

**Charakterisierung der lateralen Diffusion einzelner  $\beta_2$ -adrenerger  
Rezeptor-Ligand-Komplexe an lebenden Zellen**

Möglichkeiten und Grenzen der Einzelmolekülmikroskopie  
und Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Anne Sieben

aus

Mönchengladbach

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn unter [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Häberlein

2. Gutachter: Prof. Dr. G.M. König

Tag der Promotion: 09.12.2008

Erscheinungsjahr 2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	2
1.1.1. Struktur.....	2
1.1.2. Rezeptormodelle .....	4
1.2 $\beta$ 2-Adrenerge Rezeptoren .....	5
1.2.1 Signaltransduktion .....	6
1.2.2 Regulation .....	8
1.3 Membranmodell und laterale Proteinmobilität .....	13
1.4 Ermittlung von Proteindynamiken.....	16
1.4.1 Einzelmolekültracking.....	17
1.4.1.1 Das Einzelmolekülmikroskop.....	18
1.4.1.2 Detektion einzelner Moleküle .....	19
1.4.1.2.1 Auflösung.....	19
1.4.1.2.2 Lokalisierung .....	21
1.4.1.2.3 Signal-zu-Rausch-Verhältnis.....	21
1.4.1.3 Mobilitätsanalyse .....	22
1.4.1.3.1 Analyse des mittleren Abstandsquadrats .....	22
1.4.1.3.2 Analyse der Sprungweitenverteilung.....	24
1.4.2 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.....	25
1.4.2.1 Das Fluoreszenzkorrelationsspektrometer .....	26
1.4.2.2 Mathematischer Hintergrund .....	27
<b>2 Zielsetzung.....</b>	<b>31</b>
<b>3 Experimenteller Teil.....</b>	<b>32</b>
3.1 Einzelmolekülmikroskopie.....	32
3.1.1 Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit.....	32
3.1.2 Zelllinie und Ligand.....	33
3.1.3 Detektion einzelner $\beta$ 2AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexe auf der Plasmamembran lebender A549-Zellen .....	38
3.1.4 Bewegungsverhalten des $\beta$ 2AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexes.....	44
3.1.5 Agonistische Beeinflussung .....	50
3.1.5.1 Betrachtung der Verteilung von Diffusionskoeffizienten .....	51
3.1.5.2 Betrachtung der Diffusionskoeffizienten .....	55
3.1.5.3 Betrachtung der Trajektorienausdehnung.....	57
3.1.5.4 Betrachtung der Trajektorienanzahl.....	61
3.1.6 Hemmung der Signaltransduktion und Regulation .....	63
3.1.6.1 Betrachtung der Verteilung von Diffusionskoeffizienten .....	64
3.1.6.2 Betrachtung der Diffusionskoeffizienten .....	67
3.1.6.3 Betrachtung der Trajektorienausdehnung.....	68
3.1.6.4 Betrachtung der Trajektorienanzahl.....	70

3.2	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopische Messungen.....	73
3.2.1	Diffusionsverhalten des $\beta$ 2AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexes.....	73
3.2.2	Agonistische Beeinflussung .....	77
3.2.3	Hemmung der Signaltransduktion und Regulation .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
4.1	Diskussion der Ergebnisse des Einzelmolekültrackings.....	93
4.2	Methodenvergleich .....	104
4.3	Diskussion der Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie .....	112
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick .....	116
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>121</b>
6.1	Geräte.....	121
6.1.1	Das Einzelmolekülmikroskop.....	121
6.1.2	Das Fluoreszenzkorrelationsspektrometer .....	122
6.2	Zellkultur.....	123
6.2.1	Kultivierung der A549-Zellen.....	123
6.2.2	Vorbereitung der Zellen für die Lebendzellmessungen.....	124
6.3	Einzelmolekülmikroskopische Studien.....	124
6.3.1	Immobilisierung von Nanobeads .....	124
6.3.2	Immobilisierung von Alexa-Noradrenalin .....	125
6.3.3	Bindung von Alexa-Noradrenalin an A549-Zellen.....	125
6.3.4	Unspezifische Bindung von Alexa-Noradrenalin und Alexa532.....	126
6.3.5	Stimulationsexperimente mit Terbutalin.....	126
6.3.6	Choleratoxin-Studien.....	126
6.3.7	Datenauswertung .....	127
6.3.7.1	Lokalisierung und Verfolgung von Einzelmolekülen .....	127
6.3.7.2	Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses .....	127
6.3.7.3	Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit.....	128
6.3.7.4	Bearbeitung der Rohdaten.....	128
6.4	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopische Studien.....	131
6.4.1	Bindung von Alexa-Noradrenalin an A549-Zellen.....	131
6.4.2	Unspezifische Bindung von Alexa-Noradrenalin und Alexa532.....	131
6.4.3	Stimulationsexperimente mit Terbutalin.....	131
6.4.4	Choleratoxin-Studien.....	132
6.4.5	Datenauswertung .....	132
6.5	Statistische Auswertung.....	133
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>138</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>149</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>151</b>
11.1	Publikationen .....	151
11.2	Lebenslauf.....	152

## Abkürzungsverzeichnis

$\beta$ 2AR	$\beta$ 2-adrenerger Rezeptor
$\beta$ Arr	$\beta$ -Arrestin
7-TM	7-Transmembranrezeptor
AC	Adenylatzyklase
ACF	Autokorrelationsfunktion
ADP	Adenosindiphosphat
AOTF	acousto-optical tunable filter akusto-optisch regulierbarer Filter
APD	Avalanche-Photodiode
Arg	Arginin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CTX	Choleratoxin
Cys	Cystein
EMCCD	electron multiplying charge-coupled device ladungsgekoppelter Elektronenvervielfacher
<i>et al.</i>	und andere
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinase
GTP	Guanosintriphosphat
MSD	mean square displacement mittleres Abstandsquadrat
n.d.	nicht detektierbar
NA	Noradrenalin
<i>NA</i>	numerische Apertur
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A

PSF	point spread function Punktabbildungsfunktion
SNR	signal-to-noise ratio Signal-zu-Rausch-Verhältnis
SPT	single particle tracking Einzelmolekültracking
TM	Transmembrandomäne
TMR	Tetramethylrhodamin
Tyr	Tyrosin

## 1 Einleitung

Für die Kommunikation einer Zelle mit ihrem extrazellulären Umfeld sind membranäre Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. Bei der am weitesten verbreiteten Rezeptorfamilie, den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, wird die Transduktion extrazellulärer Informationen in das Zellinnere durch die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor, G-Proteinen und Effektoren realisiert. Bei entsprechend ausreichendem externen Stimulus folgt der Aktivierung des Rezeptors seine Desensitivierung sowie Internalisierung. Obwohl für den hier im Fokus stehenden  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ AR) diese Prozesse auf molekularer Ebene und in ihrer chronologischen Abfolge weitgehend verstanden sind, sind die dynamischen Mechanismen, die zu einem erfolgreichen Kontakt zwischen den beteiligten Proteinen führen, nach wie vor unklar [1]. Über das laterale Diffusionsverhalten des einzelnen Rezeptors während Transduktion und Regulation ist ebenfalls wenig bekannt. Bereits publizierte Mobilitätsdaten für den  $\beta_2$ AR stammen aus Messungen der Fluoreszenzwiederkehr nach Photobleichen (FRAP, fluorescence recovery after photobleaching) sowie Untersuchungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS, fluorescence correlation spectroscopy) [2-4]. Die aus diesen Messungen resultierenden Angaben beschränken sich jedoch auf die Geschwindigkeiten im unstimulierten bzw. nur schwach stimulierten Zustand.

Das in den späten 1970er Jahren entwickelte Modell der zufälligen Kollision von Interaktionspartnern eines Signaltransduktionsweges konnte nicht die hoch spezifischen und schnellen Interaktionen zwischen den einzelnen beteiligten Komponenten erklären [5]. Heute dominiert die Vorstellung, dass es sich bei der Plasmamembran um ein komplexes, hoch organisiertes System handelt, in dem Proteine und Lipide einer heterogenen Verteilung innerhalb von Mikrodomänen mit funktionellem Charakter unterliegen [6]. In diesem Zusammenhang kommt der Beschreibung der dynamischen Organisation von Proteinen, die an einem Signaltransduktionsweg beteiligt sind, eine besondere Bedeutung zu. Die molekulare Organisation der Plasmamembran beeinflusst

die Dynamik von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und insbesondere deren laterales Diffusionsverhalten in Bezug auf den Rezeptorstatus.

Um die laterale Mobilität von Proteinen in der Plasmamembran lebender Zellen zu beschreiben, kommen verschiedene biophysikalische Methoden zum Einsatz. In dieser Arbeit fand einerseits die bereits etablierte Fluoreszenzkorrelationspektroskopie Anwendung, die eine Messung und Differenzierung verschiedener dynamischer Prozesse ermöglicht. Andererseits wurde die innovative Methodik der Einzelmolekülmikroskopie eingesetzt, die eine Verfolgung individueller Moleküle erlaubt und damit direkte Rückschlüsse auf das Diffusionsverhalten einzelner Rezeptoren und auf die Membranorganisation zulässt.

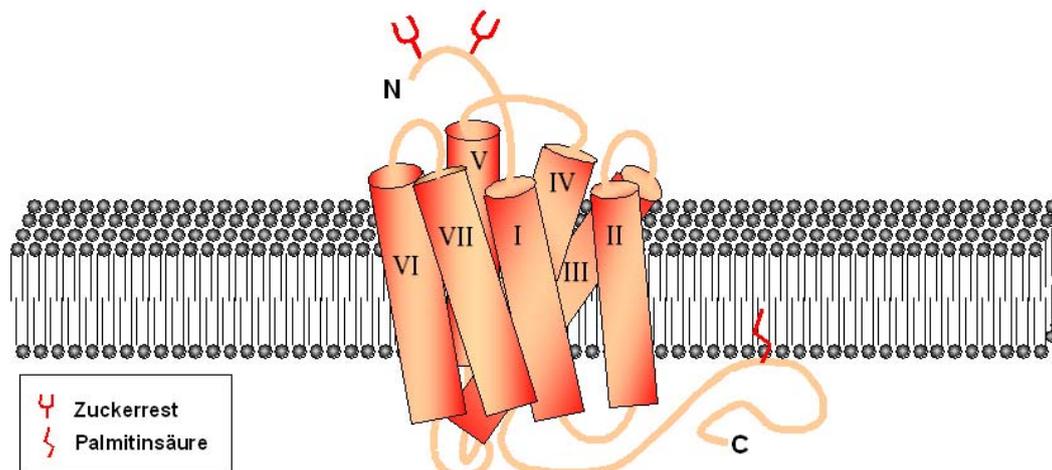
Eine detaillierte Kenntnis über das laterale Diffusionsverhalten von aktivierten Rezeptor-Ligand-Komplexen in der Plasmamembran ist neben der Bindungskinetik für die molekulare Wirkstoffforschung im Hinblick auf das Verständnis der Wirkung bekannter Pharmaka und für die Entwicklung neuer Leitstrukturen von entscheidender Bedeutung.

## **1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren**

### **1.1.1. Struktur**

Bei der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, G-protein-coupled receptor) handelt es sich um die vielfältigste Gruppe membranärer Rezeptoren und um die größte Familie im humanen Genom [7]. So finden sich in dieser Familie Rezeptoren für diverse Hormone, Neurotransmitter, Chemokine, Kalzium-Ionen sowie Duftstoffe. Dementsprechend breit stellt sich die therapeutische Anwendbarkeit der Pharmaka dar, die an ebendiesen Rezeptoren angreifen [8]. Tatsächlich stellen GPCR die Zielstrukturen für etwa 30-50 % der aktuell verfügbaren Pharmaka, die z.B. gegen Asthma, allergische Rhinitis, Schmerz, Hypertonie oder Schizophrenie Anwendung finden [7].

Strukturell zeichnen sich GPCR dadurch aus, dass sie sieben  $\alpha$ -helikale transmembranäre Domänen (Abb. 1-1; TM I-VII) mit einem extrazellulären N-Terminus, einem intrazellulären C-Terminus sowie je drei extra- und intrazellulären Schleifen besitzen, weshalb sie zudem als 7-Transmembranrezeptoren (7-TM) bezeichnet werden. Der hydrophobe Kernbereich, der extrazellulär durch die transmembranären  $\alpha$ -Helices gebildet wird, dient der Erkennung kleiner Liganden. Demgegenüber werden Protein- und Peptid-Liganden vom N-Terminus, welcher N-glykosidisch Zuckerreste gebunden haben kann, und den hydrophilen extrazellulären Schleifen erkannt [9]. Der intrazelluläre C-Terminus kann an Cys-341 palmitoyliert vorliegen [10] und hat die Funktion, das jeweilige Signal an das membranständige heterotrimere Guaninnukleotid bindende Protein (G-Protein) weiterzugeben. Über die Spezifität der Kopplung an ein bestimmtes G-Protein entscheiden Sequenzen, die in der dritten intrazellulären Schleife lokalisiert sind. Die C-terminale Domäne ist außerdem Zielstruktur für Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen, die diverse nachgeschaltete Regulationsprozesse initiieren.



**Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines GPCR am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.**

I-VII beziffern die jeweilige Transmembrandomäne, C und N markieren das C- bzw. N-terminale Ende des Rezeptors.

### 1.1.2. Rezeptormodelle

Das von Lefkowitz *et al.* in den 1980er Jahren entwickelte Modell des Ternärkomplexes beschreibt den Zusammenschluss von Agonist, Rezeptor und G-Protein als Grundlage für die Aktivierung von GPCR [11]. Die Existenz eines hoch affinen und niedrig affinen Rezeptorstatus wurde damals bereits erfasst [12]. Durch die Entdeckung, dass neben der G-Protein-Aktivierung durch einen Rezeptor mit gebundenem Agonist zusätzlich eine Agonist unabhängige Möglichkeit zur G-Protein-Kopplung existiert, kam es eine Dekade später zur Weiterentwicklung dieses Modells [13]. Die Eigenschaft von GPCR, selbst dann Aktivität zu zeigen, wenn kein Agonist gebunden ist, wird als konstitutive Aktivität bezeichnet und ist in ihrem Ausmaß für jeden Rezeptortyp unterschiedlich. Rezeptormutanten mit einer erhöhten konstitutiven Aktivität scheinen bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine Rolle zu spielen (z.B. Thyreotropin (TSH)-Rezeptoren auf Schilddrüsenadenomen) [1, 14].

Das Ternärkomplex-Modell wurde um zwei funktionell unterschiedliche, im Gleichgewicht vorliegende Rezeptorzustände erweitert (aktiv  $R^*$ ; inaktiv  $R$ ), die sich in ihrer Fähigkeit G-Proteine zu aktivieren unterscheiden. Nativ liegt der freie Rezeptor bevorzugt in der  $R$ -Konformation vor. Nach Agonistbindung lagert sich der Rezeptor in die  $R^*$ -Konformation um, und die G-Protein-Kopplung wird so ermöglicht. Die Effektivität von Liganden spiegelt sich in ihrer Fähigkeit wider, das Gleichgewicht zwischen  $R$  und  $R^*$  zu verschieben. Bezogen auf das erweiterte Modell ist ein voller Agonist in der Lage, zur Erlangung eines maximalen Effektes die  $R^*$ -Konformation zu stabilisieren und das Gleichgewicht weitgehend in Richtung des aktiven Status zu verschieben. Partielle Agonisten haben eine geringere intrinsische Effektivität und erreichen somit eine submaximale Systemantwort. Antagonisten binden mit gleicher Affinität sowohl an aktive als auch an inaktive Rezeptoren, sind aber nicht in der Lage eine physiologische Antwort auszulösen. Inverse Agonisten verhalten sich in einem nicht konstitutiv aktiven System wie Antagonisten. Betrachtet man sie allerdings in einem konstitutiv aktiven System, so sind sie in der Lage diese Aktivität zu reduzieren, indem sie bevorzugt an die

R-Konformation binden und das Gleichgewicht in Richtung des inaktiven Status verschieben [15].

Doch selbst die Erweiterung des Modells scheint nicht zu Genüge die tatsächlichen Verhältnisse widerspiegeln zu können. Das beschriebene Modell impliziert, dass Liganden einer Klasse die entsprechenden Rezeptoren bezüglich G-Protein-Kopplung, Signalweitergabe, Desensitivierung und Internalisierung immer in dergleichen Art und Weise beeinflussen. Es gibt aber eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass mehrere aktive Rezeptorzustände existieren und unterschiedliche Liganden verschiedene GPCR-Konformationen stabilisieren, die sich insbesondere in ihrer Fähigkeit mit G-Proteinen zu interagieren unterscheiden [15, 16]. Die geringe intrinsische Effektivität partieller Agonisten ließe sich dann möglicherweise durch eine Stabilisierung des ternären Komplexes erklären, wodurch die Guanosintriphosphat (GTP)-Bindung und somit der G-Protein-Umsatz reduziert würden [16].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GPCR an alternativen G-Protein unabhängigen Signalwegen beteiligt sein können [15]. Die Fähigkeit von Rezeptoren, ihre Selektivität für verschiedene G-Proteine unter bestimmten Voraussetzungen zu ändern, führt zu einer weiteren Erhöhung der Komplexität des Rezeptorsystems [17].

Somit wird immer deutlicher, dass das G-Protein gekoppelte Rezeptorensystem ein hoch komplexes, in seinen Feinheiten noch lange nicht erfasstes Signalweitergabesystem darstellt, welches auf verschiedene Liganden höchst individuell zu reagieren scheint.

## 1.2 $\beta$ 2-Adrenerge Rezeptoren

Die Gruppe der adrenergen Rezeptoren (AR) des sympathischen Nervensystems zeichnet sich dadurch aus, dass sie durch Bindung der Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin agonistisch stimuliert werden kann. Als Subgruppen lassen sich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren differenzieren, welche sich in Affinität endogener und synthetischer Liganden und in Art und Ausmaß der zellulären Antwort nach Ligandbindung

unterschiedlich verhalten. Zudem ist eine Unterteilung in  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ - sowie  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Rezeptoren möglich. Die einzelnen Rezeptorsubtypen werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert.

Der in dieser Arbeit im Fokus stehende  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ AR) wird in glatten Muskelzellen von Gefäßen, im Bronchialsystem, im Magen-Darm-Trakt und Uterus, in der Leber sowie in Fettzellen und Skelettmuskulatur gebildet.

### 1.2.1 Signaltransduktion

Nach der Bindung eines Agonisten an einen GPCR führt die folgende Konformationsänderung der TM III und TM VI zur Interaktion mit einem heterotrimeren G-Protein, welches aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta,\gamma$ -Untereinheit besteht [18-20]. Verschiedene Mitglieder der G-Protein-Familie wurden bisher beschrieben [21]. Sie unterscheiden sich insbesondere durch ihren Einfluss auf ihr entsprechendes Effektorprotein. Die  $\alpha$ -Untereinheit ( $G_\alpha$ ) hat im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) gebunden und die  $\beta,\gamma$ -Untereinheit ( $G_{\beta\gamma}$ ) unterstützt die Verankerung des G-Proteins in der Plasmamembran. Durch die Interaktion mit einem aktiven Rezeptor wird GDP durch GTP ausgetauscht, in der Folge dissoziiert das nun aktivierte G-Protein lateral vom Rezeptor und  $G_\alpha$  trennt sich vom  $\beta\gamma$ -Komplex (Abb. 1-2). Unabhängig voneinander sind sowohl  $G_\alpha$  als auch  $G_{\beta\gamma}$  in der Lage mit verschiedenen Effektorproteinen zu interagieren, deren Aktivität positiv oder negativ zu regulieren und damit die entsprechende physiologische Zellantwort auszulösen [14, 21].

Der  $\beta_2$ AR interagiert primär mit stimulierenden G-Proteinen ( $G_s$ ).  $G_{s\alpha}$  aktiviert die membranäre Adenylatzyklase (AC), welche wiederum die Synthese des sekundären Botenstoffes (second messenger) zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat katalysiert. Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bedingt die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche nun durch die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine vielfältige Effekte auslösen kann (Abb. 1-2).

Das System gelangt in den Ruhezustand zurück, indem  $G_{s\alpha}$  durch seine intrinsische GTPase-Aktivität GTP in GDP und anorganisches Phosphat hydrolysiert. Dieser Prozess wird durch RGS (regulator of G-protein signaling)-Proteine gesteuert und führt zur Rekonstitution des G-Protein-Trimers.

Neben der klassischen Kopplung an  $G_s$  wurde zudem die Interaktion von  $\beta_2AR$  mit inhibitorischem G-Protein ( $G_i$ ) beschrieben [17, 22]. In Abhängigkeit von Zellsystem und experimentellen Bedingungen liegen hierzu allerdings gegensätzliche Ergebnisse vor [23]. In diesem Zusammenhang wird kontrovers diskutiert, über welche Zwischenschritte die MAPK (mitogen-activated proteine kinase)-Signalkaskade nach agonistischer Stimulation des  $\beta_2AR$  aktiviert wird. Es gibt auf der einen Seite Hinweise aus *in-vitro*-Experimenten, dass die Phosphorylierung des  $\beta_2AR$  durch die PKA zu einem Umschalten der Kopplungsspezifität des Rezeptors auf Bindung und Aktivierung von  $G_i$  führt. Die dadurch frei werdende  $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit des  $G_i$ -Proteins soll u. a. über Einflussnahme auf die Tyrosinkinase c-Src und das G-Protein Ras den MAPK-Signaltransduktionsweg aktivieren [17, 22]. Die Hemmung der AC durch die  $G_{i\alpha}$ -Untereinheit und die dadurch bedingte Limitierung der cAMP-Produktion könnte somit als ein Teil des negativen Rückkopplungsmechanismus angesehen werden. Andererseits gibt es Daten, die eine mögliche  $G_i$ -Kopplung des  $\beta_2AR$  zelltypabhängig verneinen und die Aktivierung des MAPK-Signalweges  $G_s$ -abhängig über eine Aktivierung der c-Src und unabhängig von der PKA-Phosphorylierung des Rezeptors vermuten lassen [23].

Des Weiteren existieren Signaltransduktionswege, die unabhängig von der Kopplung der GPCR an heterotrimere G-Proteine sind (siehe Kap. 1.2.2).

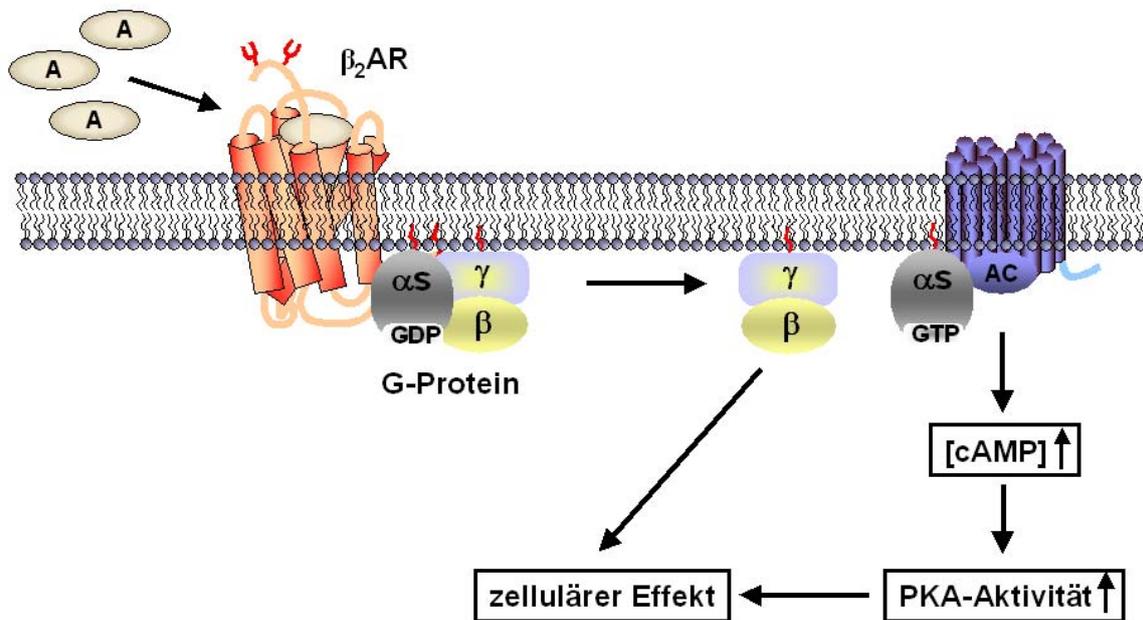


Abb. 1-2: Signaltransduktion eines GPCR am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.

A = Agonist; GDP = Guanosindiphosphat; GTP = Guanosintri-phosphat; AC = Adenylatzyklase; cAMP = zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat; PKA = Proteinkinase A.

## 1.2.2 Regulation

Ein GPCR ist in der Lage nach Agonistbindung mehrere G-Proteine nacheinander zu aktivieren. Um sowohl bei einem akuten als auch kontinuierlichen Stimulus eine Überstimulation des Systems zu vermeiden, existieren drei zeitversetzt ablaufende Mechanismen der Gegenregulation: Desensitivierung und Internalisierung des Rezeptors sowie Verringerung der Rezeptorexpression.

Die als heterologe Desensitivierung bezeichnete Phosphorylierung von intrazellulären Rezeptorbereichen durch ‚second-messenger‘-regulierte Kinasen erfolgt im Falle des  $\beta_2$ AR durch die PKA (Abb. 1-3). Die PKA kann sowohl freie als auch okkupierte Rezeptoren phosphorylieren, wobei geringe Ligandkonzentrationen bereits ausreichen. Die Phosphorylierung erfolgt an Serinresten der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors [24, 25].

Der Vorgang der homologen Desensitivierung wird durch spezifische G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinasen (GRK) vermittelt, die ausschließlich Rezeptoren phosphorylieren, die durch einen Agonisten belegt sind. Es existieren sieben verschiedene Typen dieser Serin-Threonin-Kinasen (GRK1-7). Der  $\beta_2$ AR wird primär durch die GRK2 und bevorzugt an Serinresten, die am proximalen C-terminalen Ende des Rezeptors lokalisiert sind, phosphoryliert [10, 26-28]. Nach Agonistbindung an den  $\beta_2$ AR und Aktivierung des G-Proteins wird die zytosolisch lokalisierte GRK2 transient Richtung Plasmamembran umverteilt. Voraussetzung dafür ist die Assoziation von freiem  $G_{\beta\gamma}$  und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) mit der ‚pleckstrin homology‘-Domäne der GRK2 ([29], Abb. 1-3). Die Aktivität der GRK2 und ihre Translokation zur Plasmamembran können mittels Phosphorylierung durch unterschiedliche Proteine positiv (z.B. PKA, [30]; Proteinkinase C, [31]; c-Src, [32]) oder negativ (ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases, [33, 34]) beeinflusst werden. Die GRK2-Phosphorylierung des Rezeptors fördert die Bindung an  $\beta$ -Arrestin ( $\beta$ Arr) 1 bzw.  $\beta$ Arr2, wodurch die weitere Kopplung an  $G_s$  sterisch verhindert und die Signalweitergabe abgebrochen wird [35-38]. Der Prozess dieser funktionellen Desensitivierung nimmt lediglich Sekunden in Anspruch und stellt somit eine erste schnelle Reaktion auf eine agonistische Stimulation dar.

Die anschließende Internalisierung des Rezeptors, die innerhalb von Minuten nach Stimulation beginnt, hat die endozytotische Entfernung des Rezeptors von der Plasmamembran zur Folge.  $\beta$ Arr1 und  $\beta$ Arr2 gehören zur vier Mitglieder umfassenden Familie der Arrestine, wobei der  $\beta_2$ AR eine höhere Affinität für  $\beta$ Arr2 zeigt [39, 40]. Die Arrestine dienen bei der Internalisierung als Adaptermoleküle für die Bindung weiterer Proteine, die an den folgenden endozytotischen Prozessen beteiligt sind (Abb. 1-3). So wurde gezeigt, dass sowohl  $\beta$ Arr1 als auch  $\beta$ Arr2 an die schweren Ketten des Clathrins binden, welches das Hauptstrukturprotein von Clathrin ummantelten Einstülpungen in die Plasmamembran (clathrin-coated pits) ist [41]. Zusätzlich binden die Arrestine an die  $\beta_2$ -Adaptin Untereinheit des heterotetrameren AP-2 Adapterkomplexes, der entscheidende Adapterfunktionen bei der Bildung von ‚clathrin-coated pits‘ erfüllt [42, 43].

Ein weiteres mit  $\beta$ Arr interagierendes Protein, dessen Bedeutung bei der Desensitivierung und Internalisierung von GPCR erst im letzten Jahrzehnt offensichtlich wurde, ist die c-Src, die zur Familie der Src-Tyrosinkinase gehört. Die c-Src scheint bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Agonistbindung direkt an den  $\beta$ 2AR zu binden [44]. Nach Aktivierung des G-Proteins führt die Phosphorylierung des Rezeptors an Tyr-350 durch eine noch unbekannte Kinase zur Ausbildung einer SH2 (Src-Homologie 2)-Bindungsstelle. Die c-Src, welche eine SH2-Domäne besitzt, wird durch Bindung an den Rezeptor aktiviert und aktiviert dann ihrerseits durch Tyrosinphosphorylierung die GRK2, welche erst dadurch in die Lage versetzt wird, den Rezeptor zu phosphorylieren [32, 44, 45].  $\beta$ Arr-Bindung initialisiert in der Folge die Desensitivierung und Internalisierung des Rezeptors, wobei verschiedentlich gezeigt werden konnte, dass sowohl  $\beta$ Arr1 als auch  $\beta$ Arr2 direkt an die c-Src binden [44, 46, 47]. Zudem gibt es Studien, die belegen, dass sowohl  $G_{s\alpha}$  als auch  $G_{i\alpha}$  durch Bindung an die c-Src deren Kinaseaktivität durch die Herbeiführung einer Konformationsänderung zu steigern vermögen. Die Src-Tyrosinkinase-Familie stellt somit einen direkten Effektor für G-Proteine dar [48]. Abgesehen von ihrer Rolle bei der Internalisierung von  $\beta$ 2AR, kommt der c-Src eine entscheidende Funktion bei der Signalumschaltung auf G-Protein unabhängige Signaltransduktionswege, wie die Aktivierung der MAPK-Kaskade via Ras, zu. Die Bindung an  $\beta$ Arr scheint hierbei von Bedeutung zu sein [46]. Um GPCR an alternative Signaltransduktionswege zu koppeln, ist deren Desensitivierung und Internalisierung notwendig, weshalb diese Prozesse als eine Art molekularer Schalter fungieren.

c-Src ist an weiteren Zwischenschritten des endozytotischen Prozesses beteiligt. So ist die Phosphorylierung der GTPase Dynamin an Tyrosinresten c-Src abhängig und essentiell für die Dynaminfunktion, also die Abschnürung der endozytotischen Vesikel von der Plasmamembran nach Dynaminoligomerisierung ([47, 49], Abb. 1-3). Sowohl an der Abschnürung der endozytotischen Vesikel als auch an ihrem Transport und der anschließenden Fusion mit sogenannten ‚early endosomes‘ ist die GTPase Rab5 regulativ beteiligt [50]. Internalisierte Rezeptoren können in Endosomen durch die GPCR-spezifische Phosphatase (GRP) dephosphoryliert werden, wobei eine vorherige

---

Konformationsänderung des Rezeptors durch Absenkung des pH-Wertes im endosomalen Kompartiment eine Rolle zu spielen scheint [51]. In der Folge werden die Rezeptoren dann, reguliert durch die GTPase Rab4, voll funktionsfähig zur Zelloberfläche recycelt [50]. Alternativ erfahren die Rezeptoren nach Ubiquitinylierung eine lysosomale Degradation (Abb. 1-3).

Eine über Stunden erfolgte Rezeptorstimulation resultiert in der Verringerung der Rezeptordichte auf der Plasmamembran. Sowohl die Degradation existierender Rezeptoren durch lysosomalen Abbau als auch die Regulation der Synthese neuer Rezeptoren auf transkriptionaler oder translationaler Ebene scheint hierbei von Bedeutung zu sein [52].

Frühe histologische Studien lieferten Hinweise auf die Lokalisierung und Internalisierung von  $\beta$ AR durch Caveolae [53, 54]. In späteren Arbeiten konnte zwar die Lokalisierung von unstimulierten  $\beta_2$ AR in solchen Mikrodomänen bestätigt werden, jedoch war dies zelltypabhängig, und nach agonistischer Stimulation konnte in keinem Fall mehr eine Existenz von  $\beta_2$ AR in caveolaren Subdomänen festgestellt werden [49, 55-58]. Somit kann eine Internalisierung über Caveolae ausgeschlossen werden und die Internalisierung über ‚clathrin-coated pits‘ ist wahrscheinlich der einzige endozytotische Mechanismus für  $\beta_2$ AR [37].

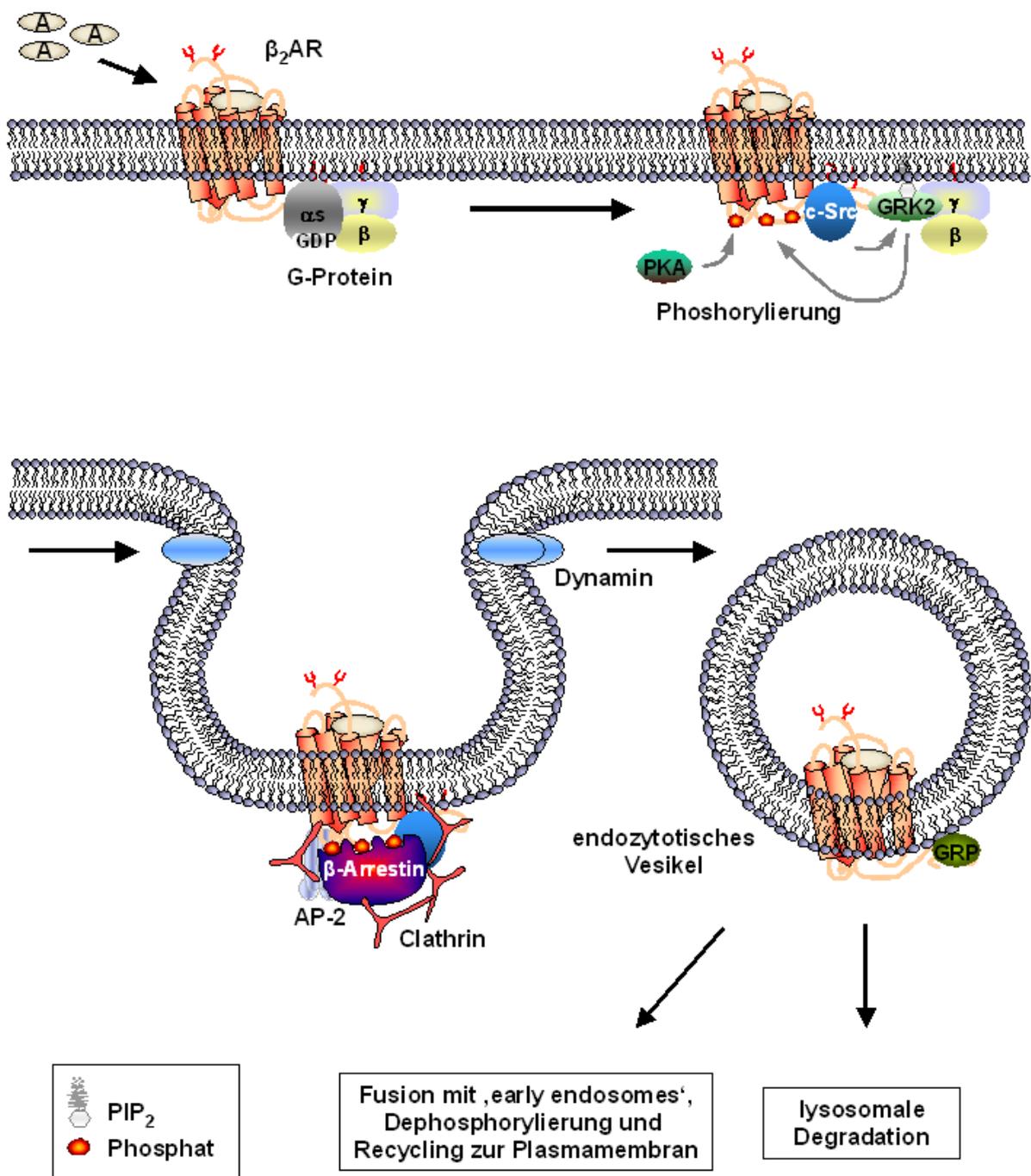


Abb. 1-3: Desensitivierung und Internalisierung eines GPCR am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.

A = Agonist; GDP = Guanosindiphosphat; PKA = Proteinkinase A; GRK2 = G-Protein gekoppelter Rezeptor-Kinase 2; AP-2 = Adapterkomplex 2; GRP = GPCR-spezifische Phosphatase; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat.

### 1.3 Membranmodell und laterale Proteinmobilität

Das klassische Modell, welches die Organisation der Biomembran und der darin eingebetteten Proteine beschreibt, ist das von Singer und Nicolson 1972 entwickelte ‚fluid mosaic model‘ [59]. Dieses Modell beschreibt die Biomembran als eine Lipid-Doppelschicht mit integralen Proteinen, die diese Doppelschicht durchspannen. Assoziierte Proteine können der Membran von außen oder von innen angelagert sein. Den Proteinen wurde eine zufällige Verteilung und eine freie laterale Beweglichkeit innerhalb der flüssig dynamischen Membran - im Sinne einer Brownschen Molekularbewegung - zugeschrieben. Voraussetzung hierfür wäre allerdings eine fehlende Organisation innerhalb der Membran. Die Tatsache, dass Proteine in Membranen lebender Zellen eine 10-100fach geringere Diffusionsgeschwindigkeit aufweisen als in artifiziellen Doppelschichten, führte zu der Erkenntnis, dass dieses Modell die tatsächlich in der Membran herrschenden Zustände nur sehr vereinfacht darstellt und die Komplexität der Membranorganisation nicht zu erfassen vermag [60]. Zur Erklärung einer hohen molekularen Ordnung innerhalb der Membran wird die Existenz von sogenannten ‚lipid rafts‘ postuliert. Es handelt sich dabei um lokale Ansammlungen von Cholesterol und Sphingolipiden in hoch dynamischen, membranären Mikrodomänen mit einem Durchmesser von etwa 10-200 nm [61-66]. Diverse Proteine scheinen bevorzugt in ‚lipid rafts‘ lokalisiert zu sein. Dazu gehören Proteine, die einen GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-Anker besitzen, doppelt acetylierte Proteine, wie die Kinasen der Src-Familie oder die  $\alpha$ -Untereinheit von heterotrimeren G-Proteinen, sowie einige transmembranäre Proteine [65]. Die Funktion solcher ‚lipid rafts‘ scheint v.a. in der lokalen Konzentrierung bzw. Separierung bestimmter transmembranärer und membran-assoziiertes Proteine zu liegen. So werden Proteine, die an demselben Signalübertragungsweg beteiligt sind, in eine räumliche Nähe zueinander gebracht [64, 65]. Neben den klassischen ‚lipid rafts‘, die keine Strukturproteine enthalten, existieren in der Membranraft-Familie noch als Caveolae bezeichnete Mikrodomänen, die angereichert sind mit dem integralen Strukturprotein Caveolin [67, 68]. Die Mitglieder der Caveolin-

Familie (Caveolin 1-3) beeinflussen sowohl Morphologie als auch Funktion einer Mikrodomäne. So formt Caveolin kolbenförmige Einstülpungen in die Membran, die einen Durchmesser von etwa 50-100 nm haben [64]. Caveolae können sich als Vesikel von der Membran abschnüren und somit an endozytotischen und transzytotischen Prozessen beteiligt sein [65]. ‚Lipid rafts‘ scheinen neueren Ergebnissen zur Folge allerdings nicht geschwindigkeitsbestimmend für das Diffusionsverhalten der raftassoziierten Membranproteine zu sein [69]. Darüber hinaus ist die Existenz von ‚lipid rafts‘ weiterhin umstritten. Ein tatsächlicher Nachweis solcher Mikrodomänen in lebenden Zellen konnte bisher nicht erbracht werden und es gibt Hinweise auf eine artifizielle Entstehungsmöglichkeit während des Isolierungsprozesses [70].

Andere Faktoren müssen somit zur Verlangsamung der Proteindiffusion in biologischen Membranen beitragen. Die Beteiligung verschiedener Mechanismen ist denkbar. So können andere mobile oder immobile Proteine in der Membran als Hindernisse fungieren und in der Folge Diffusionsprozesse einschränken. Der Effekt von Hindernissen auf die Diffusion kann mit der ‚percolation theory‘ beschrieben werden. Dabei ist die Diffusionsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration der Hindernisse und von der Zeit [71]. Außerdem kann die transiente Bindung an andere mobile oder immobile Proteine eine Verlangsamung der Mobilität bedingen. Betrachtet man ein Rezeptorsystem, dann können die Interaktionen mit Proteinen, die an der intrazellulären Signalweitergabe und an den Regulationsmechanismen beteiligt sind, zur Einschränkung in der lateralen Beweglichkeit führen. Diskutiert werden außerdem Mobilitäts einschränkungen durch Bindung an oder Begrenzung durch die extrazelluläre Matrix [60]. Kusumi *et al.* haben basierend auf Einzelmolekültechniken das ‚membrane skeleton fence model‘ entwickelt. Das zytoskeletale Netzwerk soll durch seine Nähe zur Plasmamembran in der Lage sein, eine Barriere für die laterale Beweglichkeit von Transmembranproteinen zu bilden. In diesem Modell diffundieren Moleküle innerhalb der durch das membrannaher Zytoskelett gebildeten Domänen, können diese jedoch durch ‚hopping‘ verlassen. Transiente Lücken in der Barriere, die durch ständige Umbauprozesse

entstehen, sowie variable Abstände zwischen Membran und Zytoskelettbarriere ermöglichen diesen Übertritt in benachbarte Kompartimente [72-74].

Die Feststellung, dass Phospholipide innerhalb der äußeren Schicht der Lipid-Doppelschicht ebenso wie Transmembranproteine ‚hop‘-Diffusion zeigen, obwohl sie nicht direkt mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen können, führte zur Entwicklung des ‚anchored-protein picket model‘ [75]. In diesem Modell sind transmembranäre Proteine mit dem zytosolischen Aktinnetzwerk verbunden. Diese immobilisierten Proteine teilen die Plasmamembran in Kompartimente auf wie Pfähle entlang eines Zaunes. Die Beweglichkeit der Phospholipide wird durch sterische Behinderung sowie Erhöhung von Reibung und Packungsdichte eingeschränkt. Zwischen den begrenzten Domänen scheint ‚hop‘-Diffusion eine Kompartiment übergreifende Beweglichkeit zu ermöglichen. Eine Domänengröße zwischen 30-230 nm wurde in verschiedenen Zelllinien gefunden [76]. Dieses Modell basiert jedoch ausschließlich auf Daten von goldmarkierten Phospholipiden oder Proteinen, die in der äußeren Schicht der Biomembran verankert sind. In vergleichbaren Untersuchungen mit GPI-verankertem CD59 wurde ein fluoreszenzmarkiertes Fab-Fragment für die Detektion verwendet [77]. Hier konnte jedoch keine ‚hop‘-Diffusion oder räumlich begrenzte Beweglichkeit für CD59 gefunden werden. Als Ursache für die konträren Ergebnisse wird vermutet, dass die Goldmarkierung aufgrund ihrer erheblichen Größe ‚hop‘-Diffusion durch Interaktion mit anderen membranären Proteinen induzieren kann.

So vielfältig die möglichen Mechanismen zur Beeinflussung des Diffusionsverhaltens membranärer Proteine sind, als so unterschiedlich erweisen sich die bisher mit diversen biophysikalischen Methoden erlangten dynamischen Bewegungsprofile.

In den wenigsten Fällen zeigt ein in der Plasmamembran lokalisiertes Protein eine einzige homogene Mobilität. So werden z.B. für den GPCR OR17-40 vier Bewegungspopulationen gefunden; immobile Rezeptoren existieren dabei ebenso wie nahezu unbehindert diffundierende und solche, die sich entweder in großen oder kleinen Domänen bewegen [78]. Das Diffusionsverhalten des  $\mu$ -Opioid-Rezeptor wird entweder als räumlich begrenzte Diffusion innerhalb einer selber diffundierenden Domäne beschrieben [79]

oder aber als räumlich eingeschränkte Bewegung mit ‚hop‘-Diffusion auf einer längeren Zeitskala [80]. Der EGF (epidermal growth factor)-Rezeptor [81] und der  $\alpha_{1A}$ -adrenerge Rezeptor [82] zeigen Aktin bzw. Myosin abhängige gerichtete Bewegung. Des Weiteren wurde für den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ein Bewegungsprofil beschrieben, bei dem freie Brownsche und gerichtete Bewegung alternierend auftreten [83].

## 1.4 Ermittlung von Proteindynamiken

Es existieren verschiedene biophysikalische Methoden zur Ermittlung der lateralen Mobilität von Membranproteinen. Jahrelang wurde vor allem FRAP eingesetzt [84, 85]. Die Messung der Fluoreszenzwiederkehr über die Zeit nach Photobleichen einer begrenzten Beobachtungsfläche liefert Informationen über die Diffusionsgeschwindigkeit sowie über den Anteil der mobilen Fraktion. In neueren Untersuchungen konnten durch Variation der Größe der Bleichfläche Membrandomänen identifiziert und charakterisiert werden [86, 87]. Diese sehr zuverlässige und gut erprobte Technik stößt dann an ihre Grenzen, wenn es darum geht, Subpopulationen mit unterschiedlichen Diffusionscharakteristika voneinander zu unterscheiden oder komplexe Bewegungsprofile zu erkennen [88, 89]. Ursächlich hierfür ist u.a. die stets stattfindende Mittelung der Einzelereignisse, sowie die unzureichende räumliche Auflösung von etwa 1  $\mu\text{m}$  [90].

Die Etablierung der FCS-Technik (siehe Kap. 1.4.2) zur Messung von Mobilitäten einzelner Moleküle in Membranen lebender Zellen ist u.a. ihren klaren Vorteilen gegenüber FRAP zuzuschreiben. So ist mit dieser Methode eine Erfassung der Diffusion verschiedener Subpopulationen bei bereits sehr geringen Probenkonzentrationen, meist im nanomolaren Bereich, möglich. Als weitere Kenngrößen können Konzentrationen und Zählraten der fluoreszenzmarkierten Moleküle erfasst werden. Molekulare Interaktionen, die z.B. ein Clustern von Proteinen zur Folge haben, können durch Änderungen des Diffusionskoeffizienten sowie Zunahme der Helligkeit pro Partikel quantifiziert werden [91]. Eine Limitierung der FCS-Anwendung liegt in der Tatsache, dass immobile Partikel

nicht detektierbar sind und die Diskriminierung ähnlich diffundierender Moleküle unzureichend ist. Wie FRAP ist die FCS eine Ensembletechnik, bei der eine Mittelung von hunderten bis tausenden Einzelereignissen stattfindet.

Die Einzelmolekülmikroskopie ermöglicht die Verfolgung einzelner Partikel (SPT, single particle tracking) und somit die Erfassung individueller Molekülpfade mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung (siehe Kap. 1.4.1). Sowohl Informationen zum Diffusionsverhalten in verschiedenen Zellbereichen als auch zu unterschiedlichen Bewegungscharakteristika können erhalten werden.

Da für diese Arbeit sowohl SPT als auch FCS verwendet wurden, soll auf diese Techniken im Folgenden genauer eingegangen werden.

### 1.4.1 Einzelmolekültracking

Die Technik des SPT ermöglicht eine Lokalisierung von Einzelmolekülen und eine direkte Beobachtung ihrer Bewegung. Neben Einzelmoleküldetektion und -tracking in Lösung [92, 93] kommt v.a. der Erkennung und Verfolgung von individuellen Molekülen in der Plasmamembran [94-97], dem Zytosol und Zellkompartimenten wie z.B. dem Nukleus [98, 99] eine bedeutende Rolle zu. Die jeweils im Fokus stehenden Proteine oder Lipide werden für das SPT meist fluoreszenzmarkiert, wobei verschiedene Markierungsarten Verwendung finden. Organische Fluorophore wie Tetramethylrhodamin (TMR, [95]) oder CY5 [78], fluoreszierende Proteine [96] und immer häufiger Quantum-Dots [83, 96, 100] werden erfolgreich für die fluoreszenzmikroskopische Detektion von einzelnen Molekülen in lebenden Zellen eingesetzt. Alternativ findet sich eine Vielzahl von Arbeiten, die als Markierung kolloidale Goldpartikel [73, 79, 101] oder Latexkugeln [102, 103] verwenden, um eine Detektion mittels differentieller Interferenzkontrast-Mikroskopie zu ermöglichen.

Die Identifizierung einzelner Signale und ihre Verfolgung zeitabhängig durch eine Serie von Bildern führen zu Trajektorien individueller Moleküle. Unter Verwendung von Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie in Kombination mit einem hochsensitiven und

schnellen Kamerasystem (515 Bilder/s im Vollbildmodus) ist eine räumliche Auflösung einzelner Fluorophore mit einer Präzision im zweistelligen Nanometer- sowie einer zeitliche Auflösung im Millisekundenbereich realisierbar.

