

Multiparameter-Fluoreszenz-Image-  
Spektroskopie  
von Proteinkomplexen *in planta*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Stephanie Grabowski**

aus Moers

Düsseldorf 2013

aus dem Institut für Physikalische Chemie II  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Claus A. M. Seidel  
Koreferent: Prof. Dr. Stefan Egelhaaf

Tag der mündlichen Prüfung:  
30. Januar 2014

# Publikation

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgendem Artikel veröffentlicht:

Stahl Y., Grabowski S., Bleckmann A., Kühnemuth R., Weidtkamp-Peters S., Pinto K. G., Kirschner G. K., Schmid J. B., Wink R. H., Hülsewede A., Felekyan S., Seidel C. A. M., Simon R. (2013)

“Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes.“

Current Biology **23**: 362–371

# Inhaltsverzeichnis

<b>Publikation</b>	<b>i</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>ix</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie . . . . .	1
1.1.1. Förster-Resonanzenergietransfer zum Nachweis von Protein-Protein- Interaktionen in lebenden Zellen . . . . .	2
1.1.2. Mobilitätsmessungen von Proteinen in der Membran . . . . .	3
1.2. Regulation und Signaltransduktion der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	5
1.2.1. Mechanismen der Signaltransduktion . . . . .	7
1.2.2. Plasmodesmata . . . . .	8
1.2.3. Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	9
1.3. Zielsetzung der Arbeit . . . . .	10
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>12</b>
2.1. Fluoreszenz . . . . .	12
2.2. Fluoreszenz-Lebensdauer . . . . .	14
2.3. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) . . . . .	16
2.4. Fluoreszenz-Anisotropie und Depolarisierung . . . . .	19
<b>3. Materialien und Methoden</b>	<b>24</b>
3.1. Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (MFIS) . . . . .	24
3.1.1. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC) . . . . .	24
3.1.2. Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) . . . . .	25
3.1.3. Optischer Aufbau . . . . .	25
3.1.4. Gerätefunktion . . . . .	29
3.2. Durchführung der MFIS-Messungen . . . . .	30
3.2.1. Standardeinstellungen für MFIS-Messungen . . . . .	31
3.3. Analyse der MFIS-Daten . . . . .	32
3.3.1. Fluoreszenz-Parameter . . . . .	32
3.3.2. Software . . . . .	33
3.3.3. Anpassungen der Fluoreszenz-Lebensdauer und Modellfunktionen . . . . .	34

3.3.4.	Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	38
3.3.5.	Darstellung der MFIS-Daten . . . . .	40
3.4.	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) . . . . .	44
3.4.1.	Rauschanalyse mittels Korrelationsfunktion . . . . .	46
3.4.2.	Modellfunktionen für die Korrelationsfunktion . . . . .	48
3.4.3.	Verwendete Modellfunktionen zur FCS Kurvenanpassung . . . . .	50
3.4.4.	Praktische Durchführung der FCS-Messungen . . . . .	53
3.5.	Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) . . . . .	54
3.5.1.	Praktische Durchführung der FRAP-Messungen . . . . .	54
3.6.	Das grün fluoreszierende Protein (GFP) . . . . .	58
3.6.1.	Allgemeine Eigenschaften . . . . .	58
3.6.2.	Photophysikalische Eigenschaften . . . . .	61
3.7.	Induzierbare Expression von Fusionsproteinen in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	63
3.7.1.	Transformation mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . . . . .	63
3.7.2.	Verwendete Peptide . . . . .	64
3.7.3.	ACR4 und CLV1 . . . . .	65
<b>4.</b>	<b>Experimentelle Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>66</b>
4.1.	MFIS-Bilder von Rezeptorkinasen in <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	68
4.1.1.	FRET-Indikatoren . . . . .	72
4.2.	FLIM-Messungen an GFP und mCherry in <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	75
4.2.1.	Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP und GFP-Fusionen . . . . .	75
4.2.2.	Bestimmung optimaler Messbedingungen . . . . .	80
4.2.3.	Auswahl des Fitmodells für FRET-FLIM-Messungen . . . . .	84
4.2.4.	Mögliche Artefakte in FLIM-Messungen . . . . .	89
4.2.5.	Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer . . . . .	96
4.2.6.	Zusammenfassung und Diskussion der FLIM-Messungen . . . . .	97
4.3.	Untersuchung von Komplexbildung mit FRET-FLIM . . . . .	99
4.3.1.	Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer . . . . .	100
4.3.2.	Komplexbildung an der Plasmamembran . . . . .	103
4.3.3.	Komplexbildung an Plasmodesmata . . . . .	106
4.3.4.	Abhängigkeit vom Donor-Akzeptorverhältnis . . . . .	109
4.3.5.	Quantifizierung der FRET-Population . . . . .	113
4.3.6.	Zusammenfassung und Diskussion der FRET-FLIM-Messungen . . . . .	116
4.4.	Untersuchung von homomerer Komplexbildung mit Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	121
4.4.1.	Nachweis von Homo-FRET mit stationärer Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	121
4.4.2.	Effekte durch Orientierung . . . . .	129
4.4.3.	Progressives Photobleichen . . . . .	131
4.4.4.	Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	136
4.4.5.	Zusammenfassung und Diskussion der Homo-FRET-Messungen . . . . .	140
4.5.	Simultane Identifizierung von homomeren und heteromeren Komplexen . . . . .	142
4.6.	Mobilität von ACR4 und CLV1 in der PM . . . . .	145
4.6.1.	Bestimmung mobiler Fraktionen mit FRAP . . . . .	146
4.6.2.	FCS an freiem GFP . . . . .	149
4.6.3.	Isolierung der mobilen Fraktion durch Photobleichen . . . . .	155

4.6.4.	FCS an ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran . . . . .	156
4.6.5.	Bestimmung ligandenabhängiger Mobilitätsänderungen mit FCS . . . . .	165
4.6.6.	Diskussion der FRAP- und FCS-Messungen . . . . .	168
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>179</b>
5.1.	MFIS-Messungen mit Peptid . . . . .	179
5.1.1.	Peptidbehandlung . . . . .	179
5.1.2.	Heterokomplexbildung von ACR4 und CLV1 mit CLE40 . . . . .	180
5.1.3.	Homomerbildung von ACR4 mit CLE40 . . . . .	182
5.2.	Messung der Diffusion im Zellverband mit Hilfe von paGFP . . . . .	183
5.3.	PAINT an DNA . . . . .	185
5.3.1.	Hochauflösende Fluoreszenz-Mikroskopie . . . . .	185
5.3.2.	Experimentelle Realisierung und Validierung: PAINT an DNA . . . . .	186
<b>6.</b>	<b>Abschließende Diskussion</b>	<b>191</b>
6.1.	Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit FRET <i>in planta</i> . . . . .	191
6.1.1.	Interpretation der FRET-Daten . . . . .	191
6.1.2.	Quantitative FRET-Bestimmung . . . . .	192
6.2.	Nachweis von Homo-FRET mit Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	193
6.3.	Simultaner Nachweis von Homomeren und Heteromeren . . . . .	194
6.4.	Mobilität in der Plasmamembran . . . . .	196
6.5.	Biologische Bedeutung . . . . .	197
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassungen</b>	<b>200</b>
7.1.	Zusammenfassung . . . . .	200
7.2.	Summary . . . . .	202
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>204</b>
<b>A.</b>	<b>Anhang</b>	<b>216</b>
A.0.1.	FCS von freiem mCherry . . . . .	216
A.0.2.	Komplexbildung von GFP . . . . .	217
A.0.3.	Zusätzliche Parameter bei der Kurvenanpassung von Fluoreszenz- Abklingkurven . . . . .	218
A.0.4.	FRAP . . . . .	219
A.0.5.	FCS . . . . .	226
A.0.6.	Zum Orientierungseffekt bei Anisotropiemessungen . . . . .	229
A.0.7.	Plasmidkarten . . . . .	230
	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>232</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>233</b>

# Tabellenverzeichnis

3.1. Verwendete Peptide . . . . .	64
4.1. Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	79
4.2. Fluoreszenz-Lebensdauer von freiem GFP und ACR4-GFP an verschiedenen Messtagen . . . . .	97
4.3. FRET-FLIM: Mittelwerte Fluoreszenz-Lebensdauer . . . . .	108
4.4. FRET-FLIM: Parameter des Zwei-Spezies-Modells . . . . .	115
4.5. Zusammenfassung der Ergebnisse stationäre Fluoreszenz-Anisotropie . . . .	128
4.6. Streuung der Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	128
4.7. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	137
4.8. FCS an freiem GFP: Ergebnisse der Kurvenanpassungen . . . . .	152
4.9. FCS Kurvenanpassungen ACR4 und CLV1 . . . . .	156
4.10. FCS: Fitergebnisse ACR4 und CLV1 . . . . .	166
4.11. Diffusionskoeffizienten bestimmt mit FCS . . . . .	172
5.1. Verwendete Chemikalien für PAINT . . . . .	187

# Abbildungsverzeichnis

1.1. ACR4 und CLV1 im Wurzelmeristem von <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	6
1.2. Plasmodesmata . . . . .	9
2.1. Jablonski-Diagramm . . . . .	13
2.2. Jablonski-Diagramm mit FRET . . . . .	16
2.3. Schema: Voraussetzungen für FRET . . . . .	17
2.4. Abklingverhalten der Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	19
2.5. Depolarisierung . . . . .	22
3.1. Optischer Aufbau 1 (4 Kanäle) . . . . .	26
3.2. Optischer Aufbau 2 (6 Kanäle) . . . . .	27
3.3. MFIS Auswertung . . . . .	32
3.4. Beispiel eines zweidimensionalen Häufigkeitshistogramm . . . . .	41
3.5. Boxplot . . . . .	42
3.6. Schema einer FCS-Messung . . . . .	45
3.7. Schema eines FRAP-Experiments . . . . .	55
3.8. Beispiel einer FRAP-Messung . . . . .	57
3.9. Struktur von GFP . . . . .	59
3.10. Zustände von GFP . . . . .	62
3.11. Schemata von ACR4 und CLV1 . . . . .	65
4.1. Schema MFIS in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	68
4.2. MFIS von ACR4-GFP, ACR4-GFP + CLV1-mCh, CLV1-GFP, CLV1-GFP + ACR4-mCh . . . . .	69
4.3. MFIS von ACR4- und CLV1-Homomeren . . . . .	70
4.4. MFIS von ACR4 und CLV1 mit ausgetauschter Transmembrandomäne . . . . .	71
4.5. 2d-Histogramme zum FRET-Nachweis . . . . .	74
4.6. Fluoreszenz-Intensitätsbilder von freiem GFP und ACR4-GFP in <i>N. bentha- niana</i> . . . . .	75
4.7. Fluoreszenz-Intensitätsbilder von freiem mCherry und unbehandeltem <i>N. benthamiana</i> . . . . .	76
4.8. Fluoreszenz-Abklingkurven von GFP in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	78
4.9. Optimale Messbedingungen für FLIM an GFP . . . . .	81
4.10. Bestimmung optimaler Messbedingungen für ACR4-GFP . . . . .	83
4.11. Vergleich verschiedener Fitmodelle (256) . . . . .	86
4.12. Vergleich verschiedener Fitmodelle (1024) . . . . .	87
4.13. Abklingkurve eines Einzelpixel . . . . .	88
4.14. Fluoreszenz-Lebensdauer in der Region der PM . . . . .	90

4.15. Fluoreszenz-Lebensdauer von Chloroplasten . . . . .	91
4.16. Fluoreszenz-Lebensdauer in frühen Stadien der Expression von ACR4-GFP .	93
4.17. Direkte Akzeptoranregung von FP-Dimeren . . . . .	95
4.18. FRET von FP-Dimeren . . . . .	95
4.19. Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer . . . . .	96
4.20. FLIM: ACR4-GFP und CLV1-mCh an der PM . . . . .	99
4.21. FLIM Auswertung . . . . .	102
4.22. FRET-FLIM: Kontrollen und Bedeutung der TM . . . . .	104
4.23. FRET-FLIM: Komplexbildung von ACR4 und CLV1 . . . . .	105
4.24. FLIM: ACR4-GFP und CLV1-mCh an PD . . . . .	106
4.25. FRET-FLIM: Komplexbildung an Plasmodesmata . . . . .	107
4.26. Intensitätsbild mit direkter Akzeptoranregung . . . . .	109
4.27. Direkte und indirekte Akzeptorfluoreszenz . . . . .	110
4.28. Direkte und indirekte Akzeptorfluoreszenz gegen F.-Lebensdauer . . . . .	112
4.29. FRET-FLIM: Anteil der FRET-Spezies . . . . .	114
4.30. Chromophorabstände von GFP und mCherry . . . . .	119
4.31. Schema von Homo-FRET an GFP-GFP . . . . .	122
4.32. Fluoreszenz-Anisotropiebilder von GFP und GFP-GFP . . . . .	123
4.33. Zweidimensionale $\tau$ - $r$ -Histogramme von freiem GFP und GFP-GFP . . . . .	124
4.34. Varianz der Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	125
4.35. Fluoreszenz-Anisotropie-Bilder von GFP und ACR4-GFP . . . . .	126
4.36. Zweidimensionale $\tau$ - $r$ -Histogramme von freiem GFP und ACR4-GFP . . . . .	127
4.37. ACR4 bildet homomere Komplexe . . . . .	128
4.38. Orientierungseffekt auf Fluoreszenz-Anisotropie . . . . .	129
4.39. Zum Orientierungseffekt . . . . .	130
4.40. Progressives Photobleichen . . . . .	131
4.41. Progressives Photobleichen von ACR4-GFP . . . . .	133
4.42. Progressives Photobleichen von CLV1-GFP und freiem GFP . . . . .	133
4.43. Zeitaufgelöste Anisotropie . . . . .	136
4.44. <i>wobbling in a cone</i> -Modell . . . . .	138
4.45. Pixelpopulationen und Lokalisation . . . . .	143
4.46. Pixelpopulationen von PD im $r$ - $\tau$ -2d-Histogramm . . . . .	144
4.47. FRAP an ACR4 mit CLE40 . . . . .	148
4.48. FRAP an CLV1 mit CLV3 . . . . .	148
4.49. Normierte Korrelationskurven von freiem GFP . . . . .	150
4.50. FCS: Hintergrund in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	151
4.51. FCS: Photobleichen der immobilen Fraktion . . . . .	155
4.52. FCS: Diffusion von ACR4 und CLV1 in der PM . . . . .	157
4.53. Daten FCS ACR4-GFP 1 . . . . .	158
4.54. Daten FCS ACR4-GFP 2 . . . . .	159
4.55. Daten FCS ACR4-GFP 3 . . . . .	160
4.56. Daten FCS CLV1-GFP 1 . . . . .	161
4.57. Daten FCS CLV1-GFP 2 . . . . .	162
4.58. Daten FCS CLV1-GFP 3 . . . . .	163
4.59. Daten FCS CLV1-GFP 4 . . . . .	164

4.60. FCS: Diffusion von ACR4 und CLV1 nach Ligandenbindung . . . . .	167
4.61. Vergleich von Diffusionskoeffizienten . . . . .	174
4.62. ACR4 und CLV1 liegen in Fraktionen mit unterschiedlicher Mobilität vor. . . . .	177
4.63. Diffusionskoeffizienten der mobilen Fraktion von ACR4 und CLV1 . . . . .	178
5.1. ACR4 + CLV1 mit CLE40 . . . . .	181
5.2. ACR4-GFP mit CLE40 . . . . .	182
5.3. Diffusion von paGFP im Zellverband . . . . .	184
5.4. TIRF-Aufnahme von DNA mit TO . . . . .	188
5.5. PAINT-Bild von DNA . . . . .	189
5.6. PAINT-Analyse mit <i>Analecta</i> . . . . .	190
6.1. Komplexbildung von ACR4 und CLV1 mit MFIS . . . . .	195
6.2. Hypothetisches Schema der Funktionsweise von ACR4 und CLV1 im Wurzelmeristem von <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	198
A.1. FCS freies mCherry . . . . .	216
A.2. GFP liegt monomer vor . . . . .	217
A.3. Reduziertes $\chi^2$ und FRET-Lebensdauer . . . . .	218
A.4. FRAP-Kurven ACR4 -1 . . . . .	219
A.5. FRAP-Kurven ACR4 -2 . . . . .	220
A.6. Tabelle: FRAP-Kurvenanpassung ACR4 . . . . .	221
A.7. FRAP-Kurven CLV1 -1 . . . . .	222
A.8. FRAP-Kurven CLV1 -2 . . . . .	223
A.9. FRAP-Kurven CLV1 -3 . . . . .	224
A.10. Tabelle: FRAP-Kurvenanpassung CLV1 . . . . .	225
A.11. Tabelle: FCS-Kurvenanpassungen . . . . .	226
A.12. Parameter der FCS Auswertung ACR4 . . . . .	227
A.13. Parameter der FCS Auswertung CLV1 . . . . .	228
A.14. Fluoreszenz-Intensitäts- und -Lebensdauerbilder zum Orientierungseffekt . . . . .	229
A.15. Plasmidkarte ACR4-GFP . . . . .	230
A.16. Plasmidkarte CLV1-GFP . . . . .	231

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACR4	ARABIDOPSIS CRINKLY 4
A4	ACR4
ACR4(BAK1-TM)	ACR4 mit ausgetauschter Transmembrandomäne von BAK1
BAK1	BRI1 ASSOCIATED KINASE 1
BR	Brassinosteroid
BRI1	BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1
CFP	cyan fluorescent protein
CLE40	CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION40
CLV1	CLAVATA 1
C1	CLV1
CLV3	CLAVATA 3
CLV1(BAK1-TM)	CLV1 mit ausgetauschter Transmembrandomäne von BAK1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy)
FAIM	Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie (Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy)
FLIM	Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
flg	Flagellin
FLS2	FLAGELLIN SENSITIVE2
FRAP	Fluoreszenz nach Photobleichen (Fluorescence recovery after photobleaching)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FRET-FLIM	Messung von FRET mit FLIM
GFP	das grün fluoreszierende Protein
Glg.	Gleichung
Kap.	Kapitel

LRR	leucin rich repeats
LSM	laser scanning microscope
mCh	das rot fluoreszierende Protein mCherry
MFIS	Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy)
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
PAINT	Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography
PD	Plasmodesmata
PM	Plasmamembran
PTM	photomultiplier tube
ROI	ausgewählter Bildausschnitt (region of interest)
RK	Rezeptorkinase (receptor kinase)
RLK	rezeptorähnliche Kinase (receptor-like kinase)
SERK	SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE
SPAD	single photon avalanche photodiode
Tab.	Tabelle
TCSPC	zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (time-correlated single photon counting)
TM	Transmembrandomäne
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
YFP	yellow fluorescent protein
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

### **Physikalische Größen**

D	Diffusionskoeffizient
F	Fluoreszenz
$r$	Fluoreszenz-Anisotropie
$r_0$	fundamentale Fluoreszenz-Anisotropie
$\rho$	Rotationsdiffusionszeit
S	Fluoreszenz-Signal
$\tau$	Fluoreszenz-Lebensdauer
$t_D$	Diffusionszeit

# 1 Einleitung

## 1.1. Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie

Fluoreszenz-mikroskopische und -spektroskopische Methoden verfügen über ein breites Anwendungsspektrum in Forschungsfeldern der physikalischen Chemie, Biophysik, Biochemie und bei zellbiologischen Fragestellungen. Besonders im Zuge der Etablierung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) als Marker für Zielproteine in lebenden Zellen hat sich die Fluoreszenz-Mikroskopie als nicht-invasive Technik unentbehrlich gemacht, um zelluläre Organisation und Reaktionsmechanismen aufzuklären [Bastiaens und Pepperkok 2000], [Straight 2007], [Wang et al. 2008], [Goldmann et al. 2009].

Die Fluoreszenz eines Chromophors besitzt neben ihren spektralen Eigenschaften weitere Parameter, die Aufschluss über den Zustand und die Umgebung des Chromophors liefern können. Hier sind besonders die Fluoreszenz-Lebensdauer und die Fluoreszenz-Anisotropie zu nennen, da sie als Indikatoren für Energietransfer zwischen fluoreszenten Proteinen und damit für Komplexbildung der fusionierten Zielproteine dienen können. Des Weiteren enthält die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz Informationen über z. B. Konzentration und Mobilität der Zielmoleküle. Es wurden eine Reihe von speziellen Fluoreszenz-Techniken entwickelt, die sich einzelner Parameter bedienen, um mit ihrer Hilfe einzelne Aspekte der Proteinwechselwirkung und Zellphysiologie zu untersuchen [Liu et al. 2008], [Borst und Visser 2010], [Ishikawa-Ankerhold et al. 2012]: Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM), Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie (Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy, FAIM), Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS), Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, FCCS), Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (Fluorescence recovery after Photobleaching, FRAP), usw.

Die Idee der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion (MFD) ist nun, alle Fluoreszenz-Parameter simultan zu messen und zu analysieren, um in einer Messung die maximal enthaltene Information zu extrahieren [Eggeling et al. 2001], [Kühnemuth und Seidel 2001], [Widengren et al. 2006]. Während die Methode ursprünglich für Einzelmolekülmessungen entwickelt und perfektioniert wurde [Sisamakos et al. 2010], wurde sie vor einigen Jahren zur Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (MFIS) erweitert und erfolgreich in lebenden Zellen angewendet [Kudryavtsev et al. 2007] , [Weidtkamp-Peters et al. 2009], [Kravets et al. 2012].

MFIS liefert in jedem Pixel eines Bildes nicht nur die Fluoreszenz-Intensität, sondern auch Parameter wie Lebensdauer, Anisotropie und den Abstand von Fluorophoren. Auf diese Weise kann eine Analyse von z. B. Proteinkomplexbildung mit hoher räumlicher Auflösung erfolgen. Spezies können identifiziert und selektiv analysiert werden, ohne die Information über die Lokalisation im Bild und damit der Zelle zu verlieren.

### **1.1.1. Förster-Resonanzenergietransfer zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen**

Die Wechselwirkungen zwischen Proteinen steuern die elementaren Abläufe in lebenden Zellen wie Signaltransduktion, Immunabwehr, Wachstum und Zelltod. Mit wem, wie und wo in der Zelle ein Protein interagiert sind die Schlüsselfragen zur Erforschung ihrer Funktion. In Fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen kann die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Proteinen innerhalb der Zelle bestimmt werden. Allerdings kann die Bindung von Proteinen optisch nicht aufgelöst werden, da diese auf einer Längenskala von wenigen Nanometern stattfinden, die unterhalb des Beugungslimits von etwa 250 nm liegen. Mit Hilfe des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) kann die relative Nähe von Molekülen über die optische Grenze hinaus bestimmt werden. FRET kann zwischen einem Donor- und einem Akzeptor-Fluorophor stattfinden, wenn diese einen Abstand von typischerweise unter zehn Nanometern besitzen. Sind Donor und Akzeptor an Biomoleküle gekoppelt, so impliziert das Auftreten von FRET die unmittelbare Nähe der gekoppelten Moleküle zueinander und dient daher als Nachweis für Bindung und Komplexbildung.

In der Fluoreszenz-Mikroskopie finden FRET-Messungen mit fluoreszenten Proteinen eine breite Anwendung, um in lebenden Zellen Protein-Interaktionen nachzuweisen [Levitt et al. 2009], [Padilla-Parra und Tramier 2012]. FRET-Messungen können robust und unkom-

pliziert intensitätsbasiert durch z. B. Akzeptor-Photobleichen erfolgen [Kaminski et al. 2014]. Die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie stellt eine fortgeschrittene Methode zum FRET-Nachweis dar (FRET-FLIM) und ermöglicht darüber hinaus eine quantitative Bestimmung von FRET mit hoher räumlicher Auflösung [Becker 2012], [Walther et al. 2011]. FLIM ist daher bestens geeignet, Protein-Interaktionen in lebenden Zellen nachzuweisen und zu quantifizieren [Wallrabe und Periasamy 2005], [Biskup et al. 2007], [Sun et al. 2012].

Eine nützliche Variante des Resonanzenergietransfers stellt Homo-FRET zwischen gleichartigen Fluorophoren dar, da hier die Markierung mit einem zweiten Fluorophor entfällt. Insbesondere ist Homo-FRET im Vergleich zu Hetero-FRET besser dazu geeignet, homomere Komplexe bei niedriger FRET-Effizienz nachzuweisen [Tramier et al. 2003]. Homo-FRET kann über die Abnahme der Anisotropie (Polarisation) der emittierten Fluoreszenz zeitaufgelöst gemessen werden [Chan et al. 2011], [Vogel et al. 2009] und wurde erfolgreich in lebenden Zellen angewandt [Gautier et al. 2001], [Paila et al. 2011], [Nguyen et al. 2012]. Die Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie ermöglicht in lebenden Zellen sowohl den Nachweis von homomerer Komplexbildung [Tramier und Coppey-Moisan 2008] als auch die Größenbestimmung von Molekülclustern [Bader et al. 2009], [Bader et al. 2011]. Des Weiteren können Anordnungen innerhalb von Proteindomänen aufgelöst werden [Mattheyses et al. 2010].

### 1.1.2. Mobilitätsmessungen von Proteinen in der Membran

Eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie enzymatische Reaktionen, Signaltransduktion und die Bildung von makromolekularen Komplexen sind von der Mobilität der beteiligten Proteine abhängig. Diffusion innerhalb der Zelle bzw. eines Zellkompartiments bildet die obere Grenze für Geschwindigkeitskonstanten von biochemischen Reaktionen und für die Reaktion auf extrazelluläre Stimuli.

Die Plasmamembran enthält in hoher Konzentration Membranproteine, die für eine Fülle von Prozessen von Signaltransduktion bis Zelladhäsion verantwortlich sind. Die Proteine sind oftmals nicht rein zufällig in der Membran verteilt, sondern unterliegen einer spezifischen lokalen Ordnung. Lipide Mikrodomänen, *lipid rafts* genannt [Lingwood und Simons 2010], [Cacas et al. 2012], sind essenziell für die Funktionalität von Transportern und Rezeptoren und spielen eine Rolle bei der Internalisierung [Chini und Parenti 2004], [Jayanthi et al. 2004], [Bhat und Panstruga 2005], [Hanzal-Bayer und Hancock 2007], [Kusumi et al. 2012]. *Lipid rafts* können generell Ausgangspunkt für Exo- und Endozytose sein.

Sie können als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dienen, indem sie Rezeptoren spezifisch mit sekundären Proteinen und Kinasen zusammenbringen, um Signalkaskaden auszulösen.

Methoden der kinetischen Mikroskopie wie FRAP können Assoziationen mit Membrandomänen wie *lipid rafts* nachweisen und so wertvolle Einblicke in die Mechanismen der funktionalen Strukturierung von Zellmembranen liefern [Adkins et al. 2007], [Sergé et al. 2002].

Mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie werden in der Regel Diffusionskonstanten und Konzentrationen sowie Ratenkonstanten für photophysikalische und chemische Reaktionen bestimmt [Schwille und Haustein 2004]. Dies geschieht im konfokalen Volumen auf einer im Vergleich zu FRAP kurzen Längenskala von ca. 1  $\mu\text{m}$ . In lebenden Zellen wurde mittels FCS an der Membran u.a. die agonisteninduzierte Dynamik von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren beschrieben [Hegener et al. 2004], [Prenner et al. 2007], die Rezeptor-Ligand-Bindung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [Bridson und Hill 2007] und des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) [Pramanik und Rigler 2001] nachgewiesen und die Dichte von Rezeptoren in der Membran bestimmt [Chen et al. 2009].

FRAP und FCS stellen komplementäre Techniken dar und liefern Informationen über die Mobilität von Proteinen in der Membran auf kurzer Längenskala (FCS) und im Bereich von vielen Mikrometern (FRAP). Zugrundeliegende Dynamiken können in einem weiten Zeitbereich von Mikrosekunden bis Minuten erfasst werden.

## 1.2. Regulation und Signaltransduktion der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 in *Arabidopsis thaliana*

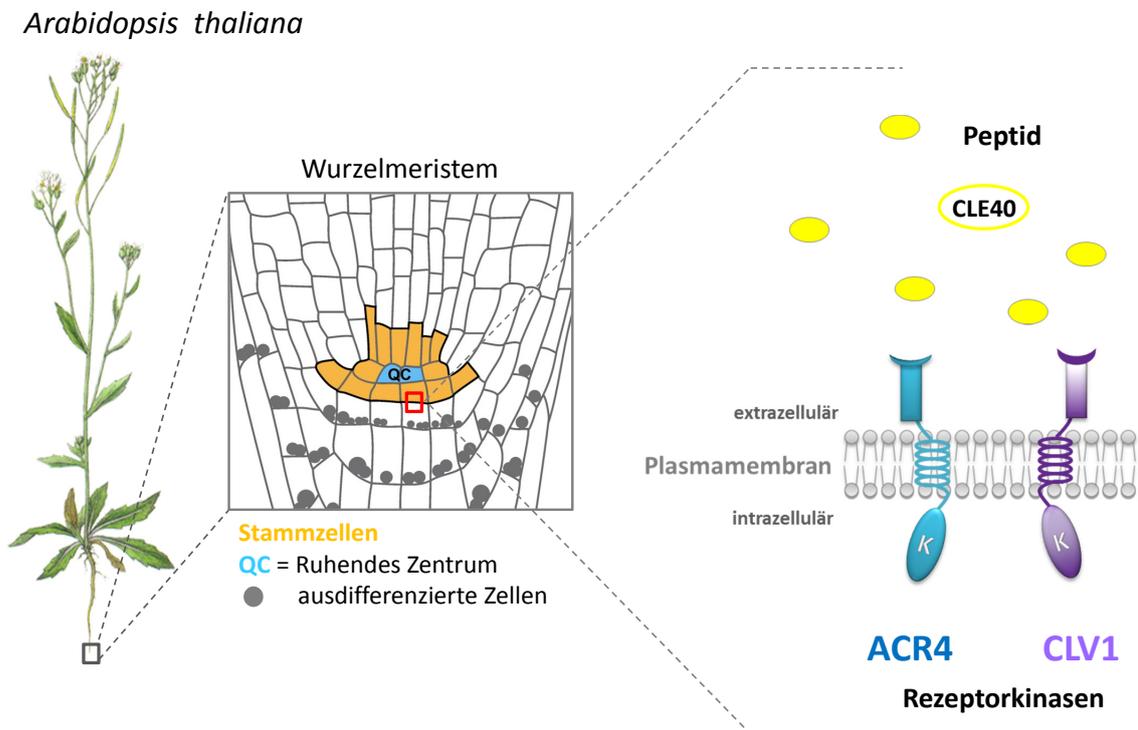
### Rezeptorkinasen in Pflanzen

Die Rezeptorkinasen (RK) mit leucinreichen extrazellulären (LRR-) Domänen bilden die größte Rezeptorfamilie im Pflanzenreich und besitzen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* über 600 Mitglieder [Shiu und Bleecker 2001]. Sie lokalisieren an der Zelloberfläche in der Plasmamembran und sind daher an vorderster Front bei der Erkennung von extrazellulären Signalen und Pathogenen beteiligt. Ihre molekulare Struktur zeigt einen modularen Aufbau bestehend aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Kinasedomäne (Abb. 1.1). Rezeptorkinasen binden eine Reihe von Phytohormonen und kleinen Peptiden und übernehmen Funktionen in vielfältigen Signalprozessen wie der Immunabwehr (FLAGELLIN SENSITIVE2, FLS2), des Wachstums (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1, BRI1) und des Stammzellenerhalts (CLAVATA, CLV) [Osakabe et al. 2013], [Somssich und Simon 2012], [Wierzba und Tax 2013].

### Stammzellenerhalt und der CLAVATA-Signalweg

In Pflanzen beruht oberirdisches Wachstum wie die Bildung von Blättern, Stamm und Blüten und unterirdisches Wachstum wie die Bildung von Wurzeln auf der Stammzellaktivität und Zellteilung in Stammzellnischen, den sogenannten Meristemen. Die Stammzellpopulationen in den beiden primären Meristemen, dem Spross- und dem Wurzelmeristem des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* werden unter anderem über einen Signalaustausch zwischen den undifferenzierten Stammzellen und den sich differenzierenden, oder bereits differenzierten Zellen stabil gehalten.

Im Spross kommt dem CLAVATA (CLV) Signalweg dabei eine zentrale Rolle zu. Der Stammzellenerhalt wird hier durch den mobilen Transkriptionsfaktor WUSCHEL (WUS) kontrolliert, dessen Expression wiederum durch das Peptid CLAVATA3 (CLV3) unterdrückt wird. Wie über genetische Analysen gezeigt werden konnte, sind im CLAVATA-Signalweg mindestens drei membranlokalisierte Rezeptorkinasen an der Weiterleitung des durch das Peptid CLV3 vermittelten Signals beteiligt: Die Rezeptorkinase CLAVATA1 (CLV1), das Rezeptorprotein CLAVATA2 (CLV2) und das Kinaseprotein CORYNE (CRN) [Stahl und Simon 2010].



**Abbildung 1.1.** Die Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 regulieren im Wurzelmeristem von *Arabidopsis thaliana* zusammen mit dem Peptid CLE40 den Stammzellenerhalt.

Neuere Studien belegen, dass im Wurzelmeristem ein ähnlicher Signalweg aktiv ist, der als zentrale Bestandteile die Rezeptorkinase ARABIDOPSIS CRINKLY 4 (ACR4), das CLV3-verwandte Peptid CLV3/ENDOSPERM SURROUNDING REGION 40 (CLE40) und den Transkriptionsfaktor WUSCHELRELATED HOMEODOMAIN BOX 5 (WOX5) enthält [Stahl et al. 2009]. Die Anordnung und Anzahl der Stammzellen im Wurzelmeristem wird durch die Zellen des Ruhenden Zentrums (quiescent centre, QC) und einem Rückkopplungssignal der ausdifferenzierten Zellen gehalten (Abb. 1.1).

Aktuelle Studien von [Stahl et al. 2013] belegen nun, dass CLV1 nicht nur im Spross sondern auch in der Wurzel eine zentrale Rolle bei der Stammzellenregulation übernimmt. So konnte in genetischen Analysen gezeigt werden, dass CLV1 und ACR4 in der Wurzel in einem gemeinsamen Signalweg aktiv sind und zusammen mit dem Peptid CLE40 den Stammzellenerhalt im Wurzelmeristem regulieren (Abb. 1.1).

An dieser Stelle ist die physikalische Interaktion der beiden Proteine noch unbekannt, sowie Details und Dynamiken der Komplexbildung. Diese Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit mit fluoreszenzmikroskopischen Techniken adressiert und beantwortet werden.

### 1.2.1. Mechanismen der Signaltransduktion

#### Komplexbildung von Rezeptoren

Die ligandenabhängige Komplexbildung von Rezeptorkinasen und assoziierten Proteinen in der Plasmamembran ist ein wesentlicher Schlüssel zum Verständnis von signalverarbeitenden Prozessen in Pflanzenzellen. Die Interaktion von Rezeptoren und Proteinen nach Ligandenbindung stellt auf molekularer Ebene den initialen Schritt einer Signalkaskade dar. Das Modell der Funktionsweise von LRR-RK geht von einer ligandeninduzierten Heterokomplexbildung mit anderen LRR-Rezeptoren aus [Jaillais et al. 2011]. Der Brassinosteroid (BR)-Rezeptor BRI1 bildet nach der Bindung von Brassinosteroid (BR) einen Heterokomplex mit der rezeptorähnlichen Kinase BAK1 [Rusinova et al. 2004]. Auch der Rezeptor FLS2 rekrutiert BAK1 nach Bindung des Liganden Flaggelin, um Signalkompetenz zu erlangen [Chinchilla et al. 2007].

Die Rolle von BAK1 in unterschiedlichen Signalwegen macht deutlich, dass Rezeptoren und rezeptorähnliche Proteine wahrscheinlich mehr als einen potentiellen Bindungspartner unterschiedlicher Affinität besitzen. Die Bildung von hetero- und homomeren Komplexen kann Abhängigkeiten von Liganden, Konzentrationen oder lokalen Mikroumgebungen in der Zelle aufweisen, sodass sich ein komplexes Netzwerk von möglichen Reaktionswegen ergibt.

*In vitro*-Methoden wie die Co-Immuno-Präzipitation (Co-IP) können zwar stabile und langlebige Komplexe in Lysaten nachweisen, allerdings ist die Übertragbarkeit auf die tatsächliche Komplexbildung *in vivo* begrenzt. Mikroskopische Methoden sind in der Lage, Komplexbildung in einzelnen Zellen zu untersuchen und dabei die Lokalisation in der Zelle zu berücksichtigen.

Wie [Bleckmann et al. 2010a] anhand von FRET-Studien zeigen konnten, liegen an der Membran CLV1-Homomere, CLV2/CRN-Heteromere und CLV1/CLV2/CRN-Multimere, jedoch keine CLV1/CLV2- oder CLV1/CRN-Heteromere vor. Zudem konnte über Fluoreszenz-Mikroskopie nachgewiesen werden, dass CLV2 und CRN nur in heteromeren Komplexen an die Plasmamembran lokalisieren, während sie ohne den Partner in den Membranen des endoplasmatischen Reticulums verbleiben.

Der Nachweis der Heterokomplexbildung von BR1 und BAK1 gelang [Rusinova et al. 2004] durch FRET-FLIM-Messungen in Protoplasten.

#### Assoziation mit Membrandomänen

Die spezifische Anordnung von Rezeptorkinasen in Membrandomänen kann sich ligandeninduziert verändern und so neben Komplexbildung einen weiteren initialen Schritt beim

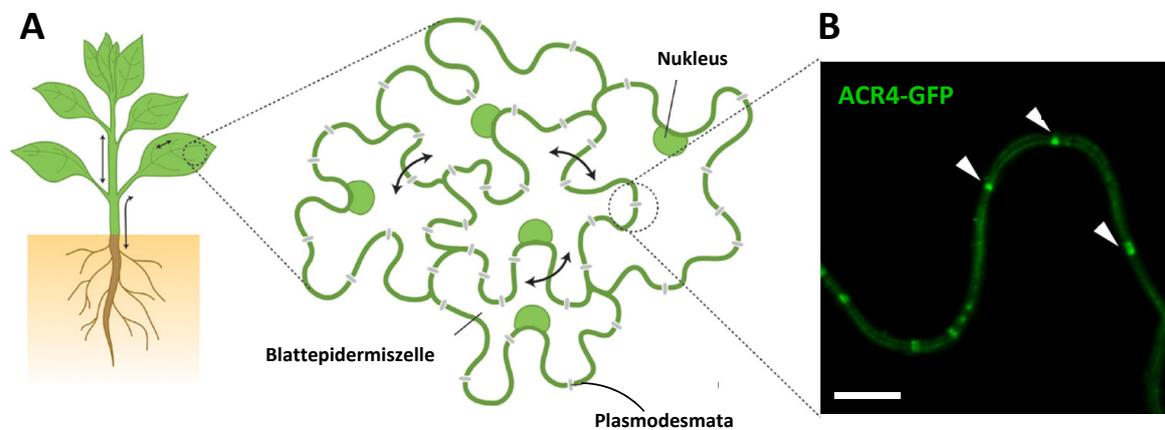
Auslösen von Signalkaskaden darstellen. In aktuellen Modellen der ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung und -internalisierung spielen lipide Mikrodomänen (lipid rafts) eine zentrale Rolle [Simons und Toomre 2000]. Sie können als Plattform für Proteinkomplexbildung dienen und/oder Ausgangspunkt für Rezeptorabbau und Recycling sein.

In Mobilitätsmessungen mit FCS und FRAP an den Rezeptorkinasen BRI1 und FLS2 [Ali et al. 2007] und den rezeptorähnlichen Kinasen BAK1 und SERK1 [Hink et al. 2008] wurde eine verminderte Mobilität nach Ligandenzugabe festgestellt, die auf Clusterbildung und Assoziation mit Mikrodomänen als notwendigen Schritt bei der Signalantwort zurückgeführt wurde.

### 1.2.2. Plasmodesmata

Pflanzenzellen können auf zwei verschiedenen Wegen Signale austauschen [Turnbull und Lopez-Cobollo 2013]. Sie können durch den extrazellulären Raum (apoplastisch) Signale über Liganden und membranlokalisierte Rezeptoren übertragen. Der Austausch von informationstragenden Molekülen kann aber auch symplastisch durch Plasmodesmata (PD) erfolgen. PD sind kleine Kanäle, welche zwei benachbarte Pflanzenzellen miteinander verbinden [Maule 2008]. PD kommt eine große Bedeutung für die direkte symplastische Zell-Zell-Kommunikation zu, da Pflanzenzellen von stabilen Zellwänden umgeben sind, die einen direkten Austausch sonst nicht erlauben. PD ermöglichen den Austausch von z.B. Transkriptionsfaktoren und kleinen RNA sowohl mit kurzer Reichweite zwischen benachbarten Zellen als auch innerhalb der ganzen Pflanze. Die Porengröße von PD bestimmt die Größe der durchgelassenen Moleküle und kann dynamisch durch den Auf- und Abbau von Kallose an den Halsenden der PD reguliert werden.

Für ACR4 und CLV1 konnte aktuell von [Stahl et al. 2013] gezeigt werden, dass beide Proteine zwar an der Plasmamembran lokalisieren, sich jedoch außerdem an den Plasmodesmata konzentrieren (Abb. 1.2 B). Diese Akkumulation an PD ist sowohl in der Modellpflanze *Nicotiana benthamiana* als auch *Arabidopsis thaliana* zu beobachten. Die Lokalisation von Rezeptorkomplexen an diesen Zellverbindungen könnte eine Bedeutung dieser Kanäle auch für die CLE40-, oder CLV3-Signalweiterleitung implizieren und sollte daher detailliert in dieser Arbeit mit MFIS untersucht werden.



**Abbildung 1.2. Plasmodesmata.** (A) Schema von Blattepidermiszellen, die durch Plasmodesmata symplastisch verbunden sind [Maule et al. 2012]. (B) ACR4-GFP lokalisiert an der Plasmamembran und akkumuliert an Plasmodesmata (weiße Pfeile) [Stahl et al. 2013]. Fluoreszenzintensitäts-Bild von ACR4-GFP exprimiert in Blattepidermiszellen *N. benthamiana*. Der Skalierungsbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

### 1.2.3. Expression in *Nicotiana benthamiana*

Die Komplexbildung von ACR4 und CLV1 sollte in dieser Arbeit mit MFIS untersucht werden. Die niedrige Expressionsstärke der beiden Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 unter ihren endogenen Promotoren in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* machte eine solche Untersuchung aus folgendem Grund schwierig. Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer ist eine minimale Photonenzahl pro Pixel nötig, die entweder durch ausreichende Expressionsstärke der fluoreszenten Fusionsproteine oder lange Bildserien erzielt werden kann. Die niedrige Expressionsstärke von ACR4 und CLV1 konnte hier allerdings nicht durch lange Bildserien kompensiert werden, da die zu untersuchenden Wurzeln mit einer Geschwindigkeit im Bereich von  $\mu\text{m/s}$  wachsen und daher während einer entsprechend langen Bildserie buchstäblich aus dem Bildausschnitt herauswachsen. Darüber hinaus ist die Herstellung von stabilen Linien von *Arabidopsis thaliana*, die FP-Fusionen der gewünschten Proteine exprimieren, aufwendig und langwierig.

In einer anderen Modellpflanze, *Nicotiana benthamiana*, stand ein Estradiol-induzierbares Expressionssystem zur Verfügung, das den immensen Vorteil hat, dass in viel kürzerer Zeit verschiedene Fusionsproteine mit fluoreszenten Proteinen zur Expression gebracht und untersucht werden können. Darüber hinaus hat dieses Expressionssystem den Vorteil, dass Expressionsstärken gut kontrolliert werden können. Daher wurde die Interaktion von ACR4 und CLV1 in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* untersucht, die die RK in Fusion mit den fluoreszenten Proteinen GFP und mCherry transient exprimierten.

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Das simultane Auslesen mehrerer Fluoreszenz-Parameter und die damit verbundene Verknüpfung von Informationen über u.a. Energietransfer macht die Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie zu einer höchst aussagekräftigen und komplexen Methode zur Bestimmung von Protein-Interaktionen in lebenden Zellen. Bisher wurde die Idee der Multiparameter-Fluoreszenz-Detektion, alle möglichen Fluoreszenz-Parameter simultan zu messen und zu analysieren, in der Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie nur an einem Modellsystem demonstriert [Kudryavtsev et al. 2007]. Weitere Anwendungen von MFIS in lebenden Zellen verwendeten entweder Fluoreszenz-Lebensdauer oder -Anisotropie zum Nachweis von Protein-Interaktionen [Weidtkamp-Peters et al. 2009], [Bleckmann 2010], [Kravets et al. 2012]. In dieser Arbeit sollte das Potential von MFIS ausgeschöpft werden, durch die gleichzeitige Verfügbarkeit von Fluoreszenz-Lebensdauer und -Anisotropie als Indikatoren für Energietransfer homomere und heteromere Komplexbildung von Proteinen simultan bestimmen zu können.

Das Wachstum der Wurzel beruht auf der Aktivität der Stammzellnische, die Stammzellen enthält, aus denen sich alle Zellen der Wurzel entwickeln. Sowohl die Anordnung als auch die Anzahl dieser Stammzellen wird durch Rückkopplungsmechanismen gehalten, die als zentrale Elemente plasmamembranständige Rezeptorkinasen und kleine Peptide als Botenstoffe enthalten. In genetische Studien konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 zusammen mit dem Peptid CLE40 in einem Signalweg zur Stammzellenregulation aktiv sind [Stahl et al. 2013].

An dieser Stelle ist die molekulare Funktionsweise dieses rezeptorvermittelten Signalprozesses und insbesondere die tatsächliche physikalischen Interaktion der beiden Rezeptorkinasen noch unbekannt.

In dieser Arbeit sollte die Interaktion der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 auf molekularer Ebene mit MFIS *in planta* untersucht werden. Insbesondere sollte eine hohe räumliche Auflösung erzielt werden, um Plasmodesmata, denen eine besondere Rolle bei der Kommunikation zwischen Zellen zukommt, differenziert analysieren zu können.

Während die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie zur Messung von Protein-Interaktionen in lebenden Zellen vieler Organismen weit verbreitet ist, wird diese Methode lediglich von wenigen Gruppen in Pflanzen angewendet [Immink et al. 2002] [Rusinova et al. 2004], [Aker et al. 2006],[Adjobo-Hermans et al. 2006], [Osterrieder et al. 2009], [Elgass et al.

2010], [Crosby et al. 2011], u. a. da Pflanzenzellen in einem weiten spektralen Bereich hohe Autofluoreszenz durch z. B. Chloroplasten zeigen. Messungen mit Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie sind in Pflanzen gar nicht beschrieben. Daher galt es zu nächst, die Messbedingungen für FLIM und FAIM im untersuchten Organismus *Nicotiana benthamiana* zu charakterisieren.

Um Komplexbildung mit hoher räumlicher Auflösung zu bestimmen, ist eine pixelweise Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer und -Anisotropie nötig. Die Aussagekraft und Zuverlässigkeit dieser Analysemethoden für ACR4 und CLV1 galt es zu überprüfen.

Die Mobilität von ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran sollte in Abhängigkeit des zugehörigen Liganden mit FCS und FRAP untersucht werden, um Aufschluss über molekulare Dynamiken und spezifische lokale Anordnungen der Rezeptorkinasen zu geben.

Die einzelnen Aspekte der Interaktion von ACR4 und CLV1 (heteromere und homomere Komplexbildung, Lokalisation, Mobilität) sollten zusammengeführt werden, um ein detailliertes Bild der Funktionsweise der beiden Rezeptorkinasen auf molekularer Ebene zu zeichnen.

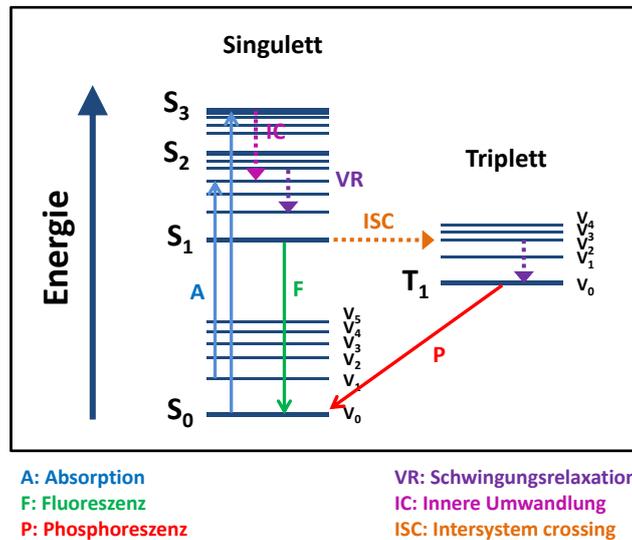
## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1. Fluoreszenz

Lumineszenz bezeichnet den Übergang eines Valenzelektrons aus einem elektronisch angeregten Zustand in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons. Je nach Art des angeregten Zustands unterscheidet man Fluoreszenz, einem spinerlaubten Übergang, und Phosphoreszenz, die einem spinverbotenem Übergang entspricht. Der Übergang aus einem angeregten Singulett-Zustand, in dem das ungepaarte angeregte Elektron und das Elektron im Grundzustand entgegengesetzten Spin besitzen, ist nach den Auswahlregeln erlaubt und erfolgt daher schnell durch Emission eines Photons mit einer für Fluoreszenz typischen Emissionsrate von  $10^8 \text{ s}^{-1}$ . Der Übergang aus einem angeregten Triplett-Zustand in den Grundzustand ist dagegen spinverboten, da sowohl das angeregte Elektron als auch das Elektron im Grundzustand gleichen Spin besitzen. Die Übergangsraten für Phosphoreszenz sind daher deutlich kleiner ( $10^3$  bis  $10^0 \text{ s}^{-1}$ ) als bei der Fluoreszenz und führen zu z. T. sehr langlebigen Zuständen und dem typische Nachglühen im Dunklen von phosphoreszierenden Materialien [Lakowicz 2006], [Valeur 2002].

### Jablonski-Diagramm

In einem sogenannten **Jablonski-Diagramm** sind die möglichen Übergänge eines Valenzelektrons in die verschiedenen Anregungszustände eines Moleküls dargestellt (siehe Abb. 2.1). Die Energie ist hier auf der vertikalen Achse aufgetragen, während sich die beiden horizontalen Spalten in Spinmultiplizität (Singulett, Triplett) unterscheiden. Die breiteren horizontalen Linien repräsentieren die elektronischen Eigenzustände des Moleküls. Sie sind weiter in Schwingungsniveaus ( $V_1, V_2, \dots$ ) unterteilt, die mit schmalen Linien dargestellt sind. Aufgrund der mitunter hohen Anzahl von Schwingungsniveaus in Molekülen, sind hier nur beispielhaft einige wenige gezeigt. Die weitere Aufspaltung in Rotationsnive-



**Abbildung 2.1.** Jablonski-Diagramm. Das Jablonski-Termschema stellt in Form eines Energie-diagramms qualitativ die Energieniveaus eines Moleküls und mögliche Übergänge zwischen diesen dar. Die breiteren schwarzen horizontalen Linien repräsentieren die elektronischen Eigenzustände des Moleküls (S, T), während die dünneren Linien die Schwingungsniveaus (V) darstellen. Die Spalten unterscheiden die Spin-Multiplizität und zeigen dennoch die Niveaus des Singulett-Systems (links) und Triplettsystems (rechts). Die durchgezogenen Pfeile zeigen mögliche Übergänge, in die Photonen involviert sind, während die gestrichelten Pfeile strahlungslose Übergänge darstellen.

aus ist nicht dargestellt. Mit höheren elektronischen Zuständen wird die Energiedifferenz zwischen Niveaus zunehmend geringer und geht ins Kontinuum über. Zusätzlich überlappen die Schwingungszustände unterschiedlicher höherer elektronischer Zustände.

Durch **Absorption** (A) eines Photons geht ein Molekül aus dem Grundzustand ( $S_0$ ) in einen elektronisch angeregten Zustand über. Außer dem Übergang in den ersten Singulett-Zustand ( $S_1$ ) sind auch Übergänge in höhere angeregte Singulett-Zustände ( $S_2$ , usw.) möglich. Absorption stellt einen sehr schnellen Übergang in der Größenordnung von Femtosekunden dar. Die Absorptionswahrscheinlichkeit hängt quadratisch vom Übergangsdipolmoment der beteiligten Zustände ab.

Die Abregung eines Moleküls aus einem angeregten Zustand kann auf mehreren Wegen erfolgen. Die **Schwingungsrelaxation** (VR, von "vibrational relaxation") stellt einen strahlungslosen Übergang zwischen Schwingungsniveaus innerhalb eines elektronischen Zustands dar. Hier wird kinetische Energie an Schwingungszustände innerhalb des Moleküls oder auch Moleküle der Umgebung abgegeben. Diese Übergänge sind mit  $10^{-14}$  bis  $10^{-11}$  s sehr schnell und erfolgen meist unmittelbar nach der Absorption.

Die **interne Umwandlung** (IC von "internal conversion") ist ein Spezialfall der Schwingungsrelaxation. Bei höheren Anregungsniveaus überlappen die Schwingungsniveaus verschiedener elektronischer Zustände. Die interne Umwandlung bezeichnet eine Schwingungsrelaxation, bei der sich der elektronische Zustand ändert.

Die **Fluoreszenz** (F) ist der Übergang in den Grundzustand unter Abgabe eines Photons. Der Prozess ist mit  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$  s recht langsam und nur beim Übergang vom  $S_1$  in den  $S_0$ -Zustand konkurrenzfähig. Der Energieverlust durch vorangegangene Schwingungsrelaxation führt zu einer Rotverschiebung des emittierten Photons im Vergleich zum absorbierten Photon ("Stokes shift").

Die **Phosphoreszenz** (P) ist ein weiterer Übergang, bei dem ein Photon abgegeben wird. Dieser Prozess ist eine Folge des **Intersystem Crossing**, dem verbotenen Übergang vom Singulett in den Triplettzustand. Solch ein Übergang ist streng nach den elektronischen Auswahlregeln nicht möglich. Allerdings führt die Spin-Bahn-Kopplung, insbesondere in größeren Molekülen zu einer geringen Übergangswahrscheinlichkeit. Intersystem Crossing und Phosphoreszenz sind daher sehr langsame Prozesse.

Es existieren weitere strahlungslose Übergänge, die in Konkurrenz zur Fluoreszenz stehen können. Hier ist vor allem der Energietransfer zwischen Molekülen durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung (siehe Abschnitt 2.3) oder Kollisionen zu nennen.

## 2.2. Fluoreszenz-Lebensdauer

Die Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$  ist die mittlere Verweildauer eines Elektrons im angeregten Zustand und liegt typischerweise im Nanosekundenbereich. Der Übergang in den Grundzustand kann einmal durch die Abgabe eines Photons erfolgen oder durch strahlungslose Prozesse. Jeder Prozess wird durch eine charakteristische Zerfallsrate  $k$  beschrieben, die die Übergangswahrscheinlichkeit und damit die Zeitskala des Prozesses angibt. Je größer die Übergangswahrscheinlichkeit ist, desto schneller ist der Übergang. Die Fluoreszenz-Lebensdauer ist umgekehrt proportional zur Summe der Zerfallsraten  $k_i$  aller beteiligten Übergänge:

$$\frac{1}{\tau} = \sum_i k_i. \quad (2.1)$$

Für den in Abbildung 2.1 dargestellten Fall ergibt sich für die Fluoreszenz-Lebensdauer

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}}, \quad (2.2)$$

mit den Zerfallsraten für Fluoreszenz  $k_F$ , für innere Umwandlung  $k_{IC}$  und für Intersystem Crossing  $k_{ISC}$ .

Die Fluoreszenz-Lebensdauer charakterisiert auch das zeitliche Abklingverhalten der Fluoreszenz-Intensität  $F(t)$  nach einem anregenden Laserpuls:

$$F(t) = F(0) \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right). \quad (2.3)$$

Liegen mehrere fluoreszente Spezies oder Zustände im Gleichgewicht vor, muss das Abklingverhalten mit mehreren Exponentialtermen beschrieben werden.

## Quantenausbeute

Die Fluoreszenz-Quantenausbeute  $\Phi$  ist das Verhältnis aus der Anzahl von emittierten zu absorbierten Photonen. Sie kann mit den Zerfallsraten für strahlende  $k_r$  (r für "radiative") und strahlungslose (nr für "non-radiative") Übergänge  $k_{nr}$  wie folgt beschrieben werden:

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}}. \quad (2.4)$$

Die Quantenausbeute wird 1, wenn die strahlungslosen Prozesse eine untergeordnete Rolle spielen und im Vergleich zu  $k_r$  eine kleine Zerfallsrate  $k_{nr}$  besitzen.

## 2.3. Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)

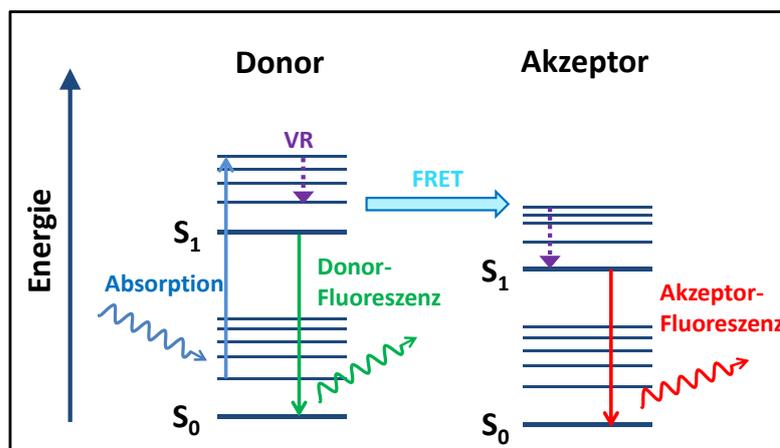
Der Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer oder Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein strahlungsloser Energietransfer zwischen zwei Farbstoffmolekülen, der auf Dipol-Dipol-Wechselwirkung beruht. Der Übergang findet aus dem  $S_1$ -Zustand eines angeregten Farbstoffmoleküls, dem Donor, in den angeregten  $S_1$ -Zustand eines zweiten Farbstoffmoleküls, dem Akzeptor, mit der FRET-Rate  $k_{FRET}$  statt (Abb. 2.2). Dieser Prozess führt zusätzlich zu den im Jablonski-Diagramm (Abb. 2.1) dargestellten Prozessen zur Entvölkerung des  $S_1$ -Zustands und verkürzt daher die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors:

$$\tau_{FRET} = \frac{1}{k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{FRET}}. \quad (2.5)$$

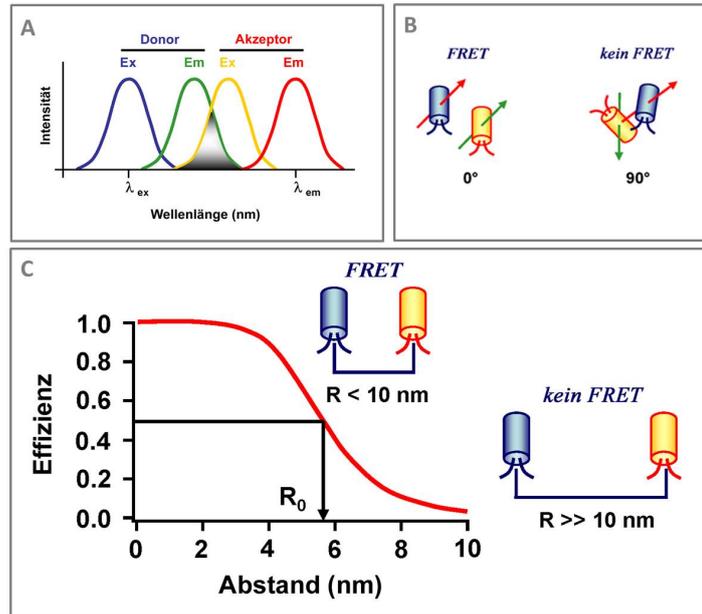
Dieser Energietransfer wurde erstmals von Förster 1948 theoretisch beschrieben:

$$k_{FRET} = 8,79 \times 10^{23} \frac{J \kappa^2 \Phi_D}{n^4 r^6 \tau_D} s^{-1}, \quad (2.6)$$

- $\kappa^2$ : Orientierungsfaktor der Übergangsdipolmomente,
- $J$ : Überlappungintegral des Donor-Emissions- und Akzeptor-Absorptionsspektrums,
- $n$ : Brechungsindex der Umgebung,
- $\Phi_D$ : Fluoreszenz-Quantenausbeute des Donors in Abwesenheit eines Akzeptors,
- $r$ : Abstand von Donor und Akzeptor in [ $10^{-10}$  m],
- $\tau_D$ : Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors in Abwesenheit des Akzeptors.



**Abbildung 2.2.** Das Jablonski-Diagramm zeigt die Energieniveaus eines Donors und eines Akzeptors mit FRET als strahlungsfreiem Energietransfer zwischen Donor und Akzeptor. FRET steht als zusätzlicher Entvölkerungsprozess des  $S_1$  in Konkurrenz zur Fluoreszenz des Donors.



**Abbildung 2.3. Voraussetzungen für FRET.** (A) Das Emissionsspektrum des Donors muss mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. (B) Die Orientierung der Dipolmomente muss parallel sein. (C) FRET ist empfindlich vom Abstand des Donors und Akzeptors abhängig. Der Förster-Radius entspricht dem Abstand, bei dem 50% Energietransfer stattfindet. Abb. aus [Damien 2013]

Donor und Akzeptor müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um FRET zu ermöglichen, insbesondere müssen das Emissionsspektrum des Donors und das Absorptionsspektrum des Akzeptors überlappen. Das sogenannte Überlappungsintegral  $J$  beschreibt die Überschneidung der Spektren und geht linear in die FRET-Rate ein.

Des Weiteren spielt die Orientierung der Übergangsdipolmomente eine Rolle. Das Emissionsdipolmoment des Donors und das Absorptionsdipolmoment des Akzeptors müssen annähernd parallel zueinander stehen, um optimalen Energietransfer zu ermöglichen. Die Ausrichtung von Donor und Akzeptor wird durch den Orientierungsfaktor  $\kappa^2$  beschrieben:

$$\kappa^2 = (\cos(\theta_{DA}) - 3 \cos(\theta_D) \cos(\theta_A))^2, \quad (2.7)$$

wobei  $\theta_{DA}$  den Winkel zwischen dem Emissionsdipolmoment des Donors und dem Absorptionsdipolmoment des Akzeptors bezeichnet. Mit  $\theta_D$  und  $\theta_A$  sind die Winkel zwischen diesen Dipolmomenten und dem Verbindungsvektor zwischen Donor und Akzeptor benannt. Der Orientierungsfaktor kann Werte zwischen null und vier annehmen, wobei null einer Lage der Dipolmomente von  $90^\circ$  zueinander, gleichbedeutend mit keinem Energietransfer, entspricht. Für frei bewegliche Farbstoffe beträgt  $\kappa^2 = 2/3$ .

Die **FRET-Effizienz** ist das Verhältnis aus der Anzahl von Energietransfers und Donor-anregungen. Sie kann Werte zwischen null und eins annehmen und hängt mit den beiden üblichen Messgrößen Fluoreszenz-Intensität und Fluoreszenz-Lebensdauer wie folgt zusammen:

$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D}, \quad (2.8)$$

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.9)$$

mit

$I_{DA}$ : Fluoreszenz-Intensität des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

$I_D$ : Fluoreszenz-Intensität des Donors ohne Akzeptors

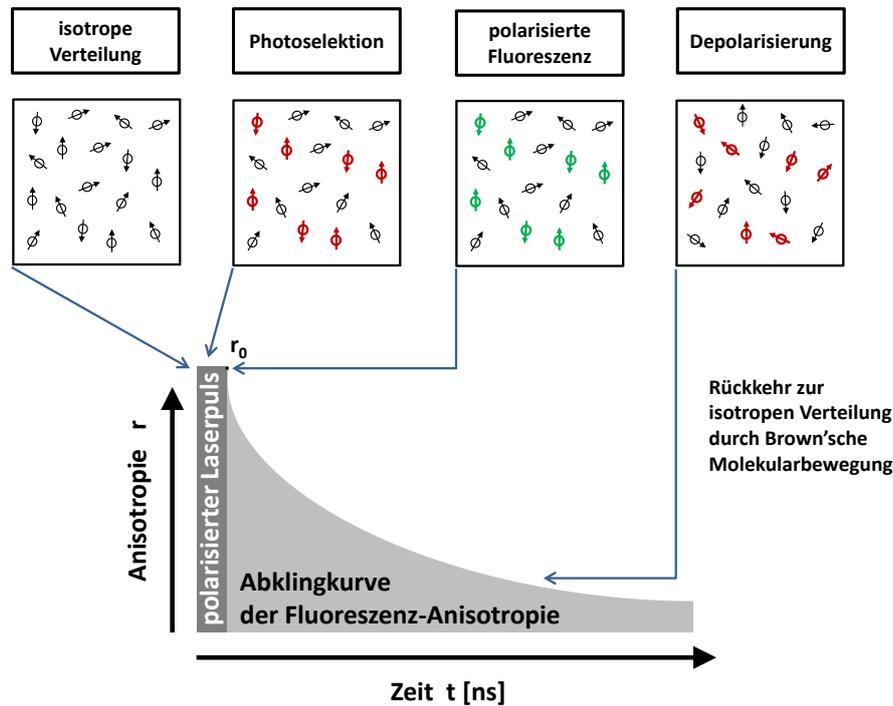
$\tau_{DA}$ : Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors in Anwesenheit des Akzeptors

$\tau_D$ : Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors ohne Akzeptor.

Als **Förster-Radius**  $R_0$  wird der Abstand von Donor und Akzeptor bezeichnet, bei dem 50% Energietransfer stattfinden. Er ist eine charakteristische Größe eines Donor-Akzeptor-Paares und liegt typischerweise zwischen 20 und 90Å. Mit ihm lässt sich die FRET-Rate in folgender gebräuchlichen Form ausdrücken:

$$k_{FRET}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6. \quad (2.10)$$

Sie verdeutlicht die Abstandsabhängigkeit von FRET, die umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstands  $r$  zwischen Donor und Akzeptor ist. Dies ist u. a. der Grund für die große Bedeutung, die FRET heutzutage beim Nachweis von Interaktionen von Biomolekülen spielt. Der Förster-Radius der meisten FRET-Paare liegt in der Größenordnung vieler Biomoleküle wie z. B. Proteinen. Das Auftreten von FRET zwischen an Makromoleküle gekoppelten Fluorophoren impliziert eine Distanz zwischen den gekoppelten Molekülen, die nur im Falle einer nicht-zufälligen Bindung gegeben sein kann.



**Abbildung 2.4.** Photoselektion und Depolarisierung durch Brown'sche Molekularbewegung. (Abb. angelehnt an [Kühnemuth 2011])

## 2.4. Fluoreszenz-Anisotropie und Depolarisierung

Die Absorption eines Photons hängt von der Orientierung des Übergangsdipolmoments des Absorptionsübergangs und des elektrischen Feldvektors der anregenden Strahlung ab. Die Absorptionswahrscheinlichkeit ist proportional zu  $\cos^2 \theta$ , wobei  $\theta$  den Winkel zwischen der Polarisationsrichtung (bzw. des elektrischen Feldvektors) und dem Übergangsdipolmoment bezeichnet [Lakowicz 2006]. Das bedeutet, in einem Ensemble von Fluorophoren werden durch die Bestrahlung mit linear polarisiertem Licht vorzugsweise diejenigen Moleküle angeregt, deren Übergangsdipolmomente nahezu parallel zur Polarisationsrichtung stehen. Dieser Effekt wird als **Photoselektion** bezeichnet.

Die emittierte Fluoreszenz eines Fluorophors hat einen elektrischen Feldvektor parallel zum Übergangsdipolmoment des Fluoreszenzübergangs und ist damit grundsätzlich polarisiert. Die **Fluoreszenz-Anisotropie**  $r(t)$  ist ein Maß für die Polarisation des emittierten Lichts und ist wie folgt definiert:

$$r(t) = \frac{I(t)_p - I(t)_s}{I(t)_p + 2 \cdot I(t)_s}, \quad (2.11)$$

mit der Intensität parallel zur Polarisationsrichtung des anregenden Lichts  $I(t)_p$  und der Intensität senkrecht zur Polarisationsrichtung des anregenden Lichts  $I(t)_s$ . Der Nenner stellt die Gesamtintensität  $I(t) = I(t)_p + 2 \cdot I(t)_s$  dar.

Die stationäre Anisotropie  $r$  berechnet sich daraus durch Integration

$$r = \frac{\int_0^\infty I(t) \cdot r(t) dt}{\int_0^\infty I(t) dt} \quad (2.12)$$

und stellt damit einen Mittelwert über die Zeit dar.

Wird ein Ensemble von frei beweglichen Fluorophoren mit isotroper Verteilung der Übergangsdipolmomente mit einem linear polarisierten Laserpuls bestrahlt, so besitzt aufgrund der PhotoSelektion die Population der angeregten Fluorophore vorzugsweise parallel zur anregenden Polarisation ausgerichtete Dipolmomente. Die unmittelbar erfolgende Fluoreszenz ist für die jeweilige Verteilung maximal polarisiert. Der lineare Polarisationsvektor ist lediglich um den Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment gedreht (intrinsische Depolarisierung). Die Anisotropie nimmt hier den Wert der fundamentalen Anisotropie  $r_0$  an, die für einen idealen Fluorophor mit parallelem Absorptions- und Emissionsdipolmoment und mit isotroper Dipolverteilung 0,4 beträgt. Sobald Moleküle nicht mehr frei diffundieren können, sondern an Strukturen gebunden oder in starrer Weise arrangiert sind, wie z. B. in der Membran, können sie eine Vorzugsorientierung besitzen und damit eine nicht-zufallsverteilte Dipolausrichtung. Damit einhergehend können sowohl höhere als auch niedrigere Werte der fundamentalen Anisotropie auftreten.

Jede Richtungsänderung des Dipolmoments innerhalb der Fluoreszenz-Lebensdauer, und damit des Beobachtungszeitraums, führt zu einer Depolarisierung der Fluoreszenz und damit einem Abklingen der Anisotropie über die Zeit. Bei frei diffundierenden Farbstoffmolekülen sorgt allein die Brown'sche Molekularbewegung für die Rückkehr zur isotropen Dipolverteilung (Abb. 2.4).

Die Rotationsdiffusion wird durch die Rotationsdiffusionszeit bzw. Rotationskorrelationszeit  $\rho$  beschrieben, die sowohl von der Größe und Form des Moleküls als auch von der Umgebung abhängt:

$$\rho = \frac{\eta V_{eff}}{k_B T}, \quad (2.13)$$

mit der Viskosität  $\eta$ , dem effektiven molekularen Volumen  $V_{eff}$ , der Boltzmann-Konstanten  $k_B$  und der Temperatur  $T$ . Die Abklingkurve der Fluoreszenz-Anisotropie kann mit der

Rotationskorrelationszeit als Exponentialfunktion beschrieben werden.

$$r(t) = r_0 \cdot \exp\left(\frac{-t}{\rho}\right) \quad (2.14)$$

Der Zusammenhang von Anisotropie  $r$ , Rotationskorrelationszeit  $\rho$  und Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$  wird durch die **Perrin-Gleichung** beschrieben:

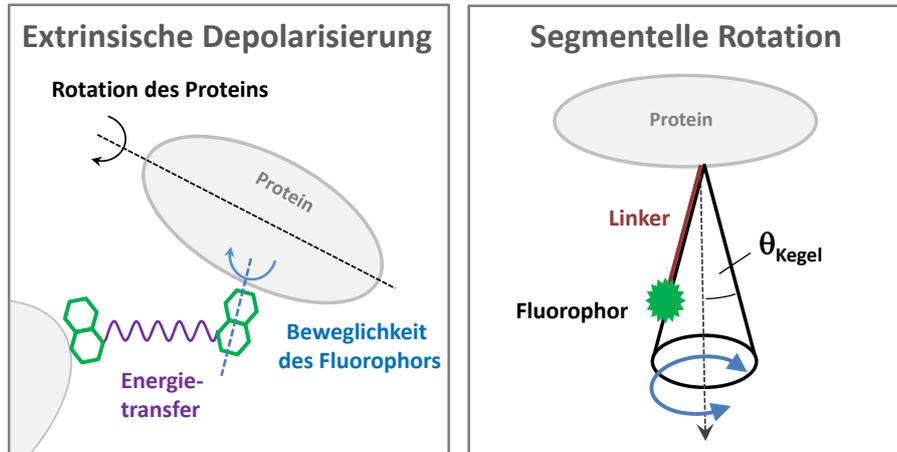
$$r = \frac{r_0}{1 + \tau/\rho}. \quad (2.15)$$

Die charakteristische Rotationskorrelationszeit von Fluorophoren in Lösung beträgt typischerweise 50 bis 100 ps und ist damit deutlich kleiner als die Fluoreszenz-Lebensdauer von einigen Nanosekunden. Ein Farbstoffmolekül kann daher innerhalb der Fluoreszenz-Lebensdauer mehrmals rotieren, so dass die Emission vollständig depolarisiert und damit die Anisotropie null wird [Lakowicz 2006]. Dies ist allerdings nicht für GFP der Fall. Der Chromophor besitzt innerhalb des  $\beta$ -barrel praktisch keine Rotationsfreiheit, sondern kann nur mit dem kompletten Protein rotieren, das entsprechend seiner Größe und Form in Puffer eine Rotationszeit von 14 ns besitzt [Borst und Visser 2010]. Mit zunehmender Viskosität wird die Rotation eines Moleküls erschwert. Man misst daher für GFP im Zytoplasma längere Rotationskorrelationszeiten und damit höhere Anisotropien als vergleichsweise in Puffer. Einschränkungen der Rotationsbeweglichkeit sind durch Komplexbildung und/oder der Verankerung des Moleküls in der Membran zu erwarten. Hier ist es durchaus möglich, dass die Rotation innerhalb der Fluoreszenz-Lebensdauer zu vernachlässigen ist und die Anisotropie Werte nahe  $r_0$  annimmt.

Für die vollständige oder teilweise Depolarisierung der Fluoreszenz gibt es insbesondere bei an größere Proteine gebundenen Farbstoffmolekülen mehrere mögliche extrinsische Ursachen (Abb. 2.5). Die zugehörigen Zeitkonstanten können aus der Anisotropieabklingkurve bestimmt werden.

### 1) Segmentelle Rotation des Farbstoff relativ zum gekoppelten Protein ("wobbling in a cone").

Die Rotationsbeweglichkeit des Fluorophors kann durch die Kopplung über einem Linker eingeschränkt sein. Das "wobbling in a cone"-Modell beschreibt die Rotation auf der Mantelfläche eines Kegels, dessen Spitze den Anknüpfungspunkt des Linkers darstellt [Kinosita et al. 1982]. Diese segmentelle Rotation führt zu keiner vollständigen Depolarisierung, son-



**Abbildung 2.5.** Die Depolarisierung von Fluoreszenz kann verschiedene extrinsische Ursachen haben, u.a. segmentelle Rotation.

dern äußert sich in der Abklingkurve in einer Restanisotropie  $r_\infty$ :

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp\left[\frac{-t}{\rho_{Kegel}}\right] + r_\infty, \quad (2.16)$$

wobei  $\rho_{Kegel}$  die Rotationsdiffusionszeit der Kegelrotation bezeichnet. Aus der Restanisotropie kann der halbe Öffnungswinkel des Kegels  $\theta_{Kegel}$  bestimmt werden [Valeur 2002]:

$$\frac{r_\infty}{r_0} = \left[ \frac{1}{2} \cos(\theta_{Kegel})(1 + \cos(\theta_{Kegel})) \right]^2. \quad (2.17)$$

Die segmentelle Rotation eines gebundenen Fluorophors ist schneller als die normale Rotationsdiffusion und führt zu einer reduzierten apparenten Rotationsdiffusionszeit. Darüber hinaus kann sehr schnelle segmentelle Rotation zu einer apparenten fundamentalen Anisotropie  $r_0^{app}$  führen, die um einen winkelabhängigen Faktor niedriger ist als die tatsächliche fundamentale Anisotropie  $r_0$  [Lakowicz 2006]:

$$r_0^{app} = r_0 \left( \frac{\langle 3 \cos^2 \theta_{Kegel} \rangle - 1}{2} \right), \quad (2.18)$$

mit  $\langle \dots \rangle$  Mittel über alle Kegelwinkel.

## 2) (Segmentelle) Rotation des gekoppelten Proteins.

Das gekoppelte Protein selbst kann rotieren oder segmentelle Rotationen z.B. bezüglich seiner Membranverankerung ausführen.

### 3) Homo-FRET.

Der Energietransfer zwischen identischen Farbstoffmolekülen (Homo-FRET) ist symmetrisch und führt daher nicht zu einer Verkürzung der Fluoreszenz-Lebensdauer wie der Energietransfer zwischen verschiedenartigen Fluorophoren (Hetero-FRET). Allerdings führt homo-FRET zu einer Depolarisierung der Fluoreszenz, da durch FRET indirekt angeregte Moleküle mit anders orientiertem Dipol emittieren können. Zwar unterliegt auch FRET einer Orientierungsabhängigkeit (vgl. Glg. 2.7), diese ist aber nicht so streng wie die Auswahlregel der Photoselektion [Vogel et al. 2009]. Das zeitliche Abklingen der Fluoreszenz-Anisotropie kann bei zu vernachlässigender Rotation und isotrop verteilten Fluorophoren geschrieben werden als:

$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \cdot \exp\left(\frac{-t}{\rho_{FRET}}\right) + r_\infty, \quad (2.19)$$

mit der Abklingzeit  $\rho_{FRET}$ , die sich aus der FRET-Rate  $k_{FRET}$  (Glg. 2.10) ergibt:

$$\rho_{FRET} = \frac{1}{2 \cdot k_{FRET}}. \quad (2.20)$$

Das Auftreten einer Restanisotropie kann anhand eines symmetrischen, idealen Dimers ohne Rotationsdiffusion erläutert werden. Direkt angeregte Moleküle unterliegen der Photoselektion und emittieren mit einer Anisotropie nahe der fundamentalen Anisotropie von 0,4. Der Energietransfer auf den anderen Fluorophor erfolgt unter nahezu vollständigem Verlust der Korrelation von Polarisationsrichtung und Emission. Die Anisotropie dieser indirekt durch FRET angeregten Fluorophore beträgt nach nur einem Energietransfer 0,016 [Runnels und Scarlata 1995]. Da die Anisotropie von Populationen additiv ist, ergibt sich insgesamt für einen idealen Dimer eine Restanisotropie von 0,2.

## 3 Materialien und Methoden

### 3.1. Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (MFIS)

Zur Aufnahme von Fluoreszenzintensitätsbilder mit einem Fluoreszenzmikroskop sind kontinuierliche Lichtquellen und eine Detektion mit einer Zeitauflösung im Mikrosekunden-Bereich ausreichend. Für fortgeschrittenere Techniken wie Fluoreszenz-Lebensdauermessungen und MFIS-Aufnahmen wird neben einer gepulsten Anregung eine weitaus höhere Zeitauflösung im Sub-Nanosekundenbereich benötigt und erfordert daher spezielle Detektionssysteme. Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit einem Multiparameter-Fluoreszenzdetektionssystem aufgenommen, das auf zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung basiert.

#### 3.1.1. Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC)

Die zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung ("time correlated single photon counting", TCSPC) ist eine Methode, Photonenankunftszeiten mit einer Auflösung von einer Picosekunde zu erfassen. Die Zeit zwischen einem Laserpuls und einem registrierten Photon wird gemessen und in einem Histogramm gespeichert. Das Triggersignal des anregenden, gepulsten Lasers liefert den Start-Trigger, der Puls nach Detektion eines Photons den Stop-Trigger für einen Zeit-zu-Amplituden-Konverter ("time-to-amplitude converter", TAC). Der TAC liefert als Ausgangssignal eine Spannungsrampe, deren Amplitude proportional zur Zeit zwischen Start- und Stopppuls ist. In der Regel wird unter Bedingungen gemessen, die lediglich 0,01 bis 0,1 Photonen pro Laserpuls liefern, sodass die meisten Perioden ohne Detektion eines Photons bleiben. Dies bedeutet, der TAC muss mit Laserrepetitionsrate arbeiten, da er mit jedem Puls gestartet wird. In den meisten Fällen muss er zurückgesetzt werden, wenn kein Photon registriert wurde. Bei hoher Laserrepetitionsrate wird daher in umgekehrter Start-Stopp Konfiguration ("reversed start-stop") gearbeitet. Hier startet der

Puls eines Photons den TAC, während der verzögerte Laserpuls den TAC stoppt.

### **Mehrphotonenereignisse (“pile-up“)**

Ein TCSPC-System ist nicht in der Lage mehr als ein Photon pro Laserpuls zu erfassen. Für hohe Zählraten wächst die Wahrscheinlichkeit für solche Mehrphotonenereignisse. Da nur das schnellste Photon gezählt wird, sind lange Ankunftszeiten im Histogramm unterrepräsentiert und führen bei der Lebensdauerbestimmung zu zu kurzen Zeiten.

Dagegen können Zählraten und damit berechnete Größen um Mehrphotonenereignisse korrigiert werden.

### **3.1.2. Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD)**

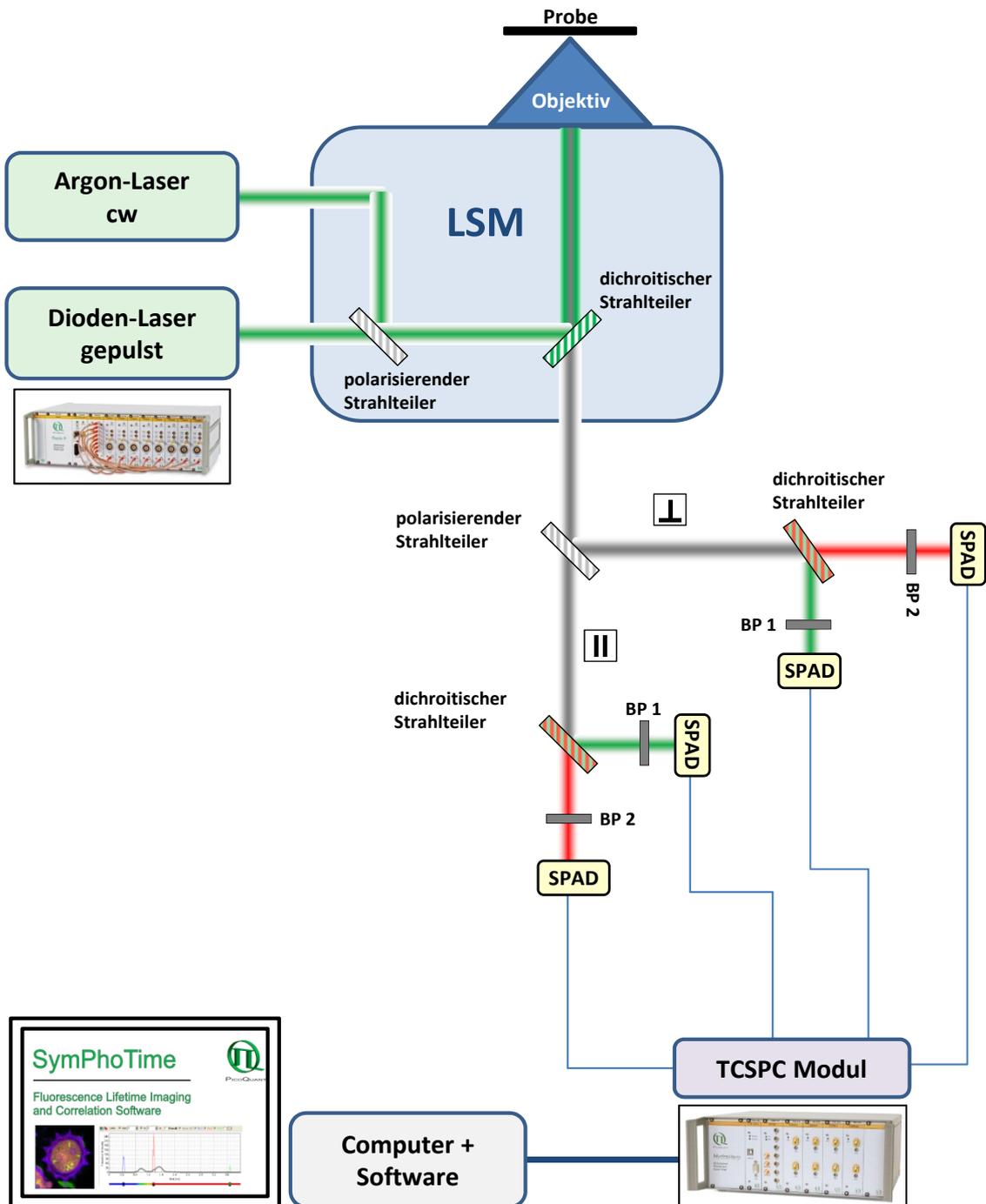
Die Multiparameter-Fluoreszenzdetektion (MFD) basiert auf der simultanen Erfassung voneinander unabhängiger Fluoreszenzparameter. Dazu gehören die Größen Fluoreszenzintensität, -Lebensdauer, Anisotropie und spektrale Verteilung. Die Anwendung dieser Technik ist umfangreich in [Sisamakias et al. 2010] beschrieben.

### **3.1.3. Optischer Aufbau**

Der optische Aufbau bestand aus einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Fluoview FV1000, Olympus) auf der Plattform eines inversen Lichtmikroskops (IX81, Olympus) mit einer zusätzlichen Erweiterung zur zeitaufgelösten Einzelphotonendetektion in bis zu sechs Kanälen.

#### **Lichtquellen**

Zur kontinuierlichen Anregung standen zwei systemintegrierte Laser zur Verfügung. Zur Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm kam ein linear polarisierter Argon-Laser zum Einsatz, während für die Anregungswellenlänge von 559 nm ein linear polarisierter Diodenlaser genutzt wurde. Für die MFIS-Messungen wurde ein mit 40 MHz gepulster Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 485 nm (dual-mode laser head LDH-D-C 485, PicoQuant) mit der zugehörigen computergesteuerten Ansteuerungseinheit (Computer controlled Multichannel Picosecond Diode Laser Driver “Sepia II“, PDL 828, PicoQuant) verwendet.



**Abbildung 3.1. Optischer Aufbau mit 4 Kanälen.** Das Schema skizziert den optischen Aufbau mit Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) und zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC) in vier Kanälen. Geeignete Bandpassfilter (BP) vor den Detektoren bestimmen den spektralen Bereich der detektierten Emission. Die Emission wird im grünen und roten Spektralbereich mittels "Single-Photon Avalanche Photodiodes" (SPAD) gemessen.



