

INAUGURAL - DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Anne Lucia Katharina Unger geb. Seefeld
geboren in Offenbach

Mündliche Prüfung: 11. Juli 2014

Systemische Untersuchung der Dynamik des
Erythropoetin-Rezeptors
durch
Einzelmolekül-Verfolgung und Variabilitätsanalyse

Gutachter:

Apl. Prof. Dr. Dirk-Peter Herten

Prof. Dr. Ursula Kummer

Meinen Eltern.

Kurzfassung

Signalkaskaden basieren auf fein abgestimmte Wechselwirkungen von Proteinen und sind Basis der Regulation aller biologischen Systeme. Das Hormon Erythropoetin (Epo) fördert die Bildung roter Blutkörperchen durch Bindung an den Erythropoetinrezeptor (EpoR). Dieser wird nur in geringen Mengen an der Oberfläche von Zellen des hämatopoetischen Systems präsentiert, zeigt aber eine anpassungsfähige Reaktion auf Aktivierung durch Epo. Die Sensitivität einer Signalweiterleitung ist von der Menge an Rezeptoren an der Plasmamembran abhängig. Der EpoR zeigt auch ligandenunabhängig eine ständige Zirkulation von Rezeptoren aus dem intrazellulärem Pool an die Membran und zurück. Das System bleibt dadurch adaptiv. Alle Vorgänge sind mit dem Aufbau und der Kompartimentierung der Membran, sowie den Transportvorgängen in der Zelle verknüpft. Fluoreszenzbasierende Methoden der Mikroskopie bieten vielfältige Möglichkeiten die räumliche und zeitliche Bewegung von Rezeptoren in Zellen zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung molekularer Prozesse, die beim Epo-induzierten Signalweg eine wichtige Rolle spielen. Dazu wurde einerseits die Mobilität des Rezeptors und andererseits seine Internalisierung mit Einzelmolekülmethode untersucht. Der EpoR konnte zu diesem Zweck stöchiometrisch markiert und seine Dynamik und molekulare Interaktion in der Zellmembran auf Einzelmolekülniveau durch Einzelpartikelverfolgung beobachtet werden. Die Studien der Mobilität des EpoR in der Zellmembran konnten demonstrieren, dass aktivierte Rezeptoren eine erhöhte Neigung zur Oligomerisierung aufweisen. Die mittlere Bewegung der Rezeptorpartikel an der Membran bleibt weitestgehend unbeeinflusst vom Ligandenstimulus, doch erhöht sich der Anteil gerichteter Bewegung der Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, dass bevorzugt Zusammenlagerungen von Rezeptoren an der Membran nach Aktivierung internalisiert werden. Der interhelikale Abstand von Rezeptorhomodimeren ist ausschlaggebend für die fehlerfreie Translokation und den Rücktransport internalisierter Rezeptoren an die Membran. Der inaktive EpoR scheint mit *lipid rafts* assoziiert zu sein.

Auf einer weiteren Beobachtungsebene konnte die Kinetik des Signaltransduktionsweges und die Heterogenität der zugrundeliegenden Prozesse basierend auf zeitaufgelösten Einzelzellmessungen betrachtet werden. Dabei wurde der Rezeptortransport durch eine neue Methode analysiert, die die sich heterogen ver-

haltene Zellen durch ein zelluläres Ensemble-Modell beschreibt. Eine umfassende Modellanalyse identifizierte Recycling-, Internalisierungs- und Synthesekinetik als Ursprung zellulärer Variabilität in der Dynamik des EpoRs.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse konnten aufgrund der Verwendung einzelmolekülsensitiver Methoden mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung, erstmals zu einer genaueren Charakterisierung der Dynamik des EpoR auf Einzelmolekülebene verhelfen.

Abstract

Signalling cascades are based on fine-tuned protein interactions and form the basis for the regulation of all biological systems. The hormone Erythropoietin (Epo) stimulates the production of red blood cells by binding to the Erythropoietin receptor (EpoR). This receptor is present in small amounts at the cell surface of the hematopoietic system. The sensitivity of the signal transduction depends on the receptor quantity at the plasma membrane. The EpoR also shows a permanent, ligand-independent circulation of receptors between the intracellular pools and the membrane. As such, the system remains adaptive. All processes are linked with the membrane structure and its compartmentalisation, as well as with cellular traffic. Fluorescence microscopy methods provide various possibilities for investigating of spatial and temporal movements of receptors in living cells.

The aim of this work was the investigation of molecular processes, which play an important part in Epo-induced signalling pathways. This thesis explores the mobility of receptors, as well as their internalisation using single molecule methods. The EpoR was labeled stoichiometrically, and its dynamic and molecular interaction at the cell membrane was analysed on the single molecule level by single particle tracking. The results of the EpoR mobility analysis at the cell membrane showed that activated receptors have an increased affinity for oligomerisation. The average movement of receptor particles at the membrane generally remains unaffected by ligand stimulation, but the amount of directed receptor movements increases. It is shown that receptor clusters at the membrane were preferably internalised upon activation. The interhelical distance of receptor homodimers is critical for the correct transport and return of internalised receptors to the plasma membrane. The inactive EpoR seems to be associated with lipid rafts. On an additional level of analysis, the kinetics of the signal transduction pathway and the heterogeneity of underlying processes were considered based on time-resolved single-cell measurements. The receptor traffic was investigated with a new method, which describes cells with heterogeneous behaviour using a cellular ensemble model. Comprehensive model analysis identifies recycling, internalisation and synthesis kinetics as source of cellular variability of EpoR dynamics. With the results of this work, further insights into the EpoR dynamic on single-molecule level were obtained for the first time due to the utilisation of single-molecule sensitive methods with high spatial and temporal resolution.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Messung der Dynamik in Biomembranen	3
1.1.1 Fluoreszenz als vielseitige Messgröße	3
1.1.2 Methoden der Mikroskopie	6
1.1.3 Optionen der Fluktuationsmessung	9
1.1.4 Markierung von Biomolekülen	11
1.1.5 Membranorganisation und Rezeptor- <i>Clustering</i>	12
1.2 Aufbau und Funktion des Erythropoetin - Rezeptors	14
1.3 Mathematische Modellierung biologischer Systeme	16
1.4 Motivation	17
2 Experimente und Ergebnisse	19
2.1 Einzelmoleküluntersuchungen zur Dynamik des EpoR	19
2.1.1 Validierung der EpoR-Konstrukte	20
2.1.2 Einzelpartikelverfolgung des EpoR	22
2.1.3 Charakterisierung der Bewegungszustände des EpoR	27
2.1.4 Charakterisierung der Aktivität des EpoR	44
2.1.5 Zusammenfassung	48
2.2 Zell-zu-Zell Heterogenität des EpoR-Transports	49
2.2.1 Validierung der hergestellten stabilen Zelllinien	49
2.2.2 Bestimmung der Rezeptorbewegung zwischen Zellkompartimenten	51
2.2.3 Modell des Rezeptortransports und zelluläre Variabilität	56
2.2.4 Zusammenfassung	58
3 Diskussion	59
3.1 Anstieg der Anteile an Rezeptoroligomeren nach Aktivierung	60
3.2 Geringe Beeinflussung der Membranbewegung aktivierter Rezeptoren	61
3.3 Assoziierung der Rezeptorbewegung mit Cholesterol	62

3.4	Zelluläre Heterogenität kann durch Synthese, Internalisierung und Recycling erklärt werden	62
3.5	Zusammenfassung und Ausblick	63
4	Materialien und Methoden	65
4.1	Zelllinien und Zellkultur	65
4.1.1	Verwendete Zelllinien	65
4.1.2	Kultivierung und Passagierung der Zellen	65
4.1.3	Retrovirale Transduktion der Zellen	66
4.2	Proteinquantifizierung	67
4.3	Markierung von Proteinen	68
4.4	Mikroskopaufbau und Messung des Rezeptors	70
4.5	Datenanalyse	73
4.5.1	Analyse der Einzelmoleküldaten	73
4.5.2	Analyse der Einzelzellaten	75
A	Analyse der Bewegungsformen	77
	Abkürzungsverzeichnis	80
	Danksagung	84
	Literatur	100
	Eidesstattliche Versicherung	100

Abbildungsverzeichnis

1.1	Franck-Condon-Prinzip und Jablonski-Diagramm	4
1.2	Ausleuchtungsschemata von Weitfeld und TIRF	7
1.3	Prinzip der FCS-Messung	10
1.4	Elektronenmikroskopisches Bild des Membranzytoskeletts	13
1.5	Aufbau des Erythropoetin-Rezeptors	14
1.6	Schematische Darstellung der Erythropoese	15
2.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von markiertem EpoR-wt	21
2.2	Effizienz der HaloTag Markierung	21
2.3	Detektion von SiR-Halo Molekülen durch TIRFM	23
2.4	Intensitätsverteilung des EpoR-wt	24
2.5	Intensitätsverteilung des EpoR-T243N	25
2.6	Detektion und Verfolgung von SiR-Halo markierte EpoR-Partikeln durch TIRFM	27
2.7	Bewegungstypen des EpoR in gehungerten Zellen	29
2.8	Relative Änderung der Bewegungstypen nach Stimulation	30
2.9	Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten der EpoR-wt Partikel	32
2.10	Anteile der Bewegungsklassen für Diffusionskoeffizienten des EpoR- wt	33
2.11	Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten der EpoR-T243N Partikel	34
2.12	Anteile der Bewegungsklassen für Diffusionskoeffizienten des EpoR- T243N	35
2.13	Häufigkeitsverteilung der Intensitäten der EpoR-wt Partikel	38
2.14	Anteile der Bewegungsklassen an Intensitäten von EpoR-wt Partikeln	39
2.15	Häufigkeitsverteilung der Intensitäten der EpoR-T243N Partikel	40
2.16	Anteile der Bewegungsklassen an Intensitäten von EpoR-T243N Partikeln	41
2.17	Verteilung der Fluoreszenzintensität gegen die Diffusion für EpoR-wt	42
2.18	Verteilung der Fluoreszenzintensität gegen die Diffusion für EpoR- T243N	43
2.19	Bewegungstypen des EpoR in Zellen	45

2.20	TIRFM Bild der Wechselwirkung des EpoR mit dem Aktinzytoskelett	46
2.21	Relative Änderung der Bewegungstypen nach Behandlung mit Inhibitoren	47
2.22	STAT5-Aktivierung in EpoR-GFP und MyrPalm-mCherry exprimierenden H838 Klonen	50
2.23	Internalisierung von EpoR-GFP und EpoCy-5.5 in H838-Zellen . .	51
2.24	Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Zellkompartimenten . . .	52
2.25	Syntheserate des EpoR	54
2.26	Degradationsrate des EpoR	55
2.27	Modell des EpoR Transports	57
4.1	Struktur des SiR-Halo und Bildung des Spirolacton	69
4.2	Messaufbau des TIRF-Mikroskops	71
4.3	<i>Moment Scaling Spectrum</i> -Analyse	74
A.1	Verteilung der Steigung des <i>Moment Scaling Spectrum</i> für EpoR-wt	78
A.2	Verteilung der Steigung des <i>Moment Scaling Spectrum</i> für EpoR-T243N	79

Tabellenverzeichnis

2.1	Anzahl der Trajektorien	26
2.2	Diffusionskoeffizienten der Rezeptorpartikel vor und nach Stimulation	28
2.3	Diffusionskoeffizienten nach Behandlung mit Inhibitoren	47
4.1	Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE	68

Kapitel 1

Einleitung

Mit 1,8 Millionen neu diagnostizierten Erkrankungen im Jahr 2012 ist Lungenkrebs einer der häufigsten Krebserkrankungen weltweit [GLSL12]. Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (*non small cell lung carcinoma*, NSCLC) hat daran den größten Anteil [PAG⁺12]. Die Diagnose erfolgt häufig erst in späten Stadien der Erkrankung und Patienten werden daraufhin mit Chemotherapie behandelt, welche aber aufgrund von Nieren- und Knochenmarksschädigungen, neben dem Krebs selbst, zur Entwicklung von Blutarmut führt. Diese wurde bislang mit dem Hormon Erythropoetin (Epo) behandelt, welches die Bildung von roten Blutkörperchen fördert. Allerdings konnte die Therapie mit Epo mit erhöhtem Tumorstadium und damit niedrigerer Überlebensrate in Verbindung gebracht werden [ES12]. Die Signaltransduktion, die von Epo in Adenokarzinomzellen ausgelöst wird, ist daher Gegenstand andauernder Untersuchungen und Motivation dieser Arbeit.

Signaltransduktionsprozesse werden durch spezifische Proteininteraktionen an der Plasmamembran eingeleitet. Die zelluläre Antwort wird durch die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor ausgelöst, welcher aktiviert wird und den externen Stimulus durch Signalwege an Proteine im Zellinneren weiterleitet. Die Umverteilung von Rezeptoren und deren *Cluster*-Bildung stellen in vielen Signalwegen Schlüsselschritte dar [MSA⁺07, NML⁺10, PMZ⁺04]. Klassische molekularbiologische oder biochemische Methoden lieferten bislang lediglich über die Zellpopulation gemittelte Daten. Darüber hinaus kann keine Aussage über die absolute Zahl der beteiligten Moleküle getroffen werden, da diese mit den gängigen Techniken aufgrund geringer Sensitivität nicht ermittelt werden kann. Im letzten Jahrzehnt wurde eine Fülle von fluoreszenzbasierten Mikroskopietechniken neuentwickelt oder erweitert, was es heute ermöglicht molekulare Mechanismen in einzelnen Zellen unter verschiedensten Aspekten zu untersuchen [LW09]. Detaillierte Informationen über die räumliche und zeitliche Dynamik von Membranrezeptoren und über die Mechanismen die Rezeptor-*Clustering* verursachen, können hierbei deren Beobachtung in Echtzeit auf Einzelmolekülebene liefern. Durch Techniken der Einzelmolekül-Mikroskopie ist es nicht nur möglich, Pro-

teininteraktionen über das Fluoreszenzsignal zu untersuchen, sondern auch deren Bewegung und Stöchiometrie zu bestimmen [JKT⁺11, MCL⁺13]. Bedingungen, um diese Parameter zu erhalten, schließen die Wahl geeigneter Fluoreszenzfarbstoffe und einen möglichst stöchiometrischen Markierungsgrad der zu beobachteten Proteine, sowie ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, hohe Aufnahmefrequenzen und eine minimal-invasive Markierungsmethode ein. Häufig werden zu diesem Zweck fluoreszente Fusionsproteine eingesetzt [SMY00]. Diese sind zwar kovalent durch Peptidbindung mit dem Rezeptor verbunden, benötigen aber eine gewisse Zeit zur Faltung in den fluoreszenten Zustand, falls diese überhaupt vollendet wird. Zudem zeigen sie eine geringere Photostabilität als organische Fluoreszenzfarbstoffe. Alternativ stehen mittlerweile eine ganze Reihe von sogenannten *Tags* zur Verfügung, die auf Protein-Liganden-Interaktion [KGG⁺03, MCSC05, GSHV07, GJH⁺08], Metallchelatabildung [Gri98, LGTP06] oder auf enzymatischen Reaktionen [CHLT05, HCG⁺06, PAG⁺07] basieren. In dieser Arbeit wurde durch Einzelmolekülverfolgung des Erythropoetin-Rezeptors (EpoR) untersucht, wie dieser durch Ligandenstimulation in seiner Bewegung beeinflusst wird und welche Komponenten der Zellmembran dafür verantwortlich gemacht werden können. Dabei war der EpoR über den sogenannten HaloTag kovalent an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden.

Neben der zeitlichen und räumlichen Verteilung von Signalmolekülen in zellulärer Umgebung konnte festgestellt werden, dass auch die Zell-zu-Zell Variabilität einen wichtigen Anteil an der Zellantwort inne hat. Es ist bekannt, dass die Proteinkonzentration in Zellen innerhalb einer Population heterogen verteilt ist, was auf stochastische Genexpression zurückgeführt werden kann [RvO08, CFX06]. Damit zeigen Zellen auch ein heterogenes Verhalten in der Signalweiterleitung und -antwort. In Kapitel 2.2 wurde durch quantitative Einzelzellmessungen untersucht, welche Prozesse im Transport des EpoRs und seinem Liganden Epo für zelluläre Variabilität verantwortlich sind. Mathematische Modelle können anhand von zeitaufgelösten, quantitativen Daten, Aussagen über Kontrollmechanismen eines Signalweges und über experimentell nicht greifbare Parameter treffen. Durch die Anwendung von Ensemblemodellen auf Einzelzelldaten der zellulären Variabilität der Dynamik des EpoR Transports lassen sich Schlüsselregulatoren, die zu dieser Heterogenität führen, identifizieren, zugrundeliegende neue Mechanismen erkennen und dadurch das Potential schaffen, neue Therapieformen zu entwickeln.

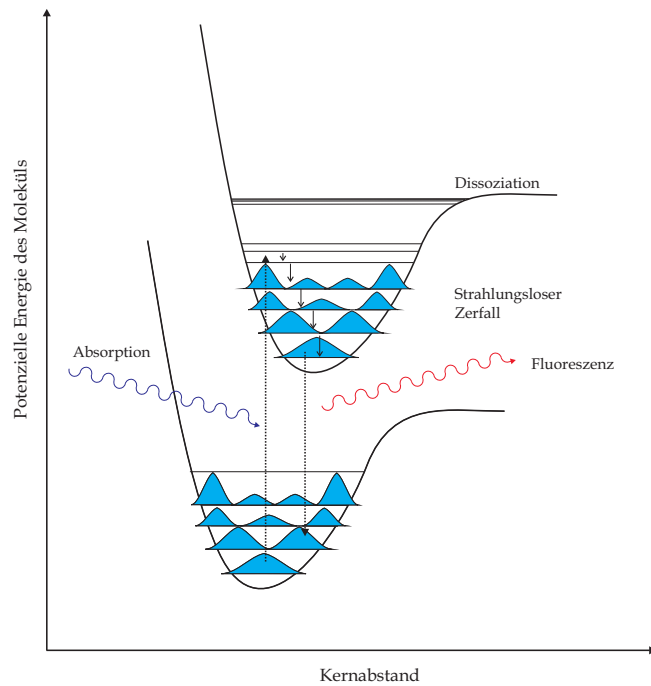
Die folgenden Kapitel dienen der Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie, ferner werden die im Kapitel 2.1 und 2.2 verwendete Techniken beschrieben. Anschließend wird eine kurze Übersicht über den Stand der Forschung bildgebender Verfahren dynamischer Prozesse gegeben und geeignete, sowie verwendete Methoden zur Messung und Markierung biologischer Proben aufgezeigt. Die Passage schließt mit der Darstellung des molekularbiologische Hintergrunds der zu untersuchenden Proben und der in Kapitel 2.2 verwendeten mathematischen Betrachtungen biologischer Systeme.

1.1 Messung der Dynamik in Biomembranen

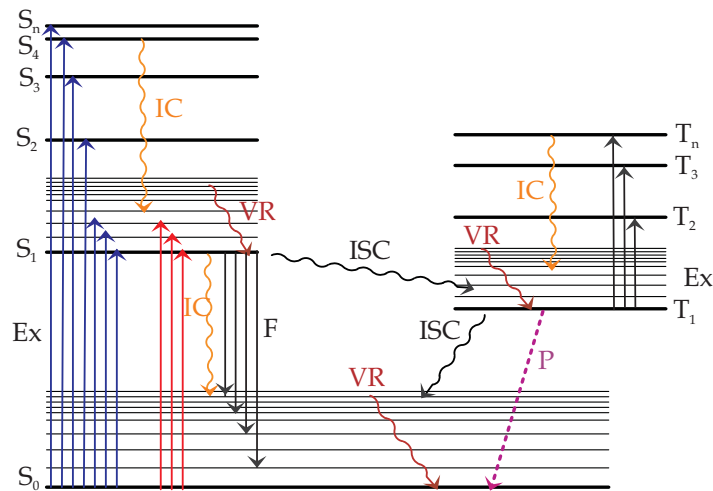
1.1.1 Fluoreszenz als vielseitige Messgröße

Als Fluoreszenz bezeichnet man die spontane Emission von Licht, welche im Spektralbereich vom Ultravioletten bis zum nahen Infrarot zu beobachten ist, bei der Energie aus elektronisch angeregten Quantenzuständen freigesetzt wird. Entsprechend bezeichnet die Farbstoffabsorption den Vorgang bei dem der betrachtete Chromophor ein Photon aufnimmt. Der Absorptionsvorgang bei Farbstoffen im sichtbaren Spektralbereich verkörpert einen elektronischen Übergang mit einem Energiebetrag von 2 bis 3 eV, was circa 16000 cm^{-1} bis 24000 cm^{-1} entspricht. Am Chromophor wird ausgehend von einem Schwingungsniveau im elektronischen Grundzustandes S_0 ein Schwingungsniveau im ersten angeregten Zustand S_1 besetzt. Die Wahrscheinlichkeit der Photonenabsorption durch den Chromophor steigt durch die Nutzung heller Lichtquellen mit genügend hohem Photonen- und Energiefluss, wie es durch Dauerstrich- oder ultrakurz gepulste Laser Anwendung findet. Ein Elektron, das sich in einem HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) auf dem S_0 -Niveau befand, tritt nach Anregung in ein LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) auf dem S_1 -Niveau über (Franck-Condon-Niveau). Thermische Übergänge vom S_0 - in das S_1 -Niveau sind bei Raumtemperatur vernachlässigbar, wie aus der Boltzmannverteilung mit einem Anteil $< 10^{-30}$ verdeutlicht wird. Bei elektronischen Übergängen, welche sehr schnell in einem Zeitrahmen von Femto- bis Attosekunden ablaufen, gilt das Franck-Condon-Prinzip. Dieses Prinzip besagt, dass bei schnellen Übergängen die Kernbewegung, welche aufgrund der großen Masse der Kerne langsam abläuft, vernachlässigt werden kann. Das bedeutet, dass elektronische Übergänge in einem Potentialdiagramm stets vertikal verlaufen und sich die Molekülstruktur während eines solchen Übergangs nicht ändert.

Dieses Verhalten wird in einem Potentialdiagramm in Abbildung 1.1(a) mit einem senkrecht nach oben verlaufender Anregungsübergang dargestellt, welcher in ein schwingungsangeregtes S_1 -Niveau führt, das dabei über einen vergrößerten Gleichgewichtsabstand r_{gt} verfügt.



(a) Franck-Condon-Prinzip



(b) Jablonski-Diagramm

Abbildung 1.1: (a) Potentialkurven des Grund- und des ersten angeregten Zustands eines zweiatomigen Moleküls mit Schwingungsniveaus und den Wellenfunktionen Ψ nach Boltzmann. (b) Jablonski-Schema für elektronische Übergänge: IC: internal conversion, strahlungslose Desaktivierung, ISC: intersystem crossing, Übergang mit verbotener Spinumkehr, VR: vibrational relaxation, Schwingungsrelaxation, Ex: Excitation, Anregung, F: Fluoreszenz, P: Phosphoreszenz, S_x : Singulettzustände, T_x : Triplettzustände.

Nach dem Bohr'schen Postulat sind nur Energie-Übergänge aus einem Vielfachen des Planck'schen Wirkungsquantums h zulässig:

$$\Delta E = h \cdot \nu, \quad \text{mit } h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \quad (1.1)$$

Elektronische Zustände in Chromophoren spalten sich in Schwingungs- und Rotationsniveaus auf, wobei die letzteren in gelösten, adsorbierten oder kovalent gebundenen Farbstoffen eingeschränkt sein können. Farbstoffmoleküle sind zu den benachbarten Molekülen in Lösung unterschiedlich ausgerichtet. Dadurch weichen ihre Energieniveaus geringfügig voneinander ab. Die daraus resultierenden, energetisch benachbarten Übergänge finden sich als überlagerte breite Absorptionsbanden im Farbstoffspektrum wieder.

Indessen müssen bei quantitativen Fluoreszenzmessungen Streueffekte beachtet werden. Insbesondere bei kleineren Anregungswellenlängen im UV treten Streueffekte, bedingt durch die Zunahme der Rayleigh-Streuung mit der vierten Potenz der Wellenzahl, verstärkt in Erscheinung.

Im Grundzustand S_0 befindet sich ein Chromophor mit den umgebenden Lösungsmittelmolekülen im thermischen Gleichgewicht. Durch Absorption eines Photons wird dieses innerhalb von 10^{-15} s in den S_1 -Zustand überführt. Nach dem Franck-Condon-Prinzip ändert sich dabei nur die Elektronenverteilung, dagegen sind die Kernbewegungen wesentlich langsamer [Con28]. Ebenso rasch werden die Elektronenverteilungen der gegebenen Umgebung polarisiert und zusätzlich ändert sich das Dipolmoment. Nach einem Absorptionsvorgang wird mittels *internal conversion* (IC) ein Teil der absorbierten Energie intern verteilt bis der Schwingungsgrundzustand auf dem S_1 -Niveau erreicht ist; dieser Vorgang benötigt circa 10^{-12} s .

Zur Darstellung der möglichen Übergänge innerhalb der elektronischen Anregungsniveaus mit den gekoppelten vibronischen Moden bietet das Jablonski-Diagramm in Abbildung 1.1(b) einen schematischen Überblick.

Beim Übergang mit verbotener Spinumkehr (*intersystem crossing*, ISC) zum Triplettzustand ändert sich die Spinmultiplizität. Der Übergang in den energetisch tiefer liegenden Triplettzustand ist spinverboten und weist daher eine kleinere Übergangsrate auf, obwohl der T_1 -Zustand energetisch dem S_1 -Zustand benachbart ist. Besetzt der Chromophor den Triplettzustand (T_1), bleibt er relativ lange, über mehrere Mikrosekunden, im T_1 -Zustand, da der Übergang in den Grundzustand (S_0) gleichfalls nicht erlaubt ist. Von T_1 sind strahlungslose Relaxationen (IC) möglich oder ein Photon wird als Phosphoreszenzstrahlung emittiert. Phosphoreszenz tritt überwiegend in Festkörpern auf, da in flüssigen Phasen durch die lange Lebensdauer des T_1 -Zustandes eine Energieabgabe durch Stoßrelaxation wahrscheinlicher wird. Zusätzlich können Schwingungsmoden durch Stöße mit Nachbarmolekülen auf diese übertragen werden, was als Schwingungsrelaxation (*vibrational relaxation*) bezeichnet wird [Kas52]. Fluoreszenzfarbstoffe sind nach der Anregung in der Lage mit merklicher Quantenausbeute Photonen

wieder bei normalerweise niedrigerer Quantenenergie (*Stokes-Shift*) zu emittieren. Im Falle der Fluoreszenz wird beim Übergang $S_1 \rightarrow S_0$ ein Photon emittiert. Der Spin-erlaubte Übergang wird in Lösung spontan ablaufen, soweit keine externe Emission einen Übergang stimuliert und keine reflektierenden, dielektrischen oder metallischen Grenzflächen mit hohen Brechungsindexunterschieden in unmittelbarer Nähe des Fluorophors vorliegen [Dre74]. Wegen des Energieverlustes durch Schwingungsrelaxation findet die Emission gegenüber der Anregung rotverschoben statt, der sogenannte *Stokes-Shift*. Das angeregte Molekül kann neben den bereits angesprochenen Prozessen auch durch intramolekularer Ladungsübertragung, Konformationsänderungen, Exiplex- oder Eximerbildung oder Energietransfer in den Grundzustand gelangen. Die Art der Wechselwirkung hängt stark von den Eigenschaften des S_1 -Zustands, sowie dessen Umgebung, ab. Die typischen Eigenschaften des Fluoreszenzsignals Fluoreszenzlebensdauer τ_{fl} , -quantenausbeute Φ_{fl} und das -spektrum λ_{fl} werden durch diese unterschiedlichen Abklingverhalten beeinflusst und lassen dadurch Rückschlüsse auf die Umgebung des Chromophors zu. Unter anderem macht man sich diesen Zusammenhang bei der Einzelmolekül-Fluoreszenz-Mikroskopie zu nutze.

1.1.2 Methoden der Mikroskopie

Die Entwicklung des Mikroskops ist hauptsächlich mit zwei Namen assoziiert: Robert Hooke und Antonie van Leeuwenhoek. Robert Hooke beschrieb sein einfaches *Micrographia*, neben ersten Beobachtungen einer Korkzelle durch selbiges im Jahre 1665 in einem Buch, was die erste Publikation über ein Mikroskop darstellt. Etwa zur derselben Zeit baute van Leeuwenhoek mehr als 500 einfache Mikroskope, die lediglich aus einer einfachen Linse bestehen. Erst durch die Entwicklung achromatischer Linsen Anfang des 19. Jahrhunderts wurde es möglich, das heute bekannte Lichtmikroskop zu bauen. 1873 konnte Ernst Abbe die theoretischen Grundlagen der optischen Mikroskopie durch seine Beschreibung der Auflösungsgrenzen von Linsen schaffen [Abb73]. Im Wesentlichen zeigte er, dass Licht, welches von einer Punktquelle stammt, nur bis zu einem Volumen der lateralen und axialen Ausdehnung der Halbwertsbreite (engl. *full width half maximum*, FWHM) der Punktabbildungsfunktion (engl. *point spread function*, PSF) fokussiert werden kann. Die bekannte oft genutzte Beziehung zur Beugungsgrenze lautet:

$$d_{x,y} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\alpha)} \quad (1.2)$$

$$d_z = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin(\frac{\alpha}{2})^2} \quad (1.3)$$

wobei λ die Wellenlänge, n der Brechungsindex des Immersionsmediums und α der halbe Öffnungswinkel des maximal passierbaren Lichtkegels der Objektivlinse ist. Dabei ist $n \cdot \sin(\alpha)$ die numerische Apertur einer Linse (NA), welche

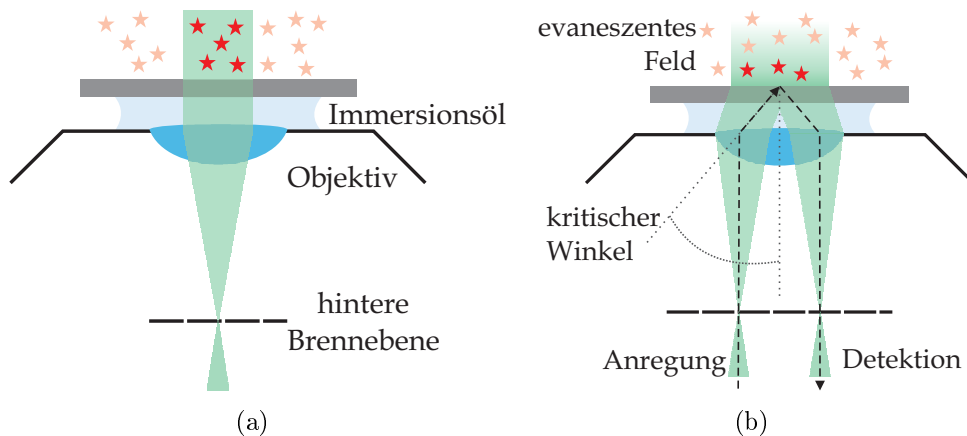


Abbildung 1.2: Verschiedene Ausleuchtungsschemata eines (a) Weitfeldmikroskops und eines (b) TIRFM

einen Wert von bis zu 1,65 erreichen kann. Passiert Licht also eine Linse im Mikroskop entsteht ein kleines, kreisförmiges Beugungsmuster, im Durchmesser die sogenannte *Airy-Scheibe* (engl. *airy-disk*,) der PSF, dessen Radius durch u.a. die optischen Elemente bestimmt ist. Diese beugungsbedingte Ausdehnung benachbarter Punktquellen können sich überlagern und bestimmen damit die Auflösung des optischen Systems. Nach dem *Rayleigh-Kriterium*, in etwa gleichbedeutend mit dem Ansatz von Abbe (0,61 bzw. 0,5), gelten solche Emitter als aufgelöst deren Mittelpunkte (Maxima) der *Airy-Scheibe* gerade nicht mehr auf dem ersten Minima des jeweils anderen liegen (Gleichung 1.5) [Hec05].

In der **Weitfeldmikroskopie** wird eine ausgedehnte Ausleuchtung der Probe durch monochromatisches Licht erzeugt, welches auf die hintere Brennebene des Objektivs fokussiert ist (Abb. 1.2(a)). Die Sammlung des Fluoreszenzsignals der Probe erfolgt durch ein Objektiv mit hoher NA und wird durch einen dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht getrennt. Das Fluoreszenzsignal kann durch eine CCD-Kamera (ladungsgekoppeltes Bauteil, *charged-coupled device*) detektiert werden. Um beispielsweise zelluläre Proben auf Einzelmolekül-Niveau zu beobachten, ist diese Form der Ausleuchtung allerdings wenig geeignet, da durch die weite Ausleuchtung eine hohe zu detektierende Schichtdicke entsteht, die in kontrastarmen Bildern mit hohem Hintergrundsignal resultiert. Schräg einfallendes Anregungslicht kann das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessern.

Umgesetzt wurde dies vor rund 30 Jahren durch Daniel Axelrod *et al.* mit der **Internen Totalreflexionsmikroskopie (TIRFM)** [Axe81, Axe03, Axe08]. Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Objektiv-basierendem TIRFM [SGAS00] gelangt Anregungslicht, wie im Weitfeldmikroskop, orthogonal zur hinteren Brennebene des Objektivs aus selbigem, aber nicht aus dem Zentrum, sondern relativ dazu verschoben, aus der Peripherie des Objektivs. Dabei wird ein evaneszentes Feld durch totale Reflexion des Laserlichts an der Grenzfläche zwi-

schen Deckglas ($n_g = 1,523$) und Probe ($n_{Wasser} = 1,33$) aufgrund deren unterschiedlichen Brechungskoeffizienten erzeugt. Dem *Snelliusschem Gesetz* folgend knickt der Laserstrahl beim Eintreten in die wässrige Probe mit niedrigerem Brechungsindex ($n_g > n_w$) als Glas von der Normalen weg [Hec05] :

$$\sin(\theta_T) = \frac{n_{gl} \cdot \sin(\theta_E)}{n_p} \quad (1.4)$$

Totale Reflexion tritt ein, sobald der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel θ_G ist ($\theta_E > \theta_G$). Das Anregungslicht verläuft parallel zur Grenzfläche, wenn $\theta_E = \theta_G$ gilt, und erzeugt das evaneszente Feld mit einer Ausdehnung bis zu 100 nm über der Grenzfläche und mit einer exponentiell abfallenden Anregungsleistung mit der Entfernung zum Deckglas (1.2(b)). Weiterführende Betrachtungen zur klassischen Strahlenoptik bezüglich TIR sind in Kapitel 4 von [Hec05] zu finden. Das Konzept des TIRMs wurde aufgrund des reduzierten Hintergrundsignals und des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses bereits 1994 zur Einzelmoleküldetektion eingesetzt [FHM⁺94].