#### 1.4.1.1 Das Einzelmolekülmikroskop

Verwendung findet ein konventionelles inverses Epifluoreszenzmikroskop mit Weitfeldoptik. Der Einsatz eines leistungsfähigen Festkörperlaser mit definierter Wellenlänge erlaubt einerseits eine ausreichend hohe Anregungsintensität, andererseits wird eine selektive Anregung der Zielmoleküle ermöglicht und somit störende Autofluoreszenz minimiert. Der Laserstrahl wird über einen akusto-optisch regulierbaren Filter (AOTF, acousto-optical tunable filter) in eine Lichtfaser eingekoppelt (Abb. 1-4). Der AOTF kontrolliert die Leistung sowie den Zeitpunkt der Laserillumination mit Transistor-Transistor-Logic (TTL)-Signalen, welche von der Kamera produziert werden. Der Laserstrahl tritt kollimiert mit einem Durchmesser von 0,7 mm, bezogen auf eine Intensität von  $1/e^2$  (13,5 %) der Maximalintensität, aus der Faser aus und wird rückwärtig in das Mikroskop eingekoppelt. Das Linsensystem im Beleuchtungsstrahlengang, bestehend aus einer Tubuslinse ( $f = 200$  mm) und einem Wasserimmersionsobjektiv (60x, 1,2 NA), fokussiert den Strahl über einen dichromatischen Spiegel, welcher das Laserlicht reflektiert und das Fluoreszenzlicht durchtreten lässt, in die Objektebene. Die entstehende Beleuchtungsfläche hat einen Durchmesser ( $1/e^2$ ) von 11,7  $\mu\text{m}$ . Das Fluoreszenzsignal wird durch das Objektiv gesammelt, passiert den Dichromaten sowie einen entsprechenden Emissionsfilter, der nur das Fluoreszenzlicht durchtreten lässt. Das Emissionslicht wird durch eine zweite Tubuslinse ( $f = 200$  mm) fokussiert, nachdem es von einem Spiegel durch den seitlichen Mikroskopausgang gelenkt wird. Bevor das Licht auf den EMCCD (electron multiplying charge-coupled device)-Detektor fällt, erfährt es eine vierfache Vergrößerung, was zu einer Pixelgröße im Objektraum von 100 nm führt.

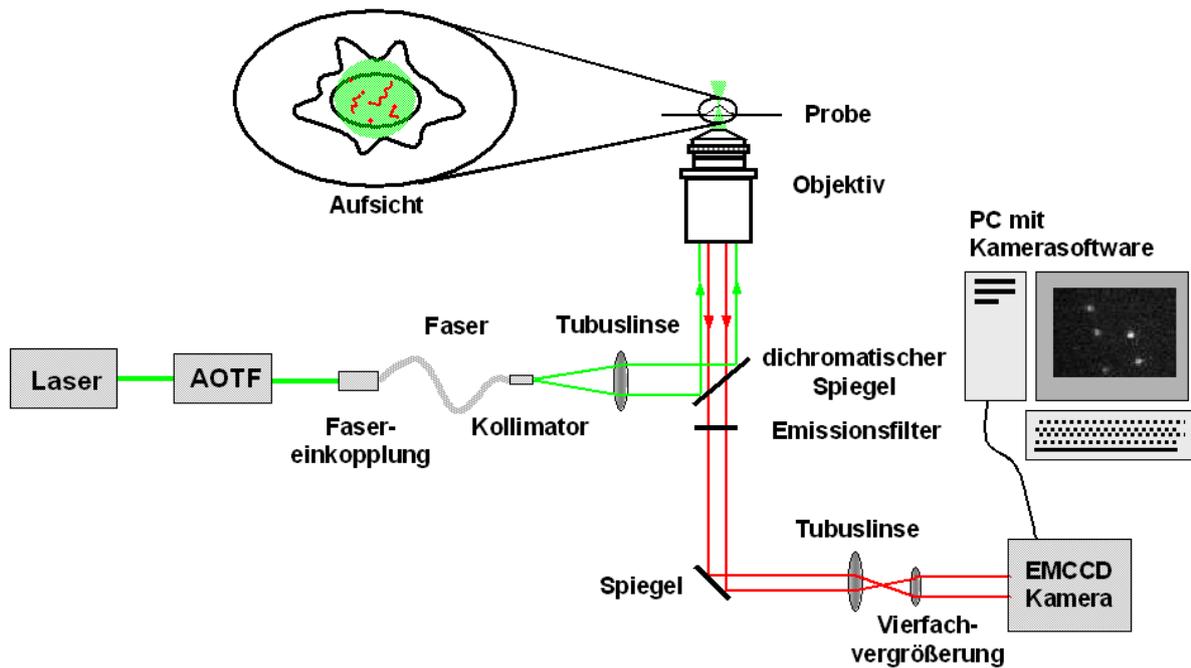
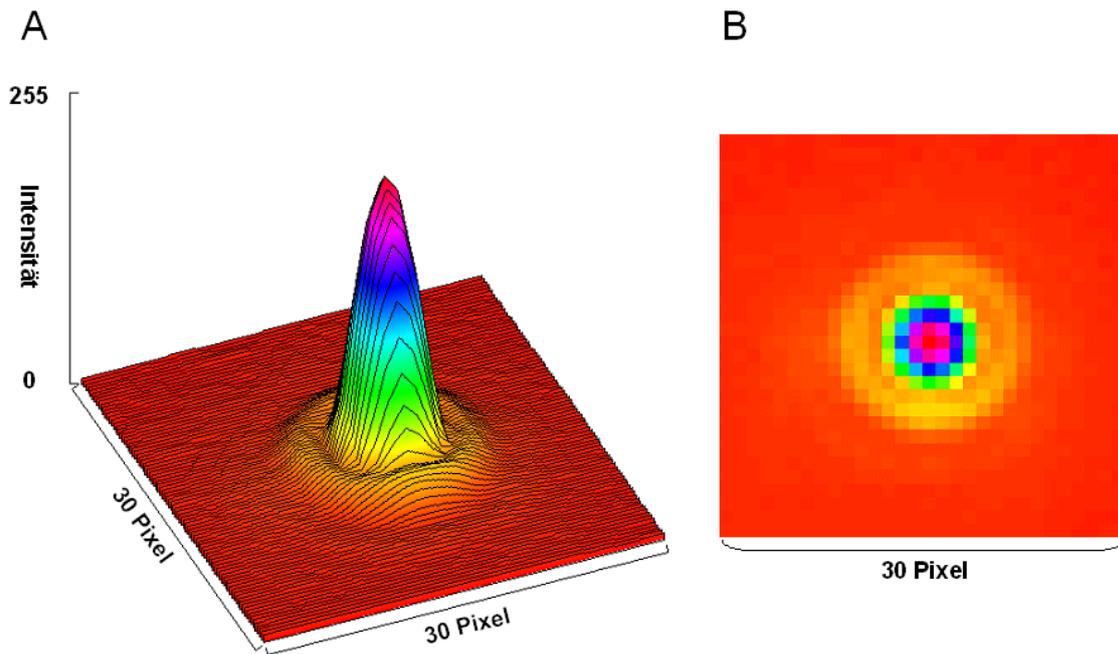


Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Einzelmolekülmikroskops.

## 1.4.1.2 Detektion einzelner Moleküle

### 1.4.1.2.1 Auflösung

Die Größe eines Farbstoffmoleküls ist sehr viel kleiner als die Wellenlänge des emittierten Lichts, wodurch dieses als Punktlichtquelle fungiert. Das Bild eines Punktobjekts hat ein komplexes Intensitätsprofil in der Bildebene, welches als Punktabbildungsfunktion (PSF, point spread function, Abb. 1-5 A) bezeichnet wird. Durch die Beugungseigenschaften des Abbildungssystems erscheint auf der CCD-Kamera eine Intensitätsverteilung mit konzentrischen Ringen (Airy-Disk, Abb. 1-5 B). Dies limitiert die laterale Auflösung des Mikroskops.



**Abb. 1-5: Nanobead immobilisiert auf einem Deckglas.**

A: Punktabbildungsfunktion, B: Airy-Disk; Aufnahmebedingungen: 5 ms Illuminationszeit, 0,94 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung.

Der Radius  $r_{Airy}$  des ersten Intensitätsminimums im Airy-Beugungsmuster ist abhängig von der Wellenlänge ( $\lambda_0$ ) des Fluoreszenzlichts und der numerischen Apertur ( $NA$ ) des Objektivs [104]:

$$r_{Airy} = 0,61 \frac{\lambda_0}{NA_{Obj}} \quad (1.1)$$

Zwei Punktlichtquellen gelten dann als aufgelöst, wenn ihre Distanz größer oder gleich dem Radius ihrer Airy-Scheiben ist. Dieser als Rayleigh-Kriterium bezeichnete Zusammenhang gilt für zwei Punktlichtquellen mit inkohärenter Strahlung. Bezogen auf eine Emissionswellenlänge von 553 nm und eine  $NA$  von 1,2 ergibt sich für das hier verwendete mikroskopische System eine Auflösung von etwa 280 nm.

### 1.4.1.2.2 Lokalisierung

Die Genauigkeit, mit der ein Einzelmolekül lokalisiert werden kann, ist nicht durch das Auflösungslimit des Systems begrenzt. Die Position eines einzelnen fluoreszierenden Partikels kann mit einer Genauigkeit bestimmt werden, die wesentlich größer ist als die Auflösung des Mikroskops. Hierfür wird an die PSF eines Einzelmoleküls näherungsweise eine zweidimensionale Gaußfunktion angepasst:

$$f(x, y) = A \exp \left[ -\frac{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2}{2\sigma_{xy}^2} \right] \quad (1.2)$$

$x_c, y_c$  sind die Koordinaten des Mittelpunkts,  $A$  ist die Amplitude und  $\sigma_{xy}^2$  die radiale Varianz [105]. Für mobile Partikel gilt, bedingt durch ihre Bewegung während der Aufnahme des Bildes, eine geringere Lokalisierungsgenauigkeit, die somit eine Funktion des Diffusionskoeffizienten ist. Die Lokalisierungsgenauigkeit ist abhängig vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis und wird außerdem durch die mechanische Stabilität des jeweiligen Mikroskopaufbaus beeinflusst.

### 1.4.1.2.3 Signal-zu-Rausch-Verhältnis

Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR, signal-to-noise ratio) ist abhängig von der Signalintensität im Maximum der PSF über Hintergrund ( $I$ ) sowie vom Hintergrundrauschen ( $\sigma_{total}$ ) und ist definiert als

$$SNR = \frac{I}{\sigma_{total}} = \frac{I}{\sqrt{F^2(\sigma_{sig}^2 + \sigma_b^2) + \sigma_{readout}^2} / M^2} \quad (1.3)$$

$\sigma_{sig}^2$  ist die Varianz der maximalen Signalintensität über Hintergrund und stammt vom statistischen Emissionsverhalten des Farbstoffs (photon shot noise), welches einer Poisson-Verteilung folgt.  $\sigma_b^2$  entspricht der Varianz der Hintergrundintensität. Autofluoreszenz von Zellen oder verwendeten Lösungen, ‚out-of-focus‘-Fluoreszenz und Fluoreszenz durch Verunreinigungen führen zum Rauschen der Hintergrundintensität. EMCCD-Kameras generieren durch den Verstärkungsprozess elektronisch bedingtes Rauschen, das durch Einführung des ‚noise factor‘  $F$  berücksichtigt wird. Das bei allen CCD-Kameras existierende Rauschen während des Ausleseprozesses (readout noise) wird bei der EMCCD-Kamera durch den Verstärkungsfaktor  $M$  dividiert und dadurch vernachlässigbar klein [106]. Durch die Wahl einer Farbstoffmarkierung mit optimalen Fluoreszenzeigenschaften sowie Verfeinerung der Geräteeinstellungen bezüglich Laserleistung, Integrationszeit, Ausleserate und Signalverstärkung kann das SNR günstig beeinflusst werden.

### 1.4.1.3 Mobilitätsanalyse

#### 1.4.1.3.1 Analyse des mittleren Abstandsquadrats

Jede Trajektorie kann durch eine Reihe von Koordinaten  $\{x_i, y_i\}$  charakterisiert werden, mit  $1 \leq i \leq N$ , wobei  $N$  die Anzahl der Beobachtungen eines einzelnen Moleküls ist [107]. Für jede Trajektorie ergibt sich für unterschiedliche Zeitdifferenzen eine Reihe von Abstandsquadraten  $r^2(t)$  zwischen zwei Positionen. Die Zeitdifferenz  $t$  (lag time) ergibt sich aus  $t = n(t_{ill} + t_{delay})$ , mit  $1 \leq n \leq N - 1$ ,  $t_{ill}$  als Integrations- bzw. Illuminationszeit und  $t_{delay}$  als Verzögerungszeit (delay time) zwischen zwei aufeinanderfolgenden Belichtungen. Die ‚delay time‘ entspricht mindestens der Zeit, die für das Auslesen des Chips benötigt wird. Das mittlere Abstandsquadrat (MSD, mean square displacement,  $\langle r^2(t) \rangle$ ) ergibt sich aus der Mittelung der einzelnen Werte für  $r^2(t)$  für identische

Zeitdifferenzen einer Trajektorie. Diese Vorgehensweise führt dazu, dass das  $MSD$  für kurze Zeitdifferenzen geringere Abweichungen vom Mittelwert aufweist als für lange Zeitdifferenzen. Im Falle von freier Brownscher Bewegung im zweidimensionalen Raum, was einer normalen Diffusion entspricht, stehen Diffusionskoeffizient  $D$  und  $MSD$  in einer linearen Beziehung zueinander (Abb. 1-6):

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt \quad (1.4)$$

Aus dem entsprechenden Funktionsgraph des  $MSD$  gegen die Zeit kann somit der Diffusionskoeffizient für jede einzelne Trajektorie ermittelt werden (Abb. 1-6; [107, 108]). Ergibt sich jedoch keine lineare Beziehung zwischen  $MSD$  und der Zeit, so kann keine uneingeschränkte Brownsche Bewegung vorliegen. Wenn der Kurvenverlauf eine positive Krümmung zeigt, so wird die normale Diffusion von einer gerichteten Bewegung mit der Geschwindigkeit  $v$  überlagert (Abb. 1-6; [109]) und es gilt:

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt + (vt)^2 \quad (1.5)$$

Moleküle, die sich innerhalb einer räumlich begrenzten Domäne bewegen, zeigen für kleine Zeitintervalle eine Abhängigkeit entsprechend Gleichung 1.4. Betrachtet man jedoch längere Zeiten, so strebt das  $MSD$  in Richtung eines asymptotischen Wertes  $r_D^2$ , der mit der Domänengröße gleichgesetzt werden kann (Abb. 1-6). In solch einem Szenario gilt sowohl für kurze als auch für lange Zeitintervalle [60, 105]:

$$\langle r^2(t) \rangle = \langle r_D^2 \rangle \left[ 1 - A_1 \exp \left( - \frac{4A_2 Dt}{\langle r_D^2 \rangle} \right) \right] \quad (1.6)$$

$A_1$  und  $A_2$  sind Konstanten, die durch die Geometrie der Domäne bestimmt sind.

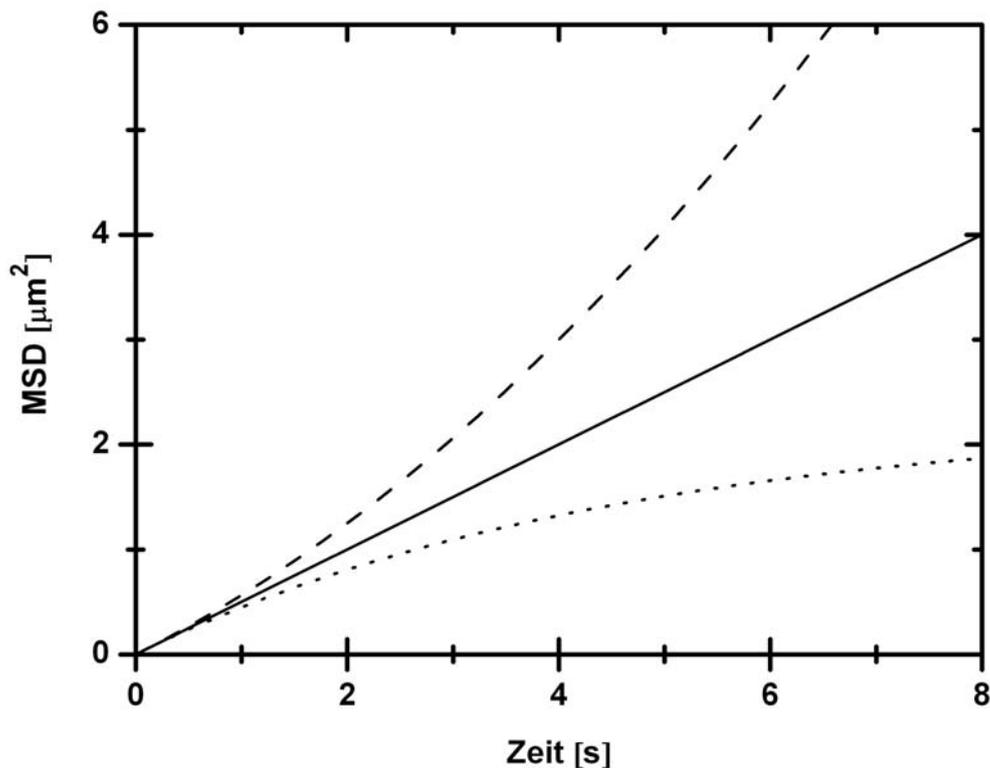


Abb. 1-6: Simuliertes mittleres Abstandsquadrat als eine Funktion der Zeit  $t$ .

Mit  $D = 0,123 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $v = 0,25 \mu\text{m}/\text{s}$ ,  $r_D = 1,5 \mu\text{m}$  und  $A_1 = A_2 = 1$ . Dargestellt sind normale Diffusion (–) nach Gl. 1.4, Diffusion mit gerichteter Bewegung (– –) nach Gl. 1.5 und räumlich eingeschränkte Bewegung (· ·) nach Gl. 1.6.

#### 1.4.1.3.2 Analyse der Sprungweitenverteilung

Die von Cherry *et al.* erarbeitete Methode basiert auf der Wahrscheinlichkeitsverteilung von Sprungweiten als Funktion von  $t$  und liefert das durchschnittliche Mobilitätsverhalten aller Partikel auf einer Zelle [90, 105, 108].

Eine Differenzierung unterschiedlicher Mobilitäten wird mit dieser Art von Datenbetrachtung ermöglicht. Von Vorteil ist, dass diese Methode selbst dann Rückschlüsse zulässt, wenn die Trajektorien relativ kurz sind, da die Daten von allen Beobachtungen gepoolt werden.  $p(r, t)dr$  ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Partikel ausgehend vom Startpunkt nach einer Zeit  $t$  in einem Kreisring mit dem Radius  $r$  und der Breite  $dr$  gefunden werden kann. Für die zufällige zweidimensionale Bewegung eines Moleküls mit einem Diffusionskoeffizienten  $D$  erhält man [107]:

$$p(r,t)dr = \frac{1}{4\pi Dt} \exp\left(-r^2/4Dt\right) 2\pi r dr \quad (1.7)$$

Um eine entsprechende Häufigkeitsverteilung zu erhalten, werden alle Sprungweiten innerhalb des Intervalls  $[r, r + dr]$  von allen beobachteten Trajektorien einer Zelle gezählt.

Wenn mehrere Mobilitätspopulationen vorliegen, muss Gl. 1.7 folgendermaßen erweitert werden:

$$p(r,t)dr = \sum_{j=1}^n \frac{Mf_j}{2D_j t} \exp\left(-r^2/4D_j t\right) r dr \quad (1.8)$$

$M$  ist die Anzahl an Sprüngen, die in der Analyse berücksichtigt werden, und  $f$  ist der Anteil der jeweiligen Molekülfraktion an der Gesamtmenge.

### 1.4.2 Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Bei der FCS handelt es sich um eine weitere biophysikalische Methode zur Detektion einzelner Moleküle. Sie erlaubt eine räumlich sowie zeitlich hochauflösende Analyse von niedrig konzentrierten Molekülen. Basis dieser Technik sind Intensitätsfluktuationen von einzelnen fluoreszierenden Molekülen innerhalb eines sehr kleinen konfokalen Volumenelements ( $\sim 1$  fl) und nicht, wie bei den meisten anderen fluoreszenzbasierten Mikroskopietechniken, die Emissionsintensität selber. Diese Fluktuationen reflektieren die durchschnittliche Anzahl von fluoreszenzmarkierten Molekülen im Volumenelement, wodurch ein direkter Rückschluss auf die Konzentration des jeweiligen Moleküls möglich wird. Weiterhin kann von der charakteristischen Diffusionszeit, die jedes Molekül benötigt, um den Fokus zu passieren, auf den Diffusionskoeffizienten geschlossen werden.

### 1.4.2.1 Das Fluoreszenzkorrelationsspektrometer

Das Fluoreszenzkorrelationsspektrometer (Abb. 1-7) basiert auf einem konfokalen Epifluoreszenzmikroskop. Laserlicht wird über eine Monomodefaser und nach Passieren eines Linsensystems rückwärtig in das Mikroskops eingekoppelt. Ein Bandpassfilter selektiert Licht mit der entsprechenden Anregungswellenlänge, welches dann über einen Dichromaten durch das Wasserimmersionsobjektiv (63x, 1,2 NA) in die Objektebene fokussiert wird. Das von den Probemolekülen emittierte Fluoreszenzlicht wird durch dasselbe Objektiv gesammelt und passiert dann den Dichromaten und einen Emissionsfilter, der das Anregungslicht des Lasers herausfiltert. Eine Linse fokussiert das Emissionslicht auf eine variable Lochblende (pinhole), die das Beobachtungsvolumen definiert. Eine weitere Linse fokussiert das Fluoreszenzlicht auf eine Avalanche-Photodiode (APD) im ‚single photon counting‘- Modus, wobei jedes auftreffende Photon einen lawinenartigen Strom in der APD erzeugt. Der Hardwarekorrelator generiert dann aus den TTL-Signalen der APD die Autokorrelationsfunktion in Echtzeit.

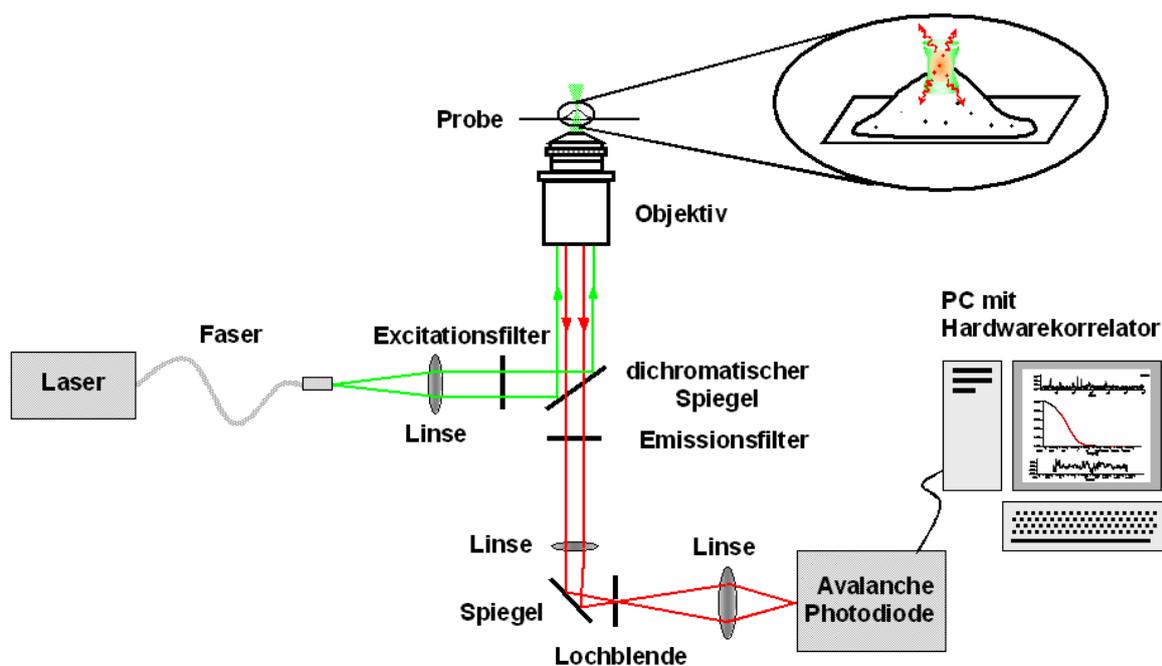


Abb. 1-7: Schematische Darstellung eines Fluoreszenzkorrelationsspektrometers.

### 1.4.2.2 Mathematischer Hintergrund

Die Fluoreszenz  $F(t)$ , emittiert von den Molekülen im Fokus, wird Photon für Photon aufgenommen. Bei konstanter Anregungsleistung ist die Fluktuation des Fluoreszenzsignals  $\delta F(t)$  definiert als die Abweichung vom zeitlichen Durchschnitt des Signals  $\langle F(t) \rangle$  [110]:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (1.9)$$

Die Autokorrelation  $G(\tau)$  der Fluktuationen der gemessenen Fluoreszenz führt zu folgender normalisierter Autokorrelationsfunktion (ACF):

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (1.10)$$

$\tau$  ist hier die Autokorrelationszeit. Ausgehend von einer ungehinderten dreidimensionalen Diffusion der fluoreszierenden Moleküle im gaußförmigen Detektionsvolumen mit den lateralen und axialen Radien  $\omega_0$  und  $z_0$  ergibt sich folgende ACF [111, 112]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \sqrt{\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 \tau/\tau_D}} \quad (1.11)$$

$N$  steht für die mittlere Anzahl an Teilchen im Detektionsvolumen.  $\tau_D$  ist die als Diffusionszeitkonstante bezeichnete mittlere Passagezeit des Fluorophors durch das Beobachtungsvolumen.

Der dynamische Diffusionskoeffizient  $D$  fließt über folgenden Zusammenhang in die ACF mit ein:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (1.12)$$

Betrachtet man Prozesse wie die lateral Diffusion eines Rezeptors in einer Membran, so vereinfacht sich aufgrund der nunmehr anzunehmenden Zweidimensionalität ( $z_0 \rightarrow \infty$ ) Gl. 1.11 zu:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \quad (1.13)$$

Die bisherigen Betrachtungen gelten nur für Prozesse, in denen sich die fluoreszierenden Moleküle mit ein und derselben Geschwindigkeit bewegen.

Spielen mehrere in verschiedenen Geschwindigkeiten frei diffundierende Komponenten eine Rolle, so kann die ACF um entsprechende Terme erweitert werden. Es gilt dann:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{j=1}^n Q_j^2 N_j}{\left[ \sum_{j=1}^n Q_j N_j \right]^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_{Dj}} \sqrt{\frac{1}{1 + (\omega_0/z_0)^2 \tau/\tau_{Dj}}} \quad (1.14)$$

mit  $Q_j = \sigma_j \eta_j g_j$ .

$Q_j$  ist der Korrekturfaktor für die Quantenausbeute der Komponente  $j$ , über den die absolute Quantenausbeute jeder einzelnen Komponente in die Autokorrelation einbezogen wird.  $\sigma_j$  ist der Absorptionskoeffizient,  $\eta_j$  die Fluoreszenzquantenausbeute und  $g_j$  die Detektionseffizienz der Komponente  $j$ .

Betrachtet man wiederum ein zweidimensionales System, so ist folgende Vereinfachung von Gl. 1.14 zulässig:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{j=1}^n Q_j^2 N_j}{\left[ \sum_{j=1}^n Q_j N_j \right]^2} \frac{1}{1 + \tau/\tau_{D_j}} \quad (1.15)$$

Um in einem Mehrkomponentensystem eine Unterscheidung der einzelnen Molekelpopulationen zu ermöglichen, müssen ihre Diffusionskoeffizienten ausreichend weit auseinander liegen. Der Einfluss diverser physikalischer Kenngrößen auf den Diffusionskoeffizienten eines sphärischen Moleküls kann durch die Stokes-Einstein-Beziehung beschrieben werden:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_h} \quad (1.16)$$

wobei  $k$  die Boltzmannkonstante mit  $1,38 \times 10^{-23}$  J/K,  $T$  die absolute Temperatur,  $\eta$  die Viskosität des umgebenden Mediums und  $r_h$  der hydrodynamische Radius des Moleküls ist. Eine Vergrößerung des hydrodynamischen Radius führt somit zu einer Verkleinerung des Diffusionskoeffizienten. In einem physikalisch inerten Molekül kann die Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius von der Molekülmasse  $m$  folgendermaßen beschrieben werden:

$$r_h = \sqrt[3]{\frac{3m/N_A}{4\pi\rho}} \quad (1.17)$$

$N_A$  ist die Avogadro-Konstante mit  $6,023 \times 10^{23}$  mol<sup>-1</sup> und  $\rho$  die mittlere Dichte des Moleküls. Aus Gl. 1.12, 1.16 und 1.17 ergibt sich somit folgende Abhängigkeit für die Diffusionszeitkonstante von der Molekülmasse:

$$\tau_D \sim \sqrt[3]{m} \tag{1.18}$$

Für eine Verdopplung der Diffusionszeitkonstante ist somit eine Verachtfachung der Molekülmasse erforderlich, wobei dies jedoch für eine Diskriminierung unterschiedlicher Moleküle nicht zwingend erforderlich ist.

## 2 Zielsetzung

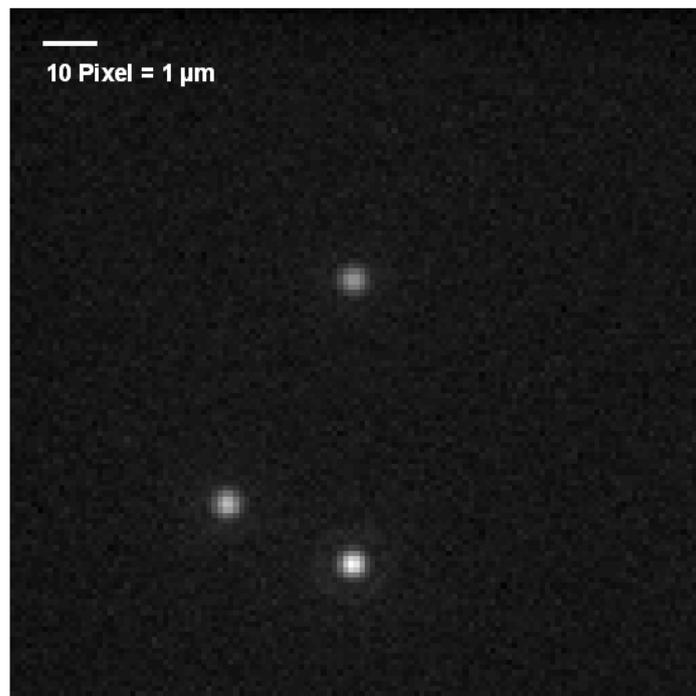
Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Bewegungsprofils von einzelnen  $\beta_2$ AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexen in der Membran von A549-Zellen. Dabei sollen erstmalig die Mobilitäten dieser Komplexe in der Plasmamembran zweidimensional visualisiert und die Bewegungspfade über den Diffusionskoeffizienten hinaus exakt beschrieben werden. Nach Definition der vorkommenden Rezeptorzustände soll in der Folge der Einfluss unterschiedlicher Testsubstanzen auf die Mobilität der Rezeptor-Ligand-Komplexe untersucht werden. So soll das veränderte Bewegungsverhalten der verschiedenen Rezeptorzustände, sowohl beeinflusst durch einen starken agonistischen Stimulus mit Terbutalin als auch durch eine Unterbrechung der Signaltransduktion mit Cholera toxin, charakterisiert werden. Zur Anwendung kommt insbesondere die Einzelmolekülmikroskopie. An ein Fluoreszenzmikroskop mit Sensitivität im Einzelmolekülbereich ist die Anforderung einer räumlichen Auflösung im niedrigen zweistelligen Nanometerbereich sowie einer im Millisekundenbereich angesiedelten maximalen zeitlichen Auflösung zu stellen. Da dies bislang von kommerziell verfügbaren Geräten nicht erfüllt werden kann, ist der Bau eines entsprechenden Fluoreszenzmikroskops mit Weitfeldoptik, Laserillumination und hochsensitiver EMCCD-Detektion unbedingte Voraussetzung für diese Arbeit. Nach Realisierung der instrumentellen Basis soll der Fokus zunächst auf der Etablierung eines Assays liegen, der die Detektion und Verfolgung von einzelnen Molekülen in der Plasmamembran von lebenden Zellen ermöglicht. Die gut etablierte Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wird als ergänzende Technik verwendet. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Vergleich der Erkenntnisse aus einzelmolekülmikroskopischen Experimenten mit Ergebnissen aus fluoreszenzkorrelationsspektroskopischen Untersuchungen.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Einzelmolekülmikroskopie

#### 3.1.1 Bestimmung der Lokalisierungs Genauigkeit

Die mechanische Stabilität des Einzelmolekülmikroskops ist unbedingte Voraussetzung für die Verfolgung einzelner Moleküle. Durch die Verwendung eines schwingungsfreien Tisches für das Mikroskop und eines optimal gedämpften Breadboards für die übrigen Gerätekomponenten, ist allein der Probenstisch der kritische Parameter für die Stabilität des Mikroskops. Des Weiteren ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR) ein entscheidender Faktor für die Genauigkeit, mit der Moleküle lokalisiert werden können. Die Objektposition, die durch Annäherung einer zweidimensionalen Gaußfunktion an die PSF eines Moleküls gefunden wird (siehe Kap. 1.4.1.2.2), ist, bedingt durch das Poisson-Rauschen der Lichtemission, lediglich ein Schätzwert für die wahre Objektposition. Die Lokalisierungs Genauigkeit wird definiert als die Distanz von der Objektposition, innerhalb der die wahre Position mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,68 liegt, was sinngemäß der üblichen Standardabweichung entspricht [92]. Um zu bestimmen, wie exakt die Lokalisierung einzelner Moleküle mit dem hier verwendeten Mikroskopaufbau und unter den definierten Einstellungen für die Intensität des Anregungslichts, die Signalverstärkung, die Illuminationszeit und die Ausleserate ist, wurden fluoreszierende Kügelchen (sog. Nanobeads) auf einem Deckglas immobilisiert (Abb. 3-1, Kap. 6.3.1). Diese Nanobeads haben einen Durchmesser von  $0,175 (\pm 0,005) \mu\text{m}$  und somit eine Größe, die unterhalb der Auflösungsgrenze von 280 nm liegt (siehe Kap. 1.4.1.2.1). Die Konzentration wurde so gewählt, dass sich in der Regel nicht mehr als fünf Nanobeads im Bildfeld der Kamera befanden.



**Abb. 3-1: Nanobeads immobilisiert auf einem Deckglas.**

Aufnahmebedingungen: 5 ms Illuminationszeit, 0,94 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung. Bildfeldgröße: 128x128 Pixel.

Zur Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit wurden die immobilisierten Nanobeads wiederholt abgelichtet. Nach Lokalisierung der beugungsbegrenzten Signale einer Bilderserie mit 1000 Bildern wurde für jedes Nanobead ein Mittelwert aus allen Positionen bestimmt. Die Standardabweichung von diesem Mittelwert ergab dann eine Lokalisierungsgenauigkeit von 15 nm ( $n = 11$ , siehe Kap. 6.3.7.3). Unter den verwendeten Aufnahmebedingungen ergab sich für die Nanobeads ein SNR von 15.

### 3.1.2 Zelllinie und Ligand

Da in dieser Arbeit das Bewegungsprofil des  $\beta_2$ AR beschrieben werden soll, muss eine Zelllinie zum Einsatz kommen, die diesen Rezeptor nativ auf ihrer Plasmamembran exprimiert. Die hier verwendete humane Lungenkarzinom-Zelllinie A549 stellt ein gut

charakterisiertes Modell für Typ II Alveolarepithelzellen (AT-II) dar [113]. Die Expression des  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen ist insbesondere von der Zelldichte und der Zeit abhängig, die seit der letzten Subkultivierung vergangen ist. Reproduzierbare Bindungsdaten können an Tag 3 und 4 nach Subkultivierung bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90 % erreicht werden. Die Komplikation, dass die Expression des  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen von der Zelldichte abhängt, wird in der Literatur beschrieben [114]. Der mittels FCS bereits bestimmten  $\beta_2$ AR-Dichte auf A549-Zellen von etwa 20 Rezeptoren/ $\mu\text{m}^2$  [3] stehen Literaturangaben wie 139 Rezeptoren/Zelle [115] entgegen. In weiteren Publikationen wird den A549-Zellen meistens eine sehr geringe Expressionsrate für den  $\beta_2$ AR im Vergleich zu anderen Lungenepithel-Zelllinien zugeordnet [116, 117]. Außerdem wird zusätzlich schwach ausgeprägt der  $\beta_1$ AR auf A549-Zellen exprimiert [116]. Die erzeugten Daten von verschiedenen Versuchstagen zeigten eine ausgeprägte Variabilität, weshalb Normierungen unumgänglich waren und sich relativ große Standardabweichungen ergaben. Ein generelles Problem bei der Arbeit mit lebenden Zellen ist, dass die Schwankungen von Zelle zu Zelle erheblich sein können und es deshalb schwer ist, signifikante Änderungen zu quantifizieren. Dies mag daran liegen, dass regulatorische Prozesse nicht innerhalb jeder Zelle in Kultur zeitgleich ablaufen, eine Synchronisation der Ereignisse jedoch nur schwer zu realisieren ist.

Für die mikroskopische Detektion des  $\beta_2$ AR wurde der fluoreszenzmarkierte Agonist Noradrenalin (NA) verwendet. NA ist ein körpereigenes Katecholamin, welches als Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems fungiert und agonistisch am adrenergen Rezeptorsystem bindet. Die Markierung des Liganden erfolgte mit dem hydrophilen Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup> 532 (Alexa532), der sich durch hohe Quantenausbeute und Photostabilität auszeichnet. Das Absorptions- und Fluoreszenz-emissionsspektrum für Alexa532 sind in Abb. 3-2 dargestellt [118].

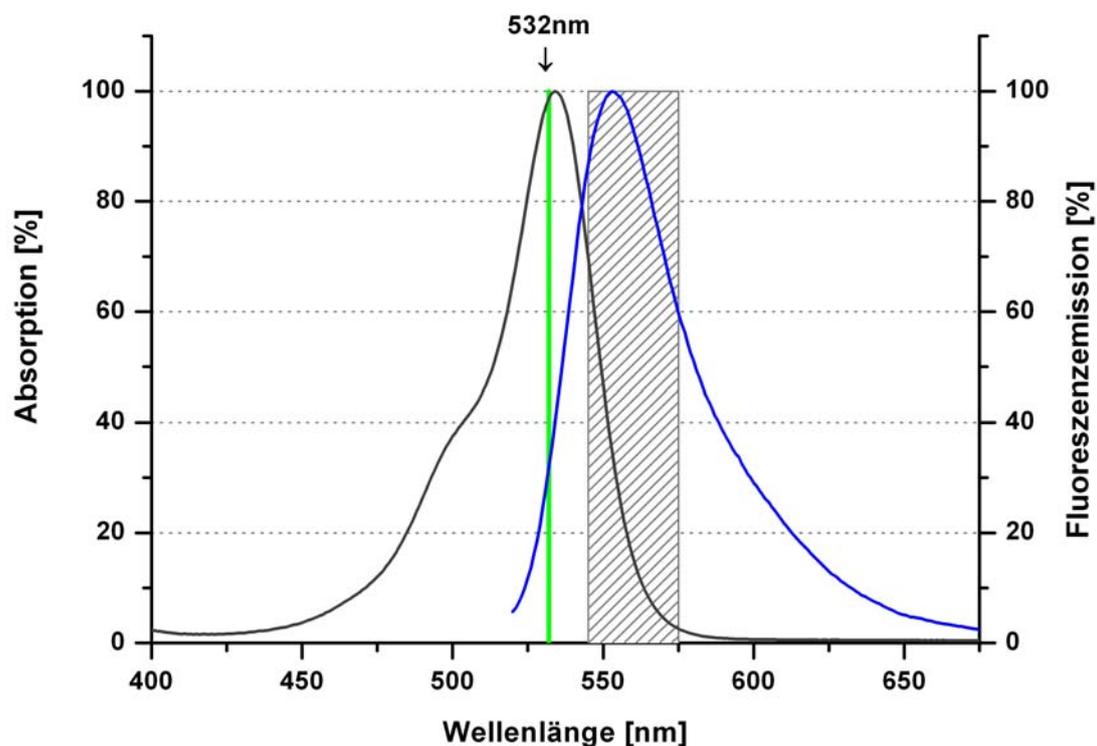


Abb. 3-2: Spektrale Eigenschaften von Alexa Fluor® 532.

Absorptionspektrum (schwarze Kurve) und Fluoreszenzemissionsspektrum (blaue Kurve) von Alexa Fluor® 532. Die grüne Linie markiert die Anregungswellenlänge des Lasers mit 532 nm. Der grau schraffierte Bereich umfasst den Wellenlängenbereich, der den Emissionsfilter (560/30) passieren kann.

Alexa532 konnte schon verschiedentlich seine gute Eignung als Fluorophor für Lebendzellmessungen auf Einzelmolekülebene unter Beweis stellen. Sowohl gekoppelt an ein Benzodiazepin [119] als auch an einen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoragonisten [120] beeinflusste Alexa532 die Effektivität der Bindung des Liganden an seinen jeweiligen Rezeptor nicht wesentlich. Unspezifische Bindung dieser Liganden an die lipophile Biomembran war ebenso wenig detektierbar. Die Synthese des Alexa532 gekoppelten NA (Alexa-NA) wurde ausführlich beschrieben [3, 121, 122]. Alexa532, als aktivierter Succinimidylester vorliegend, reagiert dabei mit dem primären Amin des NA, was als Ergebnis das in Abb. 3-3 wiedergegebene Reaktionsprodukt Alexa-NA liefert.

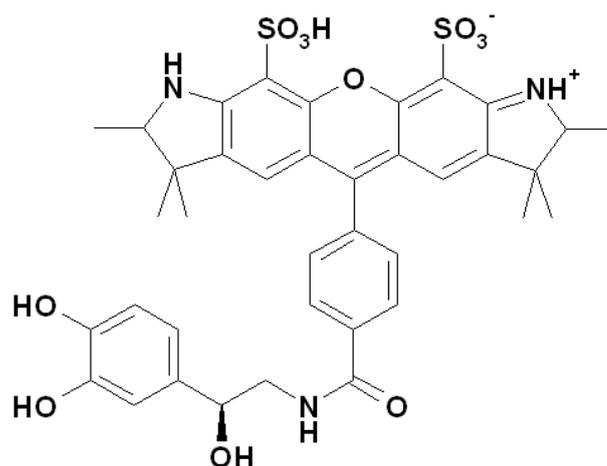
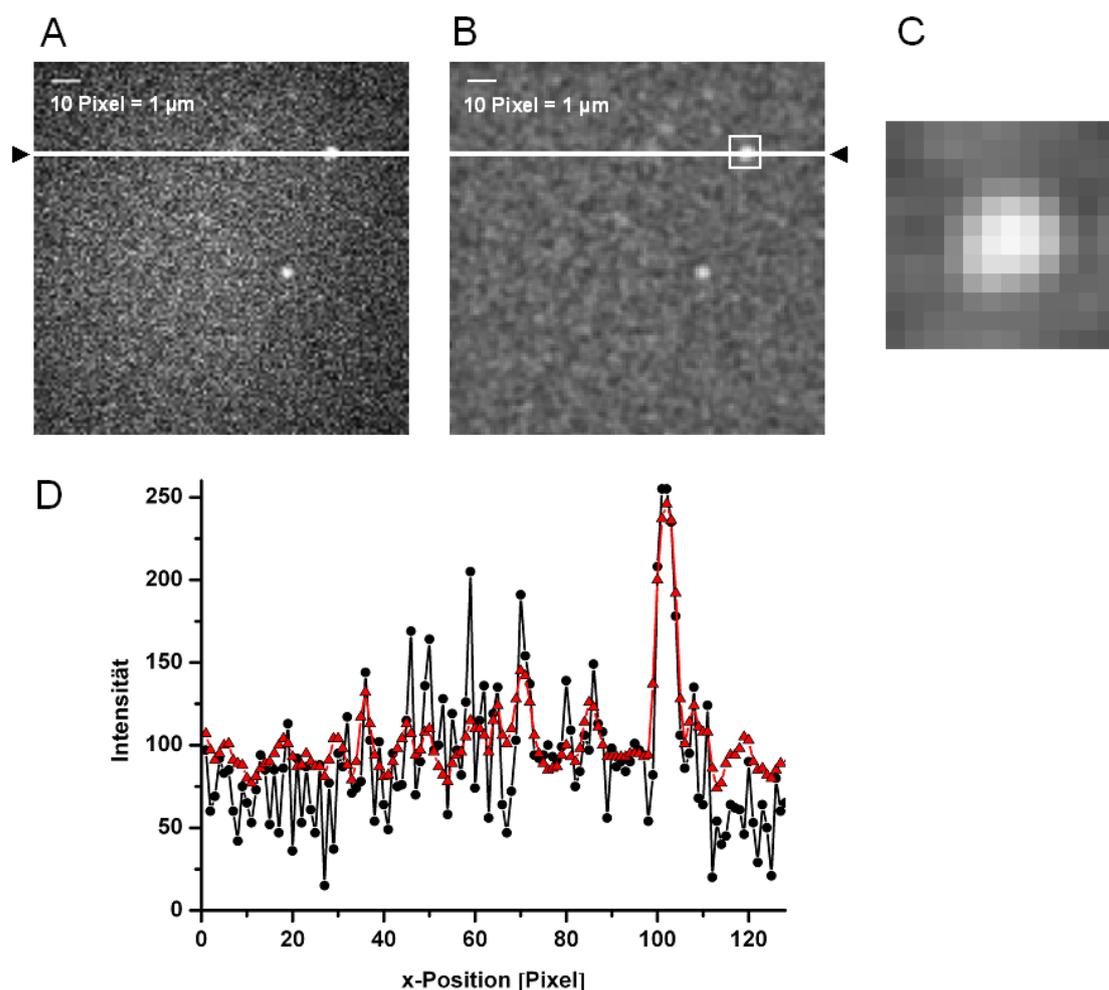


Abb. 3-3: Alexa Fluor® 532 gekoppelt an Noradrenalin.

Alexa-NA ist ein bezüglich seiner Bindungseigenschaften sehr gut charakterisierter Ligand. Insbesondere wurde der Nachweis erbracht, dass die Einführung des voluminösen Farbstoffsubstituenten am NA zu einer Verschiebung der ursprünglichen  $\beta_1$ -Präferenz zu einer  $\beta_2$ -Präferenz führt. Erstmals fand Alexa-NA Verwendung für FCS-Messungen an hippocampalen Neuronen und an den ebenfalls hier verwendeten A549-Zellen [3, 121]. Mittels Sättigungs- und Konkurrenzexperimenten konnte die Spezifität für den  $\beta_2$ AR gezeigt werden, welche später an C6-Glioblastomzellen verifiziert werden konnte [4, 122]. Des Weiteren konnte durch entsprechende cAMP-Bestimmungen das agonistische Profil von Alexa-NA bestätigt werden [4, 122].

Die Immobilisierung des Liganden auf einem Deckglas führte zu dem in Abb. 3-4 A gezeigten Originalbild. Für die in dieser Arbeit folgenden Darstellungen wurden die Bilder kontrastverstärkt und mit einem Filter geglättet, der Strukturen kleiner als 2 Pixel und größer als 20 Pixel herausfiltert. Das gefilterte Bild des immobilisierten Liganden ist in Abb. 3-4 B dargestellt. Die Vergrößerung eines einzelnen Alexa-NA-Moleküls zeigt Abb. 3-4 C. Die Intensitätsprofile (Abb. 3-4 D) durch die markierten Positionen in (A) und (B) veranschaulichen, dass eine eindeutige Identifizierung der einzelnen Alexa-NA-

Moleküle möglich ist. Zudem wird durch den Profilvergleich ersichtlich, dass durch die Bearbeitung des Originalbildes die Schwankungen im Hintergrundsignal minimiert werden, was eine Erhöhung des SNR zur Folge hat. Unter den gewählten Aufnahmebedingungen ergab sich ein SNR von 1,4 und die Lokalisierungsgenauigkeit konnte mit etwa 27 nm bestimmt werden ( $n = 15$ ).



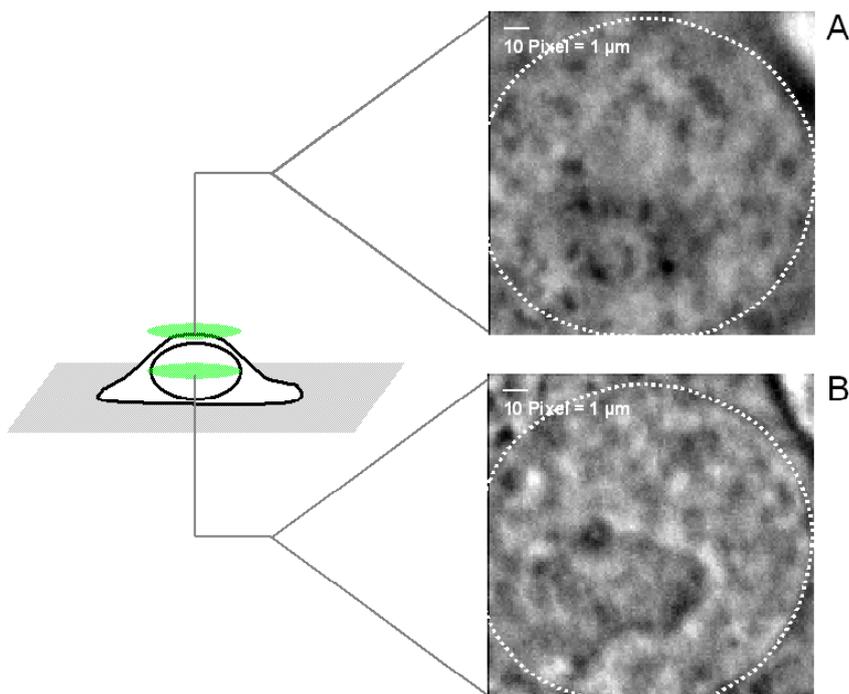
**Abb. 3-4: Alexa-NA immobilisiert auf einem Deckglas.**

(A) Fluoreszenzbild und (B) gefiltertes Bild von 0,01 pM immobilisiertem Alexa-NA, Bildfeldgröße: 128x128 Pixel. (C) Vergrößerung eines Einzelmoleküls (weißes Quadrat in (B)), Bildfeldgröße: 12x12 Pixel. (D) Intensitätsprofile durch die in (A) und (B) durch Pfeile markierte Position, ungefilterte Daten (●), gefilterte Daten (▲). Aufnahmebedingungen: 50 ms Illuminationszeit, 1,87 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung, elektronische Signalverstärkung (Gain) 220.