### **Laser Scanning Mikroskop**

Das anregende Laserlicht passierte einen Multiline-Strahlteiler (DM405/488/559/635), der die Laserlinien (405, 488, 559, 635) reflektiert und das übrige Spektrum transmittiert, und wurde mit einem 60x Objektiv (Olympus UPlanSApo, NA 1.2, Wasserimmersion) auf die Probe fokussiert. Die aus dem konfokalen Volumen emittierte Strahlung wurde vom selben Objektiv wiederum gesammelt und entweder durch geeignete Strahlteiler auf die internen Detektoren geleitet oder durch den Seitenausgang des Mikroskopstativs den externen Detektoren zugeführt.

### **Fluoreszenz-Detektion**

Das emittierte Licht wurde nach Ausgang aus dem LSM zuerst in seine bezüglich der Polarisation des anregenden Laserlichts senkrecht und parallel polarisierten Anteile aufgespalten (polarisierender Strahlteiler, PBS 101, Thorlabs). Die Aufteilung der Fluoreszenz in die verschiedenen spektralen Komponenten erfolgte über dichroitische Strahlteiler. Hier wurden zwei Konfigurationen des Versuchsaufbaus verwendet. Bei der optischen Anordnung mit vier Kanälen (Aufbau 1, Abb. 3.1) wurde die Emission für beide Polarisationsrichtungen jeweils mit einem dichroitischen Strahlteiler (Langpass, FF 560, AHF) 560 nm in einen grünen und roten Bereich geteilt. Bandpassfilter engten den Spektralbereich jeweils weiter auf die Emissionsspektren von GFP (HC 520/35, AHF) im grünen Bereich und auf die Emission von mCherry (HC 607/70, AHF) im roten Bereich ein.

Bei der optischen Anordnung mit sechs Kanälen (Aufbau 2, Abb. 3.2) erfolgt die Aufspaltung der Emission in senkrechte und parallel polarisierte Anteile wie bei Aufbau 1 (s. o.). Die Aufteilung in drei spektrale Bereiche wurde mit jeweils zwei dichroitischen Strahlteilern für jede Polarisationsrichtung erreicht. Zuerst passierte das Licht einen Kurzpass mit Trennungskante bei 630 nm (630 DCXR, AHF). Der hier reflektierte dunkelrote Spektralbereich der Emission wurde nicht genutzt, da die untersuchten Pflanzen hier eine hohe Autofluoreszenz aufweisen, die mit dem Nutzsignal nicht direkt korreliert ist. Das verbleibende Licht wurde für jede Polarisationsrichtung wie bei Aufbau 1 mit einem dichroitischen Strahlteiler (FF 560, AHF) bei 560 nm in einen grünen und roten Spektralbereich geteilt. Die Detektionsbereiche wurden mittels Bandpassfilter (HC 520/35 und HC 607/70, AHF) festgelegt. Hier ist zu beachten, dass der rote Detektionsbereich nicht dem Transmissionsbereich des roten Bandpassfilters von 572-642 nm entspricht, sondern durch den eingesetzten Kurzpass nur bis 630 nm reicht.

Die Fluoreszenz wurde in bis zu sechs Kanälen jeweils entweder mit einer "Single-Photon Avalanche Photodiode" (SPAD) (grün: MPD, PD5CTC; rot: Single Photon Counting Module, SPCM-AQR-15 und SPCM-CD 2965, PerkinElmer) oder einem Hybrid-Detektor (hybrid photomultiplier tube HPMC-100-40, Becker & Hickl) detektiert. Die angeschlossene Elektronik zur zeitaufgelösten Einzelphotonenregistrierung mit Picosekunden-Auflösung in sechs Kanälen (Multichannel Picosecond Event Timer & TCSPC Module "HydraHarp 400", PicoQuant) erfasste die Detektoreingangssignale synchronisiert und übermittelte sie mittels USB 2.0-Verbindung zu einem PC.

#### 3.1.4. Gerätefunktion

Die Vorbereitung einer MFIS Messung erforderte an jedem Messtag eine bestimmte Kalibrierungsprozedur und die Einstellung von Standardbedingungen. Die Justage wurde mit Rhodamin 110 überprüft. Die Detektorpositionen wurden optimiert. Die Justage des konfokalen Volumens wurde über die Diffusionszeit von Rhodamin 110 überprüft. Die Laserleistung wurde gemessen und für den gepulsten Diodenlaser auf 12-15  $\mu\text{W}$  ohne Abschwächer eingestellt.

Die Gerätefunktion (*instrument response function*, IRF) wurde an jedem Messtag entweder mit Erythrosin oder der Reflektion an einem Spiegel aufgenommen. Erythrosin besitzt eine sehr kurze Fluoreszenz-Lebensdauer und kann daher gut als Gerätefunktion verwendet werden [Boens et al. 2007]. Alle Filter und Strahlteiler bei der Messung von Erythrosin waren identisch mit den verwendeten im eigentlichen Experiment. Die Zählrate wurde über die Konzentration des Erythrosins und die Laserleistung eingestellt.

Zur Bestimmung der IRF kann auch die Reflektion des Lasers an einem Spiegel verwendet werden. Hierzu wurden die Spektralfilter vor den Detektoren entfernt und durch geeignete Abschwächer ersetzt. Die gewünschte Zählrate wurde über die Laserleistung eingestellt.

Die Breite einer typischen Gerätefunktion des verwendeten MFIS-Aufbaus beträgt etwa 300 ps. Die verwendeten Detektoren weisen eine zählratenunabhängige IRF auf. Dies ist für Imaging-Anwendungen unerlässlich, da sich die Zählraten in einzelnen Pixeln deutlich unterscheiden, aber mit der selben IRF angepasst werden müssen, die nur für einen Zählratenbereich die korrekte IRF darstellt.

## 3.2. Durchführung der MFIS-Messungen

Die MFIS Messungen wurden an Aufbau 1 und 2 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.1.3). Zur Anregung von GFP bei 485 nm wurde der mit 40 MHz gepulste Diodenlaser verwendet. Die Fluoreszenz von GFP wurde in den beiden grünen Detektionskanäle im Spektralbereich 502,5 - 537,5 nm detektiert. Die roten Kanäle detektierten im Spektralbereich 572 - 642 nm (Aufbau 1) bzw. 572 - 630 nm (Aufbau 2) die Fluoreszenz von mCherry. Außerdem diente die rote Emission zur Kontrolle des Hintergrunds, da insbesondere Chloroplasten bereits in diesem Spektralbereich eine starke Autofluoreszenz zeigen.

### **Vorbereitung der *Nicotiana benthamiana* Proben**

Aus einem behandelten *Nicotiana benthamiana* Blatt wurde ein ca. 5x5 mm großes Stück mit einem Skalpell herausgeschnitten. Dieses wurde mit der Blattunterseite nach oben auf einen Objektträger übertragen, mit Reinstwasser umhüllt und mit einem Deckglas abgedeckt. Das Deckglas wurde vorsichtig angedrückt, um das Blattstück zu glätten und Luftblasen zu entfernen.

### **Auswahl des Bildausschnitts**

Zunächst wurde bei niedriger Anregungsleistung, hoher Scangeschwindigkeit und niedriger Auflösung fokussiert und eine Zelle ausgewählt, die sowohl GFP als auch mCherry exprimiert. Durch die niedrige Anregungsleistung in Kombination mit einer hohen Scangeschwindigkeit konnte ein Bleichen der fluoreszenten Proteine vermieden werden. Insbesondere wurde die Expression von mCherry an einer Stelle der Zelle überprüft, die nicht für eine MFIS-Aufnahme genutzt wurde. Die Auswahl geeigneter Zellen wurde unter Verwendung der internen Laser des LSM bei Anregungswellenlängen von 488 nm bzw. 559 nm, sowie der internen Detektoren in zwei spektralen Detektionskanälen durchgeführt.

### 3.2.1. Standardeinstellungen für MFIS-Messungen

Zunächst wurden in Vorexperimenten (siehe Kapitel 4.2.2) optimale Messbedingungen bestimmt. Die daraus folgenden Standardeinstellungen wurden für alle MFIS-Messungen verwendet (falls nicht explizit anders gekennzeichnet):

- Anregung bei 485 nm mit 40 MHz
- Anregungsleistung: 1.2  $\mu\text{W}$  am Objektiv, beugungslimitierter Fokus
- 6-fach Zoom
- Auflösung 512x64 Pixel (entspricht 96 nm/Pixel) oder
- Auflösung von 128x128 Pixeln (entspricht 267 nm/Pixel)
- Bildserie aus 20 Einzelbildern
- Pixelzeit 100  $\mu\text{s}$

#### 3.2.1.1. Direkte Akzeptoranregung

Der Akzeptor mCherry wurde mit einem linear polarisierten, nicht gepulsten Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 559 nm angeregt. Die Leistung am Objektiv betrug 8,2  $\mu\text{W}$  bei beugungslimitiertem Fokus. Die roten Kanäle detektierten im Spektralbereich 572 - 630 nm (vgl. Abb. 3.2) die Fluoreszenz von mCherry. Die Aufnahmen eines Bildausschnitts wurden wie folgt durchgeführt: Zuerst wurde eine Standard-Bildserie (siehe oben) bei Anregung mit 485 nm aufgenommen. Unmittelbar anschließend wurde von demselben Bildausschnitt eine Bildserie aus fünf Einzelbildern (Pixelzeit 100  $\mu\text{s}$ ) bei einer Anregungswellenlänge von 559 nm aufgenommen.

### 3.3. Analyse der MFIS-Daten

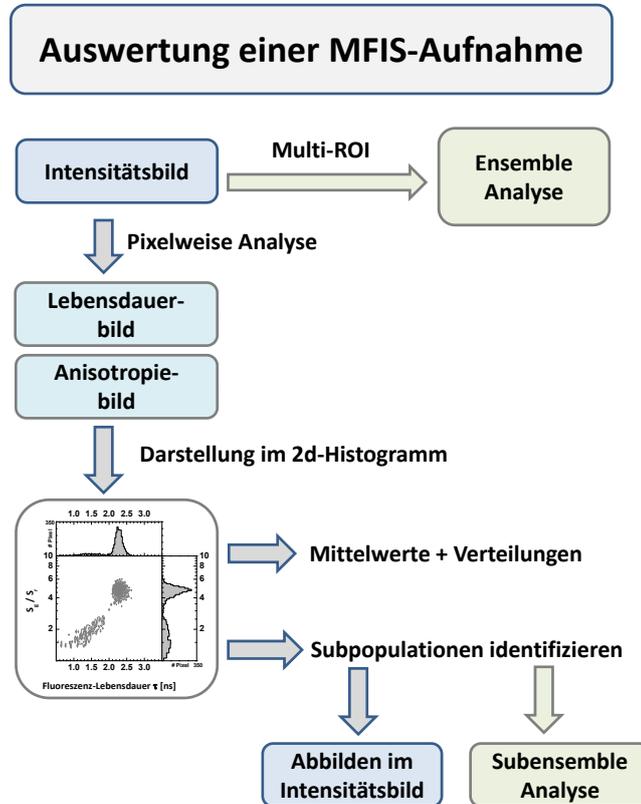


Abbildung 3.3. Auswertung einer MFIS-Aufnahme.

#### 3.3.1. Fluoreszenz-Parameter

Die Rohdaten einer MFIS-Aufnahme enthalten die Ankunftszeiten der detektierten Photonen in den einzelnen Kanälen, sowie Trigger (Bild, Linie, Pixel), um den Bildaufbau rekonstruieren zu können. Die im Folgenden beschriebenen Auswertungsprozeduren liefern daraus in jedem Pixel die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenz-Parameter:

- grünes Fluoreszenzsignal  $S_{gg}$  (Anregung bei 485 nm, grüner Detektionsbereich)
- rotes Fluoreszenzsignal bei grüner Anregung  $S_{gr}$  (Anregung bei 485 nm, roter Detektionsbereich)
- rotes Fluoreszenzsignal bei roter Anregung  $S_{rr}$  (Anregung bei 559 nm, roter Detektionsbereich)
- grüne Fluoreszenz-Intensität  $F_g$  ( $S_{gg}$  ohne Streulichtanteil)
- rote Fluoreszenz-Intensität  $F_r$  ( $S_{gr}$  ohne Streulichtanteil)

- daraus berechnete Grün-rot-Verhältnisse  $S_{gg}/S_{gr}$ ,  $S_{gg}/S_{rr}$ ,  $F_g/F_r$
- (grüne) Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$
- (grüne) Fluoreszenz-Anisotropie  $r$

Beim Bildaufbau werden die Einzelbilder einer Bildserie zu einem Bild vereinigt ("gemischt"). Das bedeutet, ein vereinigter Pixel enthält die Photonen aller 20 Einzelpixel, die gemischt wurden. Die Photonen pro vereinigtem Pixel werden gezählt und ergeben die Signalintensität in der Einheit Anzahl von Photonen (# Ph), oder dividiert durch die Pixelzeit in kHz. Aus den Photonen eines vereinigten Pixels werden Häufigkeitshistogramme der Photonenankunftszeit erstellt, aus denen die Fluoreszenz-Lebensdauer bestimmt werden kann (Kap. 3.3.3).

### Pixelweise Analyse

Die Bestimmung eines Fluoreszenz-Parameters in jedem Pixel liefert zum Fluoreszenz-Intensitätsbild das zugehörige Bild des Fluoreszenz-Parameter wie z. B. das Fluoreszenz-Lebensdauer- und Fluoreszenz-Anisotropiebild.

### Analyse eines Multi-ROI

Im Fluoreszenz-Intensitätsbild werden mehrere geeignete ROI ausgewählt, die die Plasmamembran ohne störende Einflüsse, wie z.B. Chloroplasten, enthalten und gut fokussiert sind, und zu einem "Multi-ROI" zusammengefasst. Das so erhaltene Multi-ROI beinhaltet je nach Bild typischer Weise zwischen 200 und 700 Pixel und wird repräsentativ für die MFIS-Aufnahme analysiert.

## 3.3.2. Software

Die Analyse der MFIS-Aufnahmen erfolgte mit institutsintern entwickelten LabView-Programmen. Im Laufe der Jahre, in denen diese Arbeit entstand, wurde das ursprüngliche Programm zur Auswertung von Imaging-Daten *Marcelle* [Kudryavtsev 2006] durch das leistungsstärkere und umfassendere Programm *Anl* [Felekyan 2013] ersetzt. Die Rechenzeit zur Erstellung eines Lebensdauerbilds konnte in *Marcelle* 15-40 min und mehr betragen. Die optimierte Speicherverwaltung des Programms *Anl* in Kombination mit der aufgehobenen Arbeitsspeicherrestriktion des 64bit-Systems von Windows, machten eine schnelle Analyse auch großer MFIS-Aufnahmen unter einer Minute möglich und damit auch die Bearbeitung umfangreicherer Datensätze. Des Weiteren wurde das Programm für umfassende Lebensdauerfits *fitmachine* [Kalinin 2012] in *Anl* integriert.

### 3.3.3. Anpassungen der Fluoreszenz-Lebensdauer und Modellfunktionen

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer wurden verschiedene Fitprozeduren verwendet, die sich sowohl hinsichtlich der Modellfunktion als auch des Algorithmus zur Minimierung des reduzierten  $\chi_r^2$  unterscheiden [Ma 2010].

#### 3.3.3.1. Mono-exponentielle Modellfunktion mit MLE

Dieser Fit liegt allen gezeigten Fluoreszenz-Lebensdauer-Bildern zugrunde und wurde grundsätzlich bei Einzelpixel-Daten verwendet, die eine niedrige Photonenzahl aufweisen. Denn für niedrige Photonenzahlen stellt der hier verwendete *maximum likelihood*-Schätzer (*maximum likelihood estimator*, MLE) die statistisch effizienteste Methode zu Bestimmung der besten Anpassung dar [Maus et al. 2001].

Aus den Einzelpixel-Daten wurden Photonenankunftszeit-Histogramme jeweils für den senkrechten und parallelen Kanal erstellt und mit einer Modellfunktion beschrieben, die einen mono-exponentiellen Abfall der Fluoreszenz mit einer Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$  und einer Rotationskorrelationszeit  $\rho$  annimmt. Des Weiteren wird die Polarisationsmischung in einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur mit den beiden Korrekturfaktoren  $l_1$  und  $l_2$  berücksichtigt [Koshioka et al. 1995]. Die Größen

$$F_p(t) = \frac{1}{3}F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left(1 + (2 - 3l_1)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\rho}\right)\right)$$

und

$$F_s(t) = \frac{1}{3}F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left(1 - (1 - 3l_2)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\rho}\right)\right)$$

bezeichnen das parallel (p) bzw. senkrecht (s) bezüglich des Anregungslichts polarisierte Fluoreszenzsignal als Funktion der Photonenankunftszeit,  $t$ , nach dem Laserpuls.  $F_0$  ist das anfängliche Gesamtfluoreszenzsignal und  $r_0$  die fundamentale Anisotropie (hier 0,38). Die optischen Korrekturfaktoren betragen  $l_1=0,0308$  und  $l_2=0,0368$ .

Mit Hilfe der Perrin-Gleichung

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}} \Leftrightarrow \rho = \frac{\tau}{\frac{r_0}{r} - 1}$$

ergeben sich:

$$F_p(t) = \frac{1}{3}F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left[1 + (2 - 3l_1)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\left(\frac{r_0}{r} - 1\right)\right)\right],$$

$$F_s(t) = \frac{1}{3}F_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left[1 - (1 - 3l_2)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\left(\frac{r_0}{r} - 1\right)\right)\right].$$

Die stationäre Anisotropie  $r$

$$r = \frac{G \cdot F_p^{exp} - F_s^{exp}}{(1 - 3l_1) \cdot G \cdot F_p^{exp} + (2 - 3l_2) \cdot F_s^{exp}}$$

wird aus dem integrierten, experimentell erhaltenen Signal  $S_{p,s}^{exp}$  pro Detektionskanal berechnet. Die experimentell erhaltene Gesamtfluoreszenz beträgt  $F_{p,s}^{exp} = (1 - \gamma) \cdot S_{p,s}^{exp}$ , wobei  $\gamma$  den Streulichtanteil bezeichnet. Dieser wird während der Fitprozedur iterativ bestimmt (siehe unten).

Die Modellfunktionen für die beiden Detektionskanäle werden mit ihrer Gerätefunktion (IRF von "instrument response function") gefaltet:

$$F_p(t) = \frac{1}{3}F_0 \left\{ IRF_p \otimes \left[ \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left[ 1 + (2 - 3l_1)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\left(\frac{r_0}{r} - 1\right)\right) \right] \right] \right\},$$

$$F_s(t) = \frac{1}{3}F_0 \left\{ IRF_s \otimes \left[ \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \left[ 1 - (1 - 3l_2)r_0 \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\left(\frac{r_0}{r} - 1\right)\right) \right] \right] \right\}.$$

Das Gesamtsignal  $S_{gesamt}(t)$  setzt sich aus der Gesamtfluoreszenz  $F(t) = G \cdot F_p(t) + 2 \cdot F_s(t)$ , dem Streulichtanteil  $\gamma$  und dem Hintergrund  $B(t)$  zusammen. Der G-Faktor  $G = g_s/g_p$  kompensiert die unterschiedlichen Detektionseffizienzen  $g_p$  und  $g_s$  im parallelen und senkrechten Detektionskanal. Das Gesamtsignal ergibt sich zu

$$S_{gesamt}(t) = A \cdot \left\{ (1 - \gamma) \frac{G \cdot F_p(t) + 2 \cdot F_s(t)}{\int_{t=0}^{\infty} (G \cdot F_p(t) + 2F_s(t))} + \gamma \frac{G \cdot B_p(t) + 2 \cdot B_s(t)}{\int_{t=0}^{\infty} (G \cdot B_p(t) + 2B_s(t))} \right\}. \quad (3.1)$$

Das experimentelle Gesamtsignal  $S_{gesamt}^{exp} = G \cdot S_p^{exp}(t) + 2S_s^{exp}(t)$  wird mit der Modellfunktion  $S_{gesamt}(t)$  unter Anwendung eines *maximum likelihood*-Schätzers angepasst. Der Faktor  $A$  ist ein Normierungsfaktor. Wiederholte Anregungen sind berücksichtigt [Brand et al. 1997].

### 3.3.3.2. Bi-exponentielle Modellfunktion mit Methode der kleinsten Quadrate

Das Photonenankunftszeit-Histogramm des Gesamtsignals  $S_{gesamt}^{exp}(t)$  wird aus den Signalen des parallelen und senkrechten Detektionskanals unter Berücksichtigung unterschiedlicher Detektionseffizienzen und einem Objektiv mit hoher numerischer Apertur gebildet (vgl. Abschnitt 3.3.3.1):

$$S_{gesamt}^{exp}(t) = (1 - 3l_1) \cdot G \cdot S_p^{exp}(t) + (2 - 3l_2) \cdot S_s^{exp}(t),$$

wobei  $S_p^{exp}(t)$  und  $S_s^{exp}(t)$  das parallel (p) bzw. senkrecht (s) bezüglich des Anregungslichts polarisierte Signal als Funktion der Photonenankunftszeit  $t$  nach dem Laserpuls bezeichnen.

Die Modellfunktion umfasst zwei Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$  mit den Spezies-Amplituden  $x_1$  und  $x_2$  und einen Anteil  $\gamma$  an Streulicht  $B(t) = (1 - 3l_1) \cdot G \cdot B_p(t) + (2 - 3l_2) \cdot B_s(t)$ . Ein Offset  $A_{Offset}$  berücksichtigt Detektor-Nachleuchten ("afterpulsing") und die Dunkelstromzählrate.

Die Modellfunktion wird mit der Gerätefunktion  $IRF(t) = (1 - 3l_1) \cdot G \cdot IFR_p(t) + (2 - 3l_2) \cdot IRF_s(t)$  gefaltet. Das so erhaltene Gesamtsignal  $S_{gesamt}(t)$  wird an das experimentelle Signal  $S_{gesamt}^{exp}(t)$  unter Verwendung eines Levenberg-Marquardt-Algorithmus nach der Methode der kleinsten Quadrate ("least squares fit") angepasst.

$$S_{gesamt}(t) = A \cdot \left\{ (1 - \gamma) \cdot \frac{IRF \otimes \left[ x_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + x_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + A_{Offset} \right]}{\int_0^{\infty} IRF \otimes \left[ x_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + x_2 \exp\left(\frac{-t}{\tau_2}\right) + A_{Offset} \right]} + \gamma \frac{B(t)}{\int_0^{\infty} B(t)} \right\}, \quad (3.2)$$

wobei der Faktor  $A$  ein Normierungsfaktor ist. Wiederholte Anregungen sind berücksichtigt [Brand et al. 1997]. Die optischen Korrekturfaktoren betragen  $l_1=0,0308$  und  $l_2=0,0368$ .

Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer  $\tau$  berechnet sich aus den Fluoreszenz-

Amplituden  $f_i$  zu

$$\tau = \langle \tau \rangle_f = \sum_i \tau_i f_i. \quad (3.3)$$

Die Fluoreszenz-Amplituden ergeben sich aus den Spezies-Amplituden  $x_i$  wie folgt:

$$f_i = \frac{x_i \tau_i}{\sum_i x_i \tau_i}. \quad (3.4)$$

### 3.3.3.3. FRET-Fit mit Methode der kleinsten Quadrate

Das Gesamtsignal  $S_{gesamt}^{exp}(t)$  wird analog zu Abschnitt 3.3.3.2 gebildet. Die Modellfunktion beschreibt die nicht-interagierende Donor-Population ("donor only") mit der festen Lebensdauer  $\tau_{DO}$ , die zuvor in *donor-only*-Proben mit einem mono-exponentiellen Fit bestimmt wurde, und der Spezies-Amplitude  $x_{DO}$ . Die FRET-Population wird mit der Lebensdauer  $\tau_{FRET}$  und Spezies-Amplitude  $(1-x_{DO})$  beschrieben. Des Weiteren wird der Streulichtanteil  $\gamma$  und ein Offset  $A_{Offset}$  berücksichtigt. Die Modellfunktion wird mit der Gerätefunktion gefaltet und an das experimentell erhaltene Gesamtsignal  $S_{gesamt}^{exp}(t)$  unter Verwendung eines Levenberg-Marquardt-Algorithmus angepasst (vgl. Abschnitt 3.3.3.2).

$$S_{gesamt}(t) = A \cdot \left\{ (1 - \gamma) \cdot \frac{IRF \otimes \left[ x_{DO} \exp\left(\frac{-t}{\tau_{DO}}\right) + (1 - x_{DO}) \exp\left(\frac{-t}{\tau_{FRET}}\right) + A_{Offset} \right]}{\int_{t=0}^{\infty} IRF \otimes \left[ x_{DO} \exp\left(\frac{-t}{\tau_{DO}}\right) + (1 - x_{DO}) \exp\left(\frac{-t}{\tau_{FRET}}\right) + A_{Offset} \right]} + \gamma \frac{B(t)}{\int_0^{\infty} B(t)} \right\} \quad (3.5)$$

### 3.3.4. Fluoreszenz-Anisotropie

#### 3.3.4.1. Anisotropiekorrektur im konfokalen Mikroskop

Generell muss beachtet werden, dass die beiden Detektionskanäle für parallel und senkrecht polarisierte Emission unterschiedliche Detektionseffizienzen  $g_p$  und  $g_s$  besitzen. Der Gerätefaktor (G-Faktor)  $G = g_s/g_p$  kompensiert diesen Unterschied bei der Bestimmung der Anisotropie  $r$ . Des Weiteren wird die Polarisation des emittierten Lichts durch die Sammlung durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur verändert. Der parallele und senkrechte Anteil des Fluoreszenzsignals  $S_p$  und  $S_s$  werden partiell gemischt. Durch die Einführung der zwei Faktoren,  $l_1$  und  $l_2$ , wird dies berücksichtigt [Koshioka et al. 1995], [Schaffer et al. 1999]. Somit ergibt sich für die Anisotropie  $r$ :

$$r = \frac{G \cdot S_p - S_s}{(2 - 3 \cdot l_2) \cdot S_s + G \cdot (1 - 3 \cdot l_1) \cdot S_p}. \quad (3.6)$$

#### 3.3.4.2. Totzeitkorrektur

Die endliche Geschwindigkeit der Signalverarbeitung in einem TCSPC Modul führt dazu, dass eine bestimmte Zeit nach Ankunft eines Photons kein zweites registriert werden kann. Diese Zeitspanne wird als Totzeit ("dead time")  $t_{tz}$  bezeichnet und liegt je nach Modul bei ca. 80 - 150 ns. Wird ein Photon innerhalb der Totzeit detektiert, so wird es nicht gezählt und verursacht keine weitere Totzeit. Daher ist die Zählrate der registrierten Photonen  $z_{reg}$  kleiner als die Zählrate der detektierten Photonen  $z_{det}$ . Insbesondere bei hohen Zählraten fällt dieser Effekt ins Gewicht und muss zur korrekten Bestimmung der stationären Fluoreszenz-Anisotropie korrigiert werden. Nach [Becker 2010] berechnet sich die detektierte Zählrate aus der registrierten Zählrate und der Totzeit wie folgt:

$$z_{det} = \frac{z_{reg}}{1 - z_{reg} \cdot t_{tz}}. \quad (3.7)$$

### 3.3.4.3. Eichung der stationären Fluoreszenz-Anisotropie

Die jeweiligen Wachstums- und Umgebungsbedingungen der Pflanzenproben an jedem Messtag wie z. B. Viskosität sind nicht direkt bestimmbar, haben aber Einfluss auf die Anisotropie. Dies wurde mit einem Eichparameter  $p_{Eichung}$  berücksichtigt. Die Anisotropie ergibt sich dann zu

$$r = \frac{(G + p_{Eichung}) \cdot S_p - S_s}{(2 - 3 \cdot l_2) \cdot S_s + (G + p_{Eichung})(1 - 3 \cdot l_1) \cdot S_p}. \quad (3.8)$$

Der Eichparameter wurde so gewählt, dass eine Probe, die freies GFP exprimierte, eine mittlere stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von 0,33 lieferte.

### 3.3.4.4. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropie

Aus den Fluoreszenzabklingkurven  $I_p(t)$  und  $I_s(t)$  eines bzw. mehrerer Multi-ROI wurde die Fluoreszenz-Anisotropie  $r(t)$  unter Berücksichtigung des G-Faktors berechnet (Glg. 2.11). Zur Kurvenanpassung der Anisotropie in Origin 8.6 wurde ein bi-exponentielles Modell verwendet:

$$r(t) = r_\infty + A_1 \cdot \exp(-t/\rho_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\rho_2), \quad (3.9)$$

wobei  $r_\infty$  die Restanisotropie und  $A_{1,2}$  die Amplituden der beiden Komponenten mit den Abklingzeiten  $\rho_{1,2}$  bezeichnen.

### 3.3.5. Darstellung der MFIS-Daten

#### 3.3.5.1. MFIS-Bild

Ein MFIS-Bild enthält ein Bild für jeden Fluoreszenz-Parameter. Es ergibt sich

- das **Fluoreszenz-Intensitätsbild** aus der Anzahl der Photonen pro vereinigttem Pixel. Intensitätsbilder sind schwarz-weiß dargestellt mit 256 Graustufen für Photonenzahlen zwischen 0 oder 10 Photonen (weiß) und der höchsten Photonenzahl im Bild (schwarz).
- das **Fluoreszenz-Lebensdauerbild** aus der pixelweise bestimmten Fluoreszenz-Lebensdauer (vgl. Abschnitt 4.3.1.1). Lebensdauerbilder sind in einer Regenbogenfarbskala aus 9 Farben dargestellt. Pixel unterhalb des Photonenschwellwerts, der für jedes MFIS-Bild individuell gesetzt wird, werden von der Analyse ausgenommen und sind weiß dargestellt.
- das **Fluoreszenz-Anisotropiebild** aus der stationären Fluoreszenz-Anisotropie, die unter Berücksichtigung der in Abschnitt 3.3.4 aufgeführten Korrekturen in jedem Pixel bestimmt wird. Anisotropiebilder sind in einer 10-stufigen Farbskala blau-weiß-rot dargestellt. Pixel unterhalb des Photonenschwellwerts, der für jedes MFIS-Bild individuell gesetzt wird, werden von der Analyse ausgenommen und sind schwarz dargestellt.

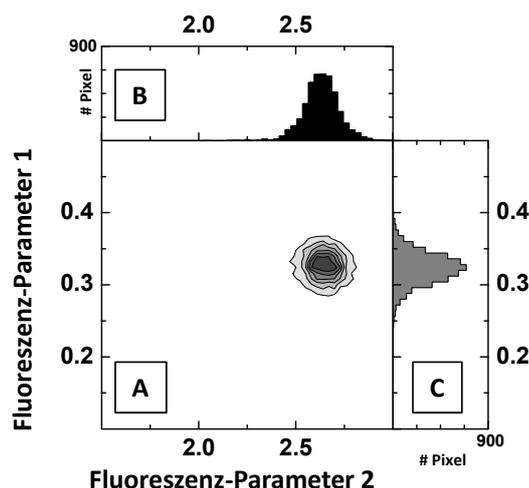
Die Totzeit der verwendeten Detektoren in Kombination mit dem TCSPC-Modul wird über die Autokorrelation des parallelen und senkrechten Signals bestimmt und betrug für beide Kanäle 80 ns. Die Korrekturfaktoren betragen  $l_1=0,0308$  und  $l_2=0,0368$ .

### 3.3.5.2. 2d-Histogramme

Zur weitergehenden Analyse der MFIS-Aufnahmen und Identifizierung von Subpopulationen eignet sich eine Darstellung der Fluoreszenz-Parameter in zweidimensionalen Häufigkeitsdiagrammen, die die Frequenz von Pixeln mit einer bestimmten Parameterkombination farbkodiert anzeigen (beispielhaft in Abbildung 3.4 A dargestellt). Die zugehörigen eindimensionalen Häufigkeitshistogramme zeigen die Verteilung und die statistische Breite des jeweiligen Fluoreszenz-Parameters (Abb. 3.4 B,C). Die Werte des dargestellten Fluoreszenz-Parameters sind in Intervalle (bins) aufgeteilt, deren Breite an die Auflösung des jeweiligen Parameters angepasst ist. Die Auftragung kann je nach Fluoreszenz-Parameter linear oder logarithmisch erfolgen.

Die Darstellung in 2d-Häufigkeitshistogrammen bildet die Grundlage für die überwiegende Mehrzahl der MFIS-Auswertungen. Üblicherweise wird ein 2d-Histogramm aus einem MFIS-Bild oder einem Multi-ROI generiert. In der 2d-Darstellungen lassen sich Pixelsubpopulationen identifizieren, die 1d-Histogramme dienen als Grundlage zur Mittelwertbestimmung eines Fluoreszenz-Parameters (siehe unten).

Es ist ebenfalls möglich, ein 2d-Histogramm aus den Pixeln mehrerer MFIS-Aufnahmen zu generieren. Eine solche Auftragung ermöglicht z.B. einen guten Überblick über die Verteilung eines Fluoreszenz-Parameters im kompletten Datensatz.

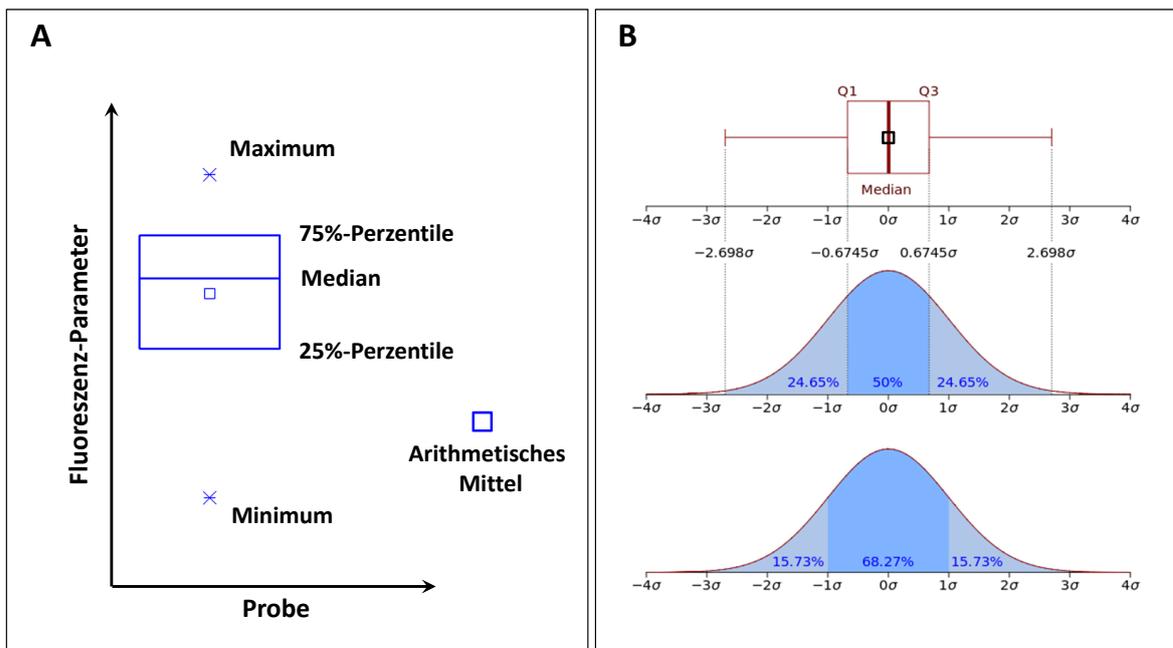


**Abbildung 3.4.** Beispiel eines zweidimensionalen Häufigkeitshistogramms von Pixeln aus dem Multi-ROI einer MFIS-Aufnahme.

(A) 2d-Histogramm Fluoreszenz-Parameter 1 gegen Fluoreszenz-Parameter 2). Die Pixelhäufigkeit wurde auf das Maximum normiert, die erhaltenen Werte zwischen 0 und 1 werden in 7 Graustufen dargestellt. (B) zugehöriges 1d-Histogramm des Fluoreszenz-Parameters 2 (Projektion von (A) auf die x-Achse). (C) zugehöriges 1d-Histogramm des Fluoreszenz-Parameters 1 (Projektion von (A) auf die y-Achse).

### 3.3.5.3. Mittelwerte und Boxplots

Um MFIS-Messungen an unterschiedlichen Zellpaaren hinsichtlich eines Fluoreszenz-Parameters vergleichen zu können, wird ein Mittelwert des Parameters benötigt, der repräsentativ für ein MFIS-Bild ist. Hierzu wird aus jeder MFIS-Aufnahme, entweder unter Berücksichtigung eines geeigneten Photonenschwellwerts oder unter Verwendung eines Multi-ROI, ein 2d-Histogramm generiert. Über die 1d-Pixelhäufigkeitsverteilung des Fluoreszenz-Parameters wird das arithmetische Mittel gebildet. Dieser Mittelwert wird als repräsentativ für die MFIS-Aufnahme angenommen und weiter für die Mittelwertbestimmung über  $n$  MFIS-Aufnahmen verwendet. Die Darstellung der Mittelwerte von  $n$  MFIS-Aufnahmen erfolgt in Boxplots, deren Abmessungen und Symbole wie in Abbildung 3.5 gezeigt definiert sind.



**Abbildung 3.5. Darstellung eines Datensatzes als Boxplot.**

(A) In dieser Arbeit verwendete Darstellung eines Boxplots erstellt mit Origin 8.0. Der Kasten wird durch die 25%- und 75%-Perzentile gebildet. 50% der Messwerte liegen also innerhalb des Kastens. Der Querstrich innerhalb des Kastens zeigt den Median. Das Quadrat zeigt den arithmetischen Mittelwert, die Sternchen zeigen den maximalen und minimalen Messwert.

(B) Darstellung als Boxplot veranschaulicht anhand einer Normalverteilung (oben und Mitte) und Normalverteilung mit Sigmaumgebungen (unten). Abb. aus [Liao 2011].

#### 3.3.5.4. Signifikanz

Bei der Bestimmung von Komplexbildung anhand der Fluoreszenz-Lebensdauer wird der Mittelwert der Messwerte einer Probe, die nur Donor enthält ("donor only") und der Mittelwert der Messwerte einer Probe, die Donor und Akzeptor enthält, verglichen.

Ein gebräuchliches und einfaches Kriterium für die Unterscheidbarkeit von Messwerten allgemein fordert, dass die zugehörigen Standardabweichungen nicht überlappen dürfen. Es handelt sich hierbei nicht um ein notwendiges Kriterium, sodass auch bei Nichterfüllen ein statistisch signifikanter Unterschied der Messwerte gegeben sein kann. Für den Fall, dass die Standardabweichungen der Mittelwerte zweier Verteilungen von Messwerten überlappen, können statistische Signifikanztests hinzugezogen werden, um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Verteilungen von Messwerten zu beurteilen. Der t-Test testet die Signifikanz des Unterschieds zweier Mittelwerte auf Grundlage der zugehörigen Verteilungen der Messwerte. Der t-Test nimmt Normalverteilungen der Messwerte an, wobei die Breite der beiden getesteten Verteilungen unterschiedlich sein kann. Statistische Tests liefern sogenannte p-Werte. P-Werte kleiner als das Signifikanzniveau bedeuten, dass sich die beiden getesteten Verteilungen signifikant unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde der studentische t-Test in Microsoft Excel mit der Funktion T.TEST (zwei Stichproben, unterschiedliche Varianz) verwendet. Als Signifikanzniveau wurde 0,01 verwendet.

### 3.4. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

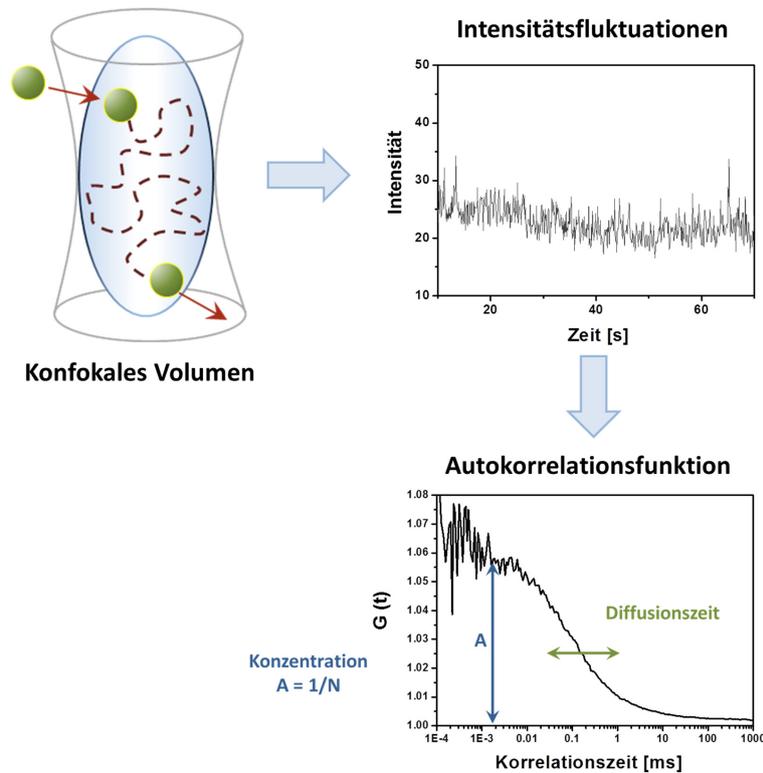
Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) ist eine Einzelmolekülmethode, um dynamische Prozesse von gelösten Molekülen zu untersuchen. FCS basiert auf der Analyse von Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität, die üblicherweise mit einem konfokalen Spektrometer detektiert wird.

Die Pionierarbeiten von Magde, Elson und Webb in den 70er Jahren an DNA-interkalierenden Substanzen hatten mit einem niedrigen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu kämpfen, hauptsächlich aufgrund schlechter Detektionseffizienzen und unzureichender Unterdrückung des Hintergrunds [Magde et al. 1972], [Magde et al. 1974]. Rigler et al. konnten dies deutlich verbessern, indem sie FCS mit einem konfokalen Aufbau kombinierten [Eigen und Rigler 1994], [Rigler und Widengren 1990], [Rigler 1995]. Die Verbindung eines konfokalen Detektionsvolumens von wenigen Femtolitern, nanomolaren Konzentrationen und einzelmolekülauglichen Avalanche-Photodioden liefert gute Signal-zu-Rausch-Verhältnisse und ist daher die heute übliche Konfiguration für FCS-Messungen.

Die Analyse von Fluktuationen wird mittels der (Auto-)Korrelationsfunktion durchgeführt. Die Autokorrelationsfunktion vergleicht die Werte  $N_F(t)$  des detektierten Signals zum Zeitpunkt  $t$  mit dem Wert  $N_F(t + t_c)$  zum Zeitpunkt  $t + t_c$ . Die Autokorrelationsfunktion drückt den Grad der Übereinstimmung einer Funktion mit sich selbst zu einem anderen Zeitpunkt aus.

Prinzipiell können nur molekulare Prozesse untersucht werden, die eine Änderung der Fluoreszenzintensität bewirken. Des Weiteren wird bei niedrigen Konzentrationen (nM) gemessen, um möglichst starke Fluktuationen zu erhalten. Idealerweise befinden sich nur einige wenige fluoreszente Moleküle im Detektionsvolumen. Translationsdiffusion führt zu einer Änderung der Fluoreszenzintensität, wenn sich durch die Brownsche Molekularbewegung Teilchen in das Detektionsvolumen hinein und wieder hinaus bewegen. Die Autokorrelation der dadurch entstehenden Fluktuationen liefert die Konzentration und den Diffusionskoeffizienten der diffundierenden Moleküle (siehe Abb. 3.6). Helle und dunkle Zustände von Molekülen können durch photophysikalische (Fluoreszenz- und Tripletteigenschaften), photochemische (Photozerstörung, Löschung, Isomerisierung) und chemische (Gleichgewichtsreaktionen) Prozesse verursacht werden. Mit FCS können die zugehörigen Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden.

Die Zeitskala der messbaren Kinetiken kann von Pikosekunden bis zu Sekunden betra-



**Abbildung 3.6. Schema einer FCS-Messung.** Die Diffusion eines fluoreszent markierten Moleküls (grün) durch das konfokale Beobachtungsvolumen verursacht Fluktuationen der detektierten Fluoreszenzintensität. Die Analyse der Autokorrelation des Fluoreszenzsignals liefert aus der Amplitude  $A$  die mittlere Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen  $N$  und deren Diffusionszeit.

gen. Die Zeitauflösung ist für kurze Zeiten durch Detektoreigenschaften wie Totzeit und *after pulsing* limitiert. Dies kann allerdings durch Verwendung von mehreren Detektoren umgangen werden. Die eigentliche Limitierung von FCS liegt in langsamen Kinetiken im Sekundenbereich. Hier werden durch die lange Messzeit an einem Molekül Bleicheffekte relevant. Werden langsame Moleküle photogeblichen, so täuscht dies ein vorzeitiges Ausreten aus dem konfokalen Volumen vor. Die zu kurzen Diffusionszeiten erschweren eine korrekte Kurvenanpassung.

Die photochemischen Eigenschaften des verwendeten Farbstoffs GFP haben ebenfalls Einfluss auf die Fluoreszenzfluktuationen und müssen entsprechend berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 3.6.2.2).

### 3.4.1. Rauschanalyse mittels Korrelationsfunktion

Ein statistisch sehr effizientes Verfahren zur Analyse der Intensitätsfluktuationen ist die Berechnung einer Autokorrelationsfunktion. Dabei wird "systematisches" Rauschen identifiziert und von "zufälligem" Rauschen abgetrennt. Die Autokorrelationsfunktion fragt den Bezug eines zur Zeit  $t$  detektierten Signals  $N_F(t)$ , zum Wert  $N_F(t + t_c)$ ,  $t_c$  Sekunden später ab (Selbstähnlichkeitsanalyse).

**Definition.** Das gemessene Fluoreszenzsignal  $N_F(t)$  (d.h. die Anzahl der registrierten Photonen in einem Zeitintervall) lässt sich auch als Fluktuation  $\delta N_F(t)$  um einen Mittelwert  $\langle N_F \rangle$  beschreiben:

$$N_F(t) = \langle N_F \rangle + \delta N_F(t), \quad (3.10)$$

mit der Mittelung  $\langle \dots \rangle$  des Fluoreszenzsignals über die Messzeit  $T$ :

$$\langle N_F \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T N_F(t) dt. \quad (3.11)$$

Mit Hilfe der Korrelationsfunktion einer beliebigen Zeitfunktion können zeitliche Vorgänge analysiert werden. Die Autokorrelation  $A(t_c)$  einer Zeitfunktion  $N(t)$  ist definiert als

$$A(t_c) = \langle N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) dt, \quad (3.12)$$

wobei  $t_c$  die Korrelationszeit bezeichnet.

Durch Einsetzen von Gleichung 3.10 und Ausmultiplizieren ergibt sich:

$$A(t_c) = \langle N_F \rangle^2 + \langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t + t_c) \rangle. \quad (3.13)$$

Die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(t_c)$  ergibt sich durch Division der Autokorrelationsfunktion  $A(t_c)$  durch den Mittelwert  $\langle N_f(t) \rangle^2$ . Mit Gleichung 3.10 erhält man dann:

$$G(t_c) = \frac{\langle N_F(t) \cdot N_F(t + t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta N_F(t) \cdot \delta N_F(t + t_c) \rangle}{\langle N_F(t) \rangle^2}. \quad (3.14)$$

Es können auch zwei verschiedenen Zeitfunktionen  $N^A(t)$  und  $N^B(t)$  (kreuz-)korreliert und so auf Ähnlichkeit überprüft werden. Hierzu verwendet man die Kreuzkorrelationsfunktion  $G_{AB}(t_c)$ , die normiert folgende Form annimmt:

$$G_{AB}(t_c) = \frac{\langle N^A(t) \cdot N^B(t + t_c) \rangle}{\langle N^A(t) \cdot N^B(t) \rangle} = 1 + \frac{\langle \delta N^A(t) \cdot \delta N^B(t + t_c) \rangle}{\langle N^A(t) \cdot N^B(t) \rangle}. \quad (3.15)$$

Sie findet insbesondere Anwendung, um ohne Totzeit messen zu können. Hierzu wird das Fluoreszenzsignal auf zwei Detektoren aufgeteilt, anschließend werden beide Zeitspuren kreuzkorreliert. Durch Kreuzkorrelation können auch Signale auf Ähnlichkeit überprüft werden, die sich spektral oder hinsichtlich ihrer Polarisation unterscheiden. Durch Kreuzkorrelation von Kanälen mit zueinander senkrechter Polarisationsrichtung können Kinetiken identifiziert werden, die die Anisotropie beeinflussen [Borst et al. 2008]. Kreuzkorrelation von spektral verschiedenen Signalen wie Donor- und Akzeptorfluoreszenz gibt Aufschluss über molekulare Interaktionen [Bacia und Schwille 2007] und Kinetiken, die mit einer Änderung der Abstände zwischen den Fluorophoren einhergehen [Eggeling et al. 2005], [Margittai et al. 2003].

### Teilchenzahl und Poisson-Verteilung.

Die Intensität  $N_F(t)$  ist proportional zur Anzahl der zur Zeit  $t$  registrierten Photonen und diese Anzahl ist wiederum proportional zur Anzahl der im Messvolumen vorhandenen fluoreszierenden Moleküle  $n$ . Die Wahrscheinlichkeit  $p(n)$ , dass sich bei einer mittleren Molekülzahl  $N$  zu einem zufälligen Zeitpunkt  $n$  Moleküle in dem Detektionsvolumen befinden, ist durch eine Poissonverteilung gegeben:

$$p(n) = \frac{N^n}{n!} \cdot e^{-N} \quad (3.16)$$

Zur Berechnung der mittleren Molekülzahl  $\langle n \rangle = N$  im Beobachtungsvolumen, muss das mit der Verteilungsfunktion gewichtete Mittel berechnet werden:

$$\langle n \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n \cdot p(n) = N \quad (3.17)$$

Analog gilt dies auch für die mittlere quadratische Anzahl  $\langle n^2 \rangle$  der Teilchen im Messvolumen:

$$\langle n^2 \rangle = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 \cdot p(n) = N^2 + N \quad (3.18)$$

Damit kann der Wert der normierten Autokorrelationsfunktion für  $t_c=0$  berechnet werden

und ergibt sich zu

$$G(0) = 1 + \frac{1}{N}. \quad (3.19)$$

Praktisch bedeutet dies, dass die Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen direkt aus der Amplitude der Korrelationsfunktion zum Zeitpunkt Null abgelesen werden kann.

### 3.4.2. Modellfunktionen für die Korrelationsfunktion

Die einzelnen sogenannten *bunching*-Terme einer Korrelationsfunktion können entsprechend ihrer zugrunde liegenden physikalischen bzw. chemischen Prozesse mit adäquaten Modellfunktionen angepasst werden. Sind die Hell- und Dunkelzustände verursachenden Prozesse voneinander unabhängig, so lässt sich die Korrelationsfunktion als Summe aus den zugehörigen Termen ausdrücken, multipliziert mit dem Diffusionsterm:

$$G(t_c) = 1 + \frac{1}{N} G_D(t_c) \cdot \left[ 1 + \sum G_i(t_c) \right]. \quad (3.20)$$

Die Herleitungen der verschiedenen Modelle für die einzelnen Terme sind in den Arbeiten von Eggeling, Widengren und Schwille ausführlich beschrieben [Eggeling et al. 1998], [Eggeling 1999], [Widengren 1996]. Hier sollen im Weiteren die Ergebnisse zusammengefasst werden.

Der einfachste Fall einer Modulation des Fluoreszenzsignals stellt die translative Diffusion dar, der alle Moleküle gleichsam unterliegen. Zwei Effekte führen hier zur Fluktuation der Signalintensitäten: Zum Einen die inhomogene Intensitätsdichteverteilung des anregenden Lichts im Anregungsvolumen, die als dreidimensionale Gaußverteilung angenommen werden kann, und zum anderen die Schwankung der Molekülkonzentration im Detektionsvolumen, die den Fick'schen Diffusionsgesetzen folgt.

Die Korrelationsfunktion ergibt sich für den Fall der translativen Diffusion zu:

$$G_D(t_c) = 1 + \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \frac{t_c}{t_D}} \right) \left( \frac{1}{1 + \left( \frac{\omega_0}{z_0} \right)^2 \frac{t_c}{t_D}} \right)^{1/2}. \quad (3.21)$$

Der Geometrieparameter  $\omega_0/z_0$  setzt sich zusammen aus der radialen ( $\omega_0$ ) und axialen ( $z_0$ )

Ausdehnung des Beobachtungsvolumen, bei der die Detektionseffizienz auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Das Detektionsvolumen berechnet sich mit diesen Größen zu

$$V_D = \pi^{3/2} z_0 \omega_0^2 \quad (3.22)$$

und liegt typischerweise im Femtoliterbereich. Die charakteristische Diffusionszeit  $t_D$  beträgt

$$t_D = \frac{\omega_0^2}{4D}, \quad (3.23)$$

wobei  $D$  der Diffusionskoeffizient des Moleküls ist.

Über diese Beziehung kann die absolute Größe des konfokalen Volumens durch die Messung eines Farbstoffs mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt werden.

Der Diffusionskoeffizient hängt nach der Stokes-Einstein-Relation von der Viskosität des Mediums  $\eta$  und dem hydrodynamischen Radius  $R_H$  und daher von der Größe eines Moleküls ab:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}, \quad (3.24)$$

mit der Boltzmann-Konstanten  $k$  und der Temperatur  $T$ . Unter der Annahme eines globulären Moleküls ergibt sich die Proportionalität des Diffusionskoeffizienten zur dritten Wurzel des molekularen Volumens bzw. des Molekulargewichts. Anschaulich heißt dies, dass ein 8-fach höheres Molekulargewicht die Diffusionszeit lediglich verdoppelt.

Aus Gleichung 3.21 ergibt sich außerdem, dass die Anzahl der Moleküle im konfokalen Volumen direkt an der Amplitude des Diffusionsterms zum Zeitpunkt Null abgelesen werden kann.

Die meisten Fluorophore gehen schon bei niedrigen Anregungsleistungen teilweise in einen Tripletzustand über. Da aus den langlebigen Tripletzuständen keine Fluoreszenz erfolgt, erscheint der spinverbotene Übergang in den dunklen Tripletzustand als zusätzlicher Term in der FCS-Kurve. Die Besetzungswahrscheinlichkeit des Tripletzustands ist sehr stark von der Anregungsleistung abhängig, und daher räumlich inhomogen und auf das Anregungsvolumen beschränkt. Die exakte Lösung des Problems in der FCS-Theorie ist in [Widengren und Rigler 1995] zu finden. Als Näherung kann eine mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit  $A_T$  über das Detektionsvolumen angenommen werden und die Korrelationsfunktion  $G_T(t_c)$

der Triplettkinetik kann durch folgende Gleichung beschrieben werden:

$$G_T(t_c) = 1 - A_T + A_T \cdot \exp(-t_c/t_T), \quad (3.25)$$

dabei ist  $A_T$  die mittlere Besetzungswahrscheinlichkeit des ersten angeregten Triplettzustands und  $t_T$  die Triplettkorrelationszeit. Der Triplettterm enthält alle Geschwindigkeitskonstanten, die zur Be- und Entvölkerung des Triplettzustands beitragen.

### 3.4.3. Verwendete Modellfunktionen zur FCS Kurvenanpassung

In diesem Abschnitt werden die Modellfunktionen zur FCS Kurvenanpassung vorgestellt.

Die **Bezeichnungen der einzelnen Parameter** sind wie folgt:

$b_0$	Grundlinie
$b_3$	Geometriefaktor 1 $(\omega_0/z_0)_1$
$b_5$	Geometriefaktor 2 $(\omega_0/z_0)_2$
N	Teilchenanzahl
R	Anteil der Diffusionskomponenten 1
$t_{D1}$	Diffusionszeit der Diffusionskomponenten 1
$t_{D2}$	Diffusionszeit der Diffusionskomponenten 2
T	Triplettanteil
$t_T$	Triplettzeit
B	Anteil des <i>bunching</i> -Terms
$t_B$	Korrelationszeit des <i>bunching</i> -Terms

Die Modellfunktionen für die einzelnen Fälle sind wie folgt:

### 1) Diffusion und Triplet

$$f(t) = b_0 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t}{|t_d|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_3^2 \cdot |t_d|}}} \cdot \left[ 1 - |T| + |T| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_T|}\right) \right] \quad (3.26)$$

### 2) Diffusion, Triplet und zusätzlicher *bunching*-Term

$$f(t) = b_0 + \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{t}{|t_d|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_3^2 \cdot |t_d|}}} \cdot \left[ 1 - |T| + |T| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_T|}\right) - |B| + |B| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_B|}\right) \right] \quad (3.27)$$

### 3) Diffusion mit zwei Komponenten und Triplet

$$f(t) = b_0 + \frac{1}{N} \cdot \left[ \frac{R}{1 + \frac{t}{|t_{d1}|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_3^2 \cdot |t_{d1}|}}} + |1 - |R|| \frac{1}{1 + \frac{t}{|t_{d2}|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_5^2 \cdot |t_{d2}|}} \right] \cdot \left[ 1 - |T| + |T| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_T|}\right) \right] \quad (3.28)$$

**4) Diffusion mit zwei Komponenten, Triplett und zusätzlicher *bunching*-Term**

$$f(t) = b_0 + \frac{1}{N} \cdot \left[ \frac{R}{1 + \frac{t}{|t_{d1}|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_3^2 \cdot |t_{d1}|}}} + |1 - |R|| \frac{1}{1 + \frac{t}{|t_{d2}|}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{t}{b_5^2 \cdot |t_{d2}|}}} \right] \\ \cdot \left[ 1 - |T| + |T| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_T|}\right) - |B| + |B| \cdot \exp\left(-\frac{t}{|t_B|}\right) \right] \quad (3.29)$$

### 3.4.4. Praktische Durchführung der FCS-Messungen

Kalibrierung:

Zu Beginn jedes Messtages wurde Rhodamin 110 in Wasser als Referenz zur Größenbestimmung des konfokalen Volumens gemessen. Es wurden die identischen Einstellungen wie für die FCS-Messungen in Zellen verwendet. Die Diffusionszeit von Rhodamin 110 betrug typischerweise  $36 \mu\text{s}$ . Mit dem bekannten Diffusionskoeffizienten von Rhodamin 110 ( $4,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$  bei  $22,5^\circ\text{C}$ , [Gendron et al. 2008]) konnte die Größe des effektiven konfokalen Volumens zu  $0,65 \text{ fl}$  bestimmt werden.

Die FCS Messungen wurden als Punktmessungen durchgeführt. Hierzu wurde das konfokale Volumen mit Hilfe der *set point*-Anwendung des Olympus FluoView in einem LSM-Bild auf der Plasmamembran bzw. bei Messungen von freiem GFP im Zytoplasma positioniert. Die anschließende Punktmessung wurde mit der externen MFD-Einheit aufgenommen (siehe Abb. 3.1).

Die standardmäßige Durchführung aller beschriebenen FCS-Messungen an der Plasmamembran begann mit einer Photobleichphase von 15 bis 30 s. Nachdem sich eine konstante Zählrate eingestellt hatte, wurden Punktmessungen von 60 bis 180 s bei einer Leistung von  $5,5 \mu\text{W}$  aufgenommen. Es wurde eine Punktmessung pro Membranabschnitt aufgenommen, sodass jede Punktmessung zu einem unterschiedlichen Zellpaar gehört.

Für FCS-Messungen an freiem GFP wurden mehrmals hintereinander Punktmessungen von 30 bis 60 s im Zytoplasma aufgenommen.

Auswertung:

Die Dateien der aufgenommenen Spuren wurden in Dateien zu je 300.000 Photonen aufgeteilt (*split files*) und mit dem institutsintern entwickelten FCS-Programm *Kristine* [Felekyan 2013] korreliert und mit Modellfunktionen (siehe Kapitel 3.4.3) angepasst. *Split files* von instabilen Abschnitten der Spur wurden nicht berücksichtigt (vgl. Intensitätsspuren in Abschnitt 4.6.4).

## 3.5. Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP)

Die Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (*fluorescence recovery after photobleaching*, FRAP) ist eine Methode der kinetischen Mikroskopie, mit der die Mobilität von Proteinen in lebenden Zellen untersucht werden kann. Bleichexperimente wurden in den 1970er Jahren entwickelt und erstmals angewendet [Axelrod et al. 1976], fanden aber ebenso wie FCS erst im Zuge der Entwicklung von GFP als universellem Fluoreszenzmarker in lebenden Zellen und der Verfügbarkeit kommerzieller LSM seit den 1990er Jahren breite Anwendung [Lippincott-Schwartz et al. 2003].

In einem FRAP-Experiment wird in einem kleinen Bereich der Zelle die Fluoreszenz markierter Zielmoleküle durch einen intensiven Laserpuls irreversibel zerstört. Anschließend ist im photogeblichen Bereich eine Erholung der Fluoreszenz zu beobachten, wenn photogeblichte Moleküle durch fluoreszente Moleküle z. B. durch Diffusion ausgetauscht werden (siehe Abb. 3.7).

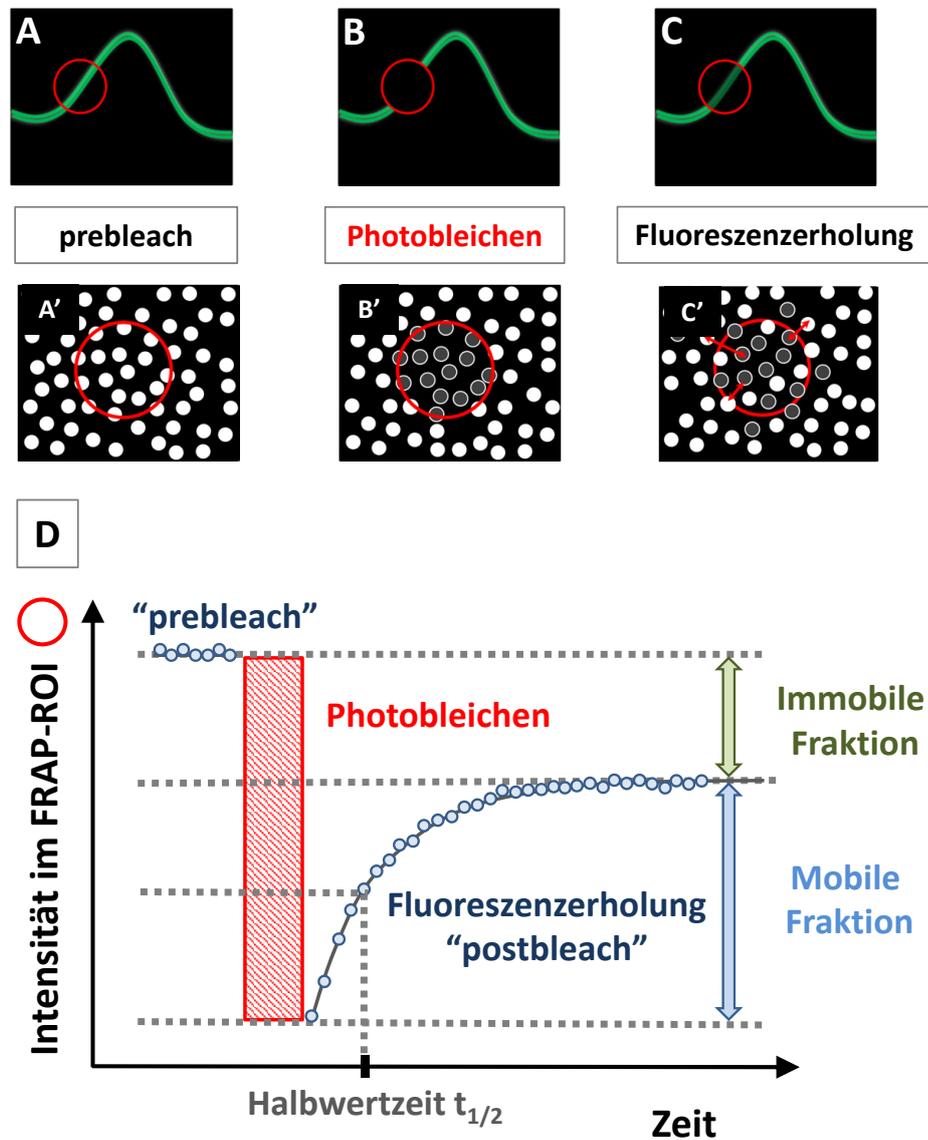
Die Beweglichkeit eines Proteins steht oftmals in engem Zusammenhang mit dessen Funktion. Die Interaktion mit Zellstrukturen und Bindungspartnern hemmt die Mobilität der beteiligten Proteine, sodass die Beweglichkeit ein Maß für Aktivität und Bindung sein kann. Aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzerholung lassen sich Diffusionskoeffizienten, Austauschraten von Bindungen und der Anteil der kinetisch gehemmten Proteine (immobile Fraktion) bestimmen.

### 3.5.1. Praktische Durchführung der FRAP-Messungen

In Vorversuchen wurden zunächst die Parameter des Bleichexperiments der Dynamik und Konzentration der untersuchten Proteine angepasst.

Zeigen Proteine eine hohe Dynamik mit schneller Fluoreszenzerholung, ist es wichtig, die Aufnahmezeit und Bleichphase möglichst kurz zu halten, da innerhalb dieser Zeit keine Dynamik beobachtet und bestimmt werden kann. Die hier untersuchten Proteine sind in der Plasmamembran zwar zum größten Teil immobil, allerdings zeigt die mobile Fraktion eine schnelle Dynamik. Daher wurden kleine Bildausschnitte mit einer Aufnahmedauer von 1 s pro Bild und Bleich-ROI mit einem Durchmesser von 5-10  $\mu\text{m}$  gewählt. Schnelles Scannen mit 20  $\mu\text{s}/\text{Pixel}$  in Kombination mit einer niedrigen Anregungsleistung von 5  $\mu\text{W}$  wurde verwendet, um kontinuierliches Bleichen während der Aufnahme möglichst gering

### Schema eines FRAP Experiments



**Abbildung 3.7. Schema eines FRAP-Experiments.** (A, B, C) FRAP- Messung an der Plasmamembran. (A', B', C') Modell der fluoreszierenden (weiße Kreise) und gebleichten (graue Kreise) Zielmoleküle während des FRAP-Experiments. (A, A') Eine Aufnahmeserie zu Beginn des Experiments (prebleach) dient zur Bestimmung der ungestörten Fluoreszenzintensität im Beobachtungsfenster (FRAP-ROI, roter Kreis). (B, B') In der Photobleichphase wird die Fluoreszenz der Zielmoleküle im FRAP-ROI irreversibel zerstört. (C) Anschließend ist eine Fluoreszenzenerholung zu beobachten (postbleach). (C') Die Fluoreszenzenerholung nach Photobleichen entsteht durch den Austausch von gebleichten Molekülen im FRAP-ROI mit ungebleichten Molekülen aus der Umgebung hauptsächlich durch Diffusion. (D) Die Fluoreszenzintensität im FRAP-ROI wird über die Zeit beobachtet. Die Anteile der mobilen und immobilen Fraktion sowie die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  können aus dem Graphen bestimmt werden.

zu halten.

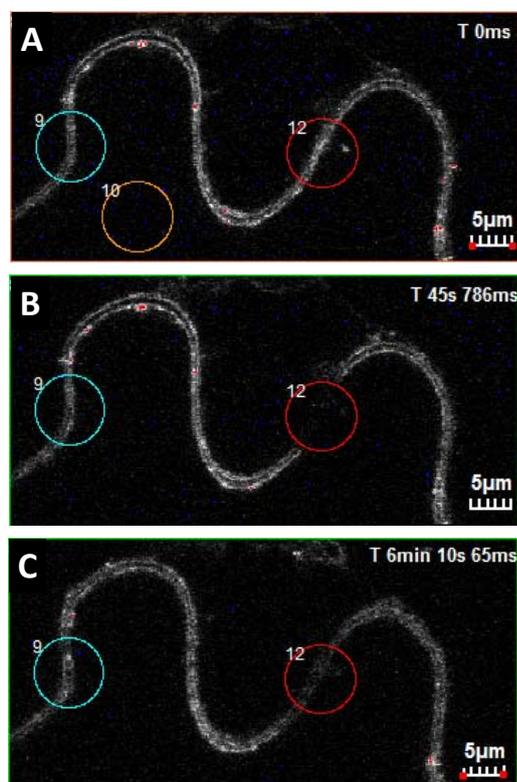
Die Bleichphase wurde mit 80 Iterationen bei 100 % Laserleistung an die durchschnittliche Konzentration der Proteine so angepasst, dass die Fluoreszenz nach der Bleichphase dem Hintergrund entsprach.

Eine FRAP-Messung bestand aus 10 Bildern vor dem Photobleichen (prebleach), einer Photobleichphase über 80 Bilder bei 100 % Laserleistung und aus der anschließenden Fluoreszenzerholungsphase, während der 100 bzw. 160 Bilder mit 2 s Zeitverzögerung bzw. ohne Zeitverzögerung aufgenommen wurden. Insgesamt ergibt sich so eine Dauer von 2 bis 7 min für eine Messung.

#### 3.5.1.1. Quantitative FRAP-Auswertung:

Zur vollständigen Analyse der Fluoreszenzerholung sind neben dem Intensitätsverlauf im FRAP-ROI auch die Intensitätsverläufe in zwei Kontroll-ROI zu berücksichtigen (siehe Abb. 3.8). Ein ROI außerhalb der Membranregion, das keine Fluoreszenz enthalten sollte, diente zur Bestimmung des Hintergrunds. Ein ROI an der Plasmamembran außerhalb des Bleichfensters wird benötigt, um die Fluoreszenzerholung um die Fluoreszenzabnahme durch kontinuierliches Photobleichen während der Aufnahme (*acquisition bleaching*) zu korrigieren.

Die FRAP-Daten wurden nach Phair normiert (*double normalization*, [Phair et al. 2004]), um Hintergrund und *acquisition bleaching* korrigiert und mit einer mono-exponentiellen Funktion angepasst. Als Ergebnis wird der Anteil der mobilen bzw. immobilen Fraktion sowie die Halbwertszeit der Fluoreszenzerholung festgehalten. Zur Auswertung der FRAP-Daten wurde das frei erhältliche IgorPro Makro *FrapCalc* verwendet [Miura 2009].



**Abbildung 3.8.** Beispiel einer FRAP-Messung an der Plasmamembran. (A) Erstes Bild der prebleach-Phase, (B) erstes Bild nach der Photobleichphase, (C) Bild nach 6 min Fluoreszenz-erholung. rot: Bleich-ROI, türkis: Referenz-ROI, orange: Hintergrund-ROI.

## 3.6. Das grün fluoreszierende Protein (GFP)

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist aus der heutigen Zellbiologie nicht mehr wegzudenken. Seit seiner Entdeckung und Isolierung 1961 durch Osamu Shimomura (Nobelpreis 2008) ist es zu einem der wichtigsten Instrumente der Molekularbiologie geworden. Das Protein stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*, der es zusammen mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Photoprotein Aequorin eine grüne Biolumineszenz verleiht. Das GFP-codierende Gen konnte von Douglas Prasher 1992 isoliert und kloniert werden [Prasher et al. 1992] und von Martin Chalfie (Nobelpreis 2008) 1994 erstmals außerhalb seines Ursprungsorganismus zur Expression gebracht werden [Chalfie et al. 1994]. Der immense Vorteil von GFP liegt in der Unabhängigkeit seiner Expression, Faltung und Chromophorreifung von zellulären Kofaktoren. Es kann daher ohne Probleme genspezifisch an Proteine fusioniert und funktional in nahezu jedem Organismus exprimiert werden.

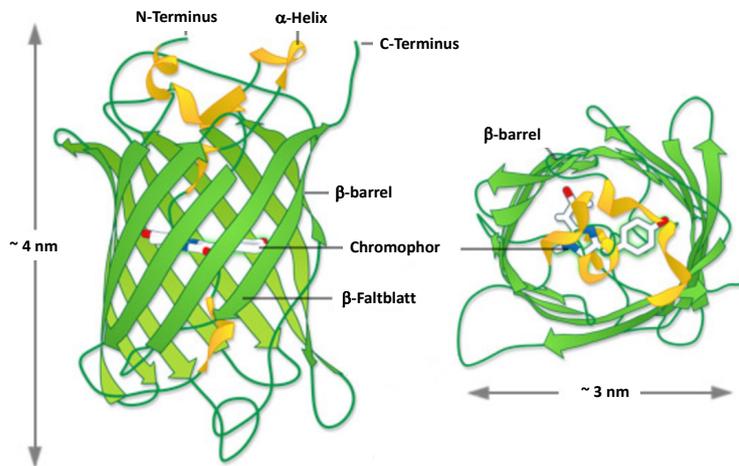
### 3.6.1. Allgemeine Eigenschaften

#### 3.6.1.1. Struktur

Das wildtypische GFP aus *Aequorea victoria* mit einer Molekülmasse von 27 kDa besteht aus 238 Aminosäuren, die eine einzigartige Zylinder-Struktur ausbilden (Abb. 3.9). Die Kristallstruktur wurde 1996 parallel von Ormö und Yang bestimmt [Ormö et al. 1996], [Yang et al. 1996]. Diese besteht aus einer  $\alpha$ -Helix innerhalb des sogenannten " $\beta$ -barrel" mit einem Durchmesser von 30 Å und einer Länge von 40 Å [Yang et al. 1996], das durch elf  $\beta$ -Faltblättern gebildet wird. Der aus drei Aminosäuren bestehende Chromophor ist in der Mitte des Zylinders in der  $\alpha$ -Helix lokalisiert und durch die umgebenden Faltblätter gut geschützt.

#### 3.6.1.2. Varianten

Es existiert eine Vielzahl homologer fluoreszenter Proteine (FP) [Chudakov et al. 2010]. Die fluoreszenten Proteine der GFP-Familie aus der Qualle *Aequorea victoria* decken den blauen, grünen und gelben Spektralbereich ab. Es existieren aber auch Varianten aus anderen Organismen, wie z.B. Spezies der Korallen *Anthozoa* [Matz et al. 1999], die vor allem



**Abbildung 3.9.** Struktur von GFP aus [Zeiss 2013]

fluoreszente Proteine im roten Spektralbereich hervorgebracht haben [Verkhusha und Lukyanov 2004]. DsRed aus der Seeanemone *Discosoma striata* war einer der ersten roten *Anthozoa*-Vertreter, der kommerziell erhältlich war und umfassend charakterisiert wurde. Das wildtypische GFP, aber auch viele andere FP, zeigen die Tendenz, insbesondere mit steigender Konzentration und Temperatur, zu aggregieren. Diese Aggregate weisen oft eine geringere oder gar keine Fluoreszenz auf. Eine starke Interaktion von FP-Molekülen untereinander stellt außerdem gerade bei Interaktionsstudien von fusionierten Proteinen ein Problem dar. Daher wurde durch Mutagenese eine Vielzahl von FP-Varianten geschaffen, die sowohl das komplette sichtbare Spektrum abdeckten, als auch stabil als Monomer vorliegen [Shaner et al. 2005]. Die ersten Varianten wurden von Roger Tsien (Nobelpreis 2008) bereitgestellt und genutzt.

### EGFP und mCherry

Das EGFP (enhanced green fluorescent protein) ist eine GFP-Variante, die durch Mutagenese des Chromophors erhalten wird [Tsien 1998]. Serin ist hier durch Threonin ausgetauscht. Sie ist die meistverwendete GFP-Variante und wurde in dieser Arbeit verwendet. Das rot fluoreszierende Protein mCherry wurde als FRET-Akzeptor für EGFP verwendet. Es stellt die zu diesem Zeitpunkt beste verfügbare monomere rote Variante dar [Shaner et al. 2005], obwohl es eine vergleichsweise schlechte Quantenausbeute aufweist und Probleme bei der Chromophorreifung auftreten können.

### 3.6.1.3. Chromophor-Reifung

Der eigentliche Chromophor des wildtypischen GFP besteht aus den drei Aminosäuren Serin an Position 65, Tyrosin an Position 66 und Glycin an Position 67 und wird autokatalytisch nur unter Beteiligung von molekularem Sauerstoff gebildet. Die beiden Aminosäuren Tyr-66 und Gly-67 sind in jedem Chromophor eines GFP-verwandten fluoreszenten Proteins erhalten. Die erste chromophorbildende Seitenkette an Position 65 kann dagegen variieren. Allein die Aminosäuresequenz führt nicht zwingend zu Fluoreszenz. Zum einen ist eine Chromophorreifung in mehreren Schritten notwendig, zum anderen die stabilisierende und schützende Umgebung des " $\beta$ -barrels".

Zuerst werden durch Faltung die beteiligten Aminosäuren in räumliche Nähe gebracht. Durch Dehydrierung des Tyrosin mit molekularem Sauerstoff wird die chromophore Gruppe fertiggestellt [Heim et al. 1994], [Reid und Flynn 1997].

Das denaturierte Protein ist nicht fluoreszent, da durch eine cis-trans-Isomerisierung die Fluoreszenz praktisch vollständig gelöscht wird. Die feste Verankerung innerhalb des " $\beta$ -barrels" verhindert die Isomerisierung und stabilisiert daher die Fluoreszenz [Niwa et al. 1996].

Die Reifung der roten FP aus der DsRed-Familie erfolgt sehr viel langsamer als für FP der GFP-Familie [Baird et al. 2000], [Terskikh et al. 2000]. Zur vollständigen Reifung des Chromophors ist ein weiterer Oxidationsschritt nötig. Darüberhinaus sind Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren des  $\beta$ -barrels essenziell. Dadurch hängt der Reifungsprozess besonders empfindlich von der korrekten Faltung des ganzen Proteins ab. Ein detaillierter Überblick über die Reifungsprozesse von FP ist in [Subach und Verkhusha 2012] zu finden. Die wesentlichsten Aspekte für die Verwendung als FRET-Akzeptor sind die folgenden: Die Reifung der Ds-Red-Familie erfolgt über einen grün fluoreszierenden, GFP-ähnlichen Zustand [Wachter et al. 2010]. Allerdings existiert der grün fluoreszierende Zustand nicht allein als Zwischenstadium des Reifungsprozesses, sondern stellt einen möglichen stabilen Endzustand dar. Dies führt dazu, dass auch nach abgeschlossener Reifung ein Teil der DsRed-Moleküle als grün fluoreszierende Spezies vorliegen [Strack et al. 2010].

### 3.6.2. Photophysikalische Eigenschaften

Das wildtypische GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima, jedoch nur ein Emissionsmaximum. Die Ursache hierfür ist das Vorliegen des Chromophors im Gleichgewicht zwischen der protonierten und deprotonierten Form, die sehr unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften besitzen.

Die deprotonierte B-Form absorbiert mit Maximum bei 470 nm und ist für die Fluoreszenz mit Emissionsmaximum bei 509 nm verantwortlich. Die neutrale A-Form hingegen absorbiert bei 395 nm und zeigt aus dem angeregten Zustand A\* praktisch keine Fluoreszenz. Durch Protonentransfer im angeregten Zustand kann der Chromophor von A\* in den anionischen angeregten Zustand B\* oder den anionische Zwischenzustand I\* übergehen. Aus diesen angeregten Zuständen erfolgt die typische grüne Fluoreszenz bei 509 nm (vgl. Abb 3.10).

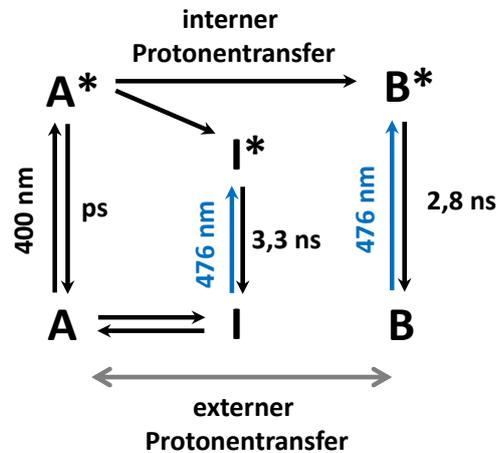
#### 3.6.2.1. Fluoreszenz-Lebensdauer

Die zeitaufgelöste Fluoreszenz GFP verwandter fluoreszenzter Proteine zeigt je nach Anregungswellenlänge ein multi-exponentielles Abklingverhalten. Die Ursache hierfür liegt hauptsächlich in den unterschiedlich protonierten Zuständen des Chromophors (Abb. 3.10). Die Lage des Gleichgewichts kann photoinduziert und pH-abhängig verschoben werden und führt entsprechend zu unterschiedlichen Fluoreszenz-Lebensdauern [Striker et al. 1999], [Liu et al. 2006].

Sowohl wildtypisches GFP als auch das verwendete EGFP zeigen bei Anregung um 488 nm eine Fluoreszenzabklingkurve, die gut mit einem bi-exponentiellen Modell beschrieben werden kann [Striker et al. 1999], [Uskova et al. 2000], [Suhling et al. 2002], [Hess et al. 2003], [Visser et al. 2010].

#### 3.6.2.2. Photodynamische Eigenschaften

Das in FCS-Experimenten beobachtete Blinken von fluoreszenten Proteinen im Mikrosekundenbereich ist in erster Linie auf das Vorliegen von protonierten und deprotonierten Molekülen im Gleichgewicht zurückzuführen und ist daher stark pH-abhängig. Bei neutralem pH liegt der Chromophor in seiner anionischen Form (B-Form) vor und



**Abbildung 3.10.** Zustände von GFP. Adaptiert an [Striker et al. 1999] und [Liu et al. 2006]

besitzt ein Absorptionsmaximum bei ca. 490 nm. Bei niedrigeren pH-Werten wird der Chromophor protoniert (A-Form), was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu ca. 400 nm führt. Im FCS-Experiment bei einer Anregungswellenlänge um 490 nm bedeutet dies, dass protonierte GFP-Moleküle nicht mehr angeregt werden können und so für die Lebenszeit des protonierten Zustands in einem Dunkenzustand verweilen. Die charakteristische Zeit für diese Protonierungskinetik ist stark vom pH-Wert der Umgebung abhängig. Sie beträgt bei pH 7 etwa 300  $\mu\text{s}$  und sinkt mit abnehmendem pH-Wert auf 45  $\mu\text{s}$  (pH 5) [Haupts et al. 1998], [Widengren et al. 1999a].

Des Weiteren existiert im pH-Bereich 8-11 eine Zeitkonstante von 450  $\mu\text{s}$ , die unabhängig vom äußeren pH-Wert ist und mit einer intramolekularen Protonierung assoziiert wird [Haupts et al. 1998].

Wechselwirkungen mit der unmittelbaren molekularen Umgebung der chromophorbildenden Aminosäuren im angeregten Zustand können entweder zu weiteren Dunkenzuständen führen oder das Gleichgewicht zwischen den neutralen und anionischen Grundzuständen verschieben [Schwille et al. 2000], [Widengren et al. 1999b], [Bosisio et al. 2008], [van Thor und Sage 2006], [Cotlet et al. 2006].

Die Triplettkinetik ist abhängig von der Anregungsleistung, führt aber nur für hohe Anregungsleistungen über 100  $\text{kW}/\text{cm}^2$  zu einer merklichen Änderung der FCS-Kurven [Widengren et al. 1999a].

## 3.7. Induzierbare Expression von Fusionsproteinen in *N. benthamiana*

### 3.7.1. Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens*

Um Proteine in Fusion mit einem fluoreszenten Protein in einer Pflanze exprimieren zu können, müssen die Zielzellen genetisch manipuliert (transformiert) werden. Bei der Transformation von Pflanzen mittels des *Agrobacterium tumefaciens*, einem gramnegativen Bodenbakterium, wird die Pathogenität des Bakteriums ausgenutzt. Agrobakterien sind durch Infektion in der Lage, bestimmte DNA-Sequenzen (die sogenannte “*t*-DNA“ = Transfer DNA) ihres Ti-Plasmides (Ti = Tumor-induzierendes) in das pflanzliche Wirtsgenom einzubauen. Für diese Übertragung sind Virulenz- (*vir*-) Gene nötig, die ebenfalls auf dem Ti-Plasmid kodiert sind. Die übertragenen Gene führen in der wildtypischen Situation unter anderem zur Bildung von Tumoren (Gallen) und der Synthese von Opinen in der Pflanzenzelle, welche dem parasitierenden Bakterium als Nahrung dienen. Die zu übertragende DNA wird dabei durch zwei sie flankierende 25-Basepaar-lange DNA-Sequenzen (“left border“ (LB) und “right border“ (RB)) definiert.

Für molekularbiologische Arbeiten wurde das Bakterium genetisch modifiziert, indem die tumorinduzierenden Gene zwischen der LB und der RB entfernt wurden und die *vir*-Gene auf ein zusätzliches Plasmid (das Helfer Ti-Plasmid) ausgelagert wurden. Anstelle der tumorinduzierenden Gene können nun Gene von Interesse eingesetzt werden, die vom Bakterium in die Pflanzen übertragen werden sollen. Da das Bakterium nun zwei Plasmide trägt, das integrative Ti- und das Helfer Ti-Plasmid, spricht man in diesem Fall von einem binären Vektorsystem [Campbell und Reece 2011].

Die Konstruktion der verwendeten Estradiol-induzierbaren Vektoren mit GFP, mCherry und GFP-mCherry als transkriptionelle Fusionen am C-Terminus zur transienten Expression in *N. benthamiana* ist beschrieben in [Bleckmann et al. 2010a]. Die Klone von *ACR4* und *CLV1* zur transkriptionellen Fusion an GFP und mCherry sowie für die Konstrukte mit ausgetauschter Transmembrandomäne sind in [Stahl et al. 2013] beschrieben.

### Transformation von *N.benthamiana* Blättern

Die Blätter von 4-5 Wochen alten *N. benthamiana* Pflanzen werden mit transgenen Agrobakterien transient transformiert. Hierfür wird eine Agrobakteriensuspension mittels einer Spritze durch die Spaltöffnungen der unteren Blattepidermis in das Blatt infiltriert. Diese Methode ist detailliert in [Bleckmann 2010] beschrieben.

### Estradiol-induzierbares Expressionssystem

Für die Expression der Transgene wurde ein Estradiol-induzierbares System verwendet, um die Expressionsstärke kontrollieren zu können. Hierbei wird der transkriptionelle Aktivator XVE konstitutiv unter Kontrolle des G10-90 Promotors exprimiert. Durch Zugabe des Hormons  $\beta$ -Estradiol kommt es zu einer Konformationsänderung des XVE, wodurch ein Kernlokalisierungssignal zugänglich wird. Im Kern bindet der XVE Transkriptionsfaktor an den lexA-46 35S Promotor und bewirkt die Expression des Zielgens.

Die Induktion der Transgenexpression erfolgte 2-4 Tage nach Infiltration. Hierzu wurden die infiltrierten Blätter mit 20  $\mu$ M  $\beta$ -Estradiol / 0.1 % Tween-20 eingesprüht. Die Pflanzen wurden frühestens 12 Stunden nach Induktion mit MFIS untersucht.

