

Quantifizierung von Protein-Protein-Interaktionen im Wnt-Signalweg mittels moderner Techniken der Fluoreszenzmikroskopie

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN (Dr. rer. nat.)
von der KIT-Fakultät für Physik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
angenommene

DISSERTATION

von

M.Sc., Eckert, Antonia Franziska

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2020

Erstreferent: Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus

Koreferent: Prof. Dr. Thomas Schimmel

Prof. Dr. Martin Bastmeyer (KSOP)

Ich versichere hiermit wahrheitsgemäß, die Arbeit selbstständig angefertigt, alle benutzten Hilfsmittel vollständig und genau angegeben und alles kenntlich gemacht zu haben, was aus Arbeiten anderer unverändert oder mit Abänderungen entnommen wurde.

Karlsruhe, den 19.10.2020

.....
(Antonia Franziska Eckert)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Fluoreszenzmikroskopie zur Entschlüsselung biologischer Fragestellungen	5
1.2	Aufbau der Arbeit	7
2	Theoretische Grundlagen	9
2.1	Der Wnt-Signalweg	9
2.1.1	Die Geschichte und Relevanz des Wnt-Signalwegs	9
2.1.2	Der kanonische Wnt-Signalweg	10
2.1.3	Nicht-kanonische Wnt-Signalwege	13
2.1.4	Interzellulärer Wnt-Transport	14
2.2	Grundlagen der Lichtmikroskopie	17
2.2.1	Ein kurzer Überblick über die Geschichte der Lichtmikroskopie	17
2.2.2	Grundlegender optischer Aufbau eines Mikroskops	18
2.2.3	Auflösungsgrenze	20
2.2.4	Das Abtasttheorem	23
2.2.5	Dekonvolution	24
2.3	Fluoreszenzmikroskopie I: Fluoreszierende Farbstoffe und ihre Fluoreszenz	26
2.3.1	Fluoreszierende Farbstoffe	27
2.3.2	Fluorophore und ihre Fluoreszenz	29
2.3.3	Zwei-Zustands-Modell	30
2.3.4	Beispiele einfacher delokalisierten Elektronensysteme	34
2.3.5	Jablonski-Termschema	37
2.3.6	Stokes-Verschiebung	39
2.3.7	Das Franck-Condon-Prinzip bei Absorption und Emission	40
2.4	Fluoreszenzmikroskopie II: Mikroskopietechniken	42
2.4.1	Weitfeld- und Konfokalmikroskopie	42

2.4.2	Auflösungsvermögen von Konfokalmikroskopen	45
2.4.3	Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie	46
2.5	Bindungsaffinität von Ligand und Rezeptor	52
2.5.1	Bestimmung der Bindungsaffinität durch Bindungskinetikexperimente	53
2.6	Diffusion von Teilchen	55
2.7	Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	58
2.7.1	Klassische Fluoreszenzkorrelationspektroskopie	59
2.7.2	Linienraster-FCS	63
2.7.3	Zweifarbigen-FCS: Kreuzkorrelation	66
3	Methoden	69
3.1	Biologische Methoden	69
3.1.1	Expression von Fusionskonstrukten	69
3.1.2	Vorbereitung der biologischen Proben	71
3.1.3	TopFlash-Assay	73
3.1.4	Western Blot	73
3.2	Fluoreszenzspektroskopie	74
3.3	Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie	75
3.4	Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie	77
3.4.1	Aufbau des Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskops	77
3.5	Axiale Linienraster-FCS	79
3.5.1	Optisches System des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops	79
3.5.2	Mikroskopzubehör für Messungen an lebenden Zellen	82
3.5.3	Gepulste alternierende Anregung für Messungen in zwei Farbkä- nälen	83
3.5.4	Charakterisierung der lateralen Fokusparameter der zwei Farbkä- näle	84
3.5.5	Axiales Linienrastern mit der TAG-Linse	86
3.5.6	Analyse der zeitlichen Intensitätsspur von axialen Linienraster- FCS-Experimenten an lebenden Zellen	89
3.5.7	Kompensation für die Photobleichung der Fluorophore	92
3.5.8	Fitfunktionen und Vorgehensweise zur Bestimmung von Bin- dungsaffinitäten	93
3.5.9	Analyse der Bildung von Heterodimeren anhand von axialer Linienraster-FCS	95

3.5.10 Konventionelle FCS-Messungen ohne TAG-Linse	96
4 Ergebnisse	99
4.1 Die Rolle von β -Catenin in Darmkrebszellen	99
4.1.1 Allelspezifische Expression von β -Catenin in HCT116-Zellen	99
4.1.2 β -Catenin-Expressionslevel in HCT116-Zellen mittels Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie	100
4.1.3 β -Catenin-Expressionslevel und Komplexbildung in HCT116-Zellen mittels FCS	103
4.2 Rezeptor-Ligand-Interaktionen im Wnt-Signalweg	119
4.2.1 DKK1 und seine Rezeptoren LRP6 und Kremen	119
4.2.2 Wnt5a und Ror2	148
4.3 Der interzelluläre Transport von Wnt3a	154
4.3.1 mWnt3a im endoplasmatischen Retikulum	154
4.3.2 Der Einfluss von PORCN auf den Aufenthaltsort der mWnt3a-Proteine in Zellen	156
4.3.3 Vesikelgröße und -geschwindigkeit von eGFP-Wnt3a-positiven Vesikeln	160
4.3.4 Einzelmolekül-Lokalisation von mWnt3a-Proteinen	164
5 Zusammenfassung und Ausblick	169
A Anhang	173
A.1 Vorgehensweise in der Zellkultur und Probenvorbereitung	173
A.1.1 Zellkulturmedien	173
A.1.2 Protokoll: Fibronectinbeschichtung der Probengefäße	173
A.1.3 Protokoll: Passagieren der Zellen	174
A.1.4 Protokoll: Auftauen der Zellen	175
A.1.5 Protokoll: Kryokonservierung der Zellen	176
A.1.6 Protokoll: Transfektion der Zellen mit Xfect	177
A.1.7 Protokoll: Herstellung von konditionierten Medien	177
A.2 Protokoll: Probenvorbereitung von fluoreszierenden Perlen	178
A.3 Positionierung des Fokusvolumens für FCS-Messungen im Cytosol oder Nukleus von lebenden Zellen	179
A.4 Betreute Arbeiten	181
A.5 Liste der Publikationen	182

Abkürzungen und Fachbegriffe	189
Formelverzeichnis	197
Literaturverzeichnis	201

1. Einleitung

1.1. Fluoreszenzmikroskopie zur Entschlüsselung biologischer Fragestellungen

Viele Krankheiten werden nach heutigem Wissensstand nicht nur durch äußere Einflüsse wie Viren oder toxische Substanzen hervorgerufen, sondern entstehen bereits im Innern des Menschen durch die Fehlregulierungen diverser Signalwege. Über diese zahlreichen und oftmals komplexen Signalwege kommunizieren die Zellen im menschlichen, aber auch in anderen lebenden Organismen miteinander. Ein für den Menschen essenzieller Signalweg ist der Wnt-Signalweg. Der Funktionsverlust bereits eines Signalweg-relevanten Proteins kann hierbei zu schwerwiegenden Krankheiten [1, 2] und sogar zur Entstehung von Krebs führen [3–5]. Um für die Therapie bzw. Heilung von Krankheiten und Krebs gezieltere pharmazeutische Mittel entwickeln zu können, ist es wichtig, die dafür relevanten biologischen Prozesse zu entschlüsseln und zu verstehen. Die Erforschung der biologischen Prozesse, die für den menschlichen Organismus essenziell sind, ist seit jeher eine zentrale Aufgabe der Lebenswissenschaften, jedoch in der Praxis erst seit einigen Jahren möglich. Der Grundbaustein für die Forschung wurde bereits im 17. Jahrhundert durch die Entwicklung der ersten Lichtmikroskopmodelle gelegt [6–8]. Mit ihnen war es erstmals möglich, die Morphologie von Zellen zu studieren [9]. Kleinere Objekte im Nanometerbereich wie einzelne Proteine blieben vom menschlichen Auge weiterhin unentdeckt. Dies liegt, neben dem mangelnden Kontrast, hauptsächlich an der Welleneigenschaft des Lichts, die die Auflösung aufgrund von Beugungseffekten begrenzt. 1873 formulierte Ernst Abbe die Abbe'sche Auflösungsgrenze für die Lichtmikroskopie, die bei etwa der Hälfte der Wellenlänge liegt [10] und für viele Jahrzehnte als unüberwindbar galt. In den 1960er Jahren entdeckte Osamu Shimomura GFP, eines der ersten fluoreszierenden Proteine [11], die inzwischen über gezielte Genklonierung auch in andere Organismen eingebracht werden können. Somit wurde eine Lösung für den Mangel an Kontrast in der optischen Lichtmikroskopie gefunden. Der Einsatz fluoreszierender Proteine zur gezielten Markierung spezifischer Strukturen in lebenden Zellen verbesserte nicht nur das Signal-Rausch-

Verhältnis erheblich, sondern ebnete den Weg für eine neue Art der Mikroskopie: die Fluoreszenzmikroskopie. Im Laufe der letzten Jahrzehnte arbeiteten Wissenschaftler und Techniker stets an der Verfeinerung und Erweiterung diverser Mikroskopietechniken bis schließlich gegen Ende des 20. Jahrhunderts die von Ernst Abbe definierte Auflösungsgrenze das erste Mal überwunden werden konnte. Möglich war dies mit den hochauflösenden Lichtmikroskopietechniken STED (engl. *stimulated emission depletion*) und der PALM/STORM (engl. *photoactivated localization microscopy/stochastic optical reconstruction microscopy*, Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopietechnik). Für deren Entwicklung erhielten die Wissenschaftler Prof. Dr. Stefan Hell, Dr. Eric Betzig und Prof. Dr. William Moerner im Jahr 2014 den Nobelpreis für Chemie.

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl von Mikroskopietechniken, die sich die Lebenswissenschaften heutzutage zu Nutze machen, um wichtige biologische Fragen zu beantworten und um die komplexen Mechanismen der essenziellen Signalwege auf der Proteinebene zu entschlüsseln. So lassen sich mittlerweile bereits einige Krankheiten auf die Fehlregulierung oder den Funktionsverlust eines Proteins in dem überaus komplexen Signalnetzwerk eukaryotischer Organismen zurückführen. Die Kenntnis über die Mechanismen der Signalwegprozesse ermöglicht in Zukunft die gezielte Entwicklung von Medikamenten und Therapieansätzen und kann auf langer Sicht zahlreiche Menschenleben retten.

1.2. Aufbau der Arbeit

In dieser Arbeit werden einige für den Wnt-Signalweg wichtige Protein-Protein-Interaktionen mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken untersucht und quantifiziert.

In Kapitel 2 wird der Wnt-Signalweg vorgestellt. Im Anschluss folgt eine Einführung in die Grundlagen der Lichtmikroskopie, woraufhin der Schwerpunkt auf die Fluoreszenzmikroskopie gelegt wird. Anschließend wird der mathematische Hintergrund zur Bindungskinetik zwischen einem Rezeptorprotein und seinem Liganden aufgezeigt. Nach einem kurzen Abschnitt zur Diffusion von Teilchen folgen die theoretischen Grundlagen zur Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), die durch eine Linienrastertechnik auch für Messungen an der Membran lebender Zellen eingesetzt werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden bzw. fluoreszenzmikroskopischen Techniken wie Fluorometrie, Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie und die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie werden in Kapitel 3 vorgestellt. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich im Detail mit axialer Linienraster-FCS, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals erfolgreich an lebenden Zellen angewandt wurde. Mit ihrer Hilfe können Bindungsaffinitäten und Komplexbildungen von membrangebundenen Proteinen quantitativ bestimmt werden.

Alle Experimente zur Entschlüsselung von Protein-Protein-Interaktionen im Wnt-Signalweg wurden in dieser Dissertation im Rahmen des SFB1324 durchgeführt. Die zusammengefassten Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln aufgezeigt und diskutiert.

In Kapitel 4.1 wird mittels klassischer FCS die Konzentration und der Diffusionskoeffizient von β -Catenin in Darmkrebszellen bestimmt. Dabei wird der Einfluss der Entfernung der Phosphorylierungsstelle Ser45 und weiterer Proteine betrachtet, die normalerweise am Abbau von β -Catenin beteiligt sind (APC, Axin, GSK3).

In Kapitel 4.2 werden Rezeptor-Ligand-Interaktionen im Wnt-Signalweg näher untersucht. Begonnen wird mit einem Assay zur Bestimmung der Einzelmolekül-Diffusionsmobilitätsverschiebung (engl. *single-molecule diffusion-mobility-shift assay*, smDIMSA) eines Rezeptorproteins durch die Zugabe von Bindungspartnern unterschiedlicher Molekülmassen. Der Fokus liegt hierbei auf dem Membranrezeptorprotein LRP6 und seinem Liganden DKK1. Daraufhin folgen Bindungskinetikexperimente zur Ermittlung

der Bindungsstärke von DKK1 an seinen Rezeptor LRP6 oder xKremen2 unter An- und Abwesenheit von LRP6. Im Anschluss wurden die Bindungsaffinitäten durch axiale Linienraster-FCS-Experimente bei unterschiedlichen Rezeptordichten in HEK293T- und H1703-Zellen quantitativ bestimmt. Der letzte Abschnitt dieses Kapitels handelt von Experimenten an *Xenopus* Explantaten, bei denen mittels Weitfeldfluoreszenzmikroskopie der Internalisierungsprozess von xRor2 unter Einfluss von Wnt5a studiert wurde.

Der Schluss dieser Arbeit, Kapitel 4.3, befasst sich mit dem aktiven, interzellulären Transport von Wnt3a in sogenannten Tunnelnanoröhren. Dabei wurden via Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie nicht nur die Größen der transportierten Vesikel in HEK293T- und H1703-Zellen bestimmt, sondern auch deren Geschwindigkeiten anhand von Zeitrafferaufnahmen ermittelt. Via Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie konnten einzelne Wnt3a-Proteine in den Filopodien und Vesikeln von H1703-Zellen lokalisiert werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Der Wnt-Signalweg

2.1.1. Die Geschichte und Relevanz des Wnt-Signalwegs

Jedes System, sei es ein Staat, eine Firma oder eine Schule, funktioniert nur aufgrund des regen Informationsaustauschs durch die Kommunikation der einzelnen Systemmitglieder. Auch der menschliche Organismus basiert auf solch einem dynamischen Kommunikationssystem, das angepasst an die äußeren Gegebenheiten und Änderungen der Umgebung die Aktivitäten innerhalb des Systems steuert. Dabei kommunizieren Zellen untereinander über ein komplexes Netzwerk aus diversen Signalwegen [12]. Einer dieser Signalwege ist der Wnt-Signalweg, dessen Entdeckung bereits mehr als 40 Jahre zurückliegt [13]. Er spielt eine wichtige Rolle in vielen grundlegenden biologischen Prozessen, u. a. in der embryonalen Entwicklung, der Zellproliferation und -migration und in der Zellpolarität [1, 2]. Eine Missregulierung in diesem Signalweg kann zudem zu schweren Krankheiten wie der Degeneration von Nervenzellen bis hin zu Krebs [3–5] führen. Der Wnt-Signalweg kann zur Vereinfachung in einen kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg eingeteilt werden. Diese Signalwege werden zwar unterschieden, sind aber dennoch teilweise voneinander abhängig bzw. beeinflussen einander. Seit der Entdeckung des Wnt-Signalwegs wurden immer mehr Proteine entdeckt, die in die Signaltransduktion involviert sind und untereinander wechselwirken. Allein zu der Familie von Wnt-Proteinen zählen mittlerweile bereits 19 Mitglieder. Umso wichtiger ist es, die Komplexität des Wnt-Signalwegs zu entschlüsseln und dessen grundlegenden Mechanismen und Funktionen Stück für Stück aufzudecken.

Ein Großteil der Experimente in dieser Arbeit widmet sich den Protein-Protein-Wechselwirkungen im Wnt-Signalweg. Ziel ist es, Rückschlüsse auf spezielle Mechanismen im Wnt-Signalweg zu ziehen und somit medizinische Fragestellungen beantworten zu können. Um die Relevanz dieser Experimente zu verdeutlichen, wird im folgenden Kapitel auf die Auswirkungen der Hoch- und Herunterregulierung sowie der Funktionsverluste einiger wichtiger Proteine im Wnt-Signalweg eingegangen. Zum besseren

Verständnis werden im folgenden Abschnitt zuerst die bisher bekannten Mechanismen des Wnt-Signalwegs erläutert. Hierbei wird darauf geachtet, trotz hoher Komplexität des Signalwegs nur die für diese Arbeit relevanten Bereiche aufzuzeigen.

2.1.2. Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Signalweg kann zur Vereinfachung in einen aktivierten und inaktivierten Zustand unterteilt werden (Abbildung 2.1). Im inaktivierten Zustand befinden sich die Wnt-Rezeptoren LRP5/6 (engl. *Low-density lipoprotein receptor-related protein*) und Frizzled (oft abgekürzt als Fzd) an der Zellmembran, bereit, einen ihrer Liganden zu binden. Im Cytosol der Zelle wird die β -Catenin-Konzentration von dem sogenannten Zerstörungskomplex reguliert. Zu diesem zählen die Strukturproteine APC (engl. *adenomatous polyposis coli*), Axin (engl. *axis inhibition protein*) und die zwei Kinasen GSK3 (engl. *glycogen synthase kinase*) und CK1 (engl. *casein kinase 1*). Die β -Catenin-Konzentration wird im inaktiven Wnt-Signalweg niedrig gehalten, indem β -Catenin N-terminal von den Kinasen phosphoryliert und anschließend vom Proteasom abgebaut wird. Die Expression von Wnt-Zielgenen ist infolge der Abwesenheit von β -Catenin im Nukleus unterdrückt.

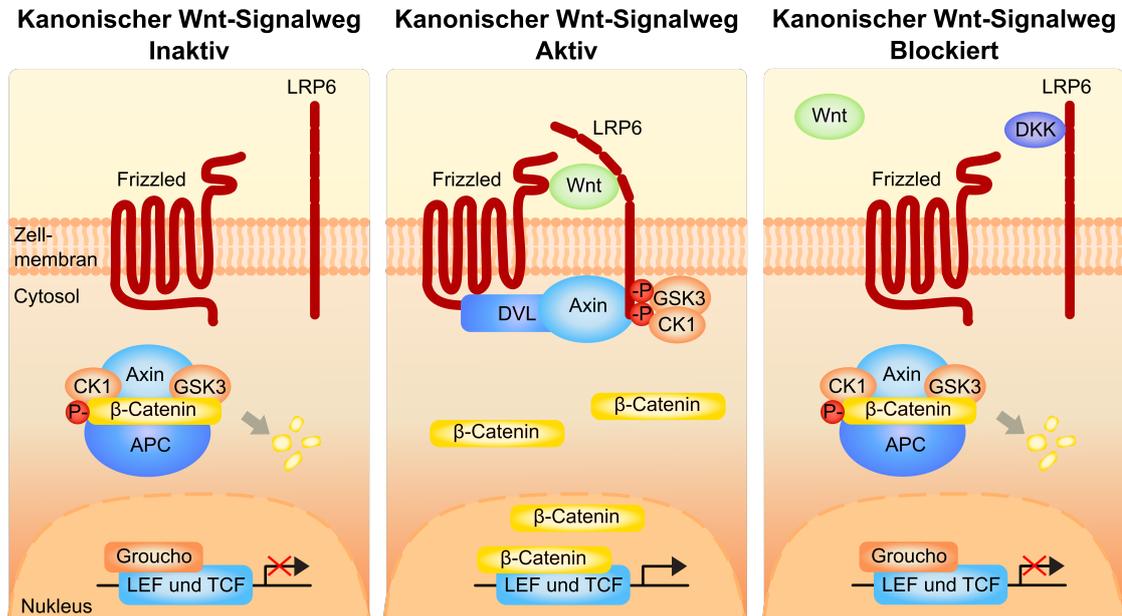


Abbildung 2.1: Der kanonische Wnt-Signalweg im inaktivierten, aktivierten und blockierten Zustand.

Von den insgesamt 19 Mitgliedern in der Familie der Wnt-Proteine wurde nur ein Teil als kanonische Wnt-Proteine klassifiziert [14]. Der kanonische Wnt-Signalweg kann durch die Bindung von Wnt-Liganden an ihre Rezeptoren LRP5/6 und Frizzled und der daraus resultierenden Komplexbildung schließlich aktiviert werden. Aus diesen Komplexen können sich größere Zusammenschlüsse bilden, die durch DVL (engl. *dishevelled*), welches als eine Art Plattform im Cytosol dient, stabil zusammengehalten werden. Diese Komplexe werden auch als Signalosome bezeichnet. Drei der zuvor in den Abbau von β -Catenin verwickelten Proteine (Axin, GSK3 und CK1) lagern sich nun intrazellulär an den C-Terminus von LRP6, wodurch der Rezeptor phosphoryliert wird. Daraufhin kommt es zur Internalisierung der Signalosome in das Innere der Zelle, was wiederum intrazelluläre Signalkaskaden auslöst. β -Catenin wird nun durch die Abwesenheit des Zerstörungskomplexes im Cytosol nicht mehr abgebaut, wodurch die β -Catenin-Konzentration im Cytosol sowie im Nukleus ansteigt. Im Nukleus wird schließlich durch die Anlagerung von β -Catenin an die Transkriptionsfaktoren LEF/TCF die Expression von Wnt-Zielgenen ausgelöst. Zu diesen zählen u. a. Onkogene, die zur Karzinogenese, der Entstehung und Progression von Tumoren, z. B. Lungenkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs und Darmkrebs führen können. Etwa 10 – 50 % der Krebszellen von verschiedenen Arten von Darmkrebsarten weisen Mutationen in β -Catenin-Gen auf, häufig in der Sequenzregion mit den Phosphorylierungsstellen Ser33, Ser37, Thr41 und Ser45 [15].

Trotz Anwesenheit von Wnt-Proteinen kann der Wnt-Signalweg durch Wnt-Inhibitoren blockiert werden. Dies führt das System in eine mit dem inaktivierten Zustand vergleichbare Situation. Im Allgemeinen stören bzw. hindern Wnt-Inhibitoren die Signalkaskade, d. h., die β -Catenin-Konzentration im Cytosol bleibt niedrig. Manche Wnt-Inhibitoren binden durch ihre höhere Bindungsaffinität im Vergleich zu den Wnt-Liganden bevorzugt an Wnt-Rezeptoren. Hierzu zählt DKK (engl. *Dickkopf-related protein*), das explizit mit Wnt3a konkurriert und durch seine Bindung an den Rezeptor LRP5/6¹ die Bindung von Wnt3a hindert. Dadurch kommt es nicht zur Bildung von Signalosomen, und der Wnt-Signalweg ist blockiert.

¹ Im Folgenden wird zur Vereinfachung nur noch LRP6 betrachtet

2.1.2.2. Einfluss des Membranrezeptors Kremen

Kremen ist ein Membranprotein und fungiert als Abwärtsregulator für LRP6 [13], d. h., in der Anwesenheit von Kremen wird LRP6 vermehrt von der Membran in die Zelle internalisiert. Außerdem ist Kremen wie LRP6 ein Rezeptor für den Wnt-Inhibitor DKK [20]. Hierbei kann Kremen entweder mit DKK allein eine Bindung eingehen oder zusammen mit LRP6 einen ternären Komplex formen [13] (Abbildung 2.3). Kremen besitzt jedoch in seiner Proteinstruktur auch Regionen, die direkt mit LRP6 wechselwirken und somit zu einer Rezeptor-Rezeptor-Bindung führen können. Dies wurde zwar bereits mittels Strukturanalyse untersucht, sollte jedoch noch durch geeignete in-vivo Messungen an lebenden Zellen bestätigt werden [20].

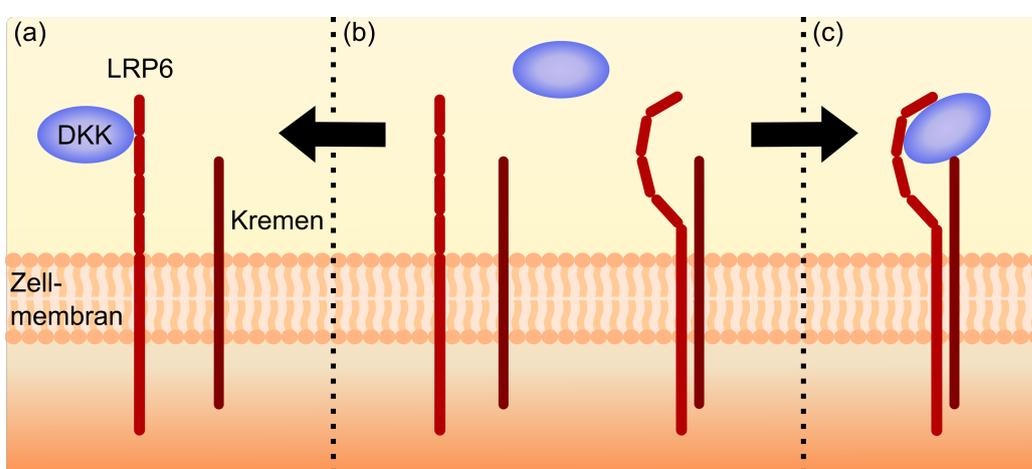


Abbildung 2.3: DKK und seine Rezeptoren LRP6 und Kremen: (a) DKK bindet an LRP6 alleine. (b) LRP6 und Kremen formen teilweise auch ohne DKK Heterodimere. (c) DKK bindet an LRP6 und Kremen, wodurch sich ein LRP6-Kremen-DKK-Komplex bildet.

2.1.3. Nicht-kanonische Wnt-Signalwege

Der nicht-kanonische Wnt-Signalweg ist im Vergleich zum kanonischen Wnt-Signalweg vielfältiger und kann in einige, zum Teil voneinander abhängige Unterzweige eingeteilt werden. Zu diesen zählen u. a. der PCP-Signalweg (engl. *planar cell polarity*) und der Wnt-Ca²⁺-Signalweg [13]. Durch die Komplexität der Mechanismen der einzelnen Signalwege und der Wechselwirkungen der involvierten Proteine ist der nicht-kanonische Wnt-Signalweg bisher noch unzureichend charakterisiert [21]. Zur Vereinfachung beschränkt sich der schematische Aufbau in Abbildung 2.4 lediglich auf den für diese Arbeit relevanten Teil des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs: Die Wechselwirkung des

Liganden Wnt5a und seines Rezeptors Ror2 (engl. *receptor tyrosine kinase-like orphan receptor*). Ror2 ist wie LRP6 und Frizzled ein membrangebundenes Rezeptorprotein und bildet infolge der Bindung von Wnt5a Homodimere aus [22, 23]. Die Internalisierung von Wnt5a/ROR-Komplexen ist laut Wallkamm et al. [24] essenziell für die Signalaktivierung des nicht-kanonischen Signalwegs. Die Interaktion von Wnt5a und Ror2 führt zu einem erhöhten Abbau von β -Catenin und inhibiert somit den kanonischen Wnt-Signalweg [25]. Zudem werden die Zellpolarität, die Migration sowie die Invasivität von Zellen beeinflusst. Letztere spielt vor allem bei bösartigen Tumorzellen eine große Rolle, deren Invasivität eine gravierende Auswirkung auf die Lebenserwartung des betroffenen Organismus hat.

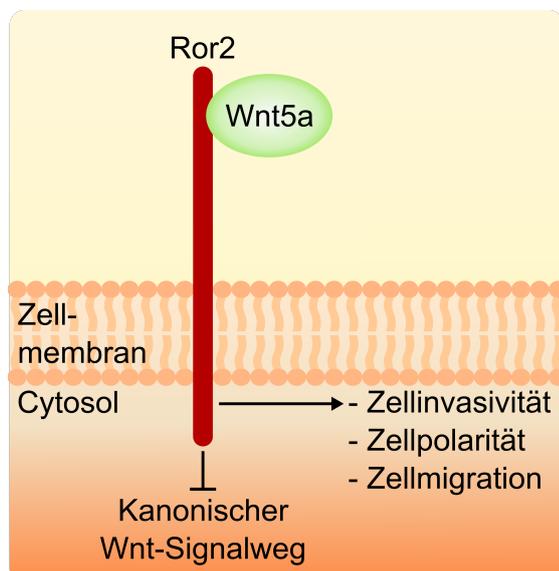


Abbildung 2.4: Interaktionen von Wnt5a und Ror2 im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Verändert nach [26].

2.1.4. Interzellulärer Wnt-Transport

Der Wnt-Signalweg basiert auf einem komplexen Zusammenspiel diverser Proteine und ist bis heute nicht komplett erforscht. Es ist bekannt, dass der Wnt-Signalweg auf verschiedenen Wegen aktiviert werden kann, auch ohne die direkte Präsenz von Wnt-Proteinen [27]. Im Fall der Anwesenheit von Wnt-Proteinen und Abwesenheit von Wnt-Inhibitoren löst die spezifische Bindung der Wnt-Proteinen an ihre Rezeptoren in der Zielzelle Signalkaskaden aus, die zur Erhöhung der Wnt-Aktivität in dieser Zelle führen. Da es sich bei den Wnt-Liganden um hydrophobe Proteine handelt, können

sie jedoch nicht ohne Weiteres bzw. ohne Schutz in den Extrazellularraum sekretiert werden und benötigen Hilfsproteinen bzw. Modifizierungen, die dies ermöglichen. Ein Enzym namens Porcupine (PORCN) ist für die Lipid-Modifizierung der Wnt-Proteine zuständig und befindet sich typischerweise im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle [28, 29]. Das ER ist ein weitverzweigtes Membrannetzwerk im Inneren der Zelle, welches an der Synthese von Proteinen und dem Lipidstoffwechsel beteiligt ist [30]. Wnt wird schließlich von dem Wnt-Hilfsprotein Wls (engl. *Wntless*) gebunden und durch dieses vom ER über den Golgi zur Plasmamembran, u. a. auch zu den Filopodien der Zelle [31, 32], transportiert. Wnt-Proteine können entweder über Wls an die Plasmamembran binden oder direkt über ihre eigene Lipideinheit. Wie Wnt-Proteine jedoch von einer Zelle zu einer Zielzelle reisen, ist nach dem heutigen Wissensstand noch nicht eindeutig geklärt.

Zu den bisher vorgestellten möglichen Transportwegen von Wnt-Proteinen zählen Mikrovesikel und Exosome, Apolipoproteine und Wnt-Bindungsproteine und der Transport via Cytonemen [28, 33] (Abbildung 2.5).

Es ist bekannt, dass die Kommunikation zwischen Zellen u. a. auf der Ausschüttung und Aufnahme von Vesikeln unterschiedlichster Größe und Ursprungs basiert [34]. In der Zelle befindet sich eine Vielzahl von membranumschlossenen Vesikeln, sogenannten Endosomen, die aktiv am Transport von Proteinen aus dem Zellinneren zur Zellmembran und wieder zurück beteiligt sind. Größere Vertreter werden Multivesikularkörper (engl. *multivesicular bodies*, MVBs) genannt und beinhalten in ihrem Inneren weitere kleinere Vesikel. Diese können schließlich durch die Fusion des multivesikulären Körpers mit der Zellmembran als 40-100 nm große Exosome in den extrazellulären Bereich sekretiert werden, wo sie wiederum zu einer anderen Zelle diffundieren können [35–37]. Neben den Exosomen gibt es auch Mikrovesikel mit einer typischen Größe von 100-1000 nm, die direkt aus der Zellmembran in den extrazellulären Bereich entkoppelt werden [38]. Eine weitere Transportmöglichkeit von Wnt besteht in sogenannten Lipoproteinen, Aggregate aus Lipiden und Proteinen. Die Lipoproteinoberfläche setzt sich u. a. aus Apolipoproteinen zusammen, die als mögliche Andockpunkte für Wnt-Proteine dienen können. So kann die Zugabe von HDLs (engl. *high-density lipoproteins*) durch das Aufladen von Wnt-Proteinen die Sekretion von Wnt3a in Medien erheblich erhöhen [39].

Neben der Ausschüttung von Vesikeln können auch Wnt-Hilfsproteine die Sekretion von Wnt unterstützen. Die Proteine sFRP (engl. *Secreted frizzled-related protein 1*) und Swim (engl. *Secreted Wg-interacting molecule*) schirmen durch ihre Bindung an

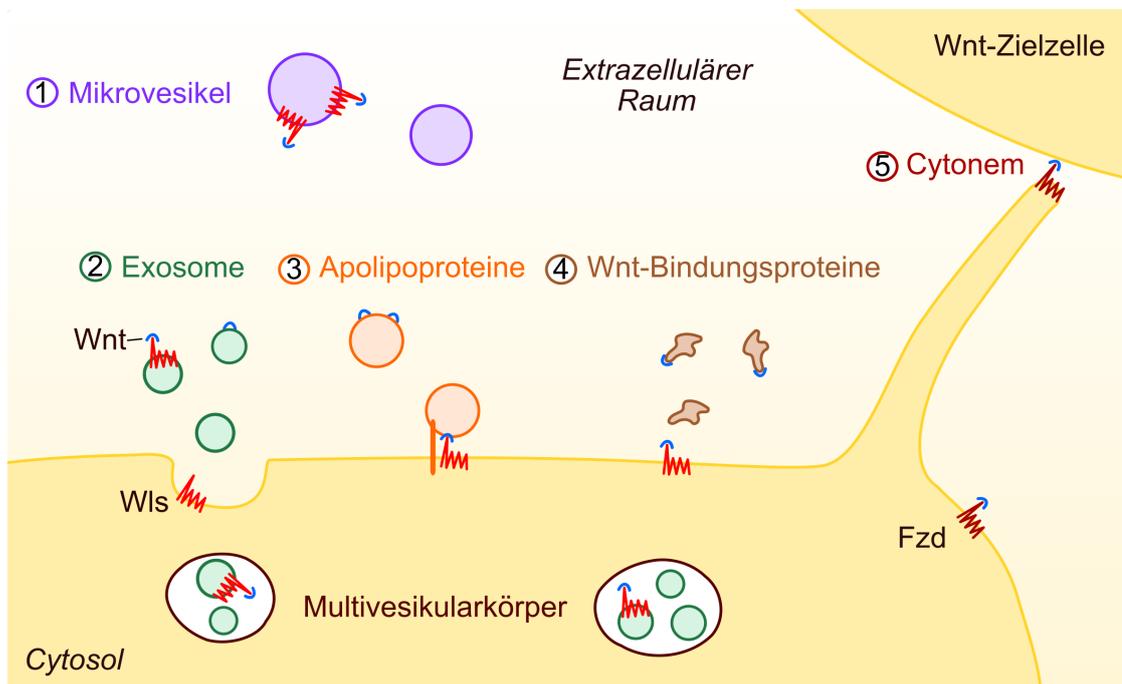


Abbildung 2.5: Interzellulärer Wnt-Transport durch (1) Mikrovessel, (2) Exosome, (3) Apolipoproteine, (4) Wnt-Bindungsproteine und durch Transport via (5) Cytoneme. Verändert nach [28, 34].

Wnt-Proteine deren hydrophoben Einheiten von der wässrigen Umgebung im Extrazellulärraum ab und erhöhen dadurch die Löslichkeit von Wnt [40–42]. Im Extrazellulärraum angelangt können die mit Wnt-Proteinen angereicherten Transportvehikel über Protein-Protein-Wechselwirkungen direkt an die membrangebundenen Wnt-Rezeptoren binden und via Endozytose in die Zelle aufgenommen werden, woraufhin der Wnt-Signalweg in der Zielzelle aktiviert wird. Zum anderen können die Vesikel aber auch über eine direkte Fusion mit der Zielmembran in die Zelle eingeschleust werden.

Abgesehen von den bisher vorgestellten Wnt-Transportvehikeln können Wnt-Proteine auch einen weiteren Transportweg nutzen, und zwar den direkten Zell-Zellkontakt durch dynamische Zellfortsätze, sogenannten Filopodien bzw. Cytoneme [43]. Cytoneme sind tubuläre, cytoplasmatische Membranfortsätze, die den Zellen nicht nur zur Adhäsion und Fortbewegung dienen, sondern die auch auf den interzellulären Austausch von Signalmolekülen spezialisiert sind [44, 45]. Sie werden durch parallel angeordnete Aktinfilamente gebildet und können eine Länge von bis zu mehreren hundert Mikrometern annehmen [46]. Wnt kolokalisiert teilweise mit Markern für Exosome und kann als punktartige Strukturen auf Cytonemen beobachtet werden [43]. Wnt-positive

Exosome können entlang von Filopodien „surfen“, bis sie am Filopodienansatz in die Zelle eingeschleust werden [47]. Wie viele für den Wnt-Signalweg relevante Transportwege Wnt-Proteinen tatsächlich offenstehen, wie frequent diese benutzt werden und ob diese Wnt-spezifisch sind (Wnt3a, Wnt5a, etc.) bleibt weiterhin eine zentrale Frage in der Erforschung des Wnt-Signalwegs.

2.2. Grundlagen der Lichtmikroskopie

Der Drang, Neues zu entdecken und die Grundlagen des Lebens zu verstehen, liegt seit jeher in der Natur des Menschen. Jedoch ist der Mensch auf seine Sinne beschränkt und kann ohne Hilfsmittel nur die Welt des Mesokosmos beobachten. Um in den Bereich des Mikrokosmos vorzudringen, eignen sich technische Werkzeuge wie z. B. ein Lichtmikroskop. Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die Geschichte der Lichtmikroskopie gegeben.

2.2.1. Ein kurzer Überblick über die Geschichte der Lichtmikroskopie

Mit der Entwicklung eines der ersten handgefertigten Mikroskopsysteme im Jahr 1665 durch Hooke [7, 8] war es dem Menschen erstmals möglich, kleine Objekte vergrößert darzustellen und Lebewesen und Pflanzen näher zu untersuchen. Bei seiner Erkundungsreise durch verschiedene biologische Präparate entdeckte er u. a. kleine Teile von biologischem Gewebe, die er als „Zellen“ bezeichnete [48], wodurch er den Anfang der Zelltheorie prägte. Antonie van Leeuwenhoek entwarf schließlich gegen Ende des 17. Jahrhunderts ein optisches System, bestehend aus einer einzigen, sorgfältig angefertigten, sphärischen Linse, das ihm eine bis zu 280-fache Vergrößerung ermöglichte. Somit gelang es ihm, diverse neue Organismen und Strukturen zu entdecken, u. a. Bakterien, Hefezellen und sogar rote Blutkörperchen [49], wodurch er auch den Titel „Vater der Mikrobiologie“ [50] erlangte. In den darauffolgenden Jahrhunderten entwickelte sich die Mikroskopie stark weiter, die optischen Systeme wurden zunehmend komplexer und immer kleinere Objekte konnten dargestellt werden. Die grundlegende Idee der Mikroskopie ist geblieben, allerdings wurden die einzelnen Komponenten, Lichtquellen und Linsen der Mikroskope technisch stark weiterentwickelt und an die jeweiligen Anforderungen bestmöglich angepasst. Lichtquellen sind heutzutage üblicherweise Halogenlampen, Laserquellen bestimmter Wellenlängen oder Leuchtdioden (engl. *light-emitting diodes*). Wo früher das Auge als Detektor zum Einsatz kam, werden heute Kameras platziert und auch Linsen und optische Komponenten werden zum Teil aufwendig hergestellt und chemisch behandelt, um optimale Mikroskopiebedingungen

zu schaffen. Somit ist die Mikroskopie seit dem 17. Jahrhundert über einige Weiterentwicklungen, wie z. B. der Fluoreszenzmikroskopie, allmählich zur „Nanoskopie“ [51] fortgeschritten (Kapitel 2.3 und Kapitel 2.4).

2.2.2. Grundlegender optischer Aufbau eines Mikroskops

Grundbausteine eines jeden Mikroskops sind lichtdurchlässige Linsen aus speziell angefertigtem Glas zur Streuung, zur Sammlung oder Ablenkung von Lichtstrahlen. Diese Linsen besitzen eine dimensionslose, materialspezifische Eigenschaft, den sogenannten Brechungsindex, der angibt, wie sich das Licht in ihnen ausbreitet bzw. wie das Licht bei einem Materialübergang gebrochen wird. Trifft ein Lichtstrahl von einem Medium 1 mit dem Brechungsindex n_1 auf ein optisch dichteres Medium 2 mit vergleichsweise höherer Brechungsanzahl $n_2 > n_1$, so wird das Licht zum Lot hin gebrochen (Abbildung 2.6 (a)). Beim Verlassen des optisch dichteren Mediums 2, d. h., beim Übergang von einem optisch dichteren in ein optisch dünneres Medium, wird der Lichtstrahl vom Lot weggebrochen, wodurch der Strahl wieder in der ursprünglichen Strahlrichtung verläuft. Nicht nur die optischen Eigenschaften einzelner Bauteile müssen beim Aufbau eines Mikroskops berücksichtigt werden, sondern auch eine intrinsische Eigenschaft von Lichtstrahlen, die Dispersion. Sie führt dazu, dass Lichtstrahlen verschiedener Farbe bzw. Wellenlänge in optischen Materialien unterschiedlich stark gebrochen werden. Ein sehr bekanntes Beispiel hierfür ist die in Abbildung 2.6 (b) veranschaulichte Farbaufteilung von weißem Licht durch ein Prisma. Mit optischen Bauelementen kann Licht in verschiedenster Weise manipuliert werden. Spiegel

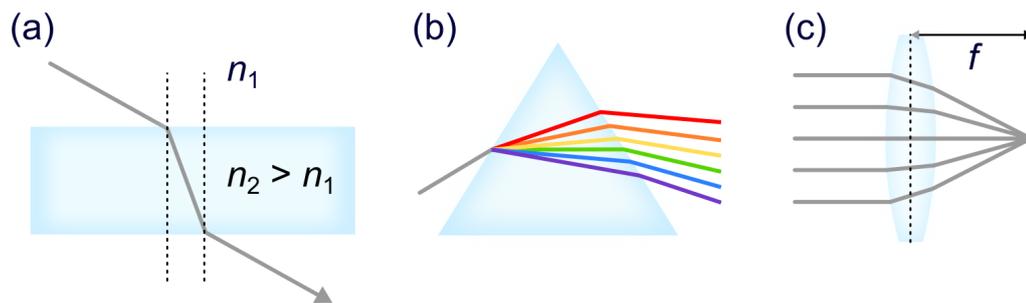


Abbildung 2.6: Grundlagen für Lichtbrechung und Linsen. (a) Brechung eines Lichtstrahls beim Passieren eines optisch dichteren Mediums mit höherem Brechungsindex ($n_1 < n_2$). Beim Eintritt in das optisch dichtere Medium wird der Lichtstrahl zum Einfallslot und beim Verlassen wieder vom Lot weggebrochen. (b) Dispersion eines weißen Lichtstrahls durch ein Prisma. (c) Lichtfokussierung durch eine konvexe Linse mit Brennweite f . Verändert nach [7].

können Lichtstrahlen entweder reflektieren oder, im Falle eines halbdurchlässigen Spiegels, Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich durchlassen. Die Eigenschaft von optischen Linsen, die je nach ihrer Dicke und Krümmung das Licht sammeln oder zerstreuen können, ist durch ihren Brennpunkt definiert. In Abbildung 2.6 (c) ist eine Sammellinse (konvexe Linse) dargestellt, die z. B. zuvor parallele Lichtstrahlen hinter sich in ihrem Brennpunkt sammelt bzw. fokussiert. Konkave Linsen hingegen zerstreuen einen zuvor parallelen Lichtstrahl, was jedoch durch das Einbringen einer nachfolgenden Sammellinse wieder rückgängig gemacht werden kann. Ein schematischer Aufbau eines einfachen optischen Systems zur Vergrößerung des Abbilds einer Probe ist in Abbildung 2.7 dargestellt.

Bei der Entwicklung der ersten Mikroskope kamen als Lichtquellen das Tageslicht oder Kerzenlicht zum Einsatz. Da es sich bei den früheren Modellen meist um Transmissionsmikroskope handelte, wurde üblicherweise im Durchlichtmodus gearbeitet. Hierbei wird das Licht einer Lichtquelle mit ausreichender Intensität über eine Kondensorlinse auf die Probe gerichtet. Die dadurch entstehende, möglichst homogene Ausleuchtung

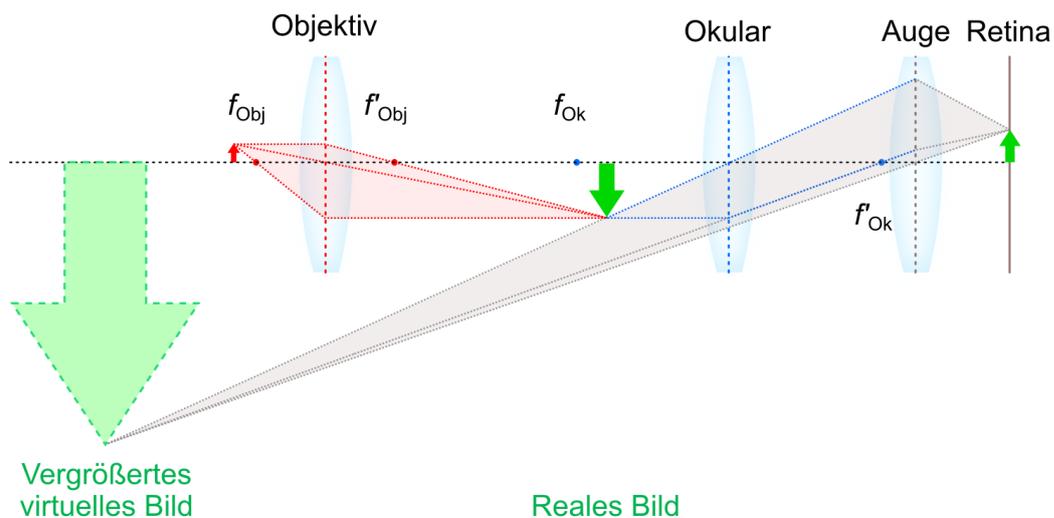


Abbildung 2.7: Bildgebung durch ein einfaches Mikroskop mit zwei eingebauten Linsen: dem Objektiv und dem Okular. Das abzubildende Objekt befindet sich links vor dem Objektiv und ist durch einen kleinen roten Pfeil und die bei der Bildgebung entstehenden Abbilder des Objekts durch grüne Pfeile dargestellt. Die Brennweiten der Linsen sind durch f_{Obj} , f'_{Obj} , f_{Ok} und f'_{Ok} gekennzeichnet. Durch das Objektiv entsteht zwischen Objektiv und Okular ein reelles, invertiertes Bild des abzubildenden Objekts. Aus diesem invertierten Bild, das sich zwischen Brennpunkt und Okular befindet, erzeugt das Okular auf der gleichen Seite ein vergrößertes, virtuelles Bild. Das menschliche Auge besitzt eine weitere Linse, die das Bild auf die Retina (Netzhaut) wirft. Verändert nach [7].

der Probe wird auch als Hellfeld bezeichnet. Der in Abbildung 2.7 dargestellte Aufbau kann als Grundlage der meisten heutzutage verwendeten Mikroskope angesehen werden. Die Objektivlinse besitzt typischerweise eine kleine Brennweite, wodurch ein vergrößertes und invertiertes reales Abbild einer Probe erzeugt wird. Hierbei ist die Bildgröße invers proportional zum Abstand zwischen Objekt und Sammellinse. Das invertierte, reale Abbild der Probe hinter dem Objektiv befindet sich meist hinter dem Brennpunkt des Okulars. Dadurch können die vom Objekt stammenden Strahlen von dieser Linse nicht mehr gebündelt werden, d. h., die Lichtstrahlen divergieren auf der anderen Seite der Linse. Verlängert man diese divergierenden Lichtstrahlen, so findet sich an dem scheinbaren Ursprung, wo sie zusammenlaufen, ein virtuelles, vergrößertes Bild des Objekts. Da die verlängerten Lichtstrahlen dort in der Realität jedoch nicht existieren, gibt es auch keine Möglichkeit, das virtuelle Abbild mit einer Kamera einzufangen. Werden allerdings die divergierenden Lichtstrahlen durch eine weitere Linse, z. B. das menschliche Auge, wieder eingefangen und gebündelt, so kann das Objekt tatsächlich wieder real abgebildet werden. Der hier gezeigte Aufbau eines Mikroskops ist stark vereinfacht. Der Aufbau moderner Mikroskope ist weitaus komplexer, so können z. B. in einem einzigen Objektiv bis zu zehn verschiedene Linsen eingebaut sein, deren Material, optische Eigenschaft und Beschichtung aufeinander abgestimmt sind [7].

2.2.3. Auflösungsgrenze

Eine charakteristische Eigenschaft jedes Mikroskops ist sein Auflösungsvermögen, welches angibt, bis zu welchem Abstand feine Strukturen der Probe noch beobachtet werden können. Das Auflösungsvermögen hängt dabei stark von der numerischen Apertur (NA) des verwendeten Objektivs ab. Die numerische Apertur ist eine dimensionslose Zahl, die angibt, wie gut ein Objektiv Licht bzw. Photonen einfangen kann [7] und definiert über

$$NA \approx n \cdot \frac{d_{\text{Obj}}}{2 \cdot f'} \quad (2.1)$$

wobei n der Brechungsindex des Immersionsmediums, f' die Brennweite der Linse und d_{Obj} der Durchmesser der Eintrittspupille des Objektivs ist. Bereits im Jahr 1873 war dem deutschen Physiker Ernst Abbe bewusst, dass die Auflösung einfacher Lichtmikroskope allein nur durch die numerische Apertur, sondern auch durch die Welleneigenschaft des Lichts beschränkt ist. Er ging davon aus, dass das Licht an Objekten, an z. B. zwei Spalten, gebeugt wird und die Bildinformation des Objektes somit auf die

entstehenden Beugungsmaxima aufgeteilt wird. Je mehr dieser Beugungsmaxima für die Bildgebung genutzt werden können, desto höher ist auch die Auflösung. Es müssen jedoch mindestens das Maximum 0. und die Maxima 1. Ordnung eingefangen werden, um ausreichend Informationen über das Objekt zu haben. Die Information über den Abstand zweier Spalten ist zum Beispiel nicht im Maximum 0. Ordnung, sondern erst in den Maxima 1. Ordnung enthalten. Abbe legte sein Auflösungskriterium in dem nach ihm benannten Abbe-Limit [10] fest:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot n \cdot \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}. \quad (2.2)$$

Hier beschreibt d_{\min} den minimalen Abstand, bei welchem zwei Objekte noch voneinander getrennt dargestellt werden können, λ die Wellenlänge des Lichts, n den Brechungsindex des Immersionsmediums, α den halben objektseitigen Öffnungswinkel, bei dem das Objektiv gerade noch Licht aufsammeln kann und NA die numerische Apertur des verwendeten Objektivs. Geht man von einem idealen Fall aus, einem optischen Aufbau, optimal justiert, frei von Aberrationen, so liegt die beste erreichbare Auflösung für ein Objektiv mit $NA = 1$ bei der Hälfte der Wellenlänge des Lichts. Dies liegt an dem Wellencharakter von Licht und den damit verbundenen Beugungseffekten (Abbildung 2.8 (a)). Wenn eine planare Wellenfront auf einen infinitesimal dünnen Spalt trifft, so entsteht am Spalt eine zylindrische Wellenfront. Diese kann in der zwei-dimensionalen Ebene als Kreiswelle mit Zentrum an der Spaltposition gesehen werden. In der Realität besitzt der Spalt jedoch eine bestimmte Spaltdicke, innerhalb welcher an jedem Punkt eine solche zylindrische Wellenfront entsteht. Diese Vielzahl an Wellenfronten interferiert hinter dem Spalt miteinander.

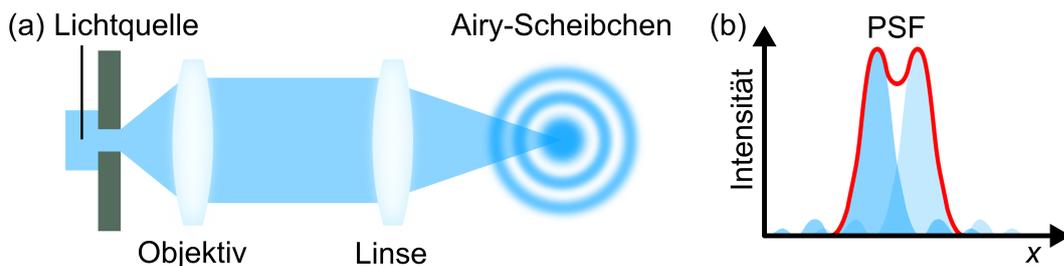


Abbildung 2.8: (a) Durch Beugungseffekte hervorgerufene Airy-Scheibchen. (b) Die resultierende, detektierte Punktspreizfunktion (PSF) als Funktion der Intensität in Abhängigkeit vom Ort x . Die Überlagerung der PSFs zweier Punktquellen ist rot gekennzeichnet. Das Hauptmaximum der linken PSF liegt im ersten Minimum der rechten PSF, somit ist das Rayleigh-Kriterium [52] erfüllt und beide Objekte können aufgelöst werden. Verändert nach [7].

Die Linsen eines Mikroskops wirken einzeln als kreisförmige Blende, wodurch die Punktspreadsfunktion (PSF) einer Punktquelle durch Beugungseffekte schließlich auf dem Detektor als Airy-Scheibchen wahrgenommen wird [7]. Einige Jahre nach der Festlegung der Abbe-Grenze stellte Lord Rayleigh im Jahre 1903 das Rayleigh-Kriterium vor [52] (Abbildung 2.8 (b)):

$$d_{\min} = \frac{0,61 \cdot \lambda}{NA}. \quad (2.3)$$

Nach Rayleigh überlagern sich die Airy-Scheibchen zweier Punktquellen auf dem Detektor und können gerade noch unterschieden werden, wenn das Hauptmaximum der einen Airy-Verteilung in das erste Minimum der anderen Airy-Verteilung fällt². Die durch Abbe und Rayleigh definierte Auflösungsgrenze galt seit vielen Jahrzehnten als unüberwindbares Hindernis für die Lichtmikroskopie. Erst gegen Ende des 20. Jahrhunderts wurde diese Barriere durch die bahnbrechenden Errungenschaften der Wissenschaftler Stefan Hell, Eric Betzig und William Moerner überwunden. Zu diesen Errungenschaften zählen u. a. die hochauflösende Mikroskopietechnik STED und die Einzelmolekül-Lokalisationstechniken SMLM (Kapitel 2.4.3). All diese Techniken basieren auf der Markierung der zu untersuchenden Strukturen mit fluoreszierenden Farbstoffen. Welche fluoreszierenden Farbstoffe dafür üblicherweise verwendet werden und wie sich die Lichtmikroskopie mit dem Einsatz dieser Farbstoffe weiterentwickelt hat, wird in Kapitel 2.3 und Kapitel 2.4 näher erläutert.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass das Auflösungsvermögen eines Mikroskops durch Aberrationen beeinflusst werden kann. Beispielsweise durchquert das emittierte Licht der Probe auf seinem Weg zur Kamera mehrere Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes, z. B. Zellzytoplasma, Zellkulturmedium, Probenträgermaterial und Luft. Auf diesem Weg wird das Licht an mehreren Grenzflächen teilweise reflektiert bzw. an Strukturen gestreut und verliert daher an Intensität, wodurch sich auch das Auflösungsvermögen verschlechtert. Zusätzlich können sphärische Aberrationen auftreten, die auf der Krümmung der verwendeten Linsen oder der Nichtübereinstimmung der

² Experimentell lässt sich das Auflösungsvermögen eines optischen Systems oftmals durch die mikroskopische Abbildung von Goldperlen oder fluoreszierenden Kugeln bestimmen. Goldperlen reflektieren das Anregungslicht zurück, wohingegen fluoreszierende Perlen durch das Anregungslicht zuerst in einen angeregten Zustand versetzt werden und dann anschließend sogenannte Fluoreszenzphotonen emittieren. Die Durchmesser solcher Messobjekte liegen typischerweise unterhalb der laut Abbe oder Rayleigh erreichbaren Auflösung im Bereich von 10-100 nm [7]. Hierbei wird die Halbwertsbreite der an die gemessenen Intensitätsprofile angenäherten Gaußfunktion noch um die Größe der verwendeten Kugeln korrigiert. Das Resultat dient schließlich als Maß für das Auflösungsvermögen eines optischen Systems.

Immersionsmedien zwischen Linse und Probe beruhen. Diese Art der Aberrationen kann z. B. durch den Einsatz eines passenden Immersionsmediums reduziert werden. Bei Wasser- oder Ölobjektiven liegt der Brechungsindex des verwendeten Immersionsmediums höher als bei Luft. Dadurch kann der Brechungsindexunterschied zum Probengefäß und auch zu dem Medium, in dem sich die Probe befindet, minimiert werden. Sind die Aberrationen wellenlängenabhängig, so werden sie chromatische Aberrationen genannt.

2.2.4. Das Abtasttheorem

Ein weiteres wichtiges Bauelement eines Mikroskops, das das Auflösungsvermögen beeinflusst, ist der Detektor, der das von der Probe kommende Signal bzw. die emittierten Photonen aufzeichnet. Um die von der Probe stammenden Photonen exakt einem Ort auf der Bildebene zuordnen zu können und die Probe somit unendlich fein abzutasten, müssten unendlich viele Pixel auf engstem Raum vorhanden sein. Bei diesem Extremfall wäre das detektierte Signal der Probe jedoch mit einer zu hohen Frequenz abgetastet worden, was man auch als „Übertastung“ bezeichnet [7]. Grund hierfür ist einerseits die Tatsache, dass die detektierten Photonen der Probe durch Pixel- und Hintergrundrauschen überlagert werden, die bei einer zu geringen Photonenzahl pro Pixel stärker ins Gewicht fallen. Näheres zu den möglichen Rauscharten befindet sich in Kapitel 2.4.3. Um ein Signal bestimmter Frequenz repräsentativ darstellen zu können, ist es meist ausreichend, das Signal bei einer Frequenz, die mindestens dem doppelten Wert der Signalfrequenz entspricht, abzutasten (Abbildung 2.9). Dies ist im Nyquist-Shannon-Abtasttheorem [53] festgehalten:

$$\nu_{\text{Abtast}} \geq 2 \cdot \nu_{\text{Signal}}. \quad (2.4)$$

Dies gilt auch für Bildinformationen, da ein Signal endlicher Breite durch eine Fourierreihe angenähert werden kann, die sich wiederum auf das Abtasttheorem beziehen lässt. In der Mikroskopie wird dieses Theorem vor allem im Zusammenhang mit dem Auflösungsvermögen relevant. Somit muss die Pixelgröße, um ein Auflösungsvermögen von 250 nm zu gewährleisten, kleiner als 125 nm sein.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird die Auflösung einer Struktur zudem durch die Dichte der zur Markierung verwendeten Farbstoffe beeinflusst (Kapitel 2.3 und Kapitel 2.4). Nach dem Nyquist-Shannon-Abtasttheorem muss der mittlere Abstand zwischen den Farbstoffen mindestens halb so groß sein wie die gewünschte Auflösung. Voraussetzung hierfür sind jedoch 100 % funktionelle Farbstoffe, was in der Realität jedoch

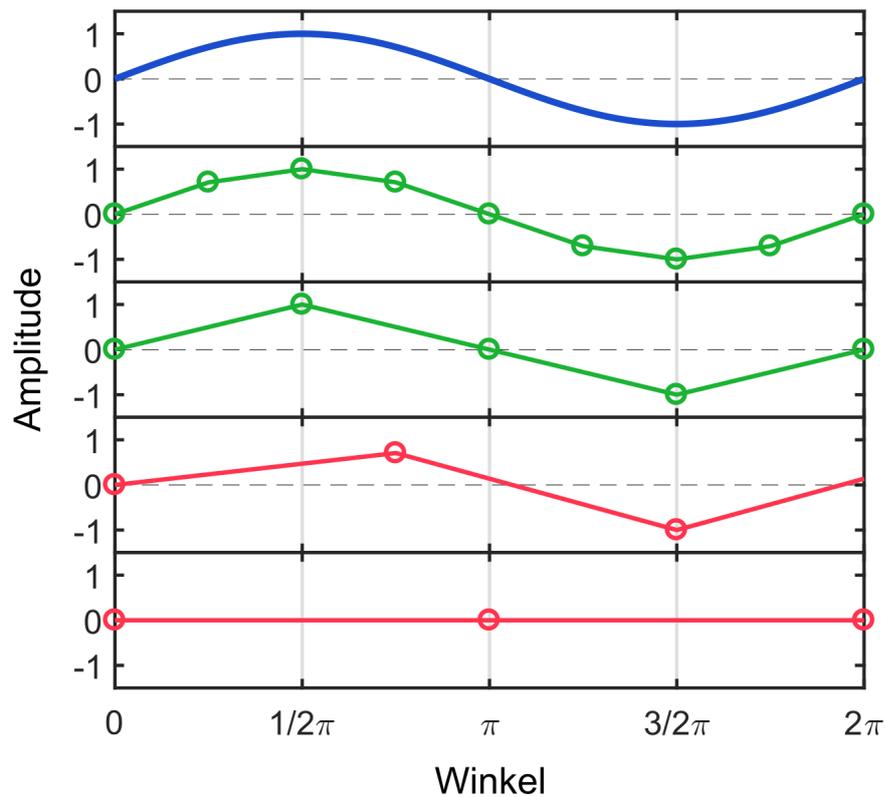


Abbildung 2.9: Veranschaulichung des Abtasttheorems anhand eines Sinus-Signals (blau). Abtastfrequenzen, die mindestens der doppelten Frequenz des Sinus-Signals entsprechen (grün), sind ausreichend, um den Verlauf des Signals hinreichend gut widerzuspiegeln. Kleinere Abtastfrequenzen (rot) können dies nicht mehr gewährleisten.

häufig nicht gegeben ist. Probleme sind u. a. eine unvollständige Maturierung im Falle von fluoreszierenden Proteinen oder falschen Rahmenbedingungen (z. B. pH-Wert, Puffersystem oder Temperatur). Nähere Informationen zu fluoreszierenden Farbstoffen befinden sich in Kapitel 2.3.

2.2.5. Dekonvolution

Die Auflösung und der Kontrast digitaler Bilder kann nachträglich durch den geschickten Einsatz von digitalen Bildbearbeitungstechniken verbessert werden. Zu diesen mittlerweile zahlreichen Techniken zählt die sogenannte „Dekonvolution“ [54, 55], die im Folgenden näher erläutert wird.

Um das Prinzip der Dekonvolution besser zu verstehen, muss man den Prozess der Bildentstehung genauer betrachten. Er beruht auf der Grundlage, dass das *Bild* der Probe durch das Mikroskop eine Faltung (Konvolution) aus der effektiven Punktspreizfunktion PSF_{Mikr} des Mikroskops und der *Probe* ist. Unter Einbezug von zusätzlichem *Rauschen* ergibt sich:

$$\text{Bild} = PSF_{\text{Mikr}} \circledast \text{Probe} + \text{Rauschen}. \quad (2.5)$$

Hierbei kann das Problem durch den Konvolutionsoperator \circledast als Multiplikation in den Frequenzraum übertragen werden. Unter der vereinfachten Annahme einer isotropen PSF_{Mikr} und vernachlässigbarem *Rauschen* lässt sich die ursprüngliche Probeninformation über die Relation der Fouriertransformationen aller beteiligten Funktionen darstellen:

$$\widehat{\text{Probe}} = \frac{\widehat{\text{Bild}}}{\widehat{PSF_{\text{Mikr}}}}. \quad (2.6)$$

In der Realität kann das *Rauschen* jedoch nicht einfach vernachlässigt werden. Hier können nun verschiedenste Nachbearbeitungsansätze in Erwägung gezogen werden, um die durch Konvolution veränderte Originalinformation bzw. Struktur aus den Bildern zurückzugewinnen. Einer dieser Ansätze ist der auf einem iterativen Verfahren basierende Richardson-Lucy-Algorithmus [56, 57]. Es werden insgesamt zwei Eingaben benötigt: die Mikroskopaufnahme der Struktur und eine möglichst gut abgeschätzte PSF des Mikroskops. Der Algorithmus versucht nun das Ausgangsbild abzuschätzen, das nach Konvolution mit der PSF zu der eingegebenen Mikroskopaufnahme führt. Die Abschätzung wird mit der PSF des Mikroskops gefaltet und mit dem Eingangsbild verglichen. Anhand des Vergleichs wird daraufhin eine neue Abschätzung erstellt. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt bis ein zufriedenstellendes Ergebnis erreicht wird [58].

Abbildung 2.10 zeigt an einem einfachen Beispiel, hier einer 2D-Aufnahme einer Ringstruktur, wie die Originalstruktur mit der Kenntnis der Mikroskop-PSF durch den Richardson-Lucy-Algorithmus rekonstruiert werden kann. Der Richardson-Lucy-Algorithmus geht standardmäßig von einem signalabhängigen Poisson-Rauschen aus [59]. Die Originalstruktur des Rings kann für das Bild, welches mit Poisson-Rauschen überlagert wurde, daher besser rekonstruiert werden als im Falle von zufälligem Rauschen. Das Hintergrundrauschen, das in realen Messaufnahmen immer vorhanden ist (Kapitel 2.4.3), kann Dekonvolutionsalgorithmen die Arbeit erschweren, wodurch die Ursprungsinformation der Probe nur bedingt rekonstruierbar ist.

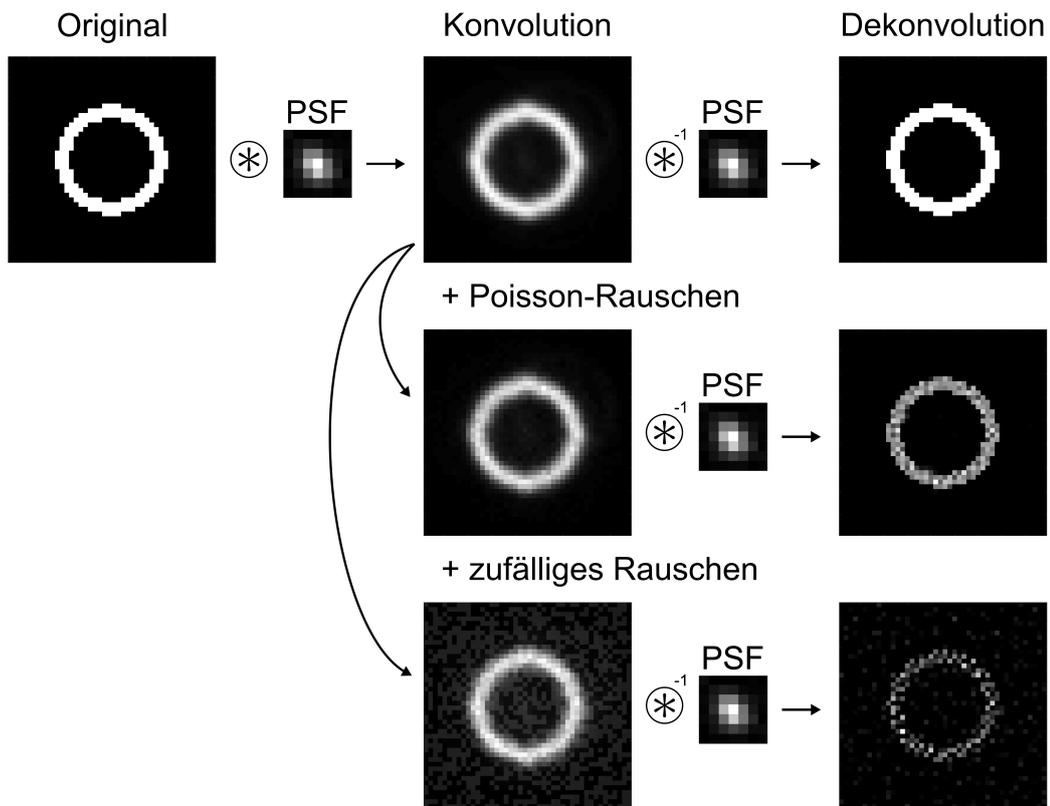


Abbildung 2.10: Veranschaulichung der Konvolution und Dekonvolution von 2D-Bildern anhand des Richardson-Lucy-Algorithmus [56, 57] durch Simulation via MATLAB-Skript. Das Originalbild wird mit der PSF gefaltet (Konvolution) und anschließend wieder entfaltet (Dekonvolution). Wird das Originalbild jedoch mit Poisson-Rauschen überlagert, so kann das Originalbild nach der Dekonvolution nicht mehr vollständig rekonstruiert werden. Zufälliges Rauschen verschlimmert das Ergebnis. (Abbildungen wurden mit den MATLAB-Befehlen (MathWorks, Natick, Massachusetts) `conv2()` und `deconvlucy()` erstellt.)

2.3. Fluoreszenzmikroskopie I: Fluoreszierende Farbstoffe und ihre Fluoreszenz

Einfache Lichtmikroskope, bestehend aus einem optischen System aus Linsen, sind ausreichend, um Bakterien oder rote Blutkörperchen zu beobachten [49]. Möchte man jedoch gezielt molekulspezifische Substrukturen in lebenden biologischen Proben betrachten, d. h. im Nanometerbereich, so wird oftmals auf die Fluoreszenzmikroskopie zurückgegriffen. Sie ermöglicht im Vergleich zur konventionellen Lichtmikroskopie durch den gezielten Einsatz fluoreszierender Marker, sogenannter Fluorophore, einen besseren Kontrast und Spezifität [60]. Die Farbe dieser Fluorophore wird durch ihr

Farbzentrum, den Chromophor, definiert. Dieser besteht aus einem delokalisierten Elektronensystem und kann nach Anregung durch Licht mit geeigneter Wellenlänge Fluoreszenzphotonen emittieren [61]. Die spontane Abstrahlung von Licht wird im Allgemeinen als Lumineszenz bezeichnet [62]. Sie wird erzeugt durch elektronische Übergänge von einem angeregten Zustand in den Grundzustand. Die Fluoreszenz ist im Grunde eine Art der Lumineszenz und wird in der Fluoreszenzmikroskopie ausgenutzt, um Objekte im Mikrometer- oder Nanometerbereich für die Mikroskopie zugänglich zu machen. Im Folgenden wird zuerst auf die besonderen Eigenschaften sowie auf die Vor- und Nachteile einiger Fluorophore eingegangen. Danach wird der physikalischen Hintergrund zur Anregung und zur Emission fluoreszierender Teilchen näher erläutert.

2.3.1. Fluoreszierende Farbstoffe

2.3.1.1. Organische Farbstoffe

Um die zu untersuchende Nanostruktur nicht zu verfälschen und im Falle von Kinetikmessungen die Bewegungen nicht zu hindern, besitzen die geeigneten Fluoreszenzmarker eine relativ geringe Größe, d. h. im Bereich weniger Nanometer. Organische Farbstoffe können u. a. über Antikörperbindung, Biotinylierung, den Einbau unnatürlicher Aminosäuren und Affinitäts-Tags an die Zielproteine konjugiert werden [63]. Problematisch ist hierbei oftmals die geringe Effizienz, unspezifisches Binden der organischen Farbstoffe oder die Notwendigkeit der Fixierung von lebenden Proben, um u. a. Antikörper in Zellen einzuschleusen. Ein bekanntes Beispiel für einen organischen Farbstoff, Alexa488 [64] (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts), ist in Abbildung 2.11 (a) abgebildet.

Alexa488 kann durch über eine geeignete funktionelle Gruppe in der Molekülstruktur (Abbildung 2.11 (a) Position R) an ein Protein gebunden werden. Handelt es sich bei der funktionellen Gruppe um eine Maleimidgruppe, so kann Alexa488-Maleimid über die Thiolgruppe eines Proteins an dieses binden.

2.3.1.2. Fluoreszierenden Proteine

Neben den organischen Farbstoffen können Zielproteine auch mit fluoreszierenden Proteinen (FPs) markiert werden. Näheres zur Expression von solchen Fusionskonstrukten in eukaryotischen Zellen wird in Kapitel 3.1.1 erläutert. Ein sehr bekannter Vertreter der fluoreszierenden Proteine ist das grün fluoreszierende Protein GFP. Im

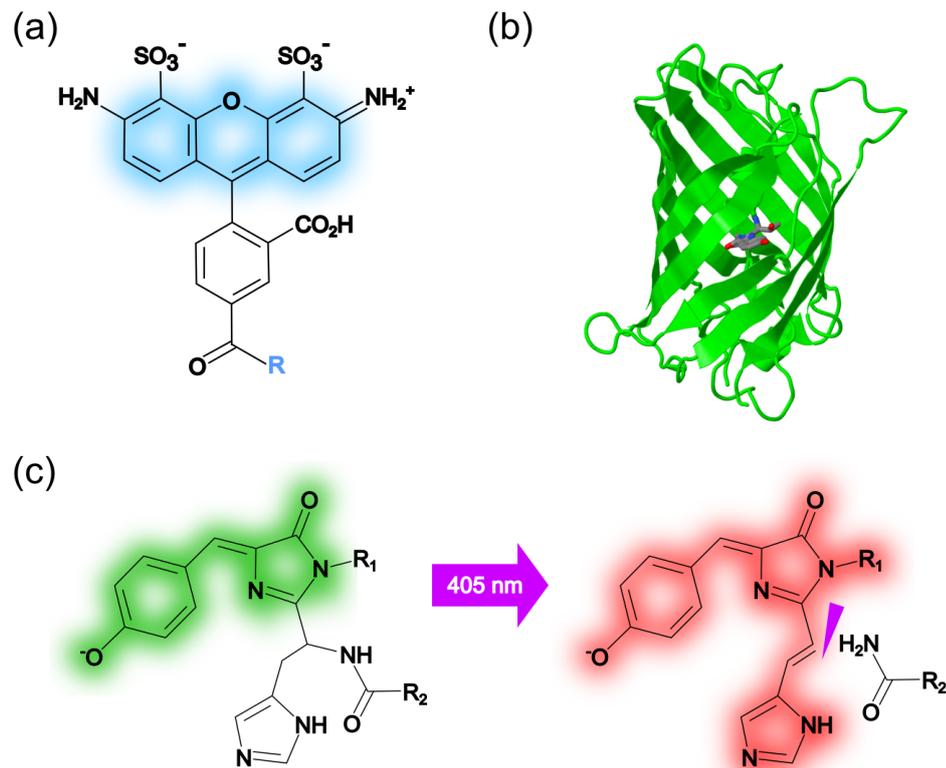


Abbildung 2.11: Beispiele für fluoreszierende Marker: (a) Organischer Farbstoff Alexa488 [64]. Dieser kann über eine geeignete funktionelle Gruppe an der Position R (blau) an eine biologische Struktur mit, u. a. an ein Protein, konjugiert werden. (b) Proteinstruktur von eGFP (erstellt via Jmol [65]). (c) Chromophorstruktur des photokonvertierbaren, fluoreszierenden Proteins EosFP [66], dessen Varianten oft zur SMLM eingesetzt werden (Kapitel 2.4.3): Mit 405 nm-Anregung kann der Chromophor von EosFP von seiner grünen ($\lambda_{\text{Emission}} = 516 \text{ nm}$) auf seine rote Form ($\lambda_{\text{Emission}} = 581 \text{ nm}$) geschaltet werden. Dabei wird das Peptidrückgrat zwischen C_{α} und N_{α} des Histidins auf Position 69 gebrochen, wodurch ein größeres delocalisiertes Elektronensystem entsteht und sich folglich die Emissionswellenlänge verändert.

Jahr 1962 wurde es als erstes, natürlich vorkommendes, fluoreszierendes Protein von Osamu Shimomura in der Quallenart *Aequorea victoria* entdeckt [11]. Diese Entdeckung war bahnbrechend für die Fluoreszenzmikroskopie und wurde nach der Weiterentwicklung von GFP zum Werkzeug für die Biowissenschaften im Jahre 2008 schließlich mit dem Nobelpreis für Chemie honoriert [67]. Die Proteinstruktur inklusive Chromophorposition von eGFP (engl. *enhanced GFP* [68, 69]), einer bekannten GFP-Variante, ist in Abbildung 2.11 (b) dargestellt. Der Chromophor befindet sich im Inneren der β -Fasstruktur und wird von dieser von der Umgebung bzw. dem Einfluss des um-

gebenden Mediums geschützt. Seit der Entdeckung von GFP und anderen fluoreszierenden Proteinen aus unterschiedlichen Organismen wurden Modifizierungen dieser Proteine vorgenommen, um ihre photophysikalischen Eigenschaften zu ändern und zu verbessern. Heutzutage steht eine Palette an fluoreszierenden Proteinen zur Verfügung, die sich über den gesamten sichtbaren Farbbereich erstreckt und somit Fluoreszenzexperimente mit mehreren Farbkanälen ermöglicht.

Besonders für die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (Kapitel 2.4.3) sind Fluorophore mit speziellen Eigenschaften vonnöten. Hohe Auflösungen werden hierbei durch die lichtinduzierte Schaltbarkeit oder Aktivierbarkeit des Chromophors erreicht. Für SMLM werden oft Varianten des photokonvertierbaren, fluoreszierenden Proteins EosFP [66] eingesetzt (Abbildung 2.11 (c)). Da SMLM-Experimente auf Langzeitaufnahmen basieren und sich die Lokalisierung der Fluorophore dabei durch das Sammeln vieler Photonen verbessert (Kapitel 2.4.3), sollten die fluoreszierenden Marker möglichst photostabil sein³. Photobleichung der Fluorophore kann aufgrund von Interkombinationen bzw. Übergängen vom Singulett- zum Triplettzustand (Abschnitt 2.3.5) oder photochemischer Veränderung [61] stattfinden.