Im Gegensatz zur Weitfeldmikroskopie werden im **konfokalen Mikroskop** nur Photonen, die aus Bereich der Fokusebene stammen, durch eine Lochblende und damit auch weniger Streulicht detektiert. Durch die Lochblende werden punktförmige Anregungs- und Detektion-PSFs mit dem gleichen konfokalen Volumen erzeugt (weitere Beschreibung zur Bildentstehung finden sich unter [SC77]). Der ideale Durchmesser der Lochblende, ein Kompromiss zwischen Signalstärke und Auflösung, ist bestimmt durch $D_{Lochblende} = M_{Objektiv} \cdot M_{Scankopf} \cdot 2R_{lateral}$, wobei

$$R_{lateral} = \frac{1}{2}AU = \frac{0,61\lambda_{ex}}{NA}, \quad (1.5)$$

$M_{Objektiv}$ und $M_{Scankopf}$ jeweils die Vergrößerung des Objektivs bzw. des Scankopfes, AU die Einheit der *airy*-Scheibe (engl. *airy unit*), $R_{lateral}$ die laterale Auflösung des konfokalen Systems mit minimal 300 nm (bis zu 600 nm axial) und λ_{ex} die Anregungswellenlänge darstellt. Beim *Confocal laser scanning* Mikroskop (CLSM) rastert das konfokale Volumen mit Hilfe eines motorisierten Spiegels die Probe linienweise ab und erzeugt so optische Schnittbilder der Probe. Je nach Frequenz und Anzahl der Pixel kann es aufgrund des mechanischen Abrasterns durch Piezo-betriebene Spiegel Sekunden dauern bis ein komplettes Bild aufgenommen wird. Das Signal wird mittels *Photo Multiplier Tubes* (PMT) oder *Avalanche Photo Dioden* (APD) detektiert. Dies wurde durch eine alternative Methode der Rasterung beim sogenannten **Spinning Disk-Mikroskop** verbessert. Hier wird das konfokale Volumen nicht durch eine einzige Lochblende erzeugt. Vielmehr werden durch bis zu 1000 Lochblenden, die in Bögen auf einer routierenden *Nipkow*-Scheibe angeordnet sind, eine ganze Reihe von konfokalen Volumina generiert [PHEG68]. Die Erweiterung durch eine zweite Scheibe mit gleichförmig angeordneten Mikrolinsen hat den Vorteil, das sie das Anregungs-

licht genau auf die einzelnen Lochblenden der *Nipkow*-Scheibe und dadurch zu einer erhöhten Anregungsleistung durch den kollimierten Laser und reduziertem Streulicht führt [II02]. Es wird eine Bildrate von mehr als $30 \frac{frs}{s}$ erreicht. Damit ist es möglich biologische Spezies mit geringerer Phototoxizität zu untersuchen. Die Detektion erfolgte über eine *Charge Coupled Device*- (CCD-) Kamera.

1.1.3 Optionen der Fluktuationsmessung

Bislang wurden Rezeptor-Liganden-Interaktionen mit molekularbiologische sowie biochemische Techniken oder biophysikalischen Methoden, wie Fluoreszenzregeneration nach Photozerstörung (FRAP) [SWK⁺07] oder Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) [WWK⁺11] untersucht. Biophysikalische Methoden haben gegenüber molekularbiologischen und biochemischen Techniken den Vorteil, dass die Wechselwirkung auf molekularer Ebene in funktionsfähigen Zellen beobachtet werden kann. Die zeitliche Information die durch das Fluoreszenzsignal bereit gestellt wird, lässt sich in vielerlei Hinsicht nutzen. Zwar haben Techniken, wie FRAP [RN01] und FCS [LSSK01], wesentlich zur Aufklärung von Proteinwechselwirkungen beigetragen, doch basieren erhaltene Daten auf Mittelwertbildung in Ensemblemessungen. Im Unterschied dazu ist es mit Einzel-Partikelverfolgung möglich, quantitativ und in Echtzeit einzelne Partikel zu verfolgen [Sax08].

Mit **Fluoreszenzregeneration nach Photozerstörung** oder *Fluorescence recovery after photobleaching* (**FRAP**) lassen sich die zweidimensionalen Molekülbewegungen in künstlichen oder Zellmembranen über den Diffusionskoeffizient charakterisieren [LSSK01]. Dazu wird ein Bereich der Membran irreversibel durch einen Laserpuls gebleicht und das wiederkehrende Fluoreszenzsignal detektiert. Dieses stammt von unbestrahlter Membran der Umgebung, die in den Bleichpunkt diffundieren, womit die Rate an wiederkehrender Fluoreszenz mit der Zeit beobachtet werden kann. Durch diese Rate kann der Diffusionskoeffizient der beweglichen Moleküle bestimmt werden. Da nur die Fluoreszenz mobiler Partikel wiederaufkommt, kann aus der Differenz zwischen ursprünglich vorhandener und wiederkehrender Fluoreszenzintensität, außerdem der Anteil unbeweglicher Partikel bestimmt werden. Der Diffusionskoeffizient berechnet sich aus dem Zeitpunkt t_D , an dem die Hälfte Intensität des wiederkehrenden Fluoreszenzsignals erreicht ist und aus dem Radius des fokussierten Laserstrahls ω mit

$$D = \frac{\omega^2 \gamma}{4t_D}. \quad (1.6)$$

Der Korrekturfaktor γ in Gleichung 1.7 berücksichtigt die verwendete Intensität und Strahlengeometrie des Lasers. Komplexere Analyse der zeitabhängigen Regeneration des Fluoreszenzsignals können Informationen über die Bindung und Interaktion von Molekülen liefern.

Auch **Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie** macht es möglich die Dif-

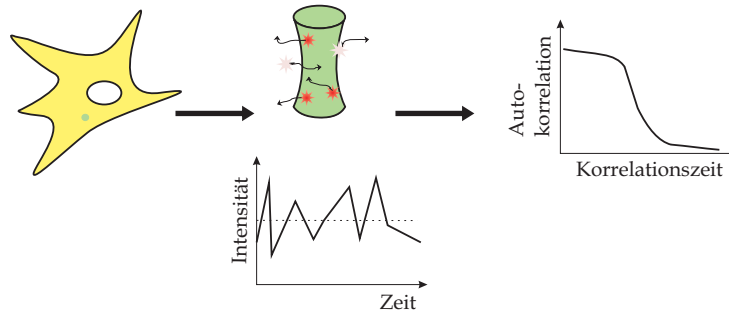


Abbildung 1.3: Prinzip der FCS-Messung. Ein fokussierter Laser erzeugt ein 1 fl großes fokales Volumen durch das die fluoreszenten Partikel diffundieren. Durch FCS kann die Fluoreszenzfluktuation dieser Partikeln zeitabhängig bestimmt werden.

fusion fluoreszenzmarkierter Molekülen in der Membran zu bestimmen [WWK⁺11, KHS07, MOS11]. Hier wird die Fluoreszenzfluktuation $\delta F(t)$ um eine zeitlich gemittelte Fluoreszenzintensität $\langle F(t) \rangle$ gemessen, die fluoreszente Moleküle bei der Diffusion durch ein konfokales Volumen emittieren (Abb. 1.3). Die Fluktuation des Fluoreszenzsignals stammt für gewöhnlich von der Änderung der Partikelanzahl im fokalen Volumen. Um diese Fluktuationen auszuwerten wird die Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen der Fluoreszenzintensität durch

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle} \quad (1.7)$$

berechnet, wobei τ die Korrelationszeit ist. Die Autokorrelationsfunktion ist ein Maß für die Selbstähnlichkeit der Fluoreszenzintensität über die Zeit und strebt daher für lange Zeitdifferenzen gegen null, wobei sich schnell bewegende Partikel bei kurzen Korrelationszeiten zur Amplitude der Kurve beitragen. Die Diffusionszeit kann aus Gleichung 1.7 berechnet werden. Wie bei dem Analogon *Image correlation spectroscopy* [SMG⁺09] werden hier Mittelwerte über das gesamte System betrachtet.

Einzelpartikelverfolgung oder *Single Particle Tracking (SPT)* ist eine quantitative Analysemethode zur Untersuchung von zellulären Dynamiken aus Zeitrafferexperimenten, die im Weitfeld oder TIRFM aufgenommen wurden. SPT erkennt einzelne Partikel und verfolgt deren Bewegung über die Zeit. Wobei ein „Partikel“ jegliches zu untersuchendes Objekt, vom einzelnen Molekül bis zu einem makromolekularen Komplex sein kann, an dem selektiv ein in der Regel fluoreszentes Signalmolekül bindet. Bewegungstrajektorien und Diffusionskoeffizienten von einzelnen Partikeln können mit Hilfe von Verfolgungsalgorithmen bestimmt werden, was voraussetzt, dass die Partikel in jedem Bild eines Videos erkannt und in einem zweiten Schritt die korrespondierenden Partikel Bild für

Bild miteinander verknüpft werden können. Neben dem mittleren Diffusionskoeffizienten lassen sich auch Klassen von Partikel bestimmen, die gewissen Bewegungsmustern folgen. Der Algorithmus spielt also eine zentrale Rolle, da dieser die Genauigkeit und Effizienz der Technik erhöhen, ihr aber auch gleichzeitig Grenzen setzt. Gegenwärtig gibt es eine Fülle von Programmen zu diesem Zweck, die aber alle aus den zwei Schritten Detektion und Verknüpfung bestehen [CSdC⁺14]. Die Genauigkeit dieser Programme hängt auch von der Qualität der zugrunde liegenden Daten ab, wie beispielsweise hohe Dichte, Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Bewegungsheterogenitäten der Partikel sowie Verschmelzen oder Teilen von Partikeln [JLM⁺08]. Der Partikelverfolgungsalgorithmus, der in Kapitel 2.1 Verwendung fand, betrachtet das Verbinden von Partikeln als lineares Zuordnungsproblem und vermag es Lücken in einer Partikeltrajektorie durch Optimierung der Kostenfunktion zu schließen [JLM⁺08] (siehe Kapitel 4.5).

1.1.4 Markierung von Biomolekülen

Wie bereits eingangs erwähnt, ist es für einzelmolekülspektroskopische Untersuchungen wünschenswert, dass die Fluoreszenzmarkierung im stöchiometrischen Verhältnis an das zu untersuchende Protein (*protein of interest*, POI) bindet. Außerdem sind eine hohe Quantenausbeute und eine geringe Größe, sowie hohe Photostabilität von Vorteil. Zur Verfolgung von Proteinen in lebenden Zellen werden häufig fluoreszente (FP) sowie photoaktivierbare Proteine eingesetzt [DD09]. Die Herstellung eines Fusionsproteins aus FP und zu untersuchendem POI erlaubt es, das Protein in Raum und Zeit zu verfolgen. Ihren großen Erfolg verdanken FPs ihrer kompakten Struktur; die Proteine sind circa 240 Aminosäuren lang, was circa 27 *kDa* entspricht, und bilden ein Fass aus einem 11-strängiges β -Faltblatt [CMLL10]. Im Zentrum befindet sich eine Helix aus drei Aminosäuren, die das Chromophor bilden. Im Falle des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) geschieht dies durch Zyklisierung und Oxidation der Reste *Ser*₆₅–*Tyr*₆₆–*Gly*₆₇ [OCK⁺96]. Das umgebende Faltblatt schirmt die Helix von der Umgebung ab, bewahrt es vor Denaturierung und schafft ein Milieu, indem es fähig ist zu fluoreszieren. Durch zielgerichtete Mutagenese der das Chromophor umgebende Aminosäuren konnten die spektralen Eigenschaften der FPs stark variiert werden, sowie Photoumwandlung ermöglichen [SST05]. Gegenwärtig ist eine ganze Fülle von FPs mit unterschiedlichen Emissions- und Extinktionsspektren, pH-Sensitivität, Helligkeit, und photophysikalischen Eigenschaften, sowie schnellerer Reifungszeit verfügbar [DD09]. Neben den spektralen Eigenschaften ist wichtig, dass die Umgebung dem pK_a des FPs entspricht. Für einige FPs konnte gezeigt werden, dass diese pH abhängig in ihrer Fluoreszenz gelöscht werden, beispielsweise zum in zellulären Organellen mit einem pH-Wert unter 0,5 [SST05].

Alternativ stehen mittlerweile eine ganze Reihe von sogenannten *Tags* zur Verfügung, die auf Protein-Liganden-Interaktion [KGG⁺03, MCSC05, GSHV07, GJH⁺08], Metallchelatbildung [Gri98, LGTP06] oder auf enzymatischen Reaktio-

nen [CHLT05, HCG⁺06, PAG⁺07] basieren. Sie haben den großen Vorteil organische Farbstoffe, welche eine hohe Quantenausbeute und Photostabilität zeigen, mit Proteinen verbinden zu können. Das erste Protein, das zur Katalyse einer kovalenten Bindung eines Fluorophors an ein Protein in einer Zelle verwendet wurde, war das 20-kDa große humane DNA-Reperaturprotein *O*⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT oder SNAP-tag) [JGK⁺03, KGG⁺03]. Das Protein katalysiert die Reaktion eines *O*⁶-Alkyl- oder *O*⁶-Benzylguanin mit einem Cystein des POI. Kürzlich konnte eine neue Form des Tags, CLIP-tag, entwickelt werden, das spezifisch mit parasubstituiertem *O*⁶-Benzylcytosin reagiert [GJH⁺08]. Neben dem Enzym hAGT wurde auch der auf das bakterielle Enzym Haloalkandehalogenase basierende HaloTag zur kovalenten Bindung von Farbstoffliganden an POIs umfunktioniert [LEM⁺08]. Die Haloalkandehalogenase entfernt Halogene von Alkanen durch nukleophile Substitution, dadurch wird im aktiven Zentrum des Enzyms ein Carbonsäureester zwischen der Alkankette des HaloTag-Liganden und Aspartat gebildet. Der HaloTag hat gegenüber dem SNAPTag den Vorteil, dass das natürliche Enzym in humanen Zellen nicht vorhanden ist. Endogenes hAGT hingegen kann in humanen Zellen mit dem *O*⁶-Benzylguaninliganden reagieren und führt dadurch zu unspezifischem Fluoreszenzsignal. Zur Markierung des EpoRs fand in Kapitel 2.1 der HaloTag und in Kapitel 2.2 GFP Verwendung.

1.1.5 Membranorganisation und Rezeptor-*Clustering*

Die Membranorganisation und deren Funktion wurden in der Vergangenheit hauptsächlich durch biochemische und molekularbiologische Methoden studiert. Durch diese Techniken war es möglich die Vielzahl der Moleküle, die für den Membranaufbau verantwortlich sind, zu identifizieren. Allerdings wurde dabei weniger das dynamische Geschehen als vielmehr ein sehr statisches Bild der Plasmamembran gezeigt. Mittlerweile konnte durch eine Vielzahl von Studien bewiesen werden, dass die grundlegenden Funktionen der Membran stark von dessen Zusammensetzung abhängig sind [LS10]. Betrachtet man ein elektronenmikroskopisches Bild der Plasmamembran, wird deutlich, wie stark das Zytoskelett Einfluss auf die Organisation und Beweglichkeit der Moleküle in der Membran nehmen kann (Abb. 1.4). Erkennbar sind kleine Kavitäten, die durch die engmaschigen Aktinfilamente verursacht werden. Die Kompartimentierung der Membran wird vom Zytoskelett durch feste Verankerung von Proteinen und durch Bildung von gitterartigen Barrieren verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass das Zytoskelett aktiv die Verteilung und *Cluster*-Bildung von Molekülen in der Membran hemmen [BW04] oder herbeiführen [Bau03] kann.

Die Kompartimentierung wird auch durch Bildung von Subdomänen durch Lipide (sogenannte *lipid rafts*) verursacht. Die *Cluster*-Bildung in Mikrodomänen scheint für eine Reihe von Rezeptoren wichtig für die Signaltransduktion zu sein, wie beispielsweise für die Interferon-Rezeptoren gezeigt werden konnte [MMF⁺06]. Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) hingegen gelangt,

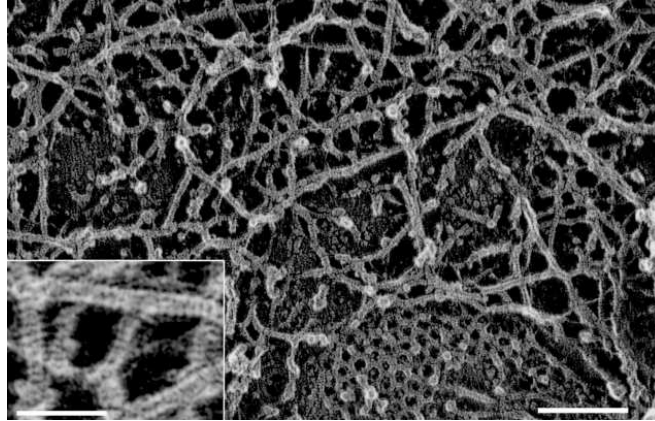


Abbildung 1.4: Elektronenmikroskopisches Bild des Membranzytoskeletts an der zytoplasmatischen Oberfläche einer Zelle; erkennbar sind Stachelsaumbläschen (clathrin-coated vesicles), Caveolae und die periodisch wiederkehrenden Muster der Aktinfilamente, Skala entspricht 100nm (Einsatz 50nm), aus [MFM⁺06]

wenn er mit Hilfe von *lipid rafts* internalisiert wird, über Lysosomen zur Degradation, während Clathrin-abhängig internalisierte EGFR wieder verwendet werden [SAT⁺08]. Hierdurch wird das Oberflächenvorkommen und damit die Signaltransduktion beeinflusst. Das Aktinzytoskelett wurde schon vielfach mit der Regulation von Proteindynamiken in der Membran in Verbindung gebracht [ALP⁺08, CAV⁺10, TDGG⁺10, JKT⁺11]. *Lipid rafts* können auch als Ausgangspunkt für die Zusammensetzung von membranständigen oder zytoplasmatischen Signalmolekülen dienen (laterales *Clustering*) und sind von nicht-raft Proteinen zu unterscheiden. Für viele verschiedene Rezeptoren, wie dem EGFR [HBM⁺10] oder verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren (*G Protein-Coupled Receptors*, GPCR) [BWR⁺10, SKH⁺12], konnte gezeigt werden, dass diese auch ohne Ligandenbindung als vorgeformtes Dimer vorliegen und *Cluster* bilden. Beschränkte Diffusion von Proteinen in der Plasmamembran wurde in verschiedenen Zelltypen schon mit Techniken wie FRAP, FCS oder SPT beobachtet. Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass eine eingeschränkte Beweglichkeit nicht nur durch das Zytoskelett verursacht wird [CAV⁺10], sondern auch durch Wechselwirkung mit anderen Komponenten in der Membran, wie durch Analyse der heterogenen Diffusion von *lipid rafts* in der Plasmamembran durch STED-FCS bewiesen werden konnte [MRH⁺11]. Interaktionen zwischen Proteinen können zu einer heterogenen Verteilung von Membranbestandteilen führen, wie durch SPT-Untersuchungen demonstriert [JKT⁺11]. Soeben beschriebene Effekte bilden Ansatzpunkt für die in dieser Arbeit in Kapitel 2.1 durchgeführten Einzelmolekülstudien. Bislang ist unbekannt, in welchem Ausmaß der Transport des EpoR und dessen Signalweiterleitung von der Membranzusammensetzung abhängig ist und welche Membranbestandteile dafür verantwortlich sind diese Prozesse zu regulieren.

1.2 Aufbau und Funktion des Erythropoetin - Rezeptors

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind unverzichtbare Regulatoren, die einer Vielfalt von immunologischen und entzündlichen Prozessen, sowie bei Wachstum und Differenzierung eine große Rolle spielen. Die onkologische Forschung konzentriert sich in letzter Zeit darauf, tumorspezifische Antigene, wie beispielsweise Zytokinrezeptoren an Zelloberflächen, zu untersuchen. Für Therapie und Prognose von Krebserkrankungen ist es unerlässlich diese Rezeptoren und die Wirkung, der dazu entwickelten Therapieansätze grundlegend zu verstehen.

Die Familie der Zytokinrezeptoren werden in zwei Typen klassifiziert. Zu Typ I gehören Erythropoetin (Epo), Prolaktin und Somatotropin, während $\text{IFN-}\alpha$, $\text{-}\beta$ und $\text{-}\gamma$ den Typ II Rezeptoren angehören. Die Zytokin-Rezeptoren bestehen aus drei Bausteinen: einem extrazellulären Bereich, der Transmembrandomäne und einem intrazellulären Bereich. Letzterer besitzt selbst keine enzymatische Funktion und ist daher mit Januskinasen (JAKs) zur Signalweiterleitung assoziiert (siehe Abbildung 1.5). Der EpoR wird im gesunden Organismus in Erythrozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet, wo er durch Epo aktiviert die Erythropoese reguliert (1.6).

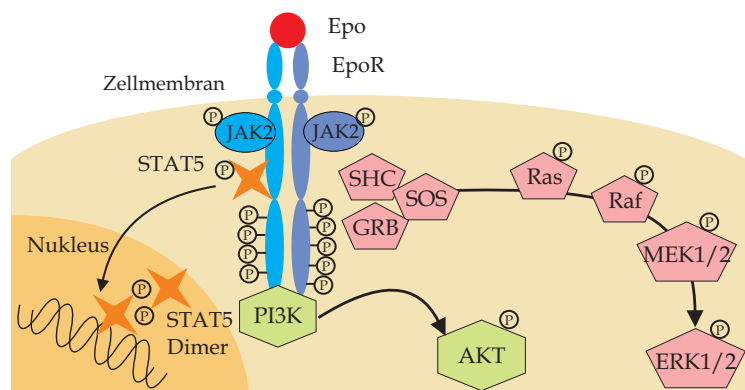


Abbildung 1.5: Aufbau des Erythropoetin-Rezeptors. Der EpoR aktiviert neben dem JAK-STAT-Signalweg, auch mitogen-activated protein kinases (AKT) und extracellular signal-regulated kinases (ERK). in Anlehnung an [ES12]

Endogen liegt Epo im Blutplasma mit einer Konzentration von 5 pM vor [ES12], kann allerdings abhängig von der Sauerstoffsättigung im Blut und im Gewebe um Faktor 1000 ansteigen. Das Zytokin wird bei adulten Organismen in interstitiellen Zellen der Niere, sowie in Hepatocyten und Kupfer-Zellen der Leber produziert [Kra91].

Wie kristallographische Studien zeigen, liegt der Rezeptor schon im unstimuliertem Zustand in vorgeformten Homodimeren an der Plasmamembran vor

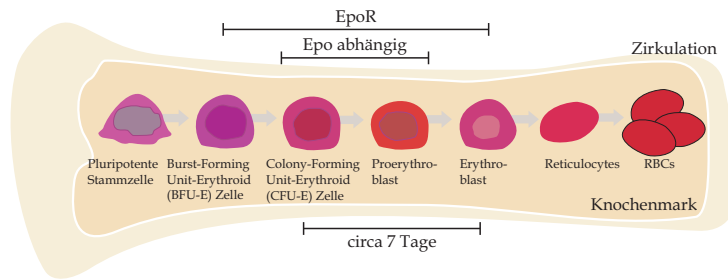


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung verschiedener Stadien der menschlichen Erythropoese In Anlehnung an [ES12]

[Liv99]. Es wurde aber ebenso die Theorie vorgeschlagen, dass der EpoR es vermag Heterodimere zu bilden [FVZ⁺10]. Vergleichbar mit anderen Zytokin-Rezeptoren wird bei der Signaltransduktion des EpoR ein Ligandenstimulus (Epo) in eine Veränderung der Genexpression übertragen. Sobald Epo an einem EpoR-Dimer bindet durchläuft dieser eine Konformationsänderung [PAA⁺96]. Zytoplasmatisch assoziierte Januskinasen phosphorylieren sich gegenseitig und werden dadurch aktiviert. Die phosphorylierten Tyrosinreste bilden Bindungsstellen für *Src-homology 2* (SH2)-Domäne der *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT)-Proteine [KBHL96]. STAT-Proteine spielen in vielen Signalwegen, von angeborener und erworbener Immunantwort bis zur Zellproliferation, eine wichtige Rolle [IH04]. Daraufhin bilden diese nach Phosphorylierung Homo- oder Heterodimere, welche in den Nukleus wandern und dort die Expression von Zielgenen aktivieren. Neben diesem sogenannten *JAK-STAT*-Signalweg, können die Signaltransduktionswege PI3K und MEK/ERK aktiviert werden [HAB⁺06]. Aufgrund der notwendigen Aktivierung von Tyrosinphosphatasen, die JAK2 dephosphorylieren, der Herunterregulierung von EpoR sowie der Induktion und Bindung von Negativregulatoren [COYKN04], ist die Beendigung der Signalkaskade wesentlich langsamer als dessen Aktivierung [CF14]. Die Signaltransduktion des EpoR ist stark von dessen Internalisierungsrate abhängig [GL06]. Die Internalisierung des Rezeptors kann das Signal nicht nur verstärken, sondern scheint dessen Genauigkeit zu erhöhen [SvZ09]. Zudem wurde die These aufgestellt, dass Liganden-induzierte Endozytose der in der Membran befindlichen Rezeptoren, die Signalkaskade unterbricht [WVK⁺05]. Darüber hinaus zeigt der EpoR aber auch liganden-unabhängige Endozytose [BLQL99].

Der EpoR hat mit einer Dissoziationskonstante von circa 100 pM eine sehr hohe Affinität zu Epo [BLB⁺91]. Verglichen mit anderen Rezeptortypen ist die Zahl der Rezeptoren pro Zelle allerdings relativ gering, wobei nur ein Anteil davon an der Membran zu finden ist [YLN⁺93], der Hauptanteil des EpoR ist in intrazellulären Reservoiren zu finden [YDL90]. Die relativ kurze Beständigkeit von rekombinantem humanem Epo (rhEpo) im Blutserum zur Therapie von Blutarmut bei Krebs, Aids, Niereninsuffizienz und anderen chronischen Krankheiten

hat zur Entwicklung einer Vielzahl von Epo-nachahmenden Medikamenten geführt [DKY⁺13], [Jel14], wie zum Beispiel das hyperglykolisierte *novel erythropoiesis stimulating protein* (NESP) oder *continuous erythropoietin receptor activator* (CERA), die zwar beide eine längere Halbwertszeit, aber eine geringere Affinität zum Rezeptor aufweisen [GL06]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Krebspatienten, die mit rekombinantem humanem Epo *rhEpo* oder Analogons behandelt worden sind, eine höhere Tumorwachstumsrate und damit eine geringere Überlebensdauer erwarten [ZDB⁺14]. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, das auch Tumorzellen EpoR exprimieren, wie bereits 1992 von Kayser et al. beschrieben [KG92], und damit die Angiogenese des Tumors bei Gabe von Epo vorantreiben [Rib10, HS11]. Für Brustkrebs konnte kürzlich gezeigt werden, das die Selbsterneuerung der Krebszellen durch Epo stimuliert wird, aber die gleichzeitige Inhibition von JAK2 eine vielversprechende Therapieform darstellt [ZDB⁺14]. Das Phänomen der Stimulation des Tumorwachstums sowie geeignete Gegenmaßnahmen, sind Gegenstand andauernder Untersuchungen [Jel14] und Motivation der vorliegenden Arbeit.

1.3 Mathematische Modellierung biologischer Systeme

Um ein umfassenderes Verständnis von der Adaption und der Regulatoren von Signalnetzwerken in Zellen zu erhalten, reicht eine statische Darstellung der Vorgänge nicht aus. In der Systembiologie machen quantitative mathematische Modelle es möglich, dynamische zelluläre Vorgänge, wie die Signaltransduktion, detaillierter zu beschreiben [ABLS06]. Solche Modelle werden verwendet um Besonderheiten des zugrunde liegenden Prozesses vorhersagen zu können oder Teile davon besser zu verstehen. Am häufigsten sind Modelle, die auf gewöhnlichen Differentialgleichungen (ODE, *ordinary differential equation*) basieren, genutzt worden um Signaltransduktionsprozesse zu beschreiben [SK13]. Ein ODE Modell besteht aus einem Netzwerk miteinander gekoppelter Geschwindigkeitsgleichungen für jede mit einbezogene Signalkomponente. Dabei wird die Kinetik jeder involvierten Reaktion mit einer Geschwindigkeitskonstanten beschrieben, die abhängig von der Konzentration der jeweiligen Edukte und Produkte des Modells ist.

Zelluläre Heterogenität kann in vielen grundlegenden Prozesse von der genetische Ausstattung bis zur Differenzierung von Zellen auftreten. Durch Analyse der zellulären Variabilität lassen sich Schlüsselregulatoren, die zu dieser Heterogenität führen, identifizieren und damit komplexe Modelle auf relevante Komponenten hin vereinfachen. Untersuchungen, die sich bereits mittels mathematischen Modelle mit dem EpoR-Signalweg auseinandersetzten, basierten lediglich auf Populationsdaten und befassten sich entweder mit dem Transportmechanismus und Signaltransduktion des EpoR [BSB⁺10] sowie verschiedenen Epo-

Spezies [GL06] oder dessen Signalweiterleitung über den *JAK-STAT*-Signalweg [VBP⁺08, BRS⁺12]. So konnten Becker *et al.* durch mathematische Modelle quantitativer Westernblotdaten zeigen, dass das Zusammenspiel von Epo und EpoR an der Membran einen großen Konzentrationsbereich an Epo in ein lineares Signal umwandeln kann [BSB⁺10]. Die Dynamik des EpoR Transports konnte zusammengefasst sehr gut durch ODE basierte Modelle charakterisiert werden. Bislang wurde der Erythropoetinsignalweg aber noch nicht hinsichtlich seiner zellulären Variabilität untersucht. Dies ist Gegenstand von Kapitel 2.2 dieser Arbeit.

1.4 Motivation

Die Größenordnung mit der Zellrezeptoren an der Oberfläche präsentiert werden, beeinflusst das Ausmaß der Zellantwort auf externe Stimuli, welche dadurch wandlungsfähig bleibt. Zunehmend sprechen Anhaltspunkte dafür, dass die Zellmembran als dynamisch und komplex aufgebauter Teil der Zelle gemeinsam mit dem Zytoskelett Proteintranslokationen, Sekretion und Internalisierung aktiv und passiv steuert und damit die Rezeptorfunktion beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit ist es, die Dynamik des EpoR sowohl der Zellmembran als auch in einzelnen Zellen weitreichender zu verstehen.

Dabei sollte die Frage beantwortet werden, welche Bestandteile der Membran für die Translokation des Rezeptors verantwortlich gemacht werden können, welchen Einfluss die Transmembrandomäne auf diese Prozesse hat und wie einzelne Rezeptoren auf Ligandenstimulus reagieren. Außerdem sollte untersucht werden, welche Prozesse für zelluläre Variabilität verantwortlich gemacht werden können, um daraus Rückschlüsse auf zugrundeliegende essentielle Regulationsvorgänge ziehen zu können.

Dazu wurde der Erythropoetinrezeptor im ersten Teil der Arbeit stöchiometrisch markiert und erstmals durch TIRFM Messungen charakterisiert. In Folge dessen wurden die Anteile der Bewegungsformen des Rezeptors und der Einfluss der Membran auf selbige untersucht.

Des Weiteren hat sich diese Arbeit zum Ziel gesetzt grundlegende Prozesse, die für variablen EpoR Transports verantwortlich gemacht werden können, mit Hilfe der Verknüpfung quantitativen Einzelzelldaten mit Zell-Ensemble-Modellen zu ermitteln.

Kapitel 2

Experimente und Ergebnisse

Der Anteil an Adenokarzinomzellen eines NSCLC-Tumors beträgt 40% (Kapitel 1). EpoR konnte auch in Adenokarzinomzellen, wie den Lungenkrebszellen H838 nachgewiesen werden, wobei rhEpo die Phosphorylierung von STAT5, Akt und ERK verursacht [DML07], was in Kapitel 1.2 ausführlicher beschrieben ist. Diese Zelllinie wurden daher im Rahmen der Arbeit gewählt, um sowohl die Kinetik des EpoR an der Membran als auch seine molekulare Interaktion innerhalb der Zelle zu beobachten. Die bis dato veröffentlichten Untersuchungen, die die Epo-EpoR-Wechselwirkung und deren Signaltransduktion charakterisieren, basieren bislang auf Populationsdaten. Der erste Teil der Arbeit behandelt daher die Einzelmolekül-Verfolgung des EpoRs an der Zelloberfläche, um Aussagen über seine Dynamik und Verteilung in einzelnen Zellen treffen zu können. Hierbei sollte gezeigt werden, ob der Rezeptor ligandeninduziert *Cluster* bildet, welchen Einfluss rhEpo auf die Bewegung einzelner Rezeptoren hat und welche Komponenten der Zelle diese Bewegung bewirken. Die quantitative Beobachtung der Heterogenität des Rezeptortransports zwischen Zellen und die Entwicklung von Zell-Ensemble-Modellen im zweiten Teil sollen Aufschluss darüber bringen, welche Prozesse gegenüber den bereits bestehenden Modellen des EpoR Transports verantwortlich für die zelluläre Variabilität sind.

2.1 Einzelmoleküluntersuchungen zur Dynamik des EpoR

Rezeptor-*Clustering* und deren Organisation in Subdomänen in der Membran ist ein wesentlicher Bestandteil der Signaltransduktion (siehe hierzu Kapitel 1.1.5). Bislang ist sehr wenig über die zugrunde liegenden Mechanismen bekannt und in welchem Maße sie die Fähigkeit eines Rezeptors Signale weiterzuleiten beeinflussen. Der EpoR liegt auch ohne Stimulation als vorgeformter Homodimer in der Zellmembran vor [Liv99]. Neben dem Wildtyp-EpoR (EpoR-wt) wurde auch seine Transmembranmutante EpoR-T242N in die Versuchsreihe mit eingeschlos-

sen. EpoR-T242N zeigt vergleichbare Aktivierungs- und Internalisierungskinetiken wie der EpoR-wt, zeichnet sich aber durch größere helikale Abstände der Transmembrandomäne aus [Bec07]. Becker *et al.* konnte zeigen, dass eine dicht gepackte Transmembrandomäne, wie sie beim EpoR-wt im Vergleich zum EpoR-T242N vorzufinden ist, zu einer Signalverstärkung durch den Rezeptor führt, und postuliert, dass dies auch mit der Bildung von höher oligomerer Strukturen zusammenhängt. Unbekannt ist bislang aber, ob aktivierte EpoR tatsächlich *Cluster* bilden, um die empfangene Signalantwort zu verstärken.

In den folgenden Kapiteln wurde die Dynamik und Interaktion des EpoR, sowie die zugrunde liegenden Mechanismus des Rezeptortransports an der Membran mittels Einzelmolekül-Methoden untersucht. Zu diesem Zweck trugen die Rezeptoren extrazellulär den sogenannten HaloTag [LEM⁺08], welches die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem modifizierten Rezeptor und einem fluoreszenten HaloTag-Liganden enzymatisch katalysiert (Kapitel 1.1.4). Das Fusionsprotein aus EpoR-T242N und HaloTag wird im Folgenden als EpoR-T243N bezeichnet. Als Ligand wurde ein Silicium-Rhodamin-Farbstoff (SiR) gewählt, welcher sich durch exzellente Photostabilität auszeichnet (siehe hierzu Kap. 4). Zunächst mussten die gewählten Fusionsproteine jedoch auf ihre Funktion in Zellen getestet werden.

2.1.1 Validierung der EpoR-Konstrukte

Die im vorliegenden Kapitel verwendeten Fusionsproteine wurden im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit [Sal13] erstellt, in Zellen durch virale Transduktion eingebracht und dessen Funktion nachgewiesen sowie auf Aktivierbarkeit geprüft. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sind eine Reihe von Farbstoffkonjugaten sowie Konstrukte, getestet worden, wobei sich die Kombination aus HaloTag und SiR-Halo als am geeignetsten erwiesen hat. Um sowohl die Funktionalität des Fusionsprotein als auch die Aktivität des Liganden SiR-Halo zu testen, wurden die Zellrezeptoren in Zellkultur gefärbt (ZK) und anschließend lysiert oder zunächst lysiert und dann mit SiRHalo markiert (Zellysät, ZL) und beide im Anschluss durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Abb. 2.1). Hierbei wurde H838 EpoR-wt und als Kontrolle Wildtyp H838-Zellen (Kontrolle) verwendet. Die Zellen wurden in Kultur für 15 Minuten mit $0,5 \mu M$ SiR-Halo behandelt, während das entsprechende aus Kultur enthaltene Zellysät 15 Minuten mit einer Farbstoffmenge von $0,1 \mu M$ versetzt wurde. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 4 zu finden. Abbildung 2.1 zeigt den Rezeptor nach Färbung im Zellysät (ZL), sowie nach Färbung in Kultur (ZK) in H838 EpoR-wt Zellen sowie die Färbung von Wildtyp-H838-Zellen in Kultur (Kontrolle).

