New England Biolabs [191].

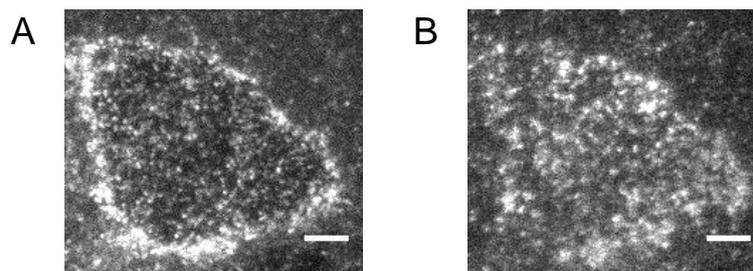
Name	Molekulargewicht [g/mol]	Anregung (Max.) [nm]	Emission (Max.) [nm]	Struktur
SNAP-Cell 430	513,5	421	444/485	
SNAP-Cell Fluorescein	712,7	500	532	
SNAP-Cell TMR-Star	677,1	554	580	
CLIP-Cell Fluorescein	756,8	500	532	
CLIP-Cell 505	586,6	504	532	
CLIP-Cell TMR-Star	642,7	554	580	

Digitonin, ein mildes Detergenz, zeigte bei einer eingesetzten Konzentration von 20 µg/ml gleiche oder ähnliche unerwünschte Eigenschaften.

Mit dem ebenfalls porenbildenden α-Hemolysin (1000 U/ml) in dem von N. Lambert empfohlenen Puffer [84] hingegen bewegten sich die Proteine derart in der Membran, wie es bei nicht-permeabilisierten Zellen zu erwarten war. Ein Nachteil dieses Toxins war jedoch die sehr schlecht reproduzierbare lytische Aktivität. Obwohl alle untersuchten Toxine verschiedener Hersteller sowie das von H. Bayley zur Verfügung gestellte Aliquot, in Aktivitätsassays an einer künstlichen Lipid-Doppelschicht hochaktiv waren, konnte in Zellen keine reproduzierbare Permeabilisierung durchgeführt werden.

Pneumolysin wurde in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,036-0,36 µg/ml getestet. Es zeigte zwar eine sehr gute Effizienz der Permeabilisierung, wobei die Adhärenz und die Zellform nicht signifikant beeinflusst wurden. Allerdings wurde auch hier eine stark reduzierte Mobilität der G-Proteine beobachtet, was auf eine deutliche Beschädigung der Zellmembran hindeutet.

Der negative Einfluss der untersuchten Detergenzien und Toxine auf die Integrität der Zellmembran war offensichtlich. Da eine Beeinflussung der zu untersuchenden membranständigen Proteine nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde von diesem Ansatz abgesehen und alle weiteren Experimente mit Zellmembran-permeablen Farbstoffen durchgeführt.



**Abb. 4.2: Ergebnis der Permeabilisierung mit Saponin.** Vor der Inkubation mit Saponin sind einzelne G-Proteine erkennbar, welche sich frei in der Membran bewegen (A). Nach einer Minute Inkubation mit 0,005 % Saponin wird die Zelle langsam diffuser, nach 10 min bilden sich größere Aggregate aus. Die Mobilität der G-Proteine ist stark eingeschränkt (B). Maßstabsbalken: 5 µm.

Trotz sehr sorgfältig gereinigter Deckgläser und der Verwendung steril filtrierter Lösungen konnte ein Auftreten von fluoreszierendem Hintergrund während der Einzelmolekülmessungen nicht vollständig verhindert werden.

Um den Hintergrund auf dem Deckglas zu reduzieren, wurden folgende Maßnahmen getestet:

- **Umsetzen der Zellen nach Fluoreszenzmarkierung**

Nach der beschriebenen Transfektion und Färbung wurden die Zellen auf ein neues gereinigtes Deckglas passagiert. Dafür wurde das Medium nach dem letzten Waschschrift entfernt, die Zellen mit DPBS-Puffer gewaschen und für 2 min mit Trypsin inkubiert. Nach vorsichtigem Ablösen der Zellen wurde die entstandene Suspension mit phenolrotfreiem Medium (+10 % FKS (V/V)) verdünnt und auf ein neues Deckglas

aufgebracht. Sobald die Zellen dort ausreichend stabil angewachsen waren, wurde die Probe mikroskopiert.

Auf diese Weise konnte der Hintergrund deutlich reduziert werden. Die Anzahl der nach dieser Behandlung auf dem Deckglas wiederzufindenden Zellen war jedoch verhältnismäßig gering. Aufgrund der Beanspruchung durch das zu durchlaufende Färbeprotokoll wuchs nur ein geringer Teil der Zellen wieder adhärent auf dem Deckglas an. Des Weiteren ist festzuhalten, dass die Zellen nach der Behandlung mindestens drei Stunden benötigten, bis sie wieder adhärent waren. Dies bedeutete, dass das Mikroskopieren frühestens drei Stunden nach der Fluoreszenzmarkierung stattfinden konnte. Dadurch hatte die Zelle jedoch ausreichend Zeit, die markierten Proteine zu recyceln. Da so nicht sichergestellt werden konnte, dass die Zellen vollständig gesund und die fluoreszenzmarkierten Proteine membranständig waren, wurde dieser Ansatz verworfen.

- **Beschichten der Deckgläser mit Glycin**

Ein weiteres Protokoll zur Minimierung von fluoreszierendem Hintergrund stammt aus der Arbeitsgruppe um M. Sauer entwickelt [192]. Hier wurden die Deckgläser vor der Zellpassage mit Glycin-Lösung (2 mol/l) für 30-60 min inkubiert. Leider konnte auch mit dieser Methode keine Verbesserung des Hintergrundrauschens für die durchgeführten Experimente erzielt werden.

Da beide getesteten Methoden nicht erfolgreich waren, wurde auf diese zusätzlichen Maßnahmen zur Reduktion des Hintergrunds verzichtet.

Die *SNAP/CLIP*-Methode erlaubt es, aufgrund der Spezifität der Markierungsreaktion, die zwei Bindestellen mit Fluorophor-BG- und -BC-Derivaten parallel anzufärben [112]. Zunächst wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt, um sicherzustellen, dass a) mit einem Fluorophor-BG kein *CLIP-Tag*-markiertes Protein angefärbt wird, und dass b) ein *SNAP-Tag*-markiertes Protein nicht von einem Fluorophor-BC besetzt wird. Die Spezifität dieser Markierungsmethode konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Auswahl der infrage kommenden BG-BC-Kombinationen erfolgte nach Testmessungen hinsichtlich spektraler Unterscheidbarkeit, Photostabilität, Helligkeit und Markierungseffizienz der Fluorophore (siehe Kap. 3.4). Außerdem musste das Zusammenspiel mit vorhandenen Anregungslasern, optischen Filtern und Kameras am Mikroskop berücksichtigt werden. Da sich die *SNAP/CLIP*-Cell TMR-Star Farbstoffe als die am besten geeigneten Zellmembranpermeablen Farbstoffe herausstellten, war der rote Detektionskanal belegt. Die weitere Auswahl beschränkte sich daher auf Fluorophore, die im tiefroten Spektralbereich emittieren. Es wurden verschiedene BG-BC-Kombinationen getestet, wobei sich die folgenden als geeignet erwiesen:

**Tab. 4.4: *SNAP-CLIP*-Fluorophorkombinationen für die zweifarbige Markierung.**

Intrazelluläre Bindestelle	Extrazelluläre Bindestelle
<i>SNAP</i> -Cell TMR-Star	<i>CLIP</i> -Surface 647
<i>CLIP</i> -Cell TMR-Star	<i>SNAP</i> -Surface Alexa Fluor 647
<i>CLIP</i> -Cell TMR-Star	<i>SNAP</i> -Surface 647

## 4.2 Visualisierung verschiedener Rezeptoren und G-Proteine mittels zeitaufgelöster Einzelmolekülmikroskopie

### 4.2.1 Aufbau

Um Rezeptoren und G-Proteine in der Membran lebender Zellen zu visualisieren, wurde ein TIRF-Aufbau auf der Basis eines inversen Fluoreszenzmikroskops verwendet (Leica AM TIRF). Die wichtigsten Elemente des TIRF-Mikroskops waren ein TIRF-Objektiv (Leica, Germany, Typ: HCX PL Apo 100x/1,46 Oil CORR) mit vier verschiedenen Laserlinien (Diodenlaser 405, 488, 561 und 645 nm) zur Fluoreszenzanregung, entsprechenden optischen Filtern sowie eine EMCCD-Kamera, und ein Inkubator mit einer Temperaturkontrolleinheit.

### 4.2.2 Durchführung der TIRF-Einzelmolekülexperimente

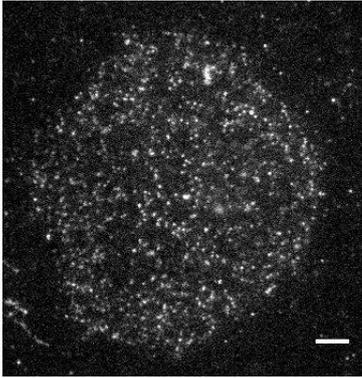
Alle nachfolgend beschriebenen Einzelmolekülexperimente wurden bei 18 °C durchgeführt, und die Temperaturkontrolleinheit entsprechend eingestellt. Nach jeder Einzelmessung erfolgte eine Temperaturkontrolle und Korrektur, falls nötig. Die Belichtungszeit sowie die Anzahl von Einzelbildern pro Experiment wurde vor Messbeginn festgelegt. Optimale Einstellungen waren dabei eine Belichtungszeit von 50 ms sowie eine Bildfolge von 400 Einzelbildern [125]. Aus technischen Gründen wurden 401 Bilder aufgenommen und das letzte Bild vor der Auswertung entfernt.

Zur eigentlichen Messung wurde das Objektiv mit einem kleinen Tropfen Immersionsöl benetzt. Die Attofluor-Kammer wurde mit dem zuvor eingesetzten Deckglas, welches die fluoreszenzmarkierte Probe enthielt, vorsichtig auf den Objektträger gesetzt. Der Inkubator wurde umgehend verschlossen, um die Temperaturkonstanz während der Messung zu gewährleisten. Zunächst wurde die Probe mittels Helfeldbeleuchtung so eingestellt, dass die Zellen in der Fokusebene lagen. Im Anschluss wurde zur evaneszenten Anregung gewechselt, wobei darauf geachtet wurde, die Leistung des Anregungslasers so gering wie möglich zu halten (~ 2 %), um übermäßiges Photobleichen zu vermeiden. Anschließend wurde eine geeignete Zelle ausgewählt, die eine für die Zelllinie typische Form und Größe aufwies und keinen störenden autofluoreszierenden Hintergrund zeigte. Damit waren die fluoreszierenden Einzelmoleküle und deren Dynamiken deutlich erkennbar. Der Begriff Einzelmoleküldynamik bezieht sich hierbei auf die Diffusion der Proteine in der Zellmembran. Nach erfolgreicher Zellauswahl wurde der Fokus feinjustiert und die Laserleistung für ein optimales Signal-Rausch-Verhältnis (83 %) erhöht. Nun wurde die Bildsequenz aufgenommen und die Rohdaten im *.tiff*-Format digital gespeichert.

Für die Visualisierung aktivierter Rezeptoren und G-Proteine wurde analog vorgegangen. Der jeweilige in FRET-Puffer gelöste Rezeptorligand wurde direkt am Mikroskop in die Attofluor-Kammer pipettiert. Nach einigen Minuten wurde die Probe gemessen.

Mit dieser Methode konnten verschiedene Rezeptoren und G-Proteine visualisiert werden. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4.3.

Bei der ersten Sichtung der akquirierten Daten zeigte sich, dass sich die G-Proteine etwas schneller als die Rezeptoren in der Membran bewegten. Die genaue Charakterisierung der Rezeptoren und G-Proteine hinsichtlich ihrer Diffusionskoeffizienten erfolgte mittels der in Kapitel 3.5.2 besprochenen Algorithmen.



**Abb. 4.3: Typische Abbildung für Einzelmoleküle.** SNAP-Cell TMR-Star-markierte  $G\alpha_{i1}$ -Proteine in der Zellmembran einer lebenden CHO-Zelle (Erstes Bild der Bildsequenz). Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

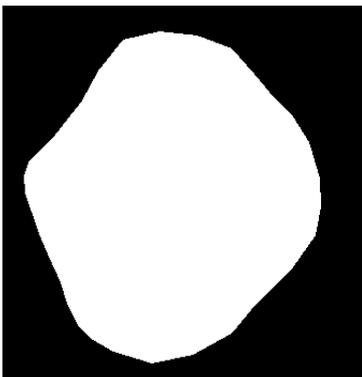
## 4.3 Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von Rezeptoren und G-Proteinen mittels maßgeschneiderter Algorithmen zur Einzelmolekülverfolgung

### 4.3.1 Bildbearbeitung mit ImageJ

Um die akquirierten Bildsequenzen (siehe Kap. 4.2) der verschiedenen Rezeptoren und G-Proteine für die Auswertung mittels Einzelmoleküldetektion und -verfolgung vorzubereiten, wurden die Rohdaten zunächst mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ aufbereitet.

Die Bildsequenzen wurden mit Hilfe des *Image-Crop-Tools* soweit verkleinert, dass sie in etwa der Größe einer einzelnen Zelle entsprachen. Das jeweils letzte Bild einer Sequenz wurde unter Anwendung des *stack-Tools* entfernt und die so bearbeitete Bildfolge gespeichert.

Des Weiteren war es notwendig, für jede einzelne Bildsequenz eine binäre Maske zu erstellen, um den auszuwertenden Bereich für den später angewendeten Detektionsalgorithmus zu markieren (siehe Abb. 4.4). Hierfür wurde, unter Verwendung der *polygon selections*, ein sogenannter Bereich von Interesse (*region of interest, ROI*) entlang der Zellmembran gelegt. Dieser wurde mit dem Befehl *Add to manager* an den *ROI manager* übergeben. Ein Einzelbild der Bildsequenz wurde unter Verwendung des *duplicate-Tools* dupliziert und der Bildtyp von 16 bit auf 8 bit geändert. Nun war es möglich, unter Verwendung der *color picker*-Funktion dem gesamten Bild den Farbcode 0-0-0 zuzuweisen. Mit Hilfe des *ROI managers* konnte anschließend der festgelegte Bereich von Interesse in dem Bild aufgerufen und mit Hilfe des *color pickers* als 1-1-1 markiert werden. Die so erstellte binäre Maske wurde zusammen mit der zugehörigen Bildsequenz gespeichert.

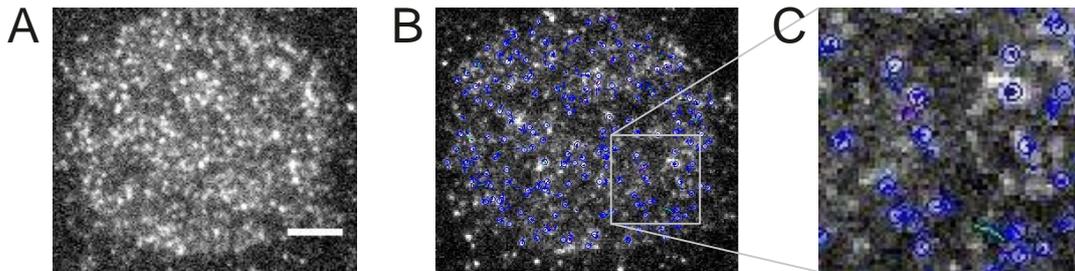


**Abb. 4.4: Binäre Maske.** Um den auszuwertenden Bereich für den Detektionsalgorithmus festzulegen, wurde an einem Einzelbild der Bildsequenz eine Maske erstellt. So konnte zwischen der zu analysierenden Zelle (weiß) und dem Hintergrund (schwarz) unterschieden werden.

### 4.3.2 Datenauswertung mit *u-track*/Matlab

Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, wurde die Detektion und Verfolgung der einzelnen Moleküle mit Hilfe von *u-track* [124] und der von Calebiro *et al.* [125] (weiter-) entwickelten Algorithmen in Matlab durchgeführt.

Um das Ergebnis der Partikeldetektion und -verfolgung zu überprüfen, konnte beispielsweise der *MovieViewer* in *u-track* [75, 124] oder der Befehl *starshow* des erweiterten Algorithmus genutzt werden. Ein Beispiel zeigt Abbildung 4.5.



**Abb. 4.5: Einzelmoleküldetektion und -verfolgung.** (A) *CLIP*-Cell TMR-Star-markierte  $G\alpha_{i1}$ -Proteine in der Zellmembran einer CHO-Zelle (Bild 1 der Bildsequenz). (B+C) Ergebnis der Einzelmoleküldetektion und -verfolgung: Einzelne G-Proteine wurden detektiert (blaue Kreise) und über die Zeit verfolgt (blaue Trajektorien). Das Auftreten von grünen und roten Segmenten deutet auf das sich Verbinden bzw. Trennen zweier Partikel hin (Bild 30 der Bildsequenz). Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

Das Ergebnis der mathematischen Auswertung war eine Verteilung der Diffusionskoeffizienten aller detektierten und verfolgten Moleküle. Dies erlaubt zum einen das Bestimmen des Mittelwerts der Diffusionskoeffizienten, zeigt zum anderen aber auch die Größe der verschiedenen mobilen Populationen auf. Die Daten mehrerer Experimente können zusammengefasst und die Ergebnisse gemeinsam dargestellt werden.

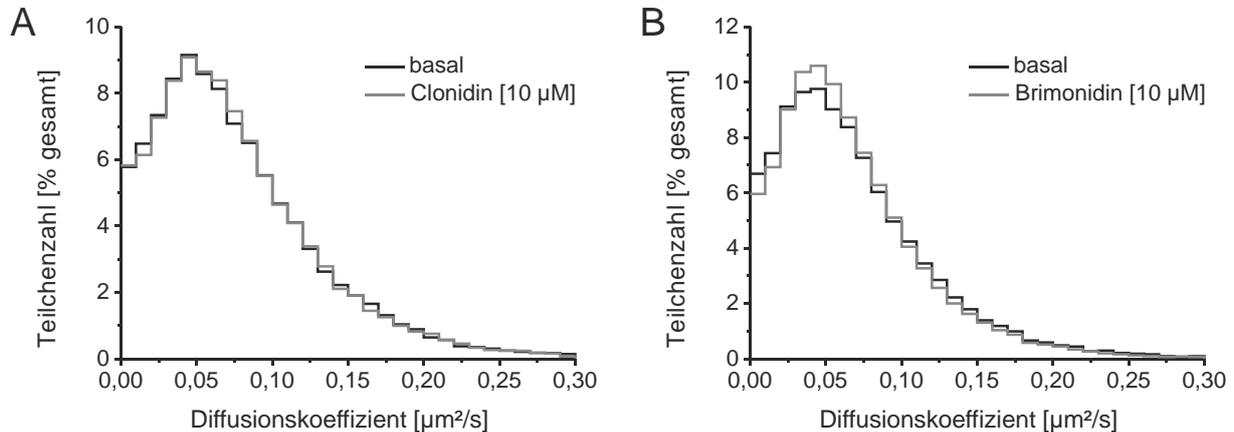
Dieses Auswertungsprotokoll wurde für alle unten stehenden Rezeptoren und G-Proteine durchgeführt. Die jeweiligen Ergebnisse werden nachfolgend dargestellt.

### 4.3.3 Charakterisierung des Diffusionsverhaltens

In dieser Arbeit wurden verschiedene G-Proteine und Rezeptoren untersucht, wobei der Schwerpunkt der Diffusionsanalyse auf den  $G\alpha_i$ -Proteinen und den  $G\alpha_i$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren lag.

Wie Calebiro *et al.* [125] bereits zeigten, stellt sich die Verteilung der Diffusionskoeffizienten für  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren glockenförmig (ähnlich einer Gauß-Kurve) dar. Die Stimulation mit einem Rezeptorliganden hatte keine Auswirkung auf das Diffusionsverhalten. In dieser Arbeit sollte nun der  $\alpha_{2A}$ -adrenerge Rezeptor sowie erstmals auch das nachgeschaltete  $G\alpha_{i1}$ -Protein untersucht werden, um zu überprüfen, ob sich ein ähnliches Verteilungsmuster der Diffusionskoeffizienten zeigen lässt. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Berechnung der mittleren Diffusionskoeffizienten sowie der Standardabweichung aus den nach Kapitel 4.3.2 erhaltenen Daten erfolgte wie von C. W. On vorgeschlagen [193].

Abbildung 4.6 zeigt, dass die Verteilung der verschiedenen schnell diffundierenden Fraktionen der  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptoren ähnlich denen der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren ist [125]. Der mittlere Diffusionskoeffizient der Rezeptoren im basalen Zustand beträgt  $0,072 \pm 0,088 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Die Stimulation des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors hatte keinen Einfluss auf diese Verteilung, unabhängig davon, ob der Partialagonist Clonidin (siehe Abb. 4.6 A) oder der Vollagonist Brimonidin (siehe Abb. 4.6 B) eingesetzt wurde.

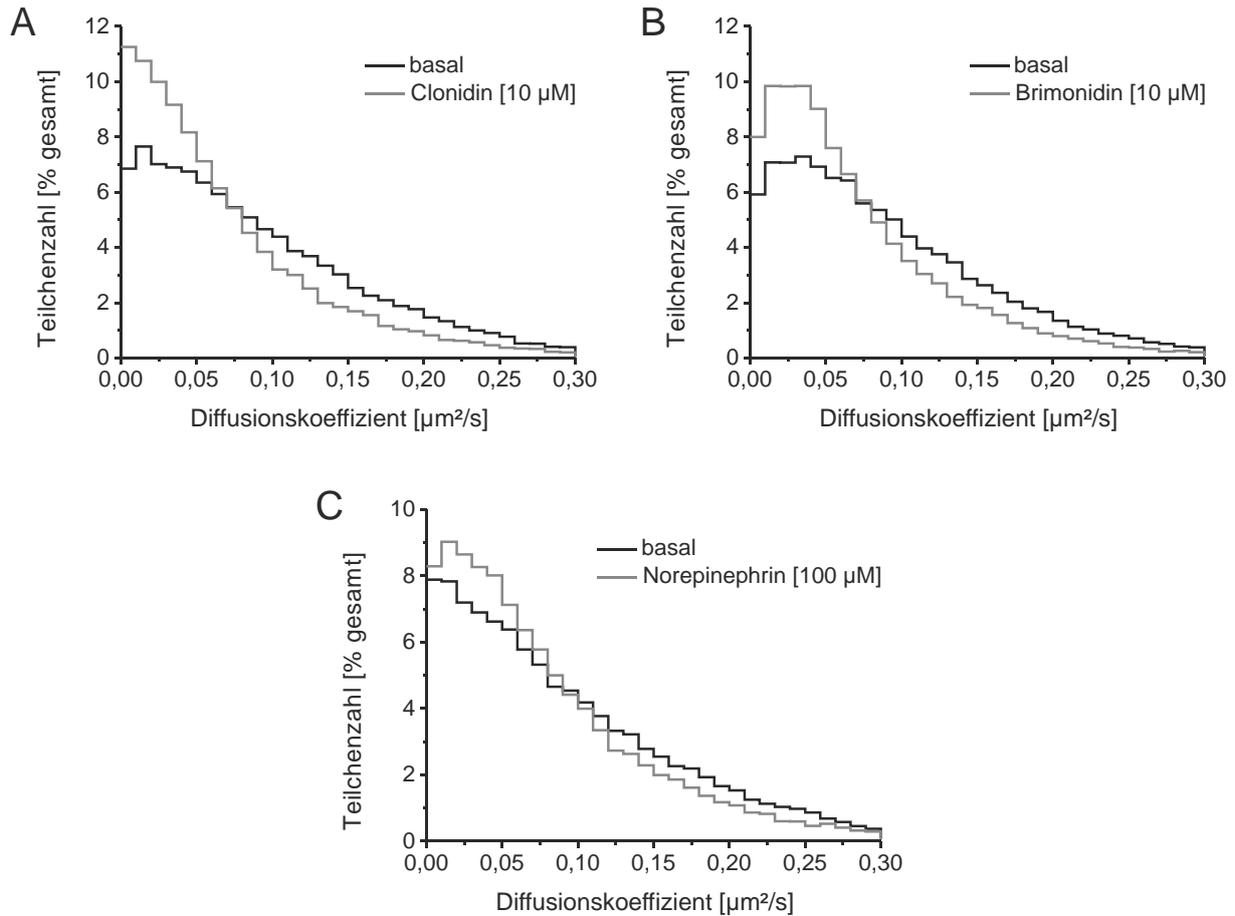


**Abb. 4.6: Diffusionskoeffizienten des  $\alpha_{2A}$ -adrenergen Rezeptors.** Die Verteilung der Diffusionskoeffizienten ist glockenförmig. Zwischen basalem Zustand (schwarz) und Situation nach Stimulation mit dem angegebenen Agonisten (grau; (A) Clonidin, (B) Brimonidin).