2.3.1.3. Nanopartikel

Eine Alternative zu organischen Fluorophoren und Fluoreszenzproteinen bieten sogenannte Nanopartikel aus anorganischem Material, z. B. Goldnanopartikel. Ihr Zustandssystem und ihre Emissionswellenlänge hängen stark von ihrer Größe ab, weshalb sie leicht den individuellen Ansprüchen anpassbar sind. Ein großer Nachteil dieser anorganischen Fluoreszenzmarker ist allerdings ihre Unlöslichkeit in Wasser. Deshalb müssen sie nach der Synthetisierung erst mit einer biokompatiblen Schicht aus z. B. Polymeren ummantelt werden, um in biologische Proben eingebunden werden zu können [61].

2.3.2. Fluorophore und ihre Fluoreszenz

Fluoreszierende Farbstoffe besitzen ein Farbzentrum, einen sogenannten Chromophor, der nach Anregung durch Licht passender Wellenlänge Fluoreszenzphotonen emittieren kann [61]. Die Anregung kann nur stattfinden, wenn die Photonenenergie des Anregungslichts der Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand und

³ Photostabilität ist im Allgemeinen für alle Fluorophore von Vorteil.

dem angeregten Zustand des Farbstoffes entspricht und die Übergänge quantenmechanisch erlaubt sind [62].

Bei organischen Farbstoffen ist der Chromophor aus chemischer Sichtweise meist ein System aus konjugierten Doppelbindungen, das, je nach Länge bzw. Größe des delokalisierten Elektronensystems, auf unterschiedliche Anregungswellenlängen bzw. -energien anspricht und Fluoreszenz erzeugt. Klassisch gesehen besitzt das Farbstoffmolekül im Ausgangszustand eine bestimmte Ladungsverteilung und kann als Dipol betrachtet werden. Durch die Absorption von Licht und somit Energie ändert dieser Dipol seine Elektronenkonfiguration und die Elektronen in den Orbitalen nehmen Energie auf, wodurch sie beschleunigt bzw. abgebremst werden. Die Beschleunigung bzw. Abbremsung von Ladung führt zur Aussendung von Licht, wobei die Stärke der Dipolemission von der Größe des Dipolmoments abhängt. Im Folgenden werden physikalische Modelle zur Beschreibung des Anregungs- und Emissionsprozesses eines Farbstoffes vorgestellt.

2.3.3. Zwei-Zustands-Modell

Zur besseren quantitativen Beschreibung wird für den Prozess der Absorption und Emission von Licht nun ein semiklassischer Ansatz herangezogen. Das Molekül, das durch Absorption von Licht angeregt werden kann, wird quantenmechanisch als Zwei-Zustands-System mit den Wellenfunktionen Ψ_1 für den Grund- und Ψ_2 für den angeregten Zustand und dem zeitunabhängigen Hamilton-Operator H_0 betrachtet:

$$\begin{aligned}\langle \Psi_1 | H_0 | \Psi_1 \rangle &= E_1 \\ \langle \Psi_2 | H_0 | \Psi_2 \rangle &= E_2.\end{aligned}\tag{2.7}$$

E_1 und E_2 repräsentieren die Eigenenergien für den jeweiligen Zustand. Wird auf das System eingewirkt, z. B. durch die Absorption eines Photons, lässt sich der neue Hamilton-Operator H mit einem zusätzlichen zeitabhängigen Störungsterm $V(t)$ zusammenfassen zu:

$$H = H_0 + V(t).\tag{2.8}$$

Der Störungsterm für die Wechselwirkung zwischen dem elektrischen Feld \vec{E} des einfallenden Photons und dem elektrischen Dipolmoment $\vec{\mu}$ mit dem Ortsoperator \vec{r} für elektrische Ladungen, in diesem Fall Elektronen, kann beschrieben werden durch:

$$V(t) = -\vec{\mu} \cdot \vec{E} = -e \cdot \vec{r} \cdot \vec{E}_0 \cdot e^{-i\omega \cdot t}.\tag{2.9}$$

Unter Einbezug der Regeln der quantenmechanischen Störungsrechnung kann die Lösung als Linearkombination der Lösungen beider Zustände formuliert werden:

$$\Psi(t) = C_1(t) \cdot \Psi_1(t) + C_2(t) \cdot \Psi_2(t). \quad (2.10)$$

Die Koeffizienten $C_1(t)$ und $C_2(t)$ sind hierbei zeitabhängig. Das Einsetzen des Ansatzes in die zeitabhängige Schrödingergleichung,

$$(H_0 + V(t)) \cdot \Psi(t) = i \cdot \hbar \cdot \frac{\partial}{\partial t} \Psi(t), \quad (2.11)$$

ergibt folgenden Ausdruck:

$$(H_0 + V(t)) \cdot \Psi(t) = i \cdot \hbar \cdot \frac{\partial}{\partial t} \left(C_1(t) \cdot \Psi_1 \cdot e^{-i \cdot E_1 \cdot t / \hbar} + C_2(t) \cdot \Psi_2 \cdot e^{-i \cdot E_2 \cdot t / \hbar} \right). \quad (2.12)$$

Diese Gleichung lässt sich umformen zu:

$$V(t) \cdot \Psi(t) = i \cdot \hbar \cdot \left(\Psi_1 \cdot e^{-i \cdot E_1 \cdot t / \hbar} \cdot \frac{\partial}{\partial t} C_1(t) + \Psi_2 \cdot e^{-i \cdot E_2 \cdot t / \hbar} \cdot \frac{\partial}{\partial t} C_2(t) \right). \quad (2.13)$$

Werden nun beide Seiten von links mit Ψ_2^* multipliziert und anschließend über den Ort integriert, so folgt daraus:

$$i \cdot \hbar \cdot \frac{\partial}{\partial t} C_2 = \langle \Psi_2 | V | \Psi_1 \rangle \cdot C_1 \cdot e^{i \cdot (E_2 - E_1) \cdot t / \hbar} + \langle \Psi_2 | V | \Psi_2 \rangle \cdot C_2. \quad (2.14)$$

Dies lässt sich mit den Anfangsbedingungen $C_1 = 1$ und $C_2 = 0$ vereinfachen zu:

$$i \cdot \hbar \cdot \frac{\partial}{\partial t} C_2 = \langle \Psi_2 | V | \Psi_1 \rangle \cdot e^{i \cdot (E_2 - E_1) \cdot t / \hbar}. \quad (2.15)$$

Die Integration über die Zeit liefert mit der Energiedifferenz $\Delta E_{21} = E_2 - E_1$:

$$C_2(t) = \frac{-i}{\hbar} \cdot \langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle \cdot \vec{E}_0 \cdot \int_0^t e^{i \cdot (\Delta E_{21} - \hbar \cdot \omega) \cdot t' / \hbar} dt' \quad (2.16)$$

$$= \langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle \cdot \vec{E}_0 \cdot \frac{1 - e^{i \cdot (\Delta E_{21} - \hbar \cdot \omega) \cdot t / \hbar}}{\Delta E_{21} - \hbar \cdot \omega}. \quad (2.17)$$

Das Betragsquadrat von $C_2(t)$ ergibt sich zu:

$$|C_2|^2 = \left| \langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle \cdot \vec{E}_0 \right|^2 \cdot \left(\frac{2 \cdot \sin(\Delta E_{21} - \hbar \cdot \omega) \cdot t / \hbar}{\Delta E_{21} - \hbar \cdot \omega} \right)^2, \quad (2.18)$$

und wird maximal für $\Delta E_{21} \rightarrow \hbar \cdot \omega$, d. h. wenn die Energie des absorbierten Photons der Energiedifferenz beider Energieniveaus entspricht. Der Ausdruck $\langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle$ steht

für das sogenannte Übergangsmatrixelement. Die Wahrscheinlichkeit für die Absorption kann schließlich definiert werden über:

$$\frac{d}{dt}P_2 = \frac{d}{dt} \int_{-\infty}^{\infty} |C_2|^2 \cdot d\omega = \left| \langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle \cdot \vec{E}_0 \right|^2 \cdot \frac{2 \cdot \pi}{\hbar^2}, \quad (2.19)$$

Einstein verwendet eine andere Herangehensweise, um dieses Zweizustandssystem zu beschreiben [70]. Er ordnet in seinem Zwei-Zustands-Modell den Energieniveaus E_1 und E_2 die entsprechenden Besetzungszahlen N_1 und N_2 zu (Abbildung 2.12). Die zwischen den zwei Zuständen des Systems ist durch das Plancksche Wirkungsquantum h und die Frequenz ν definiert als:

$$\Delta E_{21} = E_2 - E_1 = h \cdot \nu > 0. \quad (2.20)$$

Das Molekül kann Strahlung der Frequenz ν nur absorbieren, wenn Gleichung 2.20 erfüllt ist. Diesen Vorgang nennt man induzierte Absorption, gekennzeichnet durch den Einsteinkoeffizienten B_{12} . Die Änderung der Population des Zustandes niedriger Energie durch Absorption eines Photons ist sowohl abhängig von seiner Besetzungszahl als auch von der Photonenzahl und der Photonenenergie, d. h. der spektralen Strahldichte $u(\nu)$:

$$\frac{d}{dt}N_1 = B_{12} \cdot N_1 \cdot u(\nu). \quad (2.21)$$

Ebenso können Elektronen im Zustand E_2 durch ein Strahlungsfeld zur stimulierten Emission veranlasst werden, d. h., sie kehren unter Emission eines Photons nach E_1 zurück. Die Populationsänderung des Zustands höherer Energie durch stimulierte Emission ist durch seine Besetzungszahl, den Einsteinkoeffizienten für stimulierte Emission

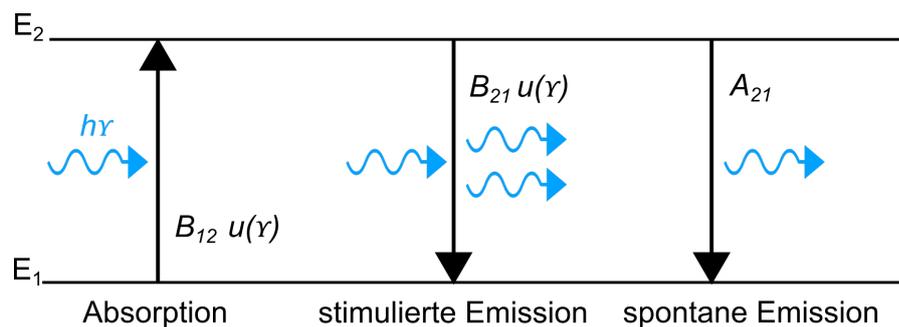


Abbildung 2.12: Zwei-Zustands-Modell nach Einstein und die zugehörigen Einsteinkoeffizienten B_{12} für induzierte Absorption, B_{21} für stimulierte Emission und A_{21} für spontane Emission. $u(\nu)$ steht für die spektrale Strahldichte.

B_{21} und die spektrale Strahldichte gegeben:

$$\frac{d}{dt}N_2^{\text{stim}} = B_{21} \cdot N_2 \cdot u(\nu). \quad (2.22)$$

Ein Molekül bzw. Atom im angeregten Zustand kann seine Anregungsenergie auch spontan durch die spontane Emission eines Photons abgeben. Die zugehörige Wahrscheinlichkeit ist in diesem Fall unabhängig von der spektralen Strahldichte und lediglich über die Besetzungszahl des Zustands höherer Energie und dem Einsteinkoeffizienten für spontane Emission A_{21} definiert:

$$\frac{d}{dt}N_2^{\text{spon}} = A_{21} \cdot N_2. \quad (2.23)$$

Betrachtet man die Änderungen der Besetzungszahlen, so folgt:

$$\frac{dN_1}{dt} = -\frac{dN_2}{dt} = -N_1 \cdot B_{12} \cdot u(\nu) + N_2 \cdot B_{21} \cdot u(\nu) + N_2 \cdot A_{21}. \quad (2.24)$$

Im Falle des thermodynamischen Gleichgewichts $\frac{dN_1}{dt} = -\frac{dN_2}{dt} = 0$ ergeben die Änderungen der Besetzungszahlen null, woraus folgender Zusammenhang entsteht:

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{B_{12} \cdot u(\nu)}{A_{21} + B_{21} \cdot u(\nu)}. \quad (2.25)$$

Aus der thermischen Besetzung der Energieniveaus nach der Boltzmann-Statistik lässt sich dieser Ausdruck umschreiben zu:

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{g_2}{g_1} \cdot e^{-\frac{\Delta E_{21}}{k_B T}}, \quad (2.26)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur und g_i der Entartungsgrad der Energie bzw. des jeweiligen Zustandes ist. Das Umstellen und Auflösen der Formel nach der spektralen Strahldichte ergibt:

$$u(\nu) = \frac{A_{21}}{B_{12} \cdot \frac{g_1}{g_2} \cdot e^{-\Delta E_{21}/(k_B T)} - B_{21}}. \quad (2.27)$$

Im Grenzfall für sehr große Temperaturen $T \rightarrow \infty$ geht die spektrale Strahldichte ebenfalls gegen unendlich $u(\nu) \rightarrow \infty$ und die Besetzungszahlen N_1 und N_2 gleichen sich an. Im Folgenden wird die Entartung der Energieniveaus nicht berücksichtigt und zur Vereinfachung $g_1 = g_2 = 1$ gesetzt. Aus Gleichung 2.25 folgt schließlich:

$$B_{12} = B_{21}. \quad (2.28)$$

Mit der Näherung für sehr kleine Frequenzen lässt sich die Exponentialfunktion umschreiben zu:

$$e^{\Delta E_{21}/(k_B \cdot T)} = 1 + \frac{\Delta E_{21}}{k_B \cdot T}. \quad (2.29)$$

Eingesetzt in Gleichung 2.27 folgt mit $\Delta E_{21} = h \cdot \nu$:

$$u(\nu) = \frac{A_{21} \cdot k_B \cdot T}{B_{12} \cdot h \cdot \nu}. \quad (2.30)$$

Der Vergleich der Koeffizienten mit dem Rayleigh-Jeans-Gesetz [71] liefert schließlich:

$$\frac{A_{21}}{B_{12}} = \frac{8 \cdot \pi \cdot h \cdot \nu^3}{c^3}. \quad (2.31)$$

Hieraus lässt sich die Plancksche Strahlungsformel [72] ableiten:

$$u(\nu) = \frac{8 \cdot \pi \cdot h \cdot \nu^3}{c^3 \cdot (e^{h \cdot \nu / k_B \cdot T} - 1)}, \quad (2.32)$$

wobei c für die Lichtgeschwindigkeit steht. Betrachtet man nun wieder den Fall der induzierten Absorption, so ergibt sich aus der Beziehung

$$\frac{d}{dt} P_2 = B_{12} \cdot u(\nu) \quad (2.33)$$

mit dem Ausdruck für die Strahlungsdichte

$$u(\nu) = \frac{|E_0|^2}{8 \cdot \pi} \quad (2.34)$$

für den Einsteinkoeffizienten der induzierten Absorption:

$$B_{12} = |\langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle| \cdot \frac{16 \cdot \pi^2}{\hbar^2}. \quad (2.35)$$

Die induzierte Lichtabsorption hängt somit von der Strahlungsdichte $u(\nu)$ und der sogenannten Dipolstärke D_{12} ab mit

$$D_{12} = |\langle \Psi_2 | \vec{\mu} | \Psi_1 \rangle|^2. \quad (2.36)$$

2.3.4. Beispiele einfacher delokalierter Elektronensysteme

2.3.4.1. Elektron in einem unendlichen Potentialtopf

Fluoreszierende Moleküle besitzen alle eine Gemeinsamkeit: sie weisen ein delokalisiertes Elektronensystem auf. Dieses basiert meist auf einem System bestehend aus

alternierenden Einfach- und Doppelbindungen, in welchem sich die sogenannten π -Elektronen frei bewegen können. Das delokalisierte Elektronensystem einer Kette aus alternierenden Einfach- und Doppelbindungen, kann stark vereinfacht als Potentialtopf mit Länge $L = (2 \cdot N_{\text{DB}} + 1) \cdot d_{\text{CC}}$ betrachtet werden. Hierbei ist d_{CC} der Abstand zwischen den Kohlenstoffatomen und N_{DB} die Anzahl der Doppelbindungen. Das Potential, in dem ein Elektron in Abhängigkeit vom Ort x gefangen ist, lässt sich dann definieren als:

$$V(x) = \begin{cases} 0 & 0 \leq x \leq L \\ \infty & x < 0 \text{ und } x > L \end{cases}. \quad (2.37)$$

Die stationäre Schrödingergleichung lässt sich in diesem Fall wie folgt schreiben:

$$-\frac{\hbar^2}{2 \cdot m} \cdot \frac{d^2}{dx^2} \Psi(x) + (V(x) - E) \cdot \Psi(x) = 0, \quad (2.38)$$

wobei m die Elektronenmasse, E die Eigenenergie eines Zustands und $h = \hbar \cdot 2 \cdot \pi$ das Plancksche Wirkungsquantum ist. Da die Wellenfunktion überall stetig sein muss, verschwindet die Wellenfunktion an den Boxgrenzen:

$$\Psi(0) = 0 \text{ und } \Psi(L) = 0. \quad (2.39)$$

Im Inneren der Box folgt für die Gleichung 2.38:

$$-\frac{\hbar^2}{2 \cdot m} \cdot \frac{d^2}{dx^2} \Psi(x) = E \cdot \Psi(x). \quad (2.40)$$

Diese Differentialgleichung kann umgeformt werden zu

$$\Psi''(x) + k^2 \cdot \Psi(x) = 0 \quad (2.41)$$

und besitzt mit $k = \sqrt{2 \cdot m \cdot E / \hbar^2}$ und unter Einbezug der Randbedingung 2.39 die Lösung für die Wellenfunktion:

$$\Psi(x) = \sqrt{\frac{2}{(2 \cdot N_{\text{DB}} + 1) \cdot d_{\text{CC}}}} \cdot \sin\left(\frac{\pi \cdot n \cdot x}{(2 \cdot N_{\text{DB}} + 1) \cdot d_{\text{CC}}}\right). \quad (2.42)$$

Hierbei entspricht n der Quantenzahl des Zustandes. Das Einsetzen der Wellenfunktion in Gleichung 2.40 führt schließlich zu den erlaubten Energiewerten:

$$E = \frac{n^2 \cdot \hbar^2}{8 \cdot m \cdot (2 \cdot N_{\text{DB}} + 1)^2 \cdot d_{\text{CC}}^2}. \quad (2.43)$$

2.3.4.2. Elektron auf einem Ring

Viele fluoreszierende Farbstoffe besitzen jedoch komplexere π -Elektronensysteme, die u. a. aus aromatischen Ringen aufgebaut sind. Für diesen Fall kann das Modell eines Teilchens auf einem Ring mit Radius R herangezogen werden. Das Teilchen soll sich nur auf dem Ring frei bewegen können:

$$V(\phi, r) = \begin{cases} 0 & r = R \\ \infty & \text{sonst} \end{cases}. \quad (2.44)$$

Bei einem konstanten Radius ergibt sich für die Schrödingergleichung für den relevanten Bereich auf dem Ring mit ϕ als Winkel für die Zylinderkoordinaten:

$$-\frac{\hbar^2}{2 \cdot m \cdot R^2} \cdot \frac{d^2}{d\phi^2} \Psi(\phi) = E \cdot \Psi(\phi). \quad (2.45)$$

Diese Differentialgleichung kann umgeformt werden zu:

$$\Psi''(\phi) + k^2 \cdot \Psi(\phi) = 0 \quad (2.46)$$

mit $k = \sqrt{2 \cdot m \cdot E} \cdot R / \hbar$. Die normierte Lösung der Wellenfunktion lässt sich schreiben als:

$$\Psi(\phi) = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot e^{i \cdot k \cdot \phi}. \quad (2.47)$$

Die Randbedingung $\Psi(\phi) = \Psi(\phi + 2 \cdot \pi)$ fordert, dass k ganzzahlig sein muss $k \in \mathbb{Z}$, damit die Wellenfunktion nach einem Umlauf auf dem Ring wieder denselben Funktion entspricht. Für die Energien des Teilchens auf dem Ring erhält man:

$$E = \frac{k^2 \cdot \hbar^2}{2 \cdot m \cdot R^2}. \quad (2.48)$$

Mit diesem einfachen Modell kann die Absorptionswellenlänge für einige Fluorophore abgeschätzt werden. Beispielsweise besitzt der organische Farbstoff Alexa488 (Abbildung 2.11 (a)) 14 π -Elektronen in seinem Chromophorsystem. Das delokalisierte Elektronensystem dieses Fluorophors kann stark vereinfacht als Kreis mit einem Radius $R = 3,12 \text{ \AA}$ betrachtet werden. Hierbei wurde von einer mittleren Länge einer C-C-Bindung von 140 pm [73] ausgegangen. Da sich nach dem Pauli-Prinzip auf einem Energieniveau zwei Elektronen mit entgegengesetztem Spin befinden können, gibt es insgesamt 4 besetzte Energieniveaus, wovon alle bis auf das unterste Niveau ($k = 0$)

entartet sind. Zur Berechnung der Absorptionswellenlänge ist der Übergang von $k = 3$ zu $k = 4$ entscheidend:

$$\Delta E_{43} = \frac{\hbar^2}{2 \cdot m \cdot R^2} \cdot (4^2 - 3^2) = 4,4 \times 10^{-19} \text{J}. \quad (2.49)$$

Dies entspricht einer Absorptionswellenlänge von etwa 450 nm und liegt für das stark vereinfachte Modell doch sehr nahe am für Alexa488 bekannten Absorptionsmaximum von 499 nm [74] mit einer Abweichung von etwa 10 %. Somit kann das Modell für ein Teilchen auf einem Ring durchaus Aufschluss über die zu erwartende Absorptionswellenlänge geben und dient auf jeden Fall als Maß zum Vergleich von Chromophorsystemen: Je länger bzw. größer das delokalisierte Elektronensystem ist, desto mehr verschiebt sich die Absorptionswellenlänge in den energieärmeren, roten Wellenlängenbereich.

2.3.5. Jablonski-Termschema

Bisher wurde zur Vereinfachung lediglich ein Zwei-Zustands-System betrachtet, in der Realität sieht das Energieniveausystem eines Moleküls jedoch weitaus komplexer aus und kann anhand eines Jablonski-Diagramms dargestellt werden [7, 75, 76] (Abbildung 2.13). Bei der Absorption von Lichtquanten geeigneter Energie werden die Elektronen im delokalisierten Elektronensystem des Moleküls verschoben und in ein höheres Energieniveau versetzt, das System wird also vom elektronischen Grundzustand, dem Singulett-Zustand S_0 , in einen der angeregten Singulett-Zustände S_1 oder S_2 angehoben.

Der Vorgang der Absorption findet im Vergleich zu den darauffolgenden Prozessen sehr schnell statt (1×10^{-15} s) und endet meist auf höheren Schwingungszuständen v_i ($i > 0$, $i \in \mathbb{Z}_{<0}$), auch vibronische Zustände genannt. Aus diesen relaxiert das System strahlungslos (vibronische Relaxation, 1×10^{-10} - 1×10^{-12} s) auf den niedrigsten Schwingungszustand v_0 des Zustands S_1 bis es schließlich, z. B. mit der Emission eines Photons (Fluoreszenz, 1×10^{-7} - 1×10^{-9} s), in den Grundzustand fällt. Für einen Anregungszustand existieren allerdings noch andere Übergangsmöglichkeiten zwischen verschiedenen Energieniveaus. Im Prozess der inneren Umwandlung (IU) wird die Zustandsenergie über Stöße mit äußeren Molekülen oder über vibronische Relaxation reduziert. Bei der Interkombination (IK) findet ein strahlungsloser Übergang von einem angeregten elektronischen Zustand in einen anderen Anregungszustand mit veränderter Multiplizität statt, z. B. von einem angeregten Singulett- in einen angeregten Triplettzustand. Diese Übergänge sind quantenmechanisch verboten und finden daher selten statt, da die Spinnmultiplizität nicht erhalten bleibt (Auswahlregeln). Der

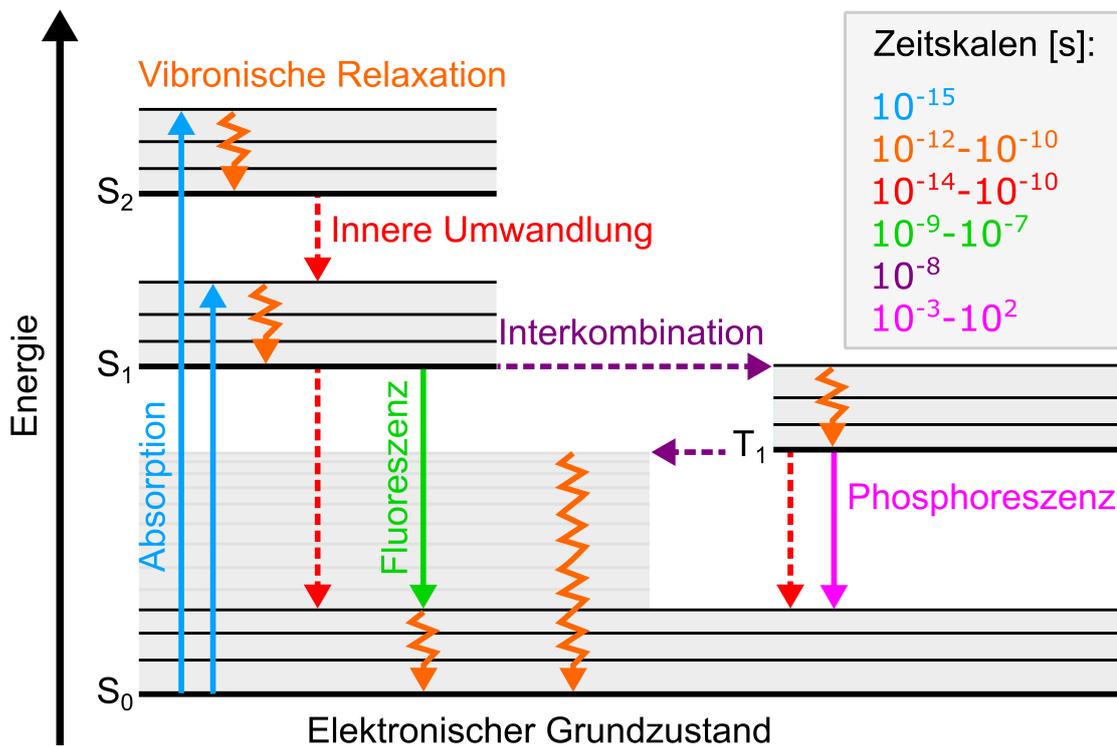


Abbildung 2.13: Jablonski-Termschema zur Veranschaulichung der photophysikalischen Vorgänge im Chromophor eines Fluorophors. Zeitskalen aus [77] übernommen.

Tripletzustand hat wiederum die Möglichkeit, über Interkombination und vibronische Relaxation in den Grundzustand überzugehen. Ein weiterer möglicher Effekt ist die Fluoreszenzauslöschung (Q) (engl. *quenching*), bei der es aufgrund von Kollisionen oder Komplexbildungen mit einem zur Fluoreszenzauslöschung fähigen Molekül (engl. *quencher*) zu einem Energieverlust kommt. All diese Prozesse sind nichtstrahlend und stehen in direkter Konkurrenz mit der Fluoreszenz (F), wodurch nicht nur die Lebensdauer τ des angeregten Zustands, sondern auch die Energie bzw. die Frequenz des emittierten Photons verkürzt werden.

Die Lebensdauer des angeregten Zustands S_1 vor der Rückrelaxation in den Grundzustand S_0 wird auch als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und ist definiert über:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IU} + k_{IK} + k_Q(Q)} \quad (2.50)$$

In den Nenner geht die Summe der Ratenkoeffizienten k_X aller möglichen Übergangsprozesse X des angeregten Zustands (k_F, k_{IU}, k_{IK}, k_Q) ein. Die Fluoreszenzlebensdauer τ_F hängt sowohl von den radiativen als auch von den nichtstrahlenden Prozessen ab und

wird daher von der Umgebung und den möglichen Wechselwirkungen des Farbstoffs beeinflusst. Für die Quantenausbeute Φ_F , die das Verhältnis von absorbierten gegenüber emittierten Photonen angibt, ergibt sich unter Einbezug der für die Fluoreszenz zur Verfügung stehenden Zeit schließlich:

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IU} + k_{IK} + k_Q(Q)} = k_F \cdot \tau. \quad (2.51)$$

Mit steigender Anregungsintensität werden zunehmend mehr Übergänge in angeregte Zustände S_n und T_n möglich. Ebenfalls steigt dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass der Fluorophor seine Fähigkeit zur Fluoreszenz gänzlich verliert und photobleicht, d. h., er wird photochemisch verändert, u. a. bis hin zur Schädigung des Chromophors. Die Wahrscheinlichkeit der Photobleichung ist durch die für die Photobleichung spezifische Quantenausbeute Φ_{PB} gegeben. Sie gibt die mittlere Anzahl der Photonen an, die vor dem Eintritt der Photobleichung absorbiert werden müssen, und kann bei moderaten Laserintensitäten und einer wohldefinierten chemischen Umgebung für einen Fluorophor als konstant betrachtet werden [7].

2.3.6. Stokes-Verschiebung

Wie zuvor erwähnt, kann der Chromophor eines Farbstoffes nach Anregung einen Teil der absorbierten Energie durch strahlungslose Prozesse wie vibronische Übergänge und durch die Wechselwirkung mit dem umgebenden Medium verlieren. Dadurch besitzt das emittierte Photon im Vergleich zum absorbierten Photon meist eine kleinere Energie bzw. eine größere Wellenlänge und ist somit rotverschoben. Diese energetische Differenz zwischen dem absorbierten und emittierten Photon wird auch als Stokes-Verschiebung bezeichnet, entdeckt im Jahr 1852 von dem namensgebenden britischen Wissenschaftler George Stokes [78].

Die Stokes-Verschiebung kann außerdem durch die Wechselwirkung des Chromophors mit dem umgebenden Lösungsmittel verstärkt werden. Dieses Phänomen lässt sich durch die unterschiedlichen Dipolmomente von Grundzustand und angeregtem Zustand erläutern. Bei Anregung des Chromophors ändert sich sein Dipolmoment, d. h. sein Elektronensystem, und unter Umständen auch die räumliche Struktur des Fluorophors. Handelt es sich um ein polares Lösungsmittel, so sind die Lösungsmittelmoleküle, die den Chromophor umgeben, unmittelbar nach der Anregung nicht mehr passend zu dessen Dipolmoment ausgerichtet. Aufgrund der relativ langen Lebensdauer des angeregten Zustands können sich die Lösungsmittelmoleküle an das

Dipolmoment anpassen, woraufhin der angeregte Zustand stabilisiert wird. Durch die Umorientierung der Moleküle geht ein Teil der Energie verloren und es stellt sich ein Zustand niedrigerer Energie ein. Beim Übergang des Fluorophors in seinen Grundzustand verändert sich sein Dipolmoment erneut. Die den Chromophor umgebenden Lösungsmittelmoleküle sind jedoch an das Dipolmoment des angeregten Zustands angepasst und müssen sich wieder umorientieren bis ein Energieminimum erreicht wird. Somit befindet sich der Fluorophor vorerst in einem energetisch höheren Zustand als der final erreichbare Grundzustand, in den der Fluorophor durch erneute Umorientierung der Lösungsmittelmoleküle übergehen kann.

2.3.7. Das Franck-Condon-Prinzip bei Absorption und Emission

Wie schon im Jablonski-Termschema aufgezeigt, gibt es nicht nur elektronische Zustände, sondern auch durch Molekülschwingungen hervorgerufene, weitaus feiner energetisch getrennte Zustände. Diese beruhen auf den chemischen Bindungen des Moleküls und werden je nach Schwingungsart als vibronische Zustände oder Rotationszustände bezeichnet. Angesichts der weitaus größeren Masse der Atomkerne im Vergleich zu den Elektronen schwingen sie um einen Faktor 10^4 langsamer als die Elektronen und können deshalb quasi als stationär angesehen werden [79]. Daher kann nach der Born-Oppenheimer-Näherung [80] die Gesamtwellenfunktion des Moleküls durch zwei voneinander unabhängige Wellenfunktionen für die sich bewegenden Elektronen $\varphi(\vec{r}, \vec{R})$ und die quasi ruhenden Kerne $\phi(\vec{R})$ ausgedrückt werden.

$$\Psi(\vec{r}, \vec{R}) = \varphi(\vec{r}, \vec{R}) \cdot \phi(\vec{R}), \quad (2.52)$$

wobei \vec{r} für den Ort des Elektrons und \vec{R} für den Ort des Atomkerns steht. Das Übergangsdipolmoment kann mit der Born-Oppenheimer-Näherung somit in zwei unabhängige Integrale aufgespalten werden:

$$M_{i \rightarrow f} = -e \cdot \int \varphi_f^*(\vec{r}) \cdot \vec{r} \cdot \varphi_i(\vec{r}) d^3\vec{r} \cdot \int \phi_f^*(\vec{R}) \cdot \phi_i(\vec{R}) \cdot d^3\vec{R}. \quad (2.53)$$

Das zweite Integral ist das Überlappungsintegral der Eigenfunktionen der Schwingungen und wird auch als Franck-Condon-Integral bezeichnet [79]. Es ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit eines Übergangs zwischen zwei Zuständen in Abhängigkeit von der Kernkoordinaten. Unter Berücksichtigung der Born-Oppenheimer-Näherung und der Tatsache, dass sich der Kernabstand nach elektronischer Anregung verändert, ist die Übergangswahrscheinlichkeit, d. h. der Überlapp der Eigenfunktionen der Schwingungen, beim Übergang von vibronischen Grundzuständen des S_0 in vibronisch

angeregte Zustände des S_1 am größten. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 2.14 näher dargestellt.

Anzumerken ist, dass die Form des Absorptionsspektrums mit zunehmender Anzahl möglicher Übergänge komplexer wird. Absorptionsspektren weisen infolge thermischer Effekte und der bisher nicht berücksichtigten Rotationszustände für Übergänge zwischen dem Grundzustand bei $v = 0$ und dem ersten angeregten Zustand keine diskreten Maxima auf, sondern sind verbreitert [81]. Meist wird das Absorptionsspektrum in der Literatur als Spiegelbild des Emissionsspektrums dargestellt. In der Realität kann das Absorptionsspektrum jedoch, je nach Art des Moleküls, von der Form des Emissionsspektrums abweichen [79]. In diesem Kontext gibt es ein weiteres molekülspezifisches Spektrum, das dem Absorptionsspektrum sehr ähnelt: Das Anregungsspektrum. Bei der experimentellen Bestimmung beider Spektrenarten werden Moleküle durch Einstrahlung von Licht mit definierter Wellenlänge angeregt. Abgerastert wird meist ein breites Anregungsspektrum. Der große Unterschied beider Messungen liegt allerdings in der Art und Weise, wie die Anregung bzw. Lichtaufnahme quantifiziert wird. Bei der Absorptionsspektroskopie wird, wie der Name schon sagt, das Absorp-

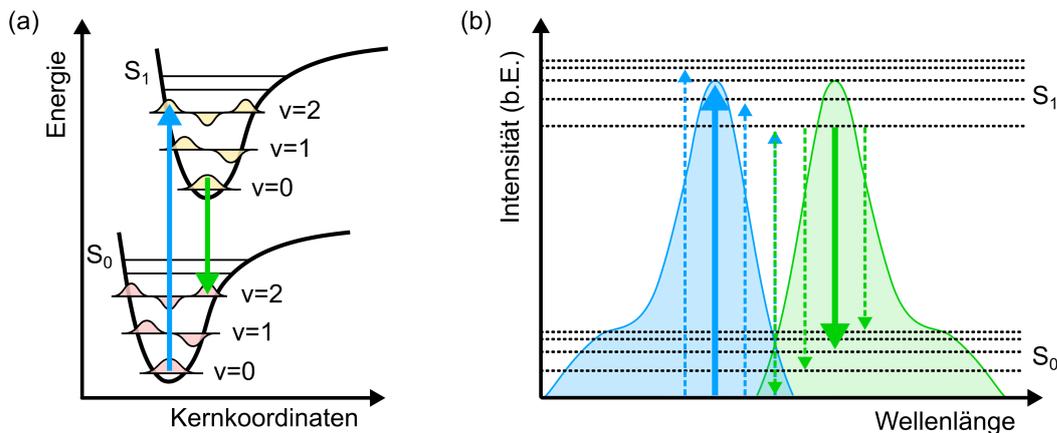


Abbildung 2.14: Franck-Condon-Prinzip bei Absorption und Emission. (a) Schematische Darstellung des Franck-Condon-Prinzips an einem fiktiven Molekül. Zu sehen sind die Potentialkurven für einen Grundzustand S_0 und einen angeregten Zustand S_1 mit jeweils drei vibronischen Zuständen und den dazugehörigen Wellenfunktionen. Nach dem Franck-Condon-Prinzip sind durch die vergleichsweise schnelle Elektronenbewegung zu der Kernbewegung nur vertikale Übergänge erlaubt. Der Überlapp beider Kernwellenfunktionen ist hierbei ein Maß für die Übergangswahrscheinlichkeit. (b) Das zugehörige Absorptions- (blau) und Emissionsspektrum (grün) stellen in diesem vereinfachten Modell das Spiegelbild voneinander dar. Verändert nach [7].

tionsverhalten eines Materials gemessen, d. h., wie viel der Lichtintensität durch die Probe absorbiert wird. Beim Anregungsspektrum wird hingegen die Intensität der Fluoreszenzemission bei einer festgelegten Emissionswellenlänge in Abhängigkeit von verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen. Näheres zu der Messmethode wird in Kapitel 3.2 erläutert.

2.4. Fluoreszenzmikroskopie II: Mikroskopietechniken

Über die letzten Jahrzehnte hat sich die Fluoreszenzmikroskopie zu einem der wichtigsten Werkzeuge zur Abbildung von lebenden Proben entwickelt. Die Frage, welche Mikroskopietechnik sich am besten für ein bestimmtes Experiment eignet, hängt jedoch von dem jeweiligen Kontext ab. Allgemein gibt es vier Hauptkriterien, die bei der Mikroskopie von biologischen Proben beachtet werden sollten, jedoch in der Realität nicht simultan optimierbar sind: Aufnahmegeschwindigkeit, räumliche Auflösung, Detektionsempfindlichkeit und die Lebensfähigkeit bzw. der Zustand der biologischen Probe [82]. Zum einen befinden sich lebende Zellen in ständiger Bewegung, zum anderen kann die Illumination der Probe durch Photobleichung freie Radikale erzeugen und zu toxischen Effekten führen [83]. Die Bewegung der Probe kann durch Fixierung mittels Paraformaldehyd minimiert werden, wodurch sich zwar das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert, die Probe sich jedoch in einem biologisch wenig relevanten Zustand befindet und im Grunde lediglich totes, biologisches Material darstellt. Dies kann eine Maßnahme sein, falls nur ein bestimmter zeitlicher Zustand der Probe von Interesse ist, jedoch gehen jegliche Informationen von dynamischen Prozessen verloren. Auch müssen andere Kriterien wie z. B. die Dicke und Beschaffenheit der Probe, die relevante Zeitskala der zu beobachtenden biologischen Prozesse, die benötigte Beobachtungszeitspanne sowie die gewünschte Anzahl von Farbkanälen beachtet werden. In vielen Fällen wird es kein Mikroskopsystem geben, das allen Ansprüchen gerecht wird. Eine vorausschauende und gut überlegte Auswahl des passenden Mikroskopsystems ist daher essenziell.

2.4.1. Weitfeld- und Konfokalmikroskopie

Unter den Fluoreszenzmikroskopietechniken gibt es unterschiedliche Ansätze zur Probenbeleuchtung und zur Detektion des Probensignals. Im Allgemeinen gibt es zwei grundlegende Mikroskopietechniken, auf denen die meisten fortgeschrittenen Mikroskope beruhen: Die Weitfeld- und Konfokalmikroskopie (Abbildung 2.15).

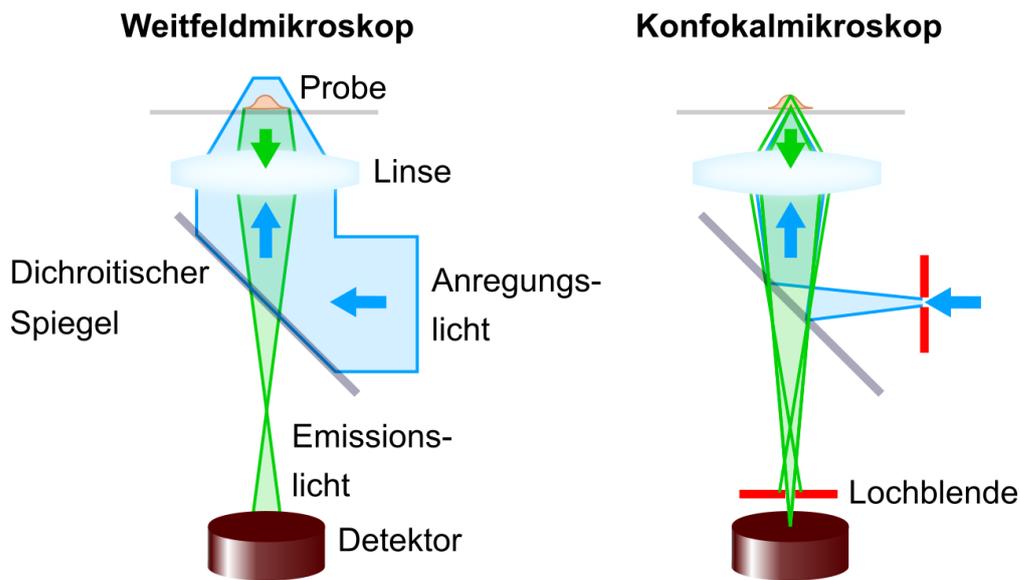


Abbildung 2.15: Vereinfachte Darstellung des Aufbaus eines Weitfeld- und Konfokalmikroskops.

Der einfachste, günstigste und am häufigsten verwendete Mikroskopaufbau ist das Weitfeldmikroskop. Hierbei wird die gesamte Probe oder zumindest ein großer Bereich der Probe simultan mit Licht beleuchtet. Übernimmt eine einzige Linse die Aufgabe des Objektivs und der Kondensorlinse, so wird von einem Epifluoreszenzmikroskop gesprochen [7]. Meist handelt es sich dabei um ein inverses Mikroskop, bei dem sich das Objektiv aus praktischen Gründen unterhalb der Probe befindet. Durch das Objektiv wird die Probe nicht nur beleuchtet, sondern auch das von der Probe emittierte Fluoreszenzlicht, welches zum Objektiv gelangt, eingefangen. Ein Vorteil von Epifluoreszenzmikroskopen ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu Transmissionsmikroskopen ein Großteil des Anregungslichts durch die Probe transmittiert und somit das Licht im Detektionspfad nicht überlagert. Der Anteil des Anregungslichts, der aufgrund von Streuung wieder vom Objektiv eingefangen wird, kann durch den geschickten Einsatz eines dichroitischen Spiegels vom Emissionslicht der Probe getrennt werden. Um jegliche Überreste des Anregungslichts schließlich gänzlich auszuschließen, wird zusätzlich ein Farbfilter, der nur einen bestimmten Frequenzbereich des Lichts passieren lässt, vor dem Detektor eingebaut. Die Möglichkeit der vollständigen Separation von Anregungslicht und Emissionslicht ist einer der größten Vorteile der Epifluoreszenzmikroskopie gegenüber der Transmissionsmikroskopie.

Das gefilterte Fluoreszenzlicht der Probe wird schließlich von einem Detektor, meist durch eine EMCCD-Kamera (engl. *electron-multiplying charge-coupled device*) mit hoher Quanteneffizienz von über 95 % [84], detektiert. Aufgrund der hohen Quanteneffizienz einer EMCCD-Kamera können nahezu alle Fluoreszenzphotonen erfolgreich detektiert werden. Bei Detektoren mit geringerer Quanteneffizienz müssten mehr Fluoreszenzphotonen von der Probe generiert werden, um dieselbe Anzahl von detektierten Photonen zu erreichen. Dafür müsste die Probe länger beleuchtet oder höhere Laserintensitäten verwendet werden, was mit einer erhöhten Strahlenbelastung für die biologische Probe einhergeht. Ein erheblicher, nicht zu vernachlässigender Nachteil eines Epifluoreszenzmikroskops bleibt allerdings bestehen: die großräumige Beleuchtung der Probe. Folglich überlagern sich die Signale aus den Probenbereichen unter- und oberhalb der Detektionsfokusebene, wodurch sich nicht nur die Auflösung, sondern auch die Tiefenschärfe verschlechtert. Zudem wird die Probe auch in Bereichen beleuchtet, die sich nicht im Detektionsfokus befinden, wodurch die Probe schnell photobleicht.

Marvin Minsky beantragte im Jahr 1957 schließlich ein Patent, in dem seine Entwicklung eines zu dieser Zeit neuartigen Mikroskops beschrieben wird, das Konfokalmikroskop [85]. Dieses Mikroskop bietet gegenüber dem Weitfeldmikroskop einige Vorteile:

Im Gegensatz zum Weitfeldmikroskop wird nur ein kleines Volumen in der Probe durch einen fokussierten Laserstrahl angeregt. Dieses Volumen wird auch als Belichtungsvolumen bezeichnet. Um schließlich ein Bild eines größeren Bereichs der Probe rekonstruieren zu können, wird entweder die Probe bewegt oder der fokussierte Laserstrahl über die Probe gerastert [7]; letzteres findet am häufigsten Anwendung.

Das emittierte Fluoreszenzsignal wird nun nicht durch eine EMCCD-Kamera, sondern durch einen Photoelektronenvervielfacher (engl. *photomultiplier tube*, PMT) oder durch eine noch empfindlichere Avalanche-Photodiode (engl. *avalanche photon detector*, APD) detektiert. Beide Detektoren sind in der Lage, die ankommenden Photonen in ein elektrisches Signal umzuwandeln und dieses anschließend um einige Größenordnungen zu verstärken. Dadurch kann der Kontrast erheblich verbessert werden.

Ein großer Vorteil des Konfokalmikroskops ist die im Vergleich zum Weitfeldmikroskop niedrigere Laserlichtbelastung und somit schonendere Belichtung für biologische Proben, zumindest in lateraler Richtung. Kernstück eines Konfokalmikroskops ist die im Detektionspfad, in der Fokusebene des Objektivs eingebaute Lochblende, die Streulicht im Strahlengang unterdrückt. Dadurch werden störende Signale aus anderen Bereichen der Probe abgeblockt und somit das Signal-Rausch-Verhältnis verbessert. Der Laserfo-

kus kann die Probe sowohl in lateraler als auch in axialer Richtung abrastern, wodurch 3D-Aufnahmen der Probe möglich sind. Die Aufnahme einer bestimmten Probenregion kann mit einem Konfokalmikroskop sehr zeitaufwendig sein, da die Aufnahmezeit von dem Abrastervorgang abhängt. Die Aufnahme der Probe muss erst digital rekonstruiert werden bis sie betrachtet werden kann. Dieser Prozess ist weitaus komplizierter als bei einem Weitfeldmikroskop.

Ebenfalls in vielen biologischen Laboren anzutreffen ist das Spinning-Disk-Konfokalmikroskop, eine erweiterte Variante des Konfokalmikroskops, das eine schnellere Aufnahme von Bildern ermöglicht (Abschnitt 3.3).

2.4.2. Auflösungsvermögen von Konfokalmikroskopen

Das Auflösungsvermögen eines optischen Systems hängt in der Realität von weitaus mehr Faktoren als nur der numerischen Apertur oder der Wellenlänge des Lichts ab. Um diese Komplexität besser nachzuvollziehen, ist es wichtig, festzuhalten, dass in einem Konfokalmikroskop insgesamt zwei Punktabbildungen stattfinden (Abbildung 2.16). Zum einen wird das Anregungslicht auf einen Punkt auf der Probe fokussiert, der nicht als Punkt erscheint, sondern vielmehr als Intensitätsverteilung. Dort entsteht die sogenannte Punktspreizfunktion der Beleuchtung PSF_{Bel} , deren Größe und Form von der numerischen Apertur des Objektivs, der Wellenlänge des Lichts und den Aberrationen durch die eingebauten optischen Elemente abhängt. Zum anderen wird das von einem Punkt im Objektraum emittierte Licht auf dem Detektor als PSF_{Det} detek-

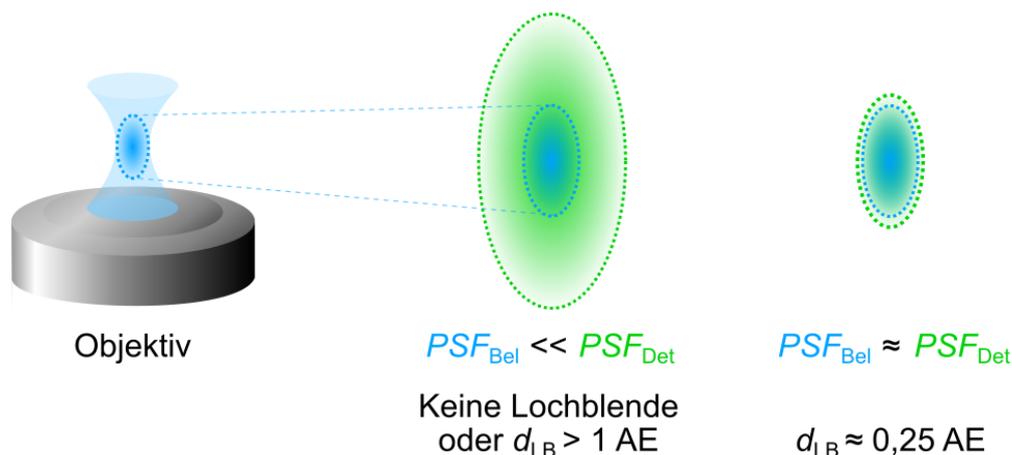


Abbildung 2.16: Beleuchtungs- und Detektions-PSF eines Konfokalmikroskops in Abhängigkeit des Lochblendendurchmessers d_{LB} . Verändert nach [7].

tiert, welche analog von den oben genannten Faktoren, nun aber zusätzlich von der Lochblende des Konfokalmikroskops beeinflusst wird. Die aus PSF_{Bel} und PSF_{Det} resultierende effektive Punktspreizfunktion PSF_{eff} kann mathematisch durch die Faltung beider PSFs gewonnen und durch folgenden Ausdruck dargestellt werden [86, 87]:

$$PSF_{\text{eff}}(\vec{r}) = PSF_{\text{Bel}}(\vec{r}) \otimes PSF_{\text{Det}}(\vec{r}). \quad (2.54)$$

Die effektive Punktspreizfunktion ist in den meisten Fällen kleiner als die Punktspreizfunktion der Beleuchtung, $PSF_{\text{eff}}(\vec{r}) \leq PSF_{\text{Bel}}(\vec{r})$. Die Punktspreizfunktion der Detektion eines Konfokalmikroskops basiert auf der Punktspreizfunktion des Fluoreszenzsignals und der Lochblende. Für das tatsächlich erreichbare Auflösungsvermögen eines Konfokalmikroskops ist daher die Größe der Lochblende entscheidend. Die Lochblende blockiert Lichtstrahlen, die von außerhalb des Fokus kommen und verbessert dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis erheblich. Ihre Größe wird meist in Airy-Einheiten (AE) angegeben, wobei eine Airy-Einheit gerade dem Durchmesser der mittleren Airy-Scheibe entspricht. Besitzt die Lochblende einen Durchmesser d_{LB} von 1 AE, so wird nur die mittlere Airy-Scheibe durchgelassen. Somit werden die Neben-Scheibchen zweier nahe beieinander liegender Punktquellen geblockt und folglich der Kontrast verbessert [7]. Die untere Grenze für den Lochblendendurchmesser liegt bei etwa 0,25 AE, da bei diesem Wert die Punktspreizfunktionen der Beleuchtung und Detektion nahezu identisch sind.

2.4.3. Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie

Konfokalmikroskope bieten zwar einige Vorteile gegenüber Weitfeldmikroskopen, eignen sich allerdings nicht für jede Fragestellung bzw. jedes Experiment. Ende des 20. Jahrhunderts wurde von Eric Betzig [88] eine besondere Technik der Weitfeldlichtmikroskopie, die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (engl. *single-molecule localization microscopy*, SMLM), realisiert, wofür er im Jahr 2014 schließlich mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde. Das grundlegende Prinzip der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie, welches die Auflösung von Nanostrukturen unterhalb der Auflösungsgrenze ermöglicht, wird im Folgenden näher erläutert.

Nähern sich zwei punktförmige Lichtquellen einander, sodass ihr Abstand in etwa oder sogar weniger als die Breite ihrer Punktspreizfunktion beträgt, so können sie effektiv nicht mehr voneinander unterschieden werden [7]. Die Intensitätsverteilung einer einzelnen Punktquelle hingegen kann jedoch mit einer Gaußkurve angenähert und dadurch die Position des Farbstoffs bestimmt werden.

Geht man nun von einer dicht mit Fluorophoren markierten Nanostruktur aus (Abbildung 2.17 (a)), so erscheint die Struktur nach Anregung mit einem Anregungslaser der Wellenlänge $\lambda_{\text{anr.}}$ auf der Mikroskopaufnahme verschwommen. Wäre es nun möglich, die Fluorophore nacheinander oder zumindest nur eine kleine, gut verteilte Untergruppe an aktiven Fluorophoren pro Bildaufnahme anzuregen und deren Positionen auszulesen (Abbildung 2.17 (b)), so könnte die Nanostruktur schließlich nach dem Sammeln und der Überlagerung aller Fluorophorpositionen rekonstruiert werden (Abbildung 2.17 (b)).

Voraussetzung hierfür ist die Existenz eines Dunkelzustands dieser Farbstoffe, in welchem sie nicht in der Lage sind, zu fluoreszieren. Mittels Aktivierungslaser mit der Wellenlänge $\lambda_{\text{akt.}}$ kann in Abhängigkeit von der Laserleistung eine kleine Untergruppe der Fluorophore in einen vom Anregungslaser anregbaren Zustand geschaltet werden. Nach dem Photobleichen oder Übergang dieser Farbstoffe in einen Dunkelzustand wird der Vorgang der Positionsbestimmung weiterer Fluorophorgruppen solange wiederholt bis die Positionen aller Farbstoffe der Nanostruktur bestimmt wurden (Abbildung 2.17 (b)). Für die Rekonstruktion von Nanostrukturen mittels Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie sind meist mehrere tausend Mikroskopaufnahmen nötig. Die Anzahl hängt hierbei von der Anzahl und den photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore sowie auch von der Aufnahmezeit pro Bild ab. Solch ein System, in wel-

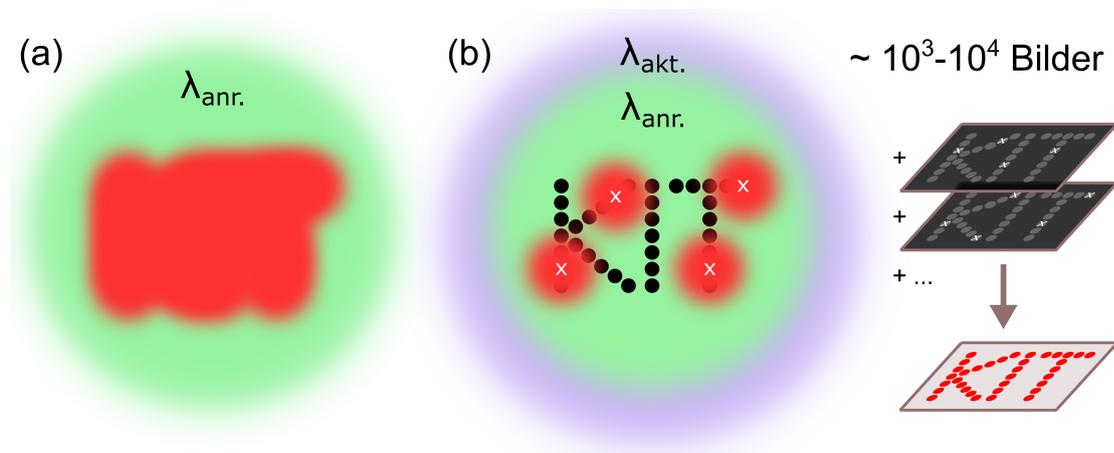


Abbildung 2.17: Fluoreszenzmarkierte KIT-Nanostruktur: (a) Eine konventionelle Weitfeldbeleuchtung der Probe führt zur zeitgleichen Überlagerung aller Fluorophorsignale und daher zum Verschwimmen der Nanostruktur, die nun nicht mehr aufgelöst werden kann. (b) Mittels SMLM können die Positionen einer kleinen Untergruppe an aktiven Fluorophoren pro Bildaufnahme ausgelesen und nach der Auswertung von meist mehreren tausend Bildern schließlich die Nanostruktur rekonstruiert werden.

chem die Fluorophore kontrollierbar nacheinander ausgelesen werden können, ist die Grundlage der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie.

Die tatsächlich erreichbare Auflösung hängt am Ende jedoch von zwei Größen ab: der Lokalisationspräzision und -genauigkeit [89, 90]. Beim wiederholten Messen einer Position ist die Lokalisationspräzision definiert durch die Breite der Verteilung an ermittelten Positionen in Bezug auf deren Mittelwert (Abbildung 2.18). Die Lokalisationsgenauigkeit hingegen ist durch die Abweichung der realen Position des Fluorophors von dem errechneten Mittelwert gegeben und kann u. a. durch chromatische Aberrationen hervorgerufen werden. Hierbei wird die Kenntnis der realen Position des Fluorophors vorausgesetzt, welche ohne weitere Referenzpunkte in den meisten Messungen unbekannt ist. Die Lokalisationspräzision σ_{xy} lässt sich über die folgende Formel berechnen [91]:

$$\sigma_{xy}^2 = \frac{s^2}{N_{\text{total}}} + \frac{a^2}{12 \cdot N_{\text{total}}} + \frac{8 \cdot \pi \cdot s^4 \cdot b^2}{a^2 \cdot N_{\text{total}}}. \quad (2.55)$$

Hierbei ist N_{total} die Anzahl detektierter Photonen, s die Standardabweichung der 2D-Gaußverteilung der Photonen, hervorgerufen durch Schrotrauschen, a die durch den Detektor vorgegebene Pixelgröße und b das Rauschsignal pro Pixel. Letzteres wird vor allem von Auslesefehlern, dem Dunkelrauschen der Pixel oder anderen Quellen ungewünschter Fluoreszenz, u. a. Autofluoreszenz der Zellen, beeinflusst. Die Lokalisierung von Ereignissen mit niedriger Photonenzahl hängt demnach stark von Hintergrundsignalen ab; die von Ereignissen mit hoher Photonenausbeute hingegen hauptsächlich vom Schrotrauschen der Photonen. Bei einem perfekten Detektor, ohne großen Einfluss von Pixel- und Hintergrundrauschen, würde daher die Lokalisationspräzision nur vom ersten Term und somit von der Standardabweichung der PSF und der Anzahl detektierter Photonen abhängen. Mit steigender Anzahl detektierter Photonen verbessert sich demnach die Lokalisationspräzision mit:

$$\sigma_{xy} \propto \frac{s}{\sqrt{N_{\text{total}}}}. \quad (2.56)$$

In einem realen Experiment besitzt ein Detektor jedoch eine begrenzte Detektionseffizienz. Zudem kann Hintergrundrauschen das detektierte Signal dominieren und die Photonenausbeute pro Fluorophor, besonders bei fluoreszierenden Proteinen im Vergleich zu organischen Farbstoffen, gering ausfallen. All diese Faktoren wirken sich somit negativ auf die Lokalisationspräzision aus. Im Beispiel für einen Fluorophor mit Emission bei 500 nm, der im Schnitt 10^5 Photonen emittiert, bevor er bleicht, könnte die Lokalisationspräzision im besten Fall etwa 1,6 nm erreichen [92]. Durch die meist

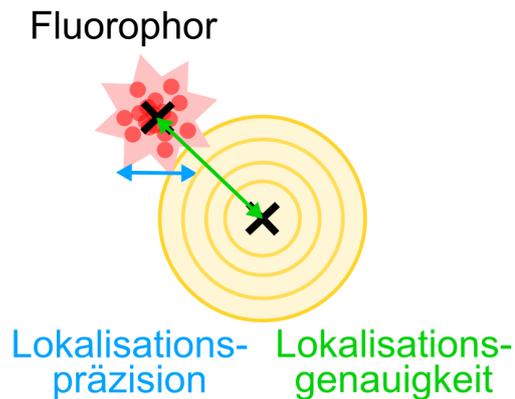


Abbildung 2.18: Schematische Darstellung der Lokalisationspräzision und -genauigkeit. Verändert nach [89].

geringe Detektionseffizienz ($< 5\%$) kann die tatsächlich detektierte Anzahl der Photonen in Gleichung 2.55 besser durch $N_{\text{total}} = \Phi_{\text{DE}} / \Phi_{\text{PB}}$ abgeschätzt werden. Hierbei ist Φ_{PB} die Wahrscheinlichkeit für Photobleichung eines Fluorophors pro absorbiertem Photon und Φ_{DE} die Detektionseffizienz. Der Kehrwert von Φ_{PB} spiegelt die mittlere Anzahl der Anregungs-/Emissionszyklen wider, die ein Fluorophor erreichen kann, bevor er photobleicht wird. Im Gegensatz zu der Wahrscheinlichkeit für Photobleichung von organischen Farbstoffen ($\Phi_{\text{PB}} = 10^{-7} - 10^{-5}$) fällt die Wahrscheinlichkeit von fluoreszierenden Proteinen größer aus ($\Phi_{\text{PB}} = 10^{-5}$), wodurch sich die Lokalisationspräzision verschlechtert. Leider sind Strukturen im Inneren von lebenden Zellen für Antikörper-Farbstoffverbindungen nur durch Fixierung der Probe zugänglich, wodurch keine Bildaufnahmen von Strukturen lebender Proben möglich wären. Fluoreszierende Proteine hingegen ermöglichen die Einfärbungen von Proteinen in lebenden Zellen, haben jedoch den Nachteil einer geringen Photonenausbeute, die zu einer geringen Lokalisationspräzision führt. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, dass nicht alle möglichen Messgrößen eines fluoreszenzmikroskopischen Experiments beliebig genau bestimmt werden können und an einigen Stellen Kompromisse getroffen werden müssen, um die für die Anforderung optimale Herangehensweise zu finden. Die zwei SMLM-Techniken PALM (engl. *photoactivated localization microscopy*) und STORM (engl. *stochastic optical reconstruction microscopy*) basieren im Grunde auf derselben Herangehensweise, unterscheiden sich jedoch in der verwendeten Farbstoffgruppe und Probenpräparation. Um Strukturen in einem Bereich von $250\text{ nm} \times 250\text{ nm}$ bei 20 nm Auflösung darzustellen, muss nach dem Nyquist-Abtasttheorem ($\nu_{\text{Abtast}} \geq 2 \cdot \nu_{\text{Signal}}$, Kapitel 2.2.4) die Struktur mindestens alle 10 nm mit einem funktionellen Fluorophor versehen sein. Der we-

sentliche Unterschied zwischen PALM und STORM liegt im Grunde in der Art des Fluorophors, der für die Markierung von Nanostrukturen zum Einsatz kommt. Bei PALM werden Biostrukturen oder Zielproteine in Zellen, meist durch das Einbringen von Fremd-DNA und anschließender Proteinexpression, gezielt mit fluoreszierenden Proteinen markiert. Im Vergleich dazu wird bei STORM mit organischen Farbstoffen gearbeitet. Der Chromophor des zur Markierung verwendeten Fluorophors wird durch einen Aktivierungslaser als erstes lichtinduziert in einen aktiven Zustand gebracht. Von dort aus kann er dann durch einen Laser mit passender „Abfragewellenlänge“ angeregt werden und die daraufhin emittierten Fluoreszenzphotonen können detektiert werden. Organische Farbstoffe sind jedoch den fluoreszierenden Proteinen in Bezug auf photophysikalische Eigenschaften meist überlegen, u. a. sind sie heller und mit geeigneten Puffersystemen photostabiler. Ein typischer Vertreter für organische Farbstoffe ist der photoschaltbare Farbstoff Cy5 der Cyanin-Farbstofffamilie mit einer Photonausbeute von etwa 3000 Photonen [93] pro Fluorophor. Zum Erreichen der Photoschaltbarkeit von Cy5 wird der Probe meist ein Reduktionsmittel mit Thiolgruppen hinzugegeben. Für eine möglichst hohe Photostabilität des Fluorophors werden die Experimente bei möglichst niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in der Probenumgebung durchgeführt [94]. Im Gegensatz zu den organischen Farbstoffen für STORM hat sich für PALM über die Jahre u. a. mEosFP*thermo* als Fluorophorvariante [95, 96] bewährt. mEosFP*thermo* ist ein photokonvertierbares, fluoreszierendes Protein und kann durch Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm aktiviert werden, d. h. von seinem grün- in seinen rot-emittierenden Zustand überführt werden. Der Ausleselaser, typischerweise bei einer Wellenlänge von 561 nm, ist nun in der Lage die rote Version von mEosFP*thermo* zur Fluoreszenz anzuregen. Die Aktivierungswahrscheinlichkeit von mEosFP*thermo* kann durch die Intensität des 405 nm-Laserlichts beeinflusst werden. Somit ist es möglich, die Dichte von aktivierten Fluorophoren zu regulieren und die aufeinanderfolgende Anregung kleiner Fluorophor-Untergruppen zu gewährleisten. Nach dem Auslesen aller Fluorophore und der Ansammlung von meist mehreren tausend Bildern können am Ende die Positionen aller funktioneller Fluorophore und somit die Nanostruktur rekonstruiert werden.

2.4.3.1. Interne Totalreflexion

Trotz Einsatz von schaltbaren oder aktivierbaren Fluorophoren können hohe Hintergrundsignale die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie erheblich erschweren und das Signal-Rausch-Verhältnis reduzieren. Befinden sich die Nanostruktur oder die Zielproteine in unmittelbarer Nähe zur Glas- bzw. Probengefäßoberfläche, z. B. auf

der Membran einer Zelle, so kann interne Totalreflexion (engl. *total internal reflection*, TIR) genutzt werden, um den störenden Einfluss von Hintergrundsignalen aus anderen Ebenen zu minimieren. Bei konventionellen Weitfeld-Mikroskopen wird der Laserstrahl auf den hinteren Fokuspunkt des Objektivs fokussiert, wodurch ein kollimierter Lichtstrahl entsteht, der für eine gleichmäßige Beleuchtung der Probe sorgt (Abbildung 2.19 (a)). Wird der Laserstrahl jedoch von seiner ursprünglichen Strahlachse abgelenkt, sodass er schräg auf die Oberfläche des Probengefäßes trifft, reduziert sich die Eindringtiefe der Weitfeldbeleuchtung erheblich (Abbildung 2.19 (b)). Diese Art der Beleuchtung wird auch HILO-Modus (engl. *highly inclined and laminated optical sheet*) genannt [97]. Sobald der Laserstrahl einen kritischen Winkel erreicht, wird der Hauptstrahl zum Objektiv zurückreflektiert (Abbildung 2.19 (c)). An der Grenzfläche wird ein evaneszentes, elektromagnetisches Feld erzeugt, dessen Intensität mit der Eindringtiefe in die Probe exponentiell abfällt. Nur Fluorophore, die sich im Bereich der Eindringtiefe des evaneszenten Felds befinden, werden angeregt. Die typische Eindringtiefe eines evaneszenten Felds liegt bei etwa 150 – 250 nm. Störende Fluoreszenzsignale oberhalb dieser Eindringtiefe werden somit erheblich reduziert und das Signal-Rausch-Verhältnis dadurch verbessert.

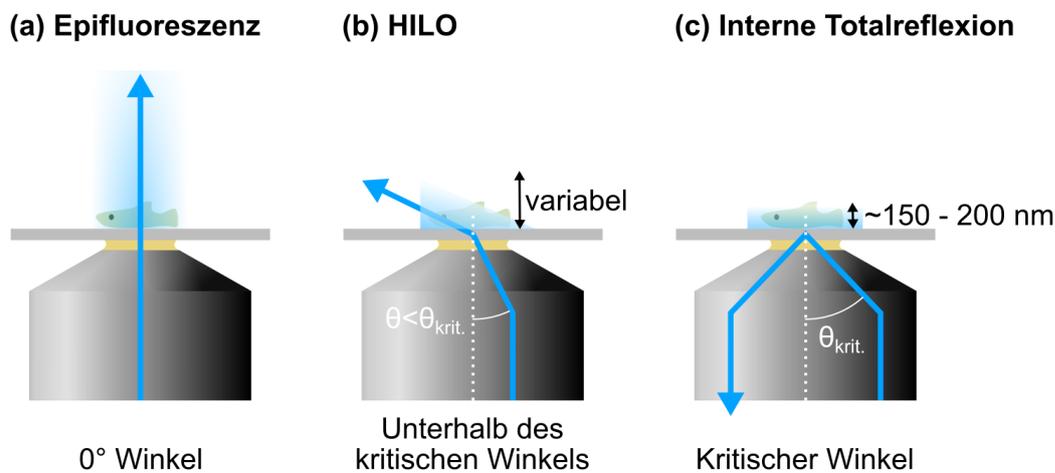


Abbildung 2.19: Unterschiedliche Beleuchtungsmodi eines Weitfeldmikroskops: (a) Bei der Epifluoreszenzbeleuchtung wird die ganze Probe durchleuchtet. (b) Weicht der Laserstrahl von der Strahlachse ab, so reduziert sich die Eindringtiefe der Beleuchtung. (c) Fällt der Laserstrahl unter einem kritischen Winkel ein, so wird er an der Grenzfläche Probengefäß-Probe reflektiert, wobei auf der Probenseite ein evaneszentes Feld mit typischer Eindringtiefe im Bereich von etwa 150 – 250 nm [61] entsteht. Verändert nach [7].

2.5. Bindungsaffinität von Ligand und Rezeptor

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit den Grundlagen der Bindungstheorie von Liganden und Rezeptoren [98–100]. Die Bindungsaffinität ist hierbei das Maß für die Stärke einer Bindung zwischen zwei Proteinen. Im Folgenden werden ausschließlich die Bindungs- (Assoziation) und Trennungsprozesse (Dissoziation) von nicht kovalenten Protein-Protein-Bindungen betrachtet. Das Bindungsgleichgewicht zwischen einem Liganden L und seinem Rezeptor R bei einer bestimmten Temperatur wird beschrieben durch die folgende Reaktionsgleichung mit den zwei Ratenkoeffizienten k_A (Assoziationsratenkoeffizient) und k_D (Dissoziationsratenkoeffizient):



Befindet sich das System jedoch noch nicht im Gleichgewicht, z. B. direkt nach der Zugabe von freien Liganden, so ändert sich die Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplexen mit der Zeit wie folgt:

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_A \cdot [L] \cdot [R] - k_D \cdot [LR], \quad (2.58)$$

wobei $[L]$ die Liganden-, $[R]$ die Rezeptorkonzentration und $[LR]$ die Konzentration an Ligand-Rezeptor-Komplexen ist. Nach einer gewissen Zeit kehrt das System wieder in einen Gleichgewichtszustand zurück, der durch die Gleichgewichtskonstante K_A , auch Assoziationskonstante genannt, definiert werden kann:

$$K_A = \frac{[LR]}{[L] \cdot [R]}. \quad (2.59)$$

Meistens wird die Stärke einer Bindung nicht durch die Assoziationskonstante, sondern durch die Dissoziationskonstante K_D angegeben:

$$K_D = \frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} = \frac{1}{K_A} = \frac{k_D}{k_A}. \quad (2.60)$$

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante müssen lediglich die Fraktion an gebundenen Komplexen über die freie Ligandenkonzentration aufgetragen und die freie Ligandenkonzentration gefunden werden, bei der die Hälfte an Rezeptoren einen Liganden gebunden haben (Abbildung 2.20). Die Dissoziationskonstante hat sich aus diesem Zusammenhang als Maß für die Stärke einer Bindung bewährt. Starke, nicht kovalente Bindungen zwischen Proteinen besitzen eine K_D im Bereich von wenigen Piko- bis Nanomol pro Liter (10^{-12} M bis 10^{-9} M), schwache Bindungen hingegen eine K_D im Bereich von einigen Millimol pro Liter (10^{-3} M).

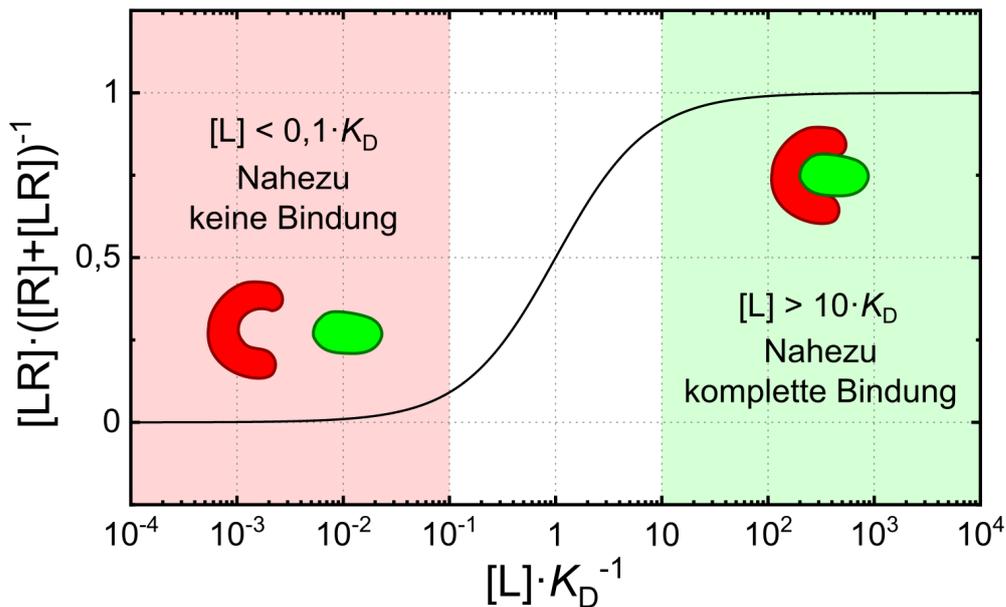


Abbildung 2.20: Verlauf einer typischen Bindungskurve zwischen einem Liganden (grün) und seinem Rezeptor (rot) bei konstanter Temperatur (isotherm). Der Anteil von gebundenen Rezeptor-Ligand-Komplexen ist auf die Gesamtkonzentration an Rezeptoren normiert ($[LR]/([R]+[LR])$) und in Abhängigkeit von der freien Ligandenkonzentration $[L]$ dargestellt. Die freie Ligandenkonzentration wurde hierbei auf die Dissoziationskonstante K_D normiert.

2.5.1. Bestimmung der Bindungsaffinität durch Bindungskinetikexperimente

Die Bindungsaffinität von Liganden und ihren Rezeptorproteinen in lebenden Zellen kann mit Hilfe von simplen, jedoch oftmals zeitlich aufwendigen Bindungskinetikexperimenten mittels fluoreszenzmikroskopischer Zeitrafferaufnahmen bestimmt werden. Für diese Art von Experimenten müssen die Rezeptor- und Ligandenproteine in zwei unterschiedlichen Farbkanälen fluoreszenzmarkiert werden. Die Ligandenproteine können in Form von konditioniertem Medium geerntet und das Medium anschließend zu den Zellen, die die Rezeptorproteine exprimieren, hinzugegeben werden. Um die Bindungskurve möglichst exakt rekonstruieren zu können, sollte es möglich sein, Datenpunkte im Bereich der Sättigung aufzunehmen ($[L] = 100 \cdot K_D$). Zudem muss die Konzentration an freien Liganden in Lösung $[L]$ bei jedem Experiment genau bekannt sein. Bei fluoreszenzmikroskopischen Bindungsreihen an lebenden Zellen wird typischerweise der Anstieg (Assoziation) oder die Abnahme (Dissoziation) des Fluoreszenzsignals der Rezeptor-Ligand-Komplexe an der Zellmembran im Liganden-Farbkanal gemessen. Dieser Intensitätsverlauf wird normiert durch das Fluoreszenzsignal an der

Zellmembran im Rezeptor-Farbkanal. Der Anstieg bzw. die Abnahme der Fluoreszenzsignale an der Zellmembran im Ligandenkanal ist proportional zum Anstieg bzw. zur Abnahme der Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplexen $[LR]$. Die Anpassungsfunktionen, die unter dieser Annahme für den Assoziations- oder Dissoziationsprozess verwendet werden können, werden im Folgenden näher erläutert.

Für Systeme, die sich noch nicht im Gleichgewicht befinden, gilt die inhomogene Differentialgleichung 2.58. Führt man nun ein Dissoziationsexperiment durch, so lässt sich zunächst die Dissoziationsrate k_D bzw. ihr Kehrwert, die Zeitkonstante der Dissoziation t_D bestimmen. Hierfür müssen lediglich alle freien Liganden eines sich im Gleichgewicht befindenden Rezeptor-Ligand-Systems z. B. durch einen Komplettaustausch der Lösung in der Probenkammer entfernt werden ($[L] = 0$ M). Dadurch zerfallen die vorhandenen Ligand-Rezeptor-Komplexe mit der Zeit in Abhängigkeit von der Dissoziationsrate. Der Startwert für die Konzentration an Komplexen ist durch $[LR]_0$ gegeben. Beschrieben wird dieser Dissoziationsprozess schließlich durch folgende vereinfachte Differentialgleichung:

$$\frac{d[LR]}{dt} = -k_D \cdot [LR]. \quad (2.61)$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung ist ein exponentieller Zerfall:

$$[LR] = [LR]_0 \cdot e^{-k_D \cdot t}. \quad (2.62)$$

Passt man nun diese Funktion an die gemessenen Datenpunkte an, so kann die Dissoziationsrate ermittelt werden.