Im resultierenden Gel in Abbildung 2.1 ist bei den Auftragungen der H838 EpoR-wt Zellen, wie zu erwarten, eine Fluoreszenzbande bei circa $110 kDa$ erkennbar, die dem erfolgreich gefärbtem Fusionsprotein des Rezeptors entspricht. Somit konnte die Präsenz des Konstrukts auf Proteinebene nachgewiesen wer-

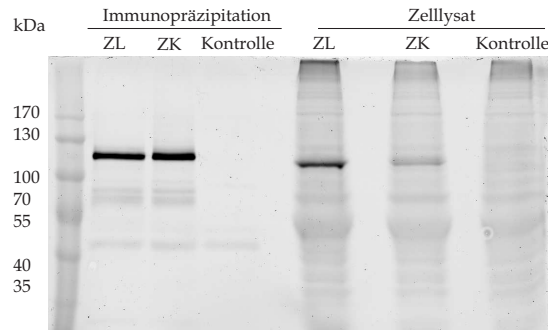


Abbildung 2.1: Gelelektrophoretische Auftrennung von markiertem EpoR-wt aus Immunopräzipitation bzw. totalem Zellysat von H838 EpoR-wt Zellen und H838-Wildtyp-Zellen. Die Färbung erfolgt jeweils mit $0,2 \mu\text{M}$ SiR-Halo.

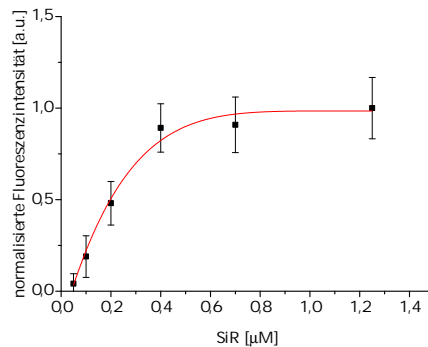


Abbildung 2.2: Effizienz der HaloTag Markierung. H838 EpoR-wt Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an SiR-Halo gefärbt und die mittlere Fluoreszenzintensität am TIRFM gemessen. Gezeigt sind Daten aus 4 unabhängigen Experimenten (Mittel \pm STD).

den. Um geeignete Versuchsbedingungen zur Messung der Rezeptordynamik an lebenden Zellen zu etablieren, wurde eine Titration mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen an SiR-Halo in H838 EpoR-wt Zellen durchgeführt.

Die mittleren Fluoreszenzintensitäten aus 4 unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 2.2 gegen die Konzentration aufgetragen. Die resultierende Sättigung kann auf eine spezifische Markierung der Rezeptors zurückgeführt werden. Für SiR-Farbstoffe wurde postuliert, dass diese im spezifisch gebundenen Zustand als fluoreszentes Zwitterion vorliegt, während sie ungebunden bevorzugt als nicht-fluoreszierendes Spirolacton vorliegen [LUO⁺13]. Dieser Effekt kann das Problem unspezifisches Hintergrundsignal durch Farbstoffaggregate oder durch Bindung an hydrophobe Strukturen zu erhalten zwar reduzieren, aber nicht ganz eliminieren. Aufgrund der resultierenden Sättigung und um ein optimales Signal-zu-Rausch Verhältnis zu erlangen, fand in allen folgenden Experimenten, soweit nicht anderst angegeben, eine Konzentration von $0,2 \mu\text{M}$ SiRHalo Verwendung.

2.1.2 Einzelpartikelverfolgung des EpoR

Es ist unumstritten, dass die *Cluster*-Bildung von Rezeptoren relevant für die Signaltransduktion ist. Für die zwei Untereinheiten des Interferon- γ -Komplexes (IFNG) aus der Familie der Zytokinrezeptoren, die IFNG-Rezeptoren 1 und 2, ist bekannt, dass sich diese erst nach Stimulation mit IFN- γ Lipidmikrodomänen an der Plasmamembran anschließen und *Cluster* bilden [MMF⁺06]. Um der Frage nachzugehen, ob auch der EpoR diesen Effekt durch Stimulation mit seinem Liganden Erythropoetin (rhEpo, rekombinantes humanes Erythropoetin) zeigt und welchen Einfluss seine Transmembrandomäne darauf hat, wurden der EpoR-wt und seine Transmembranmutante T243N in H838-Zellen mit SiR-Halo über den HaloTag markiert und die Verteilung der Rezeptoren an der basalen Zellmembran am TIRF-Mikroskop unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Basierend auf der gemessenen Intensitätsverteilung konnten Aussagen über die Bildung oder Änderung der Größe von Rezeptor*cluster* durch Ligandenstimulation in diesem Kapitel sowie des Diffusionskoeffizients und die Änderung im Bewegungsmodus einzelner Partikel im darauffolgenden Kapitel 2.1.3 getroffen werden.

Dazu sind die über Nacht in Medium ohne Serum und in *8-well Lab-Tek* Messkammern kultivierten Zellen in L15-Medium überführt worden und für fünf Minuten mit $0,2\mu M$ SiR-Halo gefärbt, sowie im Anschluss zwei Mal mit L15-Medium gewaschen worden. Nach dem ersten Messzeitpunkt wurden die Zellen mit $6,25 nM$ rhEpo stimuliert worden. Über einen Zeitraum von einer Stunde wurde dieselbe stimulierte Zelle an 4 weiteren Messzeitpunkten am TIRF-Mikroskop beobachtet.

Die Fluoreszenzpunkte der TIRF-Aufnahme der Rezeptoren an der basalen Membran konnten mit dem von Jaqaman *et al.* veröffentlichten Algorithmus Bild für Bild erfasst werden, der die Intensitäten der Punktabbildungsfunktionen aufgrund ihrer anzunehmenden Gaußschen Verteilung erkennt (Kapitel 4.5) [JLM⁺08]. Durch aus diesen Daten erstellten Intensitätshistogrammen zu den 5 unterschiedlichen Messzeitpunkten vor und nach Stimulation des Rezeptors lassen sich Aussagen über die ligandeninduzierte Umverteilung des Rezeptors an der Plasmamembran treffen. Für die kleinstmögliche Einheit als die der Rezeptor vorliegt, erhält man aus der Verteilung der Intensitäten eine Normalverteilung mit dem Mittelwert μ_1 . Bestehen die detektierten Intensitätsmaxima aber aus mehreren Komponenten n , wird der Mittelwert aus deren Normalverteilung aus $n \cdot \mu_1$ gebildet (Kapitel 4.5.1). An die Intensitätsverteilungen (kombinierte Gaußsche Funktion) wurden daher eine Summe an Gaussfunktionen global angepasst, wodurch man Aussagen über die zugrundeliegenden Komponenten treffen kann. Die einzelnen Normalverteilungen können durch $N_n(\mu, \sigma^2)$ beschrieben werden, wobei μ der mittleren Fluoreszenzintensität und σ^2 der Varianz der Gauß-Kurve entspricht. Als Referenz wurden SiR-Halo-Moleküle auf der Glasoberfläche mittels TIRFM gemessen (Abb. 2.3(a)). Die Intensitätsverteilung von einzelnen Molekülen auf der Oberfläche zeigt eine mittlere Intensität von $0,007 \pm 3 \cdot 10^{-6}$.

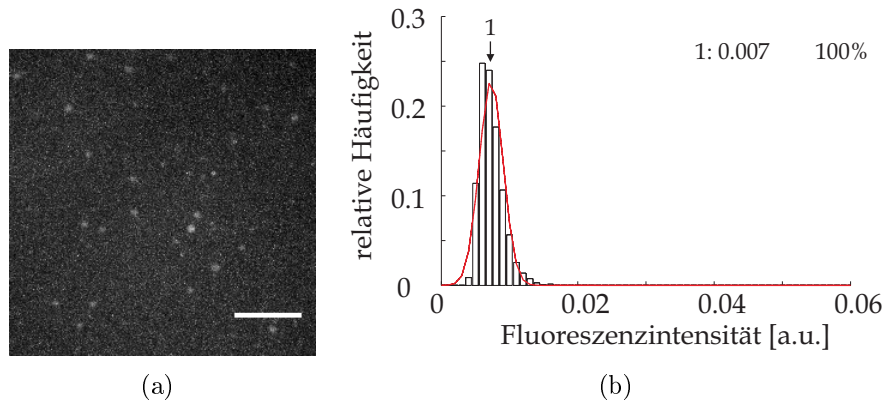


Abbildung 2.3: Detektion von SiR-Halo Molekülen durch TIRFM. a) 256x256 Pixel TIRFM Bild von 0,05 μ M SiR-Halo auf einer sauberer Glasoberfläche von 8-well Lab-Tek-Messkammern. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μ M b) Intensitätsverteilung von SiR-Halo Molekülen. Die Positionen und Intensitäten jedes Partikel aus Abbildung a) konnte durch einen Algorithmus erfasst werden.

Ausgehend zu diesem Wert wurde die relative Anzahl der Komponenten an Rezeptoren in der Membran bestimmt. Abbildung 2.4 zeigt charakteristische Intensitätsverteilungen der SiR-markierten EpoR-wt an der basalen Membran der selben H838 EpoR-wt Zelle über einen Messzeitraum von einer Stunde. Der unstimulierte Rezeptor zeigt vier verschiedene Komponenten mit $N_1(0,007, 8 \cdot 10^{-7})$, $N_1, 5(0,009, 2 \cdot 10^{-6})$, $N_2(0,014, 7 \cdot 10^{-6})$ und $N_4(0,021, 4 \cdot 10^{-5})$ (Abb. 2.4(a)). Fünf Minuten nach Stimulation ist die erste Gauß'sche Funktion immer noch einen maßgeblicher Anteil von 30%, doch ist die relative Häufigkeit leicht nach links hin zu Partikeln mit höherer Fluoreszenzintensität verschoben (Abb. 2.4(b)). 10 Minuten nach Stimulation zeigt sich die vierte Verteilung bei dem fünffachen des Ausgangswertes von μ_1 . Nach einer Stunde hat sich diese mit einem Anteil von 15% dem sechsfachen μ_1 verschoben (Abb. 2.4(b)). Die Rezeptormutante EpoR-T243N, welche eine dichter gepackte Membrandomäne aufweist (Kapitel 1.2), zeigt im Vergleich zu EpoR-wt eine höhere mittlere Intensität zu allen Messzeitpunkten an der Membran (Abb. 2.5). Zu allen Messungen vor und nach der Stimulation konnte 5 Gauß-Funktionen an die Intensitätsverteilungen angepasst werden, allerdings unterscheiden sich diese in der geschätzten Anzahl der zugrunde liegenden Komponenten (Abb. 2.5). Für die beiden Messungen 30 und 60 Minuten nach Stimulation des Rezeptors steigt die Anzahl der Komponenten der letzten Normalverteilung von 12 auf 16 und 14 Komponenten an (Abb. 2.5(d) und 2.5(e)).

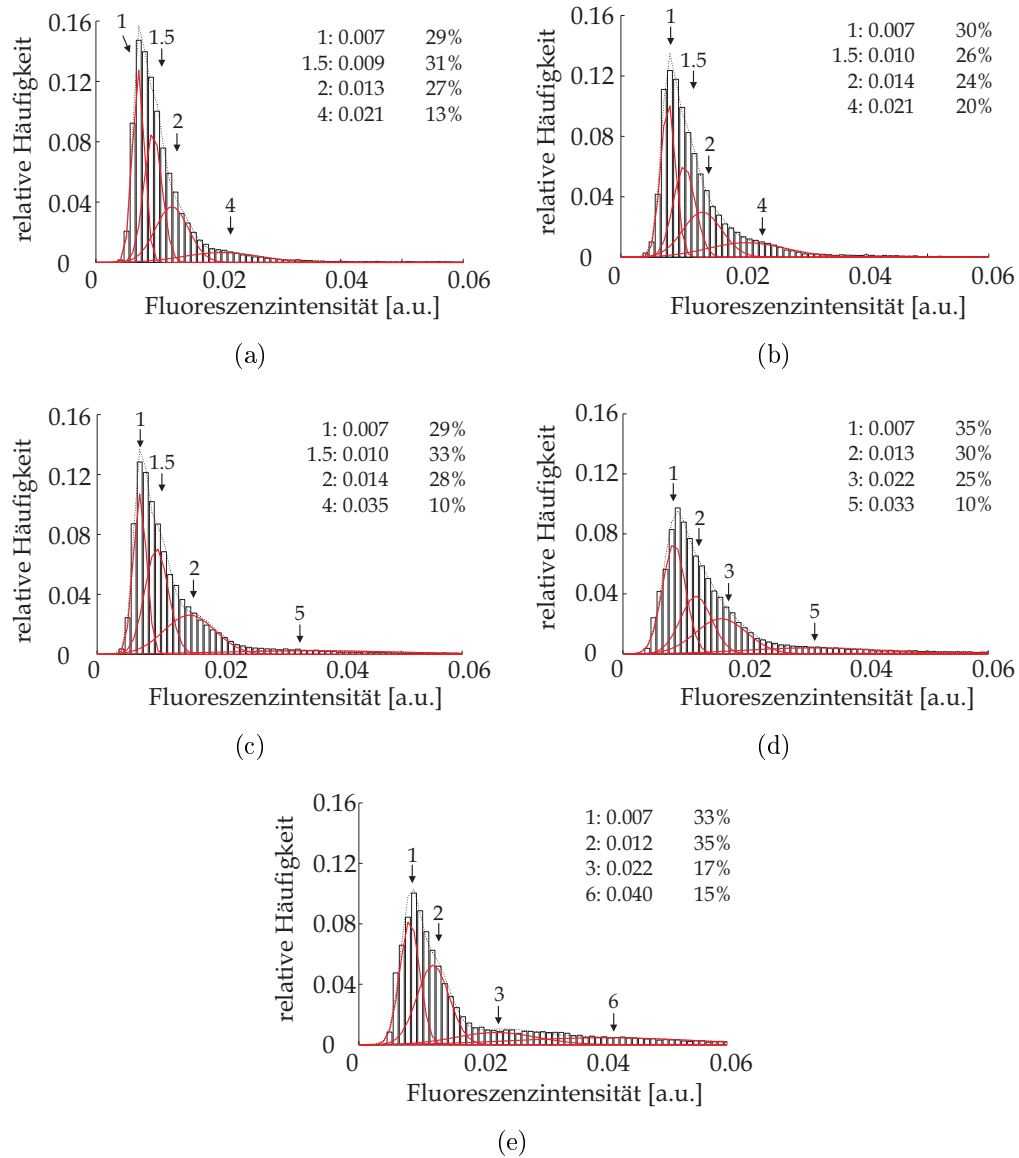


Abbildung 2.4: Intensitätsverteilung von SiR-markierten Partikeln vor (a) und zu vier (b-e) Zeitpunkten nach der Stimulation mit rhEpo in der selben H838 EpoRH-wt Zelle. Dargestellt sind kombinierte Gauß'sche Anpassungsfunktion (grau) zu den Zeitpunkten a) vor der Stimulation, b) 5, c) 10, d) 30 und e) 60 Minuten nach Stimulation mit einzelnen Komponenten der kombinierten Gauß-Funktion in rot.

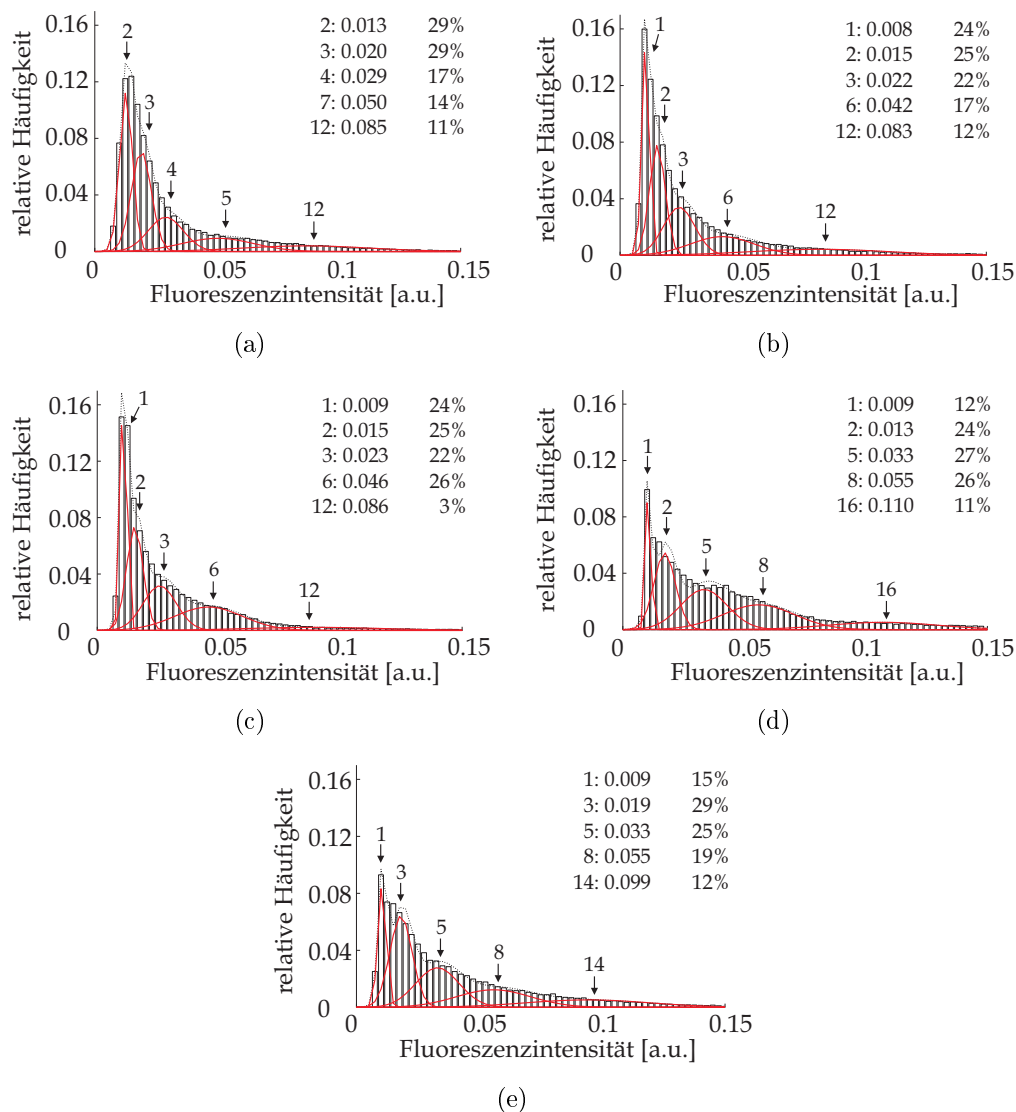


Abbildung 2.5: Charakteristische Intensitätsverteilung von SiR-markierten Partikeln vor und zu vier Zeitpunkten nach der Stimulation mit rhEpo in der selben H838 EpoR-T243N Zelle. Dargestellt sind kombinierte Gauß'sche Anpassungsfunktion (grau) zu den Zeitpunkten a) vor der Stimulation, b) 5, c) 10, d) 30 und e) 60 Minuten nach Stimulation mit einzelnen Komponenten (rot).

Die Verteilung der Komponenten der Messreihe war für alle gemessenen Zellen ähnlich. Bei beiden Rezeptoren ist ein Anstieg der mittleren Intensität nach Hormongabe zu verzeichnen. Sowohl der EpoR-wt als auch seine Mutante EpoR-T243N zeigen eine Zustandsänderung nach Behandlung mit dem Hormon rhEpo. In den Intensitätshistogrammen der repräsentativen Zellbeispiele tritt 5 Minuten nach Hormongabe eine Verschiebung der Häufigkeit hin zu Partikeln mit höherer Intensität, was für einen gesteigerten Oligomersierungsgrad der Rezeptorkomple-

xe nach Ligandenzugabe spricht und durch größere σ^2 -Werte der entsprechenden Gauß'schen Funktionen unterstützt wird. Der Stimulus wirkt sich aber unterschiedlich auf beide Rezeptoren aus. Während der Anteil der höheren Komponenten bei $t = 30$ Minuten für EpoR-wt bei nur 10 % liegt (Abb. 2.4(c)), ist der Anteil zum gleichen Zeitpunkt bei EpoR-T243N mit 29 % viel höher. Der Rezeptor liegt vorangegangenen Untersuchungen zufolge nie als Monomer vor [Liv99]. Die μ -Werte der einzelnen Normalverteilungen bilden allerdings nicht immer ein Vielfaches vom Maximum der Gaußfunktion der Referenzmessung, sondern sind mitunter im Falle des EpoR (Abb. 2.4(b) und 2.4(c)) nur eineinhalbmal so groß. Mit der Annahme, dass die Gaußverteilung der Referenzmessung einzelner SiR-Halo tatsächlich die Intensitätsverteilung einzelner Moleküle widerspiegelt, liegt die Vermutung nahe, dass der Rezeptor dazu im Stande ist neben Homodimeren auch Heterodimere zu bilden.

Zeit[min]	H838 EpoR-wt	H838 EpoR-T243N
0	8722	5575
5	6572	3087
10	3631	2810
30	5892	2995
60	6167	2820

Tabelle 2.1: Absolute Anzahl der Trajektorien in H838 EpoR-wt und EpoR-T243N Zellen

Bei beiden Rezeptoren ist eine Abnahme der Partikelanzahl an der Membran gegenüber denselben Zellen zum Zeitpunkt vor der Rezeptoraktivierung zu beobachten (Tabelle 2.1). Doch hat sich die Mengen an Partikeln an der Zellmembran eine Stunde nach Stimulation bei EpoR-wt, womöglich durch schnellen Umsatz des Rezeptors in der Zelle [BSB⁺10], dem Ausgangsniveau angenähert. Die Verschiebung der Intensitätsverteilung hin zu höheren Intensitäten (Abb. 2.4 und 2.5) bei abnehmender Partikelanzahl (Tabelle 2.1) lassen einen erhöhten Oligomerisierungsgrad bei beiden Rezeptortypen bei konstantem Stimulus vermuten, was auf die Bildung von Rezeptor-*Clustern* hinweist. Neben der Betrachtung der ligandeninduzierten Ballung von Signalmolekülen in der Membran soll im nächsten Kapitel die Analyse der Bewegung der Rezeptorpartikel und der Einfluss der Rezeptoraktivierung untersucht werden.

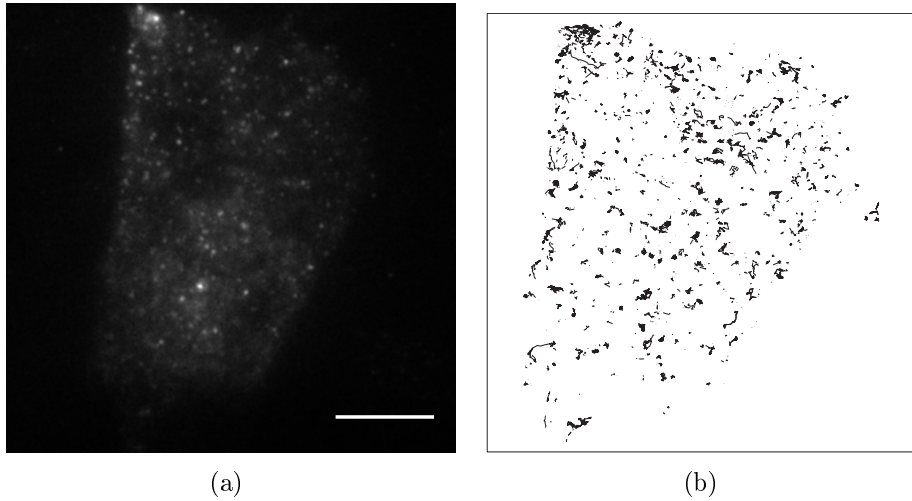


Abbildung 2.6: Detektion und Verfolgung von SiR-Halo markierte EpoR-Partikeln durch TIRFM. (a) 512x512 Pixel TIRFM Bild einer 500 Bilder langen Aufnahme von EpoR T243N an der basalen Membran von H838 Zellen in einer 8-well Lab-Tek-Messkammer. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ m. (b) Trajektorien einzelner EpoR Partikel. Aus dem 50 Bilder langem Video wurden diese Partikel durch den Verfolgungsalgorithmus automatisch detektiert und bildweise miteinander verknüpft.

2.1.3 Charakterisierung der Bewegungszustände des EpoR

Durch den dynamische Aufbau der Zellmembran und dessen Kompartimentierung durch Filamenten sind Membranproteine in ihrer Bewegung eingeschränkt (Kapitel 1.1.5). Die Beeinflussung der Rezeptorbewegung durch Ligandenbindung wird im Folgenden durch die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten, sowie der Bewegungsmodi mittels Einzelmolekül-Verfolgung (SPT) untersucht. Grundlage für die Durchführung der Experimente bilden die aus Kapitel 2.1.2 geschilderten Vorgehensweisen. Dabei wurden 20.000 Zellen 48 Stunden vor dem Experiment in 8-well *Lab-Tek*-Messkammern, deren Glasoberfläche zuvor gereinigt wurde, gesetzt, was im Detail in Kapitel 4.4 geschildert ist. Die Zellen wurden vor dem Experiment über Nacht in Medium ohne Serum kultiviert. Am Messtag wurden sie in L15-Medium überführt und für fünf Minuten mit 0,2 μ M SiR-Halo gefärbt sowie im Anschluss zwei Mal mit L15-Medium gewaschen. Nach dem ersten Messzeitpunkt wurde zur Stimulation der Ligand rhEpo mit einer Konzentration von 6,25 nM hinzugegeben. Die aus dem bereits erwähnten Algorithmus erhaltenen Intensitätsspuren der einzelnen Partikel wurden anhand ihrer Bewegungsform und Diffusion betrachtet.

Die Bewegung der Partikel werden aufgrund der Streuung ihrer Positionen entlang ihrer Bewegungsspur zunächst in nicht-gerichtete oder gerichtete Bewegung unterteilt. Die Bestimmung des Beweglichkeit der Partikel erfolgte durch

die *Moment Scaling Spectrum* (MSS)-Analyse. Kurzgefasst wird dabei für jede Zeitänderung einer Einzelmolekültrajektorie der nullte bis sechste Bewegungsmoment bestimmt. Der zweite Verschiebungsmoment ($\nu = 2$) ist dabei die mittlere quadratische Verschiebung (*mean square displacement*, MSD). Über die MSS-Analyse konnte der Diffusionskoeffizient ermittelt werden. Für selbstähnliche Prozesse kann das MSS als Maß heran gezogen werden um die Beweglichkeit eines Partikels zu charakterisieren. Detaillierter ist dies in Kapitel 4.5 beschrieben. Das MSS wurde hier verwendet um die Rezeptorbewegung in drei Hauptbewegungsklassen gerichtet, beschränkt und unbeschränkt einzuteilen, die den größten Anteil an der Rezeptorbewegung ausmachten. Weitere Details zur Datenerfassung und Auswertung sind in Kapitel 4.4 und 4.5.1, sowie Kapitel 1.1.3 beschrieben.

Der mittlere Diffusionskoeffizient des EpoR-wt zeigte nach Stimulation mit rhEpo keine drastische Änderung (Tabelle 2.2), während bei der Rezeptormutante EpoR-T243N nach Stimulation ein stetiger Abfall des mittleren Diffusionskoeffizienten zu verzeichnen ist, der allerdings nicht signifikant ist.

Zeit[min]	H838EpoR-wt	H838EpoR-T243N
0	$0,17 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,09$
5	$0,17 \pm 0,07$	$0,22 \pm 0,07$
10	$0,18 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,06$
30	$0,18 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,06$
60	$0,19 \pm 0,08$	$0,17 \pm 0,05$

Tabelle 2.2: Diffusionskoeffizienten (Median in $\mu\text{m}^2/\text{s} \pm$ Interquartile von 68% der Daten) der Rezeptorpartikel berechnet aus der MSS-Analyse für die Partikelverschiebung zu 5 Messzeitpunkten in denselben H838 EpoR-wt / EpoR-T243N Zellen ($n_{wt} = 8$, $n_{T243N} = 10$).

Durch Analyse des Bewegungstyps und der Beweglichkeit der Partikel konnten die relativen Anteile der Rezeptoren, die den drei Bewegungsklassen beschränkt, unbeschränkt und gerichtet angehören, bestimmt werden. Hierzu wurden die relativen Häufigkeiten gegen die durch MSS-Analyse klassifizierten Bewegungstypen aufgetragen, dabei stellen die Fehlerbalken nach der ursprünglich von Efron veröffentlichten Methode den mittleren Standardfehler aus 200 Bootstraps dar [Efr79]. Eine Stichprobenwiederholung zur Ermittlung des Standardfehlers wurde hier verwendet, da die theoretische Verteilung der Bewegungsformen in den wenigen zur Verfügung stehenden Datensätzen ($n_{wt} = 8$, $n_{T243N} = 10$) nicht bekannt ist. 17,2% der EpoR-wt zeigten an der Plasmamembran in unbehandelten Zellen eine gerichtete Fortbewegung, 71,1% beschränkte Diffusion und 11,5% unbeschränkte Diffusion, wobei 8 Zellen betrachtet wurden (grüne Balken in Abb. 2.7). Eine ähnliche Verteilung ließ sich auch für den EpoR-T243N Rezeptor bestimmen. Gerichtete Bewegung wurde bei 19,8% der Partikel gefunden, beschränkte Diffusion bei 64,6% und unbeschränkte Diffusion bei 11,4% der Partikeltrajektorien in 10

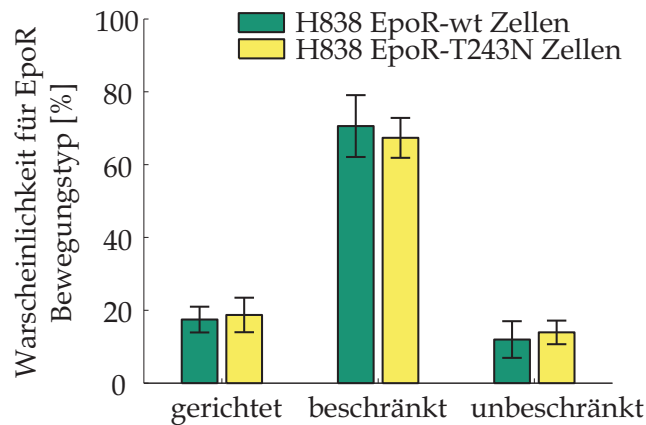


Abbildung 2.7: Wahrscheinlichkeit des EpoR in gehungerten, unstimulierten Zustand verschiedene Bewegungsmodi zu erfahren. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler aus 200 Bootstraps.

Zellen (gelbe Balken in Abb. 2.7).

In einem nächsten Schritt wurden die relativen Änderungen der Bewegungen der Rezeptoren 5, 10, 30 und 60 Minuten nach Ligandenstimulation im Verhältnis zu unbehandelten Zellen aus Abbildung 2.7 untersucht. Abbildung 2.8 zeigt die Unterschiede der Bewegungsformen gerichtet (grün), beschränkt (rot) und unbeschränkt (blau) in Prozent zu den vier gemessenen Zeitpunkten nach Stimulation in Relation zu den Bewegungsformen der gleichen Zellen im noch unstimulierten Zustand aus Abbildung 2.7 von EpoR-wt und EpoR-T243N. Die Stimulation der Rezeptoren führt zu keiner ausgeprägten Änderung ihres Bewegungstyps, dennoch sind Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Rezeptor und seiner Transmembranmutante erkennbar. Der EpoR-wt bleibt in der Verteilung seiner Bewegungsformen über 5 und 10 Minuten nach Stimulation unverändert. Der Anteil an EpoR-wt-Partikel mit unbeschränkter Diffusion oder gerichteter Fortbewegung nimmt erst nach 30 Minuten kontinuierlicher Stimulation zu. Für den EpoR-T243N zeigt sich eine Zunahme der Partikel, die gerichtete Bewegung verrichten, über alle Messzeitpunkte. Sich beschränkt fortbewegende Partikel nehmen bei beiden Rezeptortypen nach Stimulation ab.

Aufgrund der geringen Abweichung der mittleren Diffusionskoeffizienten nach Ligandenstimulation (Tabelle 2.2) wurde im Folgenden untersucht, ob Partikel abhängig vom Diffusionskoeffizient nach Stimulation in andere Bewegungstypen wechseln und inwieweit sich dabei der Diffusionskoeffizient der entsprechenden Fraktionen ändert. Abbildung 2.9 zeigt in Balkendiagrammen die Häufigkeitsverteilung aller Diffusionskoeffizienten von EpoR-wt über alle Bewegungsklassen, dabei sind die Anteile an verschiedenen Bewegungstypen in rot für beschränkte und blau für unbeschränkte Diffusion sowie grün für gerichtete Fortbewegung gewählt. Die Diffusionskoeffizienten ändern sich in ihrer Verteilung kaum durch Ligandenstimulus. In Abbildung 2.10 sind die Verteilungsfunktionen der Diffu-

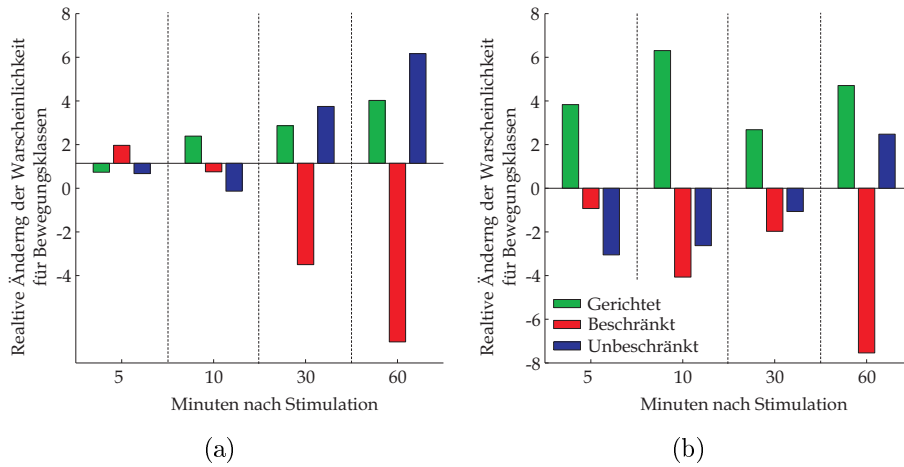


Abbildung 2.8: Relative Änderung der Wahrscheinlichkeit bestimmte Bewegungsmodi zu erreichen für a) *EpoR-wt* und b) *EpoR-T243N*. Gezeigt sind die Änderung in Prozent relativ zum gehungerten, unstimulierten Zustand aus Abb. 2.7 nach 5, 10, 30 und 60 Minuten

sionskoeffizienten in Abhängigkeit von einer Bewegungsklasse für alle Messzeitpunkte in einem Graphen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Anteile an den Bewegungsklassen in Abhängigkeit vom Diffusionskoeffizienten nahezu unverändert bleiben.

Um die Ergebnisse der Verteilungen zu quantifizieren, wurde ein zwei-Proben Kolmogorow-Smirnow-Test (KS-Test) durchgeführt, der in MATLAB implementiert ist [Mas51, Mil56]. Der zwei-Proben KS-Test ist ein Test, der die größten Unterschiede zwischen zwei Verteilungen berechnet. Die Nullhypothese besagt, dass die verschiedenen Datensätze der gleichen Verteilungsfunktion folgen oder diese andernfalls abgelehnt wird. Der p-Wert beschreibt die Irrtumswahrscheinlichkeit mit der die Nullhypothese zutrifft. Durch Verwendung des KS-Test auf die Verteilungen einer Bewegungsform zu unterschiedlichen Messzeiten zueinander soll getestet werden, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden.

Die Verteilungen der beschränkten Bewegung abhängig vom Diffusionskoeffizienten in Abbildung 2.9 nimmt mit zunehmender Stimulationsdauer tendenziell ab. Dabei unterscheiden sich die Verteilungen vor Ligandenstimulation $t=0'$ über den KS-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ von den Verteilungen $t=5'$ und $t=60'$ Minuten nach Stimulation (Abb. 2.10(a)). Als signifikant verschieden klassifiziert der KS-Test auch die Verteilungen für $t=5'$ und $t=60'$.