## 3.7.2. Verwendete Peptide

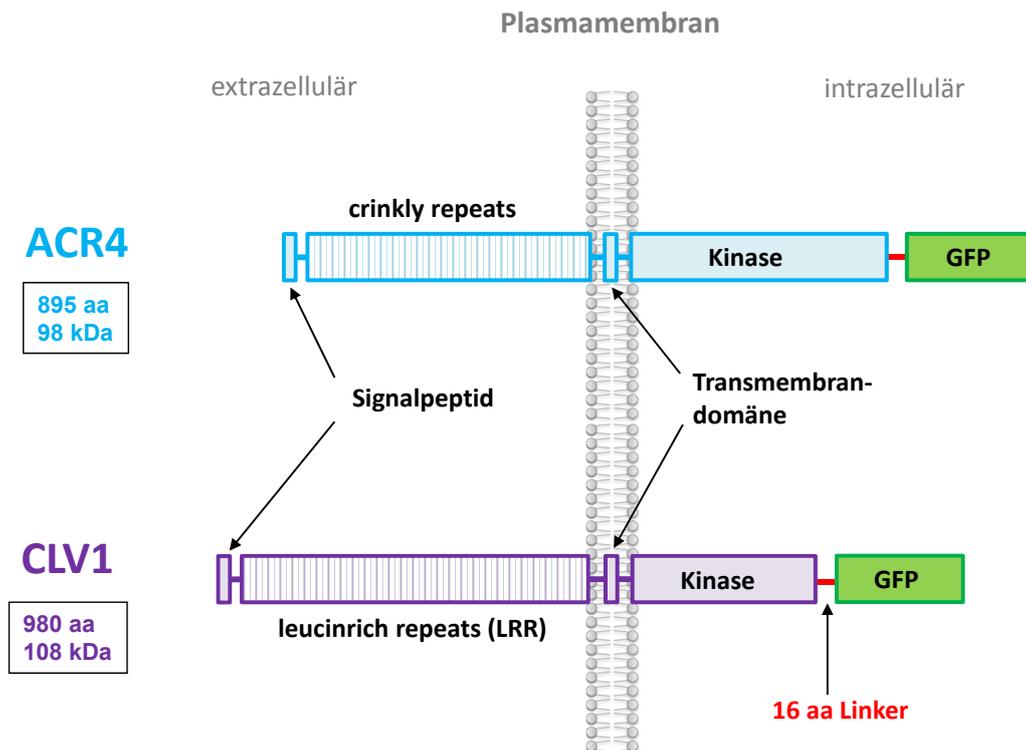
In Tabelle 3.1 sind die verwendeten synthetisch hergestellten Peptide aufgelistet.

**Tabelle 3.1.** Aminosäuresequenzen der verwendeten Peptide. Das unterstrichene P steht für Hydroxyprolin.

Peptid	Aminosäuresequenz
CLE40p	RQVPT <u>G</u> SDPLHH
CLV3p	RTV <u>P</u> SGPDPLHH
TDIFp (CLE41/44)	HEV <u>P</u> SGPNPISN

### 3.7.3. ACR4 und CLV1

In Abbildung 3.11 sind die beiden membranständigen Rezeptorkinasen ACR4 (895 aa, 98 kDa) und CLV1 (980 aa, 108 kDa) schematisch dargestellt. Ihr modularer Aufbau umfasst extrazellulär eine Signalpeptidsequenz (ACR4: 29 aa; CLV1: 24 aa) und eine Domäne, die bei ACR4 aus "crinkly repeats"(405 aa) und bei CLV1 aus "leucinrich repeats"(614 aa) besteht. Die Plasmamembran wird jeweils von einer 21 aa-langen Transmembrandomäne durchspannt. Intrazellulär im Zytoplasma befindet sich die Kinasedomäne (ACR4: 440 aa; CLV1: 321 aa). Bei den verwendeten Konstrukten sind die 238 aa-langen fluoreszenten Proteine GFP und mCherry über einen Linker aus 16 Aminosäuren mit der Kinasedomäne verbunden.



**Abbildung 3.11. Schemata der membranständigen Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1.** Die dargestellten Größen der extrazellulären repeats, der Kinase und des GFP sind maßstabsgetreu entsprechend der Anzahl der Aminosäuren. Die Sequenzen der beiden Proteine sind bei UniProtKB [[www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)] unter den Einträgen Q9LX29 (ACR4) und Q9SYQ (CLV1) zu finden. Die Plasmidkarten befinden sich im Anhang A.0.7.

## 4 Experimentelle Ergebnisse und Diskussion

Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (MFIS) vereinigt verschiedene Fluoreszenz-Mikroskopiemethoden wie die Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM) und die Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie (FAIM). Das simultane Auslesen mehrerer Fluoreszenz-Parameter und die damit verbundene Verknüpfung von Informationen über u.a. Energietransfer macht MFIS zu einer höchst aussagekräftigen und komplexen Methode zur Bestimmung von Proteininteraktionen.

Es ist sinnvoll, jede Methode (FRET-FLIM, Fluoreszenz-Anisotropie) erst einzeln hinsichtlich ihrer Anforderungen und Fehlergrenzen im jeweiligen System zu untersuchen. Auf diese Weise werden optimale Versuchsbedingungen für MFIS in *Nicotiana benthamiana* bestimmt und Grenzen für die Interpretation der MFIS-Daten gesteckt.

Zunächst werden die Fluoreszenz-Lebensdauern der verwendeten Fluorophore GFP und mCherry in *N. benthamiana* bestimmt und mögliche Artefakte des Expressionssystems charakterisiert.

Die zentrale Frage nach der physikalischen Interaktion von ACR4 und CLV1 auf molekularer Ebene in der Plasmamembran und an Plasmodesmata in *N. benthamiana* wird im dritten Abschnitt mittels Hetero-FRET in Fluoreszenz-Lebensdauer-Messungen (FRET-FLIM) beantwortet.

Die Fluoreszenz-Anisotropie wird in MFIS zur Bestimmung von Homo-FRET und damit als Nachweis für die Bildung von homomeren Komplexen verwendet. Die Verlässlichkeit und Aussagekraft insbesondere von Messungen der stationären Anisotropie im untersuchten System in *N. benthamiana* werden im vierten Abschnitt eingehend beleuchtet und mit den Ergebnissen erweiterter Anisotropie-Messungen untermauert.

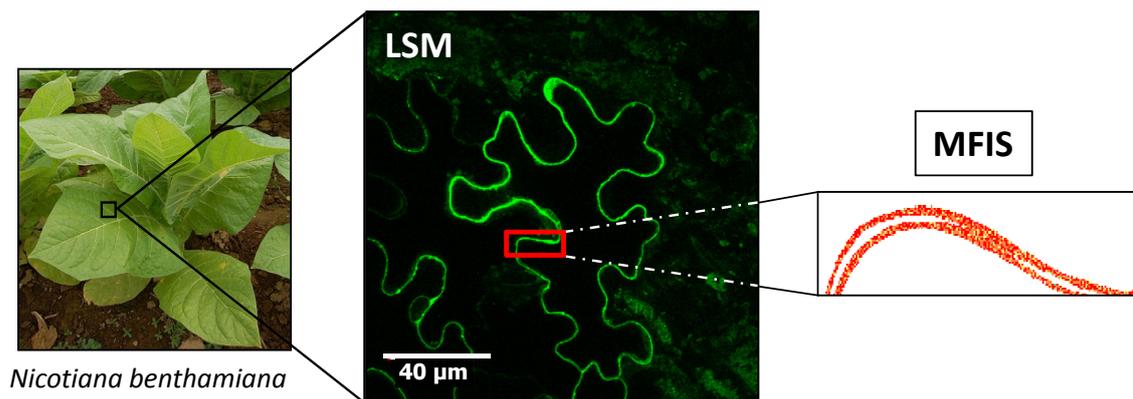
Die Kombination der beiden Fluoreszenz-Parameter Lebensdauer und Anisotropie in MFIS-Bildern ergibt im fünften Abschnitt ein detailliertes Bild der Komplexbildung von ACR4 und CLV1 mit hoher räumlicher Auflösung. Die Identifizierung von Pixel-Subpopulationen ermöglicht die differenzierte Beschreibung von lokalen Heterogenitäten und funktionalen Strukturen wie Plasmodesmata.

Abschließend geben Mobilitätsmessungen an der Plasmamembran mit Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) Aufschluss über die funktionelle Clusterbildung von ACR4 und CLV1 im Zyklus von Exo- und Endozytose und ligandeninduzierter Signalantwort.

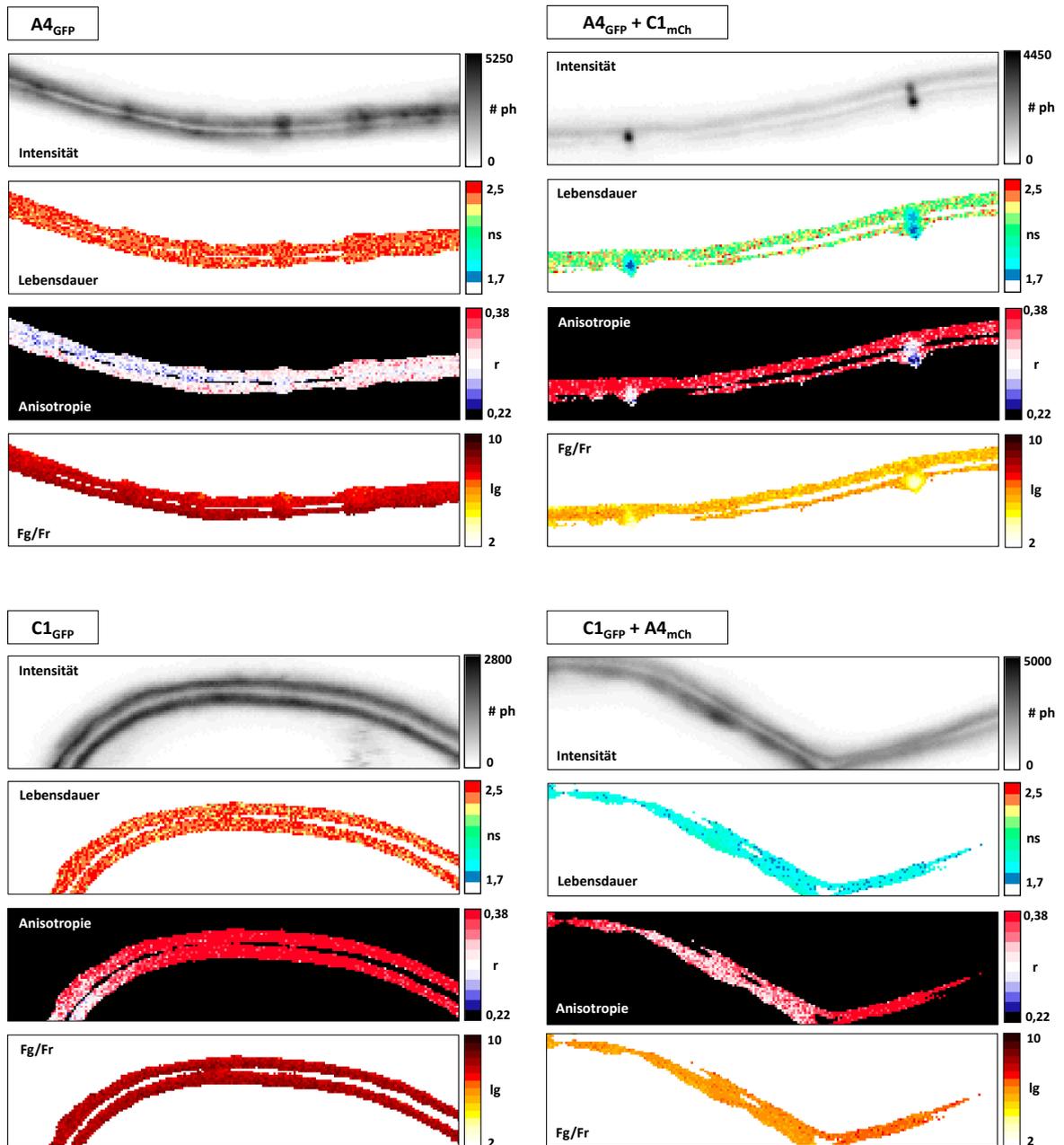
## 4.1. MFIS-Bilder von Rezeptorkinasen in *Nicotiana benthamiana*

In dieser Arbeit wurde die Komplexbildung der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 mit MFIS untersucht. Hierzu wurden von Yvonne Stahl folgende Fusionsproteine mit GFP und mCherry hergestellt und transient in *N. benthamiana* exprimiert (Kapitel 3.7) und an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen mit MFIS untersucht: ACR4 und CLV1 jeweils mit beiden FP, ACR4 mit GFP und mCherry als FRET-positiv-Kontrolle, die rezeptorähnliche Kinase BAK1 als negativ-Kontrolle, sowie Varianten von ACR4 und CLV1, in denen jeweils die Transmembrandomäne (TM) gegen die TM von BAK1 ausgetauscht wurde, um die Bedeutung der TM bei der Komplexbildung von ACR4 und CLV1 zu untersuchen.

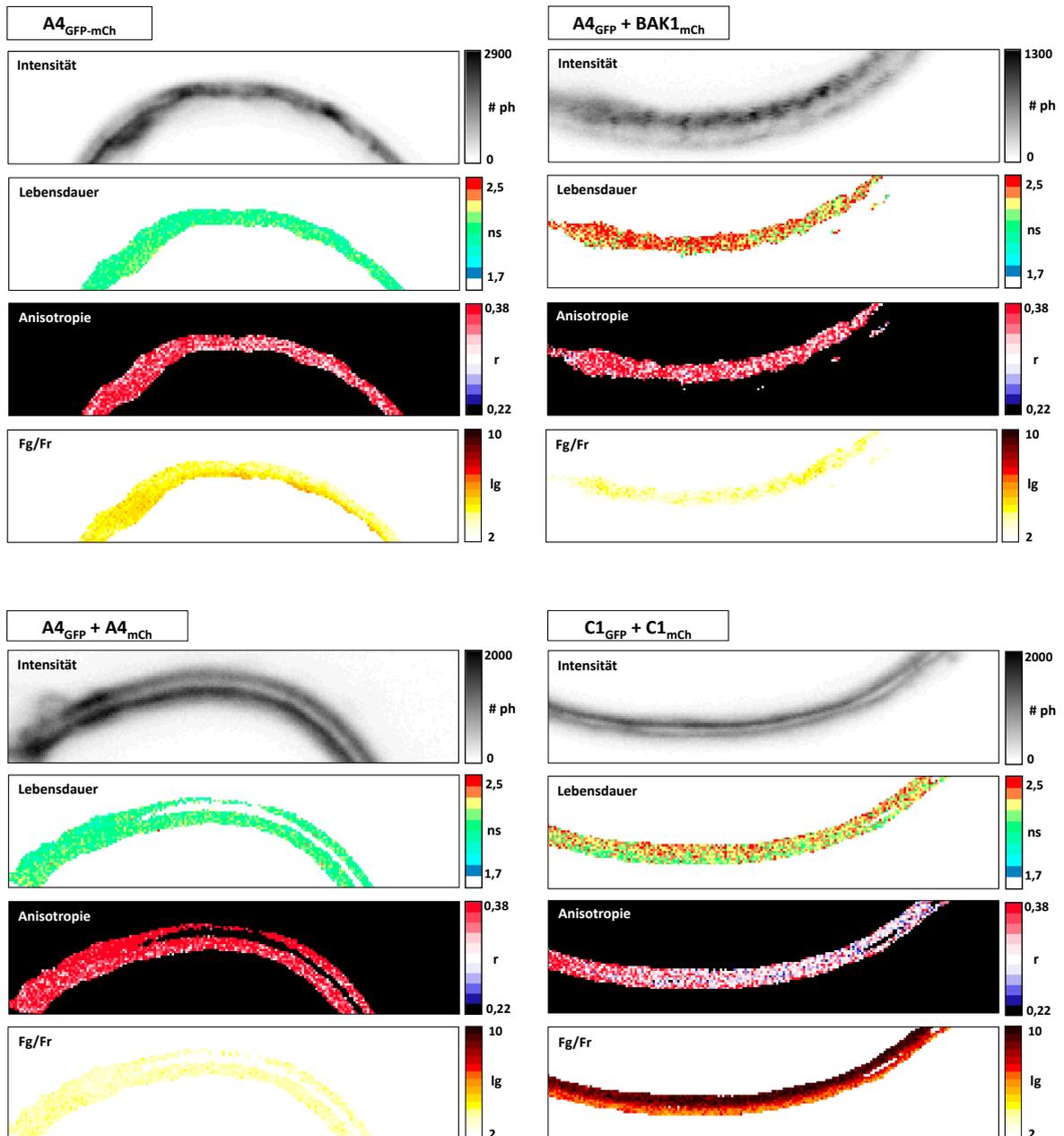
Ein MFIS-Bild liefert einen Satz aus vier Bildern: Fluoreszenz-Intensitätsbild, Fluoreszenz-Lebensdauerbild, Fluoreszenz-Anisotropiebild und das Grün-rot-Verhältnisbild. In den Abbildungen 4.2, 4.3 und 4.4 ist für jede Expressionskombination ein MFIS-Bild als Beispiel gezeigt. Die MFIS-Bilder bilden die Grundlage für alle weiteren Analysen der Komplexbildung in den folgenden Kapiteln. Hierbei dient die Fluoreszenz-Lebensdauer als Indikator für Hetero-FRET zwischen dem Donor GFP und dem Akzeptor mCherry und dient damit dem Nachweis von heteromerer Komplexbildung. Die Fluoreszenz-Anisotropie dient als Indikator für Homo-FRET zwischen GFP-Molekülen und damit für die homomere Komplexbildung der fusionierten Proteine.



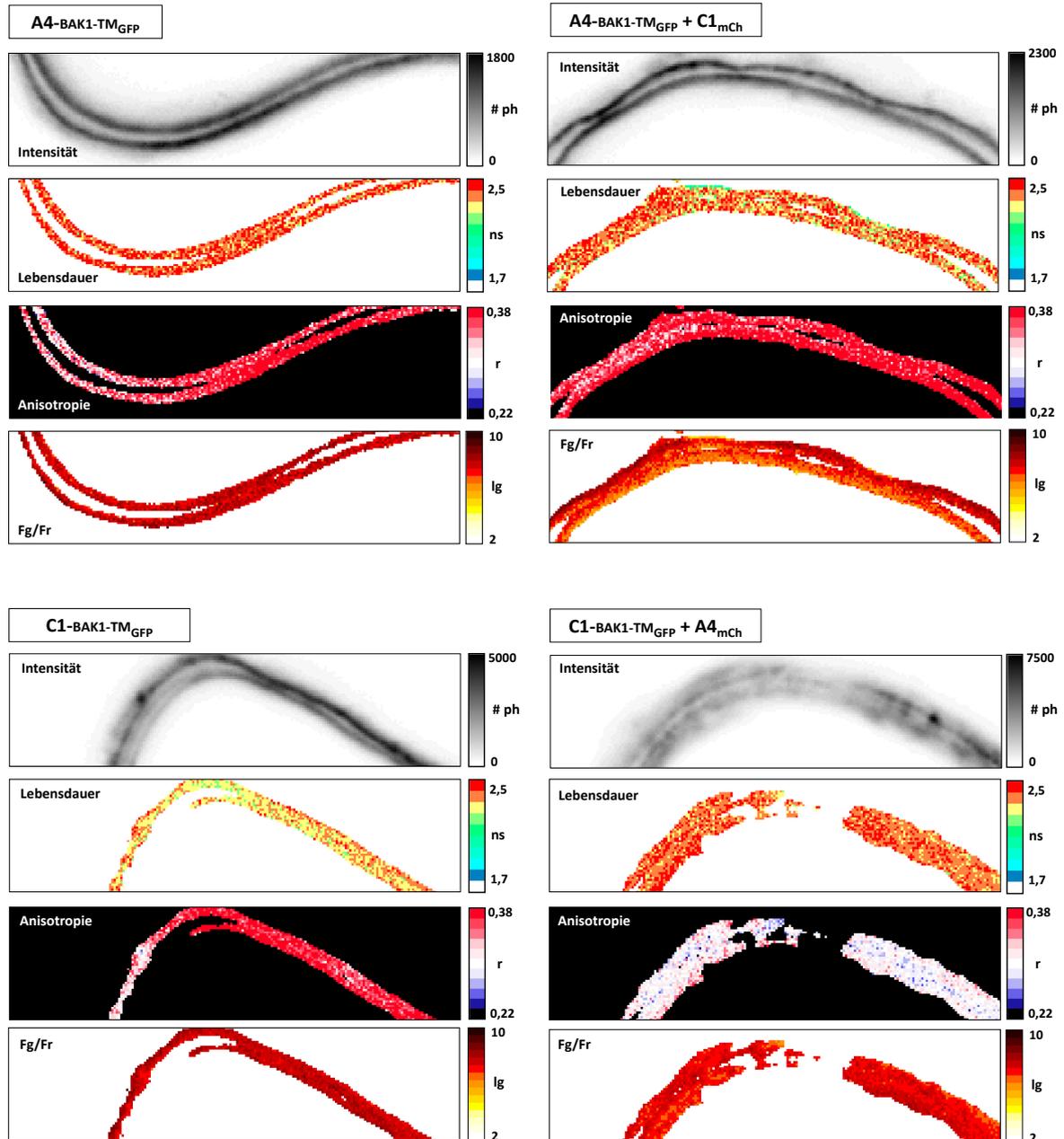
**Abbildung 4.1. Schema der MFIS-Messungen in *Nicotiana benthamiana*.** FP-Fusionen wurden induzierbar in *N. benthamiana* exprimiert und an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen mit MFIS untersucht.



**Abbildung 4.2.** MFIS von ACR4-GFP, ACR4-GFP + CLV1-mCh, CLV1-GFP, CLV1-GFP + ACR4-mCh exprimiert in Blattepidermiszellen in *Nicotiana benthamiana*. Das oberste Bild zeigt jeweils die Fluoreszenz-Intensität in Anzahl von Photonen, das zweite die Fluoreszenz-Lebensdauer in ns, das dritte die Fluoreszenz-Anisotropie und das vierte das Verhältnis aus grüner und roter Fluoreszenz-Intensität  $F_g/F_r$ . Die Abmessungen der Bildausschnitte betragen  $4,8 \times 19,2 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.3.** MFIS von ACR4-GFP + ACR4-mCh, CLV1-GFP + CLV1-mCh und den Kontrollen ACR4-GFP-mCh und ACR4-GFP + BAK1-mCh exprimiert in Blattepidermiszellen in *Nicotiana benthamiana*. Das oberste Bild zeigt jeweils die Fluoreszenz-Intensität in Anzahl von Photonen, das zweite die Fluoreszenz-Lebensdauer in ns, das dritte die Fluoreszenz-Anisotropie und das vierte das Verhältnis aus grüner und roter Fluoreszenz-Intensität  $F_g/F_r$ . Die Abmessungen der Bildausschnitte betragen  $4,8 \times 19,2 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.4.** MFIS von ACR4 und CLV1 mit ausgetauschter Transmembrandomäne: ACR4(BAK1-TM)-GFP, ACR4(BAK1-TM)-GFP + CLV1-mCh, CLV1(BAK1-TM)-GFP, CLV1(BAK1-TM)-GFP + ACR4-mCh exprimiert in Blattepidermiszellen in *Nicotiana benthamiana*. Das oberste Bild zeigt jeweils die Fluoreszenz-Intensität in Anzahl von Photonen, das zweite die Fluoreszenz-Lebensdauer in ns, das dritte die Fluoreszenz-Anisotropie und das vierte das Verhältnis aus grüner und roter Fluoreszenz-Intensität  $F_g/F_r$ . Die Abmessungen der Bildausschnitte betragen  $4,8 \times 19,2 \mu\text{m}$ .

### 4.1.1. FRET-Indikatoren

Der Nachweis von Hetero-FRET zwischen GFP und mCherry kann einmal mittels der Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP erfolgen, die im Falle von Energietransfer reduziert ist. Die durch FRET indirekt angeregte Akzeptorfluoreszenz erhöht gleichzeitig die rote Emission  $F_r$ , sodass sich das Grün-rot-Verhältnis  $F_g/F_r$  ebenfalls als FRET-Indikator eignet und im Falle von FRET einen niedrigeren Wert annimmt.

Die Kombination der beiden Parameter Grün-rot-Verhältnis und Fluoreszenz-Lebensdauer hilft Artefakte auszuschließen und ermöglicht darüber hinaus die Identifizierung von Subpopulationen. So bilden z. B. die beiden unterschiedlich exprimierenden Zellen bei CLV1-GFP+CLV1-mCh (Abb. 4.3) im 2d-Histogramm (Abb. 4.5 D) zwei getrennte Populationen, die nur anhand der Lebensdauer nicht zu identifizieren wären.

In Abbildung 4.5 ist zu jedem MFIS-Bild aus Abb. 4.2, 4.3 und 4.4 das zugehörige 2d-Häufigkeitshistogramm  $F_g/F_r$  gegen Fluoreszenz-Lebensdauer dargestellt. Das Diagramm des alleine exprimierten Donors (rot) ist jeweils mit dem Diagramm der Koexpression (blau) überlagert. Im FRET-Fall zeigt sich eine Verschiebung zu niedrigeren Fluoreszenz-Lebensdauern und zu einem kleineren Grün-rot-Verhältnis (A-E). Findet kein Energietransfer statt, so überlagern die Populationen von Donor und Koexpression (G, H). Die Negativkontrolle ACR4-GFP koexprimiert mit BAK1-mCherry weist keine Änderung der Fluoreszenz-Lebensdauer auf, allerdings ein sehr niedriges Grün-rot-Verhältnis. Diese Beobachtung wurde auch bei Koexpression von BAK1 mit anderen Rezeptorkinasen gemacht, die nicht mit BAK1 interagieren [Bleckmann 2010]. Des Weiteren konnte bereits zuvor in Untersuchungen mit zwei unterschiedlichen Methoden keine Interaktion von ACR4 und BAK1 festgestellt werden (Split *Renilla* Luziferase Essay, [Stahl et al. 2013]) und unveröffentlichte Messungen mit Akzeptor-Photobleichen von Yvonne Stahl). Bei dem beobachteten niedrigen Grün-rot-Verhältnis handelt es sich offenbar um ein Artefakt, wahrscheinlich bedingt durch die instabile Expression und Lokalisation von BAK1 [Ntoukakis et al. 2011].

Darüber hinaus besitzt das Grün-rot-Verhältnis einen entscheidenden Nachteil gegenüber der Fluoreszenz-Lebensdauer als FRET-Indikator: Absolutwerte sind nicht unmittelbar vergleichbar, da sie von Anregungsleistung und dem spektralen Detektionsbereich abhängen. So wurden z.B. die MFIS-Messungen an CLV1-GFP in Abbildung 4.5 (B) und (D) bei unterschiedlicher Filterkonfiguration aufgenommen und liefern daher für das gleiche Konstrukt

zwei verschiedene Werte für das Grün-rot-Verhältnis  $F_g/F_r$ . Des Weiteren ist das Grün-rot-Verhältnis  $F_g/F_r$  fehleranfällig durch den verwendeten Akzeptor mCherry: unreifes, grün fluoreszierendes mCherry verfälscht das Grün-rot-Verhältnis ebenso wie das Vorliegen in zwei unterschiedlich hellen Spezies [Wachter et al. 2010], [Wu et al. 2009].

Daher wird im Folgenden nur noch die Fluoreszenz-Lebensdauer als FRET-Indikator verwendet.

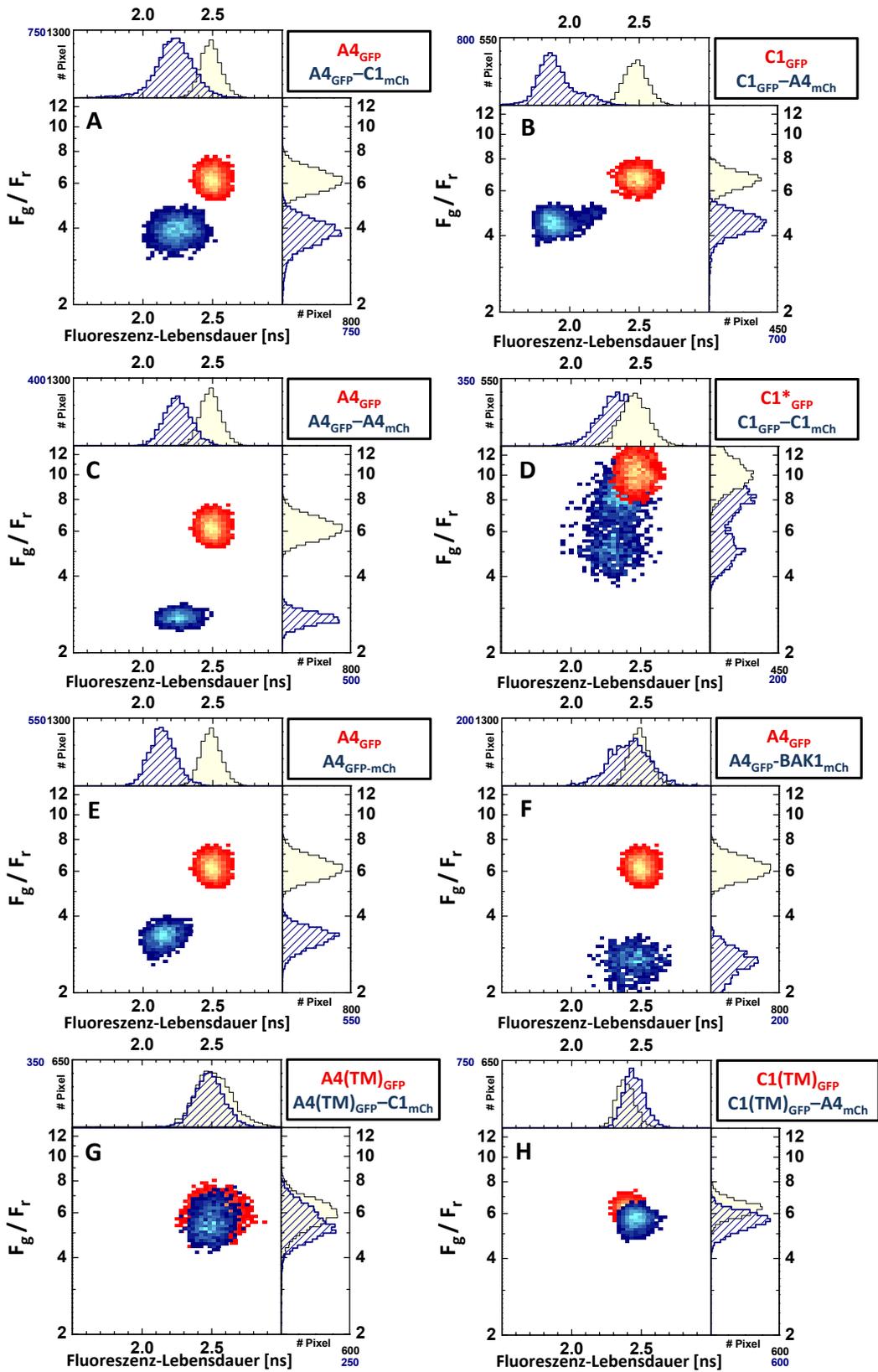
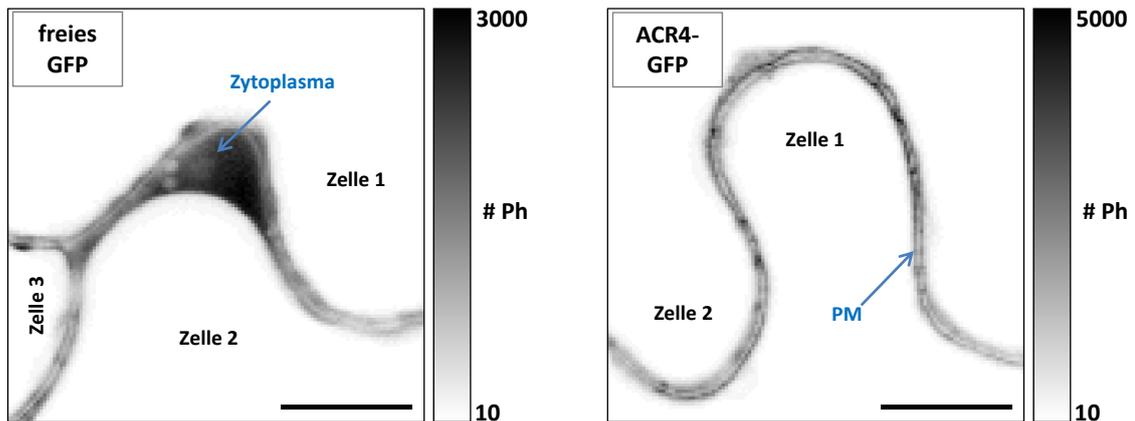


Abbildung 4.5. 2d-Histogramme  $g/r$  gegen Fluoreszenz-Lebensdauer zum Nachweis von FRET. Alle Histogramme (außer  $C1^*$ , MFIS-Bild nicht gezeigt) wurden aus den MFIS-Bildern in Abbildung 4.2, 4.3 und 4.4 generiert.

## 4.2. FLIM-Messungen an GFP und mCherry in *Nicotiana benthamiana*

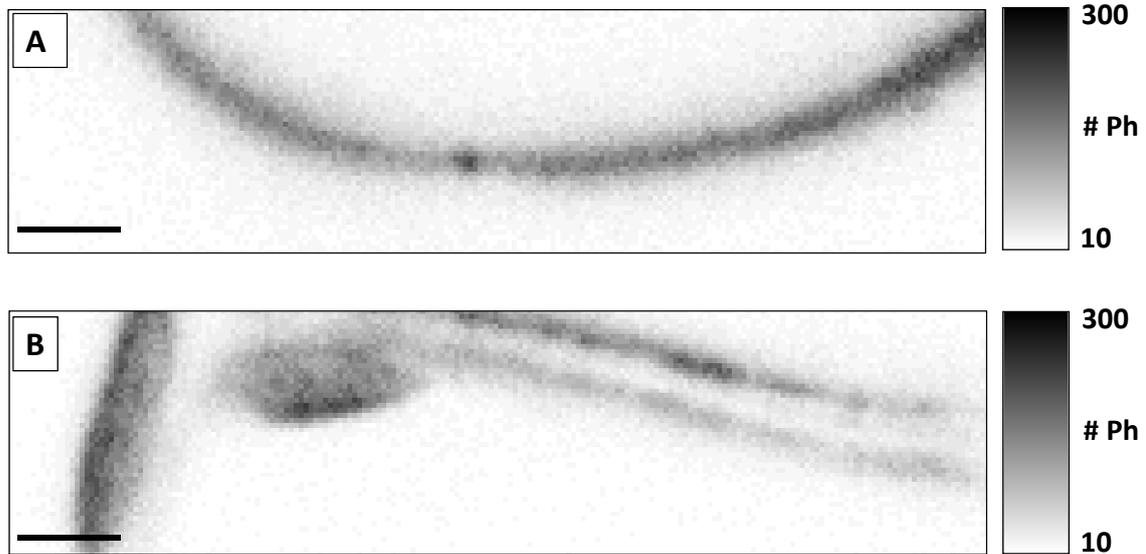
Zur Charakterisierung der verwendeten EGFP- und mCherry-Varianten in *Nicotiana benthamiana* wurden diese unter einem Estradiol-induzierbaren Promotor zur Expression gebracht (Kap. 3.7) und in Blattepidermiszellen mit MFIS untersucht (Abb. 4.6). Die im Folgenden als "freies GFP" bzw. "freies mCherry" bezeichneten Konstrukte lokalisieren innerhalb einer Blattepidermiszelle hauptsächlich im Zytoplasma und im Kern. Sie besitzen keinen Membrananker, sodass sie zwar im Zytoplasma auch in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran lokalisieren, aber nicht ausschließlich.



**Abbildung 4.6.** Fluoreszenz-Intensitätsbild von (A) freiem GFP und (B) ACR4-GFP, exprimiert in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*. Freies GFP lokalisiert im Zytoplasma, welches bis an die Plasmamembran (PM) reicht. Im Fluoreszenz-Intensitätsbild wird so die PM-Region benachbarter Zellen nachgezeichnet. ACR4-GFP lokalisiert an der Plasmamembran. Im Fluoreszenz-Intensitätsbild sind die beiden PM benachbarter Zellen zu sehen. Im extrazellulären Zwischenraum befindet sich die Zellwand. Der Skalierungsbalken entspricht 10 µm.

### 4.2.1. Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP und GFP-Fusionen

Die Lebensdauer von GFP in *N. benthamiana* wurde anhand von Zellen bestimmt, die freies GFP (n=5) und ACR4-GFP (n=6) exprimierten (Abb. 4.6). Zur Bestimmung des Hintergrunds dienen sowohl unbehandelte Zellen von *N. benthamiana* (n=4) als auch Zellen, die freies mCherry (n=3) exprimierten (Abb. 4.7). Zur Auswertung der MFIS-Bilder wurde die Multi-ROI-Analyse verwendet (Kap. 4.3.1.2), bei der aus allen Photonen eines Multi-ROI ein Photonenankunftszeit-Histogramm erstellt und mit einer bi-exponentiellen



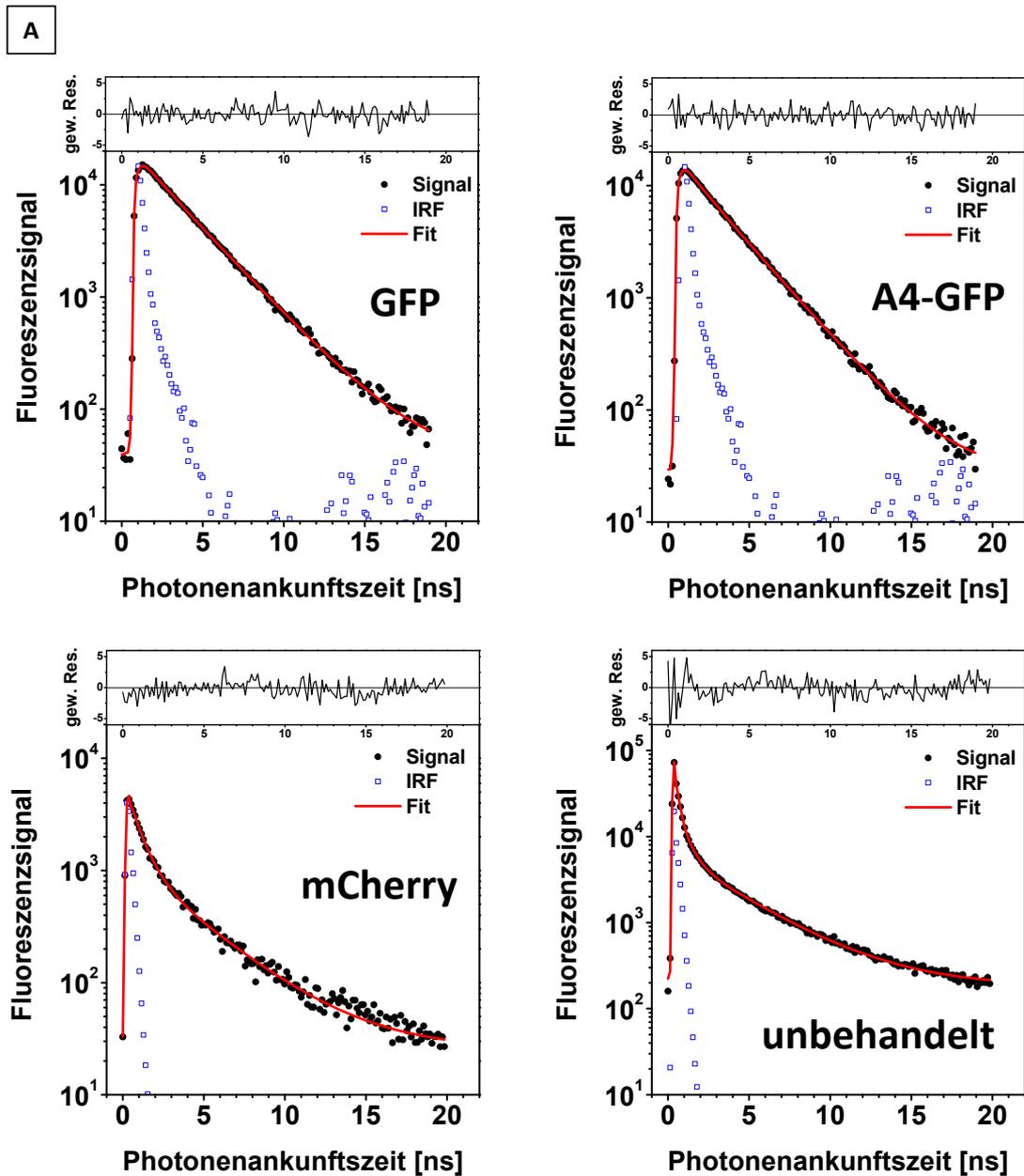
**Abbildung 4.7.** Fluoreszenz-Intensitätsbild (A) von freiem mCherry exprimiert in *N. benthamiana* und (B) einer unbehandelten Blattepidermiszelle von *N. benthamiana*. Der Skalierungsbalken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

Modellfunktion (Glg. 3.2) angepasst wird. Die MFIS-Bilder aller Proben wurden unter identischen Bedingungen aufgenommen, d.h. insbesondere bei gleicher Anregungswellenlänge von 485 nm und mit gleichem spektralen Detektionsbereich (Kap. 3.1.3). Diese Bedingungen sind an die Absorption und Emission von GFP angepasst, sodass hier kein Fluoreszenzbeitrag von mCherry zu erwarten ist. Trotzdem zeigen die unbehandelten Zellen und Zellen mit mCherry hier ebenfalls Fluoreszenz, die allerdings bedeutend schwächer ist als das Signal von GFP. Die Autofluoreszenz von *N. benthamiana* beträgt im Mittel 12 Photonen pro Pixel und in Zellen mit freiem GFP durchschnittlich 1200 Photonen pro Pixel. Die Zellen mit freiem mCherry zeigen mit 86 Photonen pro Pixel mehr Fluoreszenz als die reine Autofluoreszenz von *N. benthamiana*.

Das Fluoreszenz-Abklingverhalten von GFP unterscheidet sich von dem der Autofluoreszenz und mCherry (Abb. 4.8) und liefert entsprechend unterschiedliche fluoreszenzgewichtet gemittelte Fluoreszenz-Lebensdauern  $\tau_{av}$  (Tab. 4.1). Während GFP im Mittel ( $n=5$ ) mit einer Lebensdauer von 2,66 ns fluoresziert, besitzt der Hintergrund durch mCherry eine deutlich kürzere Lebensdauer von 2,24 ns ( $n=3$ ). Die Lebensdauer der Autofluoreszenz von *N. benthamiana* liegt im Mittel bei 2,17 ns ( $n=4$ ), zeigt aber zwischen einzelnen Proben mit Werten zwischen 1,67 und 2,75 ns eine große Varianz.

Alle Zerfälle weisen eine Komponente mit kurzer Lebensdauer  $\tau_1$  auf (GFP: 0,77 ns, mCherry: 0,69 ns, *N. benthamiana*: 0,54 ns). Diese Komponente dominiert die Autofluoreszenz von unbehandeltem *N. benthamiana* (Spezies-Amplitude 74 %) als auch die Fluoreszenz von mCherry (72 %), stellt dagegen bei GFP aber nur 21% der fluoreszenten Spezies. Die zweite Komponente mit einer Lebensdauer  $\tau_2$  von 2.81 ns bestimmt mit 78 % das Abklingen von GFP. Die zweite Lebensdauerkomponente von *N. benthamiana* und mCherry betrug 3,31 ns bzw. 3,30 ns (Spezies-Amplituden: 20 % bzw. 23 %).

An ACR4 fusioniertes GFP zeigt mit 2,50 ns (n=6) eine kürzere Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau_{av}$  als freies GFP mit 2,66 ns. Dies rührt von einer Verkürzung der Lebensdauer  $\tau_2$  der zweiten Komponente von 2,81 ns (freies GFP) auf 2,68 ns her. Die kurze Komponente besitzt eine Lebensdauer  $\tau_1$  von 0,81 ns und stellt 25 % der Spezies.



**B**

	#Ph/Pixel	$\tau_1$	$\tau_2$	$x_2$	$\gamma$	Offset	$\chi^2$	$\tau_{AV}$
freies GFP	1094	0,704	2,829	0,80	0 fix	0,01	1,01	2,700
ACR-GFP	2918	0,656	2,642	0,74	0 fix	0,01	1,03	2,482
mCherry	60	0,774	3,651	0,25	0,11	0,07	1,20	2,563
unbehandelt	11	0,612	3,707	0,27	0,35	0,07	1,79	2,746

**Abbildung 4.8. Fluoreszenz-Abklingkurven von GFP in *N. benthamiana*.** (A) Fluoreszenz-Abklingkurven von freiem GFP, freiem mCherry und ACR4-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*, und von einer unbehandelten *N. benthamiana* Blattepidermiszelle. Die Graphen zeigen jeweils die Fluoreszenz-Abklingkurve (schwarz) mit Anpassung (rot) und Gerätefunktion (blau) eines MFIS-Bildes. Der obere Graph zeigt jeweils die gewichteten Residuen der Anpassung. (B) Ergebnisse der Kurvenanpassungen. Die verwendete bi-exponentielle Modellfunktion (Glg. 3.2) berücksichtigt zwei Fluoreszenz-Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , einen Streulichtanteil  $\gamma$  und einen Offset. Der Anteil der Komponente mit Lebensdauer  $\tau_2$  wird durch die Fluoreszenz-Amplitude  $f_2$  bzw. Spezies-Amplitude  $x_2$  beschrieben.

**Tabelle 4.1.** Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer von in *N. benthamiana* exprimiertem freien GFP, ACR4-GFP und mCherry und unbehandelten *N. benthamiana* Blattepidermiszellen mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion (Glg. 3.2), die zwei Fluoreszenz-Lebensdauern  $\tau_1$  und  $\tau_2$ , einen Streulichtanteil  $\gamma$  und einen Offset berücksichtigt. Der Anteil der Komponente mit Lebensdauer  $\tau_2$  wird durch die Fluoreszenz-Amplitude  $f_2$  bzw. Spezies-Amplitude  $x_2$  beschrieben.

	Ph/pixel	$\tau_1$ [ns]	$\tau_2$ [ns]	$f_2$	$x_2$	$\gamma$	Offset	$\chi^2$	$\tau_{av}$ [ns]
<b>GFP</b>	714	0,734	2,761	0,91	0,76	0 fix	0,01	1,51	2,597
	1094	0,704	2,829	0,93	0,80	0 fix	0,01	1,01	2,700
	685	0,765	2,855	0,92	0,78	0 fix	0,02	1,29	2,727
	2359	0,906	2,853	0,91	0,78	0 fix	0,01	1,23	2,696
	1242	0,760	2,742	0,91	0,77	0 fix	0,01	2,52	2,582
Mittelwert	1219	0,774	2,808	0,92	0,78	0	0,01		2,660
<b>A4-GFP</b>	2918	0,656	2,642	0,91	0,74	0 fix	0,01	1,03	2,482
	3765	0,926	2,711	0,88	0,74	0 fix	0,01	1,06	2,513
	2838	0,811	2,692	0,90	0,75	0 fix	0,01	1,69	2,521
	2359	0,794	2,678	0,90	0,76	0 fix	0,01	1,44	2,507
	2938	0,776	2,644	0,90	0,76	0 fix	0,01	1,22	2,474
	2477	0,894	2,682	0,89	0,75	0 fix	0,01	1,42	2,501
Mittelwert	2883	0,810	2,675	0,90	0,75	0	0,01		2,500
<b>mCherry</b>	58	0,714	3,294	0,52	0,25	0,09	0,04	1,17	2,256
	141	0,581	2,954	0,44	0,19	0,16	0,04	1,61	1,886
	60	0,774	3,651	0,51	0,25	0,11	0,07	1,20	2,563
Mittelwert	86	0,690	3,300	0,49	0,23	0,12	0,05		2,235
<b>N. b.</b>	22	0,507	3,105	0,06	0,12	0,83	0,04	5,74	1,666
	8	0,440	2,883	0,06	0,12	0,83	0,05	3,53	1,652
	9	0,601	3,528	0,47	0,28	0,23	0,08	2,12	2,595
	11	0,612	3,707	0,40	0,27	0,35	0,07	1,79	2,746
	Mittelwert	12	0,540	3,306	0,25	0,20	0,56	0,06	

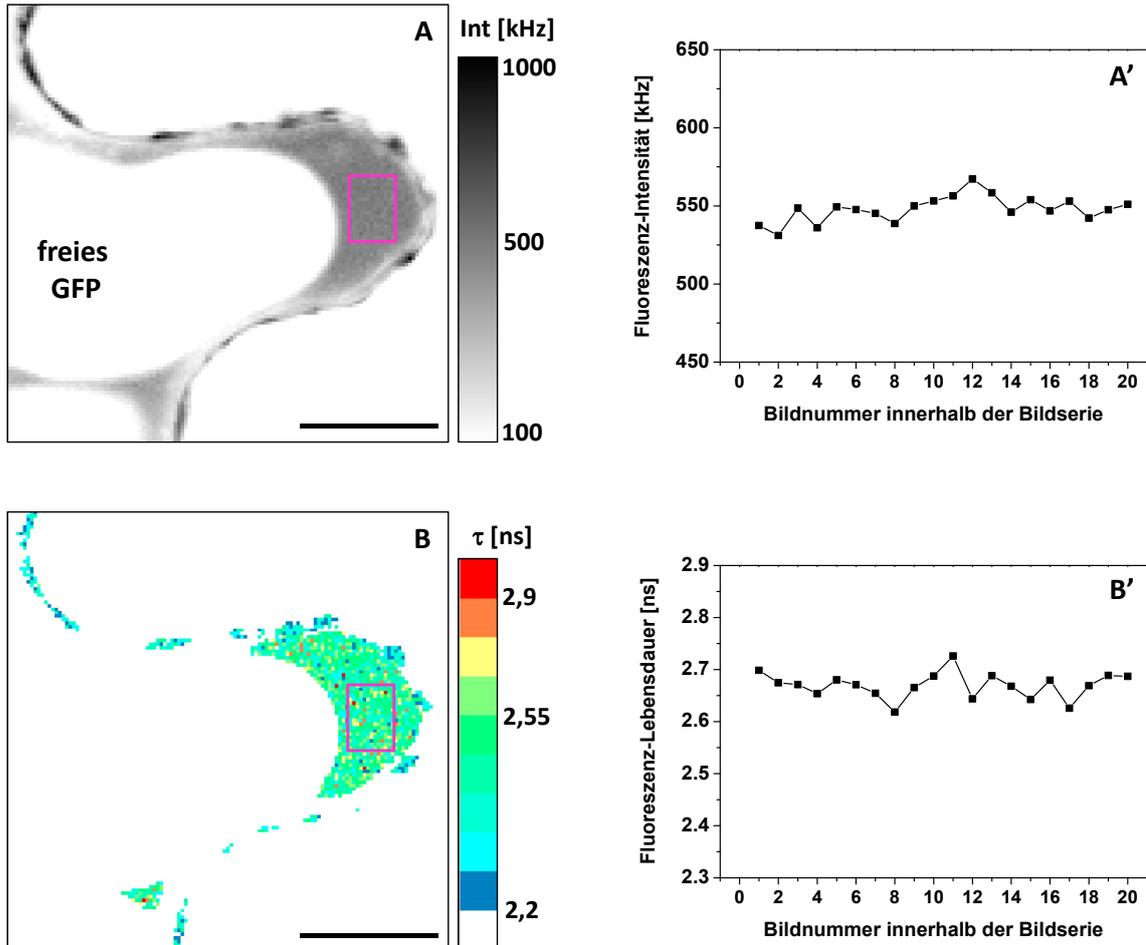
### 4.2.2. Bestimmung optimaler Messbedingungen

Die optimalen Messbedingungen für FLIM-Messungen an GFP-Konstrukten in *N. benthamiana* wurden zuerst in Vorexperimenten bestimmt. Zunächst gilt es, das Pflanzenmaterial auf erfolgreiche Expression der FP-Konstrukte hin zu überprüfen. Dies geschieht zuerst anhand der Fluoreszenz-Intensität der FP. Des Weiteren müssen auch die Lokalisation innerhalb der Zelle und eventuelle Aggregatbildung überprüft werden. Generell kann also eine gewisse Konzentration der FP-Konstrukte nicht unterschritten werden, da sonst diese Überprüfungen anhand von LSM-Aufnahmen nicht möglich sind. Andererseits darf die Konzentration nicht zu hoch werden, da sonst Artefakte durch Überexpression auftreten. Hier sind neben einer generell gestörten Physiologie der Zellen vor allem Oligomerisierung und Aggregatbildung der exprimierten Konstrukte zu nennen.

Auf der Fluoreszenz-spektroskopischen Seite sind folgende Kriterien zu berücksichtigen:

- 1) Die Anregungsleistung und Pixelzeit müssen so niedrig sein, dass Photobleichen minimiert wird.
- 2) Die Anregungsleistung und Pixelzeit müssen so niedrig sein, dass photophysikalische Effekte, die die Fluoreszenz-Lebensdauer beeinflussen, minimiert werden.
- 3) Die Anregungsleistung und Pixelzeit müssen andererseits hoch genug sein, um ausreichend viele Photonen pro Pixel zu erzielen. Eine hohe Anzahl von Photonen pro Pixel ist essenziell für eine gute Anpassung der Fluoreszenz-Abklingkurven und damit für die Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer.
- 4) Die Bildserien müssen möglichst viele Bilder enthalten, um die Anzahl der Photonen pro Pixel zu maximieren.
- 5) Die Bildserien müssen andererseits schnell genug sein, damit die Bewegungen der Zelle während der Aufnahme die Position der Plasmamembranregion nicht zu sehr verschieben.

Optimale Messbedingungen werden mit einer Pixelzeit von  $100 \mu\text{s}$  bei einer Anregungsleistung von  $1,2 \mu\text{W}$  erzielt. Eine Bildserie aus 20 Einzelaufnahmen liefert ausreichend viele Photonen pro Pixel bei hinreichend konstanter Position der PM-Region. In Abbildung 4.9 wird dies anhand einer Aufnahme von freiem GFP demonstriert. (A) zeigt das Fluoreszenz-Intensitätsbild und (B) das zugehörige Fluoreszenz-Lebensdauerbild. Die Graphen (A') und (B') zeigen den Verlauf der Intensität und Lebensdauer über die Bildserie. In jedem Einzelbild wurden hierzu über alle Pixel des ROI (magenta-farbenes Rechteck in A, B) die Intensität und die Lebensdauer gemittelt und gegen die Einzelbildnummer aufgetragen (A', B'). In (A') lässt sich erkennen, dass die Fluoreszenz-Intensität von 550 kHz über die Dauer der Bildserie konstant bleibt und kein Photobleichen aufweist.



**Abbildung 4.9. Optimale Messbedingungen für FLIM an GFP in *N. benthamiana*.** (A) Intensitätsbild von freiem GFP exprimiert in *N. benthamiana*. Einstellungen: 6-fach Zoom, 128x128 Pixel, 1 Pixel entspricht 267 nm, Pixelzeit 100  $\mu$ s, Anregungsleistung 1,2  $\mu$ W, Bildserie aus 20 Einzelaufnahmen. Der Skalierungsbalken entspricht 10  $\mu$ m. (B) Fluoreszenz-Lebensdauerbild von (A). Die Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer erfolgte pixelweise mit einem mono-exponentiellen Fitmodell (Glg. 3.1). Pixel mit weniger als 300 Photonen wurden von der Analyse ausgenommen (weiß). (A') Der Graph zeigt die über alle Pixel des ROI (magenta-farbenes Rechteck in (A, B)) gemittelte Fluoreszenz-Intensität in jedem Einzelbild der Bildserie. (B') Der Graph zeigt die über alle Pixel des ROI (magenta-farbenes Rechteck in (A, B)) gemittelte Fluoreszenz-Lebensdauer in jedem Einzelbild der Bildserie.

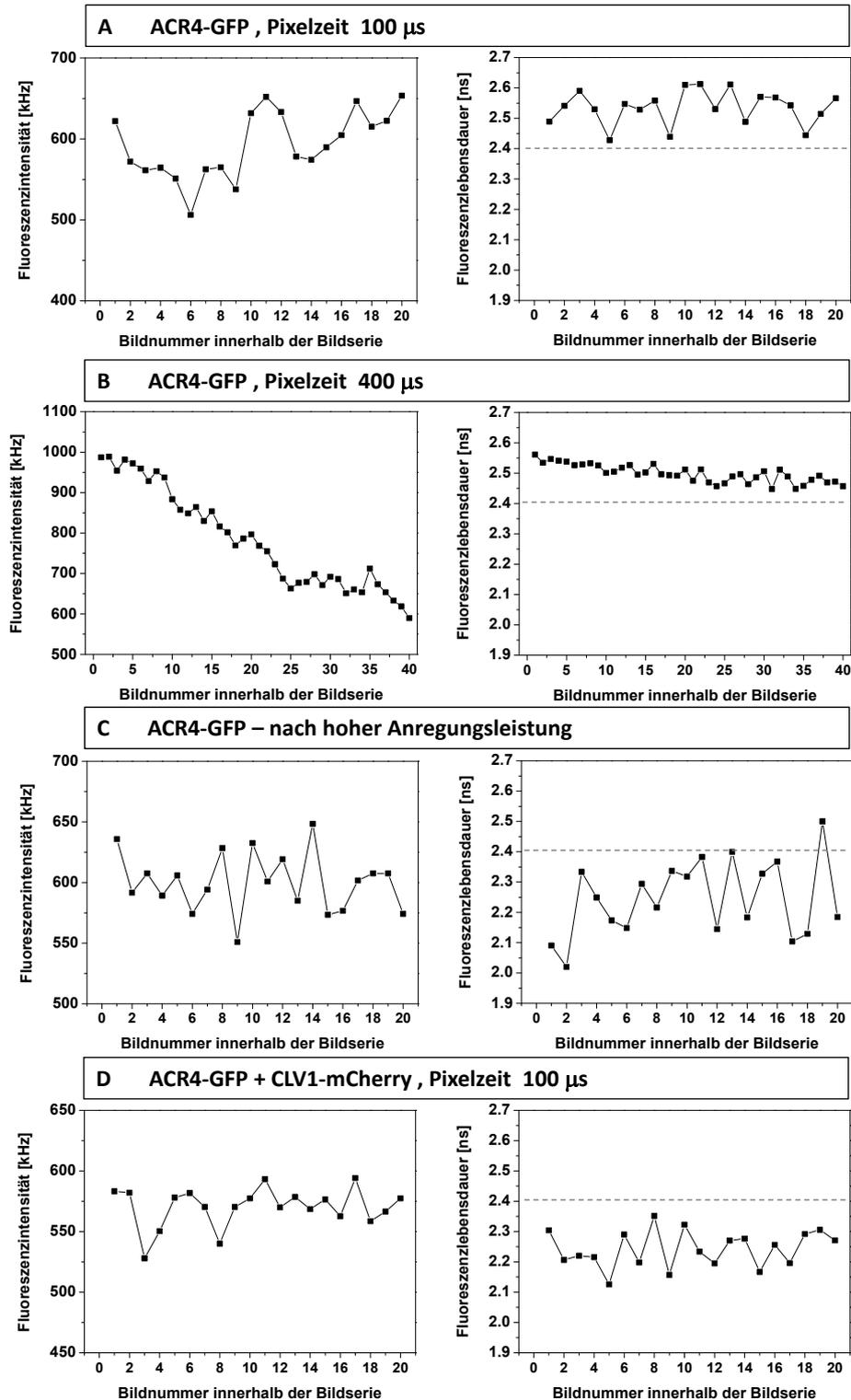
Die Fluoreszenz-Lebensdauer zeigt ebenfalls keine systematische Änderung im Verlauf der Bildserie (B'), sondern besitzt einen konstanten Wert von  $2,670 \pm 0,025$  ns.

In Abbildung 4.10 sind die Fluoreszenz-Intensität und -Lebensdauer von ACR4-GFP über den Verlauf der Bildserie aufgetragen, die analog zu freiem GFP erhalten wurden. (A) und (D) zeigen, dass unter optimalen Messbedingungen (Anregungsleistung  $1,2 \mu\text{W}$ , Pixelzeit  $100 \mu\text{s}$ ) auch ACR4-GFP kein Photobleichen und eine konstante Fluoreszenz-Lebensdauer aufweist.

Dagegen ist in (B) zu erkennen, dass bereits eine Erhöhung der Pixelzeit auf  $400 \mu\text{s}$  bei unveränderter Anregungsleistung zu deutlichem Photobleichen führt. Damit einhergehend zeigt sich eine systematische Abnahme der Fluoreszenz-Lebensdauer, die in einer Bildserie aus 20 Einzelbildern 50-100 ps betragen kann.

In (C) ist demonstriert, wie sich hohe Anregungsleistungen auf die Fluoreszenz-Lebensdauer von ACR4-GFP auswirken. Zunächst wurde eine Bildserie bei einer Anregungsleistung von  $12 \mu\text{W}$  durchgeführt. Diese wurde nicht aufgenommen, da unter diesen Bedingungen die Zählraten zu hoch für die Detektoren und die Elektronik sind. Direkt im Anschluss wurde aber eine Bildserie mit optimalen Einstellungen aufgenommen. Die Fluoreszenz-Lebensdauer ist nun deutlich niedriger als in (A) und zeigt zusätzlich eine Relaxation zu höherer Lebensdauer. Bei hoher Anregungsleistung verschiebt sich offenbar das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Zuständen des Chromophors (vgl. Kap. 3.6.2.2). Die Relaxation der Lebensdauer kann einmal durch die Rückkehr der Chromophore in den Gleichgewichtszustand oder durch den Austausch von ACR4-GFP-Molekülen durch Diffusion bedingt sein.

Derartige photophysikalische Effekte gilt es unbedingt zu vermeiden, da sie niedrige Fluoreszenz-Lebensdauern verursachen, die mit der Lebensdauer-Abnahme durch FRET (D) verwechselt werden können.



**Abbildung 4.10. Bestimmung optimaler Messbedingungen für ACR4-GFP.** Fluoreszenz-Intensität und -Lebensdauer von ACR4-GFP über den Verlauf einer Bildserie (A) unter optimalen Messbedingungen, (B) bei langer Pixelzeit, (C) nach Bestrahlung mit hoher Anregungsleistung und (D) unter optimalen Messbedingungen koexprimiert mit CLV1-mCherry.

### 4.2.3. Auswahl des Fitmodells für FRET-FLIM-Messungen

Die Löschung der Donorfluoreszenz durch Energietransfer auf einen Akzeptor geht mit einer Verkürzung der Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors einher, welche daher als Indikator für FRET verwendet wird. Die Bestimmung der Lebensdauer setzt ein Modell für die vorliegenden Fluoreszenz-Abklingkurven voraus. Das einfachste Modell beschreibt das Abklingen der Fluoreszenz mit einer mono-exponentiellen Funktion. Für den Fall, dass der Donor nicht als eine homogene Population vorliegt, stellt die so erhaltene Fluoreszenz-Lebensdauer ein fluoreszenzgewichtetes Mittel über alle vorliegenden Spezies und Donor-Akzeptor-Abstände dar.

Multi-exponentielle Modelle können mehrere Spezies berücksichtigen, so z.B. eine nicht interagierende Donor-Population, die für das hier verwendete FRET-Paar GFP und mCherry immer mit berücksichtigt werden muss [Padilla-Parra et al. 2009]. Ein bi-exponentielles Modell beschreibt für diesen Fall eine FRET- und eine nicht interagierende Population von Donor-Molekülen jeweils mit einer mittleren Lebensdauer.

Für GFP als Donor stellt dies eine Vereinfachung dar, zeigt allein das bi-exponentielle Abklingen von GFP, dass bereits der Donor in zwei Spezies vorliegt. Der Fluoreszenzabfall in Gegenwart des FRET-Akzeptors ist also mindestens auch mit zwei Spezies zu beschreiben, sodass für eine korrekte Beschreibung unter Berücksichtigung aller Spezies eine Modellfunktion mit vier Lebensdauern notwendig wäre.

Die Anzahl freier Fitparameter muss andererseits an die Qualität der Fluoreszenz-Abklingkurven angepasst sein. Ausschlaggebend ist hier vor allem die Anzahl der Photonen, aus der das Photonenankunftszeit-Histogramm erstellt wird.

Im Folgenden wird die identische Fluoreszenz-Abklingkurve einer FRET-Probe (ACR4-GFP + CLV1-mCherry) mit verschiedenen Modellfunktionen angepasst. Die Qualität der Anpassung wird anhand der gewichteten Residuen und des reduzierten  $\chi^2$  verglichen.

Die detaillierten Ergebnisse der Kurvenanpassungen sind in Abbildung 4.11 und 4.12 jeweils in den Tabellen (B) zu finden.

In Abbildung 4.11 und 4.12 (A) ist die Fluoreszenz-Abklingkurve mit Anpassungen in zwei Zeitauflösungen (128 ps bei 256 Kanälen, 32 ps bei 1024 Kanälen) gezeigt. Die Abklingkurve besteht aus dem Photonenankunftszeit-Histogramm, das aus den 135.000 Photonen eines Multi-ROI (Kap. 4.3.1.2) gebildet wurde. Zur Kurvenanpassung wurden vier Modellfunktionen (Kap. 3.3.3) verwendet:

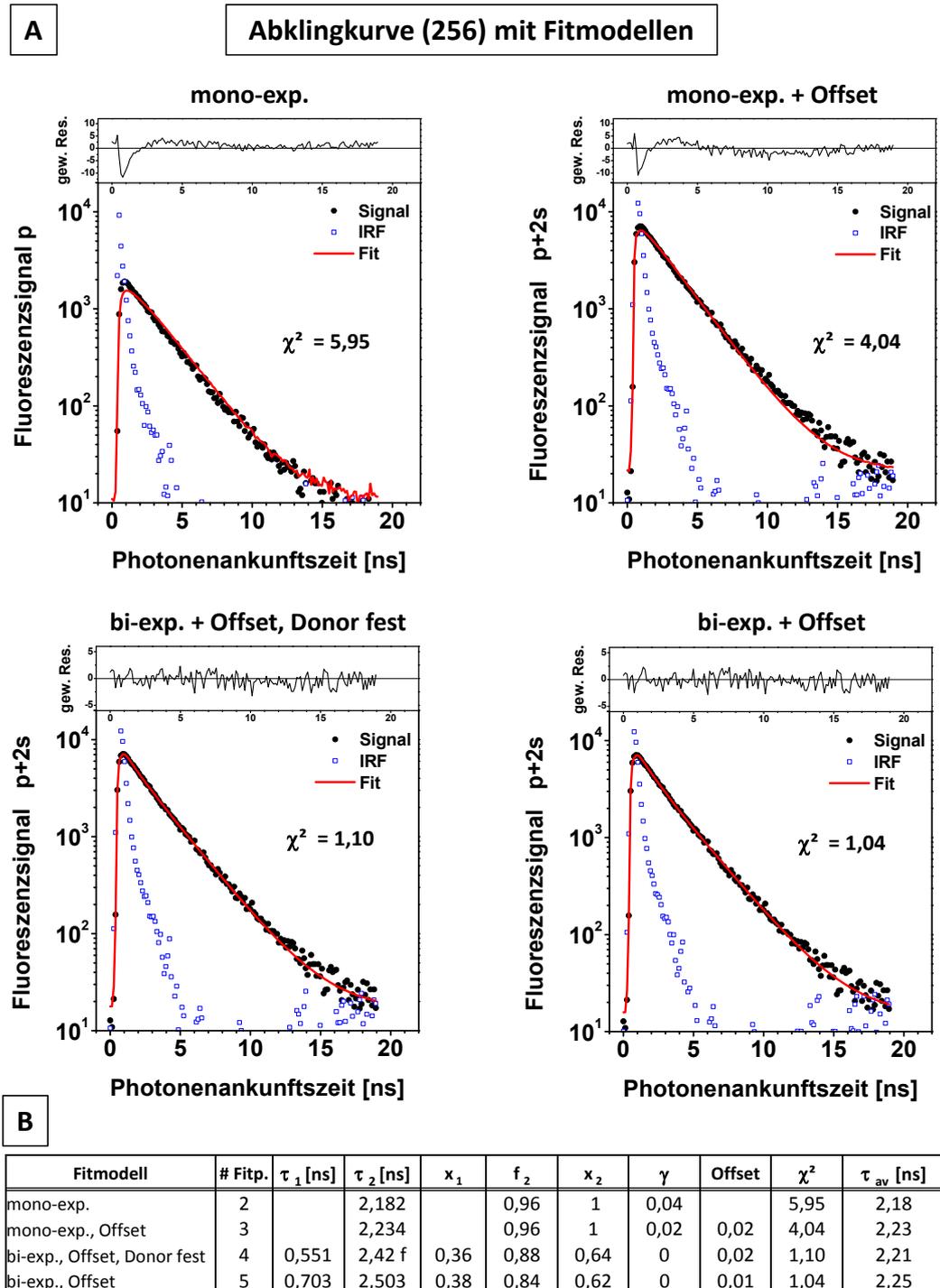
- 1) mono-exponentiell (Glg. 3.1)
- 2) mono-exponentiell mit konstantem Offset (Glg. 3.2 mit einer freien Lebensdauer)
- 3) bi-exponentiell mit konstantem Offset und fixierter Donor-Lebensdauer (Glg. 3.5)
- 4) bi-exponentiell mit konstantem Offset (Glg. 3.2)

Beide mono-exponentiellen Anpassungen zeigen starke systematische Abweichungen in den gewichteten Residuen und hohe Werte von  $\chi^2$ . Sie beschreiben die Fluoreszenz-Abklingkurven nur unzureichend.

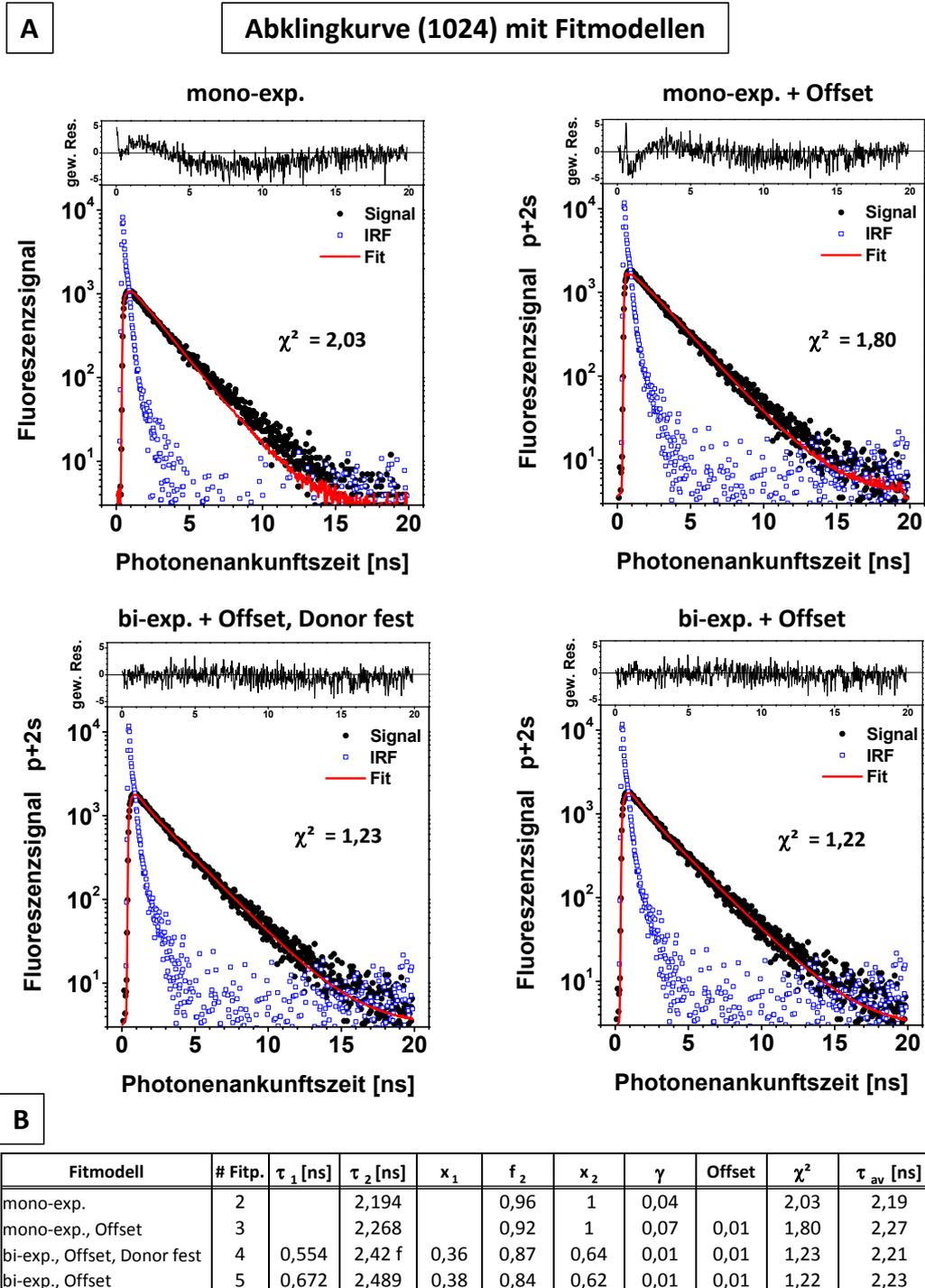
Es zeigte sich, dass die Berücksichtigung eines konstanten Offsets, neben dem obligatorischen Streulichtanteil  $\gamma$ , unbedingt zur Kurvenanpassung benötigt wird. Des Weiteren muss zur vollständigen Kurvenanpassung zusätzlich eine zweite Lebensdauerkomponente verwendet werden. Eine bi-exponentielle Modellfunktion mit zwei Lebensdauern  $\tau$ , Streulichtanteil  $\gamma$  und konstantem Offset verfügt über fünf freie Fitparameter und führt zu einer guten Kurvenanpassung mit einem  $\chi^2$  nahe eins.

Die Reduktion von freien Fitparametern ist sinnvoll, um die Modellfunktion auch bei einer geringeren Photonenzahl noch anwenden zu können. Zum anderen ist eine Modifizierung der Modellfunktion hier von Interesse, um die FRET-Spezies näher quantifizieren zu können. Der Donor allein sowie die FRET-Population zeigen einen bi-exponentiellen Fluoreszenzabfall. Die langen und kurzen Lebensdauern liegen jeweils eng beieinander, sodass mit einer bi-exponentiellen Funktion im Wesentlichen eine mittlere kurze und eine mittlere lange Lebensdauer erhalten wird. Die Spezies-Amplitude der FRET-Population im Sinne eines Anteils von FRET-Molekülen geht verloren. Um die FRET-Spezies-Amplitude zu erhalten, wird die mittlere Lebensdauer des Donors, die separat bestimmt werden kann, konstant gehalten und nur eine zweite mittlere FRET-Lebensdauer angepasst. Diese Modellfunktion verfügt dann nur über vier freie Fitparameter und liefert eine Kurvenanpassung, die qualitativ vergleichbar mit der bi-exponentiellen Anpassung ist. Sie wurde für die FRET-FLIM-Auswertung in Kapitel 4.3 verwendet.

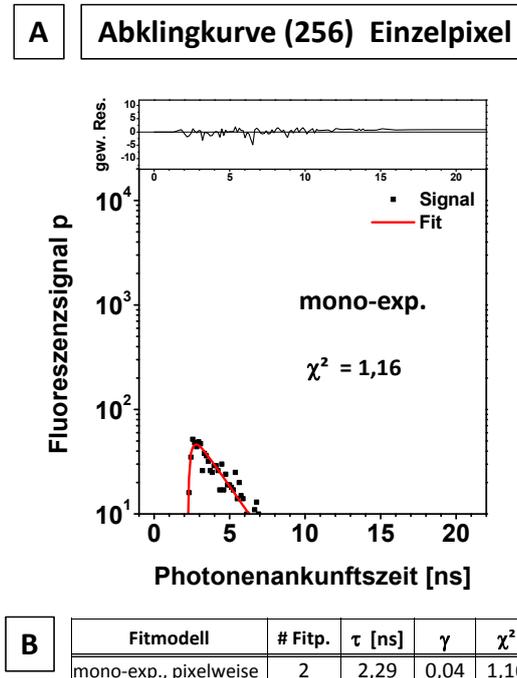
Eine Erhöhung der Zeitauflösung von 128 ps auf 32 ps verbessert die Kurvenanpassung nicht und liefert vergleichbare Ergebnisse (vgl. Abb. 4.11 und 4.12).



**Abbildung 4.11. Fluoreszenz-Abklingkurve (256 Kanäle) angepasst mit verschiedenen Fitmodellen.** (A) Fluoreszenz-Abklingkurve erhalten aus einem Multi-ROI eines MFIS-Bildes von ACR4-GFP, koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*. Die Graphen zeigen jeweils die Fluoreszenz-Abklingkurve (schwarz) mit Fit (rot) und Gerätefunktion (IRF) (blau). Die oberen Graphen zeigen jeweils die gewichteten Residuen. (B) Ergebnisse der Kurvenanpassungen: Modellfunktion (Kap. 3.3.3), Anzahl der Fitparameter, Fluoreszenz-Lebensdauern  $\tau$ , Spezies-Amplituden  $x$ , Fluoreszenz-Amplitude  $f$ , Streulichtanteil  $\gamma$ , konstanter Offset, reduziertes  $\chi^2$ , fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer  $\tau_{av}$ .



**Abbildung 4.12. Fluoreszenz-Abklingkurve (1024 Kanäle) angepasst mit verschiedenen Fitmodellen.** (A) Fluoreszenz-Abklingkurve erhalten aus einem Multi-ROI eines MFIS-Bildes von ACR4-GFP, koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*. Die Graphen zeigen jeweils die Fluoreszenz-Abklingkurve (schwarz) mit Fit (rot) und Gerätefunktion (IRF) (blau). Die oberen Graphen zeigen jeweils die gewichteten Residuen. (B) Ergebnisse der Kurvenanpassungen: Modellfunktion (Kap. 3.3.3), Anzahl der Fitparameter, Fluoreszenz-Lebensdauern  $\tau$ , Spezies-Amplituden  $x$ , Fluoreszenz-Amplitude  $f$ , Streulichtanteil  $\gamma$ , konstanter Offset, reduziertes  $\chi^2$ , fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer  $\tau_{av}$ .



**Abbildung 4.13. Fluoreszenz-Abklingkurve (256 Kanäle) eines Einzelpixels.** (A) Fluoreszenz-Abklingkurve eines Einzelpixels im MFIS-Bildes von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*. Der Graph zeigt die Fluoreszenz-Abklingkurve (schwarz) mit mono-exponentieller Anpassung (rot). Der obere Graph zeigt die gewichteten Residuen. (B) Ergebnis der Kurvenanpassungen mit mono-exponentieller Modellfunktion (Kap. 3.3.3). Anzahl der Fitparameter, Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$ , Streulichtanteil  $\gamma$  und reduziertes  $\chi^2$ .

Zur Darstellung von Fluoreszenz-Lebensdauerbildern ist die Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer in jedem einzelnen Pixel nötig. Hier wird das Photonenankunftszeit-Histogramm aus deutlich weniger Photonen gebildet als in dem oben genannten Beispiel einer Multi-ROI-Analyse. Ein Pixel enthält typischerweise 300 bis 2000 Photonen, während ein Multi-ROI 100.000 bis 1.000.000 Photonen enthält. In Abbildung 4.13 ist die Fluoreszenz-Abklingkurve eines Pixels mit 861 Photonen dargestellt. Der Vergleich mit den obigen Beispielen macht deutlich, dass für eine pixelweise Auswertung nur eine mono-exponentielle Modellfunktion mit möglichst wenigen Fitparametern angemessen ist.

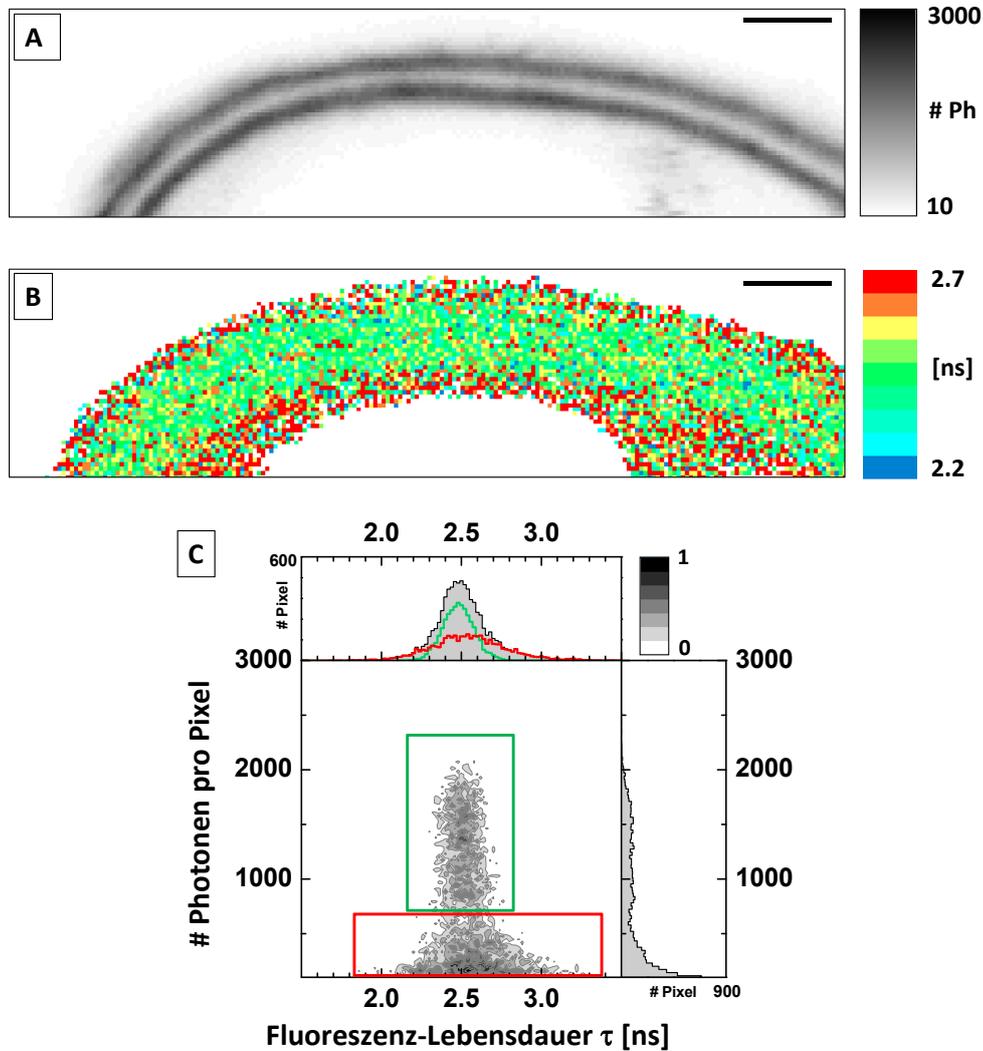
## 4.2.4. Mögliche Artefakte in FLIM-Messungen

### 4.2.4.1. Fluoreszenz-Lebensdauer in benachbarten Regionen der PM

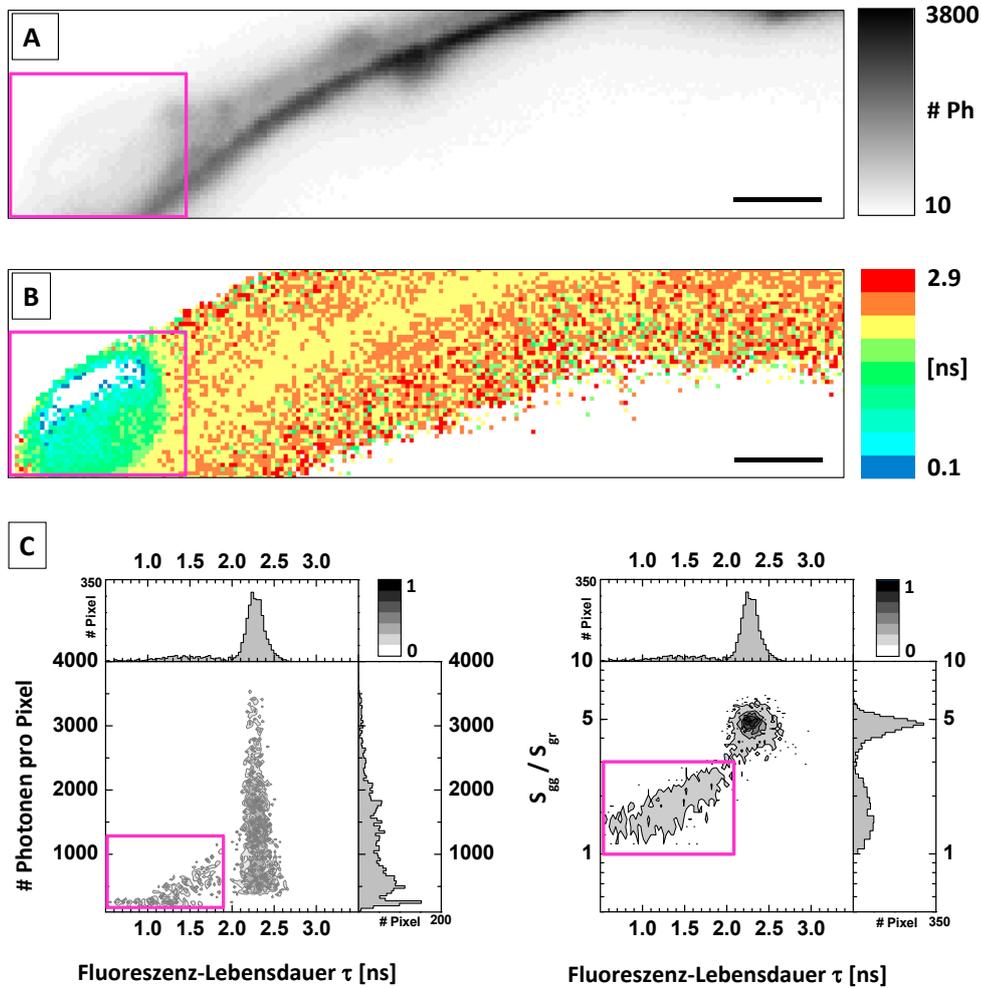
Die Plasmamembranregion, bestehend aus den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen mit dazwischenliegender Zellwand, umfasst etwa einen Mikrometer und damit im MFIS-Bild nur wenige Pixel. Da die PM deutlich heller ist, kann sie durch einen unteren Photonschwellwert für Pixel gut isoliert werden. Trotzdem kann die Mischung des Fluoreszenzsignals von Molekülen in der PM und denen in unmittelbarer Nachbarschaft der PM in einzelnen Pixeln nicht vollständig vermieden werden. Daher wird die Fluoreszenz-Lebensdauer in unmittelbarer Nähe der PM im Sinne einer systematischen Fehlerquelle untersucht und abgeschätzt.