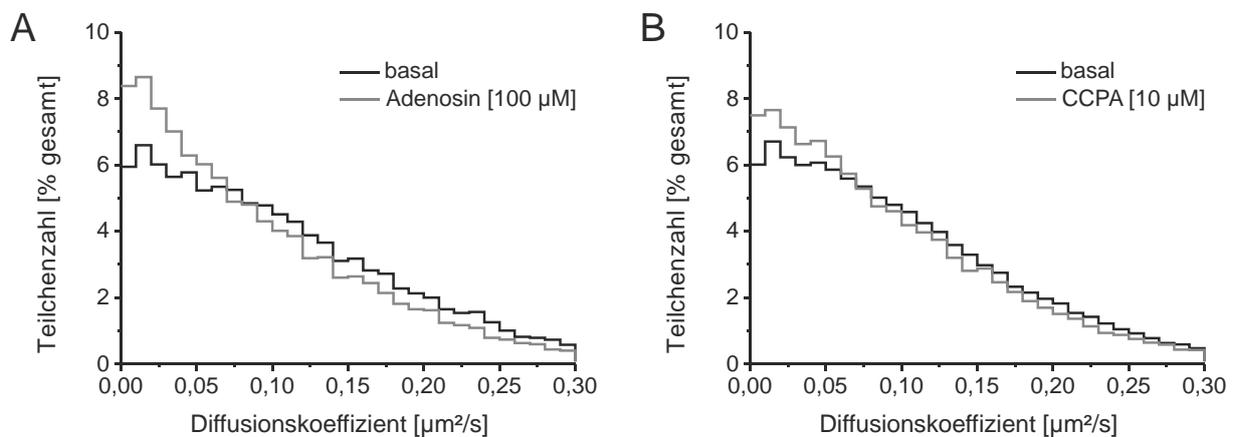
Das Diffusionsverhalten der  $G\alpha_{i1}$ -Proteine stellt sich hingegen anders dar. Wie Abbildung 4.7 zeigt, weisen die  $G\alpha_{i1}$ -Proteine einen größeren Anteil sehr langsam diffundierender Moleküle auf, aber auch der Anteil der schnell diffundierenden  $G\alpha_{i1}$ -Proteine ist im Vergleich zu den Rezeptoren etwas größer. Der mittlere Diffusionskoeffizient beträgt im basalen Zustand  $0,090 \pm 0,112 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Die Stimulierung des Rezeptors und damit die Aktivierung des  $G\alpha_{i1}$ -Proteins erhöhte den Anteil der langsamen  $G\alpha_{i1}$ -Proteine, während er für die sehr schnellen  $G\alpha_{i1}$ -Proteine etwas abnahm. Dabei trat diese Veränderung bei allen getesteten Rezeptorliganden, Clonidin (Abb. 4.7 A), Brimonidin (Abb. 4.7 B) sowie Norepinephrin (Abb. 4.7 C) auf.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den aufgetretenen Diffusionsänderungen der  $G\alpha_{i1}$ -Proteine um ein rezeptorspezifisches Phänomen handelt, wurden sie mit einem anderen  $G\alpha_i$ -gekoppelten Rezeptor koexprimiert, dem Adenosin- $A_1$ -Rezeptor. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, konnte auch hier sowohl durch die Stimulierung mit dem physiologischen Agonisten Adenosin (Abb. 4.8 A), als auch mit dem hochaffinen Liganden 2-Chlor-N $\beta$ -Cyclopentyl-Adenosin, CCPA (Abb. 4.8 B) die Verteilung der Diffusionskoeffizienten hin zu einer höheren Fraktion an langsam diffundierenden  $G\alpha_{i1}$ -Proteinen beeinflusst werden.

## Ergebnisse



**Abb. 4.7: Diffusionskoeffizienten des  $G\alpha_{i1}$ -Proteins bei Koexpression mit  $\alpha_{2A}$ -AR.** Die  $G\alpha_{i1}$ -Proteine weisen einen höheren Anteil sehr langsamer Partikel auf (schwarz). Die Aktivierung der  $G\alpha_{i1}$ -Proteine durch die stimulierten Rezeptoren resultiert in einer leichten Vergrößerung des Anteils sehr langsamer Partikel, während der Anteil der schnell diffundierenden etwas sank (grau; (A) Clonidin, (B) Brimonidin, (C) Norepinephrin).



**Abb. 4.8: Diffusionskoeffizienten des  $G\alpha_{i1}$ -Proteins bei Koexpression mit dem Adenosin  $A_1$ -Rezeptor.** Das Verteilungsmuster der Diffusionskoeffizienten der  $G\alpha_{i1}$ -Proteine im basalen Zustand (grau) sowie nach Rezeptoraktivierung (grau; (A) Adenosin, (B) CCPA) ist ähnlich derer aus Abbildung 4.7.

**Tab. 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Diffusionsanalyse unter Verwendung der bildgebenden Einzelmolekülverfolgung.**

<b>Experiment</b>	<b>Abbildung</b>	<b>D ± SD [<math>\mu\text{m}^2/\text{s}</math>]</b>	<b>Anzahl aus- gewerteter Zellen</b>	<b>Anzahl aus- gewerteter Partikel</b>
$\alpha_{2A}$ -AR-basal	4.6 A	$0,076 \pm 0,093$	65	47.900
$\alpha_{2A}$ -AR-Clonidin	4.6 A	$0,076 \pm 0,092$	44	29.937
$\alpha_{2A}$ -AR-basal	4.6 B	$0,068 \pm 0,084$	85	56.542
$\alpha_{2A}$ -AR-Brimonidin	4.6 B	$0,067 \pm 0,081$	73	48.518
G $\alpha_{i1}$ -basal ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 A	$0,090 \pm 0,112$	75	45.380
G $\alpha_{i1}$ -Clonidin ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 A	$0,068 \pm 0,091$	58	32.657
G $\alpha_{i1}$ -basal ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 B	$0,090 \pm 0,111$	87	52.275
G $\alpha_{i1}$ -Brimonidin ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 B	$0,071 \pm 0,092$	66	36.288
G $\alpha_{i1}$ -basal ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 C	$0,090 \pm 0,113$	58	47.036
G $\alpha_{i1}$ -NE ( $\alpha_{2A}$ -AR)	4.7 C	$0,078 \pm 0,100$	57	45.842
G $\alpha_{i1}$ -basal (A1)	4.8 A	$0,102 \pm 0,124$	33	21.668
G $\alpha_{i1}$ -Adenosin (A1)	4.8 A	$0,088 \pm 0,111$	34	20.629
G $\alpha_{i1}$ -basal (A1)	4.8 B	$0,098 \pm 0,120$	75	53.332
G $\alpha_{i1}$ -CCPA (A1)	4.8 B	$0,090 \pm 0,113$	68	46.280
$\alpha_{2A}$ -AR-basal, gesamt	4.6	$0,072 \pm 0,088$	150	104.442
G $\alpha_{i1}$ -basal ( $\alpha_{2A}$ -AR), gesamt	4.7	$0,090 \pm 0,112$	220	144.691
G $\alpha_{i1}$ -basal (A1), gesamt	4.8	$0,099 \pm 0,121$	108	75.000

## 4.4 Etablierung eines F(C)CS-Versuchsaufbaus zur Analyse schneller Rezeptordynamiken

Die Fluoreszenz-(Kreuz-)Korrelations-Spektroskopie erlaubt das Erfassen von molekularen Dynamiken im Allgemeinen (FCS) oder auch von Interaktionen (FCCS). Die Stärke dieser Technik liegt insbesondere in der Einzelmolekülempfindlichkeit zur Erfassung von Molekülflektuationen über einen großen zeitlichen Bereich ( $\mu\text{s}$ -s) und kommt deshalb hier als komplementäre Methode zur Anwendung. Der apparative Aufbau für FCS und FCCS ist konzeptuell gleich, deshalb werden hier beide Verfahren weitestgehend gemeinsam behandelt.

### 4.4.1 Die konfokale F(C)CS

#### 4.4.1.1 Aufbau

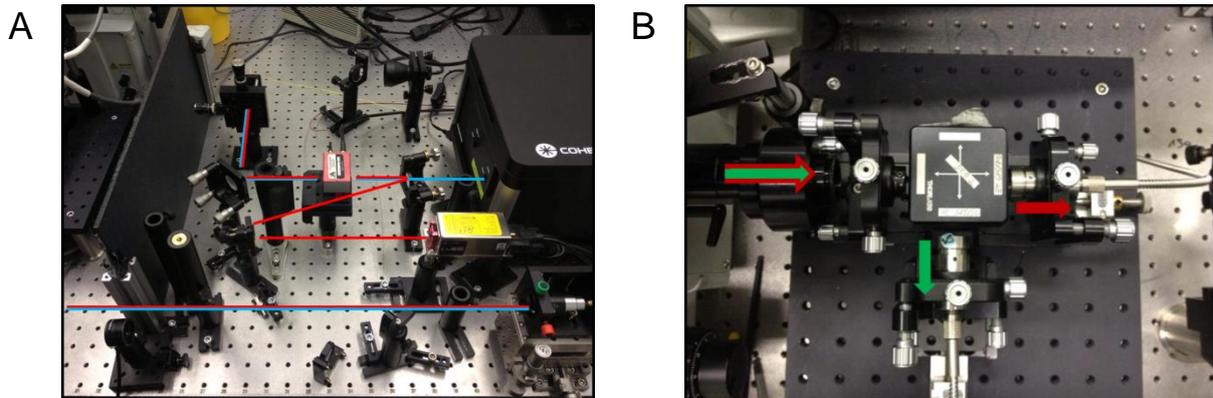
Der experimentelle Aufbau, der in der Arbeitsgruppe um K. Heinze realisiert wurde, besteht aus drei Teilen:

- einem kommerziell erhältlichen inversen Lichtmikroskop;
- einer Lasereinkopplung mit zwei verschiedenen Wellenlängen (488 nm und 640 nm);
- einer zweikanaligen Detektionseinheit mit Silizium-Halbleiter-Dioden, die als *Single Photon Avalanche Diodes* (SPADs) bezeichnet werden

Details zu den hier verwendeten Instrumenten und Materialien sind in Kapitel 2 verzeichnet. Wie in Abbildung 4.9 A zu sehen ist, befinden sich die Anregungslaser außerhalb des Mikroskops. Für die benötigte blaue 488 nm Laserlinie wird gepulstes Laserlicht eines modengekoppelten durchstimmbaren Titan:Saphir-Lasers (Ti:Sa) über einen Frequenzverdoppler in gepulstes sichtbares Licht umgewandelt. Die zweite rote Laserlinie (640 nm) wird durch einen Diodenlaser erzeugt. Beide Laserlinien werden gemeinsam rückseitig in das Mikroskop und über einem dichroitischen Strahlenteiler in das Objektiv eingekoppelt (Epi-Illumination). Als Objektive wurden je nach Versuchsanordnung ein Wasserimmersionsobjektiv mit einer  $NA$  von 1,4 und ein TIRF-Objektiv mit Ölimmersion und einer  $NA$  von 1,49 verwendet. Die Probe befindet sich über dem Objektiv auf einem motorisierten Mikroskoptisch, der lateral (x-y-Ebene) gesteuert werden kann. Der beugungslimitierte Laserfokus stellt das optisch definierte offene Volumenelement für die F(C)CS dar und wird axial über den manuellen Fokustrieb in die Probe (und im Fall der Zelle auf die Zellmembran) platziert. Das von der Probe ausgestrahlte Fluoreszenzlicht wird vom selben Objektiv eingesammelt und passiert den dichroitischen Strahlenteiler. Die Detektionseinheit befindet sich am seitlichen Kameraausgang (siehe Abb. 4.9 B). Nach erneuter spektraler Aufteilung durch einen Strahlenteiler wird das Fluoreszenzlicht in der Bildebene über Kollimatoren auf die fasergekoppelten SPADs fokussiert, wobei die Faseröffnung als Lochblende dient, um die Konfokalität herzustellen. Ein zusätzlicher Emissionsfilter vor dem Detektor stellt sicher, dass kein Anregungslicht auf den Detektor gelangt.

Ein kritischer Punkt ist die Abstimmung von Faserdurchmesser, Detektionswellenlänge und der  $NA$  des verwendeten Objektivs sowie Durchmesser des eingekoppelten Anregungs-

laserstrahls. Kommerziell sind typischerweise Fasern mit Durchmessern von 25-105  $\mu\text{m}$  erhältlich, die hier in unterschiedlicher Kombination verwendet wurden.



**Abb. 4.9: Anregungs- und Detektionseinheit für die F(C)CS.** (A) Aufbau der Anregungseinheit, bestehend aus Ti:Sa und Frequenzverdoppler sowie einem Dioden-Laser (640 nm). (B) Detektionseinheit am rechten Ausgang des Mikroskops: Das Fluoreszenzlicht wird im Filterwürfel spektral getrennt und mittels Kollimatoren auf die Faseröffnungen der SPADs abgebildet.

#### 4.4.1.2 Kalibrierung des FCS-Systems

Für die zuverlässige Bestimmung von Molekülkonzentrationen und Diffusionskoeffizienten in späteren Experimenten ist es unerlässlich, Größe und Form des optisch erzeugten Volumenelements sowie das Verhalten der Fluoreszenzfarbstoffe genau zu charakterisieren und die kritischen Parameter zu optimieren.

Die Residenzzeit eines fluoreszierenden Moleküls im optisch erzeugten Volumenelement ist von verschiedenen geräte- und molekülspezifischen Parametern abhängig. Dazu gehören die Größe des Fokalvolumens, die Viskosität der Fluorophor-Umgebung sowie der hydrodynamische Radius des Moleküls. Je größer die Ausdehnung des Volumens, desto länger die Zeit, die ein Fluorophor braucht, dieses zu durchstreichen; je viskoser das Medium, desto länger die Residenzzeit im Fokus. Ein kleines Molekül in wässriger Lösung diffundiert typischerweise schneller, als ein in der Membran verankertes großes Protein.

Hinsichtlich der photophysikalischen Eigenschaften der jeweils verwendeten Fluorophore sind sowohl eine geringe molekulare Helligkeit, als auch eine geringe Photostabilität ungünstig. So kann es unter Umständen zu Messartefakten hinsichtlich Molekülanzahl und Diffusionszeit kommen, wenn der Fluorophor photobleicht, bevor er das Volumenelement komplett durchstrichen hat.

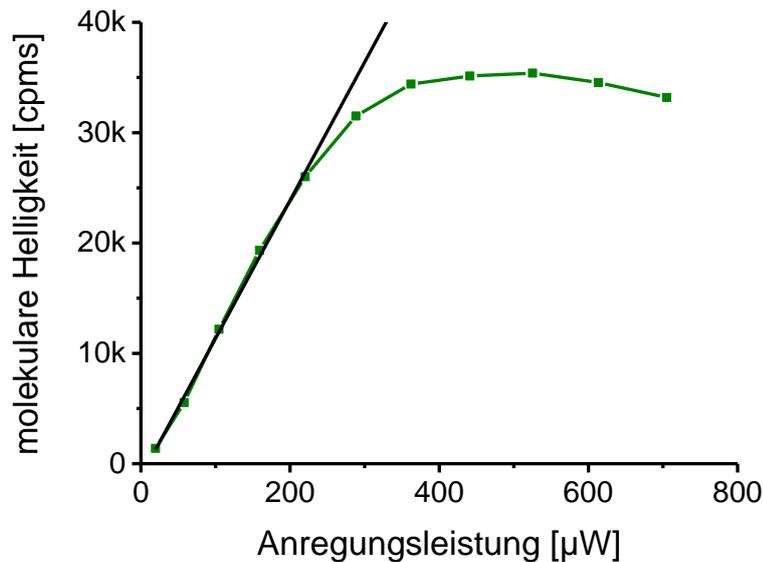
Daher war es besonders wichtig, die Anregungsintensität auf die Größe des Volumenelements, die verwendeten Fluorophore und ihre zu erwartende Mobilität abzustimmen, wie es im Folgenden beschrieben ist.

#### Bestimmung der Anregungsintensität

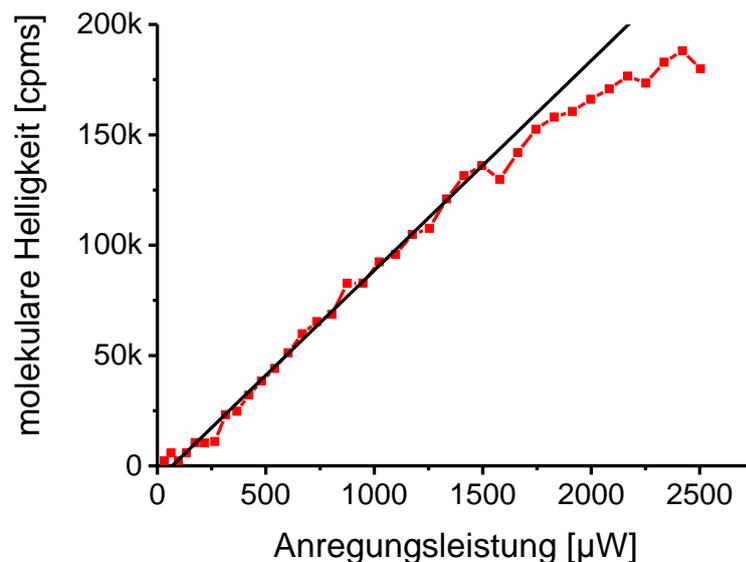
Die Optimierung der eingesetzten Anregungsintensitäten ist der erste kritische Schritt. Einerseits muss die Anregungsleistung hoch genug gewählt werden, sodass der Fluorophor möglichst viele Photonen emittiert. Andererseits darf die Anregungsintensität nur so hoch gewählt werden, dass die Fluorophore während ihres Durchtritts nicht ausbleichen.

Um die optimale Anregungsintensität zu bestimmen, wurden FCS-Kurven von rGFP und Bodipy 630/650 in wässriger Lösung mit ansteigenden Laserintensitäten gemessen (5x20 s pro eingestellter Laserintensität). Aus jeder FCS-Einzelmessung kann die Teilchenzahl mittels Kurvenfit bestimmt werden, um damit eine normierte Photonenzählrate (cpms, entspricht der molekularen Helligkeit) als direktes Maß für das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung zu ermitteln (siehe auch Helligkeit  $\eta$  in Kap. 3.5.3.3). Wie aus Abbildung 4.10 ersichtlich, steigen für rGFP die cpms-Werte bis zu einer Anregungsleistung von etwa 220  $\mu\text{W}$  linear an.

A



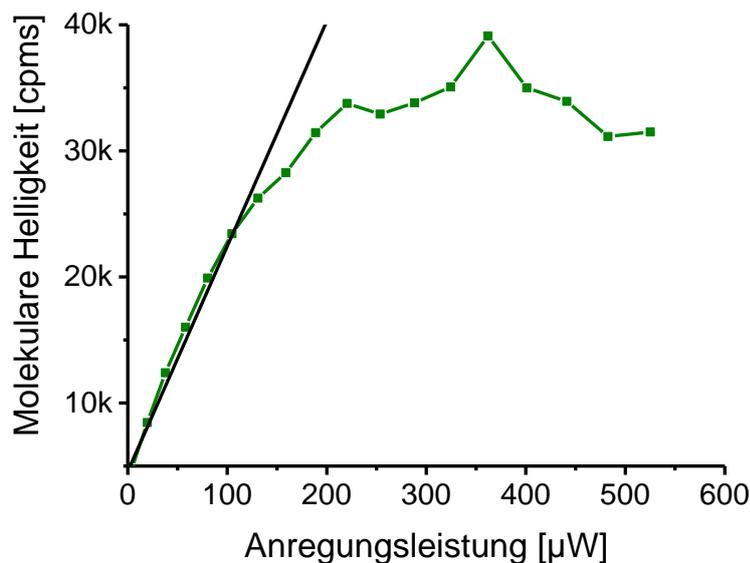
B



**Abb. 4.10: Bestimmung der optimalen Anregungsintensität von rGFP und Bodipy630/650.** Die Auftragung der Laserleistung gegen die molekulare Helligkeit zeigt die niedrigere Photostabilität des fluoreszierenden Proteins GFP (A) im Vergleich zu dem kleinen organischen Fluorophor Bodipy 630/650 (B).

Im weiteren Verlauf flacht die Kurve ab und fällt bei sehr hohen Laserleistungen sogar wieder leicht ab. Die molekulare Helligkeit von Bodipy 630/650 lässt sich im Vergleich bis zu einer Laserleistung von etwa 1400  $\mu\text{W}$  annähernd linear steigern und zeigt folglich eine sehr viel höhere Photostabilität.

Die effektive Photostabilität ist auch von der Umgebung und der Verweilzeit des Moleküls im Volumenelement abhängig, in der sich ein Molekül befindet. Daher wurde das Verhalten von GFP ebenfalls in der Zellmembran charakterisiert: Hierfür wurden CHO-Zellen auf Deckgläser passagiert, transient mit dem *N*-terminal EGFP-markierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor transfiziert (pro Fach einer 6-Fach-Zellkulturschale: 2  $\mu\text{g}$  cDNA, 6  $\mu\text{l}$  L2000) und am darauf folgenden Tag wie oben beschrieben gemessen (5x20 s). Zwischen aufeinanderfolgenden Messungen wurde eine andere Stelle auf der Membran beleuchtet, um Artefakte durch kumuliertes Bleichen zu verhindern. Abbildung 4.11 zeigt die detektierte molekulare Helligkeit in Abhängigkeit von der Anregungsleistung. Durch die höhere Viskosität der Zellmembran ist die Diffusionszeit durch das Volumenelement verlängert bzw. der Diffusionskoeffizient verringert. Außerdem ist die Bewegung aufgrund der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran von 3D auf 2D reduziert. Die maximal einsetzbare Laserleistung wurde in etwa halbiert.