Abbildung 2.11 zeigt die entsprechende Verteilung der Diffusionskoeffizienten der *EpoR-T243N* vor der Stimulation mit rhEpo und zu vier Zeitpunkten nach der Stimulation. Die relative Häufigkeit ist hier im Vergleich zum *EpoR-wt* über alle Messzeitpunkte zu höheren Diffusionszeiten verschoben, was auch aus den Diffusionskoeffizienten aus Tabelle 2.2 hervorgeht. Nach Stimulation mit dem Liganden

rhEpo kommt es zu einer leichten Erhöhung der schnelleren Komponenten für gerichtete und unbeschränkte Bewegungsklassen zu allen weiteren Messzeitpunkten (Abb. 2.11). Dabei steigt der Anteil an Rezeptor-Partikeln mit gerichteter Bewegung (grün) nach Stimulation ebenfalls an (Abb. 2.11(b) und 2.11(c)). Die Veränderung der Anteile an den verschiedenen Bewegungsformen ist in Abbildung 2.12 deutlicher zu erkennen. Hier sind alle Messzeitpunkte für eine Bewegungsform in drei Graphen dargestellt. Für beschränkte Bewegung verschieben sich die Anteile des Diffusionskoeffizienten signifikant hin zu schnelleren Komponenten, was durch den KS-Test belegt wurde (Abb. 2.12(a)). Danach unterscheiden sich alle Verteilungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ voneinander, bis auf die Verteilung zwischen Zeitpunkt $t=5'$ und $t=0'$ beziehungsweise $t=10'$, sowie $t=10'$ und $t=30'$. Der Anteil an gerichteter Bewegung steigt schon fünf, sowie 10 Minuten nach Stimulation mit rhEpo signifikant an (Abb. 2.12(b)).

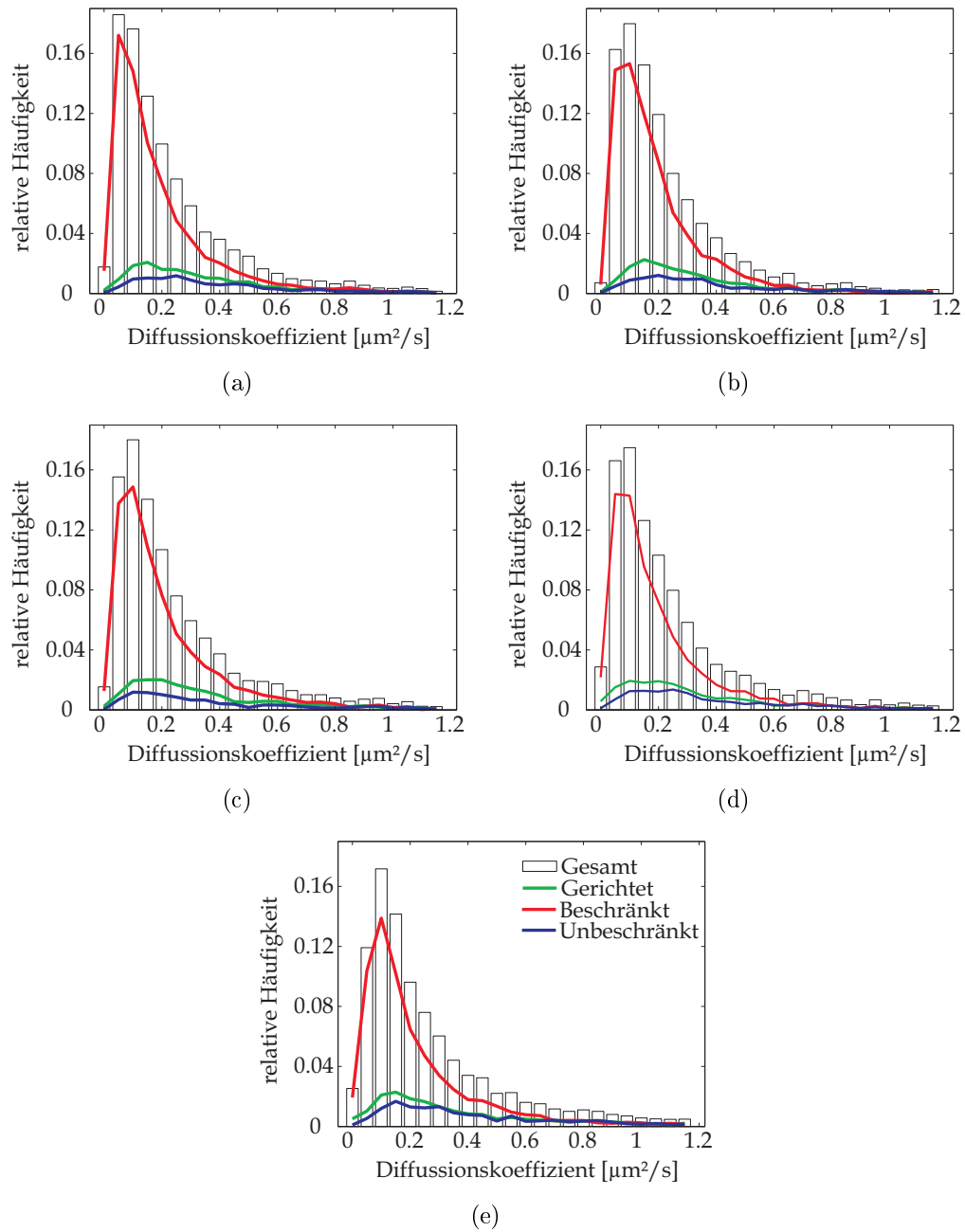


Abbildung 2.9: Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten der Rezeptorpartikel berechnet aus der MSS-Analyse für die Partikelverschiebung vor Stimulation (a), und (b) 5, (c) 10, (d) 30 und (e) 60 Minuten nach Stimulation in den gleichen H838 EpoR-wt Zellen ($n=9$). Die Kurven zeigen die Anteile der Diffusionskoeffizienten, die von Partikeln mit unterschiedlichen Bewegungsformen (grün: gerichtet; rot: beschränkt; blau: unbeschränkt) stammen und durch MSS-Analyse bestimmt wurden.

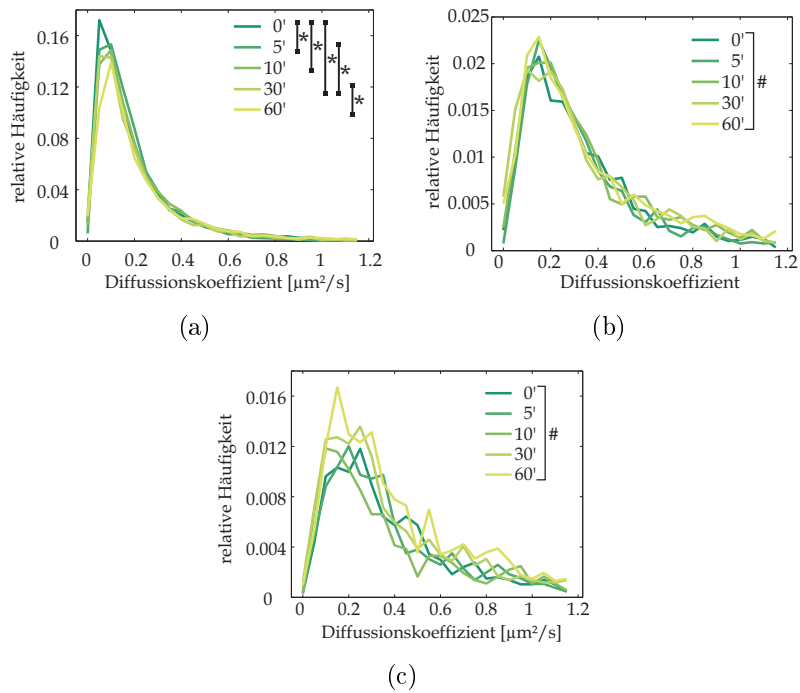


Abbildung 2.10: Anteile der Bewegungsklassen beschränkt (a), gerichtet (b) und unbeschränkt (c) an der Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten für die Messpunkte vor und bis 60 Minuten nach Stimulation in H838 EpoR-wt Zellen. Der zwei-Proben Kolmogorow-Smirnow-Test klassifiziert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ die mit * markierte Verteilungen als signifikant verschieden, eine # zeigt an, dass die Nullhypothese zutrifft. Hanteln markieren zwei Datensätze, die im KS-Test verglichen wurden und sich von den anderen Zeitpunkten im Testergebnis unterscheiden, während bei einer Klammer alle Verteilungen bei einem Test das gleiche Ergebnis erhielten, was entsprechend mit * oder # markiert ist.

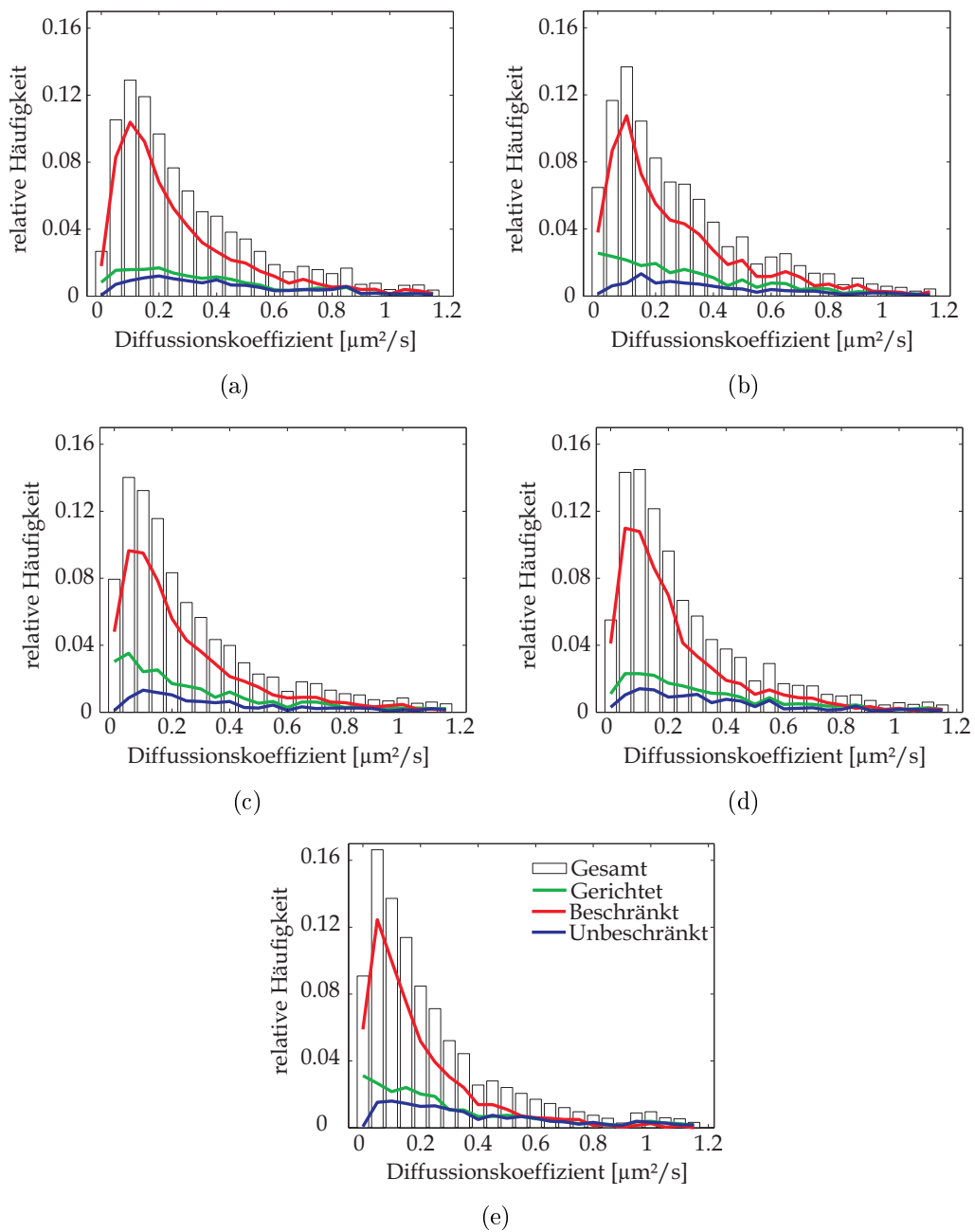


Abbildung 2.11: Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten der Rezeptorpartikel berechnet aus der MSS-Analyse für die Partikelverschiebung vor Stimulation (a), und (b) 5, (c) 10, (d) 30 und (e) 60 Minuten nach Stimulation in den gleichen H838 EpoR-T243N Zellen ($n=11$). Die Kurven zeigen die Anteile der Diffusionskoeffizienten, die von Partikeln mit unterschiedlichen Bewegungsformen stammen und durch MSS-Analyse bestimmt wurden.

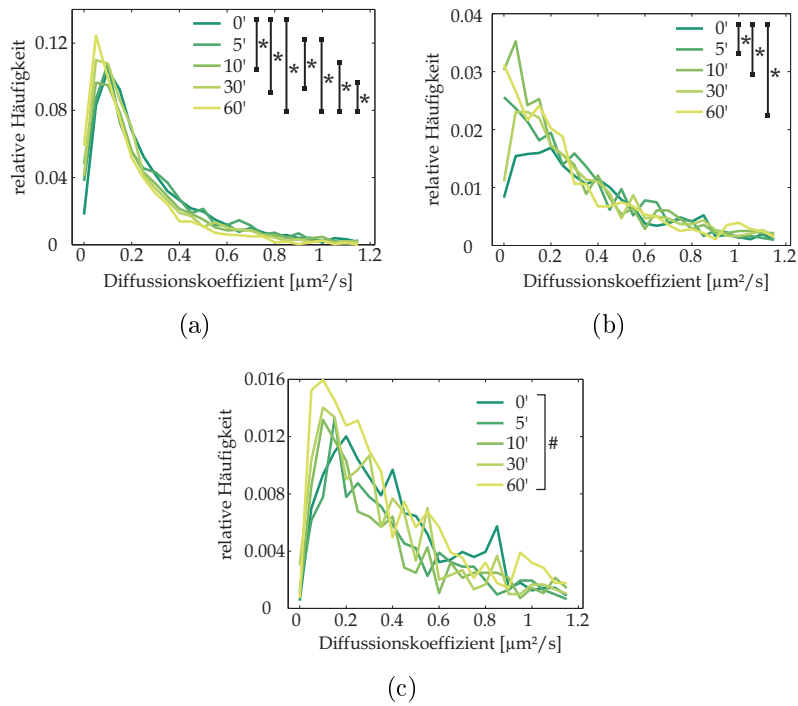


Abbildung 2.12: Anteile der Bewegungsklassen beschränkt (a), gerichtet (b) und unbeschränkt (c) an der Häufigkeitsverteilung der Diffusionskoeffizienten für die Messpunkte vor und bis 60 Minuten nach Stimulation in H838 EpoR-T243N Zellen. Der zwei-Proben Kolmogorow-Smirnow-Test klassifiziert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ die mit * markierte Verteilungen als signifikant verschieden, eine # zeigt an, dass die Nullhypothese zutrifft. Hanteln markieren zwei Datensätze, die im KS-Test verglichen wurden und sich von den anderen Zeitpunkten im Testergebnis unterscheiden, während bei einer Klammer alle Verteilungen bei einem Test das gleiche Ergebnis erhielten, was entsprechend mit * oder # markiert ist.

Abhängig von den drei verschiedenen Bewegungsklassen soll nun statt den Diffusionskoeffizienten die Verteilung der Intensitäten der Partikel betrachtet werden (Abb. 2.13). Bei unstimulierten H838 EpoR-wt Zellen haben beschränkt bewegende Partikel (rote Kurve) den größten Anteil (Abb. 2.13(a)). Nach 5 bzw. 10 Minuten verschiebt sich die Verteilung zu niedrigeren Intensitätswerten (Abb. 2.13(b) und 2.13(c)) dabei nimmt die Fraktion an Partikel aus Abb. 2.13(a) mit Intensitäten von 0,04 bis 0,06 ab. Gleichzeitig steigt der Anteil an sich gerichtet bewegender Partikel über die Messzeitpunkte bei 5 und 10 Minuten an. Die Fraktion zwischen einer Intensität von 0,04 bis 0,06 stellt sich nach 30min allmählich gegenüber den vorangegangenen Messzeitpunkten wieder her (Abb. 2.11(d)), wobei nach einer Stunde der Ausgangszustand erreicht ist (Abb. 2.11(e)). Diese Beobachtung wird durch Abbildung 2.14 unterstützt. Hier wurde für alle Verteilungen der KS-Test durchgeführt. Wie schon aus Abbildung 2.13 ersichtlich steigt der Anteil an gerichteter Bewegung mit der Stimulationsdauer an, während der Anteil unbeschränkter Bewegung weitestgehend gleich bleibt.

Im Gegensatz dazu zeigt der EpoR-T243N schon im gehungerten, unstimulierten Zustand einen höheren Anteil an Partikeln mit hoher Fluoreszenzintensität (Abb. 2.15(a)). Interessanterweise ist im Vergleich zu EpoR-wt ein höherer Anteil an gerichteter Bewegung zu beobachten. Fünf und 10 Minuten nach Stimulation mit rhEpo steigt hier der Anteil an Partikel mit mittlerer Fluoreszenzintensität (0,04 – 0,08AU) (Abb. 2.15(b), 2.15(c) und 2.16(b)). Beschränkte Partikelbewegung nimmt über den gesamten Messzeitraum ab. Die Nullhypothese des KS-Tests wird hier für alle Verteilungen gerichteter und beschränkter Bewegung verworfen, sie sind alle mit $p = 10^{-4}$ verschieden. Unbeschränkte Partikelbewegung bleibt sowohl bei EpoR-wt als auch bei EpoR-T243N weitestgehend unbeeinflusst von der Stimulation mit dem Liganden.

Um den Effekt des Liganden auf die Diffusionsgeschwindigkeit und die Fluoreszenzintensität von Partikeln unabhängig von deren Bewegungstyp besser betrachten zu können, wurden die Daten in Abhängigkeit ihrer Häufigkeit in einem Streudiagramm aufgetragen. Jeder Punkt stellt dabei farbkodiert eine normierte Anzahl an Trajektorien mit gleicher Intensität und Diffusionskoeffizienten dar. Für den EpoR-wt ist ersichtlich, dass die Häufigkeit höhere Intensitäten und schnellere Diffusionskoeffizienten anzunehmen nach Stimulation sinkt (Abb.2.17(b)). Gefolgt von der Abnahme der Partikelzahl (Tabelle 2.1), nimmt die Partikeldichte zwischen 5 und 10 Minuten nach Stimulation ab (Abb. 2.17(b)). Erst nach 30 Minuten steigt der Anteil der Partikel mit höheren Intensitäten sowie geringen Diffusionskoeffizient wieder (Abb. 2.17(d)) und nach einer Stunde über Anfangsniveau (Abb. 2.17(e)).

Wie schon aus den Diffusionskoeffizienten aus Tabelle 2.2 ersichtlich, sinkt der Diffusionskoeffizient für die Transmembranmutante EpoR-T243N (Abb. 2.18(c)). Allerdings in einem höheren Maße als im Vergleich zu EpoR-wt zum gleichen Zeitpunkt. Die Häufigkeit der Partikel mit niedrigerer Fluoreszenzintensität sinkt zu-

nächst nach Ligandenzugabe und steigt dann wieder an (Abb. 2.18(e)). Insgesamt ist die Verteilung für EpoR-T243N im Vergleich zu EpoR-wt nach Stimulation zu Partikeln geringerer Fluoreszenzintensität und kleinerem Diffusionskoeffizienten verschoben.

Der EpoR-wt und seine Transmembranmutante zeigen unterschiedliche Reaktionen auf den Liganden rhEpo im Zeitverlauf. Während der EpoR-wt sich in seinen Bewegungsklassen abhängig von deren Geschwindigkeit kaum ändert, reagiert der EpoR-T243N mit einer anteiligen Erhöhung langsamerer Diffusionskoeffizienten mit gerichteter und beschränkter Bewegung auf den Stimulus (Abb. 2.12). Werden die Bewegungsklassen in Abhängigkeit von den Fluoreszenzintensitäten betrachtet, zeigt EpoR-wt einen höheren Anteil an Partikeln mit niedriger Fluoreszenzintensität und gerichteter Bewegung 5 und 10 Minuten nach Stimulation (Abb. 2.13(b) und 2.13(c)). Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen aus Abbildung 2.17(b). Hier sinkt der Anteil der Partikel von möglichen Rezeptor-*Cluster* höherer Intensität nach Stimulus. Zusammen mit der sinkenden Anzahl an Rezeptorpartikeln an der Membran überhaupt kann davon ausgegangen werden, dass Rezeptoranhäufungen an der Membran ligandeninduziert internalisiert werden, während einzelne Rezeptoren, die sich schneller fortbewegen, zunächst an der Membran verbleiben. Die Zunahme der gerichteten Bewegung von dunkleren, schnelleren Partikeln nach Stimulation könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese gesteuert neue *Cluster* zur Internalisierung bilden. Zu späteren Zeitpunkten werden neue Rezeptoren an der Membran präsentiert, was sich durch steigende Partikelzahlen für EpoR-wt äußert (Abb. 2.17(d) und 2.17(e)). EpoR-T243N zeigt im Mittel höhere Diffusionskoeffizienten als der EpoR-wt zu allen Messzeitpunkten. Da der Anteil von Partikeln langsamer Diffusion (Abb. 2.11(b) und 2.11(c)) und mittlerer Intensität (Abb. 2.15(b) und 2.15(c)) nach Stimulation des EpoR-T243N steigt, könnte daraus eine ligandeninduzierte Zusammenlagerung der Rezeptoren abgeleitet werden. Im Vergleich zum EpoR-wt fehlt die Wiederkehr von Rezeptorpartikeln an die Membran nach 60 Minuten (Abb. 2.17(e)). Die Rezeptormutante EpoR-T243N scheint nicht im gleichen Ausmaß an die Zellmembran transportiert zu werden, was sich durch stetig sinkende Partikelanzahl äußert (Abb. 2.18(e) und Tab. 2.1).

Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, welche Elemente der Plasmamembran tatsächlich die Bewegung des Rezeptors beeinflussen und damit bestimmen können.

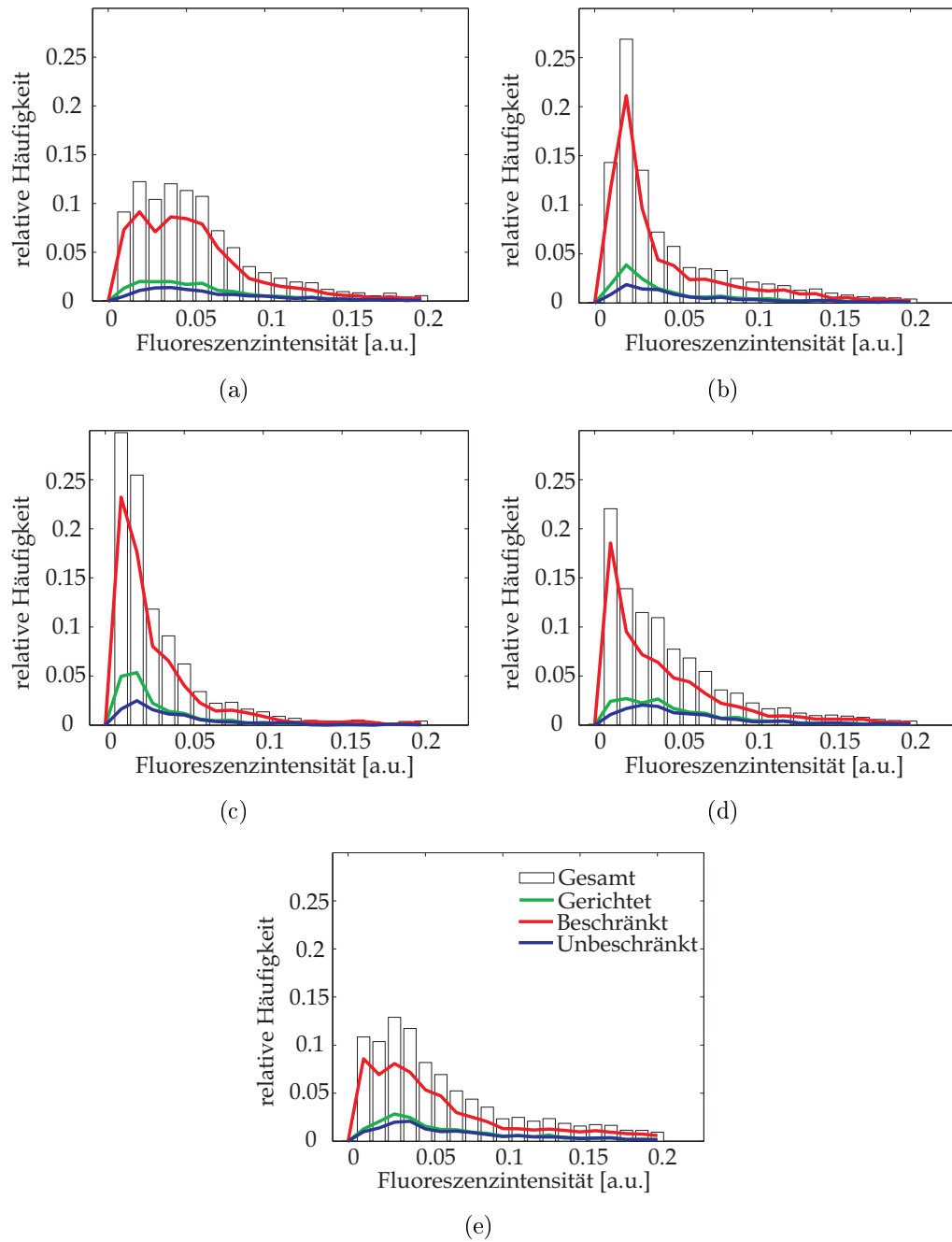


Abbildung 2.13: Häufigkeitsverteilung der Intensitäten der Rezeptorpartikel in den gleichen H838 EpoR-wt Zellen vor Stimulation (a), und (b) 5, (c) 10, (d) 30 und (e) 60 Minuten nach Stimulation ($n=9$). Die Kurven zeigen die Anteile der Intensitätswerte, die von Partikeln mit unterschiedlichen Bewegungsformen stammen.

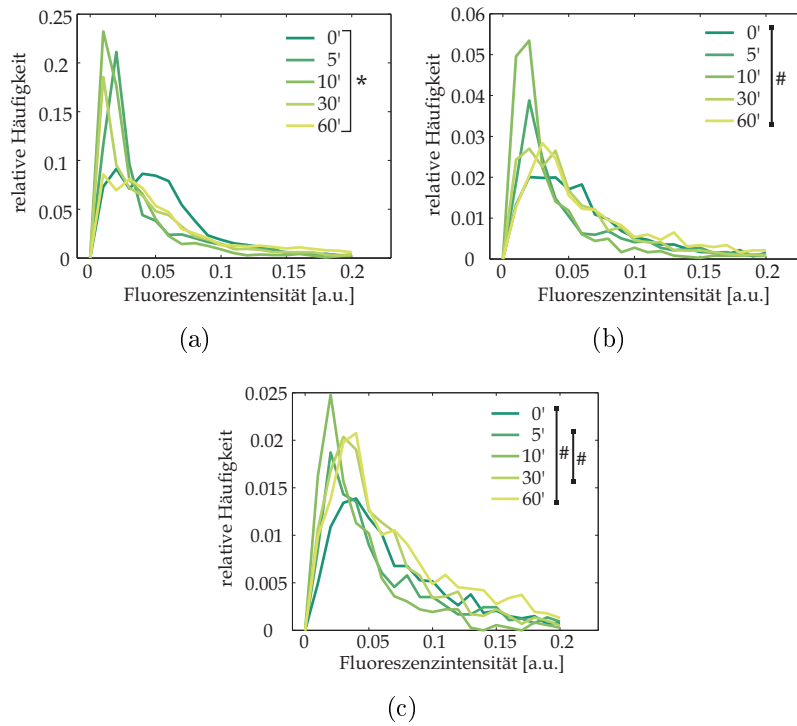


Abbildung 2.14: Anteile der Bewegungsklassen beschränkt (a), gerichtet (b) und unbeschränkt (c) an der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten für die Messpunkte vor und bis 60 Minuten nach Stimulation in H838 EpoR-wt Zellen. Der zwei-Proben Kolmogorow-Smirnow-Test klassifiziert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ die mit * markierte Verteilungen als signifikant verschieden, eine # zeigt an, dass die Nullhypothese zutrifft. Hanteln markieren zwei Datensätze, die im KS-Test verglichen wurden und sich von den anderen Zeitpunkten im Testergebnis unterscheiden, während bei einer Klammer alle Verteilungen bei einem Test das gleiche Ergebnis erhielten, was entsprechend mit * oder # markiert ist.

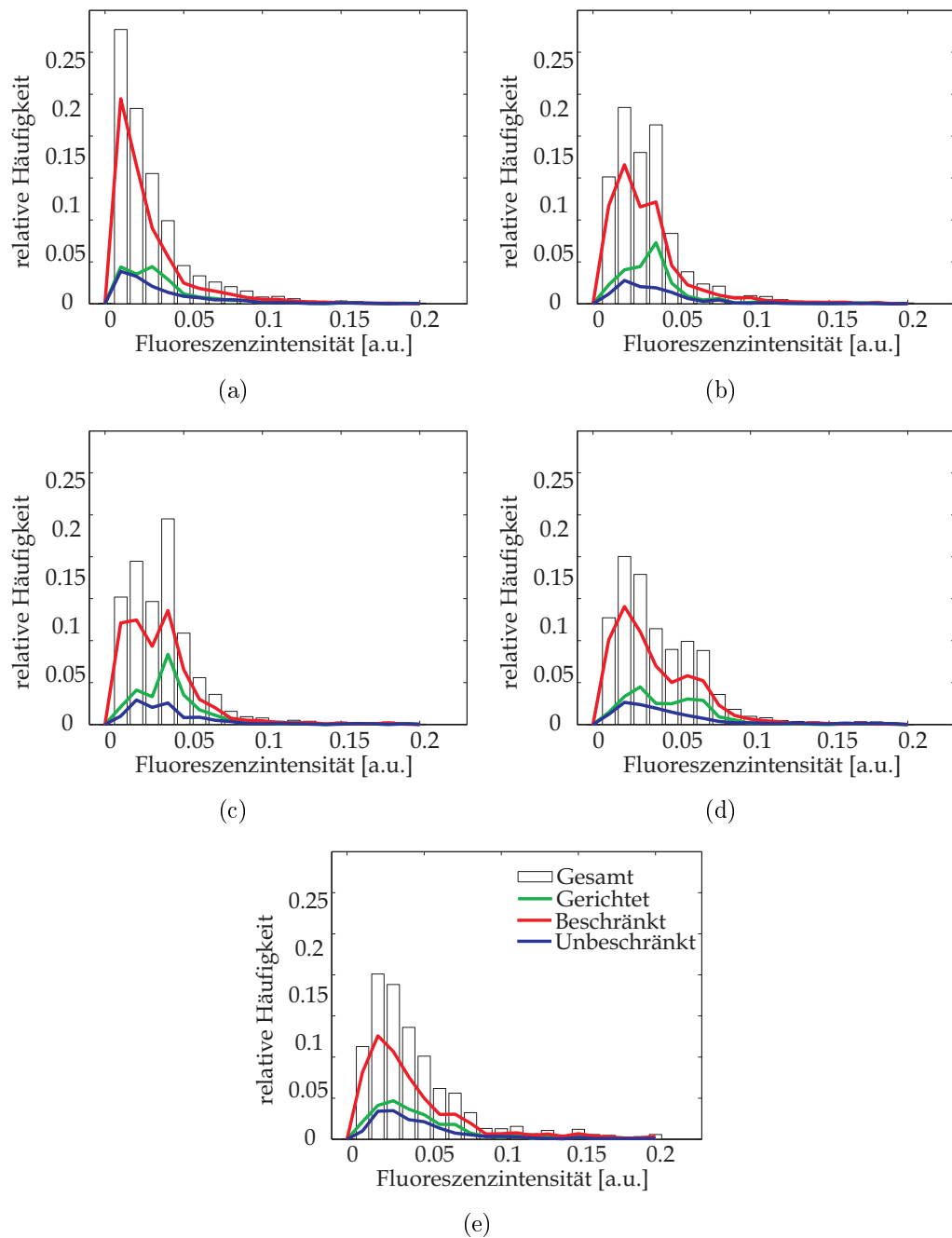


Abbildung 2.15: Häufigkeitsverteilung der Intensitäten der Rezeptorpartikel in den gleichen H838 EpoR-T243N Zellen ($n=11$) vor Stimulation (a), und (b) 5, (c) 10, (d) 30 und (e) 60 Minuten nach Stimulation. Die Kurven zeigen die Summe der Häufigkeiten im Balkendiagramm und die Anteile der Intensitätswerte, die von Partikeln mit unterschiedlichen Bewegungsformen stammen.

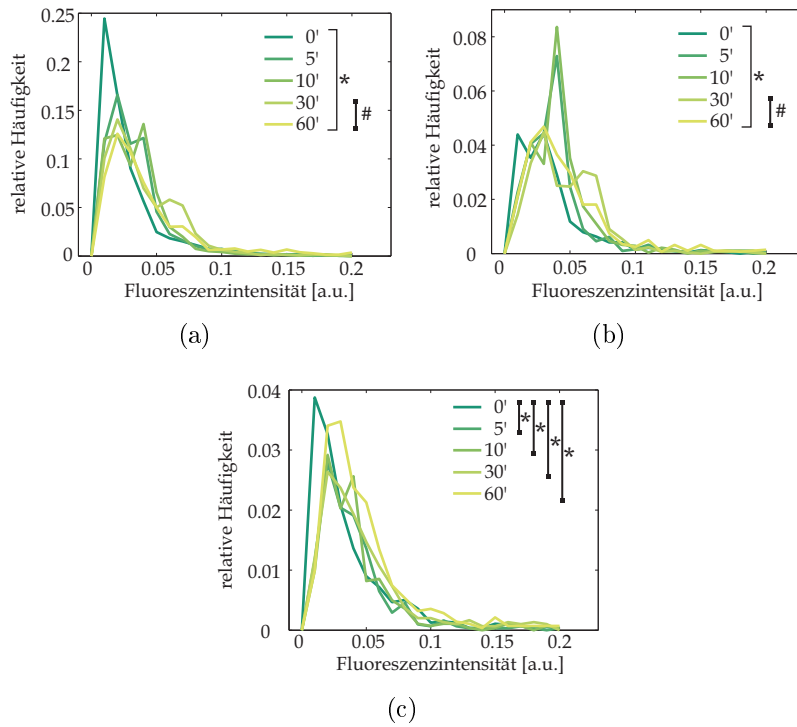


Abbildung 2.16: Anteile der Bewegungsklassen beschränkt (a), gerichtet (b) und unbeschränkt (c) an der Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten für die Messpunkte vor und bis 60 Minuten nach Stimulation in H838 EpoR-T243N Zellen. Der zwei-Proben Kolmogorow-Smirnow-Test klassifiziert mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 10^{-4}$ die mit * markierte Verteilungen als signifikant verschieden, eine # zeigt an, dass die Nullhypothese zutrifft. Hanteln markieren zwei Datensätze, die im KS-Test verglichen wurden und sich von den anderen Zeitpunkten im Testergebnis unterscheiden, während bei einer Klammer alle Verteilungen bei einem Test das gleiche Ergebnis erhielten, was entsprechend mit * oder # markiert ist.