In Abbildung 4.14 sind das Fluoreszenz-Intensitätsbild (A) und das zugehörige Fluoreszenz-Lebensdauerbild (B) von CLV1-GFP an der PM von Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* dargestellt. Im Intensitätsbild zeichnet sich die PM (schwarz) deutlich vor dem lichtschwachen Hintergrund (weiß) ab und kann durch einen Schwellwert von 600-700 Photonen sauber getrennt werden. Im Fluoreszenz-Lebensdauerbild ist der Bereich der PM in Grün zu erkennen, während angrenzende Bereiche mit einer längeren Lebensdauer mehr rot erscheinen. Die Auftragung von Photonenzahl gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer in einem zweidimensionalen Pixelhäufigkeitshistogramm (C) erlaubt ebenfalls eine deutliche Unterscheidung von PM (grün markiert) und Hintergrund (rot markiert), einmal durch die Helligkeit (Anzahl der Photonen) und auch durch die Breite der Fluoreszenz-Lebensdauer-Verteilung, die für das GFP-Signal an der PM wesentlich schmäler ist. Die Auswahl und Mittelung der zugehörigen markierten Pixelsubpopulationen liefert als mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer an der PM  $2,481 \pm 0,010$  ns und  $2,550 \pm 0,059$  ns für die dunkleren Nachbarregionen.

Das bedeutet, dass Hintergrundanteile in Pixeln zu große Fluoreszenz-Lebensdauern als systematischen Fehler hervorrufen. Dies könnte in FRET-Proben dazu führen, dass eine zu geringe Lebensdauerverkürzung, also weniger FRET als eigentlich vorhanden ist, gemessen wird. Daher ist eine strenge Wahl des Photonschwellwerts unerlässlich, der in jedem MFIS-Bild individuell gesetzt werden muss.



**Abbildung 4.14. Fluoreszenz-Lebensdauer in der Region der Plasmamembran.** Fluoreszenz-Intensitätsbild (A) und Fluoreszenz-Lebensdauerbild (B) von CLV1-GFP exprimiert in *N. benthamiana*. Pixel mit weniger als 10 Photonen wurden nicht berücksichtigt und sind in (B) weiß dargestellt. Der Skalierungsbalken entspricht  $2 \mu\text{m}$ . (C) 2d-Häufigkeitshistogramm von (A) und (B) mit den zugehörigen 1d-Histogrammen. Die Anzahl der Photonen ist gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer aufgetragen. Die Pixelsubpopulation der PM ist grün markiert, die des Hintergrunds rot. Die zugehörigen Verteilungen finden sich im 1d-Histogramm der Fluoreszenz-Lebensdauer als grüne (PM) und rote (Hintergrund) Kurve.



**Abbildung 4.15. Fluoreszenz-Lebensdauer von Chloroplasten.** Fluoreszenz-Intensitätsbild (A) und Fluoreszenz-Lebensdauerbild (B) von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-GFP in *N. bentamiana*, das in der Nähe der PM einen Chloroplasten enthält (magenta-farbener Kasten). Pixel mit weniger als 10 Photonen wurden nicht berücksichtigt und sind in (B) weiß dargestellt. Ebenfalls weiß dargestellt sind im Bereich des Chloroplasten Pixel mit einer Lebensdauer  $<0,1$  ns. Der Skalierungsbalken entspricht  $2 \mu\text{m}$ . (C) 2d-Häufigkeitshistogramme von (A) und (B) mit den zugehörigen 1d-Histogrammen. (C, links) Anzahl der Photonen gegen Fluoreszenz-Lebensdauer. (C, rechts) Verhältnis des grünen Signals zu rotem Signal  $S_{gg}/S_{gr}$  gegen Fluoreszenz-Lebensdauer. Die Pixelsubpopulationen des Chloroplasten sind magenta-farben markiert.

#### 4.2.4.2. Chloroplasten

Chloroplasten fluoreszieren hauptsächlich im roten Spektralbereich mit Emissionsmaxima bei 682 nm und 740 nm [Krause und Weis 1984]. Die Autofluoreszenz von Chloroplasten im Spektralbereich von GFP ist deutlich schwächer als das Signal von GFP. So ist im Fluoreszenz-Intensitätsbild (Abb. 4.15, A) der Chloroplast (magenta-farben markiert) nur schwach zu erkennen. Er hebt sich durch seine extrem kurze Fluoreszenz-Lebensdauer allerdings deutlich im Fluoreszenz-Lebensdauerbild ab (Abb. 4.15, B). Im 2d-Histogramm (Abb. 4.15, C) bildet der Chloroplast eindeutige Subpopulationen (magenta-farben markiert) bei niedriger Fluoreszenz-Lebensdauer, niedriger Photonenzahl und niedrigem Grünrot-Verhältnis  $S_{gg}/S_{gr}$ .

In der Praxis lassen sich Chloroplasten nicht immer so einfach identifizieren. Liegen sie in der Zelle z.B. knapp unterhalb der Fokusebene, so sind sie sowohl im grünen als auch roten Fluoreszenz-Intensitätsbild praktisch nicht auszumachen. Dennoch führt ihr Photonenbeitrag auch in hellen Pixeln der PM-Region zu einer deutlich verkürzten Fluoreszenz-Lebensdauer. Um falsch-positive FRET-Ergebnisse auszuschließen, müssen verdächtige Bereiche im MFIS-Bild von der Auswertung ausgeschlossen werden.

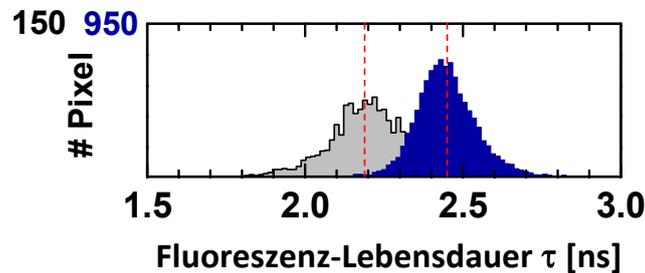
#### 4.2.4.3. Fluoreszenz-Lebensdauer in frühen Stadien der Expression von membranständigen GFP-Fusionen

In frühen Stadien der Expression von membranständigen GFP-Fusionen wurde eine deutlich niedrigere Fluoreszenz-Lebensdauer gemessen als 12 bis 24 Stunden nach Induktion. Zusätzlich war die Fluoreszenz-Lebensdauer in frühen Stadien der Expression inhomogen und instabil, während in späteren Stadien die Lebensdauer von Zelle zu Zelle deutlich weniger Schwankungen zeigte, innerhalb einzelner Zellen homogener war und vor allem über viele Stunden keine systematische Veränderung mehr zeigte.

Obwohl die Fluoreszenz-Intensität in einigen Zellen vier Stunden nach Induktion bereits ausreichend hoch war, um FLIM-Messungen durchzuführen, wurde daher nur FLIM an Pflanzen gemessen, deren Expression mindestens 12 Stunden früher induziert wurde.

In Abbildung 4.16 sind als Beispiel die 1d-Häufigkeitshistogramme von zwei FLIM-Bildern von ACR4-GFP gezeigt. Die FLIM-Aufnahme vier Stunden nach Induktion (grau) liefert mit 2,19 ns eine deutlich niedrigere Fluoreszenz-Lebensdauer als die Messungen am selben *N. benthamiana*-Blatt 15 Stunden nach Induktion (blau) mit 2,45 ns.

Eine mögliche Ursache könnte die noch nicht endgültige Lokalisation von ACR4-GFP sein.



**Abbildung 4.16. Fluoreszenz-Lebensdauer in frühen Stadien der Expression von ACR4-GFP.** 1d-Häufigkeitshistogramm jeweils eines FLIM-Bildes von ACR4-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*, vier Stunden nach Induktion (grau) und 15 Stunden nach Induktion (blau). Die Mittelwerte (rot gestrichelt) der Verteilungen liegen bei 2,19 ns (grau) und 2,45 ns (blau).

Die optische Auflösung erlaubt es nicht, zu unterscheiden, ob sich ACR4-GFP schon in der Plasmamembran befindet oder noch im Zytoplasma in unmittelbarer Membrannähe, wo z.B. ein anderer pH-Wert vorliegen könnte.

An manchen Tagen zeigten GFP-Fusionen auch mehr als 15 Stunden nach Induktion noch sehr niedrige Fluoreszenz-Lebensdauern. Eine Ursache hierfür könnte ein niedrigerer pH-Wert in der Zellen als Folge von ungünstigen Wachstumsbedingungen sein. Die Messungen wurden an diesen Tagen abgebrochen und die Daten nicht verwendet, da die ungewöhnlich niedrige Lebensdauer des Donors zu falsch-positiven FRET-Aussagen führen kann. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, an jedem Messtag das allein exprimierte Donor-Fusionsprotein zu messen.

#### 4.2.4.4. Reifung von mCherry

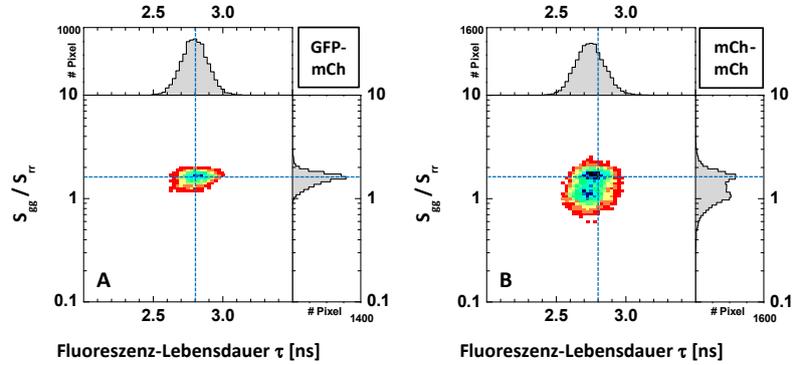
Generell können fluoreszente Proteine der DsRed-Familie wie mCherry sowohl einen grün fluoreszierenden Zwischenzustand während der Reifung als auch einen stabilen grünen Endzustand erreichen, der ein GFP-ähnliches Emissionsspektrum besitzt (vgl. 3.6.1.3). Daher wurden als Kontrolle vier freie FP(-Konstrukte) in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* exprimiert und mit MFIS gemessen: GFP, mCherry, die Fusion von GFP und mCherry (GFP-mCh) und die Fusion von zwei mCherry-Molekülen (mCh-mCh). Es wurde vom selben Ausschnitt jeweils ein MFIS-Bild mit Anregung bei 485 nm und eines bei 559 nm aufgenommen (Kap. 3.2.1).

Freies GFP zeigt erwartungsgemäß grüne Fluoreszenz nach Anregung mit 485 nm und einen sogenannten *crossstalk* im roten Detektionsbereich, der dem Anteil des Emissionsspektrums in diesem Bereich entspricht. GFP zeigt keine rote Fluoreszenz nach Anregung mit 559 nm. Freies mCherry zeigte kein grünes Fluoreszenzsignal  $S_{gg}$  bei Anregung mit 485 nm, sondern nur rotes Signal  $S_{rr}$  nach Anregung mit 559 nm.

Das FP-Dimer GFP-mCh zeigt wie erwartet sowohl grüne Fluoreszenz nach Anregung bei 485 nm ( $S_{gg}$ ) als auch rote Fluoreszenz nach direkter Anregung von mCherry mit 559 nm ( $S_{rr}$ ). Unerwarteterweise ist das Dimer mCh-mCh auf den ersten Blick nicht von GFP-mCh zu unterscheiden: Es zeigt sowohl grüne als auch direkt angeregte rote Fluoreszenz. Das bedeutet, dass sich im Dimer mCh-mCh neben rotem mCherry noch eine grün fluoreszierende Spezies befinden muss. In Abbildung 4.17 ist das Verhältnis aus grünem Signal (Anregung bei 485 nm) zu rotem Signal (Anregung bei 559 nm)  $S_{gg}/S_{rr}$  gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer für beide Dimere aufgetragen. Es spiegelt im Wesentlichen das vorliegende Donor-Akzeptor-Verhältnis wider. Beim Vergleich fällt auf, dass mCh-mCh zwei Populationen enthält: Die eine ist praktisch identisch mit GFP-mCh, während die andere ein etwas niedrigeres Signalverhältnis  $S_{gg}/S_{rr}$  besitzt. Da es sich nicht um unterschiedliche Donor-Akzeptor-Konzentrationen handeln kann, muss mCh-mCh in zwei Varianten vorliegen, die sich hinsichtlich ihrer Helligkeit unterscheiden. Es könnten zwei grüne Spezies existieren, die verschieden hell sind. Allerdings wurde zuvor von [Wu et al. 2009] berichtet, dass mCherry FP-Fusionen in zwei unterschiedlichen hellen (roten) Spezies vorliegt. Wahrscheinlich liegen diese beiden Spezies hier auch vor und zwar im mCh-Dimer in einem anderen Verhältnis als bei den anderen mCherry-Konstrukten.

Die FP-Dimere GFP-mCh und mCh-mCh zeigen beide (intramolekulare) FRET, wie in den 2d-Histogrammen in Abbildung 4.18 deutlich wird. Die Fluoreszenz-Lebensdauer ist jeweils im Vergleich zu GFP ohne Akzeptor verkürzt. Zusätzlich ist das Signalverhältnis  $S_{gg}/S_{gr}$  infolge von indirekt angeregter Akzeptorfluoreszenz reduziert. Die FRET-Populationen beider Dimere sind homogen und lassen nicht auf das Vorliegen mehrerer Spezies schließen.

Offenbar kann auch im verwendeten Expressionssystem in *N. benthamiana* mCherry als GFP-ähnliche Spezies vorliegen, die grün fluoresziert und zusammen mit rotem mCherry FRET zeigt. Das Auftreten dieser Spezies hängt davon ab, wie und an welches Protein mCherry fusioniert ist. Außer im mCh-Dimer wurde die grüne Spezies nicht beobachtet, insbesondere im häufig verwendeten Konstrukt CLV1-mCherry nicht.

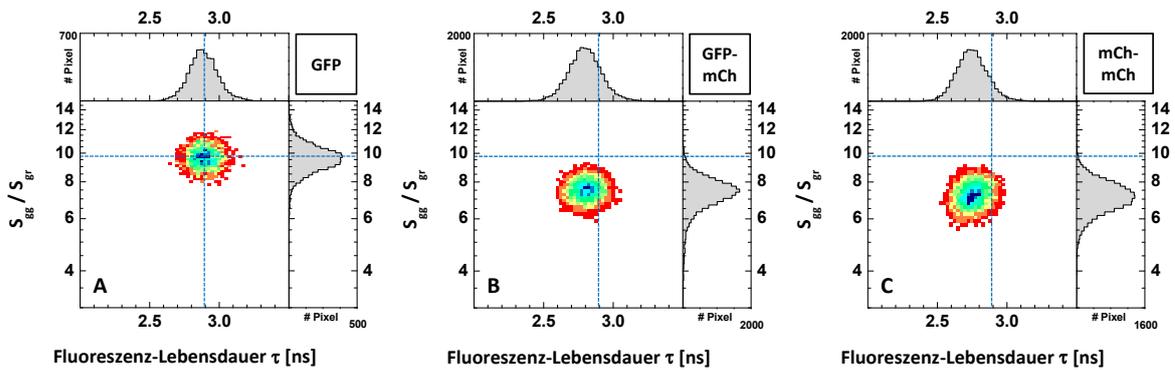


**Abbildung 4.17. Direkte Akzeptoranregung von FP-Dimeren.**

2d-Häufigkeitshistogramme Signalverhältnis  $S_{gg}/S_{tr}$  gegen Fluoreszenz-Lebensdauer generiert aus jeweils 10 MFIS-Aufnahmen von (A) GFP-mCherry und (B) mCherry-mCherry exprimiert in *N. benthamiana*. Die blauen Linien markieren identische Positionen zum besseren Vergleich der Diagramme.

(A) GFP-mCh:  $\tau = 2,80 \pm 0,10$  ns,  $S_{gg}/S_{tr} = 1,57 \pm 0,25$

(B) mCh-mCh:  $\tau = 2,74 \pm 0,11$  ns,  $S_{gg}/S_{tr} = 1,32 \pm 0,46$ .



**Abbildung 4.18. FRET von FP-Dimeren.** 2d-Häufigkeitshistogramme Signalverhältnis  $S_{gg}/S_{gr}$  gegen Fluoreszenz-Lebensdauer generiert aus n MFIS-Aufnahmen von freien FP-Konstrukten exprimiert in *N. benthamiana*. (A) GFP (n=2), (B) GFP-mCherry (n=10) und (C) mCherry-mCherry (n=10). Die blauen Linien markieren in allen Diagrammen die Position der Donorpopulation.

(A) GFP:  $\tau = 2,89 \pm 0,11$  ns,  $S_{gg}/S_{gr} = 9,70 \pm 1,05$

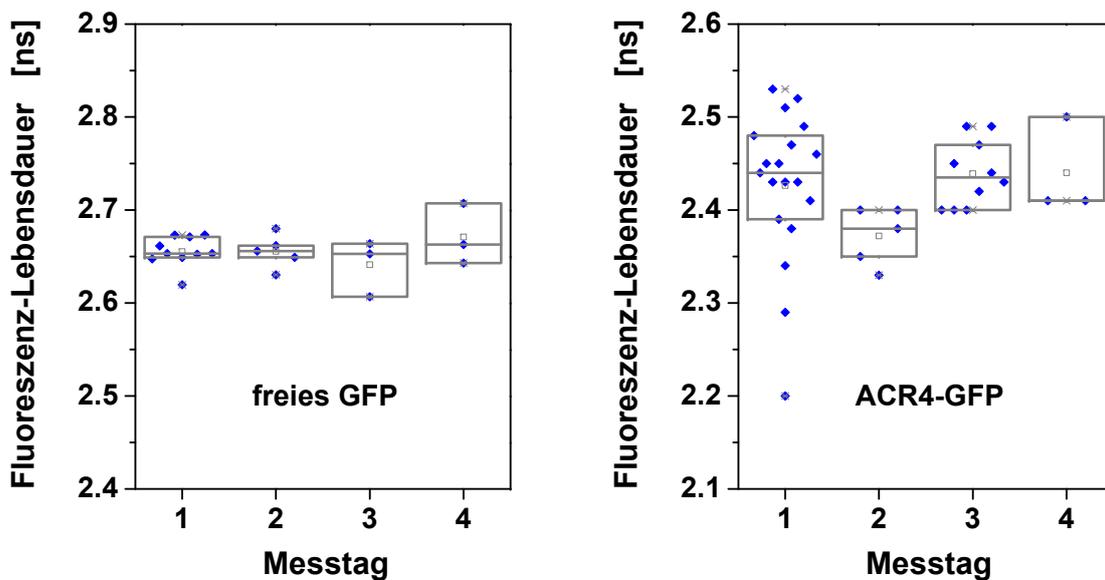
(B) GFP-mCh:  $\tau = 2,80 \pm 0,12$  ns,  $S_{gg}/S_{gr} = 7,42 \pm 0,97$

(C) mCh-mCh:  $\tau = 2,75 \pm 0,11$  ns,  $S_{gg}/S_{gr} = 7,25 \pm 0,88$ .

### 4.2.5. Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer

Die Fluoreszenz-Lebensdauer zeigt eine Varianz zwischen einzelnen Zellen. Wachstum und Expression der *N. benthamiana*-Pflanzen können ebenfalls Einfluss auf die Fluoreszenz-Lebensdauer haben, sodass es eine Varianz zwischen einzelnen Messtagen gibt. (Hier sind solche Messtage ausgenommen, an denen die Expression offensichtlich unzureichend oder fehlerhaft war, da an diesen Tagen die Messungen angebrochen und die Daten von der Auswertung ausgenommen wurden.)

Anhand von freiem GFP und ACR4-GFP kann gezeigt werden, dass die Varianz zwischen einzelnen Zellen dominiert und der Einfluss des Messtages keine Rolle spielt.



**Abbildung 4.19. Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer.** Zusammenfassung der Fluoreszenz-Lebensdauer-Messungen an verschiedenen Messtagen von freiem GFP und ACR4-GFP in Boxplots. Die einzelnen Datenpunkte (blau) gehören jeweils zu einer MFIS-Aufnahme. Die Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer erfolgte für freies GFP mit der Multi-ROI-Methode (Kap. 4.3.1.2) und für ACR4-GFP mit der pixelweisen Auswertung (Kap. 4.3.1.1).

In Abbildung 4.19 sind die Messdaten der Fluoreszenz-Lebensdauer von freiem GFP und ACR4-GFP an jeweils vier Messtagen in Boxplots zusammengefasst. Die zugehörigen Mittelwerte sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Das arithmetische Mittel über alle Messwerte ( $\Sigma$ ) gibt den Mittelwert ungeachtet des Messtages an, die zugehörige Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung zwischen einzelnen Zellen. Dagegen gibt das arithmetische Mittel und Standardabweichung der Mittelwerte der einzelnen Messtage („alle Tage“) Aufschluss

über die Schwankungen zwischen Messtagen.

Diese beiden Mittelwerte nehmen bei freiem GFP denselben Wert an und unterscheiden sich bei ACR4-GFP nur um 5 ps. Die Standardabweichungen zeigen, dass die Schwankung der Fluoreszenz-Lebensdauer zwischen einzelnen Zellen (GFP: 21 ps; ACR4-GFP: 66 ps) größer ist als zwischen einzelnen Messtagen (GFP: 12 ps; ACR4-GFP: 32 ps).

**Tabelle 4.2. Gemittelte Fluoreszenz-Lebensdauer von freiem GFP und ACR4-GFP an verschiedenen Messtagen.** Es wurde über die  $n$  Messwerte eines Messtages gemittelt (Tag 1 bis Tag 4), über alle Messwerte ( $\Sigma$ ) und über die Mittelwerte der einzelnen Messtage (alle Tage).

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	$\Sigma$	alle Tage
<b>ACR4-GFP</b>						
Mittelwert	2,426	2,372	2,439	2,440	2,424	2,419
Standardabweichung	0,081	0,031	0,035	0,052	0,066	0,032
n	19	5	10	3	37	4
<b>freies GFP</b>						
Mittelwert	2,655	2,655	2,641	2,671	2,656	2,656
Standardabweichung	0,016	0,018	0,030	0,033	0,021	0,012
n	10	5	3	3	21	4

#### 4.2.6. Zusammenfassung und Diskussion der FLIM-Messungen

Die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer von freiem GFP in *N. benthamiana* beträgt 2,66 ns und lässt sich gut mit einem bi-exponentiellen Model beschreiben, wie vormals u. a. in [Suhling et al. 2002] berichtet. Interessanterweise ist die Lebensdauer von fusioniertem GFP mit 2,50 ns deutlich kürzer als die des freien GFP, obwohl beide im Zytoplasma lokalisieren und so z.B. gleichem pH ausgesetzt sind. Trotzdem ist die Lokalisation des fusionierten GFPs besonders. Da es an einen membranständigen Rezeptor fusioniert ist, befindet es sich in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran. Die PM-Region besitzt einen höheren Brechungsindex als das Zytoplasma und bedingt so eine niedrigere Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP [van Manen et al. 2008].

Der autofluoreszente Hintergrund durch unbehandelte Blattepidermiszellen besitzt eine kürzere Fluoreszenz-Lebensdauer als GFP-Fusionen und ist darüber hinaus aufgrund der niedrigen Intensität zu vernachlässigen.

Die Fluoreszenz von mCherry im grünen Spektralbereich besitzt eine etwas kürzere Fluoreszenz-Lebensdauer als GFP-Fusionen und ist unter normalen Umständen zu vernachlässigen. Allerdings kann eine fehlerhafte Reifung zu einer grünen Spezies führen, die mit der roten mCherry-Spezies FRET zeigt.

Die systematische Bestimmung optimaler Messbedingungen führt zu den Standardeinstellungen der durchgeführten MFIS-Messungen (siehe Kapitel 3.2.1), die minimales Photobleichen und eine konstante Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP gewährleisten.

Zur Anpassung der Fluoreszenz-Abklingkurven des FRET-Paares GFP-mCherry in *N. benthamiana* erweist sich ein bi-exponentielles Modell mit Offset und Streulichtanteil, das eine Donor-Lebensdauer festhält, als am besten geeignet. Dies ist im Einklang mit Untersuchungen von [Padilla-Parra et al. 2009] an EGFP-mCherry in He-La- und HEK293-Zellen.

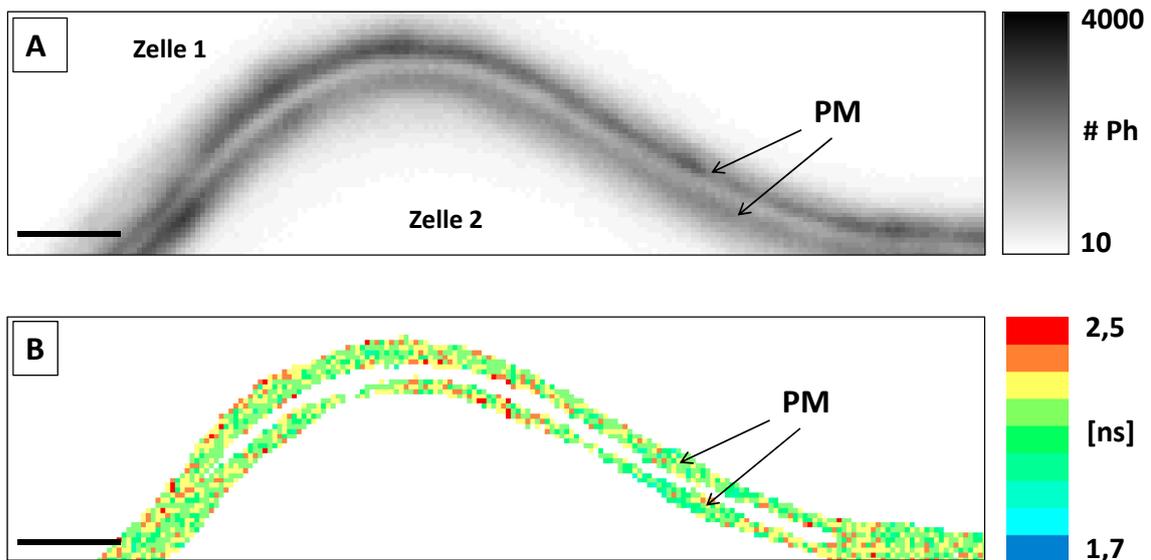
Die Spezifizierung von möglichen Artefakten in FLIM-Messungen führt auf folgende Aspekte, die bei der FLIM-Analyse beachtet werden müssen:

- Die Plasmamembran muss in jedem MFIS-Bild individuell durch eine ausreichend hohe Mindestphotonenzahl pro Pixel vom dunkleren Hintergrund getrennt werden.
- Chloroplasten müssen sorgfältig von der Analyse ausgenommen werden, da sie zu falsch-positiven FRET-Ergebnissen führen können.
- Die Expression muss zu jeder FRET-Probe anhand einer Probe des allein exprimierten Donors überprüft werden, da ungünstige Wachstums- und Expressionsbedingungen der Pflanzen zu niedrigen Fluoreszenz-Lebensdauern führen.

Die Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer wird in erster Linie durch die Varianz zwischen einzelnen Zellen bestimmt.

### 4.3. Untersuchung von Komplexbildung mit FRET-FLIM

Die Komplexbildung von ACR4 mit CLV1 auf molekularer Ebene wurde mittels FLIM-FRET *in planta* untersucht. Aufgrund der niedrigen Expression von ACR4 und CLV1 unter ihren endogenen Promotoren in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* wurden die FP-Fusionen der RK unter einem Estradiol-induzierbaren Promotor in Blattepidermiszellen in *Nicotiana benthamiana* transient exprimiert und mit MFIS gemessen (vgl. Kap. 3.2.1). Die untersuchten Rezeptorkinasen und rezeptorähnlichen Kinasen lokalisieren in den Zellen an der Plasmamembran (PM). Es wurden Bildausschnitte gewählt, die den Bereich der PM zweier benachbarter Zellen beinhalten (Abb. 4.20).



**Abbildung 4.20.** FRET-FLIM: Koexpression von ACR4-GFP und CLV1-mCh in Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. ACR4-GFP und CLV1-mCh lokalisieren jeweils an der Plasmamembran (PM) zweier benachbarter Zellen. (A) Fluoreszenz-Intensitätsbild. (B) Zugehöriges Fluoreszenz-Lebensdauerbild. Der Balken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .

Fusionen von ACR4 und CLV1 sowie der nicht assoziierten rezeptorähnlichen Kinase BAK1 mit GFP und mCherry wurden einzeln und paarweise exprimiert. Einzeln exprimierte GFP-Fusionen dienten als Referenz für die Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP ohne Energietransfer (“donor only”). Der Förster-Resonanz-Energietransfer zwischen dem Donor GFP und Akzeptor mCherry in koexprimierten Proben wurde über eine verkürzte Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors GFP nachgewiesen.

Hierzu wurde die Fluoreszenz-Lebensdauer in den MFIS-Aufnahmen sowohl pixelweise

unter Verwendung eines mono-exponentiellen Fitmodells als auch in einem Multi-ROI mit einem bi-exponentiellen Fitmodell bestimmt. Die pixelweise Analyse hat den Vorteil, dass Komplexbildung mit hoher räumlicher Auflösung bestimmt werden kann. Auf diese Weise ist es möglich, auch kleine, wenige Pixel umfassende Strukturen wie Plasmodesmata zu untersuchen (siehe Abschnitt 4.3.3). Die Multi-ROI-Analyse liefert durch die hohe Anzahl von Photonen die Möglichkeit einer genaueren spektroskopischen Beschreibung. Damit können quantitative Aussagen über die Komplexbildung getroffen werden (siehe Abschnitt 4.3.5).

### 4.3.1. Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer

#### 4.3.1.1. Pixelweise Analyse

Um Heterogenitäten der Zielmoleküle mit hoher lokaler Auflösung bestimmen zu können, ist es unerlässlich, die Lebensdauer pixelweise zu bestimmen. Die oftmals niedrige Photonenzahl pro Pixel schränkt die Auswahl geeigneter Fitmodelle ein. Es wird ein Fitmodell mit so wenig freien Parametern wie möglich benötigt.

Zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer wurde eine mono-exponentielle Modellfunktion mit Streulichtanteil (Glg. 3.1) und ein *maximum likelihood*-Schätzer verwendet, der bei niedrigen Photonenzahlen den besten Fitalgorithmus liefert [Maus et al. 2001].

GFP allein hat bereits ein bi-exponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz-Intensität, welches für GFP in Anwesenheit des FRET-Akzeptor mCherry noch entsprechend erweitert werden muss. Das verwendete Fitmodell ist daher simplifiziert und liefert eine über alle Populationen gemittelte Lebensdauer. Dafür ist es robust anwendbar bei niedrigen Photonenzahlen.

Praktische Anwendung:

Die Fluoreszenz-Intensitätsbilder enthielten typischerweise 100 bis 4000 Photonen pro Pixel. Durch die geeignete Wahl einer Mindestphotonenzahl pro Pixel konnten die dunklen Pixel, die unspezifischen Hintergrund enthielten, ausgewählt und von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. In allen verbleibenden Pixeln wurde die Fluoreszenz-Lebensdauer mit einer mono-exponentiellen Modellfunktion bestimmt. Zum Vergleich der Fluoreszenz-Lebensdauer verschiedener Zellen muss pro Bild eine repräsentative Lebensdauer bestimmt werden. Hierzu wurde ein geeignetes ROI von typischerweise 40 bis 90 Pixeln aus-

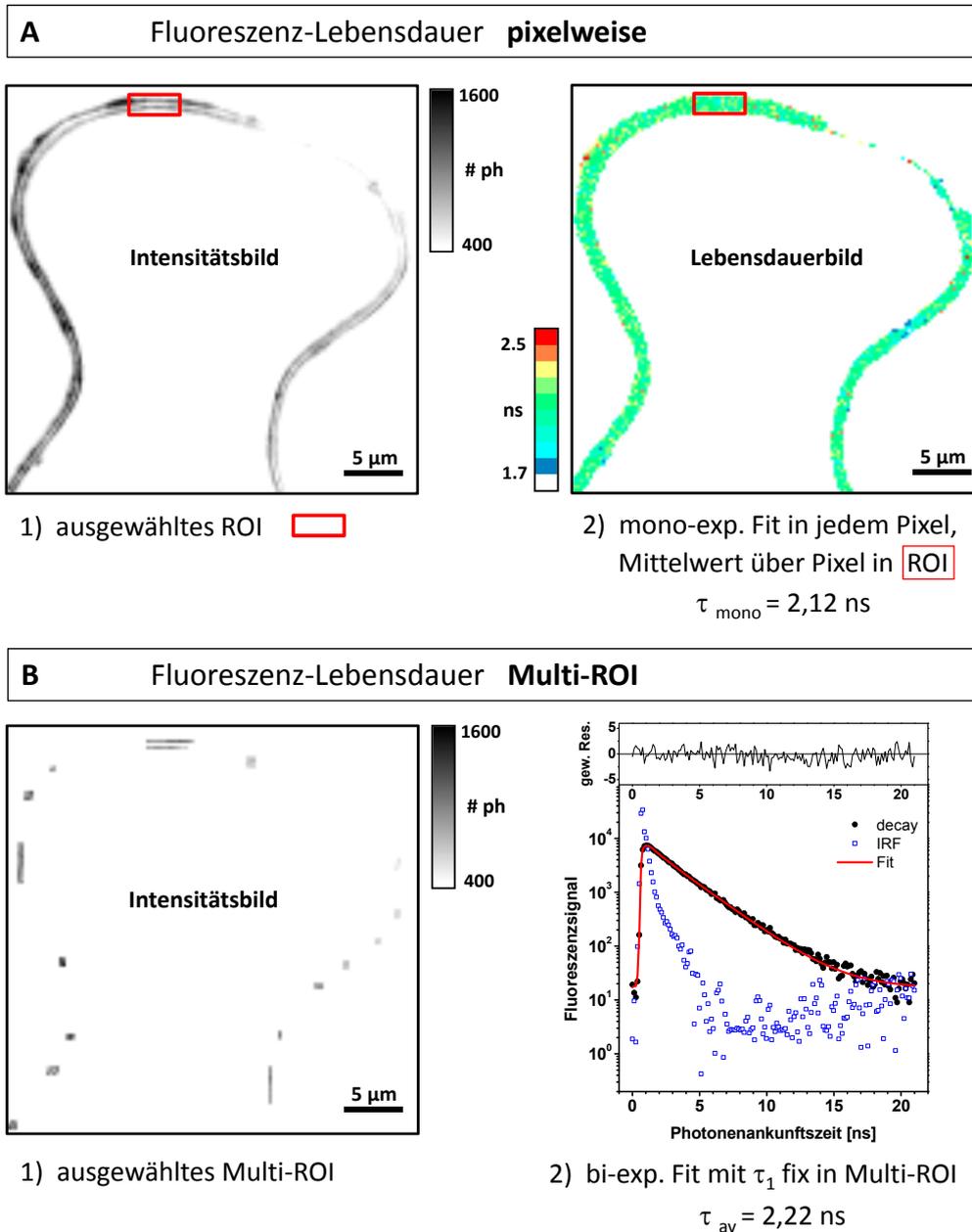
gewählt, das Plasmamembran ohne störende Einflüsse wie Chloroplasten oder Vesikel enthielt und gut fokussiert war. Innerhalb dieses ROI wurde das arithmetische Mittel der Fluoreszenz-Lebensdauer über alle Pixel berechnet und als Ergebnis  $\tau_{mono}$  festgehalten (siehe Abb. 4.21 A).

### 4.3.1.2. Multi-ROI-Analyse

Eine adäquate Beschreibung des Fluoreszenz-Abklingverhaltens einer FRET-Probe benötigt in der Regel mehr freie Parameter als eine Lebensdauer und den Streulichtanteil. Dies erfordert eine deutlich höhere Photonenzahl als in den vorliegenden Messungen pro Pixel zur Verfügung standen. Eine Möglichkeit, die Photonenzahl zu erhöhen, ist die Vereinigung vieler Pixel bzw. vieler ROI zu einem "Multi-ROI". Die anschließende Analyse des Histogramms aus allen Photonen des Multi-ROI kann eine genauere spektroskopische Beschreibung der FRET-Population liefern. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass über einen großen Bereich der Zelle gemittelt wird und die Information über lokale Heterogenitäten verloren geht.

Praktische Anwendung:

Im Fluoreszenz-Intensitätsbild wurde zunächst analog zur pixelweisen Analyse der dunklere Hintergrund durch die Wahl einer Mindestphotonenzahl pro Pixel ausgeblendet. Dann wurden mehrere geeignete ROI ausgewählt, die die Plasmamembran ohne störende Einflüsse enthielten und gut fokussiert waren. Das so erhaltenen Multi-ROI umfasste je nach Bild typischerweise zwischen 200 und 700 Pixel und damit 100.000 bis 1.000.000 Photonen. Das aus allen Photonen des Multi-ROI konstruierte Ankunftszeithistogramm wurde mit einem bi-exponentiellen Modell angepasst, das die Lebensdauer des Donors festhält und die Lebensdauer der FRET-Population und einen Hintergrund anpasst (Glg. 3.5). Dieser Fit mit drei freien Parametern liefert sowohl die Lebensdauer der FRET-Population  $\tau_{FRET}$  als auch die zugehörige fluoreszenzgewichtete Amplitude  $f_{FRET}$ . Als Ergebnis wird die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer  $\tau_{av}$  angegeben (siehe Abb. 4.21 B).



**Abbildung 4.21. FLIM Auswertung.** Die Abbildung illustriert die beiden verwendeten Auswertemethoden (pixelweise und mit Multi-ROI), um die Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP aus einer MFIS-Aufnahme zu bestimmen. Das Beispiel zeigt die Analyse einer MFIS-Aufnahme von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*.

### 4.3.2. Komplexbildung an der Plasmamembran

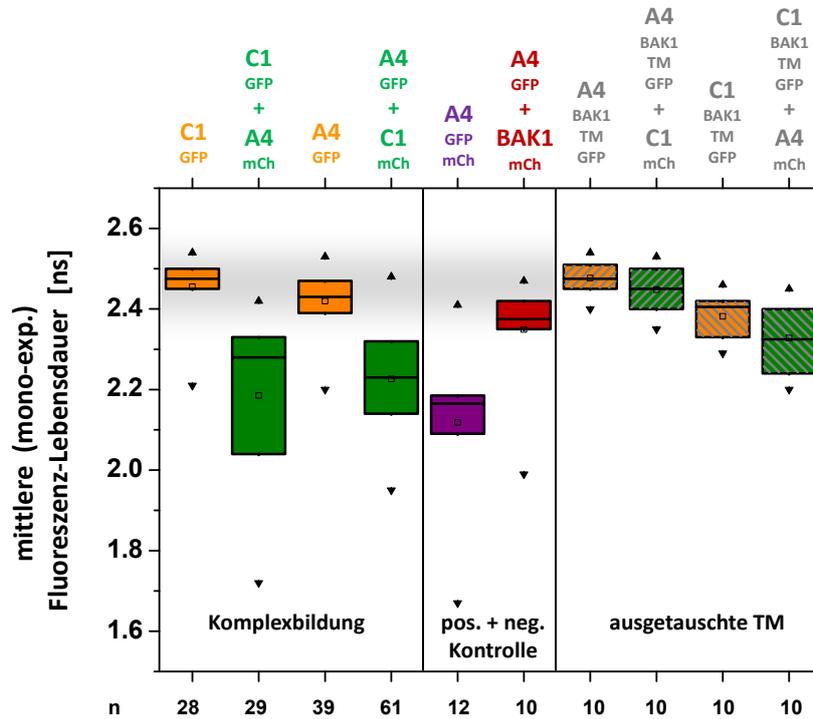
Die Komplexbildung von ACR4 und CLV1 wurde an der Plasmamembran mit FRET-FLIM untersucht. Hierzu wurden in einem MFIS-Bild, das den Bereich der PM zweier benachbarter Blattepidermiszellen zeigt, gezielt Pixel ausgewählt, die nur die PM enthalten, und zur Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer verwendet. Auf diese Weise erhält man in jedem MFIS-Bild eine Fluoreszenz-Lebensdauer, die über die Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen gemittelt ist.

Die Fluoreszenz-Lebensdauer wurde für den vollständigen Datensatz aus allen FRET-Kombinationen, Kontrollen und Konstrukten mit ausgetauschter Transmembrandomäne pixelweise mit einer mono-exponentiellen Anpassung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Des Weiteren wurde für einen ausgewählten Datensatz der wichtigsten Konstrukte und Kombinationen die Fluoreszenz-Lebensdauer sowohl pixelweise als auch in Multi-ROI bestimmt (vgl. Abschnitt 4.3.1) und verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 dargestellt. Die Mittelwerte der Daten dargestellt in Abb. 4.22 und 4.23 sind mit Standardabweichung und Signifikanztest in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Die Koexpression von GFP und mCherry im selben Konstrukt (ACR4-GFP-mCh) führt zu intramolekularem FRET und dient damit als Positivkontrolle für die Lebensdauerverkürzung durch FRET. Diese beträgt im Mittel 236 ps (Multi-ROI) bzw. 193 ps (pixelweise). ACR4-GFP zeigt bei Koexpression mit CLV1-mCh eine signifikante Verkürzung der Fluoreszenz-Lebensdauer von 206 ps bzw. 301 ps, die auf intermolekularen FRET bei Komplexbildung von ACR4 und CLV1 zurückzuführen ist. Ebenso führt der Tausch von Donor und Akzeptor (Koexpression von CLV1-GFP und ACR4-mCh) zu einer deutlichen Lebensdauerverkürzung von 270 ps (pixelweise) (Abb. 4.22).

Die Bildung von homomeren Komplexen kann durch die Koexpression von GFP- und mCherry-Fusion der RK bestimmt werden. Dies führt bei ACR4 und CLV1 jeweils zu einer signifikanten Lebensdauerverkürzung (ACR4: 312 ps bzw. 176 ps; CLV1: 161 ps bzw. 114 ps) und zeigt damit, dass sowohl ACR4 als auch CLV1 homomere Komplexe bilden.

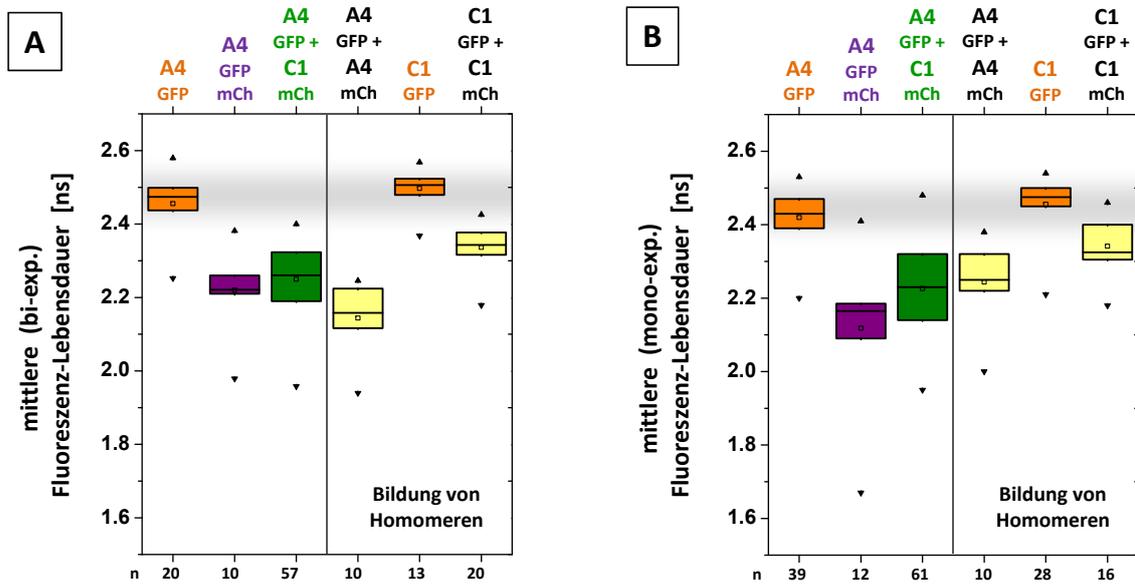
Die rezeptorähnliche Kinase BAK1 bildet weder mit ACR4 noch CLV1 spezifische Komplexe. Bei Koexpression von BAK1 mit ACR4 ist daher keine Lebensdauerverkürzung aufgrund von FRET zu erwarten. BAK1-mCh wurde als Kontrolle verwendet, um den Einfluss der unspezifischen Interaktion von GFP und mCherry bei Koexpression auf die Fluoreszenz-Lebensdauer zu untersuchen. ACR4-GFP zeigt zusammen mit BAK1-mCh



**Abbildung 4.22. FRET-FLIM: Kontrollen und Bedeutung der TM.** Die Boxplots zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der FRET-FLIM Messungen an ACR4, CLV1 und BAK1, sowie Konstrukten mit ausgetauschter Transmembrandomäne (TM). Die fluorezenzgewichtet gemittelte Lebensdauer wurde in n MFIS Aufnahmen jeweils pixelweise bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Der Referenzbereich der GFP Fluoreszenz-Lebensdauer ohne Energietransfer ist grau unterlegt.

zwar eine Lebensdauerverkürzung von 71 ps, allerdings ist diese statistisch nicht signifikant ( $p = 0,14$ ) (Abb. 4.22, Tab. 4.3).

Mit weiteren Konstrukten wurde die Bedeutung der Transmembrandomäne (TM) für die Komplexbildung von ACR4 und CLV1 untersucht (Abb. 4.22). Hierzu wurde in ACR4 bzw. CLV1 die Transmembrandomäne gegen die TM von BAK1 ausgetauscht, sodass eine über die TM vermittelte Bindung gestört wird bzw. verloren geht. Tatsächlich führt die Verwendung von ACR4 und CLV1 mit ausgetauschter TM als FRET-Partner zu einer viel kleineren, statistisch nicht signifikanten Lebensdauerverkürzung als das unveränderte Protein (ACR4(TM):  $p = 0,23$ ; CLV1(TM):  $p = 0,12$ ) (Tab. 4.3). Es ist also davon auszugehen, dass sowohl die Transmembrandomäne von ACR4 als auch CLV1 für die Interaktion benötigt wird.



**Abbildung 4.23. FRET-FLIM: Komplexbildung von ACR4 und CLV1 an der PM.** Die Boxplots zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der FRET-FLIM Messungen an ACR4 und CLV1. Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer wurde in n MFIS Aufnahmen jeweils bestimmt (A) in einem Multi-ROI (vgl. Kapitel 4.3.1.2) und (B) pixelweise (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Der Referenzbereich der GFP Fluoreszenz-Lebensdauer ohne Energietransfer ist grau unterlegt.

Die präzisere spektroskopische Beschreibung mit einem bi-exponentiellen Modell bei der Auswertung von Multi-ROI liefert qualitativ die gleichen Aussagen über die Komplexbildung wie die pixelweise Analyse mit mono-exponentieller Anpassung (Vergleich Abb. 4.23 A und B):

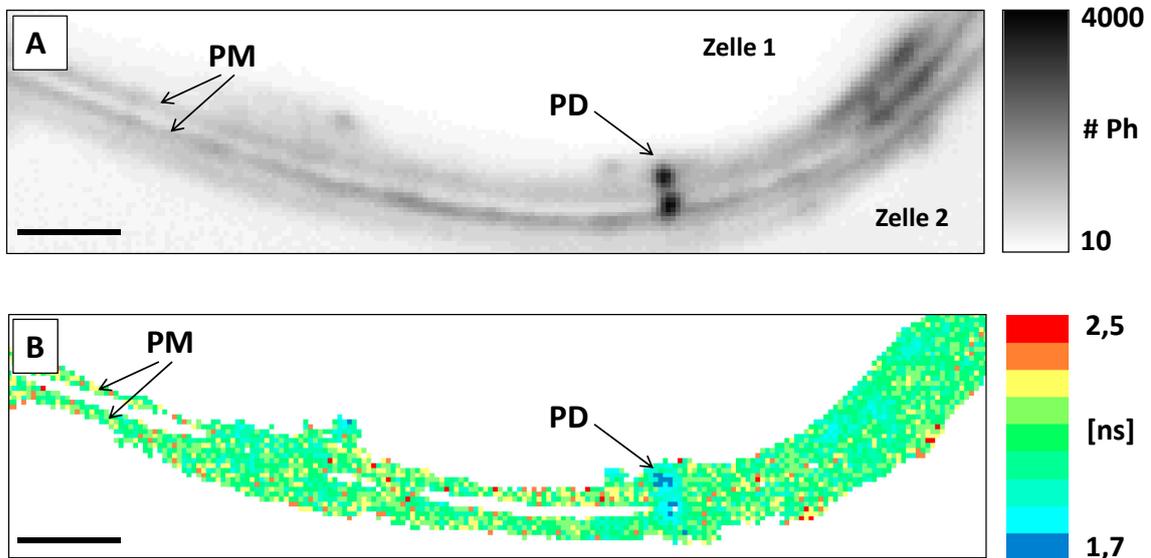
- ACR4 bildet Komplexe mit CLV1
- ACR4-GFP-mCherry zeigt intramolekularen FRET
- ACR4 bildet Homomere
- CLV1 bildet Homomere

Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Auswertemethoden ist wichtig für die spätere Untersuchung von kleinen Strukturen und Heterogenitäten im MFIS-Bild, da hierzu nur die pixelweise Auswertung zur Verfügung steht.

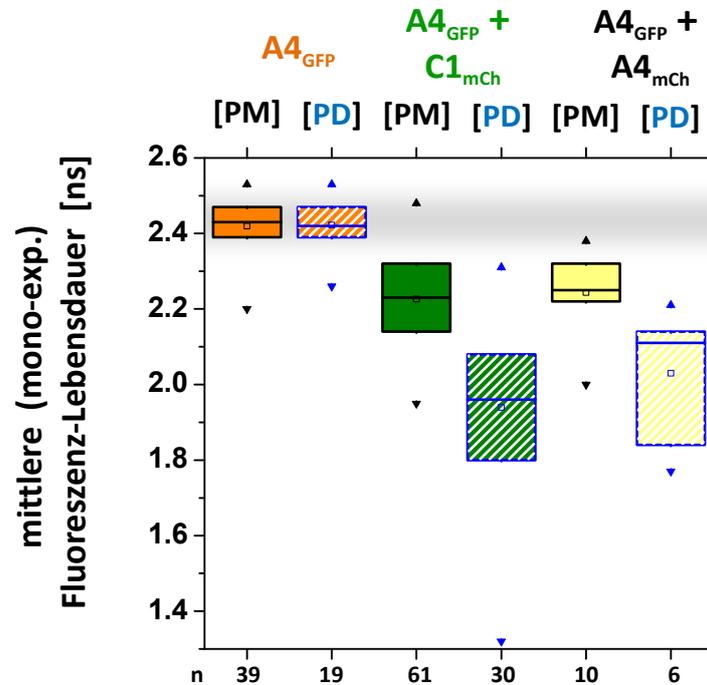
### 4.3.3. Komplexbildung an Plasmodesmata

ACR4 lokalisiert allein und koexprimiert mit CLV1 verstärkt an Plasmodesmata [Stahl et al. 2013] (vgl. Kapitel 1.2.2), die im Fluoreszenzbild als dicht zusammenliegende, kreisförmige Strukturen auf den Plasmamembranen zweier benachbarter Zellen zu erkennen sind (Abb. 4.24 A). Die Konzentration von ACR4-GFP, und damit die Fluoreszenz-Intensität, ist an Plasmodesmata etwa vierfach höher als an der Plasmamembran. Im Fluoreszenz-Lebensdauerbild von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCh ist außerdem zu erkennen, dass an PD die Fluoreszenz-Lebensdauer deutlich niedriger als an der PM ist (Abb. 4.24 B).

Zur systematischen Untersuchung der Plasmodesmata wurden diese in MFIS-Bildern mit einem ROI ausgewählt und die (pixelweise) Fluoreszenz-Lebensdauer in diesem ROI gemittelt. Zum Vergleich wurde im selben MFIS-Bild ein ähnlich großes ROI an der PM ausgewählt und dort ebenfalls die Fluoreszenz-Lebensdauer durch Mittelung bestimmt. Die Ergebnisse sind für ACR4-GFP, ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCh und ACR4-GFP koexprimiert mit ACR4-mCh, aufgeschlüsselt nach Plasmodesmata und Plasmamembran, in Abbildung 4.25 dargestellt und in Tabelle 4.3 zusammengefasst.



**Abbildung 4.24.** FRET-FLIM: Koexpression von ACR4-GFP und CLV1-mCh in Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. ACR4-GFP lokalisiert an der Plasmamembran (PM) und besonders an Plasmodesmata (PD). (A) Fluoreszenz-Intensitätsbild. (B) Zugehöriges Fluoreszenz-Lebensdauerbild. Pixel unterhalb des Photonenschwellwerts wurden von der Analyse ausgenommen und sind weiß dargestellt. Der Skalierungsbalken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.25. FRET-FLIM: Komplexbildung von ACR4 und CLV1 findet verstärkt an Plasmodesmata statt.** Die Boxplots zeigen zusammenfassend die Ergebnisse der FRET-FLIM Messungen an ACR4 und CLV1 an der Plasmamembran (PM) und an Plasmodesmata (PD). Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer wurde in n MFIS-Aufnahmen jeweils pixelweise bestimmt (vgl. Kapitel 4.3.1.1). Der Referenzbereich der GFP Fluoreszenz-Lebensdauer ohne Energietransfer ist grau unterlegt.

ACR4-GFP allein zeigt in PD und an der PM keinen Unterschied in der Fluoreszenz-Lebensdauer. Bei Koexpression von ACR4-GFP mit CLV1-mCh allerdings ist die Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP im Mittel an PD 287 ps niedriger als an der PM, bei Koexpression mit ACR4-mCh beträgt der Unterschied 214 ps.

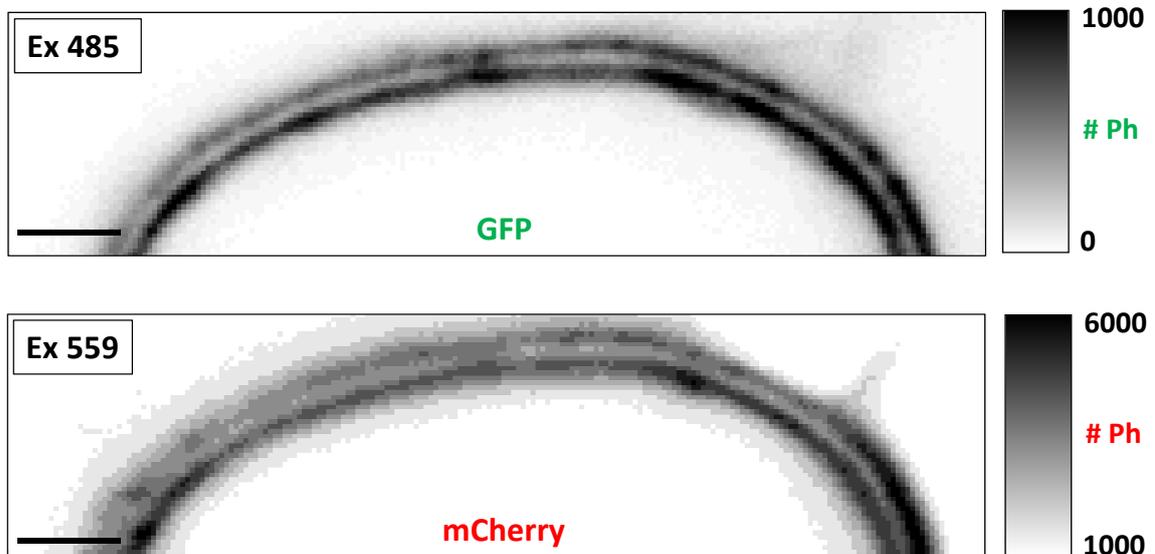
Dies weist darauf hin, dass ACR4 an PD verstärkt sowohl homomere Komplexe bildet als auch heteromere Komplexe mit CLV1.

**Tabelle 4.3.** Mittelwerte über  $n$  analysierte MFIS-Aufnahmen der fluoreszenzgewichtet gemittelten Lebensdauer mit Standardabweichung  $\sigma$  und  $p$ -Wert des  $t$ -Tests. Getestet wurde jeweils die Verteilung der FRET-Probe gegen die Verteilung der zugehörigen "donor only"-Probe. (A) Multi-ROI Analyse (vgl. Kap. 4.3.1.2). Bestimmung der Lebensdauer mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion bei ACR4-GFP und CLV1-GFP (Kap. 3.3.3.2) bzw. mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion mit fixierter Donor-Lebensdauer bei allen anderen Proben (Kap. 3.3.3.3). (B) Pixelweise Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer (vgl. Kap. 4.3.1.1) mit mono-exponentieller Modellfunktion (Kap. 3.3.3.1). (C) Pixelweise Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer in Plasmodesmata (vgl. Kap. 4.3.1.1 und 3.3.3.1). T-Test mit den Messwerten der gleichen Probe an der PM (B).

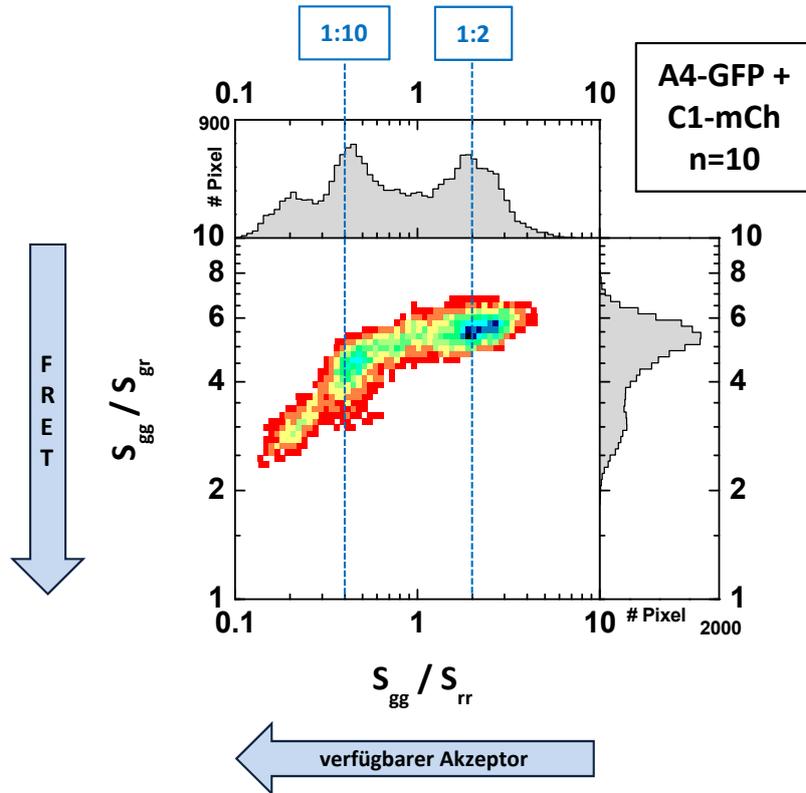
(A) Multi-ROI	F. Lebensdauer [ns]	$\sigma$ [ns]	n	p-Wert
A4 <sub>GFP</sub>	2,456	0,077	20	
A4 <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,250	0,096	57	4,7 E-12
A4 <sub>GFP-mCh</sub>	2,220	0,100	10	1,1 E-5
A4-TM <sub>GFP</sub>	2,424	0,038	10	
A4-TM <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,383	0,021	10	0,01
C1 <sub>GFP</sub>	2,497	0,051	13	
A4 <sub>GFP</sub> + A4 <sub>mCh</sub>	2,144	0,095	10	1,9 E-7
C1 <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,336	0,057	20	3,1 E-9
(B) Pixelweise	F. Lebensdauer [ns]	$\sigma$ [ns]	n	p-Wert
A4 <sub>GFP</sub>	2,420	0,066	39	
A4 <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,226	0,121	61	3,6 E-17
A4 <sub>GFP-mCh</sub>	2,118	0,190	12	1,7 E-4
A4 <sub>GFP</sub> + BAK1 <sub>mCh</sub>	2,349	0,133	10	0,14
A4-TM <sub>GFP</sub>	2,477	0,044	10	
A4-TM <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,448	0,060	10	0,23
C1 <sub>GFP</sub>	2,456	0,073	28	
C1 <sub>GFP</sub> + A4 <sub>mCh</sub>	2,185	0,206	29	1,1 E-7
C1-TM <sub>GFP</sub>	2,382	0,055	10	
C1-TM <sub>GFP</sub> + A4 <sub>mCh</sub>	2,328	0,088	10	0,12
A4 <sub>GFP</sub> + A4 <sub>mCh</sub>	2,244	0,115	10	8,2 E-4
C1 <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	2,366	0,061	16	1,7 E-5
(C) Plasmodesmata	F. Lebensdauer [ns]	$\sigma$ [ns]	n	p-Wert
A4 <sub>GFP</sub>	2,422	0,058	19	0,88
A4 <sub>GFP</sub> + C1 <sub>mCh</sub>	1,939	0,214	30	9,8 E-14
A4 <sub>GFP</sub> + A4 <sub>mCh</sub>	2,030	0,179	6	2,7 E-3

#### 4.3.4. Abhängigkeit vom Donor-Akzeptorverhältnis

Individuelle Zellen unterscheiden sich hinsichtlich FRET, so zeigen manche Zellen nur eine geringe Fluoreszenz-Lebensdauerverkürzung, besitzen also wahrscheinlich einen hohen Anteil von nicht-interagierendem Donor. Dies könnte im vorliegenden Verhältnis von Donor und Akzeptor begründet liegen. Der Expressionslevel der koexprimierten Konstrukte kann zwar durch die Konzentrationen der Bakterien bei der Infiltration der Pflanzen beeinflusst werden, der tatsächliche Expressionslevel in den individuellen Zelle hängt allerdings stark vom Zufall ab und ist generell zunächst nicht bekannt. Die Information, ob überhaupt genügend Akzeptor vorhanden ist, wird aber zur Beurteilung der FRET-Ergebnisse gebraucht. So kann bisher nicht entschieden werden, ob eine geringe Lebensdauerreduktion eine Folge einer niedrigen Affinität der komplexbildenden Proteine ist oder durch den Mangel an verfügbarem Akzeptor bedingt ist. Die direkte Anregung des Akzeptors mCherry (Abb. 4.26) liefert ein Maß, wieviel Akzeptor tatsächlich exprimiert und verfügbar ist.



**Abbildung 4.26. Fluoreszenz-Intensitätsbilder desselben Ausschnitts mit Donoranregung und direkter Akzeptoranregung** von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*. (oben) grüne Fluoreszenz-Intensität bei Anregung von GFP mit 485 nm, (unten) rote Fluoreszenz-Intensität bei direkter Anregung von mCherry mit 559 nm. Der Skalierungsbalken entspricht 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.27. Direkte und indirekte Akzeptorfluoreszenz.** 2d-Histogramm aus dem Grün-rot-Verhältnis  $S_{gg}/S_{gr}$  ( $S_{gr}$ : indirekte Akzeptoranregung, Donoranregung bei 485 nm) gegen das Grün-rot-Verhältnis  $S_{gg}/S_{rr}$  ( $S_{rr}$ : direkte Akzeptoranregung bei 559 nm).  $S_{gg}/S_{gr}$  ist ein Maß für FRET, während  $S_{gg}/S_{rr}$  das molekulare Verhältnis von Donor und Akzeptor enthält. Das Histogramm wurde generiert aus  $n=10$  MFIS-Aufnahmen von ACR4-GFP ko-exprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana*. Die blauen Linien geben das GFP-zu-mCherry-Verhältnis an, das dem Wert von  $S_{gg}/S_{rr}$  entspricht, der sich theoretisch aus den Zählraten pro Molekül aus FCS-Messungen ergibt (ohne Berücksichtigung von Quenching durch FRET).

In Abbildung 4.27 sind die beiden Grün-rot-Verhältnisse  $S_{gg}/S_{gr}$  und  $S_{gg}/S_{rr}$  in einem 2d-Histogramm gegeneinander aufgetragen. Das Grün-rot-Verhältnis bei indirekter Akzeptoranregung  $S_{gg}/S_{gr}$  ist ein Maß für FRET. Mit zunehmendem Energietransfer steigt die durch FRET indirekt angeregte Akzeptorfluoreszenz  $S_{gr}$ , infolgedessen sinkt das Grün-rot-Verhältnis  $S_{gg}/S_{gr}$ . Das Grün-rot-Verhältnis bei direkter Akzeptoranregung  $S_{gg}/S_{rr}$  enthält das molekulare Verhältnis von Donor und Akzeptor. Mit zunehmendem Akzeptoranteil sinkt  $S_{gg}/S_{rr}$ .

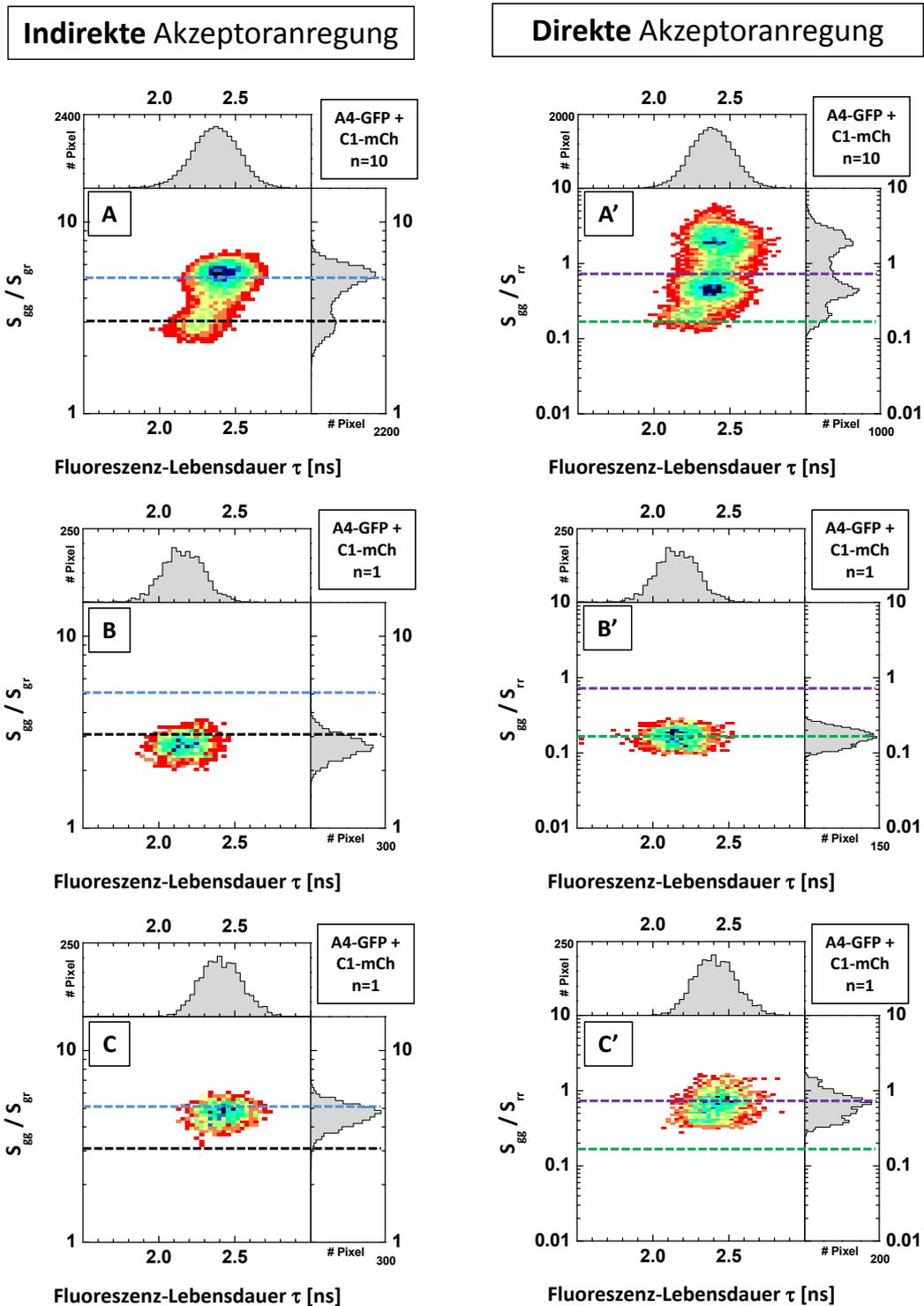
Das dem Grün-rot-Verhältnis  $S_{gg}/S_{rr}$  zugrunde liegende tatsächliche Molekülverhältnis kann über die Zählraten pro Molekül von GFP und mCherry aus FCS-Messungen abgeschätzt werden. Hierzu werden FCS-Messungen an freiem GFP und mCherry durchgeführt,

jeweils bei Messbedingungen, die auch für die MFIS-Aufnahmen verwendet wurden, insbesondere bei gleicher Anregungsleistung und gleicher Lochblende. Die Zählrate pro Molekül beträgt für GFP 8 kHz (vgl. Kapitel 4.6 Tabelle 4.8) und für mCherry 2 kHz (vgl. Anhang A.0.1). Daraus ergeben sich theoretische Werte<sup>1</sup> für  $S_{gg}/S_{rr}$ , die in Abbildung 4.27 als blaue Linien eingezeichnet sind. Anhand der Linien lässt sich erkennen, dass sich das tatsächliche Expressionsverhältnis von GFP und mCherry in den 10 untersuchten Zellen etwa zwischen 1:2 und 1:10 bewegt. Eine Zelle besitzt einen höheren Akzeptoranteil (1:20) und bildet die Population bei  $S_{gg}/S_{rr}$  0,2. Mit zunehmendem Akzeptoranteil nimmt auch der Energietransfer zu. Bei sehr niedrigem Akzeptoranteil beträgt  $S_{gg}/S_{gr}$  etwa sechs, bei ausgeprägterem FRET drei.

Die Auftragung der beiden Grün-rot-Verhältnisse gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer in Abbildung 4.28 zeigt, dass erst ein hoher Akzeptoranteil zu einer deutlichen Lebensdauerverkürzung führt (A, A'). Es ist wichtig anzumerken, dass die in Abb. 4.28 (A) und (A') zu erkennenden Pixelpopulationen von einzelnen Zellen stammen. Als Beispiel sind in Abb. 4.28 (B, B', C, C') die 2d-Histogramme von zwei einzelnen Zellen dargestellt, die sowohl hinsichtlich  $S_{gg}/S_{rr}$  als auch  $S_{gg}/S_{gr}$  homogene Pixel-Populationen bilden. Das bedeutet, dass an der Plasmamembran einer Zelle ein homogenes Expressionsverhältnis von Donor und Akzeptor vorherrscht und das Auftreten von FRET keine lokalen Heterogenitäten zeigt, abgesehen von Plasmodesmata. Je nach Akzeptoranteil enthält die Gesamtheit der exprimierten FP-Fusionen mehr oder weniger nicht-interagierenden Donor bzw. FRET-Spezies-Anteil, die aber immer zusammen in einem Pixel vorliegen. Die FRET-Population kann also nicht in einer Pixel-Subpopulation abgetrennt und näher quantifiziert werden. Stattdessen wird im nächsten Abschnitt das Pixel-Ensemble mit einer geeigneten Modellfunktion angepasst, um die FRET-Population näher zu beschreiben.

---

<sup>1</sup>ohne Berücksichtigung von Quenching durch FRET



**Abbildung 4.28. Zusammenhang von Fluoreszenz-Lebensdauer und direkter und indirekter Akzeptorfluoreszenz von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry.** (linke Spalte) 2d-Histogramme des Grün-rot-Verhältnisses  $S_{gg}/S_{gr}$  ( $S_{gr}$ : indirekte Akzeptoranregung bei 485 nm) gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$ . (rechte Spalte) 2d-Histogramme des Grün-rot-Verhältnisses  $S_{gg}/S_{rr}$  ( $S_{rr}$ : direkte Akzeptoranregung bei 559 nm) gegen die Fluoreszenz-Lebensdauer  $\tau$ . Die Histogramme wurden generiert aus  $n=10$  (A, A') MFIS-Aufnahmen von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. b.*. Die 2d-Histogramme zweier ausgewählter Aufnahmen sind in (B, B') und (C, C') dargestellt. Die horizontalen Linien dienen dem besseren Vergleich und markieren identische Grün-rot-Verhältnisse.

### 4.3.5. Quantifizierung der FRET-Population

Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer diente im vorigen Abschnitt dazu, FRET zwischen GFP und mCherry und damit die Komplexbildung der fusionierten Proteine nachzuweisen. Darüber hinaus kann mit einem geeigneten Fitmodell die FRET-Population quantifiziert und zugehörige FRET-Effizienzen bestimmt werden.

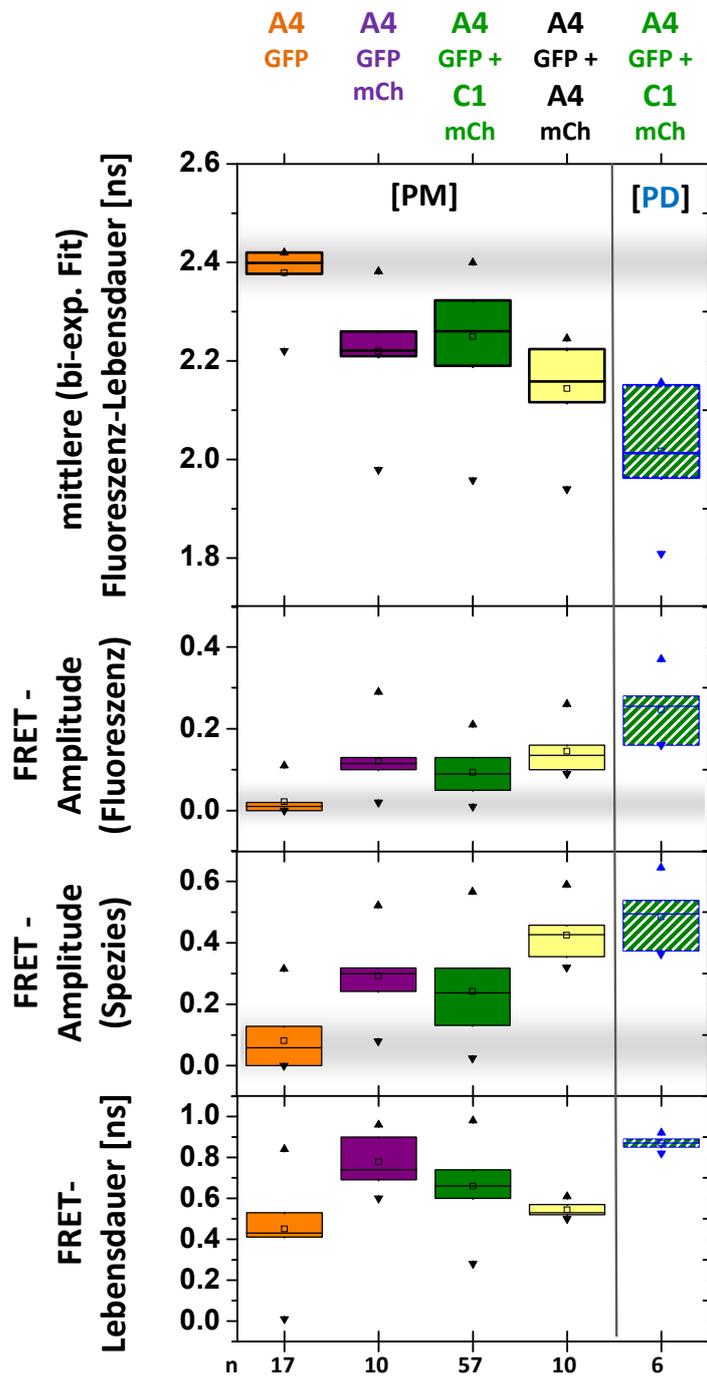
Zur Beschreibung der Komplexbildung von ACR4-GFP wurde ein Modell angenommen, das eine nicht-interagierende Donor-Population und eine FRET-Population beschreibt (Kap. 3.3.3.3). Die mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer von ACR4-GFP wurde zuvor in *donor-only*-Proben bestimmt (Tab. 4.3 B) und in der folgenden Analyse festgehalten. Das Auftreten einer Population mit niedrigerer Fluoreszenz-Lebensdauer ist hier das entscheidende Kriterium, ob FRET vorliegt, und wird mit der Population der interagierenden, komplexbildenden Donoren identifiziert.

In Abbildung 4.29 sind die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer, die Fluoreszenz- und Spezies-Amplituden sowie die Lebensdauer der FRET-Population von  $n$  MFIS-Messungen an ACR-GFP-mCherry, ACR4-GFP mit CLV1-mCherry und ACR4-GFP mit ACR4-mCherry zusammengefasst. Die zugehörigen Mittelwerte mit Standardabweichung finden sich in Tabelle 4.4.

Die Hetero-FRET-Proben ACR4-GFP-mCherry, ACR4-GFP+CLV1-mCherry (an PM und PD) und ACR4-GFP+ACR4-mCherry enthalten jeweils eine Komponente mit kurzer Fluoreszenz-Lebensdauer, deren Amplitude höher ist als die der Probe mit allein exprimiertem ACR4-GFP. Es handelt sich nach obigem Kriterium folglich bei dieser Komponente um eine FRET-Population.

Die Spezies-Amplituden  $x_{FRET}$  der FRET-Population liegen zwischen 24 und 49 % und offenbaren, dass in allen Proben über die Hälfte der Donor-Moleküle gar keinen Energietransfer zeigen und nicht zur mittleren Lebensdauerverkürzung der Probe beitragen.

Die Tatsache, dass auch ACR4-GFP ohne die Anwesenheit von mCherry mit 0,082 eine von Null verschiedene FRET-Amplitude zeigt, ist auf die Varianz der Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors zurückzuführen, die mit der festgehaltenen Lebensdauer in der Anpassung nicht erfasst wird.



**Abbildung 4.29. FRET-FLIM: Parameter des Zwei-Spezies-Modells.** Die Boxplots zeigen zusammenfassend die Parameter der Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion, die eine nicht-interagierende Donor-Spezies mit fester Lebensdauer und eine FRET-Spezies beschreibt (Kap.3.3.3.3). Der Anteil der FRET-Spezies (FRET-Amplitude), deren mittlere Lebensdauer als FRET-Lebensdauer bezeichnet wird, ist als Fluoreszenz- und Spezies-Amplitude angegeben. Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer wurde in Multi-ROI bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Die FRET-Proben zeigen Lebensdauern der FRET-Spezies  $\tau_{FRET}$  zwischen 0,5 und 0,9 ns, die effizientem Energietransfer bei Chromophorabständen unter dem Försterradius zuzuordnen sind. ACR4-Homomere besitzen mit 0,54 ns eine kürzere FRET-Lebensdauer als ACR4-CLV1-Heteromere mit 0,66 ns. Dies könnte daher rühren, dass der Abstand von GFP und mCherry in einem ACR4-Dimer kürzer ist als in einem ACR4-CLV1-Heteromer. Interessanterweise besitzen ACR4-CLV1-Heteromere an PD eine längere FRET-Lebensdauer als an der Plasmamembran. Dies lässt vermuten, dass sich an PD andere Komplexe als an der PM bilden.

Generell ist anzumerken, dass die Fehlergrenzen von Fluoreszenz-Lebensdauer und Spezies-Amplitude der FRET-Population nicht durch die Standardabweichung wiedergegeben werden. Diese reflektiert nur die Streuung zwischen einzelnen MFIS-Bildern bei gleichen Fitparametern. Die Genauigkeit der Kurvenanpassung kann deutlich schlechter sein (siehe Anhang A.0.3). Die Fluoreszenz-Amplituden der FRET-Spezies liegen nur bei etwa bei 10%. Dies entspricht einer Photonenzahl, die eine Quantifizierung der FRET-Spezies nur innerhalb großer Fehlergrenzen (>20%) zulässt [Ma 2010], [Qijun Ma und Stanislav Kalinin, unveröffentlichte Simulationen]. Vor diesem Hintergrund sind die Unterschiede der Fluoreszenz-Lebensdauern der FRET-Proben nicht signifikant.

**Tabelle 4.4. FRET-FLIM: Parameter des Zwei-Spezies-Modells.** Parameter der Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion, die eine nicht-interagierende Donor-Spezies mit fester Lebensdauer und eine FRET-Spezies beschreibt (Kap.3.3.3.3). Fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer  $\langle\tau\rangle_f$ , Fluoreszenz-Amplitude der FRET-Spezies  $f_{FRET}$ , Spezies-Amplitude der FRET-Spezies  $x_{FRET}$ , mittlere Lebensdauer der FRET-Spezies (FRET-Lebensdauer)  $\tau_{FRET}$ , n Anzahl der analysierten MFIS-Bilder.

	$A4_{GFP}$	$A4_{GFP-mCh}$	$A4_{GFP+C1_{mCh}}$	$A4_{GFP+A4_{mCh}}$	$A4_{GFP+C1_{mCh}}$ PD
$\langle\tau\rangle_f$ [ns]	2,379	2,220	2,250	2,144	2,017
	$\pm 0,055$	$\pm 0,100$	$\pm 0,095$	$\pm 0,095$	$\pm 0,132$
$f_{FRET}$	0,022	0,120	0,094	0,145	0,247
	$\pm 0,030$	$\pm 0,068$	$\pm 0,053$	$\pm 0,053$	$\pm 0,081$
$x_{FRET}$	0,082	0,292	0,242	0,425	0,485
	$\pm 0,089$	$\pm 0,109$	$\pm 0,137$	$\pm 0,084$	$\pm 0,108$
$\tau_{FRET}$ [ns]	0,451	0,779	0,659	0,544	0,870
	$\pm 0,216$	$\pm 0,121$	$\pm 0,132$	$\pm 0,035$	$\pm 0,034$
n	17	10	57	10	6

### 4.3.6. Zusammenfassung und Diskussion der FRET-FLIM-Messungen

#### **Pixelweise und Multi-ROI-Analyse sind äquivalent.**

Bei der Bestimmung der Fluoreszenz-Lebensdauer lieferten die pixelweise Analyse mit vereinfachter Modellfunktion bei niedriger Photonenzahl und die Multi-ROI-Analyse mit bi-exponentieller Modellfunktion bei höherer Photonenzahl äquivalente Ergebnisse, um das Vorliegen von FRET zwischen den Rezeptorkinase ACR4 und CLV1 zu beurteilen. Das bedeutet insbesondere, dass die Verteilung von ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran im Bereich der Pixelgröße homogen ist.

#### **ACR4 und CLV1 bilden heteromere und homomere Komplexe.**

Die FRET-FLIM-Messungen in *N. benthamiana* ergaben signifikante Fluoreszenz-Lebensdauerverkürzungen des Donors GFP bei Koexpression von GFP- mit mCherry-Fusionen von CLV1 und ACR4. Daraus lässt sich auf die Komplexbildung der RK schließen. ACR4 und CLV1 bilden heteromere Komplexe. Bei den FRET-FLIM-Messungen spielte es keine Rolle, welche RK den Donor bzw. den Akzeptor trug. Das spricht dafür, dass der Komplex ACR4 und CLV1 zu gleichen Teilen enthält, im einfachsten Fall also als Dimer vorliegt. Sowohl ACR4 als auch CLV1 bilden homomere Komplexe.

#### **ACR4 bildet verstärkt an Plasmodesmata heteromere und homomere Komplexe.**

Die pixelweise Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer ermöglichte die Bestimmung von FRET mit hoher räumlicher Auflösung, sodass die Komplexbildung von ACR4 an Plasmodesmata, deren Größe mit unter einem Mikrometer nur wenige Pixel umfasst, aufgeschlüsselt werden konnte. An Plasmodesmata zeigte ACR4-GFP sowohl koexprimiert mit ACR4-mCherry als auch CLV1-mCherry eine deutlich stärkere Verkürzung der Fluoreszenz-Lebensdauer als an der Plasmamembran. Dies kann auf einen kürzeren Abstand von GFP und mCherry im Komplex zurückzuführen sein. Ein kürzerer Abstand kann durch die Bildung eines Komplexes mit anderer Zusammensetzung oder durch Umstrukturierung innerhalb des Komplexes entstehen. Die erhöhte FRET-Spezies-Amplitude an PD, die mit der Analyse mit einem Zwei-Spezies-Modell bestimmt wurde, spricht allerdings dafür, dass sich an PD mehr Komplexe bilden als an der PM. Es ist daher davon auszugehen, dass ACR4 an PD verstärkt sowohl heteromere Komplexe mit CLV1 als auch homomere Komplexe bildet.

**Die FRET-Population ist nicht gleich dem Anteil der gebildeten Komplexe.**

Die Verkürzung der Lebensdauer war in einzelnen Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Analyse mit einem Modell, dass eine nicht-interagierende Donor-Population und eine FRET-Population annimmt, zeigte, dass diese Schwankungen auf den unterschiedlich großen Anteil der FRET-Population zurückzuführen sind. Die Ergebnisse von ACR4-GFP-mCherry zeigen, dass die FRET-Population nur einen Teil der gebildeten Komplexe darstellt. In diesem GFP-mCherry-Dimer tragen weniger als ein Drittel (29%) der Donor-Moleküle zu FRET bei. Dies liegt zum Teil an unreifem mCherry, dessen Anteil abhängig vom Konstrukt ist, aber durchaus geringer sein kann als die hier beobachteten 71% [Padilla-Parra et al. 2009] bzw. ganz zu vernachlässigen sein kann [Albertazzi et al. 2009].

Der niedrige Speziesanteil der Positivkontrolle, die GFP und mCherry als Dimer enthält, macht deutlich, dass der Anteil der FRET-Population nicht gleich dem Anteil der vorliegenden Komplexe ist. Vor diesem Hintergrund sind die erhaltenen Speziesanteile der FRET-Population bei den Koexpressionen von GFP- und mCherry-Fusionen zu interpretieren.

Tatsächlich deckt sich der FRET-Speziesanteil von ACR4-GFP+ACR4-mCherry mit 43% mit dem von [Padilla-Parra et al. 2009] berichteten Spezies-Anteil von 45% eines GFP-mCherry-Paares. Es ist daher wahrscheinlich, dass ACR4 praktisch vollständig als Dimer vorliegt.

ACR4-GFP+CLV1-mCherry besitzt mit 76% mehr nicht-interagierenden Donor als es für ein vollständiges Dimer zu erwarten wäre. Das bedeutet, dass nur ein Teil der ACR4-Moleküle in heteromeren Komplexen mit CLV1 vorliegt. Das Verhältnis von Komplex und freien Rezeptoren spiegelt dann im Wesentlichen die Affinität von ACR4 und CLV1 wider, die offenbar geringer ist als die von ACR4 zu sich selbst.

An Plasmodesmata ist die FRET-Spezies-Amplitude von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry mit 49% doppelt so hoch wie an der Plasmamembran (24%) und entspricht der eines Dimers. Das bedeutet, dass an PD praktisch alle ACR4-Moleküle im Komplex mit CLV1 vorliegen.