### 3.1.3 Detektion einzelner $\beta_2$ AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexe auf der Plasmamembran lebender A549-Zellen

Um die Detektion einzelner  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe auf der Plasmamembran lebender Zellen zu ermöglichen, ist eine geringe Konzentration der fluoreszierenden Moleküle entscheidend. Eine niedrige Ligandkonzentration verbessert einerseits das SNR, andererseits wird die Verfolgung einzelner Partikel durch die eindeutige Zuordnung zu bestimmten Trajektorien erleichtert.

Die Lokalisierung des Fokus in der oberen Zellmembran von A549-Zellen wurde im Durchlicht überprüft (Abb. 3-5).



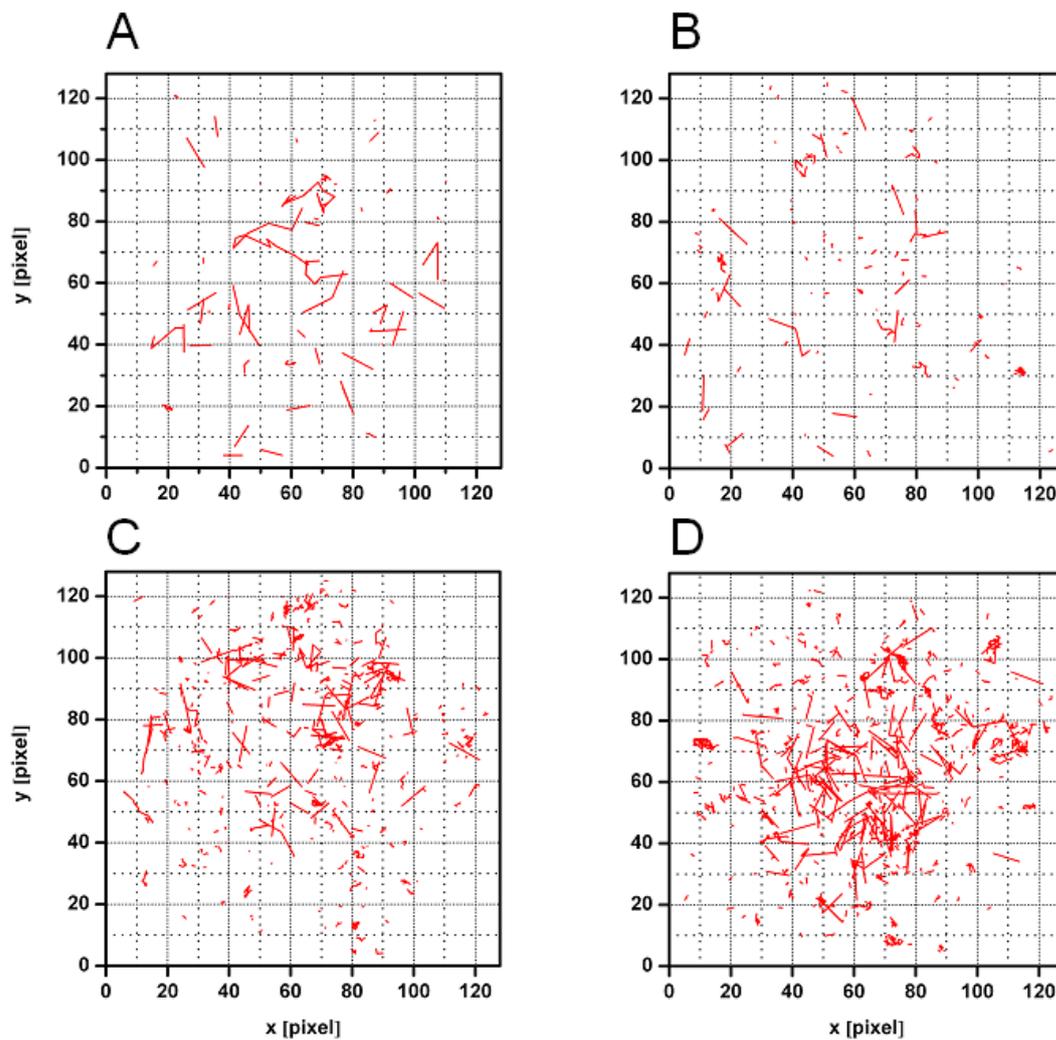
**Abb. 3-5: Durchlichtaufnahmen von verschiedenen Fokuspositionen einer A549-Zelle.**

Positionierung (A) auf der oberen Plasmamembran, (B) im Zellkern. Die gestrichelte weiße Linie markiert die Zellkernmembran.

Zunächst wurde auf den Zellkern einer Zelle fokussiert (Abb. 3-5 B) und der Fokus dann soweit nach oben verschoben, dass die diffusen Strukturen der Zellmembran noch gerade eben erkannt werden konnten (Abb. 3-5 A). Durch die anschließende Betrachtung des Fluoreszenzbildes, war eine Feinjustierung der Fokusposition möglich.

Auf unbehandelten Kontrollzellen wurden im Einzelmolekülmikroskop autofluoreszierende Partikel detektiert. Bei einer Wellenlänge von 532 nm werden insbesondere Flavine und Flavoproteine, die in die Plasmamembran eingebettet sind, angeregt [123]. Die entstehenden Molekülpfade waren jedoch von sehr geringer Quantität (Abb. 3-6 A, Negativkontrolle, 51 Trajektorien).

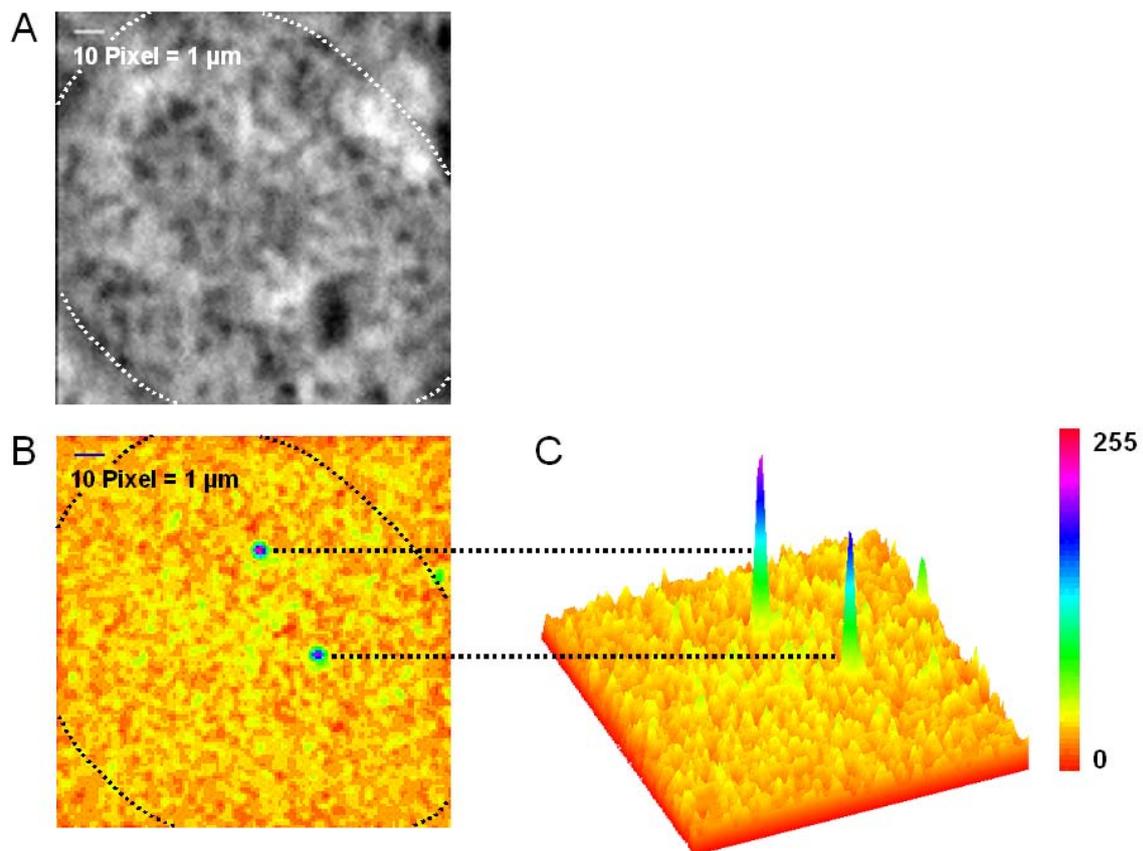
Zur Bestimmung der optimalen Ligandkonzentration wurden A549-Zellen mit steigenden Konzentrationen Alexa-NA inkubiert, woraus ein Anstieg der Ligandbindung und somit eine Zunahme an detektierbaren Einzelmolekülpfaden resultierte. Eine Inkubation mit 0,1 nM Alexa-NA ergab im Vergleich zur Negativkontrolle etwa doppelt so viele Trajektorien (Abb. 3-6 B, 112 Trajektorien). Die Inkubation mit 0,5 nM Alexa-NA lieferte eine Trajektorienanzahl, die sich quantitativ deutlich von den aus Autofluoreszenz stammenden Trajektorien abhob (Abb. 3-6 C, 365 Trajektorien). Die Inkubation mit 1 nM Alexa-NA (Abb. 3-6 D, 513 Trajektorien) ergab eine Vielzahl räumlich naher Signale, deren Zuordnung zu individuellen Molekülpfaden durch das automatische Tracking-Programm kaum zu bewältigen war. Bei der Plausibilitätsprüfung jeder Einzeltrajektorie fielen hier besonders viele falsch verbundene Molekülpfade auf. Als Konsequenz aus diesem Versuchsteil ergab sich eine ausschließliche Verwendung von 0,5 nM Alexa-NA für die sich anschließende Verfolgung von Einzelmolekülen.



**Abb. 3-6: Zweidimensionale Darstellung aller Trajektorien einer A549-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Alexa-NA-Konzentrationen.**

(A) Autofluoreszenz ohne Alexa-NA, 20 min Inkubation mit (B) 0,1 nM, (C) 0,5 nM, (D) 1 nM Alexa-NA. Aufnahmenbedingungen: 50 ms Illuminationszeit, 10 Hz Bildwiederholungsrate, 0,95 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung, Gain 100, 2000 Bilder.

Nach Inkubation der A549-Zellen mit 0,5 nM Alexa-NA, konnten auf der Plasmamembran beugungsbegrenzte Fluoreszenzsignale detektiert werden (Abb. 3-7 B, C). Diese Signale waren in ihrer Intensität vergleichbar mit den Signalen einzelner Alexa-NA-Moleküle immobilisiert auf einem Deckglas (siehe Abb. 3-4 D). Zur räumlichen Orientierung ist in Abb. 3-7 A die entsprechende Zelle als Durchlichtbild dargestellt.



**Abb. 3-7: Beugungsbegrenzte Fluoreszenzsignale auf A549-Zellen.**

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min. (A) Durchlichtbild einer A549-Zelle mit weißer Zellkernumrandung. (B,C) Fluoreszenzbild der Zelle aus (A) mit zwei Einzelmolekülsignalen auf der Plasmamembran. (B) 2D-Darstellung mit schwarzer Zellkernumrandung, (C) 3D-Darstellung mit Intensitätsskala. Bildfeldgröße: 128x128 Pixel. Aufnahmebedingungen: 50 ms Illuminationszeit, 0,94 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung, Gain 130.

Die Fluoreszenzsignale zeigten eine einstufige Photobleichung (single-step photobleaching), welche beispielhaft für einen individuellen Rezeptor-Ligand-Komplex in Abb. 3-8 dargestellt ist. Diese Art der Fluorophorbleichung ist typisch für einzelne fluoreszierende Moleküle. Eine mehrstufige Fluoreszenzabnahme, die das Ergebnis von oligomerisierten fluoreszierenden Molekülen wäre, konnte nicht gefunden werden.

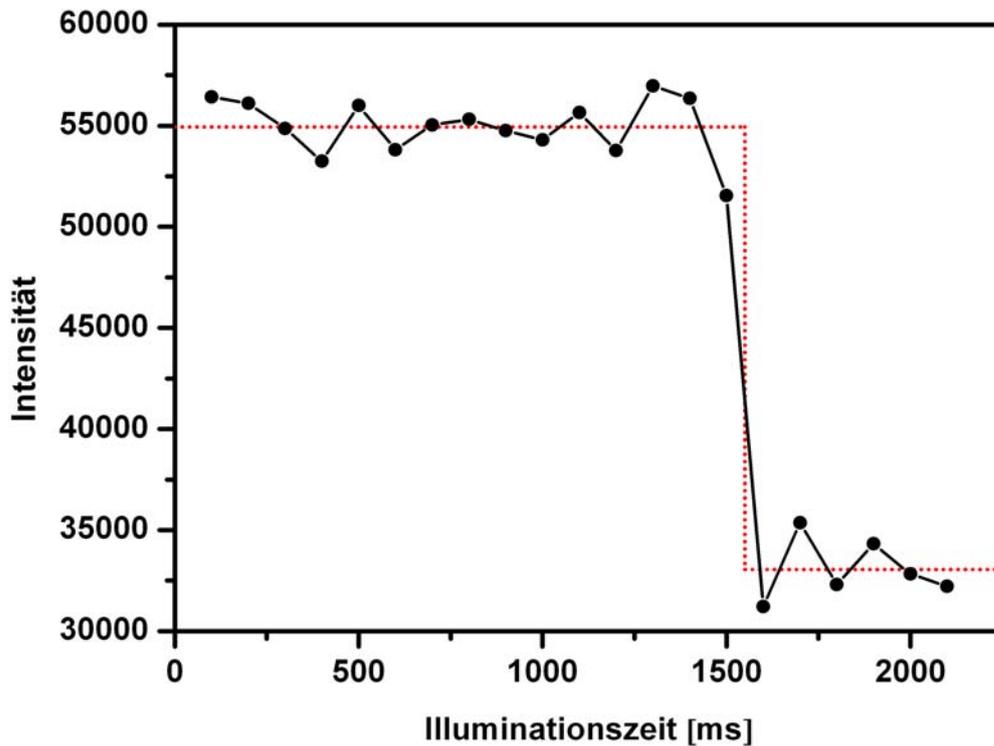


Abb. 3-8: Einstufige Photobleichung eines individuellen  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexes.

Aufnahmebedingungen: 50 ms Illuminationszeit, 10 Hz Bildwiederholungsrate, 0,94 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung, Gain 130.

Die konzentrationsabhängige Zunahme der Trajektorienzahl sowie die gute Detektierbarkeit intensitätsstarker, beugungsbegrenzter Fluoreszenzsignale und die einstufige Photobleichung führten zu dem Schluss, dass es sich bei den auf der Plasmamembran von A549-Zellen detektierten Signalen um einzelne gebundene Alexa-NA-Moleküle handelt.

Um eine Aussage über die Spezifität der Bindung von Alexa-NA an die Plasmamembran von A549-Zellen treffen zu können, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt (Abb. 3-9).

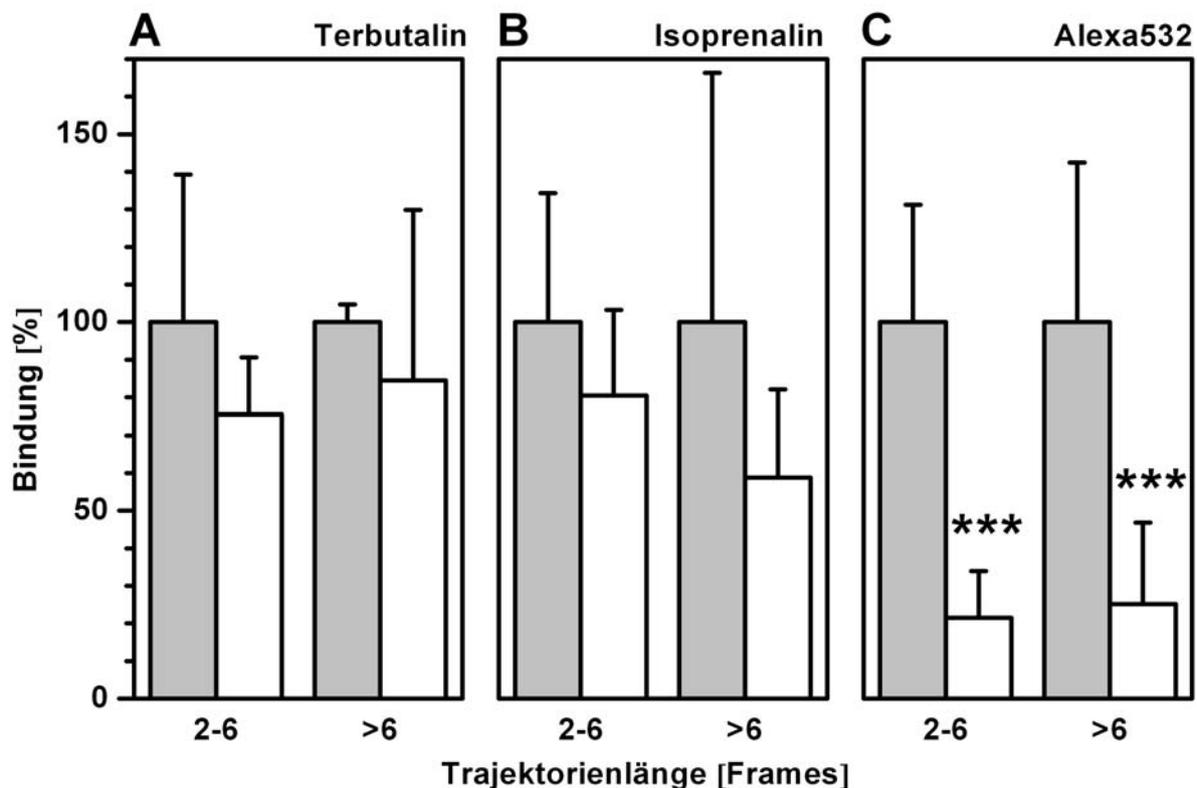


Abb. 3-9: Unspezifische Bindung von Alexa-NA und Alexa532.

Bindung von 0,5 nM Alexa-NA in Abhängigkeit von der Trajektorienlänge vor (grau) und nach (weiß) Verdrängung mit (A) 10  $\mu$ M Terbutalin 1 h ( $n = 3$ ), (B) 10  $\mu$ M Isoprenalin 1 h ( $n = 3$ ) und (C) Bindung von 0,5 nM Alexa-NA (grau) im Vergleich zu 0,5 nM Alexa532 (weiß) ( $n = 10$ ); ( $p^{***} \leq 0,001$ ).

Durch Verdrängung der Bindung von 0,5 nM Alexa-NA an A549-Zellen mit 10  $\mu$ M des  $\beta_2$ -selektiven Agonisten Terbutalin bzw. 10  $\mu$ M des  $\beta_1/\beta_2$ -unselektiven Agonisten Isoprenalin konnte eine Restbindung in Höhe von 76,5 ( $\pm 15,9$ ) % bzw. 79,0 ( $\pm 20,6$ ) % detektiert werden. Die differenzierte Betrachtung der Trajektorienabnahme in Abhängigkeit von der Trajektorienlänge zeigte, dass Isoprenalin, nicht aber Terbutalin, bevorzugt lange Trajektorien mit mehr als sechs Frames (Einzelbilder einer Serie) verdrängte (Abb. 3-9 A und B). Die Unterschiede fielen jedoch in keinem Fall signifikant aus. Die nach der Verdrängung verbliebenen Trajektorien unterschieden sich weder im Diffusionsverhalten noch in der Trajektorienlängenverteilung auffällig von Trajektorien, die vor der Verdrängung detektiert wurden. Zur Überprüfung, ob die Restbindung auf

den A549-Zellen ein Ergebnis unspezifischer Bindung des Liganden über den Farbstoff Alexa532 war, wurden Inkubationen mit 0,5 nM des reinen Farbstoffs durchgeführt. Die detektierbaren Trajektorien betrug lediglich 21,9 ( $\pm 13,2$ ) % im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen. Lange wie kurze Trajektorien konnten gleichermaßen gefunden werden (Abb. 3-9 C). Damit ergab sich eine signifikant geringere Bindung des reinen Farbstoffes gegenüber der Bindung des Liganden.

### 3.1.4 Bewegungsverhalten des $\beta_2$ AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexes

Um Aussagen über das Mobilitätsverhalten des Rezeptor-Ligand-Komplexes treffen zu können, wurden A549-Zellen mit Alexa-NA inkubiert. Nach Positionierung des Fokus auf die obere Zellmembran wurden Bilderserien aufgenommen. Die einzelnen fluoreszierenden Moleküle wurden lokalisiert und die jeweils zu einer Trajektorie gehörenden Positionen in der Bilderserie miteinander verbunden.

Über die Betrachtung der Länge der entstandenen Trajektorien können Aussagen über die Existenzdauer des Rezeptor-Ligand-Komplexes auf der Plasmamembran getroffen werden. Bezüglich Trajektorienlänge und somit Existenzdauer der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe zeigte sich mit einer Variationsbreite von einigen Millisekunden bis Sekunden ein sehr inhomogenes Bild. Im Mittel konnten die Einzelmolekülereignisse über 3,5 Frames beobachtet werden und die Trajektorien waren somit vornehmlich kurz. 57,3 % der Trajektorien waren nur in zwei Frames zu sehen, was bei einer Illuminationszeit von 50 ms und einer Verzögerungszeit von 50 ms bedeutet, dass diese Trajektorien lediglich 150 ms bis maximal 200 ms lang existent waren. Für die Existenzdauer des Rezeptor-Ligand-Komplexes ergaben sich aus der Häufigkeitsverteilung der Trajektorienlängen (Abb. 3-10) zwei Zeitkonstanten ( $\tau$ ).  $\tau_1 = 66,4 (\pm 1,0)$  ms ergab sich zu 97,1 ( $\pm 3,1$ ) % und  $\tau_2 = 265,4 (\pm 7,2)$  ms zu 2,9 ( $\pm 0,2$ ) %.

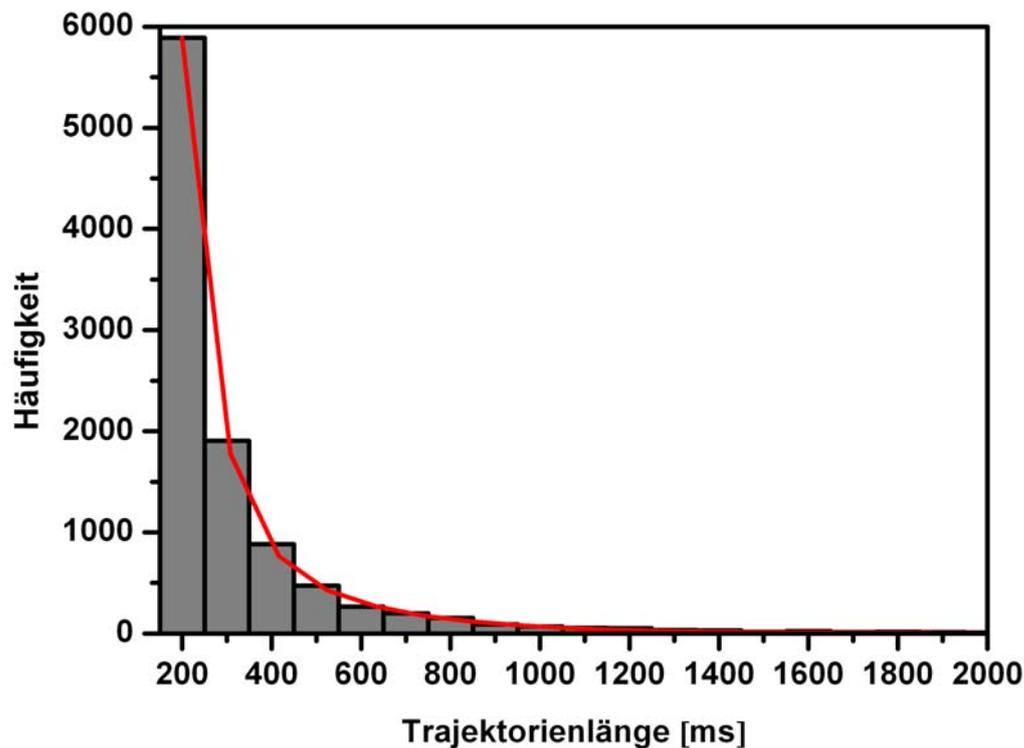
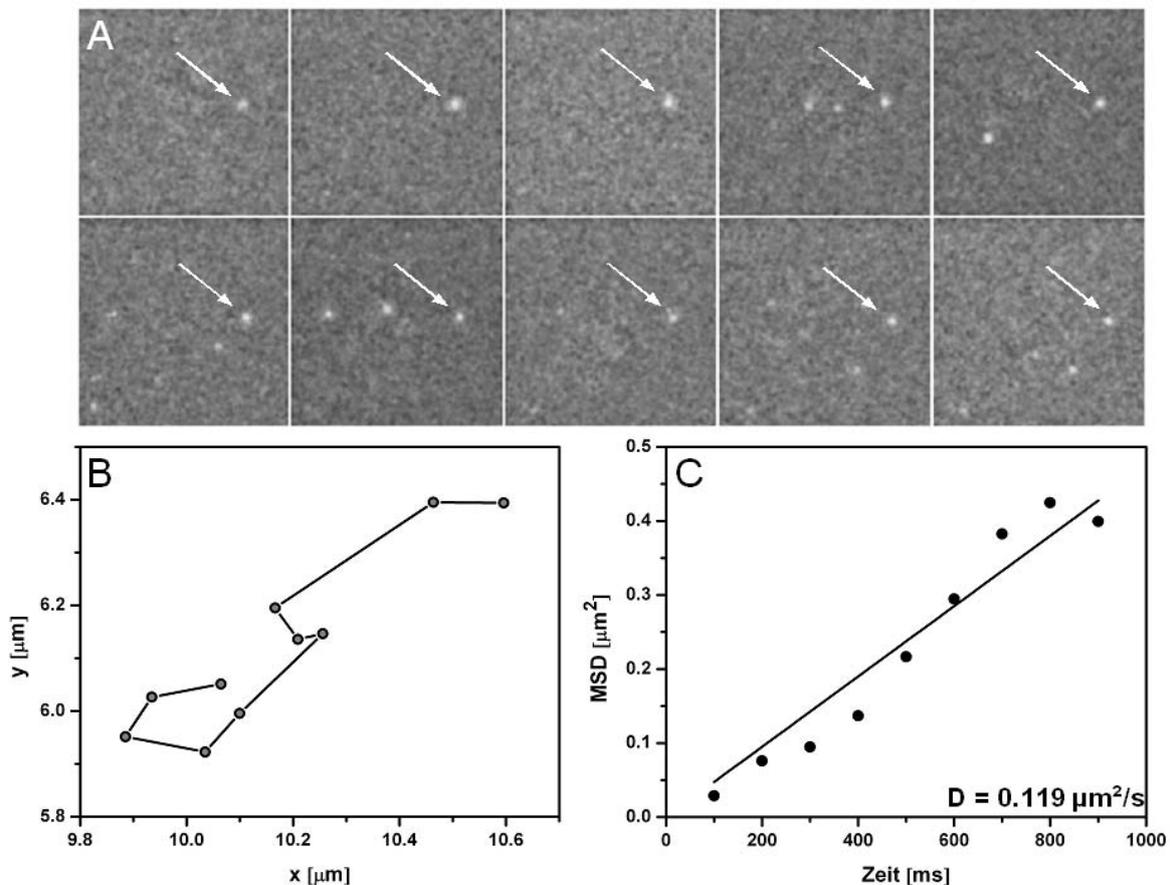


Abb. 3-10: Häufigkeitsverteilung der Trajektorienlängen von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 20 min ( $n = 24$ ). Die biexponentielle Kurvenanpassung ergab zwei Zeitkonstanten mit  $\tau_1 = 66,4 (\pm 1,0)$  ms zu 97,1 ( $\pm 3,1$ ) % und  $\tau_2 = 265,4 (\pm 7,2)$  ms zu 2,9 ( $\pm 0,2$ ) %.

In der Folge war zu erwarten, dass eine Datenauswertung mittels MSD erschwert sein würde, da diese Art der Einzeltrajektorienbetrachtung nur für längere Molekülpfade sinnvoll ist. Ausgehend von dem Anspruch, dass eine statistisch gut abgesicherte MSD-Analyse auf mindestens fünf Datenpunkten basieren sollte, die jeweils aus einer Mittelung von mindestens zwei Abstandsquadraten resultieren, waren Trajektorien mit mindestens sechs Einzelsprüngen vorauszusetzen. Im Mittel waren lediglich 8,4 % der Trajektorien mindestens sechs Sprünge lang und damit einer aussagekräftigen MSD-Analyse zugänglich. Exemplarisch sind die einzelnen Bilder einer typischen Trajektorie in Abb. 3-11 A dargestellt. Der abgebildete  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplex konnte in zehn aufeinanderfolgenden Bildern beobachtet werden.



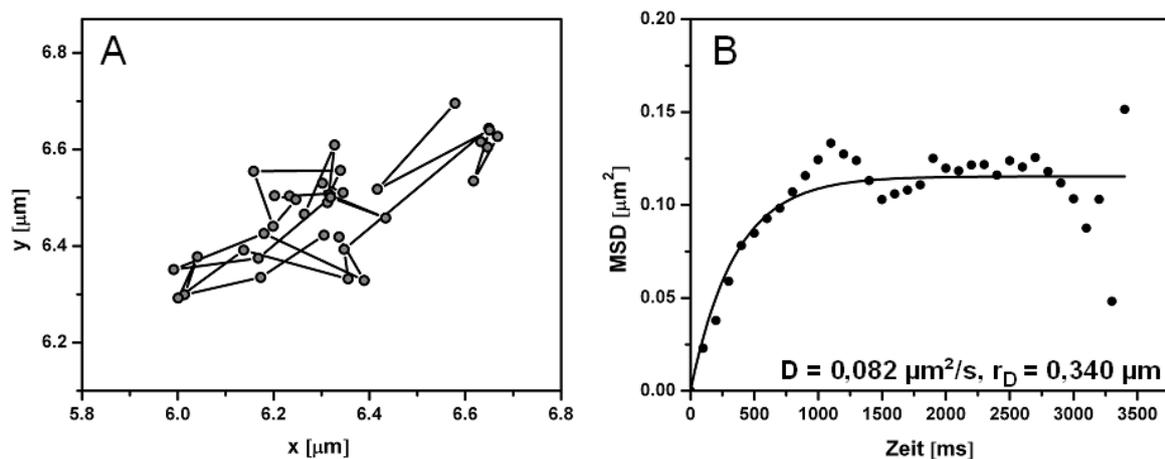
**Abb. 3-11: Einzeltrajektorienanalyse eines  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexes mit nahezu ungehinderter lateraler Diffusion.**

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 20 min. (A) Einzelbilder eines Rezeptor-Ligand-Komplexes. Die weißen Pfeile markieren die jeweilige Position. Bildfeldgröße: 128x128 Pixel, entspricht 12,8x12,8  $\mu\text{m}^2$ . (B) Trajektorie aus (A) in vergrößerter Ansicht. (C) MSD-Analyse der Trajektorie aus (A) mit einer linearen Kurvenanpassung nach Gl. 1.4. Aufnahmebedingungen: 50 ms Illuminationszeit, 10 Hz Bildwiederholungsrate, 0,94 kW/cm<sup>2</sup> Laserleistung, Gain 130.

Die sich aus den Einzelbildern ergebende Trajektorie ist in Abb. 3-11 B gezeigt. Abb. 3-11 C gibt die Abhängigkeit des MSD von der Zeit wieder sowie die lineare Kurvenapproximation basierend auf Gl. 1.4, welche einen Diffusionskoeffizienten von  $D = 0,119 (\pm 0,006) \mu\text{m}^2/\text{s}$  lieferte.

Neben Trajektorien, deren MSD sich linear zur Zeit verhielt, konnten zusätzlich solche Molekülpfade detektiert werden, die eine räumlich begrenzte Diffusion aufwiesen. Abb. 3-12 A zeigt schematisch die vergrößerte Darstellung einer solchen Trajektorie,

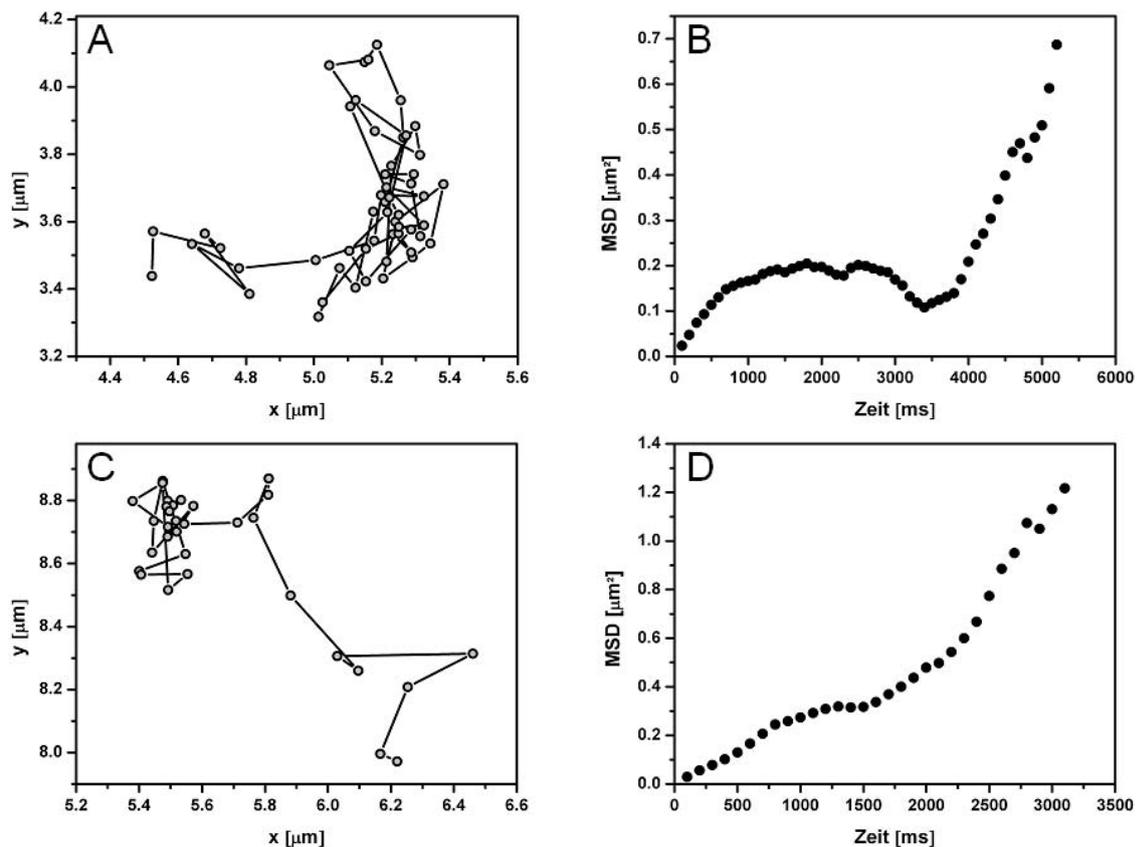
deren Bewegung auf eine Fläche beschränkt ist. Die entsprechenden Werte für das MSD streben für größere Zeitdifferenzen auf einen asymptotischen Wert zu (Abb. 3-12 B). Die Kurvenapproximation entsprechend Gl. 1.6 ergab einen Diffusionskoeffizienten von  $D = 0,082 (\pm 0,014) \mu\text{m}^2/\text{s}$  und eine Domänengröße von  $r_D = 0,340 (\pm 0,005) \mu\text{m}$ .



**Abb. 3-12: Einzeltrajektorienanalyse eines  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexes mit räumlich begrenzter lateraler Diffusion.**

(A) Trajektorie schematisch in vergrößerter Ansicht. (B) MSD-Analyse der Trajektorie aus (A) mit einer Kurvenanpassung nach Gl. 1.6.

Gerichtete Bewegungsprofile konnten für den  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplex auf A549-Zellen nur selten detektiert werden. Viele der langen Trajektorien wiesen Bewegungsprofile auf, die mit den verfügbaren mathematischen Modellen nur unzureichend zu beschreiben waren. So zeigten die beiden unterschiedlichen Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abb. 3-13 A und C ein heterogenes Bewegungsverhalten mit temporärer räumlicher Begrenzung unterbrochen von Abschnitten mit nahezu ungehinderter Mobilität. Dementsprechend atypisch verhielt sich das MSD mit zunehmender Zeitdifferenz (Abb. 3-13 B und D).



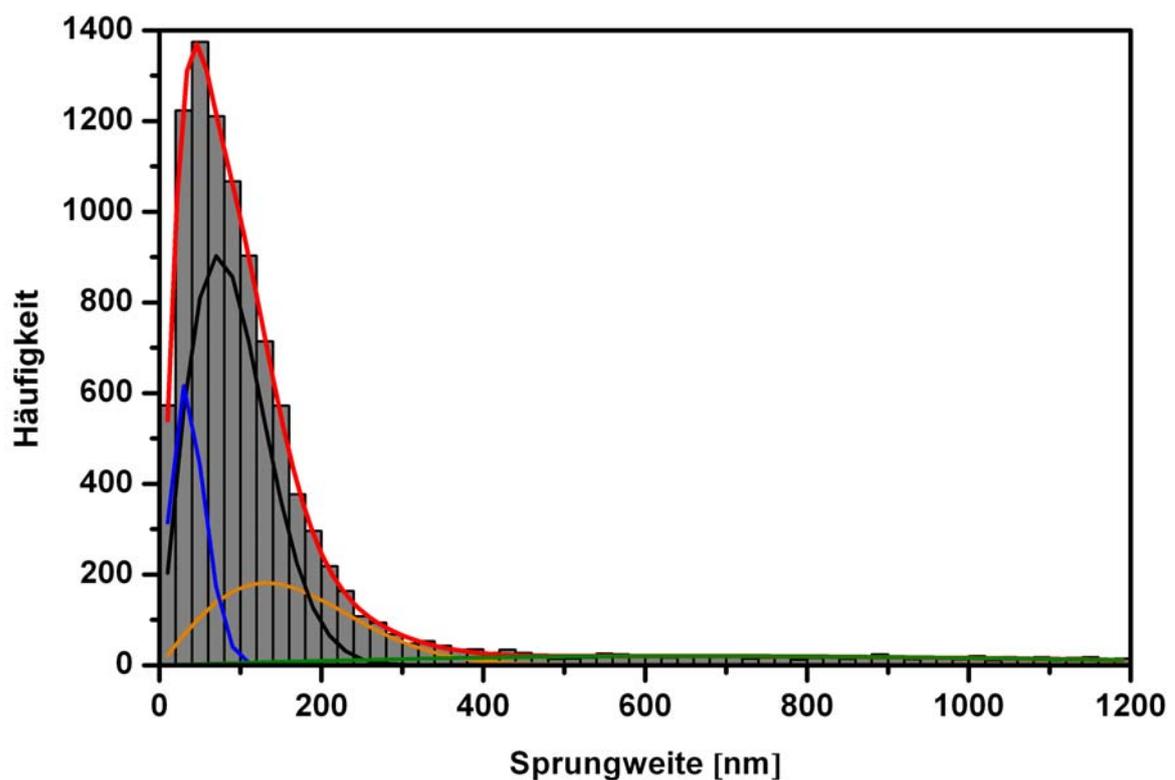
**Abb. 3-13: Einzeltrajektorienanalyse von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit heterogenem Bewegungsprofil.**

(A) und (C) Trajektorien schematisch in vergrößerter Ansicht. (B) und (D) MSD-Analyse der Trajektorien aus (A) und (C).

Aus verschiedenen Gründen stellte sich die Analyse der Mobilitäten des  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes mittels MSD als unzureichend dar. So waren die meisten Trajektorien zu kurz, um sie der MSD-Analyse unterwerfen zu können. Trajektorienpopulationen, bei denen sich im Verlauf Bewegungseigenschaften änderten, konnten nicht zufriedenstellend mittels MSD-Betrachtung ausgewertet werden. Eine Verteilungsanalyse über das Vorkommen bestimmter Mobilitätsprofile ist aufgrund der geringen Trajektorienanzahl an dieser Stelle nicht aussagekräftig. Die Tatsache, dass die Diffusion ein stochastischer Prozess ist, erschwerte zusätzlich die Unterscheidung verschiedener Mobilitätsmodelle. Saxton [124] hat unter Verwendung von Monte Carlo Simulationen gezeigt, dass bei einer

theoretisch freien Diffusion eines Moleküls ebenfalls eine signifikante Anzahl an Trajektorien beobachtet werden können, die gerichtete Bewegungen und Diffusion innerhalb einer Domäne zeigen.

Die Analyse der Sprungweiten, wie in Kap. 1.4.1.3.2 beschrieben, ist methodisch geeigneter, um Datenpopulationen mit vielen kurzen Trajektorien zu analysieren. Daten sowohl von langen als auch von kurzen Trajektorien wurden gepoolt und klassifiziert. Die sich ergebende Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten für den  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplex auf A549-Zellen ist in Abb. 3-14 dargestellt.



**Abb. 3-14: Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.**

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 20 min. Daten von 9 Zellen mit 3424 Trajektorien bzw. 9904 Sprüngen. Kurvenanpassung entsprechend Gl. 1.8 für vier Komponenten (rote Kurve) bzw. für D1 (blau), D2 (schwarz), D3 (orange) und D4 (grün); Klasseneinteilung 20 nm. Einzelwerte s. Tab. 3-1.

Die Kurvenapproximation an die Häufigkeitsverteilung (Histogramm) konnte zufriedenstellend mit einem Vier-Komponentenmodell basierend auf Gl. 1.8 durchgeführt werden. Die sich ergebenden Diffusionskoeffizienten lagen zwischen  $0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $2,150 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und sind in Tab. 3-1 aufgelistet. Zur graphischen Verdeutlichung der resultierenden Diffusionskoeffizienten wurden diese innerhalb des Histogramms jeweils als Einzelkurve an die Rohdaten angenähert.

**Tab. 3-1: Diffusionskoeffizienten von  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen.**

	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3	Komponente 4
D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	0,005 ( $\pm 0,0002$ )	0,026 ( $\pm 0,001$ )	0,087 ( $\pm 0,011$ )	2,150 ( $\pm 0,501$ )
Anteil [%]	15,6 ( $\pm 0,8$ )	53,8 ( $\pm 2,6$ )	19,7 ( $\pm 2,8$ )	10,9 ( $\pm 1,1$ )

### 3.1.5 Agonistische Beeinflussung

Es war davon auszugehen, dass die bislang eingesetzte Konzentration von  $0,5 \text{ nM}$  Alexa-NA zu gering war, um wesentliche regulatorische Prozesse wie Desensitivierung und Internalisierung des Rezeptors auszulösen. Um im Folgenden Erkenntnisse über den agonistisch deutlich stimulierten Rezeptor zu erlangen, war eine Erhöhung der Ligandkonzentration erforderlich. Da aus messtechnischen Gründen (siehe Abb. 3-6) eine Steigerung der Alexa-NA-Konzentration auszuschließen war, wurde in den nachfolgenden Experimenten zusätzlich mit dem  $\beta_2$ -selektiven Agonisten Terbutalin stimuliert. Die Stimulation erfolgte 15 Minuten nach Alexa-NA-Zugabe mit verschiedenen Konzentrationen Terbutalin. Um Einsichten in eventuell vorhandene Zeitabhängigkeiten während der Stimulation zu erlangen, wurden die Messungen in zeitlich definierten Abständen von 5, 15, 25 und 35 Minuten wiederholt.

### 3.1.5.1 Betrachtung der Verteilung von Diffusionskoeffizienten

An die aus den Messungen resultierenden Sprungweitenverteilungen wurden Kurven basierend auf einem Vier-Komponentenmodell nach Gl. 1.8 angenähert. Die einzelnen sich ergebenden Diffusionskoeffizienten sowie deren prozentuale Verteilung sind in Tab. 3-2 dargestellt.

**Tab. 3-2: Verteilung der Diffusionskoeffizienten von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen in Abhängigkeit von der Terbutalinstimulation.**

		D1 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D1 [%]	D2 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D2 [%]	D3 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D3 [%]	D4 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D4 [%]
0,5 nM Alexa-NA 15 min (n = 3)		0,005 ( $\pm 0,0004$ )	19,8 ( $\pm 2,0$ )	0,027 ( $\pm 0,002$ )	55,8 ( $\pm 2,6$ )	0,140 ( $\pm 0,059$ )	10,9 ( $\pm 2,9$ )	2,193 ( $\pm 1,198$ )	13,5 ( $\pm 2,9$ )
	5	0,003 ( $\pm 0,0002$ )	10,5 ( $\pm 1,0$ )	0,013 ( $\pm 0,001$ )	47,6 ( $\pm 1,5$ )	0,055 ( $\pm 0,004$ )	29,4 ( $\pm 1,8$ )	2,038 ( $\pm 0,473$ )	12,5 ( $\pm 1,5$ )
	15	0,004 ( $\pm 0,0002$ )	25,8 ( $\pm 1,6$ )	0,017 ( $\pm 0,001$ )	46,1 ( $\pm 2,2$ )	0,070 ( $\pm 0,011$ )	18,2 ( $\pm 2,7$ )	2,534 ( $\pm 1,272$ )	9,9 ( $\pm 2,4$ )
+ 100 nM Terbutalin [min] (n = 3)	25	0,003 ( $\pm 0,0003$ )	18,7 ( $\pm 2,3$ )	0,012 ( $\pm 0,001$ )	40,8 ( $\pm 2,1$ )	0,049 ( $\pm 0,004$ )	29,3 ( $\pm 2,7$ )	1,145 ( $\pm 0,214$ )	11,2 ( $\pm 1,2$ )
	35	0,004 ( $\pm 0,0002$ )	20,0 ( $\pm 1,5$ )	0,017 ( $\pm 0,001$ )	49,6 ( $\pm 3,0$ )	0,059 ( $\pm 0,009$ )	19,0 ( $\pm 3,6$ )	2,576 ( $\pm 0,969$ )	11,4 ( $\pm 2,2$ )

Fortsetzung Tab. 3-2

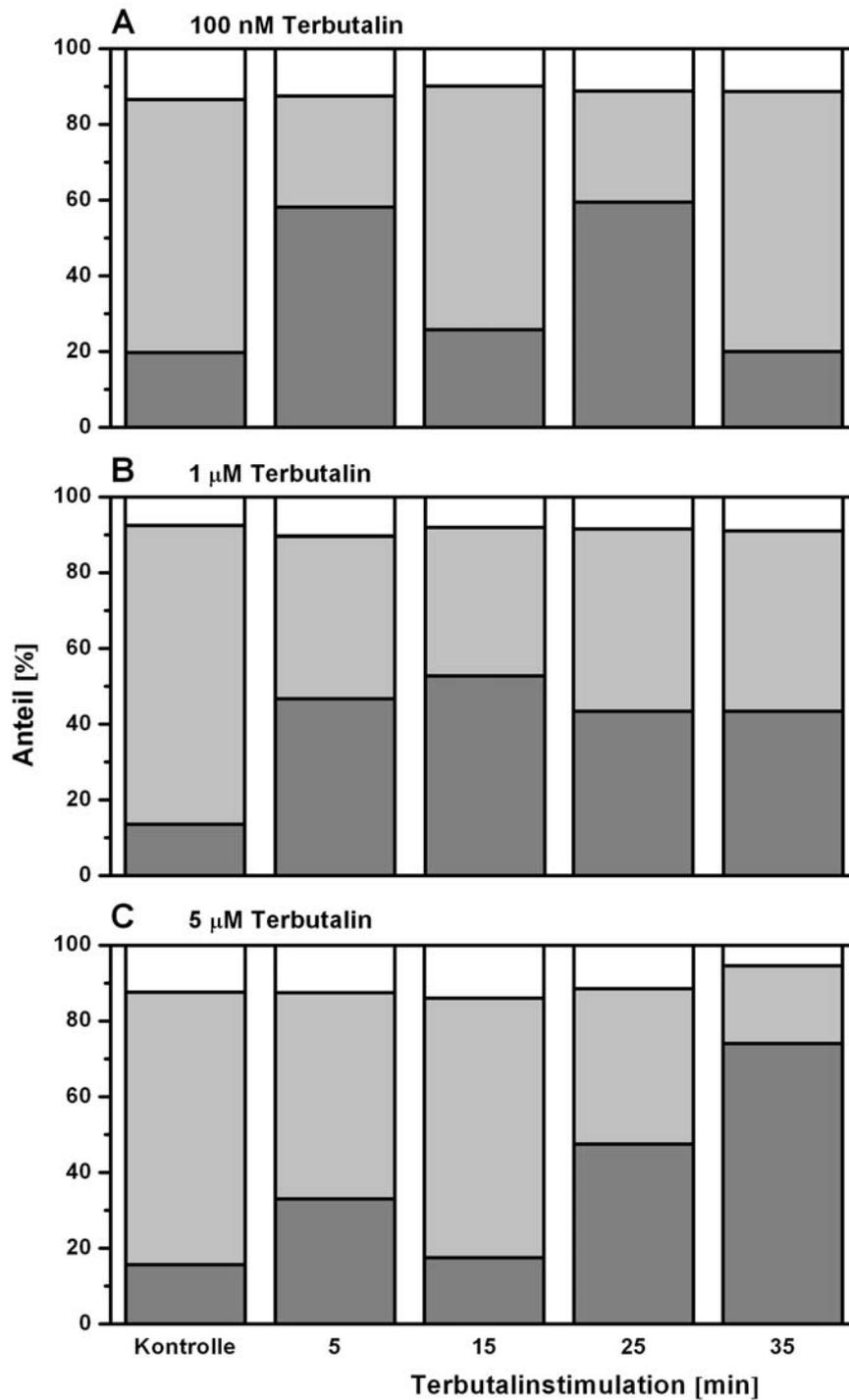
		D1 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D1 [%]	D2 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D2 [%]	D3 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D3 [%]	D4 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D4 [%]
0,5 nM Alexa-NA 15 min (n = 3)		0,005 ( $\pm 0,0004$ )	13,8 ( $\pm 1,4$ )	0,028 ( $\pm 0,003$ )	49,6 ( $\pm 5,6$ )	0,083 ( $\pm 0,013$ )	29,2 ( $\pm 6,2$ )	2,098 ( $\pm 1,094$ )	7,4 ( $\pm 1,8$ )
	5	0,002 ( $\pm 0,0001$ )	11,8 ( $\pm 0,6$ )	0,013 ( $\pm 0,001$ )	34,9 ( $\pm 1,3$ )	0,052 ( $\pm 0,002$ )	43,2 ( $\pm 1,5$ )	1,292 ( $\pm 0,177$ )	10,1 ( $\pm 0,8$ )
	15	0,001 ( $\pm 0,0001$ )	8,3 ( $\pm 0,4$ )	0,011 ( $\pm 0,0003$ )	44,5 ( $\pm 1,0$ )	0,056 ( $\pm 0,002$ )	39,2 ( $\pm 1,1$ )	1,098 ( $\pm 0,246$ )	8,0 ( $\pm 1,0$ )
	25	0,002 ( $\pm 0,0001$ )	19,2 ( $\pm 1,6$ )	0,011 ( $\pm 0,002$ )	24,6 ( $\pm 2,5$ )	0,042 ( $\pm 0,003$ )	48,0 ( $\pm 3,1$ )	1,555 ( $\pm 0,605$ )	8,2 ( $\pm 1,7$ )
+ 1 $\mu\text{M}$ Terbutalin [min] (n = 3)	35	0,001 ( $\pm 0,0001$ )	12,0 ( $\pm 1,1$ )	0,007 ( $\pm 0,001$ )	31,8 ( $\pm 1,3$ )	0,037 ( $\pm 0,002$ )	47,2 ( $\pm 1,6$ )	1,606 ( $\pm 0,643$ )	9,0 ( $\pm 2,0$ )
	0,5 nM Alexa-NA 15 min (n = 3)	0,004 ( $\pm 0,0002$ )	15,7 ( $\pm 1,0$ )	0,026 ( $\pm 0,002$ )	56,5 ( $\pm 4,7$ )	0,083 ( $\pm 0,021$ )	15,4 ( $\pm 5,0$ )	2,650 ( $\pm 1,100$ )	12,4 ( $\pm 2,5$ )
	5	0,002 ( $\pm 0,0002$ )	4,9 ( $\pm 0,8$ )	0,009 ( $\pm 0,001$ )	28,1 ( $\pm 1,8$ )	0,034 ( $\pm 0,001$ )	54,5 ( $\pm 2,0$ )	1,352 ( $\pm 0,240$ )	12,5 ( $\pm 1,3$ )
+ 5 $\mu\text{M}$ Terbutalin [min] (n = 3)	15	0,004 ( $\pm 0,0003$ )	17,6 ( $\pm 1,9$ )	0,018 ( $\pm 0,002$ )	40,6 ( $\pm 3,0$ )	0,063 ( $\pm 0,008$ )	27,8 ( $\pm 3,7$ )	1,868 ( $\pm 0,433$ )	14,0 ( $\pm 1,6$ )
	25	0,004 ( $\pm 0,001$ )	10,8 ( $\pm 3,8$ )	0,011 ( $\pm 0,002$ )	36,7 ( $\pm 2,9$ )	0,039 ( $\pm 0,003$ )	41,0 ( $\pm 4,1$ )	1,909 ( $\pm 0,518$ )	11,5 ( $\pm 1,6$ )
	35	0,003 ( $\pm 0,0001$ )	18,4 ( $\pm 0,6$ )	0,015 ( $\pm 0,001$ )	55,6 ( $\pm 1,5$ )	0,054 ( $\pm 0,004$ )	20,5 ( $\pm 1,7$ )	1,349 ( $\pm 0,330$ )	5,5 ( $\pm 0,7$ )

Die Diffusionskoeffizienten werden zur besseren Überschaubarkeit einer Kategorisierung unterworfen. Zunächst kann ein Grenzwert definiert werden, der eine Unterscheidung zwischen immobilen und beweglichen Partikeln ermöglicht. Die maximale Sprungweite

$dr_{\max}$  zwischen zwei Frames, die von einem immobilen Partikel erreicht werden kann, ist begrenzt durch die Lokalisierungsgenauigkeit  $\sigma_{loc}$  und kann definiert werden als [98]:

$$dr_{\max} = 3\sigma_{loc} \quad (3.1)$$

Mit der zuvor bestimmten Lokalisierungsgenauigkeit von 27 nm für Alexa-NA (siehe Kap. 3.1.2) ergibt sich eine maximal erreichbare Sprungweite von 81 nm für immobile Partikel. Nach Gl. 1.4 ist diese Sprungweite von Rezeptor-Ligand-Komplexen mit einem Diffusionskoeffizienten von bis zu  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  zu erwarten. Diese immobilen Partikel können unter Kategorie 1 zusammengefasst werden. In Kategorie 2 werden  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexe mit Sprungweiten zwischen 81 nm und 283 nm vereint. Langsam mobile Partikel mit Diffusionskoeffizienten zwischen  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  werden dadurch subsumiert. Partikel mit Diffusionskoeffizienten oberhalb von  $0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  werden in Kategorie 3 gruppiert, welche folglich für Rezeptor-Ligand-Komplexe mit einer schnellen Mobilität charakteristisch sind. Die Grenze zwischen der Kategorie 2 und 3 ergibt sich aus der Streuung der Diffusionskoeffizienten (Tab. 3-2). In Abb. 3-15 ist der prozentuale Anteile dieser einzelnen Mobilitätskategorien in Abhängigkeit von der Terbutalinkonzentration und Stimulationszeit dargestellt.