Die zur Bestimmung der Bindungsaffinität noch fehlende Assoziationsrate kann experimentell durch Bindungsreihen bestimmt werden. Dafür wird der freie Ligand in jeweils unterschiedlicher Konzentration zu den Rezeptoren hinzugefügt. Wichtig hierbei ist es, das Experiment so zu konzipieren, dass die Konzentration an freien Liganden bekannt ist und während der Messzeit möglichst konstant bleibt. Dies kann u. a. durch eine niedrige Zelldichte im Probengefäß und ausreichender Menge an Ligandenlösung erreicht werden. Im Folgenden wird die Funktion zur Anpassung der Datenpunkte der Assoziationsexperimente hergeleitet. Aus der Annahme, dass sich die Rezeptorkonzentration während des Bindungsexperimentes nicht ändert, folgt:

$$[R]_0 = [R] + [LR]. \quad (2.63)$$

Eingesetzt in Gleichung 2.58 erhält man daraus:

$$\frac{d[LR]}{dt} = -(k_A \cdot [L] + k_D) \cdot [LR] + k_A \cdot [L] \cdot [R]_0. \quad (2.64)$$

Für das Lösen dieser Gleichung wird zuerst ein homogener ($[LR]_h$) und anschließend ein partieller ($[LR]_p$) Lösungsansatz gewählt:

$$[LR] = [LR]_h + [LR]_p. \quad (2.65)$$

Als homogener Lösungsansatz wird eine Exponentialfunktion aufgestellt mit $C_h \in \mathbb{R}$ als reelle Konstante:

$$[LR]_h = C_h \cdot e^{-(k_A+k_D) \cdot t}. \quad (2.66)$$

Beim partiellen Ansatz wird hingegen eine reelle Konstante $C_p \in \mathbb{R}$ angenommen:

$$[LR]_p = C_p. \quad (2.67)$$

Durch die Zugabe von Liganden einer bestimmten Konzentration $[L]$ steigt die Konzentration an gebildeten Komplexen von $[LR]_0 = 0$ mit der Zeit auf ein Sättigungsplateau $[LR]_{\max}$ gemäß:

$$[LR] = [LR]_{\max} \cdot (1 - e^{-k_{A_{\text{beob}}} \cdot t}). \quad (2.68)$$

Der bei einer bestimmten Ligandenkonzentration $[L]$ apparenter Ratenkoeffizient $k_{A_{\text{app}}}$ (Kehrwert der beobachteten Zeit der Assoziation) hängt mit der Assoziationsrate k_A , der freien Ligandenkonzentration und mit der Dissoziationsrate k_D über folgende Gleichung zusammen:

$$k_{A_{\text{app}}} = k_A \cdot [L] + k_D. \quad (2.69)$$

2.6. Diffusion von Teilchen

In Flüssigkeit suspendierte Teilchen führen ständig unregelmäßige Eigenbewegungen aus und diffundieren fortlaufend von einem Ort zum anderen. Dieser Prozess wird als Brownsche Molekularbewegung bezeichnet und beruht auf der thermischen Bewegung der Moleküle des Lösungsmittels, die zu Stößen mit den schwereren suspendierten Teilchen führt. Im Jahr 1905 lieferte Einstein hierzu das mathematische Modell des „Random Walks“ [101]. Reduziert man die Bewegung eines Teilchens auf eine Dimension, so legt es aufgrund der Stöße in sehr kleinen zeitlichen Abständen Schritte in positiver oder negativer Richtung zurück (Abbildung 2.21 (a)). Es gibt hierbei keine Vorzugsrichtung, da die Stöße und daraus resultierenden Bewegungsschritte unabhängig voneinander stattfinden. Daraus ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 50 % ($p = 1/2$)

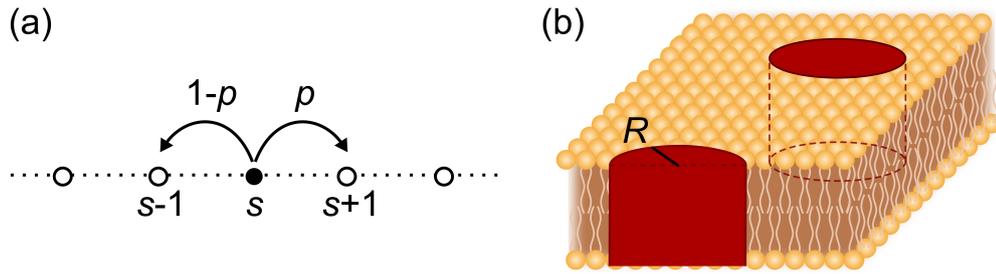


Abbildung 2.21: (a) eindimensionaler „Random Walk“ eines Teilchens auf der Position s mit der Wahrscheinlichkeit q nach links und p nach rechts zu gehen. (b) Saffman-Delbrück-Modell für die Diffusion von membrangebundenen Proteinen. Hierbei werden die Proteine als in die Membran gebettete Zylinder mit Radius R angenommen [102, 103].

für die Bewegung in positiver oder negativer Bewegungsrichtung. Wenn das Teilchen bei $t = 0$ bei der Position $s = 0$ startet, so hat es sich innerhalb eines Zeitintervalls Δt um eine Strecke Δx in positiver Richtung mit der Wahrscheinlichkeit p bewegt. Für die negative Richtung ergibt sich daraus eine Wahrscheinlichkeit von $1 - p$. Befindet sich das Teilchen nach N gleich großen Schritten bei Position s , so hat es eine Anzahl von r Schritten in positiver (rechts) und l Schritten in negativer Richtung (links) zurückgelegt mit $N = r + l = s + 2 \cdot l$. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich das Teilchen nach Δt bei s befindet, kann mit

$$l = \frac{N - s}{2} \text{ und } r = \frac{N + s}{2} \quad (2.70)$$

durch eine binomiale Wahrscheinlichkeitsverteilung beschrieben werden:

$$P_s = \frac{N!}{r! \cdot l!} \cdot p^r \cdot (1 - p)^l = \frac{N!}{(N - r)! \cdot r!} \cdot p^r \cdot (1 - p)^{N - r}. \quad (2.71)$$

Für eine unendlich große Anzahl von Schritten kann die Binomialverteilung durch eine Normalverteilung angenähert werden:

$$P(x, t) = \frac{1}{(4 \cdot \pi \cdot D \cdot t)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|x|^2}{4 \cdot D \cdot t}}, \quad (2.72)$$

wobei d die Dimensionen des „Random Walks“ angibt. Für das Teilchen ergibt sich aus $p = 1/2$ eine mittlere zurückgelegte Strecke von $\langle x \rangle = 0$. Die Varianz von $P(x, t)$ entspricht der mittleren quadratischen Verschiebung des Teilchens:

$$\langle x^2 \rangle = 2 \cdot d \cdot D \cdot t. \quad (2.73)$$

Hierbei steht D für den Diffusionskoeffizienten des Teilchens in Lösung. Das Modell der normalen Diffusion reicht oftmals nicht aus, um die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Teilchen in biologischen Proben ausreichend zu beschreiben. Grund hierfür

sind z. B. der aktive Teilchentransport oder die sterischen Behinderung der Teilchendiffusion. Die mittlere quadratische Verschiebung kann daher allgemeiner ausgedrückt werden durch

$$\langle x^2 \rangle = 2 \cdot d \cdot \Gamma \cdot t^\alpha \quad (2.74)$$

mit Γ als verallgemeinerter Diffusionskoeffizient und α als Anomalieparameter: anomale Subdiffusion ($\alpha < 1$), Brownsche Diffusion ($\alpha = 1$) und anomale Superdiffusion ($\alpha > 1$) [104]. Die Diffusion von Teilchen in Lösung kann verglichen werden mit der Diffusion von hypothetischen Kugeln mit gleichen Diffusionseigenschaften. Dabei ist zu beachten, dass das für die Diffusion relevante Volumen nicht allein durch den Radius des Teilchens gegeben ist, sondern auch durch die elektromagnetische Wechselwirkung mit dem umgebenden Lösungsmittel. Dadurch wird der hydrodynamische Radius R_H der hypothetischen Kugeln in der Regel größer ausfallen als der tatsächliche, durch die atomare Struktur definierte Radius der Teilchen. Der hydrodynamische Radius kann durch die Stokes-Einstein-Gleichung [101] ermittelt werden:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta(T) \cdot R_H}, \quad (2.75)$$

wobei k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur in Kelvin und $\eta(T)$ die Viskosität des Lösungsmittels ist. Da die Formel explizit und implizit durch die Viskosität von der Temperatur abhängt, können Diffusionskoeffizienten nur verlässlich ermittelt werden, wenn die Temperatur während der Messzeit konstant gehalten wird. Die Stokes-Einstein-Gleichung bezieht sich auf die Diffusion von Teilchen in drei Dimensionen und kann nicht ohne Weiteres auf die meist weitaus komplexere Diffusion von membrangebundenen Proteinen angewandt werden. Im Jahr 1975 fanden Saffman und Delbrück [102] in diesem Zusammenhang eine logarithmische Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von dem Radius R eines als Zylinder angenommenen, membrangebundenen Proteins [103] (Abbildung 2.21 (b)):

$$D = \frac{k_B \cdot T}{4 \cdot \pi \cdot \eta_{\text{Mem}} \cdot h_{\text{Mem}}} \cdot \left(\ln \frac{\eta_{\text{Mem}} \cdot h_{\text{Mem}}}{\eta_{\text{Fl}} \cdot R} - \gamma \right). \quad (2.76)$$

Hierbei stehen η_{Mem} , η_{Fl} für die Viskositäten der Membran⁴ und der membranumgebenden Flüssigkeit, h_{Mem} für die Dicke der Membran und γ für die Euler-Mascheroni-Konstante. Änderungen im Radius von Membranproteinen führen nach diesem Modell,

⁴ Oftmals wird die Membranviskosität als Produkt aus der Membranhöhe und der effektiven Lipidviskosität angegeben [103].

selbst nach Bindung von großen Bindungspartnern, nur zu sehr geringen Änderungen ihrer Diffusionskoeffizienten. Ramadurai et al. [105] konnten in ihren Experimenten an integralen Membranproteinen in großen unilamellaren Vesikeln das Saffman-Delbrück-Modell bestätigen. Im Gegensatz dazu fanden Gambin et al. [106] für Membranproteine empirisch ein Diffusionsverhalten, das der Stokes-Einstein-Beziehung stark ähnelte:

$$D = \frac{k_B \cdot T \cdot \lambda_{\text{char}}}{4 \cdot \pi \cdot \eta(T) \cdot R_H \cdot h'} \quad (2.77)$$

wobei λ_{char} für die charakteristische Länge⁵ steht, die aus „Dimensionsgründen“ [106] eingeführt wurde. Guigas und Weiss [107] zeigten in ihren Simulationen in Übereinstimmung mit Hughes et al. [108], dass die $D \propto 1/R$ -Beziehung erst für große Membranproteine ($R \approx 10$ nm) zum Tragen kommt.

2.7. Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

In den letzten 40 Jahren hat sich die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (engl. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), die von Madge, Elson und Webb [109] entwickelt wurde, zu einer vielseitig angewandten Methode in der Biophysik etabliert. Mittels FCS können nicht nur Aussagen über die kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften von fluoreszierenden Molekülen in Lösung getroffen werden, sondern auch über deren Konzentrationen und Molekülmasse. Darüber hinaus werden FCS-Messungen auch zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen angewandt. Dadurch können nicht nur die Assoziations-, Dissoziations- und chemische Ratenkonstanten, sondern auch die Diffusionskonstanten von Proteinen in Lösung oder an der Zellmembran bestimmt werden [110]. FCS basiert auf der Analyse von Intensitätsfluktuationen, die durch die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Teilchen durch ein kleines Beobachtungsvolumen (\approx fl) hervorgerufen werden. Voraussetzung für die erfolgreiche Detektion von Intensitätsfluktuationen sind niedrige Teilchenzahlen im nanomolaren Bereich. Mittlerweile bieten einige Mikroskophersteller kommerziell erhältliche FCS-Mikroskope inklusive Bedienungs- und Auswertungssoftware an, die FCS-Messungen für viele Labore leicht zugänglich machen. FCS-Messungen von fluoreszenzmarkierten Teilchen in Lösung sind im Allgemeinen recht simpel. Im Vergleich dazu gibt es bei FCS-Messungen an Zellmembranen einige zusätzliche Herausforderungen, worauf in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird.

⁵ Die charakteristische Länge ist ein Maß für die Komplexität der Membran. Da die Membranviskosität schwer festzulegen ist, kann die charakteristische Länge auch nur abgeschätzt werden [106].

2.7.1. Klassische Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Das Prinzip der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie basiert auf der statistischen Analyse von zeitlichen Intensitätsfluktuationen, die von Partikelfluktuationen in einem ausreichend kleinen Ensemble innerhalb eines Beobachtungsvolumens herrühren [111]. Andere Methoden zur Messung von Diffusionskoeffizienten und Reaktionsraten basieren auf Relaxationsexperimenten, die einen Ausgangszustand erfordern, von dem ausgehend eine Rückrelaxation in den Gleichgewichtszustand des Systems beobachtbar ist. Die FCS bietet, im Gegensatz dazu, die Möglichkeit, diese Informationen in einem System zu messen, das sich bereits im Gleichgewichtszustand befindet. Die Teilchenkonzentration in einem wohl definierten Volumen der Probe ist in solch einem System im zeitlichen Mittel konstant. Betrachtet man jedoch ein viel kleineres Subvolumen an aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, so diffundieren Moleküle durch Brownsche Bewegung in das Subvolumen hinein und wieder heraus. Folglich sind im Subvolumen Teilchenfluktuationen wahrnehmbar. Sind diese Teilchen nun zusätzlich fluoreszenzmarkiert, so fluktuiert nicht nur ihre Konzentration, sondern auch das gemessene Fluoreszenzsignal um einen Mittelwert⁶. Diese Fluoreszenzfluktuationen können schließlich via FCS einer statistischen Analyse unterzogen werden. Für konventionelle FCS-Messungen bedarf es eines konfokalen Mikroskopaufbaus mit einem wohldefinierten fokussierten Laserstrahl, der in Kombination mit dem Detektionsobjektiv ein effektives Beobachtungsvolumen bildet, durch das die fluoreszierenden Teilchen diffundieren. Die Anzahl von Teilchen N im Beobachtungsvolumen ist zu jeder Zeit durch die Poisson-Verteilung gegeben. Es ergibt sich für die Wurzel der mittleren quadratischen Fluktuation der Teilchenanzahl N :

$$\frac{\sqrt{\langle(\delta N)^2\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N \rangle)^2\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}. \quad (2.78)$$

Somit wird klar, dass bei steigender Teilchenanzahl im Beobachtungsvolumen die relativen Fluktuationen abnehmen, d. h., das für die FCS-Analyse benötigte Signal geht im Messrauschen unter. Die mittlere Teilchenanzahl, die sich zu einem Zeitpunkt im Beobachtungsvolumen befindet, liegt bei FCS-Messungen typischerweise zwischen 0,1 und 1000, was bei einem Beobachtungsvolumen von etwa einem Femtoliter einem Konzentrationsbereich von 1 nM bis 1 μ M entspricht [112]. Die untere Grenze wird

⁶ Teilchenfluktuationen im Beobachtungsvolumen können auch durch chemische Reaktionen hervorgerufen werden, sofern die chemische Reaktion eine Änderung der Teilchenanzahl eines Reaktants zur Folge hat. Diese Art von FCS-Experimenten sind jedoch etwas komplizierter, da nun neben der Diffusion der Teilchen auch noch die Kinetik der chemischen Reaktion berücksichtigt werden muss.

letztendlich durch das vorherrschende Hintergrundsignal bestimmt. Fluoreszierende Teilchen, die beim Diffundieren den Laserfokus passieren, werden angeregt und emittieren Photonen, die durch das optische System gesammelt und auf einen Detektor geleitet werden. Wenn die Umgebungsbedingungen und mittlere Konzentration der fluoreszierenden Teilchen innerhalb der Messzeit T_{Mess} konstant bleiben, so fluktuiert die Fluoreszenzintensität $F(t)$ um einen Mittelwert:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T_{\text{Mess}}} \cdot \int_0^{T_{\text{Mess}}} F(t) dt. \quad (2.79)$$

Die Fluktuationen $\delta F(t)$ stehen im direkten Zusammenhang mit der Dynamik der diffundierenden, fluoreszierenden Teilchen und können mathematisch mit folgendem Ausdruck beschrieben werden [112]:

$$\delta F(t) = \langle F(t) \rangle - F(t) = P_{\text{Det}} \cdot \int_V I_{\text{Anreg}}(\vec{r}) \cdot \text{OTF}(\vec{r}) \cdot \delta(\sigma \Phi C(\vec{r}, t)) dV. \quad (2.80)$$

Hierbei entspricht P_{Det} der Detektionseffizienz und $\delta(\sigma \cdot \Phi \cdot C(\vec{r}, t))$ den unterschiedlichen Ursachen von Fluoreszenzfluktuationen im Beobachtungsvolumen ($\delta\sigma$: Fluktuationen im molekularen Absorptionsquerschnitt, $\delta\Phi$: Fluktuationen der Quantenausbeute, $\delta C(\vec{r}, t)$: Konzentrationsfluktuationen). Letzteres ist durch das Produkt aus der räumlichen Verteilung der Anregungsenergie I_{Anreg} und der dimensionslosen, optischen Transferfunktion $\text{OTF}(\vec{r})$ der Detektion bzw. der Kombination aus Objektiv und Lochblende gegeben. All diese Parameter im Einzelnen zu bestimmen ist äußerst schwierig [112]. Daher wird die Gleichung 2.80 vereinfacht zu folgendem Ausdruck:

$$\delta F(t) = \int_V V_{\text{3DGauß}}(\vec{r}) \cdot \delta(\eta \cdot C(\vec{r}, t)) dV. \quad (2.81)$$

Die räumliche Verteilung des emittierten und detektierten Fluoreszenzlichts $V_{\text{3DGauß}}(\vec{r})$ wird hierfür meist durch eine dreidimensionale Gaußfunktion angenähert, welche bei den Parametern z_0 und ω_0 auf einen Faktor $1/e^2$ abfällt (Abbildung 2.22 (a)):

$$V_{\text{3DGauß}}(\vec{r}) = e^{-2 \cdot \frac{x^2 + y^2}{\omega_0^2}} \cdot e^{-2 \cdot \frac{z^2}{z_0^2}}. \quad (2.82)$$

Die Parameter, die sich auf die Fluoreszenzfluktuationen auswirken, werden zu einem Parameter $\eta = I_0 \cdot P_{\text{Det}} \cdot \sigma \cdot \Phi$ zusammengefasst mit I_0 als Amplitude der räumlichen Verteilung der Anregungsenergie. Quantifiziert werden können die gemessenen zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen $\delta F(t)$ (Abbildung 2.22 (b)) über ein analytisches mathematisches Werkzeug, die Autokorrelation. Sie ist, anschaulich betrachtet, ein Maß für die Selbstähnlichkeit eines Signals unter einem bestimmten zeitlichen Versatz τ . Mit

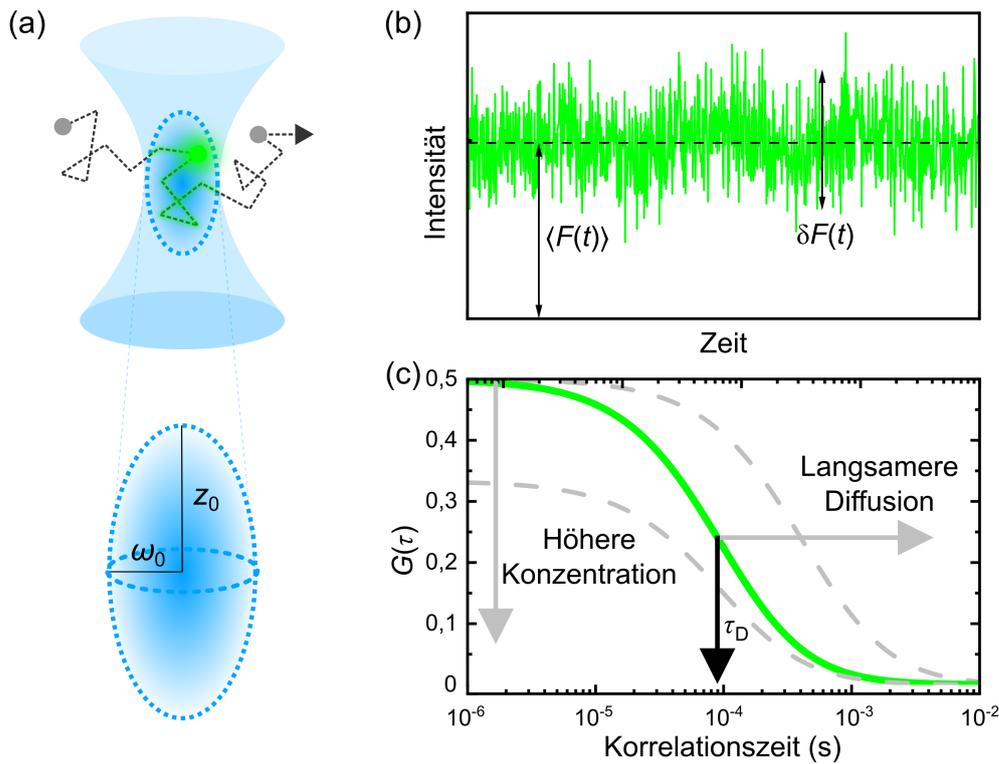


Abbildung 2.22: Grundlagen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie: (a) Brownsche Diffusion eines fluoreszierenden Teilchens durch den Laserfokus, dessen geometrisches Ausmaß durch die Fokusparameter für ein 3D-Gaußvolumen ω_0 und z_0 gegeben ist. (b) Ein beispielhafter Verlauf eines gemessenen zeitlichen Intensitätsverlaufs einer FCS-Messung. $\langle F(t) \rangle$ ist der zeitliche Mittelwert des Signals und $\delta F(t)$ die Fluoreszenzfluktuation am Zeitpunkt t . (c) Einfluss von Teilchenanzahl und Diffusionsgeschwindigkeit auf den Verlauf einer FCS-Autokorrelationskurve. Verändert nach [113].

der Autokorrelationsanalyse können wichtige Informationen über die fluoreszierenden Partikel gewonnen werden, u. a. die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen, somit auch die Diffusionskonstante sowie die mittlere Teilchenanzahl im Beobachtungsvolumen über die gesamte Messzeit. Die normierte Autokorrelationsfunktion ist wie folgt definiert:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle F(t) \cdot F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1. \quad (2.83)$$

Bei Betrachtung von lediglich frei diffundierenden Teilchen in einem dreidimensionalen Volumen mit Diffusionskoeffizient D folgt [112, 114]: Durch Einsetzen von Gleichung 2.81 in 2.83, unter der Annahme, dass sich die in η enthaltenen Parameter über

die Messzeit nicht ändern⁷, d. h. $\delta\eta = 0$, ergibt sich folgende Korrelationsamplitude ($t = 0$):

$$G(\tau) = \frac{\int_V \int_{V'} V_{3\text{DGau\ss}}(\vec{r}) \cdot V_{3\text{DGau\ss}}(\vec{r}') \cdot \langle \delta C(\vec{r}, 0) \cdot \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \cdot \int_V V_{3\text{DGau\ss}}(\vec{r}) dV)^2} \quad (2.84)$$

mit

$$\langle \delta C(\vec{r}, 0) \cdot \delta C(\vec{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \cdot \frac{1}{(4 \cdot \pi \cdot D \cdot \tau)^{(3/2)}} \cdot e^{-\frac{(\vec{r}-\vec{r}')^2}{4 \cdot D \cdot \tau}}. \quad (2.85)$$

Unter Berücksichtigung der Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten und der Korrelationszeit der Teilchendiffusion⁸

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot D} \quad (2.86)$$

durch das Beobachtungsvolumen

$$V_{\text{Beob}} = \frac{(\int_V V_{3\text{DGau\ss}}(\vec{r}) dV)^2}{\int_V V_{3\text{DGau\ss}}^2(\vec{r}) dV} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0 \quad (2.87)$$

liefert das Auswerten der Integrale in Gleichung 2.84 schließlich die vereinfachte Form der Autokorrelationsfunktion:

$$G_{3\text{D}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D \cdot S^2}\right)}}. \quad (2.88)$$

Hierbei wurden die Fokusvolumenparameter zur Vereinfachung zu einem Faktor $S = z_0/\omega_0$ zusammengefasst. Ein beispielhafter Verlauf einer Autokorrelationsfunktion für die Diffusion einer Teilchenart durch ein dreidimensionales, gaußförmiges Beobachtungsvolumen ist in Abbildung 2.22 (c) dargestellt. Die mittlere Teilchenanzahl im Beobachtungsvolumen wirkt sich durch ihr Verhältnis $G(0) = 1/\langle N \rangle$ antiproportional auf die Amplitude der Autokorrelationsfunktion aus. Durch Kenntnis des Amplitudenwerts der Autokorrelationsfunktion $G(0)$ und der Größe des Beobachtungsvolumens V_{Beob} können Rückschlüsse auf die mittlere Teilchenanzahl sowie die mittlere Teilchenkonzentration getroffen werden:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{Beob}} \cdot \langle C \rangle}. \quad (2.89)$$

⁷ Die Annahme, dass die Anzahl der emittierten Photonen pro Fluorophor während einer Messung konstant bleibt, ist nicht immer gültig. Zum Beispiel kann es zu einem mit der Fluoreszenz konkurrierenden Übergang in einen „dunklen“ Triplett-Zustand kommen.

⁸ τ_D wird auch als mittlere Verweildauer eines Teilchens im Beobachtungsvolumen bezeichnet.

Anhand des Fokusp parameterwerts ω_0 und der ermittelten Korrelationszeit τ_D kann der Diffusionskoeffizient

$$D = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot \tau_D} \quad (2.90)$$

und daraus über die Stokes-Einstein-Gleichung 2.75 der hydrodynamische Radius der Teilchen berechnet werden [112]. Außerdem lässt sich das konfokale Volumen

$$V_{\text{Konf}} = \int_V V_{3\text{DGauß}}(\vec{r}) dV \quad (2.91)$$

über die Beziehung $V_{\text{Konf}} = 2^{-3/2} \cdot V_{\text{Beob}}$ aus dem effektiven Beobachtungsvolumen berechnen. Letzteres kann durch das Messen der FCS-Kurve einer Referenzprobe bekannter Konzentration und Diffusionskonstante bestimmt werden.

2.7.2. Linienraster-FCS

Klassische FCS-Messungen werden mit einem statischen Beobachtungsvolumen durchgeführt und eignen sich daher vor allem für Messungen von frei diffundierenden, fluoreszierenden Teilchen in Lösung. Bei vielen aktuellen Fragestellungen in der Biowissenschaft sind jedoch komplexere Systeme von Interesse. Beispielsweise sind einige Rezeptorproteine aufgrund ihrer Membrangebundenheit in ihrer Bewegung eingeschränkt und diffundieren daher, im einfachsten Fall, auf einer zweidimensionalen Zellmembran.

Da Membranproteine im Vergleich zu frei diffundierenden Farbstoffen oder Proteinen in Lösung relativ langsam diffundieren⁹, verweilen sie länger im Laserfokus und sind dadurch stärker von der Photobleichung betroffen. Zudem werden für eine genügende Statistik bei langsam diffundierenden Membranproteinen wesentlich längere Messzeiten benötigt. Auch Schwankungen in der Laserintensität oder Membranbewegungen können die Intensitätsverläufe in dieser Zeit stark beeinflussen. Allein aus diesen Gründen können Protein-Protein-Wechselwirkungen an der Zellmembran mit Hilfe von statischer FCS nur schwierig bis gar nicht untersucht werden. Die fortgeschrittene FCS-Variante der Linienraster-FCS, die in der Theorie bereits im Jahr 1986 von Petersen [115] vorgeschlagen wurde, ermöglicht es, diese Probleme zu umgehen. Experimentell wurde diese Technik erst einige Jahre später verwirklicht, erstmals im Labor von Petra Schwille [116].

⁹ Der Diffusionskoeffizient von einem Farbstoff in wässriger Lösung liegt meist bei etwa $100 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$, der von membrangebundenen Rezeptorproteinen im Bereich von $0,01 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ [112].

Im Idealfall rastert der Laserfokus hierbei senkrecht durch die Zellmembran, die durch ihre Dicke im Bereich einiger Nanometer [117, 118] im Vergleich zum Laserfokus als zweidimensionale Ebene angenommen werden kann. Ausschlaggebend für die Wahl der Autokorrelationsfunktion zur Anpassung der Daten ist der Überlapp des Konfokalsvolumens mit der Zellmembran, welcher nun das Beobachtungsvolumen bzw., unter Vernachlässigung der Membrandicke, die Beobachtungsfläche widerspiegelt. Hierbei gilt es zwei Fälle zu unterscheiden, das laterale und das axiale Linienrastern durch die Zellmembran (Abbildung 2.23). Im Falle des lateralen Linienrastern wird der Laserfokus entlang einer seiner lateralen Achsen gerastert (z. B. entlang der y-Achse, Abbildung 2.23 (a)). Der Beobachtungsquerschnitt, den der Laserfokus beim Rastern mit der Zellmembran bildet, hat die Form einer Ellipse mit einer Beobachtungsfläche von $A_{\text{eff}} = \pi \cdot \omega_0 \cdot z_0$ und hängt somit von beiden Fokusparametern ω_0 und z_0 ab. Für die Autokorrelationsfunktion der lateralen Linienraster-FCS folgt:

$$G_{\text{lateral}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D S^2}\right)}}. \quad (2.92)$$

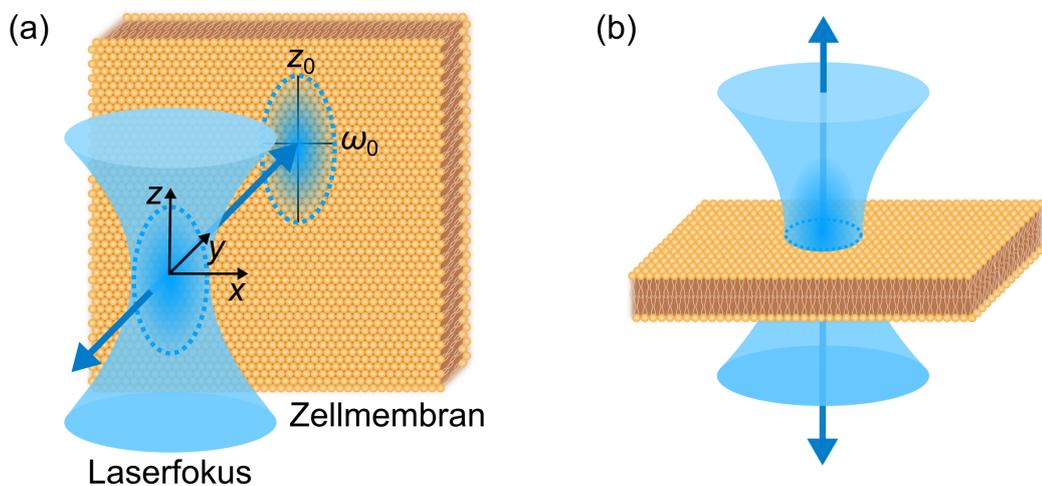


Abbildung 2.23: (a) Laterale und (b) axiale Linienraster-FCS an einer vereinfachten Zellmembran ohne Membranwölbungen. Ein großer Vorteil des axialen Rasterns gegenüber dem lateralen Rastern ist die Tatsache, dass der Beobachtungsquerschnitt mit dem Laserfokus nur noch von einem Fokusparameter abhängt und somit die Anpassung der Messdaten erleichtert. Zur besseren Veranschaulichung ist die Lipidschicht in Beziehung auf den Laserfokus vergrößert dargestellt, d. h. in dieser Abbildung nicht maßstabsgetreu gezeichnet.

Beim axialen Linienrastern reduziert sich die Beobachtungsfläche auf einen Kreis (Abbildung 2.23 (b)), die nun nur noch von ω_0 abhängt mit $A_{\text{eff}} = \pi \cdot \omega_0^2$, was die Anpassung der Messdaten durch eine vereinfachte Form der Autokorrelationsfunktion für die axiale Linienraster-FCS erleichtert [114]:

$$G_{\text{axial}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)}. \quad (2.93)$$

Die Membran lebender Zellen gleicht einem über den Nukleus aufgespannten „Zelt“, wodurch sie meist schräg zur Probengefäßoberfläche ausgerichtet ist. Lebende adhärenente Zellen bewegen sich zudem bevorzugt entlang der Probengefäßoberfläche fort. Dadurch wird hauptsächlich die Membran senkrecht zur Probengefäßoberfläche verzogen. Beim lateralen Rastern wird der Laserfokus von der Seite durch die Zellmembran gerastert, wodurch sich der Beobachtungsquerschnitt bei sich bewegenden Zellen aufgrund der schrägen Membranen deutlich verzieht.

Im Gegensatz dazu bietet das axiale Rastern den Vorteil, dass der Rastervorgang auch durch die untere Zellmembran stattfinden kann, die durch ihre Adhäsion an die Oberfläche der Probenkammer für Membranfluktuationen weniger anfällig ist.

Generell werden die fluoreszenzmarkierten Membranproteine bei der Linienraster-FCS effektiv für nur einen Bruchteil der Gesamtmesszeit angeregt, wodurch sich die Photobleichung reduziert. Im Vergleich zum lateralen Rastern fällt beim axialen Rastern aufgrund der kleineren Beobachtungsfläche die durchschnittliche Verweildauer der fluoreszierenden Teilchen in dieser zudem kürzer aus. Dadurch können mittels axialer Linienraster-FCS Messungen mit guter Statistik in wesentlich kürzerer Zeit erfolgen. Näheres zum direkten Vergleich der lateralen und axialen Linienraster-FCS findet sich in Kapitel 3.5.

Axiales Linienrastern kann durch den Einsatz einer TAG-Linse (engl. *tunable acoustic gradient index of refraction lens*) realisiert werden. Dieses optische Element ist ein Vertreter der adaptiven Optik und basiert auf dem Einsatz von Schallwellen, welche die Wellenfront eines einfallenden Lichtstrahls modulieren. Der Aufbau einer TAG-Linse setzt sich vereinfacht aus einer piezoelektrischen Kammer mit zwei eingebauten Glasfenstern zusammen, welche dem ein- und ausfallenden Strahl das Passieren der Linse ermöglichen. Im Inneren der Kammer befindet sich eine Brechungsflüssigkeit, in welcher durch eine anliegende Wechselspannung, meist im Hochfrequenzbereich, eine stehende Schallwelle erzeugt wird. Die daraus resultierenden Dichteunterschiede führen zu Variationen des Brechungsindex in der Flüssigkeit, wodurch die Wellenfront bzw. der Lichtstrahl unterschiedlich fokussiert wird. Die Fokusvariation findet im

100 kHz-Bereich [119, 120] statt mit einem effektiv in axialer Richtung verbreiterten Fokus im Mikrometerbereich. Der Zusammenhang zwischen Amplitude, Frequenz und resultierenden Brechungsindex der TAG-Linse ist äußerst komplex, lässt sich jedoch numerisch berechnen [121].

2.7.3. Zweifarben-FCS: Kreuzkorrelation

Klassische FCS ist ein mächtiges Werkzeug zur Bestimmung von Diffusionseigenschaften und Konzentrationen von fluoreszenzmarkierten Partikeln in Lösung oder Membranen. In der Biologie und Medizin gehen allerdings einige Fragestellungen einen Schritt weiter und wollen klären, ob sich ein bestimmter Ligand an einen Rezeptor bindet, ihn inhibiert oder Signalwege aktiviert. Die geeignete Messmethode dafür bietet eine Erweiterung der klassischen FCS, die FCCS (engl. *fluorescence cross-correlation spectroscopy*), welche auf der Kreuzkorrelationsanalyse der Messsignale von zwei Farbkanälen basiert [122].

Gehen zwei Bindungspartner eine Bindung ein, so erhöht sich ihr gemeinsamer, hydrodynamischer Radius (Stokes-Einstein-Gleichung 2.75) somit auch ihr Volumen V , ihre Molekülmasse MM und folglich der via FCS gemessene Diffusionskoeffizient:

$$D \propto \frac{1}{\tau_D} \propto \frac{1}{\sqrt[3]{V}} \propto \frac{1}{\sqrt[3]{MM}}. \quad (2.94)$$

Dieser Diffusionsunterschied ist durch FCS in lediglich einem Farbkanal messbar, sofern die gemessenen, fluoreszierenden Teilchen nach der Bindung extrem verlangsamt werden, z. B. durch die Bindung eines fluoreszenzmarkierten Proteins an einen viel größeren Bindungspartner in Lösung oder durch Bindung an einen Membranrezeptor [122]. Betrachtet man allerdings Membranproteine, so ist ein Unterschied im Diffusionskoeffizienten durch Bindungsprozesse oder Clusterbildung nahezu unmöglich nachzuweisen. Dies ist anhand der Saffman-Delbrück-Gleichung ersichtlich [102, 103] (Kapitel 2.6). Eine Lösung für dieses Problem bietet die FCCS, die mittels Kreuzkorrelationsanalyse die gemessenen Intensitätssignale von zwei getrennten Farbkanälen auf Ähnlichkeit prüft. Diffundieren zwei mit unterschiedlichen Farbstoffen versehene Proteine durch Bindung gemeinsam durch das Beobachtungsvolumen, so ähneln sich die zeitlichen Verläufe der Fluoreszenzfluktuationen in beiden Farbkanälen stark. Daher können mittels Kreuzkorrelationsanalyse spezifische Bindungen zweier Zielproteine detektiert werden. Dies wäre mit einer reinen Autokorrelationsanalyse in nur einem Farbkanal nicht möglich [122, 123]. Betrachtet man nur die Diffusion des fluoreszenzmarkierten Zielproteins A, so kann sich dessen Diffusionskoeffizient auch durch andere

Ursachen als die Bindung mit einem unmarkierten Zielprotein B ändern. Andere Proteine oder Bestandteile des Inneren einer Zelle können mit Zielprotein A wechselwirken oder deren Diffusionsweg blockieren und so eine Änderung des Diffusionskoeffizienten zur Folge haben.

Analog zur Gleichung 2.83 ist die Gleichung der Kreuzkorrelation zweier Signale aus unterschiedlichen Farbkanälen (g: grün, r: rot) definiert als:

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle \delta F_g(t) \cdot \delta F_r(t + \tau) \rangle}{\langle F_g(t) \rangle \cdot \langle F_r(t) \rangle} = \frac{\langle F_g(t) \cdot F_r(t + \tau) \rangle}{\langle F_g(t) \rangle \cdot \langle F_r(t) \rangle} - 1. \quad (2.95)$$

Für den Fall einer freien Diffusion in 3D ergibt sich für die Kreuzkorrelation folgende Gleichung [112]

$$G_{gr}(\tau) = \frac{\langle C_{gr} \rangle}{V_{\text{eff}} \cdot (\langle C_g \rangle + \langle C_{gr} \rangle) \cdot (\langle C_r \rangle + \langle C_{gr} \rangle)} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_x}}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\omega_{\text{eff}}^2}{z_{\text{eff}}^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_{D_{gr}}}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.96)$$

mit den Parametern $\omega_{\text{eff}} = \sqrt{\omega_r^2 + \omega_g^2}$ und $z_{\text{eff}} = \sqrt{z_r^2 + z_g^2}$ für das effektive Beobachtungsvolumen V_{eff} . Die mittlere Konzentration der ungebundenen grün- bzw. rot-fluoreszierenden Teilchen ist durch $\langle C_g \rangle$ bzw. $\langle C_r \rangle$ und die mittlere Konzentration der gebundenen Komplexe durch $\langle C_{gr} \rangle$ gegeben.

Für FCCS-Experimente an Proteinen in Zellmembranen kann, bei einem perfekten Überlapp der Beobachtungsflächen beider Farbkanäle, die Konzentration der gebundenen Komplexe durch die Amplituden der Auto- und Kreuzkorrelationskurven gewonnen werden [124], durch

$$\frac{C_{gr}}{C_{gr} + C_g} = \frac{G_{gr}(0)}{G_r(0)} \quad \text{und} \quad \frac{C_{gr}}{C_{gr} + C_r} = \frac{G_{gr}(0)}{G_g(0)}, \quad (2.97)$$

wobei $C_{g,r,gr}$ für die Konzentrationen der grünen, roten und gebundenen Teilchen steht. In der Realität stimmen die Beobachtungsflächen verschiedener Farbkanäle allerdings aufgrund ihres Wellenlängenunterschieds oder nicht optimal justierter optischer Elemente nicht überein. Die maximal erreichbare Amplitude der Kreuzkorrelationsfunktion bei gut justierten Beobachtungsflächen findet sich schließlich für:

$$G_{gr}(0) = \frac{2}{G_g(0)^{-1} + G_r(0)^{-1}}. \quad (2.98)$$

Sie hängt sowohl von der Gesamtmenge an grünen und roten Molekülen als auch von der Menge an gebundenen Komplexen ab. Wenn alle Moleküle erfolgreich mit

funktionellen Fluorophoren in beiden Farbkanälen markiert wurden, dann besitzt die Kreuzkorrelationsamplitude denselben Wert wie die Autokorrelationsamplitude im grünen und roten Farbkanal. Existieren jedoch ausschließlich einfarbig markierte Moleküle, so fällt die Amplitude auf null ab.

3. Methoden

3.1. Biologische Methoden

3.1.1. Expression von Fusionskonstrukten

Ein Fusionskonstrukt, das man für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet, besteht aus einem Zielgen, an welches das Gen eines fluoreszierenden Proteins gekoppelt ist. Für die Expression der Fusionskonstrukte in eukaryotischen Zellen, muss diesen ein Protein-Bauplan in Form von DNA oder mRNA eingeschleust werden (Abbildung 3.1 (a)). Der DNA-Code für das Fusionskonstrukt befindet sich üblicherweise auf einem Plasmid, einem DNA-Ring, der das Zielgen und das Gen für das ausgewählte fluoreszierende Protein enthält. Der genetische Code des fluoreszierenden Proteins wird normalerweise entweder vor oder nach dem Zielgen eingefügt, d. h. entweder C-terminal oder N-terminal. Auf dem Plasmidring befinden sich außerdem Resistenzgene gegen Antibiotika. Durch die Zugabe des passenden Antibiotikums zum Zellkulturmedium können stabile Zelllinien generiert und die DNA dauerhaft ins Genom eingebaut werden. Die Zellen, die das Plasmid mit dem Resistenzgen für das verwendete Antibiotikum erfolgreich aufgenommen haben, sind resistent und überleben die Behandlung mit dem Antibiotikum. Die übrigen Zellen hingegen sterben aufgrund der fehlenden Resistenz. Damit das fluoreszierende Protein die Funktionalität des Zielproteins nach Expression nicht hindert, wird zwischen den beiden Proteinen meist ein flexibler Linker eingebaut [125]. Das Plasmid kann in die Zelle u. a. durch Transfektion¹ mit einem kommerziell erhältlichen Transfektionsreagenz eingeschleust werden. In der Zelle angekommen wird das Plasmid im Nukleus durch RNA-Polymerasen in einsträngige mRNA umgeschrieben, was auch als Transkription bezeichnet wird. Diese mRNA-Stränge werden von Ribosomen gelesen und das gewünschte Fusionsprotein schließlich synthetisiert bzw. exprimiert. Dieser Prozess wird auch Translation genannt.

Neben der transienten oder stabilen Transfektion, die auf dem Einschleusen von Fremd-DNA beruht, gibt es mittlerweile auch zahlreiche Werkzeuge zur Editierung des vorhandenen Genoms in der Zielzelle. Das CRISPR/Cas9-System zählt hierbei zu den

¹ Bei Bakterien spricht man hier von einer Transformation

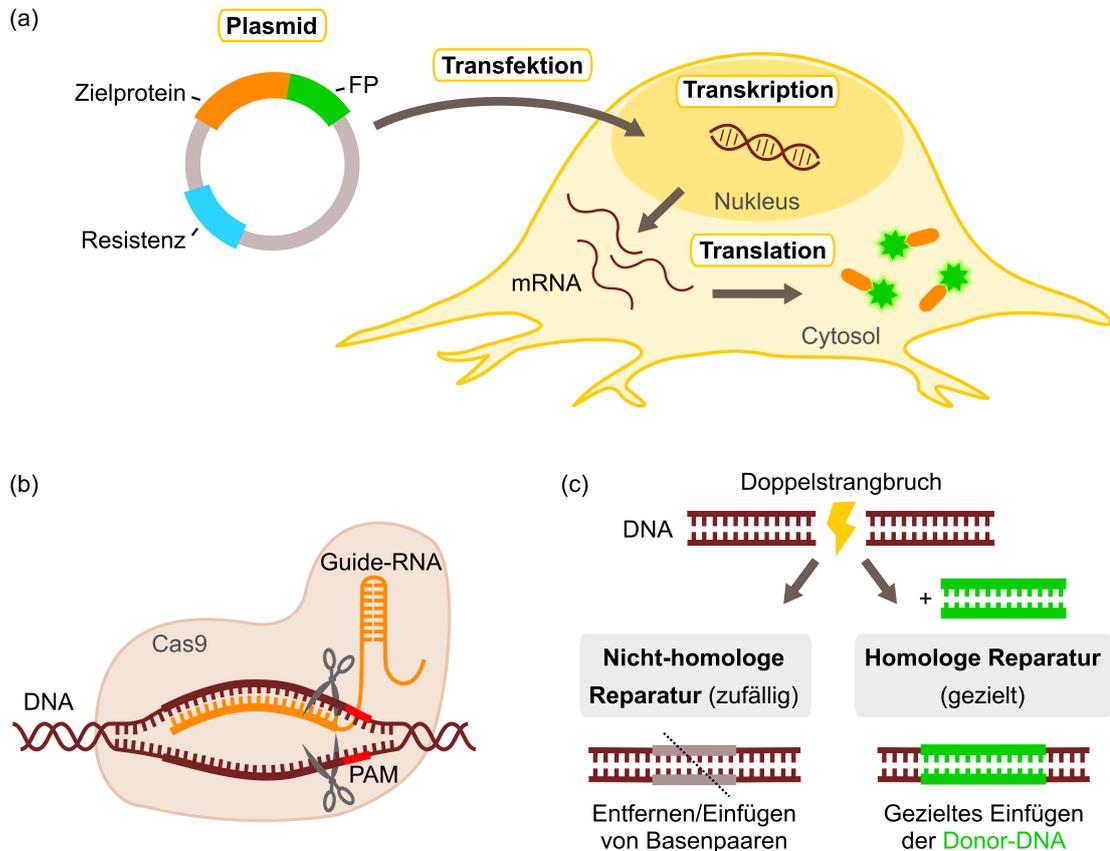


Abbildung 3.1: Genetische Werkzeuge zur Expression eines Fusionsproteins: (a) Der genetische Code des Fusionsproteins wird durch ein Plasmid über eine Transfektion in eine Zelle geschleust. Im Nukleus der Zelle findet die Transkription der DNA zu mRNA statt. Durch die Translation der mRNA in eine Aminosäuresequenz durch Ribosome wird das Fusionsprotein synthetisiert. (b) In der CRISPR/Cas9-Geneditierung findet das Cas9-Protein die Schnittstelle des Zielgens durch eine Guide-RNA in der Nähe einer PAM-Sequenz. Dort wird die DNA des Zielgens aufgespalten. (c) Der dadurch entstandene Doppelstrangbruch kann entweder zufällig durch nicht-homologe Reparatur oder gezielt durch homologe Reparatur repariert werden. Durch die nicht-homologe Reparatur werden Basenpaare zusätzliche eingefügt oder sogar entfernt. Bei der homologen Reparatur wird eine beigefügte Donor-DNA zur Reparatur in den Doppelstrangbruch eingebaut. Verändert nach [126, 127].

meistgenutzten Geneditierungswerkzeugen [126] (Abbildung 3.1 (b)). Mit Hilfe einer vorgefertigten „Guide-RNA“, die dem Cas9-Protein den Weg zum Zielgen weist, können an den gewünschten DNA-Stellen gezielt Doppelstrangbrüche erzeugt werden. Voraussetzung beim konventionellen CRISPR/Cas9-System für das erfolgreiche

Andocken des Cas9-Proteins an das Zielgen ist eine bestimmte DNA-Sequenz, die sogenannte PAM-Sequenz (engl. *Protospacer Adjacent Motif*), die in der Zielregion vorhanden sein muss [127]. Das Cas9-Protein kann nun einen Doppelstrangbruch an der gewünschten Sequenzstelle erzeugen (Abbildung 3.1 (c)). Dieser Bruch in der DNA kann über zwei Mechanismen repariert werden, entweder zufällig durch nicht-homologe Reparatur oder gezielt durch homologe Reparatur. Bei der nicht-homologen Reparatur werden an der Bruchstelle zusätzliche Basenpaare eingefügt oder sogar entfernt [128]. Im Gegensatz dazu wird bei der homologen Reparatur eine beigefügte Donor-DNA in den Doppelstrangbruch eingebaut und der DNA-Bruch somit repariert [129]. Mit dem CRISPR/Cas9-System kann das Genom zwar gezielt modifiziert werden, jedoch nur zu einem bestimmten Anteil. Das Zielgen im Genom kann in verschiedenen Varianten, sogenannten Allelen, vorliegen. Wenn alle Allele erfolgreich geneditiert wurden, so wird von einer homozygoten Editierung des Genoms gesprochen, anderenfalls verbleibt das Genom auf das Zielgen bezogen heterozygot. Koch et al. [130] etablierten 2019 ein Protokoll, mit welchem sie bis zu 70 % der Zielgene homozygot mit fluoreszierenden Proteinen markieren konnten.

3.1.2. Vorbereitung der biologischen Proben

3.1.2.1. Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden für optimale Wachstumsbedingungen zellgerecht in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ gehalten. Als Kulturgefäß wurden belüftete Zellkulturflaschen mit 12 cm² Wachstumsfläche verwendet. Je nach Wachstumsrate wurden die Zellen 2-3 Mal in der Woche passagiert (Protokoll A.1.3). Es wurde zudem darauf geachtet, dass die Zellen nicht zu lange in Kultur blieben, d. h., ab der Passagennummer 20 wurden sie entsorgt und neue Zellen aus dem in Flüssigstickstoff befindlichen Zellvorrat aufgetaut (Protokoll A.1.4).

Voraussetzung hierfür war ein ausreichender, in Flüssigstickstoff gelagerter Vorrat an Zellen. Der Zellvorrat wurde nach Protokoll A.1.5 regelmäßig angelegt. Um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch Mykoplasmenkontaminationen auszuschließen, wurden die Zellen zudem ebenfalls regelmäßig auf Mykoplasmen untersucht.

3.1.2.2. Probengefäße zur Mikroskopie

Als Probengefäß kamen, sowohl für die Referenzproben (z. B. Alexa-Farbstoffe) als auch für die Zellmessungen, 8-Kammerdeckgläser (Nunc Lab-Tek II Chamber Slide,

VWR, Darmstadt) zum Einsatz. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die verwendeten 8-Kammerdeckgläser für das Gewährleisten einer verbesserten Zelladhäsion mit Fibronectin (F1141, Sigma-Aldrich) beschichtet (Protokoll A.1.2).

3.1.2.3. Aussäen der Zellen und Einbringen des genetischen Codes

Vor jedem Zellexperiment wurden die Zellen bis zu einer Zelldichte von ca. 90 % kultiviert und anschließend in die Probengefäße gesetzt (Protokoll A.1.3). Für die Expression gewünschter Fusionskonstrukte wurden die Zellen mit Xfect (Takara Bio Inc., Kusatsu, Shiga, Japan) transfiziert. Das in dieser Arbeit verwendete Transfektionsprotokoll (Protokoll A.1.6) lehnt sich an das Herstellerprotokoll [131] an. Die DNA- und Xfect-Mengenangaben wurden an die Zellkulturfläche, an die verwendete Zelllinie und an das verwendete Plasmid angepasst. Typischerweise wurden die Zellen am Vortag vor der geplanten Messung in mit Fibronectin beschichtete 8-Kammerdeckgläser ausgesät und etwa 1-6 h nach der Aussaat (abhängig von der Zeit, die die jeweilige Zelllinie zur Adhäsion benötigt) transfiziert.

3.1.2.4. Herstellung von konditionierten Medien

Das Zellkulturmedium, in dem Zellen für einen gewissen Zeitraum (meist mehrere Tage) kultiviert wurden, kann als konditioniertes Medium geerntet werden. Dieses enthält u. a. Proteine, die von den Zellen in diesem Zeitraum sekretiert wurden. Im Verlauf dieser Arbeit wurden konditionierte Medien in einem Inkubationszeitraum von etwa 3 – 4 Tagen sowohl mit adhären Zellen als auch mit Suspensionszellen hergestellt (Protokoll A.1.7).

3.1.2.5. Probenvorbereitung zur Konzentrationsbestimmung

Für Experimente zur quantitativen Bestimmung der Fluorophorkonzentration von Referenzproben oder konditioniertem Medium wurden ebenfalls Kammerdeckgläser oder mit Polyethylenglykol (PEG) passivierte Glasoberflächen verwendet [132]. Die nicht passivierten Kammerdeckgläser wurden vor der Messung mehrfach mit der Farbstofflösung für jeweils mindestens 15 Minuten inkubiert, um die Oberfläche zu sättigen. Anschließend wurde die Farbstofflösung durch eine frisch angesetzte Lösung ausgetauscht und direkt gemessen. Dies ist notwendig, da viele organische Farbstoffe und auch Proteine dazu neigen, an die Oberfläche der Kammerdeckgläser zu adsorbieren, wodurch die gemessene im Vergleich zur tatsächlichen Fluorophorkonzentration in Lösung niedriger ausfallen würde. Zusätzlich kann die Fluorophorkonzentration über

die Zeit aufgrund von Verdunstung der Probe abnehmen. Um dies zu vermeiden, wurden das Probengefäß außen mit Parafilm luftdicht verschlossen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die FCS-Messungen von Fluorophoren in Lösung immer 30 µm über der Oberfläche des Probengefäßes durchgeführt wurden, um möglichst weit entfernt von der unter Umständen mit Farbstoffen angereicherten Oberfläche zu sein.

3.1.3. TopFlash-Assay

Die relative Signalaktivität (kanonischer Wnt-Signalweg) von Zellen bzw. von konditionierten Medien wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von TopFlash-Assays bestimmt [133, 134]. Bei diesem Assay werden Zellen mit einem TopFlash-Plasmid transfiziert, welches das Glühwürmchen-Luziferasegen beinhaltet. Das Luziferasegen dient als TCF/LEF-gesteuertes Reportergen und führt bei der Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs zur Expression von Luziferase. Die Zugabe eines Substrats führt nach Reaktion mit der Luziferase zu einer Lumineszenz, deren Signal quantifiziert werden kann. Durch den Vergleich mit einer Kontrollprobe kann schließlich die relative Wnt-Aktivität einer bestimmten Probe ermittelt werden.

3.1.4. Western Blot

Bei einem Western Blot handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen [135]. Die Proteine werden entweder in ihrer natürlichen, nicht-denaturierten Form (z. B. Native PAGE) oder in denaturierter Form (z. B. SDS-PAGE) als Proteinlösung auf eine Trägermembran, beispielsweise ein Polyacrylamid-Gel, übertragen. Meist wird parallel eine Referenzprobe bzw. eine „Protein-Leiter“ mit Banden bekannter Molekülmasse aufgetragen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die Proteine entsprechend ihrer Größe bzw. Ladung unterschiedlich weit auf dem Gel (Gelelektrophorese). Die aufgetrennten Proteinbanden werden anschließend auf eine feste Trägermembran übertragen (Blotting). Zum Nachweis des Zielproteins werden heutzutage meist Antikörper-Farbstoff-Konjugate verwendet, welche spezifisch an das Zielprotein binden. Mit einem Transilluminator wird das Fluoreszenzsignal des fluoreszierenden Farbstoffs nach Anregung mit Licht passender Wellenlänge detektiert.

3.2. Fluoreszenzspektroskopie

Ein Fluorospektrometer, auch Fluorometer genannt, ist ein Messgerät, das mittlerweile in vielen Laboren anzutreffen ist. In dieser Arbeit wurde ein Fluorolog-3 Spektrofluorometer FL3-22 (HORIBA Jobin Yvon GmbH, Unterhaching) verwendet. Als Lichtquelle dient eine 450 W-Xenon-Hochdruck-Bogenlampe. Mit Hilfe eines Doppelspaltmonochromators wird das Anregungs- und Emissionslicht spektral zerlegt, wodurch die Anregungs- und Emissionswellenlänge frei wählbar sind. Das Licht wird mittels Photomultiplerröhre R928P in einem 90°-Winkel zur Anregung detektiert, was verhindert, dass das Anregungslicht auf den Detektor gelangt. Mit einem Fluorometer können sowohl Anregungs- als auch Emissionsspektren einer Probe aufgenommen werden. Beim Anregungsspektrum wird die Wellenlänge des detektierten Emissionslichts konstant gehalten und das Anregungslicht in einem bestimmten Wellenlängenbereich in 1 nm-Schritten durch einen Monochromator variiert (Abbildung 3.2). Analog dazu wird beim Emissionsspektrum die Anregungswellenlänge durch einen Monochromator konstant gehalten und das Emissionssignal der Probe wellenlängenabhängig als Spektrum in 1 nm-Schritten aufgezeichnet. Um nicht in den Sättigungsbereich des Detektors zu gelangen, muss die Spaltbreite der Monochromatoren so gewählt werden, dass die Signalintensität den Wert $2 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ nicht überschreitet. Das detektierte Signal wird sowohl auf die wellenlängenabhängige Effizienz des Detektors als auch auf die Fluktuationen des Anregungslichts korrigiert. Als Probengefäß wurde eine QS-Ultra-Mikro-Küvette (Hellma, Müllheim) mit einer Weglänge von 3 mm verwendet.

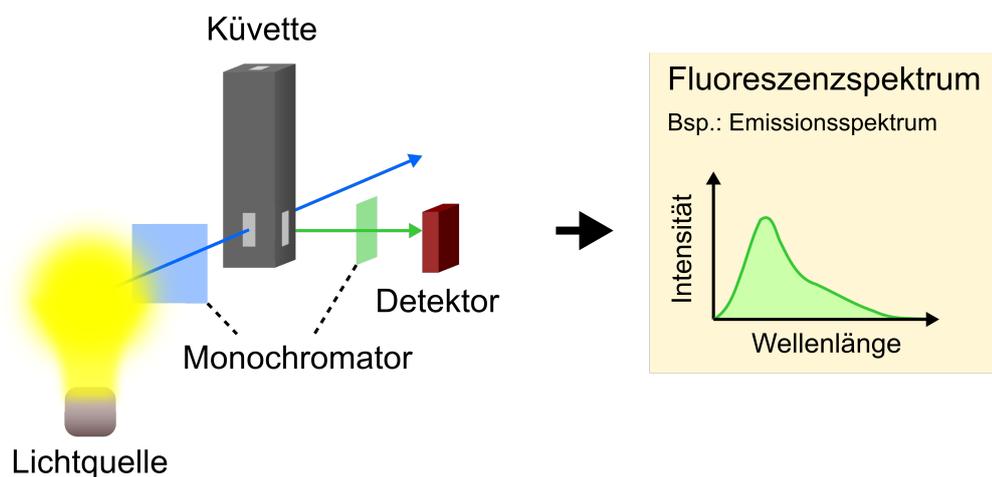


Abbildung 3.2: Schematischer Aufbau eines Fluorometers. Dabei befinden sich die Lichtquelle und der Detektor in einem Winkel von 90° zueinander.

Fluorometer können zur Konzentrationsbestimmung von fluoreszierenden Molekülen in Lösung angewendet werden. Mit Hilfe einer geeigneten Referenzprobe bekannter Konzentration, z. B. einer Lösung des zur Fluoreszenzmarkierung verwendeten Fluorophors, ist es durch die Messung des Fluoreszenzspektrums der zu untersuchenden Lösung möglich, bei gleichbleibendem Volumen den Fluorophorgehalt quantitativ zu bestimmen².

3.3. Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie

Ein Vorteil konventioneller Konfokalmikroskope ist die Reduzierung von lichtinduzierten, toxischen Effekten auf lebende Proben. Die Untersuchung schneller Prozesse (im Millisekundenbereich) bleibt jedoch angesichts der zeitlichen Einschränkung durch den Abrasterprozess verwehrt. Das von der japanischen Firma Yokogawa entwickelte Spinning-Disk-Konfokalmikroskop (engl. *spinning disk confocal microscope*, SDCM) ermöglicht dies mit einem Multistrahl-Abrasterverfahren [136]. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde ein kommerzielles Spinning-Disk-Konfokalmikroskop der Firma Andor (Andor Technology, Oxford Instruments, Abingdon, Oxfordshire, England) mit der Spinning-Disk-Einheit CSU-X1 (Yokogawa, Tokio, Japan) verwendet. Zentraler Bestandteil dieses Mikroskops ist ein konfokales Nipkow-Scheiben-System, das aus zwei simultan rotierenden Scheiben besteht (Abbildung 3.3). Auf einer dieser Scheiben befindet sich zur Fokussierung des Anregungslaserlichts eine Anordnung aus etwa 20000 Mikrolinsen, die jeweils einen Durchmesser von 50 μm und einen Linsenabstand von 250 μm aufweisen; auf der anderen Scheibe, der eigentlichen Nipkow-Scheibe, findet sich die gleiche Anzahl von Lochblenden, auf diese das Laserlicht durch die Mikrolinsen fokussiert wird. Durch den Zusatz der Mikrolinsenscheibe kann die Lichtausbeute durch die Nipkow-Scheibe von nur circa 4 bis 6 % auf etwa 40 bis 60 % gesteigert werden. Das Mikroskop verfügt über insgesamt fünf Laser mit Wellenlängen von 405 nm, 488 nm, 532 nm, 561 nm und 640 nm, um die Anregung von allen möglichen Fluorophorkombinationen im sichtbaren Wellenlängenbereich zu ermöglichen. Typische Anregungslaserleistungen befinden sich im Bereich weniger μW pro Fokus. Der Anregungslaserstrahl trifft zunächst auf die rotierende Scheibe mit den Mikrolinsen und wird dort in viele Teilstrahlen aufgespalten. Diese passieren einen dichroitischen Spiegel, werden dann auf die Lochblenden der Nipkow-Scheibe fokussiert

²Gerade bei der Verdünnung von Proteinlösungen ist auf eine sorgfältige Arbeitsweise zu achten, da Proteine dazu neigen, u. a. an Glasoberflächen zu adsorbieren. Deshalb ist es ratsam, die Verdünnungsschritte genauestens mittels Konzentrationsmessungen nachzuverfolgen.

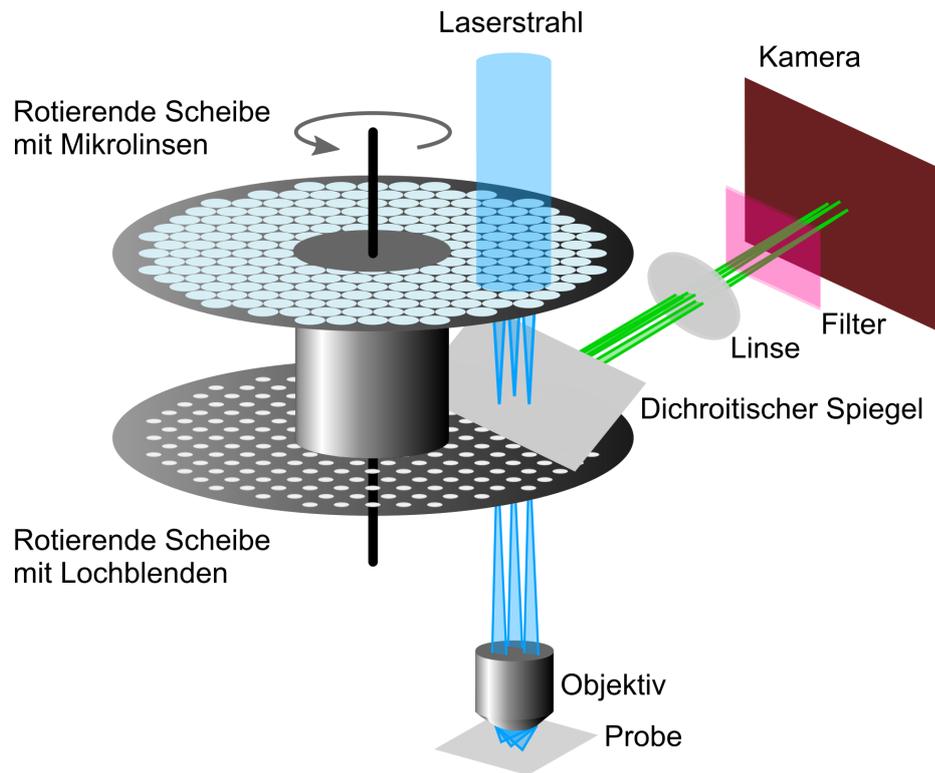


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Spinning-Disk-Konfokalmikroskops, verändert nach [137].

und schließlich über den Mikroskopkörper (IX81S1F-ZDC, Olympus, Tokio, Japan) und ein Objektiv (Öbobjektiv, APON 60x/1,49, Olympus) zur Probe geleitet. Ein Rotor dreht die zwei Scheiben mit hoher Geschwindigkeit, bis zu 10000 Umdrehungen pro Minute, sodass das Sichtfeld auf der Probe gleichzeitig mit ca. 1000 Laserfoki beleuchtet und abgerastert wird. Dadurch kann für den Abrasterprozess eine Rate von bis zu 2000 Bilder pro Sekunde erreicht werden. Das von der Probe ausgesandte Fluoreszenzlicht wird von dem Objektiv gesammelt und am dichroitischen Spiegel zum Detektionspfad reflektiert. Das Fluoreszenzsignal kann entweder simultan in zwei Kanälen von zwei EMCCD-Kameras (DU897, Andor, Belfast, Irland) oder durch eine schnell rotierende Filter-Einheit in bis zu 6 verschiedenen Farbkanälen auf nur einer EMCCD-Kamera aufeinanderfolgend detektiert werden. Der Detektionsbereich der EMCCD-Kameras entspricht einer Anordnung von 512×512 Pixeln, die einen Bereich der Probe von $(222 \times 222) \text{ nm}^2$ abdecken. Für den grünen Emissionskanal (z. B. eGFP, mClover) wird ein (525/50 nm)-, für den roten Emissionskanal (z. B. mCherry) ein (607/36 nm)- und für den dunkelroten Emissionskanal (z. B. mGarnet2) ein (685/40 nm)-Bandpass-Filter

(Brightline, Semrock, Rochester, New York) verwendet. Zudem ist die Probenkammer für Experimente an lebenden Zellen mit einer Inkubatoreinheit (W3720, Tokai Hit, Shizuoka-ken, Japan) und CO₂-Versorgung ausgestattet, um einen CO₂-Gehalt von 5 % zu gewährleisten. Für die Experimente in dieser Arbeit wurden Belichtungszeiten von 200 μ s pro Aufnahme gewählt. Das Zeitintervall zwischen zwei aufeinanderfolgende Zeitrafferaufnahmen eines Vesikeltransport-Experiments betrug typischerweise 15 s. Bei vier registrierten Positionen wurde das Zeitintervall für eine Position auf 1 min erhöht. Für Assoziations- bzw. Dissoziationsexperimente wurden Zeitintervalle von 100 s bzw. 300 s für eine Gesamtmessdauer von 1 h bzw. 3 h gewählt.

3.4. Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie

3.4.1. Aufbau des Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskops

Das in dieser Arbeit zur Einzelmolekül-Lokalisation verwendete Weitfeldmikroskop basiert auf einem inversen Mikroskop (Axiovert200, Zeiss, Jena), bei dem sich das Objektiv, in diesem Aufbau ein Ölimmersionsobjektiv (C-Apochromat, 63 \times , NA 1,2, Zeiss), unterhalb der Probe befindet (Abbildung 3.4). Die vier, zur Verfügung stehenden Anregungslaser mit Wellenlängen von 405 nm (OXX-LBX 405 nm, 300 μ W, Laser 2000, Weßling), 473 nm (LuxX 473-100, Omicron-Laserage Laserprodukte, Rodgau-Dudenhofen), 561 nm (Gem 561, Laser Quantum, Konstanz) und 639 nm (MRL-FN-639-500, Ultralasers, Ontario, Kanada) werden über ein Spiegelsystem aus dichroitischen Spiegeln (AHF, Tübingen) zusammengeführt. Der gebündelte Strahl der Anregungslaser durchquert einen akusto-optischen Modulator, auch AOTF genannt (engl. *acousto-optical tunable filter*) (AOTFnC-400.650, AA Opto-Electronic, Orsay Cedex), mit dem die Intensität der Anregungslaser präzise und wellenlängenabhängig reguliert werden kann. Der akusto-optische Modulator wird via LabVIEW (National Instruments, Austin, Texas) über eine Datenerfassungskarte (NI USB-6229 BNC, National Instruments) gesteuert. Hinter dem AOTF befinden sich zwei mögliche Lichtpfade, die über die Polarisation des Lichts gesteuert werden können. Der FRAP-Pfad wird für FRAP-Experimente (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*) eingesetzt und ist in Abbildung 3.4 durch eine violette, gestrichelte Linie dargestellt. Dieser Lichtweg kann über den Einschub eines $\lambda/2$ -Verzögerungsplättchens ausgewählt werden. Im Pfad für die Weitfeldbeleuchtung durchquert der Lichtstrahl zuerst einen polarisierenden Strahlteiler und wird dann über ein Teleskopsystem aus zwei Linsen aufgeweitet (10 \times). Dies soll eine möglichst homogene Ausleuchtung der Probe im Beobachtungsfeld (50 μ m \times 50 μ m) gewährlei-

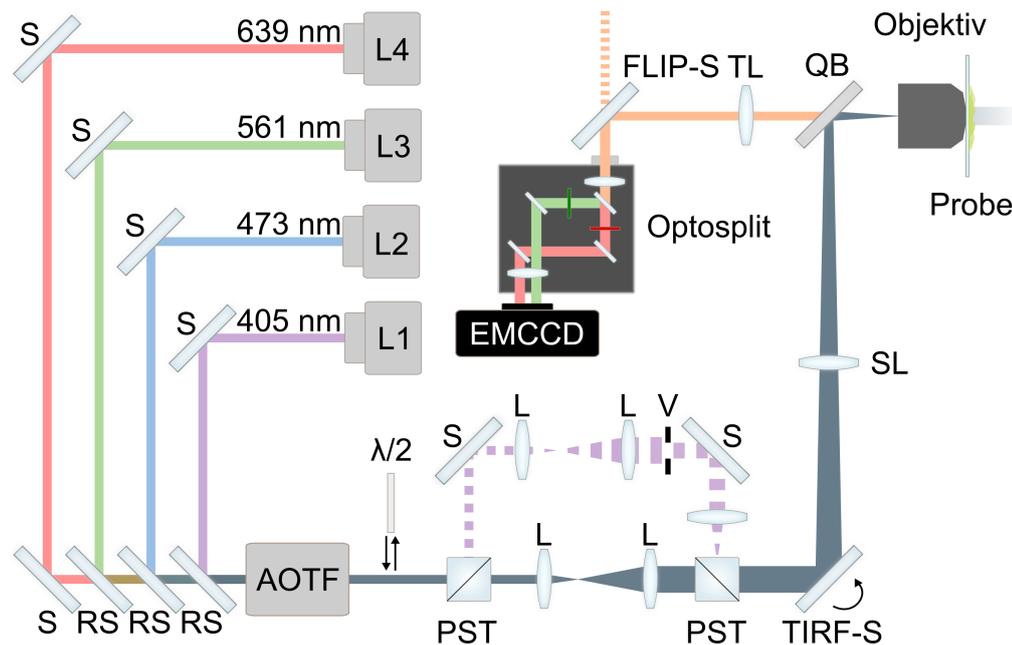


Abbildung 3.4: Aufbau des Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskops. Die folgenden Abkürzungen wurden verwendet: AOTF (engl. *acousto-optical tunable filter*); EMCCD (Kamera, engl. *electron-multiplying charge-coupled device*); FLIP-S (Spiegel zum Verstellen der Lichtwegrichtung); L (achromatische Linse); L1/L2/L3/L4 (Anregungslaser); PST (polarisierender Strahlteiler); QB (Quad-Band-Spiegel); RS (auf eine bestimmte Laserwellenlänge abgestimmter, reflektierender Spiegel); S (Spiegel); SL (Scanlinse); TIRF-S (TIRF-Spiegel); TL (Tubuslinse); $\lambda/2$ (Verzögerungsplättchen); V (steuerbarer Verschluss des Lichtwegs). Verändert nach [138].

sten. Für die Weitfeldbeleuchtung der Probe wird der Lichtstrahl über die Scanlinse auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert. Wird jedoch die Beleuchtung der Probe durch ein evaneszentes Feld bevorzugt, so kann dies durch das Kippen des TIRF-Spiegels erreicht werden. Das Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt und passiert im Anschluss einen Quad-Band-Spiegel (z. B. 405/473/561/640, AHF). Im Falle der simultanen Aufnahme von zwei Farbkanälen kann ein Optosplit (Optosplit II unit, Cairn Research, Kent, Vereinigtes Königreich) zur wellenlängenabhängigen, räumlichen Trennung des Fluoreszenzsignals eingesetzt werden. Dieser beinhaltet typischerweise einen austauschbaren, dichroitischen Kantenfilter (Langpass- oder Kurzpassfilter) zur Auftrennung des Fluoreszenzlichts: einen 580 nm-Langpass-Spiegel für z. B. eine YFP-mCherry-Fluorophorkombination und einen 640 nm-Kurzpass-Spiegel für z. B. eine mEosFP(rot)-mGarnet2-Fluorophorkombination. Für jeden Farbkanal wird zusätzlich ein passender Filter eingebaut: 525/45 nm und 641/75 nm für YFP/mCherry sowie 587/35 nm und 665 nm-Langpassfilter für mEosFP(rot)/mGarnet2 (Brightline,

Semrock, Rochester). Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgt über eine EMCCD-Kamera (Ixon Ultra X-7759, Andor, Belfast, Vereinigtes Königreich) mit einer Pixelgröße von 109 nm. Fluoreszenzmikroskopische Bilder werden durch die vom Hersteller (Andor) zur Verfügung gestellte Software aufgenommen. Meist handelt es sich dabei um einen Stapel aus mehreren tausend Aufnahmen. mEosFP*thermo* wurde für smDIMSA-Experimente mit einer 561 nm-Laserleistung von 20 bis 30 Wcm⁻² belichtet. Für konventionelle SMLM-Experimente wurden für mEosFP*thermo* Laserleistungen von 100 Wcm⁻² bis 400 Wcm⁻² verwendet. Die 488 nm- bzw. 640 nm- Laserleistung für Fluorophore im grünen bzw. dunkelroten Farbkanal lag typischerweise bei etwa 100 Wcm⁻². Für smDIMSA-Experimente wurden Belichtungszeiten von 75 ms pro Aufnahme, für die Explantat-Experimente 100 ms pro Aufnahme und für die mWnt3a-Experimente 50 ms pro Aufnahme gewählt. In Experimenten mit der Fluorophorkombination mEosFP*thermo*/mGarnet2 in fixierten Zellen wurde typischerweise zuerst mGarnet2 mit einem 640 nm-Laser belichtet und gebleicht, bevor der 561 nm-Laser für mEosFP*thermo* angeschaltet wurde. Dies lag daran, dass sich mGarnet2 mit dem 561 nm-Laser ebenfalls gut anregen lässt ($\approx 60\%$, [139]) und sich die Emissionsspektren der beiden fluoreszierenden Proteine spektral überschneiden, sodass das Fluoreszenzsignal von mGarnet2 bei Überexpression merklich in den mEosFP*thermo*-Farbkanal durchbrennt. Im Anschluss an ein SMLM-Experiment können die Aufnahmen mit Hilfe der Software a-livePALM [140] ausgewertet werden und in einem Bilderstapel einzelne Moleküle nicht nur lokalisiert, sondern auch zeitlich verfolgt werden.

3.5. Axiale Linienraster-FCS

Im Folgenden wird näher auf den Aufbau und die Funktionsweise des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops sowie im Anschluss auf die Datenanalyse für axiale Linienraster-FCS-Experimente eingegangen.