**Das verwendete GFP-mCherry-Dimer als FRET-Positivkontrolle.**

ACR4-GFP koexprimiert mit ACR4-mCherry besitzt mit 43% einen höheren FRET-Spezies-Anteil als die Positivkontrolle ACR4-GFP-mCherry mit 29%. Daraus folgt, dass ACR4-GFP-mCherry keine perfekte Positivkontrolle darstellt, die den maximal möglichen FRET-Spezies-Anteil eines GFP-mCherry-Paares liefert. Dieser Wert könnte nämlich nicht überschritten werden, da er den Fall beschreibt, dass alle Donor-Moleküle einen FRET-Partner haben, der zu einem intrinsischen, unabhängigen Anteil funktional ist. Es gibt

keine Hinweise darauf, dass ACR4-GFP-mCherry Donor und Akzeptor nicht im Verhältnis 1:1 enthält. Allerdings hat die Erfahrung mit dem mCherry-Dimer gezeigt, dass der Anteil von funktionalem mCherry offenbar abhängig vom Konstrukt ist und stark schwanken kann (vgl. Kap. 4.2.4.4). Die Wahrscheinlichkeit ist daher durchaus groß, dass mCherry im Konstrukt ACR4-GFP-mCherry nur zu einem geringeren Anteil funktional ist, als es maximal möglich wäre. Zusätzlich könnte die Ausrichtung der Chromophore von GFP und mCherry zueinander bei der Aneinanderreihung der beiden FP nicht optimal sein und daher nicht die maximal mögliche FRET-Population ausbilden. Der verwendete Linker zwischen GFP und mCherry mit 21 Aminosäuren kann theoretisch eine Länge bis zu 3 nm besitzen<sup>2</sup> und damit eine Vielzahl von Orientierungen und Abständen der Chromophore zueinander ermöglichen. Eine ungünstige Orientierung  $\kappa^2$  von Donor und Akzeptor zueinander führt zu weniger oder gar keinem FRET und erhöht den Anteil an nicht-interagierenden Donor-Molekülen. Abstände der Chromophore größer dem Försterradius von 5 nm [Albertazzi et al. 2009] erhöhen die Fluoreszenz-Lebensdauer der FRET-Spezies und können mit dem verwendeten Modell unter Umständen nicht von der Lebensdauer des nicht-interagierenden Donors unterschieden werden. Insbesondere wird im Modell keine Verteilung der Abstände und damit Lebensdauern berücksichtigt. [Albertazzi et al. 2009] konnten zeigen, dass sich die Fluoreszenz-Lebensdauer eines GFP-mCherry-Dimers mit einem Linker aus 20 Aminosäuren am besten mit einem gestreckt-exponentiellen Modell anpassen lässt, das eine Verteilung der Abstände beschreibt.

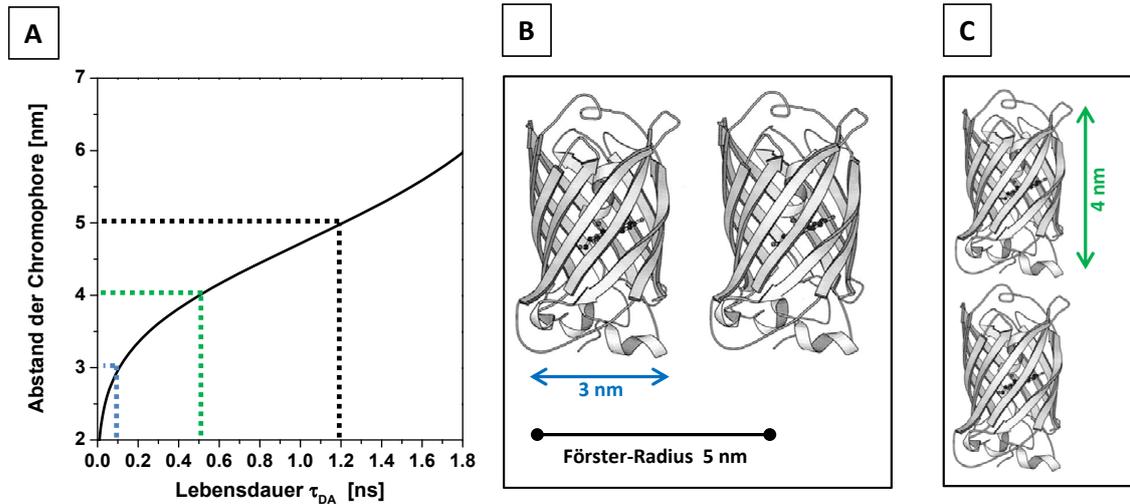
Das verwendete GFP-mCherry-Dimer eignet sich qualitativ als FRET-positiv-Kontrolle. Durch die oben aufgeführten Einschränkungen eignet es sich allerdings nicht dazu, als Maß für die Spezies-Amplitude eines Dimers zu dienen.

#### **FRET-Effizienzen und Abstände**

Die Fluoreszenz-Lebensdauer der FRET-Spezies liefert die FRET-Effizienz und den Abstand von Donor und Akzeptor innerhalb der Komplexe. Die FRET-Effizienz von GFP und mCherry in der Positivkontrolle ACR4-GFP-mCherry beträgt 0,68 und ist vergleichbar mit der FRET-Effizienz von 0,58 eines GFP-mCherry-Dimers in Säugerzellen [Padilla-Parra et al. 2009]. Die FRET-Effizienzen von ACR4-GFP mit CLV1-mCherry und ACR4-GFP mit ACR4-mCherry liegen in einem ähnlichen Bereich (ACR4-GFP+CLV1-mCherry **PM**: 0,65; ACR4-GFP+CLV1-mCherry **PD**: 0,73; ACR4-GFP+ACR4-mCherry: 0,78) und sprechen für eine Bildung von heteromeren und homomeren Komplexen als Dimere. Die FRET-Effizienzen entsprechen Chromophorabständen zwischen 4,0 und 4,5 nm (vgl. Abb. 4.30).

---

<sup>2</sup>Abschätzung über die Bindungslänge einer C-Doppelbindung (1,5 Å) und C-N-Bindung (1,3 Å) [Stryer et al. 2000] ohne Berücksichtigung der Sekundärstruktur.



**Abbildung 4.30. Mögliche Chromophorabstände von GFP und mCherry und daraus resultierende Fluoreszenz-Lebensdauer.** (A) Zusammenhang von Chromophoranstand und Fluoreszenz-Lebensdauer nach Gleichung 2.10 mit einem Försterradius von 5 nm [Albertazzi et al. 2009]. Markierung von Wertepaaren: (blau) Der minimale Abstand der Chromophore beträgt 3 nm bei horizontaler Ausrichtung der FP-Moleküle (B). (grün) Der minimale Abstand der Chromophore beträgt 4 nm bei vertikaler Ausrichtung der FP-Moleküle zueinander (C). Abmessungen des GFP  $\beta$ -barrel nach [Yang et al. 1996].

### Abschätzung von Konzentrationen

Die Konzentrationen von ACR4 und CLV1 bei den MFIS-Messungen in *N. benthamiana* können abgeschätzt werden. FCS-Messungen unter gleichen Bedingungen liefern die Zählrate pro Molekül für GFP und mCherry und das konfokale Volumen, das hier möglichst klein gewählt wurde, um die Lokalisation an der Plasmamembran zu berücksichtigen. Die Zählrate in einem Pixel eines MFIS-Bildes liefert dividiert durch die Zählrate pro Molekül eine Anzahl von Molekülen in einem Pixel. Division durch das konfokale Volumen ergibt die Konzentration von GFP bzw. mCherry. Diese liegt für GFP zwischen 200 - 750 nM und für (funktionales) mCherry zwischen 500 nM und 3  $\mu$ M. Hier ist zu beachten, dass die Konzentration der mit mCherry fusionierten Proteine mindestens doppelt so hoch ist, da nicht alle mCherry-Moleküle funktional sind. Die Konzentration der mit GFP fusionierten Proteine wird auch höher liegen, da bei der Konzentrationsabschätzung über das Fluoreszenzsignal Quenching durch FRET nicht berücksichtigt wurde.

Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die fusionierten Proteine membranständig sind und daher nicht das ganze dreidimensionale konfokale Volumen ausfüllen. Die lokale Konzentration in der Plasmamembran wird daher höher sein als die abgeschätzte.

### **Expressionsverhältnis von Donor und Akzeptor**

Die direkte Akzeptoranregung liefert neben der absoluten Konzentration von mCherry (s.o.) das vorliegende Verhältnis von GFP und mCherry in der untersuchten Zelle. In neun von zehn untersuchten Zellen, die ACR4-GFP und CLV1-mCherry koexprimierten, lag das Verhältnis von GFP zu mCherry zwischen 1:2 und 1:10. Das Verhältnis wurde mit den Zählraten pro Molekül aus FCS-Messungen abgeschätzt (s.o.). Eine Zelle besaß ein höheres Verhältnis von etwa 1:20. Nur diese Zelle zeigte eine deutlich reduzierte Fluoreszenz-Lebensdauer, deren Wert dem Mittelwert aller  $n = 57$  Proben entspricht. Es ist also davon auszugehen, dass das Expressionsverhältnis in den zehn mit direkter Akzeptoranregung gemessenen Zellen nicht repräsentativ für den gesamten Datensatz ist, sondern im Mittel in den Zellen, die FRET zeigten, CLV1-mCherry im deutlichen Überschuss vorlag. Die Abschätzung des Donor-Akzeptor-Verhältnisses mit 1:20 wird hier ungenau, da das Quenching des Donors durch FRET nicht berücksichtigt wird und der Donor-Anteil damit unterschätzt wird.

### **Affinität der interagierenden Proteine**

Die Bestimmung der Akzeptorkonzentration durch direkte Anregung von mCherry offenbart, dass die z. T. geringe Lebensdauerreduktion, also wenig FRET, nicht durch Akzeptormangel verursacht ist. Donor und Akzeptor sind immer mindestens im Verhältnis 1:1 exprimiert. Die Tatsache, dass FRET mit steigendem Akzeptoranteil zunimmt, ist daher auf die vorherrschenden absoluten Konzentrationen von ACR4 und CLV1 zurückzuführen und die ihrer Bindungskonstanten entsprechenden Komplexkonzentration.

Die Größenordnung der Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung von ACR4 und CLV1  $K_D = [A4-C1]/[A4]*[C1]$  kann mit den oben abgeschätzten Konzentrationen von ACR4-GFP und CLV1-mCherry und der FRET-Spezies-Amplitude zu  $10^{-1} \mu\text{M}$  abgeschätzt werden<sup>3</sup>.

---

<sup>3</sup> $[A4] + [A4-C1] = 500 \text{ nM}$ ,  $[C1] + [A4-C1] = 3 \mu\text{M}$ , 24 % FRET-Spezies-Amplitude ergibt  $[A4-C1] = 120 \text{ nM}$

## 4.4. Untersuchung von homomerer Komplexbildung mit Fluoreszenz-Anisotropie

Der Förster-Resonanz-Energietransfer zwischen gleichartigen Chromophoren (Homo-FRET) führt nicht zu einer Änderung der Fluoreszenz-Lebensdauer, da der Energietransfer symmetrisch beide Chromophore betrifft. Allerdings führt Homo-FRET zu einer Depolarisierung der Fluoreszenz und kann daher mittels der Fluoreszenz-Anisotropie gemessen werden.

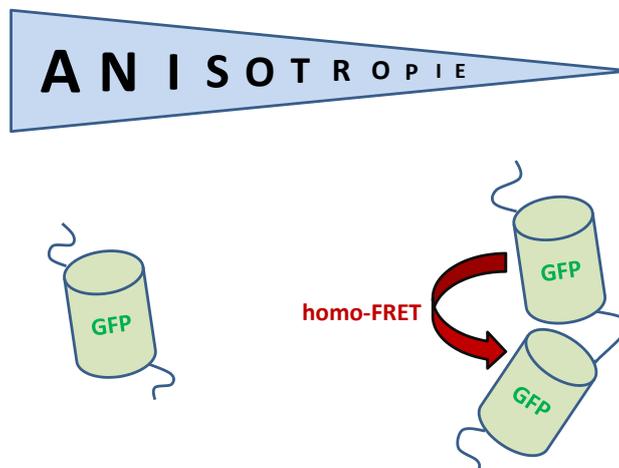
Die stationäre Anisotropie ist im Experiment leicht zugänglich, pixelweise bestimmbar und ermöglicht eine Totzeitkorrektur (Kap. 3.3.4). Sie soll daher in MFIS dazu verwendet werden, Homo-FRET pixelweise zu detektieren. Allerdings muss beachtet werden, dass die stationäre Anisotropie einen Mittelwert in einem Zeitintervall, hier der Zeit zwischen zwei Laserpulsen, darstellt. Neben Homotransfer wird die Fluoreszenz-Anisotropie von der Rotationsdiffusion und Orientierung des Fluorophors beeinflusst. Die stationäre Anisotropie kann diese Einflüsse nicht unterscheiden, sondern ist ein Maß für die mittlere Depolarisierung des beobachteten Moleküls.

Daher ist es notwendig, Effekte durch anisotrope Orientierung auszuschließen sowie die Depolarisierung durch Rotationsdiffusion und durch Homotransfer zu trennen. Hierzu wurden Analysen mit zeitaufgelöster Fluoreszenz-Anisotropie sowie progressives Photobleichen durchgeführt.

Abschließend wird die homomere Komplexbildung der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 diskutiert, insbesondere im Hinblick auf die Verlässlichkeit der stationären Fluoreszenz-Anisotropie als Maß für Homo-FRET.

### 4.4.1. Nachweis von Homo-FRET mit stationärer Fluoreszenz-Anisotropie

Zunächst werden die stationären Fluoreszenz-Anisotropien von bekannten Molekülen untersucht und quantifiziert sowie die Einflüsse von Umgebungs- und Messbedingungen bestimmt. Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von freiem GFP dient hier als Referenz für Depolarisierung aufgrund von Rotationsdiffusion. Ein GFP-Dimer wird als Positivkontrolle für Homotransfer verwendet.



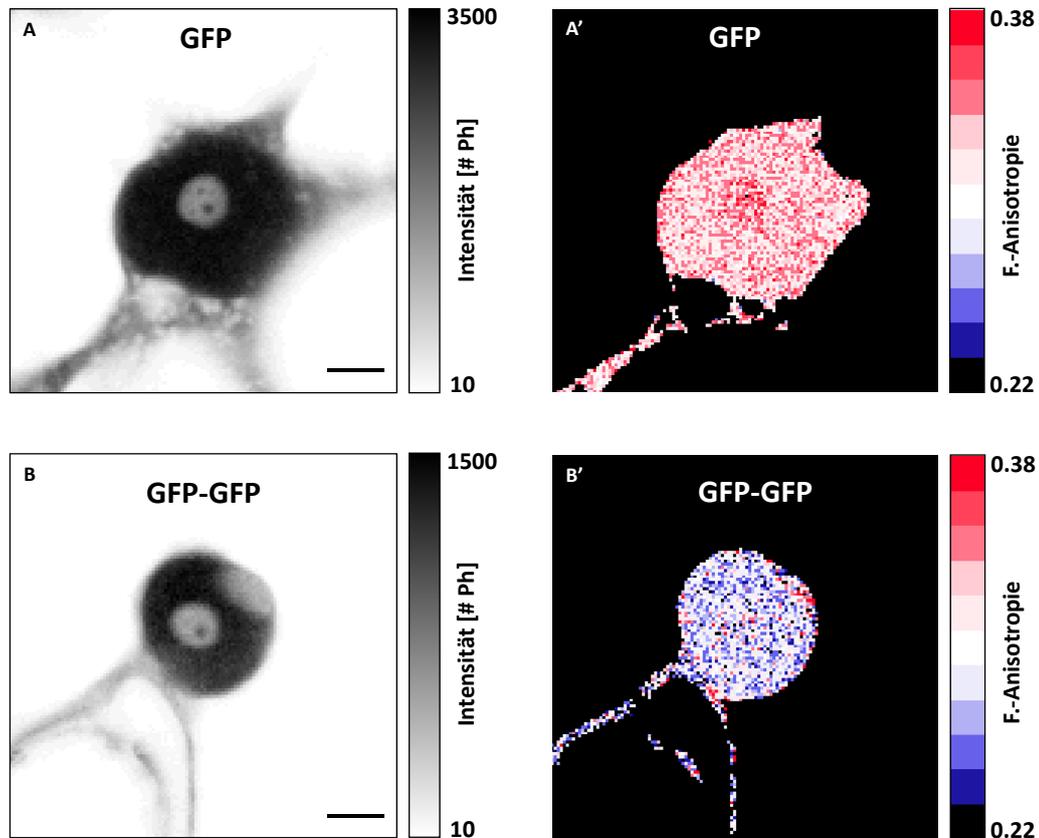
**Abbildung 4.31. Schema von Homo-FRET an GFP-GFP.** Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von GFP-GFP ist durch das Auftreten von Homo-FRET zwischen den GFP-Molekülen eines Dimers niedriger als von monomerem GFP.

Die stationäre Anisotropie von frei diffundierendem GFP im Zytoplasma einer Zelle beträgt 0,33, die intrinsische Anisotropie von GFP liegt dagegen bei 0,38. Diese Depolarisierung wird durch die Rotation des GFP-Moleküls innerhalb der Fluoreszenz-Lebensdauer hervorgerufen und durch die Rotationskorrelationszeit beschrieben, die für freies GFP in Lösung zu 14 ns [Borst und Visser 2010], 16 ns [Volkmer et al. 2000] und 20 ns [Swaminathan et al. 1997] bestimmt wurde.

Durch Homo-FRET zwischen GFP-Molekülen wird deren Fluoreszenz stärker depolarisiert als dies allein durch Rotationsdiffusion der Fall wäre. Dies führt zu einer niedrigeren stationären Fluoreszenz-Anisotropie im Vergleich zu GFP ohne Homo-FRET. Im Folgenden wird dies am Beispiel eines GFP-Dimers demonstriert.

Hier handelt es sich um eine Fusion von zwei GFP-Molekülen, die über einen Linker aus 21 Aminosäuren verbunden sind. Der GFP-Dimer (GFP-GFP) und monomeres GFP wurden jeweils frei in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* exprimiert und unter den üblichen Bedingungen mit MFIS untersucht (Kapitel 3.2).

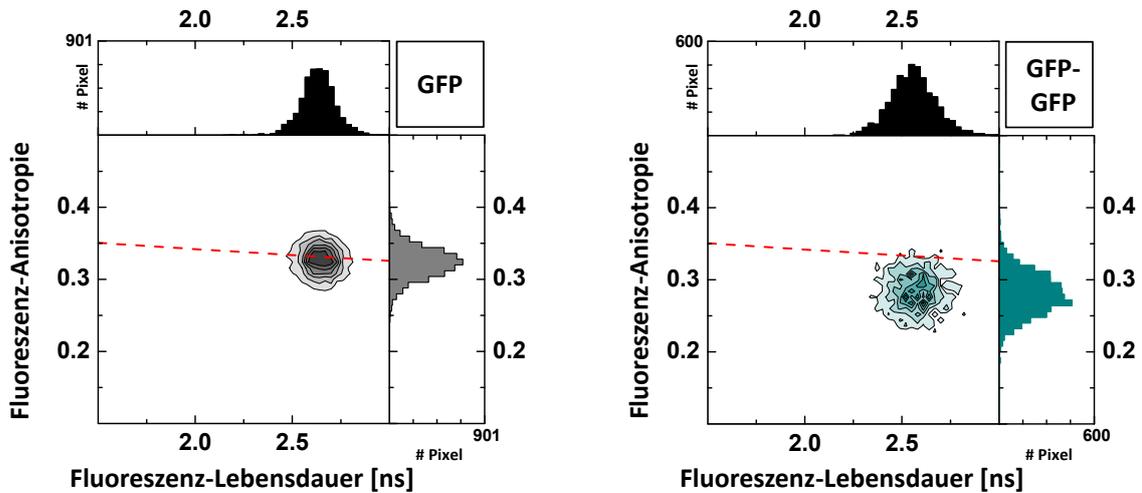
In Abbildung 4.32 ist für freies GFP und GFP-GFP jeweils das Fluoreszenz-Intensitätsbild (schwarz-weiß) und Fluoreszenz-Anisotropiebild (blau-weiß-rot) einer MFIS-Aufnahme gezeigt. Die Bildausschnitte zeigen den Nukleus der jeweiligen Blattepidermiszelle. In den Fluoreszenz-Anisotropiebildern lassen sich monomeres und dimeres GFP qualitativ leicht unterscheiden: GFP erscheint rot, besitzt also Anisotropiewerte größer als 0,3, während GFP-GFP mit Anisotropiewerten kleiner als 0,3 blau erscheint.



**Abbildung 4.32. Fluoreszenz-Anisotropiebilder von GFP und GFP-GFP.** Fluoreszenz-Intensitätsbilder (A, B) und die zugehörigen Fluoreszenz-Anisotropiebilder (A', B') von freiem GFP und freiem GFP-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*. Die Bildausschnitte zeigen jeweils den Nucleus der untersuchten Blattepidermiszelle. Der Skalierungsbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Die Auftragung in einem zweidimensionalen Pixelhäufigkeitsdiagramm (Kap. 3.3.5.2) ermöglicht einen quantitativen Vergleich und die Berücksichtigung eines weiteren Fluoreszenz-Parameters, hier der Fluoreszenz-Lebensdauer (Abb. 4.33). Die Perrin-Gleichung (Glg. 2.15), in Abb. 4.33 dargestellt als rot-gestrichelte Linie, liefert den Zusammenhang zwischen stationärer Fluoreszenz-Anisotropie und Fluoreszenz-Lebensdauer, wenn als Ursache für Depolarisierung nur die Rotation des Moleküls während der Fluoreszenz-Lebensdauer entscheidend ist. Hier wurde für die Rotationsdiffusionszeit von GFP ein Wert von 18 ns eingesetzt, der im Bereich gemessener Rotationsdiffusionszeiten von freiem GFP in Lösung liegt (14 ns [Borst und Visser 2010], 20 ns [Swaminathan et al. 1997]).

Im 2d-Histogramm deutet eine Lage oberhalb der Perrin-Linie auf eine langsamere Rotationsdiffusion als von freiem GFP in Lösung hin, die durch Molekülgröße oder sterische



**Abbildung 4.33.** Zweidimensionale  $\tau$ - $r$ -Histogramme von freiem GFP und GFP-GFP. 2d-Histogramme (Fluoreszenz-Lebensdauer gegen Fluoreszenz-Anisotropie) von freiem GFP (links) und freiem GFP-GFP (rechts), exprimiert in *N. benthamiana*. Die Daten stammen aus den MFIS-Aufnahmen gezeigt in Abbildung 4.32. Die rote Linie beschreibt die Perrin-Gleichung (Glg. 2.15) für freies GFP mit einer Rotationskorrelationszeit von 18 ns.

Hinderungen bedingt sein kann. Eine Position unterhalb der Perrin-Linie kann nicht durch Depolarisierung allein durch Rotation des GFP-Moleküls verursacht sein, sondern ist auf die zusätzliche Depolarisierung durch Homo-FRET zurückzuführen.

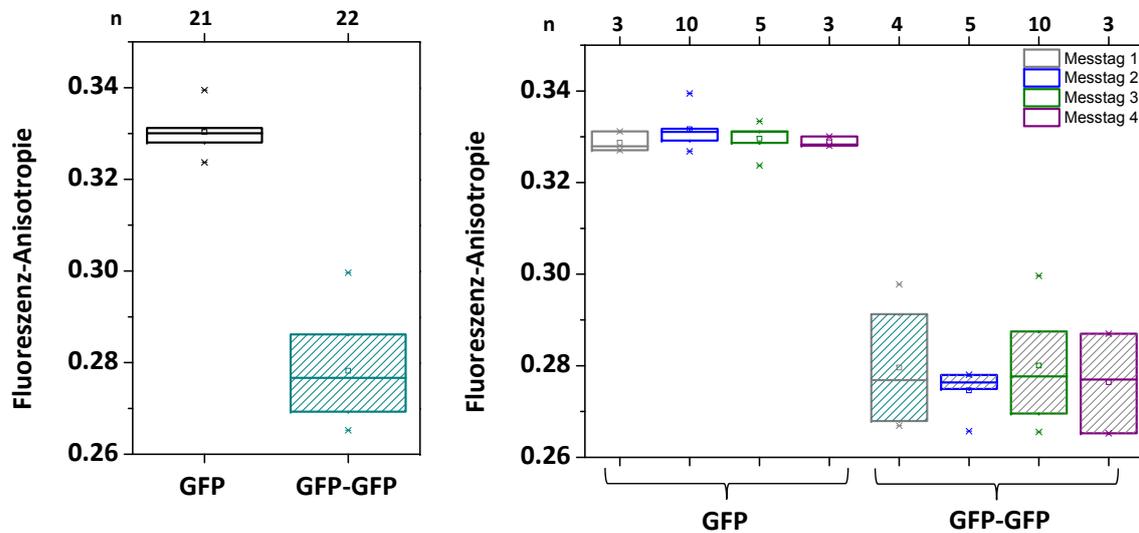
In Abbildung 4.33 liegt die Pixelverteilung von freiem GFP auf der Perrin-Linie, die freiem GFP in Lösung entspricht. Der Dimer-GFP-GFP liegt aufgrund des intramolekularen Homotransfers deutlich unterhalb der Perrin-Linie.

Das eindimensionale Häufigkeitsdiagramm liefert sowohl das arithmetische Mittel der Fluoreszenz-Anisotropie über alle Pixel als auch die Breite der Verteilung, also die Varianz der Anisotropie innerhalb einer Probe:

GFP:  $0,323 \pm 0,023$ ; GFP-GFP:  $0,281 \pm 0,030$

### Varianz der Fluoreszenz-Anisotropie zwischen Messtagen

Anders als die Fluoreszenz-Lebensdauer zeigt die Fluoreszenz-Anisotropie große Schwankungen zwischen einzelnen Messtagen. Dies liegt wahrscheinlich an Schwankungen der Viskosität, die abhängig von Wachstumsbedingungen der *N. benthamiana*-Pflanzen und der Temperatur ist. Die Viskosität geht über die Rotationsdiffusionszeit in die Fluoreszenz-Anisotropie ein. Sie ist für Pflanzen desselben Messtages vergleichbar, sodass die Differenz der Anisotropiewerte der einzelnen Konstrukte zueinander erhalten bleibt. Um die Ergebnisse der einzelnen Messtage vergleichen und zusammenfassen zu können,



**Abbildung 4.34. Varianz der Fluoreszenz-Anisotropie.** Im Box-Plot (links) ist die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie aus  $n$  MFIS-Messungen von freiem GFP und GFP-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*, aufgetragen. Der Box-Plot (rechts) zeigt die Ergebnisse aufgeschlüsselt nach Messtagen.

wurde für die Anisotropie ein Eichfaktor verwendet, der für freies GFP einen Wert von 0,33 reproduziert (Kap. 3.3.4.3).

In Abbildung 4.34 sind die (geeichten) Ergebnisse der MFIS-Messungen an  $n=43$  Zellen zusammengefasst. Gemittelt über die Anzahl der gemessenen Zellen  $n$  ergibt sich die Fluoreszenz-Anisotropie zu:

GFP:  $0,330 \pm 0,004$  ( $n=21$ ); GFP-GFP:  $0,278 \pm 0,010$  ( $n=22$ ).

Unter der Voraussetzung, dass die Eichung der Fluoreszenz-Anisotropie korrekt ist, beträgt die Standardabweichung der Fluoreszenz-Anisotropie von freiem GFP zwischen einzelnen Zellen 1,2%. Die Standardabweichung des Konstrukts aus zwei GFP-Molekülen ist mit 3,6 % deutlich größer. Hier spielen der Reifungsgrad des Konstrukts als auch die Orientierung der beiden GFP-Moleküle zueinander eine Rolle. Unreifes oder falsch gefaltetes GFP sowie eine ungünstige Orientierung zueinander beeinflussen den Homotransfer innerhalb des Konstrukts und erklären die beobachtete Varianz der Anisotropiewerte.

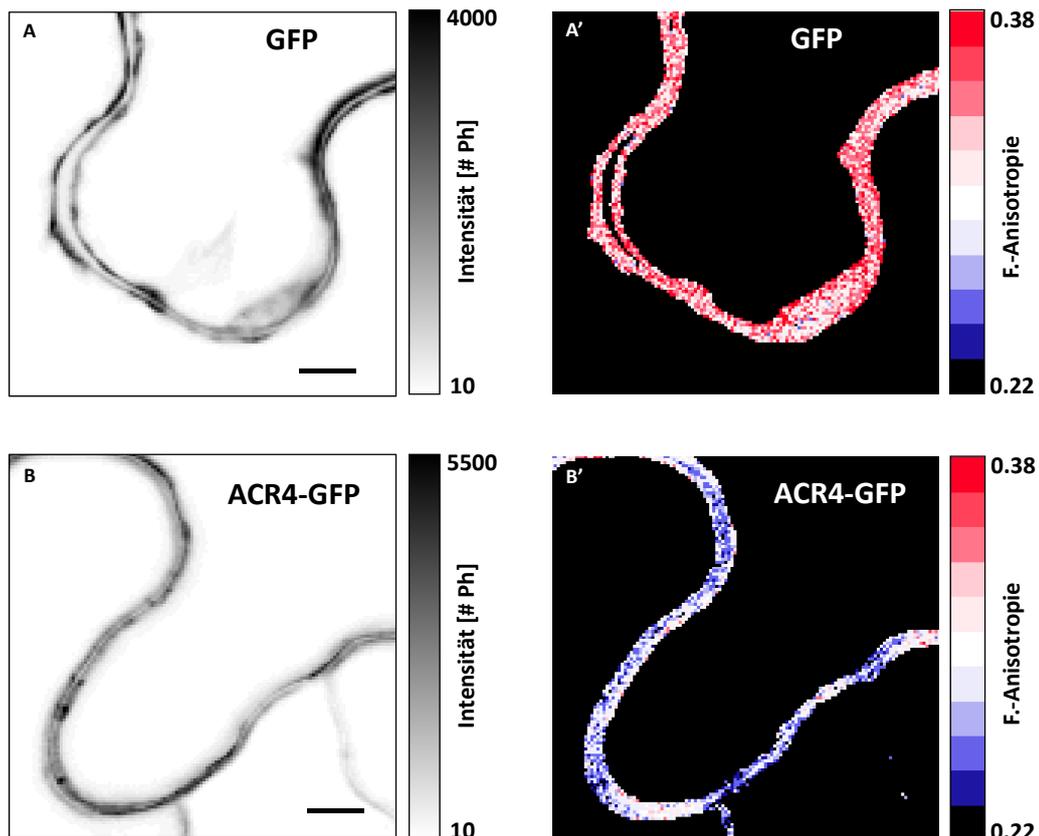
Die Breite der Anisotropie-Verteilung innerhalb einer Zelle beträgt im Mittel:

GFP:  $0,027 \pm 0,006$  ( $n=21$ ); GFP-GFP:  $0,030 \pm 0,009$  ( $n=22$ ).

#### 4.4.1.1. Homomere Komplexbildung von ACR4

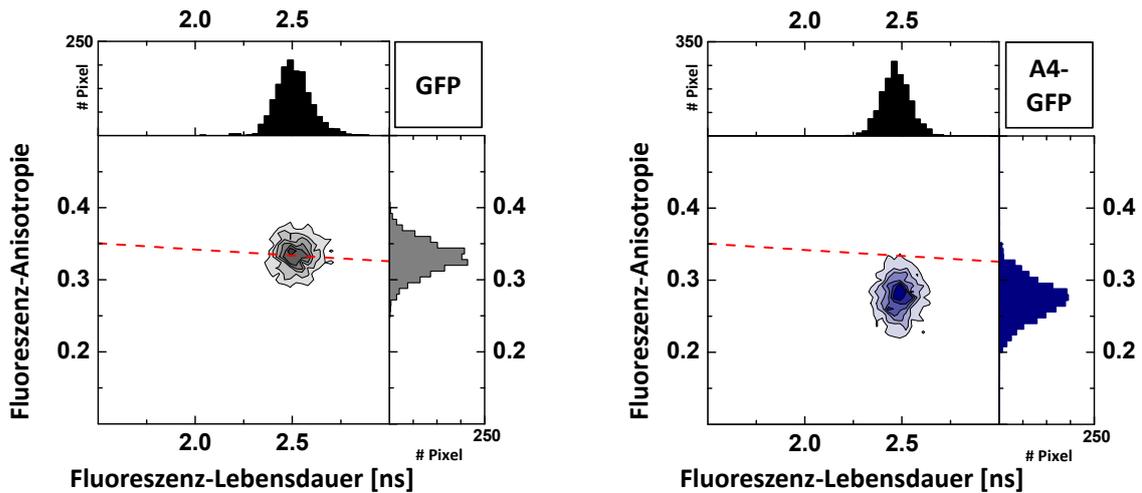
Im Folgenden wird in analoger Weise zu GFP-GFP gezeigt, dass ACR4 Homo-FRET zeigt. In Abbildung 4.35 ist für ACR4-GFP und freies GFP jeweils das Fluoreszenz-Intensitäts- (schwarz-weiß) und Fluoreszenz-Anisotropie-Bild (blau-weiß-rot) einer MFIS-Aufnahme gezeigt. Die Bildausschnitte zeigen die Region der Plasmamembran zweier benachbarter Blattepidermiszellen. ACR4-GFP lokalisiert an der Plasmamembran, daher wurde als Vergleich freies GFP im Zytoplasma in der PM-Region mit ähnlicher Expressionsstärke gewählt.

In den Fluoreszenz-Anisotropie Bildern wird deutlich, dass ACR4-GFP eine niedrigere Anisotropie aufweist als freies GFP: GFP erscheint rot, besitzt also Anisotropiewerte größer als 0,3, während ACR4-GFP mit Anisotropiewerten kleiner als 0,3 blau erscheint.



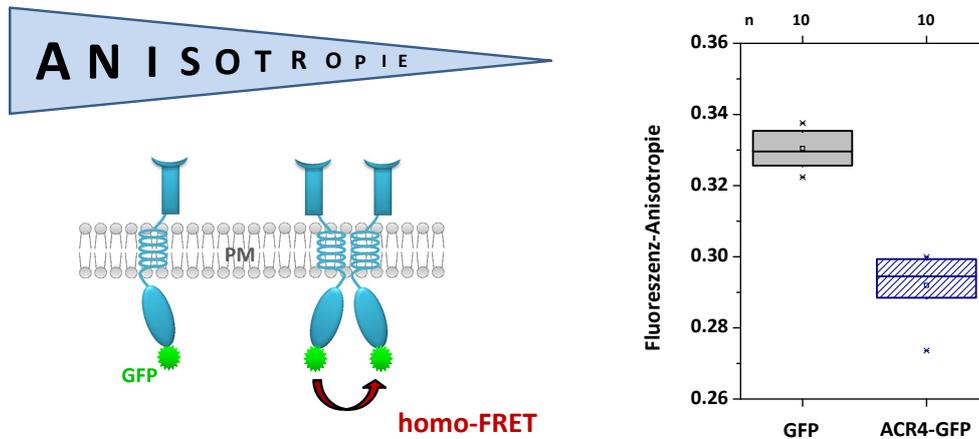
**Abbildung 4.35. Fluoreszenz-Anisotropie-Bilder von GFP und ACR4-GFP.** Fluoreszenz-Intensitäts-Bilder (A, B) und die zugehörigen Fluoreszenz-Anisotropie-Bilder (A', B') von freiem GFP und ACR4-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*. Die Bildausschnitte zeigen den Bereich der Plasmamembran der untersuchten Blattepidermiszellen. Der Skalierungsbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Im zweidimensionalen  $\tau$ - $r$ -Histogramm (Abb. 4.36) liegt freies GFP auf der Perrin-Linie (Glg. 2.15) entsprechend den Literaturwerten. Die Pixelverteilung von ACR4-GFP liegt dagegen deutlich unterhalb der Perrin-Linie. Die Depolarisierung ist damit stärker als nur durch Rotation allein und deutet auf Homo-FRET von GFP in homomeren ACR4-GFP-Komplexen (Abb. 4.37).



**Abbildung 4.36. Zweidimensionale  $\tau$ - $r$ -Histogramme von freiem GFP und ACR4-GFP.** 2d-Histogramme (Fluoreszenz-Lebensdauer gegen Fluoreszenz-Anisotropie) von freiem GFP (links) und von ACR4-GFP (rechts), exprimiert in *N. benthamiana*. Die Daten stammen aus den MFIS-Aufnahmen gezeigt in Abbildung 4.35. Die rote Linie beschreibt die Perrin-Gleichung (Glg. 2.15) für freies GFP mit einer Rotationskorrelationszeit von 18 ns.

Das eindimensionale Häufigkeitsdiagramm liefert für jede MFIS-Aufnahme sowohl das arithmetische Mittel der Fluoreszenz-Anisotropie über alle Pixel als auch die Breite der Verteilung  $\sigma$ , die die Streuung der Fluoreszenz-Anisotropie innerhalb einer Probe beschreibt. In Abbildung 4.37 ist die mittlere Fluoreszenz-Anisotropie aus 20 MFIS-Messungen in einem Box-Plot aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 und Tabelle 4.6 zusammengefasst. Die niedrige stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von ACR4-GFP wird auf die Bildung von homomeren Komplexen von ACR4 zurückgeführt. Allerdings muss beachtet werden, dass die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie nicht nur abhängig von Homotransfer und Rotationsdiffusion ist, sondern auch von der Orientierung der Moleküle (vgl. Kap. 4.4.2). Die untersuchte Rezeptorkinase ACR4 lokalisiert an der Plasmamembran, die während der MFIS-Aufnahme eine definierte und feste Orientierung bezüglich der Polarisationsrichtung des Lasers einnimmt. Es könnte also auch für das an ACR4 fusionierte GFP eine bevorzugte Anfangsorientierung geben. Dies wurde im Experiment, anders als für CLV1, zwar nicht beobachtet, kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden. Daher wurde als Absicherung progressives



**Abbildung 4.37. ACR4 bildet homomere Komplexe.** Der Box-Plot (rechts) zeigt die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie aus  $n$  MFIS-Messungen von freiem GFP und ACR4-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*. Die beobachtete niedrige Anisotropie von ACR4-GFP ist auf Homo-FRET zwischen GFP-Molekülen in homomeren ACR4-Komplexen zurückzuführen (Schema links).

Photobleichen durchgeführt (Kap. 4.4.3) sowie die Fluoreszenz-Anisotropie zeitaufgelöst untersucht (Kap. 4.4.4).

**Tabelle 4.5.** Stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von freiem GFP, freiem GFP-GFP und ACR4-GFP gemittelt über  $n$  MFIS-Messungen angegeben mit Standardabweichung.

	F.-Anisotropie	n
ACR4-GFP	$0,292 \pm 0,009$	10
freies GFP (Zytoplasma)	$0,330 \pm 0,006$	10
freies GFP (Nukleus)	$0,330 \pm 0,004$	21
freies GFP-GFP (Nukleus)	$0,278 \pm 0,010$	22

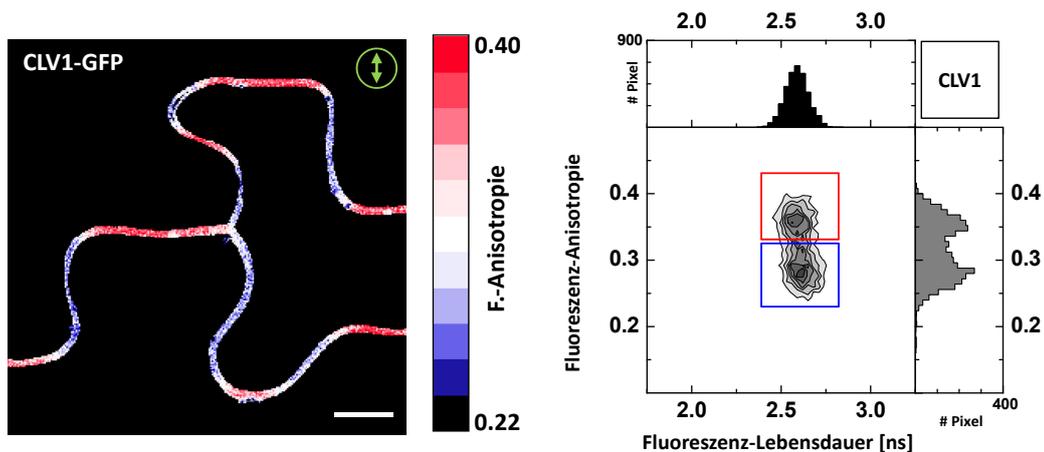
**Tabelle 4.6.** Breite der Fluoreszenz-Anisotropie-Verteilung von freiem GFP, freiem GFP-GFP und ACR4-GFP gemittelt über  $n$  MFIS-Messungen angegeben mit Standardabweichung.

	$\sigma$ (F.-Anisotropie)	n
ACR4-GFP	$0,029 \pm 0,003$	10
freies GFP (Zytoplasma)	$0,025 \pm 0,005$	10
freies GFP (Nukleus)	$0,027 \pm 0,006$	21
freies GFP-GFP (Nukleus)	$0,030 \pm 0,009$	22

#### 4.4.2. Effekte durch Orientierung

Bei den bisherigen Betrachtungen wurden angenommen, dass die Ausrichtung des Dipolmoments von GFP im Experiment zufallsverteilt ist, oder anders ausgedrückt, dass GFP keine Vorzugsorientierung bezüglich der Plasmamembran besitzt. Eine solche Vorzugsorientierung könnte bei eingeschränkter Rotationsfreiheit durch den Linker und/oder einer relativ unbeweglichen Kinasedomäne auftreten, wenn GFP nur einen eingeschränkten Winkelbereich bezüglich der PM einnehmen kann (segmentelle Rotation, siehe Kapitel 2.4).

In den MFIS-Aufnahmen wurden immer Bildausschnitte gewählt, in denen die Plasmamembran senkrecht zur fokussierten Bildebene stand. Die Polarisationsrichtung des Lasers lag in der Bildebene. Wenn nun GFP eine feste Position bezüglich der PM innehat, so ändert sich mit dem Verlauf der Plasmamembran in der Bildebene der Winkel zwischen dem GFP-Dipolmoment und der Polarisationsrichtung des Lasers und damit der Fluoreszenz-Anisotropie. Dieser Orientierungseffekt ist in Abbildung 4.38 eindrucksvoll für CLV1-GFP

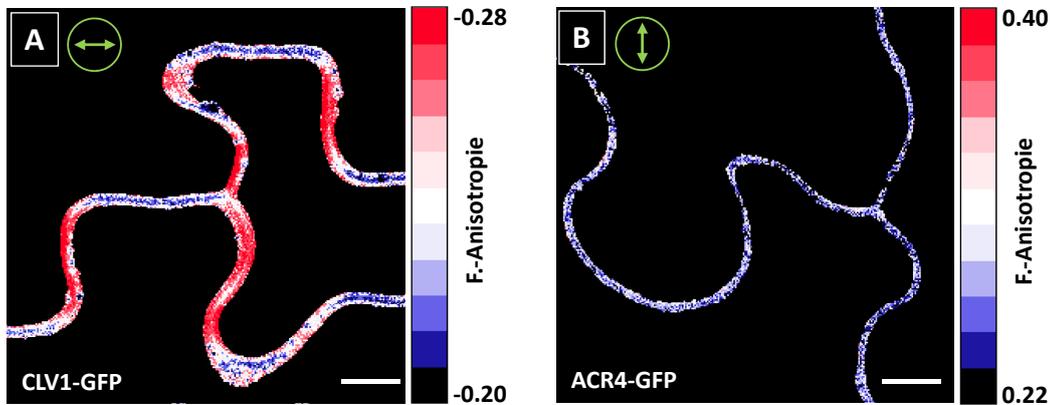


**Abbildung 4.38. CLV1-GFP zeigt Orientierungseffekt auf die Fluoreszenz-Anisotropie.** (links) Fluoreszenz-Anisotropie-Bild von CLV1-GFP, exprimiert in *N. benthamiana*. Der grüne Pfeil zeigt die Polarisationsrichtung des Lasers in der Bildebene. Der Skalierungsbalken entspricht  $5 \mu\text{m}$ . (rechts) Im zugehörigen 2d-Histogramm (Fluoreszenz-Lebensdauer gegen Fluoreszenz-Anisotropie) bilden die waagrecht und senkrecht verlaufenden Abschnitte der PM jeweils eine Pixelpopulation (rot und blau markiert).

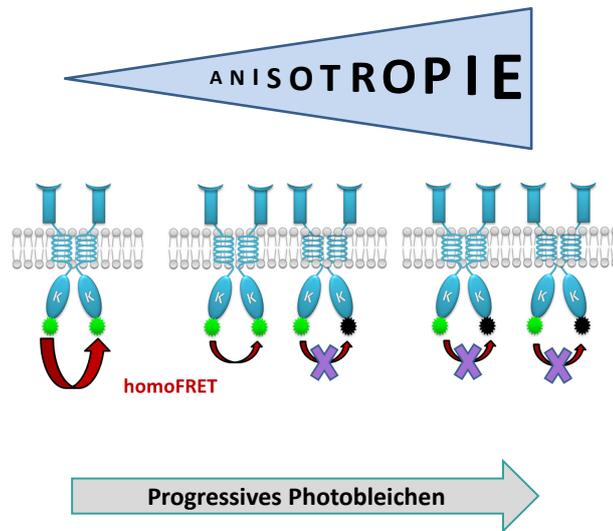
gezeigt. Die Fluoreszenz-Anisotropie nimmt je nach Lage der PM bezüglich der Polarisationsrichtung des anregenden Lasers Werte zwischen 0,20 und 0,41 ein. Waagrecht verlaufende Abschnitte der PM, die senkrecht zur Polarisationsrichtung stehen, erscheinen rot, senkrecht verlaufende blau. Dreht man die Polarisationsrichtung des anregenden Lasers um  $90^\circ$ , so dreht sich der Effekt in der Anisotropie mit: waagrecht verlaufende Abschnitte erscheinen nun blau, senkrechte rot (Abb. 4.39). Das bedeutet, dass das Dipolmoment von

GFP vorzugsweise senkrecht zur Plasmamembran ausgerichtet ist.

ACR4-GFP zeigt keinen solchen Orientierungseffekt, sondern einen homogenen Wert der Fluoreszenz-Anisotropie unabhängig vom Verlauf der PM in der Bildebene (siehe Abb. 4.39). Die starre und anisotrope Orientierung von CLV1-GFP bestimmt maßgeblich dessen stationäre Fluoreszenz-Anisotropie und führt im zweidimensionalen  $\tau$ - $r$ -Histogramm zu breiten Verteilungen. Im gezeigten Beispiel (Abb. 4.38) bilden die waagerechten und senkrechten PM-Abschnitte zwei deutlich getrennte Pixelpopulationen (blau und rot markiert). Im Allgemeinen kann der Winkel zwischen PM und damit der Position von GFP zur Polarisationsrichtung des Lasers nicht ausreichend quantifiziert werden, um die Anisotropiewerte entsprechend zu korrigieren. Orientierungseffekt und Homo-FRET können nicht sauber getrennt werden. Daher ist es nicht möglich, CLV1 analog zu ACR4 mit Fluoreszenz-Anisotropie auf die Bildung von homomeren Komplexen zu untersuchen. Generell macht das Verhalten von CLV1-GFP deutlich, dass es unbedingt notwendig ist, Orientierungseffekte zu überprüfen und auszuschließen, um Homo-FRET mit stationärer Fluoreszenz-Anisotropie nachweisen zu können.



**Abbildung 4.39. Zum Orientierungseffekt von CLV1-GFP.** (A) Fluoreszenz-Anisotropie-Bild von CLV1-GFP desselben Ausschnitts wie in Abb. 4.38 mit um  $90^\circ$  gedrehter Polarisationsrichtung des anregenden Lasers. (B) Das Fluoreszenz-Anisotropie-Bild von ACR4-GFP zeigt keinen Orientierungseffekt. Der grüne Pfeil zeigt jeweils die Polarisationsrichtung des Lasers in der Bildebene. Der Skalierungsbalken entspricht  $5 \mu\text{m}$ .



**Abbildung 4.40. Progressives Photobleichen.** Das Schema veranschaulicht den Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie beim progressivem Photobleichen von homomeren Komplexen. Im homomeren Komplex der membranständigen Rezeptoren (blau) findet zwischen den GFP-Molekülen (grün) Homo-FRET (roter Pfeil) statt. Dies führt zu einem niedrigen Wert für die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie (Spitze des blauen Dreiecks). Der Wert der Fluoreszenz-Anisotropie nimmt im Verlauf des progressiven Photobleichens zu, da zwischen irreversibel photogeblichten GFP-Molekülen (schwarz) und fluoreszenten GFP-Molekülen (grün) kein Homo-Transfer mehr stattfindet (durchgekennzeichnete rote Pfeile).

#### 4.4.3. Progressives Photobleichen

Fluoreszenz-Depolarisation durch Homo-FRET führt zu einer verringerten stationären Fluoreszenz-Anisotropie. Daher kann diese als Messgröße für Homo-FRET dienen. Allerdings beeinflussen auch Orientierungseffekte und die Rotationsmobilität die stationäre Anisotropie. Um sicherzugehen, dass die beobachtete verminderte stationäre Anisotropie von ACR4-GFP auf die Bildung von homomeren Oligomeren zurückzuführen ist, wurde progressives Photobleichen durchgeführt.

Bei dieser Methode wird durch kontinuierliches Photobleichen von Homo-FRET Donoren bzw. Akzeptoren der Homotransfer unterdrückt oder ganz eliminiert [Ganguly et al. 2011]. Dies äußert sich dann in einem Anstieg der stationären Fluoreszenz-Anisotropie mit voranschreitendem Photobleichen (Abb. 4.40).

In einem derartigen Experiment können Orientierung und Rotationsmobilität nur zu einer Verringerung der stationären Anisotropie führen (siehe Diskussion 4.4.3) und daher den durch Homo-FRET-Unterdrückung hervorgerufenen Anstieg der Anisotropie nur abschwächen aber nicht hervorrufen.

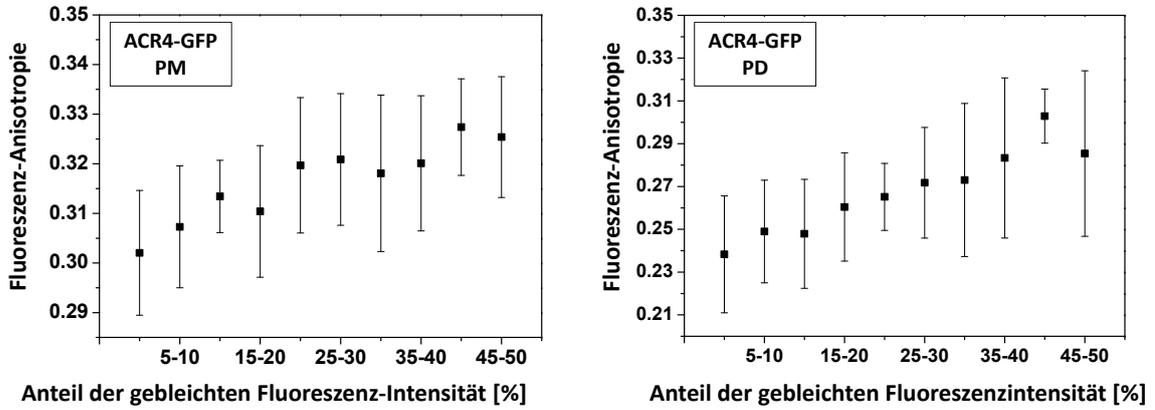
### Durchführung und Auswertung

Die Photobleichexperimente an ACR4-GFP (transient exprimiert in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*) wurden am MFIS-Aufbau (Kap. 3.1.3) durchgeführt. GFP wurde in Bildserien aus vierzig Einzelbildern (256x256 Pixel, ein Pixel entsprach 96 nm)) bei 1,5  $\mu\text{W}$  und 400  $\mu\text{s}$  Pixelzeit kontinuierlich photogeleicht. Zur Auswertung wurde für ein gewähltes ROI erstens die Intensitätsspur über die Dauer der Bildserie und zweitens die Anisotropiespur über den gleichen Zeitraum bestimmt. Die Intensitätsspur enthält die Information, wieviel Fluoreszenz bezüglich des Ausgangswertes noch vorhanden ist bzw. welcher prozentuale Anteil photogeleicht wurde. Die Anisotropiespur liefert zu jedem dieser Intensitätswerte die gemessene stationäre Anisotropie. Die auf diese Weise erhaltenen Wertepaare aus Intensität und Anisotropie wurden für 13 ROI (Plasmamembran) bzw. 4 ROI (Plasmodesmata) in je vier Bildserien bestimmt. Zur besseren Übersicht wurden die Wertepaare in Intensitätsintervalle von fünf Prozentpunkten zusammengefasst.

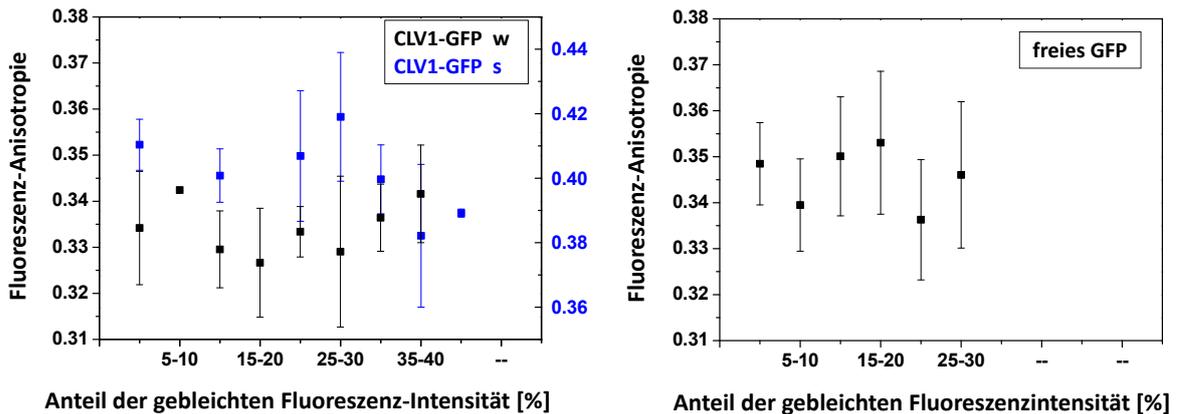
### Ergebnisse

Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von GFP nimmt an der Plasmamembran mit zunehmendem Photobleichen von 0,3021 auf 0,3254 kontinuierlich zu, an den Plasmodesmata steigt die Fluoreszenz-Anisotropie im Mittel von 0,2383 auf einen Wert von 0,2854 (Abb. 4.41). Dies entspricht einer Anisotropiezunahme von 7,7 % an der PM und 19,8 % an PDs bei einer Fluoreszenzabnahme von 45-50 %.

In Kontrollmessungen an freiem GFP konnte unter gleichen Bedingungen nur in einem Fall eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität beobachtet werden, da frei diffundierendes GFP während der Bildserie im Beobachtungs-ROI ständig ausgetauscht wird. Nur in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran fanden sich immobilere Moleküle, die photogeleicht werden konnten. Diese monomeren GFP-Moleküle zeigten keine Abnahme der stationären Fluoreszenz-Anisotropie mit zunehmendem Photobleichen (Abb. 4.42). Die anisotrope Ausrichtung von CLV1-GFP führt für waagrecht und senkrecht verlaufende Membranabschnitte zu unterschiedlich hohen Werten der stationären Anisotropie. In beiden Fällen ist kein Anstieg der Fluoreszenz-Anisotropie zu beobachten (Abb. 4.42).



**Abbildung 4.41. Progressives Photobleichen von ACR4-GFP.** Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von ACR4-GFP an der Plasmamembran (links) und an Plasmodesmata (rechts) ist gegen den Anteil der photogebleichten Fluoreszenz-Intensität in Prozent aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. (PM: n=13 ROI in vier Bildserien; PD: n=4 ROI in vier Bildserien).



**Abbildung 4.42. Progressives Photobleichen von CLV1-GFP und freiem GFP.** Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie von CLV1-GFP an der PM und von freiem GFP im Zytoplasma (in Membrannähe) ist gegen den Anteil der photogebleichten Fluoreszenz-Intensität in Prozent aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

## Diskussion Progressives Photobleichen

Im Folgenden werden mögliche Artefakte und Fehlerquellen diskutiert, um das Ergebnis der Bleichexperimente besser beurteilen zu können.

### Fluoreszenz-Lebensdauer

Das Photobleichen von GFP verursachte eine Verkürzung der Fluoreszenz-Lebensdauer von bis zu 200 ps (siehe Abb. 4.10). Die Anisotropie ist über die Perrin-Gleichung mit der Fluoreszenz-Lebensdauer verknüpft:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\rho}}$$

mit der fundamentalen Anisotropie,  $r_0$ , der Fluoreszenz-Lebensdauer,  $\tau$ , und der Rotationskorrelationszeit,  $\rho$ .

Unter der Annahme frei rotierender GFP-Moleküle mit  $\rho=14$  ns und  $r_0=0.38$  [Borst und Visser 2010] mit gleichverteilter Anfangsorientierung ergeben sich für die beiden im Experiment beobachteten Extremwerte der Fluoreszenz-Lebensdauer  $r(2.4 \text{ ns}) = 0.3244$  und  $r(2.2 \text{ ns}) = 0.3284$ .

Die Anisotropiezunahme allein durch die beobachtete Lebensdauerverkürzung beträgt also maximal 0.004. Dies entspricht bei einer gemessenen Anisotropiezunahme von ACR4-GFP von insgesamt 0.0233 einem Anteil ("Fehler") von 17%.

### Orientierung

Die Rotationsdiffusion von proteinfusioniertem GFP kann durch einen starren Linker oder Wechselwirkungen mit dem Protein und der Membrenumgebung eingeschränkt sein. Insbesondere kann das GFP eine Vorzugsrichtung bezüglich der Membran einnehmen und damit eine Anfangsorientierung besitzen, die nicht mehr stochastisch verteilt ist. Trotz des bei allen Proteinen verwendeten 21 Aminosäure langen und damit theoretisch flexiblen Linkers trat genau dies bei CLV1 auf und führte zu den in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Orientierungseffekten auf die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie. Für ACR4 wurde zwar weitgehend eine stochastische Anfangsorientierung beobachtet, allerdings können Orientierungseffekte nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

Das folgende Gedankenexperiment veranschaulicht die Auswirkung einer Nicht-Zufalls-Verteilung von GFP im Bleichexperiment:

Angenommen, in dem ausgewählten ROI befinden sich zwei Populationen von GFP-Molekülen mit gleicher und unendlich hoher Rotationskorrelationszeit. Die einen sind

vorzugsweise parallel, die anderen vorzugsweise senkrecht zur Polarisation des anregenden Laserlichts ausgerichtet. Die gemessene Anisotropie ist das Mittel über alle Moleküle, wobei die vorzugsweise parallel ausgerichteten Moleküle einen hohen Anisotropiewert liefern und die vorzugsweise senkrecht stehenden einen niedrigen. Durch die  $\cos^2$ -Beziehung der selektiven Anregung absorbieren parallel ausgerichtete Moleküle mehr und bleichen daher auch stärker. Dies dezimiert die parallele Population mit fortschreitendem Bleichen stärker und verschiebt so den Mittelwert der Anisotropie in Richtung des niedrigeren Werts der weniger gebleichten senkrechten Population. Das bedeutet also, dass inhomogene Orientierung im Bleichexperiment lediglich eine Abnahme der Anisotropie verursachen kann.

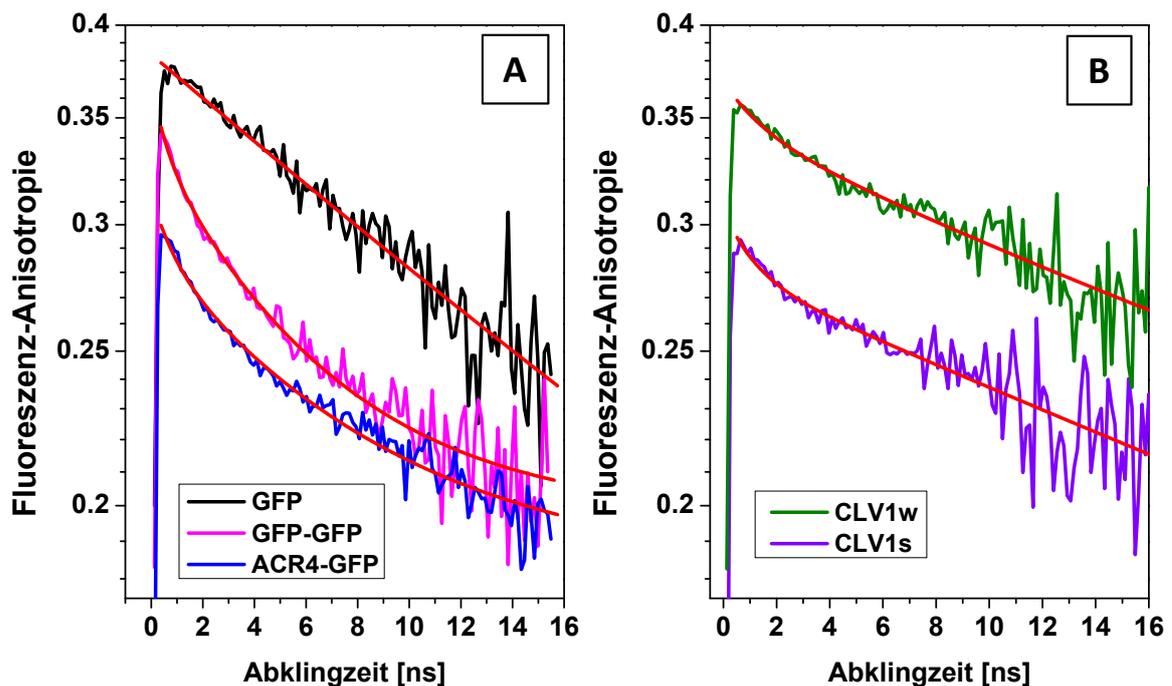
#### Laterale Mobilität

Membranproteine liegen in der Plasmamembran oft nebeneinander sowohl frei diffundierend als auch an Membrandomänen gebunden vor. Die Fluoreszenz-Depolarisation hängt von der Fähigkeit eines Moleküls ab, sich innerhalb seiner Fluoreszenz-Lebensdauer aus der Orientierung zum Zeitpunkt der Anregung herauszudrehen. Schnelle Rotation führt zu starker Depolarisation und damit niedriger Anisotropie und ist der mobilen Fraktion zuzuordnen. Die immobile Fraktion wird dagegen durch die eingeschränkte Beweglichkeit der Moleküle langsamer oder gar nicht rotieren. Für sie erhält man daher hohe Anisotropiewerte nahe  $r_0$ . Die immobile Fraktion ist vom Photobleichen stärker betroffen als die mobile Fraktion. Die beweglichen Moleküle der mobilen Fraktion werden kontinuierlich durch Diffusion ausgetauscht und durch ungebleichte Moleküle ersetzt. Dies führt dazu, dass die mobile Fraktion mit niedriger Anisotropie mit fortschreitendem Bleichen immer stärker zur Gesamtanisotropie beiträgt. Dies resultiert in einer abnehmenden Anisotropie im Bleichexperiment.

#### 4.4.4. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropie

Die Abklingkurven der Fluoreszenz-Anisotropie enthalten die Zeitkonstanten der Depolarisierungsprozesse, wie Rotation und Homotransfer. Diese Zeitkonstanten können durch die Kurvenanpassung mit Exponentialfunktionen (Kap. 3.3.4.4) bestimmt werden. Die Rotationszeit, die der Molekülgröße und den Umgebungsbedingungen (u.a. Viskosität, Rotationsbeweglichkeit) entspricht, beschreibt die schnellstmögliche Depolarisierung der Fluoreszenz, die ohne Homotransfer möglich ist. Das Auftreten einer kürzeren Zerfallskonstanten ist auf Energietransfer zurückzuführen und dient daher als Nachweis von Homo-FRET.

In Abbildung 4.43 sind die Fluoreszenz-Anisotropie-Abklingkurven der untersuchten Rezeptorkinasen und der freien GFP-Konstrukte, exprimiert in *N. benthamiana*, aufgetragen. In Tabelle 4.7 sind die Ergebnisse der Kurvenanpassungen zusammengefasst.



**Abbildung 4.43. Zeitaufgelöste Fluoreszenz-Anisotropie.**

Fluoreszenz-Anisotropie-Abklingkurven mit einer Zeitauflösung von 128 ps generiert aus (A) jeweils drei MFIS-Bildern von freiem GFP, freiem GFP-GFP und ACR4-GFP, (B) einem MFIS-Bild von CLV1-GFP (vgl. Abb. 4.38). Es wurde je eine Abklingkurve aus der Pixelpopulation von senkrecht (s) und waagrecht (w) verlaufenden Abschnitten der PM erstellt (rot und blau markierte Populationen im 2d-Histogramm in Abb. 4.38).

**Tabelle 4.7.** Ergebnisse der Kurvenanpassungen der Fluoreszenz-Anisotropie-Abklingkurven.  $r_\infty$ : Restanisotropie,  $\rho$ : Rotationsdiffusionszeit bzw. Abklingzeit, A: Amplitude,  $r_0$ : fundamentale Anisotropie.

	$r_\infty$	$A_1$	$\rho_1$	$A_2$	$\rho_2$	$r_0$
GFP	0,0489	0,3315	27,54			0,380
GFP-GFP	0,1970	0,0201	0,60	0,1350	6,03	0,352
ACR4-GFP	0,1820	0,0177	0,86	0,1041	8,12	0,304
CLV1-GFP (w)	0,1150	0,0179	1,55	0,2282	37,3	0,361
CLV1-GFP (s)	0,0457	0,0189	1,16	0,2324	49,6	0,297

Freies GFP zeigt einen mono-exponentiellen Anisotropieabfall mit einer Abklingzeit  $\rho_1$  von 27 ns. Die fundamentale Anisotropie  $r_0$  von 0,38 entspricht der intrinsischen Anisotropie des Chromophors und einer isotropen Verteilung der Dipolmomente.

Das Dimer GFP-GFP besitzt zwei Abklingzeiten  $\rho_1=0,6$  ns und  $\rho_2=6,0$  ns und eine fundamentale Anisotropie von 0,35, die leicht niedriger ist als von monomerem GFP. Es bleibt eine Restanisotropie  $r_\infty$  von 0,20 erhalten.

ACR4-GFP zeigt wie GFP-GFP zwei Abklingzeiten von 0,9 ns und 8,1 ns. Die fundamentale Anisotropie ist mit 0,30 deutlich niedriger als von freiem GFP. Es bleibt eine ausgeprägte Restanisotropie von 0,18.

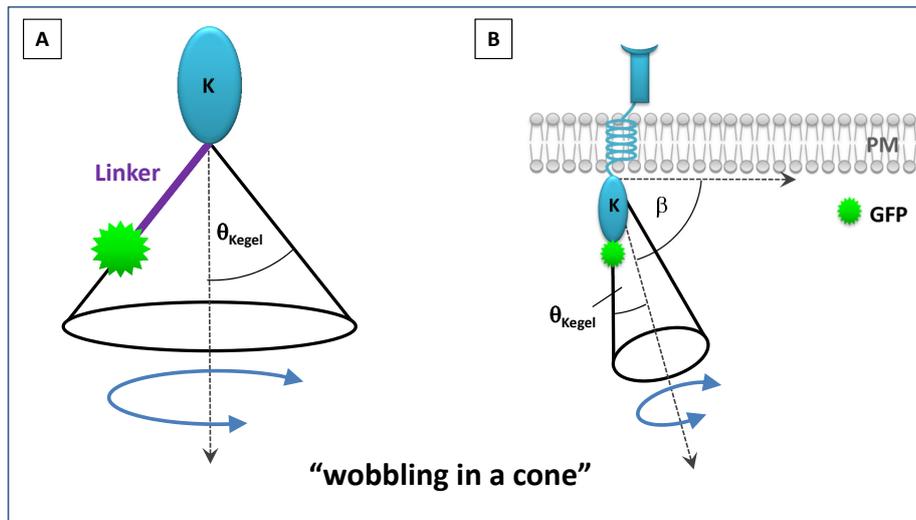
### Interpretation und Diskussion der zeitaufgelösten Anisotropie

Beide Abklingzeiten des GFP-Dimers sind kürzer als die erwartete Rotationszeit eines Moleküls dieser Größe. Eine Abklingzeit unter einer Nanosekunde ist einem effizienten Homotransfer bei niedrigem Chromophorabstand und günstiger Orientierung der Dipolmomente  $\kappa^2$  zuzuordnen. Die zugehörigen Amplituden sind klein, sodass nur ein geringer Teil der Depolarisierung von Homo-FRET herrührt.

Die zweite Abklingzeit von 6,0 ns kann als Mittel über alle Dimere interpretiert werden, die aufgrund von ungünstiger Orientierung  $\kappa^2$  weniger effizienten Homotransfer zeigen. Die Abklingzeit könnte aber auch zu einer segmentellen Rotation gehören, wenn der Linker zwischen beiden GFP-Molekülen die Rotationsfreiheit jeweils einschränkt.

Die ausgeprägte Restanisotropie kann leider nicht dazu beitragen, zwischen den beiden Fällen Homo-FRET und segmentelle Rotation zu unterscheiden:

Auf der einen Seite ist eine Restanisotropie typisch für segmentelle Rotationen und kann zur Berechnung des Öffnungswinkel des kegelförmigen Rotationsvolumen benutzt werden (vgl. Glg. 2.17). Für GFP-GFP würde sich hier ein Winkel von  $63^\circ$  ergeben. Andererseits



**Abbildung 4.44.** Schema zur segmentellen Rotation von GFP bezüglich der Kinasedomäne (links) und bezüglich der Plasmamembran (rechts)(vgl. Kapitel 2.4).

postuliert die Theorie von Runnels und Scarlata [Runnels und Scarlata 1995] das Auftreten einer Restanisotropie bei Homotransfer. Diese kann experimentell dazu genutzt werden, die Anzahl von Molekülen in homomeren Komplexen zu bestimmen [Bader et al. 2007], [Bader et al. 2009]. Für einen idealen Dimer postuliert die Theorie eine Restanisotropie von  $r_0/2$ , da ein Molekül des Dimers mit  $r=r_0$  emittiert und eines mit  $r=0$  und der Effekt in einem idealen Dimer symmetrisch ist. Der Wert für  $r_0/2$  ist für GFP  $0,38/2=0,175$ . Der etwas höhere Wert von  $0,197$  im Experiment könnte mit unvollständig gefalteten Dimeren, in denen kein Energietransfer stattfinden kann, erklärt werden.

Darüber hinaus kann eine Restanisotropie auch die Folge einer eingeschränkten Rotationsbeweglichkeit sein, z.B. durch die Umgebung wie hier dem Nukleus.

ACR4-GFP zeigt wie GFP-GFP eine deutlich kürzere mittlere Abklingzeit, als es für ein Molekül dieser Größe allein durch Rotationsdiffusion zu erwarten wäre. Die kurze Abklingzeit unter einer Nanosekunde ist analog zu GFP-GFP auf Homotransfer mit hoher Effizienz zurückzuführen.

Ebenfalls analog zu GFP-GFP lässt die zweite Abklingzeit von  $8 \text{ ns}$  zwei Interpretationen zu: weniger effizienter Homo-FRET und segmentelle Rotation, hier in einem Kegel mit einem Öffnungswinkel von  $61^\circ$ .

Die fundamentale Anisotropie erreicht für GFP-GFP mit  $0,35$  nicht den Wert von freiem GFP, obwohl auch hier von einer isotropen Verteilung der Molekülausrichtung auszugehen ist, da GFP und GFP-GFP beide in der gleichen Umgebung im Nukleus gemessen wurden.

Trotzdem kann eine Einschränkung in der Rotationsbeweglichkeit durch die sperrigere Form des Dimers natürlich nicht ausgeschlossen werden. Die Ursache für die niedrige fundamentale Anisotropie könnte auch in einer sehr kurzen Abklingzeit im Bereich der Breite der Gerätefunktion von etwa 100 ps liegen, der ohne Entfaltung nicht auflösbar ist.

Die fundamentale Anisotropie von ACR4-GFP ist mit 0,30 sehr viel niedriger als die von freiem GFP und von der bereits reduzierten initialen Anisotropie von GFP-GFP. Hier muss berücksichtigt werden, dass GFP nicht frei vorliegt, sondern gebunden an ein membranständiges Protein, sodass es grundsätzlich Effekte durch eine Vorzugsorientierung zu beachten gilt.

Wie sich dieser Orientierungseffekt in den Anisotropie-Abklingkurven widerspiegelt, kann in Abbildung 4.43 B anhand von CLV1-GFP demonstriert werden. In vorigen Abschnitt war die stark anisotrope Ausrichtung von CLV1-GFP bereits im stationären Fluoreszenz-Anisotropie-Bild (Abb. 4.38) zu sehen. In diesem Bild wurden aus den waagrecht und senkrecht verlaufenden Abschnitten der PM Fluoreszenz-Anisotropie-Abklingkurven generiert. Diese unterscheiden sich in erster Linie in der fundamentalen Anisotropie. Die Kurvenanpassung ergibt jeweils eine kurzen Zeitkonstante, die Homotransfer zuzuordnen ist, und eine lange Abklingzeit, die der verminderten Beweglichkeit an der PM entspricht. Diese eingeschränkte Rotationsbeweglichkeit zeigt sich auch darin, dass die Anisotropie nicht auf Null abklingt, sondern eine Restanisotropie erhalten bleibt.

#### 4.4.5. Zusammenfassung und Diskussion der Homo-FRET-Messungen

Die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie ist experimentell leicht zugänglich und in MFIS pixelweise auswertbar. Daraus ergibt sich ihr Potential, homomere Komplexbildung mit hoher lokaler Auflösung anzuzeigen. Allerdings nehmen auch andere Prozesse als Homotransfer Einfluss auf die stationäre Anisotropie. Insbesondere die Annahme einer isotropen Verteilung der Dipolmomenten gilt es zu überprüfen. Andere Methoden wie Progressives Photobleichen und zeitaufgelöste Anisotropie-Messungen können mehr Informationen liefern und Artefakte aufdecken.

##### Orientierung

Für CLV1 konnte eine Vorzugsorientierung senkrecht zur Plasmamembran festgestellt werden. ACR4 zeigt diesen Effekt nicht. Allerdings wäre eine Ausrichtung in einem Winkel von  $45^\circ$  bezüglich der Plasmamembran invariant unter  $90^\circ$ -Drehungen und daher unter den Experimentbedingungen nicht feststellbar.

##### Zeitaufgelöste Anisotropie

In Abklingkurven der Fluoreszenz-Anisotropie lässt sich Homo-FRET durch das Auftreten einer zusätzlichen kurzen Abklingzeit identifizieren [Vogel et al. 2009], [Tramier und Coppey-Moisan 2008]. Um diese Abklingzeit von Rotationsbewegungen sauber trennen zu können, müssen sie sich deutlich unterscheiden. Dies ist für freies GFP erfüllt: der Chromophor kann sich innerhalb des  $\beta$ -barrels nicht bewegen und das ganze GFP-Molekül hat mit 14-20 ns eine langsame Rotationsdiffusionszeit, verglichen mit der Fluoreszenz-Lebensdauer von 2,7 ns. Abklingzeiten unter der Rotationsdiffusionszeit können dann nur aufgrund von Homotransfer auftreten. Homo-FRET in Venus-Dimeren führt zu Abklingzeiten kleiner als 2 ns [Nguyen et al. 2012] und für GFP zu 2,4 ns [Gautier et al. 2001]. [Paila et al. 2011] beobachteten bei der Oligomerisierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kurze Anisotropieabklingzeiten unter einer Nanosekunde des verwendeten FP EYFP und interpretierten diese als Folge effizienten Homotransfers.

Sowohl GFP-GFP als auch ACR4-GFP zeigten eine Abklingzeit unter einer Nanosekunde, die im Einklang mit obiger Literatur effizientem Homotransfer zugeordnet werden kann. Auch die zweite Abklingzeit von 6 ns bzw. 8 ns kann auf Homo-FRET zurückgeführt werden. Der Linker aus 21 Aminosäuren lässt viele Abstände und Orientierungen der Chromophore zueinander zu und ermöglicht damit Homo-FRET mit unterschiedlicher

Effizienz. Die Abklingzeit von 6 ns bzw. 8 ns kann als Mittel über die Abklingzeiten bei allen eingenommenen Abständen interpretiert werden.

Allerdings muss beachtet werden, dass in der vorliegenden Arbeit in allen Experimenten fusionierte Konstrukte verwendet wurden. Grundsätzlich erlaubt ein flexibler Linker die segmentelle Rotation in einem kegelförmigen Volumen. Diese als "wobbling in a cone" beschriebene Schlingerbewegung kann zu deutlich kürzeren apparenten Rotationsdiffusionszeiten führen. Da sie nicht alle Raumrichtungen abdeckt, ist die mit der segmentellen Rotation einhergehende Depolarisierung unvollständig und führt zu einer von Null verschiedenen Anisotropie  $r_\infty$ , wie dies sowohl für GFP-GFP als auch ACR4-GFP beobachtet wurde. Andererseits ist auch Homotransfer immer mit einer Restanisotropie verbunden [Baumann und Fayer 1986]. Beide Erklärungen, Homo-FRET und segmentelle Rotation, sind denkbar und schließen sich nicht gegenseitig aus. Messungen bei systematischer Variation der Linkerlänge könnten hier weiter Aufschluss geben.

Das Auftreten einer verringerten initialen Anisotropie, die niedriger als die fundamentale Anisotropie ist, gibt bei den vorliegenden Messungen den Ausschlag, um zwischen Homotransfer und segmenteller Rotation zu unterscheiden. Da Orientierungseffekte für ACR4 und GFP-GFP nicht beobachtet wurden, ist die verringerte initiale Anisotropie auf eine Komponente in der Anisotropie-Abklingkurven mit einer Abklingzeit unter 100 ns zurückzuführen, die durch effizienten Homotransfer verursacht wird.

#### **Progressives Photobleichen**

Progressives Photobleichen von ACR4-GFP an der Plasmamembran und an Plasmodesmata führte zu einem Anstieg der stationären Anisotropie. Dies ist auf die Unterdrückung von Homo-FRET bei der fortschreitenden Photozerstörung von Donor- bzw. Akzeptormolekülen zurückzuführen und belegt die Präsenz von homomeren ACR4-Komplexen an der PM und PD.

#### **Nachweis von Homo-FRET mit stationärer Anisotropie**

Generell kann aus der stationären Anisotropie nicht ohne weiteres eindeutig auf Homotransfer geschlossen werden ohne mögliche Artefakte durch weitere Messungen auszuschließen. Im vorliegenden Fall von ACR4 wurden mögliche Orientierungseffekte weitgehend ausgeschlossen, und es wurde Homotransfer in zeitaufgelösten Anisotropiemessungen und durch progressives Photobleichen nachgewiesen. Daher kann die stationäre Anisotropie dazu verwendet werden, Homotransfer und damit die Bildung von homomeren Komplexen von ACR4 in MFIS-Bildern nachzuweisen.

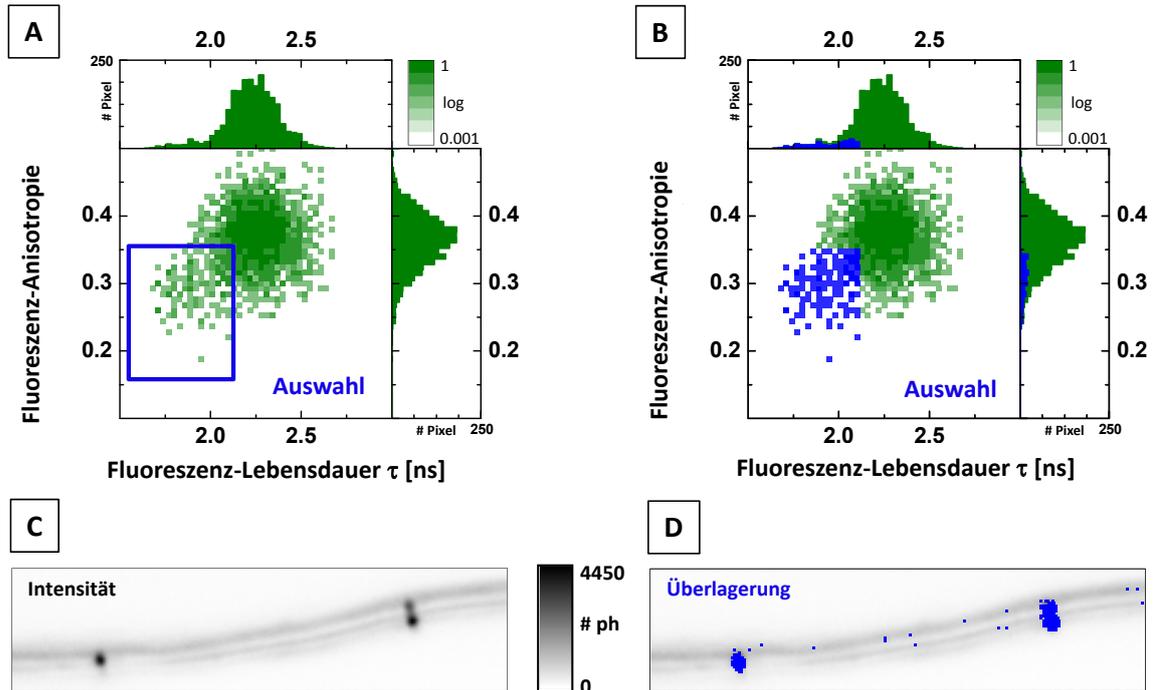
## 4.5. Simultane Identifizierung von homomeren und heteromeren Komplexen

In den beiden vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass sich die Komplexbildung von ACR4 und CLV1 anhand von Energietransfer nachweisen lässt. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Lebensdauer kann Hetero-FRET und damit die Bildung von heteromeren Komplexen nachgewiesen werden. Der Homotransfer zwischen GFP-Molekülen zeigt die Bildung von homomeren Komplexen an und kann mit der Fluoreszenz-Anisotropie bestimmt werden. Ein wesentlicher Punkt ist hier, dass sich beide Parameter in jedem Pixel und damit mit hoher lokaler Auflösung bestimmen lassen.

Die Kombination der beiden Fluoreszenz-Parameter Lebensdauer und Anisotropie ermöglicht nun die simultane Identifizierung von heteromeren und homomeren Komplexen in MFIS-Bildern. Hierzu werden die Fluoreszenz-Lebensdauer und -Anisotropie in einem zweidimensionalen Pixel-Häufigkeitsdiagramm gegeneinander aufgetragen (Abb. 4.46 B, D). Pixel mit identischen Fluoreszenz-Parametern bilden Pixelpopulationen. Unterschiedliche Pixelpopulationen lassen sich im 2d-Histogramm leicht erkennen, selektieren und dem ursprünglichen (Intensitäts-)Bild überlagern. Dies wird in Abbildung 4.45 anhand eines MFIS-Bildes von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry demonstriert. Die blau markierte Pixelpopulation mit niedriger Fluoreszenz-Lebensdauer und niedriger Fluoreszenz-Anisotropie (Abb. 4.45 A, B) überlagert im Intensitätsbild mit den als schwarze, kreisförmige Strukturen zu erkennenden Plasmodesmata (C, D).

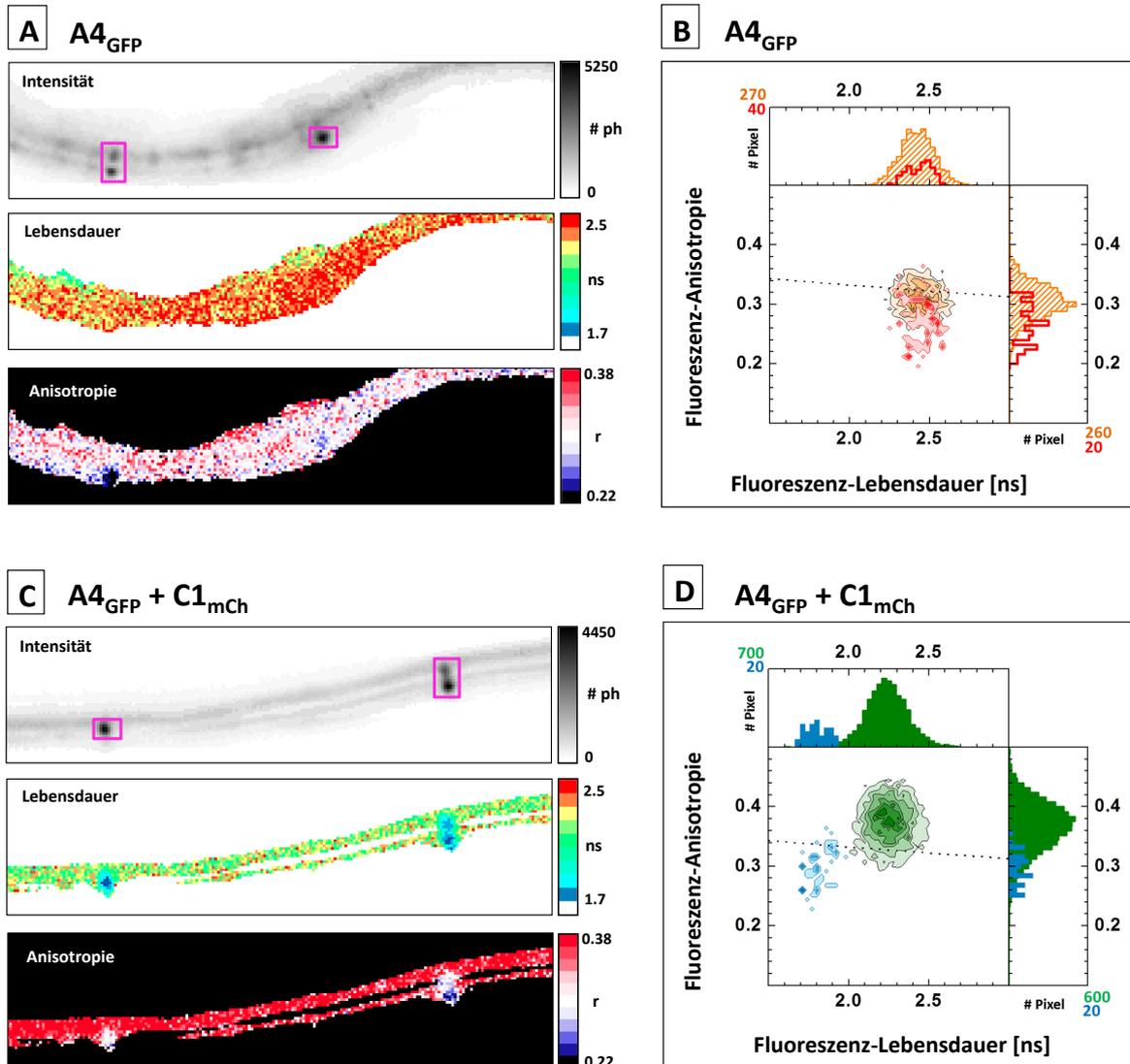
Zum systematischen Vergleich von Plasmodesmata und Plasmamembran ist ein anderes Vorgehen bei der Darstellung von Subpopulationen besser geeignet, da die PD nur wenige Pixel umfassen und gegen die große Population der Pixel der PM im 2d-Histogramm schlecht skaliert werden können. Deshalb wurde im Intensitätsbild der Bereich der PD als ROI ausgewählt und nur aus diesen Pixeln ein 2d-Histogramm erstellt und mit dem 2d-Histogramm der Pixel der PM überlagert (Abb. 4.46 B, D). In dieser Darstellung lassen sich die Eigenschaften von Plasmodesmata und Plasmamembran besonders gut hervorheben und vergleichen.