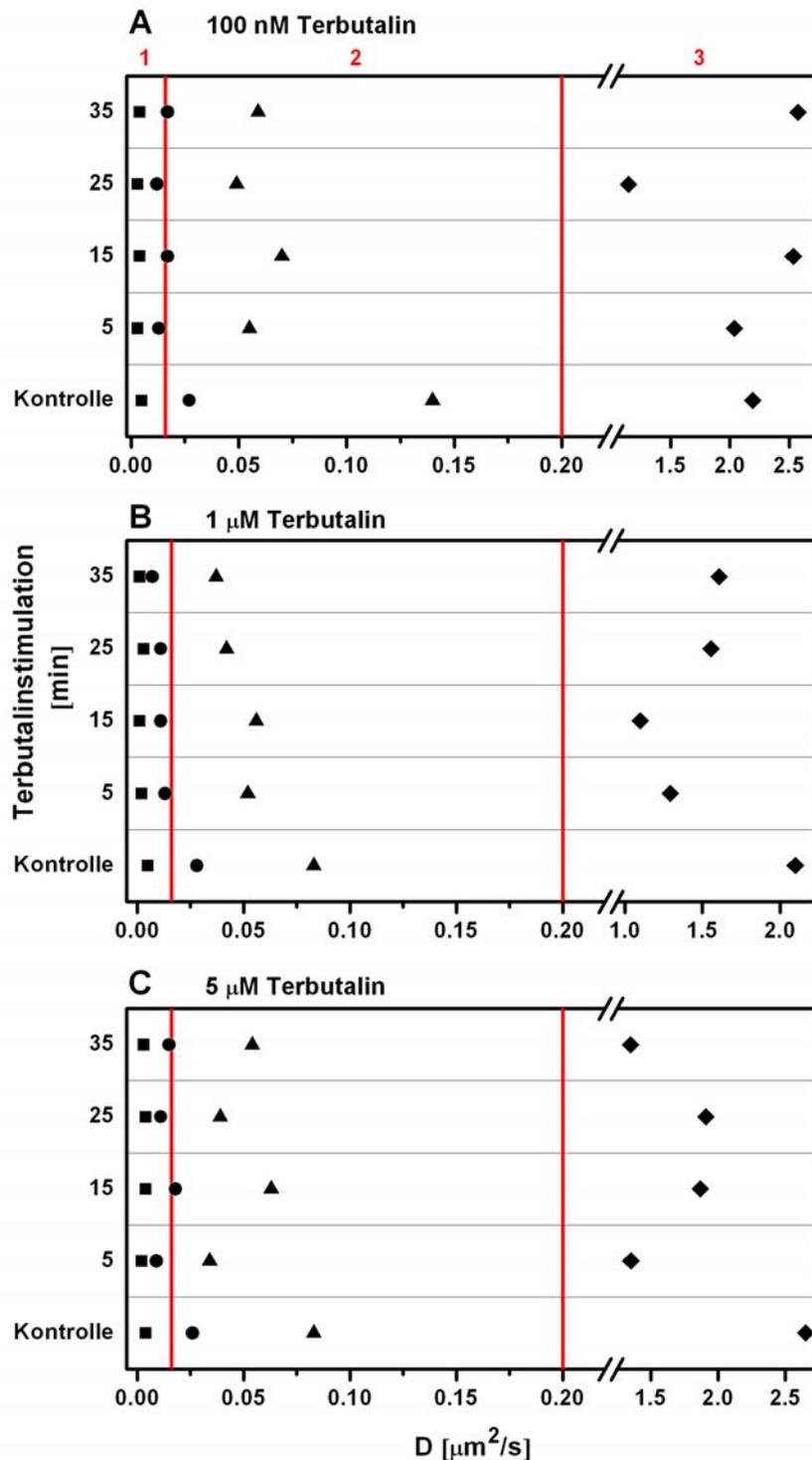
**Abb. 3-15: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Mobilitätskategorien 1-3 der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe.**

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin über 35 min, (je n = 3). Kategorie 1:  $D \leq 0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (dunkelgrau), Kategorie 2:  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s} < D \leq 0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (hellgrau), Kategorie 3:  $D > 0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (weiß).

Nach Stimulation der Zellen mit 100 nM Terbutalin zeigte sich ein wenig konsistentes Verhalten. Eine Zunahme der immobilen Rezeptor-Ligand-Komplexe und somit der Kategorie 1 konnte nicht zu jedem Stimulationszeitpunkt gefunden werden (Abb. 3-15 A, Tab. 3-2). Dementsprechend inhomogen verlief die Reduktion des Anteils der Kategorie 2. Der prozentuale Anteil von Kategorie 3 blieb nahezu unverändert. Betrachtet man den Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin, so konnte eine Zunahme der immobilen Geschwindigkeitsanteile von ursprünglich etwa 14 % auf den Kontrollzellen auf 53 % nach 15-minütiger Stimulation verzeichnet werden (Abb. 3-15 B, Tab. 3-2). Zu späteren Stimulationszeitpunkten blieb diese Erhöhung erhalten. Gleichermäßen konnte eine Abnahme in der langsamen Mobilität der Kategorie 2 festgestellt werden. Ein Einfluss auf die schnelle Mobilität wurde nicht gefunden. Die höchste eingesetzte Terbutalinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  zeigte ein vergleichbares Bild (Abb. 3-15 C, Tab. 3-2). Die Zunahme an immobilen Anteilen war hier nach 35 min besonders ausgeprägt. Zusätzlich konnte bei diesem starken Stimulus nach 35-minütiger Stimulation eine etwa 45-prozentige Reduktion in der schnellen Mobilität der Kategorie 3 gefunden werden.

### 3.1.5.2 Betrachtung der Diffusionskoeffizienten

Neben einer Veränderung in den Anteilen der drei auftretenden Kategorien war eine Verschiebung in der Größe der Diffusionskoeffizienten innerhalb der Kategorien denkbar. Abb. 3-16 zeigt den Einfluss von Terbutalinkonzentration und Stimulationszeit auf die Größe der Diffusionskoeffizienten.



**Abb. 3-16: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Diffusionskoeffizienten der  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexe.**

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1 µM und (C) 5 µM Terbutalin über 35 min, (je n = 3). (■) D<sub>1</sub>, (●) D<sub>2</sub>, (▲) D<sub>3</sub> und (◆) D<sub>4</sub>. Die roten Linien markieren die Grenzen zwischen den Mobilitätskategorien 1-3 (siehe Kap. 3.1.5.1).

Nach Stimulation mit Terbutalin ist insbesondere die Verschiebung der Diffusionskoeffizienten  $D_2$  und  $D_3$  zu kleineren Werten hin deutlich zu erkennen (Abb. 3-16 A-C, Tab. 3-2). Dieser Effekt konnte bei allen drei Terbutalinkonzentrationen beobachtet werden und trat in jedem Fall bereits nach fünfminütiger Stimulation auf. Sowohl  $D_2$  als auch  $D_3$  der Kontrollzellen waren der Kategorie 2 für langsam mobile Partikel zuzuordnen. Nach Terbutalinstimulation führte die Reduktion von  $D_2$  meist zu einer Umverteilung in Kategorie 1 und somit zu einer Immobilisierung der entsprechenden  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe. Eine Verkleinerung von  $D_4$  und somit der mobilen Partikelpopulation zeigte sich nach Stimulation mit  $1 \mu\text{M}$  bzw.  $5 \mu\text{M}$  Terbutalin ebenfalls bereits nach fünf Minuten (Abb. 3-16 B-C).  $D_1$  blieb unabhängig von Stimulationszeit und Terbutalinkonzentration nahezu konstant.

### 3.1.5.3 Betrachtung der Trajektorienausdehnung

Ein weiterer Parameter, der bei der Betrachtung individueller Trajektorien aufschlussreich sein kann, ist die maximale laterale Ausdehnung der einzelnen Trajektorien und somit die Domänengröße, innerhalb der sich die  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe bewegen. Die Klassifizierung erfolgt in drei Kategorien, wobei Kategorie A Trajektorien umfasst, die in ihrer Ausdehnung weder in  $x$ - noch in  $y$ -Richtung  $300 \text{ nm}$  überschreiten. Trajektorien der Kategorie B erstrecken sich mindestens in eine laterale Richtung über mehr als  $300 \text{ nm}$ , erreichen jedoch in keinem Fall eine Ausbreitung von mehr als  $600 \text{ nm}$ . Kategorie C fasst Trajektorien zusammen, die in mindestens eine Richtung eine größere Ausdehnung als  $600 \text{ nm}$  aufweisen (siehe Kap. 6.3.5). In Abb. 3-17 ist die Verteilung der Trajektorien auf die einzelnen Kategorien in Abhängigkeit von Terbutalinkonzentration und Stimulationszeit dargestellt.

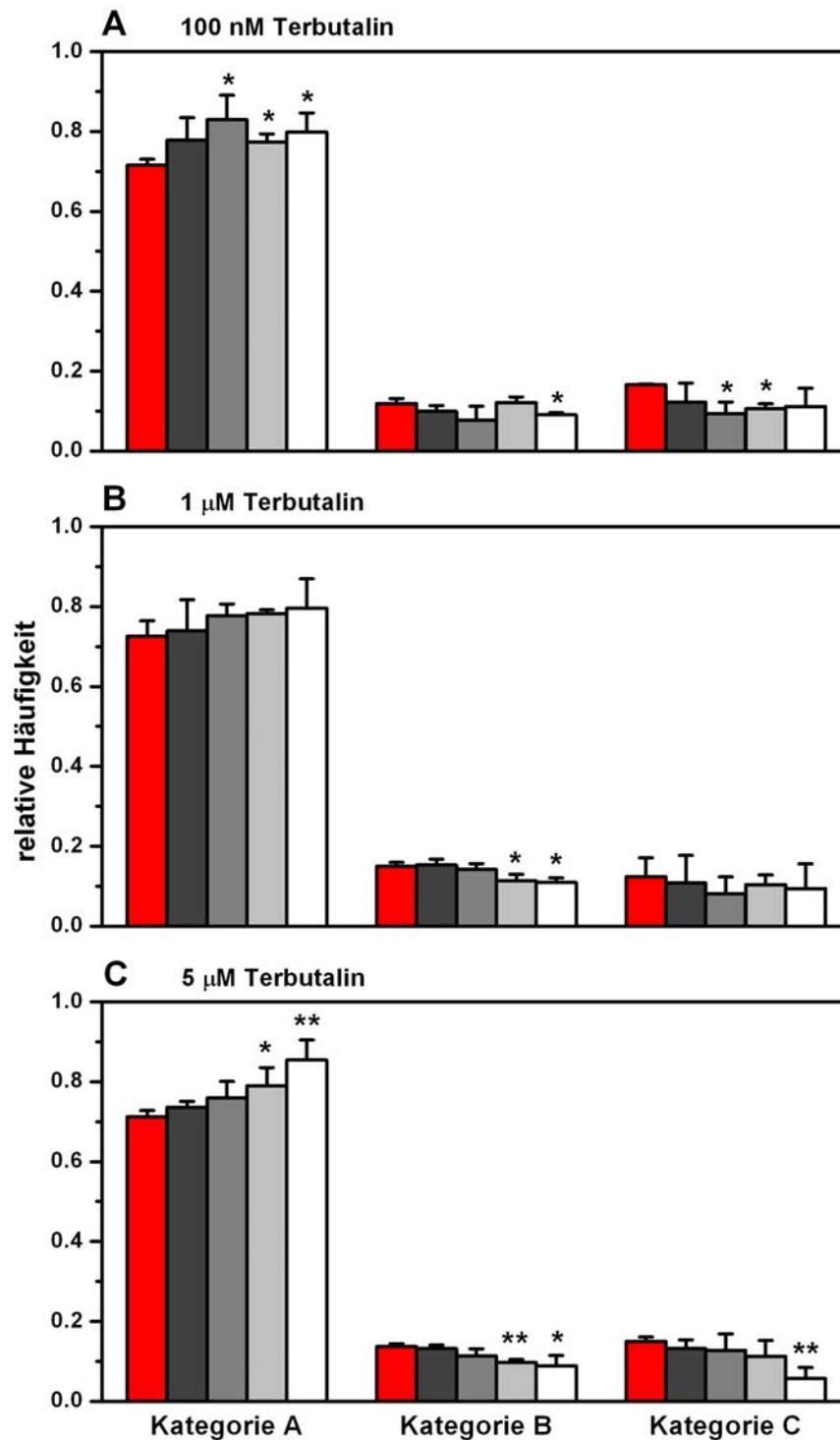


Abb. 3-17: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), (je n = 3); ( $p^* \leq 0,05$ ;  $p^{**} \leq 0,01$ ); Kategorisierung siehe Text.

Aus Abb. 3-17 ist zu entnehmen, dass unabhängig von der jeweiligen Versuchsbedingung mehr als 70 % der Trajektorien kleine laterale Ausdehnungen der Kategorie A aufwiesen. Trajektorien der Kategorie B und C konnten zu etwa gleichen Teilen gefunden werden. Nach Stimulation mit 100 nM Terbutalin wurde nach 15 Minuten ein signifikanter Anstieg in der Anzahl kleinflächiger Trajektorien erreicht (Abb. 3-17 A). Trajektorien der Kategorie B und C wurden hingegen seltener, wobei die Abnahme nur teilweise Signifikanzniveau erreichte. Die Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin zeigte ein ähnliches Bild (Abb. 3-17 B). Mit steigender Stimulationszeit war eine Zunahme in der Anzahl kleinflächiger Trajektorien zu verzeichnen, was wiederum mit einer Abnahme in mittel- bis großflächigen Trajektorien einherging. Signifikanz wurde dabei selten erreicht. Am ausgeprägtesten konnten die beschriebenen Terbutalineinflüsse auf die Trajektorienausdehnung mit 5  $\mu$ M Terbutalin gezeigt werden (Abb. 3-17 C).

Die Zeitabhängigkeit war in allen Kategorien gegeben und sowohl bei der Zunahme der kleinflächigen Trajektorien als auch bei der Abnahme der mittel- bis großflächigen Trajektorien wurden nach längeren Stimulationszeiten hoch signifikante Änderungen beobachtet. Rezeptor-Ligand-Komplexe, die nur kurze Trajektorien aufweisen, können sich in Abhängigkeit von ihrer Geschwindigkeit nur begrenzt über eine große Fläche hinweg bewegen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache ist eine ergänzende Betrachtung der Ausdehnung lang existierender Rezeptor-Ligand-Komplexe sinnvoll. Für Trajektorien mit mehr als sechs Frames ist die entsprechende Verteilung der Trajektorien in Abhängigkeit von ihrer Ausdehnung in Abb. 3-18 dargestellt.

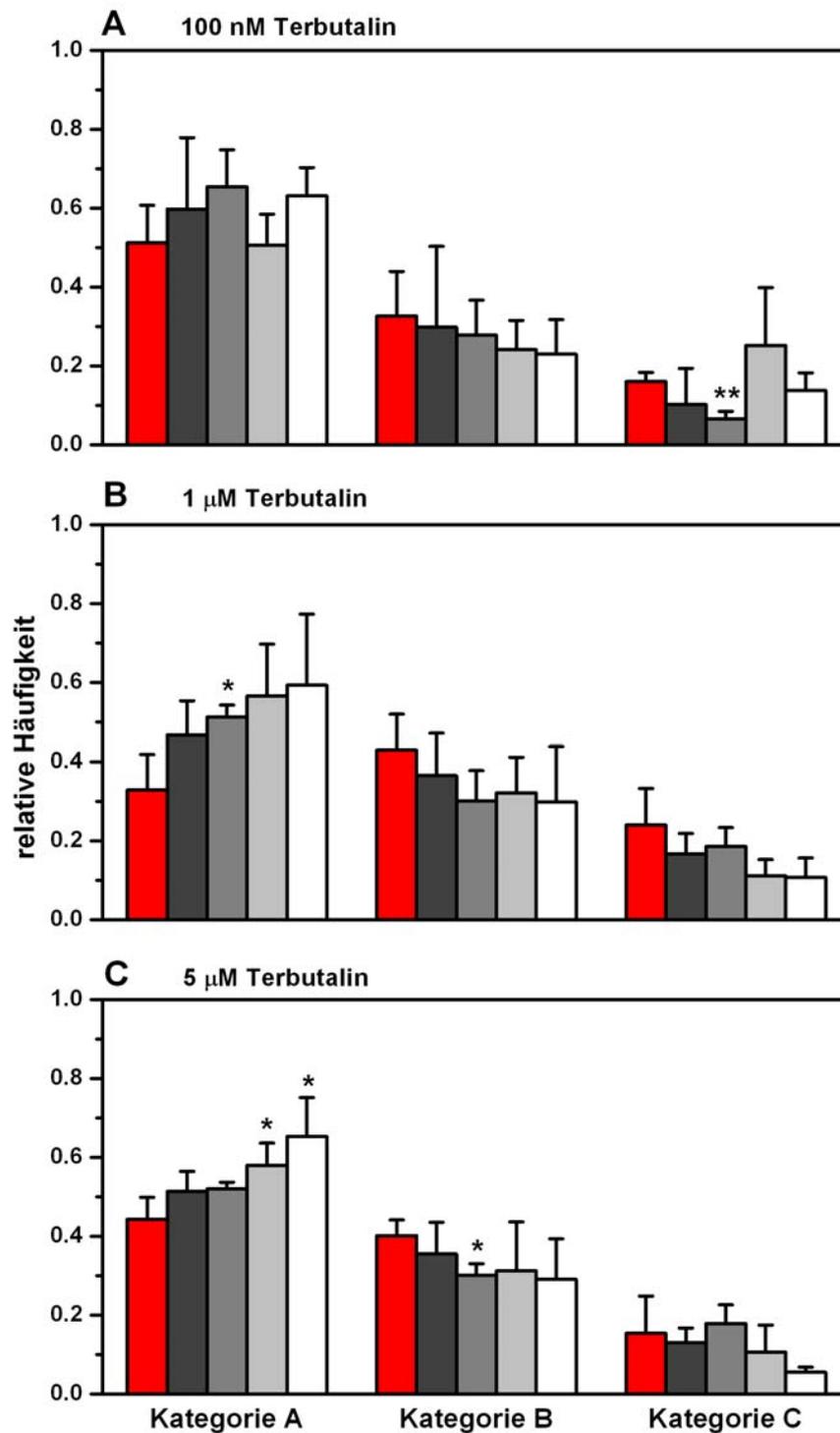


Abb. 3-18: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), (je n = 3); ( $p^* \leq 0,05$ ;  $p^{**} \leq 0,01$ ); Kategorisierung s. Text.

Bereits die Verteilung der Trajektorien auf die einzelnen Kategorien unterschied sich von der Gesamtrajektorienbetrachtung. Lediglich ein Anteil von etwa 33 % bis 51 % der Trajektorien auf den Kontrollzellen war kleinflächig (Abb. 3-18 A-C), während 33 % bis 43 % mittelflächige und 15 % bis 24 % großflächige Trajektorien gefunden wurden. Lange Trajektorien nahmen somit nahezu gleichermaßen kleine wie auch mittelgroße Flächen ein. Die Stimulation mit 100 nM Terbutalin hatte einen Anstieg der Häufigkeit kleinflächiger Trajektorien zur Folge (Abb. 3-18 A). Dieser Effekt war nahezu durchgängig zeitabhängig. Eine zeitabhängige Abnahme konnte ebenfalls in Kategorie B gefunden werden. Die Abnahme in Kategorie C wies gewisse Abweichungen in der Zeitabhängigkeit auf. Sehr viel ausgeprägter stellte sich die Zunahme in Kategorie A nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin dar (Abb. 3-18 B). Die Zeitabhängigkeit war hier eindeutig. Von wenigen Abweichungen abgesehen, zeigte sich bei dieser Terbutalin-konzentration eine deutliche Abnahme der mittel- und großflächigen Trajektorien mit der Zeit. Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin, wobei mehrfach signifikante Änderungen erreicht wurden (Abb. 3-18 C). Aufgrund der separaten Betrachtung von Trajektorien mit mehr als sechs Frames und der dadurch bedingten kleinen Stichprobenzahl, wurden signifikante Änderungen seltener erreicht als bei der Betrachtung der Gesamtrajektorien.

#### **3.1.5.4 Betrachtung der Trajektorienanzahl**

Die insgesamt pro Zelle detektierbare Anzahl von Trajektorien ist eine Kenngröße, die besonders bei längerer Stimulation mit hohen Terbutalinkonzentrationen durch Konkurrenz des Liganden und Rezeptorinternalisierung einer Veränderung unterliegen sollte. Abb. 3-19 zeigt den Einfluss der verschiedenen Terbutalinkonzentrationen auf die Gesamtrajektorienzahl.

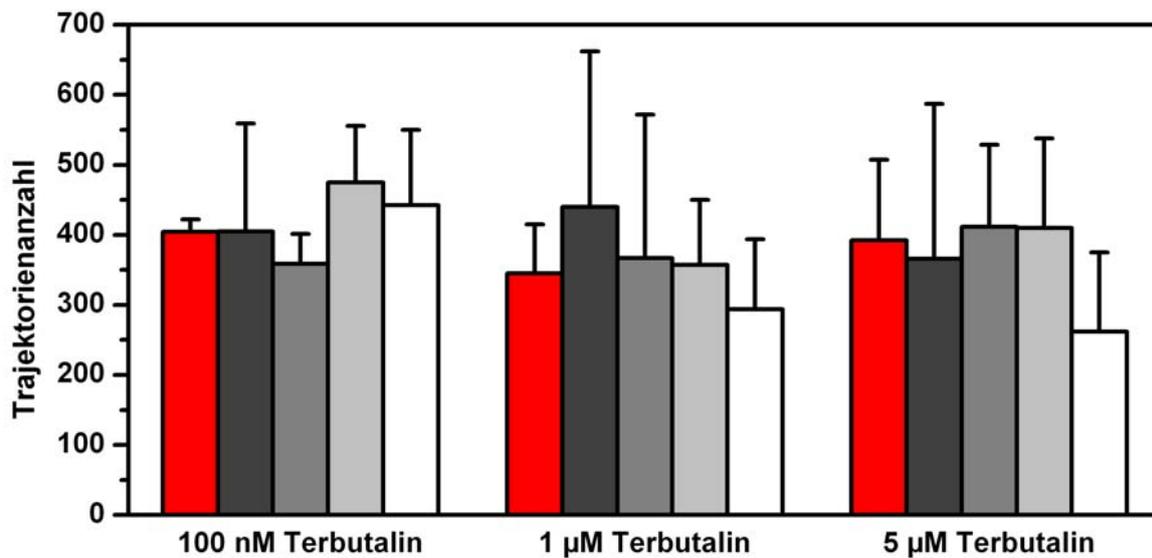


Abb. 3-19: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot) und nach anschließender Stimulation mit 100 nM, 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), (je n = 3).

Insgesamt wird deutlich, dass die Anzahl der Trajektorien ein Parameter ist, der von Zelle zu Zelle großen Schwankungen unterliegt, was durch die enormen Standardabweichungen bestätigt wird (Abb. 3-19). 100 nM Terbutalin führte zu keinem Stimulationszeitpunkt zu einer signifikanten Änderung der Trajektorienzahl. Eine Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin führte nach 35 min zu einer Reduktion in der Trajektorienzahl, die allerdings nicht signifikant war. Dieses Ergebnis war mit 5  $\mu$ M Terbutalin reproduzierbar.

Wird der Fokus auf Rezeptor-Ligand-Komplexe mit einer längeren Existenzdauer von mehr als sechs Frames gerichtet, so ergibt sich der in Abb. 3-20 dargestellte Zusammenhang zwischen Trajektorienzahl und Terbutalinstimulation.

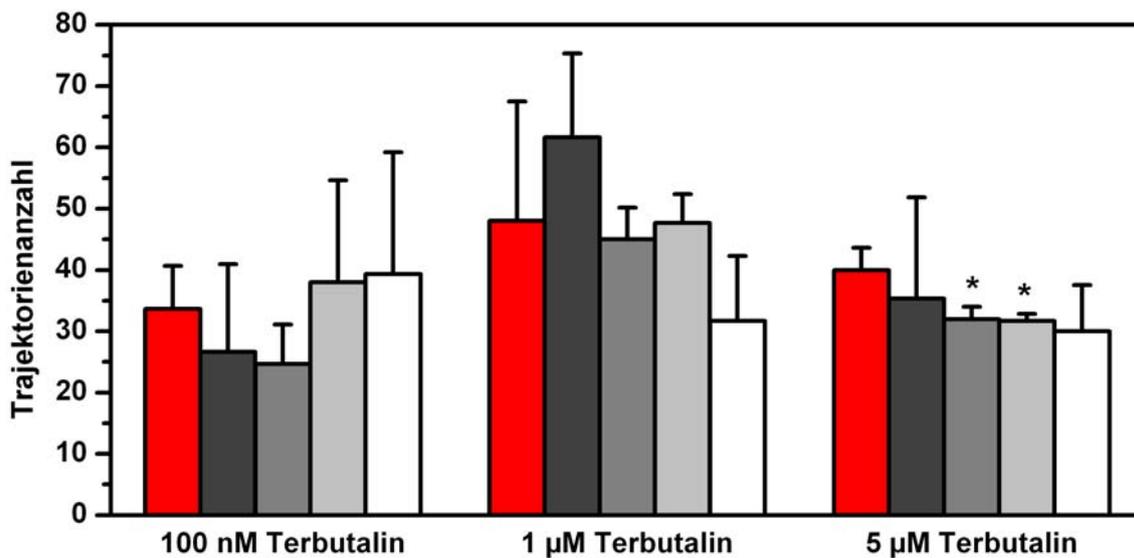


Abb. 3-20: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot) und nach anschließender Stimulation mit 100 nM, 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), (je n = 3); ( $p^* \leq 0,05$ ).

Im Vergleich zur Gesamttrajektorienbetrachtung wurden vergleichbare Ergebnisse erreicht. Der entscheidende Unterschied lag in der zeitabhängigen Abnahme der Anzahl der Trajektorien nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin, wobei nach 15 min und 25 min die Abnahme Signifikanz erreichte.

### 3.1.6 Hemmung der Signaltransduktion und Regulation

Zur Verifizierung der Annahme, dass die regulatorischen Prozesse der Desensitivierung und Internalisierung ursächlich für die beschriebenen Terbutalineeekte waren, wurden die Zellen einer Vorinkubation mit Cholera toxin (CTX) unterworfen. CTX, ein vom Bakterium *Vibrio cholerae* produziertes Enterotoxin und Auslöser der Cholera, fungiert als direkter Aktivator des stimulierenden G-Proteins, indem es Nicotinamidadenin-dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) abhängig die ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheit an Arg-201

katalysiert. Dadurch wird die intrinsische GTPase-Aktivität von  $G_{s\alpha}$  irreversibel inhibiert und die Rekonstitution des G-Protein-Trimers wird verhindert. Zusätzlich konnte eine Umverteilung von  $G_{s\alpha}$  durch CTX in endosomale Kompartimente gezeigt werden [125, 126]. In der Konsequenz bedeutet dies eine Verarmung der Plasmamembran an heterotrimeren  $G_s$ -Proteinen. Bei der Stimulation eines  $G_s$ -Protein-gekoppelten Rezeptors nach CTX-Inkubation müssten demgemäß sowohl Signaltransduktion, als auch die regulatorischen Prozesse der Desensitivierung und Internalisierung erheblich gestört sein.

### 3.1.6.1 Betrachtung der Verteilung von Diffusionskoeffizienten

Nach vierstündiger Vorinkubation der A549-Zellen mit CTX (1  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde eine Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin durchgeführt. Um bei dieser Einflussnahme auf die zellulären Prozesse ebenfalls einen Einblick in eine eventuell vorhandene Zeitabhängigkeit zu erlangen, wurden die Messungen abermals nach Minute 5, 15, 25 und 35 wiederholt. Die Kurvenanpassung eines Vier-Komponentenmodells nach Gl. 1.8 an die Sprungweitenverteilung ergab die in Tab. 3-3 zusammengefassten Diffusionskoeffizienten und deren prozentuale Verteilung. Graphisch sind die Anteile der einzelnen Diffusionskoeffizienten in Abb. 3-21 nach Einteilung in die drei Mobilitätskategorien nach Kap. 3.1.5 aufgearbeitet.

**Tab. 3-3: Verteilung der Diffusionskoeffizienten von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen unter Einfluss von CTX und in Abhängigkeit von der Terbutalinstimulation.**

		D1 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D1 [%]	D2 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D2 [%]	D3 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D3 [%]	D4 [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Anteil D4 [%]
0,5 nM Alexa-NA 15 min (n = 6)		0,004 ( $\pm 0,0003$ )	14,9 ( $\pm 1,1$ )	0,024 ( $\pm 0,002$ )	57,3 ( $\pm 5,0$ )	0,078 ( $\pm 0,016$ )	22,1 ( $\pm 5,0$ )	0,898 ( $\pm 0,450$ )	5,7 ( $\pm 1,4$ )
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CTX 4 h + 0,5 nM Alexa-NA 15 min (n = 3)	0,001 ( $\pm 0,0002$ )	2,1 ( $\pm 0,5$ )	0,008 ( $\pm 0,0004$ )	34,4 ( $\pm 1,3$ )	0,038 ( $\pm 0,001$ )	56,2 ( $\pm 1,4$ )	1,027 ( $\pm 0,310$ )	7,3 ( $\pm 1,2$ )
+ 1 $\mu\text{M}$ Terbutalin [min] (n = 3)	5	0,003 ( $\pm 0,0002$ )	10,4 ( $\pm 1,0$ )	0,015 ( $\pm 0,001$ )	38,9 ( $\pm 3,4$ )	0,043 ( $\pm 0,003$ )	39,7 ( $\pm 3,8$ )	1,762 ( $\pm 0,467$ )	11,0 ( $\pm 1,4$ )
	15	0,002 ( $\pm 0,0002$ )	10,3 ( $\pm 1,0$ )	0,011 ( $\pm 0,001$ )	33,1 ( $\pm 2,1$ )	0,038 ( $\pm 0,002$ )	45,1 ( $\pm 2,5$ )	1,499 ( $\pm 0,337$ )	11,4 ( $\pm 1,3$ )
	25	0,003 ( $\pm 0,0005$ )	8,9 ( $\pm 1,9$ )	0,013 ( $\pm 0,001$ )	42,3 ( $\pm 3,6$ )	0,045 ( $\pm 0,004$ )	40,1 ( $\pm 4,4$ )	2,299 ( $\pm 1,747$ )	8,7 ( $\pm 3,6$ )
	35	0,002 ( $\pm 0,0002$ )	6,6 ( $\pm 1,0$ )	0,010 ( $\pm 0,001$ )	36,6 ( $\pm 1,6$ )	0,038 ( $\pm 0,001$ )	48,3 ( $\pm 2,0$ )	1,330 ( $\pm 0,354$ )	8,5 ( $\pm 1,1$ )

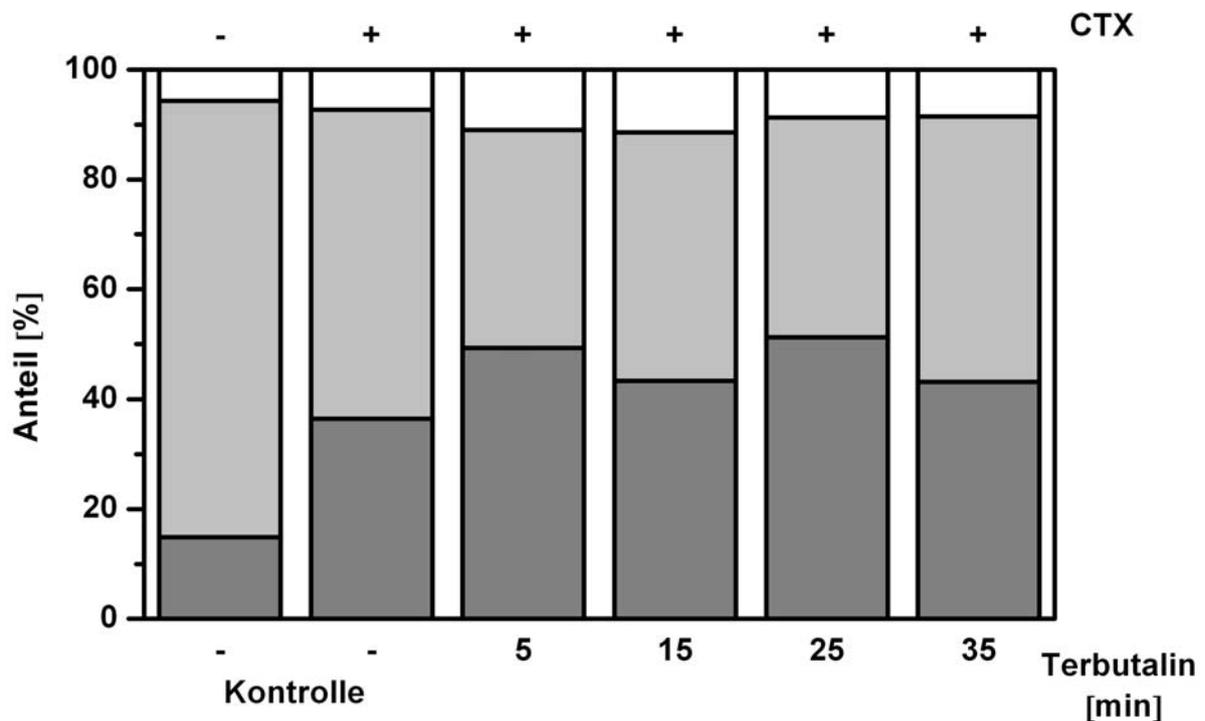


Abb. 3-21: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Mobilitätskategorien 1-3 der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle,  $n = 8$ ) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle,  $n = 6$ ). Anschließend Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin über 35 min, ( $n = 6$ ). Kategorie 1:  $D \leq 0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (dunkelgrau), Kategorie 2:  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s} < D \leq 0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (hellgrau), Kategorie 3:  $D > 0,200 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (weiß).

Der Einfluss von CTX war bereits ohne Terbutalinstimulation ersichtlich. Der immobile Anteil, der von Kategorie 1 repräsentiert wird, nahm von 14,9 % auf 36,5 % zu. Zusätzlich war eine Abnahme in Kategorie 2 von 79,4 % auf 56,2 % zu verzeichnen. Der Einfluss von CTX auf die hoch mobilen Rezeptor-Ligand-Komplexe der Kategorie 3 lag in einer Zunahme des Anteils von 5,7 % auf 7,3 %. Nach Terbutalinstimulation nahm der Anteil der immobilen Komponente initial auf 49,3 % zu, um sich im weiteren zeitlichen Verlauf auf etwa diesem Niveau zu stabilisieren. Der Anteil der langsam mobilen Komponente blieb nach Terbutalinstimulation stets unterhalb des Wertes der CTX-Kontrolle. Die Stimulation mit Terbutalin hatte außerdem einen prozentualen Anstieg der schnellen Mobilität zur Folge. Nach Minute 5 bzw. 15 wurden Werte von etwa 11 % erreicht, die

nach 25 min bzw. 35 min auf etwa 8,5 % absanken und somit zu jedem Zeitpunkt noch oberhalb der CTX-Kontrolle angesiedelt waren. Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem Einfluss, den Terbutalin auf die Verteilung der einzelnen Kategorien ohne vorherige CTX-Inkubation hat (Abb. 3-15 B), so ist der agonistische Einfluss aufgrund der veränderten Ausgangssituation nach CTX-Inkubation weniger stark ausgeprägt.

### 3.1.6.2 Betrachtung der Diffusionskoeffizienten

Betrachtet man Abb. 3-22, so wird ersichtlich, welchen Einfluss CTX auf die Diffusionsgeschwindigkeit der individuellen Komponenten hat.

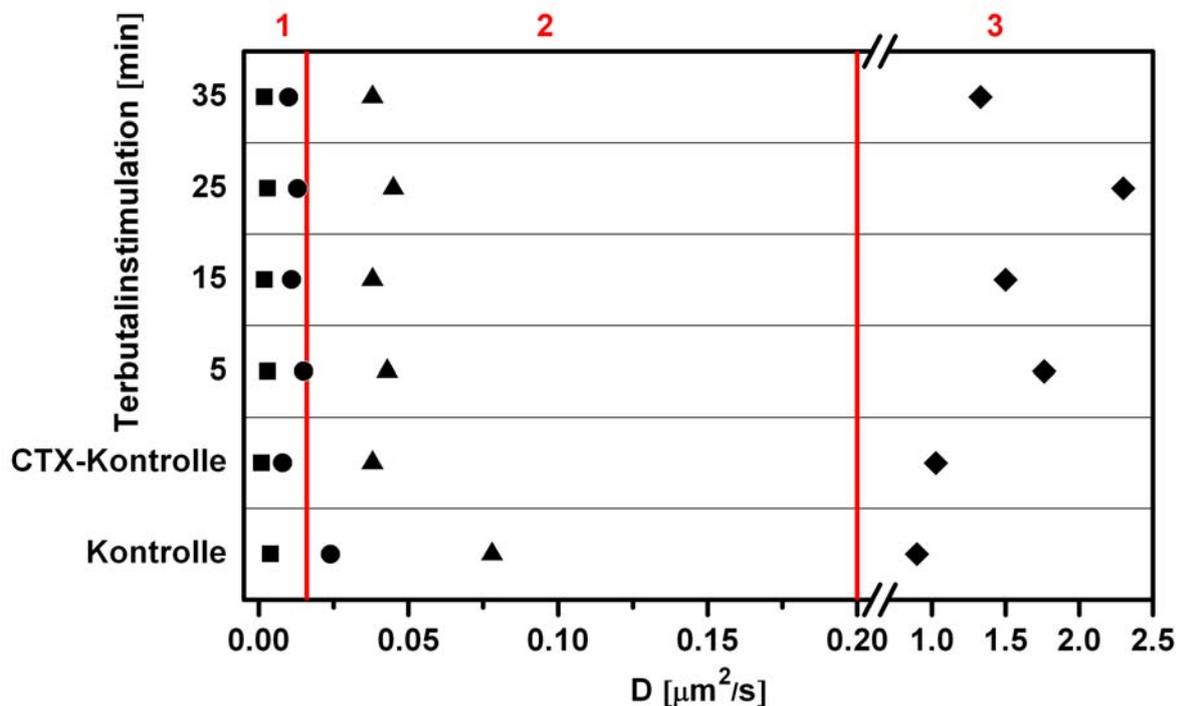


Abb. 3-22: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Diffusionskoeffizienten der  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexe.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle,  $n = 8$ ) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle,  $n = 6$ ). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin über 35 min, ( $n = 6$ ). (■)  $D_1$ , (●)  $D_2$ , (▲)  $D_3$  und (◆)  $D_4$ . Die roten Linien markieren die Grenzen zwischen den Mobilitätskategorien 1-3 (siehe Kap. 3.1.5.1).

Sowohl die CTX-Inkubation als auch die anschließende Terbutalinstimulation hatten keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit  $D_1$  (Abb. 3-22, Tab. 3-3). Allerdings führte die Vorinkubation mit CTX zu einer Mobilitätsabnahme von  $D_2$  und infolgedessen zu einer Verschiebung von  $D_2$  aus Kategorie 2 in Kategorie 1. CTX führte somit zu einer Immobilisierung von vormals langsam beweglichen Anteilen. Die Terbutalinstimulation hatte in der Folge keinen erheblichen Einfluss mehr auf  $D_2$ . Die Geschwindigkeit  $D_3$  verkleinerte sich ebenfalls nach CTX-Inkubation. Ein Einfluss von Terbutalin auf  $D_3$  war nicht ersichtlich.  $D_4$  nahm nach CTX-Inkubation geringfügig und nach anschließender Terbutalinstimulation in stärkerem Maße zu. Im Vergleich mit nicht CTX vorinkubierten Zellen (siehe Abb. 3-16) war die Verringerung von  $D_2$ - $D_4$  durch Terbutalin nach CTX-Vorinkubation nicht mehr detektierbar.

### **3.1.6.3 Betrachtung der Trajektorienausdehnung**

Die Analyse der lateralen Trajektorienausdehnung ergab den in Abb. 3-23 graphisch dargestellten Sachverhalt. Die Einteilung entspricht den bereits in Kap. 3.1.5.3 definierten Kategorien.

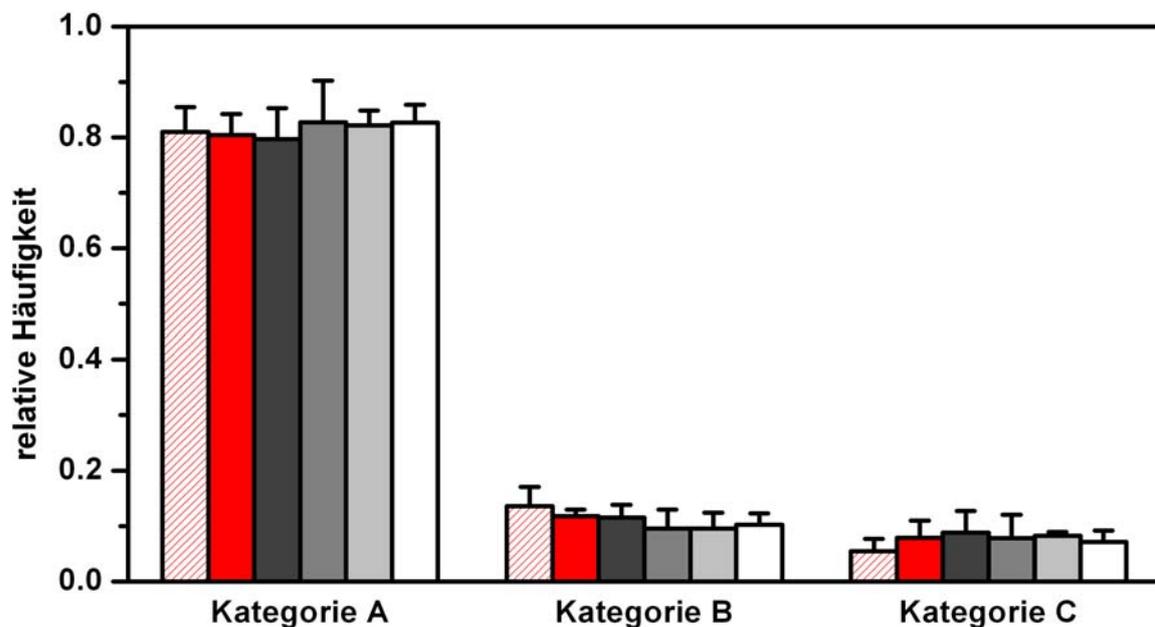


Abb. 3-23: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot schraffiert,  $n = 8$ ) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle, rot,  $n = 6$ ). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), ( $n = 6$ ); Kategorisierung siehe Kap. 3.1.5.3.

Die Häufigkeit kleinflächiger Trajektorien blieb sowohl nach CTX-Inkubation als auch nach zusätzlicher Terbutalinstimulation nahezu konstant (Abb. 3-23). Nach CTX-Vorinkubation konnte eine Abnahme in der Häufigkeit mittelflächiger Trajektorien festgestellt werden, welche nach Terbutalinstimulation noch verstärkt wurde. Eine durch CTX ausgelöste Zunahme der Menge großflächiger Trajektorien blieb in der Folge durch Terbutalin nahezu unbeeinflusst. Der Terbutalineefferkt auf nicht vorbehandelte Zellen (siehe Abb. 3-17) konnte somit nach CTX-Vorinkubation schwach ausgeprägt wiedergefunden werden. Lediglich die Abnahme großflächiger Trajektorien war nicht mehr detektierbar. Wird die Betrachtung der lateralen Ausdehnung auf Trajektorien mit einer Länge von mehr als sechs Frames beschränkt, ergibt sich Abb. 3-24.

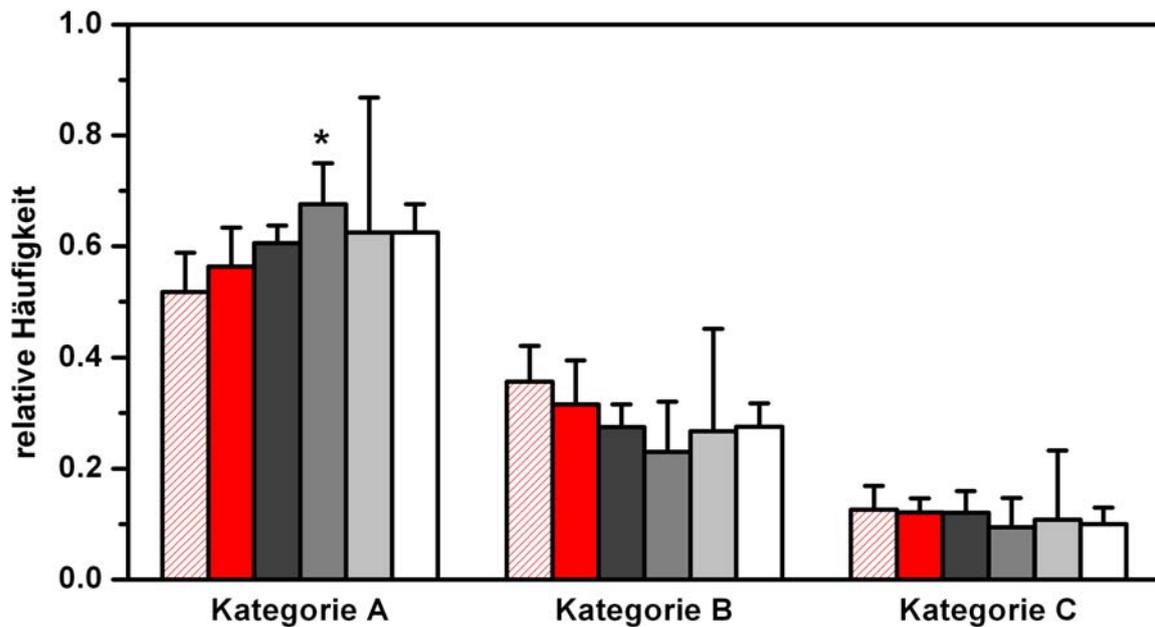


Abb. 3-24: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot schraffiert, n = 8) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle, rot, n = 6). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), (n = 6); ( $p^* \leq 0,05$ ); Kategorisierung siehe Kap. 3.1.5.3.