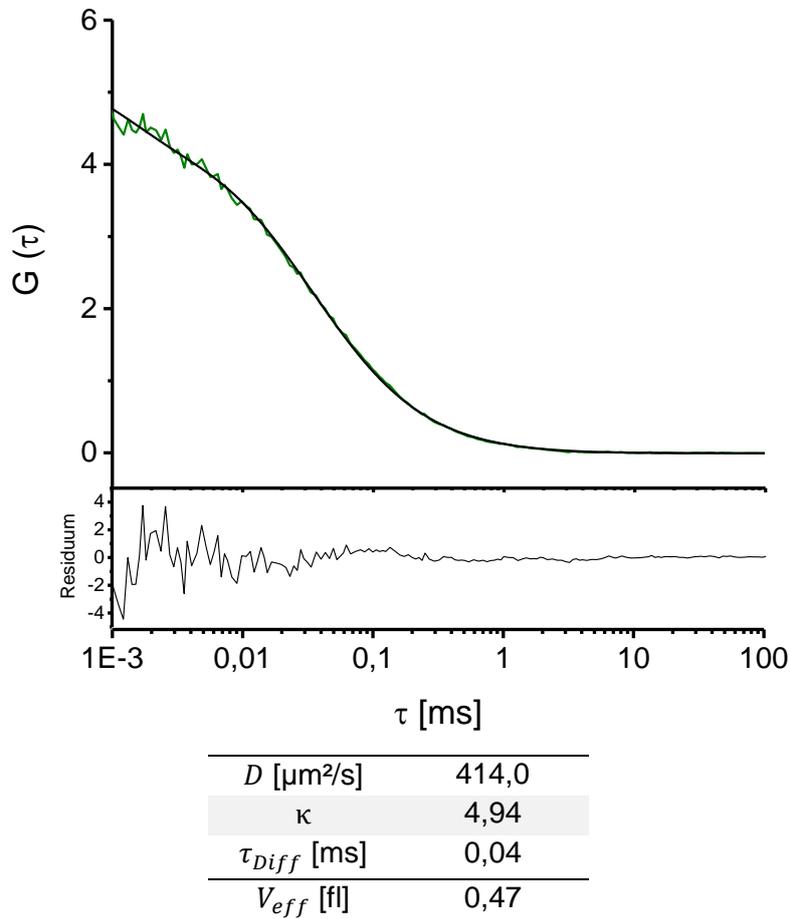
**Abb. 4.11: Bestimmung der optimalen Anregungsintensität in Zellen.** Aufgrund des erhöhten Widerstandes in der Zellmembran ist die Beweglichkeit des fluoreszierenden Proteins eingeschränkt. Die maximal einsetzbare Anregungsleistung ist reduziert.

### Bestimmung des effektiven Volumenelements

Nach Aufbau der konfokalen FCS-Apparatur und der Bestimmung der optimalen Anregungsleistung wurde das effektive Volumenelement  $V_{eff}$  bestimmt. Dies erfolgte durch Messung eines Farbstoffs mit bereits bekanntem Diffusionskoeffizienten in wässriger Lösung [194-196]. Gemeinsam mit der gemessenen Diffusionszeit  $\tau_D$  des Fluorophors durch das Volumenelement, dem aus dem Experiment erhaltenen Formfaktor und unter Berücksichtigung der Viskosität des jeweils verwendeten Lösungsmittels lässt sich aus den Gleichungen (3.21), (3.24) und (3.25)  $V_{eff}$  wie folgt berechnen:

$$V_{eff} = D^{\frac{3}{2}} \kappa \pi^{\frac{3}{2}} 8 \tau_D^{\frac{3}{2}}. \quad (4.1)$$

Für die Bestimmung des grünen (rGFP) Konfokalvolumens wurde eine wässrige Lösung des Fluorophors Alexa Fluor 488 gemessen. Das Ergebnis einer Beispielmessung zeigt Abbildung 4.12. Die Charakterisierung des effektiven Volumenelements erfolgte später vor jedem Experiment, um die richtige Berechnung der Diffusionskoeffizienten zu gewährleisten.



**Abb. 4.12: Bestimmung des effektiven Volumenelements.** Mittels Messung des Fluorophors Alexa Fluor 488, dessen Diffusionskoeffizient in wässriger Lösung bekannt ist [197], kann das Volumenelement bestimmt werden.

#### 4.4.1.3 Kalibrierung des FCCS-Systems

Für die Durchführung der zweifarbigen Kreuzkorrelationsanalyse war es zusätzlich notwendig, die Überlappung der beiden Anregungs- und Detektionsvolumenelemente zu maximieren (vgl. Kap. 3.5.3.4). Im Idealfall eines zu 100 % zweifach markierten Kalibrierstandards und zweier Volumenelemente gleicher Größe, die perfekt übereinanderliegen, müsste die resultierende Kreuzkorrelationskurve mit den beiden entsprechenden Autokorrelationskurven deckungsgleich sein. Leider sind die Volumenelemente aufgrund der unterschiedlichen Anregungswellenlängen nie gleich groß.

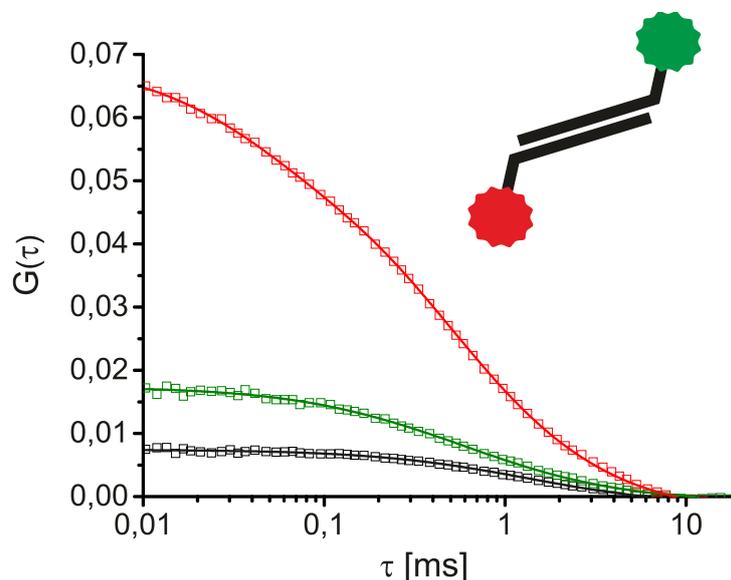
Damit unterscheiden sich zunächst die beiden Autokorrelationskurven und auch bei einer idealen Probe (100 % zweifach markiert) kann die Amplitude der Kreuzkorrelationskurve maximal die Amplitude der niedrigeren Autokorrelationskurve erreichen.

### FCCS-Standard in Lösung

Um die Überlappung der beiden Volumenelemente zu bestimmen, wurde eine zweifach markierte Doppelstrang-DNA (siehe Abb. 4.13) als Kalibrierstandard verwendet. Dieser Standard ist kommerziell erhältlich (IBA, Göttingen) [198, 199] und kommt dem Idealzustand einer zu 100 % zweifach markierten Probe nahe. Der Standard wurde nach Herstellerangaben verdünnt und direkt im Anschluss die FCCS Messungen durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 3.5.3.4 beschrieben, wächst das Volumenelement mit zunehmender Wellenlänge. Um diesen Unterschied auszugleichen und um die unterschiedlichen molekularen Helligkeiten zu berücksichtigen, wurden für die Detektion beider Kanäle Fasern unterschiedlicher Durchmesser gewählt (grün>rot). Daher erschien nun das grüne Detektionsvolumenelement etwas größer als das rote.

Die erhaltenen Autokorrelationskurven sind wie erwartet nicht deckungsgleich. Wie Abbildung 4.13 zeigt, besitzt das größere Volumenelement wie erwartet die kleinere Amplitude der Autokorrelation. Es konnte mit dem FCCS-Aufbau der typische Wert einer 50 %igen Kreuzkorrelation erreicht werden.

Aufgrund der sehr geringen Größe der Volumenelemente und der Empfindlichkeit des Aufbaus ist es empfehlenswert, die Kalibrierung in regelmäßigen Abständen zu wiederholen, um eine eventuelle Dejustage des Aufbaus vor der eigentlichen Messungen ausschließen zu können.



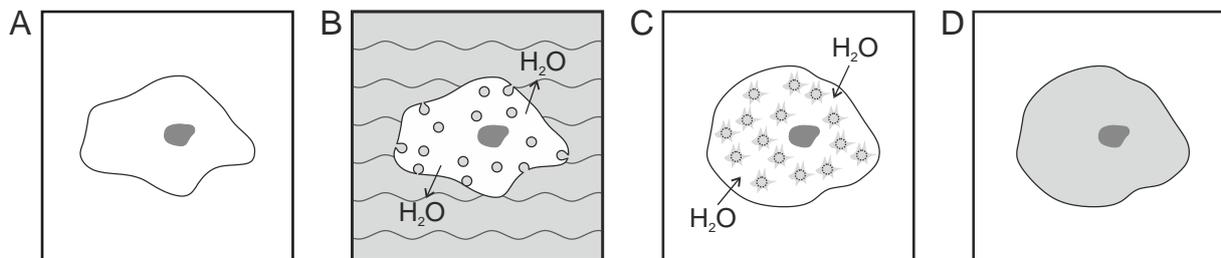
**Abb. 4.13: Kalibrierung des FCCS-Systems mit einem FCCS-Standard in Lösung.** Schematische Darstellung der zweifach markierten Doppelstrang-DNA, mit welcher durch die Auswertung der zugehörigen Auto- (grün und rot) und Kreuzkorrelationskurven (schwarz) die räumliche Überlappung der beiden Volumenelemente bestimmt werden konnte. Der Fit der 3D-Diffusion ist jeweils als durchgezogene Linie dargestellt.

### FCCS Standard in lebenden Zellen

Da die Aufklärung von Rezeptordynamiken in lebenden Zellen erfolgen sollte, wurde für die Kalibrierung des FCCS Systems auch ein *in-vivo*-Standard durchgeführt. Dieser ebenfalls kommerziell erhältliche Standard (IBA, Göttingen) erfordert eine über Pinozytose getriebene Transfektion von zweifach markierten Konstrukten in lebende Zellen und eine anschließende FCCS-Messung wie oben beschrieben.

Die Zellen werden für die Transfektion zunächst mit einem hypertonen Medium versetzt, in dem der zweifach markierte Standard enthalten ist, um diesen dann mit pinozytotischen Vesikeln aufzunehmen. Eine anschließende Inkubation der Zellen mit hypotonischem Medium soll letztlich zum Platzen der Vesikel und damit zur Freisetzung des zweifach markierten Konstrukts führen (siehe Abb. 4.14).

Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden HEK 293Ad-Zellen auf Deckgläser passagiert und am folgenden Tag der zweifach markierte Standard mit dem *Influx pinocytotic cell-loading reagent* in die Zellen transfiziert. Nach mehrmaligem Waschen mit Puffer erfolgte die FCCS-Messung. Trotz wiederholter Versuche konnte mit diesem Standard hier keine Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt werden. Auch die Färbung der Zellen war leider nicht reproduzierbar.

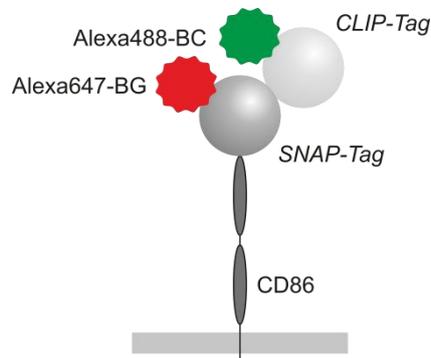


**Abb. 4.14: Funktionsschema eines kommerziellen FCCS-Standards in lebenden Zellen.** Zellen auf Deckgläsern (A) werden in einem hypertonen Medium inkubiert, welches ein zweifach markiertes Konstrukt enthält (B). Die Zellen nehmen dieses Konstrukt in Form von pinozytotischen Vesikeln auf (C). Inkubation der Zellen in hypotonem Medium bewirkt das Aufplatzen der Vesikel und die Zytosolfärbung der Zellen (D). Nach Life Technologies [200].

Da die Rezeptoren in der Zellmembran und nicht im Zytosol gemessen werden, ist der Ansatz mit pinozytotischen Vesikeln darüber hinaus für die hier verfolgten Zwecke nicht ideal und wurde nicht weiter verfolgt. Da kein kommerziell erhältlicher FCCS Standard für Membrananwendungen existiert, wurde ein Standard auf Basis der *SNAP-CLIP*-Technologie konzipiert. Hierzu wurde ein *N*-terminal mit dem *CLIP*- und dem *SNAP*-Tag markierter CD86-Rezeptor (siehe Abb. 4.15) aus der AG Lohse ausgewählt. Dieser Rezeptor konnte parallel mit Fluorophor-BC und -BG-Derivaten fluoreszenzmarkiert werden. Ein so erhaltener Standard ist prinzipiell gut geeignet, um die Ko-Diffusion durch die Volumenelemente zu messen, wobei sogar die zu erwartenden dynamischen Konstanten dieses Standards mit den späteren Experimenten vergleichbar sein sollten.

Für die Durchführung der Kalibrierungsmessung wurden CHO-Zellen wie beschrieben auf Deckgläser passagiert und unter Verwendung des L2000-Transfektionsreagenzes transient mit dem *CLIP-SNAP-CD86*-Rezeptor transfiziert (2 µg cDNA und 6 µl L2000 pro Deckglas). Am nächsten Tag erfolgte die Fluoreszenzmarkierung nach beschriebenem Protokoll (siehe Kap. 4.1.3). Es wurden verschiedener Mengen an eingesetztem Farbstoff (0,5-1 µl pro Fluorophor) getestet und die Dauer der Inkubationszeit variiert (20 bis 40 min).

Auch mit diesem Ansatz konnte trotz wiederholter Versuche keine Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt werden. Als Ursache ist hierbei zu sehen, dass der Idealzustand einer 100 % zweifach markierten Probe mit dem *SNAP-CLIP*-Markierungsprotokoll nicht gewährleistet werden konnte.



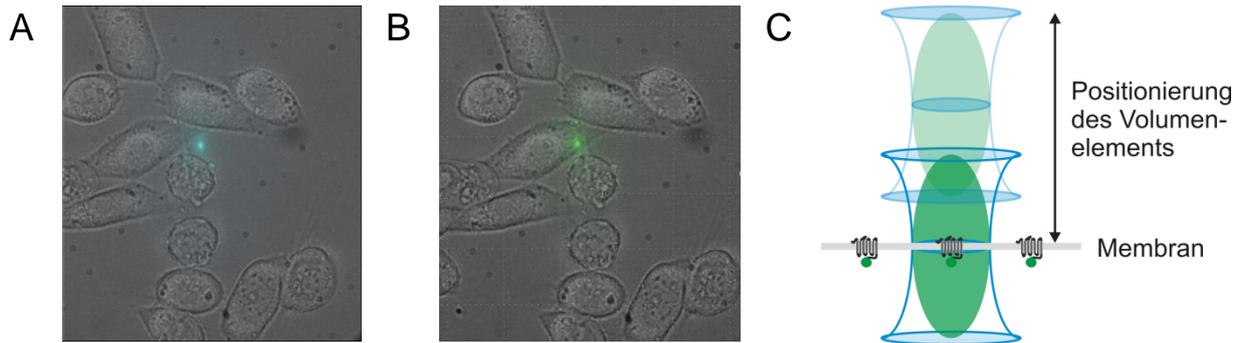
**Abb. 4.15: FCCS-Standard in der Zellmembran.** Dieser *N*-terminal *CLIP-SNAP*-markierte CD86-Rezeptor kann mit einem BC- und BG-Fluorophor markiert werden. Ähnlich wie in Calebiro *et al.* [125].

#### 4.4.1.4 Aufklärung von Rezeptordynamiken mit konfokaler FCS

Der etablierte und kalibrierte F(C)CS-Aufbau diene zunächst dazu, das Diffusionsverhalten von Rezeptoren in Zellmembranen lebender Zellen zu untersuchen, und die Voraussetzungen für Interaktionsstudien zu schaffen. Da die mit fluoreszierenden Proteinen markierten Rezeptoren in der Gruppe um M. Lohse bereits etabliert sind, wurde zuerst die Mobilität eines GFP-markierten  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mittels FCS untersucht. Dieser Ansatz ist einzelmolekülmethodisch der einfachste, da hier im Gegensatz zu anderen Methoden wie *SNAP-CLIP* ausgeschlossen werden kann, dass freier Farbstoff bei der FCS-Messung stört.

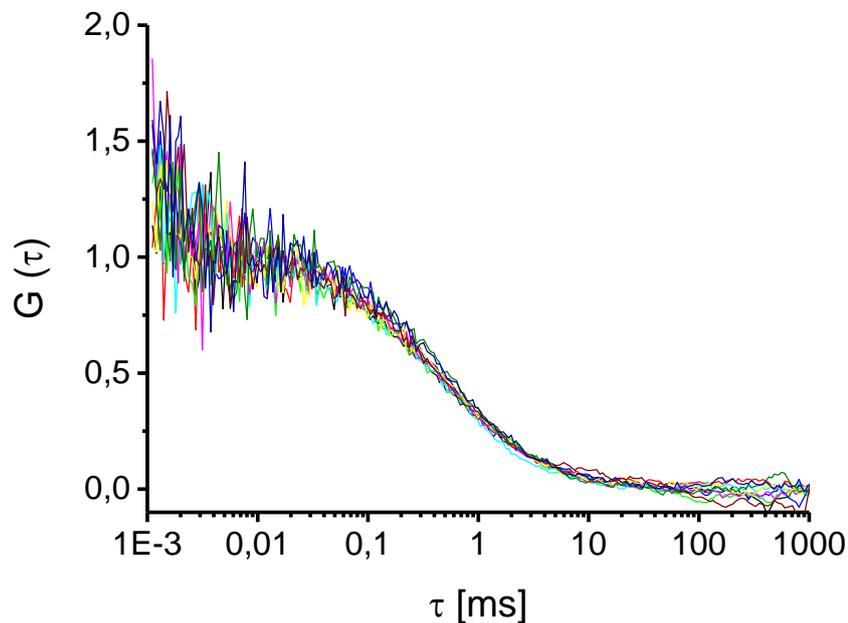
Für die Messungen wurden CHO-Zellen wie beschrieben transfiziert und am nächsten Tag gemessen. Hierzu wurden die Zellen zunächst im Hellfeldmodus betrachtet, dann eine transfizierte Zelle im Fluoreszenzweitfeldmodus ausgewählt und schließlich auf die konfokale Anregung gewechselt, um das kleine, als grüner Lichtpunkt erscheinende Fokalvolumen in der Zelle zu platzieren (siehe Abb. 4.16). Die Positionierung des Volumenelements in der *z*-Achse innerhalb der Membran ist der letzte Schritt vor der Messung und erfolgte nicht mehr bildgebend, sondern über eine Maximierung der Photonenzählraten, die von der Korrelationssoftware ausgegeben werden [201].

## Ergebnisse



**Abb. 4.16: Experimentelle Durchführung eines FCS-Experiments in lebenden Zellen.** Zunächst wurden die Zellen im Hellfeld fokussiert (A). Nach Auswahl einer transfizierten Zelle (B), konnte die Position des Volumenelements in der Membran durch Maximierung der Photonenzahl optimiert werden (C).

Für die eigentliche FCS-Messung wurde eine Zelle zehnmal für 10 s gemessen. Zwischen den Messungen verschiedener Zellen wurde die Laseranregung über eine Blende unterbrochen, um unnötiges Bleichen der Probe während der Auswahl einer geeigneten Zelle zu vermeiden. Die Messung von stimulierten Zellen erfolgte analog. Nach Zugabe des Rezeptorliganden (10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol) und einer kurzen Verzögerungszeit von ca. 5 min wurde die Messung gestartet. Ein Ensemble an so erhaltenen Einzelkurven zeigt Abbildung 4.17.

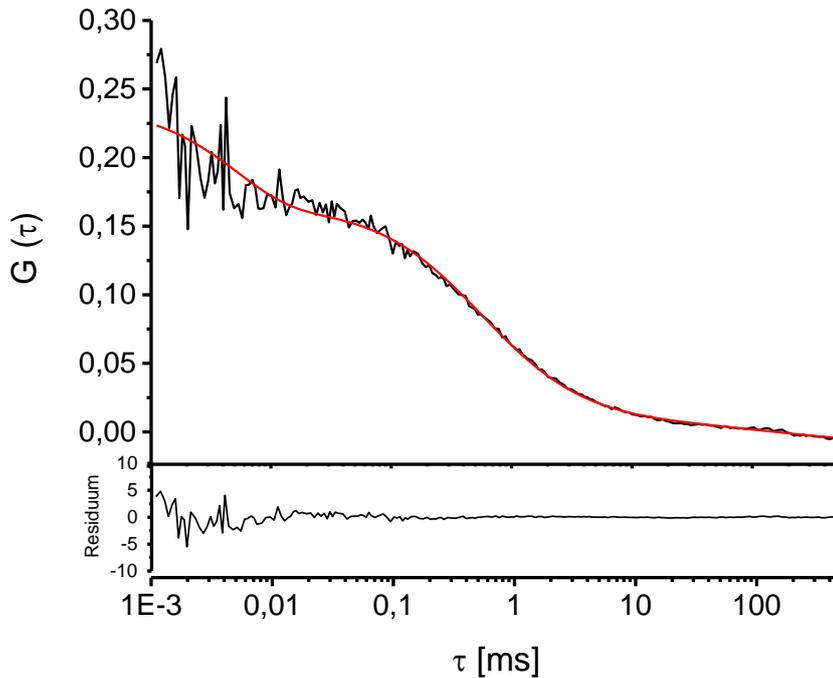


**Abb. 4.17: Typisches Ergebnis einer 10x10 s FCS-Messung von EGFP- $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in lebenden CHO-Zellen.** Daten normalisiert.

Für die Interpretation der Daten wurden zunächst alle Kurven der einzelnen Messungen individuell gesichtet. Einzelkurven, welche untypische Verläufe zeigten, die auf Bewegungsartefakte der Zelle oder starkes Bleichen hinwiesen, wurden wie in [139] beschrieben von der weiteren Auswertung ausgeschlossen: Nur Datensätze bei denen mindestens sieben der

zehn Einzelmessungen auswertbar waren, wurden berücksichtigt, die anderen verworfen. Die einzelnen Kurven wurden gemittelt und mit entsprechenden Fitfunktionen analysiert (vgl. Gl. (3.36) und (3.37)). Eine Beispielfunktion ist in Abbildung 4.18 dargestellt.

Während der Auswertung der Messdaten zeigte sich, dass alle FCS-Kurven, sowohl die der inaktiven, als auch die der aktivierten Rezeptoren, zwei unterschiedliche Diffusionskomponenten  $L_{(Konf)}$  und  $S_{(Konf)}$  aufwiesen (siehe Abb. 4.19) und mit einem Einkomponenten-Modell nicht beschrieben werden konnten. Bei der Anwendung eines geeigneten Zweikomponenten-Modells nach Gleichung (3.37) konnten die beiden unterschiedlich schnellen Komponenten näher charakterisiert werden.