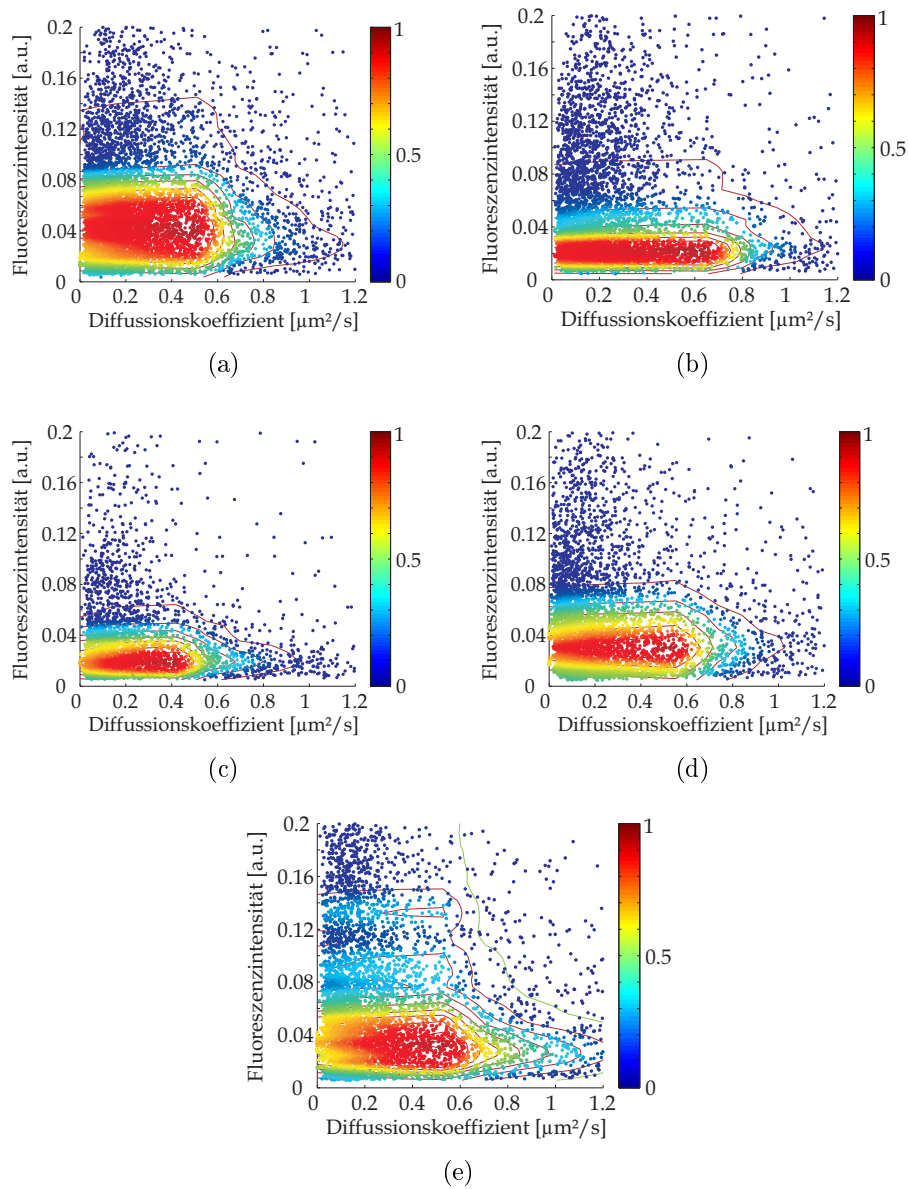


Abbildung 2.17: Verteilung der Fluoreszenzintensität gegen die Diffusion des zugehörigen Partikels in 9 unstimulierten H838 EpoR-wt Zellen (a), sowie 5 Minuten (b), 10 Minuten (c), 30 Minuten (d) und 60 Minuten (e). Die Farbskala zeigt die relative Häufigkeit an, mit der ein Punkt der Abbildung in den Daten vertreten ist.

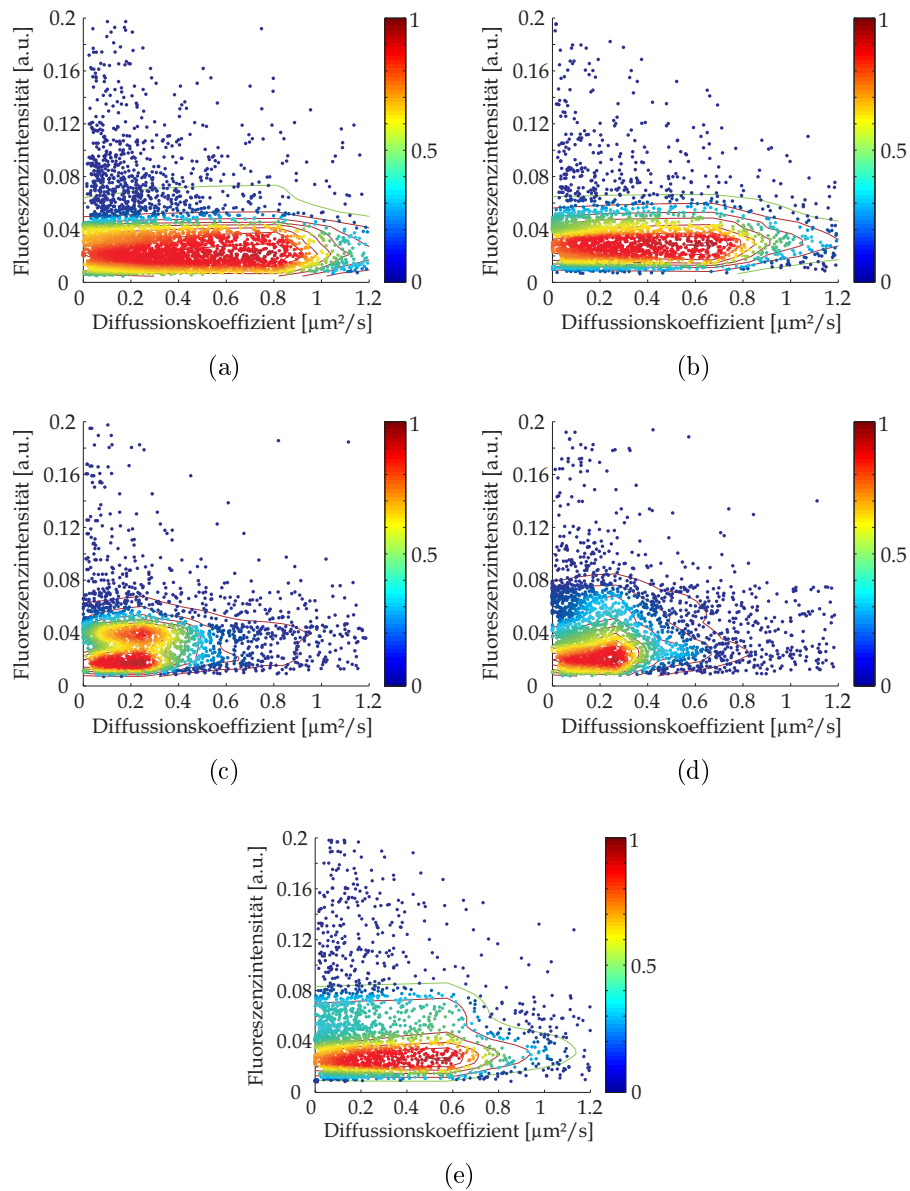


Abbildung 2.18: Verteilung der Fluoreszenzintensität gegen die Diffusion des zugehörigen Partikels in 11 unstimulierten H838 EpoR-T243N Zellen (a) sowie 5 Minuten (b), 10 Minuten (c), 30 Minuten (d) und 60 Minuten (e).

2.1.4 Charakterisierung der Aktivität des EpoR

Nachdem beobachtet werden konnte, wie die Rezeptoren in der Membran vorliegen und wie sie auf Ligandenstimulus reagieren, soll durch die Beeinflussung des Zellmembranaufbaus und der Endozytose beobachtet werden, welche Mechanismen an der Umverteilung des EpoR in der Membran Anteil haben.

Dies wurde durch die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Chemikalien, die als Inhibitoren auf Bausteine der Membran wirken, ermöglicht. Dabei wurden Inhibitoren gewählt, die Elemente des Zytoskeletts hemmen oder auflösen (Blebbistatin, Latrunculin B und Nocodazol), die Endozytose beeinflussen (Dynasore) oder die Lipidzusammensetzung der Membran verändern (Methyl- β -Cyclodextrin).

Dazu sind die über Nacht in Kulturmedium ohne Phenolrot gehaltenen Zellen in L15-Medium überführt, mit den entsprechenden Chemikalien behandelt und im Anschluss mit $0,2\mu M$ SiR-Halo gefärbt worden. Daraufhin wurde die Verteilung der fluoreszenzmarkierten Rezeptoren an der basalen Membran der behandelten Zellen mittels TIRFM gemessen (siehe zum Messprotokoll Kap. 4.4).

Blebbistatin inhibiert selektiv die Myosin II Aktivität [KTH⁺04] indem es den Myosinkopf gebunden an Aktin blockiert und hemmt damit seine weitere Kontraktilität. Der Aktomyosinkomplex dient der motorisierten Bewegung in Zellen entlang des Aktinnetzwerks auch im Membranbereich über kurze Distanzen.

Latrunculin B bindet in einem stöchiometrischen Komplex an Aktinmonomere und verhindert dessen Polymerisation zu F-Aktin [YSB⁺00].

Nocodazol zerstört Mikrotubuli durch Bindung an β -Tubulin und verhindert die Bildung zweier Disulfidbrücken zwischen zwei Ketten und damit die Mikrotubulibewegung [LR91]. Ein Effekt auf den Diffusionskoeffizienten und die Bewegungsklassen des EpoR durch diese drei Inhibitoren würde bedeuten, dass dessen Verteilung aktiv durch die Membranstruktur, die durch das Zytoskelett bewirkt wird, verändert wird.

Dynasore blockiert innerhalb von Sekunden die Bildung von umhüllten Vesikeln, indem es Dynamin hemmt, und damit die Endozytose, wobei zwei verschiedene Arten von Grübchen an der Plasmamembran verbleiben, wie durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt werden konnte [MEM⁺06]. Für den Zytokinerezeptor γc ist bekannt, dass dieser dynaminabhängige Internalisierungsprozesse durchläuft [SDDV05].

Methyl- β -Cyclodextrin(M β CD) entzieht der Membran Cholesterol, indem es aufgrund seines hydrophoben Hohlraums Einschlussverbindungen mit dem apolaren Cholesterol eingeht, wodurch dessen Löslichkeit erhöht wird. In behandelten Zellen führt das entzogene Cholesterol zur Auflösung von *lipid rafts* oder unterbindet dessen Bildung [RSG⁺99, SKH⁺12].

Abbildung 2.19 zeigt die Wahrscheinlichkeiten mit denen Rezeptorpartikeln den drei Bewegungsklassen angehören. Im Gegensatz zu Abbildung 2.7 sind die Zellen hier in Medium mit Serum kultiviert worden. Der EpoR-T243N zeigt in

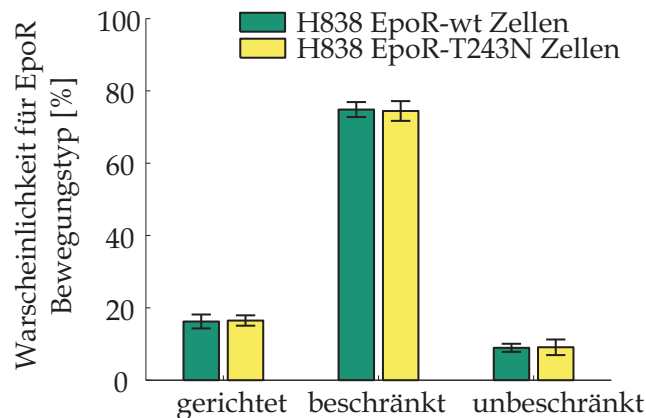


Abbildung 2.19: Wahrscheinlichkeit des EpoR verschiedene Bewegungsmodi zu erfahren. Dargestellt sind H838 EpoR-wt-Halo ($n=12$ Zellen) in grün und H838 EpoR-T243N-Halo ($n=5$ Zellen) in gelb. Fehlerbalken: mittlerer Standardfehler aus 200 Bootstraps.

Abbildung 2.19 17,5% gerichtete Bewegung, 73% beschränkte und 8,5% unbeschränkte Diffusion. Mit 16,1%, 75,2% und 8,7% befindet sich der EpoR-wt im gleichen Bereich.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Bewegung des EpoR vom Zytoskelett abhängig ist. Um zu überprüfen, ob der gerichtete Anteil der Rezeptorbewegung vom Aktomyosin des kortikalen Netzwerks abhängig ist und ob dies einen Effekt auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Rezeptors hat, wurden die H838 EpoR-wt und EpoR-T243N Zellen für 10min mit $10\mu M$ **Blebbistatin** behandelt. Beide Rezeptoren der jeweils behandelten Zellen zeigen einen Anstieg des Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu unbehandelten (Tab. 2.3). Unbeschränkte Diffusion nimmt dabei bei EpoR-wt um 8% zu, während beschränkte Diffusion um 11% abnimmt. Im Falle von EpoR-T243N sind es entsprechend 6,3% und 6,4% (Abb. 2.21(a)). Blebbistatin hat aber nur einen geringen Einfluss auf die gerichtete Bewegung des Rezeptors.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bewegung durch **Latrunculin B** beeinflusst wird. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit $10\mu M$ Latrunculin B behandelt um Aktin zu depolymerisieren. Die relativ kurze Inkubationszeit stellt sicher, dass das Aktin nur partiell fragmentiert wird, so dass genügend funktionales Aktin verbleibt um die Zelladhäsion zu bewerkstelligen. Zwar erhöht sich der Diffusionskoeffizient bei beiden Rezeptoren leicht für EpoR-wt und EpoR-T243N auf $0,177\mu m^2/s$ bzw. $0,176\mu m^2/s$, doch ist auch hier der Einfluss auf die gerichtete Bewegung gering (Abb. 2.21(b)). Abbildung 2.20 zeigt fixierte Zellen mit und ohne Behandlung mit Latrunculin B und dessen Auswirkung auf die Rezeptorverteilung und auf das Aktinzytoskelett. Dabei wurde der EpoR mit SiR-Halo gefärbt und anschließend fixiert. Daraufhin wurde Aktin mit Phalloidin-Atto565 gefärbt. Erkennbar ist, dass Latrunculin B keinen Einfluss auf die Verteilung der

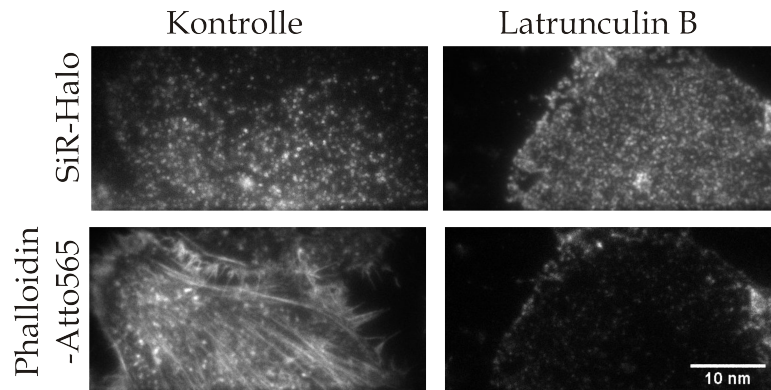


Abbildung 2.20: TIRF-Messungen der Wechselwirkung des *EpoR* mit dem Aktinzytoskelett. Zellen wurden mit *Latrunculin B* behandelt, anschließend der *EpoR* mit *SiR-Halo* markiert und nach Fixierung wurde Aktin mit *Phalloidin-Atto565* gefärbt.

Rezeptoren hat, während deutlich die Auswirkungen auf das Aktinzytoskelett zu erkennen sind.

In Einklang mit diesen Ergebnissen zeigt auch die Behandlung der Zellen mit **Nocodazol** bei *EpoR*-wt keinen Effekt auf die gerichtete Bewegung des Rezeptors. *Nocodazol* zerlegt Mikrotubuli und verringert den Anteil gerichteter Rezeptorbewegung im Falle des *EpoR*-T243N hingegen um 7%. Während beschränkte Bewegungsanteile um 11% steigen (Abb. 2.21(b)). Der Diffusionskoeffizient bleibt innerhalb der Fehlergrenzen auf Ausgangsniveau.

Dynasore ist der Inhibitor von *Dynamin*, welches für die Einschnürung von *Clathrin*-umhüllte Vesikel an der Plasmamembran verantwortlich ist. Doch kann *Dynasore* auch bei *Clathrin*-unabhängigen Prozessen eine Rolle spielen, wie für den *Interleukin 2*-Rezeptor gezeigt werden konnte [LDB⁺01]. Durch Inhibierung verbleiben die Grübchen an der Plasmamembran ohne abgeschnürt werden zu können; die Endozytose wird unterbunden. Für *EpoR*-wt steigt der Anteil beschränkter Diffusion nach Behandlung mit $80\mu M$ *Dynasore* für 30 Minuten (Abb. 2.21(b)) und der Diffusionskoeffizient sinkt bei *EpoR*-T243N auf $0,10 \pm 0,08$.

Als nächstes wurden die Zellen mit $10mM$ **M β CD** für 15 Minuten inkubiert. *M β CD* vermindert den Cholesterolgehalt in der Zellmembran indem es Einschlusskomplexe bildet und unterbindet damit die Bewegung von *lipid rafts*. Der Diffusionskoeffizient erhöht sich für beide Rezeptortypen im Vergleich zu allen verwendeten Inhibitoren am stärksten ($D_{EpoR-wt} = 0,24 \mu m^2/s$ und $D_{EpoR-T243N} = 0,26 \mu m^2/s$), wobei gleichzeitig der Anteil beschränkter Bewegung abnimmt (9% für *EpoR*-wt und 10,5% für *EpoR*-T243N).

Die durchgeführten Experimenten zeigen, dass das Zytoskelett keinen Einfluss auf die Rezeptorbewegung in der Membran zu haben scheint. Weder die Depolymerisation von F-Aktin (Abb.2.20) oder Mikrotubuli, noch die Inhibition von *Myosin II* beeinflussen die Rezeptorbewegung. Was gegen Bewegung des

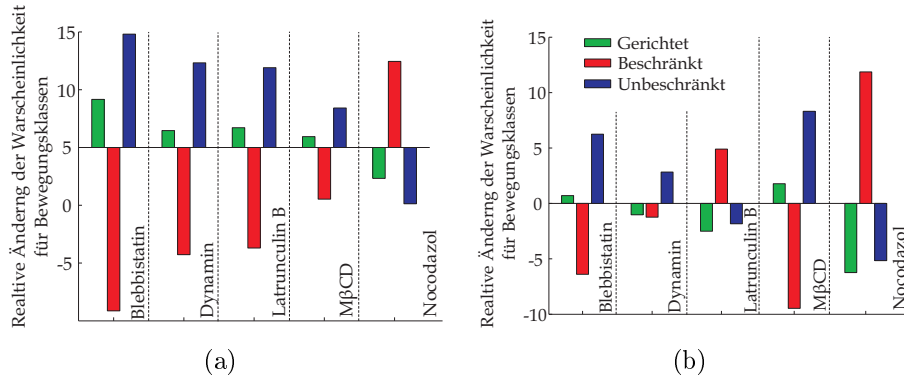


Abbildung 2.21: Relative Änderung der Wahrscheinlichkeit bestimmte Bewegungsmodi zu erreichen. Gezeigt ist die Änderung in Prozent relativ zum gehungerten, unstimulierten Zustand aus Abb. 2.19 in (a) H838 EpoR-wt Zellen und (b) H838 EpoR-T243N Zellen.

Rezeptors durch Motorproteine in der Membran spricht und bislang häufig als Indikator für die vom Zytoskelett abhängige *Cluster*-Bildung, die von Motorproteinen verursacht wird, gesehen wurde [SFHC03, JKT⁺11]. Methyl- β -Cyclodextrin verursacht hingegen den größten Effekt auf die Rezeptorbewegung: Die Diffusionskoeffizienten steigen signifikant an und der Anteil beschränkter Bewegung nimmt ab. Ein Hinweis darauf, dass die Rezeptorverteilung Cholesterol und damit *lipid raft* abhängig sind.

	EpoR-wt	n_{wt}	EpoR-T243N	n_{T243N}
unbehandelt	$0,13 \pm 0,06$	12	$0,16 \pm 0,07$	5
Blebbistatin	$0,22 \pm 0,08$	10	$0,21 \pm 0,09$	9
Latrunculin B	$0,18 \pm 0,08$	9	$0,18 \pm 0,08$	9
Dynasore	$0,18 \pm 0,06$	10	$0,10 \pm 0,08$	9
Nocodazol	$0,17 \pm 0,07$	10	$0,15 \pm 0,07$	8
M β CD	$0,24 \pm 0,08$	10	$0,26 \pm 0,04$	10

Tabelle 2.3: Diffusionskoeffizienten (Median in $\mu\text{m}^2/\text{s} \pm$ Interquartile von 68% der Daten) der Rezeptorpartikel berechnet aus der MSS-Analyse für die Partikelverschiebung in H838 EpoR-wt-Halo/EpoR-T243N-Halo Zellen behandelt mit fünf verschiedenen Chemikalien. n bezeichnet die berücksichtigte Zellzahl.

2.1.5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie des Wildtyp-EpoR und seiner Mutante auf Einzelmolekülebene zeigt eine Änderung in der Dynamik des Rezeptors nach Ligandenstimulus. Die Analyse der Komponentenanzahl lässt vermuten, dass der Rezeptor sich nach Ligandenbindung an Stellen an der Membran mit höherer Rezeptordichte aufhält, was sich durch steigende Anteile höherer Komponenten nach Stimulation widerspiegelt (Abb. 2.4). Gegenüber EpoR-wt zeigt der EpoR-T243N eine ausgeprägtere Reaktion auf Stimulation in Bezug auf die Änderung seiner Bewegungsform, was sich durch höheren Anteil an gerichteter Bewegung 5 Minuten nach Aktivierung des Rezeptors äußert (Abb. 2.15). Als Ursache können schnellere Internalisierungsraten oder die Bildung höherer Komponenten, wie in Abbildung 2.5(d) gezeigt werden konnte, in Betracht gezogen werden. rhEpo hat keinen Einfluss auf den mittleren Diffusionskoeffizienten an der Membran. Es zeigt sich aber eine Veränderung der Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit von der Bewegungsform. Nach Stimulation steigt der Beitrag gerichteter Bewegung für beide Rezeptoren bei schnellen Diffusionszeiten. Für EpoR-T243N wird eine zweite Fraktion nach Stimulation bei mittlerer Fluoreszenzintensität sichtbar. Die Analyse der Häufigkeit von Partikeln mit gleicher Fluoreszenzintensität und gleichem Diffusionskoeffizienten zeigt, dass der EpoR-wt eine Stunde nach Stimulation wieder vergleichbare Menge an Rezeptoren an der Membran präsentiert wie vor Stimulation (Abb. 2.17). Die Zellen mit der Transmembranmutante EpoR-T243N scheinen nicht im gleichen Ausmaß dazu befähigt, Rezeptoren nach Ligandenbindung an die Membran zu transportieren, was sich in sinkenden Partikelzahlen über den Messzeitraum äußert (Abb. 2.18). Die Rezeptorbewegung in der Membran scheint nicht vom Zytoskelett abhängig zu sein, ist aber auf Cholesterol in der Membran angewiesen und damit nach gängiger Meinung mit *lipid rafts* assoziiert.

Folgendes Kapitel beschreibt die Transportmechanismen des EpoR in einzelnen Zellen. Das Projekt wurde in Kooperation mit Stefan Kallenberger aus der Arbeitsgruppe für Theoretische Systembiologie (Prof. Roland Eils, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt. Abschnitt 2.2.3 fasst die Ergebnisse der mathematischen Modellierung von S. Kallenberger kurz zusammen.

2.2 Zell-zu-Zell Heterogenität des EpoR-Transports

Eine Vielzahl von Bestandteilen des EpoR-Signalweges konnten durch molekularbiologische oder biochemische Methoden bereits aufgedeckt werden (Kapitel 1.2). Allerdings zeigen diese Methoden wiederum ein statisches Bild des eigentlich wesentlich komplexeren, dynamischen Prozesses der Signaltransduktion. Diese Darstellung genügt also nicht, um verstehen zu können, wie Signaltransduktionswege auf höherer Ebene reguliert werden oder welche Einflussgröße hauptsächlich ihre Dynamik bestimmt. Bislang konnte die Änderung des EpoR-Transportes und die durch Epo ausgelöste Zellantwort umfassend durch ODE-Modelle auf Basis von Zellpopulationen charakterisiert werden (Kapitel 1.2 und 1.3). Doch wurde dabei das heterogene Verhalten von Zellen und deren unterschiedlichen kinetischen Parameter nicht berücksichtigt. Um die Frage zu beantworten, welche Prozesse im Transport des EpoRs und seinem Liganden Epo für zelluläre Variabilität verantwortlich sind, wurden quantitative Einzelzellmessungen an Adenokarzinomzellen durchgeführt. Für die Experimente wurde ein konfokaler Versuchsaufbau gewählt, der es ermöglicht die fluoreszenzmarkierten Proteine EpoR und Epo zeitabhängig in verschiedenen Kompartimenten einzelner Zellen zu lokalisieren. Die erhaltenen Proteinkonzentrationen konnten zur Kalibrierung kinetischer Modelle des EpoR-Transports auf Einzelzellebene genutzt werden.

2.2.1 Validierung der hergestellten stabilen Zelllinien

Zur Untersuchung der Transportprozesse des EpoR wurde, wie in Kapitel 2.1, die humane Adenokarzinomzelllinie H838 gewählt. Um den Rezeptor durch ein Fluoreszenzsignal verfolgen zu können, wurde das von U.Klingmüller freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid pMOWS-EpoR-GFP [KHO⁺02, Bec07] verwendet. Das Konstrukt konnte mittels retroviraler Transduktion in die Zellen eingebracht werden (Kapitel 4.1.3). Der große Vorteil des fluoreszenten Proteins gegenüber einer *tag*-Markierung in dieser Versuchsreihe ist, dass das Protein im Unterschied zum organischen Farbstoff im Falle einer Degradation gleichzeitig mit dem Rezeptor-Protein von der Zelle abgebaut wird. Die im Vergleich zu Fluoreszenzfarbstoffen schlechtere Photostabilität von fluoreszenten Proteinen konnte durch die Verwendung eines *Spinning-Disk*-Aufbaus kompensiert werden (siehe dazu 1.1.2).

Daraufhin konnte die transduzierte Zelllinie mit einem Fusionsprotein aus

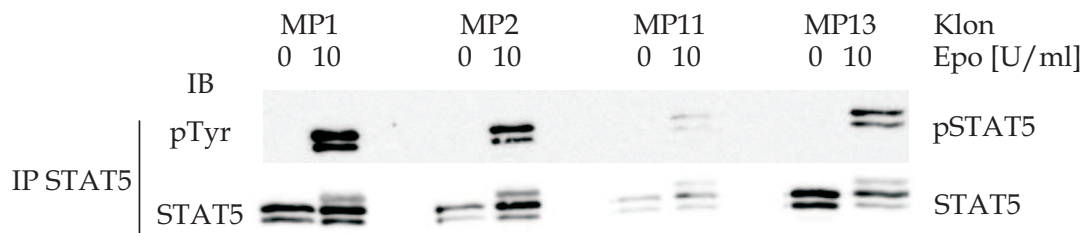


Abbildung 2.22: STAT5-Aktivierung in EpoR-GFP und MyrPalm-mCherry exprimierenden H838 Klonen. 4 Klone aus H838-Zellen, die stabile EpoR-GFP und MyrPalm-mCherry exprimieren, blieben unbehandelt oder wurden mit 10U/ml Epo für 10min stimuliert. Die erhaltenen Zelllysate wurden einer Immunopräzipitation (IP) durch Antikörper anti-STAT5 unterzogen und durch 10%SDS-PAGE aufgetrennt. Durch ein Immunoblot (IB) mittels anti-Phosphotyrosin-Antikörpern werden die aktivierten Proteine dargestellt. Danach wurde die Gesamtmenge des Proteins mit anti-STAT5 Antikörpern nachgewiesen.

Myristoylierungs-Palmitoylierungs-Domäne und dem fluoreszenten Proteine mCherry (MyrPalm-mCherry) transfiziert werden. Das Plasmid gleicht dem in Beaudouin et al. verwendeten Konstrukt [BLA⁺13]. Ihm fehlt allerdings die Spaltungsstelle; dadurch ist es nach Faltung ein ständiger Bestandteil der Membran und ermöglicht die spätere Segmentierung der Membran zur Bestimmung der Kompartimente. Aufgrund der transienten Transfektion konnten für MyrPalm-mCherry unterschiedliche Expressionsstärken erzielt werden. Vier Klone, die ein genügendes Membransignal aufwiesen, wurden auf die einwandfreie Induktion der Signaltransduktion durch Epo getestet. Die Bindung von Epo am EpoR bewirkt durch eine Konformationsänderung, welche zur Rekrutierung und Phosphorylierung von JAK2 führt, letztendlich die Phosphorylierung von STAT5 (pSTAT5). Aufgrund dessen konnte pSTAT5 durch ein Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 2.22).

Um nur die durch Epo erzeugte Phosphorylierung zu messen, wurden die Zellen 12 Stunden ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Ohne Behandlung oder nach 10-minütiger Stimulation mit 10 U/ml Epo wurden Zelllysate hergestellt und eine Immunopräzipitation gegen STAT5 durchgeführt. Der in Abbildung 2.22 gezeigte Immunoblot wurde zunächst mit anti-Phosphotyrosin- und anschließend mit anti-STAT5-Antikörper entwickelt (siehe Kapitel 4 für Details). Es ist zu erkennen, dass nicht alle Klone eine gleich hohe Phosphorylierungsniveau erreichen. Möglicherweise steht eine übermäßige Expression von MyrPalm-mCherry an der Zellmembran einer kritischen Zahl an EpoR-GFP im Wege, die für eine ungestörte Signalweiterleitung notwendig ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Klon MP1 das höchste Phosphorylierungslevel aufweist und wurde daher für weitere Experimente gewählt. Das rhEpo wurde mittels Periodat-Reduktion an das Hydrazid Cy5.5 gekoppelt (siehe dazu Kapitel 4.3).

2.2.2 Bestimmung der Rezeptorbewegung zwischen Zellkompartimenten

Um die Prozesse der Internalisierung und des intrazellulären Transports des EpoR zeitaufgelöst in einzelnen lebenden Zellen beobachten zu können, fand der in Kapitel 4 beschriebene *Spinning Disk*-Mikroskop Aufbau Verwendung. 20.000 H838-Zellen, welche GFP-markiertes EpoR und mCherry-markierte MyrPalm-Domäne stabil exprimieren, wurden am Vortag in eine 8-well *Lab-Tek*-Messkammern überführt und 5 Stunden vor dem Experiment in Medium ohne Wachstumsfaktoren kultiviert. Nach Messung des ersten Zeitpunktes wurde der Messkammer 4,2nM Epo-Cy5.5 hinzugefügt, was einer enzymatischen Aktivität von 10U/ml entspricht. Über einen Zeitraum von insgesamt 6 Stunden wurde pro Gesichtsfeld für jeden Zeitpunkt ein Stapelbild aus 26 Einzelbildern mit einer Schichtdicke von 0,7 μ m aufgenommen, um das gesamte Zellvolumen im Verlauf des Experiments abbilden zu können. In den ersten 30 Minuten wurde ein höheres Messintervall von 5 Minuten gewählt, während später alle 10 Minuten ein Stapelbild aufgenommen wurde.

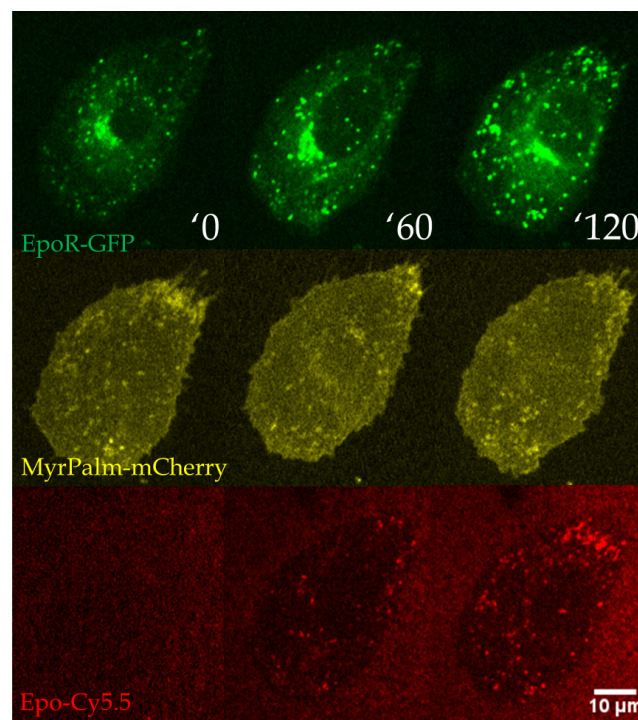


Abbildung 2.23: Internalisierung von EpoR-GFP und EpoCy-5.5 in H838-Zellen. Gezeigt sind einzelne Ebenen eines Bildstapels für unterschiedliche Zeitpunkte in Minuten. 10U/ml Epo-Cy5.5 wurde nach $t = 0'$ hinzugegeben und Bildstapel über 6 Stunden aufgenommen.

In Abbildung 2.23 ist von mehreren Zeitpunkten eine Ebene solch eines Sta-

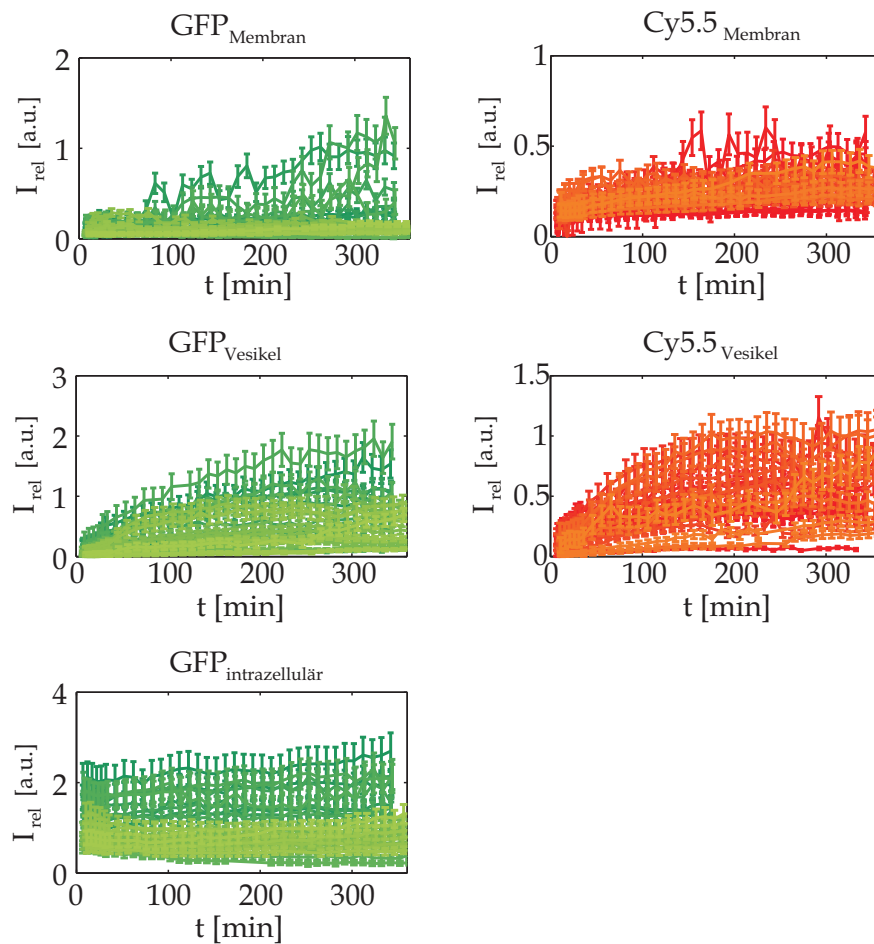


Abbildung 2.24: Fluoreszenzintensitäten der Einzelzelltrajektorien in den verschiedenen Kompartimenten der Zellen: Membran, Vesikel und intrazelluläres Kompartiment ($n=25$)

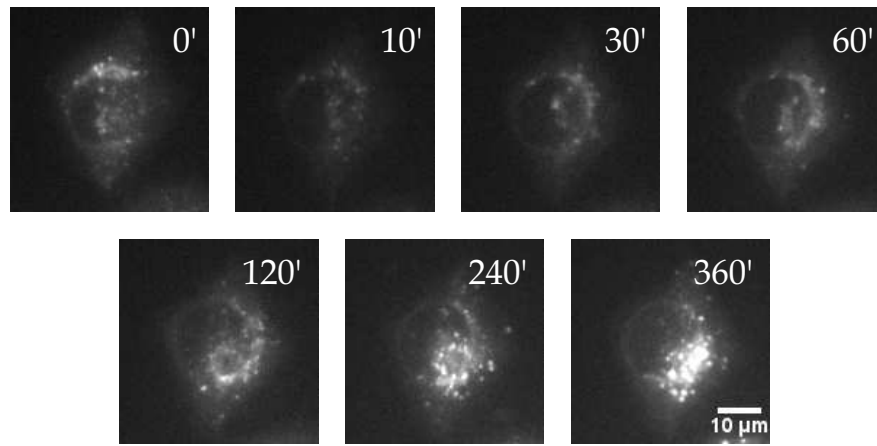
pelbildes aus einer Messung nach Stimulation mit Epo-Cy5.5 am *Spinning Disk*-Mikroskop gezeigt. Der in Abbildung 2.24 gezeigte Datensatz umfasst $n = 25$ Zellen und stellt die Intensitätsänderung in den segmentierten Kompartimenten an Epo-Cy5.5 und EpoR-GFP dar. Während die Intensität im intrazellulären Pool der Zellen für Epo-GFP nur leicht ansteigt, zeigt sich ein starker Zuwachs an endozytierten Vesikeln, die an Epo-Cy5.5 gebundenen EpoR enthalten.