CTX und stärker ausgeprägt Terbutalin vermehrten kleinflächige, lange Trajektorien. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich in Bezug auf mittel- und großflächige Trajektorien. Die Häufigkeit nahm bei diesen nach CTX-Vorinkubation und noch auffälliger nach Terbutalinstimulation ab. Der Terbutalineinfluss auf CTX vorinkubierte Zellen sowie auf unbehandelte Zellen (siehe Abb. 3-18) erwies sich als sehr ähnlich.

#### 3.1.6.4 Betrachtung der Trajektorienanzahl

Der Einfluss von CTX auf die pro Zelle detektierbare Gesamttrajektorienzahl ist aus Abb. 3-25 zu entnehmen.

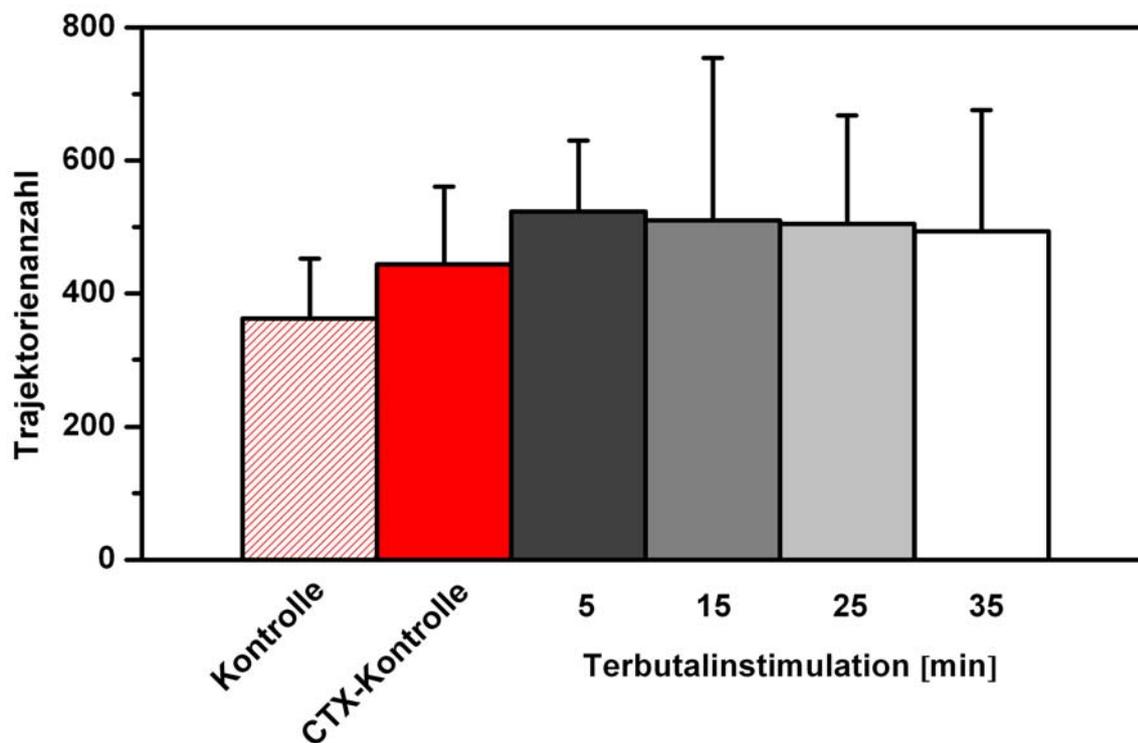


Abb. 3-25: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot schraffiert,  $n = 8$ ) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle, rot,  $n = 6$ ). Anschließend Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), ( $n = 6$ ).

Die CTX-Inkubation führte zu einer Zunahme der Trajektorienzahl, welche durch die nachfolgende Terbutalinstimulation eine stärkere Ausprägung erfuhr, über die 35-minütige Stimulationszeit aber nahezu konstant blieb. Die Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR konnte somit nach CTX-Inkubation nicht durch Terbutalin verdrängt werden.

Abb. 3-26 gibt die Veränderung der Trajektorienzahl durch CTX und Terbutalin wieder, wenn nur lange Trajektorien mit mehr als sechs Frames betrachtet werden.

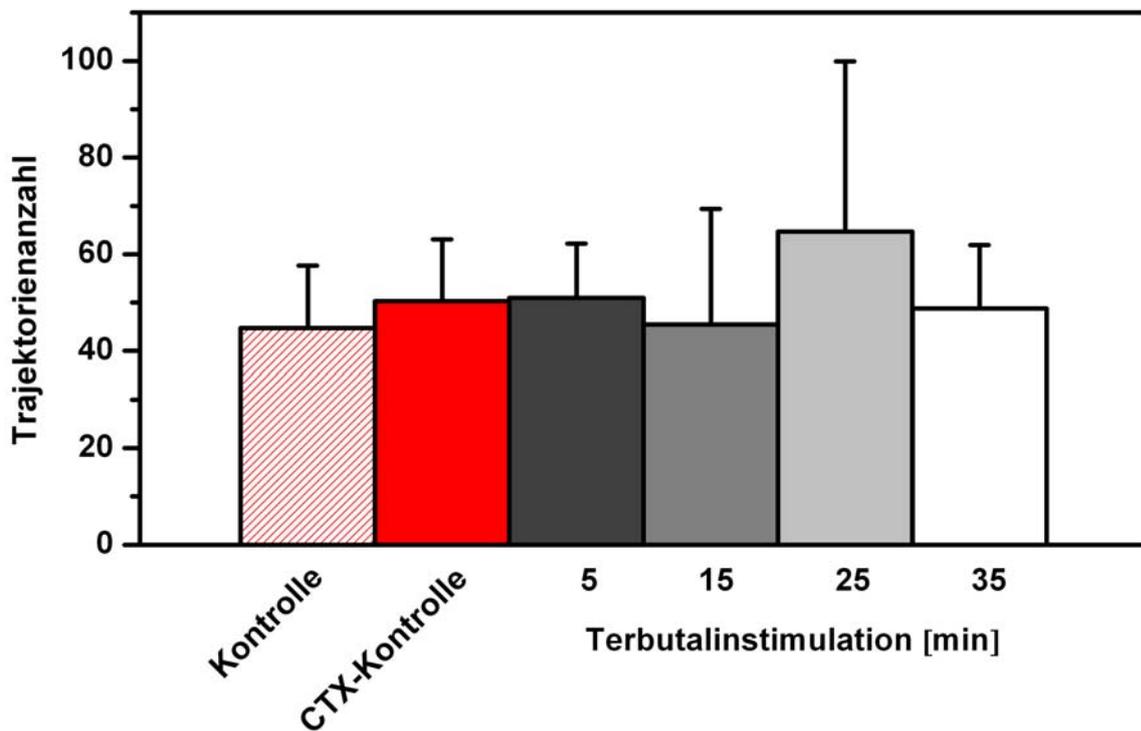


Abb. 3-26: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von  $\beta$ 2AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames.

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, rot schraffiert,  $n = 8$ ) und mit vorheriger CTX-Inkubation (CTX-Kontrolle, rot,  $n = 6$ ). Anschließend Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin über 5 min (dunkelgrau), 15 min (grau), 25 min (hellgrau) und 35 min (weiß), ( $n = 6$ ).

Die Konzentration auf lange Trajektorien offenbarte eine geringe Zunahme der Trajektorienmenge nach CTX-Vorinkubation. Die anschließende Terbutalinstimulation hatte hingegen keine eindeutige Auswirkung hinsichtlich der Trajektorienzahl. Der Gewinn an Trajektorien nach Terbutalinstimulation ist somit vor allem durch eine Zunahme von kurzen Trajektorien geprägt.

## 3.2 Fluoreszenzkorrelationspektroskopische Messungen

Durch die folgenden FCS-Experimente sollen einerseits Teilaspekte der mittels SPT erlangten Ergebnisse bestätigt und ergänzt werden, andererseits sollen Erkenntnisse über die Vergleichbarkeit beider Methoden gewonnen werden. Die hier verwendete A549-Zelllinie und der Ligand Alexa-NA fanden zusammen bereits Anwendung in FCS-Experimenten. Die Zellen zeigten in der Plasmamembran eine maximale, nicht korrelierbare Autofluoreszenz von nur 1,5 kHz und erwiesen sich somit als sehr geeignet für FCS-Messungen. Die Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen konnte im nanomolaren Bereich gesättigt werden und war mit verschiedenen Agonisten und Antagonisten des  $\beta_2$ AR verdrängbar [3, 121]. Somit existierten bereits wichtige Vorkenntnisse über das Bindungsverhalten von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen.

### 3.2.1 Diffusionsverhalten des $\beta_2$ AR-Alexa-Noradrenalin-Komplexes

Nach Inkubation der A549-Zellen mit 5 nM Alexa-NA für 15 min wurde der Laserfokus mittels Scan in z-Richtung durch die Zelle bei halbmaximaler Fluoreszenzintensität so in der oberen Plasmamembran positioniert, dass das fokale Volumenelement gleichermaßen in die fluoreszierende Ligandlösung oberhalb der Zelle und in das Zytosol tauchte (Abb. 3-27). Diese Art der Positionierung ermöglichte neben der Erfassung von membranären Fluoreszenzereignissen zusätzlich die Detektion des freien Liganden im Inkubationspuffer und früher Internalisierungsprozesse des Rezeptor-Ligand-Komplexes.

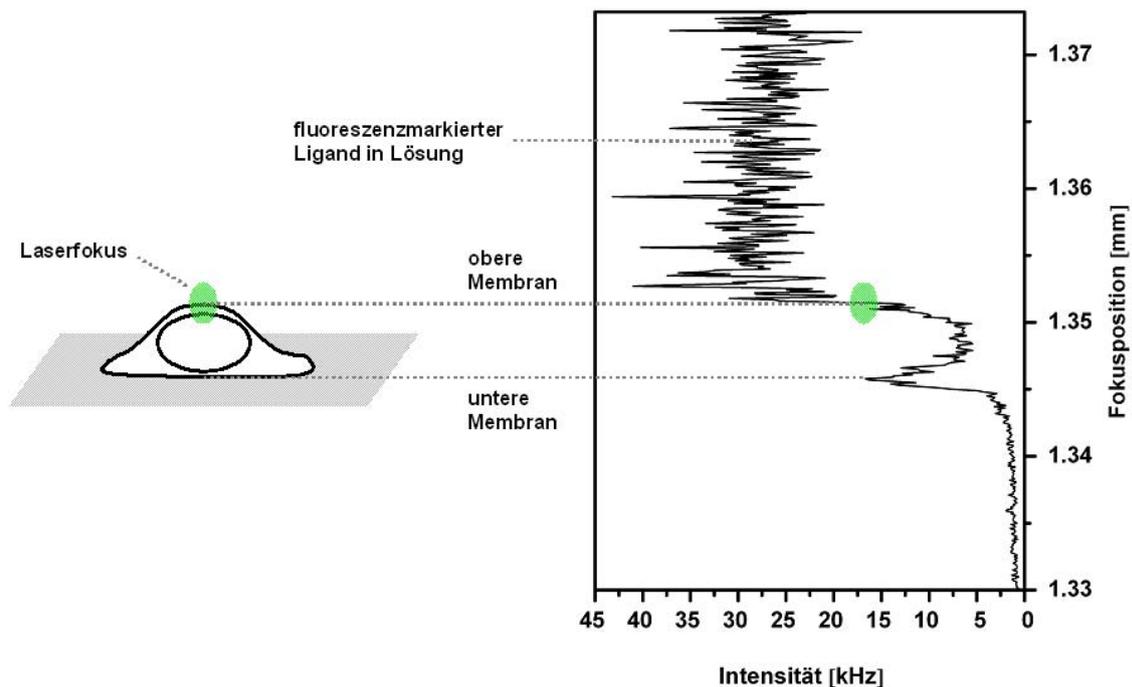


Abb. 3-27: Schematische Darstellung der FCS-Fokuspositionierung auf der oberen Plasmamembran einer A549-Zelle nach Inkubation mit 5 nM Alexa-NA.

Zur Ermittlung des Diffusionsverhaltens des freien Alexa-NA im Inkubationspuffer wurde der Fokus mit seiner gesamten Ausdehnung über der Zelle positioniert. Es ergab sich eine Diffusionszeitkonstante von  $\tau_{frei} = 57,02 (\pm 6,58) \mu\text{s}$  ( $n = 30$ ), woraus sich nach Gl. 1.12 ein Diffusionskoeffizient von  $D_{frei} = 156,96 (\pm 18,03) \mu\text{m}^2/\text{s}$  errechnen ließ. Eine entsprechende Autokorrelationskurve ist exemplarisch in Abb. 3-28 abgebildet. Neben dem frei diffundierenden Alexa-NA konnten nach Fokussierung auf die Zellmembran zwei weitere Diffusionszeitkonstanten von  $\tau_{Diff1} = 0,65 (\pm 0,30) \text{ms}$  und  $\tau_{Diff2} = 42,00 (\pm 31,02) \text{ms}$  ( $n = 15$ ) gefunden werden. Der Rezeptor-Ligand-Komplex zeigte somit zwei unterschiedliche Geschwindigkeiten mit  $D_{Diff1} = 15,99 (\pm 6,29) \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{Diff2} = 0,32 (\pm 0,21) \mu\text{m}^2/\text{s}$ , die zu 75,9 ( $\pm 13,8$ ) % bzw. 24,1 ( $\pm 13,8$ ) % detektierbar waren. Die dazugehörige Autokorrelationskurve (Abb. 3-28) zeigte im unteren Kurvenbereich eine deutliche Rechtsverschiebung zu höheren Diffusionszeitkonstanten.

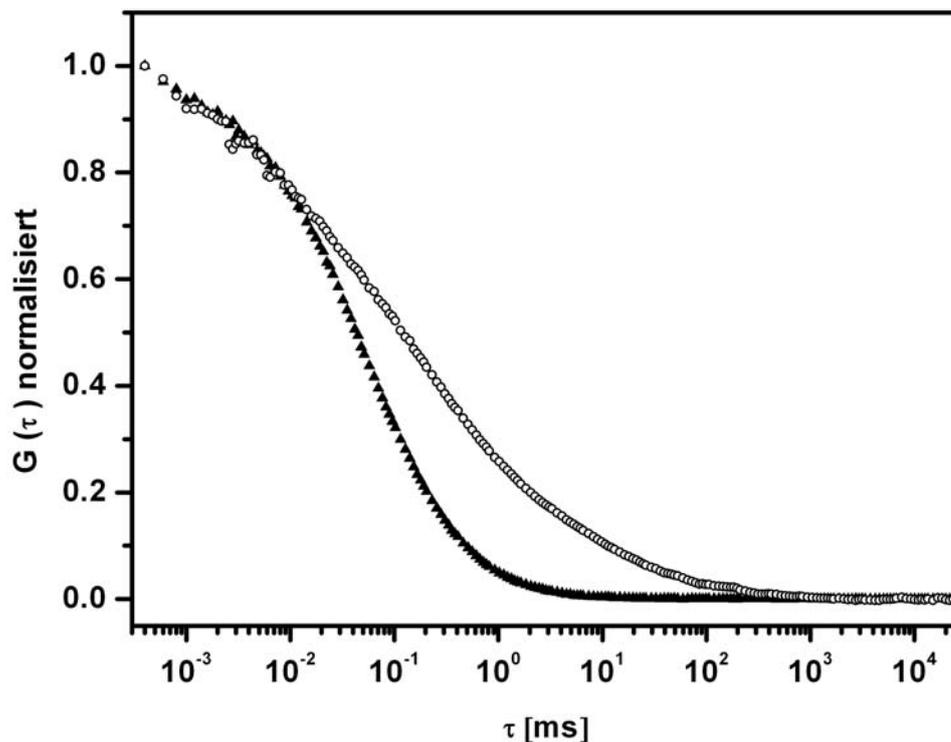


Abb. 3-28: Autokorrelationskurven von Alexa-NA frei in Lösung und gebunden an A549-Zellen.

5 nM Alexa-NA frei in Lösung über der Zelle (▲) und nach Fokussierung auf die Plasmamembran zusätzlich gebunden an den  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen (○), (je  $n = 6$ ).

Die Gesamtbindung von 5 nM Alexa-NA an die Membran von A549-Zellen betrug nach 15-minütiger Inkubation  $2,14 (\pm 0,49)$  nM ( $n = 15$ ). Um eine Aussage über die Spezifität dieser Bindung treffen zu können, wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt, wobei die Restbindung von 5 nM Alexa-NA nach einstündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Terbutalin bzw. Isoprenalin bestimmt wurde (Abb. 3-29 A und B). Durch Terbutalin konnten 50 % der schnellen Geschwindigkeit  $\tau_{Diff1}$ , aber nur 37 % der langsamen Komponente  $\tau_{Diff2}$  verdrängt werden (Abb. 3-29 A). Der  $\beta_1/\beta_2$ -unselektive Agonist Isoprenalin konnte 55 % der schnellen Anteile und 70 % der langsamen Anteile verdrängen (Abb. 3-29 B). Um die Frage zu klären, welcher Anteil der nicht verdrängbaren Bindung möglicherweise durch unspezifische Bindung des Farbstoffs Alexa532 verursacht wurde, wurden A549-Zellen für 15 min mit 5 nM Alexa532 inkubiert. Im Vergleich zu entsprechenden Kontrollzellen, welche mit 5 nM Alexa-NA

behandelt wurden, konnten nur 38 % mit der Geschwindigkeit  $\tau_{Diff1}$  detektiert werden (Abb. 3-29 C). Mit  $0,82 (\pm 0,59)$  ms lag diese Mobilität in der gleichen Größenordnung wie  $\tau_{Diff1}$  der Kontrollzellen. Die weniger mobile Komponente war mit  $93,57 (\pm 90,25)$  ms langsamer und vor allem inhomogener als  $\tau_{Diff2}$  der Kontrollzellen und im Vergleich zu diesen lediglich zu 8 % detektierbar.

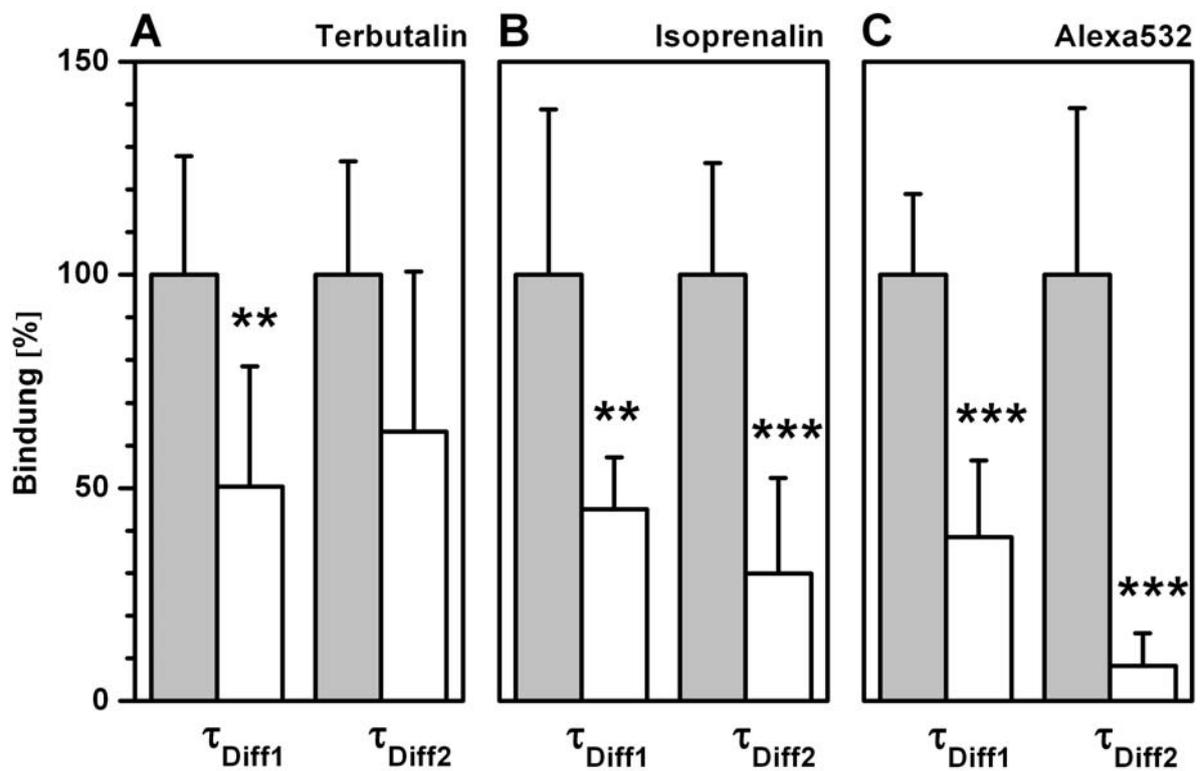


Abb. 3-29: Unspezifische Bindung von Alexa-NA und Alexa532.

Bindung von 5 nM Alexa-NA vor (grau) und nach (blau) Verdrängung mit (A) 10  $\mu$ M Terbutalin 1 h, (B) 10  $\mu$ M Isoprenalin 1 h und (C) Bindung von 5 nM Alexa-NA (grau) im Vergleich zu 5 nM Alexa532 (weiß), (je n = 7); ( $p^{**} \leq 0,01$ ,  $p^{***} \leq 0,001$ ).

### 3.2.2 Agonistische Beeinflussung

Der konzentrations- und zeitabhängige Einfluss von Terbutalin auf die Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen sowie auf das Diffusionsverhalten des  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes wurde mit FCS-Experimenten untersucht. Um die Vergleichbarkeit mit den SPT-Experimenten zu gewährleisten, wurden die Zellen nach 15-minütiger Vorinkubation mit 5 nM Alexa-NA mit 100 nM, 1  $\mu$ M bzw. 5  $\mu$ M Terbutalin stimuliert und nach 5, 15, 25 und 35 min FCS-Messungen durchgeführt. Die sich aus den FCS-Messungen unter den verschiedenen Bedingungen ergebende Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR sowie die Verteilung auf die beiden unterschiedlichen lateralen Geschwindigkeiten des  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes  $\tau_{Diff1}$  und  $\tau_{Diff2}$  finden sich in Tab. 3-4 und Abb. 3-30.

**Tab. 3-4: Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Terbutalin auf die Bindung von 5 nM Alexa-NA an A549-Zellen.**

		Alexa-NA Gesamtbindung [%]	Bindung $\tau_{Diff1}$ [nM]	Bindung $\tau_{Diff2}$ [nM]	Anteil $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		100,00 ( $\pm$ 17,65)	2,06 ( $\pm$ 0,51)	0,41 ( $\pm$ 0,28)	5,06
	5	85,65 ( $\pm$ 6,64)	1,75 ( $\pm$ 0,46)	0,36 ( $\pm$ 0,31)	4,88
+ 100 nM Terbutalin [min] (n = 5)	15	100,79 ( $\pm$ 11,07)	2,15 ( $\pm$ 0,44)	0,34 ( $\pm$ 0,24)	6,42
	25	105,90 ( $\pm$ 20,08)	2,34 ( $\pm$ 0,59)	0,28 ( $\pm$ 0,15)	8,39
	35	79,03 ( $\pm$ 17,29)	1,65 ( $\pm$ 0,40)	0,30 ( $\pm$ 0,13)	5,52

Fortsetzung Tab. 3-4

		Alexa-NA Gesamtbindung [%]	Bindung $\tau_{Diff 1}$ [nM]	Bindung $\tau_{Diff 2}$ [nM]	Anteil $\tau_{Diff 1}/\tau_{Diff 2}$
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		100,00 ( $\pm$ 20,68)	1,17 ( $\pm$ 0,42)	0,59 ( $\pm$ 0,18)	1,99
	5	77,97 ( $\pm$ 10,82)	1,03 ( $\pm$ 0,21)	0,33 ( $\pm$ 0,15)	3,08
+ 1 $\mu$ M Terbutalin [min] (n = 5)	15	76,09 ( $\pm$ 14,84)	1,05 ( $\pm$ 0,26)	0,29 ( $\pm$ 0,07)	3,64
	25	40,49 ( $\pm$ 32,39)**	0,48 ( $\pm$ 0,54)	0,23 ( $\pm$ 0,18)	2,05
	35	43,17 ( $\pm$ 28,70)**	0,58 ( $\pm$ 0,42)	0,18 ( $\pm$ 0,12)	3,21
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		100,00 ( $\pm$ 19,79)	1,73 ( $\pm$ 0,46)	0,46 ( $\pm$ 0,28)	3,79
	5	85,66 ( $\pm$ 44,71)	1,56 ( $\pm$ 0,94)	0,31 ( $\pm$ 0,19)	5,11
+ 5 $\mu$ M Terbutalin [min] (n = 5)	15	75,84 ( $\pm$ 32,41)	1,36 ( $\pm$ 0,72)	0,30 ( $\pm$ 0,17)	4,58
	25	57,54 ( $\pm$ 30,81)*	1,10 ( $\pm$ 0,57)	0,16 ( $\pm$ 0,13)	6,84
	35	40,51 ( $\pm$ 29,12)**	0,75 ( $\pm$ 0,54)	0,13 ( $\pm$ 0,11)	5,79

(p\*  $\leq$  0,05, p\*\*  $\leq$  0,01)

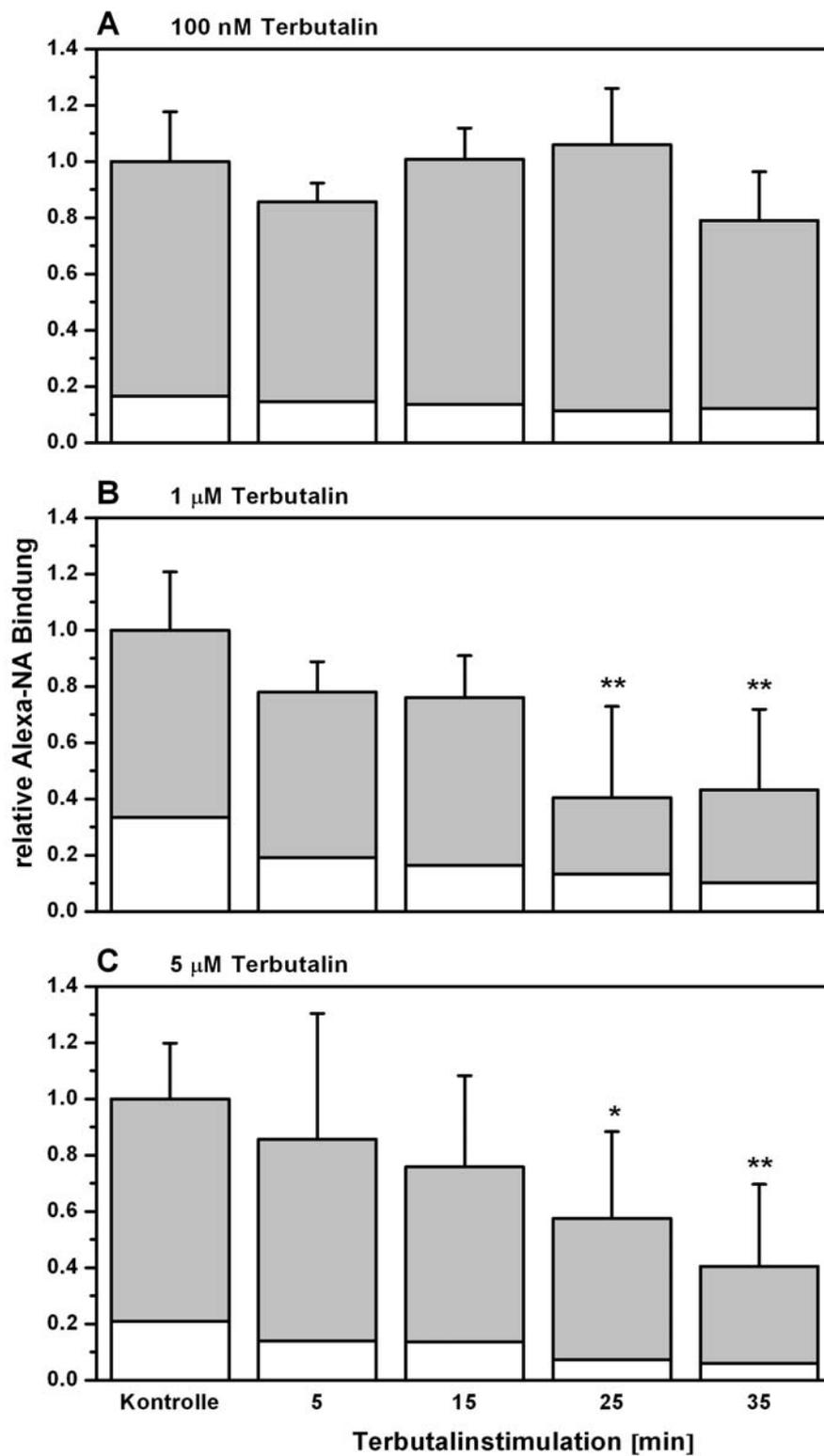


Abb. 3-30: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin über 35 min, (je n = 5). Anteile an der Gesamtbindung:  $\tau_{Diff 1}$  (grau) und  $\tau_{Diff 2}$  (weiß); ( $p^* \leq 0,05$ ;  $p^{**} \leq 0,01$ ).

Die Stimulation mit 100 nM Terbutalin führte unabhängig vom Stimulationszeitpunkt zu keiner signifikanten Beeinflussung der Alexa-NA-Bindung an die A549-Zellen (Abb. 3-30 A). Das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitsanteile zueinander war sehr variabel (Tab. 3-4). Eine Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin bewirkte hingegen eine eindeutige Reduktion der Bindung von Alexa-NA, welche nach 25- und 35-minütiger Stimulation Signifikanz erreichte (Tab. 3-4, Abb. 3-30 B). Zu ebendiesen Zeitpunkten verblieb eine Restbindung, die mit rund 40 % in einer vergleichbaren Größenordnung in den Verdrängungsexperimenten gefunden wurden (siehe Kap. 3.2.1). Der Quotienten  $\tau_{Diff1}/\tau_{Diff2}$  nahm geringfügig zu, was auf eine bevorzugte Verdrängung langsamer Geschwindigkeitsanteile schließen ließ (Tab. 3-4). Eine ausgeprägt zeitabhängige Abnahme der Bindung von Alexa-NA zeigte sich ebenfalls nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin (Tab. 3-4, Abb. 3-30 C). Nach 35-minütiger Stimulation konnten nur noch etwa 40 % der Ausgangsbindung gefunden werden. Der Quotienten  $\tau_{Diff1}/\tau_{Diff2}$  erhöhte sich, was aus einer stärkeren Abnahme langsamer Mobilitätsanteile resultierte (Tab. 3-4). Beispielhaft sind in Abb. 3-31 normalisierte Autokorrelationskurven für jede Stimulationsbedingung dargestellt.

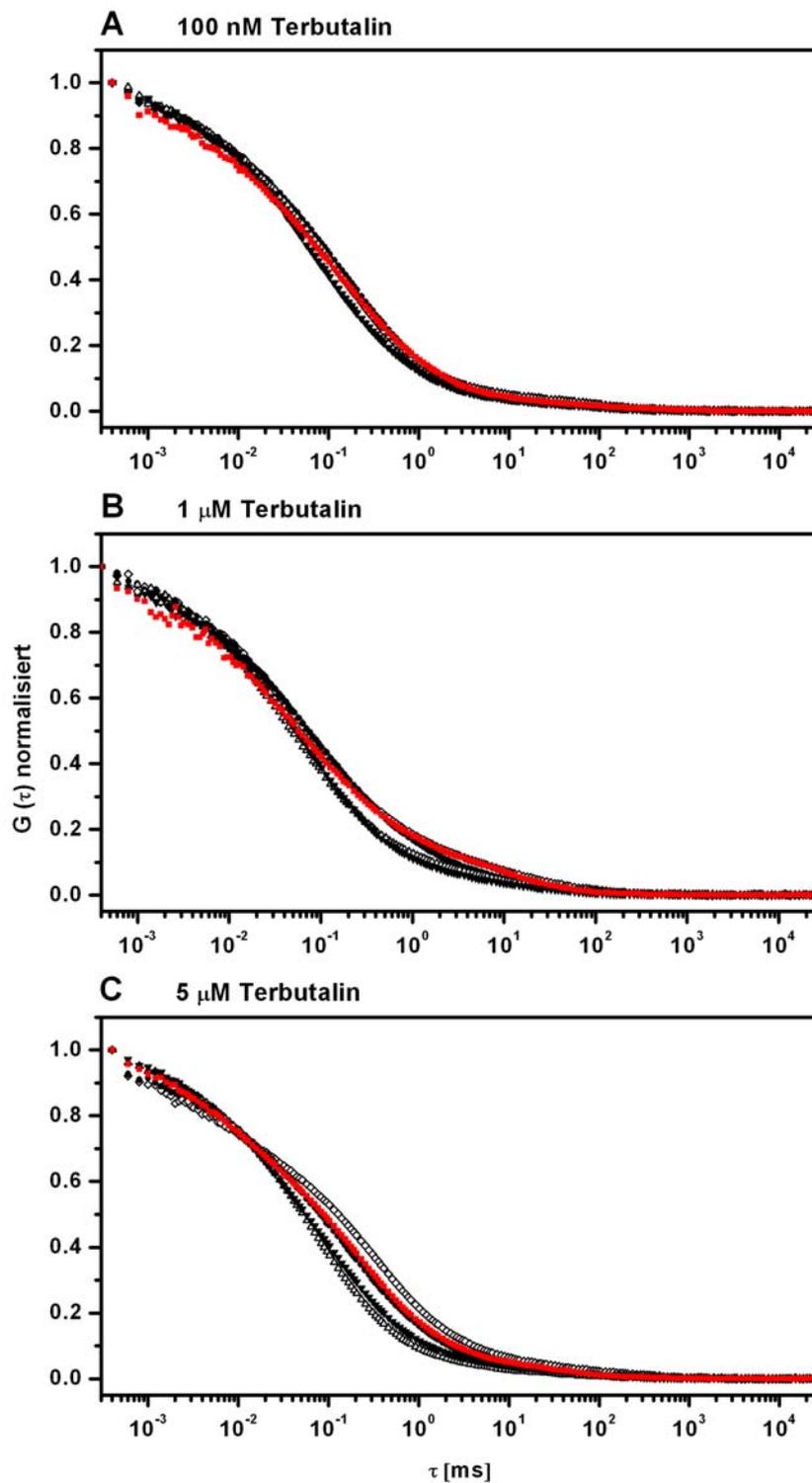


Abb. 3-31: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Autokorrelationskurven von Alexa-NA gebunden an A549-Zellen.

A549-Zellen inkubiert mit 5nM Alexa-NA für 15 min (Kontrolle, ■) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin für 5 ( $\diamond$ ), 15 ( $\bullet$ ), 25 ( $\triangle$ ) und 35 ( $\blacktriangledown$ ) min.

Die Autokorrelationskurven vor bzw. nach Stimulation mit 100 nM Terbutalin waren erwartungsgemäß weitgehend deckungsgleich (Abb. 3-31 A). Die beschriebene Bindungsabnahme nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin spiegelte sich in einer leichten Linksverschiebung der entsprechenden Autokorrelationskurven im unteren Teilbereich wider (Abb. 3-31 B). In Abhängigkeit von der Stimulationszeit entfernten sich die Autokorrelationskurven immer stärker von der Kontrollkurve. Besonders ausgeprägt zeigte sich diese Verschiebung der Kurven zu kleineren Diffusionszeitkonstanten und damit die Bindungsabnahme nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin (Abb. 3-31 C). Der Einfluss von Terbutalin auf die Geschwindigkeit der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit hoher lateraler Beweglichkeit, kann aus Tab. 3-5 sowie Abb. 3-32 entnommen werden.

**Tab. 3-5: Einfluss der Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff1}$  verschiedener Zellen.**

	$\tau_{Diff1}$ [ms]				
	Zelle A (dunkelblau)	Zelle B (cyan)	Zelle C (hellgrau)	Zelle D (blau)	Zelle E (dunkelgrau)
<b>5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)</b>	0,35 ( $\pm$ 0,09)	0,62 ( $\pm$ 0,17)	0,45 ( $\pm$ 0,18)	0,78 ( $\pm$ 0,26)	0,45 ( $\pm$ 0,09)
<b>5</b>	0,52 ( $\pm$ 0,13)	0,46 ( $\pm$ 0,06)	0,40 ( $\pm$ 0,04)	0,53 ( $\pm$ 0,05)	0,27 ( $\pm$ 0,03)
<b>+ 100 nM Terbutalin</b>					
<b>15 [min]</b>	0,29 ( $\pm$ 0,08)	0,46 ( $\pm$ 0,06)	0,31 ( $\pm$ 0,05)	0,51 ( $\pm$ 0,24)	0,24 ( $\pm$ 0,01)
<b>25 (n = 5)</b>	0,25 ( $\pm$ 0,04)	0,43 ( $\pm$ 0,04)	0,34 ( $\pm$ 0,03)	0,53 ( $\pm$ 0,09)	0,37 ( $\pm$ 0,01)
<b>35</b>	0,28 ( $\pm$ 0,05)	0,65 ( $\pm$ 0,19)	0,48 ( $\pm$ 0,13)	0,49 ( $\pm$ 0,06)	0,57 ( $\pm$ 0,27)
	Zelle F (dunkelblau)	Zelle G (cyan)	Zelle H (hellgrau)	Zelle I (blau)	Zelle J (dunkelgrau)
<b>5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)</b>	0,48 ( $\pm$ 0,05)	0,23 ( $\pm$ 0,05)	0,91 ( $\pm$ 0,10)	0,66 ( $\pm$ 0,25)	1,24 ( $\pm$ 0,25)
<b>5</b>	0,89 ( $\pm$ 0,43)	0,55 ( $\pm$ 0,11)	1,01 ( $\pm$ 0,46)	0,37 ( $\pm$ 0,06)	0,87 ( $\pm$ 0,24)
<b>+ 1 <math>\mu</math>M Terbutalin</b>					
<b>15 [min]</b>	0,62 ( $\pm$ 0,17)	0,58 ( $\pm$ 0,19)	0,94 ( $\pm$ 0,17)	0,27 ( $\pm$ 0,01)	0,87 ( $\pm$ 0,19)
<b>25 (n = 5)</b>	0,50 ( $\pm$ 0,05)	4,92 ( $\pm$ 1,90)	1,59 ( $\pm$ 0,69)	1,68 ( $\pm$ 1,19)	3,08 ( $\pm$ 2,40)
<b>35</b>	0,72 ( $\pm$ 0,26)	1,64 ( $\pm$ 1,33)	0,65 ( $\pm$ 0,35)	3,69 ( $\pm$ 3,09)	1,03 ( $\pm$ 0,56)

Fortsetzung Tab. 3-5

	$\tau_{Diff1}$ [ms]				
	Zelle K (dunkelblau)	Zelle L (cyan)	Zelle M (hellgrau)	Zelle N (blau)	Zelle O (dunkelgrau)
<b>5 nM Alexa-NA</b>					
<b>15 min (n = 5)</b>	0,43 ( $\pm$ 0,04)	0,32 ( $\pm$ 0,06)	0,83 ( $\pm$ 0,33)	1,26 ( $\pm$ 0,41)	0,62 ( $\pm$ 0,35)
<b>5</b>	0,52 ( $\pm$ 0,09)	0,37 ( $\pm$ 0,04)	0,88 ( $\pm$ 0,41)	0,78 ( $\pm$ 0,45)	0,81 ( $\pm$ 0,15)
<b>+ 5 <math>\mu</math>M</b>					
<b>Terbutalin</b>					
<b>15</b>	0,43 ( $\pm$ 0,06)	0,39 ( $\pm$ 0,04)	0,57 ( $\pm$ 0,14)	1,48 ( $\pm$ 0,67)	0,50 ( $\pm$ 0,06)
<b>[min]</b>					
<b>25</b>	0,23 ( $\pm$ 0,01)	0,49 ( $\pm$ 0,07)	0,86 ( $\pm$ 0,12)	4,39 ( $\pm$ 2,00)	1,45 ( $\pm$ 0,79)
<b>(n = 5)</b>					
<b>35</b>	0,32 ( $\pm$ 0,06)	0,29 ( $\pm$ 0,04)	0,47 ( $\pm$ 0,12)	1,39 ( $\pm$ 0,24)	5,15 ( $\pm$ 4,34)

Auf unterschiedlichen Zellen konnten sehr homogene Werte für  $\tau_{Diff1}$  gefunden werden. Die Stimulation mit 100 nM Terbutalin führte zu keiner deutlichen Beeinflussung von  $\tau_{Diff1}$  (Tab. 3-5, Abb. 3-32 A). Bei einer Erhöhung der Terbutalin-konzentration auf 1  $\mu$ M zeigten die Zellen bis Minute 15 ein dem niedrigeren Stimulus vergleichbares unbeeinflusstes Verhalten. Nach 25-minütiger Stimulation konnte eine Verschiebung von  $\tau_{Diff1}$  zu langsameren Geschwindigkeiten hin detektiert werden (Tab. 3-5, Abb. 3-32 B). Diese Veränderung trat zeitgleich mit der signifikanten Verdrängung des Liganden auf (siehe Abb. 3-30). Das Ausmaß der Reaktion verschiedener Zellen auf diesen Stimulus war unterschiedlich stark ausgeprägt. Nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin konnte ein ähnlicher Effekt detektiert werden. Bis Minute 15 blieb  $\tau_{Diff1}$  nahezu unbeeinflusst, wohingegen ab Minute 25 teilweise Änderungen der Geschwindigkeiten meist hin zu langsameren Mobilitäten gefunden wurden (Tab. 3-5, Abb. 3-32 C). Im Vergleich mit Abb. 3-30 war erneut eine zeitliche Übereinstimmung mit der erfolgreichen Verdrängung des Liganden zu finden. Nicht jede Zelle reagierte auf diese starke agonistische Stimulation mit einer deutlichen Veränderung von  $\tau_{Diff1}$ .

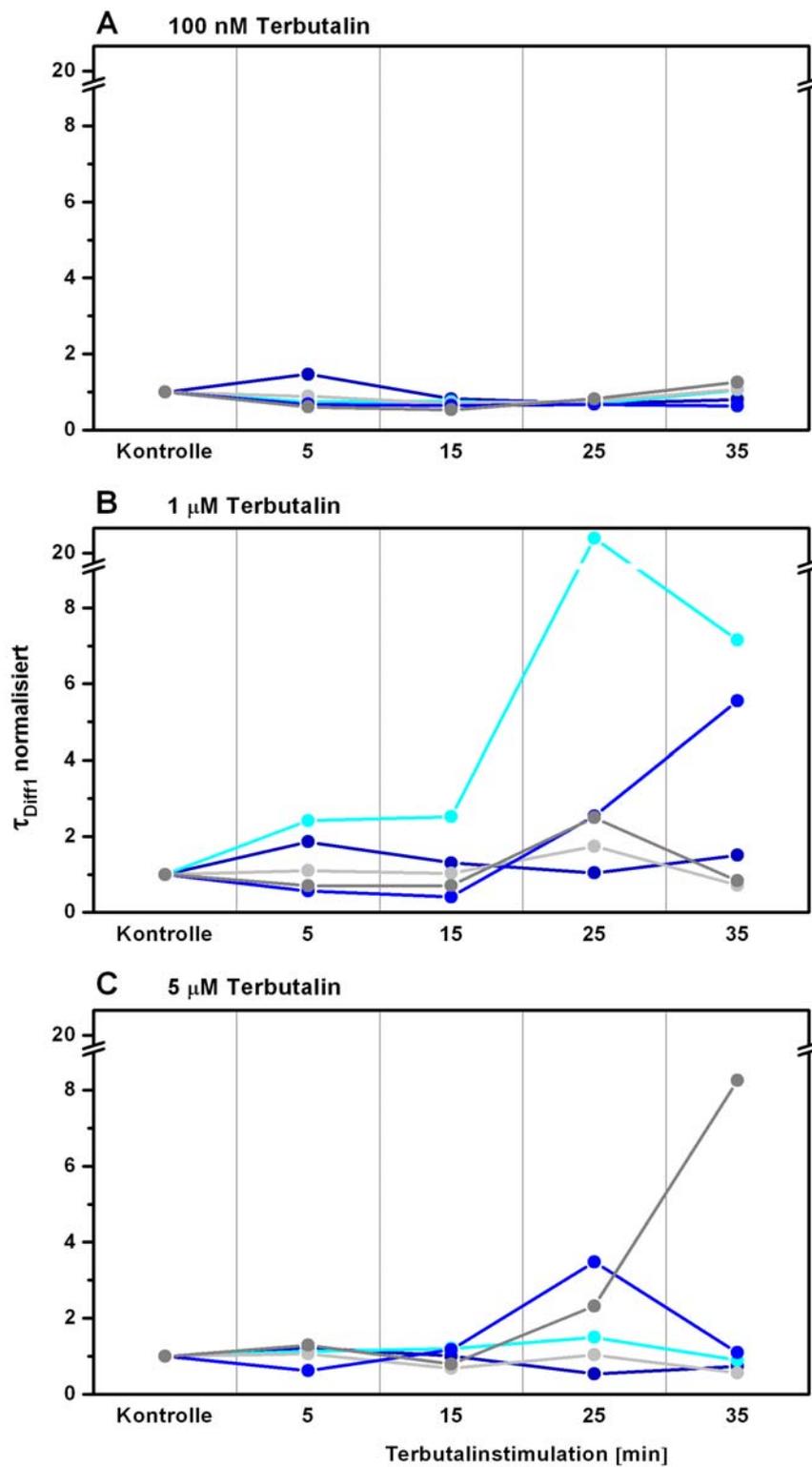


Abb. 3-32: Einfluss der Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff1}$  verschiedener Zellen.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA 15 min (Kontrolle) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1  $\mu$ M und (C) 5  $\mu$ M Terbutalin über 35 min. Normalisierung auf  $\tau_{Diff1}$  der jeweiligen Kontrolle.

Die Konsequenzen einer Terbutalinstimulation auf die langsam lateralen Rezeptor-Ligand-Komplexe mit der Diffusionszeit  $\tau_{Diff 2}$  werden von Tab. 3-6 sowie Abb. 3-33 wiedergegeben.

**Tab. 3-6: Einfluss der Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff 2}$  verschiedener Zellen.**

		$\tau_{Diff 2}$ [ms]				
		Zelle A (dunkelblau)	Zelle B (cyan)	Zelle C (hellgrau)	Zelle D (blau)	Zelle E (dunkelgrau)
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		72,84 ( $\pm 39,99$ )	123,40 ( $\pm 52,85$ )	90,81 ( $\pm 65,54$ )	27,85 ( $\pm 23,44$ )	32,50 ( $\pm 9,56$ )
	5	93,00 ( $\pm 67,70$ )	138,58 ( $\pm 54,78$ )	36,24 ( $\pm 22,86$ )	12,52 ( $\pm 2,78$ )	33,09 ( $\pm 9,47$ )
+ 100 nM Terbutalin [min] (n = 5)	15	84,65 ( $\pm 35,85$ )	69,94 ( $\pm 21,34$ )	41,00 ( $\pm 34,31$ )	31,03 ( $\pm 31,38$ )	44,41 ( $\pm 31,18$ )
	25	81,78 ( $\pm 35,54$ )	84,44 ( $\pm 32,93$ )	64,65 ( $\pm 20,01$ )	42,82 ( $\pm 23,56$ )	52,71 ( $\pm 27,19$ )
	35	45,24 ( $\pm 19,28$ )	77,86 ( $\pm 28,22$ )	56,34 ( $\pm 25,36$ )	23,56 ( $\pm 11,42$ )	36,25 ( $\pm 14,45$ )
		Zelle F (dunkelblau)	Zelle G (cyan)	Zelle H (hellgrau)	Zelle I (blau)	Zelle J (dunkelgrau)
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		20,95 ( $\pm 13,81$ )	11,99 ( $\pm 5,11$ )	11,48 ( $\pm 4,40$ )	17,19 ( $\pm 5,94$ )	37,24 ( $\pm 8,94$ )
	5	28,65 ( $\pm 15,43$ )	31,28 ( $\pm 16,78$ )	29,58 ( $\pm 27,89$ )	43,44 ( $\pm 21,41$ )	43,76 ( $\pm 25,69$ )
+ 1 $\mu$ M Terbutalin [min] (n = 5)	15	51,57 ( $\pm 50,25$ )	21,39 ( $\pm 11,52$ )	21,71 ( $\pm 7,79$ )	92,88 ( $\pm 14,42$ )	51,79 ( $\pm 17,51$ )
	25	29,20 ( $\pm 10,73$ )	n.d.	35,49 ( $\pm 56,46$ )	77,29 ( $\pm 125,34$ )	22,84 ( $\pm 13,00$ )
	35	24,31 ( $\pm 6,16$ )	44,17 ( $\pm 32,30$ )	14,34 ( $\pm 2,99$ )	42,92 ( $\pm 22,40$ )	61,91 ( $\pm 0,00$ )

n.d. = nicht detektierbar

Fortsetzung Tab. 3-6

		$\tau_{Diff\ 2}$ [ms]				
		Zelle K (dunkelblau)	Zelle L (cyan)	Zelle M (hellgrau)	Zelle N (blau)	Zelle O (dunkelgrau)
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 5)		37,79 ( $\pm$ 13,40)	27,74 ( $\pm$ 9,63)	35,62 ( $\pm$ 34,75)	36,08 ( $\pm$ 23,85)	46,48 ( $\pm$ 48,00)
	5	82,65 ( $\pm$ 40,39)	26,28 ( $\pm$ 6,14)	29,63 ( $\pm$ 11,54)	27,97 ( $\pm$ 19,90)	51,83 ( $\pm$ 53,51)
	15	68,43 ( $\pm$ 57,69)	25,42 ( $\pm$ 6,69)	17,71 ( $\pm$ 11,69)	31,21 ( $\pm$ 33,50)	55,55 ( $\pm$ 32,09)
+ 5 $\mu$ M Terbutalin [min] (n = 5)	25	30,16 ( $\pm$ 15,41)	51,57 ( $\pm$ 29,34)	37,75 ( $\pm$ 26,96)	50,84 ( $\pm$ 31,01)	47,92 ( $\pm$ 31,79)
	35	39,95 ( $\pm$ 20,08)	27,75 ( $\pm$ 16,38)	25,24 ( $\pm$ 20,79)	57,26 ( $\pm$ 15,21)	n.d.

n.d. = nicht detektierbar

Die Diffusionszeiten der langsamen Mobilitäten mit  $\tau_{Diff\ 2}$  zeigten auf unterschiedlichen Zellen eine breite Streuung. Die Stimulation mit 100 nM Terbutalin hatte keine eindeutige Auswirkung auf  $\tau_{Diff\ 2}$  (Tab. 3-6, Abb. 3-33 A). 1  $\mu$ M Terbutalin führte bei jeder der betrachteten Zellen zu einer Vergrößerung von  $\tau_{Diff\ 2}$  bis Minute 15 und damit zu einer Verlangsamung der langsam mobilen Rezeptor-Ligand-Komplexe. Die ab Minute 25 detektierbare Restbindung wies bezüglich  $\tau_{Diff\ 2}$  ein inkonsistentes Verhalten auf (Tab. 3-6, Abb. 3-33 B). Nach Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin konnte keine Verstärkung des Effektes von 1  $\mu$ M Terbutalin festgestellt werden. Lediglich zwei Zellen reagierten mit einer Erhöhung von  $\tau_{Diff\ 2}$  bis Minute 15. Die übrigen Zellen zeigten eine geringfügige Geschwindigkeitsreduktion erst ab Minute 25 (Tab. 3-6, Abb. 3-33 C).