In Abbildung 4.46 A und C sind die MFIS-Bilder bestehend aus Fluoreszenz-Intensitätsbild, -Lebensdauerbild, und -Anisotropiebild, von ACR4-GFP allein und in Koexpression mit CLV1-mCherry an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N.benthamiana* gezeigt, die Plasmodesmata sind magenta-farben markiert. Die aus den beiden Bildern gene-



**Abbildung 4.45. Pixelpopulationen im 2d-Histogramm und Lokalisation im Intensitätsbild.** 2d-Histogramm F.-Anisotropie gegen F.-Lebensdauer des MFIS-Bildes gezeigt in Abb. 4.46 C von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in *N. benthamiana* mit logarithmischer Skala. Die Pixel der ausgewählten Pixelpopulation (blaues Rechteck, (A, B)) überlagern im Intensitätsbild (D) mit Plasmodesmata, die in (C) als schwarze, kreisförmige Strukturen zu erkennen sind.

rierten zweidimensionalen Pixelhäufigkeitsdiagramme aus Fluoreszenz-Lebensdauer und -Anisotropie (B, D) zeigt jeweils zwei klar getrennte Pixelpopulationen, die jeweils zur Plasmamembran (grün bzw. orange) und zu Plasmodesmata (rot bzw. türkis) gehören. An der Lage im 2d-Histogramm kann die Komplexierung der beteiligten Rezeptorkinasen angelesen werden: ACR4-GFP allein zeigt keine Reduktion der Lebenszeit, also kein hetero-FRET, aber eine reduzierte Anisotropie, die Homo-FRET und damit Homomerebildung anzeigt, an der PM (orange) und besonders ausgeprägt an PD (rot). ACR4-GFP koexprimiert mit mCherry zeigt eine reduzierte Fluoreszenz-Lebensdauer aufgrund von hetero-FRET an der PM (grün) und eine besonders niedrige Lebensdauer an PD (türkis). Zusätzlich zeigt die niedrige Fluoreszenz-Anisotropie an PD (türkis) Homo-FRET und damit die homomere Komplexbildung von ACR4 an.



**Abbildung 4.46. Pixelpopulationen von Plasmodesmata im  $r$ - $\tau$ -2d-Diagramm.** MFIS-Bild (Intensität, Fluoreszenz-Lebensdauer, Fluoreszenz-Anisotropie) von ACR4-GFP alleine (A) und koexprimiert mit CLV1-mCherry (C) in *N. benthamiana*. (B, D) zugehörige 2d-Histogramme F.-Anisotropie gegen F.-Lebensdauer generiert aus (orange) allen Pixeln aus (A), (rot) den ausgewählten Pixeln der PD-Region (magenta-farbenen Rechtecke in (A)), (grün) allen Pixeln aus (C) und (türkis) den ausgewählten Pixeln der PD-Region (magenta-farbene Rechtecke in (C)). Die Perrin-Linie für freies GFP ist jeweils als gestrichelte Linie eingezeichnet.

## 4.6. Mobilität von ACR4 und CLV1 in der PM

Rezeptoren und Rezeptorkinasen in der Plasmamembran unterliegen einer ständigen Fluktuation durch Endo- und Exozytose, Transport und einer sich ändernden Anordnung innerhalb der Membrenumgebung. Komplexbildung mit anderen Rezeptoren und Proteinen sowie Umstrukturierung innerhalb der Membrenumgebung wie lipiden Mikrodomänen sind übliche Mechanismen der Signaltransduktion und des Rezeptorrecyclings nach Ligandenbindung. Diese Prozesse stehen in engem Zusammenhang mit der Mobilität der Rezeptoren in der Plasmamembran. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Methoden der kinetischen Mikroskopie wie FRAP sind dazu geeignet, Diffusionsgeschwindigkeiten, lokale Konzentrationen und Assoziation mit strukturbildenden Elementen der PM in lebenden Zellen zu messen und so wichtige Hinweise zur Rolle der Rezeptoren innerhalb des Signalprozesses zu liefern.

Von Membranproteinen ist bekannt, dass sie unterschiedlich mobile Populationen an der PM bilden. Je nach Funktion und Aktivität liegen die Membranproteine gebunden an statischen, strukturierenden Elementen der PM vor (immobiler Fraktion) oder können sich frei in der PM bewegen (mobile Fraktion). Mit FRAP kann zum einen das Verhältnis von mobiler und immobiler Fraktion bestimmt und zum anderen die Dynamik der mobilen Fraktion auf einer Zeitskala von Millisekunden bis Minuten verfolgt werden. Im FCS-Experiment kann ebenfalls die Dynamik der mobilen Fraktion untersucht werden, im Gegensatz zu FRAP allerdings mit höherer Zeit- und Ortsauflösung. Dies ermöglicht es prinzipiell, Komplexbildung auf molekularer Ebene zu studieren. Die immobile Fraktion ist in einem FCS-Experiment nicht zugänglich, da immobile Teilchen keine Fluktuationen verursachen und daher nicht zur Korrelationsamplitude beitragen.

FRAP und FCS liefern also komplementäre Informationen über die Mobilität in der PM und erfassen die zugrundeliegenden Dynamiken von Mikrosekunden bis Minuten auf unterschiedlichen Längenskalen. Die Kombination beider Techniken wurde angewandt, um die GFP-Fusionen von ACR4 und CLV1 vor und nach Zugabe des jeweiligen Liganden an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana* zu untersuchen (vgl. Material und Methoden 3.4.4 und 3.5.1). Zunächst wurde mit FRAP jeweils der Anteil der mobilen ACR4 und CLV1-Moleküle in der PM bestimmt, anschließend wurden die mobilen Fraktionen mit FCS untersucht.

### 4.6.1. Bestimmung mobiler Fraktionen mit FRAP

Die Mobilität von ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran wurde mit FRAP untersucht. Hierzu wurde die Fluoreszenz in einer kreisförmigen Region (FRAP-ROI) im Bereich der Plasmamembran bis auf das Hintergrundniveau photogeblickt. Die anschließende Fluoreszenzerholung wurde in Bildserien über 2-7 min beobachtet (alle FRAP-Kurven im Anhang A.0.4).

Der Einfluss der Liganden CLE40 bzw. CLV3 auf die Mobilität der zugehörigen Rezeptorkinase wurde in Epidermiszellen untersucht, die 30-60 min in 100 nM Peptidlösung inkubierten. Als Kontrolle für unspezifische Änderung der Mobilität diente das Peptid TDIF, von dem zum Zeitpunkt der Messungen keine spezifische Bindung an ACR4 und CLV1 bekannt war. [Guo et al. 2010] zeigten kürzlich die Bindung von TDIF an CLV1.

ACR4 und CLV1 zeigen beide einen hohen Anteil von immobilisierten Molekülen, die nicht zur Fluoreszenzerholung beitragen (siehe Abb. 4.47 und 4.48).

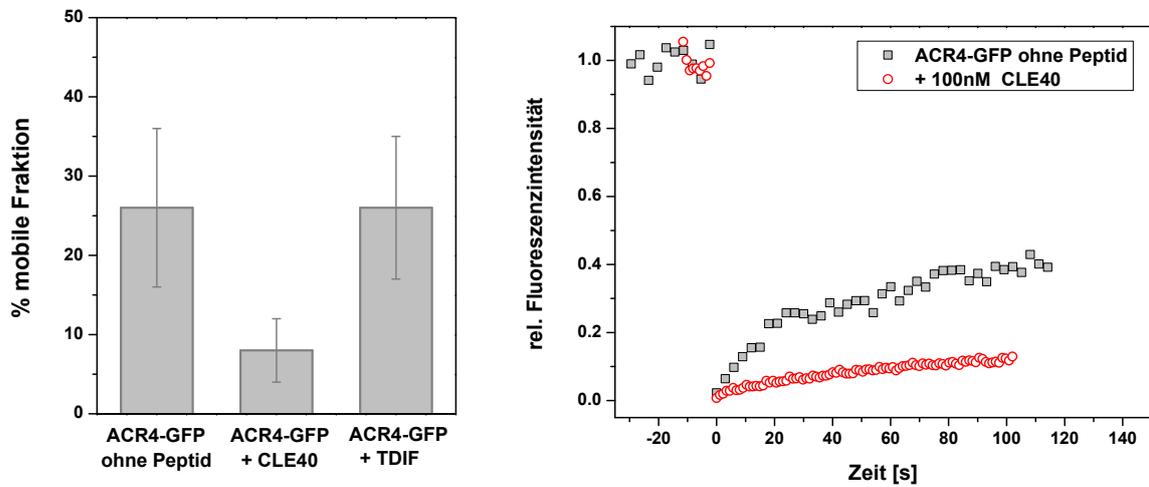
So liegt ACR4 nur zu  $26 \pm 10 \%$  ( $n=10$ ) und CLV1 zu  $31 \pm 10 \%$  ( $n=13$ ) mobil in der PM vor. Die mobile Fraktion beider RK verringert sich unter Einfluss ihres jeweiligen Liganden signifikant: ACR4 zeigt nach Behandlung mit CLE40 eine Abnahme der mobilen Fraktion auf  $8 \pm 4 \%$  ( $n=4$ ). CLV3 verringert die mobile Fraktion von CLV1 auf  $11 \pm 7 \%$  ( $n=7$ ). Die Kontrollen mit TDIF zeigen für ACR4 keine signifikante Änderung der mobilen Fraktion ( $26 \pm 9 \%$ ;  $n=4$ ). Bei CLV1 ist allerdings auch mit TDIF eine Abnahme der mobilen Fraktion zu beobachten ( $15 \pm 6 \%$ ;  $n=5$ ).

Die Halbwertszeiten der Fluoreszenzerholung zeigen nach Peptidzugabe einen Anstieg (vgl. Tabelle Anhang A.6 und A.10). Bei ACR4 verlangsamt die Zugabe von 100 nM CLE40 die Halbwertszeit von  $44 \pm 24$  s auf  $62 \pm 20$  s. CLV1 zeigt nach Zugabe von CLV3 eine Zunahme der Halbwertszeit von  $68 \pm 30$  s auf  $103 \pm 52$  s.

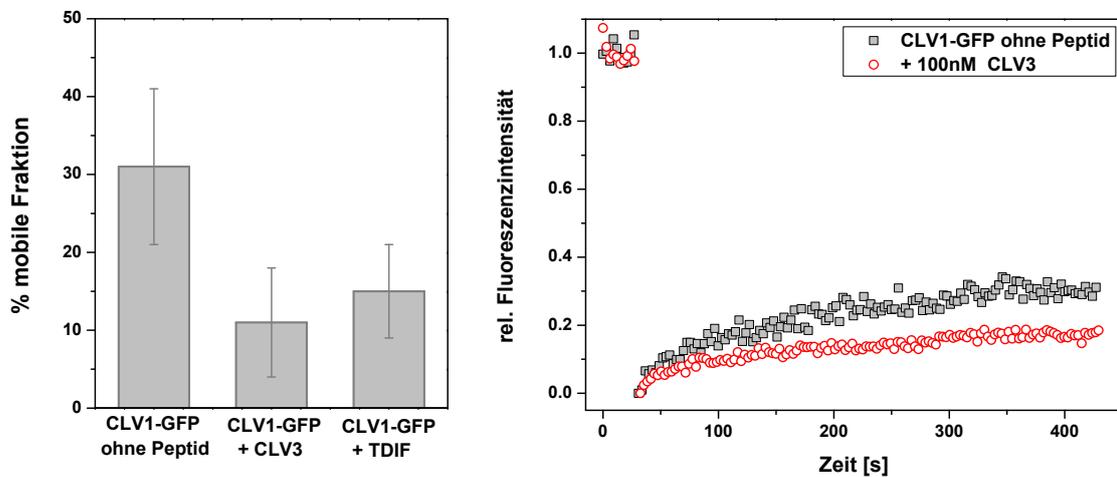
Es wurde von den durchgeführten FRAP-Messungen nur der Anteil der mobilen Fraktion als verlässliche Messgröße verwendet. Die Halbwertszeit, die aus dem verwendeten mono-exponentiellen Modell erhalten wurde, eignet sich zur qualitativen Beschreibung der Mobilitätsänderung unter Einfluss des jeweiligen Peptids. Zur quantitativen Bestimmung von Diffusionskoeffizienten ist die Verwendung entsprechender Modellfunktionen für die zweidimensionale Diffusion in einer Membran unter Berücksichtigung des Bindungsverhaltens nötig [Sprague und McNally 2005], [Owen et al. 2009]. Um bereits beschriebene

analytische Ansätze und Protokolle [Bancaud et al. 2010], [Day et al. 2012] anwenden zu können, sollten in zukünftigen Messungen kleinere FRAP-ROI verwendet werden.

In vielen FRAP-Kurven ist eine Komponente im Zeitbereich unter 10 s zu erkennen. Um diese Komponente und gegebenenfalls auch weitere Komponenten besser erfassen zu können, sollten in zukünftigen Messungen kleinere Bildausschnitte und schnellere Bildserien gewählt werden.



**Abbildung 4.47. FRAP an ACR4-GFP.** Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der FRAP-Messungen an ACR4-GFP exprimiert in *N. benthamiana* Epidermiszellen vor (n=10) und nach Behandlung mit CLE40 (n=4) und TDIF (n=4). Der rechte Graph zeigt je eine FRAP-Kurve vor (schwarz) und nach Zugabe von CLE40 (rot).



**Abbildung 4.48. FRAP an CLV1-GFP.** Das Balkendiagramm zeigt die Ergebnisse der FRAP-Messungen an CLV1-GFP exprimiert in *N. benthamiana* Epidermiszellen vor (n=13) und nach Behandlung mit CLV3 (n=7) und TDIF (n=5). Der rechte Graph zeigt je eine FRAP-Kurve vor (schwarz) und nach Zugabe von CLV3 (rot).

### 4.6.2. FCS an freiem GFP

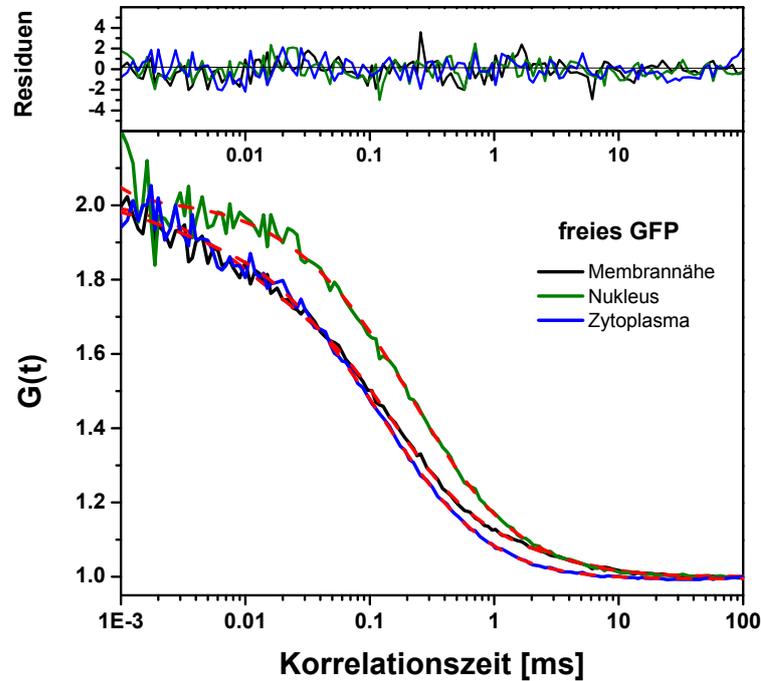
Die Analyse der photodynamischen Eigenschaften der verwendeten GFP-Variante soll Aufschluss darüber geben, welche Terme als intrinsische Eigenschaften des Fluorophors bei der FCS-Kurvenanpassung zu berücksichtigen sind. Des Weiteren soll die Untersuchung von freiem GFP die Varianz von Diffusion und photodynamischen Termen innerhalb einer Zelle und zwischen einzelnen Zellen liefern.

Zur Charakterisierung der Diffusions- und photodynamischen Eigenschaften der verwendeten GFP-Varianten wurden FCS-Messungen in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen durchgeführt, die freies GFP exprimierten. GFP lokalisiert in diesen Zellen vor allem im Zytoplasma und im Nukleus, allerdings nicht an den Membranen, da es selbst nicht membranständig ist und auch über keinen entsprechenden Membrananker verfügt. In der sauren Umgebung der Vakuole ist GFP nahezu nicht fluoreszent (vgl. Abschnitt 3.6.2.2) und kann nur durch Dunkelbehandlung der Pflanzen sichtbar gemacht werden [Tamura et al. 2003].

Die GFP-Expression erreichte typischerweise schon wenige Stunden nach Induktion, besonders im Nukleus, ausreichende Konzentrationen für FCS-Messungen. Es wurden Messungen in unterschiedlichen Zellen im Zytoplasma, im Nukleus und im Zytoplasma in unmittelbarer Nähe der Plasmamembran durchgeführt. Die quantitative Analyse der FCS-Kurven erfolgte durch Kurvenanpassung mit geeigneten Modellfunktionen (siehe Kapitel 3.4.3).

In Abbildung 4.49 ist eine Korrelationskurve aus jedem Zellkompartiment aufgetragen. Die Kurven wurden auf die Amplitude normiert, um die Diffusionszeiten in den unterschiedlichen Zellumgebungen qualitativ besser vergleichen zu können. Die Diffusion im Nukleus ist gegenüber der Diffusion in Zytoplasma verlangsamt, dazu zeigt sich im Zytoplasma in Membrannähe ein zweiter Diffusionsterm im Millisekundenbereich. Die quantitativen Analysen der FCS-Kurven sind in rot dargestellt und liefern folgende Ergebnisse (zusammengefasst in Tabelle 4.8):

Freies GFP im Zytoplasma besitzt eine Diffusionszeit von  $142 \pm 54 \mu\text{s}$  ( $n=3$ ). Um den Zeitbereich unter  $100 \mu\text{s}$  der FCS-Kurve gut anpassen zu können, ist neben dem Tripletterm bei  $2 \mu\text{s}$  ein weiterer *bunching*-Term mit einer Korrelationszeit von  $22 \mu\text{s}$  nötig. Im Nukleus besitzt GFP eine etwas höhere Diffusionszeit von  $201 \pm 29 \mu\text{s}$  ( $n=3$ ). Zur vollständigen Kurvenanpassung ist hier neben einem *bunching*-Term bei  $0,4 \mu\text{s}$  ein



**Abbildung 4.49. Normierte Korrelations-Kurven von freiem GFP** exprimiert in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen. Korrelationskurve jeweils einer Punktmessung im Zytoplasma (blau), im Nukleus (grün) und im Zytoplasma in der Nähe der Plasmamembran (schwarz). Die Kurven wurden auf die Amplituden bei  $t = 0,1 \mu\text{s}$  und  $t = 100 \text{ ms}$  normiert. Die Kurvenanpassungen sind in rot dargestellt. Das obere Diagramm zeigt die zugehörigen Residuen. Zur Kurvenanpassung wurde Gleichung 3.27 (blau, grün) bzw. Gleichung 3.28 (schwarz) verwendet. Die Ergebnisse der Kurvenanpassung sind in Tabelle 4.8 unter Punkt 1 (Zytoplasma), 4 (Nukleus) und 8 (Membrannähe) zu finden.

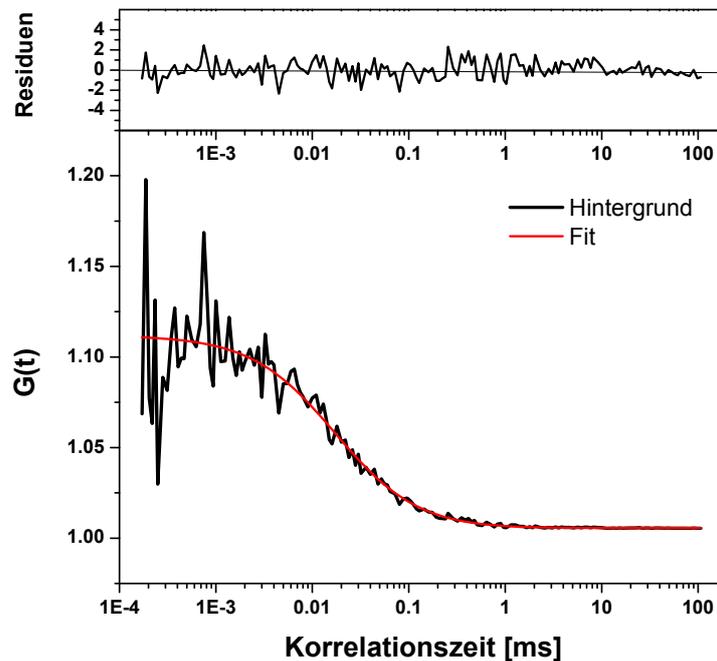
weiterer *bunching*-Term bei  $25 \mu\text{s}$  nötig. In Membrannähe reicht die Beschreibung der Diffusion mit einer Diffusionskomponenten nicht aus: neben einer kurzen Diffusionszeit von  $176 \pm 41 \mu\text{s}$  ( $n=4$ ) kommt eine zweite lange Diffusionszeit von  $4,3 \pm 3,1 \text{ ms}$  (23%) hinzu. Der Tripletterm mit einer Zeit von  $8 \mu\text{s}$  reicht aus, um die Kurve für kurze Korrelationszeiten zu beschreiben, die Verwendung eines Modells mit einem weiteren *bunching*-Term führt zu Überbestimmung.

Die Zählrate pro Molekül (cpm) ist im Zytoplasma in Membrannähe mit 7,6 kHz am geringsten und im Nukleus mit 11,4 kHz am höchsten. Im Mittel über alle Messungen beträgt die Zählrate pro Molekül  $9,0 \pm 3 \text{ kHz}$  ( $n=10$ ).

#### 4.6.2.1. Fluoreszenter Hintergrund in *N. benthamiana*

Unbehandelte Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* zeigen praktisch keine Autofluoreszenz innerhalb des Emissionsspektrums von GFP und Zählraten wie Puffer unter gleichen Anregungsbedingungen. Das detektierte Intensitätssignal zeigt insbesondere keine Korrelation. Der fluoreszente Hintergrund von Blattepidermiszellen, die FP-Fusionen exprimieren, ist dagegen in der ganzen Zelle deutlich erhöht. Zur Bestimmung dieses Hintergrunds wurden Punktmessungen ( $n=2$ ) innerhalb von Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*, die ACR4-GFP exprimierten, aufgenommen. Da ACR4 hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert, sollte die Fluoreszenz in diesem Bereich durch Artefakte der Expression oder Abbauprodukte der GFP-Fusionen bestimmt sein.

Das Fluoreszenzsignal korreliert (Abb. 4.50) und zeigt eine Korrelationszeit von  $17 \mu\text{s}$  (Tab. 4.8). Die Zählrate pro Molekül beträgt  $2,3 \text{ kHz}$ .



**Abbildung 4.50.** Fluoreszenter Hintergrund in Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*, die ACR4-GFP exprimierten. Gemittelte ( $n=2$ ) Korrelationskurve (schwarz) mit Kurvenanpassung (rot). Zur Kurvenanpassung wurde Gl. 3.26 (Diffusion mit Triplett) verwendet. Der obere Graph zeigt die zugehörigen Residuen. Die Ergebnisse der Kurvenanpassung sind in Tab. 4.8 zusammengefasst.

**Tabelle 4.8.** FCS an freiem GFP: Parameter der Kurvenanpassungen (Modellfunktionen siehe Kapitel 3.4.3). cr: Zählrate; cpm: Zählrate pro Molekül; Zy: Zytoplasma; Nu: Nukleus; M: Zytoplasma in Membrannähe; g: globale Anpassung. Die Korrelationskurven zu Punkt 1, 4 und 8 sind in Abb. 4.49 abgebildet.

Komp.	N	R [%]	$t_{D1}$ [ms]	$t_{D2}$ [ms]	B [%]	$t_B$ [ $\mu$ s]	T [%]	$t_T$ [ $\mu$ s]	$\chi^2$	cr [kHz]	cpm [kHz]
1 Zy	25,6	100	0,139		10,0	22	8,2	2	1,057	120	5,3
2 Zy	22,5	100	0,197		14,0	g	0,0	g	1,106	276	10,8
3 Zy	15,4	100	0,090		0,0	g	12,7	g	0,987	138	9,0
<b>Mittel Zy</b>			<b>0,142</b>								<b>8,4</b>
St.abw. $\sigma$			0,054								2,8
4 Nu	11,1	100	0,224		4,5	25	25,6	0,4	0,958	92	8,6
5 Nu	7,5	100	0,212		10,5	g	22,4	g	1,162	74	9,9
6 Nu	8,1	100	0,168		11,0	g	15,6	g	1,286	126	15,6
<b>Mittel Nu</b>			<b>0,201</b>								<b>11,4</b>
St.abw. $\sigma$			0,029								3,7
8 M	27,6	89	0,175	5,38			19,0	8	0,940	174	8,5
9 M	20,5	94	0,195	8,12			11,0	g	1,149	160	4,9
10 M	32,7	47	0,119	0,94			8,0	g	1,466	105	6,9
11 M	15,0	77	0,214	2,96			8,6	g	0,958	288	10,4
<b>Mittel M</b>			<b>0,176</b>	<b>4,35</b>							<b>7,7</b>
Stabw. $\sigma$			0,041	3,10							2,3
<b>Mittel alle</b>											<b>9,0</b>
Stabw. $\sigma$											3,1
<b>Mittel Zy+M</b>											<b>8,0</b>
Stabw. $\sigma$											2,3
<b>Hintergrund</b>	9,41	100	0,017				0	0	0,8386	21	2,3

#### 4.6.2.2. Diskussion

Die FCS-Messungen an freiem GFP in *N. benthamiana* zeigen, dass zur Beschreibung der Korrelationsfunktion neben der Diffusion und dem Triplettübergang ein weiterer Term mit einer Zeit von 22  $\mu\text{s}$  berücksichtigt werden muss (Tab. 4.8). Dieser Term liegt im Zeitbereich bekannter photoinduzierter Übergänge des GFP-Chromophors (siehe Kapitel 3.6.2.2) und scheint charakteristisch für das photodynamische Verhalten der verwendeten GFP-Varianten im Zytoplasma bei der verwendeten Anregungsleistung zu sein.

Das Auftreten einer Zeitkonstanten zwischen zehn und hundert Mikrosekunden kann neben einem photodynamischen Prozess auch durch den fluoreszenten Hintergrund verursacht werden, der eine Korrelationszeit von 17  $\mu\text{s}$  zeigt (Abschnitt 4.6.2.1).

Der fluoreszente Hintergrund wurde in Blattepidermiszellen, die ACR4-GFP exprimierten, gemessen, und könnte daher von abgebauten ACR4-GFP-Molekülen in der Vakuole herrühren. Im sauren Medium der Vakuole zeigt GFP nach Anregung bei 485 nm nahezu keine Fluoreszenz (vgl. Kapitel 3.6.2) und ein Blinken mit einer Korrelationszeit von 45  $\mu\text{s}$  (pH 5) [Haupts et al. 1998], [Widengren et al. 1999a], das im Bereich des beobachteten *bunching*-Terms von 22  $\mu\text{s}$  liegt. Die Hintergrundfluoreszenz könnte prinzipiell auch durch ein kleines fluoreszentes Fremdmolekül verursacht werden. In Pflanzen ist dies nicht unbedingt auszuschließen, da Blattzellen phenolische Verbindungen enthalten, die ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie GFP besitzen können. Allerdings ist dann nicht zu erklären, warum dieser Hintergrund nicht auch in unbehandelten Epidermisblättern vorhanden ist. Außerdem ist die Korrelationszeit des Hintergrunds mit 17  $\mu\text{s}$  kleiner als die Diffusionszeit von Rhodamin mit 36  $\mu\text{s}$ , dessen Größe als kleinstmöglich für einen Farbstoff angenommen werden kann und daher auch die kürzest mögliche Diffusionszeit besitzt.

Durch systematische Variierung der Größe des konfokalen Volumens ließe sich eine Diffusion von einem photodynamischen Prozess unterscheiden, da sich mit der Größe des konfokalen Volumens nur die Diffusionszeit ändert. Photoinduzierte Prozesse sind leistungsabhängig und könnten daher durch Variation der Anregungsleistung identifiziert werden.

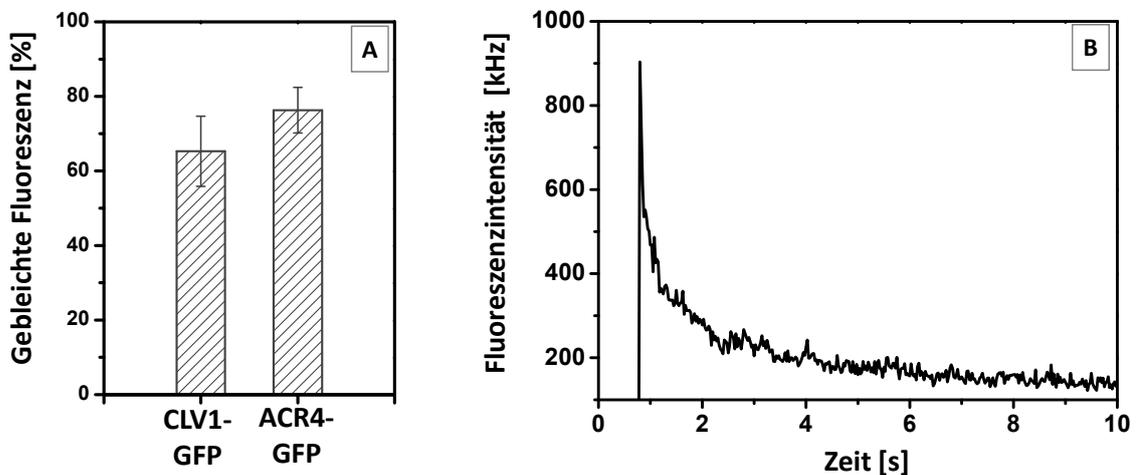
Im Zytoplasma in der Nähe der Plasmamembran zeigt freies GFP eine zweite langsame Diffusionskomponente im Millisekundenbereich. Sie ist mit der Hinderung der Mobilität durch Wechselwirkungen von GFP-Molekülen mit der PM und andern Molekülen im Bereich der PM zu erklären.

Die gemessenen Diffusionszeiten von freiem GFP im Zytoplasma und Nukleus von *N. benthamiana* Blattepidermiszellen entsprechen einem Diffusionskoeffizienten von 7,9–11,2  $\times 10^{-7}$   $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  und sind vergleichbar mit dem Diffusionskoeffizienten von aufgereinigtem GFP in Puffer von  $8,7 \times 10^{-7}$   $\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  [Swaminathan et al. 1997]. Die Abweichung vom Literaturwert kann durch den Einfluss der Viskosität und Wechselwirkungen mit anderen Molekülen herrühren und liegt innerhalb der Standardabweichungen der Messungen, die zwischen 16 und 39 % betragen. Die Unterschiede der Diffusionszeiten zwischen den einzelnen Zellkompartimenten sind nicht signifikant (T-Test). Die Berücksichtigung aller Messungen (n=10) liefert für den Diffusionskoeffizienten von GFP eine Standardabweichung von 34 % und damit den Rahmen für eine sinnvolle Interpretation der FCS-Daten von ACR4 und CLV1 (siehe Kapitel 4.6.4).

### 4.6.3. Isolierung der mobilen Fraktion durch Photobleichen

Wie die FRAP-Messungen zeigten, liegen ACR4 und CLV1 zu etwa 70% nicht frei beweglich in der Plasmamembran vor. Dies führt im FCS-Experiment dazu, dass der Großteil der Moleküle im konfokalen Volumen zur Intensität, aber nicht zur Fluktuation beiträgt. Daraus resultieren verschwindend geringe Korrelationsamplituden und damit nicht verwertbare Kurven.

Um die mobile Fraktion mit FCS untersuchen zu können, muss also zunächst die störende immobile Fraktion durch Photobleichen beseitigt werden. Praktisch geschah dies in den ersten 10-30 s einer FCS-Punktmessung, in denen die Fluoreszenzintensität bis zum Erreichen einer stabilen Zählrate steil abfiel (siehe Bleichkurven in Abb. 4.53 bis 4.59). Ein Beispiel einer Bleichkurve von ACR4-GFP an der PM ist in Abbildung 4.51 zu sehen. Der Fluoreszenzabfall durch Photozerstörung immobilier Moleküle beträgt im Mittel für ACR4-GFP  $76 \pm 6 \%$  ( $n=8$ ) und für CLV1-GFP  $65 \pm 9 \%$  ( $n=10$ ). Der durch Photobleichen bestimmte Anteil der immobilen Fraktion ist vergleichbar mit den Ergebnissen der FRAP-Messungen (ACR4-GFP 74 %, CLV1 69 %, siehe Abschnitt 4.6.1).



**Abbildung 4.51. Photobleichen der immobilen Fraktion.** (A) Das Balkendiagramm zeigt den Anteil der photogeblichen Fluoreszenz von ACR4-GFP ( $n=10$ ) und CLV1-GFP ( $n=10$ ). (B) Der rechte Graph zeigt eine Bleichkurve von ACR4-GFP.

#### 4.6.4. FCS an ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran

Nach der Isolierung der mobilen Fraktionen von ACR4-GFP und CLV1-GFP durch Photobleichen zeigten die Intensitätsspektren an der Plasmamembran Korrelation. Die aufgenommenen Bleichkurven sowie die Intensitätsspektren und Korrelationskurven sind in den Abbildungen 4.53 bis 4.59 gezeigt.

Sowohl die Intensitätsspektren als auch die Korrelationskurven sind heterogen. Manche Intensitätsspektren zeigen spitzenartige Ausschläge (z. B. Abb. 4.54 21-2), andere dagegen ein homogenes Rauschen (z. B. Abb. 4.53 10-2). In den Korrelationskurven fallen zwei Terme bei Korrelationszeiten von 100-1000  $\mu\text{s}$  und 10-100 ms auf, die bei den einzelnen Punktmessungen unterschiedlich stark ausgeprägt sind.

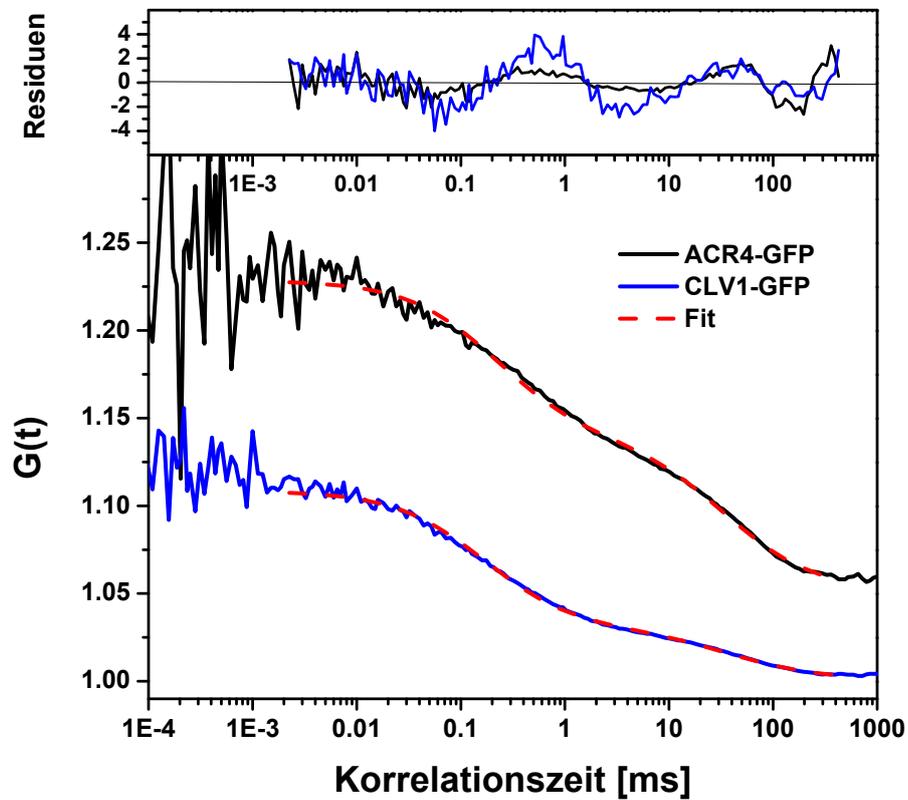
Die Kurven wurden mit einer Modellfunktion angepasst, die zwei Diffusionsterme berücksichtigt (Gleichung 3.28). Die zusätzliche Verwendung eines *bunching*-Terms bei Korrelationszeiten unter 100  $\mu\text{s}$  verbesserte das  $\chi^2$  der Kurvenanpassung nicht.

In Abbildung 4.52 ist je eine Korrelationskurve mit Kurvenanpassung für ACR4-GFP und CLV1-GFP gezeigt. Die Kurvenanpassung ergab für ACR4-GFP eine Diffusionszeit  $t_1$  von 223  $\mu\text{s}$  (51 %) und eine Diffusionszeit  $t_2$  von 35 ms. Für CLV1-GFP ergaben sich  $t_1$  zu 169  $\mu\text{s}$  (74 %) und  $t_2$  zu 39 ms.

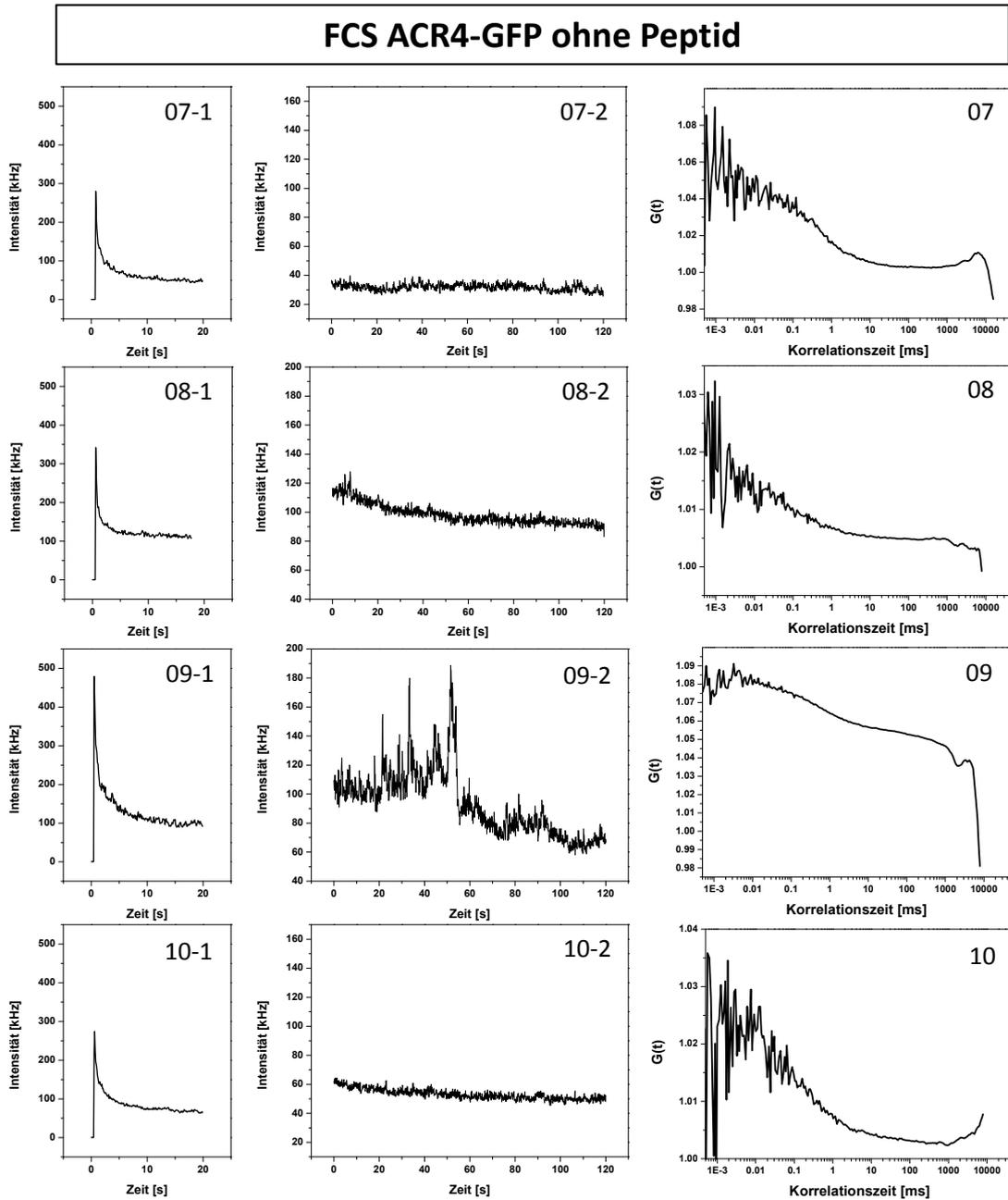
Die Heterogenität sowohl der Intensitätsspektren als auch der Korrelationskurven äußert sich in der Analyse in einer breiten Streuung der Diffusionszeiten, die Standardabweichungen liegen bei 50-150 % (siehe Tabelle 4.9 und im Anhang Tab. A.11). Innerhalb dieser Fehlergrenzen ergibt sich für ACR4-GFP und CLV1-GFP eine Komponente mit einer Diffusionszeit  $t_1$  zwischen 100 und 500  $\mu\text{s}$  und eine zweite Komponente mit einer Diffusionszeit  $t_2$  zwischen 1 und 100 ms.

**Tabelle 4.9.** Ergebnisse der FCS Kurvenanpassungen für ACR4 und CLV1 jeweils vor und nach Behandlung mit Peptid gemittelt über n Messungen an verschiedenen Zellpaaren. Die Kurvenanpassungen der Einzelkurven erfolgte im Zeitbereich 2,25  $\mu\text{s}$  - 426 ms mit zwei Diffusionstermen nach Gleichung 3.28. Die Ergebnisse der Kurvenanpassungen der Einzelkurven sind im Anhang Abb. A.11 zu finden.

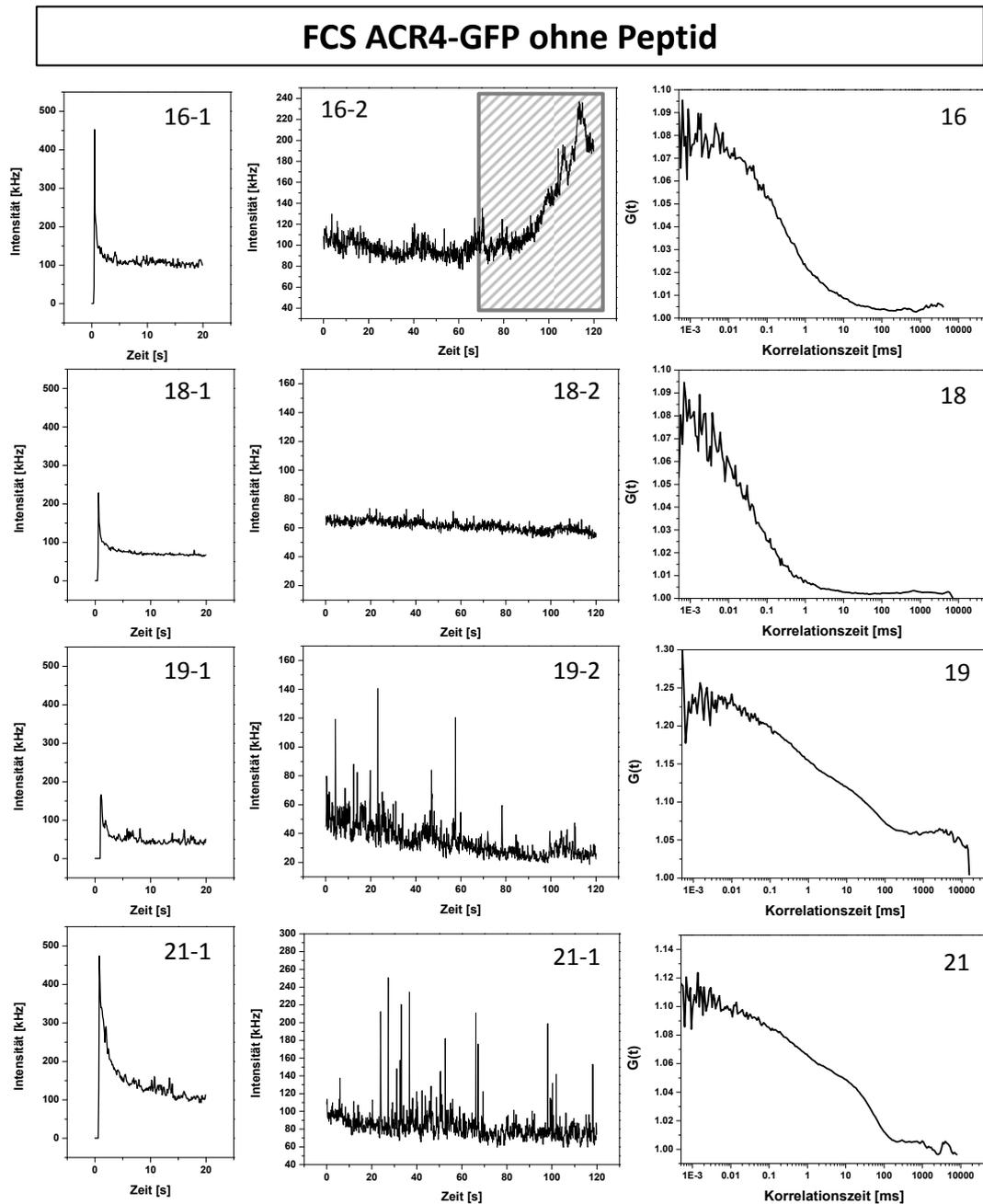
	A4 <sub>GFP</sub>	A4 <sub>GFP</sub> + CLE40	C1 <sub>GFP</sub>	C1 <sub>GFP</sub> + CLV3
n	8	4	10	4
$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	186 $\pm$ 117	1608 $\pm$ 1238	236 $\pm$ 112	513 $\pm$ 256
$t_2$ [ms]	24 $\pm$ 29	267 $\pm$ 296	40 $\pm$ 56	1179 $\pm$ 1772
R [%]	74 $\pm$ 20	52 $\pm$ 27	72 $\pm$ 11	65 $\pm$ 21
cpm [kHz]	4,1 $\pm$ 3,1	2,3 $\pm$ 1,8	3,2 $\pm$ 2,0	2,6 $\pm$ 3,5



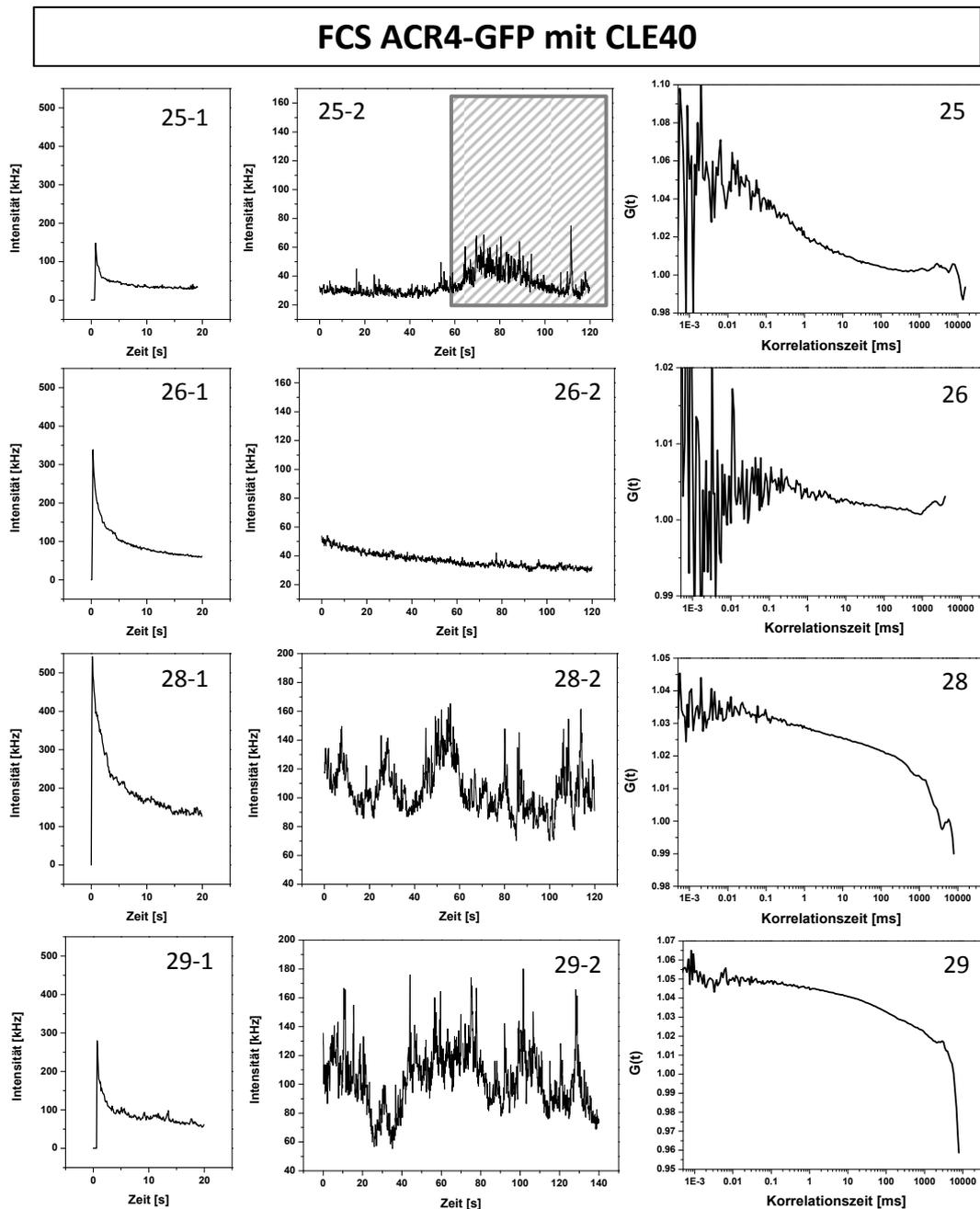
**Abbildung 4.52. FCS: Diffusion von ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran.** Korrelationskurven jeweils einer Punktmessung an der PM einer Blattepidermiszelle in *N. benthamiana*, die ACR4-GFP (schwarz) bzw. CLV1-GFP (blau) exprimierte (siehe auch Abb. 4.54 19 und 4.56 10). Die Kurvenanpassungen (rot) erfolgten mittels einer Modellfunktion, die zwei Diffusionskomponenten berücksichtigt (Glg. 3.28). Der obere Graph zeigt die zugehörigen Residuen der Kurvenanpassungen. (Ergebnisse der Kurvenanpassung siehe Anhang Tab. A.11).



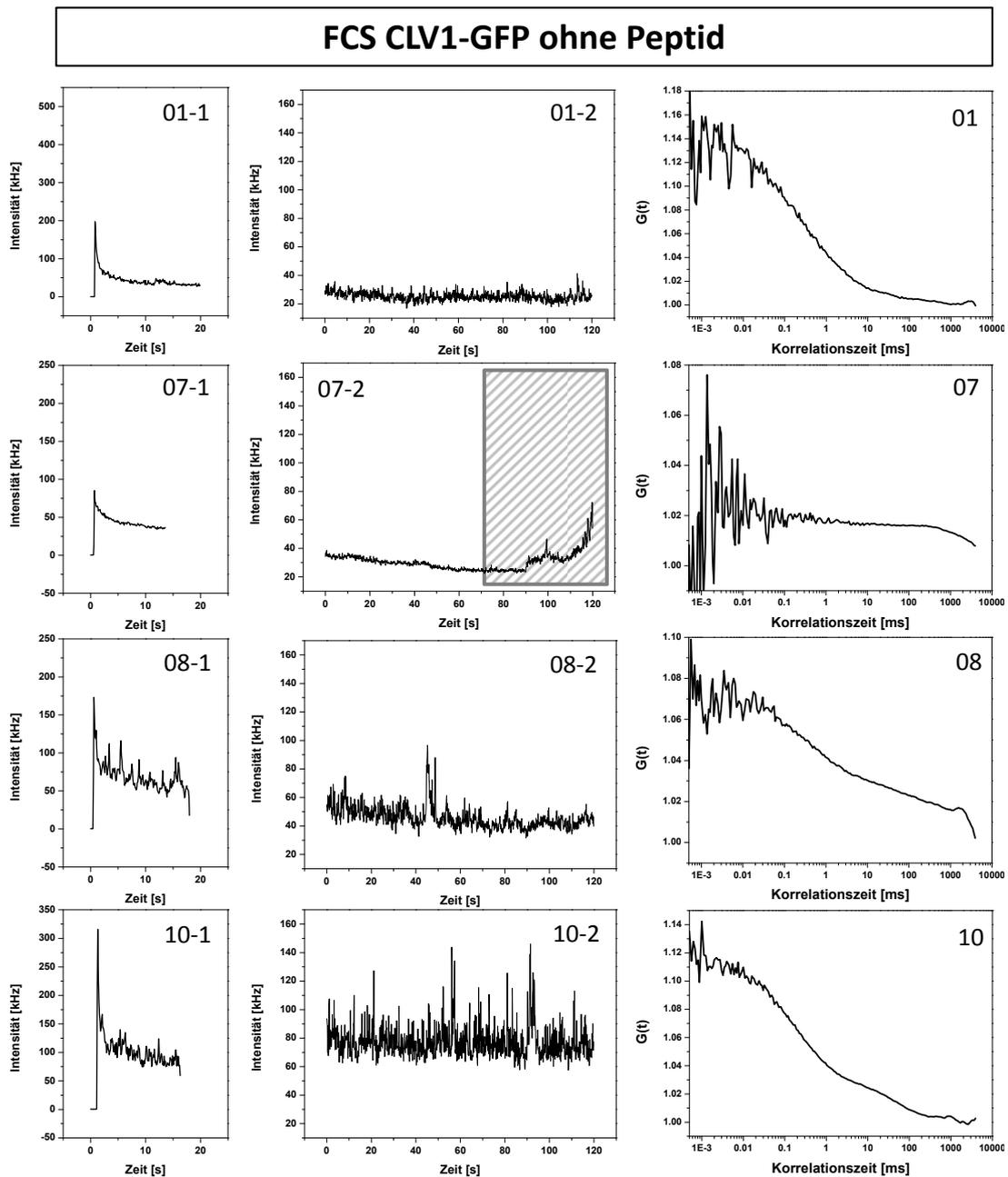
**Abbildung 4.53. FCS an ACR4-GFP ohne Peptid.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Zugehörige Korrelationskurve.



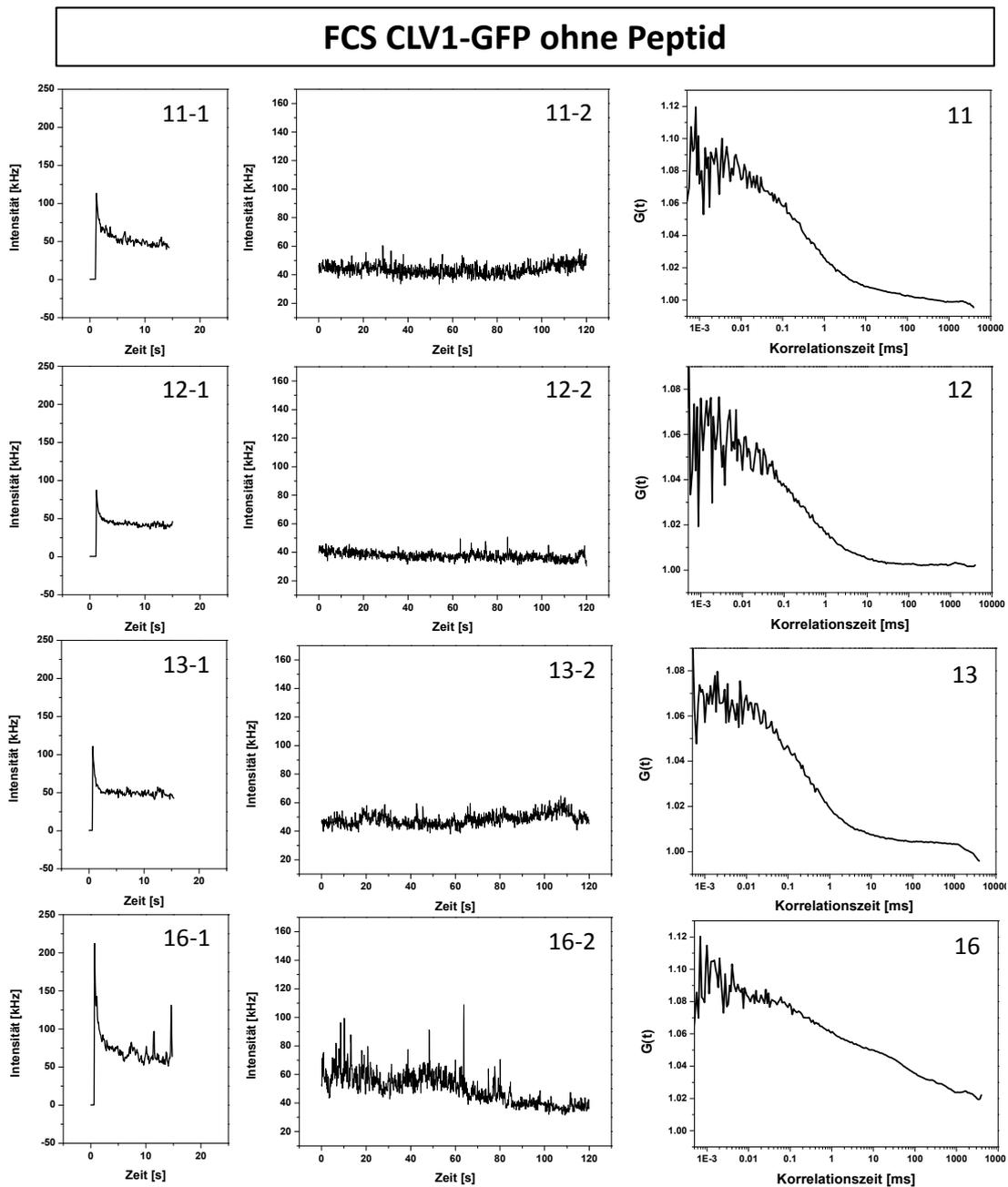
**Abbildung 4.54. FCS an ACR4-GFP ohne Peptid.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Korrelation der Intensitätsspur (ohne schraffierte Bereiche).



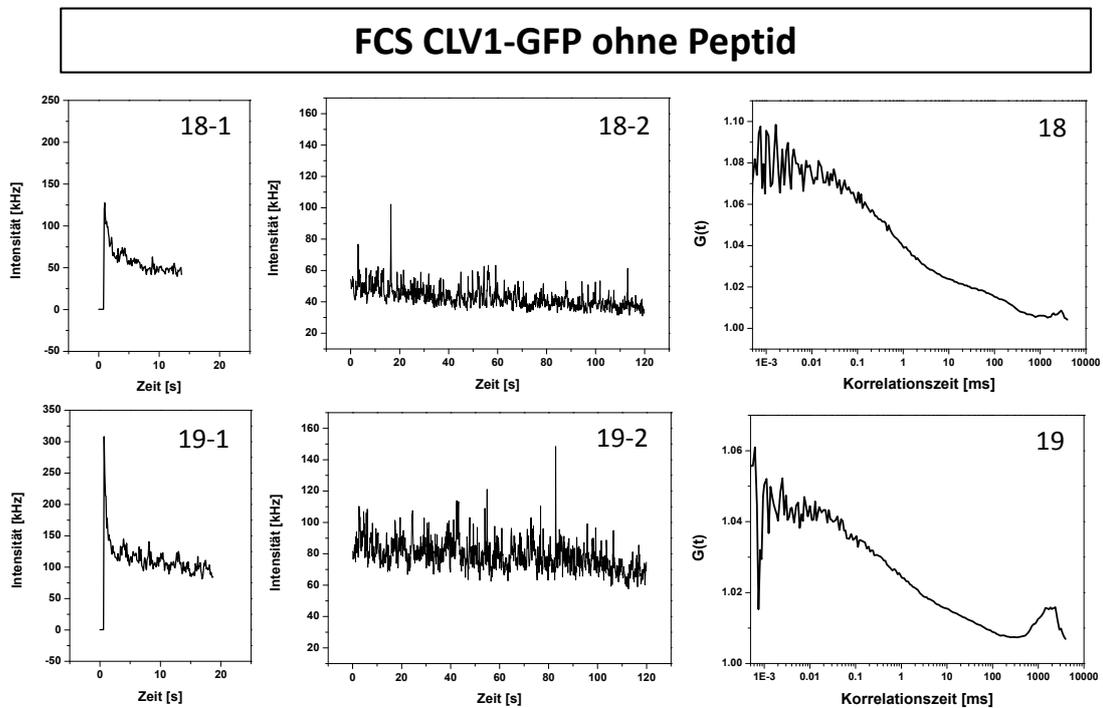
**Abbildung 4.55. FCS an ACR4-GFP mit CLE40.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Korrelation der Intensitätsspur (ohne schraffierte Bereiche).



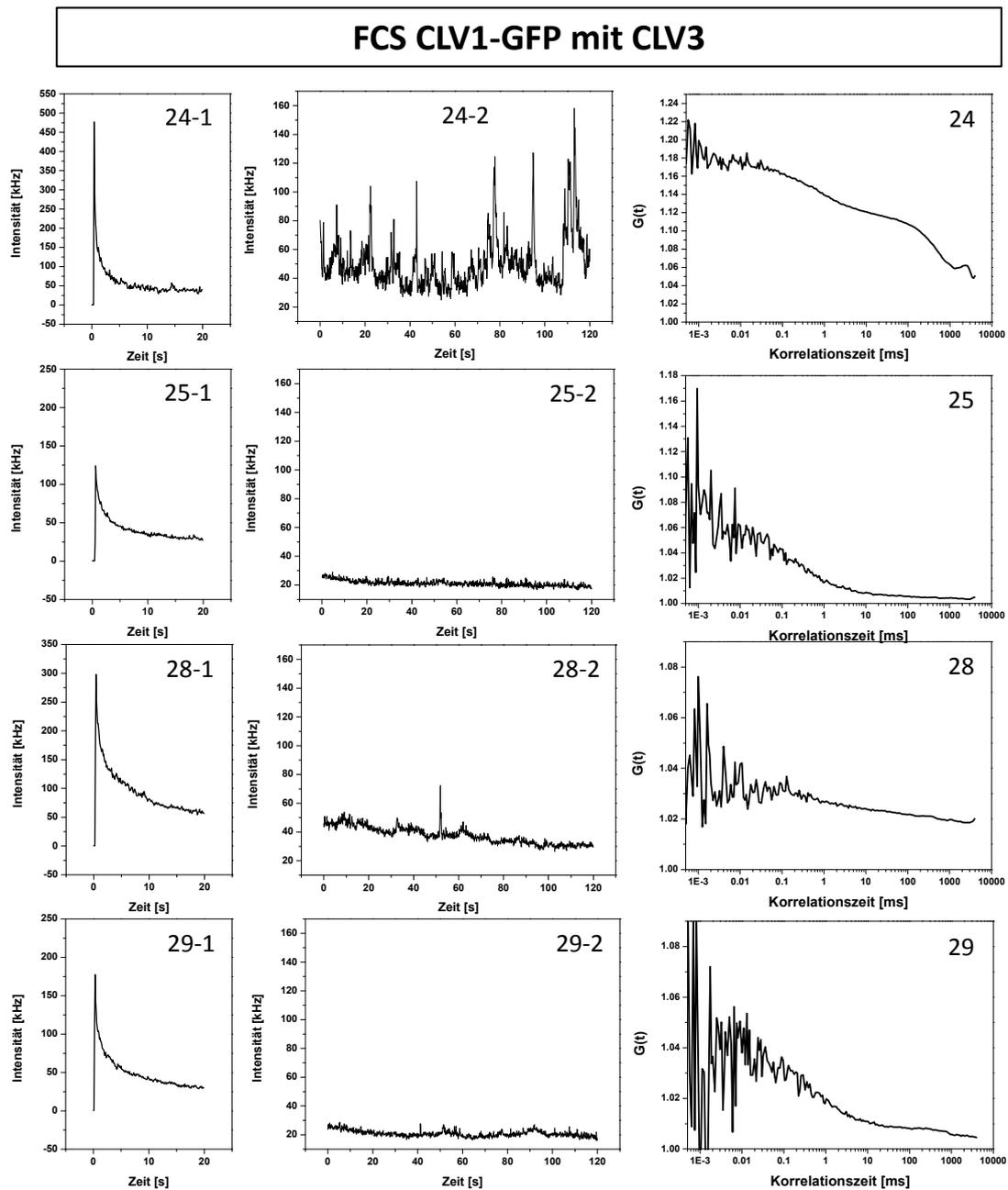
**Abbildung 4.56. FCS an CLV1-GFP ohne Peptid.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Korrelation der Intensitätsspur (ohne schraffierte Bereiche).



**Abbildung 4.57. FCS an CLV1-GFP ohne Peptid.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Korrelation der Intensitätsspur.



**Abbildung 4.58. FCS an CLV1-GFP ohne Peptid.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt-  
messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im An-  
schluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts)  
Korrelation der Intensitätsspur.



**Abbildung 4.59. FCS an CLV1-GFP mit CLV3.** (links) Bleichkurve zu Beginn einer Punkt- messung an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (Mitte) Im Anschluss an die Bleichkurve an der gleichen Stelle der PM aufgenommene Intensitätsspur. (Rechts) Korrelation der Intensitätsspur.

#### 4.6.5. Bestimmung ligandenabhängiger Mobilitätsänderungen mit FCS

Die vorangegangenen FRAP-Messungen zeigten für ACR4 und CLV1 nach Ligandenzugabe ein kleineres Verhältnis von mobiler zu immobilisierter Fraktion. Dies könnte zum einen durch Internalisierung der Moleküle der mobilen Fraktion oder Bildung größerer Komplexe und/oder Cluster begründet sein. Dabei ist unbekannt, ob Oligomerisierung als erster Schritt eine Rolle spielt und wie homogen die mobile Fraktion reagiert. Um dies näher zu untersuchen, wurden FCS-Messungen an Blattstücken durchgeführt, die 30-60 min in 100-nanomolarer Peptidlösung inkubiert wurden.

Bereits 10-15 min nach Peptidzugabe konnte insbesondere bei CLV1 eine verstärkte Vesikelbildung beobachtet werden. Außerdem wurde es im FCS-Experiment deutlich schwieriger, Intensitätsspektren zu erhalten, die über 20-60 s stabile mittlere Zählrate zeigten (siehe Intensitätsspektren in Abb. 4.55 und 4.59). Diese Hinweise auf eine umfassende Bildung von großen Komplexformationen zeigten sich auch in den Korrelationskurven, die an jeweils vier Zellen aufgenommen werden konnten (Abb. 4.55 und 4.59).

Zum qualitativen Vergleich der Diffusion von ACR4 und CLV1 mit und ohne Peptid wurden die Korrelationskurven von jeweils  $n$  Zellpaaren gemittelt und anschließend mit einer Modellfunktion angepasst, die zwei Diffusionsterme berücksichtigt, sowie einen *bunching*-Term mit einer Korrelationszeit von  $17 \mu\text{s}$ , die dem fluoreszenten Hintergrund entspricht (vgl. Abschnitt 4.6.2.1).

In Abbildung 4.60 sind die auf die Amplitude bei  $2,25 \mu\text{s}$  normierten Korrelationskurven von ACR4 und CLV1 vor und nach Peptidbehandlung dargestellt, die zugehörigen Ergebnisse der Kurvenanpassung sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

Sowohl ACR4 als auch CLV1 liegen zum größten Teil (ACR4: 84 %; CLV1: 76 %) hochmobil vor und zeigen Diffusionszeiten von  $243 \mu\text{s}$  (ACR4) bzw.  $321 \mu\text{s}$  (CLV1).

Neben der hochmobilen Fraktion zeigt sich eine weitere Diffusionskomponente mit einer Diffusionszeit von 15 ms (ACR4) bzw. 38 ms (CLV1).

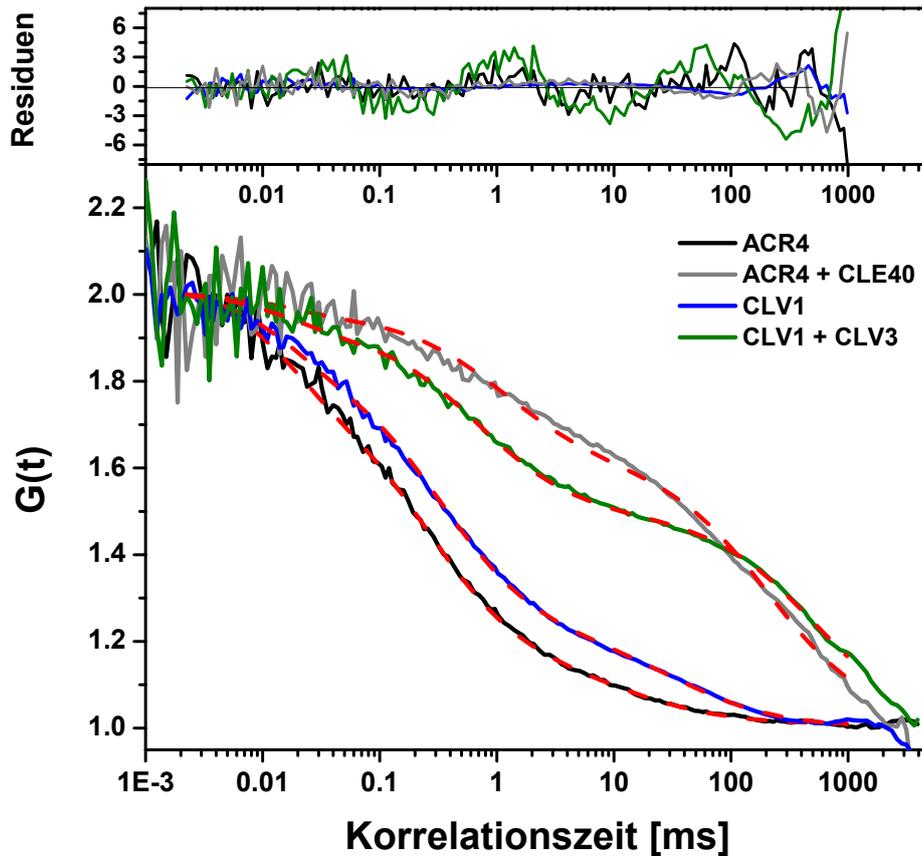
Die Korrelationskurven beider Rezeptorkinasen zeigen nach Peptidbehandlung deutlich längere Diffusionszeiten und einen starken Anstieg der langsamen Diffusionskomponenten. Vor Zugabe von CLE40 gehören nur 16 % der ACR4-Moleküle zur langsamen Fraktion mit einer Diffusionszeit im Millisekundenbereich, nach Behandlung mit CLE40 stellt diese Fraktion 63 % und besitzt eine um eine Größenordnung längere mittlere Diffusionszeit von

213 ms. Die hochmobile Fraktion bei 243  $\mu\text{s}$  verschwindet nahezu vollständig, dafür zeigt sich eine zweite starke Komponente im Millisekundenbereich (1,1 ms).

Die Mobilität von CLV1 verringert sich nach Behandlung mit CLV3 ebenfalls deutlich: 53% statt vorher 24 % der Moleküle gehören zur langsamen Fraktion mit einer Diffusionszeit von 507 ms. Im Gegensatz zu ACR4 bleibt die hochmobile Fraktion erhalten, zeigt aber eine verlangsamte Diffusionszeit von 668 ms statt vorher 321 ms.

**Tabelle 4.10.** Ergebnisse der FCS Kurvenanpassungen nach Gleichung 3.28 für ACR4 und CLV1 jeweils vor und nach Behandlung mit Peptid. Die Kurvenanpassung erfolgte an gemittelten Korrelationskurven von n unterschiedlichen Zellpaaren. Die Korrelationskurve des Hintergrunds wurde mit Gleichung 3.26 angepasst.

	A4 <sub>GFP</sub>	A4 <sub>GFP</sub> + CLE40	C1 <sub>GFP</sub>	C1 <sub>GFP</sub> + CLV3	Hintergrund
n	10	4	10	4	2
N	26,8	34,8	15,0	12,2	9,4
$t_1$ [ $\mu\text{s}$ ]	243	1105	321	668	17
$t_2$ [ms]	14,8	213,3	37,5	506,9	-
R [%]	84	37	76	47	100
T [%]	23	5	17	9	0,0
$t_T$ [ $\mu\text{s}$ ]	17	17	17	17	0
$b_0$	1,0060	1,0160	1,0067	1,0055	1,0056
$\chi^2$	2,7197	0,3734	7,4036	1,1725	0,8386
Zählrate [kHz]	51,8	71,8	48,5	32,4	21,3
cpm [kHz]	1,9	2,1	3,2	2,7	2,3



**Abbildung 4.60. FCS: Diffusion von ACR4 und CLV1 nach Ligandenbindung.** Normierte Korrelationskurven von ACR4-GFP (schwarz), CLV1-GFP (blau), ACR4-GFP nach Behandlung mit 100 nM CLE40 (grau) und CLV1-GFP nach Behandlung mit 100 nM CLV3 (grün). Jede Kurve wurde durch intensitätsgewichtete Mittelung von 10 (ACR4, CLV1) bzw. 4 (mit CLE40, CLV3) Einzelmessungen an unterschiedlichen Zellpaaren erhalten. Die Kurvenanpassungen (rot) erfolgten mittels einer Modellfunktion, die zwei Diffusionskomponenten und einen *bunching*-Term mit einer festen Korrelationszeit von 17  $\mu$ s berücksichtigt (Gleichung 3.28). Der obere Graph zeigt die zugehörigen Residuen der Kurvenanpassungen. Die Ergebnisse der Kurvenanpassung sind in Tabelle 4.10 zusammengefasst.

#### 4.6.6. Diskussion der FRAP- und FCS-Messungen

Die Dynamiken von Molekülen innerhalb der Plasmamembran finden in Bereichen von 2-300 nm statt, deren Längenskalen zwischen der Größe einzelner Moleküle und großer Molekülcluster liegen. Hier sind besonders drei Bereiche von Bedeutung [Kusumi et al. 2012]: (1) Zytosklett- und zellwandassoziierte Komplexformationen (40–300 nm), (2) lipide Mikrodomänen (lipid rafts) (2–20 nm) und (3) dynamische Proteinkomplexe (3–10 nm). Die dynamische Interaktion und Anordnung von Rezeptoren und Proteinen in diesen Domänen ist spezifisch und steht in Zusammenhang mit deren Funktionsweise, z. B. innerhalb eines Signalwegs [Cebecauer et al. 2010].

Da die Größe der Zonen unterhalb des Beugungslimits liegt, können sie mit optischer Mikroskopie nicht ohne Weiteres abgebildet und untersucht werden. Daher wurde hier FRAP, eine Methode der kinetischen Mikroskopie, und FCS angewendet, um über die Analyse der Mobilität der Rezeptorkinasen in der Plasmamembran deren Bindung und Assoziation an Membrandomänen zu bestimmen. Mit FRAP wird hierbei die Mobilität auf einer Längenskala von Mikrometern untersucht, während mit FCS in Punktmessungen die Diffusion innerhalb des konfokalen Volumens und damit auf einer Längenskala unterhalb eines Mikrometers beobachtet wird.

##### 4.6.6.1. FRAP

#### **Assoziation mit immobilisierten Membrandomänen ist spezifisch für ACR4 und CLV1**

Mit FRAP konnte gezeigt werden, dass etwa 70 % der ACR4- und CLV1-Moleküle, die in der Plasmamembran vorliegen, immobil sind. Dies lässt eine starke Assoziation von ACR4 und CLV1 mit lipiden Mikrodomänen, gerüstbildenden Proteinkomplexen und/oder mit dem Zytosklett oder der Zellwand verbundenen Domänen in der Plasmamembran vermuten. Auch die Beteiligung von weiteren bisher unbekanntem Bindungspartnern in Proteinkomplexen ist denkbar. Mobilitätsmessungen an den Rezeptorkinasen BRI1 und FLS2 [Ali et al. 2007] und den rezeptorähnlichen Kinasen BAK1 und SERK1 [Hink et al. 2008] ergaben immobile Fraktionen von unter 30 %. Der Vergleich mit diesen ähnlichen RK legt nahe, dass der auffallend hohe Anteil von immobilisierten Molekülen und die damit verbundene Assoziation mit Membrandomänen spezifisch für ACR4 und CLV1 ist.

### **ACR4 und CLV1 zeigen ligandeninduzierte Clusterbildung**

Unter dem Einfluss des zugehörigen Liganden ist für ACR4 und CLV1 eine Zunahme der immobilen Fraktion zu beobachten. Dies lässt zum einen die Schlussfolgerung zu, dass trotz der ausgeprägten Bindung an immobile Membrandomänen auch die korrespondierende mobile Fraktion an der Signaltransduktion beteiligt ist. Zum anderen bedeutet dies, dass Clusterbildung, z.B. in lipide Mikrodomänen, eine Reaktion auf die extrazelluläre Stimulation darstellt. Hier stellt sich die Frage, ob die Clusterbildung, z.B. als Signalkomplex, ein notwendiger Teil der Signaltransduktion ist oder ein Prozess der Endozytose von verbrauchten Rezeptorkinasen.

Das Modell des Brassinosteroid-abhängigen Signalwegs (Review: [Karlova und de Vries 2006]) enthält beide Aspekte: Die Rezeptorkinase BRI1 und die Rezeptor-ähnliche Kinase BAK1 bilden einen Heterokomplex nach Bindung von Brassinosteroid (BR) [Li et al. 2002], [Nam und Li 2002] sowohl an der Plasmamembran als auch in Endosomen [Rusinova et al. 2004]. Außerdem unterliegen diese beteiligten Membranproteine einem ständige Austausch an der PM, der unabhängig von der Bindung an BR ist. Das endosomale System dient hier nicht nur dem Rezeptorrecycling und -abbau, sondern kann auch ein notwendiger Teil des Signalprozesses sein [Geldner et al. 2007].

In aktuellen Modellen der ligandeninduzierten Rezeptoraktivierung und -internalisierung spielen lipide Mikrodomänen eine zentrale Rolle [Simons und Toomre 2000]. Sie können als Plattform für Proteinkomplexbildung dienen und/oder Ausgangspunkt für Rezeptorabbau und Recycling sein.

Die vorliegenden Mobilitätsmessungen können nicht aufschlüsseln, welchen genauen Zweck die Clusterbildung bei der Signaltransduktion über ACR4 und CLV1 erfüllt. Zum einen ist die hier gezeigte Assoziation von ACR4 und CLV1 mit immobiligen Membrandomänen nach Ligandenbindung im Einklang mit der beobachteten ligandeninduzierten Endozytose beider RKs [Stahl et al. 2013] und spricht für einen Prozess des Rezeptorabbaus. Andererseits legt die Lokalisation von ACR4 an Plasmodesmata eine funktionelle Bedeutung von Molekülclustern und Gerüstproteinen wie Kallose bei der Signaltransduktion nahe. Beide Erklärungen schließen sich nicht gegenseitig aus.

### **Kontrolle mit TDIF und Artefakte der Expression in *N. benthamiana***

Als Kontrolle dienten Messungen mit dem Peptid TDIF, von dem keine spezifische Bindung an ACR4 bekannt ist. So zeigte die Behandlung mit TDIF keinen Einfluss auf die Mobilität von ACR4. Zum Zeitpunkt der Messungen war keine Interaktion mit CLV1 bekannt. [Guo et al. 2010] zeigten kürzlich die spezifische Bindung von TDIF an CLV1. Dies erklärt

die Beobachtung, dass die Mobilität von CLV1 nach Zugabe von TDIF und CLV3 in vergleichbarem Umfang sank.

Die Expression in *N. benthamiana* birgt generell die Gefahr von Artefakten durch die Anwesenheit von anderen RK und RLK, die potentielle Bindungspartner sein können. Wie bereits für BAK1 gezeigt wurde [Chinchilla et al. 2009], können RK bzw. RLK abhängig von anderen RK in unterschiedliche Signalwege involviert sein. Es wäre also denkbar, dass bisher unbekannte Partner von ACR4 und CLV1, die in *N. benthamiana* Blattepidermiszellen exprimiert sind, auf die Peptidbehandlung reagieren.

### **Heterogenitäten innerhalb der Plasmamembran**

Generell weisen die hohen Standardabweichungen von bis zu 64 % auf Unterschiede zwischen individuellen Zellen hin, die abhängig vom Expressionsgrad sein können und einer eingehenderen Untersuchung mit größerem Stichprobenumfang bedürfen.

Darüber hinaus reflektieren die hohen Standardabweichungen, insbesondere der Halbwertszeiten, Heterogenitäten innerhalb der Plasmamembran. Die PM kann nicht als einfache Flüssigkeit aufgefasst werden, sondern vielmehr als organisiertes Kompartiment unterteilt in definierte Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen [Ritchie und Spector 2007], [Owen et al. 2009]. Es ist davon auszugehen, dass Rezeptoren und assoziierte Proteine in spezifischen Bereichen der PM lokalisieren und aktiviert werden. Unveröffentlichte FRET-FLIM-Messungen von Qijun Ma und Marc Somssich an ähnlichen RK in *N. benthamiana* und die Ergebnisse von [Bücherl et al. 2013] zeigen, dass Komplexbildung u. U. nur in inselartigen Bereichen der PM stattfindet, während andere Membranbereiche keine Komplexbildung zeigen.

#### **4.6.6.2. FCS**

Es konnten erfolgreich FCS-Messungen an der Plasmamembran von *N. benthamiana* Blattepidermiszellen zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten von Membranproteinen angewendet werden. Die Messungen umfassen nur die mobile Fraktion, die durch irreversibles Photobleichen der immobilisierten Fraktion isoliert wurde.

### **Fluoreszenter Hintergrund**

Die Blattepidermiszellen von *N. benthamiana*, die GFP-Fusionen exprimieren, zeigen einen korrelierenden fluoreszenten Hintergrund im Inneren der Zelle (Kapitel 4.6.2.1). Zusätzlich

wurde Fluoreszenz im Zellkern beobachtet, obwohl keine Lokalisation der untersuchten Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 im Nukleus beschrieben ist. Es könnte sich um Artefakte der Expression und um unvollständige GFP-Fusionen oder freies GFP handeln. Nähere Untersuchungen insbesondere im Zytoplasma wären nötig, um dies genauer zu bestimmen und als Hintergrund zu charakterisieren.

### **Datenqualität**

Die Datenqualität der erhaltenen Korrelationskurven von ACR4 und CLV1 an der Plasmamembran machte deutlich, dass FCS-Messungen an der PM erheblich problematischer sind als z.B. im Zytoplasma (siehe Kapitel 4.6.2). Dies liegt hauptsächlich an den niedrigen Zählraten, die nur wenig über dem Hintergrund liegen (vgl. Tab. 4.10). Die Zählraten pro Molekül für ACR4 und CLV1 liegen mit 1,9 bzw. 3,2 deutlich unter dem Wert für freies GFP von 9 kHz und sind vergleichbar mit dem Wert des Hintergrunds von 2,3 kHz.

Dieses niedrige Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis beschränkt die Qualität der erhaltenen Korrelationskurven. Des Weiteren erschwert die langsame Diffusion von Molekülkomplexen im Bereich von Millisekunden bis Sekunden die Kurvenanpassung.

### **Heterogenitäten und Auswahl von Kurven**

Sowohl die Intensitätsspuren als auch die zugehörigen Korrelationskurven waren heterogen. Dies kann zum einen an der Strukturierung der Plasmamembran an sich liegen (s. o.) und damit reale lokale Heterogenitäten widerspiegeln. Andererseits könnten die charakteristischen Unterschiede auch Artefakte der Messmethode sein. Grundsätzlich birgt die Bleichprozedur zu Beginn einer Messung die Gefahr, dass zu viel gebleicht wird und nur noch Hintergrund übrig ist. Dieser Hintergrund könnte durch Messungen im Zytoplasma in Membrannähe bestimmt und charakterisiert werden und sich dann anhand z. B. der Zählrate oder der Zählrate pro Molekül identifizieren lassen.

Das Bleichverhalten sollte Aufschluss über die Position des konfokalen Messvolumens geben. Befindet sich das Messvolumen nicht an der PM, so sollte der Anteil der gebleichten Intensität geringer sein.

Die Auftragung aller Parameter für die vorliegenden Messungen an ACR4 und CLV1 könnte einen Hinweis geben, in welcher Größe sich die Messungen signifikant unterscheiden und die Grundlage für eine Auswahl von Kurven liefern (siehe dazu im Anhang Abb. A.12 und Abb. A.13). Nicht zuletzt aufgrund des niedrigen Stichprobenumfangs ist es bei den vorliegenden Daten allerdings nicht möglich, ein geeignetes Kriterium zur Auswahl von Kurven festzulegen.

Die hohen Standardabweichungen bei der Berücksichtigung aller Kurven erlauben es daher nur, Diffusionskoeffizienten abzuschätzen.

### ACR4 und CLV1 zeigen eine hochmobile Fraktion

Sowohl ACR4 als auch CLV1 zeigen eine hochmobile Fraktion mit Diffusionskoeffizienten von 10-85  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , die für ein membranständiges Protein unerwartet hoch sind (siehe zum Vergleich Abb. 4.61). Die Diffusion von Lipiden in einer flüssigen Membran besitzt Diffusionskoeffizienten zwischen 1-20  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Kahya und Schwille 2006] und bildet damit letztlich eine obere Grenze für die zweidimensionale Diffusion in einer Membran. Die Tatsache, dass ACR4 und CLV1 abgeschätzte Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung von Lipiddiffusion und höher besitzen, könnte darauf hindeuten, dass sich diese entsprechende Fraktion nicht an der Plasmamembran, sondern frei z.B. im Zytoplasma befindet. Von ACR4 und CLV1 ist keine Lokalisation als Einzelmoleküle oder Molekülkomplexe im Zytoplasma bekannt und auch unerwartet, da es sich um membranständige Proteine handelt, deren Transport in anderen Zellkompartimenten in Vesikeln erfolgt. Es könnte sich um unvollständige GFP-Fusionen und damit um ein Artefakt der Expression handeln.