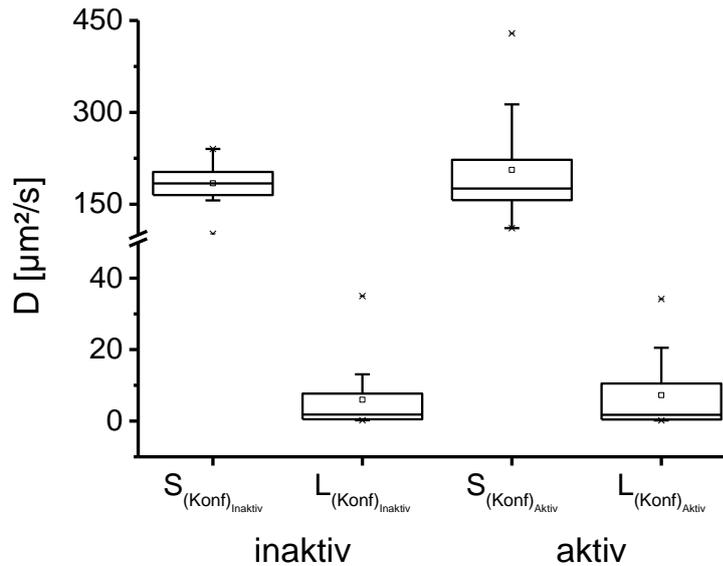


$N$	4
$\tau_{S(Konf)}$ [ms]	0,537
$\tau_{L(Konf)}$ [ms]	176,7
Fraktion 1 [%]	94,3
Fraktion 2 [%]	5,7
Anzahl Kurven	9 von 10

**Abb. 4.18: Beispielmessung von  $\beta_2$ -AR in der Zellmembran einer CHO-Zelle.** Die Auswertung der Fitfunktion (rot) zeigt zwei unterschiedlich schnell diffundierende Komponenten  $L_{(Konf)}$  und  $S_{(Konf)}$  in verschiedenen großen Anteilen auf.

Nach Berechnung der Diffusionskoeffizienten und detaillierter Betrachtung beider Komponenten im Histogramm ergaben sich Verteilungsmuster, wie sie in Abbildung 4.20 dargestellt sind.

## Ergebnisse



**Abb. 4.19: Ergebnis der Diffusionsmessung von  $\beta_2$ -AR in lebenden Zellen.** Es finden sich zwei unterschiedlich schnelle Komponenten  $L_{(\text{Konf})}$  und  $S_{(\text{Konf})}$  sowohl im basalen (schwarz), als auch im aktiven Zustand nach Stimulierung mit 10  $\mu\text{M}$  Isoproterenol (blau). Unterschiede zwischen inaktiven und aktiven Rezeptoren sind statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Test).

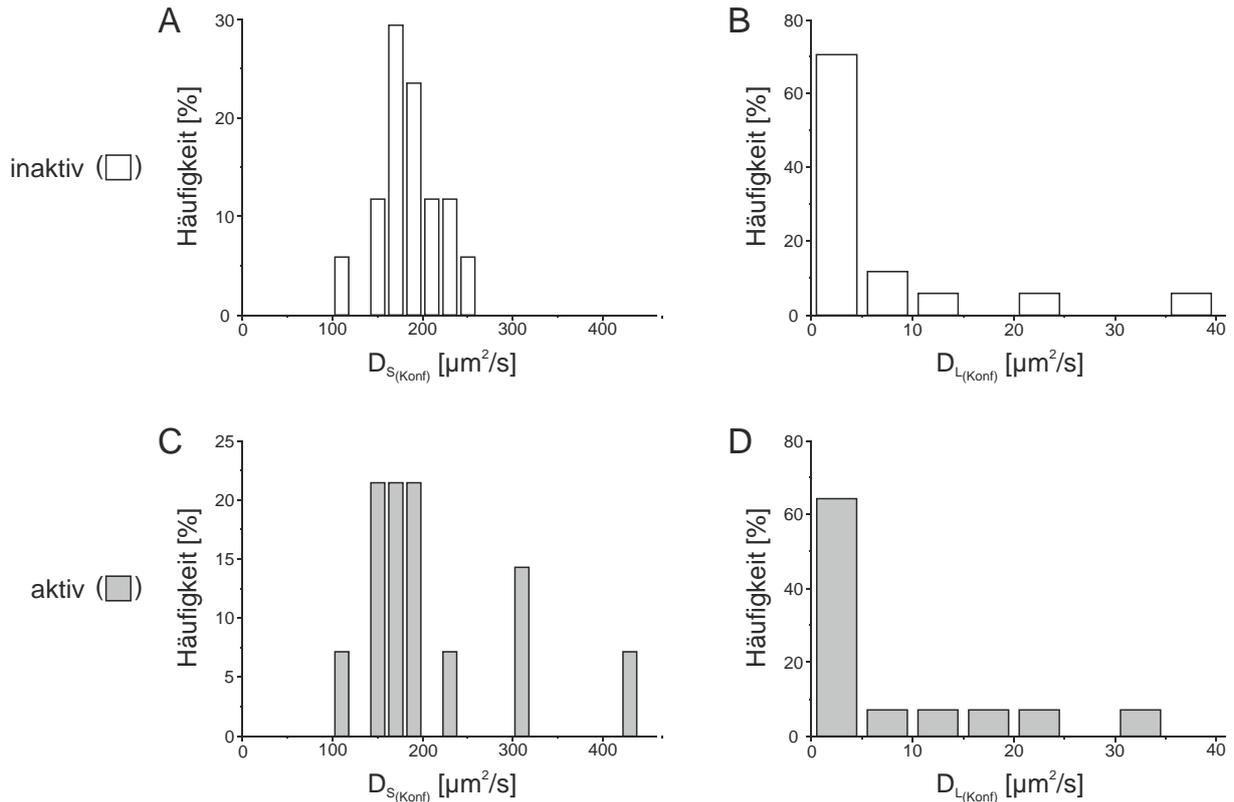
Die langsamere Komponente  $L_{(\text{Konf})}$  zeigte dabei recht breit gestreute Diffusionszeiten durch das Volumenelement mit Werten zwischen ca. 2,5 und 400 ms. Dies entsprach Diffusionskoeffizienten im Bereich von 0,2-35  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  und wurde der langsameren Bewegung der Rezeptoren in der Zellmembran zugeordnet. Der Mittelwert dieser Fraktion liegt bei  $D_{L(\text{Konf})} = 5,962 \pm 9,307 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Der Anteil der Partikel mit einem Diffusionskoeffizienten bis 5  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  liegt in dieser Fraktion bei ~ 70 % (vgl. Abb. 4.20 B). Die sehr schnelle Komponente  $S_{\text{Konf}}$ , die sich in allen Messungen finden ließ, zeigt eine schmale Verteilung mit Diffusionszeiten zwischen 0,3 und 0,9 ms ( $D_{S(\text{Konf})} = 184,1 \pm 34,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , vgl. Abb. 4.20 A).

Nach Aktivierung des Rezeptors beträgt der mittlere Diffusionskoeffizient der langsamen Komponente  $D_{L(\text{Konf})} = 7,253 \pm 10,32 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , die Werte der schnellen Komponente liegen bei  $D_{S(\text{Konf})} = 206,2 \pm 85,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (siehe Abb. 4.20 C+D). Unterschiede der Diffusionskoeffizienten zwischen aktiven und inaktiven Rezeptoren stellten sich bei Durchführung eines Mann-Whitney-Tests als statistisch nicht signifikant dar.

Zum Vergleich: In der Literatur finden sich Diffusionskoeffizienten von etwa 95  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  für freies GFP in Lösung [195]. Für die Diffusion im Zytosol werden Werte angegeben, die um den Faktor 4-10 niedriger sind [145]. Wachsmuth *et al.* [202] fanden Werte von 12,5  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ . Im Folgenden werden kurz vier verschiedene durchgeführte Kontrollen beschrieben, um die Ursache der schnellen Komponente aufzuklären:

- **Autofluoreszenz der Zelle:** Die FCS-Messungen von Wildtyp-Zellen zeigte außer dem erwarteten Detektorrauschen kein Signal, welches auf die schnelle Komponente hindeuten würde. Autofluoreszenz konnte als Ursache somit ausgeschlossen werden.

## Ergebnisse

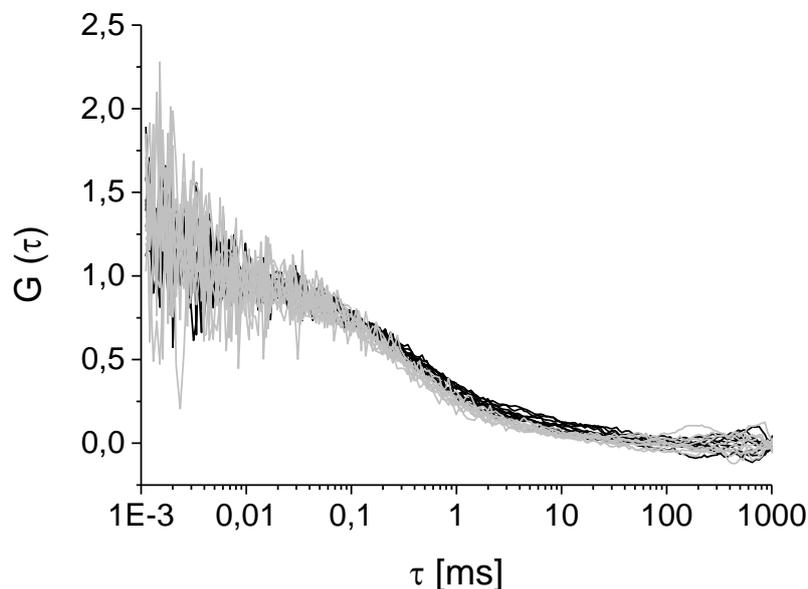


**Abb. 4.20: Histogramme der schnellen ( $S_{(Konf)}$ ) und langsamen ( $L_{(Konf)}$ ) Diffusionskoeffizienten von inaktiven sowie aktiven Rezeptoren.** Sowohl im basalen (weiß; (A+B)), als auch im aktiven Zustand (grau; (C+D)) weisen die Messungen zwei unterschiedlich schnell diffundierende Komponenten auf.

- Freies EGFP in der Umgebung der Zelle:** Das untersuchte Rezeptorkonstrukt trug das EGFP N-terminal. Unter Umständen wäre es daher möglich, wenn auch unwahrscheinlich, dass sich ungebundenes EGFP in der Umgebung der Zelle befand, bei der Messung mit erfasst wurde und zu dem Auftreten der schnellen Komponente führte. Um auszuschließen, dass die detektierte schnelle Komponente  $S_{(Konf)}$  womöglich von solchem freien Farbstoff in der untersuchten Probe herrührt, wurden alle verwendeten Medien und Puffer sowie der Überstand der transfizierten Zellen mit FCS untersucht. Jenseits des typischen Detektorrauschens konnten keine der schnellen Komponente entsprechenden Fluoreszenzfluktuationen detektiert werden.
- Akkumulation von freiem EGFP in und um der basalen Membran:** Bei den verwendeten CHO-Zellen handelte es sich um eine adhärenzte Zelllinie, deren basale Membran unmittelbar auf dem Deckglas anheftet, während die apikale Seite deckglasfern ist. In der (konfokalen) FCS ist es vorteilhaft, aber (im Gegensatz zur TIRF-M) nicht zwingend in der basalen Membran zu messen. Alle bisher gezeigten Daten wurden allerdings an der basalen Seite der Zelle akquiriert und es wurde, wie üblich, von der Gleichwertigkeit der basalen und apikalen Membran ausgegangen. Das Puffervolumen jedoch, welches die apikale Membran umspült, ist wesentlich größer als jenes, das sich zwischen der Zelle und dem Deckglas befindet. Sollte es sich bei der schnellen Komponente also um freies EGFP handeln, müsste es an der apikalen Membran

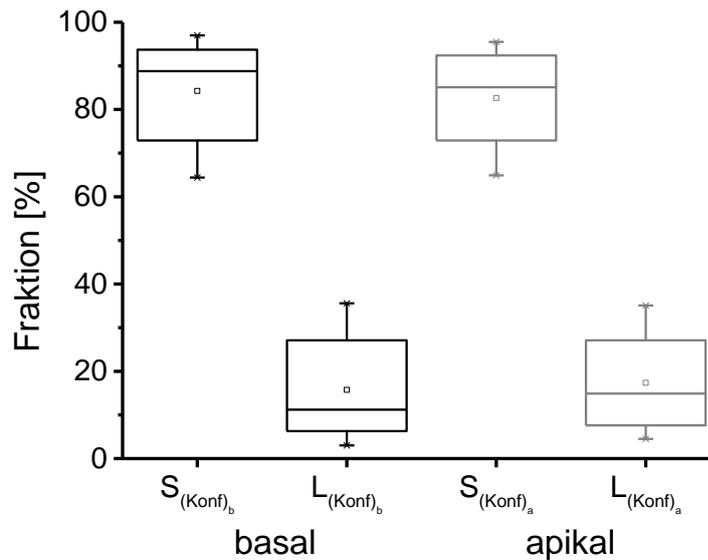
wesentlich schneller aus der Membrenumgebung diffundieren können und daher in einem geringeren Anteil detektierbar sein. Um derartige Artefakte hinsichtlich der Membranseite auszuschließen, wurde in einem neuen Versuch nicht nur die basale, sondern auch die apikale Membran einer Zelle mittels FCS untersucht. Hierfür wurden CHO-Zellen wie beschrieben transfiziert und gemessen. Während der Messung wurde folgende Strategie verfolgt: Zunächst wurde eine Zelle ausgewählt und an der apikalen Membran zehnmal für 10 s gemessen.

Dann wurde das Volumenelement an die basale Membran versetzt und erneut für zehnmal 10 s gemessen. Wie in den Abbildungen 4.21 und 4.22 ersichtlich, treten die schnelle und langsame Komponente sowohl an basaler, als auch an apikaler Membran auf. Die Durchführung eines t-Tests zeigte, dass sich die Anteile der schnellen und langsamen Komponenten an basaler und apikaler Membran nicht signifikant unterscheiden.



**Abb. 4.21: Vergleich der Einzelmessungen an basaler und apikaler Membran.** Beispielergebnis von zehn Messungen zu je 10 s an basaler (schwarz) und apikaler (grau) Zellmembran. Die schnelle Komponente ist bei beiden Messungen vorzufinden (Daten normalisiert).

- **Zytoplasmatische EGFP-Fluoreszenz:** Um die Diffusionszeiten der Rezeptoren sicher charakterisieren zu können, wurde wie bereits in Kapitel 3.5.3.5 motiviert von konfokaler zu evaneszenter Anregung gewechselt. Die axiale Ausdehnung des konfokalen Volumens von ca. 1  $\mu\text{m}$  konnte so auf ca. 100 nm in der evaneszenten Anregung verringert werden. Diese Maßnahme wird folglich eine Reduzierung des Zytoplasma-induzierten Hintergrundrauschens bewirken. Falls die schnelle Diffusionskomponente  $S_{(\text{Konf})}$  aus dem Zytoplasma herrührt, müsste sich diese nach evaneszenter Anregung extrem verringern, wenn nicht sogar verschwinden. Durch die selektive Anregung im Bereich der Zellmembran sollte nun im Folgenden näher untersucht werden, ob die Verringerung der schnellen Komponente eintritt, oder diese doch einen Teil des spezifischen Rezeptorsignals darstellt.



**Abb. 4.22: Verteilung der Fraktionen schnell und langsam diffundierender Komponenten in der basalen und apikalen Zellmembran.** An beiden Seiten der gemessenen Zellen finden sich die schnelle Komponente  $S_{(Konf)}$  und die langsame Komponente  $L_{(Konf)}$  in ähnlich großen Anteilen wieder, die sich statistisch nicht signifikant unterscheiden (gepaarter t-Test).

#### 4.4.2 Erweiterung: FCS im TIRF Modus (TIR-FCS)

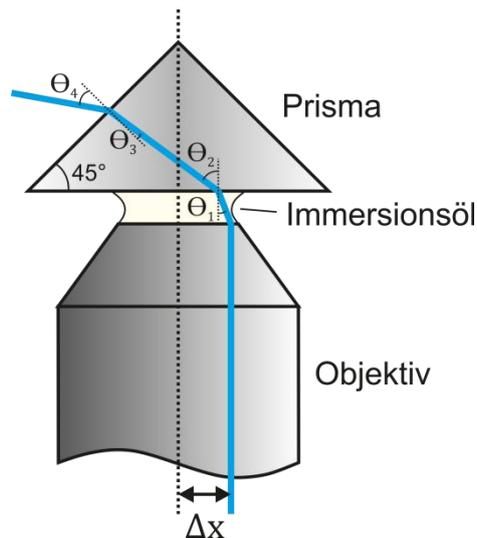
##### 4.4.2.1 Erweiterter experimenteller Aufbau für die Interne Totalreflexions-Fluoreszenzanregung

Der etablierte F(C)CS-Aufbau wurde von zunächst ausschließlich konfokaler auf optional evaneszente Anregung erweitert. Der Aufbau wurde wie von Axelrod [116] beschrieben unter Verwendung eines Objektivs mit hoher Numerischer Apertur ( $NA = 1,49$ ) modifiziert. Um die Einkopplung des Anregungslichts und damit das ausgebildete TIRF-Feld zu verkleinern, wurde die Tubuslinse entfernt und durch eine Linse mit einer Brennweite von 40 cm ersetzt. Diese wurde derart in das System integriert, dass sie auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Der Winkel der Anregung konnte nun von Epi-Illumination bis hin zu TIR variiert werden, indem die Linse relativ zur optischen Achse verschoben wurde. Ein weiterer Versatz bewirkte eine Vergrößerung des Einfallswinkels und damit eine Verringerung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe [116]. Da die Photonenzahl bei diesem Aufbau sank, wurde auch die Detektionseinheit optimiert. Der Einbau einer 50- $\mu\text{m}$  Faser diente dazu, ausreichend Photonen einsammeln zu können.

##### 4.4.2.2 Kalibrierung des TIR-FCS Systems

Zunächst erfolgte die Charakterisierung des erzeugten TIRF-Feldes wie von Lee et al. [203] vorgeschlagen. Wie in Abbildung 4.23 ersichtlich, wurde ein Prisma oberhalb des Objektivs fixiert. Beide Elemente waren über Immersionsöl mit einem Brechungsindex von 1,52 verbunden.

Der Winkel des einfallenden Laserlichts wurde stufenweise verstellt und die jeweilige Änderung des Winkels des aus dem Prisma austretenden Lichts ( $\theta_4$ ) gemessen. Mit Hilfe des Snellius'schen Brechungsgesetzes konnte der Winkel des einfallenden Laserlichts ( $\theta_1$ ) berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Brechungsindices ( $n_1 = 1,33$ ,  $n_2 = 1,52$ ) war damit nach Gleichung (3.8) die Berechnung der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe möglich (vgl. Tab. 4.6). Die ermittelten Werte lagen für typische TIRF-Winkel wie erwartet bei etwa 100 nm. Damit ist die axiale Ausdehnung des Anregungsvolumenelements um eine Größenordnung kleiner als für die konfokale Anregung, was sich prinzipiell positiv auf die Rezeptormessungen in der Membran auswirken sollte.



**Abb. 4.23: Messung des Anregungswinkels des Objektivs nach Lee *et al.* [203].** Mit Hilfe eines rechtwinkligen Prismas wurde der Austrittswinkel des Laserstrahls ermittelt. Über mehrere Zwischenschritte konnte so die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in die Probe bestimmt werden.

**Tab. 4.6: Charakterisierung der Eindringtiefe.** Durch Feineinstellung der Anregungsgeometrie kann das erzeugte evaneszente Feld optimiert werden.

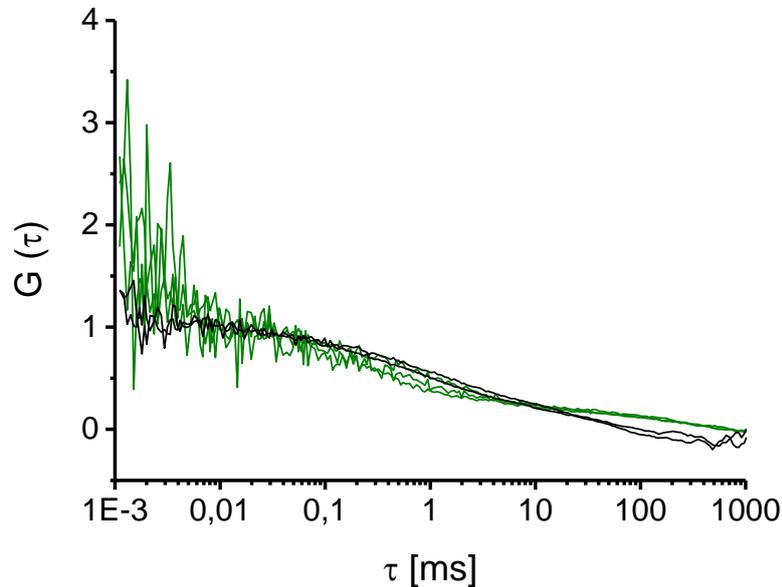
Austrittswinkel $\theta_4$ [°]	Einfallswinkel $\theta_1$ [°]	Eindringtiefe $d_{eva}$ [nm]
35	67,17	88,2
30	64,20	120,4
25	61,14	670,9

#### 4.4.2.3 Aufklärung von Rezeptordynamiken mit evaneszenter FCS

Mit dem etablierten und kalibrierten evaneszenten Aufbau konnten erste Rezeptordaten gewonnen werden. Das Protokoll der Untersuchung der Rezeptordynamik mit evaneszenter FCS erfolgte analog zu dem der konfokalen FCS (siehe Kap. 4.4.1). CHO-Zellen wurden transient mit dem fluoreszenzmarkierten Rezeptorkonstrukt EGFP- $\beta_2$ -AR transfiziert und am nächsten Tag gemessen.

Die akquirierten Daten konnten mit einem Einkomponenten-Modell nicht angepasst werden.

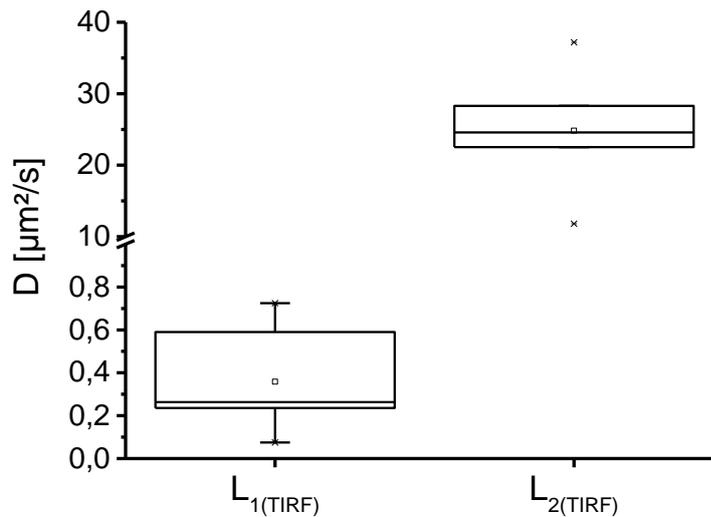
Trotz Verkleinerung des Anregungsvolumens auf einen Bereich nahe der Zellmembran wurden noch immer zwei Fraktionen detektiert, die nachfolgend als  $L_{1(\text{TIRF})}$  und  $L_{2(\text{TIRF})}$  bezeichnet werden. Wie in Abbildung 4.24 ersichtlich, war jedoch der prinzipielle Kurvenverlauf der mit evaneszenter Anregung akquirierten Kurven etwas anders als bei denen aus konfokaler Anregung.