Neben der Messung der Epo-abhängigen Internalisierung und des Transports des Rezeptors wurden weitere Messungen zur Bestimmung der Synthese- und Degradationsgeschwindigkeit des Rezeptors durchgeführt. Zur Erhebung der Syntheseraten wurden das Fluoreszenzsignal des EpoR-GFP im FRAP-Aufbau nach dem ersten Messzeitpunkt gebleicht (siehe hierzu Kapitel 1.1.3) und die Wiederkehr des Signal, entsprechend also die Menge an neu synthetisierten Rezeptoren, in einem Zeitraum von 6 Stunden gemessen (Abb. 2.25). Die Fluoreszenzbilder

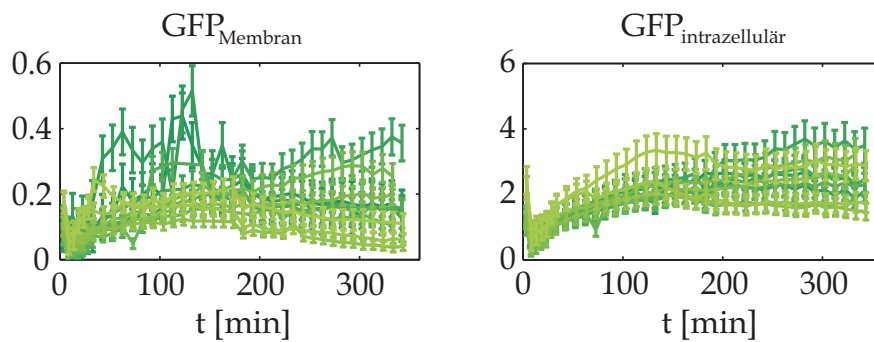
zeigen die Intensität der unbehandelten Zelle am Zeitpunkt 0' und die vollständige Wiederherstellung von selbigen nach circa 2 Stunden. Um die Degradationsrate des Rezeptors zu quantifizieren, wurde die Zellen mit $2,5\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt und quantifiziert das abklingende Fluoreszenzsignal von EpoR-GFP ebenfalls im gleichen Zeitraum (Abb. 2.26). Cycloheximid gehört zu der Gruppe der Glutarimid-Antibiotika und unterbindet die Proteinbiosynthese, indem es unter anderem die Bindung von Aminoacetyl-tRNA am Ribosomen verhindert. Es kann also der Abbau des Rezeptors beobachtet werden wie in Abbildung 2.26(a) dargestellt.

Die erhaltenen Mikroskopiedaten wurden mit Hilfe des in Kapitel 4.5 näher beschriebenen Segmentierungsprogramm in *MATLAB* ausgewertet [Kal14]. Schwellwert abhängig konnten folgende Probenbereiche innerhalb der Zelle bestimmt werden: die Membranregion, EpoR-GFP enthaltene Vesikel, Epo-Cy5.5 Vesikel sowie Vesikel, die sowohl EpoR-GFP als auch Epo-Cy5.5 enthalten (Abb. 2.24). Die Schwellwerte zur Segmentierung wurden manuell bestimmt, indem Voxel verschiedenen Probenbereichen zugeordnet und Intensitätsschwellwerte festgelegt wurden, die notwendig waren, um Regionen voneinander zu unterscheiden. Wie beispielsweise in Abbildung 2.23 ersichtlich, ist MyrPalm-mCherry in vielen Zellen nicht nur auf die Membran beschränkt. Um Artefakte zu vermeiden, wurde das mCherry-Signal dazu verwendet, die Zelle als Ganzes im Bildvolumen zu erkennen. Die Außenlinie des Zellbereichs wurde mit einer Dicke von $1\mu\text{m}$ als Membranregion definiert. Die Volumina aller Probenbereiche sowie des Zytoplasmas wurden bestimmt um Konzentrationen aus den segmentierten Daten abschätzen zu können.

Da mit Hilfe des Segmentierungsprogramms neben den Intensitäten in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle auch deren Volumen bestimmt werden konnte, war es nun möglich die Konzentration von Rezeptor und Ligand zu betrachten, die im folgenden Kapitel mit Modellvariablen verknüpft werden konnten.

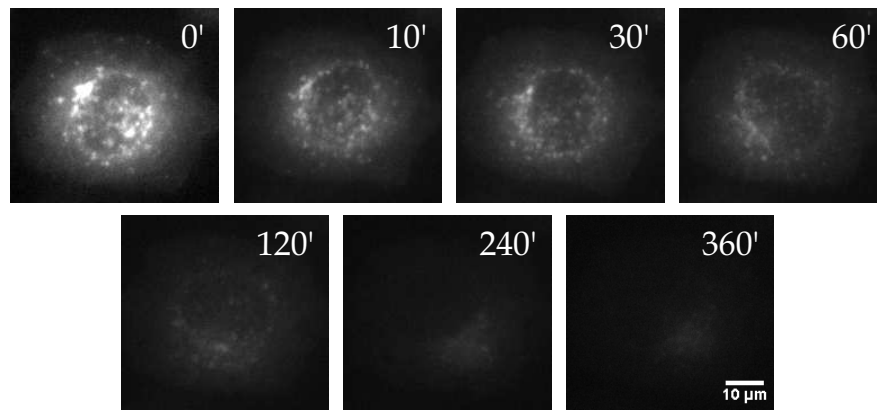


(a)

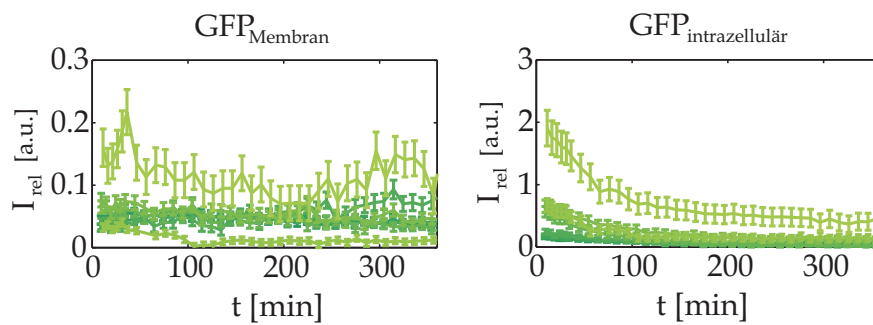


(b)

Abbildung 2.25: FRAP-Experiment zur Bestimmung der Syntheserate des EpoR. (a) Konfokale Mikroskopiebilder einer charakteristischen Zeitserie von einer lebenden H838 EpoR-GFP MyrPalm-mCherry Zellen. Nach dem ersten Messzeitpunkt wurde das GFP-Signal durch einen 488nm Laser gebleicht. Das wiederkehrende Signal stammt von neu synthetisiertem EpoR-GFP. (b) Einzelzelltrajektorien aus 11 Zellen. Das Fluoreszenzsignal aus den Probenbereichen der Membran, sowie des Zytoplasmas konnte pro Zeitpunkt mit Hilfe eines eigens dafür entwickelten Segmentierungsprogramms (Kapitel 4.5) bestimmt werden.



(a)



(b)

Abbildung 2.26: CHX-Experimente zur Bestimmung der Degradationsrate des EpoR. (a) Zeitserie der Degradation von EpoR in H838 EpoR-GFP MyrPalm-mCherry Zellen gemessen am Spinning-Disk-Mikroskop. Die Zellen wurden nach dem ersten Messzeitpunkt mit $2,5\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid behandelt und das Abklingen des Fluoreszenzsignals über 6 Stunden gemessen. (b) Einzelzelltrajektorien aus 7 Zellen. Gezeigt ist das Fluoreszenzsignal aus den Probenbereichen der Membran sowie im Zytosol.

2.2.3 Modell des Rezeptortransports und zelluläre Variabilität

Die Empfindlichkeit und Anpassungsfähigkeit eines Signaltransduktionsmechanismus ist neben Rückkopplungsprozessen abhängig von der Häufigkeit der Liganden-Rezeptor-Interaktion, das heißt, von der Anzahl an Rezeptoren, die eine Zelle nach außen hin präsentiert. Um die dafür verantwortlichen Prozesse zu identifizieren, wurden eine Reihe von ODE-Modellen entwickelt, die an die in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Einzel-Zell-Daten kalibriert werden konnten [Kal14]. Solche Vorgänge schließen durch ligandeninduzierte Rezeptor-Endozytose, Abtransport des Komplexes in intrazelluläre Recycling-Kompartimente und den Rezeptortransport ein.

Das in Abbildung 2.27 gezeigte EpoR-Transport-Modell umfasst ein Grundmodell und 4 Modellerweiterungen. Das Grundmodell beschreibt folgende Vorgänge: die Internalisierung des Epo-EpoR-Komplexes in Recycling-Endosomen, der Transport an die Membran, sowie die reversible Liganden-Rezeptor-Assoziation. Die Modellvarianten bestehen aus A) dem intrazellulären Abbau von Epo und EpoR, B) intrazelluläre Degradation des EpoRs und dem Ausstoß des Epos aus der Zelle, C) dem intrazellulären Abbau von Epo und der Ansammlung des zuvor aktivierten Rezeptors im intrazellulären Vorrat sowie der Variante D), bei der das aufgenommene Epo freigesetzt und EpoR an die Membran zurück transportiert wird. Bis auf die Bindungsparameter von Epo $k_{on,Epo}$ und $k_{off,Epo}$, die für jedes Einzelzellmodell als gleich angesehen werden konnten, wurden alle übrigen Parameter in Abbildung 2.27 zur Beschreibung der Internalisierung, des intrazellulären Transportes, des Recyclings, der Neusynthese und Degradation als variabel zwischen verschiedenen Zellen angenommen.

Der Datensatz in Kapitel 2.2.2 und 2.2.1 aus 25 Zellen, die mit Epo stimuliert wurden, sowie jeweils 10 Zellen aus Synthese- (FRAP-) und Degradations- (FRAP-) Experimenten und Populationsdaten aus Westernblot-Experimenten konnte in einem Ensemble-Modell zusammengeführt werden. Zur Modellanpassung wurden die experimentell erhaltenen Messgrößen mit Modellvariablen für gebundenes und ungebundenes Epo in verschiedenen zellulären Kompartimenten verknüpft (Tabelle 10.3 in [Kal14]). Teilmodelle zur ausschließlichen Beschreibung der Degradation oder der Synthese von EpoR wurden in das Modell eingeschlossen. Die Tatsache, dass es in den FRAP- und CHX-Experimenten möglich ist, die Synthese- und Degradationsgeschwindigkeit genauer zu schätzen, konnte zur Verbesserung der Parameterschätzungen verwendet werden. Im Ensemble-Modell wurde zu diesem Zweck die Randbedingung für die Parameterschätzung in den enthaltenen Einzelzellmodellen verwendet, so dass die Mittelwerte und Varianzen der kinetischen Parameter in Epo-internalisierenden Zellen gleich denen der Zellen aus FRAP- und CHX-Experimenten sind und damit im physiologisch sinnvollen Bereich liegen.

Durch Anpassung der Modellvarianten an die experimentellen Daten, konnte

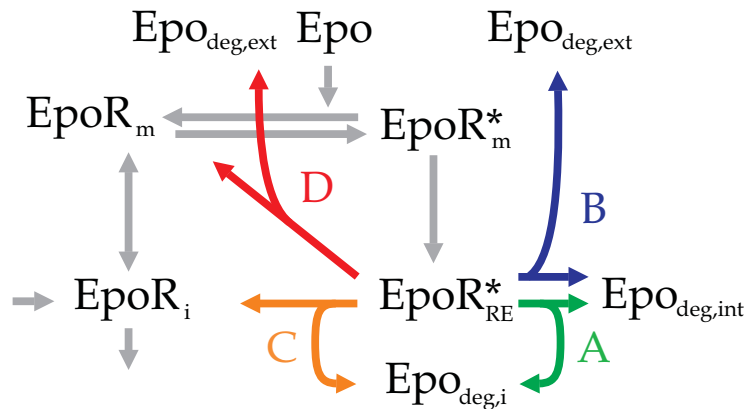


Abbildung 2.27: Modell des EpoR Transports. Das Grundmodell (grau) kann mit den Komponenten A-D erweitert werden. In Anlehnung an [KBC⁺14].

gezeigt werden, dass eine Kombination aus den Versionen A und D, also Degradation und Recycling, die Daten am besten erklären kann, was frühere Betrachtungen des Recycling-Prozesses des Rezeptors an die Membran bestätigt [BSB⁺10]. Im Unterschied dazu scheint die in Becker *et al.* vorgeschlagene Kombination aus Degradation des Rezeptors und Exozytose von Epo (Variante B in Abbildung 2.27) hier keinen Anteil am Rezeptortransport inne zu haben. Flussanalysen zeigten, dass die Hälfte der Rezeptoren wiederverwertet und an die Membran transportiert werden. Die Auswertung der besten Modellanpassung zeigte Variationskoeffizienten für die geschätzten Einzelzellparameter von etwa 0,3, was bedeutet, dass eine relativ genaue Parameterschätzung möglich war. Für die kinetischen Parameter der Modellreaktionen in verschiedenen Zellen zeigten sich Variationskoeffizienten von etwa 0,5, was zeigt, dass die Ursache für die zelluläre Variabilität recht gleichmäßig auf die verschiedenen intrazellulären Transportprozesse verteilt ist. Als nächstes wurde im Modell untersucht, inwiefern sich die Variabilität in verschiedenen intrazellulären Transportprozessen auf die zelluläre Variabilität bei der EpoR-Internalisierung und bei dem Rezeptor-Recycling auswirkt. Zu diesem Zweck wurden vor der Modellanpassung verschiedene kinetische Modellparameter oder Kombinationen von Modellparametern für alle Zellen auf den gleichen Wert fixiert, während die übrigen Parameter als individuell definiert wurden. Anhand des Akaike-Informations-Kriterium (AIC) konnte eine Parameter-Rangfolge erstellt werden. Hier zeigte sich, dass die kinetischen Parameter, welche die drei Prozesse der Epo-EpoR-Internalisierung, des EpoR-Recycling und des Transports von EpoR an die Membran bestimmen, den größten Einfluss auf den AIC haben und damit ausschlaggebend für die Zell-zu-Zell-Variabilität sind.

2.2.4 Zusammenfassung

Der EpoR Transport konnte in einzelnen Zellen durch Einzelzell- und Populationsdaten charakterisiert und die Heterogenität zwischen Zellen untersucht werden. Durch verschiedene Behandlungen der Zellen konnten in Einzelzellmessungen bestimmt werden, in welchem Rahmen sich die Aktivierung des Rezeptors auf einzelne Zellen auswirkt und wie schnell der Rezeptor in einzelnen Zellen synthetisiert oder abgebaut wird. Durch die Bestimmung eines reduzierten Modells konnten die für den Transport des Rezeptors hauptsächlich verantwortliche Prozesse identifiziert werden. Parameterabschätzungen zeigten, dass die Prozesse des Transports, des Recyclings, der Synthese und des Abbaus sich in gleichen Anteilen unterscheiden, aber die kinetischen Parameter der Synthese und Internalisierung, sowie das Wiederverwerten des Rezeptors ausschlaggebend für die Variabilität zwischen Zellen sind.

Kapitel 3

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Dynamik des Erythropoetin-Rezeptors (EpoR) und seiner Mutante EpoR-T243N in der Membran durch Einzelmolekülspektroskopische Methoden und dessen Transport in der Zelle durch konfokale Einzelzellmessungen charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde der Rezeptor stöchiometrisch über einen HaloTag kovalent mit einem photostabilen Silicium-Rhodamin-Farbstoff markiert und am TIRF-Mikroskop unter physiologischen Bedingungen untersucht. Für die konfokalen Einzelzellmessungen am *Spinning disk*-Mikroskop trug der Rezeptor intrazellulär ein GFP-Molekül. Nach unserem Wissen sind die vorliegenden Untersuchungen die erste Studie über den EpoR auf Einzelmolekülniveau. Durch verschiedene Analysemethoden der Einzelmoleküldaten konnten eine Vielzahl von quantitativen Parametern bestimmt werden, die die Bewegung des Rezeptors in der Membran charakterisieren. Dabei war es möglich in Echtzeit beispielsweise Änderungen des Bewegungstyps zu bestimmen, die durch Ensemblemessungen, wie FCS oder FRAP, nicht zugänglich gewesen wären. Ein neuer systembiologischer Ansatz wurde gewählt um die Heterogenität der Transportflüsse des EpoRs in einzelnen Zellen zu untersuchen und dafür verantwortliche Größen zu bestimmen. Die wichtigsten Ergebnisse können mit folgenden Aussagen zusammengefasst werden:

- Durch Stimulation steigen die Anteile an Rezeptoroligomeren in einzelnen Zellen an der Membran an.
- Aktivierung des Rezeptors beeinflusst dessen Membranbewegung nicht maßgeblich.
- Die Rezeptorbewegung ist mit Cholesterol assoziiert.
- Synthese, Internalisierungsprozesse und Recycling des Rezeptors sind für die zelluläre Heterogenität verantwortlich.

3.1 Anstieg der Anteile an Rezeptoroligomeren nach Aktivierung

Innerhalb der Rezeptorfamilie der Zytokine gibt es einige Rezeptoren wie beispielsweise den Somatotropin-Rezeptor, die bekannt dafür sind Homodimere nach Stimulation zu bilden [Fra14], während für andere Rezeptoren, wie die der Interleukine, gezeigt werden konnte, dass sie befähigt sind Heterodimere zu bilden [WWK⁺11]. Der gleiche Homodimerisierungsmechanismus wie für den Somatotropin-Rezeptor wird ebenso für andere Zytokinrezeptoren wie den EpoR angenommen. Eine Veröffentlichung von Forjtniková *et al.* zeigt, dass der Transferrin-Rezeptor 2 Bestandteil des EpoR-Signalkomplexes in UT7 Zellen ist [FVZ⁺10]. Ligandeninduzierte Oligomerisierung von Rezeptoren gelten bei vielen Zytokin-Rezeptoren als Initiator für die Signaltransduktion. Für den zur Familie der Zytokine gehörenden Leptin-Rezeptor wurde vorgeschlagen, dass dieser zur Signalweiterleitung Oligomere bilden kann [DGD⁺97]. Studien mit Mutanten des Leptin-Rezeptors, denen entweder die Fähigkeit fehlte JAKs zu aktivieren oder STATs zu rekrutieren, waren nur der Signalweiterleitung befähigt, wenn beide exprimiert wurden [ZLP⁺03]. Was die Vermutung nahe legt, dass sich mehr als zwei Rezeptoren für eine erfolgreiche Signaltransduktion zusammen lagern müssen. Die Theorie, dass sensitive Signalweiterleitung auf der Bildung von Rezeptoroligomeren beruht, kann auch für andere Rezeptoren der Zytokinfamilie gelten. In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht inwieweit der EpoR dazu befähigt ist ligandeninduziert Oligomere zu bilden. Dazu wurde der Wildtyp-Rezeptor und seine Transmembranmutante, die einen größeren interhelikalen Abstand zwischen Rezeptordimeren in der Transmembrandomäne zeigt, mit einem HaloTag versehen und mit dem hellen Silicium-Rhodamin-Farbstoff markiert. Die Messung der Rezeptorverteilung nach Stimulation mit Epo erfolgte an der basalen Membran der Adenokarzinomzelllinie H838 durch TIRF-Mikroskopie. Die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten für die detektierten EpoR-Moleküle zeigen nach Ligandenstimulus, sowohl für den EpoR-wt als auch für den EpoR-T243N, eine Verschiebung zu höheren Intensitäten (Abb. 2.4 und 2.5). Dabei konnte durch Referenzmessungen mit einzelnen Farbstoffmolekülen näherungsweise abgeschätzt werden, um wie viele Komponenten es sich bei dem detektierten Rezeptorsignal handelt. Die Transmembranmutante zeigt dabei eine höhere Anzahl an einzelnen Komponenten als der Wildtyp-Rezeptor. Die Zahl der Komponenten können allerdings nur relativ geschätzt werden, da die absolute Zahl der Moleküle in der Referenzmessung unbekannt ist. Dennoch ist eine Tendenz zu Bildung von höheren oligomeren Strukturen sichtbar.

3.2 Geringe Beeinflussung der Membranbewegung aktivierter Rezeptoren

Die Empfindlichkeit mit der Signale weitergeleitet werden, ist von der Zahl der Rezeptoren an der Membran abhängig, die eine Aktivierung durch den Liganden entgegen nehmen können. Die Anzahl der Rezeptoren an der Membran nahm im Fall von EpoR-wt direkt nach Stimulation rapide ab. Zehn Minuten nach Stimulation befinden sich weniger als 50% der Rezeptoren an der Zelloberfläche (Tab. 2.1). Die Anzahl steigt ab 30 Minuten nach Stimulation wieder an. Becker *et al.* postulierte, dass freier EpoR fortwährend zwischen Membran und intrazellulärem Reservoir zirkulieren. Dabei wird auch bei ligandeninduzierter Endozytose ein Teil der Rezeptoren wiederverwertet und zurück an die Membran transportiert [Bec07]. Diese modellgestützte Hypothese, konnte durch die Einzelmolekülmessung der Rezeptoren bestätigt werden (Abb. 2.17). Hingegen nimmt die Zahl der Rezeptoren der Transmembranutante stetig ab, was darauf schließen lässt, dass die Transmembrandomäne Einfluss auf den Recyclingprozess hat und die Mutante damit nicht mehr fähig ist, nach ligandeninduzierter Endozytose an die Membran zurückzukehren. Der Diffusionskoeffizient der einzelnen Rezeptorpartikel konnte aufgrund der mittleren quadratischen Verschiebung der Partikel berechnet werden. Der mittlere Diffusionskoeffizient des EpoR betrug dabei vor Stimulation $0,17 \pm 0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und 10 Minuten nach Stimulation $0,18 \pm 0,07 \mu\text{m}^2/\text{s}$; für den EpoR-T243N entsprechend $0,24 \pm 0,09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $0,19 \pm 0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Insgesamt hat der Ligand keinen Einfluss auf die mittlere Bewegungsgeschwindigkeit der Rezeptoren. Anhand ihrer Bewegungsspur konnten einzelne Trajektorien in drei unterschiedliche Bewegungsklassen (gerichtet, beschränkt, unbeschränkt) kategorisiert werden. Beide Rezeptoren reagieren auf die Aktivierung mit Änderung des Anteils beschränkter Bewegung (Abb. 2.10 und 2.12). Im Falle des EpoR-T243N steigt auch der Anteil gerichteter Bewegung nach Stimulation signifikant an (Abb. 2.12). Die Phosphorylierung des Rezeptors und seine damit verbundene Internalisierung sinkt in BaF3-EpoR Zellen eine Stunde nach Aktivierung wieder auf Ausgangsniveau [BSB⁺10]. In H838 Zellen lässt sich eine Abnahme der Partikel höherer Fluoreszenzintensität zehn Minuten nach Stimulation erkennen (Abb. 2.17), was eine raschere Internalisierung vermuten lässt. Diese Menge an Rezeptorcluster erscheinen eine Stunde nach Stimulation wieder an der Membran. Diese Beobachtung legt zusammen mit den Erkenntnissen von Becker *et al.* die Vermutung nahe, dass der EpoR schon vor Aktivierung in Clustern an der Membran vorliegt, welche in einem Zeitraum von zehn Minuten nach Aktivierung größtenteils internalisiert werden und sich erst nach einer Stunde kontinuierlicher Stimulation wieder im gleichen Ausmaß an der Membran ansammeln, um auf erneute Aktivierung reagieren zu können.

3.3 Assoziierung der Rezeptorbewegung mit Cholesterol

Die Komponenten der Membran haben Einfluss auf die Rezeptorbewegung und Internalisierung von Oberflächenrezeptoren. Der *Transforming Growth Factor*-Rezeptor kann beispielsweise durch zwei verschiedene Wege internalisiert werden, wobei Caveolae zur Degradation des Rezeptors und Clathrin-abhängig internalisierte Rezeptoren zur Signalweiterleitung und Zellantwort führen [DLGW03]. Aus der Familie der Zytokinrezeptoren zeigen der Interleukin-2 und der γ_c -Rezeptor dynaminabhängige Internalisierungsprozesse [SDDV05], die von *lipid rafts* gesteuert werden und unabhängig von Caveolae sind [LDB⁺01]. Um den Einfluss der Membran auf die Rezeptorbewegung zu bestimmen wurden H838 EpoR-wt und T243N Zellen mit Chemikalien behandelt, die den Aufbau der Membran und des Zytoskeletts beeinflussen. Chemikalien wie Blebbistatin und Latrunculin B, die das Zytoskelett beeinflussen, haben kaum einen Effekt auf die Rezeptorbewegung. Die Anordnung der Rezeptoren an der Membran bleibt nach Behandlung mit Latrunculin B, welches Aktin depolymerisiert, unverändert (Abb. 2.20). Dynamin-abhängige Internalisierungsprozesse scheinen ebenso für den EpoR eine Rolle zu spielen. Da der Anteil an sich beschränkt fortbewegenden Partikeln zunimmt, ist anzunehmen, dass an der Membran verbleibende Einschnürungen die Rezeptoren in ihrer Bewegung hindern. Den größten Effekt auf die Rezeptorbewegung verursacht hingegen Methyl- β -Cyclodextrin. Durch die verminderte Cholesterolkonzentration in der Membran erhöht sich der Diffusionskoeffizient sowohl beim Wildtyp-Rezeptor von $0,13 \pm 0,06$ auf $0,24 \pm 0,08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ als auch beim Mutanten $0,16 \pm 0,07$ auf $0,26 \pm 0,04 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Ergebnisse liefern einen Hinweis darauf, dass der EpoR neben der bereits bekannten ligandeninduzierter, clathrinabhängiger Endozytose, auch durch Dynamin abhängige Prozessen internalisiert werden kann und mit *lipid rafts* assoziiert ist. Dies konnte auch von McGraw *et al.* in UT7-Zellen berichtet werden [MFJ⁺12].

3.4 Zelluläre Heterogenität kann durch Synthese, Internalisierung und Recycling erklärt werden

Vor dem Hintergrund der Funktion der Endozytose neben der Signalweiterleitung, die Signalantwort eines aktivierten Rezeptors abzuschwächen, wie es für andere Rezeptoren, wie zum Beispiel dem EGFR postuliert ist [SGREB09], ist es wichtig aufzuklären, welche Mechanismen für den Transport von EpoRs vom intrazellulärem Vorrat an die Membran verantwortlich sind und wie die Internalisierung aktivierter Rezeptoren oder das Recycling von Rezeptoren bewerkstelligt werden. Schlussendlich soll die Analyse der zellulären Variabilität dazu führen, die Prozesse zu identifizieren, die letztendlich zu dieser Heterogenität führen. Damit ließen

sich Schlüsselstellen des Transduktionsmechanismus erkennen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein experimenteller Aufbau entwickelt werden, der es ermöglichte den Transport aktivierter Rezeptoren und dessen Liganden innerhalb einzelner Zellen zu verfolgen. Durch FRAP-Experiment, beziehungsweise durch die Behandlung der Zellen mit CHX, konnten die Synthese- und Degradationsrate des EpoR in H838 Zellen bestimmt werden. Die Heterogenität zwischen Zellen wurde im Modell durch unterschiedliche kinetische Parameter eingeführt. Es konnte eine minimale Modellvariante für die Dynamik des EpoR identifiziert werden; eine Kombination der Prozesse für Degradation und Recycling des Rezeptors können die Einzelzelldaten am besten beschreiben. Dies konnte Annahmen früherer populationsbasierender Modelle bestätigen [GL06, BSB⁺10]. Im Gegensatz zur Studie von Becker *et al.*, in der intrazellulärer Abbau des Rezeptors mit gleichzeitiger Exozytose von Epo verbunden ist, spielt dieser Vorgang bei einzelnen Zellen keine Rolle.

3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte im ersten Teil der Arbeit der Einfluss der Transmembrandomäne auf den Transport und die Dynamik des Rezeptors in der Membran durch Einsatz einzelnmolekülspektroskopischer Methoden und kovalenter Fluoreszenzmarkierung erstmals für den EpoR charakterisiert werden. Die Vermutung zur Bildung oligomerer Strukturen nach Stimulation konnte durch Schätzen der relativen Komponentenanzahl bestätigt werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der aktivierte EpoR, der in einem Membranbereich höherer Rezeptordichte im Vergleich zu Partikeln geringerer Intensität liegt, schnell internalisiert wird (Abb. 2.17). Zwar genügte die Referenzmessung einzelner Farbstoffmoleküle in Lösung um einen Anhaltspunkt hinsichtlich der Anzahl der zugrundeliegenden Komponenten zu erhalten, doch wäre es zur Quantifizierung der absoluten Zahl an Rezeptoren, die diesen oligomeren Ansammlungen zugrundeliegen, wünschenswert eine Standardprobe zur Verfügung zu haben, die eine diskrete Anzahl an Fluorophoren trägt. Eine viel versprechende Möglichkeit, Proteinoligomere über die Anzahl von Fluorophor zu quantifizieren, könnte es sein die absolute Zahl durch *Counting-by-photon statistics* (CoPS) zu bestimmen [GKH14]. Die Methode nutzt das Phänomen des *Antibunching* zur Schätzung der Anzahl von einzelnen Emittlern. Weiterführende Studien zur Untersuchung des Einflusses der Transmembrandomäne auf den Rezeptortransport und Recycling könnten fluoreszenzmarkierte assoziierte Kinasen liefern, auch um den Anteil nicht-ligandenabhängiger Endozytose bestimmen, ähnlich wie es kürzlich für den EGFR gelungen ist [LZTK⁺14]. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der angewendeten Messbedingungen der EpoR mit Cholesterol in der Membran in unstimulierten Zustand assoziiert ist und das Zytoskelett, das die Membran kompartimentiert, keinen Einfluss auf die Verteilung des unstimulierten Rezeptors in

der Membran hat. Dies schließt jedoch nicht aus, dass das Zytoskelett Einfluss auf die Signalweiterleitung des aktivierten Rezeptors durch Kompartimentierung hat und beispielsweise durch lokale Konzentrationserhöhung die Bildung von Oligomeren fördert. Um die Dynamik des Rezeptors noch umfassender zu verstehen, könnte hier mit schnellerer Detektionssensorik und einer höheren Zeitauflösung im Nanosekundenbereich Ereignisse, wie die sogenannte „Hop“-Diffusion, das wechseln zwischen Kompartimenten des Membranskeletts, sichtbar gemacht werden [KSKH⁺10, SLHE14].

Zukünftig können der auf die Transportkinetik angewendete Ansatz, die Heterogenität zwischen einzelnen Zellen durch Zellensemblemodelle zu beschreiben, dazu genutzt werden, zugrundeliegende Regulatoren, die für die Variabilität verantwortlich gemacht werden können, zu identifizieren. Dadurch könnten effizientere Ansatzpunkte für beispielsweise die chemotherapeutische Behandlung von sich heterogen verhaltenden Krebszellpopulationen in Tumoren gefunden werden. Die Vorgehensweise und Analyse der Einzelmolekülverfolgungsdaten in dieser Arbeit stellt eine allgemein anwendbare Methode dar, um Rezeptordynamiken an der Membran zu untersuchen.

Kapitel 4

Materialien und Methoden

4.1 Zelllinien und Zellkultur

4.1.1 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen *non-small cell lung cancer* (NSCLC) Adenokarzinomzelllinien H838 wurde von ATCC (Chicago, USA) bezogen. Im ersten Teil der Arbeit fanden die Fusionsproteine des Wildtyp-Rezeptors und seiner Transmembranmutante T242N Verwendung, die jeweils extrazellulär HaloTag© (pFN22A, Promega) trugen. Basis war das in der AG Klingmüller vorhandene pMOWS-HA-hEpoR-Plasmid, welches einen retroviralen Expressionsvektor trug [KHO⁺02]. Bei der Mutation des Rezeptors handelt es sich um einen Austausch von Threonin an der Position 242, die in einer hochkonservierten Region der Transmembrandomäne liegt. Durch modellbasierte Analyse konnte ein höherer interhelikaler Abstand in Rezeptorhomodimeren gezeigt werden [Bec07].

Zur Beobachtung der zellulären Variabilität (Kapitel 2.2) wurde das Fusionsprotein aus Wildtyp-Rezeptor und GFP gewählt, da damit auch die zelluläre Degradation des Rezeptors beobachtet werden kann [Bec07]. Das Plasmid pMOWS-HA-EpoR-GFP konnte durch retrovirale Transduktion in H838 Zellen eingebracht werden.

4.1.2 Kultivierung und Passagierung der Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung auf beschichteten Zellkulturschalen (TPP, Schweiz) kultiviert. Das verwendete Kulturmedium DMEM ohne Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz) enthielt folgende Supplemente: 10 % FBS, 100 $\frac{U}{ml}$ Penicillin, 100 $\frac{\mu g}{ml}$ Streptomycin (beides Invitrogen) und 2 mM L-Glutamin (Gibco). Für die Subkultivierung und um Zellen für Versuche zu gewinnen, wurden adhärente Zellen mit Hilfe der Protease Trypsin (Trypsin/EDTA, Invitrogen), welche Adhäsionsproteine proteolytisch spaltet, vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Zunächst wurde das Zellkulturmedium

abgesaugt. H838-Zellen wurden mit DPBS (Invitrogen) gewaschen und anschließend 5 Minuten mit Trypsin-EDTA bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Dann wurde frisches Medium zugegeben, um die Wirkung des Trypsins abzuschwächen. Die Zellen wurden in entsprechender Verdünnung in eine neue Kulturschale mit frischem Zellkulturmedium überführt. Zur Selektion für den Erythropoetin-Rezeptor fand das Antibiotikum Puromycin Verwendung, was der Kulturschale mit einer Konzentration von 1,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Kulturmedium zugeführt wurde.