Andererseits liegt der von [Chow et al. 2012] mit FCS bestimmte Diffusionskoeffizient des Membranproteins TetA in *Escherichia coli* auch in der Größenordnung von Lipiddiffusion und darüber hinaus fast zwei Größenordnungen über dem mit FRAP bestimmten Diffusionskoeffizienten. Die Autoren schließen daraus auf unterschiedliche Mobilität des Proteins auf den komplementären Längenskalen von FRAP und FCS und auf eine extrem schnelle Diffusion von TetA in der Membran auf einer kurzer Längenskala von etwa 400 nm.

**Tabelle 4.11.** Diffusionskoeffizienten D von ACR4 und CLV1 bestimmt mit FCS.

	A4 <sub>GFP</sub>	A4 <sub>GFP</sub> + CLE40	C1 <sub>GFP</sub>	C1 <sub>GFP</sub> + CLV3
D der hochmobilen Fraktion [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	85	10	67	31
D in der PM [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	0,65	0,06	0,40	0,01

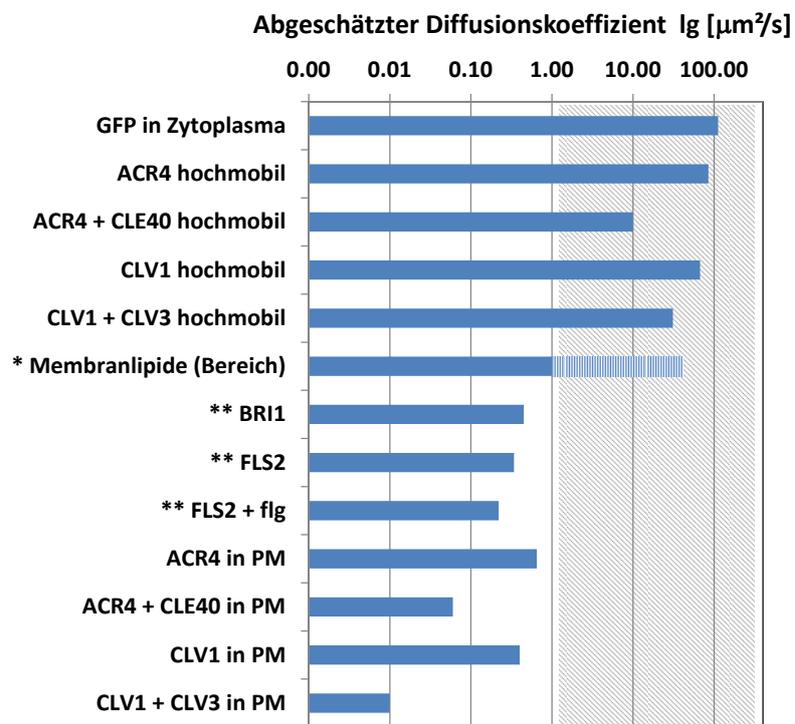
### Diffusion von ACR4 und CLV1 in der PM

Die gemessenen Diffusionszeiten von ACR4 und CLV1 im Millisekundenbereich entsprechen Diffusionskoeffizienten von 0,65  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (ACR4) bzw. 0,40  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  (CLV1) und können einer zweidimensionalen Diffusion in der PM zugeordnet werden. Die Diffusionskoeffizienten sind vergleichbar mit denen anderer Rezeptorkinasen (FLS2: 0,34  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  und BRI1: 0,26  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Ali et al. 2007]; BRI1: 0,45  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  [Hink et al. 2008]) (siehe Abb. 4.61). Hier ist anzu-

merken, dass die zitierten Messungen an Protoplasten durchgeführt wurden. Das Fehlen der Zellwand und der damit verbundenen Membranbereiche könnte prinzipiell zu weniger Hinderung innerhalb der Plasmamembran und damit zu höheren Diffusionskoeffizienten als in vollständigen Zellen führen.

Theoretisch ist der Diffusionskoeffizient eines globulären Moleküls proportional zur dritten Wurzel des molekularen Volumens bzw. Molekulargewichts. Aus dem Vergleich mit Molekülen bekannter Größe und bekanntem Diffusionskoeffizienten lassen sich Rückschlüsse auf eine vorliegende Komplexierung von ACR4 und CLV1 ziehen. Als Vergleich eignet sich BRI1, da sowohl dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist (s.o.), als auch dessen Größe: BRI bildet zusammen mit SERK1 und SERK3 multiple Komplexe mit Größen von 350-450 kDa [Karlova et al. 2006]. CLV1 zeigt den gleichen Diffusionskoeffizienten wie BRI, ist aber mit 108 kDa deutlich kleiner als das im Komplex vorliegende BRI. Dies legt nahe, dass auch CLV1 als Komplex mit weiteren Partnern in der PM vorliegt. Die deutlich schnellere Diffusion von ACR4 kann mit dem Vorliegen von ACR4 als Monomer erklärt werden.

Die bestimmten Diffusionszeiten zeigen hohe Standardabweichungen (siehe Tab, A.11), sodass nur abgeschätzte Diffusionskoeffizienten angegeben werden können. Hier wären mehr Messungen nötig, um die Ergebnisse statistisch beurteilen zu können.



**Abbildung 4.61. Vergleich von Diffusionskoeffizienten.** Die Diffusionskoeffizienten wurden mit FCS bestimmt (Tab. 4.11). \* aus [Kahya und Schwille 2006], der gestrichelte Balken markiert den Bereich für Werte des Diffusionskoeffizienten; \*\* aus [Ali et al. 2007],  $D$  gemessen mit FRAP. Der Bereich der Diffusionskoeffizienten von Membranlipiden und schnellerer Diffusion ist grau unterlegt.

### Ligandeninduzierte Komplexbildung

Nach Zugabe der Liganden war für ACR4 und CLV1 eine deutliche Verminderung der Mobilität zu beobachten. Die Diffusionszeiten verschoben sich stark in den Millisekunden- bis Sekundenbereich. Damit bewegte sich der Großteil der Moleküle am Rande der Detektionsgrenze von FCS, sodass generell Schlussfolgerungen über die genaue Zusammensetzung dieser Komponenten schwierig sind. Die ligandeninduzierten Effekte sind für ACR4 und CLV1 allerdings so groß, dass qualitative Aussagen im Hinblick auf die Frage getroffen werden können, ob Oligomer- und Clusterbildung als erster Schritt bei der Signalantwort von ACR4 und CLV1 eine Rolle spielen.

Die Diffusionskoeffizienten von ACR4 und CLV1 nach Zugabe der zugehörigen Liganden sind eine Größenordnung niedriger als ohne Peptid (siehe Abb.4.63). ACR4 zeigt mit CLE40 eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten von  $0,65 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auf  $0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , CLV1 zeigt analog mit CLV3 eine Änderung von  $0,40 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auf  $0,01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Diese Unterschiede sind deutlich größer, als es ausschließlich aufgrund molekularer Komplexbildung zu erwarten wäre.

Für die Rezeptorkinase FLS2 wurde ein verminderter Diffusionskoeffizient nach Zugabe des Liganden Flagellin flg22 gemessen [Ali et al. 2007], der durch die beschriebene Flagellin-induzierte Komplexierung mit BAK1 [Chinchilla et al. 2007] zu erklären ist. Die für FLS2 gefundene Abnahme des Diffusionskoeffizienten von  $0,34 \mu\text{m}^2/\text{s}$  auf  $0,22 \mu\text{m}^2/\text{s}$  nach Ligandenzugabe ist deutlich kleiner als für ACR4 und CLV1. Daher ist für ACR4 und CLV1 eine ligandeninduzierte Bildung größerer Cluster und/oder die Assoziation mit Membrandomänen anzunehmen.

Darüber hinaus gibt die Zählrate pro Molekül einen wichtigen Hinweis über die Bildung von homomeren Oligomeren, die die Zählrate pro Molekül entsprechend erhöhen würde. Dies ist für ACR4 und CLV1 nach Ligandenzugabe nicht der Fall, sodass nicht von einer Bildung von Homomeren auszugehen ist.

Die hochmobile Fraktion von CLV1 bleibt im Gegensatz zu ACR4 nach Peptidzugabe identifizierbar erhalten. Der Unterschied in der Diffusionszeit könnte durch eine Zunahme der Komplexgröße erklärt werden.

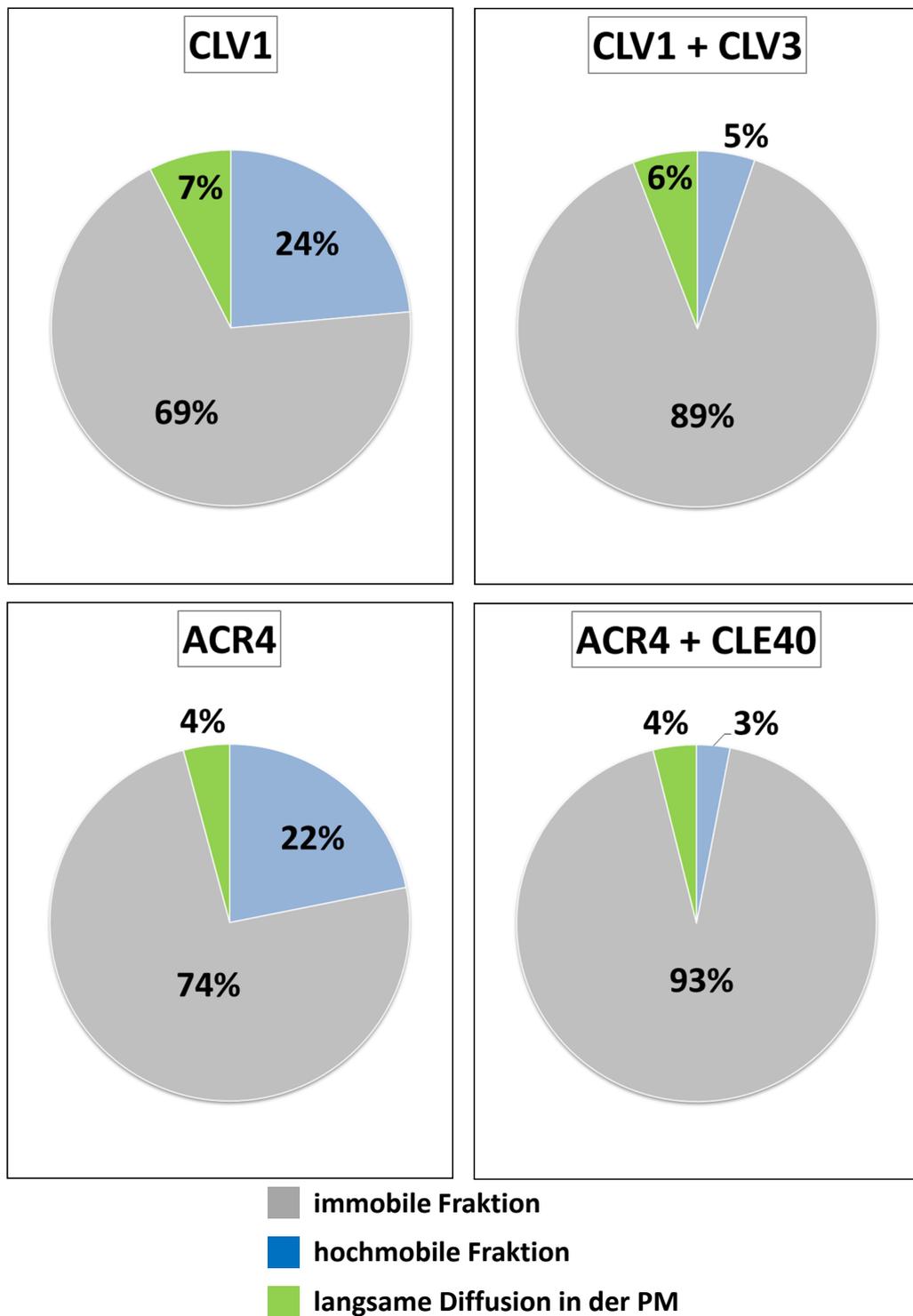
Der Diffusionskoeffizient der hochmobilen Fraktion von ACR4 beträgt nach Zugabe von CLE40  $10 \mu\text{m}^2/\text{s}$  statt vorher  $85 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und liegt damit prinzipiell im Bereich einer möglichen Membrandiffusion.

#### 4.6.6.3. Zusammenfassung und Bewertung der FRAP- und FCS-Ergebnisse

Die durchgeführten FRAP und FCS-Messungen sind aufgrund von Datenqualität und Stichprobenumfang nicht geeignet, statistisch gesicherte Werte für Diffusionskoeffizienten zu liefern oder detaillierte Aussagen über Molekülkomplexgrößen und -zusammensetzungen zu treffen. Innerhalb dieser Grenzen aber ist eine qualitative Charakterisierung der Mobilität von ACR4 und CLV1 unter dem Einfluss der jeweiligen Liganden möglich.

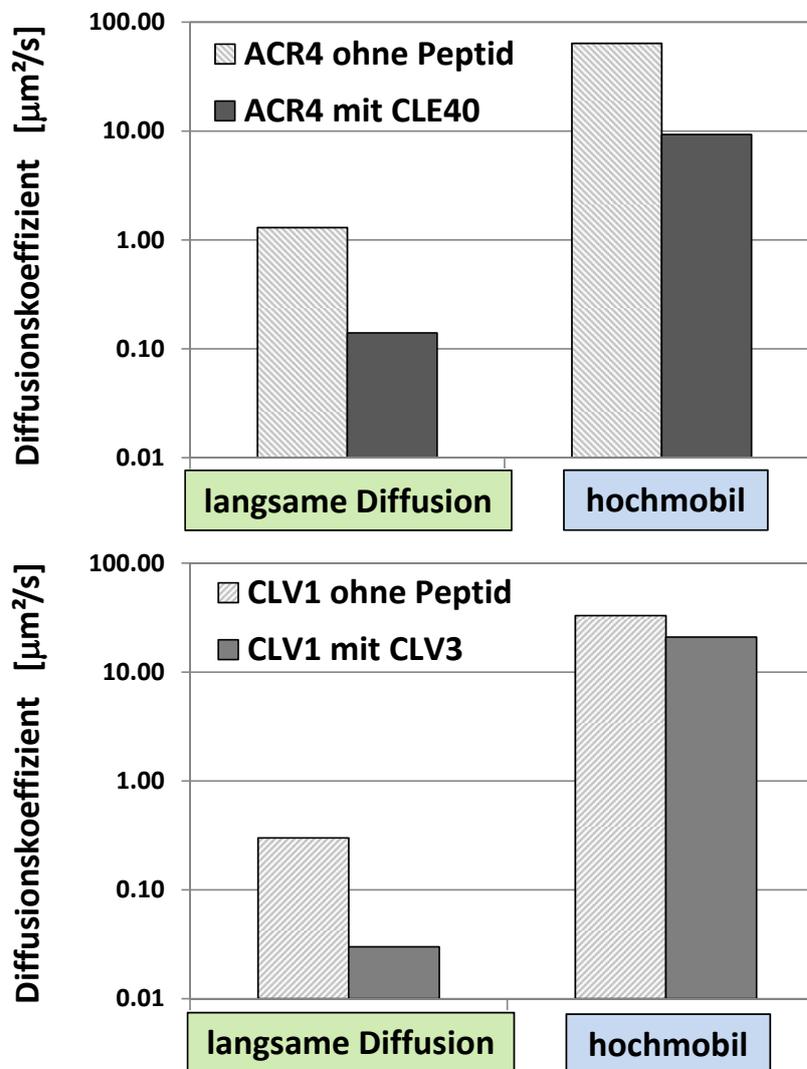
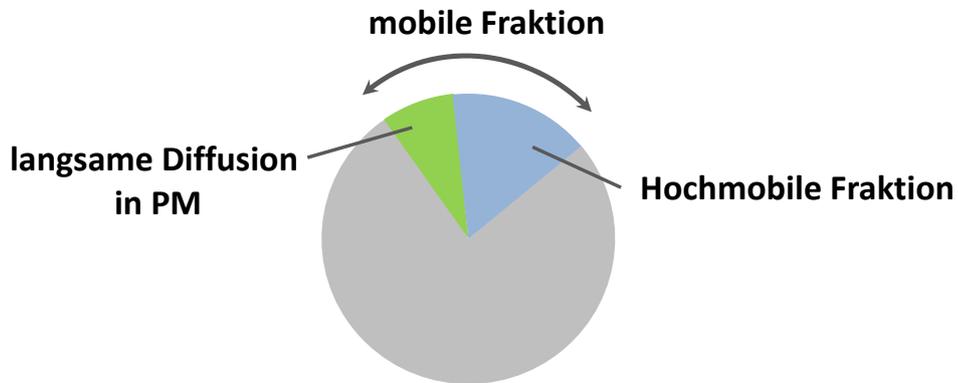
Die komplementären Ergebnisse der FRAP und FCS-Messungen geben Aufschluss über die Verteilung von ACR4 und CLV1 in unterschiedlich mobile Fraktionen (siehe Abb. 4.62). Geht man davon aus, dass diese Verteilung spezifisch für einzelne Rezeptorkinasen und deren Aktivierungszustand ist, ließe sich eine typische Änderung der Verteilung als Bindungssessay nutzen, um Rezeptor-Liganden-Bindungen *in vivo* nachweisen zu können.

Hier soll mit dem bekannten Rezeptor-Liganden-Paar CLV1 und CLV3 als Positivkontrolle eine analoge Interaktion von ACR4 und CLE40 nachgewiesen werden. Die direkte Bindung von CLV3 an CLV1 wurde nachgewiesen [Ogawa et al. 2008], während dies für ACR4 und CLE40 bisher nicht gezeigt werden konnte. CLV1 und ACR4 zeigen ohne Peptid ein ähnliches Verteilungsmuster der mobilen Fraktionen (Abb. 4.62) und sind daher grundsätzlich als vergleichbar anzusehen. Die Veränderung des Verteilungsmusters der mobilen Fraktionen von CLV1 nach CLV3-Zugabe wird in diesem Essay als Standard für Interaktion verwendet. Wie CLV1 zeigt auch ACR4 nach Ligandenzugabe eine Zunahme der immobilen Fraktion und eine Abnahme der hochmobilen Fraktion, während der Anteil der langsam diffundierenden Moleküle in der PM gleich bleibt. Die Ähnlichkeit der Reaktion von ACR4 und CLV1 auf Ligandenzugabe legt eine Bindung von CLE40 und ACR4 analog zu CLV3 und CLV1 nahe. Hierzu wären Kontrollmessungen sowohl mit weiteren Peptiden als auch Rezeptorkinasen notwendig, um die Spezifität der Verteilung und -änderung zu belegen.



**Abbildung 4.62.** ACR4 und CLV1 liegen in Fraktionen mit unterschiedlicher Mobilität vor. Die immobile Fraktion wurde mit FRAP bestimmt (siehe Abschnitt 4.6.1). Die Untersuchung mit FCS lieferte die Anteile der hochmobilen Fraktion und den Anteil der langsam diffundieren Spezies (siehe Abschnitt 4.6.4).

### Diffusionskoeffizienten der mobilen Fraktion



**Abbildung 4.63.** Diffusionskoeffizienten der mobilen Fraktion von ACR4 und CLV1. Die immobile Fraktion (grau im Kreisdiagramm) wurde mit FRAP bestimmt (siehe Abschnitt 4.6.1). Die Untersuchung mit FCS (siehe Abschnitt 4.6.4) lieferte die Anteile der hochmobilen Fraktion (blau im Kreisdiagramm), den Anteil der langsam diffundierenden Spezies (grün im Kreisdiagramm) und die zugehörigen Diffusionskoeffizienten (siehe auch Tab. 4.11).

# 5 Ausblick

## 5.1. MFIS-Messungen mit Peptid

ACR4 und CLV1 agieren zusammen mit CLE40 in einem Signalweg, der die Entwicklung des Wurzelmeristems in *Arabidopsis thaliana* reguliert [Stahl et al. 2013]. In dieser Arbeit konnte in Kapitel 4.3 gezeigt werden, dass ACR4 und CLV1 physikalisch an der Plasmamembran interagieren und heteromere Komplexe bilden. Des Weiteren bildet ACR4 homomere Komplexe an der Plasmamembran und an Plasmodesmata.

Um die ligandenabhängige Signalvermittlung innerhalb dieses Signalwegs auf molekularer Ebene zu verstehen, ist es wichtig, den Einfluss des Liganden auf die Komplexbildung zu untersuchen. Es ist denkbar, dass sich erst nach Bindung des Liganden ein signalkompetenter Rezeptorkomplex bildet, der sich von den vorgeformten Komplexen in der Zusammensetzung und/oder in zusätzlichen Bindungspartnern unterscheidet.

Um dies zu untersuchen, wurden erste MFIS-Messungen in *N. benthamiana* unter Einfluss des Peptids CLE40 durchgeführt. Hier galt es zunächst, eine geeignete Prozedur für die MFIS-Messungen an Blattepidermiszellen zu entwickeln. Da die Fluoreszenz-Lebensdauer von ACR4-GFP zwischen einzelnen Zellen schwankt (Standardabweichung 66 ps, vgl. Kapitel 4.2.5), ist es notwendig vor und nach Peptidzugabe an der selben Zelle MFIS zu messen, um auch kleine Veränderungen der Lebensdauer erfassen zu können.

### 5.1.1. Peptidbehandlung

Die Messungen mit Peptidbehandlung wurden mit Probenkammern aus Silikon durchgeführt, die auf das Deckglas mit dem untersuchten Blattstück gehaftet wurden. Durch Öffnungen an jeder Seite der Kammer konnte mit einer Pipette die Pufferlösung um das Blattstück ausgetauscht werden, ohne das Deckglas zu bewegen oder von der Halterung

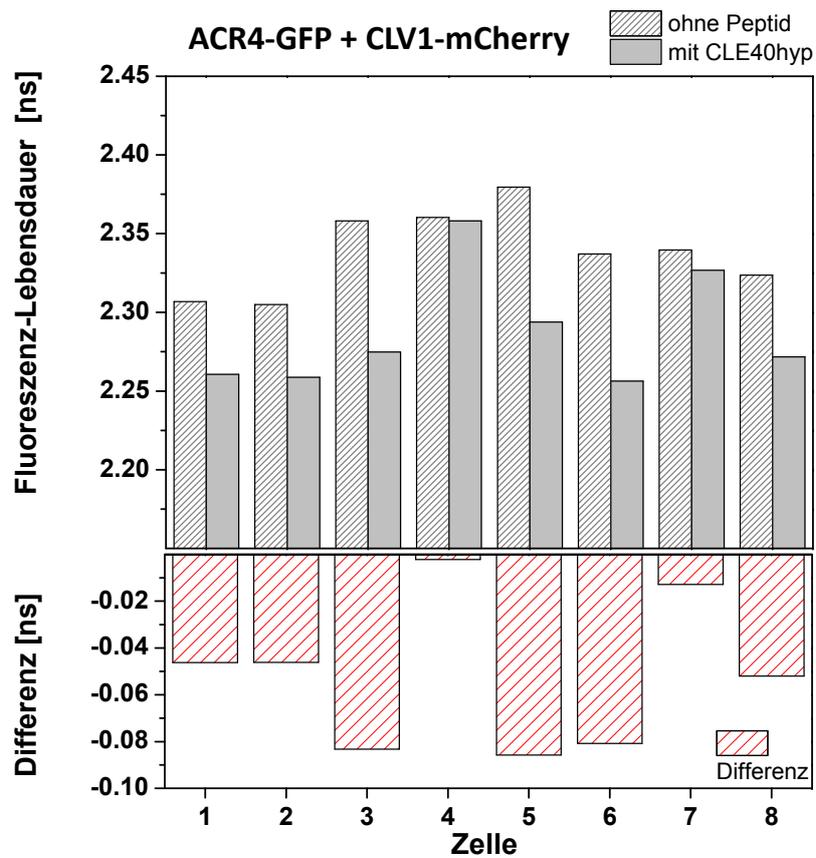
auf dem LSM entfernen zu müssen.

Mit dem Olympus FluoView Modul zur Speicherung und zum Anfahren gespeicherter Punkte innerhalb der Reichweite des Scantisches ("multi area time lapse") konnten die Positionen ausgewählter Zellen gespeichert werden. An diesen ausgewählten Zellen wurden vor Peptidzugabe pro Zelle ein MFIS-Bild aufgenommen. Der Puffer in der Probenkammer wurde gegen Peptidlösung ausgetauscht. Nach 10-30 min Inkubationszeit wurden die Zellen der Reihe nach wieder angefahren und pro Zelle ein MFIS-Bild aufgenommen.

### **5.1.2. Heterokomplexbildung von ACR4 und CLV1 mit CLE40**

In Abbildung 5.1 ist die an acht Zellen gemessene Fluoreszenz-Lebensdauer von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry vor und nach Zugabe von 200 nM CLE40hyp aufgetragen. Der untere Graph zeigt die Differenz der Lebensdauer vor und nach Peptidzugabe für jede Zelle an. Von den acht untersuchten Zellen zeigen sechs Zellen eine Abnahme der Fluoreszenz-Lebensdauer nach Zugabe von CLE40hyp. Im Mittel ergibt sich eine Verringerung der Fluoreszenz-Lebensdauer von 51 ps. Zukünftige Messungen mit größerem Stichprobenumfang sind nötig, um die statistische Relevanz der Abnahme der Fluoreszenz-Lebensdauer beurteilen zu können.

Eine quantitative Analyse der Fluoreszenz-Lebensdauer wie in Kapitel 4.3.5 könnte Aufschluss darüber geben, ob CLE40 eine Zunahme der FRET-Population, also vermehrte Komplexbildung, oder eine Änderung der Formation vorhandener Komplexe bewirkt.



**Abbildung 5.1.** Fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in 8 Blattepidermiszellen von *N. benthamiana* vor und nach Zugabe von 200 nM CLE40hyp. Die fluoreszenzgewichtet gemittelte Lebensdauer wurde über die Anpassung mit einer bi-exponentiellen Modellfunktion bestimmt (siehe Kapitel 3.3.3.3).

### 5.1.3. Homomerbildung von ACR4 mit CLE40

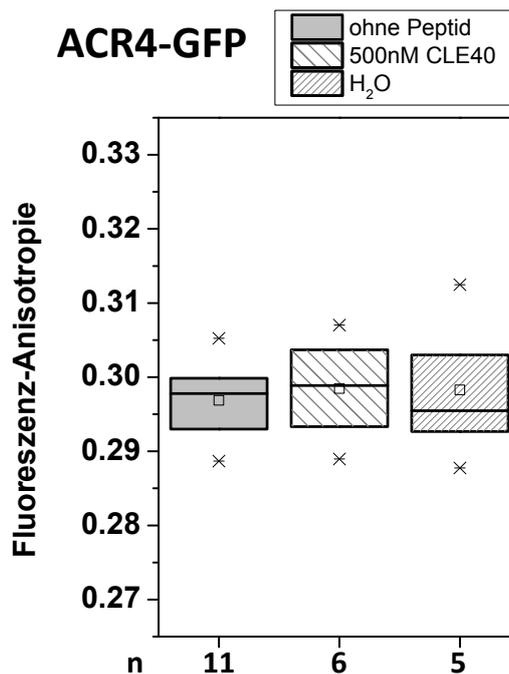
Zur Untersuchung, ob CLE40 die Bildung von Homomeren von ACR4 beeinflusst, wurde von *N. benthamiana* Epidermiszellen, die ACR4-GFP exprimierten, vor und nach Zugabe von 500 nM CLE40hyp jeweils ein MFIS-Bild aufgenommen. Zur Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit Zellen durchgeführt, denen nur Wasser zugesetzt wurde. Für jedes Bild wurde die mittlere Anisotropie aus dem eindimensionalen Pixelhäufigkeitshistogramm berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2 als Boxplots dargestellt.

Die stationäre Anisotropie von ACR4-GFP ändert sich weder unter dem Einfluss von CLE40 noch in der Kontrolle mit Wasser:

$0,2969 \pm 0,005$  ohne Peptid (n=11)

$0,2985 \pm 0,006$  mit CLE40 (n=6)

$0,2983 \pm 0,010$  mit Wasser (n=5)



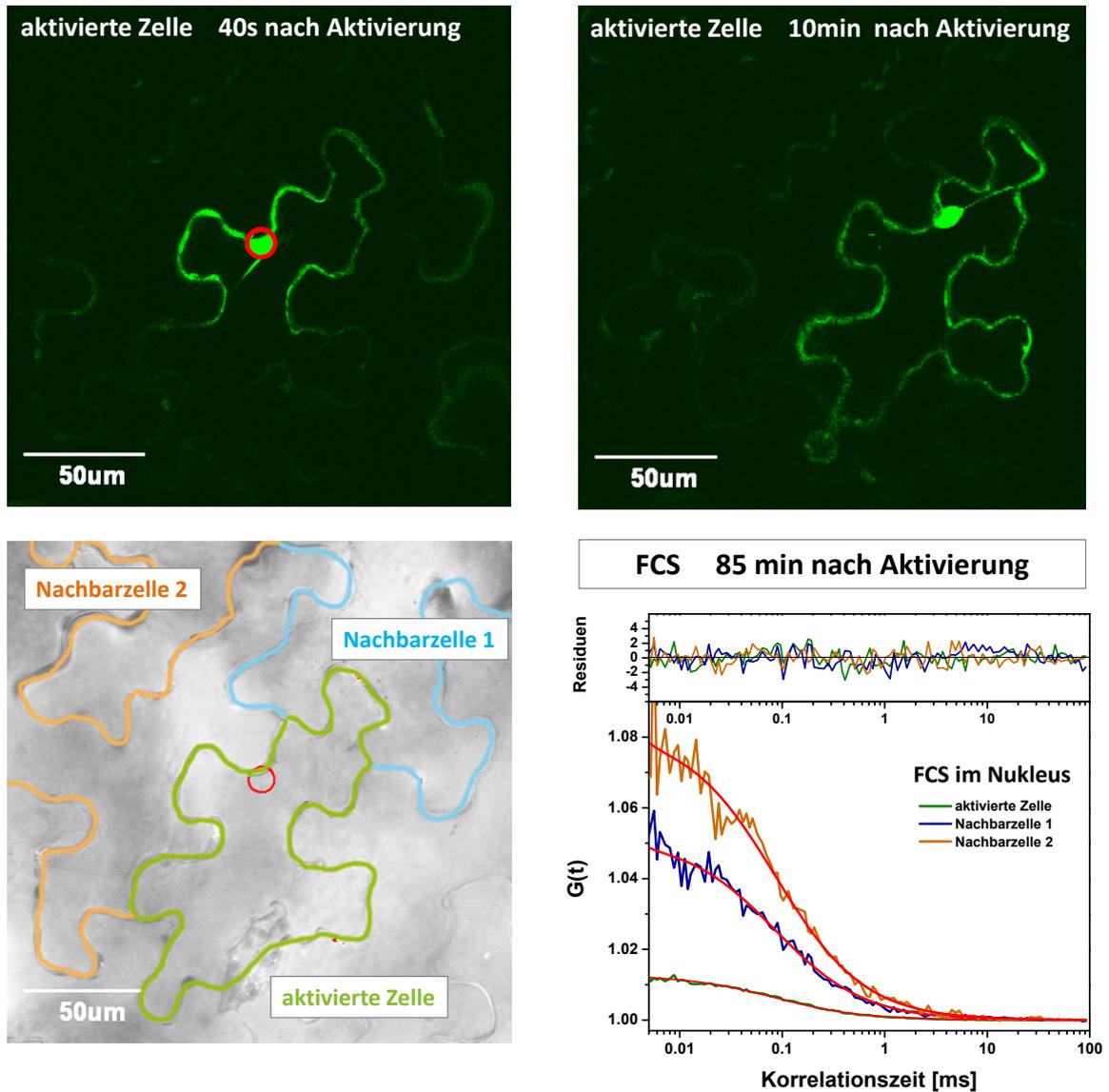
**Abbildung 5.2.** Anisotropie von ACR4-GFP vor und nach Zugabe von 500 nM CLE40hyp und Wasser.

## 5.2. Messung der Diffusion im Zellverband mit Hilfe von paGFP

ACR4 akkumuliert an Plasmodesmata und bildet dort zusammen mit CLV1 verstärkt Komplexe. Noch ist die Funktion unklar, die ACR4/CLV1-Komplexe an PD erfüllen. Sie könnten den Transport eines informationstragenden Moleküls spezifisch regulieren oder auch die Durchlässigkeit der PD insgesamt steuern.

Es wird eine Methode benötigt, mit der gezielt der symplastische Transport zwischen benachbarten Zellen im Zellverband gemessen werden kann. Dies könnte mit Hilfe von photoaktivierbarem GFP (paGFP) und FCS gelingen. Durch Photoaktivierung von paGFP mit violetterem Licht verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 400 nm zu 504 nm, was zu einer 100-fach erhöhten Fluoreszenz nach Anregung bei 488 nm führt. Dadurch ist paGFP vor Aktivierung im typischen Detektionsbereich von GFP praktisch dunkel und nach Aktivierung hell. Die Idee ist nun, paGFP gezielt in einer einzelnen Zelle zu aktivieren. Die aktivierten paGFP-Moleküle können symplastisch durch PD in benachbarte Zellen gelangen und dort mit FCS detektiert werden. Dies ist in Abbildung 5.3 demonstriert. Die oberen beiden LSM-Aufnahmen zeigen eine pa-GFP-exprimierende Blattepidermiszelle in *N. benthamiana*. Die Zelle wurde in einer kleinen Region im Zellkern mit einem violetten Laser (405 nm) bestrahlt und so paGFP aktiviert (links). Nach 10 min hat sich das aktivierte paGFP bereits über die ganze Zelle ausgebreitet (rechts). Die Gesamtmenge an aktiviertem pa-GFP reicht nicht aus, um die Diffusion in Nachbarzellen in LSM-Aufnahmen sichtbar zu machen, aber mit FCS können diese niedrigen Konzentrationen nachgewiesen werden. In Abb. 5.3 (unten rechts) sind Korrelationskurven gezeigt, die in Zellkernen von benachbarten Zellen (unten links) aufgenommen wurden. Anhand der Amplitude kann die Konzentration von ankommenden paGFP-Molekülen bestimmt werden.

In zukünftigen Messungen könnte so bestimmt werden, ob ACR4 und CLV1 in Abhängigkeit von Liganden wie CLE40 die Durchlässigkeit von PD beeinflussen.



**Abbildung 5.3. Diffusion von paGFP im Zellverband.** (oben) LSM-Bilder einer paGFP-exprimierenden Epidermiszelle in *N. benthamiana*. (links) 40 s nach Aktivierung von paGFP im Zellkern (roter Kreis). (rechts) 10 min nach Aktivierung. (unten links) DIC-Bild der aktivierten Zelle (grün markiert) und zweier benachbarter Zellen (blau und orange markiert). (unten rechts) FCS-Messungen 85 min nach Aktivierung. FCS-Kurven aufgenommen jeweils im Zellkern der aktivierten Zelle (grün), der Nachbarzelle 1 (blau) und Nachbarzelle 2 (orange) mit Kurvenanpassungen (rot). Der obere Graph zeigt die zugehörigen Residuen der Kurvenanpassung.

## 5.3. PAINT an DNA

### 5.3.1. Hochauflösende Fluoreszenz-Mikroskopie

Das Beugungslimit begrenzt das räumliche Auflösungsvermögen von optischen Abbildungen. Das bedeutet, dass mit konventioneller Mikroskopie Strukturen, die kleiner sind als die halbe Wellenlänge des verwendeten Lichts, nicht aufgelöst werden können. Die Komplexbildung von Proteinen und ihre Anordnung z.B. in der Membran finden auf einer Längenskala unterhalb des Beugungslimits statt und sind daher nicht ohne weiteres zugänglich. In den letzten Jahren wurde eine Reihe von Techniken zur hochauflösenden Fluoreszenz-Mikroskopie (Super-resolution Fluorescence Microscopy) entwickelt, die Auflösungen von wenigen Nanometern erreichen [Huang et al. 2010]. Diese Techniken basieren auf der Lokalisation von einzelnen Emitttern, indem ihre Punktspreizfunktion (point spread function) mit einer Modellfunktion angepasst wird. Das Zentrum der Punktspreizfunktion kann mit hoher Präzision bestimmt werden und entspricht dem Ort des Emitters. Praktisch wird eine CCD-Kamera benötigt, die Bildserien des fluoreszenzmarkierten Untersuchungsobjekts aufnimmt. Um zu erreichen, dass in jedem Einzelbild nur Intensitätsverteilungen von einzelnen Emitttern und damit nur von einem Subensemble der vorhandenen Emitttern erscheinen, wurden verschiedene Strategien verfolgt: Aktivierung photokonvertierbarer fluoreszenter Proteine (Photoactivated Localization Microscopy, PALM) [Betzig et al. 2006], photoinduzierte Schaltung von Cyaninfarbstoffen (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, STORM) [Rust et al. 2006] und kinetischer Austausch von Fluoreszenzmarkern (Points Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography, PAINT) [Sharonov und Hochstrasser 2006]. Durch die sukzessive Lokalisation von Einzelemitttern in Einzelbildern einer Bildserie lassen sich hochaufgelöste Bilder (super-resolution images) konstruieren.

PAINT wäre sehr gut geeignet, um die Bindung von Liganden und Rezeptoren *in vivo* nachzuweisen. PAINT nutzt aus, dass ein Fluoreszenzmarker bei der Bildaufnahme nur erfasst wird, wenn er an der Zielstruktur bindet, nicht aber, wenn er sich frei diffundierend in der umgebenden Lösung befindet. Kombinierte Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Rezeptoren in der Membran und fluoreszenzmarkierten Liganden mit zwei-Farben-PAINT könnte Kolo-kalisation im Nanometerbereich und damit einen direkten Bindungsnachweis liefern.

### 5.3.2. Experimentelle Realisierung und Validierung: PAINT an DNA

Zur experimentellen Realisierung von PAINT wird ein optischer Aufbau mit TIRF- (total internal reflection) Anregung verwendet, mit der nur Moleküle angeregt werden, die sich in unmittelbarer Nähe ( $< 300$  nm) einer Glasoberfläche befinden. Dadurch wird ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erzielt, das eine zentrale Größe bei der Erzielung von Hochauflösung bildet. Die Detektion erfolgt mit einer EMCCD- (electron multiplying charge coupled device) Kamera. Die aufgenommenen Bildserien stellen die Rohdaten dar, aus denen die hochauflösenden Bilder konstruiert werden können.

Ein vorhandener TIRF-Aufbau sollte für PAINT modifiziert und optimiert werden. Die nötige Software zur Konstruktion und Analyse von hochaufgelösten Bildern *Analecta* wurde institutsintern von Stefan Marawske [Marawske 2011] entwickelt. Die Leistungsfähigkeit und Anwendbarkeit von PAINT in der entwickelten Konfiguration sollte validiert werden. Als Modellsystem eignete sich DNA mit dem interkallierenden Farbstoff, der interkaliert deutlich stärker fluoresziert als in Lösung. Dadurch wird das Signal-Hintergrund-Verhältnis erhöht. Außerdem war ein Farbstoff zu wählen, dessen Affinität zu DNA eine An- und Ablösung des Farbstoffs innerhalb typischer Belichtungszeiten gewährleistet. Als geeignet erwies sich der Farbstoff Thiazol Orange (TO) [Hards 2004].

#### Immobilisierung von DNA auf einer Glasoberfläche

Es wurden zwei Protokolle entwickelt, um DNA auf der Oberfläche eines Deckglases zu immobilisieren: Mittels Epoxysilan und mittels Poly-L-Lysin. Die Schritte der Präparation waren wie folgt:

##### Epoxysilan

- 1) Reinigung von Deckgläsern in 5%-iger Hellmanex-Lösung im Ultraschallbad (30 min) und anschließendes mehrmaliges Spülen mit Reinstwasser
- 2) Trocknen der gereinigten Deckgläser unter Stickstofffluss
- 3) 100  $\mu$ l Epoxysilan auf ein Deckglas geben und mit einem zweiten Deckglas abdecken
- 4) 60 min Inkubation bei 80°
- 5) Deckgläser in Chloroform waschen
- 6)  $\lambda$ -DNA-Lösung: 1:10 in TRIS-Puffer (50 mM, 20 mM NaCl, 200 mM Mg<sub>2</sub>Cl, pH 8,0, aktivkohlegefiltert)
- 7) Tropfen von ca. 100  $\mu$ l  $\lambda$ -DNA-Lösung (1:10 in TRIS-Puffer) auf die funktionalisierte Seite des Deckglases aufbringen
- 8) Mehrere Stunden bis zur Messung inkubieren

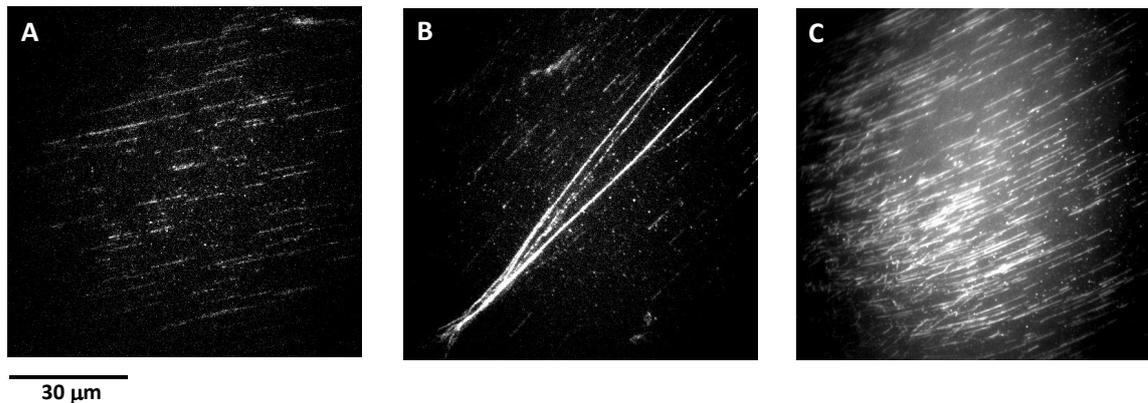
**Poly-L-Lysin**

- 1) Reinigung von Deckgläsern in 5%-iger Hellmanex-Lösung im Untraschallbad (30 min) und anschließendes mehrmaliges Spülen mit Reinstwasser
- 2) Trocknen der gereinigten Deckgläser unter Stickstofffluss
- 3) 100  $\mu\text{l}$  0,002 %-iges Poly-L-Lysin auf ein Deckglas geben und mit einem zweiten Deckglas abdecken
- 4) 60 min Inkubation bei 80°
- 5) Deckgläser in Reinstwasser waschen
- 6)  $\lambda$ -DNA-Lösung: 1:10 in TRIS-Puffer (50 mM, 20 mM NaCl, 200 mM Mg<sub>2</sub>Cl, pH 8,0, aktivkohlegefiltert)
- 7) Tropfen von ca. 100  $\mu\text{l}$   $\lambda$ -DNA-Lösung (1:10 in TRIS-Puffer) auf die funktionalisierte Seite des Deckglases aufbringen
- 8) Mehrere Stunden bis zur Messung inkubieren

Die beiden Protokolle liefern vergleichbare Ergebnisse, allerdings erwies sich die Immobilisierung mit Epoxysilan als reproduzierbarer und wurde daher standardmäßig für alle weiteren Messungen verwendet in [Savetec 2011], [Marawske 2011]. Die Ergebnisse der Immobilisierung mit Epoxysilan sind anhand von drei Beispielen in Abbildung 5.5 gezeigt. Vor der Messung wurde die DNA-Lösung abpipettiert und die Stelle mit immobilisierter DNA mit einem Tropfen TO-Lösung (1 nM TO in TRIS-Puffer (s. o.)) bedeckt.

**Tabelle 5.1.** Verwendete Chemikalien für PAINT an DNA.

Name	Hersteller
Chloroform CHROMASOLV	Sigma-Aldrich
Epoxysilan, (3-Glycidoxypropyl)dimethylethoxysilane	ABCR
Hellmanex III	Hellma
$\lambda$ -DNA 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Fermentas
Poly-L-Lysin 0,1 % w/v	Sigma-Aldrich
Reinstwasser	Sartorius
Thiazol Orange	FLUKA
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma-Aldrich



**Abbildung 5.4. TIRF-Aufnahme von DNA mit TO.** Die DNA wurde mit Epoxysilan auf der Glasoberfläche immobilisiert und mit TO angefärbt. Trotz gleicher Präparation zeigen einzelne Proben unterschiedliche Ergebnisse der DNA-Immobilisierung. Das Beispiel (A) eignet sich für eine PAINT-Analyse, während die DNA in (C) zu hoch konzentriert ist. Offenbar kondensiert die  $\lambda$ -DNA teilweise zu langen Strängen (B).

### Aufnahme der Fluoreszenz-Intensitätsbilder am TIRF-Aufbau

Die Aufnahmen wurden am TIRF-Aufbau durchgeführt, der detailliert in [Marawske 2011] beschrieben ist. Die Einstellungen waren wie folgt:

Anregung mit einem Argon-Laser bei 488 nm

Leistung am Objektiv: 4,66 mW

Detektion der Fluoreszenz: 535/50

Effektive Pixelgröße im TIRF-Intensitätsbild: 178 nm

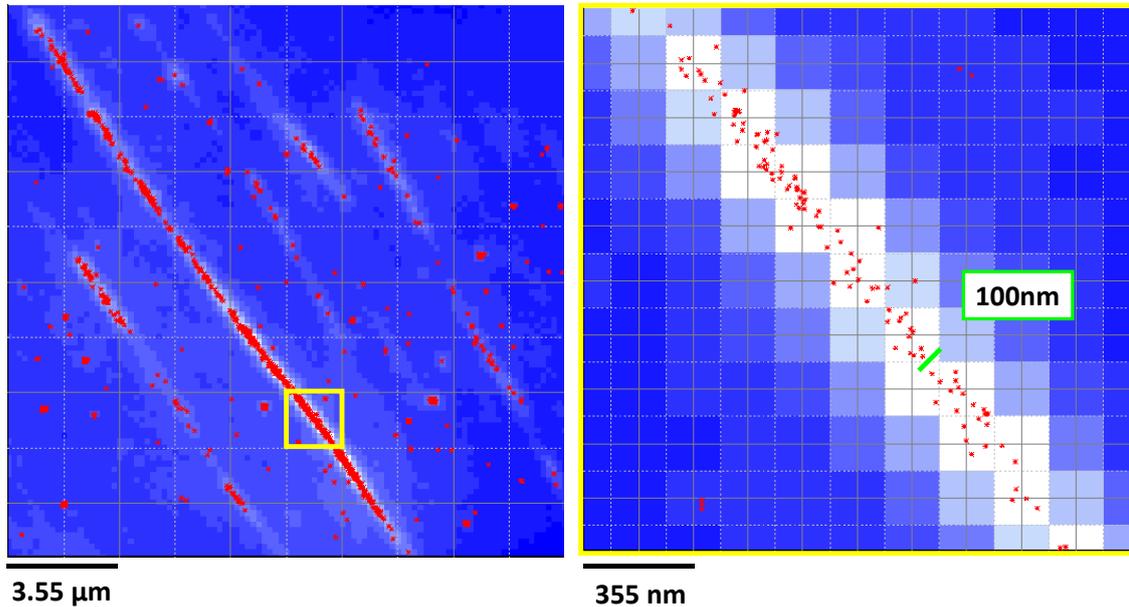
Belichtungszeit: 100 ms

Bildserien: 1000 bis 2500 Einzelbilder

### Analyse mit *Analecta*

Die PAINT-Analyse mit dem Programm *Analecta* ist in Abbildung 5.6 an einem Beispiel demonstriert und detailliert in [Marawske 2011] beschrieben. In jedem Einzelbild der Bildserie werden Pixel mit einer Intensität über dem zu wählenden Schwellwert selektiert. Die Intensitätsverteilung um diese Pixel wird jeweils mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung angepasst und deren Zentrum bestimmt. Diese berechneten Zentren stellen die Lokalisationen der TO-Moleküle dar. Über alle Einzelbilder der Bildserie akkumuliert bilden sie das hochaufgelöste PAINT-Bild (Abb. 5.5).

Die Genauigkeit, mit der das Zentrum der Intensitätsverteilung bestimmt werden kann, hängt in erster Näherung von der Breite  $\sigma$  der angepassten Gaußverteilung und der Anzahl

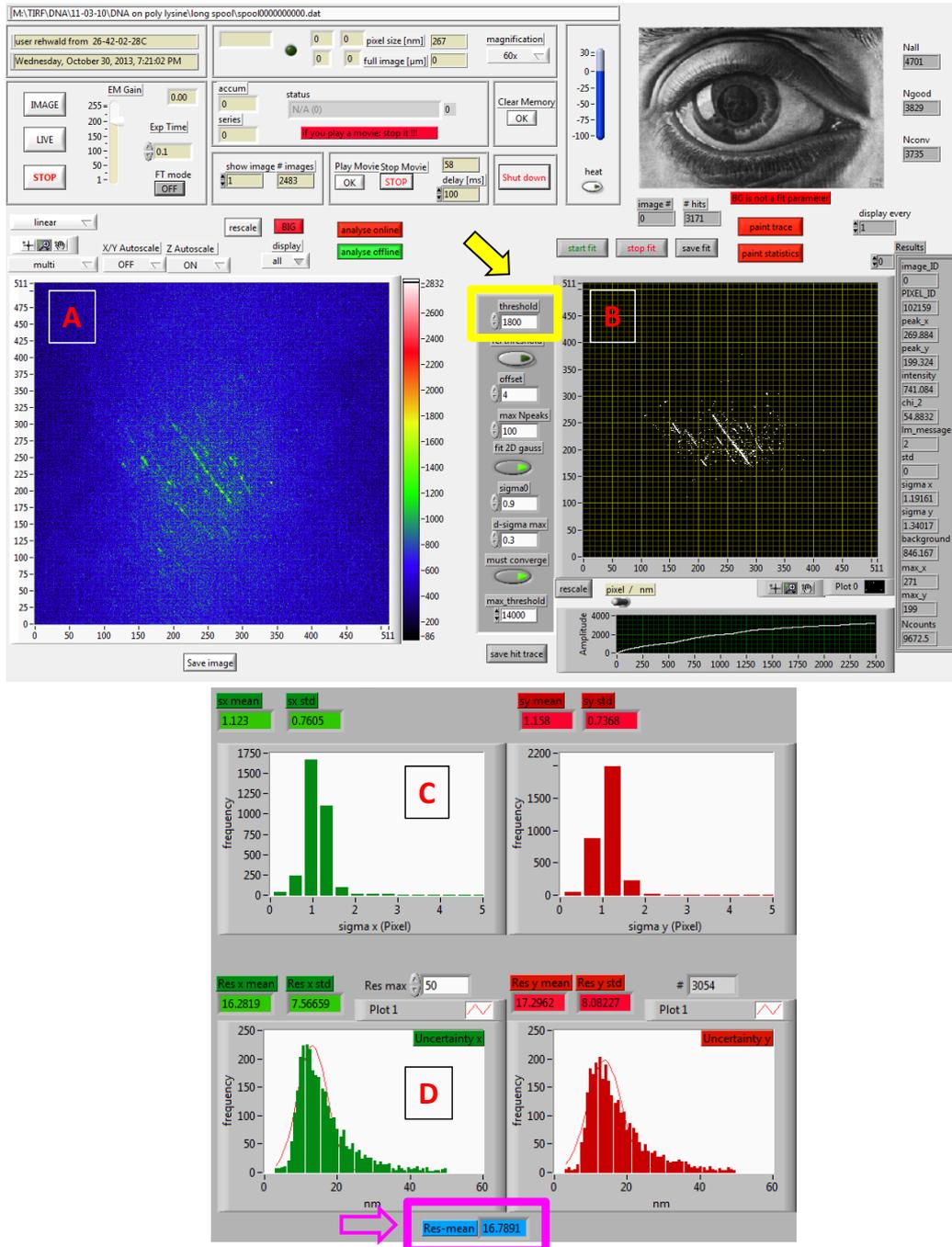


**Abbildung 5.5. PAINT-Bild von DNA mit TO.** Ausschnitt des PAINT-Bilds, dessen Analyse in Abb. 5.6 gezeigt ist. Das originale Intensitätsbild von DNA mit TO (blau) ist mit den Lokalisationen von TO (rote Kreuze) überlagert. Das rechte Bild zeigt den im linken Bild gelb markierten Ausschnitt vergrößert an.

der Primärphotonen  $N_F$  ab und wird als Auflösung  $r$  bezeichnet:

$$r = \frac{\sigma}{\sqrt{N_F}}.$$

Die Auflösung beträgt für das in Abbildung 5.5 gezeigte Beispiel 17 nm. Eine Verteilung der Lokalisationen oberhalb dieser Grenze reflektiert die tatsächliche Größe des abgebildeten Objekts. Für das in Abb. 5.5 gezeigte Beispiel bedeutet dies, dass es sich bei der abgebildeten DNA nicht um einen Einzelstrang, sondern um ein kondensiertes Bündel handeln muss, da die mit einer Genauigkeit von 17 nm bestimmten Lokalisationen etwa um 100 nm streuen.



**Abbildung 5.6. PAINT-Analyse mit Analecta.** Die Oberfläche der Analyse-Software zeigt das akkumulierte Intensitätsbild (A) einer Bildserie aus 2483 Einzelbildern. In jedem Einzelbild werden Pixel mit einer Intensität über dem Schwellwert (gelb markiert) selektiert. Die Intensitätsverteilung um diese Pixel wird jeweils mit einer zweidimensionalen Gaußverteilung angepasst und das Zentrum bestimmt. In (B) werden diese berechneten Zentren (=Lokalisationen) über alle Einzelbilder der Bildserie angezeigt. (B) stellt das hochaufgelöste Bild dar. Aus der Breite  $\sigma$  der angepassten Gaußverteilung (C) und der Anzahl der Primärphotonen  $N_F$  lässt sich die Genauigkeit der Lokalisation bestimmen, die als Auflösung des PAINT-Bildes bezeichnet wird (magenta-farben markiert).

## 6 Abschließende Diskussion

### 6.1. Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit FRET *in planta*

FRET-Messungen mit fluoreszenten Proteinen sind eine etablierte Methode in der Fluoreszenz-Mikroskopie, um Komplexbildung in lebenden Zellen nachzuweisen. Allerdings ist ihre Anwendung in Pflanzen wesentlich weniger verbreitet als in anderen Organismen [Dixit et al. 2006], [Berg und Beachy 2008]. Dies liegt u. a. an der ausgeprägten Autofluoreszenz, die Pflanzen in einem weiten spektralen Bereich zeigen. Generell hängen die Farbstoffeigenschaften der fluoreszenten Proteine stark von den Umgebungsbedingungen wie z. B. dem pH-Wert ab und bedürfen einer umsichtigen Charakterisierung unter den individuellen Experimentbedingungen. Besonders ist darauf zu achten, dass die exprimierten FP in Fusion mit den Zielproteinen funktional vorliegen, da Probleme bei der Reifung auftreten können.

In dieser Arbeit wurden die Eigenschaften des FRET-Paares GFP/mCherry im Expressionssystem in *N. benthamiana* charakterisiert und optimale Einstellungen für FLIM-Messungen bestimmt. Es offenbarte sich, dass mCherry zu weniger als 50 % funktional vorliegt. Insbesondere hängt der Anteil der funktionalen Moleküle vom Fusionsprotein ab.

#### 6.1.1. Interpretation der FRET-Daten

Der Nachweis von FRET kann einmal über die Intensität der indirekt angeregten Akzeptoremission und zum anderen über die Fluoreszenz-Lebensdauer des Donors erfolgen und ist in lebenden Zellen, besonders in Pflanzen, erheblich erschwert. Zum einen ist der fluoreszente Hintergrund von Zelle zu Zelle unterschiedlich, was intensitätsbasierte FRET-Bestimmung problematisch macht. Zum anderen hängt die Fluoreszenz-Lebensdauer von GFP von der Lokalisation in der Zelle ab und ist vom pH-Wert [Nakabayashi et al.

2008] und dem Brechungsindex [van Manen et al. 2008] abhängig. Für die korrekte Interpretation von FRET-Messungen an FP-fusionierten Proteinen ist die Berücksichtigung von beiden Parametern, Intensität und Lebensdauer, hilfreich. Nur wenn sich beide Parameter korreliert ändern, ist diese Änderung auch auf einen Unterschied in der FRET-Effizienz zurückzuführen [Weidtkamp-Peters et al. 2009].

Mit diesem zweidimensionalen Nachweis von FRET wurde in der vorliegenden Arbeit die Komplexbildung von ACR4 und CLV1 in Blattepidermiszellen in *N. benthamiana* gezeigt. ACR4 und CLV1 bilden Heteromere und jeweils Homomere an der Plasmamembran.

### 6.1.2. Quantitative FRET-Bestimmung

Neben dem qualitativen Nachweis von Komplexbildung in lebenden Zellen ist es von Interesse, ob sich ein einheitlicher Komplex oder mehrere Komplexsorten bilden, die sich hinsichtlich ihrer Stöchiometrie und/oder Konformation unterscheiden. Darüber hinaus liegen Bindungspartner entsprechend ihrer Affinität im Gleichgewicht ungebunden und im Komplex vor. Bei der FRET-FLIM-Analyse ist daher eine Population von nicht-interagierenden Donoren zu berücksichtigen, um FRET-Effizienzen korrekt zu bestimmen. Grundsätzlich können FRET-Messungen mit Fluoreszenz-Lebensdauer hier Aufschluss geben. In jüngster Zeit wurden Methoden und Ansätze für eine quantitative FRET-Bestimmung in FLIM-Messungen vorgeschlagen [Ma 2010], [Walther et al. 2011], [Laptenok et al. 2014], die mehrere Spezies und unterschiedliche FRET-Effizienzen berücksichtigen.

Bei Messungen in lebenden Zellen ist die Expressionsstärke eine schwer zu kontrollierende Größe und in jeder Zelle individuell verschieden. Dies führt zu unterschiedlich viel FRET in einzelnen Zellen allein aufgrund des unterschiedlichen Expressionsverhältnisses von Donor und Akzeptor. Ohne die Kenntnis über das tatsächlich vorliegende Donor-Akzeptor-Verhältnis ist es schwierig, viel und wenig FRET mit tatsächlicher FRET-Effizienz zu korrelieren.

In dieser Arbeit wurde das tatsächlich vorliegende Donor-Akzeptor-Verhältnis durch die direkte Anregung des Akzeptors in Stichproben bestimmt. Die Messungen ergaben, dass in den einzelnen Zellen sehr unterschiedliche Expressionsverhältnisse vorlagen. Die Konzentration des Akzeptors mCherry war in allen Stichproben höher als die des Donors GFP, insbesondere auch in den Stichproben, die nahezu kein FRET zeigten.

Die FRET-FLIM-Messungen an ACR4 und CLV1 ergaben, dass die Fluoreszenz-Lebensdauer zwischen einzelnen Zellen stark schwankte, die einzelnen Zellen also unterschiedlich viel FRET zeigten. Die Lebensdauer korrelierte in Stichproben mit dem Expressionsverhältnis: je mehr Akzeptor vorhanden war, desto stärker war die Lebensdauerreduktion. Das legte die Vermutung nahe, dass sich ACR4 und CLV1 an der PM mit ACR4/CLV1-Komplexen im Gleichgewicht befinden und entsprechend ihrer Bindungskonstante je nach vorliegenden ACR4- und CLV1-Konzentrationen ein unterschiedliches Verhältnis von Komplex und freiem ACR4 bilden. Die Donor-Moleküle im Komplex erfahren FRET, während die nicht interagierenden Donor-Moleküle nicht zur Lebensdauerreduktion beitragen. Je nach Komplexanteil ergibt sich also eine unterschiedliche mittlere Fluoreszenz-Lebensdauer.

In der Fluoreszenz-Lebensdauer-Analyse wurde daher ein Zwei-Spezies-Modell verwendet, das eine FRET-Population und eine Population von nicht-interagierenden Donoren berücksichtigt. Die Analyse ergab, dass bei der Koexpression von ACR4-GFP und CLV1-mCherry nur 24 % der GFP-Moleküle FRET zeigen. Allerdings zeigte sich auch, dass dieser Anteil der FRET-Population nicht gleich dem Anteil der ACR4/CLV1-Komplexe ist, da ein erheblicher Anteil der mCherry-Moleküle nicht funktional vorliegen.

An Plasmodesmata zeigte sich eine Verdopplung des FRET-Speziesanteils im Vergleich zur Plasmamembran. Das bedeutet, dass an PD mehr Moleküle im Komplex vorliegen als an der PM.

Darüber hinaus war es möglich, durch die Bestimmung des Anteils der FRET-Population im Zwei-Spezies-Modell und durch intensitätsbasierte Bestimmung von Donor- und Akzeptorkonzentration die Bindungskonstante abzuschätzen.

## 6.2. Nachweis von Homo-FRET mit Fluoreszenz-Anisotropie

Eine elegante Methode zum Nachweis von homomerer Komplexbildung benutzt Homo-FRET zwischen gleichartigen Fluorophoren und kann daher auf die Koexpression eines zweiten FP verzichten. Der Energietransfer wird hier über die Abnahme der Fluoreszenz-

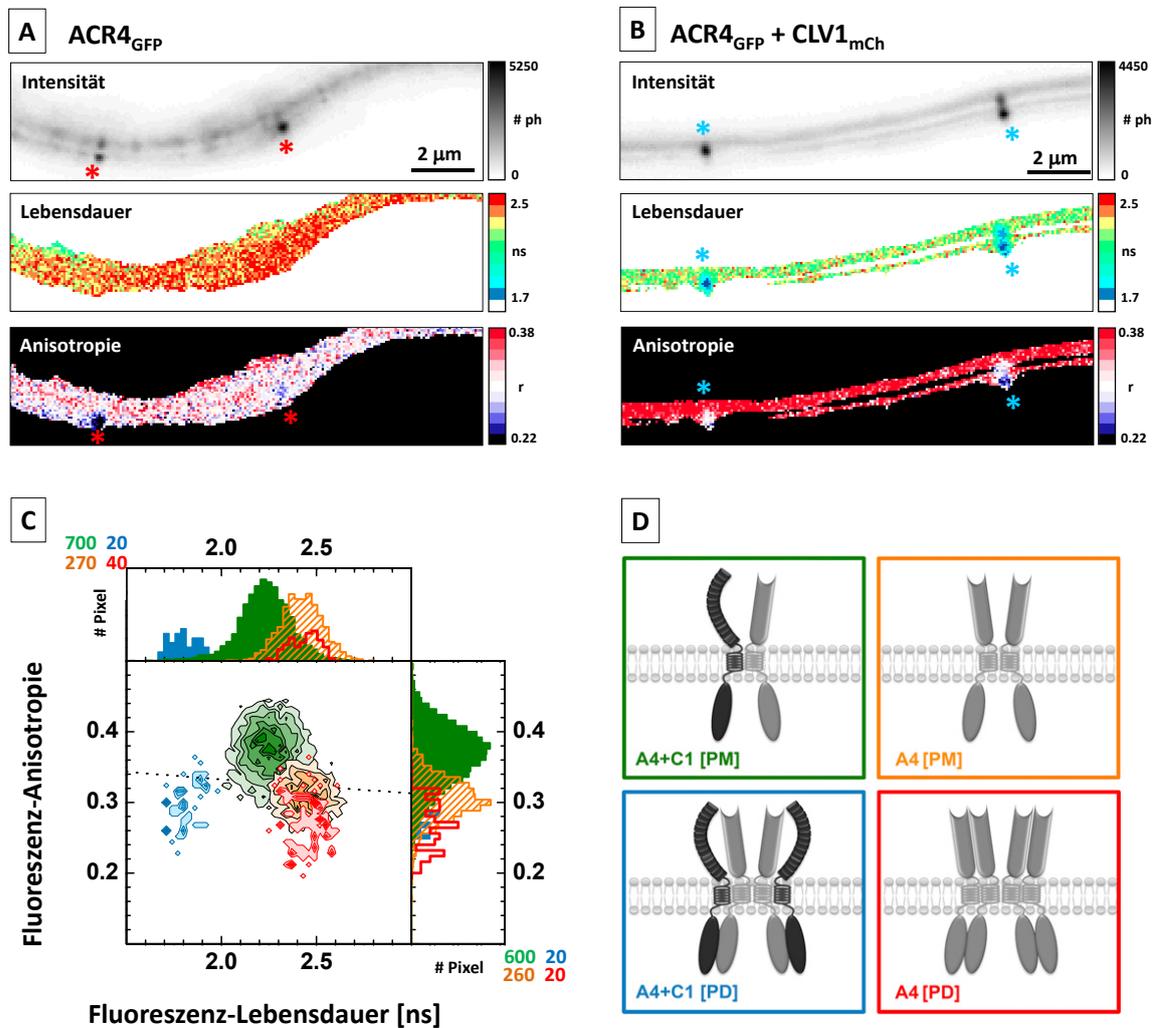
Anisotropie entweder stationär oder zeitaufgelöst gemessen. Obwohl diese Methode bereits vielfach in lebenden Zellen angewendet wurde, sind bisher keine Untersuchungen *in planta* beschrieben. In dieser Arbeit wurde erstmals homomere Komplexbildung anhand der stationären Anisotropie, der zeitaufgelösten Anisotropie sowie durch Progressives Photobleichen *in planta* nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass die Rezeptorkinase ACR4 sowohl an der Plasmamembran als auch an Plasmodesmata Homomere bildet.

Die Gültigkeit der Verwendung der stationären Anisotropie als Indikator für Homo-FRET im MFIS wurde geprüft. Es ergab sich, dass zuerst kritisch überprüft werden muss, ob die untersuchte Rezeptorkinase eine isotrope Verteilung und Ausrichtung bezüglich der Plasmamembran besitzt. Eine Vorzugorientierung, wie sie für CLV1 festgestellt wurde, beeinflusst die stationäre Anisotropie so stark, dass diese nicht als Indikator für Homo-FRET verwendet werden kann.

### 6.3. Simultaner Nachweis von Homomeren und Heteromeren

Wie Beispiele der Signaltransduktion von anderen Rezeptorkinasen zeigen [Karlova und de Vries 2006], [Chinchilla et al. 2009], [Bleckmann 2010], beruht die molekulare Vermittlung von ligandenabhängigen Signalen auf dynamischer Komplexbildung, die Homomere, Heteromere und Multimere umfasst. Daraus folgt, dass zum kompletten Verständnis der molekularen Reaktionsmechanismen Informationen über Heteromer- und Homomerbildung gleichzeitig benötigt werden. Darüber hinaus kann die Lokalisation der Komplexbildung von Rezeptorkinasen essentiell für deren Funktion sein.

Mit MFIS konnte in dieser Arbeit simultan die heteromere und homomere Komplexbildung von ACR4 und CLV1 anhand der beiden Fluoreszenz-Parameter Lebensdauer und Anisotropie mit hoher räumlicher Auflösung gezeigt werden. In Abbildung 6.1 A und B sind die MFIS-Bilder, jeweils bestehend aus Fluoreszenz-Intensitätsbild, -Lebensdauerbild und -Anisotropiebild, von ACR4-GFP allein und in Koexpression mit CLV1-mCherry an der Plasmamembran von Blattepidermiszellen in *N.benthamiana* gezeigt; die Plasmodesmata sind mit Sternchen markiert. Das aus diesen beiden Bildern generierte zweidimensionale Pixelhäufigkeitsdiagramm aus Fluoreszenz-Lebensdauer und -Anisotropie (C) zeigt vier klar getrennte Pixelpopulationen, die jeweils zur Plasmamembran (grün, orange) und zu Plasmodesmata (rot, türkis) gehören. An der Lage im 2d-Histogramm kann die Komplexierung der beteiligten Rezeptorkinasen abgelesen werden: ACR4-GFP allein zeigt



**Abbildung 6.1. Komplexbildung von ACR4 und CLV1 mit MFIS.** (A) MFIS-Bild von ACR4-GFP exprimiert in Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. (B) MFIS-Bild von ACR4-GFP koexprimiert mit CLV1-mCherry in Blattepidermiszellen in *N. benthamiana*. Die roten und türkisen Sternchen markieren Plasmodesmata. (C) Das 2d-Histogramm Fluoreszenz-Anisotropie gegen Fluoreszenz-Lebensdauer wurde generiert aus (A) und (B) und zeigt folgende Pixelpopulationen: ACR4-GFP Plasmamembran (orange), ACR4-GFP Plasmodesmata (rot), ACR4-GFP + CLV1-mCherry Plasmamembran (grün), ACR4-GFP + CLV1-mCherry Plasmodesmata (türkis). (D) Modell der heteromeren und homomeren Komplexbildung von ACR4 (grau) und CLV1 (schwarz) an der Plasmamembran (PM) und an Plasmodesmata (PD).

keine Reduktion der Lebensdauer, also kein hetero-FRET, aber eine reduzierte Anisotropie, die Homo-FRET und damit Homomerebildung anzeigt, an der PM (orange) und besonders ausgeprägt an PD (rot). ACR4-GFP koexprimiert mit mCherry zeigt eine reduzierte Fluoreszenz-Lebensdauer aufgrund von hetero-FRET an der PM (grün) und eine besonders niedrige Lebensdauer an PD (türkis). Zusätzlich zeigt die niedrige Fluoreszenz-Anisotropie an PD (türkis) Homo-FRET und damit die homomere Komplexbildung von ACR4 an.

An PD findet also "mehr FRET" statt als an der PM. Allerdings lässt sich allein aus der absoluten Abnahme der Fluoreszenz-Lebensdauer und der Fluoreszenz-Anisotropie nicht schließen, ob mehr Komplexe gebildet werden als an der PM oder Komplexe, die sich in Zusammensetzung und Konformation von denen an der PM unterscheiden.

Um dies genauer zu bestimmen ist eine quantitative FRET-Analyse nötig. Die Analyse mit einem Zwei-Spezies-Modell ergab, dass sich an PD mehr Moleküle in heteromeren Komplexen befinden als an der PM (siehe Abschnitt 6.1.2). Berücksichtigt man, dass gleichzeitig auch mehr Homomere an PD vorliegen, so ist die einfachste Erklärung die Bildung von Multimeren an PD, die mehrere ACR4 und CLV1-Moleküle enthalten. Dagegen liegen im einfachsten Fall an der PM heteromere und homomere Dimere vor (siehe Modell in Abb. 6.1 D).

## 6.4. Mobilität in der Plasmamembran

Komplexbildung mit anderen Rezeptoren und Proteinen sowie Umstrukturierung innerhalb der Membrenumgebung wie lipide Mikrodomänen sind übliche Mechanismen der Signaltransduktion und des Rezeptorrecyclings nach Ligandenbindung. Diese Prozesse stehen in engem Zusammenhang mit der Mobilität der Rezeptoren in der Plasmamembran.

Hier wurde die Mobilität von ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran mit Fluoreszenzerholung nach Photobleichen und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht. In FRAP-Messungen ergab sich, dass sowohl ACR4 als auch CLV1 zu etwa 70 % immobil in der PM vorliegen, was auf eine Assoziation mit Membrandomänen schließen lässt. Nach Zugabe der Liganden CLE40 und CLV3 zeigten beide Rezeptorkinasen eine Zunahme der immobilen Fraktion, die auf ligandeninduzierte Clusterbildung und/oder Bindung an Membrandomänen zurückzuführen ist.

Die Untersuchung der mobilen Fraktion auf kurzer Längenskala mit FCS zeigte, dass ACR4 und CLV1 an der PM eine hochmobile und eine langsame Diffusionskomponente besitzen, deren Anteile zwischen einzelnen Messpunkten an der PM stark schwankten.

Nach Zugabe der Liganden CLE40 und CLV3 zeigten beide Komponenten eine Abnahme des Diffusionskoeffizienten um eine Größenordnung. Dies lässt sich durch die Bildung großer Molekülcluster erklären.

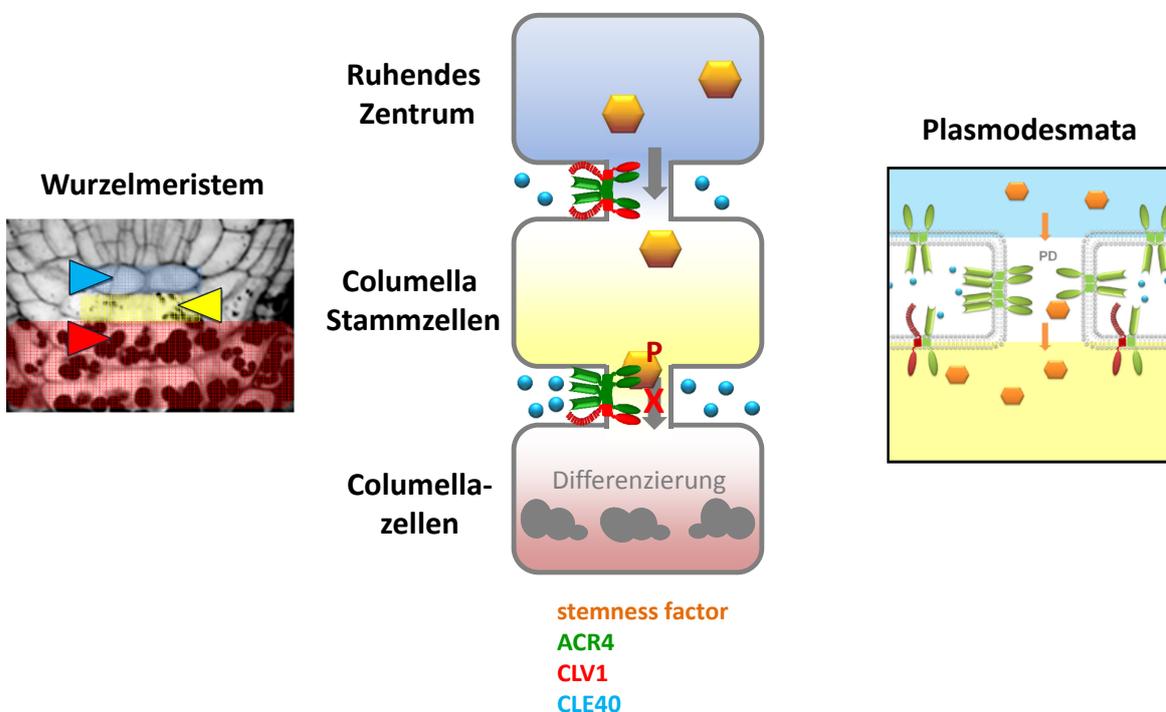
Die durchgeführten FRAP und FCS-Messungen sind aufgrund von Datenqualität und Stichprobenumfang nicht geeignet, statistisch gesicherte Werte für Diffusionskoeffizienten zu liefern oder detaillierte Aussagen über Molekülkomplexgrößen und -zusammensetzungen zu treffen. Innerhalb dieser Grenzen aber ist eine qualitative Charakterisierung der Mobilität von ACR4 und CLV1 unter dem Einfluss der jeweiligen Liganden möglich.

## 6.5. Biologische Bedeutung

Das Wachstum der Wurzel beruht auf der Aktivität der Stammzellnische (Meristem), die Stammzellen enthält, aus denen sich alle Zellen der Wurzel entwickeln. Sowohl die Anordnung als auch die Anzahl dieser Stammzellen wird durch Rückkopplungsmechanismen gehalten, die als zentrale Elemente plasmamembranständige Rezeptorkinasen und kleine Peptide als Botenstoffe enthalten. Im Spross reguliert die Rezeptorkinase CLV1 den Stammzellenerhalt, während in der Wurzel die Rezeptorkinase ACR4 eine ähnliche Rolle übernimmt. Bisher war keine Funktion von CLV1 in der Wurzel bekannt, allerdings zeigten nun Stahl et al., dass ACR4 und CLV1 überlappende Expressionsdomänen in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* besitzen. Des Weiteren zeigten [Stahl et al. 2013] in genetischen Studien, dass die Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 zusammen mit dem Peptid CLE40 in einem Signalweg zur Stammzellenregulation im Wurzelmeristem aktiv sind [Stahl et al. 2013]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ACR4 und CLV1 an der Plasmamembran lokalisieren und speziell an Plasmodesmata, denen eine besondere Rolle bei der Kommunikation zwischen Zellen zukommt, akkumulieren.

An dieser Stelle war die molekulare Funktionsweise dieses rezeptorvermittelten Signalprozesses und insbesondere die tatsächliche physikalischen Interaktion der beiden Rezeptorkinasen noch unbekannt. In der vorliegende Arbeit konnte mittels FRET nachgewiesen werden, dass ACR4 und CLV1 in der Plasmamembran direkt molekular interagieren und heteromere und homomere Komplexe bilden. Insbesondere konnte durch die erzielte hohe räumliche Auflösung bei der Analyse gezeigt werden, dass spezifisch an Plasmodesmata eine verstärkte Bildung von heteromeren und homomeren Komplexen stattfindet. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass Komplexbildung an PD eine bisher unbekannte Rolle bei

der Funktionsweise von Stammzellenregulation zukommt. Auf Grundlage der Erkenntnisse über die Plasmodesmata-lokalisierte Interaktion von ACR4 und CLV1 schlagen [Stahl und Simon 2013b] ein neues Modell für die Kommunikation zwischen Zellen vor, das apoplastische Signalübertragung über Liganden und Plasmamembran-lokalisierte Rezeptoren und symplastischen Transport von informationstragenden Molekülen durch Plasmodesmata verbindet. In diesem Modell wird der Transport eines bisher unbekanntes Moleküls, das Stammzellenerhalt reguliert ("stemness factor"), durch ACR4/CLV1-Komplexe in Abhängigkeit des Liganden CLE40 direkt an Plasmodesmata reguliert (Abb. 6.2).



**Abbildung 6.2. Hypothetisches Schema der Funktionsweise von ACR4 und CLV1 im Wurzelmeristem von *Arabidopsis thaliana*.** Im Wurzelmeristem von *Arabidopsis thaliana* befinden sich eine Zelllage unterhalb des Ruhenden Zentrums (quiescent centre, QC) die Columella-Stammzellen. Die anschließenden Zelllagen bestehen aus ausdifferenzierten Columella-Zellen. Der Rückkopplungsmechanismus, der diese Anordnung erhält, besteht aus zwei gegenläufigen Mechanismen. Der mobile Transkriptionsfaktor WOX5 wird im QC exprimiert und erhält die Stammzellidentität der Columella-Stammzellen. Ausdifferenzierte Columella-Zellen sekretieren das Peptid CLE40, das dagegen zur Ausdifferenzierung führt. Der exakte Mechanismus auf molekularer Ebene ist nicht bekannt. [Stahl und Simon 2013b] stellen die Hypothese auf, dass Stammzellidentität durch ein mobiles Molekül ("stemness factor") durch Plasmodesmata symplastisch übertragen wird. Die Mobilität dieses stemness factors zwischen Zellen wird an Plasmodesmata durch Komplexe der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1 reguliert, die Teil der apoplastischen Signalübertragung durch das Peptid CLE40 sind.

Die in den durchgeführten FRAP- und FCS-Experimenten festgestellte verringerte Mobilität von ACR4 und CLV1 in Anwesenheit von CLE40 bzw. CLV3 ist auf die Assoziation mit Membrandomänen und/oder die Bildung von Molekülclustern zurückzuführen, die sehr viel größer sein müssen als multimere Proteinkomplexe. Dies könnte auf die Anwesenheit bisher unbekannter Interaktionspartner, die an der Signalübertragung durch ACR4 und CLV1 beteiligt sind, zurückzuführen sein. Dies ist im Einklang mit der gegenwärtigen Erwartung, dass weitere Rezeptorkinasen an der Stammzellenregulation des Wurzelmeristems beteiligt sind [Williams und De Smet 2013].

Die direkte Bindung von Peptiden der CLE-Familie und Rezeptorkinasen wurde bisher nur *in vitro* gezeigt [Guo et al. 2010], aber bisher fehlen geeignete Methoden für einen Nachweis *in planta*. Die kombinierten Mobilitätsmessungen mit FRAP und FCS in dieser Arbeit offenbarten spezifische Verteilungsmuster der immobilen und mobilen Fraktionen von ACR4 und CLV1, die ligandeninduziert charakteristische Umverteilungen zeigten. Dies könnte die Grundlage für ein Bindungssessay von Liganden-Rezeptor-Interaktionen *in planta* bilden.

# 7 Zusammenfassungen

## 7.1. Zusammenfassung

Die Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie (MFIS) vereinigt folgende Fluoreszenz-Mikroskopie-Methoden: Fluoreszenz-Lebensdauer-Mikroskopie (FLIM) und Fluoreszenz-Anisotropie-Mikroskopie (FAIM), mit denen molekulare Komplexbildung über Förster Resonanzenergietransfer (FRET) nachwiesen werden können, sowie Methoden der kinetischen Mikroskopie wie Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), mit denen Moleküldynamiken gemessen werden können.

In dieser Arbeit wurde erstmalig das volle Potential von MFIS in lebenden Zellen genutzt und die Interaktion der Rezeptorkinasen ACR4 und CLV1, denen eine zentrale Rolle bei der Stammzellenregulation in der Wurzel von *Arabidopsis thaliana* zukommt, auf molekularer Ebene *in planta* untersucht. Das simultane Auslesen mehrerer Fluoreszenz-Parameter und die damit verbundene Verknüpfung von Informationen erlaubte die umfassende Untersuchung der molekularen Interaktionen von ACR4 und CLV1, die sowohl Komplexbildung als auch die molekularen Dynamiken umfasst.

Komplexbildung von Rezeptorkinasen mit Korezeptoren und Proteinen in der Plasmamembran stellt ein grundlegendes Element der ligandeninduzierten Signaltransduktion dar. In dieser Arbeit wurde sowohl die heteromere als auch homomere Komplexbildung von ACR4 und CLV1 nachgewiesen, die in Fusion mit den fluoreszenten Proteinen GFP und mCherry in Blattepidermiszellen in *Nicotiana benthamiana* transient exprimiert wurden.

FRET-FLIM-Messungen ergaben, dass ACR4 und CLV1 an der Plasmamembran miteinander heteromere Komplexe und jeweils homomere Komplexe bilden. Durch die quantitative Analyse von FRET und die intensitätsbasierte Bestimmung der Molekülkonzentrationen konnte die Gleichgewichtskonstante der Komplexbildung abgeschätzt werden.

Die homomere Komplexbildung von ACR4 wurde in stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen über Homo-FRET nachgewiesen.

Der kombinierte pixelweise Nachweis von Hetero-FRET über die Fluoreszenz-Lebensdauer und von Homo-FRET über die stationäre Fluoreszenz-Anisotropie in MFIS-Bildern ermöglichte eine Analyse mit hoher räumlicher Auflösung. Auf diese Weise konnten gezielt kleine Kanäle in der Plasmamembran, sogenannte Plasmodesmata (PD), untersucht werden, die bei maximaler Auflösung nur wenige Pixel in einem MFIS-Bild umfassen. Es konnte gezeigt werden, dass an PD eine verstärkte Bildung sowohl von heteromeren Komplexen von ACR4 und CLV1 als auch von homomeren ACR4-Komplexen stattfindet.

Molekulare Dynamiken können durch die Kombination von FCS- und FRAP-Messungen auf einer Zeitskala von Mikrosekunden bis Minuten dargestellt werden und beleuchten dabei Membrandomänen von Nano- bis Mikrometern. Während FCS die Diffusion und Komplexbildung einzelner Rezeptoren auf kurzer Längenskala erfasst, kann komplementär mit FRAP die Mobilität größerer Proteinverbände und deren Organisation in Mikrostrukturen der Plasmamembran (PM) gemessen werden. Die Mobilitätsmessungen in dieser Arbeit an ACR4 und CLV1 ergaben, dass beide Rezeptorkinasen in mindestens drei unterschiedlich mobilen Fraktionen in der PM vorliegen. In Anwesenheit des zugehörigen Liganden zeigte sich eine Zunahme der immobilen Fraktion in Kombination mit abnehmenden Diffusionskoeffizienten der beiden mobilen Fraktionen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass ligandeninduzierte Clusterbildung und verstärkte Assoziation an immobile Membrandomänen initiale Elemente bei der Signalantwort von ACR4 und CLV1 darstellen.

Durch die simultane Detektion und Analyse mehrerer Fluoreszenz-Parameter verknüpft MFIS Informationen über Energietransfer und Mobilität. Mit MFIS konnte ein differenziertes Bild der molekularen Interaktionen von ACR4 und CLV1 *in planta* gezeichnet werden, das grundlegende Aspekte der Funktionsweise von Signaltransduktion enthält und in Beziehung setzt.

## 7.2. Summary

Multiparameter Fluorescence Image Spectroscopy (MFIS) comprises the following fluorescence techniques applied in imaging: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) and Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy, which are capable of detecting the formation of molecular complexes using Förster Resonance Energy Transfer (FRET), as well as techniques focussing on kinetic properties such as Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) and Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), which are applied to determine molecular dynamics.

Here, for the first time the whole potential of MFIS was employed in living cells: the interaction of receptor kinases ACR4 and CLV1, which play a central role in stem cell regulation in the root of *Arabidopsis thaliana*, were investigated on a molecular scale *in planta*. The simultaneous analysis of different fluorescence parameters and hence, the combination of the resulting information allows for an extensive investigation of the molecular interactions of ACR4 and CLV1, which comprises complex formation as well as molecular dynamics.

Complex formation of receptor kinases with co-receptors and proteins in the plasma membrane are an essential element of ligand induced signal transduction. Here, the formation of heteromeric complexes as well as homomeric complexes was studied for ACR4 and CLV1, which were transiently expressed in fusion with the fluorescent proteins GFP and mCherry in *Nicotiana benthamiana*.

In FRET-FLIM experiments heteromeric complex formation of ACR4 and CLV1 as well as formation of homomers of both proteins at the plasma membrane (PM) was detected. Applying a quantitative FRET analysis together with an intensity-based approach to determine molecular concentrations, the equilibrium constant of complex formation could be estimated.

The formation of ACR4 homomers was revealed by steady state and time resolved fluorescence anisotropy experiments using homo-FRET.

The combined read-out of hetero-FRET determined by fluorescence lifetime and homo-FRET indicated by steady state fluorescence anisotropy in MFIS images facilitated an analysis with high spatial resolution. This approach allowed to specifically investigate small plasma membrane-lined channels, so-called plasmodesmata (PD), which only span a few pixel within an MFIS image at maximum resolution. It was demonstrated that an increased formation of hetero-oligomers of ACR4 and CLV1 as well as homo-oligomers of ACR4 occurs at PD.