**Abb. 4.24: Vergleich der Autokorrelationskurven von Messungen mit konfokaler und evaneszenter Anregung.** Sowohl bei der Messung mit konfokaler (schwarz), als auch evaneszenter (grün) Anregung findet sich eine schnelle und eine langsame Komponente. Dargestellt sind jeweils zwei Beispielkurven aus konfokaler und evaneszenter Anregung (Daten normalisiert).

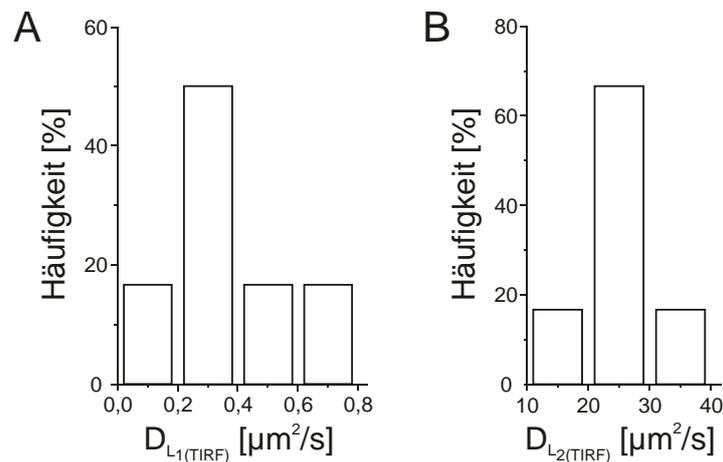
Die Auswertung der gemessenen FCS-Kurven mit der entsprechenden Fitfunktion (siehe Gl. (3.39)) zeigte, dass die Diffusionskoeffizienten der detektierten Komponenten nicht mehr so weit auseinander lagen wie die mit konfokaler Anregung gemessenen (vgl. Abb. 4.25). Die sehr schnelle Komponente aus der konfokalen Messung ( $S_{(\text{konf})}$ ) war nun nicht mehr vorzufinden.

## Ergebnisse



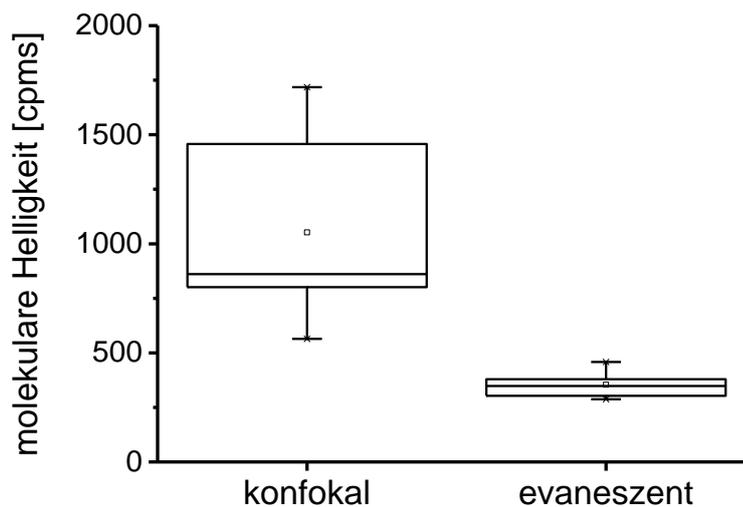
**Abb. 4.25: Diffusionsanalyse von  $\beta_2$ -AR mit evaneszenter Anregung.** Mit evaneszenter Anregung in der Region um die Zellmembran konnten zwei Hauptfraktionen diffundierender Moleküle ( $L_{1(TIRF)}$  und  $L_{2(TIRF)}$ ) beobachtet werden.

Die zwei Fraktionen  $L_{1(TIRF)}$  und  $L_{2(TIRF)}$  zeigten folgende mittlere Diffusionskoeffizienten auf:  $D_{L_{1(TIRF)}} = 0,359 \pm 0,246 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (vgl. Abb. 4.26 A),  $D_{L_{2(TIRF)}} = 24,833 \pm 8,337 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (vgl. Abb. 4.26 B). Somit konnten die langsamen Diffusionszeiten, welche mit konfokaler Anregung für den  $\beta_2$ -AR gefunden wurden ( $L_{(Konf)}$ ), weiter unterteilt werden.



**Abb. 4.26: Histogramm der Verteilung der Diffusionskoeffizienten des  $\beta_2$ -AR.** Mittels konfokaler Anregung bestimmte Diffusionszeiten konnten durch evaneszente Anregung bestätigt und weiter in  $D_{L_{1(TIRF)}}$  (A) und  $D_{L_{2(TIRF)}}$  (B) klassifiziert werden.

Insgesamt war die Akquirierung sauberer Autokorrelationskurven mit evaneszenter Anregung schwierig. Zunächst ist die Detektion bei der evaneszenten Anregung sehr viel sensitiver als bei der konfokalen, da die Zahl der emittierten Photonen durch die eingeschränkte Anregung sehr gering ist. Somit ist der Aufbau deutlich empfindlicher gegenüber Störsignalen. Dieser Parameter lässt sich über die Auswertung der molekularen Helligkeit  $\eta$  klassifizieren. Wie bereits in Kapitel 3.5.3.3 angesprochen, erlaubt dieser Wert eine Aussage über die Qualität der FCS Daten, da er in direktem Verhältnis zum Signal-Rausch-Verhältnis der Messung steht. Kim *et al.* [139] empfehlen, abhängig vom Aufbau des Messsystems und den Eigenschaften der Probe, für Messungen in lebenden Zellen Werte im Bereich von 1000-5000 cpms. Wie in Abbildung 4.27 ersichtlich, wurden diese Referenzwerte mit konfokaler Anregung erreicht. Im Mittel lagen die Werte hier bei 1050 cpms. Bei der evaneszenten Anregung hingegen lagen die Werte der molekularen Helligkeit im Mittel bei 350 cpms. Dies ist mit Hinblick auf die sehr kurzen Messzeiten von 10 s pro Einzelmessung als kritisch zu betrachten. Die Vorteile der räumlichen Verkleinerung des Volumenelements durch evaneszente Anregung ermöglicht eine verbesserte Diffusionsanalyse, geht aber demzufolge auch mit einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses der FCS-Messung einher. Längere Messzeiten wären hier, wenn möglich, notwendig.



**Abb. 4.27: Signal-Rausch-Verhältnis bei konfokaler und evaneszenter Anregung.** Die Werte für die molekulare Helligkeit  $\eta$  liegen bei konfokaler Anregung (schwarz) bei erwarteten Werten. Nach dem Wechsel zu evaneszenter Anregung (grün) sind sie reduziert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diffusionsanalyse mittels bildgebender Einzelmolekülverfolgung

Die bildgebende Einzelmolekülverfolgung erlaubt die Analyse von Diffusionskoeffizienten im Bereich von  $10^{-4}$  bis  $10^{-1} \mu\text{m}^2/\text{s}$  [204]. Allerdings ist die experimentelle Umsetzung solcher Einzelmolekülstudien an Rezeptoren und insbesondere an G-Proteinen in lebenden Zellen mit diversen Hürden verknüpft, wie zusammenfassend von Perez *et al.* [205] beschrieben: (i) Markierung intrazellulärer Proteine mit photostabilen Fluorophoren, (ii) erhebliche Autofluoreszenz lebender Zellen, (iii) Entstehung von Messartefakten durch die Bewegung der Zellen während der Messung sowie (iv) Schwierigkeiten der Interpretation von heterogenen Diffusionseigenschaften. In der hier vorliegenden Arbeit konnten diese Probleme größtenteils gelöst werden. Die Koexpression der Rezeptoren und G-Proteine mit dem *SNAP/CLIP-Tag* in lebenden Zellen ermöglicht die Fluoreszenzmarkierung mit kleinen, Zellmembran-permeablen, photostabilen Fluorophoren. Durch die Auswahl von evaneszenter Anregung konnte darüber hinaus störende Autofluoreszenz vermindert werden, da die Probe gezielt im Bereich der deckglasnahen Zellmembran illuminiert wird. Das Auftreten von Artefakten aufgrund von Zellbewegungen wurde durch die sehr kurzen Messzeiten minimiert. Dies sind wichtige Voraussetzungen für die Verlässlichkeit dynamischer Experimente. Die ermittelten Diffusionseigenschaften werden im Folgenden diskutiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verteilung der Diffusionskoeffizienten der  $\alpha_{2A}$ -AR einer glockenförmigen Kurve entspricht, deren Form sich nicht verändert, wenn der Rezeptor aktiviert wird. Dies lässt den Schluss zu, dass die Rezeptoren im basalen Zustand frei in der Zellmembran diffundieren und auch ihre Aktivierung durch einen Liganden diesbezüglich keine Änderung bewirkt. Es konnte eine Hauptfraktion an Molekülen detektiert werden, die sich mit einem Diffusionskoeffizienten von ca.  $0,072 \mu\text{m}^2/\text{s}$  in der Zellmembran bewegt. Die hier präsentierten Ergebnisse an  $\alpha_{2A}$ -AR weisen eine deutliche Ähnlichkeit mit vorherigen Daten der  $\beta_1$ -AR ( $0,052 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) und  $\beta_2$ -AR ( $0,039 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [125] sowie denen der Muskarin  $M_1$ -Rezeptoren ( $0,079 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) [206] auf. Wie bereits Calebiro *et al.* [125] zeigen konnten, diffundieren  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR frei in der Zellmembran lebender Zellen. Ein Hinweis darauf, dass sie außerdem eine eingeschränkte Bewegung aufweisen, wie es für den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor beschrieben wurde [207, 208], fand sich bei der gegebenen zeitlichen Auflösung nicht.

Bei den G-Proteinen wurde, im Gegensatz zu den bisher diskutierten Rezeptoren, ein anderes Diffusionsverhalten beobachtet. Die Fraktionen unterschiedlich schnell diffundierender G-Proteine sind breiter gestreut als die der Rezeptoren. Neben einer kleinen Fraktion, die sich etwas schneller in der Membran bewegt als die Rezeptoren, existiert ein großer Anteil sehr langsamer bzw. immobilere G-Proteine. Dieser Anteil wird noch vergrößert, wenn sich die G-Proteine in einem aktivierten Zustand befinden, unabhängig von der Koexpression mit dem  $\alpha_{2A}$ -AR oder dem  $A_1$ -R.

Studien anderer Forschergruppen haben ein ähnliches Verhalten für das G-Protein Ras gefunden. Hier wurde mittels Einzelmolekülverfolgung eine aktivierungsabhängige Immobili-

sierung dieser kleinen G-Proteine gezeigt [205, 209-211]. Die Autoren verstehen ihre Ergebnisse als Beweis für die Bildung großer aktivierter Ras-*signaling* Komplexe, in welchen die Signalweiterleitung an die entsprechenden Effektoren stattfindet [211]. Eine Ausbildung spezieller *signaling*-Kompartimente, in welchen sich Rezeptoren sowie nachgeschaltete Effektoren aufhalten, wird in Fachkreisen schon länger diskutiert [212, 213]. Solche Kompartimente werden als Mikrodomänen in der Plasmamembran verstanden. Eine ihrer Funktionen ist es, die Signaltransduktion der GPCR zu organisieren und räumlich aufzuteilen. Als Mikrodomänen wurden bisher unter anderem mit Clathrin-Gittern ausgekleidete Vertiefungen in der Zellmembran, so genannte *clathrin-coated pits* [214, 215], Tetraspanine [216, 217], *Membran/Lipid Rafts* sowie *Caveolae*, eine spezielle Untergruppe der *Lipid Rafts* [218-222] beschrieben.

Im folgenden Abschnitt soll speziell auf das in der Arbeitsgruppe um Kusumi erarbeitete Modell eingegangen werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass die komplette Zellmembran in 30-250 nm große Kompartimente unterteilt ist [208, 223-225]. Ihre Entstehung wird mit dem *picket-fence*-Modell erklärt [208, 226, 227]. Demnach werden die Kompartimente vom Aktin-Zytoskelett begrenzt („*fence*“). Direkt assoziierte Transmembranproteine sind immobil („*pickets*“) und halten das Membranskelett in nächster Nähe zur Zellmembran [227]. Darüber hinaus wird postuliert, dass diese Membrankompartimente *Rafts* unterschiedlicher Größe enthalten können, die sich unentwegt ausformen, verbinden und wieder trennen [228].

Des Weiteren konnte Kusumi in mehreren experimentellen Arbeiten zeigen, dass Lipide und Proteine von einem solchen Kompartiment zum nächsten „hüpfen“ können. Diese Bewegung wird als *hop diffusion* bezeichnet [223-225]. Während die Proteinmobilität unmittelbar vor dem Übergang zwischen Kompartimenten reduziert scheint, so ist sie innerhalb des Kompartiments jedoch durch freie Diffusion beschreibbar [213]. Dabei ist es wichtig anzumerken, dass es einer sehr hohen zeitlichen Auflösung bedarf, um zwischen freier Diffusion und *hop diffusion* zu unterscheiden. Andernfalls wird die *hop diffusion* durch Mittelungsfehler verschleiert und erscheint als freie Diffusion mit durchschnittlich kleinerem Diffusionskoeffizienten [213].

In diesem Kontext lässt sich, analog zum G-Protein Ras, die größere Fraktion immobil oder sehr langsamer G-Proteine der hier vorliegenden Arbeit auf die mögliche Ausbildung von Kompartimenten zurückführen, in welchen die G-Proteine die Signale an ihre Effektoren weitergeben. So könnte die schnelle Fraktion den innerhalb dieser Kompartimente frei diffundierenden G-Proteinen zugeschrieben werden. Die langsame bzw. immobile Fraktion würde der sich entlang eines *fence* bewegenden G-Proteine entsprechen.

Ein anderes Modell zur Erklärung der hier gefundenen mobilen und immobilen G-Proteine basiert auf der Annahme, dass die schnelle Fraktion frei diffundierenden G-Proteinen entspricht, während die langsameren an Rezeptoren vorgekoppelt sind (*precoupling*-Modell). Nach Stimulierung der Rezeptoren und Aktivierung der G-Proteine nimmt der Anteil schneller G-Proteine ab, der Anteil langsamer G-Proteine hingegen zu. Dies lässt sich auf den größeren Anteil an Rezeptor-G-Protein-Komplexen zurückführen, die nach der Theorie des *collision coupling*-Modells entstanden sind. Gestützt wird diese Theorie durch die G-Protein Studie von van Hemert *et al.* [229] in Schleimpilzen. Dort konnten zwei Populationen von G-Proteinen aufgezeigt werden, welche sich in ihren Diffusionskoeffizienten um eine Größenordnung unterscheiden ( $0,015 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,14 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Dabei wurde die schnellere Fraktion dem heterotrimeren G-Protein zugeschrieben. Die langsamere Fraktion erwies sich als vorgekoppelter Rezeptor-G-Protein-Komplex.

Die beschriebenen Modelle schließen sich nicht gegenseitig aus, sodass auch Kombinationen aus beiden denkbar sind. Unter Voraussetzung der Verfügbarkeit der schnellen Messtechnik aus der Arbeitsgruppe um Kusumi, könnten beide Modelle im bildgebenden Einzelmolekülexperiment mittels dreifacher Fluoreszenzmarkierung von *fence*, Rezeptor und G-Protein überprüft werden.

## 5.2 Diffusionsanalyse mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mit dem für diese Arbeit etablierten FCS-Aufbau konnten Diffusionszeiten im niedrigen Mikro- bis hohen Millisekundenbereich detektiert werden. Dabei wurden mittels konfokaler Anregung zwei Hauptfraktionen diffundierender Partikel ermittelt. Neben einer sehr schnellen Fraktion  $S_{(konf)}$  wurde eine langsamere Fraktion  $L_{(konf)}$  gefunden. Signifikante Änderungen der Diffusionszeiten nach Rezeptoraktivierung konnten bisher nicht beobachtet werden.

Der Wechsel zu evaneszenter Anregung erlaubte eine weitere Charakterisierung dieser Fraktionen. Die schnelle Komponente  $S_{(konf)}$  wurde nun nicht mehr ermittelt. Die langsame Komponente  $L_{(konf)}$  konnte jedoch bestätigt und weiter zu  $L_{1(TIRF)}$  und  $L_{2(TIRF)}$  klassifiziert werden.

Die mit konfokaler Anregung detektierte langsame Fraktion  $L_{(konf)}$  zeigte Diffusionskoeffizienten zwischen  $D_{L(konf)} = 0,2-35 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Der Wechsel zu evaneszenter Anregung bestätigte diese Ergebnisse. So wurde eine Fraktion  $L_{1(TIRF)}$  mit einem mittlerem Diffusionskoeffizienten von  $D_{L1(TIRF)} = 0,359 \mu\text{m}^2/\text{s}$  sowie eine etwas schnellere Fraktion  $L_{2(TIRF)}$  mit einem durchschnittlichen Diffusionskoeffizienten von  $D_{L2(TIRF)} = 24,83 \mu\text{m}^2/\text{s}$  detektiert.

Die langsame Komponente  $L_{1(TIRF)}$  wird der Diffusion der  $\beta_2$ -AR in der Zellmembran zugeschrieben. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Arbeiten an GPCR, welche diese Theorie untermauern. Herrick-Davis *et al.* [230] untersuchten kürzlich GFP- bzw. YFP-markierte Serotonin- ( $5\text{-HT}_{2A}$ ), Dopamin- ( $D_1$ ), Muskarin- ( $M_1$ ,  $M_2$ ) sowie adrenerge Rezeptoren ( $\alpha_{1b}$ ,  $\beta_2$ ) hinsichtlich ihrer Diffusionseigenschaften nach Expression in HEK-Zellen und gaben einen durchschnittlichen Diffusionskoeffizienten von  $0,75 \mu\text{m}^2/\text{s}$  an. In CHO-Zellen wurde für den mit Topaz, einer gelben GFP-Variante [231], markierten Adenosin  $A_1$ -Rezeptor ein Diffusionskoeffizient von  $0,427 \mu\text{m}^2/\text{s}$  beschrieben [232]. Für den YFP-markierten Histamin-H1-Rezeptor wurde ein Wert von  $D = 0,53 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  ermittelt [233].

Die Herkunft der etwas schnelleren Komponente  $L_{2(TIRF)}$  ist schwieriger zu interpretieren. Es existiert eine Reihe von Arbeiten, welche nicht nur eine, sondern zwei verschiedene Diffusionskoeffizienten aufzeigen [234]. So untersuchten beispielsweise Prenner *et al.* [235]  $\beta_2$ -AR in C6 Glioblastoma-Zellen nach Inkubation mit Alexa532-markiertem Noradrenalin (Alexa532-NA) mittels FCS. Neben frei diffundierendem Alexa532-NA konnten für den Rezeptor-Ligand-Komplex zwei verschiedene Mobilitäten beobachtet werden, eine langsame mit  $D = 1,1 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  sowie eine schnelle mit  $D = 15,4 \pm 8,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Hierbei waren die unterschiedlichen Diffusionszeiten nachweislich kein Artefakt von Photobleichen. Eine biologische Erklärung bleibt jedoch aus. Pramanik *et al.* [236] untersuchten die Diffusionseigenschaften von Galanin- (GAL) Rezeptoren in Insulinomazellen. Hierfür wurden die Rezeptoren mit Rhodamin-markiertem Galanin inkubiert und anschließend mit FCS gemessen. Es fanden sich ebenfalls zwei verschiedene GAL-Rezeptor-Komplexe mit

Diffusionszeiten von 22 ms und 700 ms. Mögliche Erklärungen waren die Existenz von zwei Subpopulationen des GAL-Rezeptors oder von zwei verschiedenen GAL-Rezeptor-Subtypen.

Sollte die in dieser Arbeit detektierte, etwas schnellere Komponente  $L_{2(\text{TIRF})}$  jedoch von zytosolischem GFP herrühren, dessen Diffusionskoeffizient wie beschrieben in dieser Größenordnung liegt [145], müsste der etablierte Aufbau mit evaneszenter Anregung weiter optimiert werden. Durch Verkleinerung der Eindringtiefe des TIRF-Feldes in die Probe könnte dann die Rezeptordiffusion spezifischer detektiert werden. Dies ist durch herkömmliche TIRF-Aufbauten nicht realisierbar, weil die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts die Ausbreitung des evaneszenten Feldes bestimmt [119, 237]. Ein möglicher Weg wäre eine Kombination mit optoplasmonischen Ansätzen [238], die eventuell eine weitere Einschnürung des Anregungsfeldes ermöglichen könnten. Eine alternative Möglichkeit könnte die STED-FCS [150, 151] darstellen. Da diese Methode am gegebenen Aufbau jedoch wesentlich schwieriger zu realisieren ist, wäre der optoplasmonische der favorisierte Ansatz.

Bei Messung mit konfokaler Anregung fand sich des Weiteren eine Fraktion  $S_{(\text{konf})}$  von Molekülen mit sehr schnellen Diffusionszeiten wieder ( $D_{S(\text{konf})} = 184,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), die weder aus dem Transfektionsmedium (freies EGFP in Lösung), noch aus dem Messpuffer (Verunreinigung) oder dem Zellhintergrund (Autofluoreszenz) stammt, jedoch sowohl bei der Messung der basalen, als auch der apikalen Membran auftrat. In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise darauf, dass es sich bei dieser schnellen Komponente um einen photophysikalischen Effekt des Fluorophors handeln könnte. Briddon *et al.* [232, 239] detektierten bei der Untersuchung des  $A_1$ -Adenosinrezeptors mittels FCS ebenfalls eine vergleichbar schnelle Komponente (50-100  $\mu\text{s}$ ), welche nicht der Rezeptordiffusion zugeordnet werden konnte. Vielmehr wird hier ein intramolekularer photophysikalischer oder chemischer Prozess (z. B. Protonenaustausch) vermutet, welcher zu einem Flackern bzw. Blinken des Fluorophors führen könnte [232]. Dieses Phänomen wurde ausführlich von Schwille *et al.* [190] sowie Haupts *et al.* [240] beschrieben und entsteht in Abhängigkeit von der Intensität der Anregungsleistung sowie des pH-Werts der Fluorophor-Umgebung. Auch Herrick-Davis *et al.* [230, 241] detektierten in ihren Oligomerisierungsstudien verschiedener GPCR in Abhängigkeit vom verwendeten fluoreszierenden Protein solche sehr schnellen Diffusionszeiten (YFP: 50-100  $\mu\text{s}$ , GFP: 250-300  $\mu\text{s}$ , *mCherry*: 230  $\mu\text{s}$ ). Auch hier wird deren Auftreten auf die photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore zurückgeführt. Gegen die Interpretation der schnellen Komponente als photophysikalischen Effekt spricht jedoch, dass nach dem Wechsel zu evaneszenter Anregung diese schnelle, vormals dominante Komponente in der vorliegenden Arbeit nicht mehr detektiert werden konnte. Deshalb wäre der evaneszenten Anregung für zukünftige Messungen der Vorzug zu geben, auch wenn sich hierbei das Signal-Rausch-Verhältnis im Vergleich zur konfokalen Anregung etwas verschlechtert.

Um sicherzustellen, dass es sich bei der schnellen Komponente nicht doch um ein spezifisches Rezeptorsignal handelt, wäre eine zusätzliche Anisotropie-Messung denkbar [242]. Unter Hinzufügen eines weiteren Detektionskanals wäre ein Anisotropie-Aufbau in den jetzigen Aufbau relativ einfach integrierbar.