3.5.1. Optisches System des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops

Der Aufbau des Fluoreszenzmikroskops, welches für FCS- sowie für axiale Linienraster-FCS-Experimente in dieser Arbeit zum Einsatz kam, ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Er basiert ursprünglich auf der Arbeit von Dr. Per Niklas Hedde (AG Nienhaus, APH, KIT) [141] und wurde über die Jahre den gegebenen experimentellen Fragestellungen angepasst und stetig weiterentwickelt, u. a. zur Ermöglichung von STED-Experimenten [142] (engl. *stimulated emission depletion*), auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

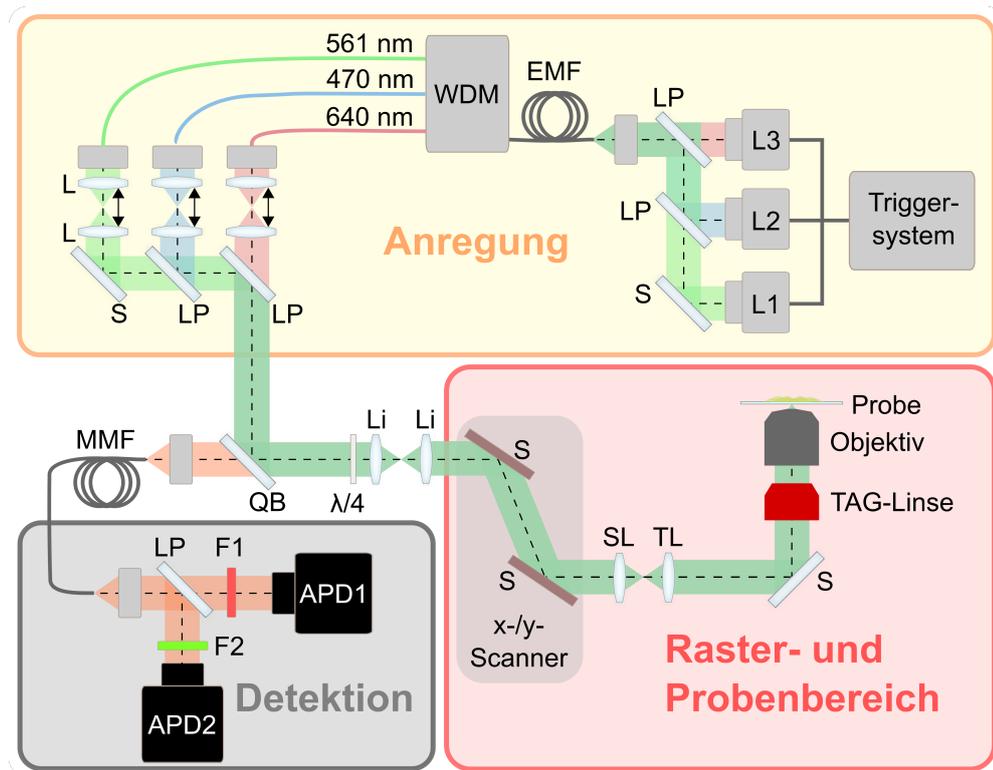


Abbildung 3.5: Aufbau des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops. Der Aufbau ist eingeteilt in drei farbliche Bereiche: Anregung (orange), Detektion (grau) und Raster- und Probenbereich (rot). Die folgenden Abkürzungen wurden verwendet: APD, Avalanche-Photodiode; EMF, Einzelmodenfaser; F, Filter; Li, achromatische Linse; L1/L2/L3, Anregungslaser; LP, dichroitischer Langpassfilter; MMF, Multimodefaser; QB, Quad-Band-Spiegel; S, Spiegel; SL, Scanlinse; TL, Tubuslinse; TAG-Linse, engl. *tunable acoustic gradient index of refraction lens*, WDM engl. *wavelength-division multiplexer*; $\lambda/4$ für das entsprechende Verzögerungsplättchen. Verändert nach [142, 143].

Für die Anregung eines breiten Spektrums an fluoreszierenden Markern stehen drei Wellenlängen zur Verfügung, die von gepulsten Diodenlaserquellen mit typischen Pulsbreiten von 100 ps erzeugt werden: 470 nm (LDH-P-C-470B, PicoQuant, Berlin), 561 nm (PDL 561, Abberior Instruments GmbH, Göttingen) und 640 nm (LDH-P-C-640B, PicoQuant). Durch Einsatz dieser Art von Laserquellen eignet sich der Mikroskopaufbau für die gepulste alternierende Anregung (Abschnitt 3.5.3). Getriggert werden diese Laser über ein 40/80 MHz Triggersystem. Die Triggersignale können entweder durch einen modengekoppelten Titan:Saphir-Laser (Ti:Sa) (Mai Tai HP, Newport Spectra-Physics, Darmstadt), einem festen Bestandteil des STED-Aufbaus, oder durch einen Signalgenerator erzeugt werden. Letzterer ist dem Ti:Sa-Triggersystem vorzuziehen, um den Verschleiß des Ti:Sa-Lasers durch STED-unabhängige Messungen bestmöglich zu re-

duzieren. Der von der Werkstatt (Michael Hippe, APH, KIT) entworfene und zusammengestellte Signalgenerator ist in einer Verzögerungsbox integriert, mit deren Hilfe auch der zeitliche Versatz zwischen beiden Laserpulsen eingestellt werden kann. Die Strahlen der Anregungslaser werden zunächst über einen Spiegel und zwei dichroitische Langpass-Spiegel (532 nm Langpassfilter, AHF Analysetechnik AG, Tübingen und 605 nm Langpassfilter, Thorlabs, Newton, New Jersey) in eine Einzelmodenfaser (EMF) (TW630R5A1, Thorlabs), eingekoppelt. Anschließend werden sie durch einen WDM (engl. *wavelength division multiplexer*) (RGB50HA, Thorlabs) wieder getrennt und über ein Linsen-Teleskopsystem geleitet. Dadurch wird die unabhängige, separate Justage zur Fokus- und Positionsoptimierung der drei Laserstrahlen gewährleistet, wodurch chromatische Aberrationen der Strahlen nach dem Objektiv korrigiert werden können. Die Strahlen werden schließlich über einen Spiegel und zwei dichroitische Langpass-Spiegel (LP) (575 nm longpass filter #64-627, Edmund Optics, Barrington, New Jersey; zt 532 RDC, AHF Analysetechnik AG) wieder zusammengeführt und über einen dichroitischen Quad-Band-Spiegel mit vier Reflexionsbanden (zt 405/473/561/640 RPC, AHF Analysetechnik AG) reflektiert. Um Polarisationsabhängigkeiten bei der Anregung der Fluorophore in der Probe zu vermeiden, wird das zuvor linear polarisierte Licht durch ein $\lambda/4$ -Plättchen (AQWP05M-600, Thorlabs) in zirkular polarisiertes Licht umgewandelt. Daraufhin passiert der Strahl ein x-/y-Scannersystem (Yanus V, TILL Photonics GmbH, Gräfelfing) aus zwei Ablenkspiegeln mit Galvanometerantrieb (Galvo-Spiegel), welches für laterales Rastern eingesetzt werden kann. Die Galvo-Spiegel werden über die Scanlinse und die Tubuslinse dann auf die Rückapertur des Objektivs abgebildet. Vor dem Objektiv befindet sich das Kernstück für das axiale Linienrastern, eine TAG-Linse (TAG lens 2.0, TAG Optics, Princeton, New Jersey), die von Dr. Peng Gao (AG Nienhaus, APH, KIT) erstmals in den Mikroskopaufbau implementiert wurde [144]. Sie ermöglicht das periodische, axiale Oszillieren des Laserfokus senkrecht zur Probenkammeroberfläche bzw. zur Zellmembran bei einer Rasterfrequenz von etwa 147 kHz und einer Rasteramplitude von ca. $5,4 \mu\text{m}$ (75 % Spannungsamplitude der TAG-Linse) (Abschnitt 3.5.5). Für die axialen Linienraster FCS-Messungen wurde ein Wasserimmersionsobjektiv (HCX PL APO 63x/1,20 W CORR CS 63x/1,2 bzw. HC PL APO 63x/1,20 W CORR CS2, Leica, Wetzlar) verwendet. Ein Ölimmersionsobjektiv (HCX PL APO CS 100x/1,46, Leica) steht ebenfalls zur Verfügung, falls das Experiment eine höhere numerische Apertur erfordert. Die laterale Positionierung der Probe erfolgt durch einen Linearaktor (Präzision $0,1 \mu\text{m}$, M-122, Physik Instrumente, Karlsruhe) und die axiale Positionierung des Objektivs durch einen Piezo-Nanofokussierer (Präzision von $0,5 \text{ nm}$, P-720, Physik Instrumente).

Das von der Probe nach der Anregung emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv bis hin zum dichroitischen Quadband-Spiegel zurückgeleitet und dort durch Transmission vom Anregungslicht getrennt. Der transmittierte Strahl wird über eine achromatische Linse in eine Multimodefaser (M31L02, Thorlabs) eingekoppelt, die hier als konfokale Lochblende wirkt. Der Lochblendendurchmesser kann an das Experiment angepasst werden (Kapitel 2.4.2), und lag für die Experimente in dieser Arbeit typischerweise bei 61,5 μm . Im Anschluss wird das Emissionslicht durch ein 555 nm Langpassfilter (Q 555 LP, Chroma, Vermont) in zwei Farbkanäle aufgeteilt, die jeweils mit einem entsprechenden Filter (F1, F2) versehen waren. Der grüne Emissionskanal wird typischerweise durch einen 525/50 nm Bandpassfilter (F2) (Brightline HC 525/50, Semrock, Rochester, New York) und der rote bzw. dunkelrote Emissionskanal durch einen 600/37 nm bzw. 676/37 nm Bandpassfilter (F1) (Brightline HC 600/37 bzw. 676/37, Semrock) gefiltert. Detektiert werden die Photonen durch APDs (τ -SPAD-50, PicoQuant; COUNT-T100, Laser Components GmbH, Olching) und deren Pulse durch ein DAQ-Gerät (engl. *data acquisition*) (NI-6229, National Instruments, Austin, Texas). Für präzise Messungen der Ankunftszeiten der Photonen und der relativen Verzögerungszeiten zum Triggersignal der Laser kommt ein TCSPC-System (engl. *time correlated single photon counting*) (SPC-150, Becker & Hickl GmbH, Berlin) zum Einsatz.

Das Auswerten der Messdaten erfolgte über eine in MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts) geschriebene Software, die von Dr. Peng Gao (AG Nienhaus, APH, KIT) zusammengestellt und deren Code an die Experimente individuell angepasst wurde.

3.5.2. Mikroskopzubehör für Messungen an lebenden Zellen

Um Messungen an lebenden Zellen zu ermöglichen, verfügt das axiale Linienraster-FCS-Mikroskop über ein speziell angefertigtes Inkubatorsystem (37 °C) mit CO₂-Zufuhr, welches auf die Bedürfnisse lebender Zellen abgestimmt ist. Hierbei ist sowohl die Temperatur der unmittelbaren Probenumgebung als auch die Menge an zugeführtem CO₂ manuell regelbar. Die Inkubatoreinheit beinhaltet einen Probenhalter für die Probenkammer und befindet sich in einem kommerziell erhältlichen Mikroskopkörper (DMi8, Leica). Eine zellfreundliche Umgebungstemperatur von 37 °C wird durch Beheizung der Inkubatorkammer, einschließlich des Objektivs gewährleistet. Der Probenhalter befindet sich auf einem Raster-Tisch, dessen Position entweder manuell durch Drehräder oder via Software am PC gesteuert werden kann. Das Mikroskop ist mit einer LED-Durchlichtbeleuchtung ausgestattet, wodurch die Qualität der Probe vorab begutachtet

und optimal positioniert werden kann. Zwei Kameraports am Mikroskop dienen als Ein- bzw. Ausgang für die Strahlen, die auf das Objektiv treffen oder aus dem Objektiv gesammelt werden sollen. Ein Kameraport ist in den Aufbau des Konfokalmikroskops integriert, der andere Port dient zum Auslesen von Bildinformationen mittels einer EMCCD-Kamera (iXon 887, Andor Technology, Belfast, Vereinigtes Königreich), mit deren Hilfe die Zellen vor einem Experiment via Durchlichtaufnahmen beobachtet und auf ihre Morphologie und Dichte überprüft werden können.

3.5.3. Gepulste alternierende Anregung für Messungen in zwei Farbkanälen

Für die axialen Linienraster-FCS-Messungen wurden die Fluorophore im grünen und roten Farbkanal durch gepulste alternierende Anregung (engl. *pulsed interleaved excitation*) [145] mit einem gepulsten 470 nm- und 560 nm-Laser angeregt (Abbildung 3.6). Die zeitliche Aneinanderreihung mehrerer Anregungslaserpulse wird an die Fluoreszenzlebensdauer der eingesetzten Fluorophore angepasst, sodass die Fluoreszenzphotonen eines Farbkanals nahezu komplett detektiert wurden, bevor ein weiterer Laserpuls generiert wird. Durch die Kenntnis der Pulsintervalle und der Verzögerungszeit zwischen den einzelnen Pulsen können die ankommenden Photonen an den Detektoren einem bestimmten Farbkanal zugeordnet werden. Die gepulste alternierende Anregung minimiert das spektrale Übersprechen erheblich und ermöglicht zudem kürzere Messzeiten, da die Fluoreszenzfluktuationen beider Farbkanäle in einem Rastervorgang praktisch gleichzeitig aufgenommen werden können.

In dem Aufbau des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops sendet der 470 nm Laser hierfür einen Triggerpuls an ein TCSPC-System, das das Triggersignal und die Zeit zwischen dem Triggersignal und der Ankunft eines Photons registriert. Die Ankunftszeiten der Photonen hängen im Allgemeinen von der Lebensdauer des emittierenden Fluorophors ab. Die Verzögerungszeit zwischen dem 470 nm- und 561 nm-Laserpuls ist mit einem selbstgebauten Verzögerungsgenerator auf etwa 12,5 ns eingestellt. Dies soll gewährleisten, dass das Fluoreszenzsignal als Antwort auf den ersten Laserpuls möglichst schon abgeklungen ist, bevor das zweite Zeitfenster für den nächsten Puls beginnt. Generell wurde in dieser Arbeit axiale Linienraster-FCS-Messungen an fluoreszenzmarkierten lebenden Zellen mit einer Laserleistung im grünen Kanal (470 nm) von $5 \mu\text{W}$ ($2,8 \text{ kWcm}^{-2}$) und im roten Kanal (561 nm) von $3 \mu\text{W}$ ($1,5 \text{ kWcm}^{-2}$) durchgeführt. Referenzproben wurden, sofern nicht anders angegeben, ebenfalls unter diesen Bedingungen gemessen.

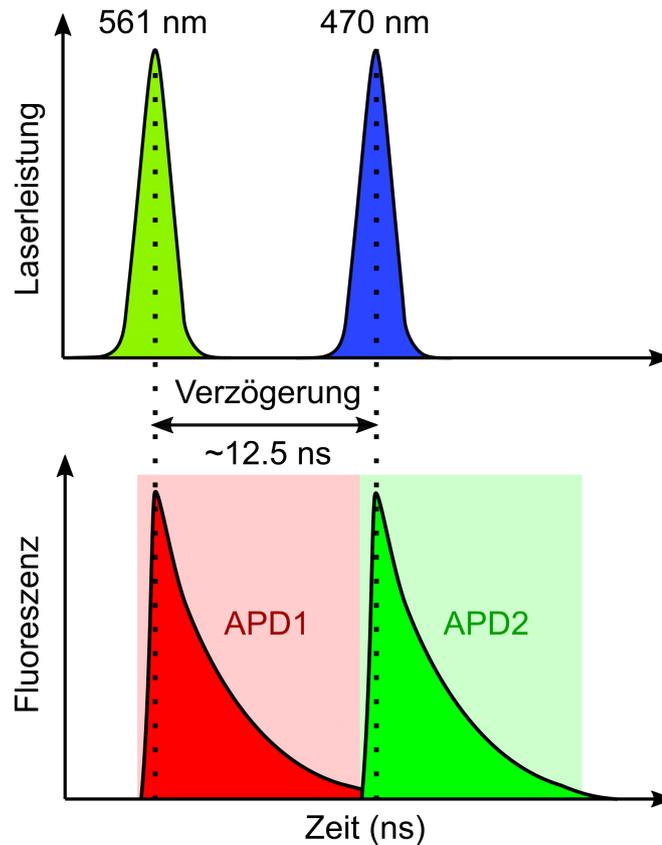


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der gepulsten alternierenden Anregung. Auf den ersten Laserpuls (561 nm) folgt nach einer Verzögerung von etwa 12,5 ns ein zweiter Puls (470 nm). Anhand der Detektionszeit der Photonen in Bezug zu den Laserpulszeiten können die Emissionssignale dem jeweiligen Farbkanal zugeordnet werden. Dadurch wird das Übersprechen auf ein Minimum reduziert.

3.5.4. Charakterisierung der lateralen Fokusparameter der zwei Farbkanäle

Der Fokusparameter ω_0 definiert die laterale Ausdehnung des Laserfokus, bei der die Intensität auf $1/e^2$ abfällt. Zur Bestimmung des Fokusparameters für den 470 nm- bzw. 561 nm-Laser im axialen Linienraster-FCS-Mikroskop wurde das Fluoreszenzsignal von Multifarbenperlen (TetraSpeck Microspheres 0,1 μm , ThermoFisher Scientific) (Kapitel 3.5) im jeweiligen Farbkanal durch einen Bandpassfilter 525/50 nm bzw. 600/37 nm detektiert. Die Messungen wurden von Dr. Peng Gao (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt (Abbildung 3.7). Pro Farbkanal wurden 10 Multifarbenperlen ausgewählt und die gemessenen Intensitätsprofile durch Gaußkurven angenähert (Abbildung 3.7 (a)).

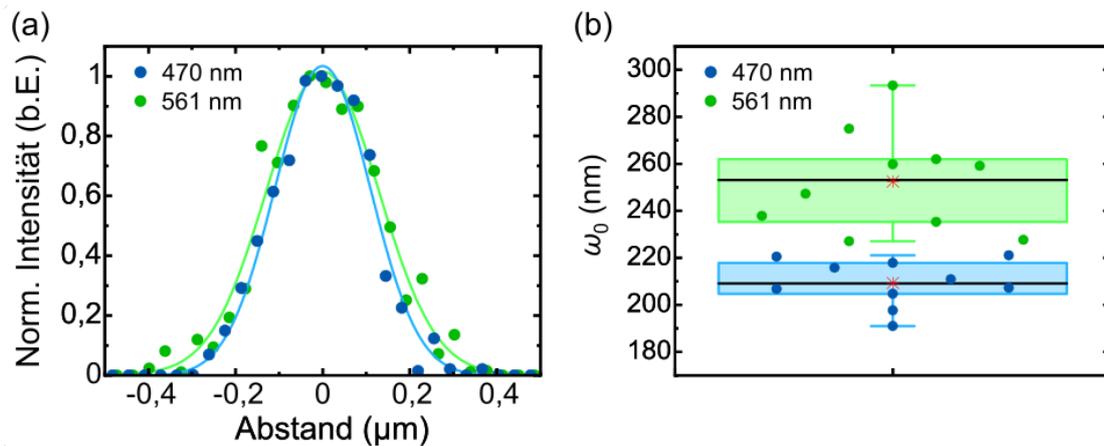


Abbildung 3.7: Ermittlung des Fokusparameters ω_0 durch die Konfokalmikroskopaufnahmen von Multifarbenperlen. (a) Beispielhafte Intensitätsverteilungen von zwei Multifarbenperlen im blauen und grünen Farbkanal mit den angenäherten Gaußkurven. (b) Verteilung der berechneten ω_0 -Werte für 10 Multifarbenperlen (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, roter Stern: Mittelwert). Aus [143].

Der Fokusparameter ω_0 wurde schließlich anhand der Halbwertsbreiten (HWB) der angenäherten Gaußkurven unter Berücksichtigung des Durchmessers d der Multifarbenperlen

$$HWB = \sqrt{HWB_{\text{Mess}}^2 - d^2} \quad (3.1)$$

durch die folgende Beziehung berechnet:

$$\omega_0 = \sqrt{2 \cdot \ln 2} \cdot HWB. \quad (3.2)$$

Die Ergebnisse befinden sich in Abbildung 3.7 (b). Aus den Boxplots³ ergab sich für den blauen Fokusparameter $\omega_{0,\text{blau}} = (209 \pm 7)$ nm und für den grünen Fokusparameter $\omega_{0,\text{grün}} = (253 \pm 13)$ nm (Median \pm die Hälfte der beiden Abstände zu den Boxgrenzen).

³ Die Box des Boxplots grenzt typischerweise 25% der kleinsten bzw. 75% der größten Datenwerte von den restlichen 50% ab. Diese Boxplotgrenzen werden daher Quartile genannt. Der Abstand zwischen beiden Quartilen wird als Interquartilabstand und die Antennen typischerweise als Whisker bezeichnet.

3.5.5. Axiales Linienrastern mit der TAG-Linse

3.5.5.1. Charakterisierung der TAG-Linse

Vor dem Einsatz von axialem Linienrastern für FCS-Experimente an lebenden Zellen musste der Einfluss der TAG-Linse auf den Laserfokus charakterisiert werden. Die Messungen zur Charakterisierung der TAG-Linse wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt und ausgewertet.

Die Resultate einer typischen Messreihe zur Charakterisierung der TAG-Linse, die von Dr. Peng Gao nach der Implementierung gemessen wurde, sind in Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9 dargestellt. Der Einfluss der TAG-Linse auf die PSF einer 80 nm-Goldperle ist in Abbildung 3.8 (a) ohne und (b) mit aktiver, in Resonanz schwingender TAG-Linse zusammengefasst. Bei 640 nm-Anregungswellenlänge wurden x-z-Querschnitte des Profils einer in einem Agarosegel (3 % w/w) eingebetteten 80 nm-Goldperle (EM.GC80, BBI solutions, Cardiff, Vereinigtes Königreich) in etwa 30 μm Höhe über dem Deckglas aufgenommen. Dabei war zu erkennen, dass die TAG-Linse durch ihr schnelles, periodisches Rastern bei 147 kHz die PSF des Lasers effektiv auf

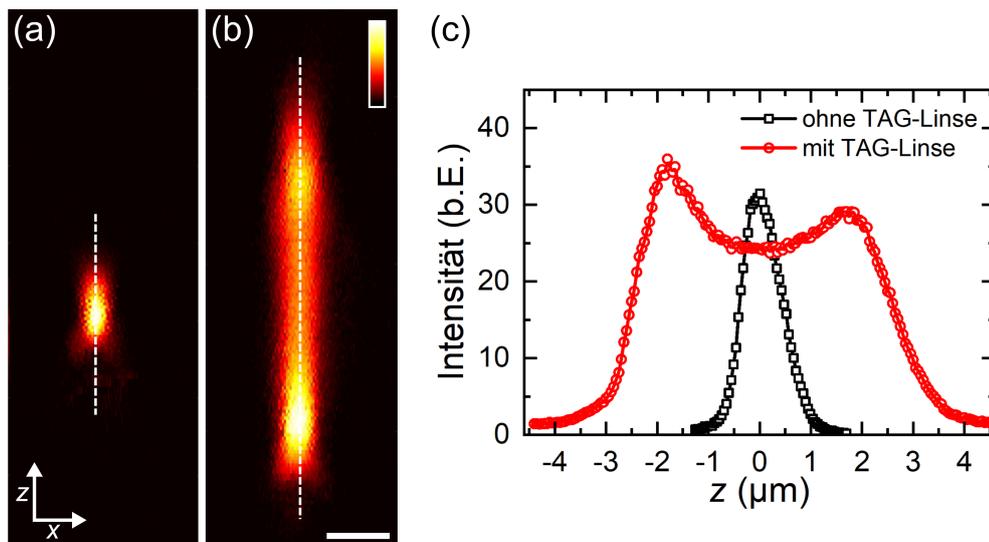


Abbildung 3.8: Charakterisierung des Einflusses der TAG-Linse auf die gemessene PSF einer in einem Agarosegel (3 % w/w) eingebetteten 80 nm-Goldperle (EM.GC80, BBI solutions) in etwa 30 μm Höhe über dem Deckglas bei 640 nm-Anregungswellenlänge. (a) x-z-Querschnitt der 3D-PSF des Lasers ohne und (b) mit aktiver, in Resonanz schwingender Tag-Linse. Die Größe des untersuchten Volumens beträgt 3 μm \times 3 μm \times 12 μm . Ein Maßstabsbalken entspricht 1 μm . (c) Intensitätswerte in der jeweiligen x-z-Ebene in Abhängigkeit von dem Fokusversatz, integriert über einen Radius vom Zentrum von 250 nm, (schwarz) ohne und (rot) mit aktiver TAG-Linse. Aus [143].

etwa $5,4\ \mu\text{m}$ in axialer Richtung aufweitete. Die zeitlich gemittelte Intensität fiel an der niedrigsten und höchsten axialen Position deutlich höher aus als im restlichen Verlauf des Rastervorgangs. Grund hierfür waren die unterschiedlichen Geschwindigkeiten bzw. Verweildauern der TAG-Linse an verschiedenen axialen Positionen, wodurch der Laserfokus wesentlich länger an den Umkehrpunkten verharrte.

Um die zeitlich registrierten Photonen einer axialen Position zuzuordnen zu können, ist die Charakterisierung der nichtlinearen Rasterbewegung des Fokus durch die TAG-Linse unerlässlich (Abbildung 3.9). Für diesen Zweck wurde bei eingeschalteter TAG-Linse die Reflexion des Lasers an einem Glasplättchen gemessen. Mit Hilfe des mikroskopeigenen piezoelektrischen Wandlers wurde ein axialer Bereich von $15\ \mu\text{m}$ in $50\ \text{nm}$ -Schritten für 300 x-y-Ebenen abgefahren. Die an der Glasoberfläche reflektierten Photonen wurden mittels TCSPC-Karte zeitlich registriert und schließlich durch die Kenntnis des Synchronisationssignals und der Rasterfrequenz der TAG-Linse einem Zeitpunkt innerhalb einer Rasterperiode zugeordnet (Abbildung 3.9 (a)). Der Verlauf der Daten aus Abbildung 3.9 (a) wurde mit einer Fourierreihe aus vier Sinusfunktio-

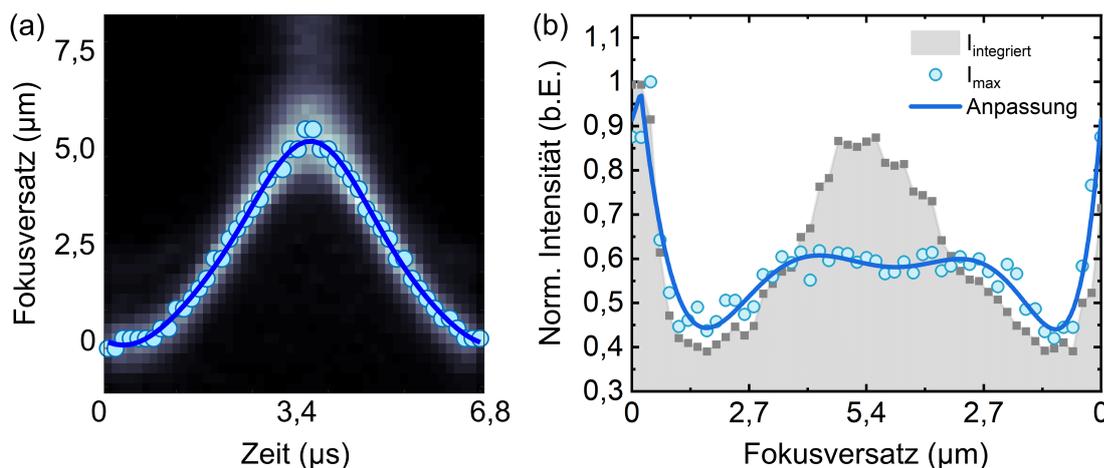


Abbildung 3.9: Nichtlinearer Rastervorgang der TAG-Linse, bestimmt durch die Messung der Reflexion des Lasers an einem Glasplättchen. Für die Messung wurde mit Hilfe des mikroskopeigenen piezoelektrischen Wandlers ein axialer Bereich von $15\ \mu\text{m}$ in $50\ \text{nm}$ -Schritten für 300 x-y-Ebenen abgefahren und $8\ \mu\text{m}$ für die Analyse verwendet ($0,12\ \text{s/Position}$). (a) Fokusversatz in Abhängigkeit von der Periodendauer von $6,8\ \mu\text{s}$, angenähert mit einer Fourierreihe aus vier Sinusfunktionen. (b) Anhand der aus (a) gewonnenen Anpassungsfunktion werden die detektierten Photonen einem bestimmten Fokusversatz innerhalb eines kompletten Rastervorgangs zugeordnet. Blaue Punkte: Intensitäten des hellsten Pixels in jeder Spalte für 50 äquidistante, axiale Positionen der TAG-Linse, normiert auf einen Bereich zwischen 0 und 1. Blaue Linie: Anpassung der Datenpunkte durch eine Polynomfunktion siebten Grades. Graue Symbole: Integrierte Intensität. Aus [143].

nen angenähert, wodurch schließlich alle Photonen innerhalb einer Rasterperiode einer bestimmten axialen Position zugeordnet werden konnten. Abbildung 3.9 (b) zeigt sowohl den Verlauf der normierten integrierten Intensität (grau) als auch der normierten maximalen Intensität (blau) in Abhängigkeit von dem Fokusversatz innerhalb eines Rastervorgangs bei insgesamt 50 verschiedenen äquidistanten TAG-Linsenpositionen. Der Verlauf der maximalen Intensität war hierbei von größerer Bedeutung, da bei der Auswertung der axialen Linienraster-FCS-Daten zur Bestimmung der Membranposition auch nur die Pixel mit der höchsten Intensität hinzugezogen wurden.

3.5.5.2. Laterales vs. axiales Rastern des Laserfokus

Eine Gegenüberstellung von lateraler und axialer Linienraster-FCS ist in Abbildung 3.10 dargestellt und basiert auf Messungen von Dr. Peng Gao (axial) und Dr. Benedikt J. Prunsche (lateral) (beide AG Nienhaus, APH, KIT) [143].

GUVs (engl. *giant unilamellar vesicles*) sind ein einfaches Modellsystem für eine Doppellipidschicht [146] und eignen sich daher hervorragend für einen Vergleich beider Messmethoden. Für die Vergleichsmessungen in Abbildung 3.10 (a) kamen mit ATTO647N-DPPE (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) eingefärbte GUVs, bestehend aus 50 % Sphingomyelin (S7004, Sigma-Aldrich) und 50 % Cholesterol (C8667, Sigma-Aldrich), zum Einsatz; ein ausführliches Protokoll zur GUV-Herstellung findet sich in der Literatur [143]. Die resultierende FCS-Kurve für laterales Linienrastern weist im Vergleich zur axialen Rastermethode eine deutlich höhere Korrelationszeit auf. Dies liegt an der deutlich größeren Beobachtungsfläche (Ellipsenfläche $A_{\text{lateral}}(\omega_0, z_0)$, $z_0 \approx 5 \cdot \omega_0$) beim lateralen im Vergleich zum axialen Rastern (Kreisfläche $A_{\text{axial}}(\omega_0)$) (siehe Kapitel 2.7.2). Dadurch verweilen fluoreszenzmarkierte Teilchen bei der lateralen Rastervariante im Schnitt länger in der Beobachtungsfläche, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit für die Photobleichung erhöht. Die laterale Linienraster-FCS-Kurve weist zudem eine verringerte Amplitude auf. Somit befindet sich im Mittel eine größere Anzahl von Fluorophoren im Beobachtungsvolumen. Die benötigte Messzeit, um mittels lateraler Linienraster-FCS denselben mittleren relativen Fehler zu erreichen wie eine 60 s-Messung mittels axialer Linienraster-FCS, liegt bei etwa 300 s (Abbildung 3.10 (b)). Ein weiterer Nachteil der lateralen Linienraster-Variante ist die Dauer, die der Strahlscanner für einen Rastervorgang benötigt. Sie liegt im Bereich von 1 ms [147] und stellt somit die minimale Korrelationszeit dar, die mit lateraler Linienraster-FCS aufgelöst werden kann. Mittels axialer Linienraster-FCS kann ein Rastervorgang bereits in etwa 6,8 μs durchgeführt werden.

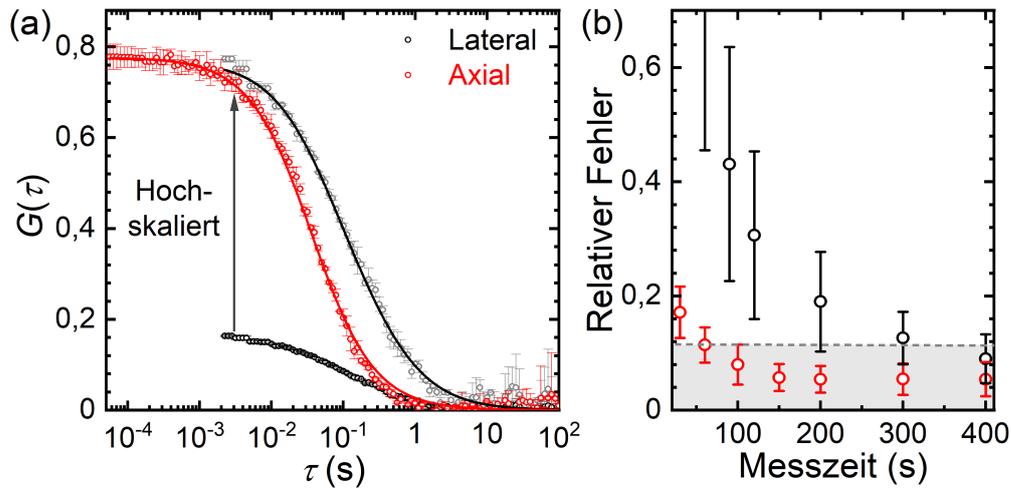


Abbildung 3.10: Gegenüberstellung der lateralen [147] und axialen Linienraster-FCS. (a) Resultierende FCS-Kurven von axialen und lateralen FCS-Messungen an der Membran von mit Atto647N-DPPE markierten GUVs (Punkte: Messdaten, Linie: Anpassung mit Hilfe von Gleichung 2.92 (lateral) und Gleichung 2.93 (axial)). Die Messzeiten betragen 200 s (axial) und 300 s (lateral) bei einer Anregung mit 640 nm und einer Laserleistung von 5 μ W in der Probe. Für die laterale Linienraster-FCS rasterte der Strahlscanner wiederholt eine Linie der Länge 10 μ m mit einer Frequenz von 500 Hz ab. (b) Mittelwert und Standardabweichung der relativen Abweichung einzelner FCS-Kurven vom Mittelwert aus allen FCS-Kurven. Die Daten basieren auf FCS-Messungen an insgesamt 40 LRP6-mCherry stabil exprimierenden H1703-Zellen bei einer Laserleistung von 6 μ W (Anregung mit 561 nm) und Detektion im Bereich von (600 ± 19) nm. Die grau-gestrichelte Linie dient als Referenzlinie und gibt an, welche Messzeit bei der lateralen Rastervariante benötigt wird, um den relativen Fehler einer axialen Linienraster-FCS-Messung mit 60 s zu erreichen. Aus [143, 148].

3.5.6. Analyse der zeitlichen Intensitätsspur von axialen Linienraster-FCS-Experimenten an lebenden Zellen

In diesem Abschnitt wird der Ablauf einer typischen axialen Linienraster-FCS-Messung zur Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen einem Rezeptor und seinem Liganden an der Membran lebender Zellen näher erläutert. Die im Folgenden gezeigten Daten stammen aus Experimenten an lebenden HEK293T-Zellen, die in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao (AG, Nienhaus, APH, KIT) geplant und durchgeführt wurden. Als Rezeptor wurde LRP6-mCherry überexprimiert und als Ligand DKK1-eGFP in Form von konditioniertem Medium (Kapitel 3.1.2.4) hinzugegeben. Abbildung 3.11 (a) zeigt sowohl eine beispielhafte 2D-Konfokalaufnahme als auch die zugehörigen Querschnitte in axialer Richtung durch HEK293T-Zellen, an deren Membranen DKK1-eGFP an LRP6-mCherry gebunden hatte.

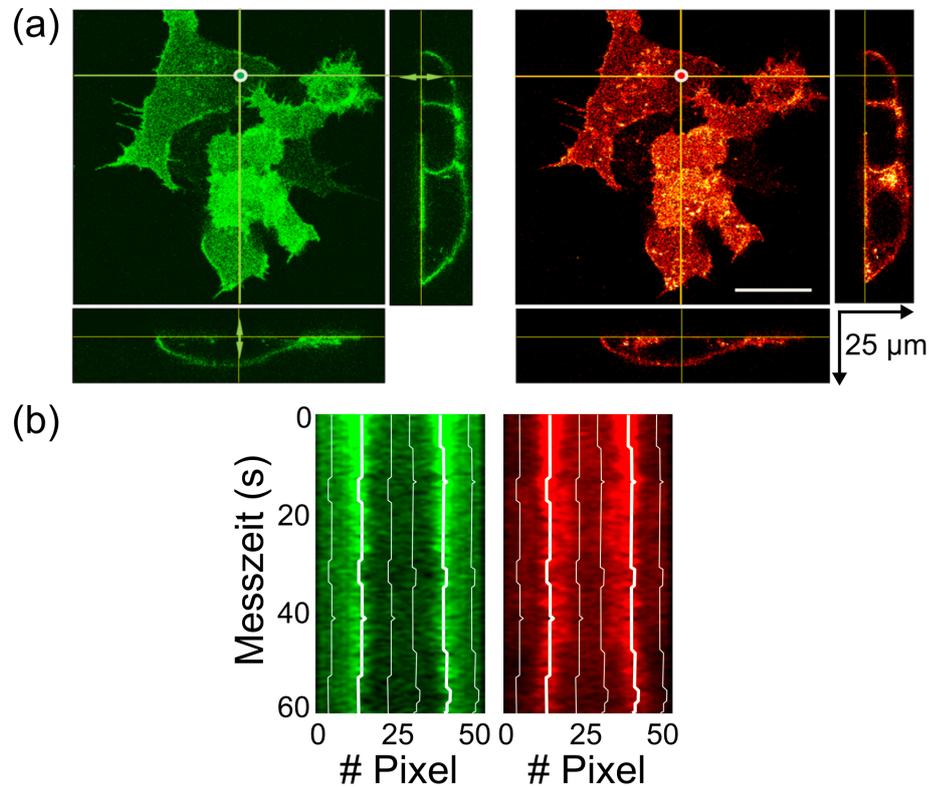


Abbildung 3.11: (a) 2D-Konfokalbilder und zugehörige axiale Querschnitte durch die Membran von im grünen und roten Farbkanal fluoreszenzmarkierten HEK293T-Zellen. LRP6-mCherry (Rezeptor) wurde von den Zellen überexprimiert und DKK1-eGFP (Ligand) in Form von konditioniertem Medium hinzugegeben. Ein Maßstabsbalken entspricht 16 µm. (b) Rekonstruiertes Pseudobild der Zellmembran im grünen und roten Farbkanal dargestellt als Kymograph. Das Fluoreszenzsignal wurde innerhalb einer Scanperiode in 50 Pixel (horizontal) eingeteilt und in Abhängigkeit von der Messzeit (vertikal) aufgetragen. Die Membranposition wurde durch die Bestimmung des Pixels höchster Intensität innerhalb einer halben Scanperiode ermittelt (dicke, weiße Linie). Der Wert des Hintergrundsignals innerhalb und außerhalb der Zelle in einem Abstand von etwa 10 Pixel (~ 2 µm, dünne weiße Linie) von der Membranposition wurde gemittelt und zur Korrektur des fluoreszierenden Hintergrundsignals in der späteren Analyse berücksichtigt. Aus [143].

Bei einer axialen Linienraster-FCS-Messung wird die Membran einer Zelle während einer Scanperiode der TAG-Linse von $6,8\text{ }\mu\text{s}$ zweimal passiert. Die Messzeit für eine axiale Linienraster-FCS-Messung beträgt, sofern nicht anders angegeben, 60 s. Das detektierte Fluoreszenzsignal wird durch das TCSPC-System zeitlich registriert. Anhand des Triggersignals für die gepulste alternierende Anregung können die Photonen in das 25 ns-Zeitfenster eingeteilt und im Anschluss einem der zwei Laserpulse bzw. einem Farbkanal zugeordnet werden. Der komplette Rastervorgang der TAG-Linse

wird für die spätere Analyse in 50 Zeitpixel unterteilt (x-Achse des Kymographen in Abbildung 3.11 (b)). Die Photonen im jeweiligen Farbkanal können dann anhand des Triggersignals der TAG-Linse einem dieser Zeitpixel zugeordnet werden. In Abhängigkeit von der Messzeit (y-Achse des Kymographen) ergeben diese Scanlinien eine Art Pseudobild der zeitlichen Membranposition in einer axialen Linienraster-FCS-Messung⁴. Für die Korrelationsanalyse sind lediglich die Fluoreszenzfluktuationen an der Zellmembran von Interesse. Daher wird für die FCS-Analyse in beiden Hälften des Pseudobildes bzw. einer TAG-Scanlinie (aufwärts und abwärts) der Pixel höchster Intensität bestimmt ($I_{\text{Membran1}}, I_{\text{Membran2}}$), welcher der zeitlichen Position der Membran entspricht. Die Intensitätsverläufe der Pixel höchster Intensität werden schließlich zu einem Intensitätsverlauf $I_{G/R, \text{Original}}(t)$ im jeweiligen Farbkanal vereint (Abbildung 3.12 (a)). Die Fluoreszenzfluktuationen an der Zellmembran werden im Allgemeinen durch die Hintergrund-Fluoreszenz lebender Zellen überlagert, was in der Analyse berücksichtigt und korrigiert werden muss. Daher wird, ausgehend von dem Pixel höchster Intensität, das Hintergrundsignal von zwei Pixeln, einem innerhalb und einem außerhalb der Zelle, bestimmt. Beide befinden sich in jeweils 10 Pixel Entfernung vom Pixel höchster Intensität. Die mittlere Hintergrundintensität ($I_{G/R, \text{Hintergrund}}(t)$) wird in der Analyse von dem Fluoreszenzsignal der Zellmembran abgezogen ($I_{G/R, \text{Korrektur}}(t) = I_{G/R, \text{Original}}(t) - I_{G/R, \text{Hintergrund}}(t)$). Die aus der Korrelationsanalyse des korrigierten Fluoreszenzsignals gewonnenen FCS-Kurven sind in Abbildung 3.12 (b) dargestellt. Im Idealfall, ohne den Einfluss von Membranbewegungen oder anderen Störungen, würde die Membran immer zur selben Zeit innerhalb eines Rastervorgangs der TAG-Linse vom Laserfokus passiert werden. Das bedeutet, dass die Zeitspur des Pixels maximaler Intensität (dicke, weiße Linie in Abbildung 3.11 (b)) einer geraden, vertikalen Linie entsprechen müsste.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass durch die Kenntnis der Makrozeit (Zeit innerhalb der Gesamtmesszeit) und der TAG-Zeit/Scanhöhe-Beziehung aus Abbildung 3.9 (a) alle registrierten Photonen einer bestimmten Scanhöhe zugeordnet werden können. In Kombination mit dem konventionellen 2D-Rastern des Laserfokus in x-y-Ebene ermöglicht die TAG-Linse schnelle 3D-Aufnahmen.

⁴ Für eine z-Messzeit-Abbildung der Zellmembran müssen die registrierten Photonen anhand ihrer TAG-Zeit (innerhalb einer halben Scanperiode, $3,4 \mu\text{s}$ für einen Scan in positiver oder negativer z-Richtung) durch die Fitfunktion aus Abbildung 3.9 einer bestimmten Scanhöhe in z-Richtung zugeordnet werden.

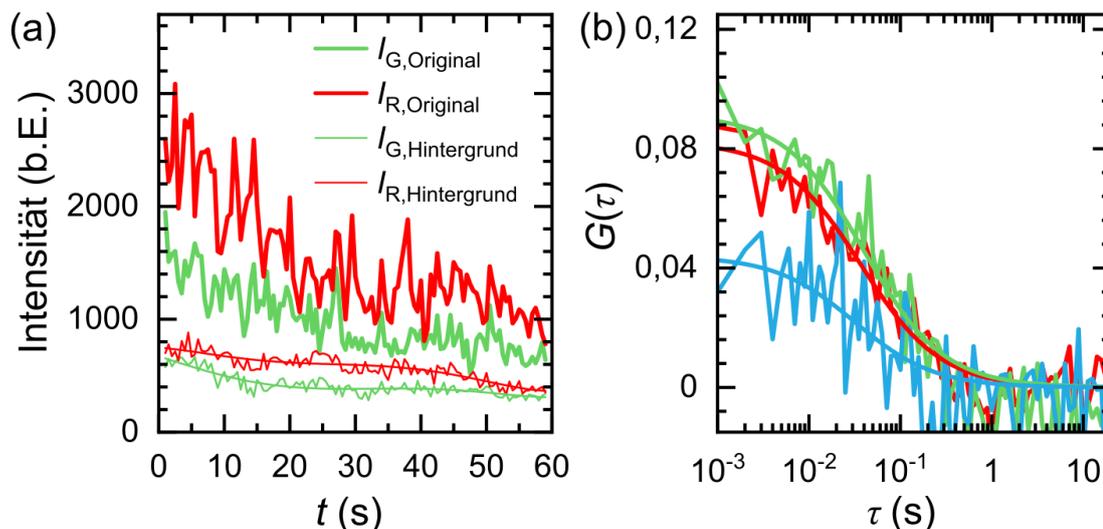


Abbildung 3.12: (a) Intensitätsverläufe des grünen (DKK1-eGFP) und roten (LRP6-mCherry) Fluoreszenzsignals an der Zellmembran und des grün- und rot-fluoreszierenden Hintergrunds in einer axialen Linienraster-FCS-Messung. (b) Die aus (a) resultierenden Korrelationskurven für den grünen und roten Farbkanal, sowie für die Kreuzkorrelation der Fluoreszenzsignale beider Farbkanäle (blau). Anpassung der Kurven durch eine 2D-FCS-Fitfunktion (Gleichung 2.93). Aus [143].

3.5.7. Kompensation für die Photobleichung der Fluorophore

Durch die Exposition der Fluorophore mit dem Laserlicht finden photochemische Reaktionen statt, die den Fluorophor schädigen und schließlich zerstören, wodurch er seine Fluoreszenzeigenschaft verliert. Fluoreszenzmarkierte Proteine an der Zellmembran diffundieren im Vergleich zu freien Teilchen in Lösung durch das Beobachtungsvolumen relativ langsam, wodurch sie länger in diesem verweilen. Dies wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit der Photobleichung. Folglich nimmt der Mittelwert der Intensität, um den das Fluoreszenzsignal fluktuiert, über die Messzeit ab (Abbildung 3.12 (a)). Dadurch steigt die Autokorrelationsamplitude an und es werden niedrigere Konzentrationen berechnet als tatsächlich vorhanden waren. Für die Korrektur der Photobleichung wird das Verhältnis $I_{G/R,Original}(0)/I_{G/R,Original}(t)$ bestimmt und dessen Verlauf mit einer Summe aus sechs Sinusfunktionen angenähert [147]. Diese Funktion wird im Folgenden als $\gamma(t)$ bezeichnet. Die für die Korrelationsanalyse verwendeten Intensitätsverläufe $I_{G/R}(t)$ werden schließlich berechnet durch

$$I_{G/R}(t) = \gamma(t) \cdot I_{G/R,Original}(t). \quad (3.3)$$

Anhand von diesen Intensitätsverläufen werden Auto- und Kreuzkorrelationsfunktionen wie in Gleichung 2.95 berechnet:

$$G_{G/R}(\tau) = \frac{1}{\langle \gamma_{G/R}(t) \rangle} \cdot \left(\frac{\langle I_{G/R}(t) \cdot I_{G/R}(t + \tau) \rangle}{\langle I_{G/R}(t) \rangle^2} - 1 \right),$$

$$G_x(\tau) = \frac{\langle I_G(t) \cdot I_R(t + \tau) \rangle}{\langle I_G(t) \rangle \cdot \langle I_R(t) \rangle} - 1. \quad (3.4)$$

Hierbei ist anzumerken, dass die Amplituden der Autokorrelationsfunktionen durch einen Faktor $\gamma(t)^{-1}$ reskaliert werden müssen. Ohne diesen Faktor würden die Amplituden nach der Bleichkorrektur größere Werte annehmen als es ohne Photobleichen der Fall wäre⁵. Bei der Kreuzkorrelationsfunktion ist dieser zusätzliche Korrekturfaktor jedoch nicht nötig, da sich die Beiträge von $\gamma(t)$ in Gleichung 3.4 im Zähler und Nenner herauskürzen.

3.5.8. Fitfunktionen und Vorgehensweise zur Bestimmung von Bindungsaffinitäten

Im Folgenden wird von einem axialen Linienraster-FCS Experiment an einer Zellmembran ausgegangen, bei dem die Rezeptorproteine jeweils mit einem roten und die zugehörigen Liganden jeweils mit einem grünen Fluorophor markiert wurden. Die Liganden werden in Form von konditioniertem Medium zur Zelle gegeben und binden in Abhängigkeit von der finalen Ligandenkonzentration im Zellmedium C_L an die Rezeptoren. Nach einer gewissen Zeit stellt sich ein Bindungsgleichgewicht ein. Ungebundene Liganden diffundieren im Allgemeinen wesentlich schneller als die an ihre Rezeptoren gebundenen Liganden, wodurch ihre Diffusion in der späteren FCS-Analyse vernachlässigt und lediglich die langsame Diffusion der membrangebundenen Proteine im Millisekundenbereich betrachtet werden kann. Die ungebundenen, fluoreszenzmarkierten Rezeptoren liegen an der Membran mit einer Konzentration C_R vor. An dieser Stelle ist anzumerken, dass einige Rezeptoren nicht fluoreszent vorliegen können: Zum einen können die Zellen endogenen Rezeptoren (kein Fusionskonstrukt) herstellen oder das fluoreszente Protein kann in einer nicht vollständig maturierten bzw. zur Fluoreszenz nicht funktionellen Form vorliegen. Gebundene Rezeptor-Ligand-Komplexe liegen somit an der Zellmembran mit den Konzentrationen C_{rL} (nicht funktioneller Fluorophor) und C_{rL} (funktioneller Fluorophor) vor. Der prozentuale Anteil

⁵ Diesen Zusammenhang erhält man, wenn man die Auto- bzw. Kreuzkorrelationsfunktionen als Summe mehrerer Korrelationsfunktionen darstellt. Teilt man die mittlere Korrelationsamplitude der Summe $\langle G_{G/R/X}(0) \rangle$ durch die initiale Korrelationsamplitude $G_{G/R/X,i}(0)$, so ergibt sich $\langle G_{G/R/X}(0) \rangle / G_{G/R/X,i}(0) = \langle \gamma(t) \rangle$.

der funktionellen Fluorophore der Rezeptorproteine beeinflusst den Wert der via axialer Linienraster-FCS bestimmten Bindungsaffinität nicht, was im folgenden Abschnitt näher erläutert wird. Es ist wesentlich entscheidender, dass die Konzentration des fluoreszenzmarkierten Liganden bei jedem Experiment bekannt ist, da sich diese direkt auf die Bindungskurve (x-Achse: freie Ligandenkonzentration) auswirkt. Im besten Fall weist der Fluorophor des Liganden eine möglichst hohe Fluorophorfunktionalität auf, was durch das fluoreszierende Protein eGFP gegeben ist [149–151].

Aus den axialen Linienraster-FCS-Daten in zwei Farbkanälen lassen sich zwei Autokorrelationsfunktionen und eine Kreuzkorrelationsfunktion berechnen [143]:

$$G_G(\tau) = \frac{1}{A_G \cdot (C_{rL} + C_{RL})^2} \cdot (C_{rL} + C_{RL}) \cdot \left(1 + \frac{4 \cdot D_{RL} \cdot \tau}{\omega_G^2}\right)^{-1}, \quad (3.5)$$

$$G_R(\tau) = \frac{1}{A_R \cdot (C_R + C_{RL})^2} \cdot \left(C_R \cdot \left(1 + \frac{4 \cdot D_R \cdot \tau}{\omega_R^2}\right)^{-1} + C_{RL} \cdot \left(1 + \frac{4 \cdot D_{RL} \cdot \tau}{\omega_R^2}\right)^{-1}\right), \quad (3.6)$$

$$G_x(\tau) = \frac{1}{A_{\text{eff}} \cdot (C_R + C_{RL}) \cdot (C_{rL} + C_{RL})} \cdot C_{RL} \left(1 + \frac{4 \cdot D_{RL} \cdot \tau}{\omega_{\text{eff}}^2}\right)^{-1}. \quad (3.7)$$

Hierbei steht $A_{G/R} = \pi \cdot \omega_{G/R}^2$ für die Beobachtungsflächen im grünen bzw. roten Farbkanal und $D_{R/RL}$ für den Diffusionskoeffizienten des Rezeptors bzw. der Rezeptor-Ligand-Komplexe. $A_{\text{eff}} = \pi \cdot \omega_{\text{eff}}^2$ ist die effektive Beobachtungsfläche, die vom effektiven Fokusparameter $\omega_{\text{eff}}^2 = (\omega_G^2 + \omega_R^2)/2$ abhängt.

Für die Bestimmung der Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand werden, neben der Kenntnis der freien Ligandenkonzentration (x-Achse der Bindungskurve), lediglich die Korrelationsamplituden bei $\tau = 0$ und die Beobachtungsflächen in den unterschiedlichen Farbkanälen benötigt. Dieser Zusammenhang ist in den folgenden Gleichungen dargestellt:

$$\frac{G_x(0)}{G_G(0)} = \frac{A_G}{A_{\text{eff}}} \cdot \frac{C_{RL}}{C_R + C_{RL}}, \quad (3.8)$$

$$\frac{G_x(0)}{G_R(0)} = \frac{A_R}{A_{\text{eff}}} \cdot \frac{C_{RL}}{C_{rL} + C_{RL}}. \quad (3.9)$$

Die Multiplikation beider Ausdrücke führt zu

$$\frac{G_x^2(0)}{G_G(0) \cdot G_R(0)} = \frac{A_G \cdot A_R}{A_{\text{eff}}^2} \cdot \frac{C_{RL}}{C_R + C_{RL}} \cdot \frac{C_{RL}}{C_{rL} + C_{RL}}. \quad (3.10)$$

Hierbei beinhaltet der Ausdruck $A_G \cdot A_R / A_{\text{eff}}^2$ das quadratische Verhältnis aus dem geometrischen und arithmetischen Mittelwert der Beobachtungsflächen mit einem Wert von 0,967 für den grünen und roten Farbkanal der axialen Linienraster-FCS-Experimente in dieser Arbeit. Der tatsächliche Überlapp der Beobachtungsflächen im grünen und roten Farbkanal weicht bei der axialen Linienraster-FCS nur um wenige Prozent von diesem Wert ab. Bei lateralen Linienraster-FCS- oder 3D-FCS-Experimenten fällt diese Abweichung durch den Einfluss der axialen Fokuskomponente größer aus. Mit der Dissoziationskonstante $K_D = C_R \cdot C_L / C_{RL}$ kann die Gleichung 3.10 zu folgendem Ausdruck umgeschrieben werden [143]:

$$\Gamma(C_L) = \frac{G_x^2(0)}{G_G(0) \cdot G_R(0)}(C_L) = A \cdot \beta \cdot \frac{1}{1 + \frac{K_D}{C_L}}. \quad (3.11)$$

Der Verlauf von $\Gamma(C_L)$ in Abhängigkeit von der freien Ligandenkonzentration C_L hat die Form einer Bindungskurve, deren Sättigungswert für sehr hohe Ligandenkonzentrationen $C_L \rightarrow \infty$ durch das Produkt aus dem geometrischen Faktor A und der Maturationseffizienz des Rezeptor-markierenden Fluorophors $\beta = C_{RL} / (C_{TL} + C_{RL})$ gegeben ist. Anhand der aus axialen Linienraster-FCS-Experimenten gewonnenen Pseudobindungskurve $\Gamma(C_L)$ kann schließlich durch die Anpassung der Daten mit der Gleichung 3.11 die Dissoziationskonstante bestimmt werden. An dieser Stelle ist anzumerken, dass die Maturationseffizienz des Rezeptor-markierenden Fluorophors β lediglich ein Skalierungsfaktor ist, welcher die Höhe der Bindungskurve beeinflusst, jedoch nicht die daraus bestimmte Dissoziationskonstante.

3.5.9. Analyse der Bildung von Heterodimeren anhand von axialer Linienraster-FCS

Im Folgenden wird die Bildung von Heterodimeren von zwei in unterschiedlichen Farbkanälen (grün, rot) fluoreszenzmarkierten membrangebundenen Rezeptorproteine betrachtet. Es wird davon ausgegangen, dass die Anzahl der nicht fluoreszenzmarkierten Rezeptoren für beide Farbkanäle vernachlässigbar klein ist. Der Anteil der Rezeptoren mit nicht funktionsfähigen Fluorophoren wird durch g/r und der fluoreszierende Anteil mit G/R gekennzeichnet. An der Zellmembran können die Rezeptoren in einem einfachen Modell nur als Monomere oder als eine von vier Heterodimerarten (GR, gR, Gr, gr) vorliegen. Für die Korrelationsamplituden für den jeweiligen Farbkanal

folgt daraus [143]:

$$G_G(0) = \frac{1}{A_G \cdot (C_G + C_{GR} + C_{Gr})} = \frac{1}{A_G \cdot (C_G + \eta_R^{-1} C_{GR})}, \quad (3.12)$$

$$G_R(0) = \frac{1}{A_R \cdot (C_R + C_{GR} + C_{gR})} = \frac{1}{A_R \cdot (C_R + \eta_G^{-1} C_{GR})}, \quad (3.13)$$

$$\begin{aligned} G_x(0) &= \frac{C_{GR}}{A_{\text{eff}} \cdot (C_G + C_{GR} + C_{Gr}) \cdot (C_R + C_{GR} + C_{gR})} \\ &= \frac{C_{GR}}{A_{\text{eff}} \cdot (C_G + \eta_R^{-1} C_{GR}) \cdot (C_R + \eta_G^{-1} C_{GR})}. \end{aligned} \quad (3.14)$$

Hierbei bezeichnet $\eta_{G/R} = C_{G/R} / (C_{G/R} + C_{g/r})$ die Maturations-effizienz bzw. den funktionellen Anteil der Fluorophore im jeweiligen Farbkanal. Um Rückschlüsse über das Verhältnis der Anzahl der Heterodimere zur Gesamtanzahl von Rezeptorproteinen in einem Farbkanal zu ziehen, muss das mit den Beobachtungsflächen gewichtete Verhältnis aus Kreuz- und Autokorrelation des anderen Farbkanals $F'_{G/R}$ gebildet werden,

$$F'_G = \frac{A_{\text{eff}}}{A_R} \cdot \frac{G_x(0)}{G_R(0)} = \frac{C_{GR}}{\eta_R^{-1} \cdot C_{GR} + C_G}, \quad (3.15)$$

$$F'_R = \frac{A_{\text{eff}}}{A_G} \cdot \frac{G_x(0)}{G_G(0)} = \frac{C_{GR}}{\eta_G^{-1} \cdot C_{GR} + C_R}. \quad (3.16)$$

Mit geschickter Umformung und $A_{\text{eff}}/A_G = 1,23$ und $A_{\text{eff}}/A_R = 0,85$ erhält man die tatsächliche Prozentzahl der Heterodimere im grünen bzw. roten Farbkanal $F_{G/R}$ über die folgenden Gleichungen:

$$F_G = \frac{C_{GR}}{C_{GR} + C_G} = \frac{1}{F_G'^{-1} + 1 - \eta_R^{-1}}, \quad (3.17)$$

$$F_R = \frac{C_{GR}}{C_{GR} + C_R} = \frac{1}{F_R'^{-1} + 1 - \eta_G^{-1}}. \quad (3.18)$$

3.5.10. Konventionelle FCS-Messungen ohne TAG-Linse

In dieser Arbeit wurden konventionelle FCS-Messungen (ohne TAG-Linse) im Cytosol und Nukleus von lebenden Zellen durchgeführt. Für eine Cytosol- und Nukleus-Messung wurde der Laserfokus zuerst im Cytosol einer Zelle platziert (Anhang A.3) und eine 120 s-FCS-Messung gestartet. Im Anschluss wurde der Laserfokus in den Nukleus der Zelle gelegt und eine weitere Messung gestartet. Die Abnahme der zeitlichen Intensitätsverläufe aufgrund von Photobleichung der Fluorophore wurde korrigiert [147] und die resultierenden Intensitätsverläufe einer Korrelationsanalyse unterzogen.

Die aus dem Fit der FCS-Kurven gewonnenen Korrelationsamplituden wurden analog zu Kapitel 3.5.7 durch einen Korrekturfaktor für die Photobleichung korrigiert. Im Anschluss daran wurden die korrigierten, apparenten Korrelationsamplituden $G_{G/R,app}(0)$ im grünen bzw. roten Farbkanal durch einen Korrekturfaktor für das unkorrelierte Hintergrundsignal der Zellautofluoreszenz nach Foo et al. [152] korrigiert:

$$G_{G/R}(0) = \frac{I_{G/R,mess}^2}{(I_{G/R,mess} - I_{G/R,HG})^2} \cdot G_{G/R,app}(0). \quad (3.19)$$

Hierbei steht $I_{G/R,mess}$ für die mittlere Fluoreszenzintensität im jeweiligen Farbkanal. Für die Korrektur der Zellautofluoreszenz wurde der Median der Hintergrundintensitäten $I_{G/R,HG}$ im Cytosol und im Nukleus von mindestens 15 Kontrollzellen unter den jeweiligen Bedingungen (ohne/mit Zugabe einer Chemikalie) in die Berechnung einbezogen. Anhand von Referenzmessungen von Farbstofflösungen wurden aus den Korrelationszeiten und korrigierten Korrelationsamplituden Diffusionskoeffizienten und Konzentrationen bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Die Rolle von β -Catenin in Darmkrebszellen

4.1.1. Allelspezifische Expression von β -Catenin in HCT116-Zellen

Im Rahmen des SFB1324 wurden in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Boutros (DKFZ, Heidelberg) die Auswirkungen von Wnt-Signalweg stimulierenden Chemikalien auf die Konzentration von β -Catenin in der Darmkrebszelllinie HCT116 untersucht [153]. In manchen Darmkrebszellen führen Mutationen im Genom zur Erhöhung der intrazellulären Menge an β -Catenin. So führt in HCT116-Zellen eine bestimmte, natürlich auftretende Mutation in der Sequenz von β -Catenin zu einem solchen Effekt und dadurch zur erhöhten Wnt-Aktivität, die wiederum mittels Luziferase-Reporterassay nachgewiesen werden kann [154]. Auf dem einen Allel befindet sich das Wildtypgen (WT) von β -Catenin und auf dem anderen Allel fehlt die Aminosäure Serin an der Sequenzstelle 45 (Δ Ser45 oder Δ 45), die eine für den Abbau von β -Catenin essenzielle Phosphorylierungsstelle darstellt. Allelspezifische Unterschiede in der Expression und im Diffusionsverhalten dieser beiden unterschiedlichen Versionen von β -Catenin in lebenden Zellen waren Schwerpunkte der Untersuchung. Für diese Experimente wurde das Genom der zu untersuchenden HCT116-Zelllinie mit dem CRISPR/Cas9-System, einem Werkzeug zur Genom-Editierung, verändert. Mit dieser Methode wurde β -Catenin fluoreszenzmarkiert und drei isogene Variationen der HCT116-Zelllinie generiert: #33, #37 und #45. Dadurch exprimierten diese Zelllinien das Zielprotein mit dem modifizierten Gen weiterhin auf einem natürlichen Expressionslevel (endogen). Dr. Giulia Ambrosi (AG Boutros, DKFZ, Heidelberg) übernahm hierfür die CRISPR/Cas9-Geneditierung der Zelllinien, die Überprüfung des erfolgreichen Einbaus des Fluorophors sowie alle Wnt-Aktivitäts-Tests. Im Anschluss wurden diese Zelllinien der Arbeitsgruppe Nienhaus zur weiteren Zellkultur und Probenpräparation vor den Messungen übergeben. Der genaue Ablauf der Probenpräparation und der Zellkultur befinden sich in Kapitel 3.1.2. Bei den Zelllinien #33 und #45 handelt es sich um Kontrollzelllinien, in welchen β -Catenin in jeweils nur einem Allel mit einem Fluoreszenzmarker versehen wurde. In der Variante #33 ist das Allel mit dem

Wildtyp-Gen β -Catenin mit dem grün fluoreszierenden Protein mClover markiert. Die mutierte Version von β -Catenin auf dem zweiten Allel, bei der die Aminosäure an der Sequenzstelle 45 fehlt (Δ Ser45), wurde hingegen mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry versehen. Die Zelllinie #37 beinhaltet beide fluoreszenzmarkierte Versionen von β -Catenin (Abbildung 4.1).

4.1.2. β -Catenin-Expressionslevel in HCT116-Zellen mittels Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie

Die Zelllinien #33, #37 und #45 wurden nach Erhalt in Kultur genommen und zeitnah auf Vitalitätszustand und die Expressionslevel von β -Catenin überprüft. Hierzu wurden die Zellen in 8-Kammerdeckgläser (Kapitel 3.1.2) gesetzt und nach erfolgreicher Adhäsion via Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie (SDCM) untersucht. Obwohl lediglich das Genom dieser Zelllinien verändert wurde und sie die β -Catenin-Versionen folglich nicht überexprimierten, waren die fluoreszierenden Versionen von β -Catenin in allen drei Zelllinien dennoch im entsprechenden Farbkanal des Fluorophors gut zu erkennen (Abbildung 4.2 (a)): Es ist bekannt, dass β -Catenin nicht nur im Cytosol und Nukleus der Zelle vorliegt, sondern sich auch an der Zellmembran anlagert [16, 19, 155]. Hier ist β -Catenin vorwiegend an Zelladhäsionsverbindungen auf Cadherinbasis beteiligt, worauf in dieser Arbeit, bis auf den nächsten Abschnitt, jedoch nicht näher eingegangen wird.

Zur ersten Probencharakterisierung wurden die effektiven Expressionslevel der zwei

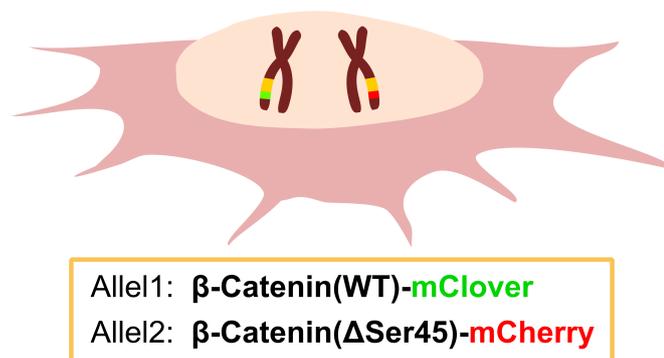


Abbildung 4.1: Entwurf der CRISPR/Cas9-genmodifizierte HCT116-Zelllinie #37; Allel1: β -Catenin(WT)-mClover, Allel2: β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry. In den Kontrollzelllinien ist β -Catenin auf jeweils nur einem Allel fluoreszenzmarkiert; #33: β -Catenin-mClover(WT), #45: β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry.

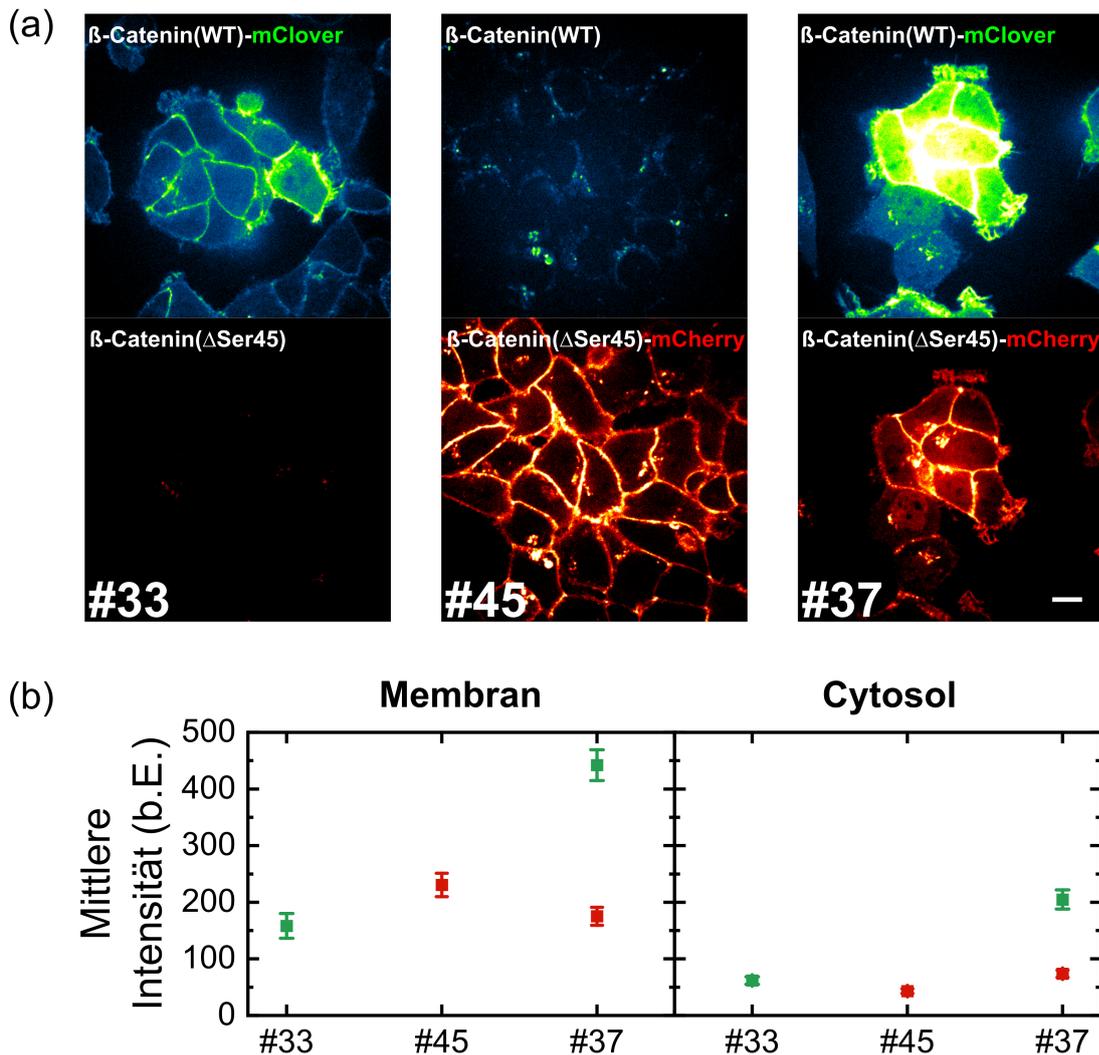


Abbildung 4.2: Bestimmung der allelspezifischen Expressionslevel der fluoreszenzmarkierten β -Catenin-Varianten in den Zelllinien #33, #45 und #37 via Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie. (a) Aufnahmen der Zelllinien #33, #45 und #37 im grünen (oben) und roten (unten) Farbkanal. Für alle Aufnahmen innerhalb eines Farbkanals wurde zum besseren Vergleich ein festgelegter Intensitätsbereich gewählt. Der Maßstabsbalken entspricht $10\ \mu\text{m}$. (b) Vergleich der β -Catenin-Expressionslevel im Membran- und Cytosolbereich der Zelllinien #33, #45 und #37.

β -Catenin-Versionen im Cytosol und auf der Membran der drei geneditierten Zelllinien miteinander verglichen (Abbildung 4.2 (b)). Hierbei ist anzumerken, dass anhand der SDCM-Aufnahmen keine absoluten Konzentrationen bestimmbar sind. Zudem ist das im Folgenden diskutierte scheinbare Expressionslevel nicht unbedingt proportional zur tatsächlichen Anzahl von exprimiertem β -Catenin, sondern hängt auch stark von

dem Regulationsmechanismus bzw. dem Abbau der jeweiligen β -Catenin-Version in der betrachteten Zelllinie ab. Für den Vergleich des β -Catenin-Expressionslevels an der Zellmembran wurden mit der Software Fiji [156] Linien mit Breite eines Pixels für mehrere Zellen entlang ihrer Zellmembran gelegt und die aufsummierte Gesamtintensität je Membran mit der Membranlänge gewichtet. Insgesamt ging pro Zelllinie eine Gesamtmembranlänge von mindestens 250 μm in die Auswertung mit ein. Auch das Expressionslevel im Cytosol der Zellen wurde überprüft, indem eine Region von Interesse im Zellinneren gewählt wurde, die weitgehend homogen erschien und keine Vesikel mit hohem Intensitätsbeitrag enthielt. Die gemessenen Intensitäten wurden mit der Fläche gewichtet und gemittelt, wobei pro Zelllinie eine Gesamtfläche von mindestens 615 μm^2 berücksichtigt wurde. Für die Bestimmung der Autofluoreszenz der HCT116-Zellen wurde jeweils die mittlere Intensität in der Zelllinie #45 (grüner Farbkanal) und #33 (im roten Farbkanal) ermittelt und diese anschließend von der mittleren Intensität im Farbkanal der entsprechend fluoreszenzmarkierten β -Catenin-Version abgezogen.

Vergleicht man die mittleren Intensitäten der Zelllinie #37 mit der der Zelllinie #45, so weist #37 eine leicht niedrigere β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry-Konzentration an der Membran (Verhältnis der mittleren Intensitäten (#37/#45): 0,76), dafür eine etwas höhere mittlere Intensität im Cytosol (Verhältnis der mittleren Intensitäten (#37/#45): 1,72) auf. Die mit mClover markierte β -Catenin(WT)-Version wurde bei der Zelllinie #37 in beiden Fällen wesentlich stärker exprimiert als bei #33 (Verhältnis der mittleren Intensitäten (#37/#33): 2,78 (Cytosol) und 3,33 (Membran)). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zelllinie #45 eine bessere Kontrollzelllinie darstellte als die Zelllinie #33, die β -Catenin(WT)-mClover in einer deutlich geringeren Menge exprimierte. Möchte man die Expressionslevel in beiden Farbkanälen miteinander vergleichen, so sollte man die Helligkeit der einzelnen Fluorophore berücksichtigen. mClover ist etwa einen Faktor 5 heller als mCherry [157, 158], was bedeutet, dass β -Catenin(WT) sowohl an der Membran als auch im Cytosol in weitaus niedrigeren Konzentrationen vorliegt als β -Catenin(Δ Ser45). Für die Messergebnisse im Cytosol bedeutet dies, dass die Konzentration von β -Catenin(WT) in etwa der Hälfte der Konzentration von β -Catenin(Δ Ser45) entspricht.

4.1.3. β -Catenin-Expressionslevel und Komplexbildung in HCT116-Zellen mittels FCS

Der Vergleich der allelspezifischen Expressionsniveaus von β -Catenin in den CRISPR/Cas9-geneditierten HCT116-Zellen mittels SDCM gab einen ersten Eindruck über die zu erwartenden Konzentrationsverhältnisse, die im Folgenden via FCS-Messungen quantitativ zu bestimmen waren. Die FCS-Messungen im Cytosol und Nukleus von Zellen wurden analog zu Kapitel 3.5.10 durchgeführt und ausgewertet.

4.1.3.1. Alexa-Farbstoffe als Referenz

Als Referenzproben wurden die organischen Farbstoffe Alexa488 und Alexa546 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts) in wässriger Lösung mit bekannten Diffusionskoeffizienten verwendet [159]. Beide Farbstoffe wurden sowohl bei 37 °C als auch mit der gleichen Laserleistung wie bei den folgenden Messungen an lebenden HCT116-Zellen (Kapitel 3.5.3) gemessen, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Mit den anhand der Anpassungen der FCS-Kurven (Abbildung 4.3 (a)) bestimmten mittleren Korrelationszeiten von Alexa488 ($\tau_D = (36,0 \pm 1,0) \mu\text{s}$, Mittelwert \pm SEM) und Alexa546 ($\tau_D = (49,9 \pm 1,2) \mu\text{s}$) wurde der laterale Fokussvolumenparameter im grünen ($\omega_0 = (258 \pm 8) \text{ nm}$) und roten Farbkanal ($\omega_0 = (312 \pm 8) \text{ nm}$) bestimmt. Die unter den oben genannten Bedingungen aufgenommenen mittleren FCS-Kurven von Alexa488 und Alexa546 in DPBS (engl. *Dulbecco's phosphate-buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung) sind in Abbildung 4.3 (a) dargestellt.

4.1.3.2. Fluoreszierende Proteine in HCT116-Zellen als Referenz

Die FCS-Messungen der in DPBS gelösten Alexa-Farbstoffe konnten nicht direkt als Referenz für Zellmessungen verwendet werden, da DPBS, u. a. durch seine geringere Viskosität und das Fehlen von Zellkompartimenten, die Eigenschaften des Cytosols einer Zelle nicht widerspiegelt. HCT116-Zellen, die zusätzlich mit den fluoreszierenden Proteinen eGFP, mClover oder mCherry mit bekannter Molekülmasse ($\approx 27 \text{ kDa}$) transient transfiziert wurden, eigneten sich als Referenzproben deutlich besser. Im Fall der grün fluoreszierenden Proteine wurde die Zelllinie #45 und für mCherry die Zelllinie #33 verwendet. Die Mediane der Verteilungen der mittleren Korrelationszeiten der fluoreszierenden Proteine im Cytosol und Nukleus von HCT116-Zellen (Abbildung 4.3 (b)) lagen im selben Größenbereich (Tabelle 4.1). Dies war auch zu erwarten, da diese fluoreszierenden Proteine alle eine Molekülmasse von etwa 27 kDa besitzen [157, 158, 160] und dadurch ähnliche Diffusionseigenschaften aufweisen sollten. Die

mittleren Korrelationszeiten der fluoreszierenden Proteine im Inneren von HCT116-Zellen lagen etwa eine Größenordnung über den mittleren Korrelationszeiten von Alexa-Farbstoffen in wässriger Lösung bei 37 °C. Dies liegt nicht nur an den unterschiedlichen Molekülgrößen, sondern auch an dem Viskositätsunterschied von DPBS und dem Cytosol der HCT116-Zellen. Für die Bestimmung des Verhältnisses der Viskositäten $\eta_{\text{Cytosol}}/\eta_{\text{DPBS}}$ wurden die Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.75) und die Gleichung 2.94 verwendet. Bei der Berechnung werden lediglich die Korrelationszeiten (Alexa488: $(35,5 \pm 1,1) \mu\text{s}$, Alexa546: $(49,9 \pm 1,2) \mu\text{s}$, übrige Fluorophore: Tabelle 4.1) und die Molekülmassen der Fluorophore (Alexa488: 0,643 kDa [64], Alexa546: 1,08 kDa [161], Fluorophor 27 kDa) benötigt. Der für eGFP ermittelte Viskositätsfaktor (Tabelle 4.1) stimmt mit den Faktoren überein, die bereits durch Dayel et al. [162] für GFP mit $\eta_{\text{Cytosol}}/\eta_{\text{Wasser}} = 2,9\text{-}3,5$ hauptsächlich in CHO-K1-Zellen und von Chen et al. [163] für eGFP mit $\eta_{\text{Cytosol}}/\eta_{\text{WässrigeLösung}} = 3,1 \pm 0,6$ und $\eta_{\text{Nukleus}}/\eta_{\text{WässrigeLösung}} = 3,3 \pm 0,8$ in HeLa-Zellen beobachtet wurden.