The combination of FRAP and FCS allows for describing molecular dynamics on a time scale of micro seconds up to several minutes and observing membrane domains on a length scale of nanometers up to micrometers. While FCS covers the diffusion and complex formation of single receptors on a short length scale, FRAP can be applied complementary to investigate mobility of larger protein assemblies and their organization within microstructures of the plasma membrane (PM). The FRAP and FCS measurements on ACR4 and CLV1 carried out here revealed that both receptor kinases are present in the PM in at least three different fractions. In the presence of the respective ligand an increase of the immobile fraction was found. Additionally, a decrease of the diffusion coefficient of both mobile fractions was observed. These results suggest that ligand-induced cluster formation and increased association with membrane domains are initial events in signaling of ACR4 and CLV1.

The simultaneous detection and analysis of different fluorescence parameters and the subsequent combination of the information regarding energy transfer and mobility allowed for a detailed description of the molecular interactions of ACR4 and CLV1 *in planta*, covering and connecting fundamental aspects of the functionality of signal transduction.

## Literaturverzeichnis

Adjobo-Hermans MJW, Goedhart J, Gadella TWJ (2006) Plant G protein heterotrimers require dual lipidation motifs of Galpha and Ggamma and do not dissociate upon activation. *Journal of Cell Science* 119: 5087–5097

Adkins EM, Samuvel DJ, Fog JU, Eriksen J, Jayanthi LD, Vaegter CB, Ramamoorthy S, Gether U (2007) Membrane mobility and microdomain association of the dopamine transporter studied with fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry* 46: 10484–10497

Aker J, Borst JW, Karlova R, de Vries S (2006) The Arabidopsis thaliana AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *Journal of Structural Biology* 156: 62–71

Albertazzi L, Arosio D, Marchetti L, Ricci F, Beltram F (2009) Quantitative FRET analysis with the E<sup>0</sup>GFP-mCherry fluorescent protein pair. *Photochemistry and Photobiology* 85: 287–297

Ali GS, Prasad KVSK, Day I, Reddy ASN (2007) Ligand-dependent reduction in the membrane mobility of FLAGELLIN SENSITIVE2, an arabidopsis receptor-like kinase. *Plant & cell physiology* 48: 1601–1611

Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson E, Webb WW (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal* 16: 1055–1069

Bacia K, Schwille P (2007) Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature protocols* 2: 2842–2856

Bader AN, Hofman EG, van Bergen en Henegouwen PM, Gerritsen HC (2007) Imaging of protein cluster sizes by means of confocal time-gated fluorescence anisotropy microscopy. *Optics Express* 15: 6934–6945

Bader AN, Hofman EG, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PM, Gerritsen HC (2009) Homo-FRET imaging enables quantification of protein cluster sizes with subcellular resolution. *Biophysical journal* 97: 2613–2622

Bader AN, Hoetzel S, Hofman EG, Voortman J, van Bergen en Henegouwen PM, van Meer G, Gerritsen HC (2011) Homo-FRET imaging as a tool to quantify protein and lipid clustering. *Chemphyschem* 12: 475–483

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *PNAS* 97: 11984–11989

Bancaud A, Huet S, Rabut G, Ellenberg J (2010) Fluorescence perturbation techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, photoactivation, photoconversion, and FLIP. *Cold Spring Harbor Protocols* 12: 1303–1324

Bastiaens PIH, Pepperkok R (2000) Observing proteins in their natural habitat: The living cell. *TIBS* 25: 631–637

Baumann J, Fayer MD (1986) Excitation transfer in disordered two-dimensional and anisotropic

three-dimensional systems: Effects of spatial geometry on timeresolved observables. *The Journal of Chemical Physics* 85: 4087–4107

Becker W (2010) *The bh TCSPC Handbook*. Becker & Hickl GmbH

Becker W (2012) Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *Journal of Microscopy* 247: 119–136

Berg RH, Beachy RN (2008) Fluorescent protein applications in plants. *Methods in Cell Biology* 85: 153–177

Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642–1645

Bhat RA, Panstruga R (2005) Lipid rafts in plants. *Planta* 223: 5–19

Biskup C, Zimmer T, Kelbauskas L, Hoffmann B, Klöckner N, Becker W, Bergmann A, Benndorf K (2007) Multi-dimensional fluorescence lifetime and FRET measurements. *Microscopy research and technique* 70: 442–451

Bleckmann A (2010) *Untersuchungen zur Stammzellregulation im Sprossapikalmeristem von Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bleckmann A, Weidtkamp-Peters S, Seidel CAM, Simon R (2010a) Stem cell signaling in Arabidopsis requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiology* 152: 166–176

Boens N, Qin W, Basaric N, Hofkens J, Ameloot M, Pouget J, Lefevre Jp, Valeur B, Gratton E, VandeVen M, Silva ND, Engelborghs Y, Willaert K, Sillen A, Rumbles G, Phillips D, Visser AJWG, van Hoek A, Lakowicz JR, Malak H, Gryczynski I, Szabo AG, Krajcarski DT, Tamai N, Miura A (2007) Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Analytical Chemistry* 79: 2137–2149

Borst JW, Visser AJWG (2010) Fluorescence lifetime imaging microscopy in life sciences. *Measurement Science and Technology* 21

Borst JW, Laptinok SP, Westphal aH, Kühnemuth R, Hornen H, Visser NV, Kalinin S, Aker J, van Hoek A, Seidel CAM, Visser AJWG (2008) Structural changes of yellow Cameleon domains observed by quantitative FRET analysis and polarized fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal* 95: 5399–5411

Bosisio C, Quercioli V, Collini M, D'Alfonso L, Baldini G, Bettati S, Campanini B, Raboni S, Chirico G (2008) Protonation and conformational dynamics of GFP mutants by two-photon excitation fluorescence correlation spectroscopy. *J Phys Chem B* 112: 8806–8814

Brand D, Eggeling C, Zander C, Drexhage KH, Seidel CAM (1997) Single-molecule identification of coumarin-120 by time-resolved fluorescence detection: comparison of one- and two-photon excitation in solution. *J Phys Chem A* 101: 4313–4321

Bridson SJ, Hill SJ (2007) Pharmacology under the microscope: the use of fluorescence correlation spectroscopy to determine the properties of ligand-receptor complexes. *Trends in pharmacological*

sciences 28: 637–645

Bücherl CA, van Esse GW, Kruis A, Luchtenberg J, Westphal AH, Aker J, Hoek A, Albrecht C, Borst JW, de Vries SC (2013) Visualization of BRI1 and BAK1 ( SERK3 ) Membrane Receptor Heterooligomers during Brassinosteroid Signaling. *Plant Physiology* 162: 1911–1925

Cacas JL, Furt F, Le Guédard M, Schmitter JM, Buré C, Gerbeau-Pissot P, Moreau P, Bessoule JJ, Simon-Plas F, Mongrand S (2012) Lipids of plant membrane rafts. *Progress in lipid research* 51: 272–299

Campbell NA, Reece JB (2011) *Biologie*. Pearson

Cebecauer M, Spitaler M, Sergé A, Magee AI (2010) Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *Journal of cell science* 123: 309–320

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802–805

Chan FTS, Kaminski CF, Kaminski-Schierle GS (2011) HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *ChemPhysChem* 12: 500–509

Chen Y, Munteanu AC, Huang YF, Phillips J, Zhu Z, Mavros M, Tan W (2009) Mapping receptor density on live cells by using fluorescence correlation spectroscopy. *Chemistry* 15 (21): 1–11

Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497–500

Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in plant science* 14: 535–541

Chini B, Parenti M (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there ? *Journal of Molecular Endocrinology* 32: 325–338

Chow D, Guo L, Gai F, Goulian M (2012) Fluorescence correlation spectroscopy measurements of the membrane protein TetA in *Escherichia coli* suggest rapid diffusion at short length scales. *PLoS One* 7

Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, Lukyanov KA (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews* 90: 1103–1163

Cotlet M, Goodwin PM, Waldo GS, Werner JH (2006) A comparison of the fluorescence dynamics of single molecules of a green fluorescent protein: one- versus two-photon excitation. *ChemPhysChem* 7: 250–260

Crosby KC, Pietraszewska-Bogiel A, Gadella TWJ, Winkel BSJ (2011) Förster resonance energy transfer demonstrates a flavonoid metabolon in living plant cells that displays competitive interactions between enzymes. *FEBS Letters* 585: 2193–2198

Damien M (2013) [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org)

Day CA, Kraft LJ, Kang M, Kenworthy AK (2012) Analysis of protein and lipid dynamics using

confocal fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). *Curr Protoc Cytom*

Dixit R, Cyr R, Gilroy S (2006) Using intrinsically fluorescent proteins for plant cell imaging. *The Plant Journal* 45: 599–615

Eggeling C (1999) Analyse von photochemischer Kinetik und Moleküldynamik durch mehrdimensionale Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

Eggeling C, Fries J, Brand L, Günther R, Seidel CAM (1998) Monitoring conformational dynamics of a single molecule by selective fluorescence spectroscopy. *PNAS* 95: 1556–1561

Eggeling C, Berger S, Brand L, Fries JR, Schaffer J, Volkmer A, M SCA (2001) Data registration and selective single-molecule analysis using multi-parameter fluorescence detection. *Journal of Biotechnology* 86: 163–180

Eggeling C, Kask P, Winkler D, Jäger S (2005) Rapid analysis of Förster resonance energy transfer by two-color global fluorescence correlation spectroscopy: Trypsin proteinase reaction. *Biophysical Journal* 89: 605–618

Eigen M, Rigler R (1994) Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *PNAS* 91: 5740–5747

Elgass K, Caesar K, Wanke D, Harter K, Meixner AJ, Schleifenbaum F (2010) Application of FLIM-FIDSAM for the in vivo analysis of hormone competence of different cell types. *Anal Bioanal Chem* 398: 1919–1925

Felekyan S (2013) LabView-basiertes Programm Anl.

Ganguly S, Clayton AHA, Chattopadhyay A (2011) Organization of higher-order oligomers of the serotonin<sub>1</sub> (A) receptor explored utilizing homo-FRET in live cells. *Biophysical Journal* 100: 361–368

Gautier I, Tramier M, Durieux C, Coppey J, Pansu RB, Nicolas JC, Kemnitz K, Coppey-Moisan M (2001) Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-Dmonomer-dtransition of GFP-tagged proteins. *Biophysical Journal* 80: 3000–3008

Geldner N, Hyman DL, Wang X, Schumacher K, Chory J (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes & Development* 21: 1598–1602

Gendron PO, Avaltroni F, Wilkinson KJ (2008) Diffusion coefficients of several rhodamine derivatives as determined by pulsed field gradient-nuclear magnetic resonance and fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence* 18: 1093–1101

Goldmann RD, Spector DL, Swedlow J (2009) *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory

Guo Y, Han L, Hymes M, Denver R, Clark SE (2010) CLAVATA2 forms a distinct CLE-binding receptor complex regulation Arabidopsis stem cell specification. *The Plant Journal* 63: 889–900

Hanzal-Bayer MF, Hancock JF (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Letters* 581: 2098–2104

- Hards A (2004) The combined AFM manipulation and fluorescence imaging of single DNA molecules. Dissertation, LMU München
- Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW (1998) Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *PNAS* 95: 13573–13578
- Hegener O, Prenner L, Runkel F, Baader SL, Kappler J, Häberlein H (2004) Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 43: 6190–6199
- Heim R, Prasher DC, Tsien RY (1994) Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *PNAS* 91: 12501–12504
- Hess ST, Sheets ED, Wagenknecht-Wiesner A, Heikal AA (2003) Quantitative analysis of the fluorescence properties of intrinsically fluorescent proteins in living cells. *Biophysical Journal* 85: 2566–2580
- Hink MA, Shah K, Russinova E, de Vries SC, Visser AJWG (2008) Fluorescence fluctuation analysis of *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinase and brassinosteroid insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophysical Journal* 94: 1052–1062
- Huang B, Babcock H, Zhuang X (2010) Breaking the diffraction barrier: Super-resolution imaging of cells. *Cell* 143: 1047–1058
- Immink RGH, Gadella TWJ, Ferrario S, Busscher M, Angenent GC (2002) Analysis of MADS box protein-protein interactions in living plant cells. *PNAS* 99: 2416–2421
- Ishikawa-Ankerhold HC, Ankerhold R, Drummen GPC (2012) Advanced fluorescence microscopy techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* 17: 4047–4132
- Jaillais Y, Belkhadir Y, Balsemão Pires E, Dangl JL, Chory J (2011) Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor / coreceptor complex formation. *PNAS* 108: 8503–8507
- Jayanthi LD, Samuvel DJ, Ramamoorthy S (2004) Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. *Journal of Biological Chemistry* 279: 19315–19326
- Kahya N, Schwille P (2006) Fluorescence correlation studies of lipid domains in model membranes. *Molecular membrane biology* 23: 29–39
- Kalinin S (2012) LabView basiertes Programm fitmachine.
- Kaminski CF, Rees EJ, Kaminski Schierle GS (2014) Methods in Molecular Biology, Chapter 19: A quantitative protocol for intensity-based live cell FRET imaging., Vol. 1076 of *Fluorescence Spectroscopy and Microscopy: Methods and Protocols*. Springer Science+Business
- Karlova R, de Vries SC (2006) Advances in understanding brassinosteroid signaling. *Science's STKE* 2006: 36
- Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, de Vries S (2006) The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *The Plant Cell* 18: 626–638

- Kinosita KJ, Ikegami A, S K (1982) On the wobbling-in-cone analysis of fluorescence anisotropy decay. *Biophysical Journal* 37: 461–464
- Koshioka M, Sasaki K, Masuhara H (1995) Time-dependent fluorescence depolarization analysis in three-dimensional microspectroscopy. *Applied Spectroscopy* 49: 224–228
- Krause G, Weis E (1984) Review: Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5: 139–157
- Kravets E, Degrandi D, Weidtkamp-Peters S, Ries B, Konermann C, Felekyan S, Dargazanli JM, Praefcke GJK, Seidel CAM, Schmitt L, Smits SHJ, Pfeffer K (2012) The GTPase activity of murine guanylate-binding protein 2 (mGBP2) controls the intracellular localization and recruitment to the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* 287: 27452–27466
- Kudryavtsev V (2006) LabView-basiertes Programm Marcelle.
- Kudryavtsev V, Felekyan S, Woźniak AK, König M, Sandhagen C, Kühnemuth R, Seidel CAM, Oesterhelt F (2007) Monitoring dynamic systems with multiparameter fluorescence imaging. *Analytical and bioanalytical chemistry* 387: 71–82
- Kühnemuth R (2011) Fluorescence Anisotropy: concept and applications. Vorlesung “Bildgebende Fluoreszenzspektroskopie“ (2011)
- Kühnemuth R, Seidel CAM (2001) Principles of single molecule multiparameter fluorescence spectroscopy. *Single Molecules* 2: 251–254
- Kusumi A, Fujiwara TK, Morone N, Yoshida KJ, Chadda R, Xie M, Kasai RS, Suzuki KGN (2012) Membrane mechanisms for signal transduction: the coupling of the meso-scale raft domains to membrane-skeleton-induced compartments and dynamic protein complexes. *Seminars in cell & developmental biology* 23: 126–144
- Lakowicz JR (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Dritte Auflage. Springer
- Laptenok SP, SnellenLap JJ, Bücherl KR C Aand Konrad, Borst JW (2014) Global analysis of FRET-FLIM Data in live plant cells. *Methods in Mol Biol* 1076: 481–502
- Levitt JA, Matthews DR, Ameer-Beg SM, Suhling K (2009) Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology. *Current Opinion in Biotechnology* 20: 28–36
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 213–222
- Liao CP (2011) [www.wikimedia.org](http://www.wikimedia.org)
- Lingwood D, Simons K (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327: 46–50
- Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N, Patterson GH (2003) Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nature cell biology* Sep: S7–14
- Liu P, Ahmed S, Wohland T (2008) The F-techniques: Advances in receptor protein studies. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 19: 181–190

- Liu Y, Kim HR, Heikal AA (2006) Structural basis of fluorescence fluctuation dynamics of green fluorescent proteins in acidic environments. *The Journal of Physical Chemistry B* 110: 24138–24146
- Ma Q (2010) Multiparameter Image Spectroscopy of living cells. Masterarbeit, HHU Düsseldorf
- Magde D, Elson E, Webb W (1972) Thermodynamic fluctuation in a reacting system - measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Physical Review Letters* 29: 705–708
- Magde D, Elson EL, Webb WW (1974) Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* 13: 29–61
- van Manen HJ, Verkuijlen P, Wittendorp P, Subramaniam V, van den Berg TK, Roos D, Otto C (2008) Refractive index sensing of green fluorescent proteins in living cells using fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biophysical Journal* 94: 67–69
- Marawske S (2011) Fluorescence spectroscopy and imaging of polymer bound fluorophores and immobilised bio-molecules. Dissertation, HHU Düsseldorf
- Margittai M, Widengren J, Schweinberger E, Schröder GF, Felekyan S, Haustein E, König M, Fasshauer D, Grubmüller H, Jahn R, Seidel CAM (2003) Single-molecule fluorescence resonance energy transfer reveals a dynamic equilibrium between closed and open conformations of syntaxin 1. *PNAS* 100: 15516–15521
- Mattheyses AL, Kampmann M, Atkinson CE, Simon SM (2010) Fluorescence anisotropy reveals order and disorder of protein domains in the nuclear pore complex. *Biophysical Journal* 99: 1706–1717
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature biotechnology* 17: 969–973
- Maule A, Faulkner C, Benitez-Alfonso Y (2012) Plasmodesmata in communicado. *Frontiers in Plant Science* 3
- Maule AJ (2008) Plasmodesmata: structure , function and biogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 680–686
- Maus M, Cotlet M, Hofkens J, Gensch T, De Schryver FC, Schaffer J, M SCA (2001) An experimental comparison of the maximum likelihood estimation and nonlinear least-squares fluorescence lifetime analysis of single molecules. *Analytical Chemistry* 73: 2078–2086
- Miura K (2009) Igorpro makro “frapcalc“. [http://cmci.embl.de/downloads/frap\\_analysis](http://cmci.embl.de/downloads/frap_analysis)
- Nakabayashi T, Wang HP, Ohta N (2008) Application of fluorescence lifetime imaging of enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements. *Photochemical&Photobiological Science* 7: 668–670
- Nam KH, Li J (2002) BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110: 203–212
- Nguyen TA, Sarkar P, Veetil JV, Koushik SV, Vogel SS (2012) Fluorescence polarization and fluctuation analysis monitors subunit proximity, stoichiometry, and protein complex hydrodynamics. *PLoS one* 7

- Niwa H, Inouye S, Hirano T, Matsuno T, Kojima S, Kubota M, Ohashi M, Tsuji FI (1996) Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green fluorescent protein. *PNAS* 93: 13617–13622
- Ntoukakis V, Schwessinger B, Segonzac C, Zipfel C (2011) Cautionary notes on the use of C-terminal BAK1 fusion proteins for functional studies. *The Plant Cell* 23: 3871–3878
- Ogawa M, Shinohara H, Sakagami Y, Matsubayashi Y (2008) Arabidopsis CLV3 peptide directly binds CLV1 ectodomain. *Science* 319
- Ormö M, Cubitt A, Kallio K, Gross L, Tsien R, Remington S (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273: 1392–1395
- Osakabe Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP (2013) Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of experimental botany* 64: 445–58
- Osterrieder A, Carvalho CM, Latijnhouwers M, Johansen JN, Stubbs C, Botchway S, Hawes C (2009) Fluorescence lifetime imaging of interactions between golgi tethering factors and small GTPases in plants. *Traffic* 10: 1034–1046
- Owen DM, Williamson D, Rentero C, Gaus K (2009) Quantitative microscopy: Protein dynamics and membrane organisation. *Traffic* 10: 962–971
- Padilla-Parra S, Tramier M (2012) FRET microscopy in the living cell: Different approaches, strengths and weaknesses. *Bioessays* 34: 369–376
- Padilla-Parra S, Audugé N, Lalucque H, Mevel JC, Coppey-Moisan M, Tramier M (2009) Quantitative comparison of different fluorescent protein couples for fast FRET-FLIM acquisition. *Biophysical Journal* 97: 2368–2376
- Paila YD, Kombrabail M, Krishnamoorthy G, Chattopadhyay A (2011) Oligomerization of the serotonin<sub>1A</sub> receptor in live cells: A time-resolved fluorescence anisotropy approach. *The Journal of Physical Chemistry B* 115 (39): 11439–11447
- Phair RD, Gorski SA, Misteli T (2004) Measurement of dynamic protein binding to chromatin in vivo, using photobleaching microscopy. *Methods in Enzymology* 375: 393–414
- Pramanik A, Rigler R (2001) Ligand-receptor interactions in the membrane of cultured cells monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biological Chemistry* 382: 371–378
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111: 229–233
- Prenner L, Sieben A, Zeller K, Weiser D, Häberlein H (2007) Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 46: 5106–5113
- Reid BG, Flynn GC (1997) Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry* 36: 6786–6791
- Rigler R (1995) Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening - Applications in biotechnology. *Journal of Biotechnology* 41: 177–186

- Rigler R, Widengren J (1990) Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioscience* 3: 180–183
- Ritchie K, Spector J (2007) Single molecule studies of molecular diffusion in cellular membranes: Determining membrane structure. *Biopolymers* 87: 95–101
- Runnels LW, Scarlata SF (1995) Theory and application of fluorescence homotransfer to melittin oligomerization. *Biophysical Journal* 69: 1569–1583
- Rusinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Caño Degado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC (2004) Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *The Plant Cell* 16: 3216–3229
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006) Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature* 3: 793–795
- Savetec I (2011) Optische Vermessung von Nukleinsäuren mit Nanometer-Auflösung. Bachelorarbeit, HHU Düsseldorf
- Schaffer J, Volkmer A, Eggeling C, Subramaniam V, Striker G, Seidel CAM (1999) Identification of single molecules in aqueous solution by time-resolved fluorescence anisotropy. *Journal of Physical Chemistry* 103: 331–336
- Schwille P, Haustein E (2004) Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. *Biophysics Textbook online*
- Schwille P, Kummer S, Heikal aa, Moerner WE, Webb WW (2000) Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *PNAS* 97: 151–156
- Sergé A, Fourgeaud L, Hémar A, Choquet D (2002) Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *Journal of Neuroscience* 22: 3910–3920
- Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2: 905–909
- Sharonov A, Hochstrasser RM (2006) Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *PNAS* 103: 18911–18916
- Shiu SH, Bleecker AB (2001) Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signaling. *Science's STKE* 113
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology* 1: 31–39
- Sisamakris E, Valeri A, Kalinin S, Rothwell PJ, Seidel CAM (2010) Accurate Single-Molecule FRET Studies Using Multiparameter Fluorescence Detection. *Methods in Enzymology* 475: 455–514
- Somssich M, Simon R (2012) Peptides Regulating Apical Meristem Development. *Signaling and Communication in Plants* 16: 25–40

- Sprague BL, McNally JG (2005) FRAP analysis of binding: Proper and fitting. *Trends in cell biology* 15: 84–91
- Stahl Y, Simon R (2010) Plant primary meristems: shared functions and regulatory mechanisms. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 53–58
- Stahl Y, Simon R (2013b) Gated communities: apoplastic and symplastic signals converge at plasmodesmata to control cell fates. *Journal of Experimental Botany*
- Stahl Y, Wink H, Ingram GC, Simon R (2009) A signaling module controlling the stem cell niche in *Arabidopsis* root meristems. *Current Biology* 19: 1–6
- Stahl Y, Grabowski S, Bleckmann A, Kühnemuth R, Weidtkamp-Peters S, Pinto KG, Kirschner GK, Schmid JB, Wink RH, Hülsewede A, Felekyan S, Seidel CAM, Simon R (2013) Moderation of *Arabidopsis* root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Current Biology* 23: 362–371
- Strack RL, Strongin DE, Mets L, Glick BS, Keenan RJ (2010) Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway. *Journal of American Chemical Society* 132: 8496–8505
- Straight AF (2007) Fluorescent protein applications in microscopy. *Methods in Cell Biology* 81: 93–113
- Striker G, Subramaniam V, Seidel CAM, Volkmer A (1999) Photochromicity and fluorescence lifetimes of green fluorescent protein. *The Journal of Physical Chemistry B* 103: 8612–8617
- Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM (2000) *Stryer Biochemie*. Springer Spektrum
- Subach FV, Verkhusha VV (2012) Chromophore transformations in red fluorescent proteins. *Chemical reviews* 112: 4308–4327
- Suhling K, Siegel J, Phillips D, French PMW, Lévêque-Fort S, Webb SED, Davis DM (2002) Imaging the environment of green fluorescent protein. *Biophysical Journal* 83: 3589–3595
- Sun Y, Hays NM, Periasamy A, Davidson MW, Day RN (2012) Monitoring protein interactions in living cells with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Methods in Enzymology* 504: 371–391
- Swaminathan R, Hoang CP, Verkman AS (1997) Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal* 72: 1900–1907
- Tamura K, Shimada T, Ono E, Tanaka Y, Nagatani A, Higashi Si, Watanabe M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *The Plant Journal* 35: 545–555
- Terskikh A, Fradkov A, Ermakova G, Zaisky A, Tan P, Kajava AV, Zhao X, Lukyanov S, Matz M, Kim S, Weissmann I, Siebert P (2000) "Fluorescent timer": Protein that changes color with time. *Science* 290: 1585–1588
- van Thor JJ, Sage JT (2006) Charge transfer in green fluorescent protein. *Photochemical & photobiological sciences* 5: 597–602

- Tramier M, Coppey-Moisan M (2008) Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-FRET in living cells. *Methods in Cell Biology* 85: 395–414
- Tramier M, Piolot T, Gautier I, Mignotte V, Coppey J, Kemnitz K, Durieux C, Coppey-Moisan M (2003) Homo-FRET versus hetero-FRET to probe homodimers in living cells. *Methods in enzymology* 360: 580–597
- Tsien R (1998) The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry* 67: 509–544
- Turnbull CGN, Lopez-Cobollo RM (2013) Heavy traffic in the fast lane: long-distance signalling by macromolecules. *New Phytologist* 198: 33–51
- Uskova MA, Borst JW, Hink MA, van Hoek A, Schots A, Klyachko NL, Visser AJ (2000) Fluorescence dynamics of green fluorescent protein in AOT reversed micelles. *Biophysical Chemistry* 87: 73–84
- Valeur B (2002) *Molecular fluorescence: Principles and applications*. Wiley-VCH Verlag
- Verkhusha VV, Lukyanov KA (2004) The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nature biotechnology* 22: 289–296
- Visser AJ, Laptinok SP, Visser NV, van Hoek A, Birch DJS, Brochon JC, Borst JW (2010) Time-resolved FRET fluorescence spectroscopy of visible fluorescent protein pairs. *European Biophysics Journal* 39: 241–253
- Vogel SS, Thaler C, Blank SV Paul Sand Koushik (2009) *FLIM microscopy in biology and medicine*, Chapter 10: Time-resolved fluorescence anisotropy. CRC Press Taylor and Francis Group, USA
- Volkmer A, Subramaniam V, Birch DJS, Jovin TM (2000) Decays of Green Fluorescent Proteins. *Biophysical Journal* 78: 1589–1598
- Wachter RM, Watkins JL, Kim H (2010) Mechanistic diversity of red fluorescence acquisition by GFP-like proteins. *Biochemistry* 49: 7417–7427
- Wallrabe H, Periasamy A (2005) Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 19–27
- Walther KA, Papke B, Sinn MB, Michel K, Kinkhabwala A (2011) Precise measurement of protein interacting fractions with fluorescence lifetime imaging microscopy. *Molecular BioSystems* 7: 322–336
- Wang Y, Shyy JY, Chien S (2008) Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: Seeing is believing. *Annual Review of Biomedical Engineering* 10: 1–38
- Weidtkamp-Peters S, Felekyan S, Bleckmann A, Simon R, Becker W, Kühnemuth R, Seidel CAM (2009) Multiparameter fluorescence image spectroscopy to study molecular interactions. *Photochemical & Photobiological Sciences* 8: 470–480
- Widengren Jand Mets, Rigler R (1995) Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *Journal of Physical Chemistry* 99: 13368–13379
- Widengren J (1996) *Fluorescence correlation spectroscopy, photophysical aspects and applications*.

Dissertation, Karolinska Institut, Stockholm

Widengren J, Mets U, Rigler R (1999a) Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Chemical Physics* 250: 171–186

Widengren J, Terry B, Rigler R (1999b) Protonation kinetics of GFP and FITC investigated by FCS - aspects of the use of fluorescent indicators for measuring pH. *Chemical Physics* 249: 259–271

Widengren J, Kudryavtsev V, Antonik M, Berger S, Gerken M, M SCA (2006) Single-molecule detection and identification of multiple species by multiparameter fluorescence detection. *Analytical Chemistry* 78: 2039–2050

Wierzba MP, Tax FE (2013) Notes from the underground: receptor-like kinases in Arabidopsis root development. *Journal of integrative plant biology* 55: 1224–37

Williams EL, De Smet I (2013) Development: CLAVATA1 joins the club of root stem cell regulators. *Current Biology* 23

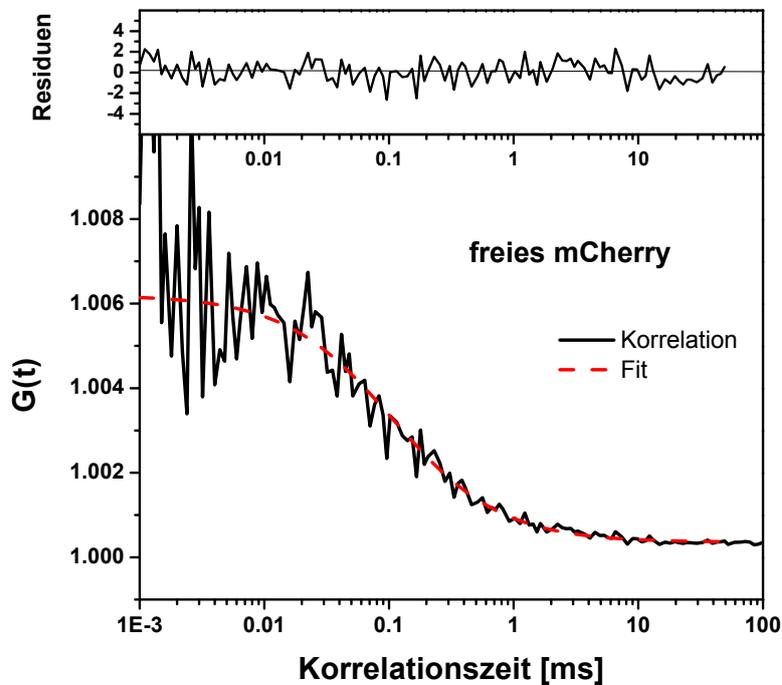
Wu B, Chen Y, Müller JD (2009) Fluorescence fluctuation spectroscopy of mCherry in living cells. *Biophysical journal* 96: 2391–2404

Yang F, Moss LG, Phillips GNJ (1996) The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* 14: 28545–28549

Zeiss (2013) <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>

# A Anhang

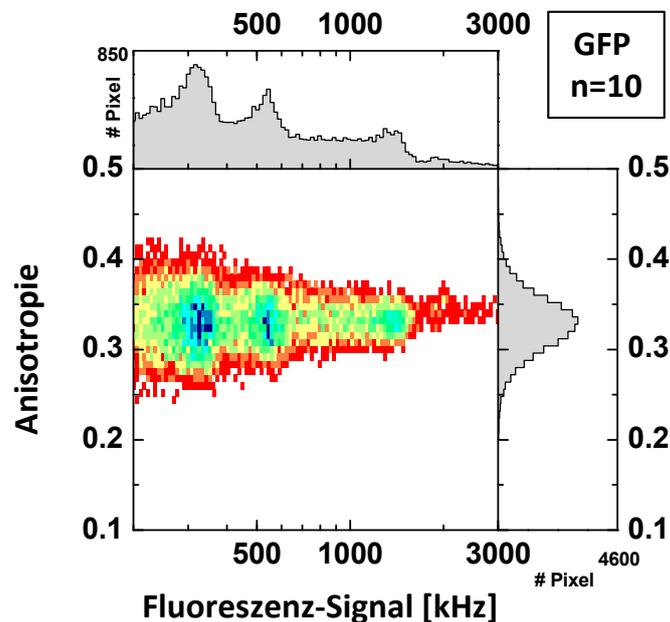
## A.0.1. FCS von freiem mCherry



**Abbildung A.1. Korrelationskurve von freiem mCherry** exprimiert in *N. benthamiana*. Die FCS-Messung wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die MFIS-Aufnahmen mit direkter Akzeptoranregung: Anregung bei 559 nm, Anregungsleistung  $8,2 \mu\text{W}$ , beugungslimitierter Fokus. Die Korrelationskurve (schwarze Kurve) wurde mit Gleichung 3.26 angepasst (rote Kurve) und ergab  $N=171$ ,  $t_D=106 \mu\text{s}$ ,  $\chi^2=1,068$ . Mit einer Gesamtzählrate von 354 kHz ergibt sich eine Zählrate pro Molekül von 2,1 kcpm.

## A.0.2. Komplexbildung von GFP

Fluoreszente Proteine liegen oftmals nicht monomer vor, sondern bilden Komplexe. Dies kann insbesondere bei zu hohen Konzentrationen auftreten. In Abbildung ist für freies GFP die Fluoreszenz-Anisotropie gegen das Fluoreszenz-Signal aufgetragen. Die Anisotropie ist in diesem Zählratenbereich konstant und zeigt insbesondere mit höherem Signal keine kleineren Werte, die ein Indikator für Homo-FRET und damit Komplexbildung wären. Das bedeutet, GFP liegt im verwendeten Konzentrationsbereich monomer vor.



**Abbildung A.2.** Zählratenabhängigkeit der Fluoreszenz-Anisotropie von freiem GFP exprimiert in *N. benthamiana* (n=10).

### A.0.3. Zusätzliche Parameter bei der Kurvenanpassung von Fluoreszenz-Abklingkurven

In der Praxis enthält der Prozess der Kurvenanpassung der Fluoreszenz-Abklingkurven mehr Parameter als nur die freien Parameter der verwendeten Modellfunktion. Es werden die Zeitbereiche festgelegt, die zur Kurvenanpassung und zur Entfaltung verwendet werden. Die Gerätefunktion wird so verschoben, dass ihr Startpunkt mit dem der Fluoreszenzkurve zusammenfällt. Eventuelle zeitliche Verschiebungen zwischen dem senkrechten und parallelen Kanal werden ebenfalls durch eine relative zeitliche Verschiebung eliminiert. Diese sogenannten "shifts" sind in der Praxis Fitparameter und werden zur Minimierung des reduzierten  $\chi^2$  variiert. Es kommt vor, dass die Minimierung von  $\chi^2$  shifts liefert, die offensichtlich falsch sind, da sie keine Überlagerung der Gerätefunktion und Fluoreszenzkurven liefern. In diesen Fällen werden solche shifts ausgewählt, die sinnvoll sind und ein möglichst kleines  $\chi^2$  liefern.

#### Genauigkeit der Fluoreszenz-Lebensdauer der FRET-Komponenten

In Kapitel 4.3.5 wurde die Fluoreszenz-Lebensdauer der FRET-Spezies mit der Modellfunktion Gl. 3.3.3.3 bestimmt. Zur Abschätzung der Genauigkeit dieser Bestimmung wurde die Fluoreszenz-Lebensdauer der FRET-Spezies variiert, festgehalten und das zugehörige reduzierte  $\chi^2$  bestimmt. Das Ergebnis ist für das Beispiel einer Kurvenanpassung einer FRET-Probe (ACR4-GFP + CLV1-mCherry) in Abbildung A.3 dargestellt. Während sich die Fluoreszenz-Lebensdauer um  $\pm 10\%$  variiert wird, ändert sich  $\chi^2$  nur unwesentlich. Hier ist insbesondere anzumerken, dass bereits eine Änderung der shifts, wie oben beschrieben, größere Unterschiede in  $\chi^2$  liefert.

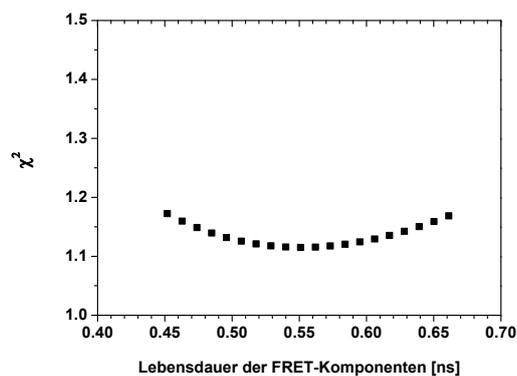
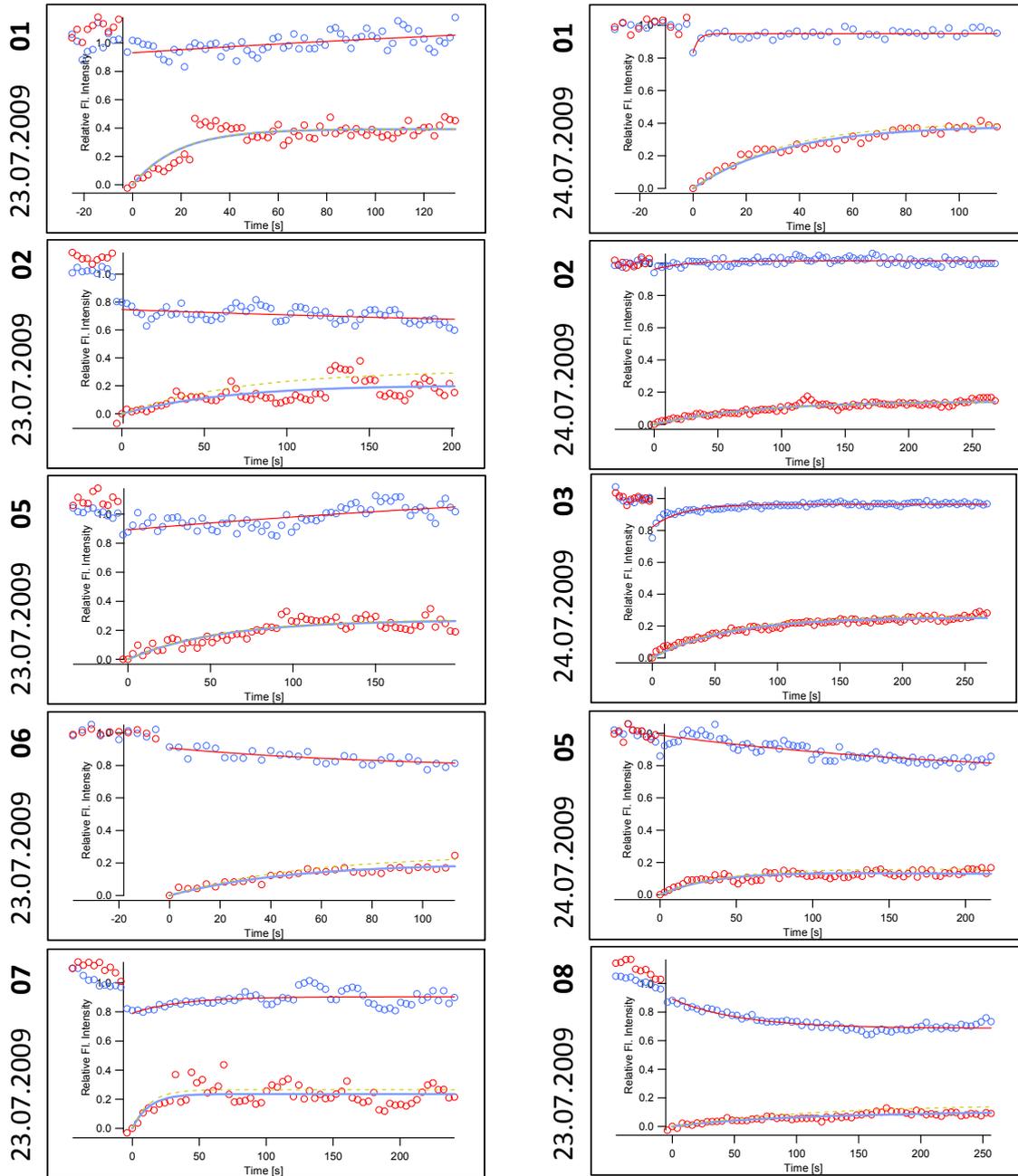


Abbildung A.3. Reduziertes  $\chi^2$  in Abhängigkeit der FRET-Lebensdauer.

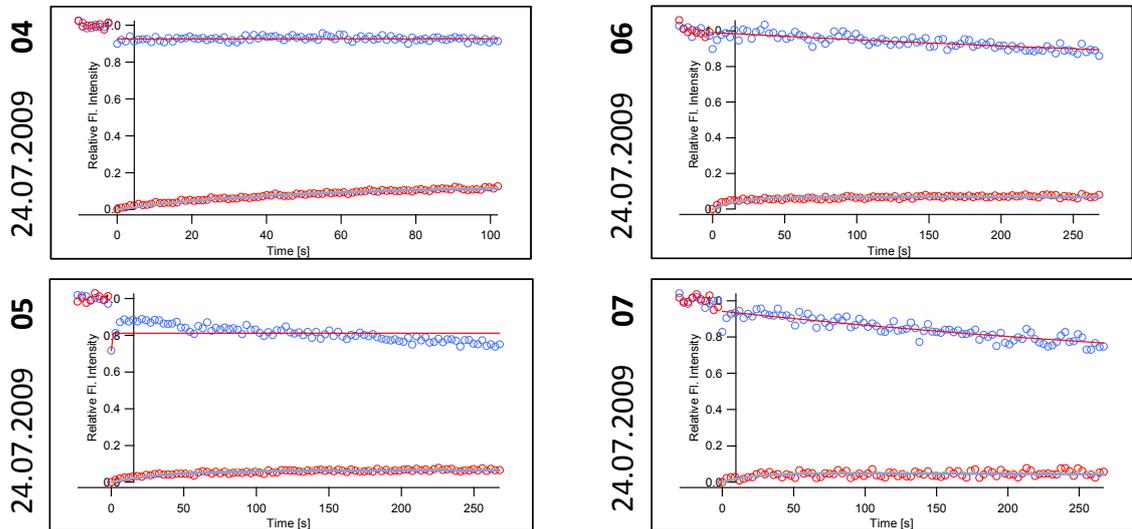
## A.0.4. FRAP

### FRAP an ACR4-GFP ohne Peptid

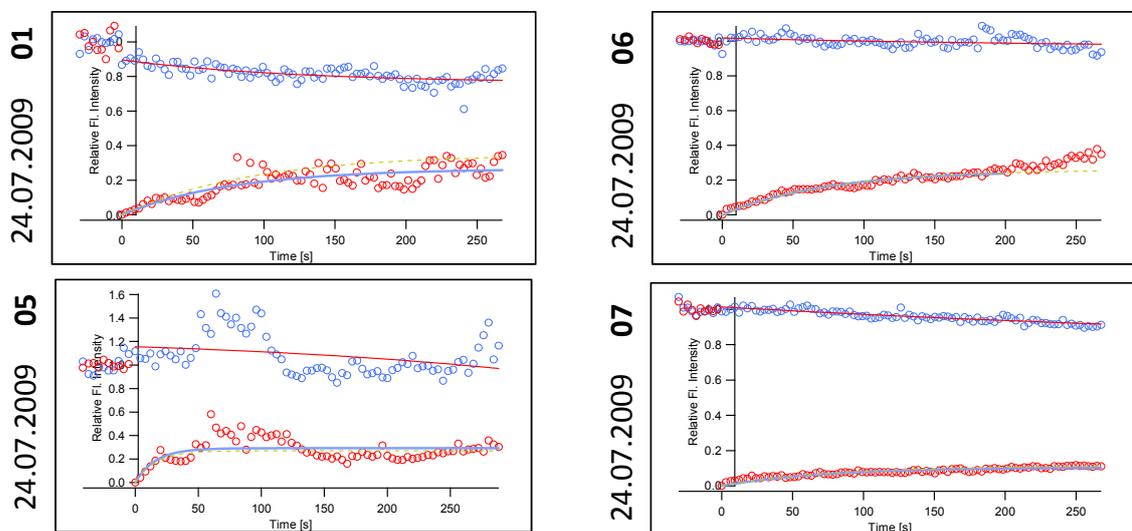


**Abbildung A.4. FRAP-Kurven von ACR4-GFP.** Normierter Intensitätsverlauf im FRAP-ROI (rote Kreise) und im Kontroll-ROI (blaue Kreise). Kurvenanpassung der Fluoreszenzerholung mit mono-exponentieller Modellfunktion (blaue Linie) unter Berücksichtigung von *aquisition bleaching* (rote Linie) (vgl. Material und Methoden 3.5).

**FRAP an ACR4-GFP mit 100 nM CLE40**



**FRAP an ACR4-GFP mit 100 nM TDIF**

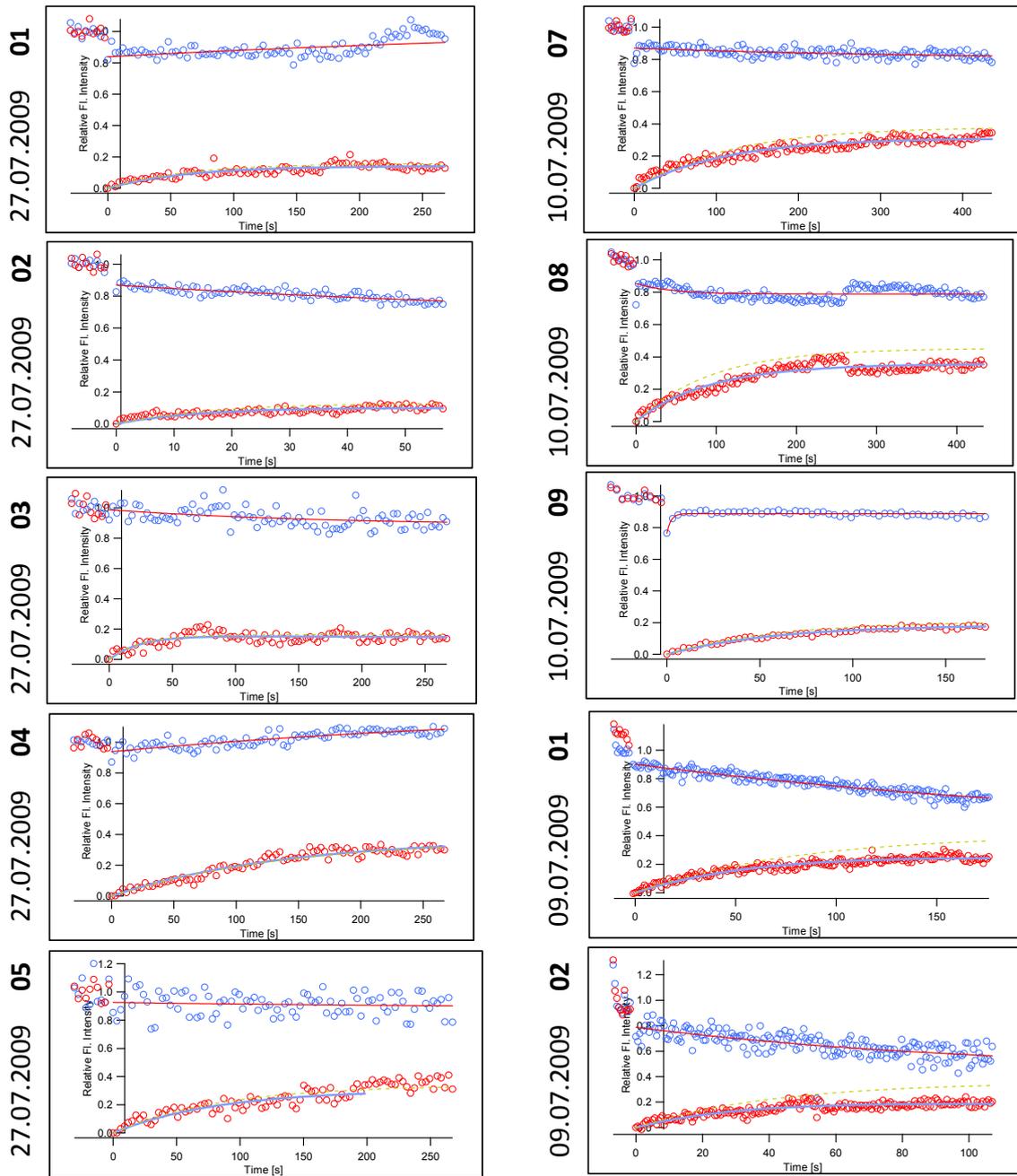


**Abbildung A.5. FRAP-Kurven von ACR4-GFP.** Normierter Intensitätsverlauf im FRAP-ROI (rote Kreise) und im Kontroll-ROI (blaue Kreise). Kurvenanpassung der Fluoreszenzerholung mit mono-exponentieller Modellfunktion (blaue Linie) unter Berücksichtigung von *aquisition bleaching* (rote Linie) (vgl. Material und Methoden 3.5).

<b>ACR-GFP</b>	<b>Datum</b>	<b>Dateiname</b>	<b><math>\tau_{1/2}</math> [s]</b>	<b>mobile Fraktion</b>	<b><math>\chi^2</math></b>	
<b>ohne Peptid</b>	23.7.2009	01	9.7	0.418	1.9	
		02	65.6	0.336	4.2	
		05	30.8	0.253	1.2	
		06	55.7	0.287	16.5	
		07	7.2	0.272	2.7	
	24.7.2009	08	68.0	0.167	0.2	
		01	26.5	0.390	15.9	
		02	72.3	0.139	32.9	
		03	50.6	0.238	26.4	
			05	48.5	0.149	32.7
	<b>Mittelwert</b>			<b>43.48</b>	<b>0.26</b>	
	Stabw.			23.69	0.10	
	<b>100nM CLE40</b>	24.7.2009	04+100nMCLE40	45.9	0.146	10.9
05+100nMCLE40			61.1	0.074	4.4	
06+100nMCLE40			52.3	0.053	6.4	
07+100nMCLE40			90.7	0.050	23.3	
<b>Mittelwert</b>				<b>62.49</b>	<b>0.08</b>	
Stabw.			19.79	0.04		
<b>100 nM TDIF</b>	24.7.2009	01 + 100nM TDIF	65.3	0.360	67.1	
		05 + 100nM TDIF	13.7	0.273	29.7	
		06 + 100nM TDIF	63.0	0.256	30.4	
		07 + 100nM TDIF	182.3	0.152	22.9	
	<b>Mittelwert</b>			<b>81.06</b>	<b>0.26</b>	
Stabw.			71.55	0.09		

Abbildung A.6. Ergebnisse der FRAP-Kurvenanpassungen von ACR4-GFP.

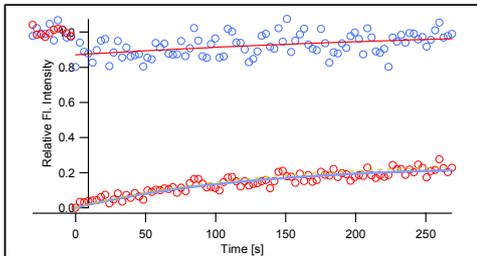
**FRAP an CLV1-GFP ohne Peptid**



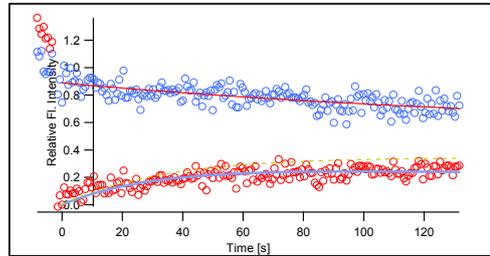
**Abbildung A.7. FRAP-Kurven von CLV1-GFP** Normierter Intensitätsverlauf im FRAP-ROI (rote Kreise) und im Kontroll-ROI (blaue Kreise). Kurvenanpassung der Fluoreszenzerholung mit mono-exponentieller Modellfunktion (blaue Linie) unter Berücksichtigung von *aquisition bleaching* (rote Linie) (vgl. Material und Methoden 3.5).

**FRAP an CLV1-GFP ohne Peptid**

27.07.2009 06

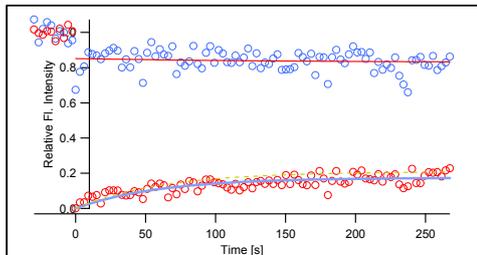


09.07.2009 03

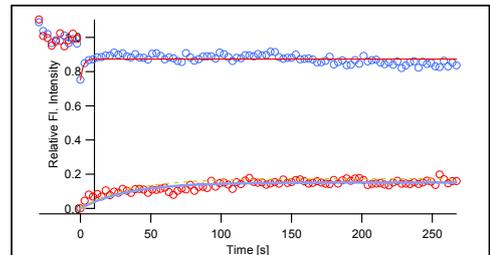


**FRAP an CLV1-GFP mit 100 nM TDIF**

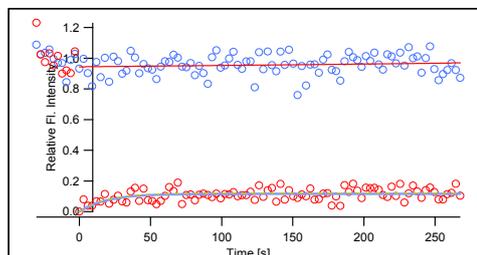
27.07.2009 01



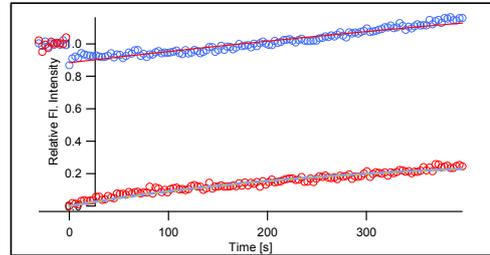
27.07.2009 03



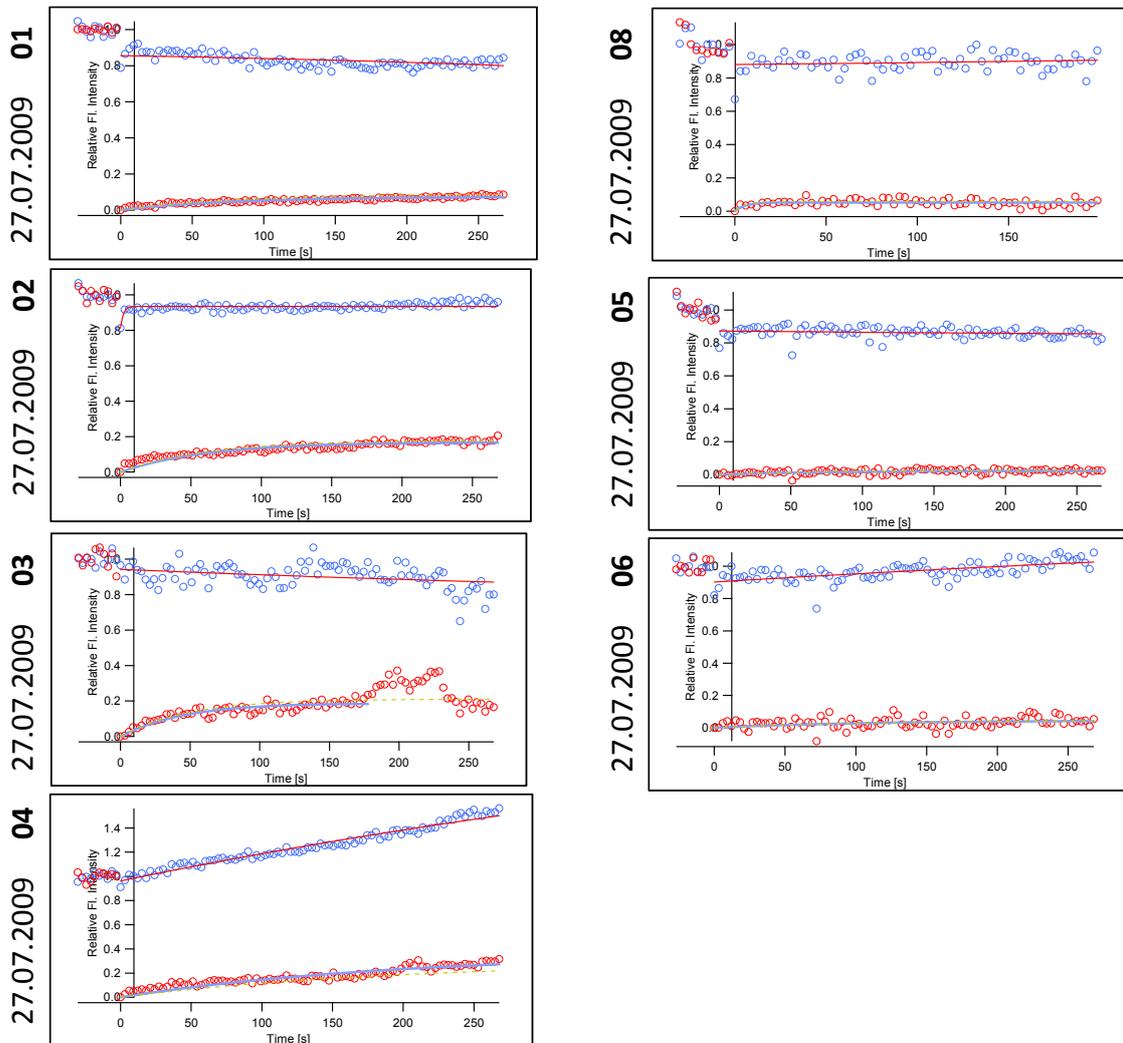
27.07.2009 02



10.07.2009 10



**Abbildung A.8. FRAP-Kurven von CLV1-GFP** Normierter Intensitätsverlauf im FRAP-ROI (rote Kreise) und im Kontroll-ROI (blaue Kreise). Kurvenanpassung der Fluoreszenzerholung mit mono-exponentieller Modellfunktion (blaue Linie) unter Berücksichtigung von *aquisition bleaching* (rote Linie) (vgl. Material und Methoden 3.5).

**FRAP an CLV1-GFP mit 100 nM CLV3**

**Abbildung A.9. FRAP-Kurven von CLV1-GFP** Normierter Intensitätsverlauf im FRAP-ROI (rote Kreise) und im Kontroll-ROI (blaue Kreise). Kurvenanpassung der Fluoreszenzerholung mit mono-exponentieller Modellfunktion (blaue Linie) unter Berücksichtigung von *acquisition bleaching* (rote Linie) (vgl. Material und Methoden 3.5).

CLV1-GFP	Datum	Dateiname	$\tau_{1/2}$ [s]	mobile Fraktion	$\chi^2$	
ohne Peptid	27.7.2009	01	39.0	0.140	32.3	
		02	86.8	0.286	19.7	
		03	18.1	0.160	13.2	
		04	74.0	0.329	28.4	
		05	84.0	0.362	12.5	
	10.7.2009	06	99.8	0.245	23.5	
		07	117.9	0.376	116.6	
		08	59.4	0.451	461.2	
	9.7.2009	09	49.9	0.213	14.6	
		01	82.1	0.475	0.9	
		02	35.1	0.361	170.7	
		03	43.5	0.299	54.3	
			04	96.2	0.354	66.7
	<b>Mittelwert</b>			<b>68.1</b>	<b>0.31</b>	
	Stabw.			29.7	0.10	
100nM CLV3	27.7.2009	01 40min	141.1	0.100	8.3	
		02 40min	81.3	0.156	22.2	
		03 70min	32.6	0.190	7.9	
		04 15min	165.0	0.215	16.2	
		05 90min	92.8	0.031	10.9	
		06 90min *	343.5	0.050	49.6	
		08 90min *	3.8	0.060	4.7	
		<b>Mittelwert</b>		<b>122.9</b>	<b>0.11</b>	
	Stabw.		112.4	0.07		
	<b>Mittelwert ohne *</b>		<b>102.6</b>	<b>0.14</b>		
Stabw. ohne *		52.1	0.07			
100 nM TDIF	10.7.2009	10	181.9	0.234	29.8	
		13	60.6	0.386	20.5	
	27.7.2009	01 90min	103.5	0.217	23.0	
		02 90min	21.1	0.088	17.5	
		03 90 min	48.3	0.140	25.2	
	<b>Mittelwert</b>		<b>57.6</b>	<b>0.15</b>		
	Stabw.		42.0	0.06		

Abbildung A.10. Ergebnisse der FRAP-Kurvenanpassungen von CLV1-GFP.

## A.0.5. FCS

ACR4-GFP	b0	N	td1 [ $\mu$ s]	td2 [ms]	frac td1	chi <sup>2</sup>	S [kHz]	kcpm
file 07	1.0025	23.2	277	3.0	0.80	1.2885	31.7	1.4
file 08	1.0048	95.9	58	1.9	0.78	1.4024	98.3	1.0
file 09	1.0490	31.4	405	78.8	0.75	1.8198	93.2	3.0
file 10	1.0029	50.5	109	7.5	0.85	2.0457	53.2	1.1
file 16	1.0022	13.8	178	5.7	0.81	1.6997	106.0	7.7
file 18	1.0026	15.2	58		1.00	4.2972	61.5	4.0
file 19	1.0512	5.6	223	35.1	0.51	1.1070	35.1	6.3
file 21	0.9965	9.6	181	38.7	0.38	10.1941	83.3	8.7
<b>Mittelwert</b>		<b>31</b>	<b>186</b>	<b>24</b>	<b>0.74</b>			<b>4.1</b>
<b>Stabw.</b>		30	117	29	0.20			3.1

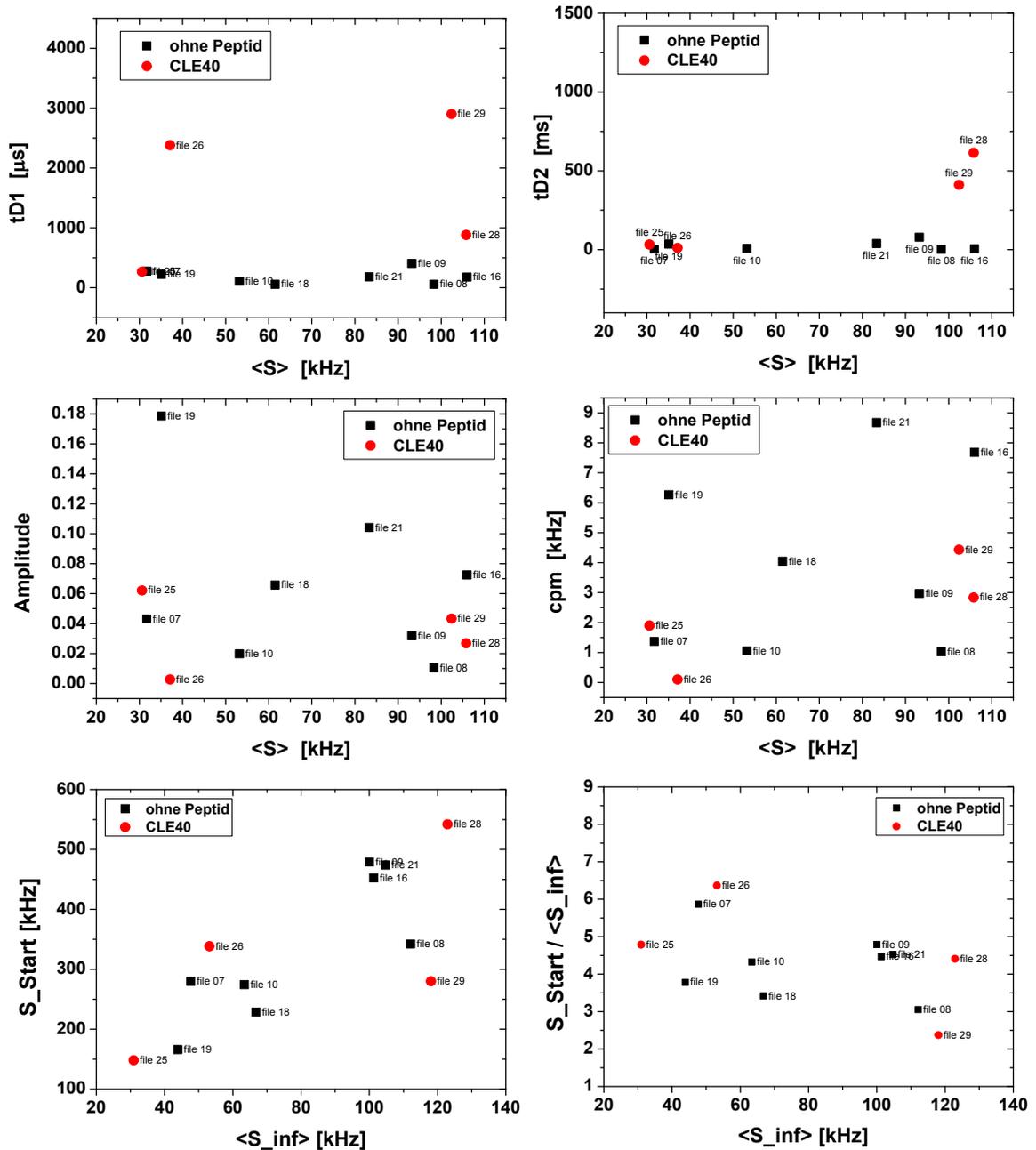
ACR4-GFP + CLE40	b0	N	td1 [ $\mu$ s]	td2 [ms]	frac td1	chi <sup>2</sup>	S [kHz]	kcpm
file 25	1.0367	16.1	267	32.1	0.63	0.9643	30.6	1.9
file 26	1.0195	368	2380	11.1	0.85	1.2542	37.1	0.1
file 28	1.0070	37.3	882	614.6	0.33	0.2969	105.8	2.8
file 29	1.0108	23.1	2902	410.8	0.27	0.3047	102.4	4.4
<b>Mittelwert</b>		<b>111</b>	<b>1608</b>	<b>267</b>	<b>0.52</b>			<b>2.3</b>
<b>Stabw.</b>		171	1238	296	0.27			1.8

CLV1-GFP	b0	N	td1 [ $\mu$ s]	td2 [ms]	frac td1	chi <sup>2</sup>	S [kHz]	kcpm
file 01	1.0042	7.8	107	2.5	0.65	2.5311	25.3	3.2
file 07	1.0168	94.3	210	25.5	0.86	1.2716	29.4	0.3
file 08	1.0177	19.4	307	49.7	0.72	1.6884	45.8	2.4
file 10	1.0009	9.3	169	39.1	0.74	2.5147	77.1	8.3
file 11	1.0009	12.7	244	11.4	0.84	3.4378	43.8	3.4
file 12	1.0023	17.8	84	1.3	0.63	1.1438	37.5	2.1
file 13	1.0041	16.4	189	3.6	0.86	1.3557	48.3	2.9
file 16	1.0259	16.9	281	54.5	0.53	0.5625	49.9	3.0
file 18	0.9991	13.4	468	187.9	0.69	2.5869	42.8	3.2
file 19	1.0066	27.7	301	23.1	0.66	2.6709	78.9	2.8
<b>Mittelwert</b>		<b>24</b>	<b>236</b>	<b>40</b>	<b>0.72</b>			<b>3.2</b>
<b>Stabw.</b>		25	112	56	0.11			2.0

CLV1-GFP + CLV3	b0	N	td1 [ $\mu$ s]	td2 [ms]	frac td1	chi <sup>2</sup>	S [kHz]	kcpm
file 24	1.0197	6.4	483	711.1	0.36	0.0903	49.8	7.8
file 25	1.0047	18.9	180	8.9	0.87	2.0327	21.2	1.1
file 28	1.0189	77	793	197.1	0.66	2.5648	37.7	0.5
file 29	0.9960	24.8	596	3800.0	0.69	1.8443	20.8	0.8
<b>Mittelwert</b>		<b>32</b>	<b>513</b>	<b>1179</b>	<b>0.65</b>			<b>2.6</b>
<b>Stabw.</b>		31	256	1772	0.21			3.5

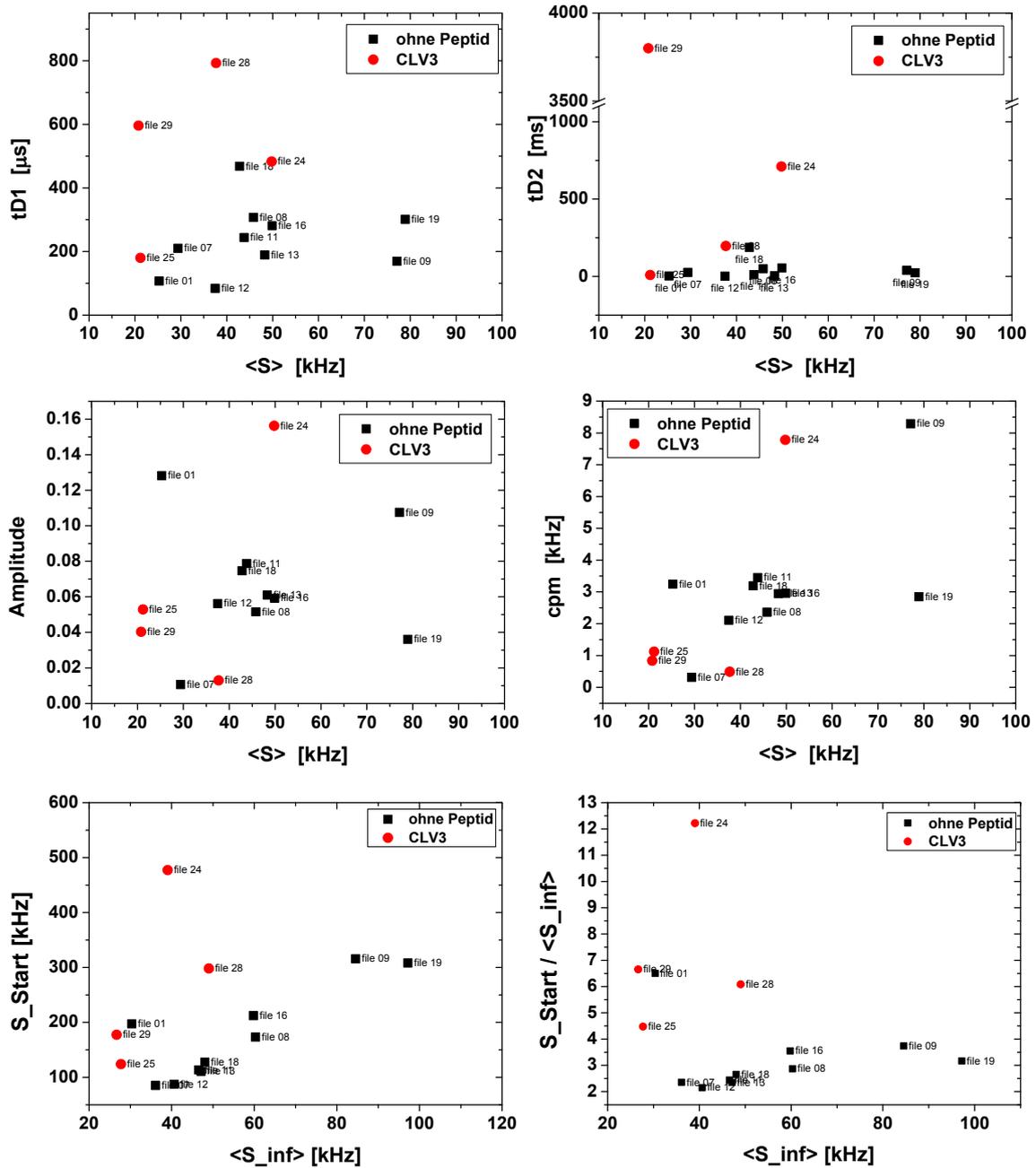
Abbildung A.11. Ergebnisse der FCS-Kurvenanpassungen von ACR4-GFP und CLV1-GFP mit einer Modellfunktion mit zwei Diffusionstermen (Glg. 3.28).

## FCS an ACR4-GFP



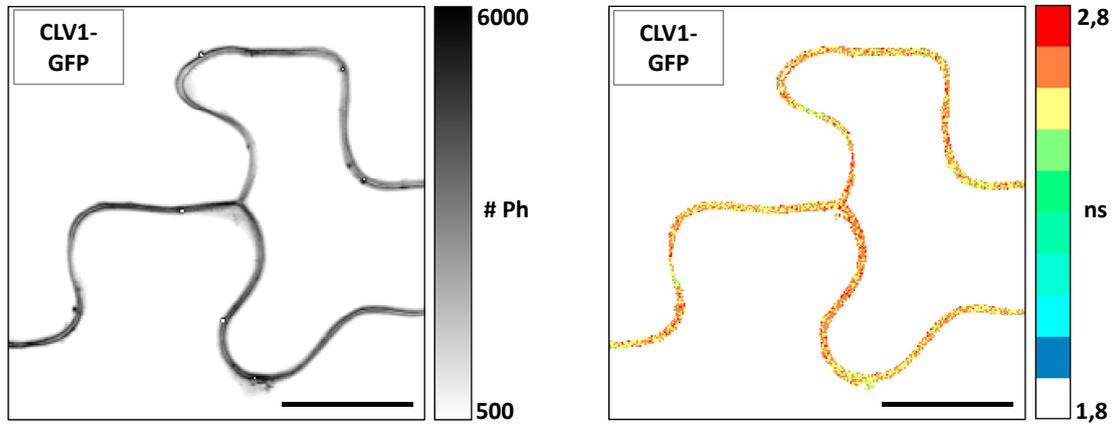
**Abbildung A.12.** Diagramme der Parameter der FCS Auswertung ACR4-GFP mit  $\langle S \rangle$  mittlere Zählrate der Intensitätsspur,  $S_{Start}$  Startwert der Bleichkurve,  $\langle S_{inf} \rangle$  mittlere Zählrate der Bleichkurve nach 15 bis 20 s,  $tD1$  und  $tD2$  Diffusionszeiten, Amplitude der Korrelationskurve, cpm mittlere Zählrate pro Molekül.

## FCS an CLV1-GFP



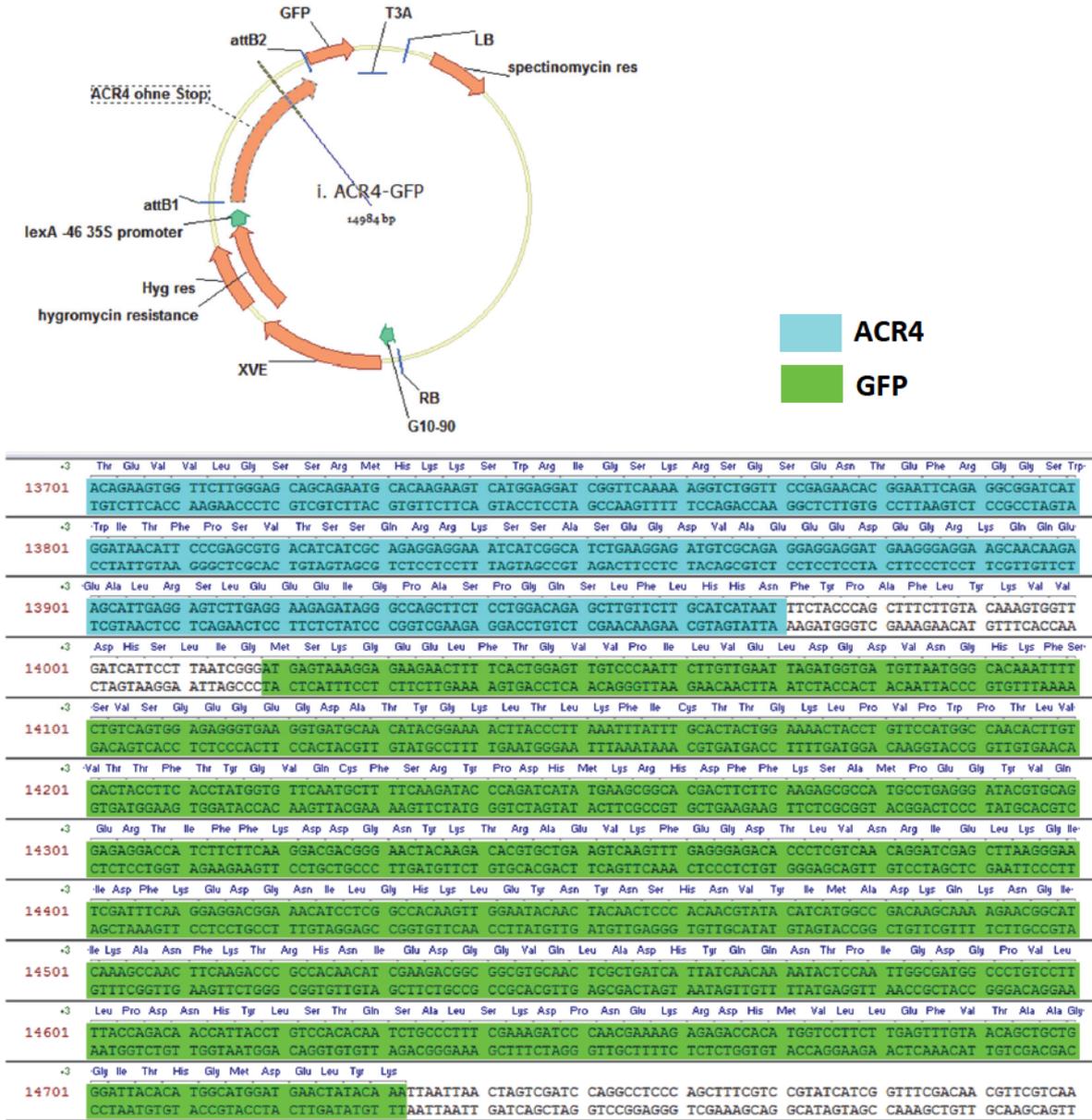
**Abbildung A.13.** Diagramme der Parameter der FCS Auswertung CLV1-GFP mit  $\langle S \rangle$  mittlere Zählrate der Intensitätsspur,  $S_{Start}$  Startwert der Bleichkurve,  $\langle S_{inf} \rangle$  mittlere Zählrate der Bleichkurve nach 15 bis 20 s, tD1 und tD2 Diffusionszeiten, Amplitude der Korrelationskurve, cpm mittlere Zählrate pro Molekül.

### A.0.6. Zum Orientierungseffekt bei Anisotropiemessungen

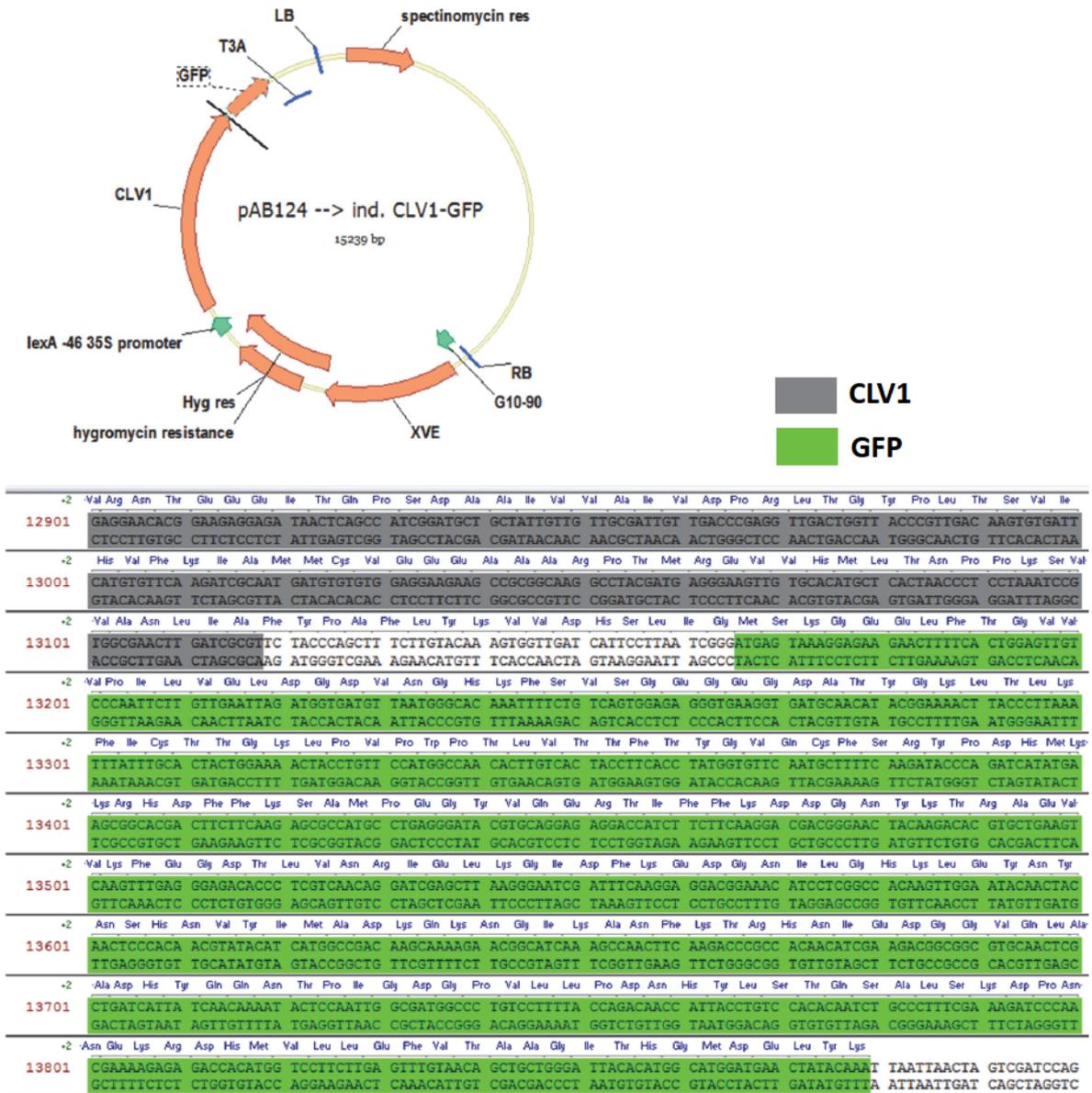


**Abbildung A.14.** Zugehöriges Fluoreszenz-Intensitätsbild (links) und Fluoreszenz-Lebensdauerbild (rechts) zum Fluoreszenz-Anisotropiebild (Abb. 4.38) in Kapitel 4.4.2 von CLV1-GFP expremiert in *N. benthamiana*. Der Skalierungsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

### A.0.7. Plasmidkarten



**Abbildung A.15. Plasmidkarte des verwendeten Estradiol-induzierbaren ACR4-GFPs.** Der untere Abschnitt zeigt die Sequenz für das Ende der Kinasedomäne von ACR4 (türkis) und für GFP (grün). Der nicht markierte Abschnitt entspricht dem Linker zwischen ACR4 und GFP aus 16 Aminosäuren.



**Abbildung A.16. Plasmidkarte des verwendeten Estradiol-induzierbaren CLV1-GFPs.** Der untere Abschnitt zeigt die Sequenz für das Ende der Kinasedomäne von CLV1 (grau) und für GFP (grün). Der nicht markierte Abschnitt entspricht dem Linker zwischen ACR4 und GFP aus 16 Aminosäuren.

# Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Promotion mit dem Thema

“Multiparameter-Fluoreszenz-Image-Spektroskopie von Proteinkomplexen *in planta*“

am Institut für Physikalische Chemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. Claus A. M. Seidel eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

Es existieren keine vorherigen Promotionsversuche.

Düsseldorf, den

# Danksagung

Es ist vollbracht! Meine Doktorarbeit ist tatsächlich fertig. Ohne die Hilfe und Unterstützung von vielen lieben Menschen, die mich in der Zeit meiner Promotion begleitet haben, hätte ich das wohl nicht geschafft. Ich möchte mich bedanken bei

Prof. Dr. Claus Seidel für die Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit in seinem Institut immer mit der neuesten und besten Technik arbeiten zu können.

Prof. Dr. Stefan Egelhaaf für die Begutachtung dieser Arbeit und für die freundliche Betreuung innerhalb des Graduiertenkollegs BioSoft.

dem Graduiertenkolleg BioSoft der International Helmholtz Research School für die finanzielle Unterstützung und die exzellente interdisziplinäre Ausbildung.

Prof. Dr. Rüdiger Simon für die gute Zusammenarbeit und breite Unterstützung, die meine Arbeit in Kooperation mit dem Institut für Genetik ermöglichen haben.

Ralf Kühnemuth für die Betreuung dieser Arbeit, seine geduldigen Erklärungen und kritischen Anmerkungen, für seine allzeit verfügbare Hilfe im Labor und Geduld mit Fehlschlägen (Äh, da war noch eine Schraube?! ...oh..."), die morgendlichen Jogging-Runden und gesellschaftlichen Abendrunden.

Yvonne Stahl für die tolle Zusammenarbeit, bei der ich sehr viel gelernt habe und mir viel abgucken konnte, und dafür, dass die endlosen Stunden im dunklen Labor ("Ich bin auf gooooo...") bevölkert waren mit dem Spaghetti-Monster, dem Anhalter und anderen unterhaltsamen Dingen, und für ihre Freundschaft.

Stefanie Weidtkamp-Peters dafür, dass sie mir die Tür zur wunderbaren Welt des Imaging geöffnet hat, mir immer hilfreich zur Seite stand und ein offenes Ohr hatte.

Suren Felekyan für grandiose Software und für seine geduldige Hilfe bei Auswerteproblemen.

Qijun und Peter für geteiltes Leid mit untitled, wirren Parametern und unkooperativen Mikroskopen.

Stefan und Markus für die Zusammenarbeit am PAINT-Projekt.

dem Kaffeekränzchen der obskuren Thesen und gewagten Theorien (Denis, Peter, Ralf und Thomas) für mittägliche Ablenkung.

der "alten Garde" Leoni, Daniela, Denis, Andreas, Heike und Stefan für eine schöne Zeit.

Marc Somssich für ein immer offenes Ohr und viele Magnums in der Sonne und auch im Regen.

den Genetikern Marc, Rene, Helge und Marcel für Asyl und Aufmunterung und jede Menge Spaß.

Ralf Kühnemuth, Erdmute Rehwald, Wiebke Werft, Leoni Rusch, Visnja Jakopec und Peter Zentis für das fleißige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Christian und Wiebke für LateX-Hokuspopus.

meinen Freunden und meiner Familie dafür, dass sie an mich geglaubt haben.

für die vielen helfenden Hände bei der Betreuung von Rosalie, wenn es mal wieder eng wurde.

ganz besonders meiner Mama, die sich um alles kümmert, immer da ist und immer einspringt und die beste Lieblings-Omi der Welt ist.

meinem Timo dafür, dass es ihn gibt und dafür, dass er mich nie gefragt hat, warum ich eigentlich meine Zeit in dunklen Räumen mit kleinen grünen Dingerkes verbringen muss, sondern mich einfach die Forscher-Else sein lässt.

am meisten meinem Sonnenschein Rosalie dafür, dass sie mich jeden Tag daran erinnert, was wichtig ist.