Wie es aus der Diskussion bis zu dieser Stelle ersichtlich ist, weisen die ermittelten Werte der Diffusionskoeffizienten verschiedener Forschergruppen und Arbeiten eine deutliche Streuung auf. Deshalb wird im Folgenden eine kurze Abhandlung über die möglichen Ursachen dieser unterschiedlichen Ergebnisse vorgenommen.

Die Diffusionskoeffizienten der untersuchten Rezeptoren sind von der Aufenthaltszeit im Detektionsvolumen abhängig. Daher liegt die Vermutung nahe, dass unterschiedliche photo-physikalische Charakteristika der verwendeten Fluorophore die gemessenen Diffusionszeiten der Rezeptoren in der Membran beeinflussen können. Wie jedoch gezeigt werden konnte, weisen beispielsweise Serotonin 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren die gleichen Diffusionszeiten auf, unabhängig davon ob sie mit GFP oder *mCherry* markiert wurden [241].

Ein weiterer Aspekt, welcher die Diffusionszeiten beeinflussen kann, ist die Größe der diffundierenden Spezies. Wie Dorsch *et al.* [243] zeigen konnten, können  $\beta_2$ -AR als Monomere, Dimere oder auch Oligomere höherer Ordnung auftreten. Um unter Anwendung der FCS zwischen Spezies verschiedener Größe unterscheiden zu können, müssen diese eine mindestens um den Faktor 1,6 verschiedene Diffusionszeit bzw. einen 6-fachen Unterschied in der Masse aufweisen [234, 244]. Daher ist es faktisch unmöglich, allein aufgrund von Unterschieden in der Größe zwischen Monomeren und Dimeren zu unterscheiden. Eine Rezeptoroligomerisierung ist daher als Ursache für das Auftreten verschieden schnell diffundierender Moleküle unwahrscheinlich. Um den Preis eines erhöhten Analyseaufwands erlaubt die FCS unter bestimmten Bedingungen die Unterscheidung von Monomeren, Dimeren oder Oligomeren: Zusätzlich zu den detektierten Fluktuationen müssen die Partikelzahl und die molekulare Helligkeit des verwendeten Fluorophors näher betrachtet werden. Die Auswertung eines entsprechenden Photonenhistogramms (*Photon Counting Histogram*, PCH) [245] oder die Anwendung der Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse (*Fluorescence-Intensity Distribution Analysis*, FIDA) [246] erlaubt die Bestimmung der molekularen Helligkeit. Diese ist direkt proportional zur Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, welche das Detektionsvolumen gemeinsam in einem Komplex durchstreichen. Diffundiert nun ein einzelner Rezeptor, hätte dieser die molekulare Helligkeit  $x$ , während ein Dimer mit zwei Fluorophoren doppelt so hell wäre. Ein Oligomer mit  $n$  Fluorophoren würde die  $n$ -fache molekulare Helligkeit aufweisen [230]. Somit können zwei verschiedene Spezies (z. B. Monomer und Dimer) bereits dann unterschieden werden, wenn sich ihre molekulare Helligkeit lediglich um den Faktor zwei unterscheidet [247]. Diese Technik wurde bereits angewendet, um die Funktion von Homodimeren verschiedener Serotonin-Rezeptoren zu untersuchen [248]. Da die PCH darüber hinaus auch im Zweifarben-Modus durchführbar ist [249], wird auch die Untersuchung von verschieden markierten Heterodimeren oder beispielsweise Rezeptor-G-Protein-Interaktionen ermöglicht. Diese Techniken könnten in Zukunft als weitere Unterstützung der FCS-Experimente dienen.

Jenseits dieser diskutierten Ursachen der streuenden Diffusionskoeffizienten ist die Anwendung der FCS zur Untersuchung von Proteinen in Zellmembranen sehr komplex und birgt verschiedene Herausforderungen. Wenn für die FCS-Messungen in Lösung typischerweise Standardabweichungen unter 5 % erreicht werden, so liegen sie für Messungen an Zellmembranen oft bei 50-100 % oder sogar darüber [250]. Auftretende Schwierigkeiten betreffen sowohl das biologische System, als auch grundsätzliche biophysikalische Überlegungen sowie geräteabhängige Aspekte und werden nachfolgend kurz erläutert.

Die zentrale Problematik der FCS-Messungen in Membranen lebender Zellen begründet sich in der relativ langen Residenzzeit der Fluorophore im Volumenelement. Die Ursache liegt zum einen im erhöhten Widerstand der Lipidmembran, zum anderen in der Einschränkung der dreidimensionalen Bewegungsmöglichkeit in Lösung hin zu zweidimensionaler in der Membran. Bleibt nun eine signifikante Fraktion an Fluorophoren während der Diffusion durch das Volumenelement, sinkt die gemessene Diffusionszeit und führt folglich zu einer

falschen Bestimmung der Diffusionskoeffizienten. Um Artefakte durch Photobleichen zu minimieren, wäre die *Line-Scan FCS* eine denkbare Option. Wie von Ries *et al.* [251] beschrieben, können so Diffusionskoeffizienten in Zellmembranen unter Verwendung eines gewöhnlichen Laserscanning-Mikroskops schnell und genau bestimmt werden.

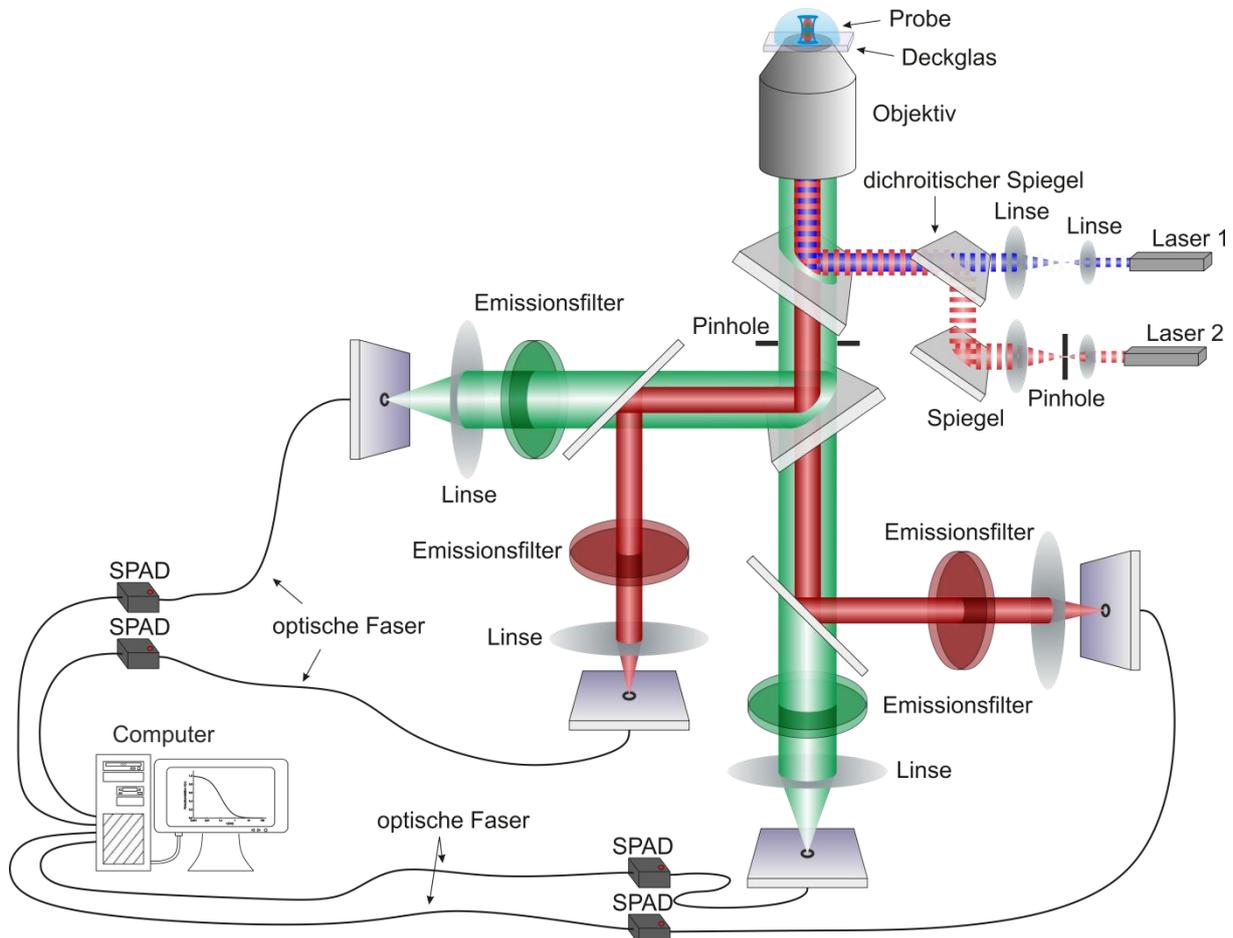
Neben der eingeschränkten Bewegungsmöglichkeit der Rezeptoren in der Membran und der dadurch bedingten langen Aufenthaltszeit im Anregungsvolumen sind es auch die Eigenschaften der Zellmembran selbst, welche die FCS-Messung beeinflussen. Die Verwendung adhärenter Zelllinien suggeriert, dass die gemessene basale Membran starr und plan auf dem Deckglas aufliegt. Tatsächlich ist die Zellmembran jedoch kein komplett planes, sondern ein dynamisch-welliges System, welches Einstülpungen und Furchungen aufweist. Wird das Volumenelement nun an einer Stelle platziert in der die Membran relativ zur Fokalebene geneigt ist, verlängern sich gegebenenfalls die Diffusionszeiten durch das Volumenelement. Der scheinbare Diffusionskoeffizient wäre damit kleiner als der tatsächliche Wert. Daneben können Substrukturen in der Zellmembran, die unterhalb der optischen Auflösungsgrenze liegen, die Messung beeinflussen. Inhomogenitäten der Brechungsindices verschiedener Zellkompartimente können zudem zu einer Verzerrung des Detektionsvolumens führen. Auch Abweichungen von der vom Hersteller angegebenen Deckglasdicke, gleich welcher Tendenz, können zu Divergenzen im optischen System führen [252].

Des Weiteren ist die Kalibrierung des Detektionsvolumens mit einer Farbstofflösung, wie in Kapitel 4.4.1.2 beschrieben, nur eine gute Näherung. Ein 3D-Gauß-Modell ist kein exaktes Modell und kann besonders unter den oben genannten Umständen vom tatsächlichen Volumenelement abweichen. Es wurde beschrieben, dass die entsprechende Photophysik des Fluorophors unterschiedlich sein kann, je nachdem ob es in Lösung oder gebunden an ein Protein vorliegt [252]. Um dies zu umgehen, wäre die Verwendung solcher FCS-Methoden von Vorteil, die nicht kalibriert werden müssen. Hierzu zählen unter anderem *z-scan FCS* [201], *two-focus FCS* [253] oder die *scanning FCS*, die parallel [254] oder senkrecht [255] zur Zellmembran durchgeführt werden kann.

Um die Limitierungen hinsichtlich der räumlichen Auflösung zu beheben, wurde von Di Rienzo *et al.* [256] jüngst eine Methode beschrieben, mit der die Zellmembran sehr schnell bildgebend erfasst werden kann. Anschließend lassen sich die einzelnen Bilder der Bilderfolge nutzen, um räumlich-zeitliche Korrelationsfunktionen zu berechnen. Die Funktionen werden mit entsprechenden Modellen angepasst und schließlich der Diffusionskoeffizient bestimmt. Diese als *STICS (Spatio-Temporal Image Correlation Spectroscopy)* bezeichnete Methode lässt sich einfach an standardisierten Mikroskop-Aufbauten etablieren und bietet sich zur Kontrolle für zukünftige Messungen an.

Neben der Etablierung und Kalibrierung des FCS-Aufbaus sowie der durchgeführten Diffusionsanalysen an GPCR wurden in dieser Arbeit außerdem die Grundlagen für die zweifarbige Kreuzkorrelationsanalyse an Rezeptoren geschaffen. Diese Erweiterung wird eine genaue Interaktionsanalyse erlauben. Der Versuchsaufbau für zukünftige FCCS-Messungen wurde bereits etabliert und kalibriert. Somit wird es ermöglicht, die Rezeptoraktivierung durch einen fluoreszierenden Liganden über Kreuzkorrelationsanalyse direkt zu verfolgen, wenn zwei verschiedene spektral ausreichend getrennte Fluorophore zur Markierung verwendet werden. Die Zweifarben-Kreuzkorrelationsanalyse erfordert die Überlagerung zweier optischer Volumenelemente. Daher empfiehlt es sich das System in regelmäßigen Abständen mit einem Kreuzkorrelations-Standard nachjustieren. Der Einsatz eines Zweiphotonenlasers, mit dem zwei Fluorophore unterschiedlicher spektraler

Emission mit nur einer Anregungswellenlänge angeregt werden können, würde die perfekte Überlagerung der Volumenelemente sicherstellen [257, 258]. Eine weitere Herausforderung ist spektrales Übersprechen, welches zu falsch-positiver Kreuzkorrelation führt. Dies kann durch den Einsatz von intermittierend gepulster Anregung (*Pulsed Interleaved Excitation*, PIE) [259, 260] gelöst werden (vgl. Abb. 4.28).



**Abb. 4.28: Typischer Aufbau für Anisotropie-Messungen.** Zweifarbige intermittierend gepulste Anregung (Laser 1 und Laser 2) an einem gewöhnlichen inversen Mikroskop-Aufbau. Die emittierte Fluoreszenz der zweifach markierten Probe wird vom Objektiv eingesammelt, mittels eines polarisierenden Strahlteilers geteilt, durch dichroitische Strahlteiler spektral aufgetrennt, gefiltert und schließlich von vier SPADs in separaten Detektionskanälen detektiert. Die Korrelationsanalyse kann zwischen den verschiedenen Kanälen durchgeführt werden. Nach Schwille und Haustein [152].

### 5.3 Bewertung der verwendeten Verfahren

In dieser Arbeit wurden Einzelmolekülstudien, basierend auf bildgebender Einzelmolekülverfolgung sowie F(C)CS, auf die Untersuchung des Diffusionsverhaltens von Rezeptoren und G-Proteinen in der Zellmembran lebender Zellen angepasst. Beide Techniken sind komplementär nutzbar und können mit dem gleichen zellulären Assay und gleichen Methoden der Fluoreszenzmarkierung betrieben werden. Der Vorteil des verwendeten TIRF-Ansatzes, der für beide Techniken zum Einsatz kam, besteht darin, dass

sich die Anregung auf Regionen nahe der Zellmembran beschränkt und so Hintergrundrauschen aus der Zelle maßgeblich reduziert werden kann. Membranständige Rezeptoren und G-Proteine konnten so mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis untersucht werden.

Um den Preis der geringeren zeitlichen Auflösung erlaubt die bildgebende Einzelmolekülverfolgung die Untersuchung eines relativ großen Sichtfeldes. So konnte in einem Experiment die Bewegung der Rezeptoren und G-Proteine innerhalb einer großen Zellmembranregion untersucht werden. Die schnellen Diffusionszeiten, welche mit der FCS detektiert wurden, blieben hier jedoch aufgrund der geringeren Zeitauflösung im Verborgenen.

Das Korrelationsverfahren ermöglichte dagegen die Auswertung von Dynamiken in einem großen Zeitbereich von Mikrosekunden bis Sekunden, jedoch nur in einem sehr kleinen Detektionsvolumen. Die Diffusionszeiten, welche mittels bildgebender Einzelmolekülverfolgung aufgezeigt wurden, konnten in der FCS nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass sehr langsame Rezeptoren photobleichen bevor sie das Volumenelement komplett durchstrichen haben. Dies würde zu artifiziell verkürzten Verweilzeiten im Detektionsvolumen führen. Eine Vergrößerung der Diffusionskoeffizienten wäre die Folge. So könnte die reduzierte Mobilität beispielsweise darauf zurückgeführt werden, dass sich die Rezeptoren in Mikrodomänen aufhalten [261]. Für die Charakterisierung sehr langsam diffundierender Moleküle eignet sich daher neben der hier angewandten bildgebenden Einzelmolekülverfolgung die *scanning* FCS [143, 254, 255]. Hierbei bewegt sich das FCS-Anregungsvolumen mit einer vorgegebenen Geschwindigkeit durch die Probe und ermöglicht so die Detektion von Fluktuationen an verschiedenen Punkten. Nach Autokorrelationsanalyse der so erhaltenen Daten kann detektiert werden, ob das Signal auch dann noch vorhanden ist, wenn das Anregungsvolumen an den gleichen Punkt zurückkehrt. Da die Geschwindigkeit, mit welcher über die Probe gescannt wird, relativ langsam ist (im Bereich von Millisekunden bis Sekunden), können auch sehr langsam diffundierende Moleküle effizienter detektiert werden [234]. So konnten Philip *et al.* [262] für den Bradikininrezeptor eine solch langsame Molekülpopulation nachweisen, die sich mit normaler FCS nicht detektieren lässt ( $D = 0,002 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Diese Methode würde es somit ermöglichen, die mit Einzelmolekülverfolgung gezeigten Diffusionszeiten zu bestätigen.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Einzelmolekültechniken konnte ein breiter Zeitbereich der Rezeptor (und G-Protein-) Dynamiken untersucht werden, der an die Zeitskalen anschließt, welche bereits mit anderen Fluoreszenztechniken wie FRET erreicht wurden. Um noch schnellere Zeitskalen abdecken zu können und somit die Lücke zu NMR- und Modellierungsdaten zu schließen, könnten sehr schnelle Spektroskopie-Techniken wie die Ultrakurzzeit-Spektroskopie eingesetzt werden. In einem Anregungs-Abfrage-Experiment (*pump-probe experiment*) kann eine zeitliche Auflösung realisiert werden, die den Nano- bis Femtosekundenbereich abdeckt [263]. Diese Technik wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung des Rhodopsins eingesetzt [264].

## 5.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurden erfolgreich Einzelmolekülfluoreszenztechniken verwendet, um das Diffusionsverhalten von Rezeptoren und G-Proteinen in der Zellmembran lebender Zellen zu studieren. Zudem wurden wichtige Voraussetzungen geschaffen, um auch die Dynamiken der Aktivierung von GPCR zu analysieren. Die Etablierung und Charakterisierung des zellulären Assays, der Methoden der Fluoreszenzmarkierung, des Messaufbaus für die FCS, FCCS sowie die Vorbereitung für die Implementierung von intermittierend gepulster Anregung werden in Zukunft folgende GPCR Studien erlauben:

- **FCS und Anisotropie: weitere Untersuchung von lateraler sowie rotierender Bewegungen.** Neben den in dieser Arbeit beschriebenen Diffusionsanalysen der Rezeptoren innerhalb der Zellmembran wird ein Anisotropie-Aufbau wie in Abbildung 4.28 dargestellt zusätzlich erlauben, Rotationsbewegungen zu detektieren. Hierbei wird die emittierte Fluoreszenz eines Fluorophors anhand seiner Polarisation unter Verwendung eines polarisierenden Strahlteilers in zwei Detektionskanäle aufgetrennt. Solche Anisotropie-Messungen könnten die in dieser Arbeit detektierte schnelle Diffusionskomponente  $S_{(konf)}$  als mögliche Rotationsdiffusion erklären. Auch schnelle Rezeptoraktivierungszeiten werden so zugänglich.
- **FCCS: Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand sowie Rezeptor und G-Protein.** Sind der Rezeptor und sein Ligand bzw. das nachgeschaltete G-Protein mit spektral ausreichend getrennten Fluorophoren markiert, erlaubt die Zweifarben-FCCS die Kreuzkorrelation der Diffusion von Rezeptor und Ligand, bzw. von Rezeptor und G-Protein. Die Amplitude der Kreuzkorrelation würde hierbei jeweils die Interaktion darstellen, während die entsprechenden Autokorrelationskurven Aussagen über Diffusionsdynamiken und Konzentrationen erlauben.
- **FRET-FCS: Untersuchung intra- oder intermolekularer Rezeptordynamiken.** Die Erweiterung des FCCS Aufbaus wie in Abbildung 4.28 dargestellt, ermöglicht zukünftige FRET-FCS Experimente. Konformationsänderungen innerhalb eines zweifach fluoreszenzmarkierten Rezeptors oder eines Rezeptordimers mit je einem Fluorophor pro Monomer können in Echtzeit unter hoher zeitlicher Auflösung sowie mit hoher Spezifität detektiert werden.

Der Grundstein für diese zukünftigen Experimente wurde durch die vorliegende Arbeit bereits gelegt. So werden weitere Einzelmolekülexperimente ermöglicht die erlauben, mehr über die schnellen inter- und intramolekularen Dynamiken von Rezeptoren und G-Proteinen zu lernen und den Aktivierungsmechanismus der GPCR detaillierter zu verstehen. Es ist offensichtlich, dass moderne, schnelle optische Verfahren eine wichtige Rolle spielen werden, um den Brückenschlag zwischen Struktur und Funktion dieser Moleküle zu schaffen. Das detaillierte Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Prozesse wird darüber hinaus langfristig von größter Bedeutung für die Arzneistoffentwicklung an dieser wichtigen Klasse von Rezeptoren sein.



## 6 Referenzen

- [1] K.L. Pierce, R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(9): S. 639-50.
- [2] M.C. Lagerstrom and H.B. Schioth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. 7(4): S. 339-57.
- [3] C.B. Brink, et al., *Recent advances in drug action and therapeutics: relevance of novel concepts in G-protein-coupled receptor and signal transduction pharmacology*. British journal of clinical pharmacology, 2004. 57(4): S. 373-87.
- [4] L.F. Kolakowski, Jr., *GCRDb: a G-protein-coupled receptor database*. Receptors & channels, 1994. 2(1): S. 1-7.
- [5] S.M. Ford, et al., *International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list*. Pharmacological reviews, 2005. 57(2): S. 279-88.
- [6] R. Fredriksson, et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Molecular pharmacology, 2003. 63(6): S. 1256-72.
- [7] H.B. Schioth and R. Fredriksson, *The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective*. General and comparative endocrinology, 2005. 142(1-2): S. 94-101.
- [8] B.K. Kobilka and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. Trends in pharmacological sciences, 2007. 28(8): S. 397-406.
- [9] A. Manglik, et al., *Structural Insights into the Dynamic Process of  $\beta$  2-Adrenergic Receptor Signaling*. Cell, 2015.
- [10] A. Manglik and B.K. Kobilka, *The role of protein dynamics in GPCR function: insights from the beta2AR and rhodopsin*. Curr Opin Cell Biol, 2014. 27: S. 136-43.
- [11] C. Hoffmann, et al., *Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open*. Br J Pharmacol, 2008. 153 Suppl 1: S. 358-66.
- [12] X. Yao, et al., *Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor*. Nat Chem Biol, 2006. 2(8): S. 417-22.
- [13] G. Swaminath, et al., *Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states*. J Biol Chem, 2004. 279(1): S. 686-91.
- [14] S. Siehler and G. Milligan, *G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling, and Physiology*. 2011, New York: Cambridge University Press.
- [15] V. Katritch, V. Cherezov, and R.C. Stevens, *Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2013. 53: S. 531-56.
- [16] R.O. Dror, et al., *Pathway and mechanism of drug binding to G-protein-coupled receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(32): S. 13118-23.
- [17] B.K. Kobilka, *The Structural Basis of G-Protein-Coupled Receptor Signaling (Nobel Lecture)*. Angew Chem Int Ed, 2013. 52(25): S. 6380-8.
- [18] A.G. Gilman, *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annu Rev Biochem, 1987. 56: S. 615-49.
- [19] W.M. Oldham and H.E. Hamm, *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): S. 60-71.
- [20] H.E. Hamm, *The many faces of G protein signaling*. J Biol Chem, 1998. 273(2): S. 669-72.
- [21] K.Y. Chung, et al., *Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor*. Nature, 2011. 477(7366): S. 611-5.
- [22] M. Louet, et al., *Dissociation of membrane-anchored heterotrimeric G-protein induced by G(alpha) subunit binding to GTP*. Journal of chemical information and modeling, 2012. 52(11): S. 3022-7.