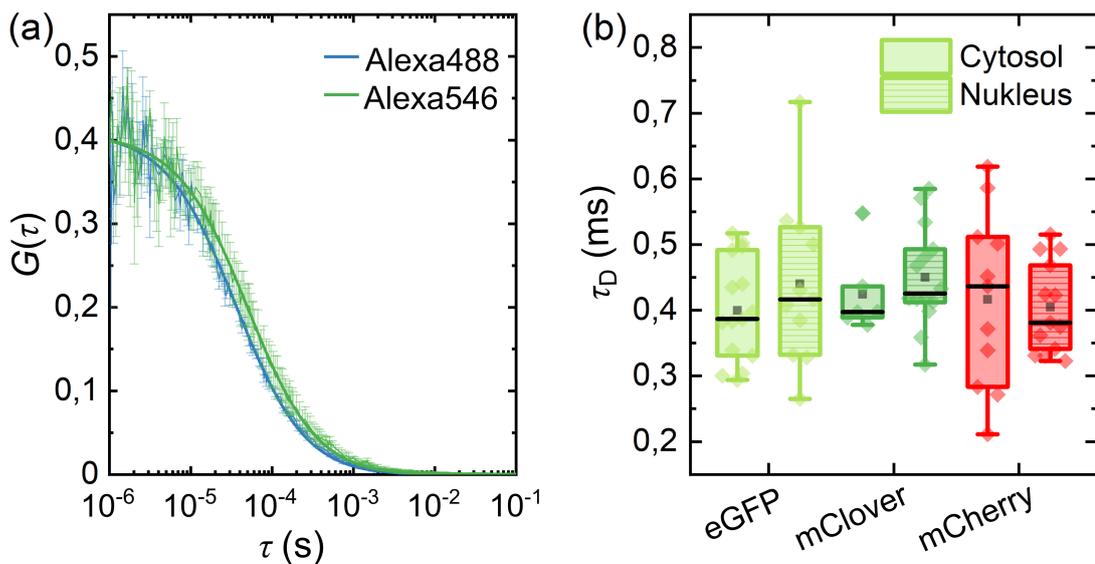


Abbildung 4.3: FCS-Referenzproben: Alexa488 und Alexa546 und fluoreszierende Proteine in HCT116-Zellen. (a) FCS-Kurven von in DPBS gelösten Alexa488- und Alexa546-Farbstoffen. Anpassung der Datenpunkte durch eine 3D-FCS-Fitfunktion (Gleichung 2.88). (b) Verteilung der bestimmten Korrelationszeiten von eGFP und mClover in Zelllinie #45 und mCherry in Zelllinie #33 (Boxbereich: 25%-75% Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, graues Quadrat: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer Zelle wider. eGFP: Cytosol von 15 Zellen, Nukleus von 11 Zellen; mClover: Cytosol von 6 Zellen, Nukleus von 14 Zellen; mCherry: Cytosol von 11 Zellen, Nukleus von 13 Zellen.)

Tabelle 4.1.: Dynamik von fluoreszierenden Proteinen in HCT116-Zellen. Anhand der Boxplot-Werte aus Abbildung 4.3 wurde der Median der Korrelationszeiten (\pm Hälfte der Boxplotgrenzen) von diffundierenden fluoreszierenden Proteinen in HCT116-Zellen bei 37 °C bestimmt. Aus diesen Werten wurde schließlich das Verhältnis der Viskositäten von HCT116-Zellen und Wasser gebildet $\eta_{\text{Cytosol/Nukleus}}/\eta_{\text{Wasser}}$.

Fluorophor	eGFP		mClover		mCherry	
	Cytosol	Nukleus	Cytosol	Nukleus	Cytosol	Nukleus
τ_D (ms)	$0,39 \pm 0,09$	$0,42 \pm 0,10$	$0,40 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,04$	$0,42 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,06$
$\eta_{\text{HCT116}}/\eta_{\text{DPBS}}$	$3,2 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,8$	$3,24 \pm 0,19$	$3,5 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,4$

4.1.3.3. FCS-Messungen von β -Catenin in HCT116-Zellen

Für die im Folgenden aufgeführten FCS-Messungen wurde die Zelllinie #37 gewählt, in der β -Catenin auf beiden Allelen fluoreszenzmarkiert wurde. Ein Ziel dieser FCS-Messungen war, nicht nur quantitativ die Konzentration der beiden β -Catenin-Varianten im Zellinneren zu bestimmen, sondern auch deren Diffusionsverhalten bzw. deren Tendenz zur Komplexbildung näher auf den Grund zu gehen. Da in den darauffolgenden Experimenten Chemikalien (u. a. Inhibitoren) in einem bestimmten Volumen zu dem Zellmedium gegeben wurden, wurde für die Kontrollmessungen dasselbe Volumen an purem Lösungsmittel (DMSO) verwendet, nur ohne Chemikalien. Um hierbei nicht nur die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, sondern auch die biologische Relevanz zu bestätigen, wurden für die Auswertung jeweils drei biologische Replikate¹ hinzugezogen.

Die Kreuzkorrelationsanalyse der Intensitätsverläufe in beiden Farbkanälen von FCS-Messungen an der Zelllinie #37 ergab, dass die Wildtypvariante und die mutierte Version von β -Catenin weder im Cytosol noch im Nukleus zusammen als Komplex diffundieren. Abbildung 4.4 zeigt die Auto- und Kreuzkorrelationskurven einer FCS-Messung im Cytosol und Nukleus einer Zelle der Zelllinie #37. Die Amplitude der Kreuzkorrelationskurve liegt im Vergleich mit den Amplituden der Autokorrelationskurven deutlich bei null. Als Nächstes wurden die Dynamik und das Expressionslevel

¹ Drei unabhängige Datensätze, aufgenommen an drei unterschiedlichen Tagen und in drei frisch angesetzten Proben.

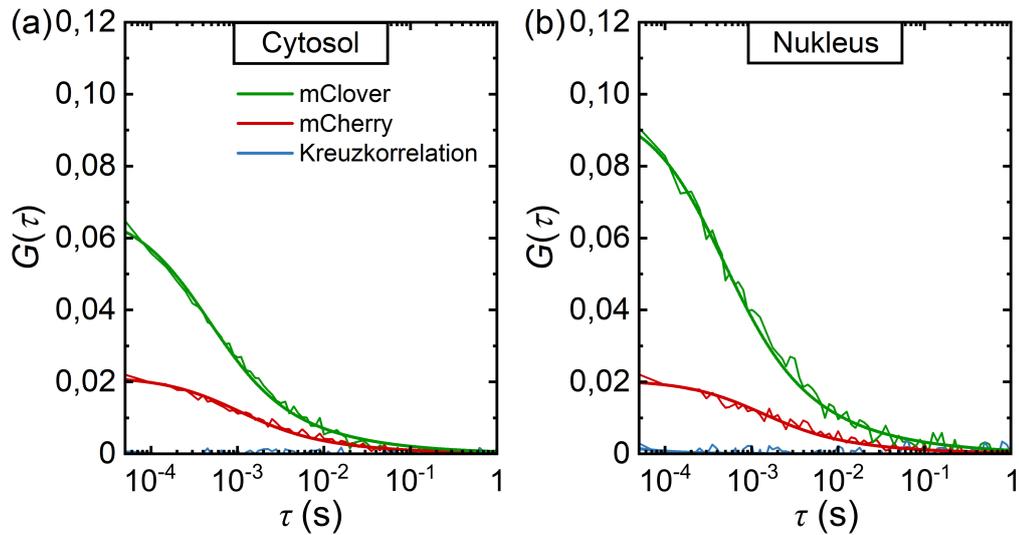


Abbildung 4.4: Beispielhafte FCS-Messung von β -Catenin(WT)-mClover und β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry im (a) Cytosol und (b) Nukleus einer Zelle der Zelllinie #37. Anpassung der Datenpunkte durch eine 3D-FCS-Fitfunktion (Gleichung 2.88).

von beiden fluoreszenzmarkierten β -Catenin-Varianten näher untersucht. Die Ergebnisse einer FCS-Messreihe an mehr als 40 individuellen Zellen der Linie #37 wurden mit Hilfe der Daten der zuvor gemessenen Referenzproben in Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten umgewandelt (Abbildung 4.5). Da es sich bei Zellen um lebende Organismen handelt, die sich individuell in Zellzyklus, Proteinkonzentration und Zellmetabolismus unterscheiden, lagen die Messergebnisse im Allgemeinen breit gestreut vor. Der Diffusionskoeffizient von β -Catenin hängt insbesondere nicht nur von der Protein- bzw. Komplexgröße, sondern auch von der lokalen Beschaffenheit und den Hindernissen in der Zelle ab, die die Diffusion von β -Catenin stark beeinflussen können. Die anhand des Medians und der Boxplotgrenzen bestimmten Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 4.2 aufgeführt.

Da die Mutation von Ser45 den Abbau von β -Catenin hindert, lag die Wildtyp-Version ($C_{\beta\text{-Cat.}} = (32 \pm 9) \text{ nM}$) im Vergleich zur mutierten Version von β -Catenin ($C_{\beta\text{-Cat.}} = (75 \pm 11) \text{ nM}$) wie erwartet in einer deutlich niedrigeren Konzentration vor. Die Konzentration der WT-Variante liegt bei etwa der Hälfte der Konzentration der mutierten β -Catenin-Variante, was gut mit den SDCM-Ergebnissen (Kapitel 4.1.2) übereinstimmt. Die WT-Variante diffundierte zudem schneller als die mutierte Variante von β -Catenin, was darauf hindeutete, dass sich die mutierte Version in größeren Komplexen durch das Cytosol bzw. den Nukleus der Zellen bewegte.

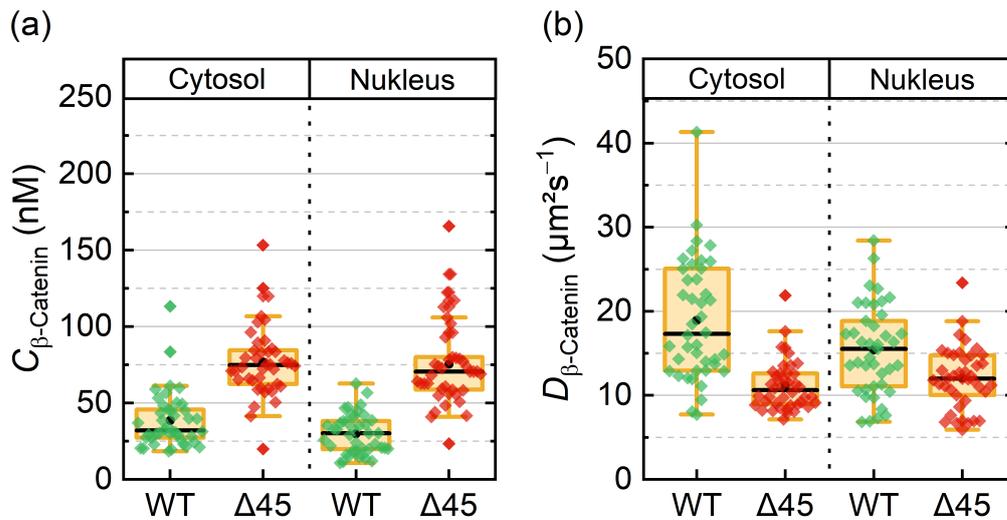


Abbildung 4.5: (a) Verteilung der Konzentrationen und (b) Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nucleus der Zelllinie #37 14 h – 26 h nach Zugabe von 10 μ M DMSO (Kontrolle). (Boxbereich: 25 % – 75 % Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, schwarzer Punkt: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer von insgesamt mehr als 40 Zellen wider.)

Tabelle 4.2.: Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nucleus der Zelllinie #37. (Median \pm Hälfte der Boxplotgrenzen.)

Zelllinie	Zugabe	Allele	Position	$C_{\beta\text{-Catenin}}$ (nM)	$D_{\beta\text{-Catenin}}$ ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)
#37	DMSO	Cytosol	WT	32 ± 9	17 ± 6
			Δ 45	75 ± 11	$10,6 \pm 1,8$
		Nucleus	WT	30 ± 9	16 ± 4
			Δ 45	71 ± 11	$12,0 \pm 2,3$

Die Rolle des Zerstörungskomplexes bei der β -Catenin-Komplexbildung

Wie die FCS-Messungen an Zelllinie #37 zeigten, lag die mutierte Version von β -Catenin im Vergleich zur Wildtypversion nicht nur in größeren Mengen vor, sondern diffundierte deutlich langsamer. Dies ließ vermuten, dass β -Catenin in großen Proteinkomplexen festsetzt, bei denen es sich aufgrund der Mutation der Phosphorylierungsstelle Ser45 um den Zerstörungskomplex handeln könnte. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der Einfluss einiger im β -Catenin-Abbau beteiligten Proteine näher betrachtet.

Der Einfluss von Axin (XAV939)

Ein wichtiges Protein im Zerstörungskomplex von β -Catenin ist das Strukturprotein Axin. Das für den Abbau von Axin verantwortliche Enzym Tankyrase ist auch als Wnt-Antagonist bekannt und führt im Falle seiner Inhibition, u. a. durch den Tankyrase-Inhibitor XAV939, zu einer erhöhten Bildung an β -Catenin-Zerstörungskomplexen [164–166]. Ob XAV939 die Wnt-Signalaktivität in HCT116-Zellen beeinflusst, wurde von Dr. Giulia Ambrosi (AG Boutros, DKFZ, Heidelberg) mit Hilfe eines TopFlash-Assays näher untersucht (Abbildung 4.6). Als Positivkontrolle wurde der Wnt-Aktivator und GSK3-Inhibitor CHIR99021 eingesetzt, welcher bekannt dafür ist, die kanonische Wnt-Signalaktivität in Zellen aufgrund der Stabilisierung von β -Catenin zu steigern [167, 168]. Wie erwartet ist im TopFlash-Assay eine deutliche Erhöhung der Wnt-Signalaktivität nach CHIR99021-Inkubation zu sehen. Auf die genaue Auswirkung von CHIR99021 auf die Konzentration und die Komplexbildung von β -Catenin in HCT116-Zellen wird im Abschnitt 4.1.3.3 detaillierter eingegangen. Im Gegensatz zu CHIR99021 hatte die Zugabe des Wnt-Antagonisten XAV939 keine wesentliche Auswirkung auf die Wnt-Signalaktivität in HCT116-Zellen. Die Messdaten lagen im Bereich der Datenpunkte der unbehandelten Wildtyp-Zellen und nur leicht unterhalb der Datenpunkte für

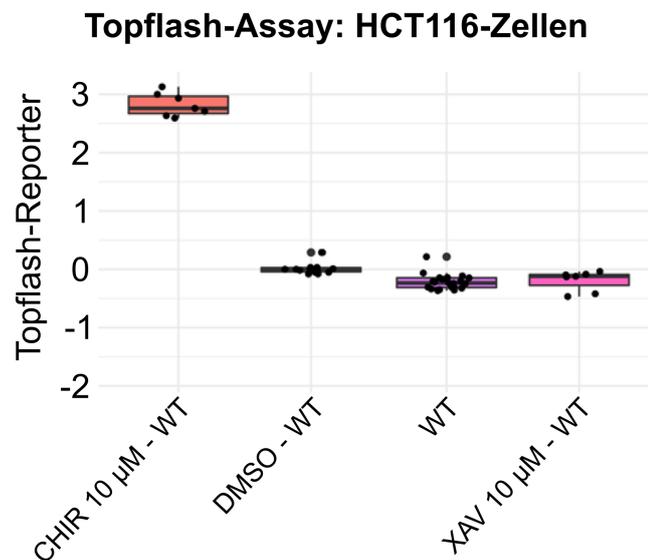


Abbildung 4.6: TopFlash-Assay in HCT116-Zellen: Einfluss von CHIR99021 (GSK3-Inhibitor und Wnt-Aktivator) und XAV939 (Axin-Stabilisator und Wnt-Antagonist) auf die Wnt-Signalaktivität. Die Zellen wurden entweder unbehandelt oder vor den Messungen mit DMSO (Kontrolle), mit 10 μ M CHIR99021 oder mit 10 μ M XAV939 inkubiert. Daten von Dr. Giulia Ambrosi (AG Boutros, DKFZ, Heidelberg).

die Zugabe von DMSO. Ein ähnliches Verhalten von HCT116-Zellen nach XAV939-Inkubation wurde 2014 von Roche et al. [169] beobachtet. XAV939 erhöhte in diesen Experimenten die Menge an Axin1, die Gesamtmenge an β -Catenin blieb jedoch unverändert. Eine mögliche Begründung für diese Ergebnisse könnte sein, dass in HCT116-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien die Stabilisation von Axin allein nicht ausreicht, um eine höhere β -Catenin-Abbaurrate zu erzielen. Wahrscheinlich müssten die HCT116-Zellen als Antwort auf die Stabilisation an Axin ebenso die Mengen an APC, GSK3 und CK1 entsprechend hochregulieren, um die Bildung von funktionsfähigen β -Catenin-Zerstörungskomplexen zu fördern. Vermutlich war die Wnt-Aktivität in HCT116-Zellen allgemein stark reduziert, wodurch die Stabilisation von Axin die β -Catenin-Abbaurrate nicht wesentlich beeinflussen konnte.

In den FCS-Experimenten konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss des Wnt-Antagonisten XAV939 auf die β -Catenin-Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 4.7 (a)). Die anhand der FCS-Experimente bestimmten Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst. Betrachtet man die Mediane, so nahmen die Konzentrationen beider β -Catenin-Varianten durch die XAV939-Zugabe leicht zu ($C_{\beta(\text{WT}),\text{XAV}}/C_{\beta(\text{WT}),\text{DMSO}}$: 1,6 (Cytosol), 1,6 (Nukleus); $C_{\beta(\Delta 45),\text{XAV}}/C_{\beta(\Delta 45),\text{DMSO}}$: 1,1 (Cytosol), 1,3 (Nukleus)). Dies widerspricht der Erwartung, dass XAV939 durch den Abbau von β -Catenin die Wnt-Signalaktivität senkt und zu einer geringeren Konzentration an β -Catenin führen sollte. Eventuell führt die Zunahme an Axin-Proteinen durch das Fehlen der anderen beteiligten Proteine nicht direkt zur Zunahme der Anzahl von β -Catenin Zerstörungskomplexen. Diese Vermutung wird durch die Betrachtung der Verteilung der Diffusionskoeffizienten (Abbildung 4.7 (b)), die durch die XAV939-Zugabe in allen Fällen nahezu unverändert scheint, unterstützt.

Tabelle 4.3.: Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 nach XAV939-Zugabe. (Median \pm Hälfte der Boxplotgrenzen.)

Zelllinie	Zugabe	Allele	Position	$C_{\beta\text{-Catenin}}$ (nM)	$D_{\beta\text{-Catenin}}$ ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)
#37 WT	XAV	Cytosol	WT	52 ± 11	17 ± 4
			$\Delta 45$	117 ± 29	$9,8 \pm 1,9$
		Nukleus	WT	32 ± 8	15 ± 5
			$\Delta 45$	94 ± 23	$11,7 \pm 2,8$

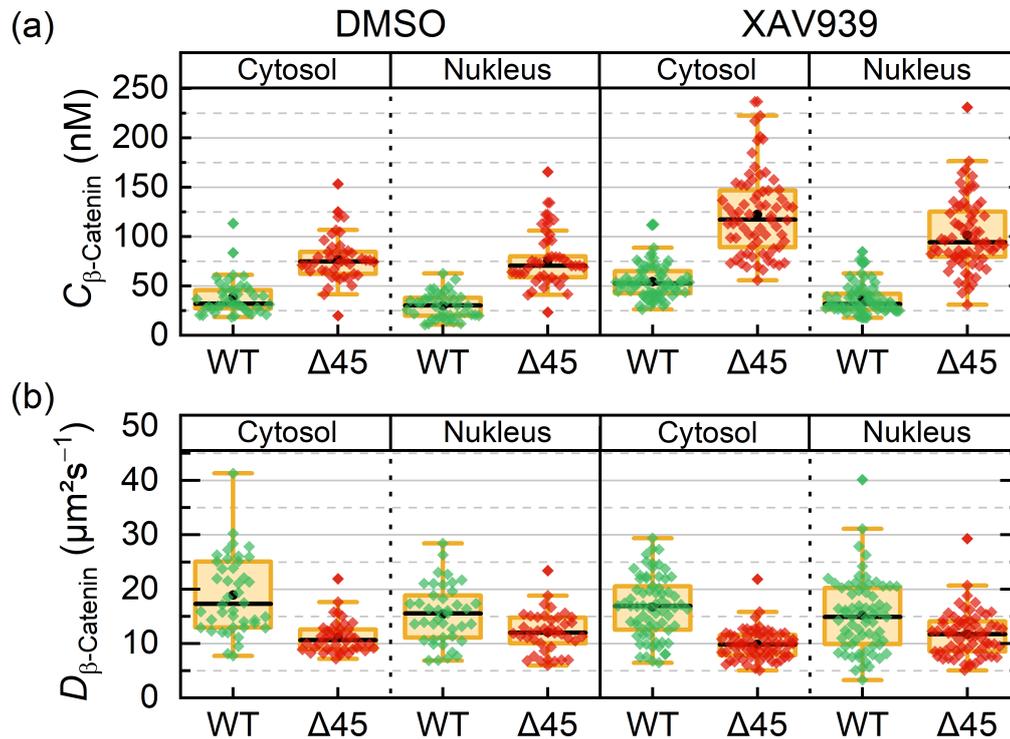


Abbildung 4.7: Einfluss des Axin-Stabilisators und Wnt-Antagonisten XAV939 auf (a) die Konzentrationen und (b) Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nucleus der Zelllinie #37. Die Zellen wurden vor den Messungen entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit 10 μ M XAV939 für ca. 16 h inkubiert. (Boxbereich: 25 % – 75 % Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, schwarzer Punkt: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer von insgesamt mehr als 40 Zellen wider.)

Der Einfluss von APC und GSK3 (shAPC, sgAPC, CHIR99021)

Neben Axin ist das Strukturprotein APC ein unerlässlicher Baustein im β -Catenin-Zerstörungskomplex. Mutationen, die in APC u. a. zu Verkürzungen führen, können den Abbau von β -Catenin erheblich beeinflussen und sind oftmals in Darmkrebszellen, u. a. in HCT116-Zellen, anzutreffen [170, 171]. Solche Verkürzungen in der Aminosäuresequenz liegen meist im C-terminalen Bereich von APC. Je kleiner solch eine verkürzte Version von APC ausfällt, desto geringer ist deren Fähigkeit, β -Catenin an sich zu binden, wodurch sich die β -Catenin-Konzentration in Zellen schließlich erhöht. Da sich β -Catenin(Δ Ser45) infolge der fehlenden Phosphorylierungsstelle in HCT116-Zellen als große Proteinkomplexe anzuhäufen schien, lag die Vermutung nahe, dass β -Catenin teilweise in einem inaktiven Zerstörungskomplex gefangen und APC daran

beteiligt war. Um dies zu überprüfen, wurde mittels sgAPC (engl. *single guide* RNA, künstliches RNA-Molekül zur Steuerung der Geneditierung eines Zielgens, hier APC) eine via CRISPR/Cas9 auf beiden β -Catenin-Allelen genetisch modifizierte Version der HCT116-Zelllinie #37 generiert (Dr. Giulia Ambrosi, AG Boutros, DKFZ, Heidelberg), die ausschließlich eine verkürzte Version von APC enthielt (~ 150 kDa von ursprünglichen 312 kDa [172, 173]). FCS-Messungen an dieser Zelllinie sollten Aufschluss darüber geben, ob die Verkürzung von APC die β -Catenin(WT)-Konzentration erhöht und die Bildung der großen β -Catenin-Protein-Komplexe beeinflusst. Ob das Senken der APC-Konzentration in der Zelllinie #37 zu ähnlichen Ergebnissen führt, kann durch die künstliche Stilllegung des APC-Gens mit Hilfe der Zugabe von shAPC (engl. *small hairpin* RNA, künstliches RNA-Molekül zum Stilllegen eines Zielgens, hier APC) überprüft werden. Die in Bezug auf APC unmodifizierte Zelllinie #37 erhält im Folgenden die Bezeichnung #37 WT, die geneditierte Zelllinie mit der verkürzten APC-Version die Bezeichnung #37 KO (engl. *knock-out*) und die mit shAPC inkubierten Zellen bekommen die Bezeichnung #37 KD (engl. *knock-down*). Hierbei ist jedoch anzumerken, dass es sich bei der Zelllinie #37 KO streng genommen um kein klassisches „Knockout“ handelt, sondern vielmehr um einen Funktionsverlust des APC-Proteins durch die eingeführte Verkürzung.

Zusätzlich zur Variation der Konzentration von funktionsfähigem APC wurde der Einfluss von GSK3 auf die Konzentration sowie auf die Diffusionseigenschaften von β -Catenin in all den oben genannten Zelllinien genauer untersucht. Wie die vorigen FCS-Messungen bereits zeigten, schien β -Catenin infolge der Mutation an der Phosphorylierungsstelle Ser45 im Vergleich zur Wildtypversion in größeren Komplexen vorzuliegen. Für einen erfolgreichen Abbau von β -Catenin ist neben der Phosphorylierung an der Stelle Ser45 durch CK1 die darauffolgende Phosphorylierung durch GSK3 essenziell. Der gezielte Einsatz des GSK3-Inhibitors CHIR99021, unterbricht, ähnlich wie die Mutation an der Stelle Ser45, die Phosphorylierungskette für den β -Catenin-Abbau, stabilisiert somit das β -Catenin-Niveau in Zellen und steigert die kanonische Wnt-Signalaktivität [167, 168].

Bei der Diskussion der β -Catenin-Konzentrationen und -Diffusionseigenschaften in den Zelllinien #37 WT, #37 KD und #37 KO liegt der Fokus im Folgenden auf den Cytosol-Messungen, da deren Messergebnisse sich nicht wesentlich von den Nukleus-Messungen unterscheiden (Abbildung 4.8). Die Mediane der Boxplots (\pm Hälfte der Boxplotgrenzen) sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

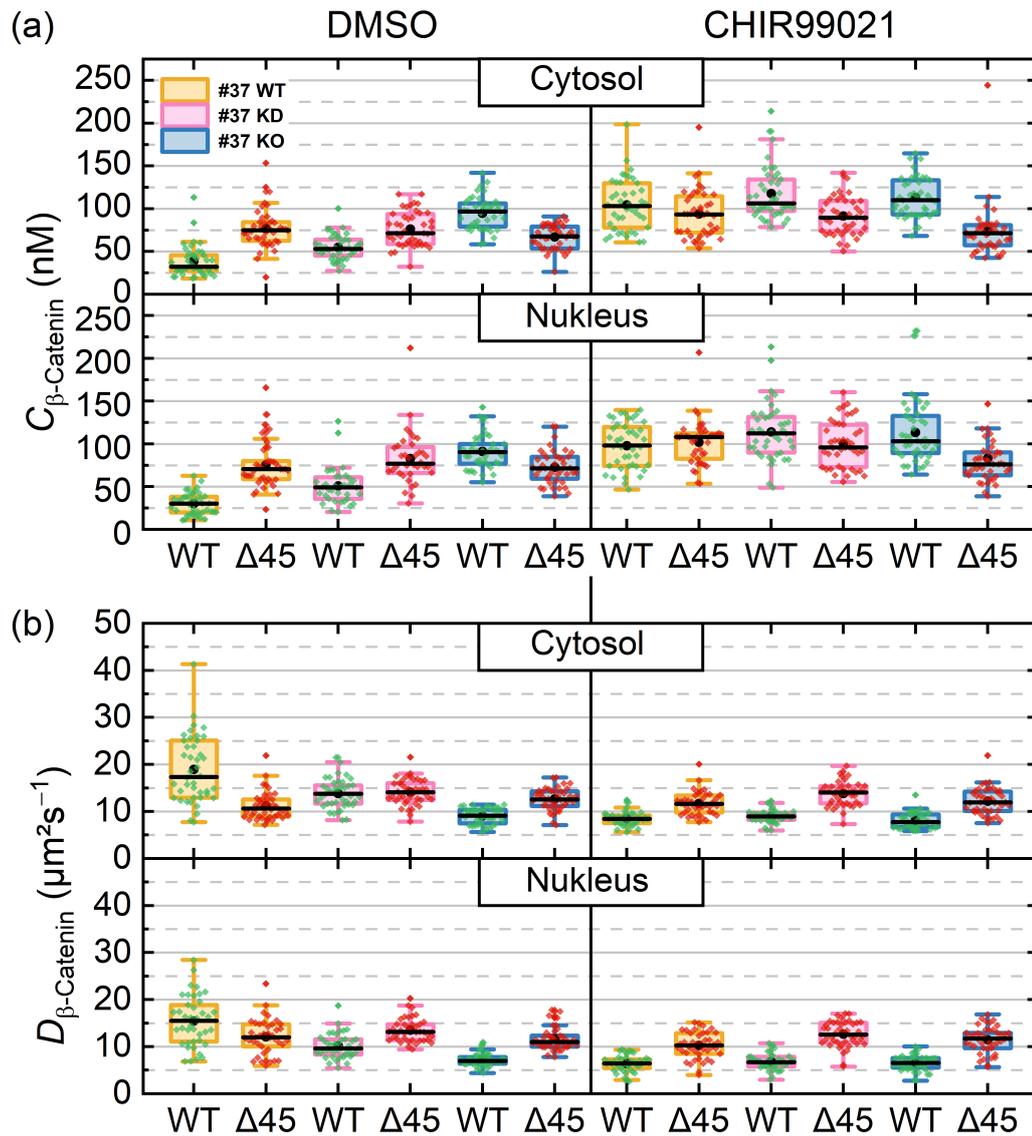


Abbildung 4.8: Einfluss des GSK3-Inhibitors CHIR99021 auf (a) die Konzentrationen und (b) Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nucleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO. Die Zellen wurden vor den Messungen entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit 10 μ M CHIR99021 für ca. 16 h inkubiert. (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, schwarzer Punkt: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer von insgesamt mehr als 40 Zellen wider.)

Allgemein schien der Funktionsverlust von APC bzw. die Erniedrigung der APC-Konzentration sich weder signifikant auf die Konzentration noch auf den Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry auszuwirken. Interessanterweise führte der Funktionsverlust von APC weder zur deutlichen Vergrößerung der β -Catenin(Δ Ser45)-Komplexe noch zur Erhöhung derer Konzentration. Dies sprach außerdem dafür, dass β -Catenin(Δ Ser45) auch mit der verkürzten APC-Version interagieren konnte, um Komplexe zu formen. Es ist zu vermuten, dass diese Komplexe wie in der Zelllinie # 37 WT als inaktiver Zerstörungskomplex in der Zelle bestehen blieben. Im Gegensatz dazu war für β -Catenin(WT)-mClover beim Vergleich der Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten in den drei Zelllinien deutliche Unterschiede zu erkennen. Dabei fielen die Unterschiede der β -Catenin(WT)-Konzentrationen (Abbildung 4.8 (a)) und der β -Catenin(WT)-Diffusionskoeffizienten (Abbildung 4.8 (b)) bei der Gegenüberstellung der Zelllinien #37 WT und #37 KO am größten aus ($C_{\beta(\text{WT}),\text{KO}}/C_{\beta(\text{WT}),\text{WT}} = 3,03$ (Cytosol); $D_{\beta(\text{WT}),\text{KO}}/D_{\beta(\text{WT}),\text{WT}} = 0,53$ (Cytosol)). Die Messergebnisse der Zelllinie #37 KD lagen im Allgemeinen zwischen den Ergebnissen der anderen beiden Zelllinien, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass das APC-Gen nur teilweise, jedoch nicht vollständig stillgelegt werden konnte. Möglicherweise war die Inkubationszeit der shRNA von 14 h – 26 h nicht ausreichend, um bei Zelllinie #37 KD einen merklichen Effekt auf die Menge an β -Catenin(WT) zu erzielen.

Als Nächstes wird der Einfluss des GSK3-Inhibitors CHIR99021 näher betrachtet. Die Zugabe von CHIR99021 führte wie erwartet zu einer Erhöhung der Gesamtmenge an β -Catenin(WT)-mClover in allen drei Zelllinien. Dieser Effekt fiel für die mit mClover markierte β -Catenin(WT)-Version in der Zelllinie #37 WT ($C_{\beta(\text{WT}),\text{CHIR}}/C_{\beta(\text{WT}),\text{DMSO}} = 3,21$ (Cytosol)) am stärksten aus. Die Konzentrationszunahme entspricht in etwa der Auswirkung der APC-Verkürzung in der Zelllinie #37 bei DMSO-Inkubation.

Beim Betrachten der β -Catenin-Diffusionskoeffizienten unter dem Einfluss des GSK3-Inhibitors CHIR99021 fällt auf, dass die Wildtypversion tendenziell im Vergleich zum Kontrollexperiment (DMSO) langsamer diffundiert. Dies deutet auf die Bildung von größeren β -Catenin-Komplexen hin. Unter Einbezug der Referenzmessung bzw. des Diffusionskoeffizienten von mClover ($D_{\text{mClover}} = (41,7 \pm 2,3) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Cytosol)) wird über das Verhältnis der Molekülmassen ($MW_{\text{mClover}}/MW_{\beta\text{-Cat.-FP}} = 27 \text{ kDa}/120 \text{ kDa}$) anhand der Gleichung 2.94 für das Fusionskonstrukt β -Catenin-FP ein Diffusionskoeffizient von $D_{\beta\text{-Cat.-FP}} = (25,5 \pm 1,4) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Cytosol) erwartet. Der Aufbau eines β -Catenin-Zerstörungskomplexes, wie er im Wnt-Signalweg oft vereinfacht dargestellt wird, setzt sich aus β -Catenin-FP (120 kDa), CK1 (39 kDa, CK1 α), GSK3 (47 kDa), Axin (96 kDa, Axin1) und APC (312 kDa) [172, 173] zusammen. Die Gesamtmolekülmasse

eines solchen Zerstörungskomplexes entspricht 614 kDa. Mit Hilfe von Gleichung 2.94 und dem Verhältnis der Molekülmassen ($MW_{mClover}/MW_{\beta-Cat.ZK} = 27 \text{ kDa}/614 \text{ kDa}$) ergibt sich daraus ein Diffusionskoeffizient von etwa $D_{\beta-Cat.ZK}^2 = (14,8 \pm 0,8) \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (Cytosol). Da Axin und APC bekannt dafür sind, zum Teil unabhängig von β -Catenin große Komplexe miteinander zu formen [174, 175], war es durchaus gerechtfertigt, größere Molekülmassen für den β -Catenin-Zerstörungskomplex und daher auch kleinere Diffusionskoeffizienten zu erwarten. Gerlach et al. [172] bestätigten diese Vermutung in ihren Versuchen. Sie verwendeten eine verbesserte Art der nativen Gelelektrophorese (BN-PAGE), um Proteine im Lysat von HEK293T-Zellen (engl. *human embryonic kidney cells*) in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse zu separieren. Dabei skaliert die Oberfläche mit der Angriffsfläche der geladenen Farbstoffmoleküle [176]. Die von Gerlach et al. [172] via BN-PAGE ermittelten β -Catenin-Molekülmassen erstreckten sich auf einen Bereich von 150-1500 kDa mit den ersten Peaks bei ca. 200 kDa und 350 kDa sowie einem deutlichen Peak bei 700 kDa [172]. Auffällig war, dass sich die Verläufe der β -Catenin-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Komplexgröße bei unbehandelten und mit Wnt3a-konditioniertem Medium inkubierten Zellen stark ähnelten. Die β -Catenin-Konzentration der unbehandelten Zellen lag jedoch bis 700 kDa unterhalb des Verlaufs der mit Wnt3a behandelten Zellen. Bei dieser Fraktion von β -Catenin handelt es sich sehr wahrscheinlich um freies β -Catenin bzw. um kleinere Proteinkomplexe, bei denen es sich nicht zwingend um Bestandteile des Zerstörungskomplexes handeln muss. Oberhalb von 700 kDa überwog die β -Catenin-Konzentration der unbehandelten Zellen.

Anhand der Korrelationszeiten lassen sich prinzipiell durch das Umstellen der Gleichung 2.86 und 2.75 die β -Catenin-Molekülmassen berechnen. Hierbei wurde für ein im Cytosol und Nukleus frei diffundierendes fluoreszierendes Protein eine Korrelationszeit von 0,4 ms angenommen. Die Häufigkeitsverteilung der mittels 0,1 ms gebinteten Ergebnisse der β -Catenin-Molekülmassen für die Zelllinien #37 WT, KD und KO nach DMSO- oder CHIR99021-Inkubation ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

Im Folgenden werden zunächst nur die Kontrollmessungen der Zelllinie #37 WT betrachtet. Kontrollexperimente (DMSO) im Cytosol der Zellen zeigten für β -Catenin(WT)-mClover zwei auffällige Peaks. Der erste Peak befand sich bei der Molekülmasse für β -Catenin-FP (120 kDa) und der zweite bei etwa 700 kDa, was der Molekülmasse eines β -Catenin-Zerstörungskomplexes entspricht. Allgemein ist festzustellen, dass β -Catenin in HCT116-Zellen analog zu den Ergebnissen aus den Experimenten von Gerlach et al. [172] an HEK293T-Zellen in Proteinkomplexen unterschiedlichster Größen

² β -Catenin-Zerstörungskomplex („ β -Cat.ZK“)

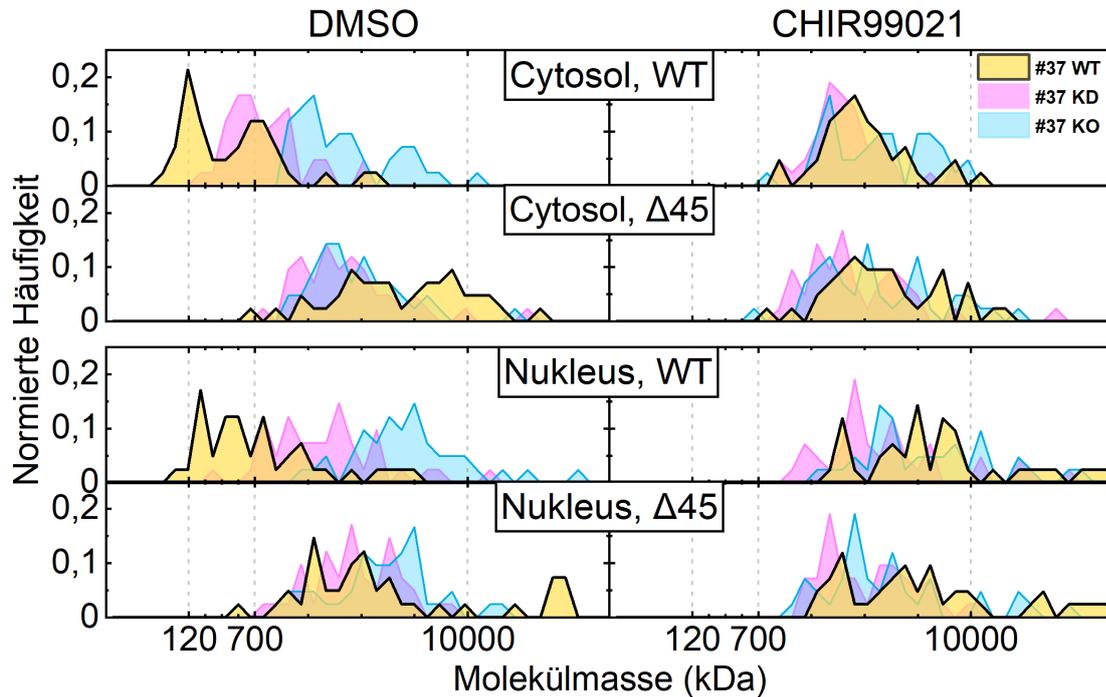


Abbildung 4.9: Einfluss von CHIR99021 auf die anhand der Korrelationszeiten umgerechnete Molekülmasse von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO. Die Zellen wurden vor den Messungen entweder mit DMSO (Kontrolle) oder mit 10 μ M CHIR99021 für ca. 16 h inkubiert. (Bin für die Korrelationszeiten: 0,1 ms; Korrelationszeit für ein FP: 0,4 ms.)

vorliegt. Im Falle von β -Catenin(Δ Ser45) führte das Fehlen der Phosphorylierungsstelle Ser45 zu einer deutlichen Verschiebung der Häufigkeitsverteilung zu größeren Proteinkomplexen (>700 kDa) im Vergleich zur β -Catenin(WT)-Version. Die CHIR99021-Inkubation führte für beide β -Catenin-Versionen zu einer etwas kompakteren Verteilung zwischen 700 kDa und 10000 kDa.

Im Gegensatz zur Zelllinie #37 WT zeigte #37 KO ein deutlich anderes Verhalten bei DMSO-Inkubation. Die Verteilung von β -Catenin(WT)-mClover verschob sich zu wesentlich größeren Molekülmassen und war nun leicht kompakter verteilt als die Verteilung von β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry. Das Fehlen der Phosphorylierungsstelle Ser45 schien bei #37 KO keinen erheblichen Einfluss auf die Molekülmassenverteilung zu haben. Dies bedeutete, dass sich hauptsächlich die Verkürzung von APC auf die Komplexformation von β -Catenin auswirkte.

Die Häufigkeitsverteilungen der Zelllinie #37 KD befanden sich analog zu den Diffusionskoeffizienten zwischen den Ergebnissen der Zelllinien #37 WT und #37 KO.

Die Zugabe des GSK3-Inhibitors CHIR9902 führte schließlich zu einer Angleichung der Verteilungen in allen drei Zelllinien. Die Reduzierung der GSK3-Menge wirkte sich zwar ähnlich aus wie die Blockierung der Phosphorylierung durch Δ Ser45 in Kontrollmessungen, war jedoch am besten vergleichbar mit dem Einfluss von verkürztem, funktionsunfähigem APC. Es ist anzumerken, dass die Ergebnisse von Cytosol- und Nukleusmessungen sich für alle drei Zelllinien ähnelten, wobei im Falle der Nukleusmessungen vereinzelt höhere Molekülmassen anzutreffen waren. Den vereinzelt Ausreißern bei hohen Molekülmassen ($\gg 10000$ kDa), vor allem nach CHIR99021-Zugabe, lagen wahrscheinlich lokale Viskositätsänderungen bzw. Hindernisse im Nukleus zugrunde. Generell ist bei der Umrechnung von Korrelationszeiten in Molekülmassen Vorsicht geboten. Große Korrelationszeiten stehen nicht nur im Zusammenhang mit der Größenzunahme der untersuchten Proteinkomplexe, sondern hängen, insbesondere bei Messungen im Zellinneren, von lokalen Gegebenheiten der Zelle ab, u. a. von der Viskosität, dem Zellkompartiment und den möglichen Wechselwirkungspartnern. Zudem muss beachtet werden, dass jeder Datenpunkt in den vorigen Boxplotgraphen sowie in der Häufigkeitsverteilung (Abbildung 4.9) eine Messung an einer individuellen Zelle widerspiegelt. Die in dieser Zelle vorliegenden Proteinzusammenschlüsse können sich von anderen Zellen durchaus unterscheiden und somit zu unterschiedlichen Korrelationszeiten führen. Mit einer ausreichenden Statistik sollte dennoch ein Trend zu erkennen sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Messergebnisse auf ein weitaus komplexeres Zusammenspiel zwischen APC, Axin, GSK3, CK1 und β -Catenin hindeuten als bisher angenommen. Eine breite Verteilung an Molekülmassen der β -Catenin-Komplexe wurde bereits von Gerlach et al. [172] in HEK293T-Zellen beobachtet. Die Molekülmassen dieser Komplexe erstreckten sich auf einen Bereich von etwa 150-1500 kDa. Größere Komplexgrößen konnten in seinen Versuchen nicht aufgelöst werden, da der gezeigte Verlauf der β -Catenin-Konzentrationen in Abhängigkeit von dem Molekülmassenbereich bei etwa 1500 kDa abbrach. Der Verlauf schien an dieser Stelle jedoch noch erheblich anzusteigen. Die FCS-Messungen dieser Arbeit bestätigen, dass β -Catenin(WT) in HCT116-Zellen, analog zur bisher bekannten Theorie des Wnt-Signalwegs, vorwiegend allein oder gebunden in Komplexen mit APC vorlag. Sowohl die Entfernung der Phosphorylierungsstelle Ser45 in der Sequenz von β -Catenin als auch die Einführung einer geneditierten, verkürzten Version von APC resultierten in vermehrter Komplexbildung von β -Catenin. Diese Ergebnisse waren durchaus zu erwarten: Beide Vorgehensweisen hinderten zwar die erfolgreiche Phosphorylierung von β -Catenin durch den Zerstörungskomplex, die Bindung von β -Catenin an den Zerstörungskom-

Tabelle 4.4.: Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO nach CHIR99021-Zugabe. (Median \pm Hälfte der Boxplotgrenzen.)

Zelllinie	Zugabe	Allele	Position	$C_{\beta\text{-Catenin}}$ (nM)	$D_{\beta\text{-Catenin}}$ ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)
#37 WT	DMSO	Cytosol	WT	32 ± 9	17 ± 6
			Δ 45	75 ± 11	$10,6 \pm 1,8$
		Nukleus	WT	30 ± 9	16 ± 4
			Δ 45	71 ± 11	$12,0 \pm 2,3$
	CHIR	Cytosol	WT	103 ± 26	$8,4 \pm 0,8$
			Δ 45	93 ± 21	$11,6 \pm 1,8$
		Nukleus	WT	98 ± 23	$6,5 \pm 1,0$
			Δ 45	107 ± 15	$10,2 \pm 2,2$
#37 KD	DMSO	Cytosol	WT	53 ± 9	$13,8 \pm 2,0$
			Δ 45	71 ± 18	$14,1 \pm 1,8$
		Nukleus	WT	49 ± 13	$9,6 \pm 1,6$
			Δ 45	77 ± 15	$13,15 \pm 1,7$
	CHIR	Cytosol	WT	106 ± 19	$8,9 \pm 0,8$
			Δ 45	90 ± 18	$14,0 \pm 1,8$
		Nukleus	WT	112 ± 21	$6,7 \pm 1,0$
			Δ 45	96 ± 25	$12,6 \pm 2,1$
#37 KO	DMSO	Cytosol	WT	97 ± 14	$9,1 \pm 1,4$
			Δ 45	68 ± 13	$12,6 \pm 1,6$
		Nukleus	WT	90 ± 12	$7 \pm 0,7$
			Δ 45	71 ± 13	$11,0 \pm 1,2$
	CHIR	Cytosol	WT	110 ± 20	$7,7 \pm 1,4$
			Δ 45	71 ± 12	$11,9 \pm 2,1$
		Nukleus	WT	103 ± 22	$6,5 \pm 1,0$
			Δ 45	76 ± 13	$11,7 \pm 1,6$

plex war jedoch weiterhin möglich [174, 175, 177, 178]. Welche Proteine im Detail an diesen großen Komplexen beteiligt waren bzw. bei welcher Stöchiometrie, blieb jedoch offen. Diese Fragestellung sollte durch gezielte Untersuchungen in der Zukunft weiterverfolgt werden. Vermutet wurden große Proteinzusammenschlüsse von β -Catenin mit

APC und Axin. CRISPR/Cas9-geneditierte Zelllinien mit fluoreszenzmarkiertem APC und Axin (z. B. in grün und rot) könnten als Grundlage weiterer, aufschlussreicher FCS-Messungen an HCT116-Zellen dienen. Da die Generierung von CRISPR/Cas9-geneditierten Zelllinien im Allgemeinen sehr zeitintensiv ist, war dies im Rahmen dieser Arbeit und Kollaboration mit der AG Boutros nicht mehr möglich. Zudem wäre es vorteilhaft, den FCS-Mikroskopaufbau für künftige Messungen zu ergänzen. Beispielsweise könnten FCS-Messungen in drei Farbkanälen, mit alternierender Anregung durch drei nacheinander gepulste Anregungslaser, Aufschluss über das komplexe Zusammenspiel der Proteine im Destruktionskomplex von β -Catenin geben.

4.2. Rezeptor-Ligand-Interaktionen im Wnt-Signalweg

4.2.1. DKK1 und seine Rezeptoren LRP6 und Kremen

Membrangebundene Rezeptoren nehmen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Signaltransduktion ein. Ihre Aktivität ist sowohl für die Funktionalität der Zelle als auch für den gesamten Organismus von Bedeutung. Gerade im Wnt-Signalweg steht eine erhöhte Aktivität in direkter Verbindung mit der Entstehung von Tumorgewebe [3–5]. Ein therapeutischer Ansatz wäre die Herunterregulierung der Signalaktivität durch gezielten Einsatz von Wnt-Inhibitoren. Zu diesen Inhibitoren zählen DKK1/2, die direkt mit Wnt3a um die Bindungsstellen am Membranrezeptor LRP6 konkurrieren. Die Kenntnis der Bindungsaffinität eines Inhibitors zu seinem Rezeptor ist der Schlüssel zur gezielten Entwicklung medizinischer Therapiemittel für diverse Krankheiten. Bindungsaffinitäten sind ein Maß für die Bindungsstärke zwischen zwei Bindungspartnern bei vergleichbaren äußeren Rahmenbedingungen. Bestimmt werden können sie durch eine Vielzahl von Methoden, u. a. durch Immunpräzipitation und isothermische Titrationskalorimetrie [179]. Ein Nachteil dieser Methoden ist es, dass sie *in vitro* stattfinden und nicht die tatsächlichen Rahmenbedingungen in einem lebenden Organismus widerspiegeln. Daher wurden weitere Methoden zur Quantifizierung der gebundenen Protein-Protein-Komplexe *in vivo* etabliert. Hierzu zählen einfache Messungen der Bindungskinetik oder auch etwas aufwendigere Experimente basierend auf Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Im Jahr 2015 stellten Kim et al. [180] einen Assay zur Bestimmung der Einzelmolekül-Diffusionsmobilitätsverschiebung (engl. *single-molecule diffusion-mobility-shift assay*, smDIMSA) vor, der ebenfalls für die Quantifizierung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen eingesetzt werden kann. In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Komplexbildung oder Bindungsaffinität zweier Proteine alle drei *in vivo* Methoden herangezogen. Die folgenden Experimente wurden im Rahmen der Kollaboration mit der AG Davidson (IBCS, KIT) durchgeführt, wobei die wichtigsten Messergebnisse in der Publikation von Eckert et al. [143] zusammengefasst wurden.

Wahl des Fluorophors

Fluoreszenzmikroskopische Messungen basieren auf dem Einsatz von Fluorophoren zur gezielten Markierung der Zielproteine. Da sich diese Fluorophore zum Teil stark in ihren photophysikalischen Eigenschaften unterscheiden, ist die Wahl des passenden Fluorophors für die Experimente entscheidend. Die Wahl des verwendeten Fluorophors sollte auf die experimentellen Anforderungen angepasst werden. Vor allem bei

der Bestimmung von Konzentrationen anhand des Fluoreszenzsignals ist darauf zu achten, ob auch wirklich alle Chromophore des fluoreszierenden Markers komplett maturiert vorliegen. Rot-fluoreszierende Proteine sind bekannt dafür, dass nur ein Bruchteil ihrer Chromophore funktionsfähig ist. Für mCherry sind etwa 50 % der Chromophore maturiert [181–183]. Im Gegensatz dazu wird eGFP aufgrund der nahezu vollständigen Maturation seines Chromophors (80 % – 100 %) oftmals als Referenzprobe zur Charakterisierung anderer Fluorophore eingesetzt [149–151, 184–186]. Um auch in dieser Arbeit eine präzise Bestimmung der Konzentrationen von fluoreszenzmarkierten Liganden in Lösung zu gewährleisten, wurde zur Markierung von DKK1 das grün fluoreszierende Protein eGFP gewählt. Für die smDIMSA-Experimente wurde, analog zu den Experimenten von Kim et al. [180], ein photokonvertierbarer Fluorophor benötigt. Die Wahl fiel auf mEosFP^{thermo}, ein photokonvertierbares fluoreszierendes Protein, welches sich aufgrund der verbesserten Thermostabilität gegenüber EosFP bei 37 °C ideal für Zellmessungen eignet [66, 95, 96, 187].

Charakterisierung der konditionierten Medien

Das DKK1-eGFP konditionierte Medium für die smDIMSA-Experimente wurde selbst in HEK293F-Suspensionszellen hergestellt. Diese Zelllinie eignet sich gut für die Expression von Proteinen und hat den Vorteil, dass sie serumfrei kultiviert werden kann. Die Autofluoreszenz von Serum ist vor allem im grünen Wellenlängenbereich störend, da sie dort stark ausgeprägt ist und das Fluoreszenzsignal von eGFP überlagert [188]. Um hohe Konzentrationen von DKK1-eGFP zu erzielen, wurde DKK1-eGFP C-terminal mit einem His-Tag versehen und die durch die Zellen sekretierten Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Die in dieser Arbeit für Bindungskinetik- oder FCS-Experimente verwendeten DKK1- bzw. DKK2-eGFP-konditionierten Medien wurden sowohl von der AG Davidson (IBCS, KIT) als auch intern in der AG Nienhaus hergestellt. Die Messungen zur Konzentrationsbestimmung von DKK1-eGFP in den konditionierten Medien wurden in enger Zusammenarbeit mit B.Sc. Jasmijn Rath (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt.

Für die Konzentrationsbestimmung von DKK1-eGFP wurde das Fluoreszenzspektrum des konditionierten Mediums bzw. der Fluoreszenzanteil von eGFP in dieser Lösung durch einen Vergleich mit einer Referenzprobe (aufgereinigtes eGFP) mit bekannter eGFP-Konzentration ermittelt. Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluorometer gemessen (Kapitel 3.2) und die Konzentration der eGFP-Referenzprobe war durch die Messung ihres Absorptionsspektrums bekannt. Die eGFP-Konzentration in der

Referenzprobe war im Vergleich zu den konditionierten Medien meist mindestens um einen Faktor 100 höher konzentriert. Daher wurde die eGFP-Referenzprobe in mehreren Schritten verdünnt (maximal um einen Faktor 10) bis die maximalen Intensitäten beider Spektren in derselben Größenordnung lagen. Die Konzentrationsverluste in jedem Verdünnungsschritt, u. a. durch Adsorption an der Küvette, wurden sorgfältig dokumentiert und in die Berechnung mit einbezogen. Die gemessenen Emissionsspektren einer eGFP-Referenzprobe und eines DKK1-eGFP-konditionierten Mediums sind in Abbildung 4.10 dargestellt. Mittels Anpassung des eGFP-Spektrums an das Spektrum des DKK1-eGFP-konditionierten Mediums wurde eine Konzentration von (567 ± 25) nM bestimmt³. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die fluoreszierende Proteinkonzentration im Medium zusätzlich via FCS gemessen. Da Proteine dazu neigen, an Glasoberflächen zu binden, wurde die Oberfläche eines selbst hergestellten Glaskanals mit

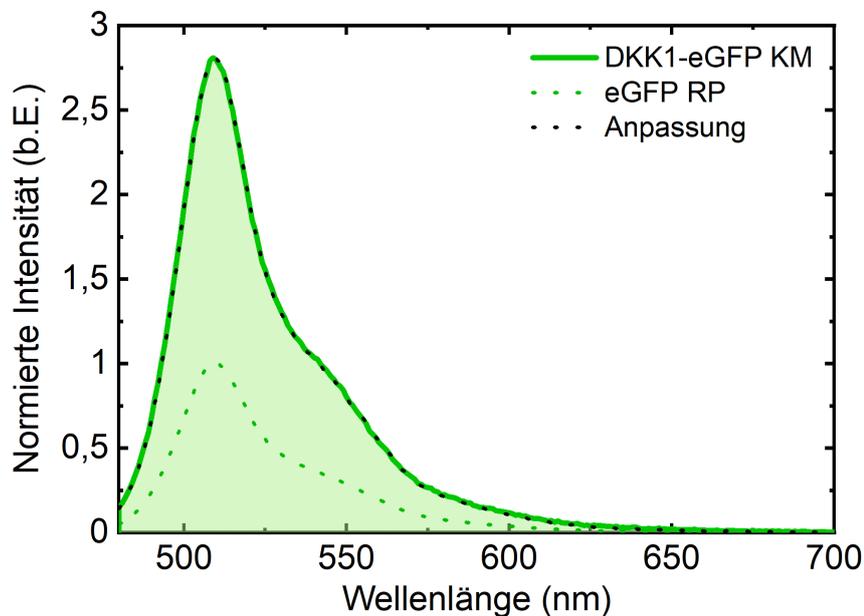


Abbildung 4.10: Bestimmung der Konzentration von DKK1-eGFP in konditioniertem Medium (KM) durch Vergleich des Fluoreszenzspektrums mit dem Spektrum von aufgereinigtem eGFP als Referenzprobe (RP). Beide Spektren wurden normiert auf die maximale Peak-Intensität des eGFP-Referenzspektrums. Anschließend wurde das Spektrum der Referenzprobe hochskaliert (schwarze Punkte) und das Spektrum des konditionierten Mediums angepasst, sodass die Konzentration mit dem Skalierungsfaktor berechnet werden kann. Anregungswellenlänge 470 nm.

³ Je nachdem wie stark die Autofluoreszenz des Zellkulturmediums zum Fluoreszenzspektrum der Probe beiträgt, war es nötig, bei der Anpassung zusätzlich das Spektrum eines Kontrollmediums mit zu berücksichtigen.

Polyethylenglykol (PEG) passiviert, um die Proteinadhäsion zu verhindern [132]. Abbildung 4.11 zeigt das Ergebnis einer FCS-Messreihe eines DKK1-eGFP-konditionierten Mediums, dessen Fluoreszenzspektrum in Abbildung 4.10 bereits gezeigt wurde. Als Referenzprobe wurde der Farbstoff Alexa488 verwendet, der in DPBS gelöst auf eine Konzentration von 5 nM verdünnt wurde. Das DKK1-eGFP-konditionierte Medium wurde ebenfalls in DPBS verdünnt, jedoch um einen Faktor 1:100 und anschließend in einem PEG-Kanal gemessen. Die DKK1-eGFP-Konzentration wurde, unter Einbezug der Referenzmessung von Alexa488, als (580 ± 40) nM bestimmt. Dieses Ergebnis liegt im Bereich der Konzentrationsbestimmung mittels Spektrenvergleichs am Fluorometer. Da es sich hierbei um eGFP als fluoreszierendes Markierungsprotein handelte, welches für die nahezu vollständige Maturation seines Chromophors (80 % – 100 %, [149–151, 184–186]) bekannt ist, konnte davon ausgegangen werden, dass die bestimmten Konzentrationen von DKK1-eGFP die tatsächlichen DKK1-Konzentrationen widerspiegeln. Zudem wurde mittels Western Blots (Abbildung 4.12 (a)) von der AG Davidson (IBCS, KIT) bestätigt, dass DKK1-eGFP als vollständiges Fusionskonstrukt im konditionierten Medium vorlag. Gut zu erkennen sind die zwei typischen Hauptbanden der Fusionsproteine DKK1-eGFP (68 kDa, erwartet: 56 kDa) und DKK2-eGFP (58 kDa, erwartet: 55 kDa). Der Unterschied zwischen der erwarteten Molekülmasse und der

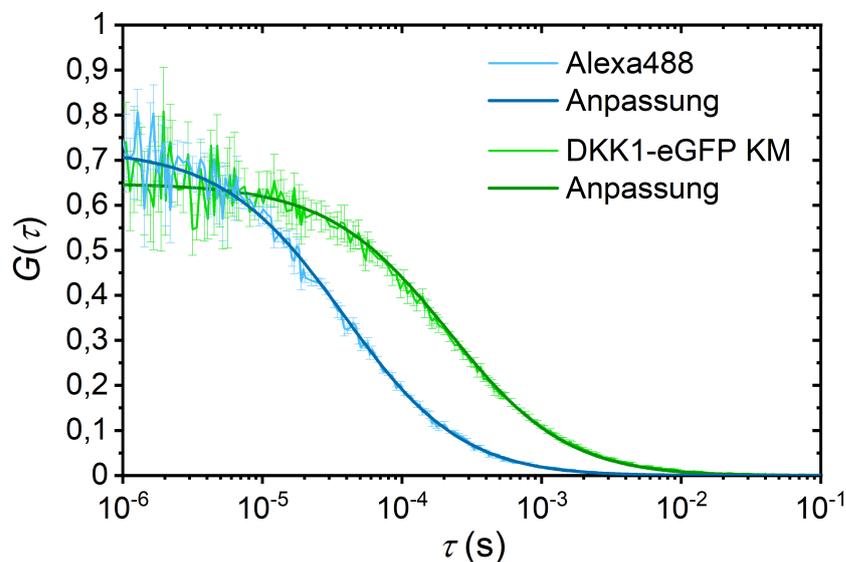


Abbildung 4.11: Gegenüberstellung der FCS-Kurven von in DPBS gelösten Alexa488-Farbstoffen (Referenzkonzentration 5,2 nM) und DKK1-eGFP KM. Anpassung der Datenpunkte durch eine 3D-FCS-Fitfunktion (Gleichung 2.88). Beide Proben wurden unter gleichen Bedingungen gemessen: 22 °C, 5 μ W Leistung des 470 nm-Lasers.

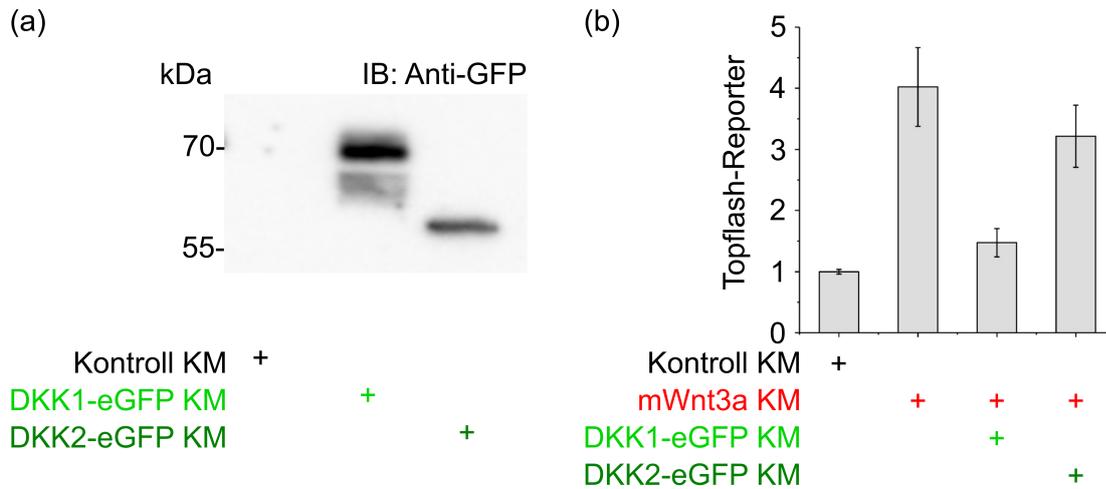


Abbildung 4.12: (a) Western Blot mit Antikörper gegen GFP für in HEK293F-Suspensionszellen hergestelltes Kontrollmedium, DKK1-eGFP- und DKK2-eGFP-konditioniertes Medium. Die für DKK1+FP und DKK2+FP typischen Hauptbanden (68 kDa und 58 kDa) sind zu sehen. (b) TopFlash-Reporterassay mit Kontrollmedium, mWnt3a-, DKK1- und DKK2-konditionierten Medien basierend auf der Lumineszenz eines Lysats aus Zellen, die mit dem zu testenden Medium für ca. 48 h inkubiert wurden. Assays durchgeführt von AG Davidson.

tatsächlichen Bande im Western Blot fällt bei DKK1-eGFP am größten aus und deutet darauf hin, dass DKK1-eGFP mehr posttranslationale Proteinmodifikation erfährt. Es ist anzumerken, dass die Überprüfung der Molekülmassen mittels Western Blots durchaus wichtig ist. Proteine können z. B. durch Proteasen gespalten werden. Dadurch könnten die DKK-Proteine, je nach Spaltungszentrum, ihre Funktionsfähigkeit als LRP6-Ligand verlieren oder, wenn sie z. B. lediglich an der Verlinkungsstelle von ihrem Fluorophor getrennt wurden, weiterhin funktionsfähig bleiben. Somit könnten sie zwar an LRP6 binden, jedoch nicht mittels FCS erfasst werden. Je nachdem welche Spaltungsprodukte vorliegen, wäre die, z. B. durch die Messung des Fluoreszenzspektrums (Abbildung 4.10), bestimmte Konzentration von funktionsfähigem DKK1-eGFP überschätzt oder unterschätzt worden. Auch wenn das komplette Fusionskonstrukt vorliegt, kann die Verlinkung mit eGFP unter Umständen zu einem Aktivitätsverlust von DKK führen. Obwohl es schwierig ist, mit den zur Verfügung stehenden biologischen Assays die absolute Aktivität von Proteinen genau zu bestimmen, konnte die AG Davidson (IBCS, KIT) die relative Aktivität von DKK mittels TopFlash-Assays [133, 134] überprüfen. In Abbildung 4.12 (b) ist ein solcher Reporterassay für DKK1-eGFP und DKK2-eGFP-konditionierte Medien dargestellt. Als Normierungsfaktor wird die Lysat-Lumineszenz von mit Kontrollmedium inkubierten Zellen herangezogen. Zellen, die

hingegen mWnt3a-konditioniertem Medium ausgesetzt waren, zeigten eine deutlich höhere, ca. 3,2-fache Lumineszenz. Zugabe des Wnt-Inhibitors DKK1 reduzierte die Lumineszenz im Vergleich zum mWnt3a-Medium um einen Faktor 2,7 deutlich. DKK2, bekannt als kontext- bzw. zellabhängiger Wnt-Inhibitor oder sogar Aktivator, ergab im Vergleich zu DKK1 nur um einen Faktor 1,5 reduziertes Reportersignal, analog zu den Ergebnissen, die in anderen Publikationen berichtet wurden [189, 190]. Somit wurde zwar die Aktivität der zwei DKK-Medien bestätigt, die Frage nach dem prozentualen Anteil an aktiven Proteinen blieb jedoch damit weiter offen.

4.2.1.1. smDIMSA: Bindung von DKK1 an LRP6

Kim et al. [180] zeigten in ihren smDIMSA-Experimenten, dass die Verschiebung des Diffusionskoeffizienten des EGF-Rezeptors (engl. *epidermal growth factor receptor*) an der Membran von lebenden Zellen mit steigender Molekülmasse des Bindungspartners linear zunahm. Als Bindungspartner wurden hierbei Antikörperfragmente (Cetuximab) unterschiedlicher Größe verwendet. Unter der Annahme, dass der Bindungspartner bei unterschiedlichen Konzentrationen zu unterschiedlichen Verschiebungen des Diffusionskoeffizienten des Rezeptorproteins führt, konnten Kim et al. [180] anhand von smDIMSA-Experimenten auch Bindungsaffinitäten bestimmen.

In dieser Arbeit lag der Fokus auf dem Membranrezeptorprotein LRP6 und seinem Liganden DKK1. Als Ligand wurde das Fusionskonstrukt DKK1-eGFP verwendet, welches aus selbst hergestelltem konditioniertem Medium (AG Nienhaus) über einen eingebauten His-Tag aufgereinigt wurde. Der aufgereinigte Ligand wurde für die smDIMSA-Experimente in eine Kammer eines 8-Kammerdeckglases zu den transient mit LRP6-mEosFP_{thermo} transfizierten H1703-Zellen gegeben. Die LRP6-Rezeptorbewegung in der Zellmembran wurde mittels TIRF-Modus auf dem Weitfeldmikroskop wie in Kapitel 3.4 beschrieben mit einer Belichtungszeit von 75 ms bei 37 °C und 5 % CO₂ vor und 10 min nach Zugabe der Ligandenlösung aufgezeichnet. Bei jedem Experiment wurde 150 µl Zellkulturmedium als Kontrollexperiment oder Ligandenlösung zu 150 µl vorhandenem Zellmedium in einer Kammer eines 8-Kammerdeckglases hinzugegeben. Mit Hilfe der Software a-livePALM [140] und Gleichung 2.73 ($d = 2$) wurden die Trajektorien einzelner LRP6-Rezeptoren rekonstruiert (Abbildung 4.13) und daraus, analog zu den Experimenten von Kim et al. [180], der Diffusionskoeffizient des Rezeptors vor und nach Zugabe der Ligandenlösung ermittelt. Meist wurde der Membranbereich der Zelle als Region von Interesse definiert, um Trajektorien, die nicht zu LRP6-mEosFP_{thermo} an der Membran der Zielzelle gehören, von der Berechnung

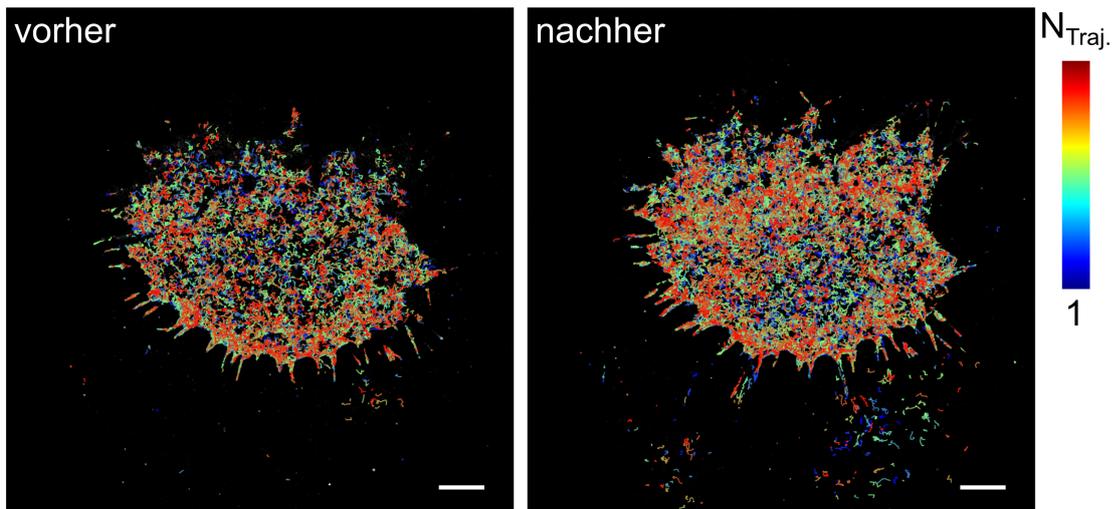


Abbildung 4.13: Rekonstruierte Trajektorien für LRP6-mEosFP*thermo* an der Membran von transfizierten H1703-Zellen, vor ($N_{\text{Traj.}} = 7618$) und 10 min nach ($N_{\text{Traj.}} = 13716$) der Zugabe des Zellkulturmediums (Kontrollexperiment).

auszuschließen. Für die a-livePALM-Software wurden die Parameter $Maxdisp = 500$, $Good = 5$, $Memory = 1$ und $Dimension = 2$ gesetzt. Dies bedeutet, dass für ein Teilchen mit der aktuellen Position x_n, y_n in der darauffolgenden Aufnahme in einem Umkreis von 500 nm nach der nächsten Position x_{n+1}, y_{n+1} gesucht wurde. Es wurden zudem nur Trajektorien in die Berechnung des Diffusionskoeffizienten mit einbezogen, die mindestens über 5 Aufnahmen beobachtet werden konnten. Für maximal eine Aufnahme innerhalb einer Trajektorie durfte dabei die Bestimmung der Teilchenposition fehlschlagen, z. B. durch den Übergang von mEosFP*thermo* in einen Dunkelzustand. Die Dimension gibt an, welches Diffusionsmodell zur Berechnung verwendet wurde (Gleichung 2.73, $d = 2$). Pro Zelle wurden mindestens 4000 Trajektorien in die Berechnung mit einbezogen.

Ausgangspunkt für die Wahl der Sättigungskonzentration für die DKK1-Inkubation waren die Ergebnisse von Niehrs et al. [191] und Dörlich et al. [147]. Niehrs et al. bestimmten in vitro für die Bindung von LRP6 und DKK1 eine Dissoziationskonstante von $K_D \sim 0,34$ nM. Die in vivo Messungen von Dörlich et al. lieferten einen um mehr als zwei Größenordnungen größeren Wert. Um die maximal mögliche Verschiebung des Diffusionskoeffizienten zu ermitteln, sollten im besten Fall alle Rezeptoren einen Liganden gebunden haben. Deshalb wurde für die folgenden Experimente vorsichtshalber eine Sättigungskonzentration von 500 nM ($10 - 100 \times K_D$) DKK1-eGFP angesetzt.

Da die Verschiebung des Diffusionskoeffizienten abhängig ist von der Molekülmasse

des Bindungspartners, wurde DKK1-eGFP sowohl mit einem Primärantikörper gegen GFP (ab1218, Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) als auch mit einem Sekundärantikörper gegen den Primärantikörper (205719, Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien) inkubiert. Als Primärantikörper (AK1) wurde ein monoklonaler Antikörper verwendet, um zu gewährleisten, dass eine 1:1-Bindung zwischen DKK1-eGFP und dem Antikörper vorlag. Der Sekundärantikörper (AK2) war polyklonal und sollte zeigen, ob die Verschiebung des Diffusionskoeffizienten von LRP6 weiter vergrößert werden konnte.

Zur Kontrolle wurden Messungen an drei Zellen vor und 10 min nach der Zugabe von Zellkulturmedium durchgeführt. Abbildung 4.13 zeigt, dass sich die Membranform der Zelle im Kontrollexperiment nicht wesentlich ändert. Die Verteilungen der gemessenen LRP6-Diffusionskoeffizienten vor und nach der Zugabe des Mediums waren zudem vergleichbar miteinander und bestätigten somit stabile Messbedingungen (Abbildung 4.14). Anzumerken ist, dass in der Verteilung der LRP6-Diffusionskoeffizienten eine Hauptpopulation ($D_{LRP6} \approx 1 \times 10^{-1} \mu\text{m}^{-2}$) und eine Nebenpopulation ($D_{LRP6} < 1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-2}$) zu sehen sind. Die Nebenpopulation repräsentiert im Vergleich zur Hauptpopulation eine nahezu statische LRP6-Fraktion und wird daher im Folgenden in der Diskussion nicht weiter berücksichtigt.

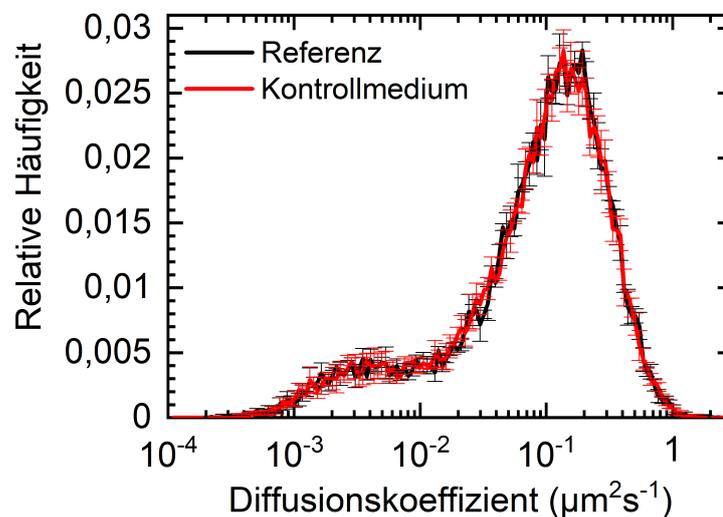


Abbildung 4.14: Häufigkeitsverteilung der via smDIMSA bestimmten Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP*thermo* vor und nach der Zugabe von Kontrollmedium. (Referenz: 3 Zellen, Kontrollmedium: 3 Zellen, Mittelwert \pm SEM.)

Als Nächstes wurde überprüft, ob die Zunahme der Molekülmasse des Bindungspartners diese Verschiebung vergrößert. Das Membranrezeptorprotein LRP6 weist eine mit dem EGF-Rezeptor vergleichbare Molekülmasse auf (LRP6: 180 kDa [192], EGFR: 170 kDa [193]) und besitzt ebenfalls nur eine Transmembranregion [194], weshalb ein ähnliches Diffusionsverhalten erwartet wurde. Die Molekülmassen der zugegebenen LRP6-Bindungspartnerkomplexe erstreckten sich über einen großen Bereich: 56 kDa für DKK1-eGFP, 206 kDa für DKK1-eGFP-AK1 und 356 kDa für DKK1-eGFP-AK1-AK2 (DKK1: 29 kDa [195], eGFP: 27 kDa [160], Antikörper: 150 kDa [196]). Nach den Experimenten von Kim et al. [180] sollte die Zugabe eines 56 kDa-Bindungspartners zu einer Diffusionskoeffizientverschiebung von etwa 15 % führen. Für die beiden größeren Komplexe war eine Verschiebung von mehr als 50 % zu erwarten. Bei den Experimenten mit DKK1-eGFP und DKK1-eGFP-AK1 wurde explizit darauf geachtet, dass die Zellen nach einer Inkubationszeit von 10 min nicht durch die Lösungszugabe schrumpften. Das Schrumpfen der Zellmembran wirkt sich abbremsend auf die Diffusion der Rezeptorproteine aus, da sich die LRP6-Proteine mit anderen membrangebundenen Proteinen folglich eine kleinere Membranfläche teilen müssen. Dadurch nimmt der Diffusionskoeffizient von LRP6 auch ohne den Einfluss von Bindungspartnern ab, was vermieden werden sollte. Daher wurde pro Probengefäß nur eine Zelle vor und nach der Zugabe gemessen. Lediglich bei den Messungen mit dem größten Bindungspartner, DKK1-eGFP-AK1-AK2, wurden die Diffusionskoeffizienten von LRP6 an der Membran von mehreren Zellen in einem Probengefäß bestimmt. Die smDIMSA-Ergebnisse für die DKK1-Komplexe unterschiedlicher Molekülmasse sind in der Abbildung 4.15 dargestellt und die Peak-Diffusionskoeffizienten in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Analog zu den Experimenten von Kim et al. [180] wurde die relative Verschiebung des Maximums der Diffusionskoeffizientenverteilung in Abhängigkeit von der Molekülmasse des Bindungspartners betrachtet (Abbildung 4.16). Als Ausgangspunkt wurde hierfür der Peak-Diffusionskoeffizient aus den Referenzmessungen betrachtet. Nach

Tabelle 4.5.: Peak-Diffusionskoeffizienten aus den LRP6/DKK1-smDIMSA-Messungen. Die Verteilung der Diffusionskoeffizienten aus Abbildung 4.15 wurde mit einer Superposition von drei Gaußkurven angepasst. Der Fehler auf den maximalen Diffusionskoeffizienten wurde durch die Hälfte des Bin-Intervalls der Diffusionskoeffizientenverteilung abgeschätzt.

Probe	Referenz	DKK1-eGFP	+AK1	+(AK1-AK2)
D_{LRP6} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,143 \pm 0,005$	$0,133 \pm 0,005$	$0,102 \pm 0,004$	$0,119 \pm 0,004$

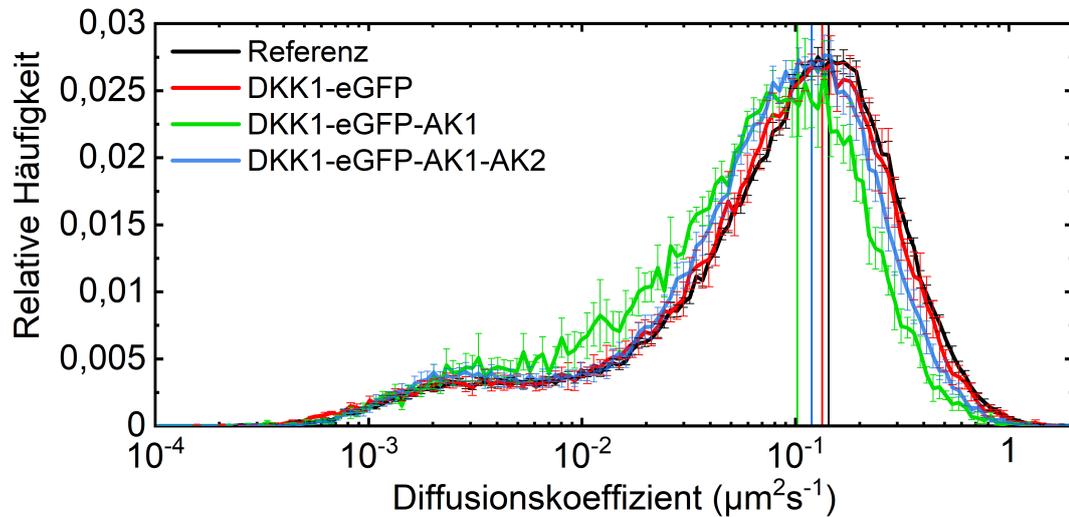


Abbildung 4.15: Häufigkeitsverteilung der via smDIMSA bestimmten Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP $_{thermo}$ unter Einfluss von DKK1-Komplexen unterschiedlicher Molekülmasse. Die Häufigkeitsverteilungen wurden jeweils mit einer Superposition von drei Gaußkurven angepasst. Die daraus bestimmten Peak-Diffusionskoeffizienten sind mit vertikalen Linien gekennzeichnet. (Referenz: 18 Zellen, DKK1-eGFP: 3 Zellen, DKK1-eGFP-AK1: 3 Zellen, DKK1-eGFP-AK1-AK2: 10 Zellen. Mittelwert \pm SEM.)

Kim et al. [180] wurde mit ansteigender Molekülmasse des Bindungspartners für die Verschiebung des Diffusionskoeffizienten ein linearer Anstieg erwartet. Vergleicht man die Werte direkt mit dem linearen Graphen von Kim et al. [180], so lag die Verschiebung für die Zugabe von DKK1-eGFP mit $(7 \pm 3) \%$ etwa um einen Faktor unterhalb des nach Kim et al. zu erwartenden Wertes. Die Zugabe von DKK1-eGFP-AK1 führte im Vergleich zu DKK1-eGFP zu einer größeren relativen Verschiebung $((28,8 \pm 2,5) \%)$, welche ebenfalls etwa um einen Faktor 2 geringer ausfiel als erwartet. Die Verschiebung nach der Zugabe von DKK1-eGFP-AK1-AK2 lag mit $(16,8 \pm 2,9) \%$ sogar unterhalb von dem Datenpunkt für DKK1-eGFP-AK1 und schien nicht zu dem Modell von Kim et al. [180] zu passen. Da der Sekundärantikörper polyklonal war, konnte es durchaus sein, dass er unvorteilhaft an DKK1-eGFP-AK1 gebunden hatte und die Bindung von DKK1 an LRP6 womöglich sterisch hinderte. Die Bindungsaffinität zwischen LRP6 und DKK1 via smDIMSA zu bestimmen schien durchaus möglich zu sein, jedoch waren die Experimente in vieler Hinsicht aufwendig und mussten sorgfältig überdacht werden. Einerseits wäre es aufgrund der verwendeten Antikörpermenge kostengünstiger und besser für die Statistik, so viele Zellen wie möglich in einer Probenkammer nach der

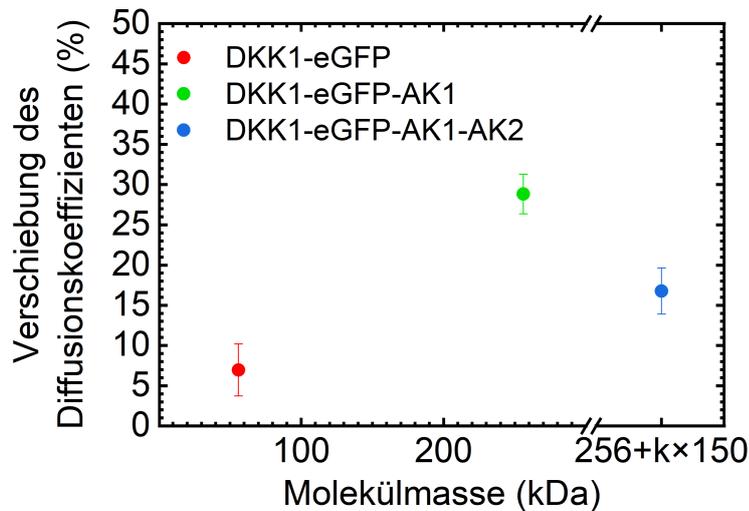


Abbildung 4.16: Prozentuale Verschiebung Peak-Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP $_{thermo}$ unter Einfluss von DKK1-Komplexen unterschiedlicher Molekülmasse mit $k \in \mathbb{N}$ als Anzahl der gebundenen polyklonalen Sekundärantikörper pro DKK1-Protein. Daten aus 4.15.

Zugabe der Bindungspartner zu messen. Andererseits können hierbei viele Faktoren zu einer Änderung des Diffusionskoeffizienten von LRP6 führen, u. a. die unterschiedliche Zellvitalität, das Schrumpfen der Zellmembran oder auch der Zeitpunkt nach der Zugabe. Allgemein waren Änderungen in der Zellmorphologie für Zellen ohne Vorher-Aufnahme nur schwer einzuschätzen. Daher war es ratsamer, pro Probenkammer eine Vorher- und eine Nachher-Messung an derselben Zelle durchzuführen. Die smDIMSA-Daten von Zellen, die sichtbar während den Messungen schrumpften, wurden verworfen.

Außerdem verwendeten Kim et al. [180] gut charakterisierte Bindungspartner mit bekannten in vitro Bindungsaffinitäten, auf welche sie ihre Experimente stützten. Daher konnten sie die zur Sättigung der Rezeptoren benötigten Inkubationszeiten und Konzentrationen gut abschätzen. Im Falle von LRP6 und DKK1 gab es zu diesem Zeitpunkt kontroverse Angaben zu ihrer Bindungsaffinität [147, 191]. Auch die Inkubationszeit, die für das Einstellen eines Gleichgewichts zwischen Assoziation und Dissoziation benötigt wird, war nicht bekannt. Aufgrund dieser Unsicherheiten wurde der Fokus im Weiteren auf die Messungen der Bindungskinetik von LRP6 und DKK1 gelegt.

4.2.1.2. Bindungskinetik von LRP6 und DKK1

Assoziation und Dissoziation von DKK1 an LRP6

Mit fluoreszenzmikroskopischen Messungen der Bindungskinetik für die Assoziation und Dissoziation eines Liganden und seines Rezeptors können die Ratenkoeffizienten für diese Prozesse und daraus unter Kenntnis der freien Ligandenkonzentration auch die Bindungsaffinität ermittelt werden. Bei den Messungen wird die Bindung von fluoreszenzmarkierten Liganden an ihre Rezeptoren beobachtet, genauer gesagt die zeitliche Zu- bzw. Abnahme des Fluoreszenzsignals des an den Rezeptor gebundenen Liganden. Diese Art von Messungen sind zwar relativ einfach durchzuführen, eine belastbare statistische Auswertung ist jedoch mit einem hohen Zeitaufwand verbunden.

In dieser Arbeit wurde der Bindungsprozess von DKK1 an seinen Rezeptor LRP6 beobachtet. Die folgenden Bindungskinetikexperimente wurden zusammen mit Dr. Benedikt Prunsche (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt und ausgewertet. Um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde der Ligand in Form von konditioniertem DKK1-eGFP-Medium zu LRP6-mCherry-exprimierenden Zellen hinzugegeben und die Assoziations- bzw. Dissoziationsprozesse an einem Spinning-Disk-Konfokalmikroskop (Kapitel 3.3) aufgezeichnet. Unterschiedliche freie Ligandenkonzentrationen wurde durch Verdünnungen des konditionierten Mediums in dem für die Zellen vorgesehenen Zellkulturmedium erreicht. Eine typische Zeitrafferaufnahme für den Bindungsprozess von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry in HEK293T-Zellen ist in Abbildung 4.17 zu sehen.

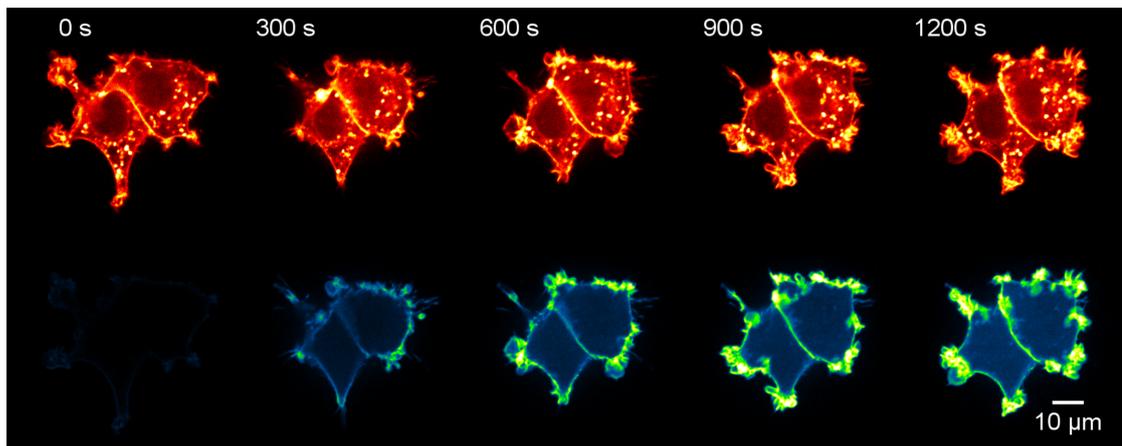


Abbildung 4.17: Zeitrafferaufnahmen der Assoziation von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry in HEK293T-Zellen bei einer freien Ligandenkonzentration von 5,1 nM, aufgenommen mit einem Spinning-Disk-Konfokalmikroskop.

Die Assoziationsprozesse von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry wurden bei verschiedenen freien Ligandenkonzentrationen in einem Zeitraum von etwa 1 h mit einem Zeitintervall von 100 s zwischen jeder Aufnahme beobachtet. Der Anstieg des DKK1-eGFP-Fluoreszenzsignals an der Zellmembran von LRP6-mCherry exprimierenden Zellen ist bei einer freien Ligandenkonzentration von 5,1 nM bereits nach 300 s deutlich zu erkennen.

Für die Messung des Dissoziationsprozesses wurden die Zellen zuerst mit konditioniertem Medium inkubiert und es wurde gewartet, bis sich ein Gleichgewicht an gebundenen Rezeptor-Ligand-Komplexen einstellte. Nach zwei Waschschrritten und dem Komplettaustausch des Zellmediums wurde die Dissoziationsmessung direkt gestartet. Die Aufzeichnung der Intensitätsverläufe für den Dissoziationsprozess erfolgte alle 300 s über einen Zeitraum von mindestens 3 h. Da HEK293T-Zellen dazu tendieren, inselhaftige Zellverbände zu bilden, kamen für die Bestimmung der Zeitkonstanten der Assoziation und Dissoziation nur Zellen in Frage, die nicht von anderen Zellen eingeschlossen waren, sondern in direktem Kontakt mit dem Zellmedium standen. Zwei beispielhafte Intensitätsanstiege und die dazugehörigen Anpassungskurven für die Assoziation von DKK1 und LRP6 bei freien Ligandenkonzentrationen von 3,5 nM und 7,0 nM sind in Abbildung 4.18 (a) veranschaulicht. Dem entgegengestellt befinden sich in Abbildung 4.18 (b) beispielhafte Intensitätsverläufe von zwei unabhängigen Disso-

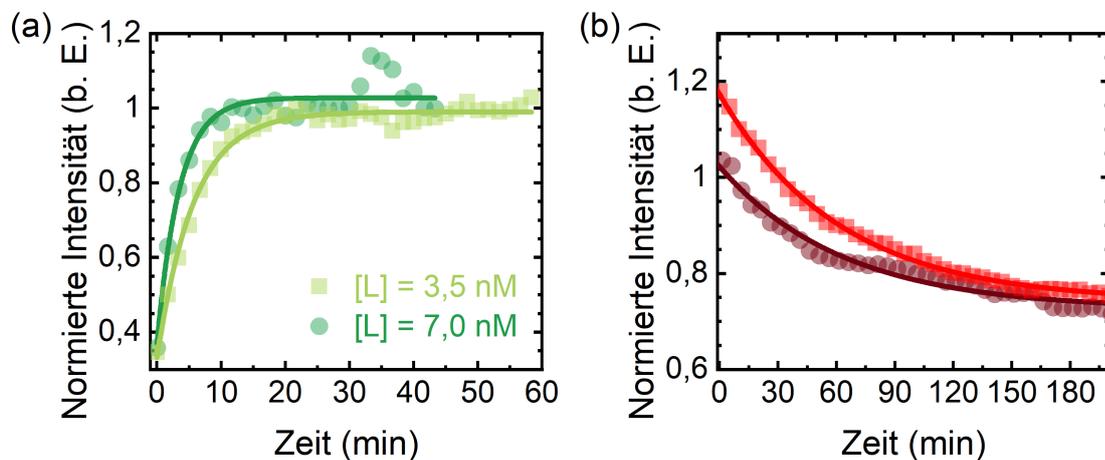


Abbildung 4.18: Zeitliche Intensitätsverläufe bei (a) Assoziation und (b) Dissoziation von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry an der Zellmembran in HEK293T. Für den Assoziationsprozess sind beispielhaft Messdaten bei zwei unterschiedlichen freien Ligandenkonzentrationen dargestellt, 3,5 nM und 7,0 nM. Die Intensitätsverläufe wurden mit den entsprechenden Fitfunktionen für einen Assoziations- (Gleichung 2.68) bzw. Dissoziationsprozess (Gleichung 2.62) angepasst (Linien).

ziationsmessungen. Um den Einfluss von Schwankungen in der Rezeptordichte von LRP6-mCherry bzw. Membranbewegungen in den Intensitätsverläufen zu berücksichtigen, wurden die gemessenen Intensitäten im Ligand-Farbkanal auf die Intensitäten im Rezeptor-Farbkanal normiert. Analog zu Kapitel 2.5 wurden die Zeitkonstanten durch Anpassung der Intensitätsverläufe mit den entsprechenden Anpassungsfunktionen für einen Assoziations- (Gleichung 2.68) bzw. Dissoziationsprozess (Gleichung 2.62) bestimmt. Die Statistik für die Assoziation umfasste insgesamt 59 Zellmessungen bei einer freien Ligandenkonzentration von 3,5 nM und 45 Zellmessungen bei 7,0 nM. Im Fall der Dissoziation wurde die Zeitkonstante durch Einbezug von Messungen an 20 verschiedenen Zellen ermittelt.

Die aus den Ergebnissen der Bindungskinetikmessungen resultierende Häufigkeitsverteilung der Dissoziationszeitkonstanten ist in Abbildung 4.19 (a) in Form eines Histogramms dargestellt. Durch die Kenntnis des Ratenkoeffizienten bzw. der inversen Zeitkonstante der Dissoziation und unter Berücksichtigung der bekannten, freien Ligandenkonzentrationen von 3,5 nM und 7,0 nM konnte schließlich anhand von Gleichung 2.69 und 2.60 die Bindungsaffinität für alle scheinbaren Ratenkoeffizienten der Assoziationsmessungen bestimmt werden. Die Häufigkeitsverteilung der daraus berechneten Bindungsaffinitäten ist in Abbildung 4.19 (b) dargestellt. Die Anpassung der Häufig-

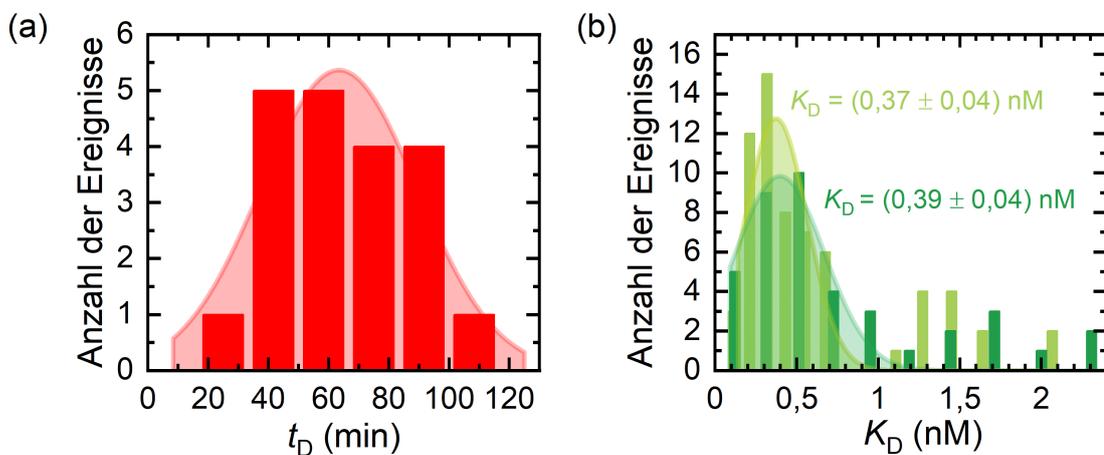


Abbildung 4.19: (a) Häufigkeitsverteilung der aus der Anpassung gewonnenen Zeitkonstanten der Dissoziation. (b) Anhand des Ratenkoeffizienten für die Dissoziation wurde für die Verteilung der scheinbaren Ratenkoeffizienten der Assoziation von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry in HEK293T-Zellen bei einer freien Ligandenkonzentration von 3,5 nM (hellgrün) und 7,0 nM (dunkelgrün) mittels Gleichung 2.69 und Gleichung 2.60 die Bindungsaffinität bestimmt. Die Histogramme wurden mit einer Normalverteilung angepasst.

keitsverteilungen basiert auf einer Normalverteilung, um vor allem für die Verteilungen in Abbildung 4.19 (b) den Einfluss von Ausreißern zu minimieren. Die aus den Bindungskinetikmessungen ermittelten Ratenkoeffizienten sind in Tabelle 4.6 aufgelistet. Somit wurde durch die Bindungskinetikexperimente schließlich eine Bindungsaffinität zwischen DKK1 und LRP6 von $(0,37 \pm 0,04)$ nM bzw. $(0,39 \pm 0,04)$ nM ermittelt.

Tabelle 4.6.: Ratenkoeffizienten und die daraus ermittelte Bindungsaffinität der Bindung zwischen DKK1-eGFP und LRP6-mCherry, bestimmt anhand von Bindungskinetikexperimenten bei einer Ligandenkonzentration von 3,5 nM und 7,0 nM.

Assoziation	C_L (nM)	3,5	7,0
		$k_{A_{\text{beob}}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
	$k_A \text{ (s}^{-1}\text{nM}^{-1}\text{)}$	$(2,5 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(4,7 \pm 0,5) \times 10^{-3}$
Bindungsaffinität	K_D (nM)	$(0,37 \pm 0,04)$	$(0,39 \pm 0,04)$
Dissoziation	$k_D \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	

4.2.1.3. Axiale Linienraster-FCS: Die Bindung von DKK1/2 an LRP6

Die aus den Bindungskinetikmessungen von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry ermittelten Ratenkoeffizienten und Bindungsaffinitäten bildeten die Grundlage für die nun folgenden axialen Linienraster-FCS-Experimente, die in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao durchgeführt und ausgewertet wurden (AG Nienhaus, APH, KIT). Die transiente Transfektion von LRP6-mCherry wurde sowohl in HEK293T- als auch NCI-H1703-Zellen (engl. *non-small cell lung cancer*) durchgeführt. Von letzteren wurde außerdem eine mit LRP6-mCherry stabil transfizierte und eine via CRISPR/Cas9-geneditierte, heterozygote Variante generiert (Dr. Janine Wesslowski, AG Davidson, IBCS, KIT). Diese wurden zur weiteren Zellkultur und Charakterisierung der AG Nienhaus zur Verfügung gestellt.

Kontrollmessungen

Für die axialen Linienraster-FCS-Experimente wurden diverse Kontrollmessungen durchgeführt (Abbildung 4.20). Zuerst wurde überprüft, ob die Kreuzkorrelationsamplitude der Fluoreszenzsignale von zwei nicht miteinander interagierenden, fluoreszenzmarkierten Membranproteinen auf null fällt. Als Proteine wurden LRP6 und MEM gewählt. MEM-Fusionskonstrukte werden oftmals zur Markierung der Zellmem-

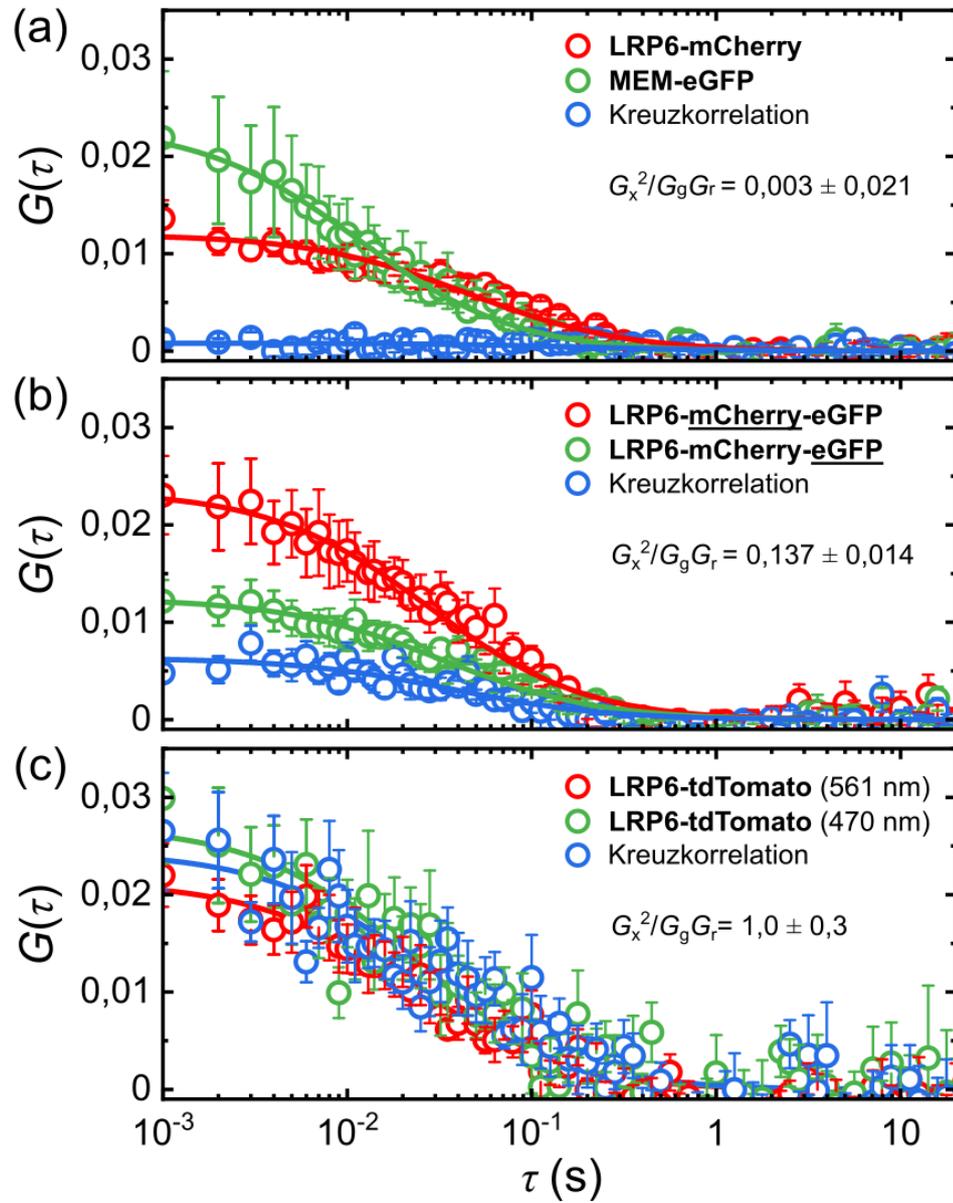


Abbildung 4.20: Kontrolleexperimente für axiale Linienraster-FCS-Messungen an Zellen bei 470 nm- und 561 nm-PIE-Anregung. Die Datenpunkte sind Mittelwerte (\pm SEM) der FCS-Kurven für den grünen und roten Farbkanal aus mindestens 9 unabhängigen Zellmessungen mit jeweils 60 s Messzeit. Die Kreuzkorrelation aus den Intensitätsverläufen der beiden Farbkanäle ist in blau dargestellt und die Anpassungskurven (Gleichung 2.93) als Linien in den Farben analog zu den Datenpunkten. Es sind Korrelationsfunktionen dargestellt von Zellen, die (a) LRP6-mCherry und MEM-eGFP, (b) nur LRP6-mCherry-eGFP oder (c) nur LRP6-tdTomato exprimieren.

bran eingesetzt und sollten nicht mit LRP6 interagieren. FCS-Messungen an HEK293T-Zellen, die LRP6-mCherry und MEM-eGFP überexprimieren, zeigten im Vergleich zu den mittleren Autokorrelationen im grünen und roten Farbkanal keinen signifikanten Beitrag der mittleren Kreuzkorrelation (Abbildung 4.20 (a), $G_x^2/G_g G_r = 0,003 \pm 0,021$). In den axialen Linienraster-FCS-Experimenten wurden die zu untersuchenden Proteine hauptsächlich mit eGFP oder mCherry fluoreszenzmarkiert. Zur Bestimmung der maximalen Kreuzkorrelationsamplitude für Proteinkomplexe, die beide Fluorophore beinhalten, wurde das Membranprotein LRP6 mit mCherry und eGFP in beiden Farbkanälen fluoreszenzmarkiert. Die mittlere Kreuzkorrelationsamplitude von Messungen an transient transfizierten HEK293T-Zellen lag wie erwartet aufgrund der nicht kompletten Fluorophormaturation von mCherry nicht zwischen beiden Autokorrelationsamplituden, sondern unterhalb (Abbildung 4.20 (b), $G_x^2/G_g G_r = 0,137 \pm 0,014$). Zuletzt sollte gezeigt werden, dass die Kreuzkorrelationsamplitude für Signale von einem Fluorophor, der in beiden Farbkanälen via PIE anregbar ist, tatsächlich zwischen den beiden Autokorrelationsamplituden liegt. Im Vergleich zu eGFP und mCherry eignete sich dafür das fluoreszierende Protein tdTomato am besten. Die Korrelationskurven der axialen Linienraster-FCS-Experimente an transient transfizierten HEK293T-Zellen zeigten eine Kreuzkorrelationsamplitude, die wie erwartet, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Beobachtungsvolumen, zwischen beiden Autokorrelationsamplituden lag (Abbildung 4.20 (c), $G_x^2/G_g G_r = 1,0 \pm 0,3$).

DKK1-eGFP(-SNAP) und LRP6-mCherry

Als Erstes wurde anhand von axialer Linienraster-FCS über die aus der Anpassung der FCS-Kurven gewonnenen Amplitude die LRP6-Rezeptordichte an der Membran der untersuchten Zelllinie bestimmt. Zur Berechnung der Rezeptordichte war die Kenntnis der Fokusparameter ω_0 notwendig, dessen Charakterisierung bereits in Kapitel 3.5.4 vorgestellt wurde. Mit diesen Werten wurden die Rezeptordichten von LRP6-mCherry an den Zellmembranen von verschiedenen Zelllinien bestimmt: transient transfizierte HEK293T-, transient transfizierte H1703-, stabil transfizierte H1703- und CRISPR/Cas9-geneditierte H1703-Zellen. Die anhand der axialen Linienraster-FCS-Messungen bestimmten Verteilung der LRP6-mCherry-Rezeptordichten sind in Abbildung 4.21 dargestellt und die Ergebnisse in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

Bei den H1703-Zellen fiel die Rezeptordichte für die transiente Transfektion am höchsten aus und war mit $140 \mu\text{m}^{-2}$ etwa dreifach so hoch wie bei der stabilen Zelllinie. Diese unterschied sich im Vergleich zur CRISPR/Cas9-geneditierten Zelllinie mit der niedrigsten Rezeptoranzahl von $18 \mu\text{m}^{-2}$ nur um einen Faktor 2,5. Die CRISPR/Cas9-

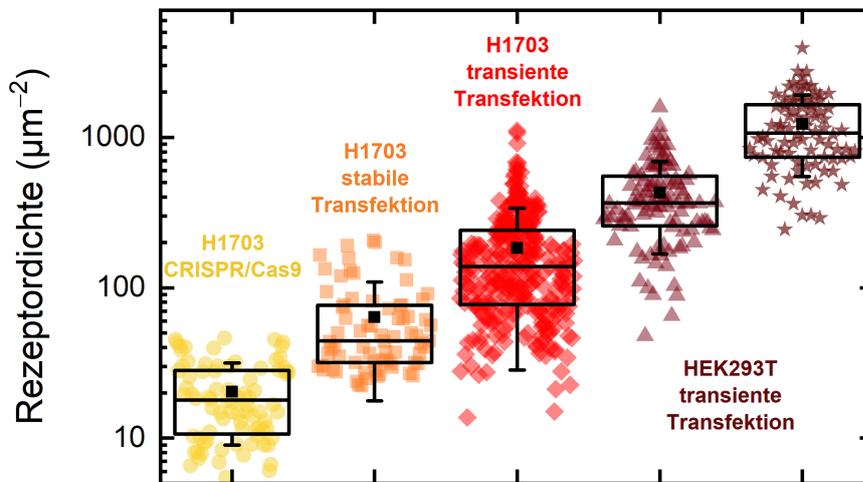


Abbildung 4.21: Verteilung der LRP6-mCherry-Rezeptordichten an der Zellmembran von transient transfizierten HEK293T-, transient transfizierten H1703-, stabil transfizierten H1703- und CRISPR/Cas9-geneditierten H1703-Zellen nach Inkubation mit DKK1-eGFP konditioniertem Medium bei unterschiedlichen Konzentrationen (Stern: DKK1-eGFP-SNAP konditioniertes Medium). (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: StAbw, schwarze Linie: Median, schwarzes Quadrat: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer Zelle wider. H1703 CRISPR/Cas9: 84 Zellen, H1703 stabile Transfektion: 73 Zellen, H1703 transiente Transfektion: 311 Zellen, HEK293T transiente Transfektion 106 Zellen (Dreieck) und 86 Zellen (Stern: DKK1-eGFP-SNAP))

geneditierte Zelllinie spiegelt aufgrund der Modifizierung des vorhandenen Genoms die natürliche LRP6-Rezeptordichte in H1703-Zellen besser wider als die übrigen untersuchten Zelllinien. Auffällig war, dass die Anzahl der membrangebundenem LRP6-mCherry nach transients Transfektion in HEK-Zellen im Vergleich zu H1703-Zellen um mehr als das Doppelte höher ausfiel. Die HEK293T-Zelllinie eignet sich im Allgemeinen sehr gut zur Überexpression von Proteinen [197], was sich auch in der höher ausfallenden LRP6-Rezeptordichte mit bis zu $\sim 1000 \mu\text{m}^{-2}$ in transient transfizierten HEK293T-Zellen widerspiegelt.

Um schließlich die Bindungsaffinität von DKK1 und LRP6 via axialer Linienraster-FCS zu bestimmen, wurden alle der oben aufgeführten Varianten an LRP6-mCherry exprimierenden Zelllinien mit DKK1-eGFP-konditioniertem Medium inkubiert.

Zusätzlich wurde überprüft, ob das fluoreszierende Protein am Liganden die Bindung von DKK1 an LRP6 beeinflusst. Für diesen Zweck wurde DKK1-eGFP C-terminal mit einem SNAP-Tag (20 kDa [198]) versehen (DKK1-eGFP-SNAP) und ebenfalls in Form von

konditioniertem Medium zu LRP6-mCherry exprimierenden HEK293T-Zellen (transiente Transfektion) gegeben.

Die Inkubationszeiten für unterschiedliche Ligandenkonzentrationen wurden anhand der durch die Bindungskinetikexperimente gewonnenen Ratenkoeffizienten berechnet. Die Kenntnis der freien Ligandenkonzentration in der Probenkammer zum Zeitpunkt der Messung ist essenziell für die Berechnung der Bindungsaffinität. Gerade bei niedrigen Konzentrationen war es wichtig, das konditionierte Medium während der Inkubationszeit mehrfach auszutauschen. Die freien Liganden binden an die Rezeptoren und an die Probengefäßoberfläche und führen daher bei niedrigen Konzentrationen zu höheren relativen Konzentrationsverlusten. Daher wurde das Medium vor der Messung mindestens einmal, meist bei der Hälfte der Inkubationszeit, ausgetauscht.

Zur Rekonstruktion der Bindungskurve von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry wurden alle vier Zelllinien mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen inkubiert. Diese mussten einen großen Konzentrationsbereich abdecken ($0,01 - 100 \times K_D$), da die Konzentrationsachse der Bindungskurve logarithmisch verläuft. Die Ergebnisse dieser axialen Linienraster-FCS-Messungen sind in Abbildung 4.22 zusammengefasst.

4.2.1.4. Bestimmung der Bindungsaffinität von LRP6 und DKK1

Anhand von Gleichung 3.11 ergibt sich aus der Relation der Korrelationsamplituden der FCS-Kurven in Abhängigkeit von der freien Ligandenkonzentration eine Pseudobindungskurve $\Gamma(C_L)$ (Abbildung 4.22 (a)). Um die endgültigen Bindungskurven zu bekommen, müssen die Pseudobindungskurven noch durch die Faktoren A und β normiert werden. Letzteres kann aus der Anpassung der Kurven mit der Gleichung 3.11 gewonnen werden. Die normierten Bindungskurven eignen sich besser zum direkten Vergleich der Bindungsaffinitäten der unterschiedlichen Proben (Abbildung 4.22 (b)). Die anhand der Anpassung der Bindungskurven gewonnenen Parametern sind zusammen mit den berechneten Diffusionskoeffizienten für die jeweiligen fluoreszenzmarkierten Proteine in Tabelle 4.7 zusammengefasst. Auffällig war die im Allgemeinen mit steigender Rezeptordichte abnehmende Bindungsaffinität und somit zunehmende Dissoziationskonstante K_D im Bereich von $(0,08 \pm 0,01)$ nM (CRISPR/Cas9, H1703) bis $(0,49 \pm 0,09)$ nM (transiente Transfektion, HEK293T). Aus den Ergebnissen ging zudem hervor, dass der zusätzliche SNAP-Tag an DKK1-eGFP die Affinität zwischen DKK1 und LRP6 nicht merklich beeinflusste.

Der prozentuale Anteil von fluoreszierenden Rezeptoren, β , lag für die HEK293T-Zellen im Bereich des Werts für die Kontrollmessungen ($\beta = 0,141 \pm 0,014$) und zeigt somit stabile Messbedingungen. Mit steigender Rezeptordichte nahm β jedoch innerhalb

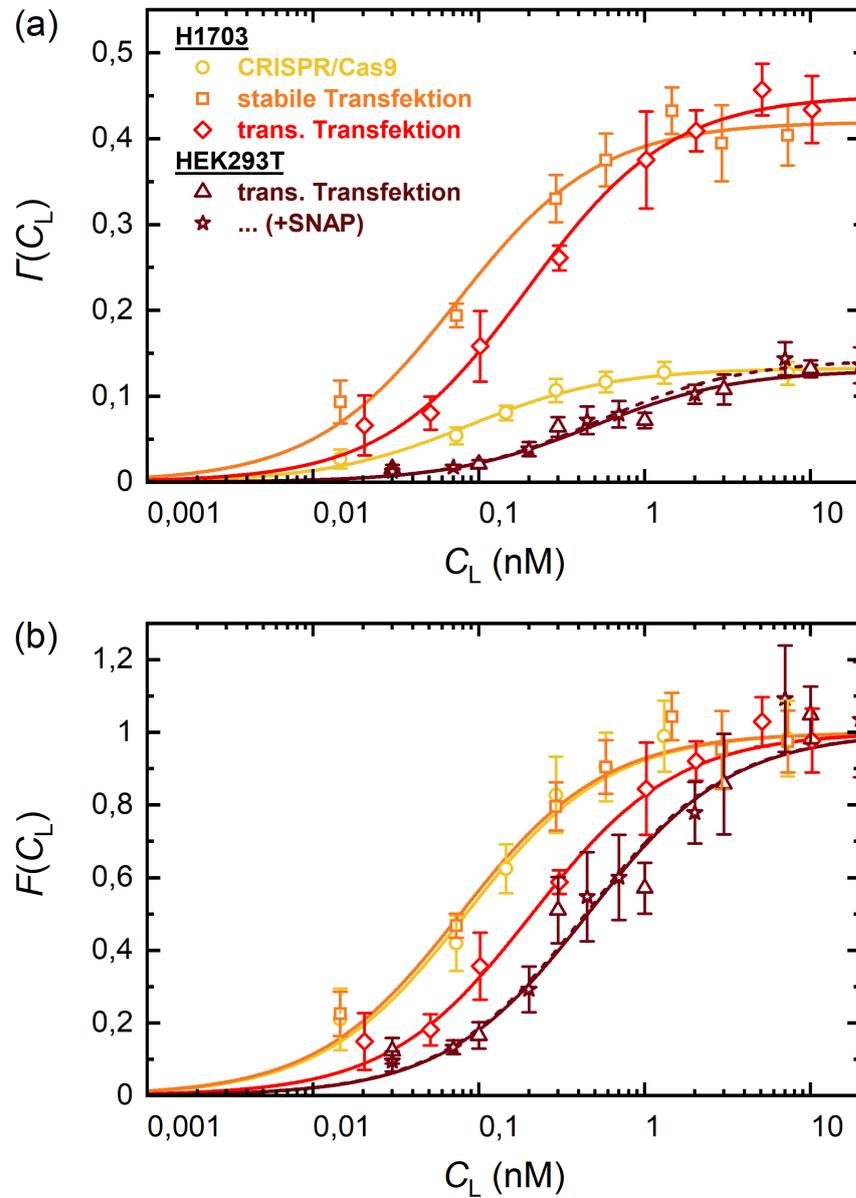


Abbildung 4.22: (a) Pseudobindungskurven und (b) normierte Bindungskurven von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry in HEK293T- und H1703-Zellen bei verschiedenen Rezeptordichten. Die Kurven wurden mit Hilfe von Gleichung 3.11 an die Datenpunkte angepasst (Linien bzw. gestrichelte Linie für transient transfizierte HEK293T-Zellen mit DKK1-eGFP-SNAP als Ligand, Farben analog zu den Datenpunkten).

Tabelle 4.7.: Ergebnisse der axialen Linienraster-FCS-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry in CRISPR/Cas9-geneditierten, stabil und transient transfizierten H1703-Zellen sowie in transient transfizierten HEK293T-Zellen.

Rezeptor	LRP6-mCherry				
	Ligand	DKK1-eGFP			+SNAP
Zelllinie		H1703			HEK293T
Rezeptor-Geninsertion	CRISPR/Cas9	stabile Transfektion	transiente Transfektion	transiente Transfektion	
Rezeptordichte (μm^{-2})	18 ± 9	45 ± 23	140 ± 80	370 ± 150	1080 ± 470
β	$0,14 \pm 0,01$	$0,44 \pm 0,02$	$0,47 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$
K_D (nM)	$0,09 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,09$
D_{DKK1} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,33 \pm 0,15$	$0,29 \pm 0,06$	$0,45 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,09$	$0,40 \pm 0,07$
D_{LRP6} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,33 \pm 0,06$	$0,27 \pm 0,05$	$0,42 \pm 0,13$	$0,46 \pm 0,09$	$0,45 \pm 0,11$

der H1703-Zelllinie von 14 % (CRISPR/Cas9, H1703) auf 47 % (transiente Transfektion, H1703) zu. Bei transient transfizierten Zellen kann normalerweise der Anteil endogener, ohne Fluorophor hergestellter Rezeptoren vernachlässigt werden. Somit lag bei der offensichtlich nicht homozygoten, CRISPR/Cas9-geneditierten Zelllinie noch ein Großteil an LRP6-Rezeptoren ohne Fluorophor vor. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass der Faktor β zusätzlich von der prozentualen Anzahl der funktionsfähigen Rezeptoren abhängt. Diese Anzahl kann zum einen Zelllinien-spezifisch sein oder zum anderen auch mit steigender Rezeptordichte aufgrund von Dimerbildung oder sterischer Hinderung abnehmen, was bei den HEK293T-Zellen womöglich den niedrigen β -Wert erklären könnte.

Die aus den Korrelationsamplituden berechneten Diffusionskoeffizienten der membran-gebundenen LRP6- und DKK1-Proteine lagen im Bereich von etwa $0,3 - 0,4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ mit jedoch relativ großen Unsicherheiten. Es ist zu vermuten, dass diese aus Inhomogenitäten in der Zellmembran resultierten.

Angesichts dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass axiales Linienraster-FCS in der Tat ein leistungsstarkes Werkzeug ist, um biologisch relevante Wechselwirkungen auf der Proteinebene zu untersuchen und sogar feine Unterschiede in der Bindungsaffinität in Abhängigkeit von der Rezeptordichte aufzudecken.

DKK1-eGFP und LRP6-tdTomato

Bisher wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzmarkierung des Liganden keinen wesentlichen Einfluss auf die Bindungsaffinität zwischen DKK1 und LRP6 hat. Als Nächstes wurde untersucht, ob dies auch auf das fluoreszierende Protein des Rezeptors zutrifft. Für diesen Zweck wurde mCherry durch tdTomato ausgetauscht, welches als Tandemdimer etwa doppelt so groß und etwa 5- bis 6-fach so hell ist wie mCherry. Es wurden axiale Linienraster-FCS-Experimente an der Membran von CRISPR/Cas9-geneditierten H1703-Zellen (hergestellt von Dr. Janine Wesslowski (AG Davidson, IBCS, KIT) und LRP6-tdTomato transient transfizierten H1703-Zellen durchgeführt.

Diese Messungen zeigten, dass der Austausch der fluoreszierenden Markierung in H1703-Zellen keinen wesentlichen Einfluss auf die LRP6-Rezeptordichten nahm (Abbildung 4.23 (a)). Die anhand der Boxplotwerte bestimmten Rezeptordichten sowie die durch Anpassung der Bindungskurven bestimmten Parameter sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Für die CRISPR/Cas9-Zelllinie fiel die Rezeptordichte mit $(21 \pm 15) \mu\text{m}^{-2}$ wie erwartet geringer aus als für die transient transfizierten Zellen mit $(106 \pm 52) \mu\text{m}^{-2}$. Die

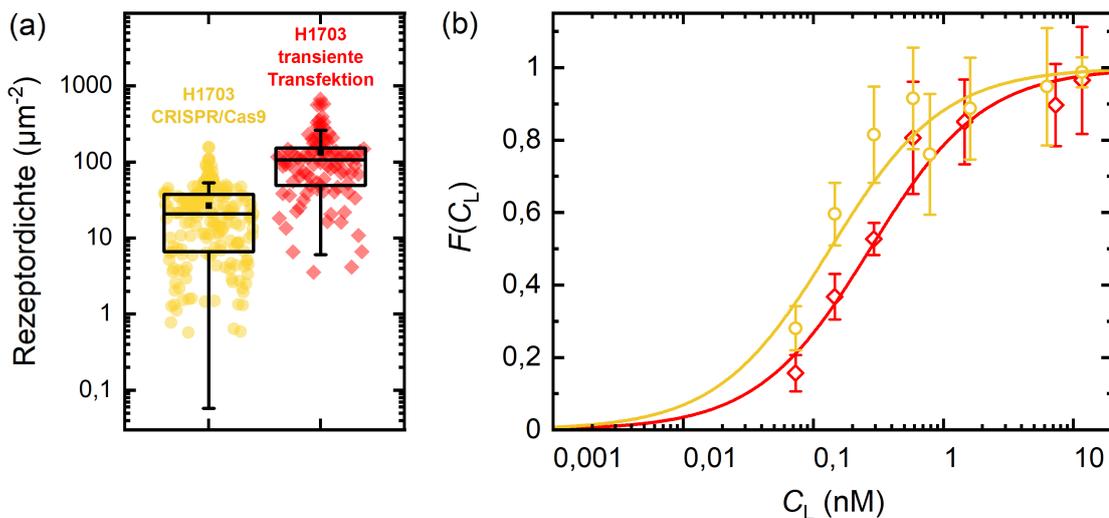


Abbildung 4.23: (a) Verteilung der LRP6-tdTomato-Rezeptordichten von CRISPR/Cas9-geneditierten und transient transfizierten H1703-Zellen (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: StAbw, schwarze Linie: Median, schwarzes Quadrat: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer Zelle wider. H1703 CRISPR/Cas9: 186 Zellen, H1703 transiente Transfektion: 99 Zellen). (b) Normierte Bindungskurven von DKK1-eGFP und LRP6-tdTomato in H1703-Zellen bei verschiedenen Rezeptordichten. Die Kurven wurden mit Hilfe von Gleichung 3.11 an die Datenpunkte angepasst (Linien).

Ergebnisse für die Rezeptordichten und Diffusionskoeffizienten für Rezeptor und Ligand liegen zudem in der gleichen Größenordnung wie bei den Messungen mit dem mCherry-Fusionskonstrukt.

Auch die rekonstruierten und angepassten Bindungskurven bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen von DKK1-eGFP, abgebildet in Abbildung 4.23 (b), ähnelten den zuvor für LRP6-mCherry gemessenen Kurven stark. Somit lagen die aus der Anpassung der Kurven gewonnenen Dissoziationskonstanten, für die CRISPR/Cas9-Zelllinie mit $K_D = (0,10 \pm 0,02)$ nM und im Falle der transient transfizierten Zellen mit $K_D = (0,22 \pm 0,03)$ nM, im gleichen Größenbereich wie die Ergebnisse für die vergleichbaren Zelllinien mit den mCherry-Fusionskonstrukten.

Der prozentuale Anteil von fluoreszierenden Rezeptoren fiel in der CRISPR/Cas9-geneditierten Zelllinie wie im Falle der mCherry-Variante geringer als bei den transient transfizierten Zellen aus. Dieser Anteil war im Vergleich zur mCherry-Variante jedoch fast doppelt so hoch.

Mit diesen Messungen wurde schließlich bestätigt, dass der Austausch des fluoreszierenden Proteins keinen merklichen Einfluss auf die Bindungsaffinität hat. Auch wurde keine wesentliche Änderung des LRP6-Diffusionskoeffizienten festgestellt. Das war nach den smDIMSA-Messungen für LRP6-mEosFP_{thermo} auch nicht zu erwarten. tdTomato führt als Tandemdimer im Vergleich zu LRP6-mEosFP_{thermo} zu einem Molekülmassenzuwachs von etwa 27 kDa und daher zu einer erwarteten Verschiebung des Diffusionskoeffizienten von weniger als 5 %. Diese war angesichts der relativ großen Unsicherheiten auf die mittels axialer Linienraster-FCS bestimmten Diffusionskoeffizienten nicht sichtbar.

DKK2-eGFP und LRP6-mCherry

Als Nächstes wurde der Fokus auf die Bindungsaffinität zwischen dem Rezeptorprotein LRP6 und einem weiteren seiner Liganden, DKK2, gelegt. Neben DKK1 zählt auch DKK2 zu den Wnt-Inhibitoren für den kanonischen Wnt-Signalweg und kann durch die Bindung an LRP5/6 die Bildung von Signalosomen hindern [189].

Inwieweit sich die Bindungsaffinitäten beider DKK-Varianten an LRP6 unterscheiden, galt es via axialer Linienraster-FCS genauer zu untersuchen. Als Zellsystem wurden hierfür mit LRP6-mCherry transient transfizierte H1703-Zellen verwendet und diese mit DKK2-eGFP-konditioniertem Medium bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen inkubiert. Eine Gegenüberstellung der normierten Bindungskurve für DKK2-eGFP und LRP6-mCherry mit der bereits aus den vorigen Abschnitten bekannten Bindungskurve von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry findet sich Abbildung 4.24.

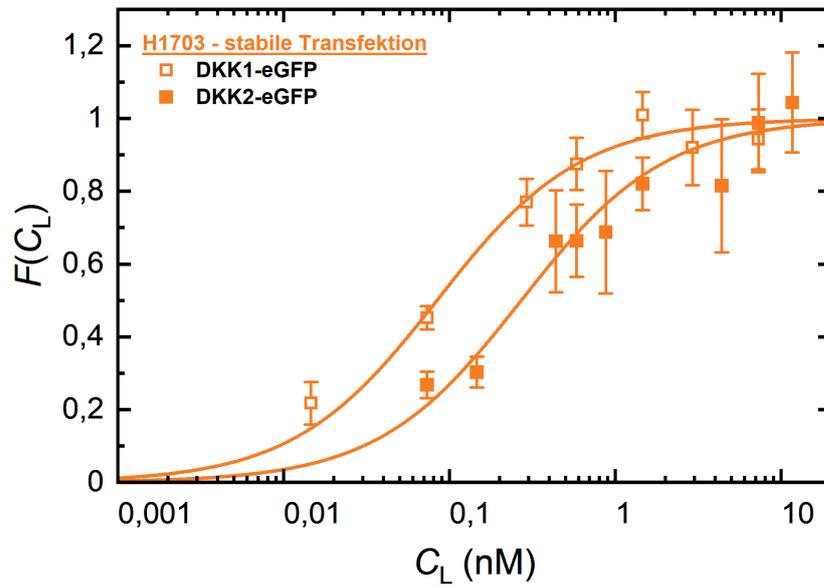


Abbildung 4.24: Rekonstruierte Bindungskurve von stabil mit LRP6-mCherry transfizierten H1703-Zellen und DKK2-eGFP als Ligand. Die Bindungskurve mit DKK1-eGFP als Ligand ist zum Vergleich mit eingezeichnet. Die Kurven wurden mit Hilfe von Gleichung 3.11 an die Datenpunkte angepasst (Linien).

Tabelle 4.8.: Ergebnisse der axialen Linienrastrer-FCS-Messungen zur Bindungsaffinität von DKK1-eGFP und LRP6-tdTomato in CRISPR/Cas9-geneditierten und transient transfizierten H1703-Zellen sowie von DKK2-eGFP und LRP6-mCherry in transient transfizierten H1703-Zellen.

Rezeptor	LRP6-tdTomato		LRP6-mCherry
	DKK1-eGFP		DKK2-eGFP
Zelllinie	H1703		
Rezeptor-Geninsertion	CRISPR/Cas9	transiente Transfektion	stabile Transfektion
Rezeptordichte (μm^{-2})	21 ± 15	106 ± 52	32 ± 16
β	$0,26 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$
K_D (nM)	$0,10 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,03$	$0,26 \pm 0,04$
D_{DKK1} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,27 \pm 0,19$	$0,35 \pm 0,19$	$0,27 \pm 0,08$
D_{LRP6} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,39 \pm 0,19$	$0,44 \pm 0,34$	$0,30 \pm 0,07$

Aus dem direkten Vergleich beider Kurven ist deutlich erkennbar, dass die Bindungsaffinität für DKK2 an LRP6 schwächer ausfiel als für DKK1 und LRP6. Die aus der FCS-Messung und Anpassung der Bindungskurve gewonnenen Parameter sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst. Mao et al. [191] zeigten in ihren Experimenten, dass DKK2 eine geringere Bindungsaffinität zu LRP6 aufweist als DKK1. Die via axialer Linienraster-FCS quantitativ bestimmte Dissoziationskonstante K_D von DKK2 und LRP6 bestätigte dies und fiel mit einem Wert von $(0,26 \pm 0,04)$ nM etwa 3-fach größer aus als im Fall für DKK1. Beide von Mao et al. [191] bestimmten Dissoziationskonstanten wurden für transient mit LRP6 transfizierte HEK293T-Zellen bestimmt. Die mittels axialer Linienraster-FCS bestimmten Dissoziationskonstanten für DKK1 und LRP6 in transient mit LRP6-mCherry transfizierten HEK293T-Zellen (DKK1-eGFP: $(0,49 \pm 0,09)$ nM, DKK1-eGFP-SNAP: $(0,46 \pm 0,09)$ nM) lagen trotz fehlender Angabe von Unsicherheiten nah an dem von Mao et al. [191] angegebenen Wert (0,34 nM).

4.2.1.5. Bestimmung der Bindungsaffinität von xKremen2 und DKK1 unter Einfluss von LRP6

Bindungskinetikexperimente

Bereits aus diversen Experimenten (Hassler et al., Mao et al., Li et al., [199–201]) war ersichtlich, dass das Zusammenspiel von Kremen, DKK und LRP6 sehr komplex ist. Die folgenden Messungen zur Untersuchung des Zusammenspiels bzw. der Bindung der zwei Membranproteine LRP6 und xKremen2 mit ihrem Ligand DKK1 wurden zusammen mit B.Sc. Jasmijn Rath (AG Nienhaus, APH, KIT) und die axialen Linienraster-FCS-Experimente wie zuvor in enger Zusammenarbeit mit Dr. Peng Gao (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt und ausgewertet.

Als Erstes wurde der Einfluss von LRP6 auf die Bindungsaffinität von xKremen2-mCherry und DKK1-eGFP näher untersucht. Für diesen Zweck wurden H1703-Zellen, die zuvor mit xKremen2-mCherry allein oder zusammen mit LRP6 (ohne Fluorophor) transient transfiziert wurden, mit DKK1-eGFP-konditioniertem Medium bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen inkubiert und die Assoziationsprozesse am Spinning-Disk-Konfokalmikroskop aufgenommen. Beispielhafte Zeitrafferaufnahmen der Bindung von DKK1-eGFP an xKremen2-mCherry unter Einfluss von LRP6 sind in Abbildung 4.25 dargestellt.

Im Fall der Einzeltransfektion von xKremen2-mCherry zeigte sich erst ab einer Konzentration von 4 nM an DKK1-eGFP eine deutliche Bindung von DKK1-eGFP an xKremen2-mCherry (Abbildung 4.25 (a)). Wurde jedoch zusätzlich LRP6 kotransfiziert, so war bereits bei 0,4 nM eine sichtliche Bindung erkennbar (Abbildung 4.25 (b)).

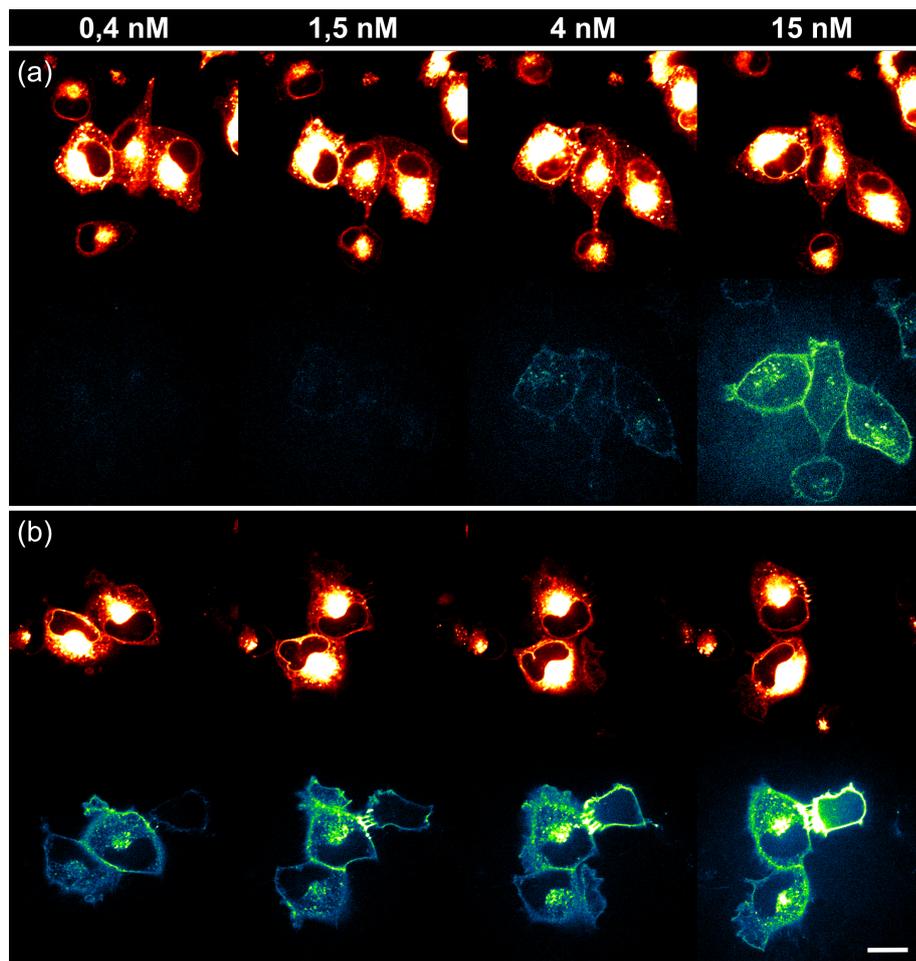


Abbildung 4.25: Konfokalmikroskopaufnahmen von einem Bindungskinetikexperiment von xKremen2-mCherry und DKK1-eGFP (a) ohne LRP6 und (b) unter Einfluss von kotransfiziertem LRP6 (ohne Fluorophor) in H1703-Zellen bei verschiedenen freien Ligandenkonzentrationen. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

Axiale Linienraster-FCS

Mit dieser Vorkenntnis wurde die Bindung zwischen xKremen2-mCherry und DKK1-eGFP unter dem Einfluss von LRP6 (ohne Fluorophor) mittels axialer Linienraster-FCS genauer untersucht. Zuerst wurde die Rezeptordichte von mit xKremen2-mCherry transient transfizierten H1703-Zellen bestimmt (Abbildung 4.26 (a)). Aus diesen Messungen ging hervor, dass die Kotransfektion von LRP6 und xKremen2-mCherry die Anzahl der xKremen2-Rezeptoren ($(68 \pm 10) \mu\text{m}^{-2}$ mit und $(79 \pm 11) \mu\text{m}^{-2}$ ohne LRP6-Koexpression) nicht merklich beeinflusste. Ein deutlicher Einfluss von kotransfiziertem LRP6 war jedoch in den rekonstruierten Bindungskurven von DKK1-eGFP an

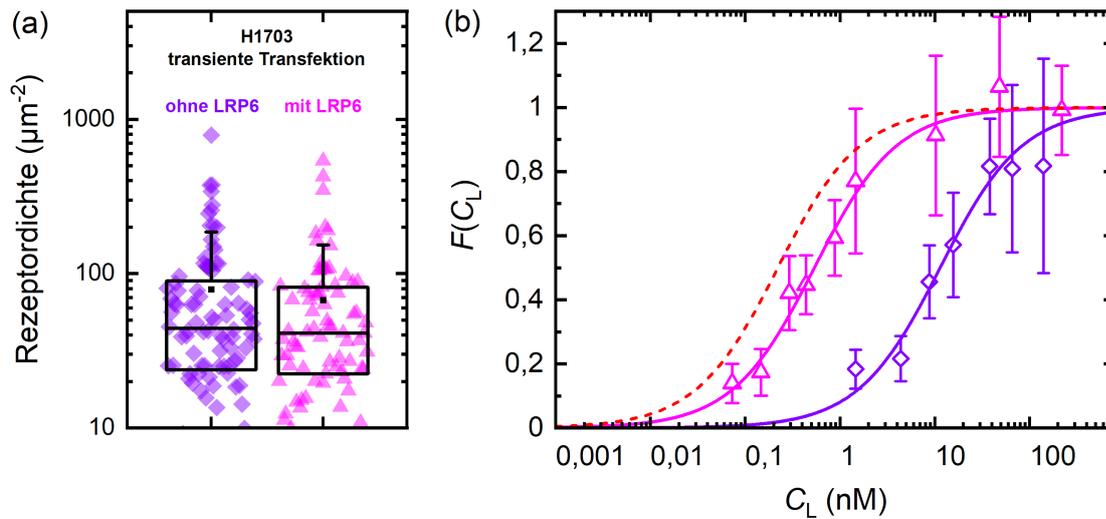


Abbildung 4.26: (a) Verteilung der Rezeptordichten von xKremen2-mCherry in transient transfizierten H1703-Zellen (Boxbereich: 25 % – 75 % Quartile, Whisker: StAbw, schwarze Linie: Median, schwarzes Quadrat: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer Zelle wider. - LRP6: 96 Zellen, + LRP6: 82 Zellen). (b) Normierte Bindungskurven von DKK1-eGFP und xKremen2-mCherry +/- LRP6 in H1703-Zellen. Als Referenz ist die normierte Bindungskurve von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry in transient transfizierten H1703-Zellen eingezeichnet (gestrichelte, rote Linie). Die Kurven wurden mit Hilfe von Gleichung 3.11 an die Datenpunkte angepasst (Linien).

xKremen2-mCherry zu sehen (Abbildung 4.26 (b)). DKK1-eGFP band im direkten Vergleich der Kurven in Abwesenheit von überexprimiertem LRP6 wesentlich schwächer an xKremen2-mCherry als im Falle der Kotransfektion (Abbildung 4.26 (b)). Die aus der Anpassung an die FCS-Daten gewonnenen Parameter sind in Tabelle 4.9 aufgelistet. Die Ergebnisse bestätigen die anhand der Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen aufgestellten Vermutungen bezüglich der Bindungsaffinitätsbereiche: Die Dissoziationskonstante von DKK1-eGFP und xKremen2-mCherry ohne Kotransfektion von LRP6 betrug $(10,3 \pm 2,1)$ nM und lag somit im erwarteten Konzentrationsbereich. Die zusätzliche Überexpression von LRP6 rückte die Dissoziationskonstante mit einem Wert von $(0,54 \pm 0,06)$ nM in niedrigere Konzentrationsbereiche und somit knapp oberhalb des Bereichs der Bindung von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass xKremen2 zusammen mit LRP6 und DKK1 einen ternären Komplex bildet und DKK1 mit höherer Affinität an LRP6 bindet als an xKremen2. Die Tatsache, dass die Bindungsaffinität von DKK1 an LRP6 alleine höher ausfällt als an den LRP6/xKremen2-Komplex impliziert, dass xKremen2 die DKK1-Bindungsstellen bei LRP6 beeinflusst. Auffällig war auch der ungewöhnlich hohe β -Wert $(0,66 \pm 0,03)$

4. Ergebnisse

Tabelle 4.9.: Ergebnisse der axialen Linienraster-FCS-Messungen zur Bindungsaffinität von DKK1-eGFP und xKremen2-mCherry +/- LRP6.

Rezeptor	xKremen2-mCherry	xKremen2-mCherry, LRP6
Ligand	DKK1-eGFP	
Zelllinie	H1703	
Rezeptor-Geninsertion	transiente Transfektion	
Rezeptordichte (μm^{-2})	44 ± 33	41 ± 30
β	$0,45 \pm 0,02$	$0,66 \pm 0,03$
K_D (nM)	$10,3 \pm 2,1$	$0,54 \pm 0,06$
D_{DKK1} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,25 \pm 0,15$	$0,32 \pm 0,18$
D_{xKremen2} ($\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$)	$0,19 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,09$

für transient mit einem mCherry-Konstrukt transfizierte H1703-Zellen. Eigentlich war sogar ein kleinerer Wert zu erwarten, da in diesen Zellen unmarkiertes LRP6 koexprimiert wurde, welches alleine DKK1 binden kann, wodurch sich die Anzahl an Molekülen im grünen Farbkanal erhöht. Eine Erklärung für den größer ausfallenden β -Wert sind größere Proteinkomplexe, die aus mehreren xKremen2-mCherry-Molekülen bestehen.

4.2.1.6. Bildung von xKremen2-LRP6-Heterodimeren unter Einfluss von DKK1

Als Nächstes wurde untersucht, ob xKremen und LRP6 ihren Liganden DKK1 zur Bildung von Heterodimeren benötigen oder schon als solche an der Zellmembran vorliegen, woraufhin die Experimente von Hassler et al. [199] bereits deuteten. Die vorigen FCS-Messungen zeigten lediglich eine erhöhte Bindungsaffinität bei Koexpression von xKremen2-mCherry zusammen mit unmarkiertem LRP6. In den folgenden Experimenten wurden stabil mit LRP6-mCherry transfizierte H1703-Zellen zusätzlich mit xKremen2-eGFP transient transfiziert und mittels axialer Linienraster-FCS gemessen. Die scheinbaren Anteile der roten und grünen Rezeptoren $F'_{R,G}$, die Heterodimer-Komplexe an der Zellmembran formen, wurden unter Anwendung der Gleichung 3.15 und Gleichung 3.16 berechnet. Durch Einsetzen der entsprechenden Korrelationsampli-

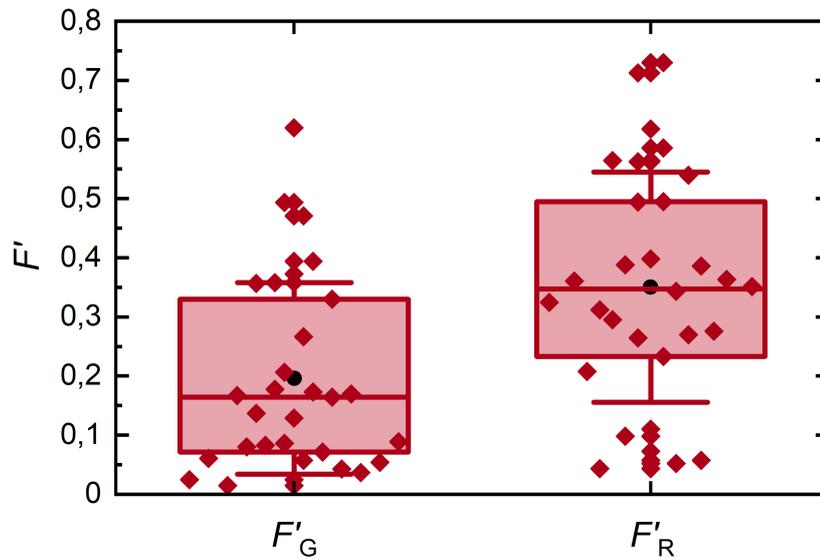


Abbildung 4.27: Anteil der LRP6-mCherry/xKremen2-eGFP-Heterodimere in H1703-Zellen. Es wurden nur Datenpunkte mit $G_{G,R}(0) > 0,02$ und $F'_{G,R} < 1$ berücksichtigt, um den Einfluss von Ausreißern zu minimieren. (Boxplotbereich: 25%-75% Quartile, StAbw, schwarzer Punkt: Mittelwert. Jeder Punkt spiegelt eine individuelle FCS-Messung in einer Zelle von insgesamt mehr als 60 Zellen wider.)

tuden und der Verhältnisse der Beobachtungsflächen ($A_{\text{eff}}/A_G = 1,23$, $A_{\text{eff}}/A_G = 0,84$) ergab sich ein Anteil der in Komplexen gebundenen LRP6-Proteine von etwa 16 % und für xKremen2 ein Anteil von etwa 35 %. Berücksichtigt man nun zusätzlich die Fluorophormaturation für mCherry ($\eta_R = 0,5$ [181–183]) und eGFP ($\eta_G = 0,9$ [149–151, 184–186]), so liegen nach Anwendung der Gleichung 3.17 und Gleichung 3.18 etwa 19 % der LRP6-Proteine und etwa 36 % der xKremen2-Proteine in Heterodimer-Komplexen vor.

4.2.2. Wnt5a und Ror2

4.2.2.1. Wnt5a und Ror2 in *Xenopus laevis*

Der Wnt-Signalweg reguliert die Abläufe vieler wichtiger biologischer Prozesse, darunter die Embryogenese. In der Embryogenese des *Xenopus laevis*, der im Deutschen auch unter dem Namen „Afrikanischer Krallenfrosch“ bekannt ist, spielt der Spemann-Organisator eine zentrale Rolle. Er ist das Organisationszentrum für die Gastrulation und zeigt den übrigen Zellen ihre Aufgaben in der Embryoentwicklung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde konkret die Auswirkung von Wnt5a auf seinen Rezeptor Ror2 in *Xenopus*-Explantaten genauer untersucht. Beide Proteine sind Teil des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs, welcher vor allem Zellpolarisation und -migration sowie, in Bezug auf den *Xenopus*-Organismus, die Drehungsbewegung des Mesoderms während der Gastrulation beeinflusst. Die im Folgenden aufgeführten Ergebnisse resultieren aus der Zusammenarbeit mit M.Sc. Katharina Puzik (AG Gradl, ZEBio, KIT), welche die für die Experimente benötigten biologischen Proben zur Verfügung stellte. Der ausführliche biologische Rahmen dieser Experimente und Näheres zu den Explantaten kann in der Publikation [202] nachgelesen werden. Hauptziele dieser Kollaboration war es, die Wnt5a induzierte Clusterbildung von xRor2 näher zu untersuchen.

4.2.2.2. Experimenteller Ablauf: „Vom Frosch über das Mikroskop zum Film“

Zur Untersuchung der Auswirkung von Wnt5a auf xRor2 in Zellen des animalen Pols (der animalen Kappe) wurden alle vier Blastomere von Embryonen in der Gastrulationsstufe 4 nahe der Kontaktregion mit den gewünschten mRNAs injiziert (Abbildung 4.28 (a)). Je nach Experiment wurde zusätzlich zu xRor2-mCherry entweder xRor2-Split-YFP(N)/xRor2-Split-YFP(C) oder Caveolin1-eGFP injiziert. Die animalen Kappen der vorinjizierten Embryonen wurden in der Gastrulationsstufe 9 manuell herausgeschnitten (Explantate) und in eine selbst angefertigte, mit bovinem Serumalbumin (BSA) beschichtete Probenkammer (Abbildung 4.28 (b)) gesetzt.

Das Explantat befand sich in einer Art „Sandwich“ aus Medium (MBSH (engl. *Modified Barth's Solution High-salt*) mit 0,1 % BSA) zwischen zwei unterschiedlich langen Deckgläsern mit Dicke #1,5. Als Stütze zwischen den Deckgläsern wurde am Glasrand Silikon angebracht. Hierbei musste darauf geachtet werden, die Explantate durch passenden Druck auf das obere Deckglas bestmöglich an das untere Deckglas zu drücken und zu fixieren, jedoch nicht zu beschädigen. Nach der Probenpräparation wurde zügig gearbeitet, da die Explantate in diesem Zustand in der Regel nur wenige Stunden überleben. Um die Auswirkungen von Wnt5a auf xRor2 in diesen Explantaten zu testen, wurde

rekombinantes Wnt5a (MBSH, 0,1 % BSA und 0,1 µg/µL Wnt5a, R&D Systems, Minneapolis, MN) mit Hilfe eines Filterpapiers vorsichtig durch die Probenkammer gezogen. Die im Folgenden gezeigten Zeitrafferaufnahmen wurden mit einem Einzelmolekül-lokalisationsmikroskop (Kapitel 3.4) im Durchlichtmodus mit einer Belichtungszeit von 50 ms pro Bild und einer Belichtungsleistung von 2 W/cm² für jeweils einige Minuten aufgenommen. Mit der im Mikroskopaufbau integrierte Optosplit-Einheit und den entsprechenden Filtern (Kapitel 3.4) war es möglich, die Signale von zwei Farbkanälen optisch zu trennen und simultan aufzuzeichnen. Die Aufnahmen wurden nachträglich mit Hilfe der Software Fiji [156] bearbeitet und aus ihnen wurden gemittelte Bildsequenzen erstellt. Jedes Bild in der Sequenz entsprach einem Mittel aus 20 Aufnahmen und zeitlich gesehen 1 s. Zusätzlich wurde mit den Fiji Plugins der Drift der Probe (SPIM Registration) [203] und die Bleichung der Fluorophore korrigiert.

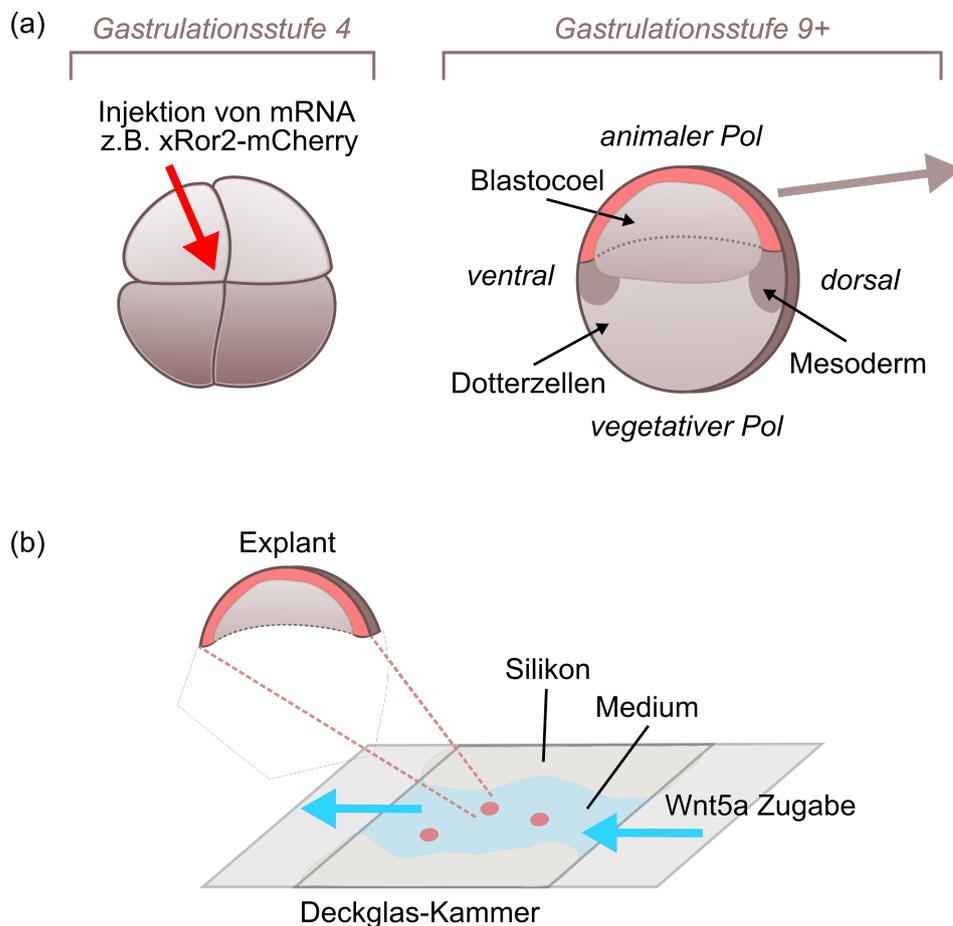


Abbildung 4.28: Herstellung der *Xenopus*-Explantate und der Probenkammer

4.2.2.3. Der Effekt von Wnt5a auf xRor2 in *Xenopus*-Explantaten

Die Wnt5a-induzierte Clusterbildung von Ror2 wurde bereits durch Feike et al. [23] und Wallkamm et al. [24] in *Xenopus*-Embryonen und -Explantaten beobachtet. Die Frage, ob Ror2 auch ohne Wnt5a Dimere oder Oligomere bildet und Wnt5a den Zusammenschluss zu größeren Komplexen lediglich positiv beeinflusst, blieb jedoch offen. Um diese Fragestellung zu lösen, wurde von der AG Gradl (AG Gradl, ZEBio, KIT) ein Split-YFP-Konstrukt generiert (xRor2-Split-YFP(N) und xRor2-Split-YFP(C) [202]). Finden während einer xRor2-Dimerisierung die jeweils komplementären nicht fluoreszierenden Teile von Split-YFP zusammen, so entsteht ein fluoreszierendes YFP. Dieses komplementierte YFP erzeugt infolge der Anregung durch einen Laser passender Wellenlänge ein Fluoreszenzsignal und weist auf die Existenz von xRor2-Dimeren hin.