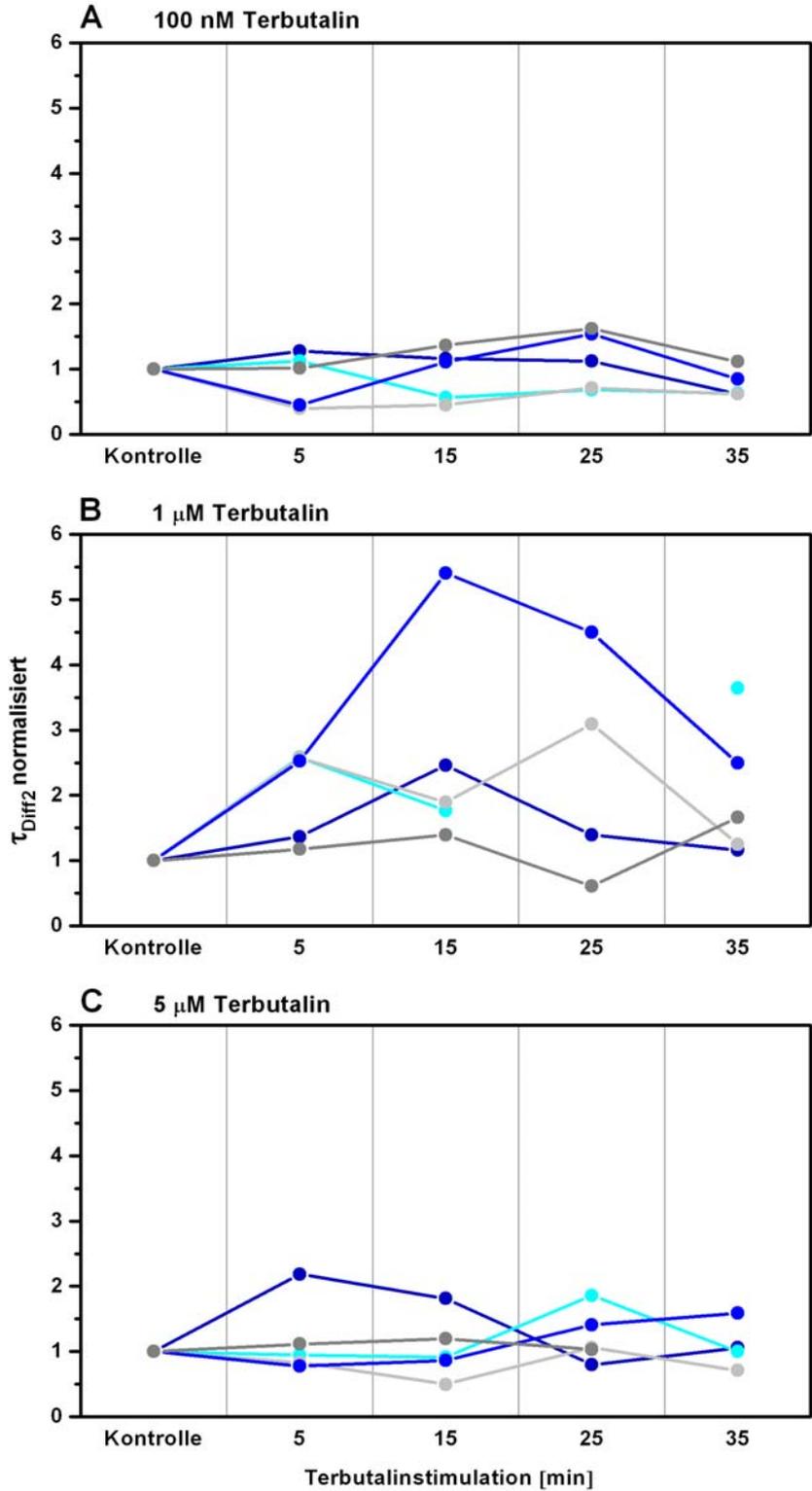


Abb. 3-33: Einfluss der Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff 2}$  verschiedener Zellen.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA 15 min (Kontrolle) und nach anschließender Stimulation mit (A) 100 nM, (B) 1 μM und (C) 5 μM Terbutalin über 35 min. Normalisierung auf  $\tau_{Diff 2}$  der jeweiligen Kontrolle.

### 3.2.3 Hemmung der Signaltransduktion und Regulation

Wie sich eine CTX-Inkubation und somit eine Störung der Übertragung eines extrazellulären Signals in das Zellinnere auf die Bindung von Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR und auf die sich dadurch ergebenden Diffusionszeitkonstanten auswirkt, wurde mittels FCS untersucht und wird im Folgenden zusammengefasst. Sowohl Tab. 3-7 als auch Abb. 3-34 geben die Bindung von 5 nM Alexa-NA an den Rezeptor und die Verteilung auf die beiden Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{Diff1}$  und  $\tau_{Diff2}$  sowie den Einfluss von CTX und der sich anschließenden Terbutalinstimulation wieder.

Tab. 3-7: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Bindung von 5 nM Alexa-NA an A549-Zellen.

		Alexa-NA Gesamtbindung [%]	Bindung $\tau_{Diff1}$ [nM]	Bindung $\tau_{Diff2}$ [nM]	Anteil $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$
5 nM Alexa-NA 15 min (n = 7)		100,0 ( $\pm$ 29,4)	1,39 ( $\pm$ 0,44)	0,45 ( $\pm$ 0,17)	3,39
1 $\mu$ g/ml CTX 4 h (n = 4)		107,2 ( $\pm$ 24,9)	1,51 ( $\pm$ 0,46)	0,46 ( $\pm$ 0,06)	3,30
	5	100,2 ( $\pm$ 22,1)	1,33 ( $\pm$ 0,37)	0,52 ( $\pm$ 0,19)	2,99
+ 1 $\mu$ M Terbutalin [min] (n = 4)	15	125,9 ( $\pm$ 33,4)	1,82 ( $\pm$ 0,60)	0,50 ( $\pm$ 0,09)	3,75
	25	116,8 ( $\pm$ 20,0)	1,60 ( $\pm$ 0,46)	0,56 ( $\pm$ 0,15)	3,22
	35	105,0 ( $\pm$ 32,7)	1,48 ( $\pm$ 0,48)	0,46 ( $\pm$ 0,13)	3,69

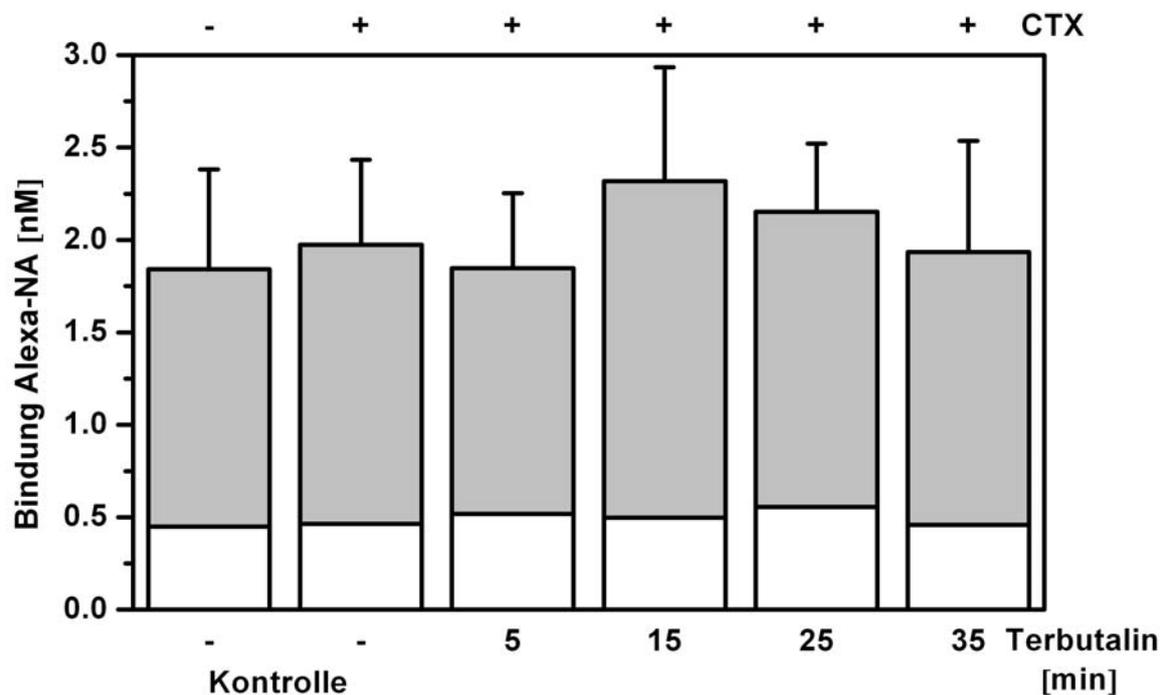


Abb. 3-34: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Bindung von Alexa-NA.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA für 15 min ohne (Kontrolle,  $n = 12$ ) und mit vorheriger Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  CTX für 4 h (CTX-Kontrolle,  $n = 7$ ). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin über 35 min ( $n = 7$ ). Anteile an der Gesamtbindung:  $\tau_{Diff1}$  (grau) und  $\tau_{Diff2}$  (weiß).

Die Vorinkubation mit CTX hatte weder auf die Gesamtbindung von 5 nM Alexa-NA an A549-Zellen noch auf das Verhältnis der beiden Mobilitäten zueinander einen erkennbaren Einfluss. Nach Stimulation der mit CTX vorinkubierten Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin blieb die Verdrängung des Liganden vollständig aus. Die Gesamtbindung von Alexa-NA änderte sich bis Minute 35 nicht signifikant. Gänzlich unbeeinflusst blieb das Verhältnis der Anteile von  $\tau_{Diff1}$  zu  $\tau_{Diff2}$  (Tab. 3-7).

Aus Abb. 3-35 wird ersichtlich, dass die Vorinkubation mit CTX keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit schneller Rezeptor-Ligand-Komplexe mit  $\tau_{Diff1}$  ausübte. Die anschließende agonistische Stimulation führte zu unterschiedlichen Reaktionen. So zeigten drei von sieben Zellen eine Beschleunigung von  $\tau_{Diff1}$  über den gesamten

Stimulationszeitraum. Drei weitere Zellen zeigten eine Beschleunigung erst nach initialer Verlangsamung.

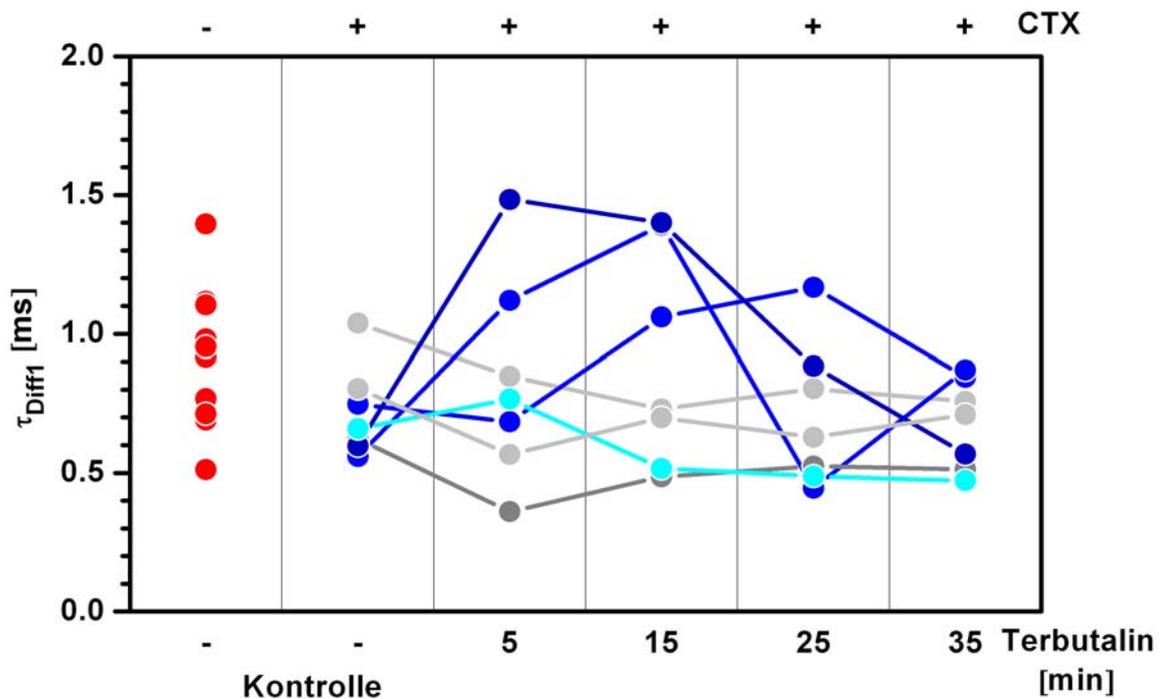


Abb. 3-35: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff1}$  verschiedener Zellen.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA 15 min ohne (Kontrolle,  $n = 12$ ) und mit vorheriger Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  CTX für 4 h (CTX-Kontrolle,  $n = 7$ ). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin über 35 min ( $n = 7$ ).

Langsame Rezeptor-Ligand-Komplexe mit der Diffusionszeitkonstante  $\tau_{Diff2}$  zeigten, wie Abb. 3-36 belegt, keine Reaktion auf eine Vorinkubation mit CTX. Die folgende Terbutalinzugabe führte zwar initial zu einer Geschwindigkeitszunahme, in der zeitlichen Folge war jedoch kein einheitlicher Einfluss auf die unterschiedlichen Zellen erkennbar. Der Endzustand nach 35-minütiger Stimulation offenbarte jedoch bei sechs Zellen eine schnellere Mobilität für  $\tau_{Diff2}$  als der entsprechende Ausgangszustand aufwies.

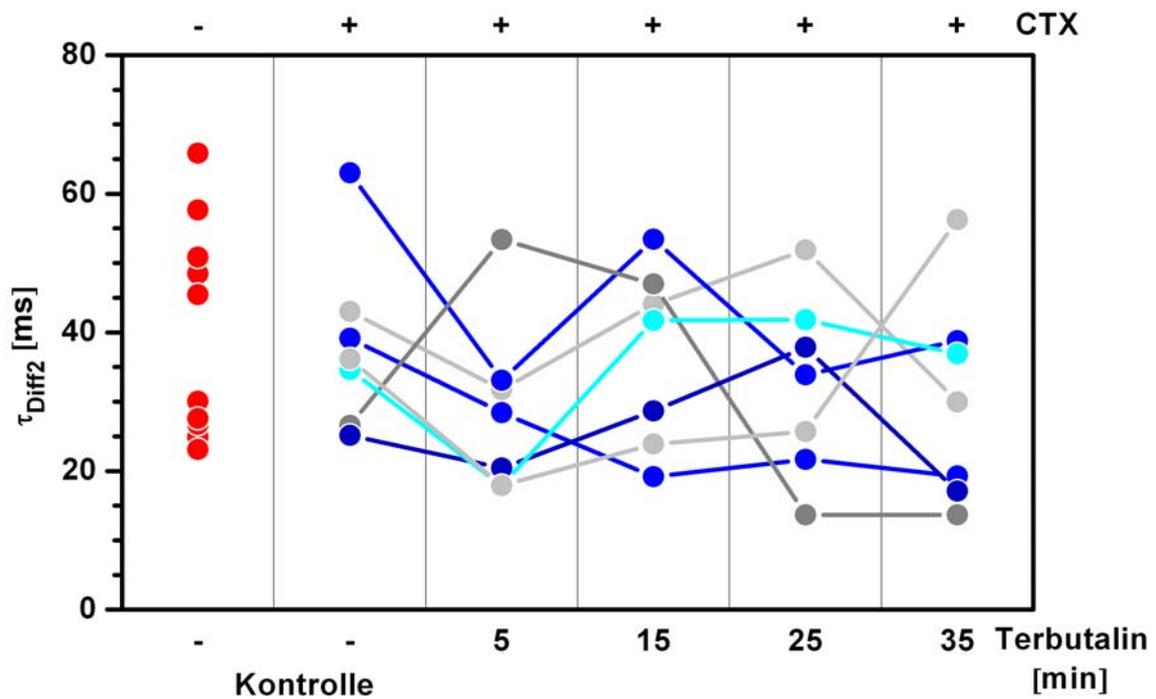


Abb. 3-36: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf  $\tau_{Diff2}$  verschiedener Zellen.

A549-Zellen inkubiert mit 5 nM Alexa-NA 15 min ohne (Kontrolle,  $n = 12$ ) und mit vorheriger Inkubation mit 1  $\mu\text{g/ml}$  CTX für 4 h (CTX-Kontrolle,  $n = 7$ ). Anschließende Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin über 35 min ( $n = 7$ ).

## 4 Diskussion

Das umfassende Verständnis von Membranorganisation und Signaltransduktion ist wichtig für die Analyse der Dynamik von Membranproteinen wie GPCR. Bezüglich des  $\beta_2$ AR sind die biochemischen Prozesse sowie die einzelnen Komponenten, die an der Weitergabe eines externen Signals in das Zellinnere beteiligt sind, bereits größtenteils identifiziert. Die Dynamik der einzelnen Reaktionspartner und die Mechanismen, die zu einer schnellen und erfolgreichen Interaktion zwischen den beteiligten Proteinen führen, bedürfen jedoch einer weiteren Charakterisierung.

Das lange angenommene Modell der zufälligen Kollisionen zwischen Ligand, GPCR, G-Proteinen und Effektorproteinen als Grundlage der Signalweitergabe entspricht nicht mehr dem aktuellen Wissensstand. Inzwischen ist anerkannt, dass zur schnellen und spezifischen Weiterleitung externer Stimuli an intrazelluläre Signalmoleküle ein räumlich und zeitlich organisiertes System von miteinander interagierenden Molekülen wahrscheinlicher ist als ein System mit frei diffundierenden Proteinen.

Um eine Betrachtung der Proteindynamik in der Membran lebender Zellen zu ermöglichen, kommen verschiedene nicht invasive meist fluoreszenzbasierte Mikroskopietechniken zum Einsatz.

Einzelmolekültracking, also die Detektion und Verfolgung einzelner Moleküle in der Zellmembran mit einer zeitlich und räumlich hoch auflösenden Kamera- und Mikroskopkombination, stellt eine leistungsstarke und aussagekräftige Methode dar, um das Diffusionsverhalten von Membranproteinen in Bezug auf die Organisation der Plasmamembran im jeweiligen Zellsystem zu beschreiben.

Eine gut etablierte Technik für die Ermittlung von Rezeptordynamiken in der Membran lebender Zellen und insbesondere für die Quantifizierung von Rezeptor-Ligand-Interaktionen ist außerdem die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie.

Das Ziel dieser Arbeit ist, durch vergleichende und ergänzende Verwendung dieser beiden Techniken, die Dynamik von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen in der Membran von A549-Zellen zu beschreiben.

## 4.1 Diskussion der Ergebnisse des Einzelmolekültrackings

Um die Bewegung einzelner Moleküle verfolgen zu können, ist eine hohe räumliche Auflösung erforderlich, die im wesentlichen vom optischen System abhängt. Unter Verwendung eines schwingungsfreien Tisches und dem Einsatz eines mechanisch stabilen Mikroskops wurde eine mit Nanobeads bestimmte Lokalisierungsgenauigkeit von 15 nm bei einem SNR von 15 erreicht. Die mit immobilisiertem Alexa-NA erreichbare Lokalisierungsgenauigkeit von 27 nm bei einem SNR von 1,4 lag deutlich unterhalb der Sprungweiten, die von membranären Proteinen zu erwarten waren. Die optimale Ligandkonzentration für die Zellmessungen wurde experimentell ermittelt und konnte auf 0,5 nM Alexa-NA festgelegt werden (Abb. 3-6).

Nach 15-minütiger Inkubation der A549-Zellen mit 0,5 nM Alexa-NA konnten fluoreszierende Partikel auf der oberen Zellmembran detektiert werden. Sowohl die Intensität dieser Signale (Abb. 3-7) als auch deren einstufiges Bleichverhalten (Abb. 3-8) ließen den Schluss zu, dass es sich hierbei um Einzelmoleküle mit jeweils einer Farbstoffmarkierung handelte.

Im Konkurrenzexperiment zeigte sich eine schwache Verdrängbarkeit der Alexa-NA-Bindung an A549-Zellen. Terbutalin und Isoprenalin verminderten die Entstehung von Trajektorien etwa gleich stark um 24 ( $\pm 16$ ) % bzw. 21 ( $\pm 21$ ) %. Weder Terbutalin noch Isoprenalin war somit in der Lage kurze und/oder lange Trajektorien in einem signifikanten Ausmaß zu verhindern (Abb. 3-9 B). Unspezifische Bindung über den Farbstoffanteil des Liganden war kaum verantwortlich für die hohe Restbindung im Verdrängungsexperiment (Abb. 3-9 C). Zunächst liegt die Vermutung nahe, dass Alexa-NA an A549-Zellen nur gering spezifisch an den  $\beta_2$ AR bindet und eher überwiegend unspezifische Interaktion mit der Plasmamembran eingeht. Da jedoch mittels FCS in einem identischen Verdrängungsexperiment eine signifikante Verdrängung von Alexa-NA sowohl durch Terbutalin als auch durch Isoprenalin gezeigt werden konnte (Abb. 3-29), kann dies nicht der Grund für die nicht detektierbare Verdrängung im Einzelmolekülmikroskop sein. Eine Erklärung findet sich beim Vergleich der

Beobachtungsflächen der beiden Techniken. Im FCS-Experiment wird eine kleine Fläche von etwa  $0,13 \mu\text{m}^2$  illuminiert und bei der Lokalisierung des Fokus werden Bereiche mit einem hohen Maß an Bindung bevorzugt. Somit findet eine Selektion von Bereichen mit einer hohen Rezeptordichte statt. Das Beobachtungsfeld des Einzelmolekülmikroskops hat eine Fläche von etwa  $164 \mu\text{m}^2$ . Unter Berücksichtigung der gaußförmigen Laserillumination wird eine Fläche von etwa  $107 \mu\text{m}^2$  illuminiert, die somit rund 800-mal größer ist als im FCS-Experiment. Neben Domänen auf der Zellmembran mit hoher Rezeptordichte werden gleichzeitig Bereiche erfasst, die eine geringe Anzahl von Rezeptoren aufweisen und damit die Möglichkeiten von meist unspezifischen Ligand-Membran-Interaktionen bieten. Überwiegen solche Membranbereiche, so kann die Verdrängung der spezifischen Bindung nicht mehr detektiert werden. Unspezifische Bindung des Liganden an die Membran spielt somit beim SPT eine viel bedeutendere Rolle als bei der FCS.

Auffällig ist die geringe Trajektorienlänge und somit die entsprechend kurze Bindungsdauer des Alexa-NA an die Membran von A549-Zellen. Durch eine biexponentielle Kurvenanpassung an das Histogramm der Trajektorienlänge konnten zwei Zeitkonstanten gefunden werden (Abb. 3-10).  $\tau_1 = 66,4 (\pm 1,0) \text{ ms}$  wurde zu  $97,1 (\pm 3,1) \%$  und  $\tau_2 = 265,4 (\pm 7,2) \text{ ms}$  zu  $2,9 (\pm 0,2) \%$  detektiert. Ein möglicher Grund für die zeitliche Begrenzung einer Trajektorie ist das schnelle Dissoziieren des Liganden von seinem Rezeptor. Die Existenz zweier unterschiedlicher Verweildauern des Liganden am Rezeptor lässt sich unter Bezug auf das Ternärkomplex-Modell erklären. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass GPCR in verschiedenen Zuständen existieren, die sich in ihrer Agonistaffinität unterscheiden [127, 128]. Rezeptoren im aktiven Zustand sind an G-Proteine gekoppelt und haben eine hohe Affinität für Agonisten, woraus eine längere Verweildauer des Liganden am Rezeptor resultiert. Für den Komplex aus phosphoryliertem Rezeptor und Arrestin konnte ebenfalls eine hohe Agonistaffinität nachgewiesen werden [127]. Im inaktiven Zustand hingegen sind die Rezeptoren nicht an G-Proteine gekoppelt und besitzen eine geringe Affinität für

Agonisten, was eine kurze Existenzdauer des Rezeptor-Ligand-Komplexes zur Folge hat. Somit könnte die kurze Bindungsdauer des Alexa-NA an A549-Zellen eine Beleg für die Existenz vieler inaktiver Rezeptoren sein. Wenn es nach der Bindung des Liganden an den aktiven Rezeptor zur Aktivierung des G-Proteins und dessen Dissoziation kommt, dann nimmt die Affinität des Liganden für seinen Rezeptor ab und es kommt somit zur Änderung der Ligandkinetik [127]. Folglich könnte die schnelle Dissoziation des Liganden vom Rezeptor alternativ als Konsequenz einer erfolgreichen G-Protein-Aktivierung interpretiert werden. Verbreitet war bislang die Vorstellung, dass ein GPCR einen Liganden bindet und in der Folge als Rezeptor-Ligand-Komplex in der Lage ist mehrere G-Proteine zu aktivieren. Die vorliegenden Ergebnisse könnten jedoch darauf hinweisen, dass nach G-Protein-Aktivierung der Ligand von seinem Rezeptor dissoziiert und erst ein neu bindender Ligand die Aktivierung des nächsten G-Proteins auslöst. Solch schnelle Bindungsereignisse sind mit Radiorezeptorassays, die bisher zur Ermittlung von Rezeptor-Ligand-Kinetiken Verwendung fanden, nicht detektierbar.

Da die meisten publizierten SPT-Daten von GPCR und sonstigen Membranrezeptoren durch Detektion des direkt markierten Rezeptors entstanden sind, existieren kaum vergleichbare Bindungsdaten. Lediglich Lill *et al.* verwendeten für die Detektion des Neurokinin-1-Rezeptors Substanz P mit TMR-Markierung [95]. Es wurden allerdings keine Aussagen über die tatsächliche Häufigkeitsverteilung der Trajektorienlängen gemacht. Außerdem wurden kurze Trajektorien mit einer Existenzdauer von weniger als 400 ms gänzlich von der Auswertung ausgeschlossen.

Eine weitere denkbare Ursache für kurz existierende Trajektorien wäre ein Bleichen des Farbstoffes. Die verwendete Laserleistung ist jedoch mit rund  $1 \text{ kW/cm}^2$  zu gering, um für die Existenz einer großen Anzahl sehr kurzer Trajektorien verantwortlich zu sein. Ein Abbruch von Trajektorien durch Internalisierung des  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexes ist aufgrund der nur sehr geringen Ligandkonzentration von 0,5 nM nicht plausibel. Zudem kann der unspezifische Anteil der kurzen Bindung ein Resultat aus schnellen Kollisionsereignissen des Liganden mit der Plasmamembran sein.

Zusätzliches Ziel der SPT-Experimente war die Charakterisierung der lateralen Diffusion von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen in der Plasmamembran. Zur Unterscheidung verschiedener Diffusionstypen wurde die in der Literatur etablierte MSD-Analyse herangezogen. Danach waren den Trajektorien der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe unterschiedliche Diffusionstypen zuzuordnen. So wurden nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor nahezu ungehindert lateral diffundierende Rezeptor-Ligand-Komplexe in der Membran von A549-Zellen gefunden (Abb. 3-11). Dieser Diffusionstyp wurde ebenfalls für diverse andere membranäre Rezeptoren beschrieben [78, 83, 103, 129]. Zum anderen konnten Rezeptor-Ligand-Komplexe detektiert werden, deren laterale Diffusion räumlich eingeschränkt war (Abb. 3-12). In der Literatur wird dieser Befund mit der Diffusion des Rezeptors innerhalb von Domänen begründet. Sowohl für den Neurokinin-1-Rezeptor [95] als auch für den Geruchsrezeptor OR17-40 [78] wurde die Diffusion in Domänen unterschiedlicher Größen beschrieben. Für Nanogold markierte Rezeptoren wie den LH (luteinisierendes Hormon)-Rezeptor [130] oder den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor [79, 80] sowie für die mit Latexbeads markierten Glutamat- und Glycinrezeptoren [102, 103] wurde ebenfalls hauptsächlich eine laterale Mobilität innerhalb räumlich begrenzter Domänen gefunden. Die detektierten Domänengrößen variierten erheblich, lagen jedoch meist im dreistelligen Nanometerbereich. Zu berücksichtigen ist, dass kolloidales Gold mit einem Partikeldurchmesser von 40 nm und Latexbeads mit einem Durchmesser von 500 nm um ein Vielfaches größer sind als die Proteine, an die sie gekoppelt sind. Diese Marker stehen daher in der Kritik, die Beweglichkeit der zu detektierenden Proteine u.a. durch Interaktionen mit der Membran und der extrazellulären Matrix räumlich einzuschränken [77, 89].

Die räumliche Begrenzung der Mobilität kann durch Beteiligung des membrannahen Zytoskeletts nach dem ‚membrane skeleton fence model‘ zustande kommen [72]. Transmembranäre Proteine können nach dem ‚anchored-protein picket model‘ ebenfalls Diffusionsbarrieren bilden [75]. Eine lokale Konzentrierung von Proteinen in Mikrodomänen würde die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens von Proteinen, die an demselben Signaltransduktionsweg beteiligt sind und damit die Effektivität der

Signalweitergabe erhöhen. Des Weiteren werden Domänen unabhängige Interaktionen mit membranären oder intrazellulären Proteinen für eine begrenzte laterale Beweglichkeit verantwortlich gemacht [78, 79].

Viele Trajektorien ließen sich allerdings nicht ohne weiteres über das MSD eindeutig einem Diffusionstyp zuordnen. Solche Trajektorien wiesen innerhalb ihrer individuellen Verläufe Heterogenitäten auf. Beispielsweise wechselten sich vorübergehende räumliche Beschränkungen mit nahezu ungehinderter Mobilität ab (Abb. 3-13). Rezeptoren, die sich innerhalb einer räumlich begrenzten Domäne bewegten, schienen teilweise die Möglichkeit zu haben, die Domäne zu verlassen. Die Geschwindigkeiten innerhalb einer Trajektorie waren ebenfalls variabel. So wechselten sich eher immobile Bereiche mit Abschnitten höherer Mobilität ab. Solch ein Bewegungsverhalten ist verschiedentlich publiziert worden. Insbesondere Kusumi *et al.* favorisieren das Modell der ‚hop‘-Diffusion, in dem sich Rezeptoren zwischen verschiedenen Membrankompartimenten fortbewegen können [80]. Die Tatsache, dass die beschriebenen mathematischen Modelle auf die meisten langen Trajektorien nicht anwendbar waren und außerdem für eine statistisch gut abgesicherte MSD-Analyse eine Mindesttrajektorienlänge von sechs Sprüngen zu fordern ist, was lediglich 8,4 % der detektierten Trajektorien erfüllten, machte andere Auswerteverfahren erforderlich, um eine Bearbeitung des Gesamtdatenpools zu ermöglichen.

Um zunächst einen Eindruck von der Geschwindigkeitsverteilung zu erhalten, wurde eine Kurve entsprechend Gl. 1.8 an die Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten aller Trajektorien approximiert, wodurch sich vier Diffusionskoeffizienten ergaben.

Die Mobilitätsgrenze definiert eine Sprungweite, welche von immobilen Molekülen aufgrund der Lokalisierungsgenauigkeit in Abhängigkeit von den experimentellen Gegebenheiten maximal erreicht werden kann (Gl. 3.1, [98]). Unter den gegebenen Bedingungen konnte eine Mobilitätsgrenze von 81 nm gefunden werden. Somit wurden solche Rezeptor-Ligand-Komplexe als immobil definierte, die Diffusionskoeffizienten unterhalb von  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  aufwiesen.

D<sub>1</sub> mit  $0,005 (\pm 0,0002) \mu\text{m}^2/\text{s}$  konnte zu  $15,6 (\pm 0,8) \%$  gefunden werden und fiel damit unter die Mobilitätsgrenze. Als Ursache für die Immobilität eines Rezeptors sind membranäre Gegebenheiten denkbar, die den Rezeptor in eine bestimmte Positionen zwingen. Auch durch zytosolische Proteine können Rezeptoren eine Art Verankerung erfahren. So kann durch die Proteinbindung an den intrazellulären Teil des Rezeptors der Gesamtkomplexe so vergrößert werden, dass die laterale Mobilität verringert wird. Derartige Komplexe entstehen während der Internalisierung über ‚clathrin-coated pits‘, die durch ihre Verankerung mit dem Membranskelett nahezu immobil sind. Zwar sollte bei einer niedrigen Ligandkonzentration von  $0,5 \text{ nM}$  keine Internalisierung von  $\beta_2\text{AR}$  stattfinden, allerdings ist zu berücksichtigen, dass es konstitutiv aktive  $\beta_2\text{AR}$  gibt [131] und sowohl Neusynthese als auch Abbau von Rezeptoren einem ständigen Kreislauf unterliegen. Andere GPCR zeigten im SPT-Experiment ebenfalls immobile Fraktionen [78, 79].

Zu  $53,8 (\pm 2,6) \%$  wurde D<sub>2</sub> mit  $0,026 (\pm 0,001) \mu\text{m}^2/\text{s}$  gefunden und D<sub>3</sub> mit  $0,087 (\pm 0,011) \mu\text{m}^2/\text{s}$  wurde zu  $19,7 (\pm 2,8) \%$  detektiert. Dies entsprach mittleren Sprungweiten von  $102 \text{ nm}$  bzw.  $187 \text{ nm}$ . Im Vergleich handelt es sich hierbei um moderate laterale Geschwindigkeiten, wie sie für andere GPCR ebenfalls publiziert wurden. Diffusionskoeffizienten zwischen  $0,011 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,207 \mu\text{m}^2/\text{s}$  wurden für den Neurokinin-1-Rezeptor [95] und Werte zwischen  $0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für den humanen Geruchsrezeptor OR17-40 gefunden [78]. *Sergé et al.* fanden für den Glutamat-5-Rezeptor einen Diffusionskoeffizienten von  $0,05 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und ordneten diesem Rezeptoren mit nahezu freier Diffusion zu [103]. Den Diffusionskoeffizienten kleiner  $0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$  wurden Rezeptoren mit begrenzter Diffusion zugewiesen. Diffusionskoeffizienten im Bereich von  $0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$  bis etwa  $0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$  sind offensichtlich typisch für membranäre Rezeptoren.  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexe mit D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> sind am treffendsten als Rezeptoren zu beschreiben, die sich nicht völlig frei, sondern eingeschränkt bewegen.

Als vierter Diffusionskoeffizient konnte  $D_4$  mit  $2,150 (\pm 0,501) \mu\text{m}^2/\text{s}$  zu  $10,9 (\pm 1,1) \%$  detektiert werden. Vergleichbare mittels SPT detektierte Geschwindigkeiten für membranäre Rezeptoren wurden bislang nicht publiziert. Diese hoch mobile Rezeptorpopulation kann als relativ frei diffundierend, ohne nennenswerte Bindung an oder Behinderung durch sonstige Proteine, interpretiert werden. Die statistische Absicherung dieser Komponente ist allerdings, bedingt durch die geringe Ereigniszahl, sehr viel schlechter als bei den drei niedrigeren Diffusionskoeffizienten. Möglicherweise repräsentiert  $D_4$  keine zusätzliche Rezeptor-Ligand-Population, sondern entsteht artifiziell durch Prozesse wie Lösungsdiffusion oder Reassoziaton. Denkbar ist ebenso eine fehlerhafte Verbindung von unabhängigen Ereignissen während der automatisierten Auswertung.

Da  $\beta_2\text{AR}$ -Alexa-NA-Komplexe mit  $D_2$  und  $D_3$  ein ähnliches Diffusionsverhalten zeigten, wurden sie für die nachfolgenden Betrachtungen in eine Mobilitätskategorie zusammengefasst. Damit ließen sich drei verschiedene Mobilitätszustände klassifizieren. Durch die Lokalisierungsgenauigkeit begrenzt, ergab sich Kategorie 1 mit Diffusionskoeffizienten von bis zu  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Alle Rezeptor-Ligand-Komplexe innerhalb dieser Kategorie sind entweder in ihrer Position arretiert oder bewegen sich mit einer so langsamen Geschwindigkeit, dass sie unter den experimentellen Bedingungen nicht von immobilien Molekülen zu unterscheiden sind. Kategorie 2 umfasst lateral mobile Rezeptor-Ligand-Komplexe mit Diffusionskoeffizienten zwischen  $0,016 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , wie sie in SPT-Experimenten ebenso für weitere GPCR und andere membranäre Rezeptoren gefunden wurden. Dieser Mobilitätskategorie werden meist Rezeptoren zugeordnet, die lateral eingeschränkt innerhalb von Mikrodomänen unterschiedlicher Größe diffundieren. Kategorie 3 beinhaltet nahezu frei bewegliche Rezeptor-Ligand-Komplexe mit Diffusionskoeffizienten größer als  $0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ .

Entsprechend waren nach einer agonistischen Stimulation des Zellsystems Veränderungen in der Rezeptordynamik innerhalb der einzelnen Kategorien zu erwarten. Die schwache Stimulation mit  $100 \text{ nM}$  Terbutalin führte zu einem zeitabhängig inhomogenen

Einfluss auf die einzelnen Kategorien (Tab. 3-2, Abb. 3-15 A). Jedoch war eine geringe Immobilisierung langsam mobiler  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe zu beobachten. Nach Gabe von 1  $\mu$ M Terbutalin konnte zu jedem Stimulationszeitpunkt mindestens eine Verdreifachung des immobilen Anteils detektiert werden (Tab. 3-2, Abb. 3-15 B). Die Arretierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe als Konsequenz der beginnenden Internalisierungsprozesse und der damit verbundenen Umverteilung in ‚clathrin-coated pits‘ ging auf Kosten der langsam lateralen Mobilitätsanteile der Kategorie 2. Die Stimulation mit 5  $\mu$ M Terbutalin führte neben den o.g. Effekten zusätzlich zu einer Abnahme der hochmobilen Rezeptorpopulation zu späteren Stimulationszeitpunkten (Tab. 3-2, Abb. 3-15 C). Der Terbutalineinfluss war nicht nur als Umverteilung innerhalb der Kategorien sichtbar, sondern zeigte sich zusätzlich bei der Betrachtung der kalkulierten Diffusionskoeffizienten (Abb. 3-16). So zeigte sich bei allen drei Terbutalinkonzentrationen eine Verkleinerung sowohl von D<sub>2</sub> als auch von D<sub>3</sub> bereits nach 5-minütiger Stimulation. Die sehr früh einsetzenden Desensitivierungsprozesse schienen somit bereits zu einer Ausbremsung der Rezeptor-Ligand-Komplexe, und dies bei niedrigen Terbutalinkonzentrationen, zu führen. Eine Verlangsamung der schnellen Mobilität, die durch D<sub>4</sub> repräsentiert wird, wurde erst ab einer Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin erreicht. Aufgrund der offensichtlichen Lokalisation außerhalb von Mikrodomänen wird diese Rezeptorpopulation wahrscheinlich nicht direkt der Internalisierung zugeführt, sondern zunehmend in Mikrodomänen umverteilt.

Da die Betrachtung von Einzeltrajektorien zu großen Teilen eine Diffusion der Rezeptor-Ligand-Komplexe innerhalb räumlich begrenzter Domänen offenbarte und in der Literatur dieses Phänomen für GPCR ebenfalls beschrieben wurde [78, 95, 130], war die Frage zu klären, welchen Einfluss eine agonistische Stimulation auf die laterale Ausdehnung der Rezeptor-Ligand-Komplexe hat. Mehr als 70 % der Trajektorien diffundierten innerhalb kleiner Domänen mit einer Ausdehnung nicht größer als 300 x 300 nm (Abb. 3-17). Die Stimulation mit Terbutalin führte konzentrationsabhängig zu einer Zunahme sich innerhalb kleiner Domänen bewogender Trajektorien, wohin-

gegen sowohl mittel- (300-600 x 300-600 nm) als auch großflächige (ab 600 x 600 nm) Bewegungen abnehmen. Dieser Effekt war bereits nach 5-minütiger Stimulation ersichtlich und nahm mit fortschreitender Stimulationszeit weiter zu. Es ist denkbar, dass die Beschränkung der Rezeptorbeweglichkeit nach Ligandbindung auf kleine Flächen zu einer großen räumlichen Nähe zwischen den beteiligten Komponenten der Rezeptoraktivierung, -desensitivierung und -internalisierung führt, welche in einer Erhöhung der Effizienz der Prozesse resultiert. Bei der Desensitivierung des  $\beta_2$ AR binden verschiedene zytosolische Proteine, wie die GRK2 und  $\beta$ Arr, an den intrazellulären Teil des Rezeptors, wodurch als Konsequenz eine deutlich eingeschränkte Beweglichkeit entsteht. Insbesondere zu späteren Stimulationszeitpunkten ist wahrscheinlich die Umverteilung in ‚clathrin-coated pits‘ für die Erhöhung der innerhalb kleiner Mikrodomänen diffundierenden Rezeptorpopulation verantwortlich. Da Trajektorien mit einer kurzen Existenzdauer die tatsächliche Domänengröße nicht wiedergeben können, ist davon auszugehen, dass durch die Betrachtung der Gesamtdaten der tatsächliche Einfluss auf die Trajektorienausdehnung nicht richtig dargestellt wird. Durch Fokussierung auf ausschließlich lange Trajektorien, wurde die Umverteilung in kleine Domänen durch agonistische Stimulation noch deutlicher (Abb. 3-18). Insbesondere die hoch affine Rezeptorpopulation, welche durch die langen Trajektorien repräsentiert wird, scheint somit in den Internalisierungsprozess involviert zu sein.

Für verschiedene GPCR konnte ein solches Verhalten nach agonistischem Stimulus bereits publiziert werden. Der Neurokinin-1-Rezeptor zeigte nach Substanz P-Bindung eine Abnahme der Domänengröße mit der Zeit [95]. Sowohl Agonisten als auch Antagonisten initiieren eine Zunahme der Häufigkeit kleinflächiger Trajektorien des Geruchsrezeptors OR17-40 auf Kosten großflächiger Trajektorien und freier Diffusion [78]. Die mittlere Kompartimentgröße des LH-Rezeptors betrug unstimuliert 230 nm und nach Stimulation mit humanem Choriongonadotropin (hCG) verringerte sich diese auf 86 nm [130]. Der Glutamat-5-Rezeptor reagierte ebenfalls mit einer Begrenzung der Diffusion auf eine kleinere Fläche nach Agonistinkubation [103].

Die Veränderung der Trajektorienanzahl nach Stimulation mit unterschiedlichen Terbutalinkonzentrationen zu den verschiedenen Zeitpunkten korreliert mit den Erkenntnissen aus dem Verdrängungsexperiment. Bei der Betrachtung des gesamten Trajektorienpools ergab sich erst nach 35-minütiger Stimulation eine konzentrationsabhängige, jedoch nicht signifikante Abnahme der Trajektorienzahl (Abb. 3-19). Durch das hohe Maß an unspezifischer Ligandbindung, die mittels SPT detektierbar ist, wird die eigentliche Verdrängung der spezifischen Bindung weitgehend verdeckt. Durch Selektion der langen Trajektorien wird deutlich, dass die hoch affine Bindung mehr spezifische Rezeptorbindung beinhaltet als die niedrig affine (Abb. 3-20). Konkurrenzexperimente mittels SPT zu quantifizieren und von der Trajektorienanzahl verlässliche Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten von Rezeptoren machen zu können ist nicht unproblematisch. Bedingt durch die große Beobachtungsfläche werden unspezifische Kollision des Liganden mit der Membran größtenteils miterfasst. Kritisch ist außerdem die Bestimmung der Grauwertgrenze (Threshold), ab der ein Signal als Partikel erkannt wird. Da das Hintergrundrauschen bei jeder Zelle und selbst bei verschiedenen Filmen einer Zelle unterschiedlich ist, muss ein idealer Wert bei jedem Film neu abgeschätzt werden. Dadurch können sich bei der geringsten Abweichung von der idealen Grauwertgrenze erhebliche Variationen in der Trajektorienanzahl ergeben. Die Aussagekraft dieses Parameters ist somit eher gering.

Der Effekt einer CTX-Vorinkubation auf die Mobilität des  $\beta_2$ AR oder andere GPCR wurde bislang nicht beschrieben. Ausgehend von einer Verarmung des vorbehandelten Zellsystems an aktivierbarem  $G_s$ -Protein war zu vermuten, dass die Weiterleitung eines externen Stimulus ins Zellinnere nahezu ausbleibt. In der Konsequenz sollte dies eine Abnahme von Desensitivierungs- und Internalisierungsprozessen zur Folge haben. Die CTX-Vorinkubation führte experimentell zu einer Erhöhung immobiler Rezeptor-Ligand-Komplexe (Abb. 3-21, Tab. 3-3) und zu einer Abbremsung von Rezeptor-Ligand-Komplexen mit den langsamen Mobilitäten D2 und D3 (Abb. 3-22, Tab. 3-3).

Konsequenterweise war zusätzlich eine geringfügige Zunahme von Trajektorien detektierbar, die sich innerhalb kleinflächiger Domänen bewegten. Dieser Effekt konnte ausschließlich den hoch affinen Rezeptoren mit längeren Trajektorien zugeordnet werden (Abb. 3-23, Abb. 3-24). Neben der homologen Desensitivierung, welche lediglich bei okkupierten Rezeptoren stattfinden kann, existiert die PKA-abhängige heterologe Desensitivierung, welche überdies bei nicht Ligand gebundenen Rezeptoren abläuft. Da CTX unabhängig von einem externen Stimulus in der Lage ist, den cAMP-Spiegel zu erhöhen [126], wäre eine durch heterologe Desensitivierung hervorgerufene Verlangsamung durch Interaktion der PKA mit dem  $\beta_2$ AR vorstellbar. Alternativ ist denkbar, dass CTX die Zelle durch die große Anzahl aktivierter G-Proteine in einen scheinbar stimulierten Zustand versetzt, wodurch ohne agonistische Rezeptorstimulation Regulationsmechanismen wie Desensitivierung und Internalisierung angestoßen werden. Die anschließende Terbutalinstimulation erhöhte den immobilen Anteil zwar noch geringfügig (+12,8 % nach 5 min), jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Zellen ohne CTX-Vorbehandlung (+32,9 % nach 5 min, Abb. 3-15 B). Die durch CTX hervorgerufene Abnahme der Diffusionskoeffizienten  $D_1$ - $D_3$  blieben durch Terbutalin unbeeinflusst (Abb. 3-22). Darüber hinaus konnte unter dem Einfluss von CTX eine Zunahme in der Häufigkeit kleiner Domänen nach Terbutalinstimulation für hoch affine Rezeptoren mit längeren Trajektorien gefunden werden (Abb. 3-24). Eine vorstellbare Ursache für den trotz CTX-Vorinkubation detektierbaren geringen Terbutalineinfluss ist, dass Inkubationszeit und/oder Konzentration des CTX zu gering waren, um das gesamte  $G_s$ -Protein-Reservoir zu beeinflussen. Außerdem konnte verschiedentlich eine zusätzliche PKA abhängige  $G_i$ -Kopplung des  $\beta_2$ AR gefunden werden und da  $G_{i\alpha}$  nicht CTX-sensitiv ist, besteht die Möglichkeit, dass im Falle einer unzureichenden  $G_s$ -Kopplung auf einen anderen G-Protein-Subtyp umgeschaltet werden kann [17, 22]. So könnte die Verlangsamung des Rezeptors die Konsequenz einer Umschaltung der Kopplungsspezifität sein. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die Vorstellung, dass die Internalisierung und die damit verbundene Umverteilung von  $\beta_2$ AR in ‚clathrin-coated pits‘ für dessen

Immobilisierung verantwortlich sind. CTX scheint in der Lage zu sein, selber Immobilisierung zu induzieren, die Signalweitergabe über  $G_s$ -gekoppelte Rezeptoren aber weitestgehend zu blockieren. Initial führte die Terbutalinstimulation von CTX vorinkubierten Zellen zusätzlich zu einem Anstieg der Häufigkeit hoch mobiler Rezeptor-Ligand-Komplexe (Abb. 3-21), der in dem Ausmaß ohne Vorinkubation nicht feststellbar war (Abb. 3-15 B). Zusätzlich war eine Zunahme von  $D_4$  zu verzeichnen (Abb. 3-22). Terbutalin muss also in der Lage sein, unabhängig von der  $G_s$ -Protein-abhängigen Signalkaskade Effekte auszulösen, die im Normalfall nicht stattfinden oder aber durch die Internalisierungsprozesse überdeckt werden. Die durch Terbutalin induzierte geringfügige Verdrängung von Alexa-NA insbesondere von hoch affinen Rezeptoren (Abb. 3-19, Abb. 3-20) konnte nach vorheriger CTX-Inkubation nicht mehr detektiert werden (Abb. 3-25, Abb. 3-26). Dies könnte aus einer veränderten Affinität des  $\beta_2AR$  durch CTX resultieren.

## 4.2 Methodenvergleich

In der Literatur lassen sich nur wenige Arbeiten finden, die SPT und FCS einem direkten Vergleich unterziehen. Grünwald *et al.* zeigten, dass sowohl Cy5 markiertes Streptavidin als auch mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 635 markierte monoklonale IgG Antikörper in Lösung unter Verwendung beider Methoden fast identische Diffusionskoeffizienten lieferten [93]. Guo *et al.*, die fluoreszenzmarkierte Lipide in GUV (giant unilamellar vesicles) und SLB (supported lipid bilayers) u.a. mittels SPT und FCS detektierten, erhielten Diffusionskoeffizienten, die für beide Techniken in dergleichen Größenordnung lagen [132]. Neben der Messung in der oberen Zellmembran lebender Zellen war der entscheidende experimentelle Unterschied zu Guo *et al.* die Verwendung eines markierten Liganden, der mit dem Rezeptor spezifisch interagiert und nicht die direkte Markierung des Zielproteins.

In Tab. 4-1 sind die Diffusionskoeffizienten von Alexa-NA gebunden an  $\beta_2$ AR auf der Membran von A549-Zellen gegenübergestellt, die mit den unterschiedlichen Methoden gefunden wurden.

Tab. 4-1: Gegenüberstellung der mittels SPT und FCS gefundenen Diffusionskoeffizienten und weiterer Kenngrößen von Alexa-NA gebunden an den  $\beta_2$ AR auf A549-Zellen.

	Komponente					
	1 <sub>SPT</sub>	2 <sub>SPT</sub>	3 <sub>SPT</sub>	1 <sub>FCS</sub>	4 <sub>SPT</sub>	2 <sub>FCS</sub>
$D_{SPT}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] <sup>#</sup>	<i>0,005</i>	<i>0,026</i>	<i>0,087</i>		<i>2,150</i>	
Anteil [%] <sup>#</sup>	15,6	53,8	19,7		10,9	
Sprungweite/Frame [nm]	44,7	102,0	186,5		927,4	
$\tau$ im FCS [ms] *	2000	385	115		4,7	
$D_{FCS}$ [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ] <sup>#</sup>				<i>0,32</i>		<i>15,99</i>
Anteil [%] <sup>#</sup>				24,1		75,9
$\tau$ [ms]				42,00		0,65
Sprungweite beim SPT [nm] *				358		2529

<sup>#</sup> Standardabweichungen siehe Tab. 3-1 bzw. Kap. 3.2.1

\* theoretisch berechneter Wert

Bemerkenswerterweise unterscheiden sich die mittels SPT und FCS gefundenen Diffusionskoeffizienten erheblich. Offensichtlich treten in Bezug auf die hier untersuchte Rezeptor-Ligand-Interaktion Ereignisse auf, die durch SPT und FCS nicht in gleichem Ausmaß erfasst werden.

Da bei der FCS Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität gemessen werden, sind immobile Moleküle nicht erfassbar. Folglich liegt die mittels SPT gefundene Komponente 1<sub>SPT</sub> für das FCS außerhalb des zu detektierenden Bereichs. Die obere Grenze der gerade noch mittels FCS detektierbaren Diffusionszeitkonstanten liegt im hohen dreistelligen

---

Millisekundenbereich. Komponente  $2_{\text{SPT}}$  und  $3_{\text{SPT}}$  würden im FCS Diffusionszeitkonstanten von 385 ms bzw. 115 ms liefern, die de facto jedoch nicht in einem entsprechenden Ausmaß detektiert wurden. Die schnellste mittels SPT gefundene Geschwindigkeit  $4_{\text{SPT}}$  sollte rechnerisch im FCS mit einer Diffusionszeitkonstanten von 4,7 ms erscheinen. Allerdings wurde im FCS diese Komponente in entsprechender Größenordnung nicht detektiert.

Die SPT-Daten ermöglichten eine Kurvenanpassung entsprechend Gl. 1.8 mit vier Komponenten in ausreichend guter statistischer Genauigkeit (Abb. 3-14, Tab. 3-1). Die mittels FCS erlangten Daten ließen allerdings lediglich eine Kurvenapproximation mit drei Komponenten zu, wobei eine dieser Komponenten für den freien Ligand beansprucht wurde. Trägt man diesem Unterschied Rechnung, indem der Kurvenanpassung der Sprungweitenverteilung lediglich ein Drei-Komponentenmodell zugrunde gelegt wird, ergibt sich als Konsequenz für die Komponente  $3_{\text{SPT}}$  ein gemittelter Diffusionskoeffizient von  $0,287 \mu\text{m}^2/\text{s}$  (Abb. 4-1, Tab. 4-2).

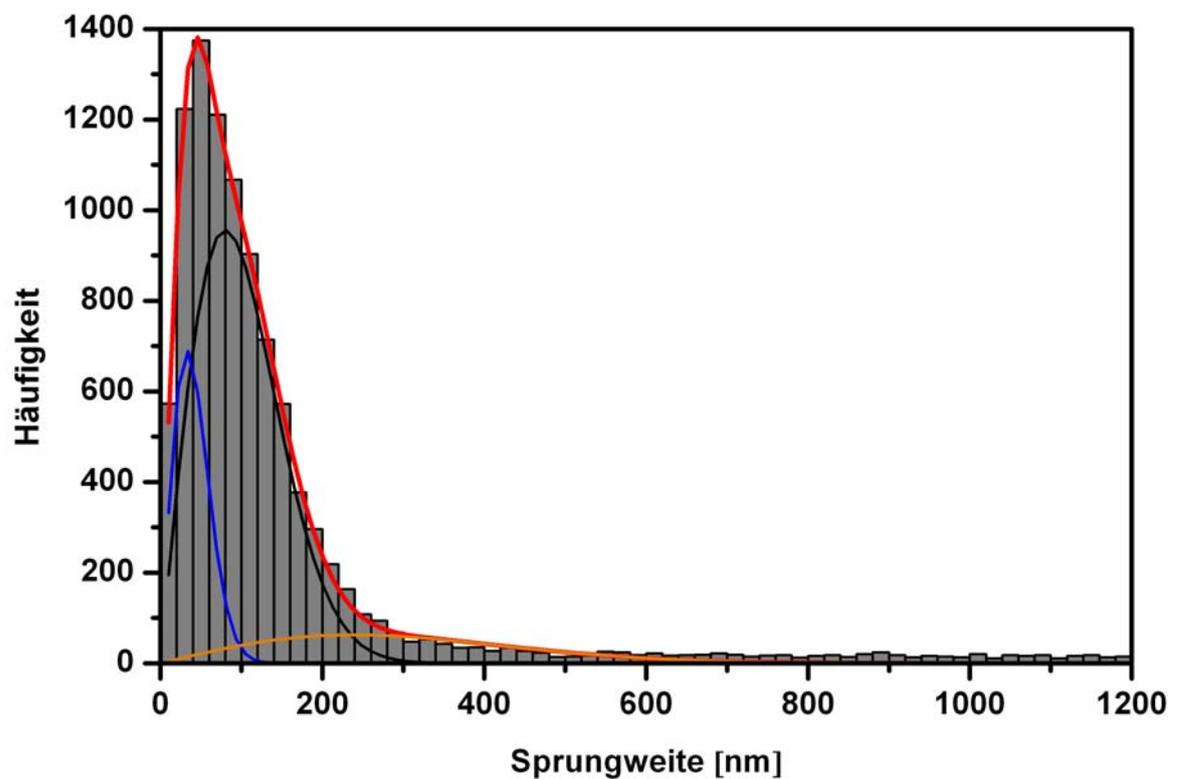


Abb. 4-1: Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen (Drei-Komponentenmodell).

A549-Zellen inkubiert mit 0,5 nM Alexa-NA für 20 min ( $n = 9$ ). Kurvenanpassung entsprechend Gl. 1.8 für drei Komponenten (rote Kurve), für D1 (blau), D2 (schwarz), D3 (orange), Klasseneinteilung 20 nm. Einzelwerte s. Tab. 4-2.

Tab. 4-2: Diffusionskoeffizienten von  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen (Drei-Komponentenmodell).

	Komponente 1	Komponente 2	Komponente 3
D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	0,005 ( $\pm 0,0002$ )	0,032 ( $\pm 0,001$ )	0,287 ( $\pm 0,047$ )
Anteil [%]	19,7 ( $\pm 1,0$ )	67,1 ( $\pm 1,1$ )	13,2 ( $\pm 1,3$ )

Die Komponenten 1 und 2 erwiesen sich als unverändert gegenüber den Ergebnissen basierend auf einem Vier-Komponentenmodell. Allerdings werden große Sprungweiten, d.h. schnelle Mobilitätsanteile bei dieser Datenauswertung vernachlässigt. Die Tatsache, dass die Häufigkeiten ab einer Sprungweite von etwa 600 nm konstant bleiben und nicht mit zunehmender Sprungweite abnehmen, weist erneut darauf hin, dass die Komponente 4<sub>SPT</sub> keine vierte Rezeptor-Ligand-Population beschreibt, sondern artifiziell sein könnte. Der Diffusionskoeffizient der Komponente 1<sub>FCS</sub> kann als eine Mittelung der Diffusionskoeffizienten der Komponenten 3<sub>SPT</sub> und 4<sub>SPT</sub> interpretiert werden.

In der Einleitung wurde bereits deutlich gemacht, dass die Modellvorstellung der freien Beweglichkeit von Proteinen und Lipiden in der Zellmembran ohne laterale Organisation nicht mehr dem heutigen Wissensstand entspricht. Von einer homogenen Rezeptorverteilung auf der Zellmembran kann somit nicht ausgegangen werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass es sich bei der Zellmembran um ein hoch organisiertes System handelt, in dem funktionelle Mikrodomänen die Membran kompartimentieren. Die in dieser Arbeit präsentierten SPT-Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass  $\beta$ 2AR sich innerhalb von lateral begrenzten Domänen bewegen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der Laser des FCS-Gerätes unter optimalen Bedingungen eine kleine Membranfläche von  $\sim 0,13 \mu\text{m}^2$  beleuchtet, besteht die Möglichkeit, dass der Fokus an Stellen positioniert wird, an denen der Rezeptor nur unzureichend beobachtet werden kann. Rezeptor-Ligand-Komplexe, die sich innerhalb von Mikrodomänen bewegen, die nur teilweise innerhalb des Fokus liegen, können diesen nur teilweise durchqueren, nicht aber ganz durchwandern. In einem solchen Szenario würden die entsprechenden Rezeptor-Ligand-Komplexe schneller erscheinen als sie tatsächlich sind. Um den Diffusionskoeffizienten von  $15,99 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für die Komponente 2<sub>FCS</sub> mit einer Häufigkeit von 75,9 % erklären zu können, müsste dieses Szenario allerdings bei jeder einzelnen Messung auftreten.

Durch die in den SPT-Experimenten verwendete zeitliche Auflösung von 10 Hz und die während der Trajektorienverfolgung maximal zugelassene Sprungweite von 1200 nm,

ergibt sich ein größtmöglich detektierbarer Diffusionskoeffizient von  $3,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Somit ist ein Diffusionskoeffizient von  $15,99 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , wie er in den FCS-Experimenten gefunden wurde, mittels SPT unter diesen Voraussetzungen nicht detektierbar. Allerdings zeigten Vorexperimente mit 100 Hz eine Sprungweitenverteilung ähnlich dem Histogramm in Abb. 3-14 und daraus resultierend vergleichbare Diffusionskoeffizienten, obgleich mit einer solch hohen zeitlichen Auflösung Diffusionskoeffizienten von bis zu  $36 \mu\text{m}^2/\text{s}$  detektierbar wären. Offensichtlich ist die Limitierung durch die zeitlich geringere Auflösung nicht der Grund, warum die ungewöhnlich schnelle Komponente im FCS-Experiment nicht mittels SPT gefunden wurde. Es existiert eine Vielzahl von Publikationen, in denen die FCS zur Detektion von membranären Rezeptoren mittels fluoreszenzmarkierten Liganden Verwendung findet (Tab. 4-3).

**Tab. 4-3: Auswahl und Zusammenfassung von FCS-basierten Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien.**

Autor	Zellen	Rezeptor	Ligand	$\tau_1$ [ms]	$\tau_2$ [ms]
Briddon <i>et al.</i> (2004) [133]	CHO	Adenosin A <sub>1</sub> - Rezeptor	XAC-BY630 (At)	17	321
Cordeaux <i>et al.</i> (2008) [134]	CHO	Adenosin A <sub>3</sub> - Rezeptor	ABEA-X-BY630 (A)	5,9	131
Hegener <i>et al.</i> (2004) [3]	A549/ hippocampale Neurone	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor	Noradrenalin- Alexa532 (A)	3,3/1,8	95/159
Maier <i>et al.</i> (2005) [135]	AtT-20	membranärer Glucocorticoid- rezeptor	Dexamethason- Fluorescein (A)	3,6	255
Meissner <i>et al.</i> (2003) [120]	hippocampale Neurone	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	Muscimol-Alexa532 (A)	4	74
Middleton <i>et al.</i> (2007) [136]	CHO	Adenosin A <sub>1</sub> - Rezeptor	div. A <sub>1</sub> -Agonisten- BY630	9,5	267
Pick <i>et al.</i> (2003) [137]	HEK293	5HT <sub>3</sub> -Rezeptor	GR119566-Cy5 (At)	1-10	> 20

Fortsetzung Tab. 4-3

Autor	Zellen	Rezeptor	Ligand	$\tau_1$ [ms]	$\tau_2$ [ms]
Pramanik <i>et al.</i> (2001) [138]	Insulinoma	Galaninrezeptor	Galanin-Rh (A)	22	700
Prenner <i>et al.</i> (2007) [4]	C6	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor	Noradrenalin- Alexa532 (A)	0,7	9,4
Rigler <i>et al.</i> (1999) [139]	renale Tubuluszellen	C-Peptid- Rezeptor	Proinsulin C- Peptid- Rh (A)	1	80
Zhong <i>et al.</i> (2001) [140]	renale Tubuluszellen	Insulinrezeptor	Insulin-Rh (A)	0,8	20

(A–Agonist, At–Antagonist, BY–BODIPY, Rh–Tetramethylrhodamin)

Im Vergleich zu den publizierten Werten für  $\tau_1$  ist die in dieser Arbeit detektierte hoch mobile Diffusionszeitkonstante von  $\tau_{Diff1} = 0,65 (\pm 0,30)$  ms auffallend schnell. Demgegenüber werden in den meisten Publikationen für  $\tau_1$  Geschwindigkeiten deutlich über 1 ms gefunden. Vergleicht man die langsamen Mobilitäten, so liegt  $\tau_{Diff2}$  mit 42,00 ( $\pm 31,02$ ) ms in einem merklich schnelleren Geschwindigkeitsbereich.

Die üblicherweise gefundenen Diffusionszeiten für  $\tau_2$  liegen häufig über 100 ms. Dessen ungeachtet handelt es sich bei  $\tau_{Diff2}$  um eine realistische Diffusionszeitkonstante für in der Membran diffundierende Rezeptoren, wohingegen  $\tau_{Diff1}$  und die Interpretation dieser Mobilität kritisch betrachtet werden muss. Problematisch ist in diesem Zusammenhang insbesondere die Tatsache, dass fluoreszenzmarkierte Lipide in künstlichen Membranen wie GUV oder SLB Diffusionskoeffizienten zeigen, die stets unterhalb von  $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  angesiedelt sind und somit Diffusionszeitkonstanten größer als 1 ms aufweisen [132, 141-143]. Es scheint somit nicht plausibel, dass Rezeptoren in Membranen lebender Zellen schneller diffundieren als Lipide in künstlichen Membranen, in denen es keine Diffusionsbarrieren wie andere membranäre Proteine oder das Zytoskelett gibt.

Um eine weitere Charakterisierung der schnellen Komponente zu ermöglichen, müssen zusätzliche Parameter hinzugezogen werden. Betrachtet man die mittels FCS durchgeführten Verdrängungsexperimente, so ergab sich eine rund 50-prozentige Verdrängbarkeit von  $\tau_{Diff1}$  durch einen Überschuss von Terbutalin bzw. Isoprenalin (Abb. 3-29). Diese Mobilitätskomponente setzt sich somit zur Hälfte aus unspezifischen und zur anderen Hälfte aus verdrängbaren und daher spezifischen Bindungsereignissen zusammen. Hinzukommt, dass die SPT-Ergebnisse eine sehr kurze Bindungsdauer des Liganden offenbaren. So waren rund 57 % der detektierten Partikel nur in zwei Frames sichtbar. Außerdem existierten viele ungezählte Partikel, die nur in einem Frame auftraten, aus diesem Grunde keine Trajektorien lieferten und somit von der weiteren Auswertung ausgeschlossen waren. Zudem zeigten bereits Vorexperimente mit einer zeitlichen Auflösung von 100 Hz, dass sehr viele Trajektorien existieren müssen, die tatsächlich noch erheblich kürzer sind und somit durch eine Auflösung von 10 Hz nicht erfasst werden konnten.

Insgesamt wird die Geschwindigkeit  $\tau_{Diff1}$  nur dann plausibel, wenn sie als Bindungsdauer und nicht als Geschwindigkeit bzw. Aufenthaltsdauer im Fokus interpretiert wird. Unterschreitet die Dauer einer spezifischen oder unspezifischen Bindung des Liganden an die Membran die durchschnittliche Aufenthaltsdauer des gebundenen Liganden im FCS-Fokus, so werden Diffusionszeitkonstanten erhalten, die um ein Vielfaches kleiner sind und nicht eine tatsächliche Geschwindigkeit sondern lediglich eine Bindungsdauer widerspiegeln. Solche Ereignisse sind aufgrund der begrenzten zeitlichen Auflösung im SPT-Experiment generell nicht detektierbar.

Denkbar ist das Zustandekommen einer extrem kurzen Bindungsdauer durch bloße Kollision des Liganden mit der Membran, wobei der Ligand nur für eine kurze Zeit unspezifisch von Membranlipiden oder -proteinen gebunden wird, ehe er wieder in Lösung geht. Allerdings weisen die Verdrängungsexperimente darauf hin, dass ein ebenso großer Teil des Liganden eine spezifische Bindung mit dem  $\beta_2AR$  eingeht, die nur von sehr kurzer Dauer ist (Abb. 3-29). Dabei müsste es sich um sehr niedrig affine

Rezeptorzustände handeln, wie sie beispielsweise für GPCR nach Abkopplung des G-Proteins postuliert werden [127].

Da man durch SPT-Experimente eine Visualisierung der einzelnen Trajektorien erreicht und somit eine direkte Kontrolle der Ereignisse möglich ist, erhalten die mittels SPT detektierten Geschwindigkeiten für den  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplex eine höhere Aussagekraft als die mittels FCS erlangten Resultate, deren Einzelereignisse nicht nachvollzogen werden können. In Bezug auf ein hoch komplexes System, wie es die Betrachtung von Ligandbindung an Rezeptoren auf der Membran lebender Zellen darstellt, sind SPT und FCS in der Lage, innerhalb ihrer jeweiligen definierten Grenzen Daten zu liefern, die sich gegenseitig sinnvoll ergänzen und zur Gesamtinterpretation der Vorgänge beitragen.

### 4.3 Diskussion der Ergebnisse der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Für den frei in Lösung über den A549-Zellen diffundierenden Liganden Alexa-NA konnte eine Diffusionszeitkonstante  $\tau_{frei} = 57,02 (\pm 6,58) \mu\text{s}$  und somit ein Diffusionskoeffizient von  $D_{frei} = 156,96 (\pm 18,03) \mu\text{m}^2/\text{s}$  gefunden werden. Nach Inkubation mit 5 nM Alexa-NA und Fokuspositionierung auf die obere Zellmembran wurden zwei weitere Geschwindigkeiten mit  $\tau_{Diff1} = 0,65 (\pm 0,30) \text{ms}$  und  $\tau_{Diff2} = 42,00 (\pm 31,02) \text{ms}$  detektiert. Unter der Annahme, dass es sich bei  $\tau_{Diff1}$  um eine Mischpopulation handelt, die eher eine Bindungsdauer von Alexa-NA widerspiegelt als eine Geschwindigkeit, ist die Kalkulation eines Diffusionskoeffizient aus  $\tau_{Diff1}$  nicht zweckmäßig. Ereignisse, die mittels  $\tau_{Diff1}$  beschrieben werden können, machten 75,9 ( $\pm 13,8$ ) % der Gesamt ereignisse aus.  $\tau_{Diff2}$  repräsentiert hingegen eine tatsächliche Diffusionszeit und erlaubt daher die Berechnung eines Diffusionskoeffizienten zu  $D_{Diff2} = 0,32 (\pm 0,21) \mu\text{m}^2/\text{s}$  mit einer Detektionshäufigkeit von 24,1 ( $\pm 13,8$ ) %.

Durch einen 2000-fachen Überschuss Terbutalin bzw. Isoprenalin konnten 50 % bzw. 55 % der Ereignisse mit  $\tau_{Diff1}$  verdrängt werden (Abb. 3-29 A und B). Somit handelt es sich bei  $\tau_{Diff1}$  um eine Mischpopulation, die zur Hälfte auf spezifischer, aber kurzlebiger Interaktion zwischen dem Liganden und  $\beta_2AR$  beruht. Diese spezifischen Rezeptor-Ligand-Komplexe charakterisieren folglich sehr niedrig affine Rezeptorzustände, die durch Terbutalin und Isoprenalin gleichermaßen verdrängbar sind. Die nicht verdrängbaren Ereignisse resultieren wahrscheinlich aus kurzer unspezifischer Bindung des Liganden an die Membran von A549-Zellen, wofür teilweise der Farbstoffanteil des Liganden verantwortlich zu sein scheint (Abb. 3-29 C). Alexa-NA von Rezeptor-Ligand-Komplexen mit  $\tau_{Diff2}$  ließ sich durch Terbutalin nur zu 37 % verdrängen. Das im Vergleich zu Terbutalin bezüglich des  $\beta_2AR$  affinere Isoprenalin verdrängte 70 % der Bindung. Der reine Farbstoff generiert durch Bindung an die Membran mit 8 % gegenüber den Kontrollzellen in vernachlässigbar kleinem Ausmaß Geschwindigkeiten in der Größenordnung von  $\tau_{Diff2}$ .

Rezeptor-Ligand-Komplexe, die eine Diffusionszeit  $\tau_{Diff2}$  aufweisen, diffundieren nur langsam lateral in der Zellmembran. Mobilitäten in dieser Größenordnung wurden schon häufig für Rezeptor-Ligand-Komplexe in Membranen unterschiedlicher Zellen mittels FCS beschrieben (Tab. 4-3). Zugeordnet wurden  $\tau_{Diff2}$  stets Rezeptoren mit einer gehinderten lateralen Mobilität, die durch die Lokalisation in komplexen Strukturen wie ‚clathrin-coated pits‘, Caveolae oder ‚lipid rafts‘ bedingt wird. Die Lokalisation des Rezeptors in Mikrodomänen wird ebenfalls als Ursache für langsame Rezeptormobilitäten diskutiert.

Um regulatorische Mechanismen wie Desensitivierung und Internalisierung sichtbar zu machen, wurde das Zellsystem in einen stimulierten Zustand versetzt. Trotz zusätzlicher Terbutalinstimulation sollte eine ausreichend große Menge  $\beta_2AR$ -Alexa-NA-Komplexe zu detektieren sein, die zwar noch nicht der Verdrängung, jedoch bedingt durch den erheblichen Gesamtstimulus der Regulation des Rezeptorensystems unterliegen sollten.

FCS-Versuche mit unterschiedlichen Terbutalinkonzentrationen wurden zu verschiedenen Stimulationszeitpunkten durchgeführt, um die optimalen experimentellen Bedingungen zu bestimmen. 100 nM Terbutalin führte zu keiner signifikanten Veränderung im Vorkommen  $\tau_{Diff1}$  und  $\tau_{Diff2}$  (Tab. 3-4, Abb. 3-30 A). Diese Konzentration erwies sich als zu schwach, um z.B. Internalisierungsprozesse in erheblichem Ausmaß innerhalb von 35 min auslösen zu können. Demgegenüber zeigte sowohl eine Konzentration von 1  $\mu$ M als auch von 5  $\mu$ M Terbutalin eine Verdrängung des Liganden (Tab. 3-4, Abb. 3-30 B und C). Bereits 5 min bzw. 15 min nach Terbutalinzugabe war eine Abnahme der Bindung von 5 nM Alexa-NA zu detektieren, die insbesondere auf eine Reduktion von  $\tau_{Diff2}$  zurückzuführen war. Da insbesondere bei einer Temperatur von 22°C so früh noch nicht mit einer Internalisierung zu rechnen ist, ist die Abnahme der detektierten Ereignisse auf eine Verdrängung durch Terbutalin zurückzuführen. Zu späteren Stimulationszeitpunkten führen wahrscheinlich zusätzlich Internalisierungsprozesse zu einer Abnahme an detektierbarer Bindung. Die Internalisierung würde die ausgeprägtere Abnahme in der langsamen Geschwindigkeit  $\tau_{Diff2}$  erklären. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Verdrängungsexperimenten, die eine bevorzugte Verdrängung von  $\tau_{Diff1}$  durch Terbutalin zeigten. Offensichtlich kommt hier die in der Literatur beschriebene Variabilität der A549-Zellen in Bezug auf die Rezeptorbindung bei hohen Ligandkonzentrationen und Inkubationszeiten zum Tragen.

Nach Stimulation der A549-Zellen mit 100 nM Terbutalin blieb ein nennenswerter Effekt auf die Diffusionszeiten von  $\tau_{Diff1}$  oder  $\tau_{Diff2}$  aus (Tab. 3-5, Abb. 3-32 A bzw. Tab. 3-6, Abb. 3-33 A). Die Verlangsamung von  $\tau_{Diff1}$  nach 25- und 35-minütiger Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin lässt den Schluss zu, dass die zu diesem Zeitpunkt verbliebene unspezifische Bindung geringfügig längere Verweildauern an der Membran aufweist, als es die Mittelung mit der spezifischen Bindung zunächst vermuten ließ (Tab. 3-5, Abb. 3-32 B). Für  $\tau_{Diff2}$  ließ sich nach Stimulation mit 1  $\mu$ M Terbutalin nach 5 min und 15 min eine Verlangsamung der Diffusionszeit und somit eine Ausbremsung langsam

lateralen Rezeptor-Ligand-Komplexe detektieren (Tab. 3-6, Abb. 3-33 B). Dies kann als eine Konsequenz der früh einsetzenden Desensitivierungsprozesse und der damit verbundenen Assoziation intrazellulärer regulatorischer Proteine an den Rezeptor verstanden werden. Nach 25 min scheinen dann Verdrängungsprozesse die tatsächliche Internalisierung der Rezeptoren zu überdecken. Der Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Terbutalin auf die Diffusionszeit  $\tau_{Diff1}$  konnte grundsätzlich mit 5  $\mu\text{M}$  Terbutalin bestätigt werden, wobei auffällig war, dass die einzelnen untersuchten Zellen sehr unterschiedlich reagierten (Tab. 3-5, Abb. 3-32 C). Der Einfluss auf  $\tau_{Diff2}$  war eher schwach ausgeprägt (Tab. 3-6, Abb. 3-33 C). Insgesamt gewinnt man den Eindruck, dass insbesondere zu späteren Stimulationszeitpunkten die Verdrängung von Alexa-NA im Vordergrund steht und die stattfindende Internalisierung des Rezeptors somit nicht mehr detektierbar ist. Bei dieser Datenbetrachtung zeigte sich sehr deutlich, dass verschiedene Zellen unter denselben Bedingungen sehr unterschiedlich reagieren können.

Im FCS-Experiment konnte durch die Vorinkubation mit CTX kein verändertes Bindungsverhalten von Alexa-NA an den  $\beta_2\text{AR}$  detektiert werden. Die Gesamtbindung sowie das Verhältnis von  $\tau_{Diff1}$  zu  $\tau_{Diff2}$  blieb gänzlich unbeeinflusst (Tab. 3-7, Abb. 3-34). Zudem bewegten sich die detektierten Diffusionszeitkonstanten innerhalb der Größenordnung von nicht behandelten Kontrollzellen (Abb. 3-35, Abb. 3-36). Da immobile Moleküle aufgrund fehlender Autokorrelation durch FCS nicht detektierbar sind, war der mittels SPT gefundene Einfluss von CTX auf die immobile Rezeptorpopulation erwartungsgemäß nicht nachweisbar. Die Terbutalin induzierte Verdrängung von Alexa-NA vom  $\beta_2\text{AR}$  konnte nach CTX-Vorinkubation nicht beobachtet werden (Tab. 3-7, Abb. 3-34). Dies korrelierte mit den entsprechenden Ergebnissen aus den SPT-Experimenten. Tendenziell führte die Stimulation mit Terbutalin nach erfolgter CTX-Inkubation zu einer Verkleinerung von  $\tau_{Diff2}$  und somit zu einer Beschleunigung der entsprechenden Rezeptor-Ligand-Komplexe. Dies stimmte mit dem Einfluss überein, den Terbutalin im SPT-Experiment auf hoch mobile

Rezeptoren mit D<sub>4</sub> nach CTX-Inkubation ausübte. Somit wird die Vermutung untermauert, dass ein G<sub>s</sub>-Protein unabhängiger Signaltransduktionsweg existieren muss, der zu einer Beschleunigung von mittel bis hoch mobilen Rezeptor-Ligand-Komplexen führt. Eine Geschwindigkeitserhöhung von Rezeptor-Ligand-Komplexen könnte ein Resultat von aufgehobenen Protein-Protein-Interaktionen oder Mikrodomänenbegrenzungen sein.

#### 4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert erstmals einen detaillierten Einblick in das zweidimensionale Diffusionsverhalten einzelner  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe auf A549-Zellen und ist gleichzeitig wegweisend für zukünftige Fragestellungen, die sich aus den hier präsentierten Resultaten ergeben.

Insbesondere die mittels SPT erlangten Ergebnisse einer räumlichen Begrenzung der Mobilität von  $\beta_2$ AR sollten in zukünftigen Untersuchungen durch selektive Einflussnahme auf die denkbaren Typen von Mikrodomänen näher analysiert werden. Eine mögliche Involvierung des Aktin basierten Zytoskeletts kann mittels Latrunculin B, welches die Aktinpolymerisation inhibiert, oder Cytochalasin D, welches die Aktindepolymerisation induziert, verifiziert werden [144]. Indem der Zellmembran durch Methyl- $\beta$ -cyclodextrin Cholesterol entzogen wird, kann eine eventuelle ‚lipid raft‘-Zugehörigkeit der Mikrodomänen untersucht werden [65]. Um mittels FCS ebenfalls eine Unterscheidung verschiedener Typen von Mikrodomänen zu ermöglichen, wäre ein Einsatz der vrFCS (variable radius FCS) eine sinnvolle methodische Ergänzung. Durch die unterschiedliche Abhängigkeit der Diffusionszeitkonstante vom Radius des konfokalen Detektionsvolumens können Erkenntnisse über die Existenz verschiedenartiger Mikrodomänen gewonnen werden [144, 145].

Eine Veränderung der  $\beta_2$ AR-Dynamik durch agonistische Stimulation mit Terbutalin oder durch Beeinflussung der nachgeschalteten Signalkaskade mit CTX konnte beschrieben werden. Durch die Einflussnahme auf verschiedene Schlüsselstellen der Desensitivierung und Internalisierung könnten die exakten Mechanismen und beteiligten Proteine, die letztendlich zu der veränderten Rezeptormobilität führen, detailliert untersucht werden. Denkbar wäre etwa der Einsatz von Inhibitoren der GRK2 oder des  $\beta$ Arr, aber ebenso die Verwendung entsprechender inaktiver Proteinmutanten.

Die Charakterisierung eines antagonistischen Einflusses auf die Rezeptordynamik stellt ebenfalls ein interessantes Folgeprojekt dar. Durch die ergänzende Verwendung eines direkt fluoreszenzmarkierten Rezeptors anstelle der Detektion über den markierten Liganden, wäre die Trajektorienlänge nicht weiter von der Ligandbindung abhängig, wodurch längere Trajektorien für eine statistisch sinnvolle MSD-Auswertung zur Verfügung stünden. Zusätzlich könnten unter simultaner Verwendung unterschiedlich markierte Liganden und Rezeptoren Kollokalisationsstudien durchgeführt werden, die weitere wichtige Erkenntnisse über An- und Abbindungsprozesse während der lateralen Rezeptordiffusion liefern würden.

Ein weiteres interessantes Resultat der vorliegenden Arbeit ist die hohe Dynamik der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Bindung. Sowohl die SPT- als auch die FCS-Ergebnisse lassen auf die Existenz von mindestens zwei verschiedenen Rezeptorzuständen mit unterschiedlichen Agonistaffinitäten schließen. Diesbezüglich ist auffällig, dass die hier detektierte Bindungsdauer des Liganden an den  $\beta_2$ AR viel kürzer und damit der Prozess der Rezeptoraktivierung wahrscheinlich sehr viel schneller ist, als bislang angenommen wurde [146, 147].

Die Verwendung zweier unterschiedlicher fluoreszenzbasierter nicht invasiver Mikroskoptechniken mit Sensitivität im Einzelmolekülbereich ermöglicht eine optimale gegenseitige Ergänzung. Ein großer Vorteil der FCS ist die simultane Detektierbarkeit sowohl von Rezeptor gebundenem als auch von frei in Lösung diffundierendem Liganden. Mittels FCS können zudem Konzentrationen bestimmt werden, wodurch exakte Bindungsstudien realisierbar sind. Die hohe Sensitivität der FCS für schnelle Ereignisse

---

(z.B. kurze Bindungsprozesse, Flackern, Blinken) unterhalb der zu erwartenden Diffusionszeitkonstante birgt die Gefahr, dass das tatsächlichen Diffusionsverhalten nicht richtig wiedergegeben wird. Außerdem sind immobile Ereignisse mittels FCS nicht erfassbar. Des Weiteren stößt die FCS dann an ihre Grenzen, wenn komplexe Bewegungsprofile - wie sie durch Diffusion, gerichteten Transport oder Bewegung in räumlich eingeschränkten Bereichen zustande kommen - unterschieden werden sollen. Eine sich innerhalb einer Trajektorie verändernde Mobilität ist gleichfalls nicht detektierbar. Das sehr kleine Beobachtungsvolumen kann nicht die Verhältnisse der gesamten Plasmamembran repräsentieren, insbesondere unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Plasmamembran nicht homogen organisiert ist.

Diese Lücken werden durch SPT weitgehend geschlossen. Durch die Weitfeldbetrachtung können Inhomogenitäten der Plasmamembranorganisation erkannt werden. Die Detektion und Analyse einzelner Trajektorien ermöglicht die Differenzierung zwischen unterschiedlichen Diffusionstypen. Die hohe Lokalisierungsgenauigkeit realisiert eine sehr gute räumliche Auflösung. Immobile und sehr langsam mobile Ereignisse können exakt erfasst werden. Im Gegensatz zur FCS ist die zeitliche Auflösung des SPT begrenzt durch die Leistungsfähigkeit der Kamera, wodurch die Detektierbarkeit sehr schneller Ereignisse eingeschränkt ist. Das SPT stößt ebenfalls bei der Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen und Bindungskinetiken an ihre Grenzen. Ein geeignet ergänzender Einsatz beider Techniken ermöglicht somit eine exakte Beschreibung von Dynamiken und Bindungseigenschaften von Rezeptoren in der Plasmamembran lebender Zellen.

Inwieweit man über das laterale Diffusionsverhalten von Rezeptor-Ligand-Komplexen auf den Rezeptorstatus schließen kann und ob dieser denkbare Zusammenhang für die molekulare Wirkstoffforschung von Bedeutung ist, werden sicherlich zukünftige Arbeiten zeigen.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt das laterale Diffusionsverhalten von Komplexen aus  $\beta_2$ -adrenergem Rezeptor und dem Liganden Noradrenalin, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup> 532, auf der Membran von A549-Zellen. Nach Eigenbau und Etablierung eines Einzelmolekülmikroskops konnte durch die Detektion und Verfolgung einzelner Rezeptor-Ligand-Komplexe das Bewegungsverhalten detailliert analysiert werden. Unterschiedliche Diffusionstypen wurden charakterisiert und verschiedene Rezeptorzustände differenziert. Neben immobilen wurden insbesondere  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe mit einer langsamen lateralen Mobilität gefunden, die sich bevorzugt in räumlich begrenzten Domänen bewegten. Aus der Länge der Einzeltrajektorien konnten außerdem Rückschlüsse auf eine kurze Existenzdauer der Rezeptor-Ligand-Komplexe gezogen werden.

Eine agonistische Stimulation mit Terbutalin beeinflusste das Diffusionsverhalten der verschiedenen Rezeptorzustände. Die Mobilitätsverteilung, die mittleren Diffusionsgeschwindigkeiten sowie die laterale Ausdehnung der Einzelmolekülpfade veränderten sich durch die einsetzenden Desensitivierungs- und Internalisierungsprozesse, die durch die Stimulation ausgelöst wurden. Durch Unterbrechung der Signaltransduktion mittels Choleratoxin konnte gleichfalls Einfluss auf die laterale Diffusion der  $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe genommen werden.

Unter gleichen experimentellen Bedingungen wurden fluoreszenzkorrelations-spektroskopische Messungen durchgeführt. Diese offenbarten insbesondere eine sehr kurze Bindungsdauer des Liganden Alexa-NA an den  $\beta_2$ AR sowie die Existenz unspezifischer kurzer Kollisionsereignisse des Liganden mit der Plasmamembran. Die agonistische Terbutalinstimulation führte zu einer ausgeprägten Verdrängung von Alexa-NA vom  $\beta_2$ AR.

Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen konnten sowohl die Stärken der verwendeten Techniken als auch ihre Grenzen deutlich herausgearbeitet werden.

Durch ergänzende Verwendung von Einzelmolekülmikroskopie und Fluoreszenzkorrelationspektroskopie gelingt eine detaillierte Beschreibung von Diffusions- sowie Bindungsereignissen membranärer Rezeptoren.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Geräte

#### 6.1.1 Das Einzelmolekülmikroskop

Das im Eigenbau entstandene Einzelmolekülmikroskop basiert auf einem inversen Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop (TE2000-S, Nikon, Kanagawa, JP). Die Anregung erfolgt mittels diodengepumptem Dauerstrahl-Festkörperlaser (LasNova GLK 3250 T01, 532 nm, 50 mW, Lasos, Jena). Der Laserstrahl passiert einen akusto-optisch regulierbaren Filter (A.A Sa, Saint-Rémy-Lès-Chevreuse, FR) und wird dann über ein Einkopplungssystem in eine optische Monomodefaser (kineFLEX<sup>TM</sup>, Point Source, Hamble, UK) geleitet. Der kollimierte Laserstrahl mit einem Durchmesser ( $1/e^2$ ) von 0,7 mm wird über einen Illuminationsarm in den rückwärtigen Eingang des Mikroskops eingekoppelt. Nach Passieren einer Tubuslinse ( $f = 200$  mm) wird der Laserstrahl über einen Dichromat (Q540lp, Chroma Technology, Rockingham, USA) durch ein Wasserimmersionsobjektiv (Plan Apo VC, 60x, 1,2  $NA$ , Nikon) in die Probe gelenkt. Der Laserstrahl erzeugt in der Objektebene ein gaußförmiges Illuminationsprofil mit einem Durchmesser ( $1/e^2$ ) von 11,7  $\mu\text{m}$ . Das Fluoreszenzlicht passiert nach Objektiv und Dichromat einen Emissionsfilter (HQ560/30, Chroma Technology) und wird dann durch den seitlichen Mikroskopausgang gelenkt. Der Fokussierung durch eine zweite Tubuslinse ( $f = 200$  mm) folgt eine vierfache Vergrößerung durch ein entsprechendes Linsensystem (VM Lens C-4 x, Nikon). Beim Detektionssystem handelt es sich um eine rückseitig illuminierte EMCCD-Kamera (iXon<sup>TM</sup> DV-860DCS-BV, Andor, Belfast, IE) mit einer Sensorgröße von 128 x 128 Pixeln, die eine Seitenlänge von 24  $\mu\text{m}$  aufweisen. Aufgrund der verwendeten Optik entspricht die Seitenlänge eines Pixels 100 nm im Objektraum. Im Vollbildmodus können bis zu 515 Bilder/s aufgenommen werden. Die Kamera wird zur Reduktion des Dunkelrauschens auf  $-85^\circ\text{C}$  gekühlt. Vor jedem Messtag wird die Laserintensität hinter dem Objektiv auf

etwa  $1 \text{ kW/cm}^2$  eingestellt. Eine Justageprobe, bestehend aus einer roten mit Edding® auf ein Deckglas gemalten Fläche eingedeckelt mit Wasser auf einem Objektträger, findet für die Feineinstellung der Probenausleuchtung Verwendung. Dabei wird das Illuminationsprofil (Abb. 6-1) und die mittige Ausleuchtung des Kamerasensors überprüft und gegebenenfalls mittels Justierung der Stellschrauben an der Fasereinkopplung in das Mikroskop korrigiert.



Abb. 6-1: Illuminationsprofil des Lasers.

### 6.1.2 Das Fluoreszenzkorrelationspektrometer

Das Fluoreszenzkorrelationspektrometer ConfoCor® (Zeiss, Jena) ist ausgestattet mit einem Argon-Ionen Laser (LGK 7812 ML 2, Lasos), dessen Intensität mit einem Graufilter OD 1,5 (optische Dichte, Linos, Göttingen) auf eine Leistung von  $2,4 \text{ kW/cm}^2$  abgeschwächt wird. Die in dieser Arbeit verwendete Anregungswellenlänge von 514 nm wird durch einen Anregungsfilter (515FS10-25, Andover, Salem, USA) vom Gesamtanregungslicht separiert. Ein Dichromat (FT540, Andover) lenkt den Laserstrahl durch ein Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat, 63x, 1,2 NA, Zeiss) in die Probe. Das Fluoreszenzlicht passiert einen Emissionsfilter (EF530-600, Andover) und eine variable Lochblende mit einem Durchmesser von  $40 \mu\text{m}$ . Bei der Detektionseinheit handelt es sich um eine Avalanche-Photodiode (SPCM-AG Series, PerkinElmer Optoelectronics, Fremont, CA). Die Datenverarbeitung und -aufzeichnung übernimmt ein digitaler Hardwarekorrelator (ALV-5000, ALV, Langen) und die zeitgleiche Darstellung der

Messergebnisse erfolgt mit der FCS Access Control Software (V. 1.2, Zeiss). Für die vor jedem Messtag stattfindende Überprüfung der symmetrischen Probenausleuchtung findet eine AxioCam-Kamera (MRm, Kamerasoftware Axiovision AC, Zeiss) Verwendung. Die ebenso zur Routine gehörende automatische Justage der Lochblende auf maximal erreichbare Zählrate wird mit 100 nM Tetramethylrhodamin-Lösung (TMR, Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Zur Kalibrierung des Beobachtungsvolumens wird für eine 10 nM TMR-Lösung die Diffusionszeitkonstante als Mittelwert aus 10 Einzelmessungen bestimmt. Die Ausdehnung und Symmetrie des konfokalen Volumenelements kann dann über den bekannten Diffusionskoeffizienten  $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für TMR berechnet werden (Gl. 1.12).

## 6.2 Zellkultur

### 6.2.1 Kultivierung der A549-Zellen

Die A549-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig; Nr.: ACC 107) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium ergänzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin (alle Gibco<sup>®</sup>, Invitrogen, Karlsruhe). Sowohl für die FCS-Messungen als auch für die SPT-Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von  $1,7\text{-}3,4 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  auf hitzesterilisierten runden Deckgläsern (Nr. 1, Durchmesser 18 mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen) in 12 x Multiwellschalen (Nunclon<sup>™</sup>, Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Die Anzucht erfolgte für drei bis vier Tage im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90 % für die Experimente verwendet.

## 6.2.2 Vorbereitung der Zellen für die Lebendzellmessungen

Die auf den Deckgläsern adhärennten Zellen wurden vor der experimentellen Verwendung dreimal mit Inkubationspuffer (Lockes Solution: 154,0 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 2,3 mM CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat, 3,6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5,0 mM HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure], 2,0 mM D-(+)-Glucose-Monohydrat, pH 7,3, alle Merck, Darmstadt) bei 37°C gewaschen, um das Kulturmedium zu entfernen. Die Deckgläser wurden für die Messungen in eine spezielle Halterung (Eigenbau) eingesetzt und mit 300 µl Lockes Solution überschichtet. Nach Fixierung des Deckglasträgers im Halterahmen des Mikroskoptisches wurde das Objektiv von unten an das Deckglas herangefahren.

## 6.3 Einzelmolekülmikroskopische Studien

### 6.3.1 Immobilisierung von Nanobeads

Fluoreszierende Nanobeads (Komponente C aus PS-Speck™ Microscope Point Source Kit, Molecular Probes, Leiden, NL) mit einem Durchmesser von 0,175 (± 0,005) µm und einer Excitations- bzw. Emissionswellenlänge von 540 bzw. 560 nm wurden 1:1000 mit Aqua bidest. verdünnt. 10 µl dieser Verdünnung wurden auf ein Deckglas (Nr. 1, 18x18 mm, Menzel, Braunschweig) pipettiert und unter Lichtausschluss an der Luft eingetrocknet. Der Rückstand wurde mit einem kleinen Tropfen Aqua bidest. und einem Objektträger (Menzel) eingedeckelt. Mit Klarlack wurde das Deckglas auf dem Objektträger luftdicht fixiert. Bilderserien mit 1000 Frames wurden mit einer Illuminationszeit von 5 ms und im ‚frame transfer‘-Modus aufgenommen, wodurch eine maximale Bildwiederholungsrate von 191,6 Hz möglich wurde (Laserleistung 0,94 kW/cm<sup>2</sup>). Das SNR und die Lokalisierungsgenauigkeit für 15 Nanobeads wurden entsprechend Kap. 6.3.7.2 bzw. 6.3.7.3 bestimmt.

### 6.3.2 Immobilisierung von Alexa-Noradrenalin

Analog zu Kap. 6.3.1 wurde eine Lösung mit 0,01 pM Alexa-NA auf einem Deckglas eingetrocknet und eingedeckelt. Bilderserien mit 1000 Frames wurden mit einer Illuminationszeit von 50 ms und im ‚frame transfer‘-Modus aufgenommen (Laserleistung 1,87 kW/cm<sup>2</sup>, Gain 220). Die Immobilisierung war lediglich vorübergehend. Die Bestimmung des SNR erfolgte wie in Kap. 6.3.7.2 beschrieben. Für die Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit nach Kap. 6.3.7.3 wurde die Position von 15 einzelnen Alexa-NA-Molekülen bestimmt, die über eine Zeitdauer von 20-70 Frames beobachtet werden konnten.

### 6.3.3 Bindung von Alexa-Noradrenalin an A549-Zellen

Für die SPT-Experimente wurden Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1 nM Alexa-NA in Lockes Solution eingesetzt. Entsprechende Mengen einer Stammlösung mit 100 nM Alexa-NA wurden direkt zu den 300 µl Inkubationspuffer auf dem Deckglasträger pipettiert und mit einer großvolumigen Pipette vermischt. Um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen, wurde eine Inkubationszeit von 15-20 min gewählt. Die Fokussierung auf die Biomembran der Zellen erfolgte wie in Kap. 3.1.3 beschrieben. Für jede Bedingung wurden Bilderserien mit 2000 Frames aufgenommen. Die Aufnahmebedingungen und Geräteeinstellungen wurden für die miteinander zu vergleichenden Messreihen konstant gehalten (Illuminationszeit 50 ms, Bildwiederholungsrate 10 Hz, Ausleserate 5 MHz, Gain 100-130, Laserleistung 0,94-1 kW/cm<sup>2</sup>, ‚vertical shift speed‘ 1,7 µs, ‚pre-amplifier gain‘ 4,5 x, ‚baseline clamp‘ aktiviert). Jede Messbedingung wurde an mindestens drei Zellen wiederholt. Alle Messungen wurden bei 22°C durchgeführt. Die Gesamtmessdauer pro Deckglas wurde auf etwa 90 min begrenzt.

### **6.3.4 Unspezifische Bindung von Alexa-Noradrenalin und Alexa532**

Um das Ausmaß der unspezifischen Bindung von 0,5 nM Alexa-NA an die Membran von A549-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen 15 min mit 0,5 nM Alexa-NA inkubiert und entsprechende Bilderserien als Kontrolle generiert. Nach Inkubation der Zellen mit 10  $\mu$ M Terbutalin-Hemisulfat oder Isoprenalin-HCl (beide Sigma, Taufkirchen) für 1 h wurde die nicht verdrängbare Bindung von Alexa-NA bestimmt. Der ursprünglich als Succinimidylester vorliegende Farbstoff Alexa532 hydrolysiert in wässriger Lösung zur nicht reaktiven freien Säure. Zellen wurden mit 0,5 nM dieser Farbstofflösung für 15 min inkubiert und es wurden entsprechende Bilderserien für die Bestimmung der unspezifischen Bindung von Alexa532 an A549-Zellen aufgenommen.