- [23] T.M. Cabrera-Vera, et al., *Insights into G protein structure, function, and regulation*. *Endocr Rev*, 2003. 24(6): S. 765-81.
- [24] D.E. Clapham and E.J. Neer, *New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling*. *Nature*, 1993. 365(6445): S. 403-6.
- [25] B. Vanderbeld and G.M. Kelly, *New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction*. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 2000. 78(5): S. 537-50.
- [26] K.M. Betke, et al., *Differential localization of G protein betagamma subunits*. *Biochemistry*, 2014. 53(14): S. 2329-43.
- [27] T. Morikawa, et al., *Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the receptor-uncoupled mutant of Galpha1*. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 2007. 63(Pt 2): S. 139-41.
- [28] C.A. Johnston, et al., *Structure of Galpha(i1) bound to a GDP-selective peptide provides insight into guanine nucleotide exchange*. *Structure*, 2005. 13(7): S. 1069-80.
- [29] S.G. Rasmussen, et al., *Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex*. *Nature*, 2011. 477(7366): S. 549-55.
- [30] D.E. Coleman, et al., *Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis*. *Science*, 1994. 265(5177): S. 1405-12.
- [31] T.L. Davis, et al., *Structural and molecular characterization of a preferred protein interaction surface on G protein beta gamma subunits*. *Biochemistry*, 2005. 44(31): S. 10593-604.
- [32] M. Bünemann, M. Frank, and M.J. Lohse, *Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(26): S. 16077-82.
- [33] M. Frank, et al., *G Protein activation without subunit dissociation depends on a Gai-specific region*. *J Biol Chem*, 2005. 280(26): S. 24584-90.
- [34] P. Hein, et al., *Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells*. *Embo J*, 2005. 24(23): S. 4106-14.
- [35] M. Nobles, A. Benians, and A. Tinker, *Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(51): S. 18706-11.
- [36] J. Jakubik, et al. *Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors*. *PLoS One*, 2011. 6, e27732 DOI: 10.1371/journal.pone.0027732.
- [37] M. Damian, et al., *Ghrelin receptor conformational dynamics regulate the transition from a preassembled to an active receptor:Gq complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(5): S. 1601-6.
- [38] K. Ray, et al., *Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits*. *J Biol Chem*, 1995. 270(37): S. 21765-71.
- [39] E. Hermans, *Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors*. *Pharmacol Ther*, 2003. 99(1): S. 25-44.
- [40] N. Wettschureck and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. *Physiological reviews*, 2005. 85(4): S. 1159-204.
- [41] M.I. Simon, M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. *Science*, 1991. 252(5007): S. 802-8.
- [42] S. Sprang, *Mechanisms and pathways of heterotrimeric G protein signaling: 74 (Advances in Protein Chemistry and Structural Biology)*. Vol. 1. Auflage. 2007, San Diego: Academic Press.
- [43] D.G. Lambert, *Signal transduction: G proteins and second messengers*. *British journal of anaesthesia*, 1993. 71(1): S. 86-95.
- [44] S. Guimarães and D. Moura, *Vascular adrenoceptors: an update*. *Pharmacological reviews*, 2001. 53(2): S. 319-56.

- [45] E. Mutschler, et al., *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. vollst. neu bearb. u. erw. Auflage. 2008, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [46] C. Hoffmann, et al., *Comparative pharmacology of human  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes—characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. 369(2): S. 151-9.
- [47] S.G. Rasmussen, et al., *Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2007. 450(7168): S. 383-7.
- [48] V. Cherezov, et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta$ 2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. 318(5854): S. 1258-65.
- [49] D.M. Rosenbaum, et al., *GPCR engineering yields high-resolution structural insights into  $\beta$ 2-adrenergic receptor function*. Science, 2007. 318(5854): S. 1266-73.
- [50] R. Nygaard, et al., *The dynamic process of beta(2)-adrenergic receptor activation*. Cell, 2013. 152(3): S. 532-42.
- [51] C. Saunders and L.E. Limbird, *Localization and trafficking of alpha2-adrenergic receptor subtypes in cells and tissues*. Pharmacol Ther, 1999. 84(2): S. 193-205.
- [52] J.O. Ruuskanen, et al., *Identification of duplicated fourth alpha2-adrenergic receptor subtype by cloning and mapping of five receptor genes in zebrafish*. Mol Biol Evol, 2004. 21(1): S. 14-28.
- [53] B.B. Fredholm, et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacological reviews, 2001. 53(4): S. 527-52.
- [54] D.E. Clapham and E.J. Neer, *G protein  $\beta\gamma$  subunits*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1997. 37: S. 167-203.
- [55] D.E. Logothetis, et al., *The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K<sup>+</sup> channel in heart*. Nature, 1987. 325(6102): S. 321-6.
- [56] W.J. Tang and A.G. Gilman, *Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits*. Science, 1991. 254(5037): S. 1500-3.
- [57] C. Hoffmann, et al., *A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells*. Nat Methods, 2005. 2(3): S. 171-6.
- [58] J.P. Vilardaga, et al., *Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells*. Nat Biotechnol, 2003. 21(7): S. 807-12.
- [59] M.J. Lohse, I. Maiellaro, and D. Calebiro, *Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation*. Curr Opin Cell Biol, 2014. 27: S. 87-93.
- [60] M.J. Lohse, S. Nuber, and C. Hoffmann, *Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling*. Pharmacological reviews, 2012. 64(2): S. 299-336.
- [61] J.P. Vilardaga, et al., *Conformational cross-talk between alpha2A-adrenergic and mu-opioid receptors controls cell signaling*. Nat Chem Biol, 2008. 4(2): S. 126-31.
- [62] J.P. Vilardaga, et al., *Molecular basis of inverse agonism in a G protein-coupled receptor*. Nat Chem Biol, 2005. 1(1): S. 25-8.
- [63] V. Hlavackova, et al., *Sequential inter- and intrasubunit rearrangements during activation of dimeric metabotropic glutamate receptor 1*. Sci Signal, 2012. 5(237): S. 1-11 (ra59).
- [64] T. Ha, *Single-molecule methods leap ahead*. Nat Methods, 2014. 11(10): S. 1015-8.
- [65] J. Fitter, et al., *Single molecule fluorescence spectroscopy: a tool for protein studies approaching cellular environmental conditions*. Soft Matter, 2011. 7(4): S. 1254-9.
- [66] A.J. Garcia-Saez and P. Schwille, *Single molecule techniques for the study of membrane proteins*. Applied microbiology and biotechnology, 2007. 76(2): S. 257-66.
- [67] L.G. Hommers, et al., *G proteins in reverse mode: receptor-mediated GTP release inhibits G protein and effector function*. J Biol Chem, 2010. 285(11): S. 8227-33.
- [68] P. Müller, P. Schwille, and T. Weidemann, *PyCorrFit—generic data evaluation for fluorescence correlation spectroscopy*. Bioinformatics, 2014. 30(17): S. 2532-3.
- [69] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. Vol. 7. überarb. u. akt. Auflage. 2013, Berlin/Heidelberg: Springer Spektrum.

- [70] H. Rehm and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Vol. 6. Auflage. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- [71] P.C. Sternweis and J.D. Robishaw, *Isolation of two proteins with high affinity for guanine nucleotides from membranes of bovine brain*. J Biol Chem, 1984. 259(22): S. 13806-13.
- [72] E. Kara and P.G. Strange, *Use of the [35S] GTPγS Binding Assay to Determine Ligand Efficacy at G Protein-Coupled Receptors*, in *G Protein-Coupled Receptors: Essential Methods*. 2009, Wiley-Blackwell: Oxford. p. 53-68.
- [73] P.G. Strange, *Use of the GTPγS ([35S] GTPγS and Eu-GTPγS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors*. Br J Pharmacol, 2010. 161(6): S. 1238-49.
- [74] S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*. Vol. 3. überarb. u. erg. Auflage. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- [75] T. Sungkaworn, et al. *High-resolution spatiotemporal analysis of receptor dynamics by single-molecule fluorescence microscopy*. J Vis Exp, 2014. e51784  
DOI: 10.3791/51784.
- [76] C. Chen and H. Okayama, *High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA*. Molecular and cellular biology, 1987. 7(8): S. 2745-52.
- [77] M.C. Jacob, M. Favre, and J.C. Bensa, *Membrane cell permeabilisation with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry*. Cytometry, 1991. 12(6): S. 550-8.
- [78] K. Kanclerski and R. Möllby, *Production and purification of Streptococcus pneumoniae hemolysin (pneumolysin)*. J Clin Microbiol, 1987. 25(2): S. 222-5.
- [79] H.M. Marriott, T.J. Mitchell, and D.H. Dockrell, *Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction*. Curr Mol Med, 2008. 8(6): S. 497-509.
- [80] C. Fortsch, et al., *Changes in astrocyte shape induced by sublytic concentrations of the cholesterol-dependent cytolysin pneumolysin still require pore-forming capacity*. Toxins (Basel), 2011. 3(1): S. 43-62.
- [81] B.W. Lau, et al., *Deoxycholic acid activates protein kinase C and phospholipase C via increased Ca<sup>2+</sup> entry at plasma membrane*. Gastroenterology, 2005. 128(3): S. 695-707.
- [82] M.A. Bittner and R.W. Holz, *Effects of tetanus toxin on catecholamine release from intact and digitonin-permeabilized chromaffin cells*. Journal of neurochemistry, 1988. 51(2): S. 451-6.
- [83] J. Hu, et al., *Novel structural and functional insights into m3 muscarinic receptor dimer/oligomer formation*. J Biol Chem, 2013. 288(48): S. 34777-90.
- [84] K. Qin, et al., *Inactive-state preassembly of G(q)-coupled receptors and G(q) heterotrimers*. Nat Chem Biol, 2011. 7(10): S. 740-7.
- [85] S. Paulick, *Der Brockhaus in Einem Band*. Vol. 9. Auflage. 2000, Leipzig: F.A. Brockhaus. 1024.
- [86] G.G. Stokes, *On the change of refrangibility of light*. Phil Trans R Soc Lond, 1852. 142: S. 463-562.
- [87] A. Jaboski, *Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes*. Nature, 1933. 131: S. 839-40.
- [88] D. Frackowiak, *The Jablonski diagram*. J Photochem Photobiol B, 1988. 2(3): S. 399.
- [89] J.W. Lichtman and J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nat Methods, 2005. 2(12): S. 910-9.
- [90] N. Nishiyama, et al., *Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(4): S. 327-38.
- [91] R. Plessow, *Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie*. 2004, Göttingen: Cuvillier Verlag.
- [92] J. Koolman, *Taschenatlas der Biochemie*. Vol. 3. Auflage. 2003, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

## Referenzen

- [93] L. Greenbaum, et al., *Green fluorescent protein photobleaching: a model for protein damage by endogenous and exogenous singlet oxygen*. Biol Chem, 2000. 381(12): S. 1251-8.
- [94] C. Eggeling, et al., *Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: Evidence of two-step photolysis*. Analytical chemistry, 1998. 70(13): S. 2651-9.
- [95] M.K. Cheezum, W.F. Walker, and W.H. Guilford, *Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles*. Biophys J, 2001. 81(4): S. 2378-88.
- [96] R.Y. Tsien, *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. 67: S. 509-44.
- [97] W.B. Frommer, M.W. Davidson, and R.E. Campbell, *Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins*. Chemical Society reviews, 2009. 38(10): S. 2833-41.
- [98] O. Shimomura, F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. Journal of cellular and comparative physiology, 1962. 59: S. 223-39.
- [99] O. Shimomura, *Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein*. FEBS letters, 1979. 104(2): S. 220-2.
- [100] H. Morise, et al., *Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea*. Biochemistry, 1974. 13(12): S. 2656-62.
- [101] M. Ormo, et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. 273(5280): S. 1392-5.
- [102] F. Yang, L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. 14(10): S. 1246-51.
- [103] M. Chalfie, et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. 263(5148): S. 802-5.
- [104] S. Inouye and F.I. Tsuji, *Aequorea green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein*. FEBS letters, 1994. 341(2): S. 277-80.
- [105] J. Zhang, et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. 3(12): S. 906-18.
- [106] R. Heim, D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(26): S. 12501-4.
- [107] G.S. Baird, D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien, *Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(22): S. 11984-9.
- [108] N.C. Shaner, et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. 22(12): S. 1567-72.
- [109] N.G. Gurskaya, et al., *GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins*. FEBS letters, 2001. 507(1): S. 16-20.
- [110] A. Keppler, et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nat Biotechnol, 2003. 21(1): S. 86-9.
- [111] A.E. Pegg, *Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases*. Mutation research, 2000. 462(2-3): S. 83-100.
- [112] A. Gautier, et al., *An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells*. Chem Biol, 2008. 15(2): S. 128-36.
- [113] New England Biolabs GmbH. *SNAP-tag® Technologies: Novel Tools to Study Protein Function*. [abgerufen und gespeichert am 03. Mai 2015]; Verfügbar unter: <https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/snap-tag-technologies-novel-tools-to-study-protein-function>.
- [114] E.J. Ambrose, *A surface contact microscope for the study of cell movements*. Nature, 1956. 178(4543): S. 1194.

- [115] D. Axelrod, *Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence*. The Journal of cell biology, 1981. 89(1): S. 141-5.
- [116] D. Axelrod, *Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology*. Traffic, 2001. 2(11): S. 764-74.
- [117] D. Axelrod, *Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology*. Methods Enzymol, 2003. 361: S. 1-33.
- [118] R. Dohlus, *Photonik: physikalisch-technische Grundlagen der Lichtquellen, der Optik und des Lasers*. 2010, München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag.
- [119] A.L. Mattheyses, S.M. Simon, and J.Z. Rappoport, *Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist*. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 21): S. 3621-8.
- [120] H. Qian, M.P. Sheetz, and E.L. Elson, *Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems*. Biophys J, 1991. 60(4): S. 910-21.
- [121] U. Kubitscheck, et al., *Imaging and tracking of single GFP molecules in solution*. Biophys J, 2000. 78(4): S. 2170-9.
- [122] M.J. Saxton and K. Jacobson, *Single-particle tracking: applications to membrane dynamics*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 1997. 26: S. 373-99.
- [123] N. Chenouard, et al., *Objective comparison of particle tracking methods*. Nat Methods, 2014. 11(3): S. 281-9.
- [124] K. Jaqaman, et al., *Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences*. Nat Methods, 2008. 5(8): S. 695-702.
- [125] D. Calebiro, et al., *Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(2): S. 743-8.
- [126] T. Schmidt, et al., *Imaging of single molecule diffusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(7): S. 2926-9.
- [127] S.M. Anthony and S. Granick, *Image analysis with rapid and accurate two-dimensional Gaussian fitting*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2009. 25(14): S. 8152-60.
- [128] R.J. Ober, S. Ram, and E.S. Ward, *Localization accuracy in single-molecule microscopy*. Biophys J, 2004. 86(2): S. 1185-200.
- [129] E. Hecht, *Optik*. Vol. 5. verb. Auflage. 2009, München: Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH.
- [130] D.B. Reid, *An algorithm for tracking multiple targets*. IEEE Trans Autom Control, 1979. 24: S. 843-54.
- [131] R. Jonker and A. Volgenant, *A shortest augmenting path algorithm for dense and sparse linear assignment problems*. Computing, 1987. 38(4): S. 325-40.
- [132] M.L. Martin-Fernandez and D.T. Clarke, *Single molecule fluorescence detection and tracking in mammalian cells: the state-of-the-art and future perspectives*. Int J Mol Sci, 2012. 13(11): S. 14742-65.
- [133] J. Ries and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy*. Bioessays, 2012. 34(5): S. 361-8.
- [134] D. Magde, E.L. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic fluctuations in a reacting system: Measurement by fluorescence correlation spectroscopy*. Phys Rev Lett, 1972. 29: S. 705-8.
- [135] E.L. Elson and D. Magde, *Fluorescence Correlation Spectroscopy .1. Conceptual Basis and Theory*. Biopolymers, 1974. 13(1): S. 1-27.
- [136] D. Magde, E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence Correlation Spectroscopy .2. Experimental Realization*. Biopolymers, 1974. 13(1): S. 29-61.
- [137] R. Rigler, et al., *Fluorescence Correlation Spectroscopy with High Count Rate and Low-Background - Analysis of Translational Diffusion*. Eur Biophys J, 1993. 22(3): S. 169-75.
- [138] M. Eigen and R. Rigler, *Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(13): S. 5740-7.

- [139] S.A. Kim, K.G. Heinze, and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy in living cells*. Nat Methods, 2007. 4(11): S. 963-73.
- [140] J. Widengren and P. Thyberg, *FCS cell surface measurements--photophysical limitations and consequences on molecular ensembles with heterogenic mobilities*. Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology, 2005. 68(2): S. 101-12.
- [141] I.R. Bates, P.W. Wiseman, and J.W. Hanrahan, *Investigating membrane protein dynamics in living cells*. Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2006. 84(6): S. 825-31.
- [142] X. Shi, et al., *Probing events with single molecule sensitivity in zebrafish and Drosophila embryos by fluorescence correlation spectroscopy*. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists, 2009. 238(12): S. 3156-67.
- [143] N.O. Petersen, *Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements*. Biophys J, 1986. 49(4): S. 809-15.
- [144] K.M. Berland, P.T. So, and E. Gratton, *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment*. Biophys J, 1995. 68(2): S. 694-701.
- [145] P. Schwille, et al., *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. Biophys J, 1999. 77(4): S. 2251-65.
- [146] Y. Ohsugi, et al., *Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2006. 91(9): S. 3456-64.
- [147] N.L. Thompson and B.L. Steele, *Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy*. Nat Protoc, 2007. 2(4): S. 878-90.
- [148] A.M. Lieto, R.C. Cush, and N.L. Thompson, *Ligand-receptor kinetics measured by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2003. 85(5): S. 3294-302.
- [149] K. Hassler, et al., *Total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy (TIR-FCS) with low background and high count-rate per molecule*. Opt Express, 2005. 13(19): S. 7415-23.
- [150] C. Eggeling, et al., *Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell*. Nature, 2009. 457(7233): S. 1159-62.
- [151] C. Tressler, M. Stolle, and C. Fradin, *Fluorescence correlation spectroscopy with a doughnut-shaped excitation profile as a characterization tool in STED microscopy*. Opt Express, 2014. 22(25): S. 31154-66.
- [152] P. Schwille and E. Haustein. *Fluorescence correlation spectroscopy-an introduction to its concepts and applications*. Biophysics Textbook Online 2004 [abgerufen und gespeichert am 03. Mai 2015];  
Verfügbar unter: <https://www.biophysics.org/Portals/1/PDFs/Education/schwille.pdf>.
- [153] J.R. Lakowicz, *Principles in Fluorescence Spectroscopy*. Vol. 3. Auflage. 2008, New York: Springer-Verlag.
- [154] R. Rieger, C. Röcker, and G.U. Nienhaus, *Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory*. Am J Phys, 2005. 73(12): S. 1129-34.
- [155] T. Ackermann, *Physikalische Biochemie: Grundlagen der physikalisch-chemischen Analyse biologischer Prozesse*. 1992, Berlin/Heidelberg: Springer.
- [156] J. Enderlein, et al., *Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy*. Current pharmaceutical biotechnology, 2004. 5(2): S. 155-61.
- [157] I. Gregor and J. Enderlein, *Focusing astigmatic Gaussian beams through optical systems with a high numerical aperture*. Opt Lett, 2005. 30(19): S. 2527-9.
- [158] T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel, *The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2001. 80(6): S. 2987-99.
- [159] S. Aragon and R. Pecora, *Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics*. J Chem Phys, 1976. 64(4): S. 1791-803.

- [160] R. Brock, M.A. Hink, and T.M. Jovin, *Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence*. Biophys J, 1998. 75(5): S. 2547-57.
- [161] D.C. Lamb, et al., *Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection*. Biophys J, 2000. 79(2): S. 1129-38.
- [162] K.G. Heinze, *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik*. Fachbereich Physik. Vol. 1. Auflage. 2002, Oldenburg/Göttingen: Cuvillier Verlag.
- [163] K. Bacia, E. Haustein, and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy: principles and applications*. Cold Spring Harb Protoc, 2014. 2014(7): S. 709-25.
- [164] J. Widengren, R. Rigler, and Ü. Mets, *Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of fluorescence, 1994. 4(3): S. 255-8.
- [165] J. Widengren, U. Mets, and R. Rigler, *Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study*. J Phys Chem, 1995. 99(36): S. 13368-79.
- [166] A. Chmyrov, et al., *Characterization of new fluorescent labels for ultra-high resolution microscopy*. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 2008. 7(11): S. 1378-85.
- [167] K. Bacia and P. Schwille, *Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*. Nat Protoc, 2007. 2(11): S. 2842-56.
- [168] J. Mutze, Z. Petrasek, and P. Schwille, *Independence of maximum single molecule fluorescence count rate on the temporal and spectral laser pulse width in two-photon FCS*. Journal of fluorescence, 2007. 17(6): S. 805-10.
- [169] D.E. Koppel, *Statistical Accuracy in Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Phys Rev A, 1974. 10(6): S. 1938-45.
- [170] P. Kask, R. Günther, and P. Axhausen, *Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments*. Eur Biophys J, 1997. 25(3): S. 163-9.
- [171] J. Rika and T. Binkert, *Direct measurement of a distinct correlation function by fluorescence cross correlation*. Phys Rev A, 1989. 39(5): S. 2646-52.
- [172] P. Schwille, F.J. Meyer-Almes, and R. Rigler, *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution*. Biophys J, 1997. 72(4): S. 1878-86.
- [173] K. Bacia and P. Schwille, *A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy*. Methods, 2003. 29(1): S. 74-85.
- [174] K. Bacia, S.A. Kim, and P. Schwille, *Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells*. Nat Methods, 2006. 3(2): S. 83-9.
- [175] T. Weidemann, et al., *Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, in *Single Mol.* 2002, Wiley-VCH: Berlin. p. 49-61.
- [176] P. Schwille, *Zwei-Photonen-Kreuzkorrelations-Spektroskopie: Nachweis der Interaktionen einzelner Moleküle in der lebenden Zelle*. Wiss Z TU Dresden, 2007. 56(1-2): S. 119-24.
- [177] A. Schmidt, et al., *Use of Kaede Fusions to Visualize Recycling of G Protein-Coupled Receptors*. Traffic, 2009. 10(1): S. 2-15.
- [178] A. Teichmann, et al., *The specific monomer/dimer equilibrium of the corticotropin-releasing factor receptor type 1 is established in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2014. 289(35): S. 24250-62.
- [179] W.D. Comar, et al., *Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Measures Clustering and Mobility of a G Protein-Coupled Receptor Opsin in Live Cell Membranes*. J Am Chem Soc, 2014. 136(23): S. 8342-9.
- [180] V. Vukojević, et al.,  *$\mu$ -Opioid receptor activation in live cells*. FASEB J, 2008. 22(10): S. 3537-48.
- [181] M. Brinkmeier, et al., *Two-beam cross-correlation: a method to characterize transport phenomena in micrometer-sized structures*. Analytical chemistry, 1999. 71(3): S. 609-16.