Für die Experimente wurden 15.000 Zellen 48 Stunden zuvor in sterile *8-well Lab-Tek*-Kammern (NuncA/S, Roskilde, DK) in DMEM ohne Phenolrot überführt. Das DMEM ohne Phenolrot enthielt ebenfalls 10 % FBS, 100 $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$ Penicillin, 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Streptomycin und 2mM L-Glutamin. Zuvor wurde die Oberfläche des Deckglas aus Borosilikat durch 200 μl 0,1M Flusssäure (AppliChem, Darmstadt) pro Kammer gereinigt und anschließend 3 mal mit ddH₂O gewaschen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Im Anschluss wurden die Kammern mit 2M Glycin für 30 Minuten behandelt, bevor die Zellen auf die Oberfläche gesetzt werden konnten. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen 5 Stunden vor dem Versuch oder über Nacht in Medium ohne Serum überführt, um ihnen damit vom Medium bereitgestellte Wachstumsfaktoren zu entziehen. Das phenolrotfreie Medium enthielt 100 $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$ Penicillin, 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Streptomycin und 2 mM L-Glutamin, sowie 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ BSA.

Für eine längerfristige Lagerung wurden die Zellen bei -196 °C in Flüssigstickstoff aufbewahrt. Als Gefrierschutzmittel für die Kryokonservierung diente Glycerol. Um Zellen einzufrieren, wurden sie mit Hilfe von Trypsin von der Zellkulturflasche gelöst, die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in Einfriermedium aufgenommen. Das verwendete Einfriermedium bestand aus normalen Zellkulturmedium mit den Supplementen 10 % FBS und 10 % Glycerol. Je 1 ml der Zellsuspension wurden in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden zunächst circa 24 Stunden in einer Einfrierbox gefüllt mit Isopropanol bei -80 °C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt. Um die Zellen aufzutauen wurde das Kryoröhrchen auf 37 °C im Wasserbad temperiert. Die Zellsuspension wurde anschließend rasch in vorgelegtes Medium überführt, um die Zellen dem toxischen Glycerol zu entziehen.

4.1.3 Retrovirale Transduktion der Zellen

Wie in Kapitel 2.2.1 geschildert, wurde der pMOWS-HA-EpoR-GFP durch stabile Transduktion mit Hilfe von Retroviren in die Zellen gebracht. Zur Gewinnung des Virusüberstands wurde aus 800'000 Phoenix eco/ampho-Zellen, die am Vortag auf eine *6-well*-Platte ausgesät waren, durch 25 μM Chloroquindiphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim) mit der über Calciumphosphat gefällten DNA transfiziert. Dazu wurden pro *6-well*-Kammer 8 μg Plasmid mit 2 μg Helfer-Vektor versetzt in 112,5 μl ddH₂O gelöst und mit 12,5 μl 2,5 M CaCl₂ gemischt. Dar-

auffin wurden durch tropfenweise hinzugegeben von 125 μl 2-fach HBS die DNA präzipitiert. Die Lösung wurde nun langsam zu den Zellen hinzugefügt und nach 6 Stunden im Inkubator das Medium gewechselt. Der Virusüberstand wurden nach 14-18 Stunden entfernt und mit einem 0,45 μm Filter (Millipore, Billerica, USA) von den Phoenix eco/ampho-Zellen getrennt.

Die H838 Zellen wurden 16 Stunden vor Transduktion mit einer Dichte von $2 \cdot 10^5$ Zellen in 6-wells überführt. Für die Transduktion wurde das Kulturmedium mit dem 1 ml retroviralem Überstand ausgetauscht, der mit 8 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Polybrene[®] (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 750 μl Kulturmedium versetzt war und anschließend für 3 Stunden bei 340 g zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in Standardmedium kultiviert und am darauffolgenden Tag durch 1,5 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Puromycin selektiert. Die Zellen konnten nach zwei Passagezyklen eingefroren oder für Experimente verwendet werden.

4.2 Proteinquantifizierung

Zum Nachweis der Präsenz oder Funktionalität der Rezeptorfusionproteine wurden diese im totalen Zelllysate analysiert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen 3 Tage vor dem Experiment in DMEM ohne Phenolrot überführt und über Nacht vor dem Experiment in DMEM ohne Phenolrot und FBS mit 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ BSA kultiviert. Die Zellen wurden jeweils für 10 Minuten mit 10 $\frac{\text{U}}{\text{ml}}$ Epo stimuliert und auf Eis mit 1,25-fach Lysepuffer versetzt. Der Lysepuffer bestand aus 25 ml Lysepuffer Stammlösung (aus 300 mM NaCl, 40 mM Tris pH 7,4, 20 mM NaF, 2 mM EDTA pH 8,0, 2 mM ZnCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 2 mM Na_3VO_4 , 20 % Glycerol), 500 μl IGEPAL (IGEPAL CA-630, Octylphenyl-polyethylenglykol, Sigma-Aldrich), 15 ml dH_2O , 25 μl Aprotinin (Sigma, 1 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$), 25 μl AEBSF (Sigma, 100 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$). Die Zellen wurden abgeschabt, das Lysat durch Pipettieren homogenisiert und im Anschluss 30 Minuten bei 4 °C rotiert und bei 13'000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Die zytosolische Fraktion befindet sich nun im Überstand und wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer BCA-Analyse (Thermo Scientific) bestimmt. Für die **Immunopräzipitation** wurden entsprechend der BCA-Analyse 1,5 mg Protein verwendet und das Lysat mit Zielgen spezifischem Antikörper (Anti-EpoR MAB307 (R&D) oder Anti-STAT5 (C17) Lot:E1410), sowie 25 μl of Protein A Sepharose (GE Healthcare) versetzt und über Nacht rotiert. Die Immunopräzipitate wurden zweimal mit 1,25-fach Lysepuffer und einmal mit TNE-Puffer (10 mM Tris pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 μM Na_3VO_4) gewaschen und mit 25 μl 2-fach SDS-Probenpuffer (2 % SDS, 50 mM Tris pH 7,4, 10% Glycerin, 100 mM Dithiothreitol, 0,01 % Bromphenolblau, 10 % β -Mercaptoethanol) gelöst und sofort elektrophoretisch aufgetrennt oder bei -20 °C eingefroren. Die Proteine werden anschließend aufgrund ihrer elektrophoretischen Mobilität in einer denatierenden SDS-PAGE aufgetrennt (Tab. 4.1). Die Proben wurden für 5 Minuten auf 96 °C

für ein Gel	10 % Gel	Sammelgel
40 % Acrylamid	5 ml	1 ml
2 % N,N'-Methylenbisacrylamid	1,3 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	5 ml	
1 M Tris-HCl pH 6,8		1,25 ml
10 % SDS	200 μ l	100 μ l
10 % Ammoniumpersulfat	200 μ l	100 μ l
Tetramethylethyldiamin	20 μ l	10 μ l
ddH ₂ O	8,5 ml	7,15 ml

Tabelle 4.1: Gelzusammensetzung für die SDS-PAGE

erhitzt, für 2 Minuten bei 13'000 rpm zentrifugiert und in ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen.

Der **Immunoblot** wurde in halbtrockenen Kammern (Amersham Biosciences) auf Nitrozellulosemembran (Protran, Whatman GmbH) für eine Stunde übertragen. Daraufhin wurde die Membran in Ponceau-Rot (Ponceau S solution, Sigma) geschwenkt, um die Proteine zu fixieren. Unspezifische Antikörper wurden mit 2% BSA in TBS-T (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20) blockiert und die Membran im Anschluss über Nacht mit dem Antikörper in einer 1:10'000 Verdünnung in 1% BSA in TBST-T bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mit dem an Meerrettichperoxidase gekoppelten Antikörper für 45 Minuten inkubiert, mit Luminol (GE Healthcare) gefärbt und die Chemolumineszenz durch den ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) gemessen. Zunächst wurde der Immunoblot mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper (anti-pTyr (4G10) Lot: DAM1682114) entwickelt um den Phosphorylierungsgrad beobachten zu können, danach wurde der Antikörper von der Membran mit Stripping-Puffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol) für 20 Minuten bei 65 °C entfernt und anschließend mit dem entsprechenden Antikörper für die totale Proteinmenge entwickelt.

4.3 Markierung von Proteinen

Zur **Markierung des Erythropoetin-Rezeptors** in H838-Zellen fand das auf dem bakteriellen Enzym Haloalkandehalogenase basierende HaloTag zur kovalenten Bindung von organischen Farbstoffen Verwendung [LEM⁺08]. Das Fusionsprotein wurde im Rahmen einer von mir betreuten Masterarbeit erstellt [Sal13].

Die Wahl des fluoreszenten Halo-Liganden fiel auf das kürzlich synthetisierte Silicium-Rhodamin (SiR) [LUO⁺13], dessen Struktur nachstehend in Abbildung 4.1 gezeigt ist. Der Farbstoff wurde freundlicherweise von Grazvydas Lukinavicius (Kai Johnsson, École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Neben der hohen Geschwindigkeitskonstante von über 250'000

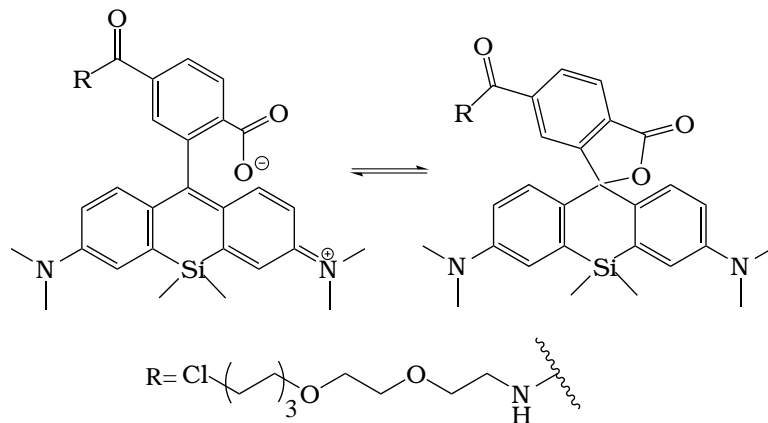


Abbildung 4.1: Struktur des SiR-Halo und Bildung des Spirolacton

$M^{-1}s^{-1}$ für die Reaktion von SiR-Halo mit HaloTag, war vor allem die Eigenschaft des SiR, die von Lukinavicius *et al.* postuliert wurde, im ungebundenen Zustand nicht-fluoreszente Spirolactone zu bilden [LUO⁺13]. Die Haloalkandehalogenase entfernt Halogene von Alkanen durch nukleophile Substitution, dadurch wird im aktiven Zentrum des Enzyms ein Carbonsäureester zwischen der Alkankette des Halotag-Liganden und Aspartat gebildet.

Die **Markierung von Erythropoetin** für die Internalisierungsexperimente (Kap. 2.2) erfolgte mit dem Hydrazid Cy5.5 (GE Healthcare). Zunächst wurden 800 μg EPOsf (Roche, Penzberg, Germany) ($2,4 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$) zur Aufreinigung vier mal drei Stunden lang gegen 500 ml einer 100 mM NaOAc-Lösung (pH 5,5), in einer Dialysekassette mit einem Grenzwert von 7.000 Da (Fisher Scientific, Schwerte-Geisecke, Deutschland) bei 4 °C aufgereinigt. Die Kohlenhydratreste des Glycoproteins wurden durch 1 mM NaIO_4 bei 4 °C oxidiert. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten durch die Zugabe von 15 mM Glycerol gestoppt und das oxidierte Erythropoetin, wie oben beschrieben nochmals dialysiert. Zur Kopplungsreaktion des Cy5.5-Hydrazids (GE Healthcare) wurde der Farbstoff in 50-fachem Überschuss dazugegeben und für 2 Stunden bei RT in Kopplungspuffer (0,1M NaH_2PO_4 , 0,15M NaCl, pH 7,2) gerührt. Das Produkt bei 4 °C 200 mM K_3PO_4 und 5% Saccharose erneut dialysiert, um freien Farbstoff zu entfernen. Zur Bestimmung der Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins wurde die Absorption im UV-VIS-Spektrometer bei 280 nm ermittelt. Die Lambert-Beer-Beziehung beschreibt den proportionalen Zusammenhang zwischen der Weglänge d , der Farbstoffkonzentration c , und dem Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda)$ und gilt nur für monochromatisches Licht, sowie verdünnte Lösungen ($c < 10^{-2} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$), bei denen ausschließlich der gelöste Stoff absorbiert. $\varepsilon(\lambda)$ weist eine zusätzliche Temperatur- und Lösungsmittelabhängigkeit auf und kann durch Grenzflächenadsorptionseffekte Veränderungen erfahren.

Die bekannte experimentell oft genutzte Beziehung lautet:

$$E = \log_{10} \frac{I_0}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d \quad (4.1)$$

Aus dem dekadischen Logarithmus des Quotienten aus Referenz- I_0 und Messstrahlintensität $I(\lambda)$, dem reziproken Transmissionsverhältnis, ergibt sich die Extinktion E .

Da sämtliche Farbstoffe ebenfalls eine gewisse Absorption bei 280 nm zeigen, muss die gemessene Absorption A_{280} um den Absorptionsbeitrag durch den *correction factor* CF_{280} des Farbstoffes korrigiert werden. Der *correction factor* kann durch $CF_{280} = \frac{\varepsilon_{280}}{\varepsilon_{max}}$ bestimmt werden und liegt bei Cy5.5 bei $CF_{Cy5.5} = 0,18$. Um den Markierungsgrad (*degree of labeling*, DOL), also die mittlere Anzahl an gebundenen Farbstoffmolekülen, eines Proteins zu bestimmen, kann der Quotient aus Absorption des Proteins und des Farbstoff bei jeweiligen Absorptionsmaximum betrachtet werden. Damit resultiert für den DOL [AT15]:

$$DOL = \frac{\frac{A_{max}}{\varepsilon_{max}}}{\frac{A_{Protein}}{\varepsilon_{Protein}}} = \frac{A_{max} \cdot \varepsilon_{Protein}}{(A_{280} - A_{max} \cdot CF_{280}) \cdot \varepsilon_{max}} \quad (4.2)$$

Für das markierte Epo-Cy5.5 ergab sich dadurch ein DOL von 1,29. Zur Aufnahme der UV/Vis-Absorptionsspektren diente ein Cary 500 Spektrometer der Firma Varian (Darmstadt, Deutschland). Die Messungen wurden in Suprasil-Quarzglas-Halbmikroküvetten der Firma Hellma (Müllheim, Deutschland) durchgeführt.

4.4 Mikroskopaufbau und Messung des Rezeptors

Das in Kapitel 2.1 verwendete **TIRF-Mikroskop**, dessen Strahlengang schematisch in Abbildung 4.2 gezeigt ist, wurde in unserer Arbeitsgruppe selbst aufgebaut. Neben dem hier dargestellten und verwendeten 635 nm Diodenlaser (30 mW Dauerstrich, TECRL-25G-635, World Star Tech, Toronto, Canada), standen noch weitere Anregungswellenlängen mit 488 nm (40 mW Dauerstrich, PC13781 Cyan Laser Head, Newport), 532 nm (30 mW Dauerstrich, TECRL-30, World Star Tech) und 561 nm (50 mW Dauerstrich), welcher gesondert in den Strahlengang eingebaut wurde, zur Verfügung. Die übrigen Laser passierten zunächst einen Aufreinigungsfilter, bevor sie jeweils in eine Monomode-Glasfaser (Thorlabs, Newton, NJ) eingekoppelt wurden und die Laserstrahlen einen akustisch-optisch regelbaren Filter (AOTF_nC.Vis, AA Opto-Electronic, Orsay Cedex, France) passieren können. Über den AOTF kann sowohl die Wellenlänge als auch die Intensität des Lasers eingestellt werden. Im Anschluss gelangt der Laserstrahl über drei Spiegel und zwei Linsen an die hintere Öffnung des inversen Mikroskops (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena) und durch das Ölimmersionsobjektiv (Ni-

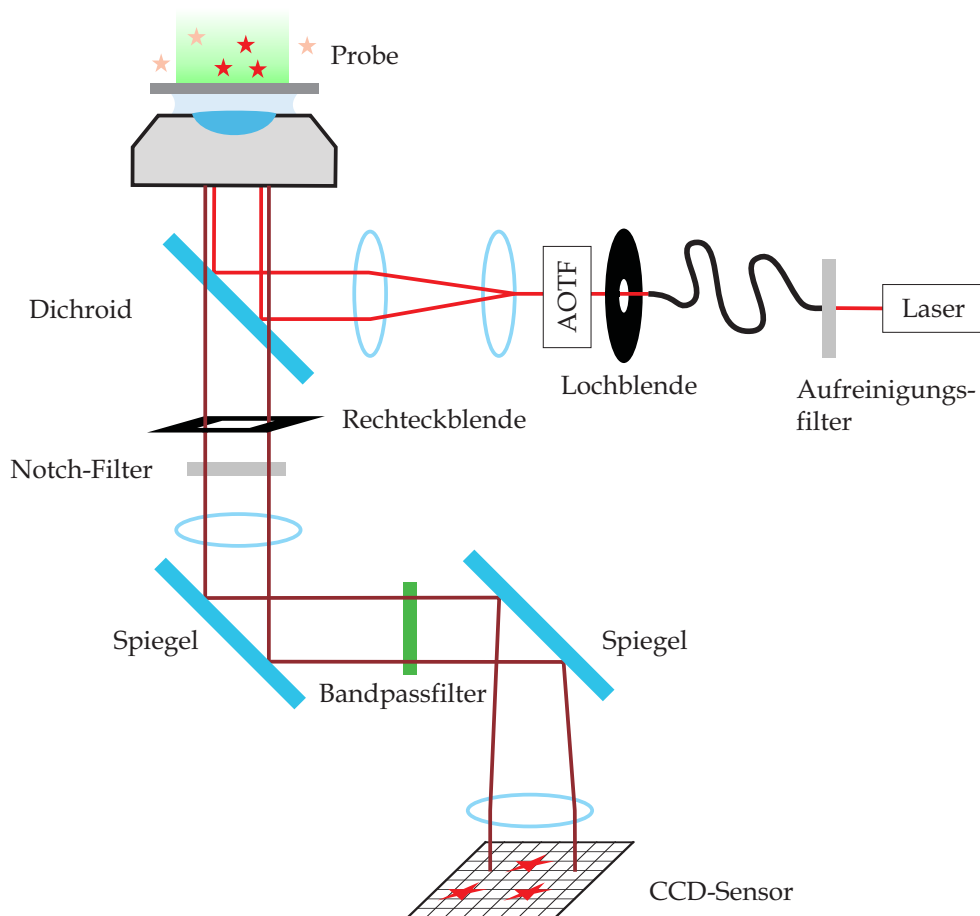


Abbildung 4.2: Messaufbau des TIRF-Mikroskops

kon CFI Apochromat TIRF 100x Oil, N.A. 1.49, Nikon, Düsseldorf). Im Mikroskop trennt ein dichroitischen Spiegel (Dual Line Beam Splitter z 532/633, AHF Analysentechnik, Tübingen) Anregungs- von Emissionslicht. Die durch die nach Stoke zu höheren Wellenlängen hin verschobenen emittierten Photonen werden durch das Objektiv gesammelt und können den Dichroiden passieren. Eine Blende erzeugt ein rechteckiges Gesichtsfeld und die Photonen werden anschließend durch einen Notch-Filter (488/532/631-640 nm, AHF Analysentechnik, Tübingen) von Anregungslicht befreit. Das Emissionslicht wird durch einen Bandpassfilter weiter eingeschränkt (SMD-Sperrfilter, HQ 685/70, AHF Analysentechnik, Tübingen) und auf den Sensor einer CCD-Kamera geleitet (iXon+ 897 Ultra emCCD, Andor, Belfast, UK). Die Videos wurden mit der vom Hersteller zu Verfügung gestellter Software Andor Solis aufgenommen.

Zur Messung von lebenden Zellen wurde der motorisierte Mikroskoptisch (Applied Scientific Imaging, Eugene, USA) mit einem auf 37 °C beheizbaren Einsatz (Okoloab, Ottaviano, NA, Italy), sowie das Objektiv mit einem Heizring (Warner

Instruments, Hamden, CT, USA) bestückt. Aufgrund der Temperierung wurde ein spezielles Immersionsöl der Firma Cargille verwendet, das einen Brechungsindex von $n = 1,515$ und eine Viskosität $\nu = 1,2510^{-4} \frac{m^2}{s}$ bei $37^\circ C$ aufweist (Typ 37 DF, Cargille, CedarGrove, NJ, USA). Dem resultierenden Fokusdrift konnte durch ein Autofokussystem (CRISP, Applied Scientific Imaging, Eugene, USA) entgegen gewirkt werden, damit war es möglich dieselbe Zelle für einen Zeitraum von einer Stunde zu beobachten. Falls nicht anders angegeben, wurden die markierten Zellen mit einer Belichtungszeit von 100 ms und einer Anregungsleistung von 1mW gemessen.

Für die Experimente der Aktindepolymerisation an fixierten Zellen wurden die H838 EpoR-wt/EpoR-T243N Zellen mit $0,2\ \mu M$ SiR-Halo gefärbt und im Anschluss mit $10\ \mu M$ Latrunculin B (Sigma-Aldrich) für 20 Minuten bei $37^\circ C$ behandelt. Daraufhin wurden die Zellen in DPBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit Triton-X (2 % BSA) fixiert. Anschließend mit 5 % BSA für 20 Minuten behandelt und dann mit Phalloidin-Atto 565 (ATTO-TEC, Siegen) für 30 Minuten bei $37^\circ C$ inkubiert.

Die Einzelzelleexperimente aus Kapitel 2.2 wurden mit einem Yokogawa- **Spinning Disk** Mikroskop durchgeführt (ERS6, PerkinElmer). Das inverse Mikroskop (Nikon TE-2000, Nikon, Düsseldorf) war mit einer Inkubationskammer für Versorgung mit 5% CO_2 und Temperierung auf $37^\circ C$ ausgestattet und verfügte über ein Ölimmersionsobjektiv (Nikon Plan Apo λ 100x NA 1.45, Nikon, Düsseldorf). Die drei Kanäle GFP, mCherry und Cy5.5 wurden mit den Laser der Spektrallinien 488 nm , 564 nm und 640 nm angeregt und konnten mit den entsprechenden Bandpassfiltern von 527/55, 615/70 und 705/90 von unspezifischer Strahlung getrennt werden. Für FRAP-Experimente stand die PerkinElmer Photokinesis Einheit zum Photobleichen zur Verfügung. Die Detektion erfolgte über eine EMCCD Kamera (Hamamatsu C9100-02) mit einer Sensorgröße von 1000×1000 Pixeln, dabei wurde eine Belichtungszeit von 200 ms und eine Zusammenfassung von 4×4 Pixeln gewählt. Die Bildaufnahme erfolgte über die PerkinElmer Software Volocity.

4.5 Datenanalyse

4.5.1 Analyse der Einzelmoleküldaten

Die Partikel wurden mit dem 2011 von Jaqaman für Messungen in Zellen beschriebenen Algorithmus detektiert und verfolgt [JLM⁺08, JKT⁺11]. Zusammengefasst werden hier in einem ersten Schritt die Position (unterhalb der Bildpunktgröße) und die Intensität (über dem Hintergrundsignal) von beugungsbegrenzten Partikeln detektiert, indem eine Anpassung einer 2D Gaußfunktion mit der Standardabweichung der Punktabbildungsfunktion des Mikroskops an lokale Intensitätsmaxima erfolgt. Von Bild zu Bild werden die Partikel sukzessiv nach der von Reid *et al.* bereits 1979 veröffentlichten *multiple-hypothesis tracking* Methode verfolgt [Rei79]. Für jede Zustandsänderung, wie zum Beispiel Vereinigung oder Trennung von anderen Partikeln, das Auftreten, Erscheinen oder Blinken von Partikeln, wird diesem Strafpunkte, abhängig von der Zustandsänderung, zugewiesen. Das Ergebnis mit der minimalen Summe an diesen Strafpunkten wird durch das Programm als Lösung ausgewählt. Die Bewegung der Partikel werden aufgrund der Streuung ihrer Positionen entlang ihrer Bewegungspur zunächst in nicht-gerichtete oder gerichtete Bewegung unterteilt [HKT⁺06, JKT⁺11]. Die Klassifizierung der Bewegung wurde durch die *moment scaling spectrum* (MSS)-Analyse durchgeführt [FaMY01, ESS⁺05]. Dieses beruht darauf für jede Trajektorie ein Momentum $\mu_\nu(t)$ der Ordnung $\nu = 1\dots 6$ als Funktion der Latenzzeit t mit zu berechnen.

$$\mu_\nu(t) = 4D_\nu \cdot t^{\gamma^\nu} \quad (4.3)$$

$\mu_2(t)$ ist dabei die mittlere quadratische Verschiebung der Partikel. Der Diffusionskoeffizient D_ν und γ^ν wurden bestimmt. Der Graph von γ^ν gegen ν wird als *moment scaling spectrum* bezeichnet [FaMY01]. Ein Beispiel für solche eine Auftragung ist in Abbildung 4.3(a) gezeigt. Für alle selbstähnliche Prozesse zeigt der MSS eine Gerade, deren Steigung S_{MSS} bei selbstähnlichen Prozessen dazu heran gezogen werden kann verschiedene Bewegungsklassen von Trajektorien zu bestimmen. Dabei beschreibt $0 < S_{MSS} < 0,5$ beschränkte Diffusion und $0,5 < S_{MSS} < 1$ unbeschränkte Diffusion (beschränkte Diffusion mit bestimmten Drift), $S_{MSS} = 0,5$ beschreibt freie Diffusion. Das beschriebene Verfahren wurde in den Verfolgungsalgorithmus implementiert [JKT⁺11]. In Abbildung 4.3(b) ist die Analyse eines ganzen Videos beispielhaft dargestellt bei dem Partikel mit einem S_{MSS} größer eins bzw. kleiner null nicht berücksichtigt wurden.

Die aus der Amplitude der Gaußfunktion erhaltenen Partikelintensitäten eines Videos unterliegen photophysikalisch bedingten Schwankungen und Verteilungen, die als normal verteilt angesehen werden können. Besteht das betrachtete System aus mehreren Komponenten, ist zu erwarten, dass die Intensitäten die Summe einer Gauß'sche Verteilung bilden, was zur Identifizierung der Anzahl der Kom-

ponenten verwendet wurde. Nach globaler Anpassung wurde die wahrscheinlichste Summe an Gauß'schen Verteilung mit Hilfe des Akaike-Informations-Kriterium bestimmt [Aka73].

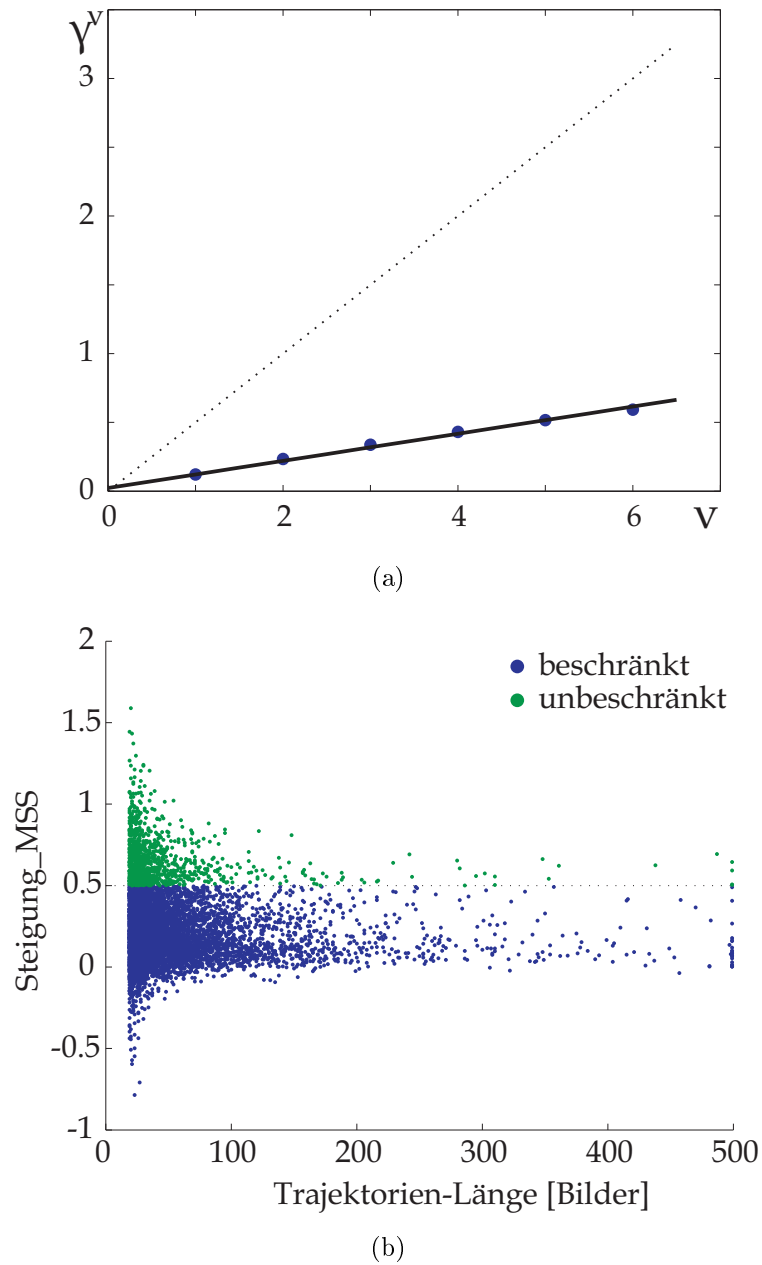


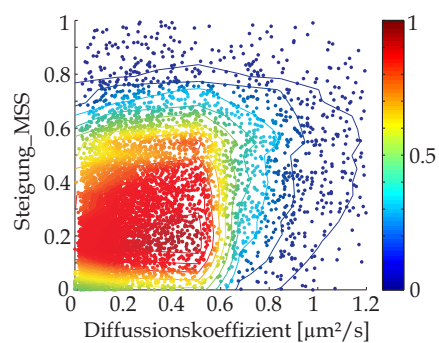
Abbildung 4.3: (a) Beispiel eines Moment Scaling Spectrum einer Trajektorie, die beschränkte Bewegung zeigt. (b) Streuhistogramm der Steigung des Moment Scaling Spectrum um die Bewegungsklassen von Trajektorien zu klassifizieren. Grün zeigt die Trajektorien, welche als unbeschränkt, blau solche die als beschränkt klassifiziert sind.

4.5.2 Analyse der Einzelzelldaten

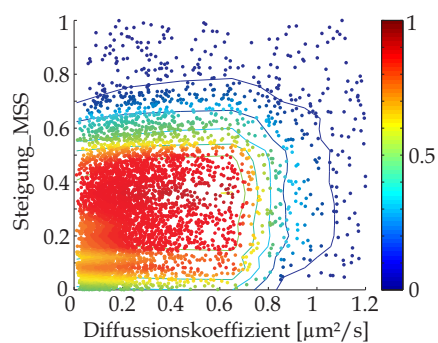
Zur Auswertung der Einzelzelldaten aus Kapitel 2.2 wurde eine von S. Kallenberger erstellte Segmentierungssoftware verwendet. Zuvor wurden die Schwellwerte zur Segmentierung manuell mit *ImageJ* bestimmt, indem Voxel verschiedenen Probenbereichen zugeordnet und Intensitätsschwellwerte festgelegt wurden, die notwendig waren, um Regionen voneinander zu unterscheiden. Dabei konnten die drei im *Spinning Disk*-Mikroskop aufgenommen Kanäle EpoR-GFP, MyrPalm-mCherry und Epo-Cy5.5 innerhalb zuvor definierter Bereiche und Schwellwerte segmentiert werden. Ausgelesen wurden die Volumina und die Intensitäten der erkannten Kompartimente.

Anhang A

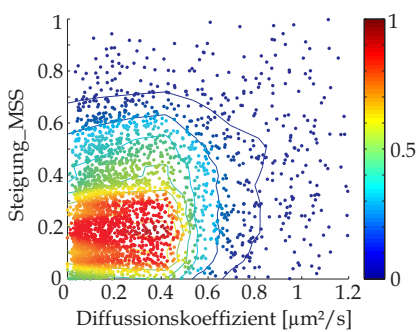
Analyse der Bewegungsformen



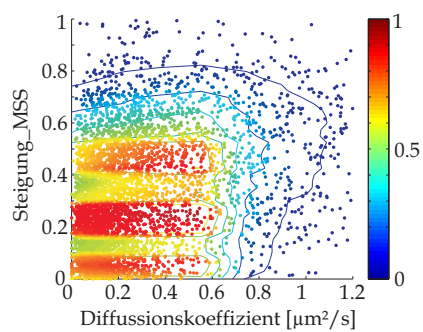
(a)



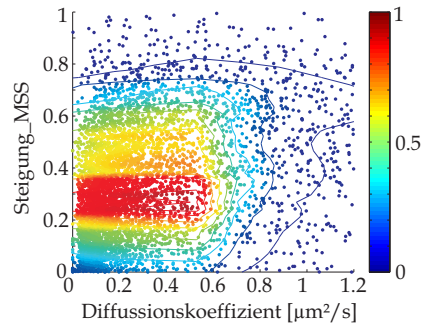
(b)



(c)



(d)



(e)

Abbildung A.1: Verteilung der Steigung des Moment Scaling Spectrum gegen die Diffusion des zugehörigen Partikels in unstimulierten H838 EpoR-wt Zellen (a, $n=8722$ Trajektorien), sowie 5 Minuten (b, $n=6572$ Trajektorien), 10 Minuten (c, $n=3631$ Trajektorien), 30 Minuten (d, $n=5892$ Trajektorien) und 60 Minuten (e, $n=6167$ Trajektorien).

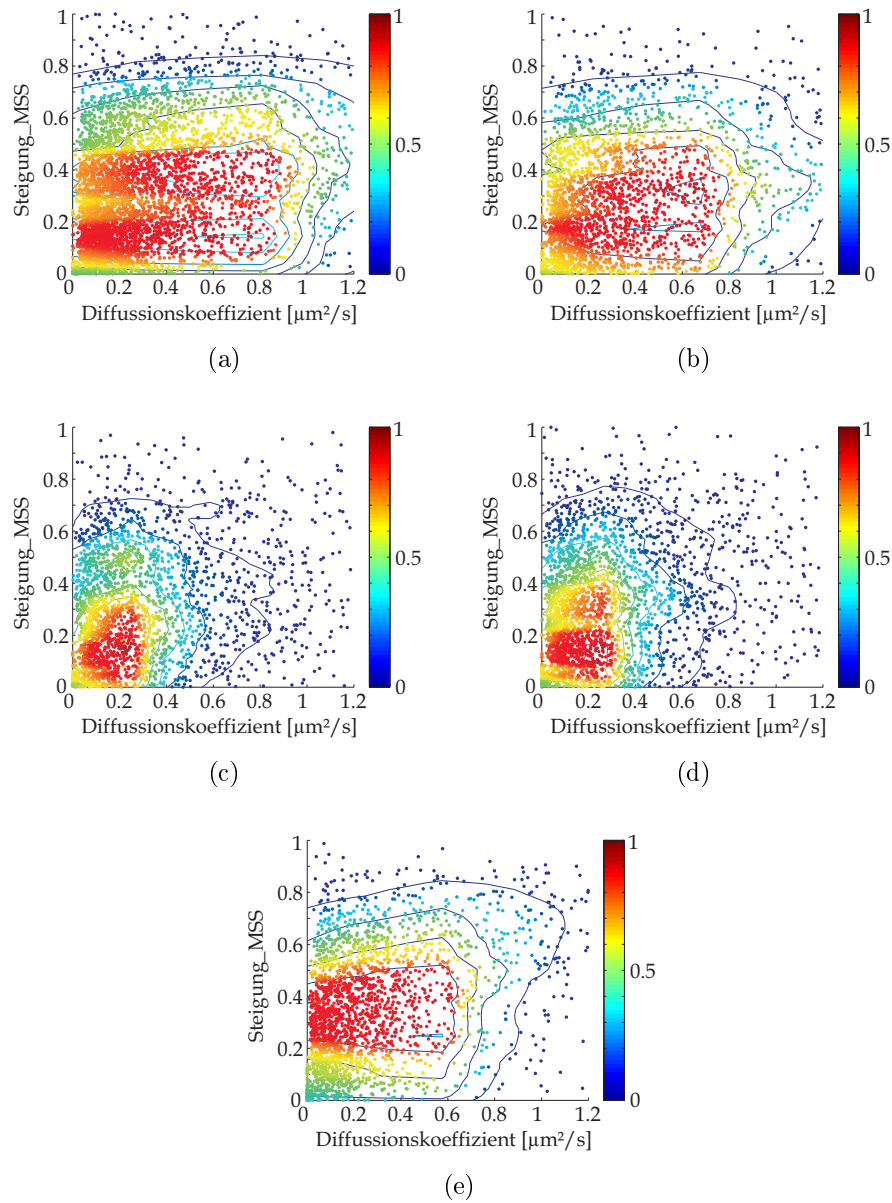


Abbildung A.2: Verteilung der Steigung des Moment Scaling Spectrum gegen die Diffusion des zugehörigen Partikels in unstimulierten H838 EpoR-T243N Zellen (a, $n=8722$ Trajektorien), sowie 5 Minuten (b, $n=5575$ Trajektorien), 10 Minuten (c, $n=3087$ Trajektorien), 30 Minuten (d, $n=2995$ Trajektorien) und 60 Minuten (e, $n=2820$ Trajektorien).