### **6.3.5 Stimulationsexperimente mit Terbutalin**

Nach Aufnahme des Diffusionsverhaltens von Rezeptor-Ligand-Komplexen im nahezu unstimulierten Zustand wurde an derselben Zelle der Einfluss einer agonistischen Stimulation aufgezeichnet. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit 100 nM, 1  $\mu$ M oder 5  $\mu$ M Terbutalin stimuliert. Entsprechende Mengen einer 100  $\mu$ M Stammlösung wurden zum Inkubationspuffer pipettiert und sorgfältig trituiert. Nach Überprüfung und gegebenenfalls Korrektur der Fokusposition wurden nach Minute 5, 15, 25 und 35 min Bilderserien mit den in Kap. 6.3.3 beschriebenen Einstellungen generiert.

### **6.3.6 Cholera-toxin-Studien**

Die Zellen wurden in Multiwellschalen mit 1  $\mu$ g/ml CTX (Sigma) im Medium für 4 h im Inkubator bei 37°C vorinkubiert. Die anschließende Bindung von Alexa-NA, die Stimulation mit Terbutalin und Datenaufnahme erfolgten analog zu Kap. 6.3.3 und 6.3.5.

## 6.3.7 Datenauswertung

### 6.3.7.1 Lokalisierung und Verfolgung von Einzelmolekülen

Die Lokalisierung sowie das Verbinden der Einzelmoleküle durch einen Bildstapel zu Trajektorien wurde mit einer automatisierten Partikel-Tracking-Software (DiaTrack 3.01, Semasopt, Chavannes, CH) durchgeführt. Nach Subtraktion des Hintergrundes erfolgte zunächst die Partikelerkennung mit Bestimmung der Objektposition durch die Annäherung einer zweidimensionalen Gaußfunktion an die PSF eines jeden Moleküls (Gl. 1.2). Für zwei räumlich nahe Partikel wurde eine minimale Nähe der Objektpositionen von 9 Pixeln zugelassen. Der zu erwartende Wert für die HWHM (half width at half maximum) der Gaußfunktion wurde mit 1,4 Pixeln vorgegeben und die automatische Bleichkompensation wurde aktiviert. Die Einstellung des ‚Trashdim‘ und somit der Grauwertgrenze, ab der Partikel als solche erkannt werden, wurde zwischen den einzelnen Bilderserien nur geringfügig zwischen 138 und 150 variiert. Um Trackingfehler durch nur teilweise im Fokus befindliche Moleküle zu vermeiden, wurde ein Rand von ungefähr 5 Pixeln von der Partikelfindung ausgeschlossen. Nachfolgend wurden die einzelnen lokalisierten Moleküle durch die Bildserie zu Trajektorien verbunden, wobei eine maximale Partikelbewegung von 12 Pixeln, entsprechend 1200 nm, zwischen zwei Frames zugelassen wurde. Mit dem hausintern geschriebenen MATLAB<sup>®</sup>-basierten Programm Trackeditor wurde jede einzelne Trajektorie auf Plausibilität geprüft und gegebenenfalls aus dem Datensatz entfernt. Der an dieser Stelle existierende Rohdatenpool bestand aus x- und y-Positionen der Partikel gelistet für jede Einzeltrajektorie.

### 6.3.7.2 Bestimmung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses

Die Amplitude der angenäherten zweidimensionalen Gaußfunktion entspricht der Signalintensität eines Partikels. Durch Subtraktion der mittleren Hintergrundintensität von der Signalintensität ergibt sich die Signalintensität über Hintergrund ( $I$ ). Das SNR

errechnet sich durch Division der Signalintensität über Hintergrund durch die Standardabweichung ( $\sigma$ ) des Hintergrundsignals (Gl. 1.3).

### 6.3.7.3 Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit

Für die Bestimmung der Lokalisierungsgenauigkeit wurde die Objektposition eines immobilisierten Moleküls durch eine Serie von Einzelbildern festgelegt. Die Standardabweichung ( $\sigma$ ) vom Mittelwert ( $\bar{x}$ ) der resultierenden Sprungweiten nach Gl. 6.1 beschreibt direkt die Genauigkeit der Lokalisierung.

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.1)$$

$x_i$  steht für die Sprungweite mit  $1 \leq i \leq N$ , wobei  $N$  die Anzahl der Sprünge ist.

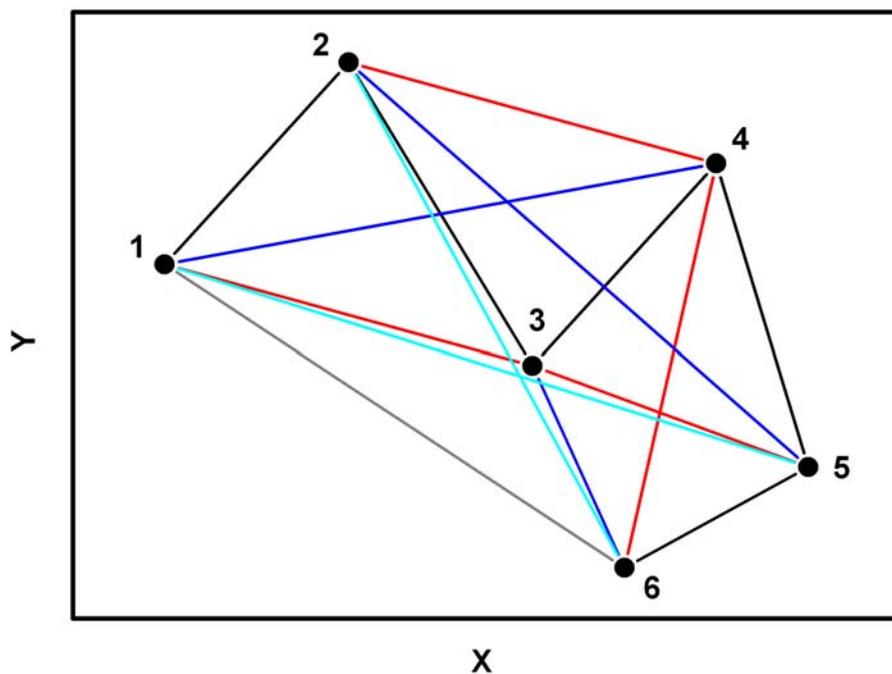
### 6.3.7.4 Bearbeitung der Rohdaten

Die weitere Bearbeitung der Rohdaten wurde mit Origin<sup>®</sup> 7.5 (OriginLab, Northampton, USA), teilweise automatisiert durch entsprechend programmierte Skripte, durchgeführt. Dazu gehörte die Berechnung der Sprungweiten  $r$  aus

$$r = \sqrt{(x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2} \quad (6.2)$$

mit  $x_i$  und  $y_i$  als x- bzw. y-Koordinate eines Partikels und mit  $1 \leq i \leq N$ , wobei  $N$  die Anzahl der Beobachtungen eines einzelnen Moleküls ist. Aus allen Sprungweiten einer Messbedingung konnte dann die Sprungweitenverteilungen mit einer Klasseneinteilung von 20 nm erstellt werden. Die Kurvenanpassung an die Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten basierte auf Gl. 1.8 und lieferte die angegebenen Diffusionskoeffizienten

sowie deren prozentuale Verteilung jeweils  $\pm$  Standardabweichung. Die Ermittlung der MSD-Werte soll anhand der in Abb. 6-2 schematisch dargestellten Trajektorie verdeutlicht werden. Die verschiedenfarbigen Verbindungslinien entsprechen den zu unterschiedlichen Zeitabständen zurückgelegten Strecken.



**Abb. 6-2: Schematische Darstellung einer Trajektorie und deren Sprungweiten für verschiedene Zeitdifferenzen.**

Zeitdifferenz  $t = 1$  (schwarz),  $t = 2$  (rot),  $t = 3$  (blau),  $t = 4$  (cyan) und  $t = 5$  (grau). Die Nummerierung entspricht der Beobachtungsreihenfolge und somit den Framenummern.

Nach Quadrierung der Abstände zu allen möglichen Zeitdifferenzen ergaben sich die entsprechenden MSD-Werte als Mittelung der Abstandsquadrate zu identischen Zeitdifferenzen. Die graphische Darstellung der MSD-Daten erfolgte wie in Kap. 1.4.1.3.1 beschrieben. Die Kurvenapproximation basierte auf Gl. 1.4 für unbehinderte Diffusion bzw. Gl. 1.6 für räumlich eingeschränkte Mobilität.

Die Trajektorienlängenverteilung zeigte eine biexponentielle Abnahme, was eine zufriedenstellende Approximation folgender Exponentialfunktion ermöglichte:

$$y = y_0 + A_1 \cdot \exp\left(-x/t_1\right) + A_2 \cdot \exp\left(-x/t_2\right) \quad (6.3)$$

$t$  ist die Abklingzeit der Komponenten 1 und 2 und  $A$  ist der Anteil der jeweiligen Komponente.

Alle nichtlinearen Kurvenapproximationen wurden mit Origin<sup>®</sup> und dem Optimierungsalgorithmus nach Levenberg-Marquardt durchgeführt.

Für die Darstellung der Bilder einzelner Moleküle sowie die Erstellung von Intensitätsprofilen wurde ImageJ 1.38x (NIH, Bethesda, USA) eingesetzt. Die in dieser Arbeit dargestellten Originalaufnahmen von einzelnen Molekülen wurden zunächst kontrastverstärkt und dann mit einem Filter geglättet, der Strukturen kleiner als 2 Pixel und größer als 20 Pixel herausfiltert.

Die Einteilung der Einzeltrajektorien anhand ihrer lateralen Ausdehnung erfolgte mit dem hausintern geschriebenen MATLAB<sup>®</sup>-basierten Programm Trackselect. Zunächst wurde die Ausdehnung  $d_{Ext}$  der Trajektorie in x und y Richtung bestimmt:

$$d_{xExt} = x_{i\max} - x_{i\min} \quad (6.4)$$

und

$$d_{yExt} = y_{i\max} - y_{i\min} \quad (6.5)$$

Dann erfolgte die automatische Einteilung in die drei Kategorien nach folgenden Einschlusskriterien:

$$\text{Kategorie A: } d_{xExt} < 300 \text{ nm} \wedge d_{yExt} < 300 \text{ nm}$$

$$\text{Kategorie B: } d_{xExt} > 300 \text{ nm} \vee d_{yExt} > 300 \text{ nm} \wedge$$

$$d_{xExt} < 600 \text{ nm} \wedge d_{yExt} < 600 \text{ nm}$$

$$\text{Kategorie C: } d_{xExt} > 600 \text{ nm} \vee d_{yExt} > 600 \text{ nm}$$

Die Sortierung der Trajektorien in Abhängigkeit von ihrer Länge wurde ebenfalls mit dem Programm Trackselect durchgeführt.

## **6.4 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopische Studien**

### **6.4.1 Bindung von Alexa-Noradrenalin an A549-Zellen**

Für die FCS-Experimente wurde eine Konzentrationen von 5 nM Alexa-NA in Lockes Solution eingesetzt. Die Inkubation erfolgte methodisch wie schon unter Kap. 6.3.3 beschrieben. Die Positionierung des fokalen Volumenelements in der Zellmembran oder in der fluoreszierenden Inkubationslösung erfolgte vor jeder Messung durch einen Zellscan in z-Richtung. Pro Zelle wurden 6-10 Einzelmessungen mit einer Länge von je einer Minute durchgeführt, was an mindestens drei verschiedenen Zellen je Versuchbedingung wiederholt wurde. Die FCS-Messungen erfolgten bei 22°C mit einer Gesamtmessdauer pro Deckglas von maximal 90 min. Regelmäßige Kontrollen der Fokusposition via z-Scan zwischen den einzelnen Messungen gehörten zur Routine.

### **6.4.2 Unspezifische Bindung von Alexa-Noradrenalin und Alexa532**

Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden Experimente analog zu den in Kap. 6.3.4 beschriebenen durchgeführt.

### **6.4.3 Stimulationsexperimente mit Terbutalin**

Die Stimulation mit Terbutalin erfolgte wie in Kap. 6.3.5 für die SPT-Experimente beschrieben.

#### 6.4.4 Cholera-toxin-Studien

Die Vorgehensweise bei den FCS-Studien mit CTX-Vorinkubation war analog zu Kap. 6.3.6.

#### 6.4.5 Datenauswertung

Bei dem Auswerteprogramm Mainfcs handelt es sich um ein MATLAB<sup>®</sup>-basiertes Programm, welches hausintern entwickelt wurde. Die sich aus den Messungen des freien Liganden über den Zellen ergebenden Autokorrelationskurven wurden mit der dreidimensionalen Autokorrelationsfunktion ausgewertet (Gl. 1.11). Für die Betrachtung der lateralen Diffusion von Rezeptor-Ligand-Komplexen in der Plasmamembran wurde ebenfalls die Funktion für die Bewegung im dreidimensionalen Raum gewählt, obgleich die laterale Bewegung zweidimensional abläuft. Beim Wechsel vom drei- in den zweidimensionalen Raum ergibt sich für die Diffusionskoeffizienten lediglich ein vernachlässigbarer sechsprozentiger Unterschied. Für die Partikelzahl macht der Unterschied nur ein Prozent aus [120]. Für die Kurvenanpassung mit drei Komponenten wurde die bekannte Diffusionszeitkonstante für den freien Liganden über der Zelle ( $\tau_{frei} = 57,71 \mu\text{s}$ ) fixiert und zwei Freiheitsgrade zugelassen. Konnten hierbei nur zwei Diffusionszeitkonstanten gefunden werden, so wurde auf ein Zwei-Komponentenmodell reduziert. Die Diffusionszeitkonstanten sowie deren prozentuale Verteilung ergaben sich direkt aus der Kurvenapproximation. Messung mit einem größeren Triplettanteil als 20 % wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Diffusionskoeffizienten wurde mit Gl. 1.12 errechnet, wobei sich der laterale Radius des Detektionsvolumens aus den Justagemessungen ergab.

## 6.5 Statistische Auswertung

Als Lageparameter wird in dieser Arbeit das arithmetische Mittel  $\bar{x}$ , definiert als die Summe aller Messwerte  $x_i$  geteilt durch die Anzahl der Messwert  $N$ , angewendet:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (6.6)$$

Die Varianz  $\sigma^2$  ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert und errechnet sich aus:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \quad (6.7)$$

Der hier verwendete Streuungsparameter ist die Quadratwurzel der Varianz, die als Standardabweichung  $\sigma$  bezeichnet wird:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (6.8)$$

Die Standardabweichung gibt einen Hinweis auf die Variabilität zwischen den einzelnen Messdaten.

Unter der Annahme, dass die Grundgesamtheit der Messwerte einer Normalverteilung entspricht, erfolgte die Bewertung der statistischen Signifikanz mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA). Statistisch signifikante Befunde wurden mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$  oder  $p \leq 0,001$  gefunden.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines GPCR am Beispiel des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.....	3
Abb. 1-2: Signaltransduktion eines GPCR am Beispiel des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors. ....	8
Abb. 1-3: Desensitivierung und Internalisierung eines GPCR am Beispiel des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors.....	12
Abb. 1-4: Schematische Darstellung des Einzelmolekülmikroskops.....	19
Abb. 1-5: Nanobead immobilisiert auf einem Deckglas.....	20
Abb. 1-6: Simuliertes mittleres Abstandsquadrat als eine Funktion der Zeit t.....	24
Abb. 1-7: Schematische Darstellung eines Fluoreszenzkorrelationsspektrometers. ....	26
Abb. 3-1: Nanobeads immobilisiert auf einem Deckglas. ....	33
Abb. 3-2: Spektrale Eigenschaften von Alexa Fluor® 532.....	35
Abb. 3-3: Alexa Fluor® 532 gekoppelt an Noradrenalin.....	36
Abb. 3-4: Alexa-NA immobilisiert auf einem Deckglas.....	37
Abb. 3-5: Durchlichtaufnahmen von verschiedenen Fokuspositionen einer A549-Zelle. ....	38
Abb. 3-6: Zweidimensionale Darstellung aller Trajektorien einer A549-Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Alexa-NA-Konzentrationen.....	40
Abb. 3-7: Beugungsbegrenzte Fluoreszenzsignale auf A549-Zellen. ....	41
Abb. 3-8: Einstufige Photobleichung eines individuellen $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes. ....	42
Abb. 3-9: Unspezifische Bindung von Alexa-NA und Alexa532.....	43
Abb. 3-10: Häufigkeitsverteilung der Trajektorienlängen von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.....	45
Abb. 3-11: Einzeltrajektorienanalyse eines $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes mit nahezu ungehinderter lateraler Diffusion.....	46
Abb. 3-12: Einzeltrajektorienanalyse eines $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexes mit räumlich begrenzter lateraler Diffusion.....	47
Abb. 3-13: Einzeltrajektorienanalyse von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit heterogenem Bewegungsprofil. ....	48
Abb. 3-14: Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen. ....	49
Abb. 3-15: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Mobilitätskategorien 1-3 der $\beta_2$ AR-Alexa- NA-Komplexe.....	54
Abb. 3-16: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Diffusionskoeffizienten der $\beta_2$ AR-Alexa-NA- Komplexe. ....	56
Abb. 3-17: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.....	58

Abb. 3-18: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames. ....	60
Abb. 3-19: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen.....	62
Abb. 3-20: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames. ....	63
Abb. 3-21: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Mobilitätskategorien 1-3 der $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe. ....	66
Abb. 3-22: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Diffusionskoeffizienten der $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexe.....	67
Abb. 3-23: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen. ....	69
Abb. 3-24: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die laterale Ausdehnung der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames. ....	70
Abb. 3-25: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen. ....	71
Abb. 3-26: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Anzahl der Trajektorien von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen mit mehr als sechs Frames. ....	72
Abb. 3-27: Schematische Darstellung der FCS-Fokuspositionierung auf der oberen Plasmamembran einer A549-Zelle nach Inkubation mit 5 nM Alexa-NA. ....	74
Abb. 3-28: Autokorrelationskurven von Alexa-NA frei in Lösung und gebunden an A549-Zellen. ....	75
Abb. 3-29: Unspezifische Bindung von Alexa-NA und Alexa532. ....	76
Abb. 3-30: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Bindung von Alexa-NA an den $\beta_2$ AR. ....	79
Abb. 3-31: Einfluss der Terbutalinstimulation auf die Autokorrelationskurven von Alexa-NA gebunden an A549-Zellen.....	81
Abb. 3-32: Einfluss der Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff1}$ verschiedener Zellen. ....	84
Abb. 3-33: Einfluss der Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff2}$ verschiedener Zellen.....	87
Abb. 3-34: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Bindung von Alexa-NA. ....	89
Abb. 3-35: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff1}$ verschiedener Zellen. ....	90
Abb. 3-36: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff2}$ verschiedener Zellen. ....	91
Abb. 4-1: Häufigkeitsverteilung der Sprungweiten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen (Drei-Komponentenmodell). ....	107

Abb. 6-1: Illuminationsprofil des Lasers. ....	122
Abb. 6-2: Schematische Darstellung einer Trajektorie und deren Sprungweiten für verschiedene Zeitdifferenzen. ....	129

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 3-1: Diffusionskoeffizienten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen. ....	50
Tab. 3-2: Verteilung der Diffusionskoeffizienten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen in Abhängigkeit von der Terbutalinstimulation. ....	51
Tab. 3-3: Verteilung der Diffusionskoeffizienten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen unter Einfluss von CTX und in Abhängigkeit von der Terbutalinstimulation. ....	65
Tab. 3-4: Konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss von Terbutalin auf die Bindung von 5 nM Alexa-NA an A549-Zellen. ....	77
Tab. 3-5: Einfluss der Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff 1}$ verschiedener Zellen. ....	82
Tab. 3-6: Einfluss der Terbutalinstimulation auf $\tau_{Diff 2}$ verschiedener Zellen. ....	85
Tab. 3-7: Einfluss von CTX und der anschließenden Terbutalinstimulation auf die Bindung von 5 nM Alexa-NA an A549-Zellen. ....	88
Tab. 4-1: Gegenüberstellung der mittels SPT und FCS gefundenen Diffusions-koeffizienten und weiterer Kenngrößen von Alexa-NA gebunden an den $\beta_2$ AR auf A549-Zellen. ....	105
Tab. 4-2: Diffusionskoeffizienten von $\beta_2$ AR-Alexa-NA-Komplexen auf A549-Zellen (Drei-Komponentenmodell). ....	107
Tab. 4-3: Auswahl und Zusammenfassung von FCS-basierten Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien. ....	109

## 9 Literaturverzeichnis

- [1] Lefkowitz RJ. *Seven transmembrane receptors: something old, something new*. Acta Physiol (Oxf) 2007;190(1):9-19.
- [2] Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Martenson C, Meyer T, Caron MG. *Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact  $\beta$ 2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate*. Mol Pharmacol 1997;51(2):177-184.
- [3] Hegener O, Prenner L, Runkel F, Baader SL, Kappler J, Häberlein H. *Dynamics of  $\beta$ 2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells*. Biochemistry 2004;43(20):6190-6199.
- [4] Prenner L, Sieben A, Zeller K, Weiser D, Häberlein H. *Reduction of high-affinity  $\beta$ 2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy*. Biochemistry 2007;46(17):5106-5113.
- [5] Tolkovsky AM, Levitzki A. *Mode of coupling between the  $\beta$ -adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes*. Biochemistry 1978;17(18):3795.
- [6] Baker A, Sauliere A, Dumas F, Millot C, Mazeret S, Lopez A, Salome L. *Functional membrane diffusion of G-protein coupled receptors*. Eur Biophys J 2007.
- [7] Goddard WA, 3rd, Abrol R. *3-Dimensional structures of G protein-coupled receptors and binding sites of agonists and antagonists*. J Nutr 2007;137(6 Suppl 1):1528S-1538S; discussion 1548S.
- [8] Hill SJ. *G-protein-coupled receptors: past, present and future*. Br J Pharmacol 2006;147 Suppl 1:S27-37.
- [9] Ji TH, Grossmann M, Ji I. *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. J Biol Chem 1998;273(28):17299-17302.
- [10] Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, von Zastrow M. *Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the  $\beta$ 2 adrenoceptor in mammalian cells*. Biochemistry 2005;44(16):6133-6143.
- [11] De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. *A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled  $\beta$ -adrenergic receptor*. J Biol Chem 1980;255(15):7108-7117.
- [12] Kent RS, De Lean A, Lefkowitz RJ. *A quantitative analysis of  $\beta$ -adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data*. Mol Pharmacol 1980;17(1):14-23.
- [13] Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. *A mutation-induced activated state of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model*. J Biol Chem 1993;268(7):4625-4636.

- [14] Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3(9):639-650.
- [15] Maudsley S, Martin B, Luttrell LM. *The origins of diversity and specificity in g protein-coupled receptor signaling*. J Pharmacol Exp Ther 2005;314(2):485-494.
- [16] Seifert R, Wenzel-Seifert K, Gether U, Kobilka BK. *Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations*. J Pharmacol Exp Ther 2001;297(3):1218-1226.
- [17] Zamah AM, Delahunty M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *Protein kinase A-mediated phosphorylation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor regulates its coupling to Gs and Gi. Demonstration in a reconstituted system*. J Biol Chem 2002;277(34):31249-31256.
- [18] Ballesteros JA, Jensen AD, Liapakis G, Rasmussen SG, Shi L, Gether U, Javitch JA. *Activation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6*. J Biol Chem 2001;276(31):29171-29177.
- [19] Gether U, Kobilka BK. *G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation*. J Biol Chem 1998;273(29):17979-17982.
- [20] Gether U, Lin S, Ghanouni P, Ballesteros JA, Weinstein H, Kobilka BK. *Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the  $\beta$ 2 adrenoceptor*. Embo J 1997;16(22):6737-6747.
- [21] Milligan G, Kostenis E. *Heterotrimeric G-proteins: a short history*. Br J Pharmacol 2006;147 Suppl 1:S46-55.
- [22] Daaka Y, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *Switching of the coupling of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A*. Nature 1997;390(6655):88-91.
- [23] Friedman J, Babu B, Clark RB.  *$\beta$ (2)-adrenergic receptor lacking the cyclic AMP-dependent protein kinase consensus sites fully activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human embryonic kidney 293 cells: lack of evidence for G(s)/G(i) switching*. Mol Pharmacol 2002;62(5):1094-1102.
- [24] Seibold A, January BG, Friedman J, Hipkin RW, Clark RB. *Desensitization of  $\beta$ 2-adrenergic receptors with mutations of the proposed G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites*. J Biol Chem 1998;273(13):7637-7642.
- [25] Yuan N, Friedman J, Whaley BS, Clark RB. *cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C consensus site mutations of the  $\beta$ -adrenergic receptor. Effect on desensitization and stimulation of adenylylcyclase*. J Biol Chem 1994;269(37):23032-23038.
- [26] Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, Clark RB. *Localization of the sites mediating desensitization of the  $\beta$ (2)-adrenergic receptor by the GRK pathway*. Mol Pharmacol 2000;58(5):1162-1173.

- [27] Vaughan DJ, Millman EE, Godines V, Friedman J, Tran TM, Dai W, Knoll BJ, Clark RB, Moore RH. *Role of the G protein-coupled receptor kinase site serine cluster in  $\beta$ 2-adrenergic receptor internalization, desensitization, and  $\beta$ -arrestin translocation.* J Biol Chem 2006;281(11):7684-7692.
- [28] Benovic JL, Onorato JJ, Arriza JL, Stone WC, Lohse M, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Cloning, expression, and chromosomal localization of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase 2. A new member of the receptor kinase family.* J Biol Chem 1991;266(23):14939-14946.
- [29] Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ. *Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with  $G\beta\gamma$  subunits and lipid.* J Biol Chem 1995;270(20):11707-11710.
- [30] Cong M, Perry SJ, Lin FT, Fraser ID, Hu LA, Chen W, Pitcher JA, Scott JD, Lefkowitz RJ. *Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79.* J Biol Chem 2001;276(18):15192-15199.
- [31] Chuang TT, LeVine H, 3rd, De Blasi A. *Phosphorylation and activation of  $\beta$ -adrenergic receptor kinase by protein kinase C.* J Biol Chem 1995;270(31):18660-18665.
- [32] Sarnago S, Elorza A, Mayor F, Jr. *Agonist-dependent phosphorylation of the G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) by Src tyrosine kinase.* J Biol Chem 1999;274(48):34411-34416.
- [33] Elorza A, Penela P, Sarnago S, Mayor F, Jr. *MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2.* J Biol Chem 2003;278(31):29164-29173.
- [34] Pitcher JA, Tesmer JJ, Freeman JL, Capel WD, Stone WC, Lefkowitz RJ. *Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases.* J Biol Chem 1999;274(49):34531-34534.
- [35] Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ.  *$\beta$ -Arrestin: a protein that regulates  $\beta$ -adrenergic receptor function.* Science 1990;248(4962):1547-1550.
- [36] Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG, Ferguson SS. *A central role for  $\beta$ -arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in  $\beta$ 2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types.* J Biol Chem 1997;272(43):27005-27014.
- [37] Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG. *Dynamin and  $\beta$ -arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization.* J Biol Chem 1996;271(31):18302-18305.
- [38] Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of  $\beta$ -arrestin and arrestin in the  $\beta$ 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems.* J Biol Chem 1992;267(12):8558-8564.

- [39] Kohout TA, Lin FS, Perry SJ, Conner DA, Lefkowitz RJ.  *$\beta$ -Arrestin 1 and 2 differentially regulate heptahelical receptor signaling and trafficking*. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98(4):1601-1606.
- [40] Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS. *Differential affinities of visual arrestin,  $\beta$  arrestin1, and  $\beta$  arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. J Biol Chem 2000;275(22):17201-17210.
- [41] Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Gurevich VV, Benovic JL, Keen JH. *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain*. J Biol Chem 1997;272(23):15017-15022.
- [42] Laporte SA, Oakley RH, Holt JA, Barak LS, Caron MG. *The interaction of  $\beta$ -arrestin with the AP-2 adaptor is required for the clustering of  $\beta$ 2-adrenergic receptor into clathrin-coated pits*. J Biol Chem 2000;275(30):23120-23126.
- [43] Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, Barak LS. *The  $\beta$ 2-adrenergic receptor/ $\beta$ arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(7):3712-3717.
- [44] Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H. *c-Src tyrosine kinase binds the  $\beta$ 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization*. J Biol Chem 2001;276(16):13240-13247.
- [45] Penela P, Elorza A, Sarnago S, Mayor F, Jr.  *$\beta$ -arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2*. Embo J 2001;20(18):5129-5138.
- [46] Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG, Lefkowitz RJ.  *$\beta$ -arrestin-dependent formation of  $\beta$ 2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes*. Science 1999;283(5402):655-661.
- [47] Miller WE, Maudsley S, Ahn S, Khan KD, Luttrell LM, Lefkowitz RJ.  *$\beta$ -arrestin1 interacts with the catalytic domain of the tyrosine kinase c-SRC. Role of  $\beta$ -arrestin1-dependent targeting of c-SRC in receptor endocytosis*. J Biol Chem 2000;275(15):11312-11319.
- [48] Ma YC, Huang J, Ali S, Lowry W, Huang XY. *Src tyrosine kinase is a novel direct effector of G proteins*. Cell 2000;102(5):635-646.
- [49] Ahn S, Maudsley S, Luttrell LM, Lefkowitz RJ, Daaka Y. *Src-mediated tyrosine phosphorylation of dynamin is required for  $\beta$ 2-adrenergic receptor internalization and mitogen-activated protein kinase signaling*. J Biol Chem 1999;274(3):1185-1188.
- [50] Seachrist JL, Anborgh PH, Ferguson SS.  *$\beta$ 2-adrenergic receptor internalization, endosomal sorting, and plasma membrane recycling are regulated by rab GTPases*. J Biol Chem 2000;275(35):27221-27228.
- [51] Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. *The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification*. J Biol Chem 1997;272(1):5-8.

- [52] Gagnon AW, Kallal L, Benovic JL. *Role of clathrin-mediated endocytosis in agonist-induced down-regulation of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor*. J Biol Chem 1998;273(12):6976-6981.
- [53] Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K. *Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells*. Embo J 1993;12(4):1597-1605.
- [54] Raposo G, Dunia I, Delavier-Klutchko C, Kaveri S, Strosberg AD, Benedetti EL. *Internalization of  $\beta$ -adrenergic receptor in A431 cells involves non-coated vesicles*. Eur J Cell Biol 1989;50(2):340-352.
- [55] Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. *Differential targeting of  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. A mechanism to functionally regulate the cAMP signaling pathway*. J Biol Chem 2000;275(52):41447-41457.
- [56] Schwencke C, Okumura S, Yamamoto M, Geng YJ, Ishikawa Y. *Colocalization of  $\beta$ -adrenergic receptors and caveolin within the plasma membrane*. J Cell Biochem 1999;75(1):64-72.
- [57] Xiang Y, Rybin VO, Steinberg SF, Kobilka B. *Caveolar localization dictates physiologic signaling of  $\beta$ 2-adrenoceptors in neonatal cardiac myocytes*. J Biol Chem 2002;277(37):34280-34286.
- [58] Ostrom RS, Gregorian C, Drenan RM, Xiang Y, Regan JW, Insel PA. *Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase*. J Biol Chem 2001;276(45):42063-42069.
- [59] Singer SJ, Nicolson GL. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science 1972;175(23):720-731.
- [60] Saxton MJ, Jacobson K. *Single-particle tracking: applications to membrane dynamics*. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1997;26:373-399.
- [61] Chini B, Parenti M. *G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?* J Mol Endocrinol 2004;32(2):325-338.
- [62] Edidin M. *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2003;32:257-283.
- [63] Simons K, Ikonen E. *Functional rafts in cell membranes*. Nature 1997;387(6633):569-572.
- [64] Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. *Emerging themes in lipid rafts and caveolae*. Cell 2001;106(4):403-411.
- [65] Simons K, Toomre D. *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol 2000;1(1):31-39.
- [66] Pike LJ. *Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*. J Lipid Res 2006;47(7):1597-1598.

- [67] Anderson RG. *The caveolae membrane system*. Annu Rev Biochem 1998;67:199-225.
- [68] Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction*. Mol Cell Biol 1999;19(11):7289-7304.
- [69] Kenworthy AK, Nichols BJ, Remmert CL, Hendrix GM, Kumar M, Zimmerberg J, Lippincott-Schwartz J. *Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface*. J Cell Biol 2004;165(5):735-746.
- [70] Munro S. *Lipid rafts: elusive or illusive?* Cell 2003;115(4):377-388.
- [71] Tremmel IG, Kirchhoff H, Weis E, Farquhar GD. *Dependence of plastoquinol diffusion on the shape, size, and density of integral thylakoid proteins*. Biochim Biophys Acta 2003;1607(2-3):97-109.
- [72] Kusumi A, Sako Y. *Cell surface organization by the membrane skeleton*. Curr Opin Cell Biol 1996;8(4):566-574.
- [73] Kusumi A, Sako Y, Yamamoto M. *Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy). Effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells*. Biophys J 1993;65(5):2021-2040.
- [74] Ritchie K, Iino R, Fujiwara T, Murase K, Kusumi A. *The fence and picket structure of the plasma membrane of live cells as revealed by single molecule techniques (Review)*. Mol Membr Biol 2003;20(1):13-18.
- [75] Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A. *Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane*. J Cell Biol 2002;157(6):1071-1081.
- [76] Murase K, Fujiwara T, Umemura Y, Suzuki K, Iino R, Yamashita H, Saito M, Murakoshi H, Ritchie K, Kusumi A. *Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques*. Biophys J 2004;86(6):4075-4093.
- [77] Wieser S, Moertelmaier M, Fuertbauer E, Stockinger H, Schutz GJ. *(Un)confined diffusion of CD59 in the plasma membrane determined by high-resolution single molecule microscopy*. Biophys J 2007;92(10):3719-3728.
- [78] Jacquier V, Prummer M, Segura JM, Pick H, Vogel H. *Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(39):14325-14330.
- [79] Daumas F, Destainville N, Millot C, Lopez A, Dean D, Salome L. *Confined diffusion without fences of a g-protein-coupled receptor as revealed by single particle tracking*. Biophys J 2003;84(1):356-366.
- [80] Suzuki K, Ritchie K, Kajikawa E, Fujiwara T, Kusumi A. *Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques*. Biophys J 2005;88(5):3659-3680.

- 
- [81] Lidke DS, Lidke KA, Rieger B, Jovin TM, Arndt-Jovin DJ. *Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors.* J Cell Biol 2005;170(4):619-626.
- [82] Liang ZY, Xu N, Guan YH, Xu M, He QH, Han QD, Zhang YY, Zhao XS. *The transport of  $\alpha$  (1A)-adrenergic receptor with 33-nm step size in live cells.* Biochem Biophys Res Commun 2007;353(2):231-237.
- [83] Bouzigues C, Dahan M. *Transient directed motions of GABA(A) receptors in growth cones detected by a speed correlation index.* Biophys J 2007;92(2):654-660.
- [84] Meyvis TK, De Smedt SC, Van Oostveldt P, Demeester J. *Fluorescence recovery after photobleaching: a versatile tool for mobility and interaction measurements in pharmaceutical research.* Pharm Res 1999;16(8):1153-1162.
- [85] Reits EA, Neefjes JJ. *From fixed to FRAP: measuring protein mobility and activity in living cells.* Nat Cell Biol 2001;3(6):E145-147.
- [86] Baker AM, Sauliere A, Gaibelet G, Lagane B, Mazeres S, Fourage M, Bachelerie F, Salome L, Lopez A, Dumas F. *CD4 interacts constitutively with multiple CCR5 at the plasma membrane of living cells: A vrFRAP approach.* J Biol Chem 2007.
- [87] Cezanne L, Lecat S, Lagane B, Millot C, Vollmer JY, Matthes H, Galzi JL, Lopez A. *Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance.* J Biol Chem 2004;279(43):45057-45067.
- [88] Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. *Studying protein dynamics in living cells.* Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2(6):444-456.
- [89] Marguet D, Lenne PF, Rigneault H, He HT. *Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order.* Embo J 2006;25(15):3446-3457.
- [90] Smith PR, Morrison IE, Wilson KM, Fernandez N, Cherry RJ. *Anomalous diffusion of major histocompatibility complex class I molecules on HeLa cells determined by single particle tracking.* Biophys J 1999;76(6):3331-3344.
- [91] Bates IR, Wiseman PW, Hanrahan JW. *Investigating membrane protein dynamics in living cells.* Biochem Cell Biol 2006;84(6):825-831.
- [92] Kubitscheck U, Kuckmann O, Kues T, Peters R. *Imaging and tracking of single GFP molecules in solution.* Biophys J 2000;78(4):2170-2179.
- [93] Grunwald D, Hoekstra A, Dange T, Buschmann V, Kubitscheck U. *Direct observation of single protein molecules in aqueous solution.* Chemphyschem 2006;7(4):812-815.
- [94] Iino R, Koyama I, Kusumi A. *Single molecule imaging of green fluorescent proteins in living cells: E-cadherin forms oligomers on the free cell surface.* Biophys J 2001;80(6):2667-2677.

- [95] Lill Y, Martinez KL, Lill MA, Meyer BH, Vogel H, Hecht B. *Kinetics of the initial steps of G protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging*. *Chemphyschem* 2005;6(8):1633-1640.
- [96] Lommerse PH, Blab GA, Cognet L, Harms GS, Snaar-Jagalska BE, Spaink HP, Schmidt T. *Single-molecule imaging of the H-ras membrane-anchor reveals domains in the cytoplasmic leaflet of the cell membrane*. *Biophys J* 2004;86(1 Pt 1):609-616.
- [97] Tardin C, Cognet L, Bats C, Lounis B, Choquet D. *Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses*. *Embo J* 2003;22(18):4656-4665.
- [98] Grunwald D, Spottke B, Buschmann V, Kubitscheck U. *Intranuclear binding kinetics and mobility of single native U1 snRNP particles in living cells*. *Mol Biol Cell* 2006;17(12):5017-5027.
- [99] Kues T, Dickmanns A, Luhrmann R, Peters R, Kubitscheck U. *High intranuclear mobility and dynamic clustering of the splicing factor U1 snRNP observed by single particle tracking*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(21):12021-12026.
- [100] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. *Science* 2005;307(5709):538-544.
- [101] Daumas F, Mazarguil H, Millot C, Lopez A, Salome L. *Probing functionalized gold colloids for single particle tracking experiments*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295(3):610-615.
- [102] Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D. *Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin*. *Nat Neurosci* 2001;4(3):253-260.
- [103] Serge A, Fourgeaud L, Hemar A, Choquet D. *Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane*. *J Neurosci* 2002;22(10):3910-3920.
- [104] Inoue S. Foundations of confocal scanned imaging in light microscopy. In: Pawley JB (Hrsg.). *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. Aufl. New York: Springer Science+Business Media 2006. p. 1-19.
- [105] Anderson CM, Georgiou GN, Morrison IE, Stevenson GV, Cherry RJ. *Tracking of cell surface receptors by fluorescence digital imaging microscopy using a charge-coupled device camera. Low-density lipoprotein and influenza virus receptor mobility at 4 degrees C*. *J Cell Sci* 1992;101 (Pt 2):415-425.
- [106] Andor Technology [Homepage] 2008. <http://www.andor.com/>
- [107] Kues T, Peters R, Kubitscheck U. *Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus*. *Biophys J* 2001;80(6):2954-2967.

- [108] Wilson KM, Morrison IE, Smith PR, Fernandez N, Cherry RJ. *Single particle tracking of cell-surface HLA-DR molecules using R-phycoerythrin labeled monoclonal antibodies and fluorescence digital imaging*. J Cell Sci 1996;109 (Pt 8):2101-2109.
- [109] Qian H, Sheetz MP, Elson EL. *Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems*. Biophys J 1991;60(4):910-921.
- [110] Van Craenenbroeck E, Engelborghs Y. *Fluorescence correlation spectroscopy: molecular recognition at the single molecule level*. J Mol Recognit 2000;13(2):93-100.
- [111] Magde D, Elson E, Webb WW. *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Physical Review Letters 1972;29(11):705.
- [112] Rigler R, Mets, Widengren J, Kask P. *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. European Biophysics Journal 1993;22(3):175.
- [113] Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. *Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism*. Exp Cell Res 1998;243(2):359-366.
- [114] Sommers Smith SK, Giannopoulos G. *Identification of  $\beta$ -adrenergic receptors in pulmonary alveolar type II cells*. Life Sci 1983;33(21):2071-2078.
- [115] Stern L, Kunos G. *Synergistic regulation of pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors by glucocorticoids and interleukin-1*. J Biol Chem 1988;263(31):15876-15879.
- [116] Szentendrei T, Lazar-Wesley E, Nakane T, Virmani M, Kunos G. *Selective regulation of  $\beta$ 2-adrenergic receptor gene expression by interleukin-1 in cultured human lung tumor cells*. J Cell Physiol 1992;152(3):478-485.
- [117] Dumasius V, Sznajder JI, Azzam ZS, Boja J, Mutlu GM, Maron MB, Factor P.  *$\beta$ (2)-adrenergic receptor overexpression increases alveolar fluid clearance and responsiveness to endogenous catecholamines in rats*. Circ Res 2001;89(10):907-914.
- [118] Invitrogen [Homepage] 2008. <http://www.invitrogen.com>
- [119] Hegener O, Jordan R, Häberlein H. *Benzodiazepine binding studies on living cells: application of small ligands for fluorescence correlation spectroscopy*. Biol Chem 2002;383(11):1801-1807.
- [120] Meissner O, Häberlein H. *Lateral mobility and specific binding to GABA(A) receptors on hippocampal neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy*. Biochemistry 2003;42(6):1667-1672.
- [121] Hegener O. *Untersuchungen zu Ligand-Rezeptor-Interaktionen an der Membran der lebenden Zelle unter Berücksichtigung der lateralen Mobilität* [PhD thesis]. Marburg: Philipps-Universität; 2002.

- [122] Prenner L. *Untersuchungen zum Einfluß von Inhaltsstoffen aus Hypericum perforatum L. auf das  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsystem am postsynaptischen Modell lebender Zellen* [PhD thesis]. Bonn: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität; 2006.
- [123] Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW. *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. Biophys J 1999;77(4):2251-2265.
- [124] Saxton MJ. *Lateral diffusion in an archipelago. Single-particle diffusion*. Biophys J 1993;64(6):1766-1780.
- [125] Yu JZ, Rasenick MM. *Real-time visualization of a fluorescent  $G(\alpha)(s)$ : dissociation of the activated G protein from plasma membrane*. Mol Pharmacol 2002;61(2):352-359.
- [126] El Hage T, Merlen C, Fabrega S, Authier F. *Role of receptor-mediated endocytosis, endosomal acidification and cathepsin D in cholera toxin cytotoxicity*. Febs J 2007;274(10):2614-2629.
- [127] Key TA, Bennett TA, Foutz TD, Gurevich VV, Sklar LA, Prossnitz ER. *Regulation of formyl peptide receptor agonist affinity by reconstitution with arrestins and heterotrimeric G proteins*. J Biol Chem 2001;276(52):49204-49212.
- [128] Leff P. *The two-state model of receptor activation*. Trends Pharmacol Sci 1995;16(3):89-97.
- [129] Dahan M, Levi S, Luccardini C, Rostaing P, Riveau B, Triller A. *Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking*. Science 2003;302(5644):442-445.
- [130] Smith SM, Lei Y, Liu J, Cahill ME, Hagen GM, Barisas BG, Roess DA. *Luteinizing hormone receptors translocate to plasma membrane microdomains after binding of human chorionic gonadotropin*. Endocrinology 2006;147(4):1789-1795.
- [131] de Vries B, Meurs H, Roffel AF, Elzinga CR, Hoiting BH, de Vries MM, Zaagsma J.  *$\beta$ -agonist-induced constitutive  $\beta(2)$ -adrenergic receptor activity in bovine tracheal smooth muscle*. Br J Pharmacol 2000;131(5):915-920.
- [132] Guo L, Har JY, Sankaran J, Hong Y, Kannan B, Wohland T. *Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: a comparative study*. Chemphyschem 2008;9(5):721-728.
- [133] Briddon SJ, Middleton RJ, Cordeaux Y, Flavin FM, Weinstein JA, George MW, Kellam B, Hill SJ. *Quantitative analysis of the formation and diffusion of A1-adenosine receptor-antagonist complexes in single living cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101(13):4673-4678.
- [134] Cordeaux Y, Briddon SJ, Alexander SP, Kellam B, Hill SJ. *Agonist-occupied A3 adenosine receptors exist within heterogeneous complexes in membrane microdomains of individual living cells*. Faseb J 2008;22(3):850-860.

- [135] Maier C, Runzler D, Schindelar J, Grabner G, Waldhausl W, Kohler G, Luger A. *G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane*. J Cell Sci 2005;118(Pt 15):3353-3361.
- [136] Middleton RJ, Briddon SJ, Cordeaux Y, Yates AS, Dale CL, George MW, Baker JG, Hill SJ, Kellam B. *New fluorescent adenosine A1-receptor agonists that allow quantification of ligand-receptor interactions in microdomains of single living cells*. J Med Chem 2007;50(4):782-793.
- [137] Pick H, Preuss AK, Mayer M, Wohland T, Hovius R, Vogel H. *Monitoring expression and clustering of the ionotropic 5HT3 receptor in plasma membranes of live biological cells*. Biochemistry 2003;42(4):877-884.
- [138] Pramanik A, Olsson M, Langel U, Bartfai T, Rigler R. *Fluorescence correlation spectroscopy detects galanin receptor diversity on insulinoma cells*. Biochemistry 2001;40(36):10839-10845.
- [139] Rigler R, Pramanik A, Jonasson P, Kratz G, Jansson OT, Nygren P, Stahl S, Ekberg K, Johansson B, Uhlen S, Uhlen M, Jornvall H, Wahren J. *Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(23):13318-13323.
- [140] Zhong ZH, Pramanik A, Ekberg K, Jansson OT, Jornvall H, Wahren J, Rigler R. *Insulin binding monitored by fluorescence correlation spectroscopy*. Diabetologia 2001;44(9):1184-1188.
- [141] Korklach J, Schwille P, Webb WW, Feigenson GW. *Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A 1999;96(15):8461-8466.
- [142] Schwille P, Korklach J, Webb WW. *Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes*. Cytometry 1999;36(3):176-182.
- [143] Przybylo M, Sykora J, Humpolickova J, Benda A, Zan A, Hof M. *Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions*. Langmuir 2006;22(22):9096-9099.
- [144] Lenne PF, Wawrezynieck L, Conchonaud F, Wurtz O, Boned A, Guo XJ, Rigneault H, He HT, Marguet D. *Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork*. Embo J 2006;25(14):3245-3256.
- [145] Wawrezynieck L, Rigneault H, Marguet D, Lenne PF. *Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization*. Biophys J 2005;89(6):4029-4042.
- [146] Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. *Drug-target residence time and its implications for lead optimization*. Nat Rev Drug Discov 2006;5(9):730-739.
- [147] Tummino PJ, Copeland RA. *Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function*. Biochemistry 2008;47(20):5481-5492.

## 10 Danksagung

An dieser Stelle sollen die Menschen Erwähnung finden, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. H. Häberlein für die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner engagierten Betreuung anzufertigen, seine stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und den freundschaftlichen Umgang in seiner Arbeitsgruppe.

Frau Prof. Dr. G.M. König für die freundliche Übernahme des Koreferats.

meinen Kollegen Anne Wolf, Thomas Sorkalla und Daniel Jakobs für die kollegiale Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft und gute Atmosphäre in der Arbeitsgruppe.

Dr. Lars Prenner für die nette Zusammenarbeit und die Einführung in die Fluoreszenz-korrelationspektroskopie.

allen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit. Namentlich sei hier die stete Hilfsbereitschaft von Herrn Norbert Rösel erwähnt.

Dr. Sebastian Franken für die Einführung in die molekularbiologischen Arbeitsmethoden und die äußerst hilfreichen Diskussionen. Sein andauerndes Interesse an meiner Arbeit sowie das Korrekturlesen und ganz besonders seine Freundschaft waren mir eine unermessliche Hilfe.

PD Dr. Joachim Kappler für sein großes Interesse an meiner Arbeit. Seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie seine kritischen Hinterfragungen waren äußerst hilfreich.

Prof. Dr. U. Kubitscheck für die Einführung in die Einzelmolekülmikroskopie sowie seine andauernde Diskussionsbereitschaft.

Dr. David Grünwald für die zeitintensive und geduldige Einweisung in die theoretischen und technischen Grundlagen der Einzelmolekülmikroskopie.

Tim Kaminski für das Programmieren der MatLab<sup>®</sup>-Programme und die sofortige Behebung aller in diesem Zusammenhang auftretenden Komplikationen.

Daniel und Tim für ziemlich viel Spaß und die Erkenntnis, dass alles gar nicht so schlimm ist.

meinen Eltern sowie meinen Schwestern Christina, Constanze, Nicole und Dr. Georg Boonen für Ihre liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

meinen Freunden für ihre Freundschaft.

Nils für den ganzen Rest.

## 11 Anhang

### 11.1 Publikationen

Prenner L, Sieben A, Zeller K, Weiser D, Häberlein H. *Reduction of high-affinity  $\beta$ 2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy.* Biochemistry 2007;46(17):5106-5113.

## 11.2 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Anne Sieben  
Geburtsdatum: 30.07.1977  
Geburtsort: Mönchengladbach

### Universitäre und berufliche

#### Ausbildung

05/2003-2008 Promotionsvorhaben am Institut für Physiologische Chemie der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. H. Häberlein  
07/2003 Approbation als Apothekerin  
05/2003 Drittes Staatsexamen  
11/2002-05/2003 Praktisches Jahr am Institut für Physiologische Chemie der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Häberlein  
05/2002-10/2002 Praktisches Jahr in der Max-und-Moritz-Apotheke, Mönchengladbach  
03/2002 Abschluss: Zweites Staatsexamen  
10/1997-03/2002 Studium der Pharmazie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

#### Schulische Ausbildung

06/1997 Abschluss: Abitur  
1989-1997 Bischöfliche Marienschule, Mönchengladbach  
1985-1988 Katholische Grundschule Bettrath-Hoven, Mönchengladbach