Zuerst wurde der Einfluss der Zugabe von Wnt5a auf xRor2 näher untersucht. Hierfür wurde 200 pg xRor2-mCherry mRNA in dorsale Blastomere in der Animalkappe injiziert. Das Medium der Explantate wurde am Versuchstag durch mit Wnt5a angereichertes Medium ersetzt. Auch hier stimulierte die Zugabe von Wnt5a seinen Rezeptor xRor2 deutlich zur Clusterbildung an der Zellmembran. Dabei schloss sich xRor2-mCherry, welches vor der Zugabe eher homogen an der Zellmembran verteilt vorlag, innerhalb weniger Sekunden zu deutlich sichtbaren Clustern zusammen (Abbildung 4.29 (a)). Um die Größen dieser Cluster zu bestimmen, wurde die Intensitätsverteilung des xRor2-mCherry-Signals entlang der Zellmembran bei 120 s näher untersucht (Abbildung 4.29 (b)). Die durch Anpassung der Kurve mittels Gaußverteilung ermittelten Halbwertsbreiten sind in Tabelle 4.10 aufgelistet und befanden sich im Bereich mehrerer hundert Nanometer mit einem Maximalwert bei etwa 700 nm.

Als Nächstes wurde zur Untersuchung der Dimerisierung von xRor2 das Prinzip der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation in Form von zwei komplementären Split-YFP-Konstrukten ausgenutzt. Diese setzen sich nach der Dimerisierung von xRor2 zu einem funktionsfähigen Fluorophor zusammen und sollten anzeigen, wo sich xRor2-Dimere befinden bzw. den Kontrast von xRor2-Cluster erhöhen. In allen Explantaten wurde xRor2-mCherry koinjiziert, da das xRor2-Split-YFP-Signal während der Zeitrafferaufnahmen meist schwach war und nach wenigen Sekunden photobleichte. Dies lag zum einen womöglich an der geringeren Menge an komplettierten Proteinen, da durch die Koinjektion die Anzahl von möglichen xRor2-Paarkombinationen anstieg. Folglich sank die Wahrscheinlichkeit, ein xRor2-Paar mit erfolgreich komplettiertem YFP anzutreffen, um die Hälfte ($P = 1/3$ für Split-YFP-Konstrukte; $P = 1/6$ für Split-YFP-Konstrukte + mCherry-Konstrukt, unter der Annahme gleicher Mengen an Proteinen in der jeweiligen Proteinsorte und mit Vernachlässigung des Einflusses endogener

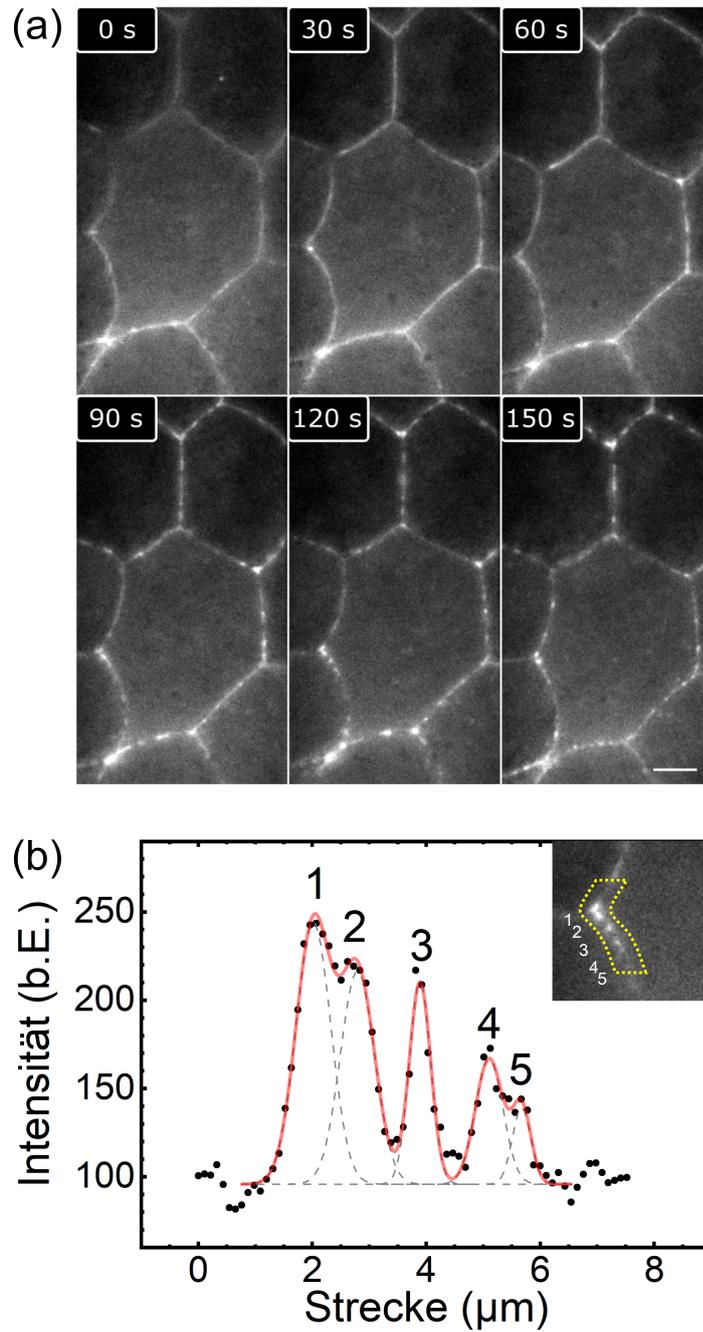


Abbildung 4.29: (a) Durch die Zugabe von Wnt5a induzierte Clusterbildung von xRor2-mCherry an der Zellmembran in einem *Xenopus*-Explantat. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . (b) Bestimmung der Clustergröße von xRor2-mCherry nach Wnt5-Zugabe via Anpassung von Gaußkurven an die Intensitätsverteilung über den Ort.

xRor2-Proteine). Zum anderen lag das schnelle Photobleichen von YFP vor allem an dem hohen Hintergrundsignal im grünen/gelben Farbkanal in biologischen Proben. Dadurch musste meist eine höhere Laserleistung verwendet werden, um ein entsprechend gutes Signal-Rausch-Verhältnis zu erzeugen. Dies erschwerte die Aufnahme von Langzeitmessungen im YFP-Kanal, zumal ein Internalisierungsprozess eines großen xRor2-Clusters spontan geschieht und äußerst selten im kleinen Bildausschnitt des großen Explantats am Einzelmoleküllokalisationsmikroskop zu beobachten war. Eine Abfolge an Zeitrafferaufnahmen einer dieser spontanen Internalisierungsprozesse von xRor2-Clustern nach Wnt5a-Zugabe ist in Abbildung 4.30 dargestellt.

Die Verteilung von xRor2-Split-YFP und xRor2-mCherry waren sowohl an der Zellmembran als auch im Cytosol nahezu deckungsgleich. Dabei verweilte das in Abbildung 4.30 zu sehende xRor2-Cluster für etwa 1 min an der Zellmembran, bevor es binnen 15s in die Zelle internalisiert wurde. Somit wurde erstmals ein Wnt5a-stimulierter Internalisierungsprozess eines xRor2-Clusters an der Zellmembran in einem *Xenopus*-Explantat in Echtzeit beobachtet. Dadurch wurde gezeigt, dass Wnt5a xROR2 nicht nur zur Clusterbildung stimuliert, sondern xRor2-Komplexe mit einem Durchmesser von mehreren hundert Nanometern nicht an der Membran verweilen, sondern auch tatsächlich als Komplex internalisiert werden.

Von Puzik et al. [202] wurde zudem gezeigt, dass die Wnt5a-Signalkomplexe mit Cav1-eGFP kolokalisieren und somit höchstwahrscheinlich durch Caveolin endozytiert werden. In den durchgeführten Experimenten an mit xRor2-mCherry und Cav1-eGFP koinjizierten Explantaten konnte ein Caveolin-abhängiger Internalisierungsprozess von

Tabelle 4.10.: Übersicht der bestimmten xRor2-mCherry Clustergrößen.

Gaußkurve Nr.	Halbwertsbreite (nm)
1	720 ± 50
2	710 ± 60
3	442 ± 27
4	570 ± 80
5	390 ± 90

Wnt5a-induzierten xRor2-mCherry-Komplexen jedoch nicht beobachtet werden. In Zukunft könnten hierfür nicht nur mehr Experimente geplant werden, sondern auch unterschiedliche Caveolin-Proteine oder auch der Einfluss von Clathrin näher untersucht werden.

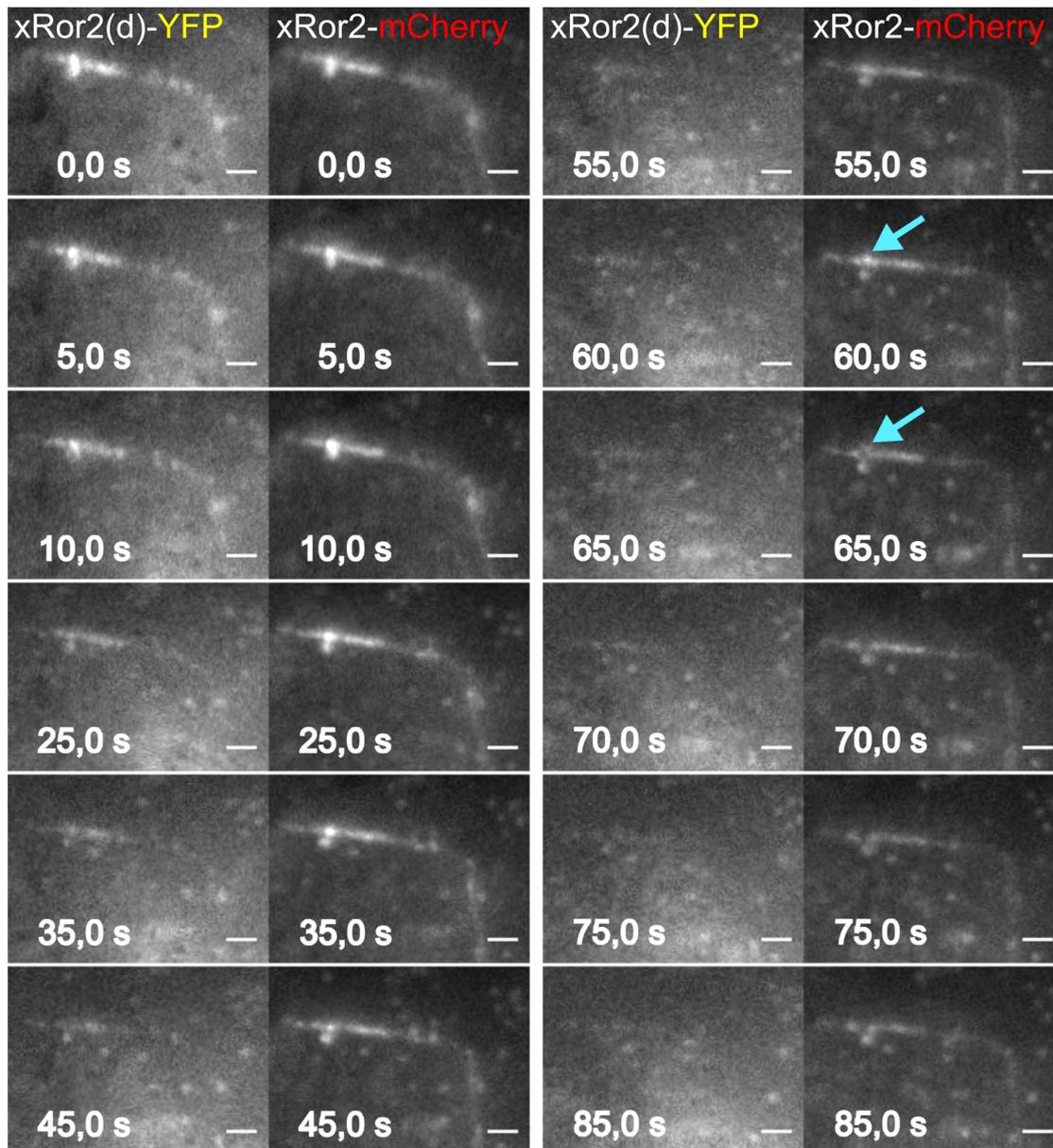


Abbildung 4.30: Wnt5a-induzierter Internalisierungsprozess von xRor2-Clustern an der Zellmembran in einem *Xenopus*-Explantat. Aufnahmen korrigiert für Photobleichen der Fluorophore und Drift der Probe. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm .

4.3. Der interzelluläre Transport von Wnt3a

In dieser Arbeit wurde der interzelluläre Transport von Wnt3a in HEK293T- und H1703-Zellen näher untersucht. Die folgenden Experimente basieren auf einer Kollaboration mit Dr. Alena Ivanova (AG Boutros, DKFZ, Heidelberg) und wurden in enger Zusammenarbeit mit B.Sc. Michael Dao (AG Nienhaus, APH, KIT) durchgeführt und ausgewertet. Dr. Alena Ivanova fokussierte sich in ihren vorangehenden Experimenten auf den Einfluss von Lin7A auf die Filopodienbildung in AGS-Zellen (Manuskript in Arbeit). In den stabil Lin7A und Lifeact-iRFP⁴ überexprimierenden HEK293T- und H1703-Zellen [204], die Dr. Alena Ivanova hergestellt hatte, schien Lin7A keine große Auswirkung auf die Filopodienanzahl und -länge zu haben. Aus diesem Grund wird im Folgenden nicht weiter auf Lin7A eingegangen. Die im Folgenden aufgeführten Experimente basieren auf dem von Takada et al. [205] bereits veröffentlichten und auf Funktionalität getesteten eGFP-mWnt3a-Konstrukt. Je nach Fragestellung wurden diese Zelllinien zusätzlich mit Plasmiden weiterer Zielproteine transient transfiziert (Probenvorbereitung in Kapitel 3.1.2). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben mit einem Spinning-Disk-Konfokalmikroskop aufgenommen.

4.3.1. mWnt3a im endoplasmatischen Retikulum

Die Überexpression von eGFP-mWnt3a in HEK293T- und H1703-Zellen führte zu einer Anhäufung von eGFP-mWnt3a im Zellinneren, in einem gitterartigen Zellkompartiment (Abbildung 4.31). Da diese Struktur stark der des ER ähnelte, wurde zur Überprüfung dieser Vermutung in diesen Zelllinien zusätzlich zu eGFP-mWnt3a ein ER-Markerprotein, Sec61 β -mCherry [206, 207], exprimiert⁵. In der Tat stimmte die Lokalisierung von eGFP-mWnt3a im Zellinneren von HEK293T- und H1703-Zellen stark mit der von Sec61 β -mCherry überein (Abbildung 4.31 (a) und (b)). Der räumliche Überlapp der Signale von eGFP-mWnt3a und Sec61 β -mCherry in Abbildung 4.31 (b) wurde zusätzlich durch einen moderat hohen Korrelationskoeffizienten nach Pearson⁶ von $P = 0,7$ bestätigt (Abbildung 4.31 (c)). Dies bedeutete, dass bei Überex-

⁴ Lifeact-iRFP diente aufgrund der Markierung von Aktinstrukturen hauptsächlich zur besseren Visualisierung des Cytoskeletts der Zellen.

⁵ Sec61 β -mCherry wurde freundlicherweise über Dr. Martin Stefl (AG Nienhaus, APH, KIT) von der AG Hof (Abteilung für Biophysikalische Chemie, J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the ASCR, Prag) zur Verfügung gestellt [206].

⁶ Der Pearson Korrelationskoeffizient P beschreibt den linearen Zusammenhang zwischen zwei Variablen und kann zwischen -1 und 1 liegen: $P \approx 0$ kein Zusammenhang, $P \approx > 0$ positive Korrelation,

pression ein Großteil von eGFP-mWnt3a im Endoplasmatischen Retikulum der Zelle akkumulierte. Das ist nicht allzu verwunderlich, da die Wnt-Synthese bzw. die Wnt-Sekretionsmaschinerie in der Zelle sehr komplex ist. Für die Lipid-Modifizierung der Wnt-Proteine wird z. B. ein Enzym namens Porcupine (PORCN) benötigt, das sich typischerweise im ER der Zelle befindet [28, 29]. Fehlt dieses Enzym oder liegt dieses Enzym in einer zu geringen Menge vor, so wirkt sich dies direkt auf die Wnt-Sekretion aus und Wnt verbleibt im ER [208, 209]. Folglich ist auch die Wnt-Signalaktivität in diesen Zellen reduziert. Ähnliches gilt für das intrazelluläre Chaperon Wntless/Evi, welches an Wnt bindet und für dessen Transport vom ER zum Golgi benötigt wird [31, 210, 211].

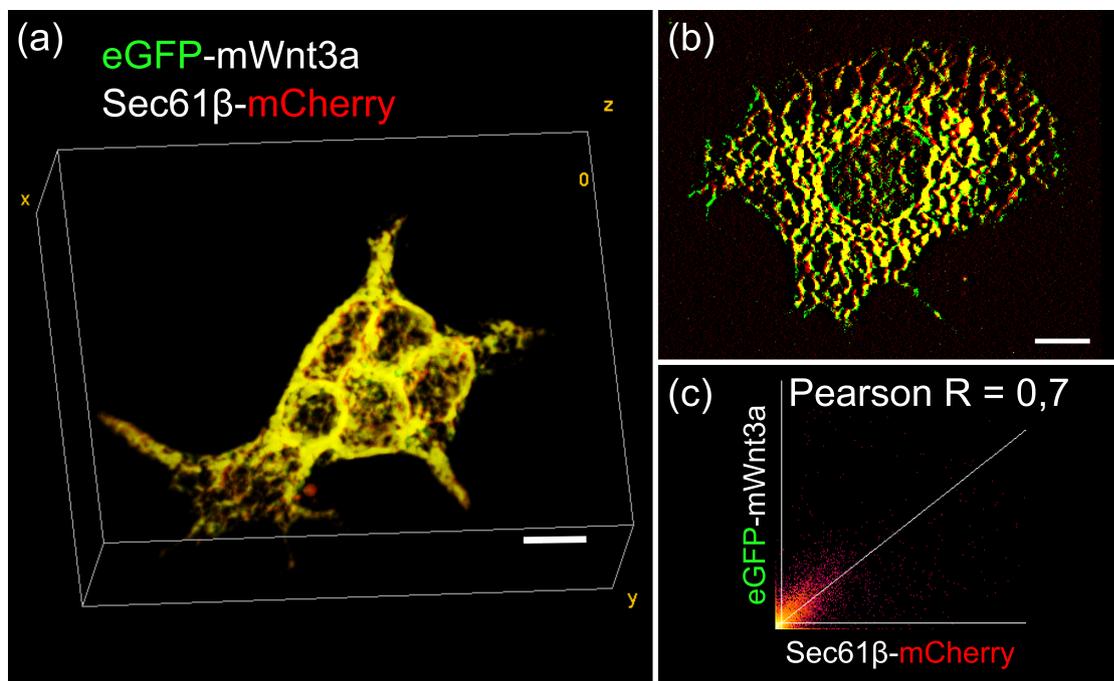


Abbildung 4.31: Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen von HEK293T- und H1703-Zellen, transient transfiziert mit eGFP-mWnt3a und Sec61β-mCherry. (a) 3D-Aufnahme (Volume Viewer, Fiji) einer HEK293T-Zelle. (b) Querschnitt durch eine H1703-Zelle und (c) das zugehörige Streudiagramm der Intensitäten im grünen und roten Farbkanal (Colocalization Threshold, Fiji) mit Pearson-Korrelation. Das Hintergrundsignal aller Aufnahmen wurde via Frequenzfilter entfernt (Python-Code, M.Sc. Manuel Hüpfel (AG Nienhaus, APH, KIT)). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

$P < 0$ negative Korrelation.

4.3.2. Der Einfluss von PORCN auf den Aufenthaltsort der mWnt3a-Proteine in Zellen

Im Folgenden wurde die Auswirkung des PORCN-Inhibitors LGK974 auf den Aufenthaltsort der mWnt3a-Proteine näher untersucht. Erwartet wurde, dass die gezielte Inhibition von PORCN die korrekte Faltung der Wnt-Proteine im ER verhindert und somit den Wnt-Sekretionsweg stört [212].

Hierfür wurden H1703-Zellen transient mit eGFP-mWnt3a und MEM-mCherry transfiziert und die Zellen am nächsten Tag, in einem Zeitraum von 26 h bis 32 h nach der Zugabe von DMSO (Kontrolle) oder LGK974 mit dem Spinning-Disk-Konfokalmikroskop betrachtet. Auffällig war, dass sich eGFP-mWnt3a vor der Zugabe des Inhibitors in kleinen Filopodien aufhielt und dort als diffuses Signal im grünen Kanal erkennbar war (Abbildung 4.32). Dass es sich um Wnt-Proteine handeln musste, wurde durch die Inkubation der Zellen mit LGK974 bestätigt. Die Zugabe von LGK974 reduzierte das eGFP-Signal in dünnen Filopodien drastisch und bewirkte offensichtlich, dass eine große Anzahl der Wnt-Proteine das ER nicht mehr verlassen konnten.

Um die Auswirkung des PORCN-Inhibitors zu quantifizieren, wurden drei unabhängige Messreihen an unterschiedlichen Messtagen durchgeführt. Die transfizierten H1703-Zellen wurden ca. 6 Stunden nach der Transfektion entweder mit 10 μ M LGK974 oder mit der gleichen Menge an Lösungsmittel (DMSO) als Kontrolle inkubiert. Am Versuchstag wurde das Fluoreszenzsignal dieser Zellen im grünen und roten Farbkanal mit einem festgelegten Abrasterschema im Probengefäß detektiert. Alle Zellaufnahmen, die bei diesem Abrasterschema erstellt wurden und ein Fluoreszenzsignal in beiden Farbkanälen aufwiesen, wurden bei der Auswertung berücksichtigt. Als nächstes wurden nur Zellen betrachtet, die im MEM-mCherry-Kanal mehrere dünne Filopodien mit einer Filopodienlänge im Bereich mehrerer Mikrometer aufwiesen. Im Anschluss wurden diese Zellaufnahmen drei Kategorien zugeordnet:

- „**Positiv**“: eGFP-mWnt3a in dünnen Filopodien
- „**Negativ**“: kein eGFP-mWnt3a in dünnen Filopodien
- „**Nicht eindeutig**“: nicht eindeutig einzuordnen

Zellen aus der Kategorie „Positiv“ wiesen typischerweise Pearson-Koeffizienten von $P \geq 0.5$ und Zellen aus der Kategorie „Negativ“ Pearson-Koeffizienten von $P < 0.5$ auf. Es wurden insgesamt 147 Kontrollzellen und 140 Zellen nach LGK974-Inkubation in

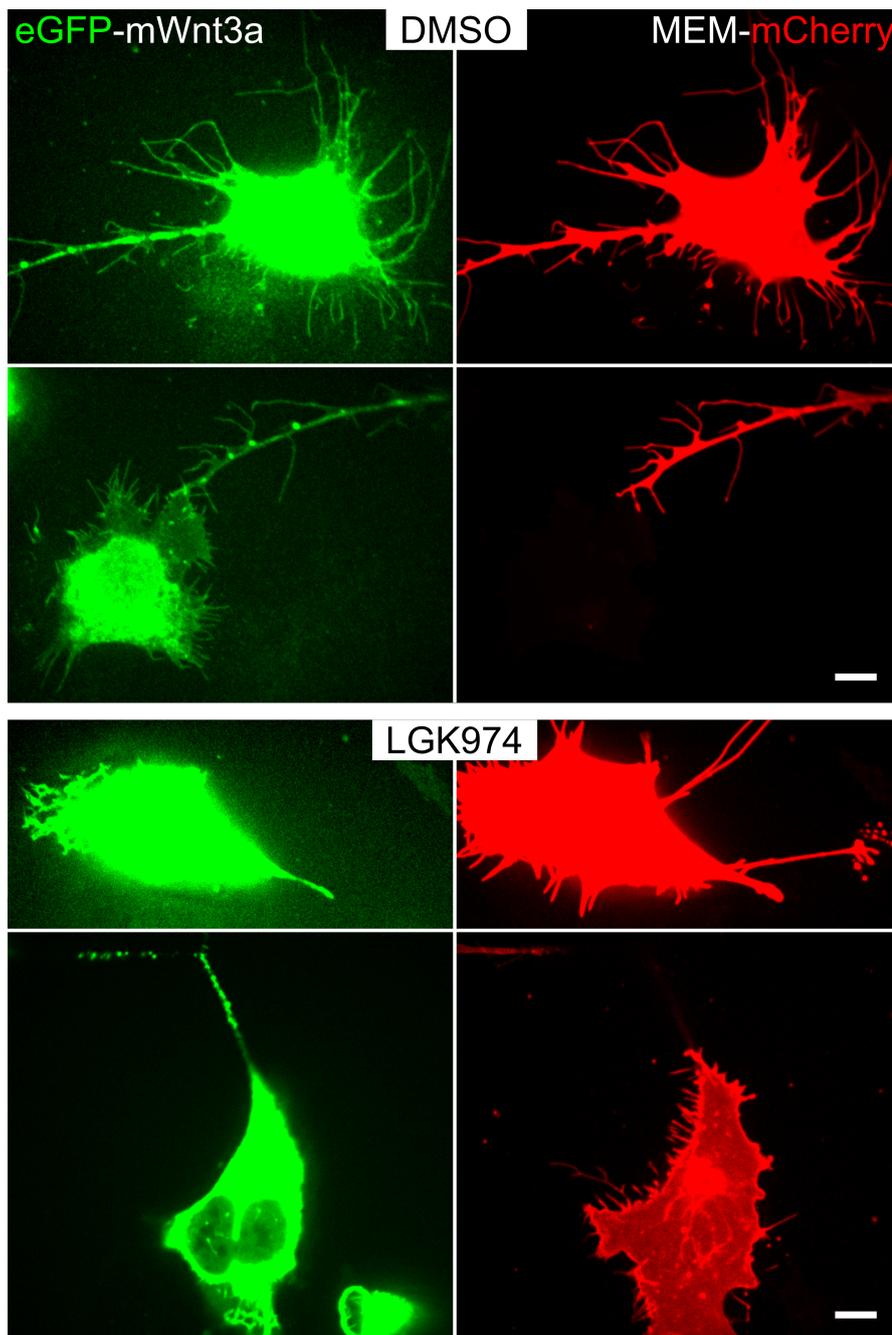


Abbildung 4.32: Einfluss des PORCN-Inhibitors LGK974 auf den Aufenthaltsort von eGFP-mWnt3a in H1703-Zellen. Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen von transient mit eGFP-mWnt3a und MEM-mCherry transfiziertem H1703-Zellen 26 h bis 32 h nach der Zugabe von DMSO (oben) oder LGK974 (unten). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

die Statistik einbezogen. Die relative Häufigkeit von mWnt3a in dünnen Filopodien in H1703-Zellen (Kategorie „Positiv“) ist in Abbildung 4.33 dargestellt. Anhand der Statistik ist bei den Zellen, die mit LGK974 inkubiert wurden, eine deutliche Reduzierung von eGFP-mWnt3a in dünnen Filopodien zu erkennen. Bei diesen Experimenten wurde somit bestätigt, dass PORCN eine wichtige Rolle in der Weiterverarbeitung von eGFP-mWnt3a im ER spielt.

Hierbei ist anzumerken, dass sich die Zugabe von LGK974 erster Linie auf die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von eGFP-mWnt3a in dünnen Filopodien auswirkte. Vereinzelt war eGFP-mWnt3a dennoch in tunnelartigen Zellfortsätzen zu sehen (Abbildung 4.32). Diese hatten jedoch im Vergleich zu den dünnen Filopodien einen deutlich größeren Durchmesser und traten vermehrt interzellulär auf. Die Art von Zellfortsätzen schien eine Art Tunnelsystem zwischen zwei Zellen darzustellen, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

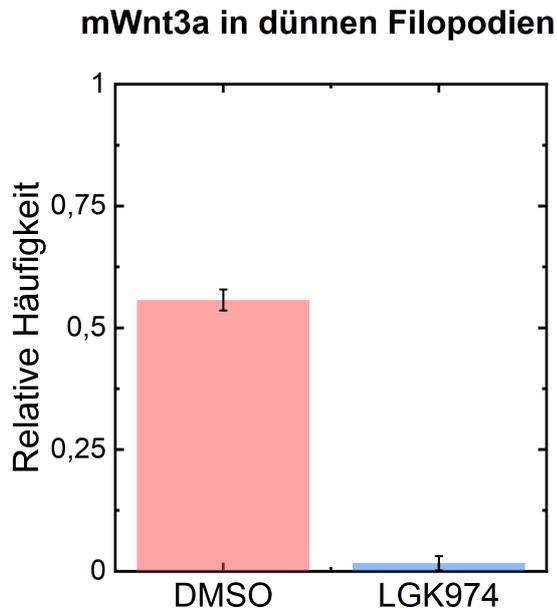


Abbildung 4.33: Relative Häufigkeit von mWnt3a in dünnen Filopodien in H1703-Zellen unter Einfluss von LGK974 (Kategorie „Positiv“, DMSO: 149 Zellen, LGK: 140 Zellen).

4.3.2.1. mWnt3a in Vesikeln in Tunnelnanoröhren

In weiteren Experimenten wurden zur besseren Visualisierung der Zellmembran H1703- und HEK293T-Zellen transient mit einem membranständigen Fusionskonstrukt (MEM-mCherry [213]) transfiziert. Die Koexpression dieses Fusionsproteins zusammen mit eGFP-mWnt3a offenbarte einen weiteren Aufenthaltsort der Wnt-Proteine: Neben ihrer Anhäufung im Endoplasmatischen Retikulum war Wnt auch deutlich in interzellulären Zellfortsätzen zu erkennen (Abbildung 4.34 (a) und (b)). Diese interzellulären Verbindungen, die womöglich neben der Fortbewegung der Zellen auch bei der interzellulären Kommunikation eine wichtige Rolle spielen, werden ab sofort als Tunnelnanoröhren [46, 214] bezeichnet.

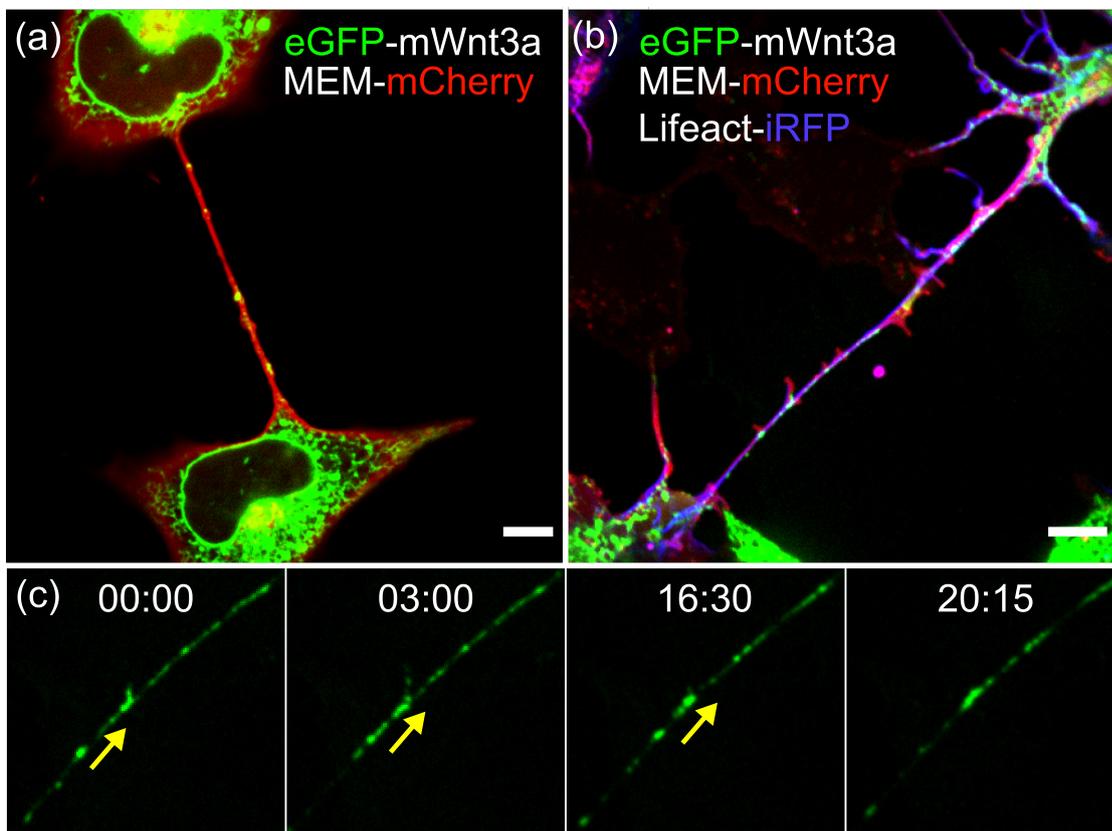


Abbildung 4.34: Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen von transient mit eGFP-mWnt3a und MEM-mCherry (und Lifeact-iRFP) transfizierten Zellen, die Ansammlungen von eGFP-mWnt3a in Tunnelnanoröhren zeigen: (a) H1703-Zellen und (b) HEK293T-Zellen. (c) Zeitrafferaufnahmen von (b) zeigen den Transport von eGFP-mWnt3a in den Tunnelnanoröhren. Zeitangabe in Minuten: Sekunden. Der Maßstabsbalken entspricht 10 µm.

Abbildung 4.34 (c) zeigt beispielhaft eine Zeitrafferaufnahme von eGFP-mWnt3a-Ansammlungen in einer Tunnelnanoröhre, die sich über die Zeit entlang des Zellfortsatzes bewegen. Es ist zu vermuten, dass es sich bei den oftmals punktförmigen Wnt3a-Ansammlungen in den Tunnelnanoröhren um eGFP-mWnt3a-reiche Vesikel handelt.

4.3.3. Vesikelgröße und -geschwindigkeit von eGFP-Wnt3a-positiven Vesikeln

4.3.3.1. Größe der eGFP-Wnt3a-positiven Vesikel

Zur Bestimmung der Vesikelgröße wurden die Intensitätsverteilungen über die Mitte der eGFP-mWnt3a-positiven Vesikel in H1703- und HEK293T-Zellen parallel und orthogonal zur Tunnelnanoröhre gemessen. Die aus der Anpassung mittels Gaußkurve bestimmten Halbwertsbreiten („HWB“) entsprechen jedoch nicht den tatsächlichen Vesikeldurchmessern. Die Intensitätsverteilung eines fluoreszierenden Teilchens wird durch die Konvolution mit der Punktspreizfunktion des Mikroskops verbreitert, was in der Größenbestimmung der Vesikel berücksichtigt werden muss. Daher wurden als Referenz für die mit eGFP fluoreszenzmarkierten Vesikel im selben Farbkanal die Intensitätsprofile von fluoreszierenden Perlen mit Durchmesser von 0,5 μm und 1 μm (TetraSpeck Microspheres, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) gemessen (Protokoll im Anhang A.2). Anhand der Referenzdaten wurde ein linearer Reskalierungsgraph erstellt, der der bestimmten HWB des detektierten Fluoreszenzsignals einen Teilchendurchmesser zuordnet (Abbildung 4.35 (a)). Der kleinste bestimmbarer Durchmesser lag bei 208 nm, was nach Rayleigh (Gleichung 2.3) der theoretisch zu erwartenden Auflösung des verwendeten Spinning-Disk-Konfokalmikroskops im grünen Farbkanal entspricht. Durch den Vergleich der HWB der eGFP-Wnt3a-positiven Vesikel mit dem Reskalierungsgraph wurde den Vesikeln schließlich jeweils ein Durchmesser zugeteilt (Abbildung 4.35 (b)). Es wurden die Durchmesser von jeweils mindestens 49 Vesikeln parallel und orthogonal zur Tunnelnanoröhre bestimmt. Die Unsicherheit der Vesikeldurchmesser basierte auf der Variation der HWB der gemessenen Referenzproben im Sichtbereich.

Beim Vergleich der Ergebnisse ist ein Trend zu erkennen: Der Median der Vesikeldurchmesser parallel zur Tunnelnanoröhre lag deutlich oberhalb des Durchmessers orthogonal zu dieser. Ursache dafür war womöglich die Einengung der Vesikel entlang der Tunnelnanoröhre. H1703-Zellen sind generell größer als HEK293T-Zellen und besitzen deutlich dickere und längere Tunnelnanoröhrensysteme, was sich in den Durchmesser

der mWnt3a-positiven Vesikeln widerspiegelt (HEK293T-Zellen: $d_{\parallel} = (0,63 \pm 0,14) \mu\text{m}$, $d_{\perp} = (0,47 \pm 0,07) \mu\text{m}$; H1703-Zellen: $d_{\parallel} = (1,6 \pm 0,5) \mu\text{m}$, $d_{\perp} = (0,9 \pm 0,3) \mu\text{m}$).

4.3.3.2. Geschwindigkeit der eGFP-Wnt3a-positiven Vesikel

In den Zeitrafferaufnahmen der eGFP-mWnt3a-Ansammlungen in HEK293T- und H1703-Zellen konnten zudem gerichtete Bewegungen entlang der Tunnelnanoröhren beobachtet werden. Hierzu wurden die Vesikelgeschwindigkeiten durch die Erstellung und Auswertung eines Kymographs mit der Software Fiji [156] ermittelt.

Abbildung 4.36 (a) zeigt beispielhafte Zeitrafferaufnahmen von eGFP-mWnt3a-Ansammlungen in Tunnelnanoröhren zwischen transient mit eGFP-mWnt3a und MEM-mCherry transfizierten H1703-Zellen. Zur Erstellung eines Kymographs wurde eine Linie mit einer Breite von 11 Pixeln entlang der Tunnelnanoröhre gezogen und der Mittelwert der Intensität in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt (Abbildung 4.36 (b)). Da

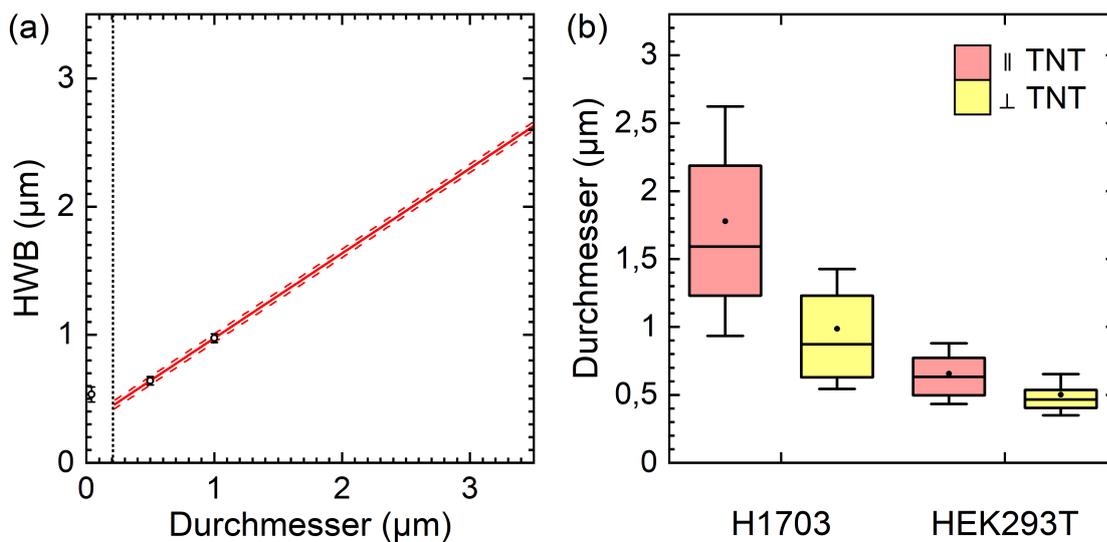


Abbildung 4.35: (a) Reskalierungsgraph zur Bestimmung der Vesikelgröße, erstellt anhand der Messdaten von fluoreszierenden Perlen von $0,5 \mu\text{m}$ und $1 \mu\text{m}$ Durchmesser und begrenzt durch die nach Rayleigh (Gleichung 2.3) theoretisch zu erwartende Auflösung des Mikroskops im grünen Farbkanal bei 208 nm (schwarz gestrichelte Linie). Der HWB der Intensitätsverteilung eines fluoreszierenden Teilchens wird ein Teilchendurchmesser zugeordnet (rote Linie) mit einem Unsicherheitsbereich (rot gestrichelte Linie, StdAbw). (b) Bestimmte Durchmesser der eGFP-Wnt3a-positiven Vesikel parallel und senkrecht zur Tunnelnanoröhre (TNT) in H1703- und HEK293T-Zellen von mindestens 49 Vesikeln pro Boxplot (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: StdAbw, schwarze Linie: Median, schwarzer Punkt: Mittelwert).

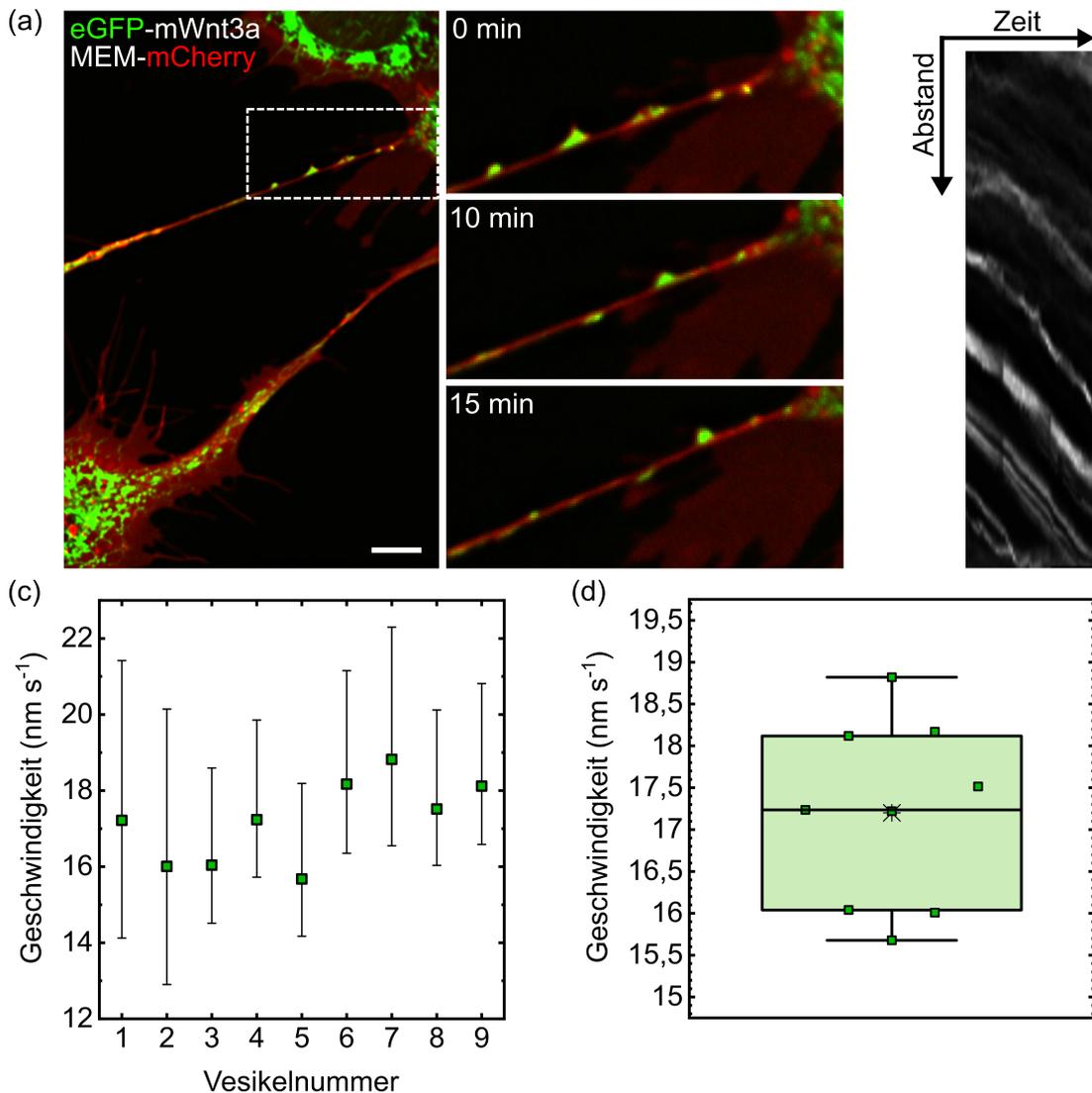


Abbildung 4.36: (a) Beispielhafte Zeitrafferaufnahmen von eGFP-mWnt3a-Ansammlungen in Tunnelnanoröhren zwischen zwei H1703-Zellen (Dekonvoliert, Maßstabsbalken $10 \mu\text{m}$, Zeitangabe in Minuten) und (b) zugehöriger Kymograph des Vesikeltransports. (c) Vesikelgeschwindigkeiten von 9 Vesikeln in H1703-Zellen. (d) Verteilung der Vesikelgeschwindigkeiten (Boxbereich: 25% – 75% Quartile, Whisker: $1,5 \times$ Interquartilabstand, schwarze Linie: Median, schwarzer Stern: Mittelwert).

sich nicht nur die Vesikel in den Filopodien, sondern auch die Filopodien an sich fortbewegen, wurde ein Zeitintervall gewählt, in welchem die Filopodienbewegung minimal war. Dieses wurde anschließend in drei Zeitbereiche eingeteilt, um der dennoch minimal vorliegenden Filopodienbewegung bestmöglich folgen zu können und somit den Einfluss auf die Geschwindigkeitsbestimmung der Vesikel zu minimieren. Aus dem

Kymograph war eine gerichtete Bewegung der Vesikel deutlich erkennbar. Für jedes Vesikel konnte somit, unter Einbezug der Steigung der Linien aller Zeitabschnitte, die mittlere Geschwindigkeit ermittelt werden. Als Gewichtungsfaktor diente die Anzahl der Bilder im jeweiligen Zeitabschnitt. Für die Fehlerabschätzung wurde angenommen, dass zum einen die für den Kymograph gezogene Linie eventuell nicht perfekt auf der Tunnelnanoröhre lag. Hierfür wurde zwischen x_{real} und $x_{\text{gem.}}$ ein maximaler Winkel von 20° angesetzt. Zum anderen wurde berücksichtigt, dass in Fiji trotz korrekter Längenangabe die Pixelzahl im Kymograph aufgerundet und daher, unter Umständen, einen Pixel zu groß angegeben wurde. Da die Linien im Kymograph manuell gezogen wurden, wurde dies ebenfalls als Fehlerquelle mit einbezogen mit einem Fehler von ± 2 Pixel in x-Richtung. Die somit bestimmten Vesikelgeschwindigkeiten der Vesikel aus Abbildung 4.36 (a) sind in Abbildung 4.36 (c) dargestellt. Der daraus resultierende Median betrug $(17,2 \pm 1,0) \text{ nms}^{-1}$ (\pm Hälfte der Boxhöhe, Abbildung 4.36 (d)). Die ermittelte Vesikelgeschwindigkeit fiel im Vergleich zu den in der Literatur berichteten in vivo Geschwindigkeiten von beispielsweise Myosin V-abhängigem Transport mit $1 \mu\text{ms}^{-1}$ [215, 216] relativ langsam aus. Ob Wnt via Myosin V oder anderen Myosin-Varianten wie Myosin X transportiert wird, ist noch nicht geklärt und kann anhand dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden. Anzumerken ist jedoch, dass der Fokus in dieser Arbeit auf den Geschwindigkeiten von großen, deutlich sichtbaren Vesikeln lag, die oftmals durch die relativ dünnen Tunnelnanoröhren eingeengt wurden, was in Abbildung 4.36 (a) gut zu erkennen ist. Dadurch wurde der Vesikeltransport vor allem für große Vesikel in Relation zum Durchmesser der Tunnelnanoröhre womöglich abgebremst, woraus kleinere Vesikelgeschwindigkeiten resultierten. Eine direkte Korrelation zwischen Vesikelgröße und -geschwindigkeit konnte aufgrund mangelnder Statistik und der relativ großen Unsicherheiten der wenigen Messergebnisse nicht bestätigt werden. Zur Bestimmung der Vesikelgeschwindigkeit wurden nur Vesikel berücksichtigt, deren Tunnelnanoröhre während der Messung relativ stabil schien und nicht wesentlich durch die Eigenbewegung der Zelle beeinflusst wurde. Viele Zeitrafferaufnahmen fielen aufgrund der Dynamik lebender Zellen aus dem Raster, was die Anzahl an auswertbaren Zeitrafferaufnahmen reduzierte. Zur Untersuchung der Korrelation zwischen Vesikeldurchmesser und -geschwindigkeit sollte in Zukunft eine größere Messreihe durchgeführt werden.

4.3.3.3. Aktiver Transport und Übergabe der mWnt3a-Vesikel auf benachbarte Zellen

Wesslowski et al. [217] stellten wie Takada et al. [205] ein eGFP-mWnt3a-Konstrukt her, bei welchem jedoch im Vergleich zu dem Konstrukt von Takada et al. der FLAG-Tag fehlt, welcher z. B. zur Proteinaufreinigung verwendet werden kann. Das von überexprimierenden HEK293F-Zellen gewonnene konditionierte Medium wurde von der AG Davidson (IBCS, KIT) für Zelleexperimente zur Verfügung gestellt.

Das in dem Medium enthaltene, aktive eGFP-mWnt3a lagerte sich nach der Zugabe zu LRP6-mCherry exprimierende H1703-Zellen an die Zellmembran an, wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.37 (a) zeigen. Bereits 10 min nach Zugabe des konditionierten Mediums konnte eine deutliche Bindung von eGFP-mWnt3a an die Zellmembran beobachtet werden. Die Bindung war jedoch nicht eindeutig mit der Überexpression von LRP6 korreliert, da auch untransfizierte Zellen diese Bindung aufwiesen, worauf im Weiteren jedoch nicht näher eingegangen wurde. Anzumerken ist, dass die Anlagerungen von eGFP-mWnt3a meist nicht homogen über die Membran verteilt war, sondern nur in einem Teilbereich der Zellmembran, bevorzugt an Membranregionen mit großen Einbuchtungen.

Wird eGFP-mWnt3a nun nicht extern hinzugegeben, sondern von H1703-Zellen zusammen mit MEM-mCherry exprimiert, so konnte eine weitere interzelluläre Transportmöglichkeit beobachtet werden. Die Filopodien der eGFP-mWnt3a überexprimierende Zelle standen im Kontakt mit einer nicht eGFP-mWnt3a exprimierenden Zielzelle. An der Kontaktregion auf der Membran der Zielzelle lagerte sich eGFP-mWnt3a an (Abbildung 4.37 (b)). Abbildung 4.37 (c) zeigt hingegen den Transportprozess von eGFP-mWnt3a-Vesikeln in einer Tunnelnanoröhre, ausgehend von einer mWnt3a-eGFP exprimierenden Zelle zu einer nicht exprimierenden H1703-Zielzelle. Folglich stammten die transportierten eGFP-mWnt3a-Vesikel nicht von der Zielzelle selbst, sondern wurden durch aktiven Transport in Tunnelnanoröhren zur Zielzelle gebracht. Schließlich wurden die eGFP-mWnt3a-Vesikel an der Kontaktregion von der Membran der Zielzelle aufgenommen.

4.3.4. Einzelmolekül-Lokalisation von mWnt3a-Proteinen

Anhand von Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen konnte der interzelluläre Transport von eGFP-mWnt3a-Vesikels in Tunnelnanoröhren nachgewiesen werden. Nähere Informationen wie z. B. die Anzahl der Wnt-Moleküle pro Vesikel konnten aus diesen Daten jedoch nicht gewonnen werden.

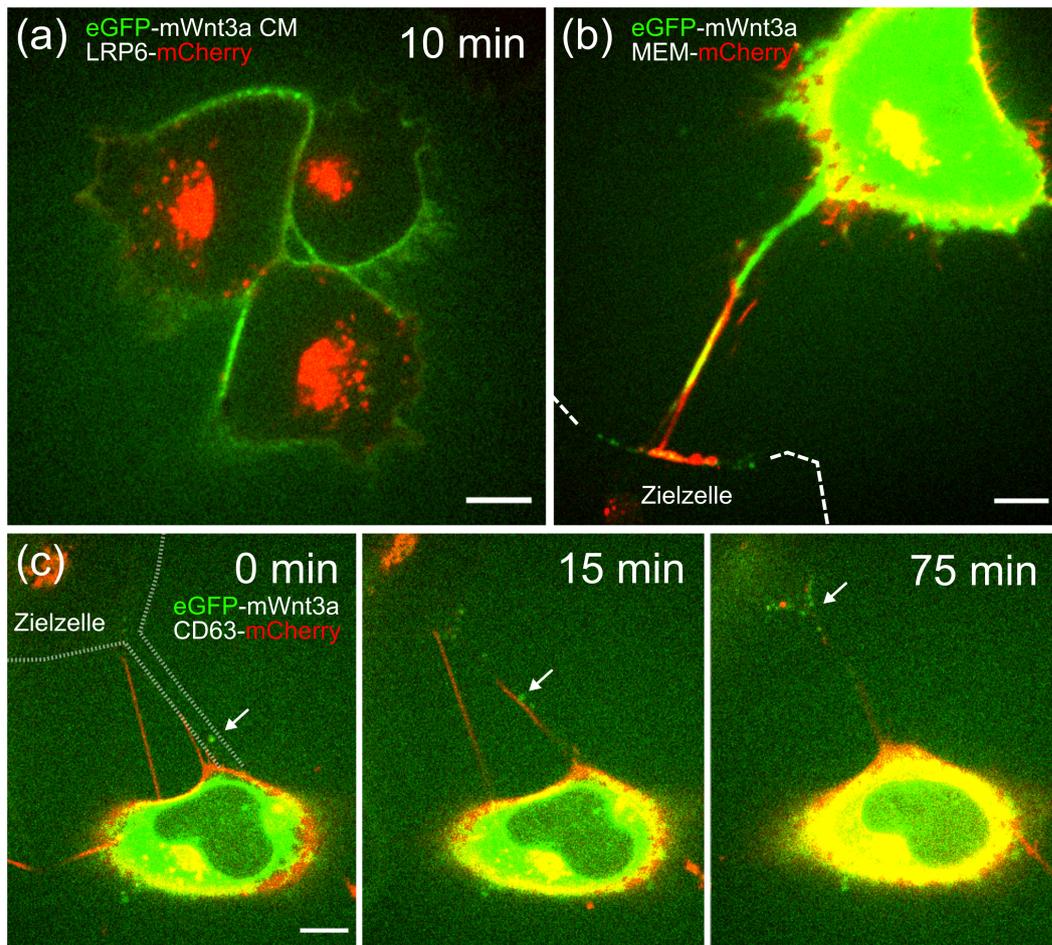


Abbildung 4.37: (a) Anlagerungen von eGFP-mWnt3a an spezifische Membranregionen von LRP6-mCherry stabil exprimierenden H1703-Zellen 10 min nach Zugabe von eGFP-mWnt3a-konditioniertem Medium (KM). Die stabile Zelllinie wurde von der AG Davidson (IBCS, KIT) zur Verfügung gestellt. (b), (c) eGFP-mWnt3a Vesikel werden von einer eGFP-mWnt3a exprimierenden zu einer nicht exprimierenden Zielzelle transportiert und lagern sich an der Kontaktregion an. (c) In den Zeitrafferaufnahmen ist der zur Zielzelle gerichtete Transport von eGFP-mWnt3a Vesikeln entlang einer Tunnelanoröhre erkennbar. Die Membran von H1703-Zellen wurde in (b) und (c) durch die Koexpression von CD63- oder MEM-mCherry markiert. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

Für das Zählen einzelner Wnt-Moleküle müssen Techniken wie die Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopie (Kapitel 3.4) herangezogen werden. Die zu untersuchenden mWnt3a-Proteine wurden für diesen Zweck mit mEosFP*thermo* fluoreszenzmarkiert, indem im eGFP-mWnt3a-Plasmid der fluoreszierende Marker eGFP durch mEosFP*thermo* ersetzt wurde. Zur Markierung der Zellmembran kam wieder ein Fusionskonstrukt

mit MEM zum Einsatz, diesmal jedoch mit mGarnet2 als fluoreszierendes Protein. Für die fluoreszenzmikroskopischen Experimente wurden H1703-Zellen mit beiden Plasmiden transient transfiziert und vor dem Experiment mit 4 % PFA fixiert. Durch die Fixierung der Zellen wurde die aktive Bewegung der Zellen minimiert, wodurch keine Driftkorrektur vonnöten war. Zudem wurde der aktive Transport der Vesikel in den Tunnelnanoröhren verhindert, wodurch Vesikelstrukturen über den Aufnahmezeitraum mehrerer Minuten deutlicher sichtbar waren. Dieser konnte, im Vergleich zu den Aufnahmen am Spinning-Disk-Konfokalmikroskop an lebenden Zellen, in diesen fixierten Zellen nicht mehr beobachtet werden. Die im Folgenden gezeigten Aufnahmen wurden mit einem Einzelmoleküllokalisationsmikroskop analog zu Kapitel 3.4 mit einer Belichtungszeit von 100 ms pro Bild und im Zeitrahmen einiger Minuten aufgenommen.

Abbildung 4.38 zeigt die mit Hilfe der Software a-livePALM [140] ermittelten Lokalisationen der Wnt-Proteine in mEosFP*thermo*-mWnt3a exprimierenden H1703-Zellen. Wnt-reiche Filopodien befanden sich nicht nur auf, sondern auch bis zu 1 μm oberhalb der Probengefäßoberfläche. Je nach Entfernung der Filopodien zur Oberfläche wurde durch Drehung des TIRF-Spiegels entweder im TIRF-Modus (Abbildung 4.38 (a), Eindringtiefe des evaneszenten Felds $\approx 150 - 250 \text{ nm}$ [61]) oder im HILO-Modus (Abbildung 4.38 (b), Eindringtiefe des Anregungslichts $> 250 \text{ nm}$) gearbeitet. Die Anzahl der detektierten mEosFP*thermo*-mWnt3a-Proteine in den dünnen Filopodien bzw. Tunnelnanoröhren und in den gefundenen Vesikeln in Abbildung 4.38 ist in Tabelle 4.11 aufgelistet. Hierbei ist anzumerken, dass im Allgemeinen nicht alle mEosFP*thermo*-Fluorophore erfolgreich maturiert und im photokonvertierbaren Zustand vorliegen. Daher wird die tatsächliche Anzahl von mEosFP*thermo*-mWnt3a höchstwahrscheinlich erheblich unterschätzt. In der Literatur wurden bisher für die Einzelmoleküllokalisationstechnik PALM nur die Effizienzen des Photoaktivierungsprozesses für die mEos-Varianten mEos2 und mEos3.2 publiziert. Diese reichen von etwa $61 \% \pm 2$ für mEos2 bis hin zu $41 \% \pm 4\%$ für mEos3.2 [218]. Da die Effizienz des Photoaktivierungsprozesses explizit für mEosFP*thermo* in diesem Kontext noch nicht bestimmt wurde, kann an dieser Stelle die zu erwartende Effizienz nur grob abgeschätzt werden. mEosFP*thermo* stimmt in seiner Sequenz zwar mit mEos2 in mehr Aminosäuren überein als mit mEos3.2, die Auswirkungen der unterschiedlichen Aminosäuren sind jedoch nicht im Detail bekannt. Daher kann für die Effizienz nur ein grober Richtwert von etwa 50% angenommen werden. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Spinning-Disk-Konfokalmikroskopaufnahmen von mit eGFP-mWnt3a transient transfizierten H1703-Zellen waren in den Einzelmolekül-Aufnahmen von mEosFP*thermo*-mWnt3a

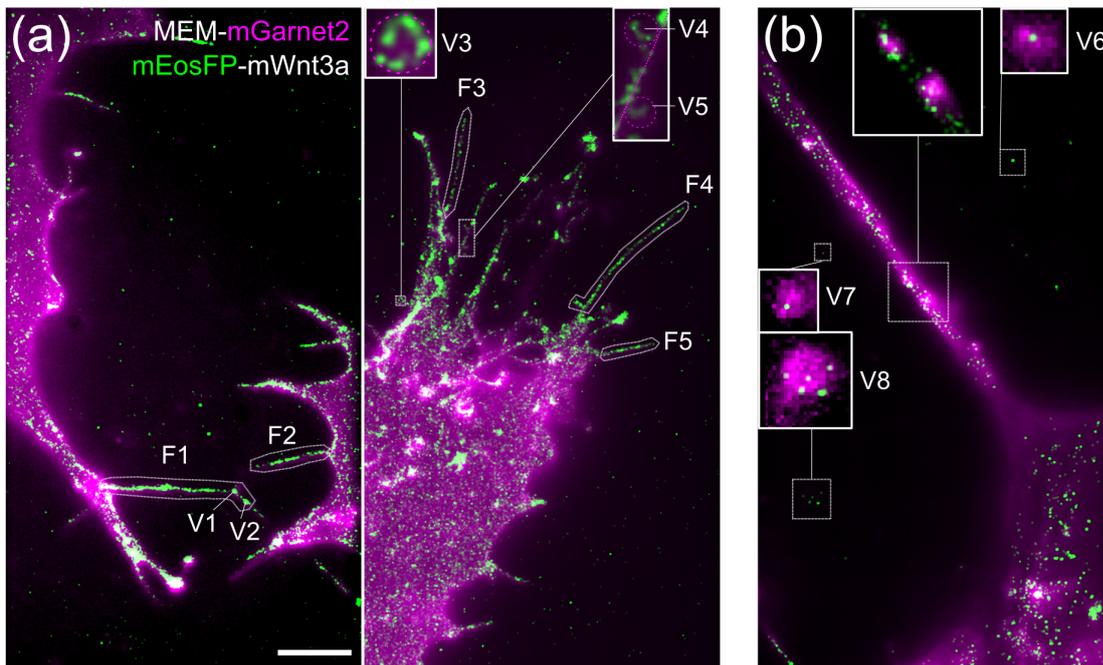


Abbildung 4.38: Lokalisierung von mEosFP*thermo*-mWnt3a in mit MEM-mGarnet2 transient transfizierten und mit 4%PFA fixierten H1703-Zellen. (a) mEosFP*thermo*-mWnt3a befindet sich vermehrt in dünnen Filopodien auf der Glasoberfläche und in Vesikelausbuchtungen sowie in (b) ausgeschütteten Vesikeln („F“: Filopodium, „V“: Vesikel). Der Maßstabsbalken entspricht 5 µm.

klare Vesikelstrukturen seltener anzutreffen. Dies konnte zum einen daran liegen, dass die Zellen zusätzlich fixiert und die Filopodien bzw. Tunnelnanoröhren dadurch negativ beeinflusst wurden. Zum anderen befanden sich die Tunnelnanoröhren mit deutlich sichtbaren eGFP-mWnt3a-Vesikel selten in unmittelbarer Nähe der 8-Kammerdeckglasoberfläche. Sie waren am häufigsten im Bereich von etwa einem Mikrometer oberhalb der Glasoberfläche anzutreffen. In der Nähe der Glasoberfläche schien eGFP-mWnt3a hingegen eher homogen verteilt in Filopodien vorzuliegen. Mittels PALM konnte dies bestätigt werden (Abbildung 4.38 (a)). mEosFP*thermo*-mWnt3a war stark in dünnen Filopodien präsent, die den Zellen zur Adhäsion an der Probenkammeroberfläche dienten. Zudem war mEosFP*thermo*-mWnt3a in kleinen Vesikeln in Zellnähe und an Filopodien zu erkennen. Auch im Zellinneren konnte mEosFP*thermo*-mWnt3a nachgewiesen werden, was durch die zuvor gezeigte Lokalisierung im ER durchaus zu erwarten war. Im HILO-Modus war teilweise eine Kolkalisierung von mEosFP*thermo*-mWnt3a in MEM-mGarnet2-Vesikeln zu sehen. Die Menge an detektierten mWnt3a-Molekülen fiel jedoch im Allgemeinen geringer aus als von den Spinning-Disk-Kon-

fokalmikroskopische Aufnahmen von eGFP-mWnt3a erwartet wurde. Nur wenige Zellen wiesen gute Expressionslevel für beide Fusionsproteine auf. Die Suche nach geeigneten Zellen für SMLM-Experimente war zudem im Vergleich zu den Experimenten mittels Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie deutlich zeitintensiver. Dies lag vor allem daran, dass der Beobachtungsbereich beim Einzelmoleküllokalisationsmikroskop kleiner ausfiel und die Vesikel im Übergangs- und Epifluoreszenzmodus im Vergleich zum Konfokalmodus des Spinning-Disk-Konfokalmikroskops schwieriger zu erkennen waren. Die SMLM-Experimente zur Lokalisierung von mWnt3a in H1703-Zellen wurde zwar bereits an vielen Messtagen durchgeführt, die Probenpräparation und die Fixierung sollten jedoch in Zukunft für weitere Messungen optimiert werden. Dadurch könnte eine größere Statistik an auswertbaren Zellmessungen generiert und dabei die Lokalisierung von mEosFP_{thermo}-mWnt3a detaillierter untersucht werden.

Tabelle 4.11.: Anzahl der detektierten Moleküle pro Filopodium bzw. Vesikel mit Längen- und Querschnittsflächenangabe. Der Fehler auf die Filopodienlänge wurde auf 1% und auf die 2D-Vesikelfläche auf 20% abgeschätzt.

Filopodium	Anzahl der Moleküle	Länge (μm)
F1	506	$10,21 \pm 0,10$
F2	162	$4,87 \pm 0,05$
F3	151	$6,77 \pm 0,07$
F4	306	$10,32 \pm 0,10$
F5	124	$3,55 \pm 0,04$
Vesikel	Anzahl der Moleküle	Querschnittsfläche (μm^2)
V1	33	$0,029 \pm 0,006$
V2	52	$0,029 \pm 0,006$
V3	24	$0,119 \pm 0,02$
V4	4	$0,168 \pm 0,03$
V5	3	$0,141 \pm 0,03$
V6	4	$0,77 \pm 0,15$
V7	2	$0,64 \pm 0,13$
V8	8	$2,2 \pm 0,4$

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Protein-Protein-Interaktionen, die Diffusionseigenschaften und Expressionslevel von fluoreszenzmarkierten Proteinen im Wnt-Signalwegs mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken untersucht.

Im kanonischen Wnt-Signalweg spielt das Level an β -Catenin eine zentrale Rolle. Bei aktivem Wnt-Signalweg erhöht sich die Menge an β -Catenin im Cytosol und Nucleus der Zellen, da die im Abbau von β -Catenin beteiligten Proteine nun in die Formation von Wnt-Signalosomen involviert sind. In vielen Darmkrebszellen liegt β -Catenin mutiert vor, beispielsweise besitzen HCT116-Darmkrebszellen ein Wildtyp-Allel (β -Catenin(WT)) und ein mutiertes Allel von β -Catenin (β -Catenin(Δ 45)), bei der die Aminosäure Serin an der Sequenzstelle 45 fehlt (Δ Ser45). Bei dieser Aminosäure handelt es sich um eine von diversen Phosphorylierungsstellen, die für den Abbau von β -Catenin für die Kinasen CK1 und GSK3 relevant sind.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde anhand von CRISPR/Cas9-geneditierte HCT116-Zellen mittels konventioneller FCS die Auswirkung der allelspezifischen Mutation Ser Δ 45 auf die Konzentration und den Diffusionskoeffizienten sowie auf die Komplexbildung von β -Catenin im Cytosol und Nucleus näher untersucht. Die mutierte Variante von β -Catenin (Allel 1: β -Catenin(Δ 45)-mCherry) lag im Vergleich zur Wildtyp-Variante (Allel 2: β -Catenin(WT)-mClover) nicht nur in höheren Konzentrationen, sondern auch in größeren Komplexen vor, bei denen es sich vermutlich um den β -Catenin-Zerstörungskomplex handelt. Die Stabilisierung von Axin hatte keinen merklichen Einfluss auf beide β -Catenin-Versionen. Dem entgegengesetzt wirkte sich die Inhibition von GSK3 auf die Wildtyp-Version von β -Catenin ähnlich aus wie die Mutation der Phosphorylierungsstelle Ser45. Der Funktionsverlust des Strukturproteins APC führte dazu, dass beide β -Catenin-Varianten in großen Komplexen vorlagen, vergleichbar mit dem Fall der Mutation Ser Δ 45.

Für die Entschlüsselung der Mechanismen des Wnt-Signalwegs ist neben dem Abbau und der Stabilisierung von β -Catenin auch die spezifische Wechselwirkung von Rezeptor- und Ligandenproteinen an der Membran lebender Zellen von zentralem In-

teresse. Während dieser Arbeit wurden konditionierte Medien hergestellt und die Konzentrationen der darin enthaltenen fluoreszenzmarkierten Liganden via FCS und Fluorometermessungen sorgfältig bestimmt. Mittels Einzelpartikelverfolgung wurde durch die Diffusionskoeffizientenverschiebung des Membranrezeptors LRP6-mEosFP^{thermo} nach Zugabe von DKK1-Antikörper-Komplexen die Bindung von DKK1 an LRP6 bestätigt. Danach folgte die Ermittlung der Bindungsstärke von DKK1 an seinen Rezeptor LRP6 anhand von zeitintensiven Bindungskinetikexperimenten. Diese wurde dann mit der Bindungsstärke von DKK1 an xKremen2 in Ab- und Anwesenheit von LRP6 verglichen. Im Anschluss wurden die Bindungsstärken in Abhängigkeit von der LRP6-Rezeptordichte durch axiale Linienraster-FCS-Experimente quantitativ bestimmt. Die LRP6-Rezeptordichte wurde von etwa $1000 \mu\text{m}^{-2}$ (transient transfizierte HEK293T-Zellen) bis hin zu etwa $20 \mu\text{m}^{-2}$ (physiologisches Expressionslevel, CRISPR-Cas9-geneditierte H1703-Zellen) variiert. Besonders bei niedrigen Expressionsleveln stellten die Bindungskinetikexperimente eine große Herausforderung dar. Das Signal-Rausch-Verhältnis fällt im Vergleich zu überexprimierenden Zellen durch die Autofluoreszenz der Probe weitaus kleiner aus, wodurch die Ergebnisse allgemein fehleranfällig sind. Die axiale Linienraster-FCS bot hierfür einen eleganteren Lösungsweg. Mit ihr wurde ein Zusammenhang zwischen dem LRP6-Expressionslevel und der Bindungsaffinität festgestellt: die Bindungsaffinität stieg mit abnehmender Rezeptordichte an. Der Wechsel des Fluorophors für LRP6 zeigte hierbei keine Auswirkung. Der Wechsel des Liganden für LRP6 von DKK1 auf DKK2 zeigte eine geringere Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und Ligand. Die Koexpression von LRP6 und xKremen2 erhöhte die Bindungsaffinität von DKK1 zu xKremen2 im Vergleich zu Experimenten, bei denen lediglich xKremen2 von Zellen überexprimiert wurde. Schließlich wurde gezeigt, dass LRP6 und xKremen2 bereits ohne die Einwirkung von DKK1 an der Zellmembran Heterodimere formen.

Die meist durch Wnt stimulierte Internalisierung von Komplexen aus Rezeptorproteinen ist ein wichtiger Prozess in der Wnt-Signalkaskade. In dieser Arbeit wurde die Clusterbildung und Internalisierung des Rezeptorproteins xRor2 durch die Zugabe seines Liganden Wnt5a in *Xenopus laevis* Explantaten durch Weitfeldmikroskopie in einer Zeitrafferaufnahme aufgezeichnet. Die Clusterbildung und darauffolgende Internalisierung erfolgte im Bereich weniger Minuten.

Ebenfalls von Interesse ist der interzelluläre Transport von Wnt-Proteinen in sogenannten Tunnelnanoröhren, welcher im Detail für mWnt3a in HEK293T- bzw. H1703-Zellen

auf einem Spinning-Disk-Konfokalmikroskop studiert wurde. Die Geschwindigkeiten von eGFP-mWnt3a-Vesikeln wurden in H1703-Zellen durch Kymographanalyse ermittelt. Für die mWnt3a-positiven Vesikel, die in den Zeitrafferaufnahmen in Tunnelnanoröhren transportiert wurden, wurde zudem der Durchmesser parallel und orthogonal zur Tunnelnanoröhre bestimmt. Allgemein fiel der Vesikeldurchmesser parallel zum Filopodium größer aus, wobei H1703-Zellen aufgrund ihrer tendenziell dickeren Tunnelnanoröhren im Schnitt größere Vesikel aufwiesen als HEK293T-Zellen.

Mit Hilfe der Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskopietechnik PALM wurde die Anzahl der mEosFP^{thermo}-mWnt3a-Proteine auf Filopodien bzw. auf Vesikeln bestimmt. Da der interzelluläre Transport von mWnt3a jedoch meist einige hundert Nanometer oberhalb der Probengefäßoberfläche in einem Netzwerk aus Tunnelnanoröhren stattfindet, wäre es sicherlich interessant, diesen Transport zukünftig mit einem Lichtscheibenmikroskop in Kombination mit photokonvertierbaren Proteinen wie mEosFP^{thermo} in 3D näher zu untersuchen. Zudem haben Experimente gezeigt [219], dass Wnt auf Vesikeln die Invasivität von Krebszellen steigert. Welche Vesikelgröße hierbei die treibende Rolle spielt und wie viele Wnt-Proteine pro Vesikel vonnöten sind, um diesen Effekt zu erzielen sollte in künftigen FCS- und SMLM-Experimenten näher untersucht werden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit einige für den Wnt-Signalweg relevante Protein-Protein-Interaktionen u. a. durch die Bestimmung der Expressionslevel, Diffusionskoeffizienten und Bindungsaffinitäten quantifiziert. In diesem Kontext wurde axiale Linienraster-FCS erstmals an lebenden Zellen angewandt. Aufgrund der Vielzahl von Proteinen, die in den Wnt-Signalweg involviert sind, verbleiben zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen noch unerforscht. Es ist eine enorme Herausforderung, die Komplexität dieses Signalwegs zu entschlüsseln und zu verstehen. Weltweit haben sich wissenschaftliche Arbeitsgruppen bereits zusammengeschlossen, um diese Aufgabe gemeinsam zu lösen. Mit dieser Forschung wird schließlich der Weg für die gezielte Entwicklung von Medikamenten oder Therapieansätzen für Krankheiten gelegt, welche auf der Fehlregulierung von Proteinen im Wnt-Signalweg beruhen.

A. Anhang

A.1. Vorgehensweise in der Zellkultur und Probenvorbereitung

A.1.1. Zellkulturmedien

Da jede Zelllinie ein etwas anderes Kulturmedium benötigt, kamen in dieser Arbeit diverse Medien zum Einsatz:

COS-7	DMEM (ohne Phenolrot) + 10 % FBS
HEK293T	DMEM (ohne Phenolrot) + 10 % FBS
HCT116	Mc Coy's 5A (mit Phenolrot) + 10 % FBS (Zellkultur)
	Mc Coy's 5A (ohne Phenolrot) + 10 % FBS (Mikroskopie)
NCI-H1703	RPMI (ohne Phenolrot) + 10 % FBS FBS + 1 % Natriumpyruvat

A.1.2. Protokoll: Fibronectinbeschichtung der Probengefäße

- Vorlegen von 40 µl der Fibronectinlösung in ein Reaktionsgefäß (mind. 2 ml Kapazität)
- Auffüllen auf 1,6 ml PBS
- Mischen der Lösung durch sanftes Hoch- und Runterpipettieren
- Verteilung der Lösung auf alle Kammern (200 µl pro Kammer)

A.1.3. Protokoll: Passagieren der Zellen

- Vorwärmen im Wasserbad bei 37 °C
 - Trypsin
 - PBS
 - Zellkulturmedium
- Überprüfung der Zellgesundheit und Konfluenz am Lichtmikroskop
- Waschen der Zellen mit 3 ml vorgewärmtem PBS, 2x
- Absaugen des PBS bis auf einen kleinen PBS-Film
- Zugabe von 300 µl Trypsin und Inkubation für etwa 1-5 min
- Leichtes Schwenken bis hin zu Klopfen des Zellkulturgefäßes auf den Zellkulturtisch, um die Zellen zu vereinzeln
- Überprüfung der erfolgreichen Vereinzelung am Lichtmikroskop
- Zugabe von 3 ml vorgewärmten Zellmedium und Resuspendierung der Zell-Trypsinlösung
- Beschriftung eines neuen T12.5 Baby-Zellkulturgefäßes (Zelllinie, Passagenummer, Datum)
- Kennzeichnung des Backup-Zellkulturgefäßes (aktuelles Zellkulturgefäß mit Zell-Trypsinlösung)
- Transfer von 150 µl Zell-Trypsinlösung (kann je nach Zelllinie und Konfluenz variieren) in das Baby-Zellkulturgefäß und Auffüllen mit Zellkulturmedium auf etwa 4-5 ml
- Transfer von 15-100 µl Zell-Trypsinlösung (kann je nach Zelllinie und Konfluenz variieren) in je eine Kammer eines 8-Kammerdeckglases und Auffüllen mit Zellkulturmedium auf etwa 300 µl
- Das Zell-Zellmediumgemisch direkt mehrmals hoch- und runterpipettieren, um die Zellen homogen in der Kammer zu verteilen (in allen vier Kammerecken, keine Blasen erzeugen!)

- Überprüfung der gewünschten Konfluenz im Baby-Zellkulturgefäß am Lichtmikroskop
- Zell-Trypsinlösung im Backup-Zellkulturgefäß nach Belieben absaugen und das Zellkulturgefäß mit Zellkulturmedium auf etwa 4-5 ml auffüllen
- Schwenken des Zellkulturgefäßes zur Verteilung der Zellen
- Zurückstellen der Zellgefäße in den Inkubator

A.1.4. Protokoll: Auftauen der Zellen

- Analog zu Protokoll A.1.3
 - Zellkulturmedium vorwärmen
 - Baby-Zellkulturgefäß beschriften
 - Baby-Zellkulturgefäß mit warmen Zellkulturmedium befüllen
 - Zusätzlich ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit etwa 5-10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium befüllen
- Kryogefäß mit Zellen schnellstmöglich im Wasserbad aufwärmen (DMSO ist schädlich für Zellen bei Raumtemperatur!)
- Regelmäßiges, sanftes Schwenken des Kryogefäßes, bis nur noch ein kleiner Eisrest im Innern zu sehen ist
- Großzügiges Einsprühen des Kryogefäßes mit 70% EtOH (Einwirkungszeit beachten!)
- Transfer der Zelllösung in das vorbereitete 50 ml Zentrifugenröhrchen und Mischen der Zellen durch sanftes Hoch- und Runterpipettieren
- Zentrifugenröhrchen zentrifugieren bei etwa 400 g für 5 min
- Überstand vorsichtig absaugen
- Zellen resuspendieren mit etwa 4-5 ml vorgewärmten Zellkulturmedium
- Transfer der Zelllösung in das Baby-Zellkulturgefäß

A.1.5. Protokoll: Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung von Zellen sollte am besten eine große Menge an Zellen zum Einfrieren zur Verfügung stehen. Am besten werden hierfür Zellen in einem größeren Zellkulturgefäß (z. B. T25) kultiviert bis eine hohe Konfluenz erreicht wird. Die Mengenangaben im Protokoll A.1.3 müssen dementsprechend hochskaliert werden. Für ein komplett auf der Oberfläche bewachsenes T25-Zellkulturgefäß kann wie folgt weitergearbeitet werden:

- Beschriftung von 1,5-2 ml Kryogefäßen (Zelllinie, Passagenummer, Datum)
- Vorbereitung des Kryomediums in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen
 - 8,89 ml Zellkulturmedium (10% FBS)
 - 1,11 ml FBS (Endkonzentration 20%)
 - 0,75 ml DMSO (Endkonzentration 5-10%)
- Kaltstellen des Kryomediums auf Eis
- Protokoll A.1.3 befolgen bis einschließlich zur Resuspendierung der Zell-Trypsinlösung
- Zell-Trypsinlösung auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen gleichmäßig aufteilen
- Zentrifugenröhrchen zentrifugieren bei etwa 400 g für 5 min
- Überstand vorsichtig absaugen
- Zellen in den zwei Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml Kryomedium resuspendieren (mehrmals hoch- und runterpipettieren)
- Zell-Kryomediumgemisch gleichmäßig auf die vorbereiteten Kryogefäße verteilen und diese direkt auf Eis stellen
- Kryogefäße über Nacht in einer speziellen Kryobox für Zellen bei -80°C lagern
- Transfer der Kryogefäße in flüssigen Stickstoff für eine Langzeitlagerung

A.1.6. Protokoll: Transfektion der Zellen mit Xfect

Als Transfektionsreagenz wurden zu Beginn Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) und ScreenFect A (ScreenFect GmbH, Eggenstein-Leopoldshafen) getestet, die jedoch zum Teil erhebliche Transfektionsartefakte aufwiesen und oftmals einen schlechten, gesundheitlichen Zustand der Zellen zur Folge hatten. Mit Xfect konnten schließlich die besten Transfektionsergebnisse erzielt werden.

- Analog zu Protokoll A.1.3
 - Vorbereitung eines 8-Kammerdeckglases mit Zellen
 - Warten bis die Zellen größtenteils adhärirt sind (1-24 h. Die Adhäsion muss für die Transfektion noch nicht zwingend komplett abgeschlossen sein.)
- Gewünschtes Plasmid mit dem Reaktionspuffer verdünnen und für 5 s vortexen
- Xfect-Polymer für 10-30 s stark vortexen
- Xfect-Polymer zum Plasmid-Reaktionspuffergemisch hinzugeben und für 10 s vortexen
- Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur
- Zugabe des Gemisches zu den Zellen
- Austausch des Zellmediums 4 h – 6 h nach der Transfektion verbessert die Zellgesundheit beim nachfolgenden Experiment (1-2 Tage danach) erheblich

A.1.7. Protokoll: Herstellung von konditionierten Medien

Im Folgenden wird beispielhaft die Herstellung von DKK1-eGFP-konditioniertem Medium in adhärenenten Zellen aufgezeigt:

- T12.5 Zellkulturgefäß mit HEK293T-Zellen bei etwa 70% Konfluenz
- Transfektion analog zum Transfektionsprotokoll mit Xfect A.1.6
- 3 µg DKK1-eGFP-Plasmid für einen T12.5 Zellkulturgefäß
- Ernte des Mediums am 3. oder 4. Tag nach der Transfektion

Je länger mit der Ernte gewartet wird, desto weniger Nährstoffe enthält das konditionierte Medium. Dies könnte sich negativ auf die Zellen auswirken, die in späteren

Versuchen damit inkubiert werden. Konditionierte Medien sollten nach Herstellung schnellstmöglich verwendet und aufgrund der enthaltenen Fluorophore lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden.

A.2. Protokoll: Probenvorbereitung von fluoreszierenden Perlen

- Als Probengefäß wird ein 8-Kammerdeckglas (Nunc Lab-Tek, VWR) verwendet.
- Zur besseren Haftung der Probe wird Poly-L-Lysin (PLL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit einer Konzentration von $1 \text{ mg}\mu\text{l}^{-1}$ in eine Kammer des 8-Kammerdeckglases gegeben.
- Nach Inkubation für 30 min wird die PLL-Lösung abgesaugt und mit PBS abgespült.
- Im Anschluss werden fluoreszierende Perlen mit Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ und $1 \mu\text{m}$ (TetraSpeck Microspheres, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) mit PBS zu der gewünschten Dichte verdünnt (1:1000 bis 1:10000), in die Kammer gegeben und für 30 min inkubiert.
- Danach wird die Lösung abgesaugt, die Kammer erneut mit PBS abgespült und anschließend mit PBS aufgefüllt.
- Die Probenkammer wird nach der Messung für weitere Messungen in den nächsten Tagen bei 4 °C gelagert.

A.3. Positionierung des Fokusvolumens für FCS-Messungen im Cytosol oder Nukleus von lebenden Zellen

Vor den FCS-Messungen im Cytosol und im Nukleus ist es entscheidend, zu wissen, wo genau sich der Nukleus der Zelle befindet, um das Beobachtungsvolumen optimal zu positionieren. Besonders bei HCT116-Zellen, die im Vergleich zu COS7- und H1703-Zellen eine deutlich geringere Kontaktfläche mit dem Probengefäß und damit auch in ihrer Größe kleiner ausfallen, sind die Zellumrisse auf dem Kamerabild nur schwer zu erkennen. Zudem zeigten Aufnahmen am Spinning-Disk-Konfokalmikroskop (Abbildung 4.2), dass der Nukleus in den geneditierten HCT116-Zellen visuell kaum vom Cytosolbereich abzugrenzen ist. Die Signalintensität war in beiden Farbkämen bis auf einige helle Aggregate nahezu homogen im Zellinneren verteilt. Um die Photobleichung der Fluorophore möglichst zu vermeiden, galt es, die Zellen vor den FCS-Messungen so wenig wie möglich mit den Lasern zu belichten. Dies erschwerte die Positionierung des Laserfokus bei FCS-Experimenten mit HCT116-Zellen und erforderte etwas Geschick und Erfahrung mit dieser Zelllinie. So wurde ein Messablauf entwickelt, mit dem vor der Messung die korrekte Positionierung des Laserfokus überprüft werden konnte (Abbildung A1). Die fluoreszenzmarkierten Proteine diffundieren während einer FCS-Messung im Cytosol weiterhin durch das Zellinnere. Die Membran des Nukleus stellt jedoch eine Barriere für makroskopische Proteine > 40 kDa dar und kann nicht ohne Weiteres passiert werden [220]. Dadurch wurde bei erfolgreicher Position des Laserfokus die Signalintensität im Cytosol gegenüber der Intensität im Nukleus im Verlauf einer Messung deutlich erniedrigt. Im Anschluss wurde der Laserfokus wieder zügig im Nukleusbereich positioniert, um die Bleichung der Fluorophore gering zu halten. Dabei wurde der Bereich des Nukleolus vermieden. Analog war auch hier die Signalintensität im Nukleus nach erfolgreicher Positionierung und Messung verringert. Somit konnte gewährleistet werden, dass im richtigen Bereich der Zelle gemessen wurde.

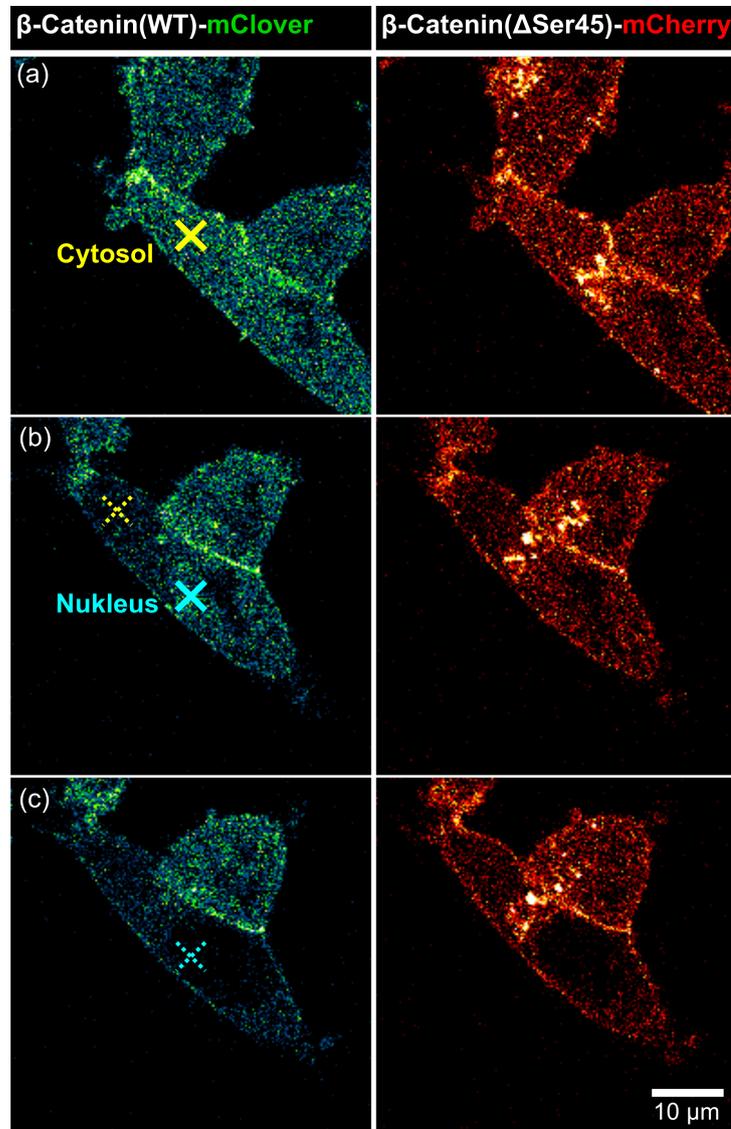


Abbildung A1: Ablauf einer typischen FCS-Messung an den HCT116-Zellen. Positionierung des Laserfokus für die FCS-Messung (a) im Cytosol (gelb) und anschließend (b) im Nukleus (türkis). (c) zeigt das Bleichen des Nukleus nach der Messung.

A.4. Betreute Arbeiten

- Jasmijn Rath, „Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Bestimmung von Konzentrationen und Bindungskonstanten von Rezeptoren und Liganden im Wnt-Signalweg“, *Bachelorarbeit* (2019)
- Trong Hung Michael Dao, „Quantitative Analyse von Wnt3a-Proteinen innerhalb von Filopodien mithilfe der Spinning-Disk-Mikroskopie“, *Bachelorarbeit* (2019)
- Larissa J. Kamps, „Konfrontationsassays und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen im WNT-Signalweg“, *Bachelorarbeit* (2019)

A.5. Liste der Publikationen

- Antonia F. Eckert, Peng Gao, Janine Wesslowski, Xianxian Wang, Jasmijn Rath, Karin Nienhaus, Gary Davidson, G. Ulrich Nienhaus, „Measuring ligand-cell surface receptor affinities with axial line-scanning fluorescence correlation spectroscopy“, *eLife* **9**, e55286 (2020)
- Katharina Puzik, Veronika Tonnier, Isabell Opper, Antonia F. Eckert, Lu Zhou, Marie-Claire Kratzer, Ferdinand le Noble, Gerd U. Nienhaus, Dietmar Gradl, „Lef1 regulates caveolin expression and caveolin dependent endocytosis, a process necessary for Wnt5a/Ror2 signaling during *Xenopus* gastrulation“, *Scientific Reports*, **9**:15645 (2019)
- Lu Zhou, Minoas Evangelinos, Valentin Wernet, Antonia F. Eckert, Yuji Ishitsuka, Reinhard Fischer, G. Ulrich Nienhaus, „Superresolution and pulse-chase imaging reveal the role of vesicle transport in polar growth of fungal cells“, *Science Advances* **4**, 1, e1701798 (2018)
- Gabriela Matela, Peng Gao, Gernot Guigas, Antonia F. Eckert, Karin Nienhaus, G. Ulrich Nienhaus, „A far-red emitting fluorescent marker protein, mGarnet2, for microscopy and STED nanoscopy“, *Chem. Commun.* **53**, pp. 979-982 (2017)
- Giulia Ambrosi, Oksana Voloshanenko, Antonia F. Eckert, Dominique Kranz, G. Ulrich Nienhaus, Michael Boutros, „Allele-specific endogenous tagging and quantitative analysis of β -catenin in colon cancer cells“, *BioRxiv*, preprint (2020)
- Antonia Schubert, Antonia F. Eckert, Gernot Guigas, Matthias Schulz, Alena Ivanova, Oksana Voloshanenko, Dominique Kranz, Karin Nienhaus, G. Ulrich Nienhaus, Claudia Binder, Michael Boutros, „The role of extracellular vesicle-mediated Wnt5a signaling in tumor progression and metastasis“, *unpublished* (2020)
- Alena Ivanova, Antonia F. Eckert, Oksana Voloshanenko, Bojana Pavlovic, Carlo Beretta, Kathrin Glaeser, Jan Winter, Clotilde Thery, Ulrike Engel, G. Ulrich Nienhaus, Phillip Port, Michael Boutros, „LIN7A promotes dispersal of Wnt proteins by inducing cell protrusions“, *unpublished* (2020)

Tabellenverzeichnis

4.1	Dynamik von fluoreszierenden Proteinen in HCT116-Zellen	105
4.2	Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37	107
4.3	Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 nach XAV939-Zugabe	109
4.4	Konzentration und Diffusionskoeffizient von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO nach CHIR99021-Zugabe	117
4.5	Peak-Diffusionskoeffizienten aus den LRP6/DKK1-smDIMSA-Messungen	127
4.6	Ergebnisse der Bindungskinetikexperimente von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry	133
4.7	Ergebnisse der axialen Linienraster-FCS-Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinität von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry	139
4.8	Ergebnisse der axialen Linienraster-FCS-Messungen zur Bindungsaffinität von DKK1-eGFP/LRP6-tdTomato und DKK2-eGFP/LRP6-mCherry	142
4.9	Ergebnisse der axialen Linienraster-FCS-Messungen zur Bindungsaffinität von DKK1-e-GFP und xKremen2-mCherry +/- LRP6	146
4.10	Übersicht der bestimmten xRor2-mCherry Clustergrößen	152
4.11	Anzahl der detektierten Moleküle pro Filopodium bzw. Vesikel mit Längen- und Querschnittsflächenangabe	168

Abbildungsverzeichnis

2.1	Der kanonische Wnt-Signalweg	10
2.2	Vereinfachte Primärstruktur von β -Catenin und der Ablauf des β -Catenin- Abbaus durch den Zerstörungskomplex	12
2.3	DKK als Ligand für LRP6 und Kremen	13
2.4	Einfluss von Wnt5a und Ror2 im nicht-kanonischen Wnt-Signalweg	14
2.5	Interzellulärer Wnt-Transport	16
2.6	Grundlagen für Lichtbrechung und Linsen	18
2.7	Bildgebung durch ein einfaches Mikroskop	19
2.8	Airy-Scheibchen, Punktspreizfunktion und Rayleigh-Limit	21
2.9	Veranschaulichung des Abtasttheorems	24
2.10	Veranschaulichung der Konvolution und Dekonvolution von Bildern	26
2.11	Chemische Strukturen bekannter Fluorophore	28
2.12	Zwei-Zustands-Modell nach Einstein	32
2.13	Jablonski-Termschema	38
2.14	Franck-Condon-Prinzip bei Absorption und Emission	41
2.15	Weitfeld- und Konfokalmikroskopie	43
2.16	Beleuchtungs- und Detektions-PSF eines Konfokalmikroskops	45
2.17	Schematische Darstellung von SMLM	47
2.18	Schematische Darstellung der Lokalisationspräzision und -genauigkeit	49
2.19	Unterschiedliche Beleuchtungsmodi eines Weitfeldmikroskops	51
2.20	Verlauf einer Bindungskurve	53
2.21	Diffusionsmodelle	56
2.22	Grundlagen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	61
2.23	Laterale und axiale Linienraster-FCS an einer Zellmembran	64
3.1	Genetische Werkzeuge zur Expression eines Fusionsproteins	70
3.2	Schematischer Aufbau eines Fluorometers	74
3.3	Schematische Darstellung des Aufbaus eines Spinning-Disk-Konfokal- mikroskops	76

3.4	Aufbau des Einzelmolekül-Lokalisationsmikroskops	78
3.5	Aufbau des axialen Linienraster-FCS-Mikroskops	80
3.6	Schema der gepulsten alternierenden Anregung (PIE)	84
3.7	Ermittlung des Fokusparameters ω_0 durch Multifarbenperlen	85
3.8	Charakterisierung der TAG-Linse	86
3.9	Nichtlinearer Rastervorgang der TAG-Linse	87
3.10	Gegenüberstellung der lateralen und axialen Linienraster-FCS	89
3.11	Konfokalbilder und axiale Linienraster-FCS-Messung an HEK293T-Zellen	90
3.12	Intensitätsverläufe des Fluoreszenzsignals der fluoreszenzmarkierten Zellmembran und des fluoreszierenden Hintergrunds in einer axialen Linienraster-FCS-Messung	92
4.1	Entwurf der CRISPR/Cas9-genmodifizierten HCT116-Zelllinie #37	100
4.2	Bestimmung der allelspezifischen Expressionslevel der fluoreszenzmarkierten β -Catenin-Varianten in den Zelllinien #33, #45 und #37 via Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie	101
4.3	FCS-Referenzproben: Alexa488 und Alexa546 und fluoreszierenden Proteinen in HCT116-Zellen	104
4.4	Kreuzkorrelationsanalyse von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) in der Zelllinie #37	106
4.5	Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37	107
4.6	TopFlash-Assay in HCT116-Zellen: Einfluss von CHIR99021 und XAV939	108
4.7	Einfluss von XAV939 auf die Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37	110
4.8	Einfluss von CHIR99021 auf die Konzentrationen und Diffusionskoeffizienten von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO.	112
4.9	Einfluss von CHIR99021 auf die anhand der Korrelationszeiten umgerechnete Molekülmasse von β -Catenin(WT)/(Δ Ser45) im Cytosol und Nukleus der Zelllinie #37 WT, #37 KD und #37 KO.	115
4.10	Fluoreszenzspektrum von DKK1-eGFP-konditioniertem Medium	121
4.11	FCS-Messung von Alexa488 und DKK1-eGFP-konditioniertem Medium	122

4.12 Western Blot und TopFlash-Assay für DKK1-eGFP- und DKK2-eGFP-konditioniertes Medium	123
4.13 Rekonstruierte Trajektorien für LRP6-mEosFP _{thermo} an der Membran von transfizierten H1703-Zellen	125
4.14 Häufigkeitsverteilung der via smDIMSA bestimmten Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP _{thermo} (Kontrolle)	126
4.15 Häufigkeitsverteilung der via smDIMSA bestimmten Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP _{thermo} unter Einfluss von DKK1-Komplexen unterschiedlicher Molekülmasse	128
4.16 Prozentuale Verschiebung der Peak-Diffusionskoeffizienten von LRP6-mEosFP _{thermo} unter Einfluss von DKK1-Komplexen unterschiedlicher Molekülmasse	129
4.17 Assoziation von DKK1-eGFP an LRP6-mCherry	130
4.18 Intensitätsverläufe bei Assoziation und Dissoziation von DKK1 und LRP6	131
4.19 Zeitkonstante der Dissoziation und Bindungsaffinität von LRP6 und DKK1	132
4.20 Kontrolllexperimente für axiale Linienraster-FCS-Messungen an Zellen	134
4.21 Rezeptordichten von LRP6-mCherry in HEK293T- und H1703-Zellen .	136
4.22 Bindungskurven von DKK1-eGFP und LRP6-mCherry in HEK293T- und H1703-Zellen bei verschiedenen Rezeptordichten	138
4.23 Rezeptordichten und Bindungskurven von LRP6-tdTomato und DKK1-eGFP in H1703-Zellen	140
4.24 Bindungskurve von LRP6 und DKK2	142
4.25 Bindungskinetikexperiment von xKremen2-mCherry und DKK1-eGFP unter Einfluss von LRP6	144
4.26 Rezeptordichten und Bindungskurven von xKremen2-mCherry und DKK1-eGFP +/- LRP6 in H1703-Zellen	145
4.27 Anteil der LRP6-mCherry/xKremen2-eGFP-Heterodimere in H1703-Zellen	147
4.28 Herstellung der <i>Xenopus</i> -Explantate und der Probenkammer	149
4.29 Wnt5a-induzierte Clusterbildung von xRor2-mCherry	151
4.30 Wnt5a-induzierter Internalisierungsprozess von xRor2-Clustern an der Zellmembran	153
4.31 ER-Lokalisierung von eGFP-mWnt3a in HEK293T- und H1703-Zellen	155
4.32 Einfluss von LGK974 auf mWnt3a in H1703-Zellen	157

4.33	Relative Häufigkeit von mWnt3a in dünnen Filopodien in H1703-Zellen unter Einfluss von LGK974	158
4.34	eGFP-mWnt3a-Transport in Tunnelnanoröhren in HEK293T- und H1703-Zellen	159
4.35	Reskalierungsgraph und Durchmesser der eGFP-Wnt3a-positiven Vesikel in H1703- und HEK293T-Zellen	161
4.36	Bestimmung der Geschwindigkeiten von eGFP-mWnt3a-Vesikeln in Tunnelnanoröhren zwischen H1703-Zellen	162
4.37	Anlagerungen von GFP-mWnt3a an Zellmembranen durch konditioniertes Medium oder Tunnelnanoröhrenkontakt	165
4.38	Lokalisierung von mEosFP ^{thermo} -mWnt3a in fixierten H1703-Zellen	167
A1	Ablauf einer typischen FCS-Messung an den HCT116-Zellen	180

Abkürzungen und Fachbegriffe

#33, #37, #45	HCT116 Zelllinien #33 (1. Allel: β -Catenin(WT)-mClover, 2. Allel: β -Catenin(Δ Ser45), #37 (1. Allel: β -Catenin(WT)-mClover, 2. Allel: β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry), #45 (1. Allel: β -Catenin(WT), 2. Allel: β -Catenin(Δ Ser45)-mCherry) 99
β-Catenin	Signalprotein im Wnt-Signalweg 10
$\lambda/2, \lambda/4$	Verzögerungsplättchen 77, 81
ΔSer45	an der 45. Stelle in der Sequenz fehlt die Aminosäure Serin 99
AE	Airy-Einheit 46
AK1, AK2	Primärantikörper, Sekundärantikörper 126
Alexaλ	Farbstoff der Alexa-Farbstofffamilie, Anregungsmaximum bei der Wellenlänge λ 103
Allel	Varianten eines Gens für ein bestimmtes Protein 71
AOTF	engl. <i>acousto-optical tunable filter</i> , akusto-optischer Modulator 77
APC	engl. <i>adenomatous polyposis coli</i> , Strukturprotein, involviert im β -Catenin-Abbau 7
APD	engl. <i>Avalanche-Photodiode</i> , Photonendetektor 44
Apolipoprotein	Bestandteil der hydrophilen Oberfläche von Lipoproteinen wie LDL, HDL 15
Armadillo	sich wiederholende Aminosäuresequenz in β -Catenin 12
Attoλ	Farbstoff der Atto-Farbstofffamilie, Anregungsmaximum bei λ 88
Axin	engl. <i>axis inhibition protein</i> , Strukturprotein, involviert im β -Catenin-Abbau 7
β-Catenin	wichtiges Protein im kanonischen Wnt-Signalweg 7
Blastomer	Furchungszellen 150
BN-PAGE	engl. <i>blue native polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Trennverfahren von Proteinen in einem Gel nach ihrem Molekulargewicht 114

BSA	bovines Serumalbumin, Protein, oftmals verwendet zur hydrophilen Beschichtung von Oberflächen) 148
C-/N-terminal	das Ende eines Proteins mit einer freien Carboxygruppe (COOH) bzw. Aminogruppe (NH ₂) 110
CD63	Membranoberflächenprotein 164
Chaperon	Protein, hilft neu synthetisierten Proteinen bei der korrekten Faltung 155
CHIR99021	GSK3-Inhibitor 110
CHO-K1	engl. <i>Chinese Hamster Ovary</i> , Eierstockzellen des chinesischen Hamsters 104
Chrom. Aberrationen	Chromatische Aberrationen: Abbildungsfehler optischer Linsen durch wellenlängenabhängige, unterschiedlich starke Lichtbrechung 48
CK1	engl. <i>casein kinase 1</i> , phosphorylierende Kinase, involviert im β -Catenin-Abbau 10
Cy5	Cyaninfarbstoff 50
Cytoneme	Filopodienart, fingerartiger (engl. <i>-neme</i>) Zellfortsatz mit Zytoplastenteil (engl. <i>cyto-</i>) 15
(De)konvolution	(Ent)faltung 24
DKK1/2	engl. <i>Dickkopf-related protein 1/2</i> , humanes sekretiertes Protein, Wnt-Inhibitor 11
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel 105
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Nukleinsäure, bestehend aus vier verschiedenen Nukleotiden, welche wiederum aus einem Phosphatrest, einem Zuckerrest und vier Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) bestehen 69
dorsal	rückenwärts 150
DPBS	engl. <i>Dulbecco' phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung 103
DVL	engl. <i>dishevelled</i> , involviert in die Bildung von Signalosomen 11
EGF-Rezeptor	engl. <i>epidermal growth factor receptor</i> , Membranrezeptorprotein 124
EMCCD-Kamera	engl. <i>electron-multiplying charge-coupled device</i> , Kamera 44
EMF	Einzelmodenfaser 81

endogen	im Innern erzeugt 99
Endozytose	Aufnahme von extrazellulären Partikeln und Flüssigkeit durch die Einstülpung der Zellmembran 16
ER	Endoplasmatisches Retikulum, verzweigtes Kanalsystem aus Membranen in einer Zelle 15
Explantat	entnommene Gewebeprobe, hier der animalen Kappe von <i>Xenopus laevis</i> 8
Expression	Synthese von Proteinen 69
FCCS	engl. <i>fluorescence cross-correlation spectroscopy</i> , Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie 66
FCS	engl. <i>fluorescence correlation spectroscopy</i> , Fluoreszenzkorrelationspektroskopie 7
Filopodium	dünnere, fingerartige Zellfortsätze 15
FLAG-Tag	Protein-Tag, kann zur Proteinaufreinigung verwendet werden 164
FLIP-S	Spiegel zum Verstellen der Lichtwegrichtung 77
Fluorophor	fluoreszierender Farbstoff 26
FRAP	engl. <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> , fluoreszenzmikroskopische Methode zur Messung von Diffusionsgeschwindigkeiten 77
Frizzled, Fzd	Membranrezeptorprotein, Wnt-Rezeptor 10
Gastrulation	Phase in der Embryogenese 148
GFP, eGFP	engl. (<i>enhanced</i>) <i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein 27
Golgi	Zellorganelle, vom ER hergestellte Proteine werden hier sortiert und modifiziert, „molekulare Poststelle der Zelle“ 15
GSK3	engl. <i>glycogen synthase kinase</i> , phosphorylierende Kinase, involviert im β -Catenin-Abbau 7
Guide-RNA	weist dem Cas9-Protein den Weg zum Zielgen im Genom 70
H1703	oder NCI-H1703, engl. <i>non-small cell lung cancer cells</i> , Lungenkrebszellen 8
HEK293T/F	engl. <i>human embryonic kidney cells</i> , Zellen der menschlichen, embryonalen Niere, T adhärenente Zellen, F Suspensionszellen 8
HeLa	Zelllinie aus Gebärmutterhalskrebszellen von Henrietta Lacks 104

heterozygot	Nichtübereinstimmung der Allelen bezüglich eines bestimmten Merkmals 133
homozygot	Übereinstimmung der Allelen bezüglich eines bestimmten Merkmals 139
IK	Interkombination 37
IU	innere Umwandlung 37
KD	engl. <i>knock-down</i> , mit shAPC inkubierte HCT116 Zellen 111
KM	konditioniertes Zellmedium 121
KO	engl. <i>knock-out</i> , geneditierte HCT116 Zelllinie mit verkürzter APC-Version 111
Kymograph	Plot des Intensitätsprofils über die Zeit 161
L	Ligand 52
L1/L2/L3/L4	Anregungslaser 77
LED	engl. <i>light-emitting diodes</i> , elektrische Lichtquelle 17
LEFTCF	Transkriptionsfaktoren 11
Li	achromatische Linse 77
LRP6	engl. <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i> , humanes Membranrezeptorprotein 7
Luziferase	Enzym, Bestandteil einiger Nachweissysteme, im Zusammenhang mit Wnt meist als Reportergen verwendet zur Verfolgung der Expression spezifischer Gene 99
Lysat	Überstand einer zentrifugierten Lösung lysierter (aufgelöster) Zellen 122
MBSH	engl. <i>modified Barth's saline with HEPES</i> , Zellkulturmedium 148
mCherry	rot fluoreszierendes Protein 100
mClover	grün fluoreszierendes Protein 100
MEM	N-terminale Sequenz von Neuromodulin, zur Markierung der Zellmembran 133, 159
mEosFPthermo	thermostabile Variante von mEosFP, photokonvertierbares, fluoreszierendes Protein 50
Mesoderm	Zellschicht, entsteht während der Gastrulation 148
mGarnet2	tiefrot fluoreszierendes Protein 78
MMF	Multimodefaser 81

mRNA	engl. <i>messenger RNA</i> , einzelsträngige RNA, komplementär zur Sequenz eines Zielgens, dient als Bauplan zur Proteinsynthese. 69
MVB	engl. <i>multivesicular body</i> , Multivesikularkörper 15
PALM	engl. <i>photoactivated localization microscopy</i> , Einzelmoleküllokalisationsmikroskopietechnik 6
PAM	engl. <i>Protospacer Adjacent Motif</i> , ein Sequenzmotiv (5'-NGG), welches im Zielgen vorhanden sein muss, damit Cas9 andocken kann 71
PCP-Signalweg	engl. <i>planar cell polarity</i> , Teilgebiet des Wnt-Signalwegs 13
PEG	Polyethylenglykol, oftmals verwendet zur Passivierung von Oberflächen 72
PFA	Paraformaldehyd, kurzkettiges Polymer, oftmals verwendet zur Fixierung von Zellen 166
PMT	engl. <i>photomultiplier tube</i> , Photonendetektor 44
PORCN	Enzym und Transmembranprotein des Endoplasmatischen Retikulum, zuständig für die Lipid-Modifizierung von Wnt-Proteinen 15, 155
Proteasom	zählt zu den Proteasen, baut Proteine in Zellen ab 12
PSF	engl. <i>point spread function</i> , Punktspreizfunktion 22
PST	polarisierender Strahlteiler 77
Q	engl. <i>quenching</i> , Fluoreszenzauslöschung 38
QB	Quad-Band-Spiegel 77
R	Rezeptor 52
RP	Referenzprobe 121
RS	auf eine bestimmte Laserwellenlänge abgestimmter, reflektierender Spiegel 77
S	Spiegel 77
Schrotrauschen	ungleiche Verteilung von Photonen, welche gemäß der Poission-Verteilung statistischen Fluktuationen unterworfen sind 48
SDCM	engl. <i>spinning disk confocal microscopy</i> , Spinning-Disk-Konfokalmikroskopie 75
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwert 103, 126

Ser33/37/45	Aminosäure Serin, an der 33., 37. bzw. 45. Stelle in der Sequenz von β -Catenin 11
sFRP	engl. <i>secreted frizzled-related protein 1</i> , Wnt-Hilfsprotein 15
sgAPC	engl. <i>single guide</i> RNA, künstliches RNA-Molekül zur Steuerung der Geneditierung eines Zielgens, hier APC1 110
shAPC	engl. <i>small hairpin</i> RNA, künstliches RNA-Molekül zum Stilllegen des Gens von APC 111
SL	Scanlinse 77, 81
smDIMSA	engl. <i>single-molecule diffusion-mobility-shift assay</i> , Einzelmolekül-Diffusionsmobilitätsverschiebung 7, 119
StAbw	Standardabweichung 136, 140, 145, 161
STED	engl. <i>stimulated emission depletion</i> , Nanoskopietechnik 6, 22
STORM	engl. <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i> , Einzelmolekül-lokalisationsmikroskopietechnik 6
Swim	engl. <i>secreted Wg-interacting molecule</i> , Wnt-Hilfsprotein 15
TAG	engl. <i>tunable acoustic gradient index of refraction lens</i> , adaptives optisches Bauelement 65
Thr41	Aminosäure Threonin, an der 41. Stelle in der Sequenz von β -Catenin 11
TIRF	engl. <i>total internal reflection fluorescence</i> , Interne Totalreflexionsfluoreszenz 51
TIRF-S	Spiegel zum Einstellen des TIRF-Modus 77
TL	Tubuslinse 77
Transfektion	Einschleusen von Fremd-DNA oder -RNA in eine eukaryotische Zelle. Variationen: transient (vorübergehendes Einbringen), stabil (dauerhafter Einbau in das Genom) 69, 103
Transkription	Umschreiben der DNA in mRNA 69
Translation	Übersetzung der Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des herzustellenden Polypeptids 69
V	steuerbarer Verschluss des Lichtwegs 77
Vesikel	bläschenförmige, membranumschlossene Struktur 8
WDM	engl. <i>wavelength-division multiplexer</i> , optisches Bauelement zur Trennung des Lichts nach seiner Wellenlänge 81
Wls	engl. <i>Wntless</i> , Wnt-Hilfsprotein 15

Wntless/Evi	Chaperonprotein, bindet an Wnt und transportiert es vom ER zum Golgi 155
Xenopus xRor2	auch bekannt als <i>Xenopus laevis</i> , Afrikanischer Krallenfrosch 8 engl. <i>tyrosine-protein kinase receptor</i> , Membranrezeptorprotein des <i>Xenopus laevis</i> , Wnt-Rezeptor 8

Formelverzeichnis

A_{21}	Einstinkoeffizient für spontane Emission 33
$A_{g,r,eff}$	Schnittfläche des grünen bzw. roten Fokus mit der Zellmembran, effektive Beobachtungsfläche 64
α	halber objektseitiger Öffnungswinkel, bei dem das Objektiv gerade noch Licht aufsammeln kann oder Anomalieparameter (Diffusion) 57
a	durch den Detektor vorgegebene Pixelgröße 48
b	Rauschsignal pro Pixel 48
B_{21}	Einstinkoeffizient für stimulierte Emission 32
c	Lichtgeschwindigkeit 34
Ca^{2+}	Kalzium-(2+)-Ion 13
d_{CC}	Abstand zwischen zwei Kohlenstoffatomen 35
d_{Obj}	Durchmesser der Eintrittspupille des Objektivs 20
$\Delta x, \Delta t$	Ortsdifferenz, Zeitdifferenz 56
d	Anzahl an Dimensionen 56
d_{min}	minimaler Abstand, bei welchem zwei punktförmige Objekte noch voneinander getrennt dargestellt werden können 21
D	Diffusionskoeffizient 56
\vec{E}	elektrisches Feld 30
E_i	Eigenenergie des Zustands i 30
γ	Euler-Mascheroni-Konstante 57
ΔE_{ij}	Energiedifferenz zwischen zwei Zuständen i und j 31
f	Brennweite 18
$F(t)$	Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Zeit 60
σ	Fluktuationen im molekularen Absorptionsquerschnitt 60
ω_0, z_0	lateraler und axialer Fokusvolumenparameter 60

$\omega_{\text{eff}}, z_{\text{eff}}$	effektiver lateraler und axialer Fokusbereichparameter für Zweifarbbexperimente 67
g_i	Entartungsgrad der Energie bzw. des Zustands i 33
Γ	verallgemeinerter Diffusionskoeffizient 57
τ_D	Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit des zeitlichen Versatzes τ_D 62
h	Plancksches Wirkungsquantum 32
\hat{H}_0	zeitunabhängiger Hamiltonian 30
\hat{H}	zeitabhängiger Hamiltonian 30
h_{Mem}	Membranhöhe 57
HWB_i	PSF-Halbwertsbreite des Mikroskops ($i = \text{Mikr}$) bzw. der gemessenen Probe ($i = \text{Mess}$) 85
I_0	Amplitude der räumlichen Verteilung der Anregungsenergie 60
I_{Anreg}	räumlichen Verteilung der Anregungsenergie 60
k_i	Ratenkoeffizient des Prozesses i , A für Assoziation, D für Dissoziation 52
k_B	Boltzmann-Konstante 33
$C(\vec{r}, t)$	Konzentration an Teilchen in Abhängigkeit von Ort und Zeit 60
L	Länge, z.B. eines Potentialtopfs 35
λ	Wellenlänge des Lichts 21
λ_{char}	charakteristische Länge 58
LR	Ligand-Rezeptor-Komplex 52
l	Anzahl an Schritten nach links für den 1D-„Random Walk“ 56
$\vec{\mu}$	elektrisches Dipolmoment 30
N	Anzahl an Schritten für den 1D-„Random Walk“ 56
NA	numerische Appertur 20
n_i	Brechungsindex von Medium i 18
N_i	Besetzungszahl für den Zustand i 32
N_{total}	Gesamtanzahl an detektierten Photonen 48
$N_{g,r}^{(i)}$	Anzahl an Teilchen (im Zeitbereich i des grünen bzw. roten Farbkanals) 59
ν	Frequenz 32

ω	Kreisfrequenz 31
$OTF(\vec{r})$	optische Transferfunktion 60
p	Wahrscheinlichkeitswert für einen Prozess 55
P_{Det}	Detektionseffizienz von Photonen 60
$Probe$	ursprüngliche Probeninformation 25
P_s	binomiale Wahrscheinlichkeitsverteilung 56
PSF_i	Punktspreizfunktion von i 45
Ψ_i	Wellenfunktion des Zustands i 30
$P(x,t)$	orts- und zeitabhängige Wahrscheinlichkeit 56
Φ	Quantenausbeute 60
\vec{r}	Ortsoperator 30
R_H	hydrodynamischer Radius 57
r	Anzahl an Schritten nach rechts für den 1D-„Random Walk“ 56
$S = \frac{z_0}{\omega_0}$	vereinfachter Fokusvolumenparameter 62
S_i	Zustand im Jablonski-Termschema (Grundzustand $i=0$, 1. angeregter Zustand $i=1$, etc.) 37
σ_{xy}	Lokalisationspräzision in x - und y -Richtung 48
s	Startpunkt beim 1D-„Random Walk“ 56
s	Standardabweichung der angenäherten Verteilung eines einzelnen Photons 48
t	Zeit 30
τ	zeitlicher Versatz 60
τ_D	Korrelationszeit der Teilchendiffusion durch das Beobachtungsvolumen 62
T_{mess}	Gesamtmesszeit 60
$u(\nu)$	spektrale Strahldichte in Abhängigkeit von der Frequenz ν 32
$\hat{V}(t)$	zeitabhängiger Störungsterm 30
V	zeitunabhängiges Potential oder Volumen 35, 60
V_{eff}	effektives Beobachtungsvolumen 62
$V_{3\text{DGau}}(\vec{r})$	Funktion des dreidimensionalen, gaußförmigen Beobachtungsvolumens 60

$\eta(T)$	Viskosität des Mediums in Abhängigkeit von der Temperatur 57
[X]	Konzentration an X 52
R	Zylinderradius 57

Literaturverzeichnis

- [1] Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev Biol.* **20**, 781–810 (2004).
- [2] Sethi, J. K. & Vidal-Puig, A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem. J.* **421**, 1–17 (2010).
- [3] Clevers, H. & Nusse, R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* **149**, 1192–1205 (2012).
- [4] Tai, D. *et al.* Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist* **20**, 1189–1198 (2015).
- [5] Zhan, T., Rindtorff, N. & Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **36**, 1461–1473 (2017).
- [6] Mait, J. N. A history of imaging: Revisiting the past to chart the future. *Opt. Photon. News* **17**, 22–27 (2006).
- [7] Vangindertael, J. *et al.* An introduction to optical super-resolution microscopy for the adventurous biologist. *Methods Appl. Fluoresc.* **6**, 022003 (2018).
- [8] Hooke, R., Allestry, J. & Martyn, J. *Micrographia, or Some Physiological Descriptions of Minute Bodies Made by Magnifying Glasses, with Observations and Inquiries Thereupon* (Printed by Jo. Martyn and Ja. Allestry, London, 1665).
- [9] Schwann, T. *Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und im Wachsthum der Thiere und Pflanzen* (Verlag der Sander'schen Buchhandlung, 1839).
- [10] Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. Mikrosk. Anat.* **9**, 413–418 (1873).
- [11] Shimomura, O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J. Microsc.* **217**, 3–15 (2005).

- [12] Krauss, G. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation* (Wiley, 2014).
- [13] Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 767–779 (2012).
- [14] Ackers, I. & Malgor, R. Interrelationship of canonical and non-canonical wnt signalling pathways in chronic metabolic diseases. *Diab. Vasc. Dis. Res.* **15**, 3–13 (2018).
- [15] Akisik, E. *et al.* Analysis of β -catenin alterations in colon tumors: a novel exon 3 mutation. *Tumor Biol.* **32**, 71–76 (2011).
- [16] Valenta, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of β -catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–2736 (2012).
- [17] Liu, C. *et al.* Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* **108**, 837–847 (2002).
- [18] Amit, S. *et al.* Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* **16**, 1066–1076 (2002).
- [19] Harris, T. J. & Peifer, M. Decisions, decisions: β -catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol.* **15**, 234–237 (2005).
- [20] Zebisch, M. *et al.* Structure of the Dual-Mode Wnt Regulator Kremen1 and Insight into Ternary Complex Formation with LRP6 and Dickkopf. *Structure* **24**, 1599–1605 (2016).
- [21] De, A. Wnt/ Ca^{2+} signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **43**, 745–756 (2011).
- [22] Liu, Y. *et al.* Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J. Cell. Biochem.* **105**, 497–502 (2008).
- [23] Feike, A. C. *et al.* Wnt5a/Ror2-induced upregulation of xPAPC requires xShcA. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **400**, 500–506 (2010).
- [24] Wallkamm, V. *et al.* Live imaging of Xwnt5A-ROR2 complexes. *PLOS ONE* **9**, e109428 (2014).
- [25] Nemeth, M. J. *et al.* Wnt5a inhibits canonical wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *PNAS* **104**, 15436–15441 (2007).

- [26] Nishita, M. *et al.* Cell/tissue-tropic functions of Wnt5a signaling in normal and cancer cells. *Trends Cell Biol.* **20**, 346–354 (2010).
- [27] Asciutti, S. *et al.* Diverse mechanisms of Wnt activation and effects of pathway inhibition on proliferation of human gastric carcinoma cells. *Oncogene* **30**, 956–966 (2011).
- [28] Routledge, D. & Scholpp, S. Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development* **146** (2019).
- [29] Proffitt, K. D. & Virshup, D. M. Precise regulation of porcupine activity is required for physiological Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **287**, 34167–34178 (2012).
- [30] Schwarz, D. S. & Blower, M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**, 79–94 (2016).
- [31] Yu, J. *et al.* WLS Retrograde Transport to the Endoplasmic Reticulum during Wnt Secretion. *Dev. Cell* **29**, 277–291 (2014).
- [32] Moti, N. *et al.* Wnt traffic from endoplasmic reticulum to filopodia. *PLOS ONE* **14**, 1–15 (2019).
- [33] Port, F. & Basler, K. Wnt trafficking: New insights into wnt maturation, secretion and spreading. *Traffic* **11**, 1265–1271 (2010).
- [34] Huang-Doran, I., Zhang, C.-Y. & Vidal-Puig, A. Extracellular Vesicles: Novel Mediators of Cell Communication In Metabolic Disease. *Trends Endocrinol. Metab.* **28**, 3–18 (2017).
- [35] Simpson, R. J., Jensen, S. S. & Lim, J. W. E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. *Proteomics* **8**, 4083–4099 (2008).
- [36] Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
- [37] Gross, J. C. *et al.* Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1036–1045 (2012).
- [38] Cocucci, E., Racchetti, G. & Meldolesi, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* **19**, 43–51 (2009).

- [39] Neumann, S. *et al.* Mammalian wnt3a is released on lipoprotein particles. *Traffic* **10**, 334–343 (2009).
- [40] Uren, A. *et al.* Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to wingless and is a biphasic modulator of wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, 4374–82 (2000).
- [41] Galli, L. *et al.* Differential inhibition of wnt-3a by sfrp-1, sfrp-2, and sfrp-3. *Dev. Dyn.* **235**, 681–690 (2006).
- [42] Mulligan, K. A. *et al.* Secreted wingless-interacting molecule (swim) promotes long-range signaling by maintaining wingless solubility. *PNAS* **109**, 370–377 (2012).
- [43] Stanganello, E. *et al.* Filopodia-based Wnt transport during vertebrate tissue patterning. *Nat. Commun.* **6**, 5846 (2015).
- [44] Ramírez-Weber, F.-A. & Kornberg, T. B. Cytonemes: Cellular Processes that Project to the Principal Signaling Center in Drosophila Imaginal Discs. *Cell* **97**, 599–607 (1999).
- [45] González-Méndez, L., Gradilla, A.-C. & Guerrero, I. The cytoneme connection: direct long-distance signal transfer during development. *Development* **146** (2019).
- [46] Mattes, B. & Scholpp, S. Emerging role of contact-mediated cell communication in tissue development and diseases. *Histochem. Cell Biol.* **150**, 431–442 (2018).
- [47] Heusermann, W. *et al.* Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the er. *J. Cell Biol.* **213**, 173–184 (2016).
- [48] Mazzarello, P. A unifying concept: the history of cell theory. *Nat. Cell Biol.* **1**, E13–E15 (1999).
- [49] Leeuwenhoek, A. v. & Dobell, C. *Antony van Leeuwenhoek and his little animals": being some account of the father of protozoology and bacteriology and his multifarious discoveries in these disciplines / collected, translated and edited ... by Clifford Dobell* (New York, Harcourt, Brace and company, 1932).
- [50] Karamanou, M. I. *et al.* Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micro-morphology and discoverer of spermatozoa. *Rev. Argent. Microbiol.* **42** **4**, 311–4 (2010).

-
- [51] Hell, S. W. Far-Field Optical Nanoscopy. *Science* **316**, 1153–1158 (2007).
- [52] Rayleigh, L. On the Theory of Optical Images, with Special Reference to the Microscope. *J. R. Micr. Soc.* **23**, 447–473 (1903).
- [53] Shannon, C. Communication in the presence of noise. *Proc. IEEE* **86**, 447–457 (1998).
- [54] Wallace, W., Schaefer, L. H. & Swedlow, J. R. A Workingperson's Guide to Deconvolution in Light Microscopy. *BioTechniques* **31**, 1076–1097 (2001).
- [55] Sarder, P. & Nehorai, A. Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images. *IEEE Signal Process. Mag.* **23**, 32–45 (2006).
- [56] Richardson, W. H. Bayesian-Based Iterative Method of Image Restoration*. *J. Opt. Soc. Am.* **62**, 55–59 (1972).
- [57] Lucy, L. An iterative technique for the rectification of observed distributions. *Astron. J.* **79**, 745–754 (1974).
- [58] Biggs, D. S. 3D Deconvolution Microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* **52**, 12.19.1–12.19.20 (2010).
- [59] Biggs, D. S. C. & Andrews, M. Acceleration of iterative image restoration algorithms. *Appl. Opt.* **36**, 1766–1775 (1997).
- [60] Masters, B. R. *The Development of Fluorescence Microscopy* (American Cancer Society, 2010).
- [61] Yeh, Y., Fore, S. & Wu, H. *Fundamental Concepts in Biophysics*, 1–48 (Humana Press, 2009).
- [62] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer, Boston, MA, 2006), 3. Aufl.
- [63] Specht, E. A., Braselmann, E. & Palmer, A. E. A Critical and Comparative Review of Fluorescent Tools for Live-Cell Imaging. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 93–117 (2017).
- [64] Sabnis, R. W. *Handbook of Fluorescent Dyes and Probes*, 71–76 (John Wiley & Sons Inc, 2015).
- [65] Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].

- [66] Nienhaus, K. *et al.* Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *PNAS* **102**, 9156–9159 (2005).
- [67] The Nobel Prize in Chemistry 2008. URL <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/1>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [68] Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38 (1996).
- [69] Zhang, G., Gurtu, V. & Kain, S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **227**, 707 – 711 (1996).
- [70] Einstein, A. Zur Quantentheorie der Strahlung. *Mittl. Phys. Gesell. Zürich* **18**, 47–62 (1916).
- [71] Jeans, J. H. On the partition of energy between matter and Æther. *Phil. Mag. Ser. 6* **10**, 91–98 (1905).
- [72] Planck, M. Über das Gesetz der Energieverteilung im Normalspectrum. *Ann. Phys.* **309**, 553–563 (1901).
- [73] Arnold, S. *Chemical Physics Research Trends. Horizons in world physics* (Nova Science Publishers, 2007).
- [74] Spectrum [Alexa Fluor 488]. https://www.aatbio.com/spectrum/Alexa_Fluor_488 (2019). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [75] Jablonski, A. Efficiency of anti-stokes fluorescence in dyes. *Nature* **131**, 839–840 (1933).
- [76] Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy, Kap. Fluorescence* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015).
- [77] Levitus, M. In Markus Sauer, J. H. & Enderlein, J. (Herausgeber) *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging. From Ensemble to Single Molecules*, Kap. Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy (Wiley-VCH, 2011).
- [78] Stokes, G. G. XXX. on the change of refrangibility of light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **142**, 463–562 (1852).
- [79] Sackmann, E. & Merkel, R. *Lehrbuch der Biophysik* (Wiley VCH Verlag GmbH, 2020).

- [80] Born, M. & Oppenheimer, R. Zur Quantentheorie der Molekeln. *Ann. Phys.* **389**, 457–484 (1927).
- [81] Townsend, T. *Electronic Spectroscopy: Interpretation*. URL [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Interpretation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy%3A_Interpretation). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [82] Stephens, D. J. & Allan, V. J. Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* **300**, 82–86 (2003).
- [83] Perkel, J. M. *Finding the right tool for the job - Confocal vs. widefield vs. deconvolution* (AAAS, 2015).
- [84] iXon EMCCD Cameras. <https://andor.oxinst.com/products/ixon-emccd-cameras>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [85] Minsky, M. *Microscopy apparatus* (1961). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [86] Birk, U. J. *Super-Resolution Microscopy - A Practical Guide*, Kap. Structured Illumination and Image Scanning Microscopy (Wiley-VCH, 2017).
- [87] Wilhelm, S. *et al.* Confocal Laser Scanning Microscopy Principles. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/referencelibrary/pdfs/ZeissConfocalPrinciples.pdf> (2003). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [88] Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).
- [89] Hemmer, P. & Zapata, T. The universal scaling laws that determine the achievable resolution in different schemes for super-resolution imaging. *J. Opt.* **14** (2012).
- [90] Deschout, H. *et al.* Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **11**, 253–266 (2014).
- [91] Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes. *Biophys. J.* **82**, 2775–2783 (2002).
- [92] Hess, S. T. *et al.* *Ultrahigh Resolution Imaging of Biomolecules by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*, 483–522 (Humana Press, 2009).

- [93] Bates, M. *et al.* Multicolor Super-Resolution Imaging with Photo-Switchable Fluorescent Probes. *Science* **317**, 1749–1753 (2007).
- [94] Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793–796 (2006).
- [95] Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1088–1106 (2014).
- [96] Wiedenmann, J. *et al.* From EosFP to mIrisFP: Structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family. *J. Biophotonics* **4**, 377–90 (2011).
- [97] Tokunaga, M., Imamoto, N. & Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods* **5**, 159–161 (2008).
- [98] Kuriyan, J., Konforti, B. & Wemmer, D. *The Molecules of Life: Physical and Chemical Principles* (Taylor & Francis Group, 2012).
- [99] Ehlert, F. J. *Affinity And Efficacy: The Components Of Drug-receptor Interactions*. Advanced Series on Ocean Engineering (World Scientific Publishing Company, 2014).
- [100] Keserü, G. *et al.* *Thermodynamics and Kinetics of Drug Binding*. Methods and Principles in Medicinal Chemistry (Wiley, 2015).
- [101] Einstein, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Ann. Phys.* **322**, 549–560 (1905).
- [102] Saffman, P. G. & Delbrück, M. Brownian motion in biological membranes. *PNAS* **72**, 3111–3113 (1975).
- [103] Venable, R. M. *et al.* Lipid and Peptide Diffusion in Bilayers: The Saffman-Delbrück Model and Periodic Boundary Conditions. *J. Phys. Chem. B* **121**, 3443–3457 (2017).
- [104] Feder, T. J. *et al.* Constrained diffusion or immobile fraction on cell surfaces: a new interpretation. *Biophys. J.* **70**, 2767–2773 (1996).

- [105] Ramadurai, S. *et al.* Lateral diffusion of membrane proteins. *JACS* **131**, 12650–12656 (2009).
- [106] Gambin, Y. *et al.* Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited. *PNAS* **103**, 2098–2102 (2006).
- [107] Guigas, G. & Weiss, M. Influence of hydrophobic mismatching on membrane protein diffusion. *Biophys. J.* **95**, L25–L27 (2008).
- [108] Hughes, B. D., Pailthorpe, B. A. & White, L. R. The translational and rotational drag on a cylinder moving in a membrane. *J. Fluid Mech.* **110**, 349–372 (1981).
- [109] Magde, D., Elson, E. & Webb, W. W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705–708 (1972).
- [110] Elson, E. L. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophys. J.* **101**, 2855–2870 (2011).
- [111] Hermann, E., Ries, J. & García-Sáez, A. J. Scanning fluorescence correlation spectroscopy on biomembranes. *Methods Mol. Biol.* **1232**, 181–197 (2015).
- [112] Schwille, P. & Haustein, E. Fluorescence Correlation Spectroscopy - An Introduction to its Concepts and Applications. *Spectroscopy* **94(22)** (2001).
- [113] Krieger, J., Tóth, K. & Langowski, J. Practical Course Biophysics: Fluorescence Correlation Spectroscopy (2013). URL <https://pdfs.semanticscholar.org/9b61/82124d1770c1b2de9e7ab3ddadc6f1c09b41.pdf>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [114] Petrov, E. & Schwille, P. *State of the Art and Novel Trends in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Bd. 6, 145–197 (2007).
- [115] Petersen, N. O. Scanning fluorescence correlation spectroscopy. I. Theory and simulation of aggregation measurements. *Biophys. J.* **49**, 809–815 (1986).
- [116] Ries, J. & Schwille, P. Studying slow membrane dynamics with continuous wave scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **91**, 1915–1924 (2006).
- [117] Fricke, H. The electric capacity of suspensions with special reference to blood. *J. Gen. Physiol.* **9**, 137–152 (1925).

- [118] Robertson, J. L. The lipid bilayer membrane and its protein constituents. *J. Gen. Physiol.* **150**, 1472–1483 (2018).
- [119] Arnold, C. & McLeod, E. A new approach to adaptive optics for materials processing. *OPTICAL SPECTRA* **41**, 78–80+82–84 (2007).
- [120] McLeod, E., Hopkins, A. B. & Arnold, C. B. Multiscale Bessel beams generated by a tunable acoustic gradient index of refraction lens. *Opt. Lett.* **31**, 3155–3157 (2006).
- [121] McLeod, E. & Arnold, C. Mechanics and refractive power optimization of tunable acoustic gradient lenses. *J. Appl. Phys.* **102** (2007).
- [122] Bacia, K., Kim, S. A. & Schwille, P. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods* **3**, 83–89 (2006).
- [123] Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. & Rigler, R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* **72**, 1878–1886 (1997).
- [124] Ries, J. & Schwille, P. New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 3487–3497 (2008).
- [125] Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1357–1369 (2013).
- [126] Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C. A. The next generation of crispr-cas technologies and applications. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 490–507 (2019).
- [127] Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and applications of crispr-cas9 for genome engineering. *Cell* **157**, 1262 – 1278 (2014).
- [128] Suzuki, K. *et al.* In vivo genome editing via crispr/cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* **540**, 144–149 (2016).
- [129] Wang, J. *et al.* Homology-driven genome editing in hematopoietic stem and progenitor cells using zfn mrna and aav6 donors. *Nat. Biotechnol.* **33**, 1256–1263 (2015).
- [130] Koch, B. *et al.* Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells using crispr-cas9 genome editing. *Nat. Protoc.* **13**, 1465–1487 (2018).

- [131] Inc., T. B. Xfect Transfection Reagent Protocol-At-A-Glance. https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Xfect%20Transfection%20Reagent%20Protocol-At-A-Glance_103012.pdf. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [132] Diao, J. *et al.* A single vesicle-vesicle fusion assay for in vitro studies of snares and accessory proteins. *Nat. Protoc.* **7**, 921–934 (2012).
- [133] Molenaar, M. *et al.* XTcf-3 Transcription Factor Mediates β -Catenin-Induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell* **86**, 391–399 (1996).
- [134] Smale, S. T. Luciferase Assay. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb.prot5421 (2010).
- [135] Western Blotting: A Guide to Current Methods. https://www.sciencemag.org/sites/default/files/custom-publishing/documents/Western_Blotting_ScienceGE2booklet_MedRes_9june15.pdf (2015). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [136] Konfokale Spinning Disk (Rotationsscheibe). <https://www.yokogawa.com/de/solutions/products-platforms/life-science/spinning-disk-confocal/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [137] Konfokales Scanning-System CSU-X1. <https://www.yokogawa.com/de/solutions/products-platforms/life-science/spinning-disk-confocal/csu-x1-confocal-scanner-unit/#Overview>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [138] Zhou, L. *Localization Microscopy Based Super-resolution Imaging and Analysis of Dynamics*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (2018).
- [139] mGarnet2. <https://www.fpbases.org/protein/mgarnet2/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [140] Li, Y. *et al.* Fast and Efficient Molecule Detection in Localization-Based Super-Resolution Microscopy by Parallel Adaptive Histogram Equalization. *ACS Nano* **7**, 5207–5214 (2013).
- [141] Hedde, P. N. *Light Microscopy Beyond the Diffraction Barrier for Live Cell Studies*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (2013).
- [142] Gao, P. *et al.* Background suppression in fluorescence nanoscopy with stimulated emission double depletion. *Nat. Photon.* **11**, 163–169 (2017).

- [143] Eckert, A. F. *et al.* Measuring ligand-cell surface receptor affinities with axial line-scanning fluorescence correlation spectroscopy. *eLife* **9**, e55286 (2020).
- [144] Zheng, J. *et al.* Dual-mode phase and fluorescence imaging with a confocal laser scanning microscope. *Opt. Lett.* **43**, 5689–5692 (2018).
- [145] Müller, B. K. *et al.* Pulsed interleaved excitation. *Biophys. J.* **89**, 3508–3522 (2005).
- [146] García-Sáez, A. J., Carrer, D. C. & Schwille, P. *Fluorescence Correlation Spectroscopy for the Study of Membrane Dynamics and Organization in Giant Unilamellar Vesicles*, 493–508 (Humana Press, Totowa, NJ, 2010).
- [147] Dörlich, R. M. *et al.* Dual-color dual-focus line-scanning FCS for quantitative analysis of receptor-ligand interactions in living specimens. *Sci. Rep.* **5**, 10149–10149 (2015).
- [148] Prunsche, B. J. *Höchstaufgelöste optische Nanoskopie und Fluktuationsspektroskopie zur Untersuchung biophysikalischer Prozesse*. Dissertation, Karlsruher Institut für Technologie (2018).
- [149] Sniegowski, J. *et al.* Base catalysis of chromophore formation in arg(96) and glu(222) variants of green fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* **280**, 26248–55 (2005).
- [150] Ulbrich, M. & Isacoff, E. Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* **4**, 319–21 (2007).
- [151] Foo, Y. H. *et al.* Factors affecting the quantification of biomolecular interactions by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **102**, 1174–83 (2012).
- [152] Foo, Y. H., Korzh, V. & Wohland, T. *Fluorescence Correlation and Cross-Correlation Spectroscopy Using Fluorescent Proteins for Measurements of Biomolecular Processes in Living Organisms*, 213–248 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
- [153] Ambrosi, G. *et al.* Allele-specific endogenous tagging and quantitative analysis of beta-catenin in colorectal cancer cells. *bioRxiv* 2020.06.18.159616 (2020).
- [154] da Costa, L. T. *et al.* CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/b-catenin signaling. *Oncogene* **18**, 5010–5014 (1999).
- [155] Scott, J. A. & Yap, A. S. Cinderella no longer: α -catenin steps out of cadherin's shadow. *J. Cell. Sci.* **119**, 4599–4605 (2006).

- [156] Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
- [157] mClover. <https://www.fpbase.org/protein/mclover3/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [158] mCherry. <https://www.fpbase.org/protein/mcherry/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [159] Petrásek, Z. & Schwille, P. Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **94**, 1437–48 (2008).
- [160] eGFP. <https://www.fpbase.org/protein/egfp/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [161] The National Center for Biotechnology Information. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/25164103#section=Computed-Properties> (2010). [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [162] Dayel, M. J., Hom, E. F. & Verkman, A. Diffusion of Green Fluorescent Protein in the Aqueous-Phase Lumen of Endoplasmic Reticulum. *Biophys. J.* **76**, 2843–2851 (1999).
- [163] Chen, Y. *et al.* Molecular Brightness Characterization of EGFP In Vivo by Fluorescence Fluctuation Spectroscopy. *Biophys. J.* **82**, 133–144 (2002).
- [164] Huang, S.-M. A. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614–620 (2009).
- [165] Kim, Y. E. *et al.* Quantitative Proteomic Analysis of 2D and 3D Cultured Colorectal Cancer Cells: Profiling of Tankyrase Inhibitor XAV939-Induced Proteome. *Sci. Rep.* **8**, 13255 (2018).
- [166] Lau, T. *et al.* A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res.* **73**, 3132–3144 (2013).
- [167] Metcalfe, C. & Bienz, M. Inhibition of GSK3 by Wnt signalling – two contrasting models. *J. Cell. Sci.* **124**, 3537–3544 (2011).
- [168] Tejeda-Muñoz, N. & Robles-Flores, M. Glycogen synthase kinase 3 in Wnt signalling pathway and cancer. *IUBMB Life* **67**, 914–922 (2015).

- [169] de la Roche, M. *et al.* LEF1 and B9L Shield b-Catenin from Inactivation by Axin, Desensitizing Colorectal Cancer Cells to Tankyrase Inhibitors. *Cancer Res.* **74**, 1495 (2014).
- [170] Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Lessons from Hereditary Colorectal Cancer. *Cell* **87**, 159–170 (1996).
- [171] Kwong, L. N. & Dove, W. F. APC and its modifiers in colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **656**, 85–106 (2009).
- [172] Gerlach, J. P. *et al.* Wnt signalling induces accumulation of phosphorylated β -catenin in two distinct cytosolic complexes. *Open Biol.* **4**, 140120–140120 (2014).
- [173] Molekulargewicht von CK1 α . https://www.novusbio.com/products/cas-sein-kinase-1-alpha-antibody_nbp1-18880?utm_source=biocompare&utm_medium=referral&utm_term=primaryantibodies&utm_campaign=product_NBP1-18880&utm_content=editorial/. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [174] Pronobis, M. I., Rusan, N. M. & Peifer, M. A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient bcatenin destruction. *eLife* **4**, e08022–e08022 (2015).
- [175] Schaefer, K. N. *et al.* Supramolecular assembly of the beta-catenin destruction complex and the effect of Wnt signaling on its localization, molecular size, and activity in vivo. *PLOS Gen.* **14**, e1007339–e1007339 (2018).
- [176] A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [177] Schneikert, J., Grohmann, A. & Behrens, J. Truncated APC regulates the transcriptional activity of β -catenin in a cell cycle dependent manner. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 199–209 (2006).
- [178] Pronobis, M. I., Rusan, N. M. & Peifer, M. A novel GSK3-regulated APC:Axin interaction regulates Wnt signaling by driving a catalytic cycle of efficient bcatenin destruction. *eLife* **4**, e08022–e08022 (2015).
- [179] Lalonde, S. *et al.* Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *Plant J.* **53**, 610–635 (2008).

- [180] Kim, D.-H. *et al.* Analysis of interactions between the epidermal growth factor receptor and soluble ligands on the basis of single-molecule diffusivity in the membrane of living cells. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 7028–7032 (2015).
- [181] Yasuda, R. *et al.* Supersensitive Ras activation in dendrites and spines revealed by two-photon fluorescence lifetime imaging. *Nat. Neurosci.* **9**, 283–291 (2006).
- [182] Maeder, C. I. *et al.* Spatial regulation of fus3 map kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nature Cell Biology* **9**, 1319–1326 (2007).
- [183] Yasuda, R. *et al.* Supersensitive ras activation in dendrites and spines revealed by two-photon fluorescence lifetime imaging. *Nature Neuroscience* **9**, 283–291 (2006).
- [184] Macdonald, P. J., Chen, Y. & Mueller, J. D. Chromophore maturation and fluorescence fluctuation spectroscopy of fluorescent proteins in a cell-free expression system. *Anal. Biochem.* **421**, 291–298 (2012).
- [185] Goedhart, J. Fluorescent Proteins 101: When GFP lets you down. <https://blog.addgene.org/when-gfp-lets-you-down>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [186] Komatsubara, A. *et al.* Single-cell quantification of the concentrations and dissociation constants of endogenous proteins. *J. Biol. Chem.* **294**, jbc.RA119.007685 (2019).
- [187] Nienhaus, G. U. *et al.* Photoconvertible fluorescent protein eosfp: Biophysical properties and cell biology applications. *Photochem. Photobiol.* **82**, 351–358 (2006).
- [188] Bruno, J. G. Strategies for maximizing fluorescence detection sensitivity in the red region of urine and serum. *J. Bionanosci.* **8**, 122–126 (2014).
- [189] Choi, H.-J. *et al.* The Wnt pathway and the roles for its antagonists, DKKS, in angiogenesis. *IUBMB Life* **64**, 724–731 (2012).
- [190] Xiao, Q. *et al.* Dkk2 imparts tumor immunity evasion through β -catenin-independent suppression of cytotoxic immune-cell activation. *Nat. Med.* **24**, 262–270 (2018).
- [191] Mao, B. *et al.* LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321–325 (2001).

- [192] Nakamura, R. E. I. & Hackam, A. S. Analysis of dickkopf3 interactions with wnt signaling receptors. *Growth Factors* **28**, 232–242 (2010).
- [193] Wang, X.-Q. *et al.* Epidermal growth factor receptor glycosylation is required for ganglioside GM3 binding and GM3-mediated suppression of activation. *Glycobiology* **11**, 515–522 (2001).
- [194] Matoba, K. *et al.* Conformational Freedom of the LRP6 Ectodomain Is Regulated by N-glycosylation and the Binding of the Wnt Antagonist Dkk1. *Cell Rep.* **18**, 32–40 (2017).
- [195] Niehrs, C. Function and biological roles of the dickkopf family of wnt modulators. *Oncogene* **25**, 7469–7481 (2006).
- [196] anti-Immunglobulin G (IgG) sekundäre Antikörper. <https://www.antikoerper-online.de/resources/16/675/anti-immunglobulin-g-igg-sekundaere-antikoerper/>. [Letzter Zugriff am 10.01.2020].
- [197] Geisse, S. & Henke, M. Large-scale transient transfection of mammalian cells: A newly emerging attractive option for recombinant protein production. *J. Struct. Funct. Genomics* **6**, 165–70 (2005).
- [198] Gautier, A. *et al.* An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem. Biol.* **15**, 128 – 136 (2008).
- [199] Hassler, C. *et al.* Kremen is required for neural crest induction in *Xenopus* and promotes LRP6-mediated Wnt signaling. *Development* **134**, 4255–4263 (2007).
- [200] Mao, B. *et al.* Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/b-catenin signalling. *Nature* **417**, 664–667 (2002).
- [201] Li, Y. *et al.* Dkk1 Stabilizes Wnt Co-Receptor LRP6: Implication for Wnt Ligand-Induced LRP6 Down-Regulation. *PLOS ONE* **5**, 1–9 (2010).
- [202] Puzik, K. *et al.* Lef1 regulates caveolin expression and caveolin dependent endocytosis, a process necessary for Wnt5a/Ror2 signaling during *Xenopus* gastrulation. *Sci. Rep.* **9**, 15645 (2019).
- [203] Preibisch, S. *et al.* Efficient Bayesian-based multiview deconvolution. *Nat. Methods* **11**, 645–648 (2014).

- [204] Melak, M., Plessner, M. & Grosse, R. Actin visualization at a glance. *J. Cell. Sci.* **130**, 525–530 (2017).
- [205] Takada, R. *et al.* Assembly of protein complexes restricts diffusion of Wnt3a proteins. *Commun. Biol.* **1**, 165–165 (2018).
- [206] Chum, T. *et al.* The role of palmitoylation and transmembrane domain in sorting of transmembrane adaptor proteins. *J. Cell. Sci.* **129**, 95–107 (2016).
- [207] Shibata, Y., Voeltz, G. K. & Rapoport, T. A. Rough Sheets and Smooth Tubules. *Cell* **126**, 435–439 (2006).
- [208] Barrott, J. J. *et al.* Deletion of mouse Porcn blocks Wnt ligand secretion and reveals an ectodermal etiology of human focal dermal hypoplasia/Goltz syndrome. *PNAS* **108**, 12752–12757 (2011).
- [209] Biechele, S., Cox, B. J. & Rossant, J. Porcupine homolog is required for canonical Wnt signaling and gastrulation in mouse embryos. *Dev. Biol.* **355**, 275–285 (2011).
- [210] Bänziger, C. *et al.* Wntless, a Conserved Membrane Protein Dedicated to the Secretion of Wnt Proteins from Signaling Cells. *Cell* **125**, 509–522 (2006).
- [211] Bartscherer, K. *et al.* Secretion of Wnt Ligands Requires Evi, a Conserved Transmembrane Protein. *Cell* **125**, 523–533 (2006).
- [212] Tian, D. *et al.* The Wnt inhibitor LGK-974 enhances radiosensitivity of HepG2 cells by modulating Nrf2 signaling. *Int. J. Oncol.* **512**, 545–554 (2017).
- [213] Yost, E. A. *et al.* Live cell analysis of G protein beta5 complex formation, function, and targeting. *Molecular Pharmacology* **72**, 812 (2007).
- [214] Rustom, A. *et al.* Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* **303**, 1007–1010 (2004).
- [215] Schott, D. H., Collins, R. N. & Bretscher, A. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J. Cell Biol.* **156**, 35–40 (2002).
- [216] Levi, V. *et al.* Melanosomes Transported by Myosin-V in *Xenopus* Melanophores Perform Slow 35nm Steps. *Biophys. J.* **90**, L07–L09 (2006).

- [217] Wesslowski, J. *et al.* egfp-tagged wnt-3a enables functional analysis of wnt trafficking and signaling and kinetic assessment of wnt binding to full-length frizzled. *J. Biol. Chem.* **295**, 8759–8774 (2020).
- [218] Durisic, N. *et al.* Single-molecule evaluation of fluorescent protein photoactivation efficiency using an in vivo nanotemplate. *Nat. Methods* **11**, 156–162 (2014).
- [219] Schubert, A. *et al.* The role of extracellular vesicle-mediated wnt5a signaling in tumor progression and metastasis. *unpublished* .
- [220] Fried, H. & Kutay, U. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1659–1688 (2003).

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all denen, die mich während meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben. Ohne diesen mentalen und physischen Rückhalt wäre ich sicher nicht so weit gekommen.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Gerd Ulrich Nienhaus für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe und das Ermöglichen meiner Doktorarbeit sehr herzlichen Dank sagen. Die Unterstützung, nicht nur durch seine Kompetenz als Mentor und sein fachliches Wissen, sondern auch durch die Bereitstellung der nötigen finanziellen Mittel, erlaubten es mir, stetig mit meiner wissenschaftlichen Arbeit voranzukommen. Besonders durch die Aufnahme in den SFB1324 entstanden einige fruchtbare, interdisziplinär sehr spannende Kollaborationen.

Auch Prof. Dr. Schimmel danke ich hiermit herzlich für die Bereitschaft, das Zweitgutachten meiner Doktorarbeit zu übernehmen.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Dr. Karin Nienhaus, die mir stets durch ihr Wissen und ihre Ratschläge bei diversen Themengebieten weiterhalf und mich bei kleinen experimentellen Rückschlägen durch neue Denkanstöße immer wieder motivierte.

Für die angenehme Zusammenarbeit am „Großprojekt Wnt“, das Bereitstellen diverser biologischer Proben und die interessanten Fachgespräche möchte ich meinen Kollaborationspartnern aus den Arbeitsgruppen Boutros, Gradl und Davidson herzlich danken.

Ein riesiges Dankeschön geht an Dr. Peng Gao, der mir vor allem in der Endphase meiner PhD-Zeit sehr zur Seite stand, mich in die Arbeit am FCS-Mikroskop eingewiesen hat und durch seine Expertise im Feld der Mikroskopie tatkräftig unterstützte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Lu Zhou, der mich zu Beginn meiner Arbeit in die Einzelmoleküllokalisationsmikroskopie einwies und Dr. Gernot Guigas für seine ständige Bereitschaft, mich durch seinen fachlichen Rat zu unterstützen.

Auch möchte ich meinen lieben Kollegen Danke sagen, durch deren Anwesenheit stets ein angenehmes Arbeitsklima herrschte.

Julia Kuhlmann, danke für die wirklich vielseitige Unterstützung, sei es durch fachliche Gespräche oder durch die fruchtbare Zusammenarbeit im Laborbereich.

Ein großes Lob gilt auch meinen drei Bachelorstudenten Jasmijn Rath, Michael Dao und Larissa Kamps für die schöne, erfolgreiche Zusammenarbeit.

Julian Holland, danke für den fachlichen Austausch rund um das STED-FCS-Mikroskop. Benedikt Prunsche möchte ich danken für die Unterstützung bei den Bindungskinetikexperimenten.

Christoph Manz, danke für das Weitergeben deiner Expertise rund um die Probenpräparation auf dem Einzelmoleküllevel.

Rui Ma möchte ich danken für seine Tipps bezüglich PALM, Manuel Hüpfel für die fachliche Unterstützung rund um die Dekonvolution von Fluoreszenzaufnahmen und Jens Lackner für einige interessante Fachgespräche und den gemeinsam, regelmäßig durchgeführten Laborreinigungsdienst.

Ein besonderer Dank geht an meine Familie, an allererster Stelle an meine lieben Eltern, die während meines Studiums stets für mich da waren und an mich geglaubt haben.

Zuletzt möchte ich mich bei all den Freunden bedanken, die in den vergangenen Jahren mein Leben bereichert haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.