- [182] S.A. Kim, et al., *Two-photon cross-correlation analysis of intracellular reactions with variable stoichiometry*. Biophys J, 2005. 88(6): S. 4319-36.
- [183] P. Schwille, *TIR-FCS: staying on the surface can sometimes be better*. Biophys J, 2003. 85(5): S. 2783-4.
- [184] C.A. Konopka and S.Y. Bednarek, *Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex*. Plant J, 2008. 53(1): S. 186-96.
- [185] K. Levenberg, *A method for the solution of certain problems in least squares*. Quart Appl Math, 1944. 2: S. 164-8.
- [186] D.W. Marquardt, *An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters*. J Soc Indus Appl Math, 1963. 11(2): S. 431-41.
- [187] E.L. Elson, *Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future*. Biophys J, 2011. 101(12): S. 2855-70.
- [188] P. Kask, P. Piksarv, and Ü. Mets, *Fluorescence correlation spectroscopy in the nanosecond time range: Photon antibunching in dye fluorescence*. Eur Biophys J, 1985. 12(3): S. 163-6.
- [189] J. Sýkora, et al., *Exploring fluorescence antibunching in solution to determine the stoichiometry of molecular complexes*. Analytical chemistry, 2007. 79(11): S. 4040-9.
- [190] P. Schwille, et al., *Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(1): S. 151-6.
- [191] New England Biolabs GmbH. *Protein Labeling*. [abgerufen und gespeichert am 03. Mai 2015]; Verfügbar unter: <https://www.neb.com/products/protein-tools/protein-labeling>.
- [192] S. van de Linde, et al., *Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes*. Nat Protoc, 2011. 6(7): S. 991-1009.
- [193] C.W. On. *Discrete Mathematics & Statistics*. [abgerufen und gespeichert am 06. Juli 2015]; Verfügbar unter: <http://www.angelfire.com/blues/michaelyang/dms.html>.
- [194] E.P. Petrov and P. Schwille, *State of the Art and Novel Trends in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, in *Springer Series on Fluorescence 6: Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II*. 2008, Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg. p. 145-97.
- [195] Z. Petrusek and P. Schwille, *Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy*. Biophys J, 2008. 94(4): S. 1437-48.
- [196] K. Palo, et al., *Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis: toward higher accuracy in fluorescence fluctuation spectroscopy*. Biophys J, 2002. 83(2): S. 605-18.
- [197] E.P. Petrov, et al., *Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA*. Phys Rev Lett, 2006. 97(25): S. 258101.
- [198] IBA. *In vitro Standard Probe for Fluorescence Cross-correlation Spectroscopy (FCCS)*. [abgerufen und gespeichert am 28. Mai 2015]; Verfügbar unter: <http://www.iba-lifesciences.com/details/product/5-0000-504.html>.
- [199] A. Honigsmann, et al., *Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate clusters act as molecular beacons for vesicle recruitment*. Nat Struct Mol Biol, 2013. 20(6): S. 679-86.
- [200] life technologies. *Influx Pinocytic Cell-Loading Reagent (I-14402)*. [abgerufen und gespeichert am 03. Mai 2015]; Verfügbar unter: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp14400.pdf>.
- [201] A. Benda, et al., *How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, 2003. 19(10): S. 4120-6.
- [202] M. Wachsmuth, W. Waldeck, and J. Langowski, *Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of molecular biology, 2000. 298(4): S. 677-89.

- [203] J.Y. Lee, S.-K. Kim, and S.-C. Hong, *Characterization of the evanescent field in objective-based total-internal-reflection fluorescence (TIRF) microscopy*. J Korean Phys Soc, 2007. 50(5): S. 1340-5.
- [204] D. Alcor, G. Gouzer, and A. Triller, *Single-particle tracking methods for the study of membrane receptors dynamics*. Eur J Neurosci, 2009. 30(6): S. 987-97.
- [205] J.B. Perez, et al., *Monitoring the diffusion of single heterotrimeric G proteins in supported cell-membrane sheets reveals their partitioning into microdomains*. Journal of molecular biology, 2006. 363(5): S. 918-30.
- [206] J.A. Hern, et al., *Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(6): S. 2693-8.
- [207] F. Daumas, et al., *Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking*. Biophys J, 2003. 84(1): S. 356-66.
- [208] K. Suzuki, et al., *Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques*. Biophys J, 2005. 88(5): S. 3659-80.
- [209] P.H. Lommerse, H.P. Spaink, and T. Schmidt, *In vivo plasma membrane organization: results of biophysical approaches*. Biochimica et biophysica acta, 2004. 1664(2): S. 119-31.
- [210] P.H.M. Lommerse, et al., *Single-molecule diffusion measurements of H-Ras at the plasma membrane of live cells reveal microdomain localization upon activation*. J Cell Sci, 2005. 118(9): S. 1799-809.
- [211] H. Murakoshi, et al., *Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(19): S. 7317-22.
- [212] R.R. Neubig, *Membrane organization in G-protein mechanisms*. FASEB J, 1994. 8(12): S. 939-46.
- [213] D.M. Owen, et al., *Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation*. Traffic, 2009. 10(8): S. 962-71.
- [214] M. von Zastrow, *Mechanisms regulating membrane trafficking of G protein-coupled receptors in the endocytic pathway*. Life Sci, 2003. 74(2-3): S. 217-24.
- [215] R.J. Lefkowitz and S.K. Shenoy, *Transduction of receptor signals by beta-arrestins*. Science, 2005. 308(5721): S. 512-7.
- [216] K.D. Little, M.E. Hemler, and C.S. Stipp, *Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association*. Mol Biol Cell, 2004. 15(5): S. 2375-87.
- [217] F. Berdichevski and E. Odintsova, *Tetraspanins as regulators of protein trafficking*. Traffic, 2007. 8(2): S. 89-96.
- [218] B.P. Head, H.H. Patel, and P.A. Insel, *Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling*. Biochimica et biophysica acta, 2014. 1838(2): S. 532-45.
- [219] H. Patel, F. Murray, and P. Insel, *G-protein-coupled receptor-signaling components in membrane raft and caveolae microdomains*, in *Protein-Protein Interactions as New Drug Targets*. 2008, Springer. p. 167-84.
- [220] R.S. Ostrom and P.A. Insel, *The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: implications for molecular pharmacology*. Br J Pharmacol, 2004. 143(2): S. 235-45.
- [221] H.A. Lucero and P.W. Robbins, *Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity*. Arch Biochem Biophys, 2004. 426(2): S. 208-24.
- [222] R.C. Calizo and S. Scarlata, *A role for G-proteins in directing G-protein-coupled receptor-caveolae localization*. Biochemistry, 2012. 51(47): S. 9513-23.
- [223] T. Fujiwara, et al., *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane*. The Journal of cell biology, 2002. 157(6): S. 1071-81.
- [224] K. Murase, et al., *Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques*. Biophys J, 2004. 86(6): S. 4075-93.

- [225] A. Kusumi, et al., *Paradigm shift of the plasma membrane concept from the two-dimensional continuum fluid to the partitioned fluid: high-speed single-molecule tracking of membrane molecules*. Annual review of biophysics and biomolecular structure, 2005. 34: S. 351-78.
- [226] N. Morone, et al., *Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography*. The Journal of cell biology, 2006. 174(6): S. 851-62.
- [227] K. Ritchie, et al., *The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review)*. Molecular membrane biology, 2003. 20(1): S. 13-8.
- [228] A. Kusumi, et al., *Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy*. FEBS letters, 2010. 584(9): S. 1814-23.
- [229] F. van Hemert, et al., *Mobility of G proteins is heterogeneous and polarized during chemotaxis*. J Cell Sci, 2010. 123(Pt 17): S. 2922-30.
- [230] K. Herrick-Davis, et al., *Fluorescence correlation spectroscopy analysis of serotonin, adrenergic, muscarinic, and dopamine receptor dimerization: the oligomer number puzzle*. Molecular pharmacology, 2013. 84(4): S. 630-42.
- [231] W. Han, D. Li, and E.S. Levitan, *A new green fluorescent protein construct for localizing and quantifying peptide release*. Ann N Y Acad Sci, 2002. 971: S. 627-33.
- [232] S.J. Briddon, et al., *Quantitative analysis of the formation and diffusion of A1-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(13): S. 4673-8.
- [233] R.H. Rose, S.J. Briddon, and S.J. Hill, *A novel fluorescent histamine H1 receptor antagonist demonstrates the advantage of using fluorescence correlation spectroscopy to study the binding of lipophilic ligands*. Br J Pharmacol, 2012. 165(6): S. 1789-800.
- [234] S.J. Briddon and S.J. Hill, *Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes*. Trends in pharmacological sciences, 2007. 28(12): S. 637-45.
- [235] L. Prenner, et al., *Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy*. Biochemistry, 2007. 46(17): S. 5106-13.
- [236] A. Pramanik, et al., *Fluorescence correlation spectroscopy detects galanin receptor diversity on insulinoma cells*. Biochemistry, 2001. 40(36): S. 10839-45.
- [237] C. Gell, et al., *TIRF microscopy evanescent field calibration using tilted fluorescent microtubules*. Journal of microscopy, 2009. 234(1): S. 38-46.
- [238] K. Elsayad, et al., *Spectrally coded optical nanosectioning (SpecON) with biocompatible metal-dielectric-coated substrates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(50): S. 20069-74.
- [239] S.J. Briddon, et al., *Plasma membrane diffusion of G protein-coupled receptor oligomers*. Biochimica et biophysica acta, 2008. 1783(12): S. 2262-8.
- [240] U. Haupts, et al., *Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(23): S. 13573-8.
- [241] K. Herrick-Davis, et al., *Oligomer size of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2C (5-HT2C) receptor revealed by fluorescence correlation spectroscopy with photon counting histogram analysis: evidence for homodimers without monomers or tetramers*. J Biol Chem, 2012. 287(28): S. 23604-14.
- [242] J.H. Spille, et al., *Rotational diffusion of the alpha(2a) adrenergic receptor revealed by FIAsH labeling in living cells*. Biophys J, 2011. 100(4): S. 1139-48.
- [243] S. Dorsch, et al., *Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy*. Nat Methods, 2009. 6(3): S. 225-30.
- [244] U. Meseth, et al., *Resolution of fluorescence correlation measurements*. Biophys J, 1999. 76(3): S. 1619-31.

- [245] Y. Chen, et al., *The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy*. Biophys J, 1999. 77(1): S. 553-67.
- [246] P. Kask, et al., *Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(24): S. 13756-61.
- [247] J.D. Muller, Y. Chen, and E. Gratton, *Resolving heterogeneity on the single molecular level with the photon-counting histogram*. Biophys J, 2000. 78(1): S. 474-86.
- [248] M. Teitler and K. Herrick-Davis, *Determining the Oligomer Number of Native GPCR Using Florescence Correlation Spectroscopy and Drug-Induced Inactivation-Reactivation*. Current pharmaceutical biotechnology, 2014. 15(10): S. 927-37.
- [249] L.N. Hillesheim, Y. Chen, and J.D. Muller, *Dual-color photon counting histogram analysis of mRFP1 and EGFP in living cells*. Biophys J, 2006. 91(11): S. 4273-84.
- [250] S. Milon, et al., *Factors influencing fluorescence correlation spectroscopy measurements on membranes: simulations and experiments*. Chem Phys, 2003. 288(2-3): S. 171-86.
- [251] J. Ries, S. Chiantia, and P. Schwille, *Accurate determination of membrane dynamics with line-scan FCS*. Biophys J, 2009. 96(5): S. 1999-2008.
- [252] J. Enderlein, et al., *Performance of fluorescence correlation spectroscopy for measuring diffusion and concentration*. Chemphyschem, 2005. 6(11): S. 2324-36.
- [253] T. Dertinger, et al., *Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements*. Chemphyschem, 2007. 8(3): S. 433-43.
- [254] Q. Ruan, et al., *Spatial-temporal studies of membrane dynamics: scanning fluorescence correlation spectroscopy (SFCS)*. Biophys J, 2004. 87(2): S. 1260-7.
- [255] Y. Xiao, V. Buschmann, and K.D. Weston, *Scanning fluorescence correlation spectroscopy: a tool for probing microsecond dynamics of surface-bound fluorescent species*. Analytical chemistry, 2005. 77(1): S. 36-46.
- [256] C. Di Rienzo, et al. *From fast fluorescence imaging to molecular diffusion law on live cell membranes in a commercial microscope*. J Vis Exp, 2014. e51994 DOI: 10.3791/51994.
- [257] J. Ries and P. Schwille, *New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes*. Physical chemistry chemical physics : PCCP, 2008. 10(24): S. 3487-97.
- [258] K.G. Heinze, A. Koltermann, and P. Schwille, *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(19): S. 10377-82.
- [259] S. Felekyan, et al., *Analyzing Forster resonance energy transfer with fluctuation algorithms*. Methods Enzymol, 2013. 519: S. 39-85.
- [260] S. Felekyan, et al., *Filtered FCS: species auto- and cross-correlation functions highlight binding and dynamics in biomolecules*. Chemphyschem, 2012. 13(4): S. 1036-53.
- [261] C.A. Day and A.K. Kenworthy, *Tracking microdomain dynamics in cell membranes*. Biochimica et biophysica acta, 2009. 1788(1): S. 245-53.
- [262] F. Philip, P. Sengupta, and S. Scarlata, *Signaling through a G protein-coupled receptor and its corresponding G protein follows a stoichiometrically limited model*. J Biol Chem, 2007. 282(26): S. 19203-16.
- [263] A.H. Zewail, *Femtochemistry: Atomic-scale dynamics of the chemical bond*. J Phys Chem A, 2000. 104(24): S. 5660-94.
- [264] H. Kandori, Y. Shichida, and T. Yoshizawa, *Photoisomerization in rhodopsin*. Biochemistry (Mosc), 2001. 66(11): S. 1197-209.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
A <sub>1</sub> R	Adenosin A <sub>1</sub> -Rezeptor(en)
AC	Autokorrelationsfunktion ( <i>Autocorrelation Function</i> )
AR	Adrenorezeptor(en)
α <sub>2A</sub> -AR	α <sub>2A</sub> -adrenerge(r) Rezeptor(en)
ATP	Adenosintriphosphat
BES	<i>N,N</i> -Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan-Sulfonsäure
BFP	Blau fluoreszierendes Protein
β <sub>1</sub> -AR	β <sub>1</sub> -adrenerge(r) Rezeptor(en)
β <sub>2</sub> -AR	β <sub>2</sub> -adrenerge(r) Rezeptor(en)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>cyclic Adenosine Monophosphate</i> )
cDNA	komplementäre DNS ( <i>complementary DNA</i> )
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters ( <i>Chinese Hamster Ovary</i> )
cpms	Photonen pro Molekül pro Sekunde ( <i>counts per molecule per second</i> )
D	Diffusionskoeffizient
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DPBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
eGFP	verbessertes GFP ( <i>enhanced GFP</i> )
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ( <i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> )
FCCS	Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie ( <i>Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy</i> )
FIDA	Fluoreszenzintensitätsverteilungsanalyse ( <i>Fluorescence-Intensity Distribution Analysis</i> )
FKS	Fötales Kälberserum
FP	Fluoreszierendes Protein
FRET	Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energie-Transfer
GAL	Galanin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
Gα <sub>i</sub>	Guaninnukleotid-bindendes Protein, inhibierend
Gα <sub>s</sub>	Guaninnukleotid-bindendes Protein, stimulierend
GPCR	G-Protein-gekoppelte(r) Rezeptor(en)
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPγS	Guanosin-5'-O-[gamma-thio]triphosphat

## Abkürzungsverzeichnis

HEK	Humane embryonale Nierenepithelzellen ( <i>Human Embryonic Kidney cells</i> )
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IC	Interne Umwandlung ( <i>Internal Conversion</i> )
ISC	Interkombination ( <i>Intersystem Crossing</i> )
kb	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
L2000	Lipofectamine 2000
LAP	Lineares Zuordnungsproblem ( <i>Linear Assignment Problem</i> )
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien ( <i>Lysogeny Broth</i> )
MDF	Moleküldetektionsfunktion ( <i>Molecule Detection Function</i> )
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHT	Multiple-Hypothesis Tracking
MSD	Mittlere quadratische Verschiebung ( <i>Mean Square Displacement</i> )
M/V	Masse pro Volumen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Di-Natriumhydrogenphosphat
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie ( <i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i> )
N-Terminus	Aminoterminus
PCH	Photonenzahl-Histogramm ( <i>Photon Counting Histogram</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PIE	Intermittierend gepulste Anregung ( <i>Pulsed Interleaved Excitation</i> )
PSF	Punktspreizfunktion ( <i>Point Spread Function</i> )
PTX	Pertussis-Toxin
QE	Quanteneffizienz, Quantenausbeute
RFP	Rot fluoreszierendes Protein ( <i>Red Fluorescent Protein</i> )
rGFP	in <i>E. coli</i> rekombinant exprimiertes grün fluoreszierendes Protein ( <i>recombinant Green Fluorescent Protein</i> )
RGS	Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion ( <i>Regulator of G-protein Signaling</i> )
ROI	Bereich von Interesse ( <i>Region Of Interest</i> )
SD	Standardabweichung
S/N	Signal-Rausch-Verhältnis ( <i>Signal to Noise Ratio</i> )
SPAD	Silizium-Halbleiter-Dioden ( <i>Single Photon Avalanche Diode</i> )
SPT	Einzelmolekülverfolgung ( <i>Single Particle Tracking</i> )
STICS	( <i>Spatio-Temporal Image Correlation Spectroscopy</i> )
TIRF	Interne Totalreflektionsfluoreszenz ( <i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> )
TIRF-M	Interne Totalreflektionsfluoreszenz-Mikroskopie
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,2-diol
U/ml	Einheiten ( <i>Units</i> ) pro Milliliter
V/V	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein ( <i>Yellow Fluorescent Protein</i> )
[ <sup>35</sup> S]GTPγS	Guanosin-5`-(γ-thio)triphosphat, [ <sup>35</sup> S]

## 8 Publikationen/Konferenzbeiträge

### 8.1 Publikationen

Calebiro D, Rieken F, Wagner J, Sungkaworn T, Zabel U, Borzi A, Cocucci E, Zürn A, Lohse MJ

***Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization***

Proc Natl Acad Sci USA, 2013.

Wagner J, Sungkaworn T, Heinze KG, Lohse MJ, Calebiro D

***Single-Molecule Fluorescence Microscopy for the Analysis of Fast Receptor Dynamics***

Methods Mol Biol., accepted, 2015.

### 8.2 Konferenzbeiträge

Julia Wagner, Christian Dees, Bianca Klüpfel, Ulrike Zabel, Martin J. Lohse, Davide Calebiro

***Direct visualisation of G-protein-coupled-receptors and heterotrimeric G-proteins using single-molecule microscopy***

78<sup>th</sup> Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Dresden 2012. Posterbeitrag.

Julia Wagner, Ulrike Zabel, Martin J. Lohse, Davide Calebiro

***Direct visualisation of G protein-coupled receptors and heterotrimeric G proteins using single-molecule microscopy***

EPOS (International Students Symposium of the GMLS), Würzburg 2012.

Posterbeitrag.

Julia Wagner, Michail Kromm, Piau-Siong Tan, Davide Calebiro, Martin Kamp, Martin J. Lohse, Katrin Heinze

***Single molecule studies of G-protein-coupled receptors and heterotrimeric G-proteins***

19<sup>th</sup> International Workshop on "Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences", Berlin 2013. Posterbeitrag.

Julia Wagner, Davide Calebiro, Martin J. Lohse, Katrin Heinze

***Single-molecule characterization of  $\alpha$ 2A-adrenergic receptors and heterotrimeric Gai- proteins***

Scientific Crosstalk (Doctoral Students Symposium), Würzburg 2013. Posterbeitrag.

Julia Wagner, Mike Friedrich, Davide Calebiro, Martin J. Lohse, Katrin Heinze

***Deciphering G-protein-coupled receptor dynamics and interactions by  
Fluorescence (Cross) Correlation Spectroscopy***

20<sup>th</sup> International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultrasensitive Analysis in the Life Sciences“, Berlin 2014. Posterbeitrag.

Julia Wagner, Mike Friedrich, Martin J. Lohse, Katrin G. Heinze

***Elucidating G-protein-coupled-receptor dynamics by Fluorescence Correlation Spectroscopy***

Focus on Microscopy 2015, Göttingen 2015. Posterbeitrag.

## 9 Danksagung

Ganz herzlichen Dank allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Ich möchte mich besonders bei Herrn Prof. Dr. M. J. Lohse für die Bereitstellung des Themas, die engagierte fachliche Unterstützung, viele wertvolle Diskussionen und die Hilfe bei der Umsetzung meiner Arbeit bedanken.

Besonders hervorheben möchte ich Frau Dr. K. G. Heinze. Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe sowie das in mich gesetzte Vertrauen. Die ausgezeichnete Anleitung und Betreuung, unzählige fachliche Diskussionen und wertvolle Hinweise waren für das Gelingen dieser Arbeit von entscheidender Bedeutung.

Mein Dank geht an Herrn Prof. Dr. M. Sauer sowie Herrn Prof. Dr. R. Benz für die Betreuung meiner Arbeit sowie hilfreiche Fachgespräche während der Treffen im Rahmen der GSLS.

Ein großes Dankeschön geht an Mike Friedrich, für die exzellente technische Expertise, große Hilfe beim Aufbau des FCS-Aufbaus sowie wertvolle Unterstützung bei den Experimenten.

Michail Kromm gilt mein Dank für die technische Hilfe zu Beginn des FCS-Projektes. Marek Suplata danke ich für viele wertvolle Diskussionen und Ratschläge, Kerstin Jansen für die technische Unterstützung bei vielen meiner Experimente.

Auch allen anderen jetzigen und früheren Mitgliedern der AG Heinze, namentlich Dr. Piau Siong Tan, Steffen Becker, Oguzhan Angay, Jürgen Pinnecker, Patrick Schmithausen, Amirali Davoudpour, Benjamin Schreiber und Si-Yun Liu danke ich für das tolle Arbeitsklima.

Herrn Dr. D. Calebiro danke ich für die Betreuung und die stets für Fragen und Diskussionen offene Bürotür während meiner Arbeit an der bildgebenden Einzelmolekülverfolgung. Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern von Room 464, Amod Godbole, Dr. Isabella Maiellaro, Dr. Titiwat Sungkaworn sowie Sandra Lyga, für die vielen fruchtbaren Gespräche und Hilfestellungen. Großer Dank für technische Unterstützung geht außerdem an Dr. Ulrike Zabel, Christian Dees, Monika Frank, Bianca Klüpfel, Barbara Leibbrandt, Iuliu Sbiera, Elke Maier und Birgit Thur.

Für Unterstützung außerhalb des wissenschaftlichen Rahmens danke ich meiner Mentorin Frau Prof. Dr. M.C. Dabauvalle.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie sowie des Rudolf-Virchow-Zentrums für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Der GSLS danke ich für den ausgezeichneten wissenschaftlichen Rahmen für meine Promotion.

Ganz besonders danke ich Dr. Dominik Richter und Dr. Ludwig Höllein für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre uneingeschränkte Hilfe und Unterstützung. Danke!



## **10 Curriculum Vitae**