Abkürzungsverzeichnis

AGT *O*⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase

AIC Akaike-Informationen-Kriterium

AOTF akustisch-optisch regelbare Filter (*acousto opticle tunable filter*)

APD *Avanlache Photo Dioden*

AU *airy unit*

BS Bovine Serum

CCD *charged-coupled device*

CERA *Continuous Erthropoetin Receptor Activator*

CLSM *Confocal point scanning microscope*

CHX Cycloheximid

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

DOL Markierungsgrad (*degree of labelling*)

EGFR *Epidermal Growth Factor Receptor*

EpoR Erythropoetin-Rezeptor

FCS Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

FP Fluoreszentes Protein

FRAP *fluorescence recovery after photobleaching*

frs/s *frames per second*

FWHM *full with half maximum*, Halbwertsbreite

GFP Grün fluoreszierendes Protein

IB Immunoblot

IFNG Interferon Gamma (Interferon- γ)

JAK Januskinase

JAK-STAT-Signalweg Janus Kinase und *signal transducer and activator of transcription* Signalweg

KS-Test Kolmogorow-Smirnow-Test

MSD *mean squared displacement*, mittlere quadratische Verschiebung

M β CD Methyl- β -Cyclodextrin

MSS *Moment Scaling Spectrum*

n Brechungsindex

NA Numerische Apertur

NESP *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*

NSCLC *non-small cell lung cancer*, Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs

ODE *ordinary differential equation*, gewöhnliche Differenzialgleichung

POI *protein of interest*, zu untersuchendes Protein

PSF *point spread function*, Punktabbildungsfunktion

PMT *Photo Multiplier Tube*

RET Resonanzenergieübertragung

rhEpo rekombinantes humanes Erythropoetin

SiR Silicium-Rhodamin

SOCS3 *suppressor of cytokine signaling 3*

SPT *Single Particle Tracking*, Einzelpartikelverfolgung

STAT *signal transducers and activators of transcription*

STD Standardabweichung

STED *Stimulated emission depletion*

τ Lebensdauer des Fluorophors in Gegenwart von Löschmolekülen

τ_0 natürliche Fluoreszenzlebensdauer

TIRFM *total internal reflection microscopy*

U unit

ZK Zentralkomitee

ZL Zellysat

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Apl. Prof. Dirk-Peter Herten, für die Möglichkeit an einem solch interessanten und interdisziplinären Thema arbeiten zu können, für die großartige Unterstützung, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die hervorragende Zusammenarbeit. Ich bin dankbar dafür, an mehreren nationalen und internationalen Konferenzen teilgenommen haben zu dürfen.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Ursula Kummer, dass sie sich bereit erklärt hat das Zweitgutachten zu übernehmen.

Im Rahmen des LungSys2-Projektes möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken den Fortschritt meiner Arbeit in den Konsortiumstreffen in Heidelberg präsentieren zu dürfen und für die hilfreichen Anregungen. Augustin Rodriguez und Florian Salopiata danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und unerlässliche Unterstützung in molekularbiologischen Fragen rund um den EpoR. Florian danke ich für die Klonierung der Fusionsproteine. Prof. Ursula Klingmüller möchte ich danken, für die Möglichkeit die biochemischen Experimente in ihrem Labor durchführen zu dürfen.

Für die produktive Kooperation, die anregenden Diskussionen, die Bereitstellung der Segmentierungssoftware und das Näherbringen des Feldes der Systembiologie bedanke ich mich bei Stefan Kallenberger.

Dr. Ulrike Engel danke ich für die hilfreichen Tipps und der Starthilfe der Messung lebender Zellen.

Ein großer Dank gebührt allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises Einzelmolekülspektroskopie, Jessica Balbo, Daniel Barzan, Dominik Brox, Tanja Ehrhard, Kristin Großmayer, Andreas Haderspeck, Siegfried Hänselmann, Alexander Kiel, Anton Kurz, Konstantinos Lymperopoulos, Arina Rybina, Michael Schwering, Christina Spassova, Ilse Valtierra und Klaus Yserentant, für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die hilfreichen Diskussionen und die schöne Zeit im Labor, beim Gruppenretreat im Kloster Schöntal, beim Weißwurstessen, den alljährlichen Gruppenausflügen, beim Grillen, beim Fussball spielen und Klettern. Die wissenschaftlichen Ausflüge in die Alpen auf zwei Brettern werden mir in schöner Erinnerung bleiben!

Für das Korrekturlesen von Teilen dieser Arbeit möchte ich Arina Rybina, Siegfried Hänselmann, Kristin Großmayer, Dominik Brox, Stefan Kallenberger und Daniel Barzan danken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Mann Peter, der mich in der Zeit meiner Doktorarbeit außerordentlich unterstützt hat und mir jederzeit Rückhalt und Ansporn geben konnte. Herzlich danken möchte ich meinem Vater, der mir das gesamte Studium ermöglicht hat und mich durch seine ständige Ermutigung und als Vorbild bis zu diesem Punkt gebracht hat.

Literaturverzeichnis

- [Abb73] Ernst Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–418, 1873.
- [ABLS06] Bree B Aldridge, John M Burke, Douglas a Lauffenburger, and Peter K Sorger. Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nature cell biology*, 8(11):1195–203, November 2006.
- [Aka73] Akaike H. Information theory and an extension of the maximum like lihood principle. In *Petrov B & F C , eds., Second international symposium on information theory*, pages 267–281. Akademinai Kiado, Budapest, 1973.
- [ALP⁺08] Nicholas L Andrews, Keith a Lidke, Janet R Pfeiffer, Alan R Burns, Bridget S Wilson, Janet M Oliver, and Diane S Lidke. Actin restricts FcepsilonRI diffusion and facilitates antigen-induced receptor immobilization. *Nature cell biology*, 10(8):955–63, August 2008.
- [AT15] Atto-Tec. *Fluorescent Labels and Dyes product catalog 2013/2015*. ATTO-TEC GmbH, Siegen, 2015.
- [Axe81] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*, 89(1):141–5, April 1981.
- [Axe03] Daniel Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. In *Methods in enzymology, Volume 361*, pages 1–33. 2003.
- [Axe08] Daniel Axelrod. Chapter 7: Total internal reflection fluorescence microscopy. In *Methods in Cell Biology, Biophysical tools for biologists*, pages 169–221. 2008.
- [Bau03] W. Baumgartner. Cadherin function probed by laser tweezer and single molecule fluorescence in vascular endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 116(6):1001–1011, January 2003.

- [Bec07] Verena Becker. *Signaling through the Erythropoietin Receptor is Promoted by Dense Packing of the Transmembrane Domain and Regulated by Rapid Receptor Internalization*. Dissertation, Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2007.
- [BLA⁺13] J Beaudouin, C Liesche, S Aschenbrenner, M Hörner, and R Eils. Caspase-8 cleaves its substrates from the plasma membrane upon CD95-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*, 20(4):599–610, April 2013.
- [BLB⁺91] V C Broudy, N Lin, M Brice, B Nakamoto, and T Papayannopoulou. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood*, 77(12):2583–90, June 1991.
- [BLQL99] D L Beckman, L L Lin, M E Quinones, and G D Longmore. Activation of the erythropoietin receptor is not required for internalization of bound erythropoietin. *Blood*, 94(8):2667–75, October 1999.
- [BRS⁺12] J Bachmann, a Raue, M Schilling, V Becker, J Timmer, and U Klingmüller. Predictive mathematical models of cancer signalling pathways. *Journal of internal medicine*, 271(2):155–65, February 2012.
- [BSB⁺10] Verena Becker, Marcel Schilling, Julie Bachmann, Ute Baumann, Andreas Raue, Thomas Maiwald, Jens Timmer, and Ursula Klingmüller. Covering a broad dynamic range: information processing at the erythropoietin receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5984):1404–8, June 2010.
- [BW04] Joan M Boggs and Huimin Wang. Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *Journal of neuroscience research*, 76(3):342–55, May 2004.
- [BWR⁺10] Mario Brameshuber, Julian Weghuber, Verena Ruprecht, Imre Gombos, Ibolya Horváth, László Vigh, Paul Eckerstorfer, Endre Kiss, Hannes Stockinger, and Gerhard J Schütz. Imaging of mobile long-lived nanoplatforms in the live cell plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, 285(53):41765–71, December 2010.
- [CAV⁺10] Inhee Chung, Robert Akita, Richard Vandlen, Derek Toomre, Joseph Schlessinger, and Ira Mellman. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature*, 464(7289):783–7, April 2010.

- [CF14] Christopher J Carbone and Serge Y Fuchs. Eliminative signaling by Janus kinases: role in the downregulation of associated receptors. *Journal of cellular biochemistry*, 115(1):8–16, January 2014.
- [CFX06] Long Cai, Nir Friedman, and X Sunney Xie. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature*, 440(7082):358–62, March 2006.
- [CHLT05] Irwin Chen, Mark Howarth, Weiyang Lin, and Alice Y Ting. Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase. 2(2):99–104, 2005.
- [CMLL10] Dmitriy M Chudakov, Mikhail V Matz, Sergey Lukyanov, and Konstantin A Lukyanov. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues. pages 1103–1163, 2010.
- [Con28] Edward U Condon. Nuclear Motions Associated with Electron Transitions in Diatomic Molecules. *Phys. Rev.*, 32:858–872, 1928.
- [COYKN04] Jacob Cohen, Liat Oren-Young, Ursula Klingmuller, and Drorit Neumann. Protein tyrosine phosphatase 1B participates in the down-regulation of erythropoietin receptor signalling. *The Biochemical journal*, 377(Pt 2):517–24, January 2004.
- [CSdC⁺14] Nicolas Chenouard, Ihor Smal, Fabrice de Chaumont, Martin Maška, Ivo F Sbalzarini, Yuanhao Gong, Janick Cardinale, Craig Carthel, Stefano Coraluppi, Mark Winter, Andrew R Cohen, William J Godinez, Karl Rohr, Yannis Kalaidzidis, Liang Liang, James Duncan, Hongying Shen, Yingke Xu, Klas E G Magnusson, Joakim Jaldén, Helen M Blau, Perrine Paul-Gilloteaux, Philippe Roudot, Charles Kervrann, François Waharte, Jean-Yves Tinevez, Spencer L Shorte, Joost Willemsse, Katherine Celler, Gilles P van Wezel, Han-Wei Dan, Yuh-Show Tsai, Carlos Ortiz de Solórzano, Jean-Christophe Olivo-Marin, and Erik Meijering. Objective comparison of particle tracking methods. *Nature methods*, (JANUARY), January 2014.
- [DD09] Richard N Day and Michael W Davidson. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews*, 38(10):2887–921, October 2009.
- [DGD⁺97] René Devos, Yves Guisez, José Van Der, David W White, Michael Kalai, Michael Fountoulakis, Geert Plaetinck, and Van Der Heyden. PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Ligand-independent Dimerization of the Extracellular Domain of the Leptin

Receptor and Determination of the Stoichiometry of Leptin Binding Ligand-independent Dimerization of the Extracellular Domain of the Leptin Recepto. 1997.

- [DKY⁺13] Sameer Doshi, Wojciech Krzyzanski, Susan Yue, Steven Elliott, Andrew Chow, and Juan José Pérez-Ruixo. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of erythropoiesis-stimulating agents. *Clinical pharmacokinetics*, 52(12):1063–83, December 2013.
- [DLGW03] Gianni M Di Guglielmo, Christine Le Roy, Anne F Goodfellow, and Jeffrey L Wrana. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nature cell biology*, 5(5):410–21, May 2003.
- [DML07] Elaine a Dunlop, Alexander P Maxwell, and Terence R J Lappin. Impaired downregulation following erythropoietin receptor activation in non-small cell lung carcinoma. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25(2):380–4, February 2007.
- [Dre74] Karl-Heinz Drexhage. Interaction of light with monomolecular Dye layers. *Prog. Opt.*, 12:163–232, 1974.
- [Efr79] B Efron. Bootstrap Methods : Another Look at the Jackknife Author (s): B . Efron Source : The Annals of Statistics , Vol . 7 , No . 1 , (Jan . , 1979), pp . 1-26 Published by : Institute of Mathematical Statistics Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/295883>. 7(1):1–26, 1979.
- [ES12] Steve Elliott and Angus M Sinclair. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biologics : targets & therapy*, 6:163–89, January 2012.
- [ESS⁺05] Helge Ewers, Alicia E Smith, Ivo F Sbalzarini, Hauke Lilie, Petros Koumoutsakos, and Ari Helenius. Single-particle tracking of murine polyoma virus-like particles on live cells and artificial membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(42):15110–5, October 2005.
- [FaMY01] R. Ferrari, a.J. Manfroi, and W.R. Young. Strongly and weakly self-similar diffusion. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 154(1-2):111–137, June 2001.
- [FHM⁺94] Takashi Funatsu, Yoshie Harada, Makio Mokunaga, Kiwamu Saito, and Toshio Yanagida. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature*, 374:555–559, 1994.

- [Fra14] Stuart J Frank. Receptor Dimerization in GH and Erythropoietin Action. *It Takes Two to Tango. But How.* 143(May):2–10, 2014.
- [FVZ⁺10] Hana Forejtníková, Maud Vieillevoys, Yael Zermati, Mireille Lambert, Rosa Maria Pellegrino, Soizic Guihard, Muriel Gaudry, Clara Camaschella, Catherine Lacombe, Antonella Roetto, Patrick Mayeux, and Frédérique Verdier. Transferrin receptor 2 is a component of the erythropoietin receptor complex and is required for efficient erythropoiesis. *Blood*, 116(24):5357–67, December 2010.
- [GJH⁺08] Arnaud Gautier, Alexandre Juillerat, Christian Heinis, Ivan Reis Corrêa, Maik Kindermann, Florent Beaufls, and Kai Johnsson. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chemistry & biology*, 15(2):128–36, February 2008.
- [GKH14] Kristin S Grubmayer, Anton Kurz, and Dirk-Peter Herten. Single-molecule studies on the label number distribution of fluorescent markers. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 15(4):734–42, March 2014.
- [GL06] Alec W Gross and Harvey F Lodish. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *The Journal of biological chemistry*, 281(4):2024–32, January 2006.
- [GLSL12] G. John Gibson, Robert Loddenkemper, Yves Sibille, and Bo Lundbäck. Lung cancer. In G. John Gibson, Robert Loddenkemper, Yves Sibille, and Bo Lundbäck, editors, *European Lung White Book*, chapter 16, pages 224–237. European Respiratory Society, 2012.
- [Gri98] B. a. Griffin. Specific Covalent Labeling of Recombinant Protein Molecules Inside Live Cells. *Science*, 281(5374):269–272, July 1998.
- [GSHV07] Emmanuel G Guignet, Jean-Manuel Segura, Ruud Hovius, and Horst Vogel. Repetitive reversible labeling of proteins at polyhistidine sequences for single-molecule imaging in live cells. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 8(8):1221–7, June 2007.
- [HAB⁺06] Matthew E Hardee, Murat O Arcasoy, Kimberly L Blackwell, John P Kirkpatrick, and Mark W Dewhirst. Erythropoietin biology in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(2):332–9, January 2006.
- [HBM⁺10] Jonathan a Hern, Asma H Baig, Gregory I Mashanov, Berry Birdsell, John E T Corrie, Sebastian Lazareno, Justin E Molloy, and

- Nigel J M Birdsall. Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6):2693–8, March 2010.
- [HCG⁺06] Mark Howarth, Daniel J-f Chinnapen, Kimberly Gerrow, Pieter C Dorrestein, Melanie R Grandy, Neil L Kelleher, Alaa El-husseini, and Alice Y Ting. A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site. 3(4):267–273, 2006.
- [Hec05] E. Hecht. *Optik*. Oldenburg Verlag München Wien, 2005.
- [HKT⁺06] Sébastien Huet, Erdem Karatekin, Viet Samuel Tran, Isabelle Fanget, Sophie Cribier, and Jean-Pierre Henry. Analysis of transient behavior in complex trajectories: application to secretory vesicle dynamics. *Biophysical journal*, 91(9):3542–59, November 2006.
- [HS11] Shane P Herbert and Didier Y R Stainier. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(9):551–64, September 2011.
- [IH04] Lionel B Ivashkiv and Xiaoyu Hu. Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther*, 6(4):159–168, 2004.
- [II02] S Inoué and T. Inoué. Direct-view high-speed confocal scanner: the CSU-10. In *Methods Cell Biol*, pages 70:87–127. 2002.
- [Jel14] Wolfgang Jelkmann. The ESA scenario gets complex: from biosimilar epoetins to activin traps. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, pages 1–7, April 2014.
- [JGK⁺03] Alexandre Juillerat, Thomas Gronemeyer, Antje Keppler, Susanne Gendreizig, Horst Pick, Horst Vogel, and Kai Johnsson. Directed Evolution of O⁶-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo. 10(Figure 2):313–317, 2003.
- [JKT⁺11] Khuloud Jaqaman, Hirotaka Kuwata, Nicolas Touret, Richard Collins, William S Trimble, Gaudenz Danuser, and Sergio Grinstein. Cytoskeletal control of CD36 diffusion promotes its receptor and signaling function. *Cell*, 146(4):593–606, August 2011.
- [JLM⁺08] Khuloud Jaqaman, Dinah Loerke, Marcel Mettlen, Hirotaka Kuwata, Sergio Grinstein, Sandra L Schmid, and Gaudenz Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. 5(8), 2008.

- [Kal14] Stefan M Kallenberger. *Variability in cellular signal transduction networks*. PhD thesis, Ruperto-Carola University of Heidelberg, 2014.
- [Kas52] Michael Kasha. Collisional Perturbation of Spin-Orbital Coupling and the Mechanism of Fluorescence Quenching. A Visual Demonstration of the Perturbation. *J. Chem. Phys.* 20, 71 (1952);, 20:71–74, 1952.
- [KBC⁺14] Stefan M Kallenberger, Joël Beaudouin, Juliane Claus, Carmen Fischer, Peter K Sorger, Stefan Legewie, and Roland Eils. Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis. *Science signaling*, 7(316):ra23, March 2014.
- [KBHL96] U Klingmüller, S Bergelson, J G Hsiao, and H F Lodish. Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16):8324–8, August 1996.
- [KG92] Kayser K. and Gabius HJ. Analysis of expression of erythropoietin-binding sites in human lung carcinoma by the biotinylated ligand. *Zentralblatt für Pathologie*, 138(4):266–70, 1992.
- [KGG⁺03] Antje Keppler, Susanne Gendreizig, Thomas Gronemeyer, Horst Pick, Horst Vogel, and Kai Johnsson. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature biotechnology*, 21(1):86–9, January 2003.
- [KHO⁺02] Robin Ketteler, Achim C Heinrich, Julia K Offe, Verena Becker, Jacob Cohen, Drorit Neumann, and Ursula Klingmüller. A functional green fluorescent protein-erythropoietin receptor despite physical separation of JAK2 binding site and tyrosine residues. *The Journal of biological chemistry*, 277(29):26547–52, July 2002.
- [KHS07] Sally A Kim, Katrin G Heinze, and Petra Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods*, 4(11):963–973, 2007.
- [Kra91] S B Krantz. Erythropoietin. *Blood*, 77:419–434, 1991.
- [KSKH⁺10] Akihiro Kusumi, Yuki M Shirai, Ikuko Koyama-Honda, Kenichi G N Suzuki, and Takahiro K Fujiwara. Hierarchical organization of the plasma membrane: investigations by single-molecule tracking vs.

- fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS letters*, 584(9):1814–23, May 2010.
- [KTH⁺04] Mihály Kovács, Judit Tóth, Csaba Hetényi, András Málnási-Csizmadia, and James R Sellers. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *The Journal of biological chemistry*, 279(34):35557–63, August 2004.
- [LDB⁺01] C Lamaze, a Dujeancourt, T Baba, C G Lo, a Benmerah, and a Dautry-Varsat. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Molecular cell*, 7(3):661–71, March 2001.
- [LEM⁺08] Georgyi V Los, Lance P Encell, Mark G Mcdougall, Danette D Hartzell, Natasha Karassina, Chad Zimprich, Monika G Wood, Randy Learish, Rachel Friedman Ohana, Marjeta Urh, Dan Simpson, Jacqui Mendez, Kris Zimmerman, Paul Otto, Gediminas Vidugiris, Ji Zhu, Aldis Darzins, Dieter H Klaubert, Robert F Bulleit, and Keith V Wood. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chem. Biol.*, 3(6):373–382, 2008.
- [LGTP06] Suman Lata, Martynas Gavutis, Robert Tampé, and Jacob Piehler. Specific and stable fluorescence labeling of histidine-tagged proteins for dissecting multi-protein complex formation. *Journal of the American Chemical Society*, 128(7):2365–72, February 2006.
- [Liv99] O. Livnah. Crystallographic Evidence for Preformed Dimers of Erythropoietin Receptor Before Ligand Activation. *Science*, 283(5404):987–990, February 1999.
- [LR91] R F Luduena and M C Roach. Tubulin sulfhydryl groups as probes and targets for antimitotic and antimicrotubule agents. *Pharmacology & therapeutics*, 49(1-2):133–52, January 1991.
- [LS10] Daniel Lingwood and Kai Simons. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5961):46–50, January 2010.
- [LSSK01] J Lippincott-Schwartz, E Snapp, and a Kenworthy. Studying protein dynamics in living cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(6):444–56, June 2001.
- [LUO⁺13] Gražvydas Lukinavičius, Keitaro Umezawa, Nicolas Olivier, Alf Honigmann, Guoying Yang, Tilman Plass, Veronika Mueller, Luc

- Reymond, Ivan R Corrêa, Zhen-Ge Luo, Carsten Schultz, Edward a Lemke, Paul Heppenstall, Christian Eggeling, Suliana Manley, and Kai Johnsson. A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nature chemistry*, 5(2):132–9, February 2013.
- [LW09] Diane S Lidke and Bridget S Wilson. Caught in the act: quantifying protein behaviour in living cells. *Trends in cell biology*, 19(11):566–74, November 2009.
- [LZTK⁺14] Vibor Laketa, Sirius Zerbakhsh, Alexis Traynor-Kaplan, Aidan Macnamara, Devaraj Subramanian, Mateusz Putyrski, Rainer Mueller, André Nadler, Matthias Mentel, Julio Saez-Rodriguez, Rainer Pepperkok, and Carsten Schultz. PIP3 Induces the Recycling of Receptor Tyrosine Kinases. *Science signaling*, 7(308):ra5, January 2014.
- [Mas51] F. J. Massey. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46(253):68–78, 1951.
- [MCL⁺13] Laura Marchetti, Andrea Callegari, Stefano Luin, Giovanni Signore, Alessandro Viegi, Fabio Beltram, and Antonino Cattaneo. Ligand signature in the membrane dynamics of single TrkA receptor molecules. *Journal of cell science*, 126(Pt 19):4445–56, October 2013.
- [MCSC05] Lawrence W Miller, Yunfei Cai, Michael P Sheetz, and Virginia W Cornish. In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates : a flexible chemical tag. 2(4):255–257, 2005.
- [MEM⁺06] Eric Macia, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner, and Tomas Kirchhausen. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell*, 10(6):839–50, June 2006.
- [MFJ⁺12] Kathy L McGraw, Gwenny M Fuhler, Joseph O Johnson, Justine a Clark, Gisela C Caceres, Lubomir Sokol, and Alan F List. Erythropoietin receptor signaling is membrane raft dependent. *PloS one*, 7(4):e34477, January 2012.
- [MFM⁺06] Nobuhiro Morone, Takahiro Fujiwara, Kotonon Murase, Rinshi S Kasai, Hiroshi Ike, Shigeki Yuasa, Jiro Usukura, and Akihiro Kusumi. Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *The Journal of cell biology*, 174(6):851–62, September 2006.

- [Mil56] L. H. Miller. Table of Percentage Points of Kolmogorov Statistics. *Journal of American Statistical Association*, 51(273):111–121, 1956.
- [MMF⁺06] Marta Marchetti, Marie-noelle Monier, Alexandre Fradagrada, Keith Mitchell, Florence Baychelier, Pierre Eid, Ludger Johannes, and Christophe Lamaze. Stat-mediated Signaling Induced by Type I and Type II Interferons (IFNs) Is Differentially Controlled through Lipid Microdomain Association and Clathrin-dependent Endocytosis of IFN Receptors. 17(July):2896–2909, 2006.
- [MOS11] J. Mütze, T. Ohrt, and P. Schwille. Fluorescence correlation spectroscopy in vivo. *Laser & Photonics Reviews*, 5(1):52–67, January 2011.
- [MRH⁺11] V Mueller, C Ringemann, a Honigmann, G Schwarzmann, R Medda, M Leutenegger, S Polyakova, V N Belov, S W Hell, and C Eggeling. STED nanoscopy reveals molecular details of cholesterol- and cytoskeleton-modulated lipid interactions in living cells. *Biophysical journal*, 101(7):1651–60, October 2011.
- [MSA⁺07] Susana Minguet, Mahima Swamy, Balbino Alarcón, Immanuel F Luescher, and Wolfgang W a Schamel. Full activation of the T cell receptor requires both clustering and conformational changes at CD3. *Immunity*, 26(1):43–54, January 2007.
- [NML⁺10] Viacheslav O Nikolaev, Alexey Moshkov, Alexander R Lyon, Michele Miragoli, Pavel Novak, Helen Paur, Martin J Lohse, Yuri E Korchev, Sian E Harding, and Julia Gorelik. Beta2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5973):1653–7, March 2010.
- [OCK⁺96] M Ormö, a B Cubitt, K Kallio, L a Gross, R Y Tsien, and S J Remington. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5280):1392–5, September 1996.
- [PAA⁺96] J S Philo, K H Aoki, T Arakawa, L O Narhi, and J Wen. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry*, 35(5):1681–91, February 1996.
- [PAG⁺07] Maximilian W Popp, John M Antos, Gijsbert M Grotenbreg, Eric Spooner, and Hidde L Ploegh. Sortagging: a versatile method for protein labeling. *Nature chemical biology*, 3(11):707–8, November 2007.

- [PAG⁺12] S Peters, a a Adjei, C Gridelli, M Reck, K Kerr, and E Felip. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23 Suppl 7(February 2002):vii56–64, October 2012.
- [PHEG68] Mojmir Petrán, Milan Hadravský, M. David Egger, and Robert Galambos. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope. *Journal of the Optical Society of America*, 58(5):661, May 1968.
- [PMZ⁺04] Enrica Maria Petrini, Ivan Marchionni, Paola Zacchi, Werner Sieghart, and Enrico Cherubini. Clustering of extrasynaptic GABA(A) receptors modulates tonic inhibition in cultured hippocampal neurons. *The Journal of biological chemistry*, 279(44):45833–43, October 2004.
- [Rei79] D. Reid. An algorithm for tracking multiple targets. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 24(6):843–854, December 1979.
- [Rib10] Domenico Ribatti. Erythropoietin and tumor angiogenesis. *Stem cells and development*, 19(1):1–4, January 2010.
- [RN01] E a Reits and J J Neefjes. From fixed to FRAP - measuring protein mobility and activity in living cells. *Nature cell biology*, 3(6):E145–7, June 2001.
- [RSG⁺99] S K Rodal, G Skretting, O Garred, F Vilhardt, B van Deurs, and K Sandvig. Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular biology of the cell*, 10(4):961–74, April 1999.
- [RvO08] Arjun Raj and Alexander van Oudenaarden. Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell*, 135(2):216–26, October 2008.
- [Sal13] Florian Salopiata. *Etablierung eines Fluoreszenz-markierbaren Erythropoetin-Rezeptors zur Messung seiner Dynamik in humanen Lungenkrebs-Zellen auf Einzelmolekül-Niveau*. Master thesis, Ruperto-Carola Universität Heidelberg, 2013.
- [SAT⁺08] Sara Sigismund, Elisabetta Argenzio, Daniela Tosoni, Elena Cavallaro, Simona Polo, and Pier Paolo Di Fiore. Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Developmental cell*, 15(2):209–19, August 2008.

- [Sax08] Michael J Saxton. Single-particle tracking: connecting the dots. *Nature methods*, 5(8):671–2, August 2008.
- [SC77] C.J.R. Sheppard and a. Choudhury. Image Formation in the Scanning Microscope. *Optica Acta: International Journal of Optics*, 24(10):1051–1073, October 1977.
- [SDDV05] Nathalie Sauvonnet, Annick Dujeancourt, and Alice Dautry-Varsat. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *The Journal of cell biology*, 168(1):155–63, January 2005.
- [SFHC03] Arnauld Serge, Lawrence Fourgeaud, Agnes Hemar, and Daniel Choquet. Active surface transport of metabotropic glutamate receptors through binding to microtubules and actin flow. *Journal of cell science*, 116(Pt 24):5015–22, December 2003.
- [SGAS00] J Schmoranzer, M Goulian, D Axelrod, and S M Simon. Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 149(1):23–32, April 2000.
- [SGREB09] Hannah Schmidt-Glenewinkel, Eileen Reinz, Roland Eils, and Nathan R Brady. Systems biological analysis of epidermal growth factor receptor internalization dynamics for altered receptor levels. *The Journal of biological chemistry*, 284(25):17243–52, June 2009.
- [SK13] Regina Samaga and Steffen Klamt. Modeling approaches for qualitative and semi-quantitative analysis of cellular signaling networks. *Cell communication and signaling : CCS*, 11(1):43, January 2013.
- [SKH⁺12] Kenichi G N Suzuki, Rinshi S Kasai, Koichiro M Hirose, Yuri L Nemoto, Munenori Ishibashi, Yoshihiro Miwa, Takahiro K Fujiwara, and Akihiro Kusumi. Transient GPI-anchored protein homodimers are units for raft organization and function. *Nature chemical biology*, 8(9):774–83, September 2012.
- [SLHE14] Steffen J. Sahl, Marcel Leutenegger, Stefan W. Hell, and Christian Eggeling. High-Resolution Tracking of Single-Molecule Diffusion in Membranes by Confocalized and Spatially Differentiated Fluorescence Photon Stream Recording. *ChemPhysChem*, pages n/a–n/a, March 2014.
- [SMG⁺09] Jagadish Sankaran, Manoj Manna, Lin Guo, Rachel Kraut, and Thorsten Wohland. Diffusion, transport, and cell membrane organization investigated by imaging fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biophysical journal*, 97(9):2630–9, November 2009.

- [SMY00] Y Sako, S Minoghchi, and T Yanagida. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature cell biology*, 2(3):168–72, March 2000.
- [SST05] Nathan C Shaner, Paul A Steinbach, and Roger Y Tsien. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods*, 2(12), 2005.
- [SvZ09] Alexander Sorkin and Mark von Zastrow. Endocytosis and signaling: intertwining molecular networks. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9):609–22, September 2009.
- [SWK⁺07] Jochen J Sieber, Katrin I Willig, Carsten Kutzner, Claas Gerding-Reimers, Benjamin Harke, Gerald Donnert, Burkhard Rammner, Christian Eggeling, Stefan W Hell, Helmut Grubmüller, and Thorsten Lang. Anatomy and dynamics of a supramolecular membrane protein cluster. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5841):1072–6, August 2007.
- [TDGG⁺10] Bebhinn Treanor, David Depoil, Aitor Gonzalez-Granja, Patricia Barral, Michele Weber, Omer Dushek, Andreas Bruckbauer, and Facundo D Batista. The membrane skeleton controls diffusion dynamics and signaling through the B cell receptor. *Immunity*, 32(2):187–99, February 2010.
- [VBP⁺08] Julio Vera, Julie Bachmann, Andrea C Pfeifer, Verena Becker, Jose a Hormiga, Nestor V Torres Darias, Jens Timmer, Ursula Klingmüller, and Olaf Wolkenhauer. A systems biology approach to analyse amplification in the JAK2-STAT5 signalling pathway. *BMC systems biology*, 2:38, January 2008.
- [WVK⁺05] Pierre Walrafen, Frédérique Verdier, Zahra Kadri, Stany Chrétien, Catherine Lacombe, and Patrick Mayeux. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood*, 105(2):600–8, January 2005.
- [WWK⁺11] Thomas Weidemann, Remigiusz Worch, Kristina Kurgonaite, Martin Hintersteiner, Christian Bökel, and Petra Schwille. Single cell analysis of ligand binding and complex formation of interleukin-4 receptor subunits. *Biophysical journal*, 101(10):2360–9, November 2011.
- [YDL90] a Yoshimura, a D D’Andrea, and H F Lodish. Friend spleen focus-forming virus glycoprotein gp55 interacts with the erythropoietin receptor in the endoplasmic reticulum and affects receptor metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11):4139–43, June 1990.

- [YLN⁺93] H. Youssoufian, G. Longmore, D. Neumann, A. Yoshimura, and H. F. Lodish. Structure, Function, and Activation of the Erythropoietin Receptor Is Not Required for Internalization of Bound Erythropoietin. *Blood*, 94:2667–2675, 1993.
- [YSB⁺00] E G Yarmola, T Somasundaram, T a Boring, I Spector, and M R Bubb. Actin-latrunculin A structure and function. Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *The Journal of biological chemistry*, 275(36):28120–7, September 2000.
- [ZDB⁺14] Bing Zhou, Jeffrey S Damrauer, Sean T Bailey, Tanja Hadzic, Youngtae Jeong, Kelly Clark, Cheng Fan, Laura Murphy, Cleo Y Lee, Melissa A Troester, C Ryan Miller, Jian Jin, David Darr, Charles M Perou, Ross L Levine, Maximilian Diehn, and William Y Kim. Erythropoietin promotes breast tumorigenesis through tumor-initiating cell self-renewal. 124(2):553–563, 2014.
- [ZLP⁺03] Lennart Zabeau, Delphine Lavens, Frank Peelman, Sven Eyckerman, Joël Vandekerckhove, and Jan Tavernier. The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Letters*, 546(1):45–50, July 2003.

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Systemische Untersuchung der Dynamik des Erythropoetin-Rezeptors durch

Einzelmolekül-Verfolgung und Variabilitätsanalyse

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich ~~wie folgt~~/bislang nicht¹⁾ an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: _____

Hochschule und Jahr: _____

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: _____

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, den 30.05.2014

Ort und Datum

Unterschrift

¹⁾ Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung.