

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
(Prof. Dr. S O. Rizzoli)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Multiplexe optische und Rasterkraftmikroskopie für biomedizinische Bildgebung

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Lucas Mittelmeier

aus

Lübeck

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H.K. Kroemer

Betreuungsausschuss

Betreuer/in Prof. Dr. S O. Rizzoli

Ko-Betreuer/in: PD Dr. S. Thoms

Prüfungskommission

Referent/in

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Multiplexe optische und Rasterkraftmikroskopie für biomedizinische Bildgebung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1 Einleitung	5
1.1 Proteomics.....	5
1.2 Multiplexe Immunoassays.....	5
1.2.1 Herkömmliche Verfahren – eine Übersicht.....	6
1.2.2 Limitationen multiplexer Immunoassays.....	7
1.3 Nanobodys	9
1.3.1 Entdeckung und Struktur.....	9
1.3.2 Eigenschaften und Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern	11
1.3.3 Aktuelle Anwendungsbereiche.....	12
1.4 Rasterkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i> , AFM)	13
1.4.1 Technische Grundlagen.....	13
1.4.2 Darstellung von Protein-Protein-Bindungen am AFM.....	15
1.5 Mechanismus und Anwendungen von 2A-Sequenzen.....	16
1.6 Zielstellung	17
1.6.1 Die Idee: Kombinatorische Proteinerkennung, Epitop-Marker und Nanobodys.....	17
1.6.2 Ziele dieser Arbeit	18
2 Materialien und Methoden	20
2.1 Bildgebung mit dem <i>Atomic Force Microscope</i> (AFM).....	20
2.2 Zellkultur und Teilen der Zellen.....	21
2.3 Aussäen und Transfektion	22
2.3.1 Zweifachtransfektion	24
2.3.2 Multitransfektion und Co-Seeding.....	25
2.3.2.1 Prinzip des Co-Seedings.....	26
2.3.3 Zweifachtransfektion mit Co-Seeding	26
2.3.4 Co-Seeding mit variabler Zelldichte.....	27
2.3.5 Transfektion der P2A-Plasmide.....	27
2.4 Fusion <i>on plate</i>	27
2.5 Fusion <i>free floating</i>	30
2.6 Fixierung und Immunfärbung durch Nanobodys.....	32
2.6.1 Fixierung.....	32
2.6.2 Sequentielle Immunfärbung.....	32

2.6.3	Simultane Immunfärbung	34
2.7	Konfokale Bildgebung.....	34
2.7.1	Bildgebung für Fusion und Co-Seeding	36
2.7.2	Bildgebung der Einzeltransfektion	36
2.7.3	Bildgebung der Zweifachtransfektion und P2A-Transfektion.....	37
2.7.4	Bildgebung des Co-Seedings mit optimierter Zelldichte.....	37
2.8	Design der P2A-Plasmide	37
2.9	Transformation der Plasmide	38
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Fluorophor-unabhängige Bildgebung am AFM.....	41
3.1.1	Optimierung der Einstellungen am AFM.....	42
3.1.2	Kontrollexperimente mit Biotin-Oberflächen.....	45
3.2	Erhöhung der Proteinzahl bei multiplexer Bildgebung.....	47
3.2.1	P2A-Plasmide.....	47
3.2.1.1	Zielgerichtete Paarung der Proteinkonstrukte	47
3.2.1.2	Design der P2A-Plasmide	50
3.2.1.3	Transfektion mit P2A-Plasmiden	51
3.2.2	Fusion multitransfizierter Zellen.....	53
3.2.3	Co-Seeding.....	55
3.2.3.1	Co-Seeding transfizierter Zellen.....	55
3.2.3.2	Co-Seeding mit optimierter Proteinkombination.....	57
3.2.3.3	Co-Seeding mit optimierter Zelldichte.....	59
3.2.4	Pixel-basierte automatische Bildanalyse.....	63
4	Diskussion.....	69
5	Abstract	74
6	Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Struktur eines IgG-Antikörpers und eines HCAb.....	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines modernen AFM.....	14
Abbildung 3: Design der Fusion <i>on plate</i>	29
Abbildung 4: Design der Fusion <i>free floating</i>	31
Abbildung 5: <i>laser alignment</i> eines TAP190AI-G.....	42
Abbildung 6: Bestimmung der Resonanzfrequenz und Federkonstante eines TAP190AI-G.....	43
Abbildung 7: Nullmessung mit einem TAP190AI-G.....	44
Abbildung 8: Messung einer Biotin-Oberfläche mit nicht-funktionalisierten AFM-Tips.....	46
Abbildung 9: Expression der Proteinkonstrukte in einzeln transfizierten Zellen.....	48
Abbildung 10: Paarung der Proteinkonstrukte als Grundlage für ein P2A-Design.....	49
Abbildung 11: Aufbau der Plasmide und Proteinsequenzen am Beispiel <i>TOM70_P2A_Endobrevin</i>	51
Abbildung 12: Anwendung der P2A-Plasmide.....	52
Abbildung 13: Fusion transfizierter Zellen <i>on plate</i> und <i>free floating</i>	54
Abbildung 14: Co-Seeding mehrfach transfizierter Zellen.....	56
Abbildung 15: Co-Seeding zweifach transfizierter Zellen.....	58
Abbildung 16: Vergleich des Effektes von Zelldichte und Zeitpunkt der Transfektion auf das Co- Seeding.....	60
Abbildung 17: Co-Seeding zweifach transfizierter Zellen mit optimierter Dichte.....	62
Abbildung 18: Bildanalyse durch probabilistische Klassifizierung.....	65
Abbildung 19: Bildanalyse durch Cross-Correlation - Einfaches und erweitertes Template.....	66
Abbildung 20: Bildanalyse durch Cross-Correlation - Template aus transfizierten Zellen.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Herstellerangaben, TAP190AI-G.....	20
Tabelle 2: Kodierungssequenzen der Plasmide.....	23
Tabelle 3: Kombination der Plasmide für die Zweifachtransfektion.....	25
Tabelle 4: Plasmidkombinationen für die Multitransfektion.....	26
Tabelle 5: Plasmidkombinationen für die Multitransfektion und Fusion.....	28
Tabelle 6: Nanobodys bei sequentieller Färbung.....	33
Tabelle 7: Nanobodys bei simultaner Färbung.....	34
Tabelle 8: Ausstattung des LSM 510 META, Firma Zeiss.....	35
Tabelle 9: Ausstattung des LSM 510 - ConfoCor 2, Firma Zeiss.....	35
Tabelle 10: Farbkodierung und Templates für die Bildanalyse.....	64

Abkürzungsverzeichnis

AFM	<i>atomic force microscope</i> , Atomkraft-/Rasterkraftmikroskop, auch: <i>Atomic Force Microscopy</i> , Atomkraft-/Rasterkraftmikroskopie
BSA	bovines Serumalbumin
CDR	<i>complementary determining region</i>
CH1	erste konstante Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
E-Cup	Eppendorf-Gefäß
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
fPALM	<i>fluorescent photoactivated localisation microscopy</i>
FR	<i>framework regions</i>
HCAb	<i>heavy chain only antibody</i>
HPP	Human Proteome Project
HUPO	Human Proteome Organization
HVJ-E	<i>hemagglutinating virus of japan /Sendai virus - envelope</i>
K _d	Dissoziationskonstante
NT	nicht transfiziert
LSM	<i>Laser Scanning Microscope</i>
PALM	<i>photoactivated localisation microscopy</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
STM	<i>scanning tunneling microscope</i> (Rastertunnelmikroskop)
STORM	<i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>
VHH	Variable Region der schweren Kette eines Einzeldomänenantikörpers

1 Einleitung

1.1 Proteomics

Entscheidende Erkenntnisse zum Verständnis des Organismus auf molekularer Ebene lieferte der erfolgreiche Abschluss des Human Genome Projects, welches das gesamte menschliche Genom identifizierte. Obwohl dieses Genom als Grundlage der Protein-Expression in allen ca. 230 Zelltypen des menschlichen Körpers gilt, ist die Untersuchung der Proteine selbst nicht minder bedeutend (Legrain et al. 2011; Lee et al. 2013). Sie sind durch alternatives Spleißen, DNA-Rekombination und post-translationale Modifikation einer Variation unterworfen, die allein die DNA nicht abbilden kann, funktionell und klinisch aber ausschlaggebend ist (Moxon et al. 2009).

Der Erforschung des Proteoms widmen sich daher breit angelegte Initiativen wie das Human Proteome Project (HPP). Das HPP verschreibt sich der „Identifizierung, Lokalisation und funktionellen Analyse der Protein-Ausstattung der Zelle“ (Human Proteome Organization (HUPO) 2017), auch *proteomics* genannt. Trotz großer Fortschritte waren selbst 2017 noch 2.186 der 19.656 vermuteten menschlichen Proteine, also etwa 11%, noch nicht erfolgreich nachgewiesen worden (HUPO 2017). Zum Nachweis dieser Proteine stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung.

Übliche Methoden sind die Massenspektrometrie oder der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Diese Verfahren können allerdings nur wenige Zielproteine pro Durchlauf identifizieren und sind daher bei der Analyse von Proben kleinerer Volumina und zahlreicher Zielproteine eher ungeeignet (Elshal und McCoy 2006). Hier kommen multiplexe Alternativen wie *planar microarrays* (auch *microchips*) oder *bead-based microarrays* in Frage. Um noch leistungsfähigere Verfahren zu erschließen, befindet sich die Entwicklung immer effizienterer und genauerer multiplexer Methoden in ständigem Fortschritt. Die folgenden Kapitel werden zwei vielversprechende Felder näher beleuchten: Die multiplexen Immunoassays und das Rasterkraftmikroskop.

1.2 Multiplexe Immunoassays

Multiplexe Bildgebung nutzt vielfältige Verfahren wie elektrische, photometrische, mechanische und piezoelektrische Detektion. Immunoassays stellen nur einen Bruchteil der multiplexen

Methoden dar. Da sich diese Arbeit aber methodisch zum größten Teil in diesem Feld bewegt, scheint eine Auseinandersetzung besonders mit dieser Gruppe von Verfahren geboten.

Verfahren werden als „multiplex“ bezeichnet, wenn mehrere Analyten gleichzeitig detektierbar sind. Dem stehen die monoplexen (auch single- oder uniplex genannten) Verfahren gegenüber, die in vielfacher Form bereits einen festen Platz in Forschung und klinischer Anwendung gefunden haben. Ihr prominentester und am besten validierter Vertreter ist der klassische ELISA (Boja und Rodriguez 2011).

Da Proteine jedoch oft in Interaktion miteinander und ihrer komplexen Umgebung untersucht werden sollen, gerade unter klinischen Gesichtspunkten, kommt multiplexer Bildgebung eine zunehmende Bedeutung zu (Spindel und Sapsford 2014; Donzella und Crea 2011). Gerade multifaktoriell bedingte Krankheiten wie maligne Neoplasien, Graft-vs-Host-Disease und Autoimmunkrankheiten erfordern den Einsatz multiplexer Verfahren (Tighe et al. 2015).

1.2.1 Herkömmliche Verfahren – eine Übersicht

Das Feld multiplexer Verfahren ist unübersichtlich. Bereits der lang etablierte und ursprünglich monoplexe ELISA kann multiplexe Ergebnisse liefern, wenn er in einer 96-Well-Platte mit verschiedenen Liganden ausgeführt wird (Donzella und Crea 2011). Auch der *Lateral Flow Immunographic Assay* (LFIA) gilt als multiplexes Verfahren und ist bereits in klinischer Anwendung, so zum Beispiel als Schwangerschaftstest (Gordon und Michel 2012). Die Bandbreite multiplexer Methoden reicht also von handlichen Einmal-Teststreifen bis zu elaborierten Laborverfahren. Im Interesse dieser Arbeit soll der Fokus allerdings auf den komplexeren multiplexen Immunoassays liegen.

Im Grunde basieren alle multiplexen Immunoassays auf den Prinzipien herkömmlicher Immunoassays: Ein hochspezifischer Ligand dient zur Fixierung des Analyten auf einer Oberfläche, wenn dieser nicht bereits gebunden vorliegt. Zur Detektion der Analyten können anschließend weitere, mit einem Label versehene, Liganden eingesetzt werden. Während aber im ELISA ein an den Liganden gebundenes Enzym den messbaren Farbstoff generiert und das Signal amplifiziert, kommen bei diesen Verfahren stets direkt gelabelte Liganden zum Einsatz (Spindel und Sapsford 2014; Tighe et al. 2015).

Innerhalb der multiplexen Immunoassays unterscheidet man planare von suspensions-/mikrosphären-basierten Arrays (Ellington et al. 2010). Planare Arrays wiederum können in *forward* und *reverse* Arrays unterschieden werden. *Forward Arrays* nutzen einen immobilisierten Liganden, wie oben beschrieben, um den Analyten auf der Oberfläche zu

fixieren. *Reverse Arrays* pressen die Analyten auf eine Oberfläche und nutzen Liganden lediglich zur Erkennung der fixierten Analyten (Lee et al. 2013).

Planare Arrays arbeiten meist mit Fluorophoren als Label, aufgrund ihrer hohen Sensitivität und dynamischen Breite (Fan et al. 2009). Da die Liganden gezielt als *microspots* mit Durchmesser von unter 250 μm auf einer Oberfläche fixiert werden, kann die Identifizierung der Analyten anhand der x,y-Lokalisation auf dem Assay vorgenommen werden (Hartmann et al. 2009). Diese Form der planaren Assays wird dank ihrer minimalen Größe auch als *microchip* bezeichnet. Im Vergleich zu monoplexen Plattformen bieten planare Mikroarrays mittlerweile die Verwendung kleinster Volumina bei hohem Durchsatz (Li und Reichert 2003).

Dem entgegen stehen die mikrosphären-basierten Verfahren, besser bekannt als *bead-based microarrays*. Sie nutzen Liganden, die auf kleinen, in einem Medium frei beweglichen, Trägerstrukturen fixiert sind. Diese *beads* sind wiederum kodiert, allerdings nicht über eine feste Position. Ihre Erkennung erfolgt nach Bindung der Analyten über Eigenschaften wie Größe, Form oder Farbe (Ellington et al. 2010; Hartmann et al. 2009). Sie bieten unter anderem eine größere Oberfläche zur Immobilisation von Proteinen und die Möglichkeit der Kombination mit *fluorescence activated cell sorting* (FACS) (Jun et al. 2012). Von den verschiedenen Formen der *bead-based-arrays* sind *quantum-dots*-Verfahren herauszuheben, die bisher die höchsten Zahlen an simultan erkannten Analyten erbrachten. Als Alternative mit genauerer räumlicher Auflösung sind die lokalisierten fluoreszenz-kodierten *bead-based-arrays* zu nennen (Jun et al. 2012).

1.2.2 Limitationen multiplexer Immunoassays

Multiplexe Bildgebung, gerade im Feld der Immunoassays, bleibt trotz aller Fortschritte in der Zahl der simultan identifizierbaren Proteine limitiert (Jun et al. 2012). Probleme bereiten vor allem die Reproduzierbarkeit und die Standardisierung der Verfahren (Spindel und Sapsford 2014; Fu et al. 2010).

Die Einschränkungen ergeben sich im Einzelnen vor allem aus a) den Eigenschaften der Liganden, meist Antikörper und b) dem Einsatz von Fluorophoren bei Verfahren mit optischer Bildgebung.

Fluorophore sind leicht erhältlich und werden in vielfältigen chemisch modifizierten Formen hergestellt. Im Bereich der optischen Mikroskopie erfreut sich daher der Einsatz von Fluorophoren, gerade als Marker in Immunoassays, großer Beliebtheit (Sanderson et al. 2014). Ihre Nachteile treten bei multiplexer Anwendung allerdings schnell zutage, da Photostabilität, Helligkeit und Intensität der Hintergrundfärbung erheblich variieren. Viele Geräte liefern

zudem nur mit bestimmten Fluorophoren valide Messergebnisse, was die Multiplexizität eingrenzt (Spindel und Sapsford 2014). Eine weitere Grenze im simultanen Einsatz multipler Fluorophore ergibt sich, da eine zu starke Überlappung ihrer Emissionsspektren vermieden werden muss. Selbst beim Einsatz weniger Fluorophore erschwert die spektrale Überlappung bereits deren Unterscheidung (Dickinson et al. 2001; Sanderson et al. 2014). Zwar gibt es die Möglichkeit, durch den Einsatz von Lambda-Stacks per *linear unmixing* selbst eng überlappende Spektren zu differenzieren. Doch diese Methode bleibt zeitintensiver und erfordert Mikroskope mit spezieller Ausstattung (Sanderson et al. 2014). Manche Assays, z. B. die *planar microarrays* und *bead-based microarrays*, umgehen dieses Problem auf andere Weise, nämlich durch die zusätzliche räumliche, chemische, form- oder größenbasierte Separation der Analyten (Spindel und Sapsford 2014).

Jegliche Form der optischen Bildgebung bleibt außerdem durch physikalische Grenzen in ihrer lateralen und axialen Auflösung beschränkt. Für klassische Fluoreszenzmikroskopie gilt die Diffraktionsbarriere von etwa 200 nm lateraler Auflösung, die bereits 1873 von Ernst Abbe postuliert wurde (Hell 2003). Mittlerweile gilt diese Grenze als gebrochen, da sogenannte *Super-Resolution Microscopy* wie *Stimulation Emission Depletion (STED)*, *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)* oder *Photoactivated Localisation Microscopy (PALM)* bzw. *fluorescent PALM (fPALM)* zur Verfügung stehen, die immerhin laterale Auflösungen von 20-30 nm erreichen können (Hess et al. 2006; Rust et al. 2006; Betzig et al. 2006; Hell und Wichmann 1994). Dieser Gewinn an Auflösung bleibt selbstverständlich mit erhöhtem Zeit- und Kostenaufwand verbunden und umgeht nicht das Problem der eingeschränkt geeigneten und damit eingeschränkt verfügbaren Fluorophore (Galbraith und Galbraith 2011).

Weiterhin verlassen sich bis heute die meisten multiplexen Immunoassays auf monoklonale Antikörper als Liganden (Hober und Uhlén 2008). Die Nutzung von Antikörpern bedeutet jedoch ein Risiko für Cross-Reaktivität, was eine genaue Validierung der Antikörper vor ihrem Einsatz verlangt (Hartmann et al. 2009; Ellington et al. 2010). Diese Validierungsverfahren sind nicht umfassend standardisiert, einige verlassen sich lediglich auf das Molekulargewicht nach einer Western-Blot-Analyse (Spurrier et al. 2008; Ellington et al. 2010). Gerade bei Sandwich-Assays, die also zwei Antikörper je Analyten verwenden, nimmt die Ungenauigkeit zu. So verglichen Hsu et al. die monoplexe Form eines Sandwich-Immunoassays mit seiner multiplexen Variante (11 Analyten) und stellten eine deutliche Minderung der Sensitivität um den Faktor 1,7-5 fest (Hsu et al. 2008).

Die Herstellung und Validierung der Antikörper wurde zwar durch die Entwicklung hochspezifischer monoklonaler Antikörper sowie die Möglichkeit der Tier-unabhängigen Selektion

in *E. Coli* in den letzten Jahrzehnten stark vereinfacht, bleibt aber zeit- und kostenintensiv (Hartmann et al. 2009; Ellington et al. 2010). Als Alternativen werden daher Nanobodys (siehe Kapitel 1.3) sowie andere synthetisch generierte Liganden wie Monobodys, Affibodys oder *designed ankyrin repeat proteins* (DARPin) gehandelt (Bedford et al. 2017).

1.3 Nanobodys

1.3.1 Entdeckung und Struktur

Nanobodys sind die rekombinanten VHH, also antigen-bindenden Anteile der schweren Kette, die aus *heavy chain only antibodies* (HCAb) von Vertretern der Camelidae gewonnen werden. Zu ihnen zählen Kamele, Lamas und Vicuñas (Muyldermans 2013). Diese HCAb entsprechen konventionellen IgG-Antikörpern, zeichnen sich aber durch das Fehlen der leichten Ketten und der CH1-Region (erste konstante Domäne der schweren Kette) aus (Muyldermans 2013), wie in Abbildung 1 schematisch angedeutet. Trotz ihrer reduzierten Struktur scheinen sie durchaus eine Funktion im Immunsystem der Tiere auszuüben, da HCAb bei Kamelen einen Anteil von 50 - 80 % der Immunglobuline im Blut ausmachen (Blanc et al. 2009).

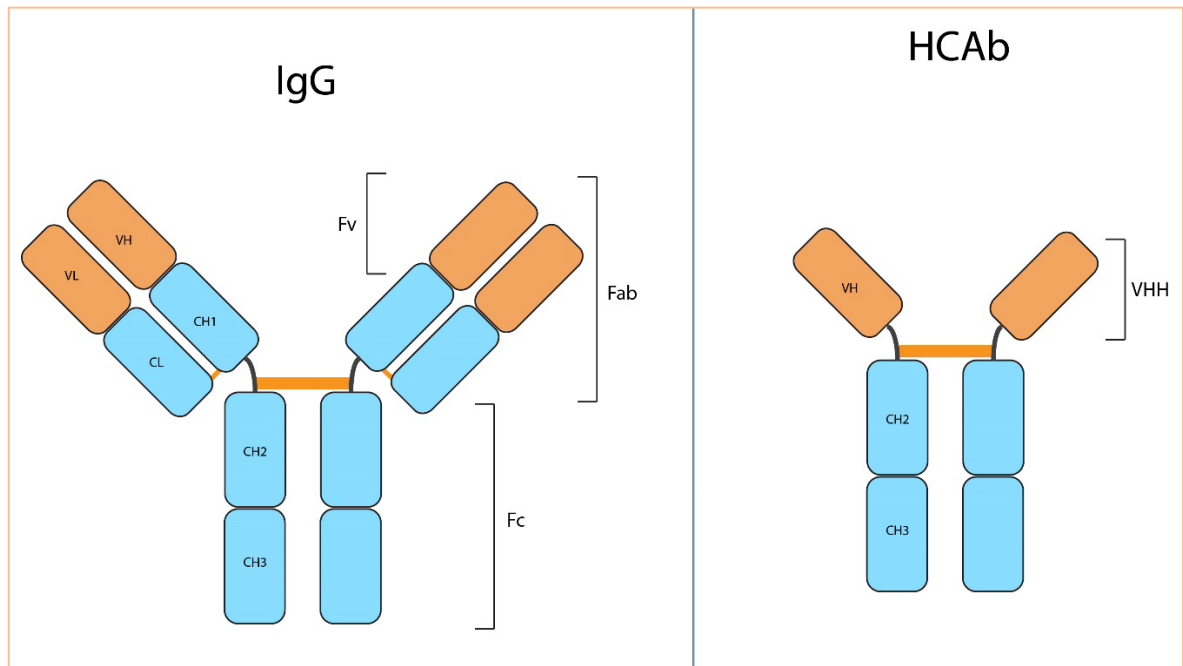


Abbildung 1: Schematische Struktur eines IgG-Antikörpers und eines HCAb.

CH1-3: konstante Regionen der schweren Kette.

CL: konstante Region der leichten Kette.

Fab: antigen-bindender Anteil.

Fc: kristallisierbares Fragment

Fv: variabler Anteil des Antikörpers.

VH: variable Region der schweren Kette.

VHH: variable Domäne des HCAb.

VL: variable Region der leichten Kette.

Diese Abbildung wurde durch den Autor selbst erstellt.

HCAb wurden erstmals im Jahre 1993 beschrieben (Hamers-Casterman et al. 1993) und finden seitdem zunehmende Beachtung. Sie wurden in ähnlicher Form im Ammenhai, Teppichhai und gefleckten Seewolf entdeckt, werden dort aber *Ig new antigen receptor* (IgNAR) genannt (Flajnik und Kasahara 2010). Selbst Menschen können unter pathologischen Umständen vergleichbare Antikörper entwickeln (Alexander et al. 1982; Cogné et al. 1989).

Die räumliche Struktur der Nanobodys besteht – entsprechend der VHH-Region eines HCAb – aus zwei β -Faltblatt-Strukturen. In ihnen befinden sich zum einen hypervariable Anteile und zum anderen eher konservierte *framework regions* (FR). Diese FR weisen in den HCAb im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern hydrophilere Eigenschaften auf, welche die Löslichkeit der Nanobodys begünstigen (Muylldermans et al. 1994; Holliger und Hudson 2005). Für die Antigenbindung stehen drei *complementary determining regions* (CDRs) zur

Verfügung, also nur halb so viele wie in konventionellen Antikörpern, deren leichte Ketten ebenfalls CDRs aufweisen. Um eine ähnliche Bindungsfläche zu erreichen, sind daher die CDR1 und 3 der VHH deutlich verlängert, was die Stabilität des Moleküls beeinträchtigen müsste (Nguyen et al. 2001). In VHH von Kamelen wurden allerdings in den CDR zusätzliche Disulfidbrücken beobachtet, die dieser Instabilität entgegen wirken (Govaert et al. 2012).

Bis heute werden die meisten Nanobodys durch Immunisierung von Vertretern der Camelidae gewonnen. Es folgt die Extraktion der B-Zellen, das Klonen der extrahierten HCAb, die Abspaltung der VHH und eine anschließende Selektion der VHH per *phage display* (Nguyen et al. 2001; Bedford et al. 2017). Seit Entdeckung der rekombinanten Gewinnung monoklonaler Nanobodys können so umfassende „Bibliotheken“ (*libraries*) mit bis zu 10^9 Klonen erstellt werden, aus denen auch ohne erneute Immunisierung von Tieren hochaffine Nanobodys gewonnen werden können (Muyldermans 2013).

1.3.2 Eigenschaften und Vorteile gegenüber konventionellen Antikörpern

Nanobodys bringen einige günstige Eigenschaften mit sich, die für ihre Verwendung anstatt konventioneller Antikörper sprechen. Vorteile ergeben sich vor allem in Sachen a) Stabilität, b) Größe, c) Affinität und Spezifität, d) Löslichkeit, e) Immunogenität, und f) Produktionsaufwand.

Stabilität:

Nanobodys sind in einer Konzentration von 1 - 10 mg/ml in simplem Phosphat- oder Tris-Puffer für mehrere Monate bei 4 °C haltbar. Werden sie bei -20 °C gelagert, erhöht sich dieser Zeitraum beträchtlich. Selbst die Exposition von 37 °C Wärme kann über Wochen toleriert werden (Arbabi Ghahroudi et al. 1997). Sie denaturieren ab 60 – 80 °C, einige sogar erst ab 90 °C (van der Linden et al. 1999). Einige Experimente zeigen außerdem ihre Bindungsfähigkeit unter widrigen Umständen wie hohen Harnsäurekonzentrationen (Dolk et al. 2005).

Größe:

Gleichzeitig führt die geringere Größe der Nanobodys vermutlich zu einer besseren Bindung an versteckt liegende Epitope, an die konventionelle Antikörper aufgrund ihrer Struktur nicht binden können (Muyldermans 2013; Bedford et al. 2017).

Affinität und Spezifität:

Durch gewissenhafte Selektion der Nanobodys aus großen Bibliotheken können hohe Affinitäten und hohe Spezifität erreicht werden. Die unspezifische Bindung an Hintergrundfärbung ist im Vergleich zu größeren Antikörpern reduziert (Hassanzadeh-Ghassabeh et al. 2013).

Löslichkeit:

Die im Vergleich zu Antikörpern teils hydrophileren *framework regions* der Nanobodys führen zu ausgezeichneter Löslichkeit derselben (Hassanzadeh-Ghassabeh et al. 2013; Muyldermans et al. 1994).

Immunogenität:

Dank der großen Ähnlichkeit der Nanobodys zu human VH-Anteilen (variabler Anteil der schweren Kette) ist eine niedrige Immunogenität im Menschen zu erwarten. In der Tat wurden bei Injektionen kleinerer Mengen in Mäusen und Menschen keine Immunantworten festgestellt (Baral et al. 2006; Cortez-Retamozo et al. 2004). Diese Eigenschaft ist für in-vivo-Anwendungen wünschenswert. Dennoch bleibt fraglich, ob bei Mehrfach-Injektionen größerer Mengen eine Immunogenität ausbleibt (Wesolowski et al. 2009).

Produktionsaufwand:

Die oben beschriebene Möglichkeit der rekombinanten Produktion der Einzeldomänenantikörper mit hoher Spezifität ermöglicht eine relativ schnelle Gewinnung neuer Nanobodys (Baral et al. 2011). Dies wird insbesondere begünstigt dadurch, dass die Tiere oft mit mehreren immunogenen Proteinen gleichzeitig innerhalb von zwei Monaten immunisiert werden (Baral et al. 2011) und die Nanobodys anschließend in hohem Level in Mikroorganismen exprimiert werden können (Frenken et al. 2000). Die gesamte Prozedur, inklusive IgG-Aufreinigung, MS, Generierung von cDNA, PCR, Cloning und Screening kann innerhalb von 4 bis 6 Wochen nach Immunisierung der Tiere abgeschlossen sein (Fridy et al. 2014).

Der vergleichsweise hohe Produktionsaufwand von Antikörpern belastet bereits ganze Gesundheitssysteme, wie Drucker et al. 2008 am Beispiel von Trastuzumab und Bevacizumab verdeutlichen (Drucker et al. 2008). Auf Dauer scheinen hier Nanobodys eine günstigere Alternative zu versprechen.

Aus diesen Gründen haben Nanobodys bereits ihren Weg in Forschung und sogar medizinische Anwendung gefunden (siehe Kapitel 1.3.3) und sind zentraler methodischer Bestandteil dieser Arbeit.

1.3.3 Aktuelle Anwendungsbereiche

Aus der Verwandtschaft zu IgG-Antikörpern ergibt sich, dass Nanobodys oft in Feldern zur Anwendung kommen, in denen Antikörper schon lange etabliert sind. In vielen Bereichen wurde funktionelle Gleichwertigkeit zu herkömmlichen Antikörpern demonstriert, in manchen

Feldern sind Nanobodys sogar die bevorzugte Wahl. Einige Beispiele seien im Folgenden genannt.

In der Forschung erweisen sich Nanobodys durch ihre geringe Größe als hervorragend geeignet für in-vivo-Bildgebung von Zellen (Rothbauer et al. 2006). Ihre einfache Kopplung an chemische Strukturen wie Fluorophore, auch „*fluobodies*“ genannt, macht sie zum nützlichen Werkzeug. Auch im *Super-Resolution Imaging* können sie vielseitig eingesetzt werden (Ries et al. 2012).

Über reine Forschungszwecke hinaus finden sich auch diagnostische Anwendungen für Nanobodys. Ihre schnelle und tiefreichende Infiltration von Organen und zügige renale Clearance hat zu ihrem Einsatz bei in-vivo-Bildgebungen geführt, dem sogenannten *Immuno-Imaging* (Vaneycken et al. 2011b; Wesolowski et al. 2009). Bei Positronen-Emissions-Tomographie (PET) können sie mit sehr kurzlebigen Nukliden versehen werden, was eine niedrigere Strahlenbelastung für den Patienten verspricht (Broisat et al. 2012). Sie wurden bereits als Marker für atherosklerotische Läsionen (Broisat et al. 2012) und HER2 genutzt (Vaneycken et al. 2011a), einer bei Brustkrebs relevanten Tyrosinkinase.

Selbst im therapeutischen Sinne wurden Nanobodys bereits erprobt. Sie zeigen zur Immunisierung bei Vergiftungen oder Infektionen teilweise dieselbe Wirksamkeit wie konventionelle Antikörper (Stewart et al. 2007; Wesolowski et al. 2009). Sie sollen zukünftig bevorzugt bei Viren, Bakterien und Parasiten mit schwierig zugänglichen Ziel-Epitopen eingesetzt werden (Harmsen et al. 2009; Stijlemans et al. 2004; Strokappe et al. 2012).

Eine weitere mögliche, wenn auch bisher ungewöhnliche, Verwendung finden Nanobodys in der Rasterkraftmikroskopie. Die Bedeutung dieser Technologie sowie konkrete Anwendungen werden in den folgenden Kapiteln besprochen.

1.4 Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*, AFM)

1.4.1 Technische Grundlagen

Die Erfindung des AFM lässt sich auf das Jahr 1986 zurückführen (Binnig et al. 1986).

AFM ist eine Unterform der Rastersondenmikroskopie (*Scanning Probe Microscopy*). Es basiert auf der Interaktion einer feinen Spitze (AFM-Tip) und der Oberfläche der Probe. Der AFM-Tip wiederum ist auf dem Cantilever, einem flexiblen Träger, angebracht. Man nimmt an, dass bereits interatomare Kräfte zwischen AFM-Tip und Oberfläche messbar sind. Zu Beginn

wurde diese Interaktion durch winzige elektrische Ströme erfasst, entsprechend dem Prinzip der Rastertunnelmikroskopie (*Scanning Tunneling Microscopy*, STM) (Binnig et al. 1986). Später setzte sich die laserbasierte Messung durch, bei der ein Helium-Neon-Laser auf die Rückseite des spiegelnd beschichteten Cantilevers gerichtet wird (Meyer und Amer 1988). Der reflektierte Laserstrahl wiederum gelangt auf einen Detektor, siehe Abbildung 2. Verbiegt sich nun durch Interaktion mit der Oberfläche der Cantilever, so registriert der Detektor die Abweichung des Lasers in zwei Dimensionen. Die angeschlossene Recheneinheit kann so unter anderem auf die Änderung der z-Höhe in der Probe zurück schließen (Eghiaian et al. 2014).

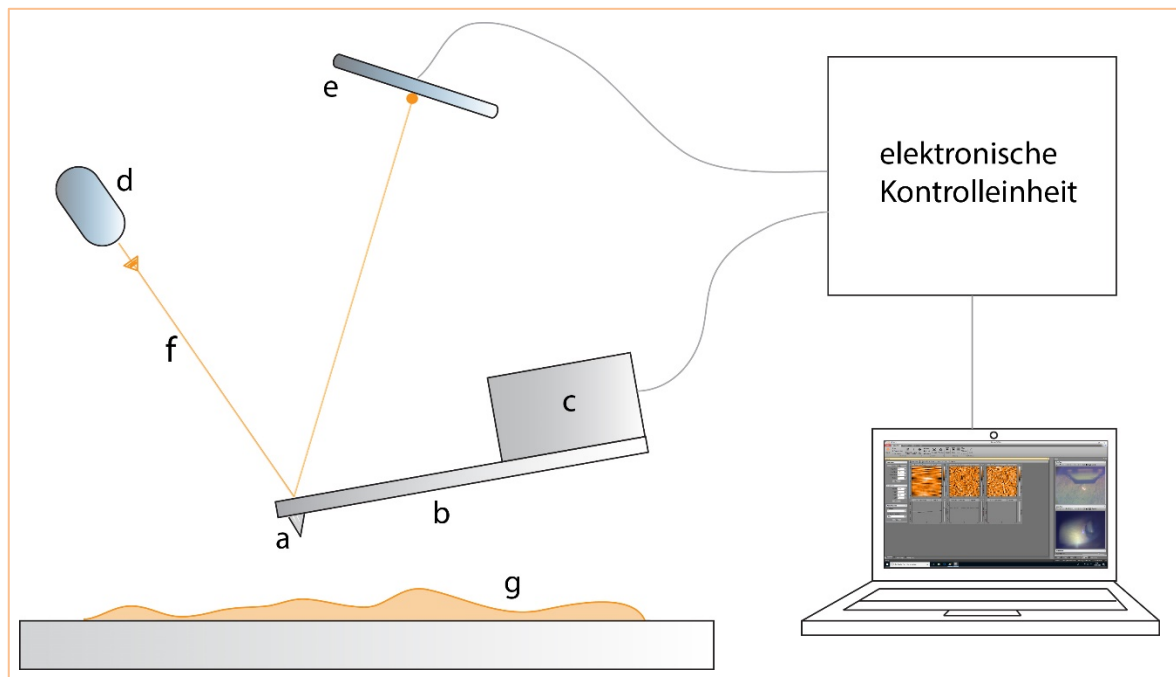


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines modernen AFM.

- (a) AFM-Tip
- (b) Cantilever
- (c) Piezo- und Steuerelement
- (d) Lasereinheit
- (e) Photodioden-Detektor
- (f) Laserstrahl
- (g) Oberfläche der Probe

Diese Abbildung wurde durch den Autor selbst erstellt.

Bereits frühe Messungen zeigten eine laterale Auflösung von unter 3 nm und eine vertikale Auflösung von unter 0,1 nm in Luft (Binnig et al. 1986). Im Vergleich zur technisch verwandten STM blieb die Auflösung des AFM allerdings lange hinter dieser zurück. Während die STM auf

Interaktionen des Tips mit peripheren Elektronen der Atome beruht, interagiert das AFM auch mit Kernelektronen, die räumlich dichter liegen. Somit sollte dem AFM theoretisch die höhere Auflösung vorbehalten sein, bis hin zur Darstellung einzelner Atome (Giessibl 2005). Die Einführung von Quarz-Cantilevern, frequenz-basierter Methoden und Vakuum-Messungen ermöglichte schließlich die atomare Auflösung, auch wenn diese bis heute in den meisten Experimenten nicht erreicht wird (Giessibl 2005).

Im Betrieb eines AFMs unterscheidet man zwei Modi: Die dynamische und die statische Messung. Im statischen *constant force mode* wird der Cantilever mit dem AFM-Tip über die Oberfläche geführt und erfährt durch Interaktionen mit dieser minimale Verkrümmungen, die dann per Laser auf dem Detektor lesbar werden. Bei modernen Geräten wird durch einen Feedback-Mechanismus der Cantilever so vertikal gesteuert, dass die auf den AFM-Tip wirkende Kraft in etwa konstant bleibt ($=\text{constant force}$). Diese Kraftschwelle wird Setpoint genannt (Eghiaian et al. 2014).

In den verschiedenen dynamischen Modi wird der Cantilever durch ein Piezo-Element zu Oszillationen angeregt und tastet so bei lateraler Bewegung über das Präparat punktweise die Oberfläche ab. Dabei wird der AFM-Tip nur so weit gegen das Präparat geführt, bis die Amplitude des frei schwingenden Cantilevers durch den Oberflächenkontakt um einen bestimmten Prozentsatz (Setpoint) gedämpft ist (NANOSURF AG 2017). Auch hier regelt also ein Feedback-Mechanismus ständig die Höhe des Cantilevers. Auf diese Weise werden Cantilever und Oberfläche geschont.

1.4.2 Darstellung von Protein-Protein-Bindungen am AFM

Das AFM gilt als bestens geeignet für die Darstellung biologischer Proben in submolekularer Auflösung. Trotzdem ist es weit entfernt davon, gleiche Beliebtheit wie Elektronen- oder Fluoreszenzmikroskopie zu genießen (Eghiaian et al. 2014). In der Untersuchung von Protein-Protein-Bindungen erfreut sich das AFM allerdings zunehmender Beliebtheit.

Zu diesem Zwecke werden Kraft-Spektroskopien genutzt, bei denen der AFM-Tip auf die Oberfläche geführt und dann wieder angehoben wird. Die Entwicklung anziehender oder abstoßender Kräfte wird dabei als Kraftkurve aufgezeichnet (NANOSURF AG 2017). Auf diese Weise lassen sich auch Protein-Interaktionen wie Rezeptor-Liganden-Bindungen charakterisieren, wenn der Ligand am AFM-Tip befestigt wird und zum Rezeptor auf der Oberfläche geführt wird.

Die Befestigung des Liganden am AFM-Tip kann über einen Poly-Ethylen-Glykol-N-Hydroxy-Succinimid-Linker (PEG-NHS-Linker) geschehen, der über seine NHS-Gruppe mit dem AFM-

Tip konjugiert wird und an seinem freien Ende die „Sonde“, also den gewünschten Liganden aufweist (Gruber 2016). Das zu bindende Protein wiederum kann auf einer Oberfläche immobilisiert werden.

Mit vergleichbarer Methode wurde beispielsweise die Rezeptor-Liganden-Bindung von Rituximab, einem Medikament aus monoklonalen Antikörpern, und CD20, einem B-Zell-Rezeptor, untersucht (Li et al. 2013). Die Bedeutung des AFM erstreckt sich mittlerweile also bis in klinische Anwendungsbereiche und soll für dieses Projekt eine ebenso wegweisende Rolle spielen.

An dieser Stelle möchten wir das weite Feld der Bildgebung verlassen und auf ein ausgefalleneres Gebiet zu sprechen kommen. Das folgende Kapitel greift ein Thema aus dem Bereich der Protein-Expression auf, welches im Laufe der Arbeit eine besondere Rolle einnehmen wird: Die 2A-Sequenzen.

1.5 Mechanismus und Anwendungen von 2A-Sequenzen

Um gezielt multiplexe Bildgebung zu erproben, ist oft die zelluläre Expression bestimmter Proteine erforderlich, die dem Untersucher hinlänglich bekannt sind. Im Rahmen dieser Anforderungen können 2A-Sequenzen ein zwar eher unbekanntes, aber nützliches Werkzeug darstellen, um die Co-Expression mehrerer Gene zu ermöglichen.

Als „2A“ wird eine 18 Aminosäuren umfassende Region auf der DNA von Picornaviridae bezeichnet, an der eine Spaltung der Polyproteinkette stattfindet. Schon früh beobachtete man, dass beim Maul-und-Klauen-Seuche-Virus (*Foot and Mouth Disease Virus*, FMDV) die 2A-Region allein ausreichend zu sein scheint für die Spaltung des Virusproteins am C-terminalen Ende der 2A-Sequenz während der Proteinsynthese (Ryan et al. 1991). Als Mechanismus wurden proteolytische Enzymaktivitäten vermutet, wahrscheinlicher ist allerdings eine hydrolytische Spaltung. Es wird angenommen, dass die Sequenz die ribosomale Aktivität in einer Art und Weise modifiziert, dass sich an besagtem Ende der 2A-Sequenz keine Peptidbindung ausbildet. Es ergibt sich ein ribosomaler „Sprung“ von einem Codon zum nächsten, sodass Downstream ein unabhängiges zweites Protein translatiert wird (Donnelly et al. 2001; Felipe 2004). Diese, auch CHYSEL (*Cis-Acting Hydrolase Element*) genannte, selbst-spaltende Eigenschaft kann experimentell genutzt werden, wenn mehrere Proteine durch nur ein Gen zur Expression kommen sollen (Co-Expression) (Felipe 2004).

Gegenüber anderen Systemen zur Co-Expression von multiplen Genen, von denen *Internal Ribosomal Entry Sites* (IRES) die verbreitetste Methode darstellen, bieten 2A-Sequenzen einige

Vorteile. Zum einen führen sie zu stöchiometrisch gleicher Expression der Proteinanteile, da sie von nur einem Promoter kontrolliert werden (Wang et al. 2015; Szymczak-Workman et al. 2012). Gleichzeitig ist durch die Kürze der Sequenz eine Funktionsbeeinträchtigung der Proteine unwahrscheinlich (Wang et al. 2015). Da außerdem der Spaltungsmechanismus lediglich vom Ribosom abhängt, einem in Eukaryoten strukturell hoch konservierten Organell, kann diese Form der Co-Expression leicht auf andere Zelltypen übertragen werden (Minskaia et al. 2013). Erfolgreiche Versuche fanden bereits in Zelllinien von Mäusen (darunter Keimzellen), Seidenwürmern, Zebrafischen, Drosophila, Menschen und sogar Pflanzen statt (Daniels et al. 2014; Hara et al. 2014; Chng et al. 2015; Kim et al. 2011; Burén et al. 2012).

Im Laufe der Zeit wurden 2A-Peptide in zahlreichen weiteren Viren entdeckt, darunter dem Porcinen Teschovirus-1, folglich P2A genannt (Luke et al. 2008). Die Länge der verschiedenen 2A-Sequenzen variiert üblicherweise zwischen 18 und 22 Aminosäuren (Kim et al. 2011; Luke et al. 2008). Kim und Kollegen führten einen Vergleich von vier verschiedenen 2A-Typen (P2A, E2A, F2A, T2A) in fünf verschiedenen Zelllinien, darunter Maus-, Zebrafisch- und menschliche Zellen durch (Kim et al. 2011). Die höchste Spaltungseffizienz ergab sich für P2A über sämtliche Zellreihen, auch die in dieser Arbeit verwendeten HEK293-Zellen.

1.6 Zielstellung

Diese Arbeit ist Teil eines umfangreichen Projektes zur Entwicklung innovativer Bildgebung und kann nur im Rahmen dessen erklärt und verstanden werden. Die Grundidee des gesamten Projektes sei daher im folgenden Kapitel skizziert. Im Anschluss daran erfolgt die genauere Eingrenzung der Zielsetzung, die dieser Arbeit als Teil des Ganzen zukommt. Sie soll den *proof of principle* des Projektes führen, also die Durchführbarkeit der im folgenden beschriebenen Idee nachweisen.

1.6.1 Die Idee: Kombinatorische Proteinerkennung, Epitop-Marker und Nanobodys

Herkömmliche multiplexe Immunoassays beruhen auf der Spezifität eines Antikörpers oder Nanobodys zu einem Antigen, welches ein – und zwar genau ein - bestimmtes Protein charakterisiert. Möchte man eine Anzahl von n Proteinen erkennen, so werden n Nanobodys benötigt, nämlich ein Nanobody für jedes zusätzliche Protein. Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Effizienz dieses Verfahrens zu steigern und bei Einsatz von nur wenigen Nanobodys eine Vielzahl an Proteinen zu erkennen. Es wird ein Ansatz verfolgt, der im Folgenden „kombinatorische Proteinerkennung“ genannt werden soll.

Die Idee: Zuerst werden die darzustellenden Proteine mit Epitop-Markern versehen. An die eigentlichen Proteine werden also Epitope angefügt, für die erprobte Nanobodys existieren. Dies kann zum Beispiel durch in vitro erzeugte Plasmide geschehen, die neben der DNA-Sequenz der Proteine zusätzlich die der gewünschten Epitope enthält. Die Epitope können dabei beliebig miteinander kombiniert werden. Dabei sollte aus methodischen Gründen beachtet werden, dass kein Protein mit einem Epitop doppelt markiert wird und die Reihenfolge der Proteine keine Rolle spielen darf, da eine Auswertung diesbezüglich sehr umständlich zu realisieren wäre. Bei einem solchen Vorgehen und einer Zahl von n Epitopen (mit n zugehörigen Nanobodys) ergeben sich also $2^n - 1$ Möglichkeiten, die Epitope zu kombinieren und damit $2^n - 1$ Proteine zu markieren. Am Ende des Prozesses stehen also Proteine, die mit einer für sie spezifischen Kombination von Epitopen markiert sind (*epitope tags*). An die Stelle eines einzigen Epitops, welches ein Protein für den Untersucher kenntlich macht, tritt also eine Kombination von Epitopen, die ebenfalls eine verwechslungsfreie Identifizierung des Proteins garantiert. Diese Technik wird von uns auch als „Nanostamps“ bezeichnet.

Auf der Basis dieses Epitope-Codes ist die Darstellung der markierten Proteine mit den üblichen – oder auch neuen – bildgebenden Verfahren denkbar. Die Auswertung dieser Methode ist vermutlich bei geringen Epitop-Zahlen noch mit bloßem Auge möglich, zur Bewältigung größerer Mengen wird allerdings eine automatisierte, pixel-basierte Analyse erforderlich sein. Erreicht wird damit eine vereinfachte und potenziell materialsparende Methode zur multiplexen Bildgebung bei hoher Komplexität der Proben.

1.6.2 Ziele dieser Arbeit

Da das gesamte Projekt der kombinatorischen Proteinerkennung durch Nanobodys einen enormen Umfang mit sich bringt, ist es notwendig, die Zielsetzung dieser Arbeit genau abzustecken. Es sind zwei große Unterziele abzugrenzen:

Zum ersten sollen Grundlagen in der Atomkraftmikroskopie (AFM) gelegt werden. Als hochauflösende und fluorophor-unabhängige Technologie bietet das AFM vielversprechende Applikationen für die angestrebte Methode. Auch wenn die eigentliche Übertragung unserer Methode von konfokaler Bildgebung auf das AFM erst im späteren Verlauf des Projektes erfolgen kann, soll im Rahmen dieser Arbeit bereits die Bildgebung mit dem AFM durch erste Kontrollexperimente vorbereitet werden. Sie bilden die Grundlage für eine valide Anwendung dieser noch unüblichen Technologie in späteren Stadien.

Zweitens soll auf Ebene der Immunhistochemie die Idee der kombinatorischen Proteinerkennung, im Sinne eines *proof of principle*, in die Tat umgesetzt werden. Mit anderen Worten galt es zu zeigen, dass durch besagte Epitop-Markierung eine multiplexe Bildgebung grundlegend möglich ist. Dies stellt den mit Abstand größeren Teil der Arbeit dar.

Zu diesem Zwecke wurden vier Epitope/Nanobodys gewählt, womit die – rein rechnerisch mögliche - Darstellung von bis zu 15 Proteinen angestrebt werden soll. Folglich bringt dies die Herausforderung mit sich, eine Umgebung zu schaffen, in der 15 künstlich markierte Proteine in einer Zellpopulation zur Expression kommen. Dieses Etappenziel wurde in mehreren parallelen Ansätzen verfolgt, unter anderem durch Fusion von Zellen und dem Einsatz von 2A-Sequenzen.

Da der Endpunkt unserer Methode die automatisierte Bildanalyse darstellt, muss gleichzeitig eine übersichtliche Bildgebung mit klarer räumlicher Trennung der Proteine gewährleistet sein. Die digitale Auswertung selbst liegt wiederum außerhalb der Zielsetzung dieser Arbeit, soll aber als Ausblick auf die Anwendung der Methode skizziert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Bildgebung mit dem *Atomic Force Microscope* (AFM)

Zur Bildgebung stand ein Nanosurf Flex AFM, Firma Nanosurf, mit einem C3000-Controller und zugehöriger Software zur Verfügung.

Die hier gezeigten Experimente wurden mit einem AFM-Tip der Firma Budget Sensors durchgeführt, Typ TAP190AI-G, dessen Spezifikationen Tabelle 1 zu entnehmen sind.

Tabelle 1: Herstellerangaben, TAP190AI-G

Hersteller	Budget Sensors
Federkonstante	48 N/m (28 – 75 N/m)*
Resonanzfrequenz (Luft)	190 kHz (160 – 220 kHz)*
Form	rechteckig
Länge	225 μm
Breite	38 μm
Höhe des Cantilevers	7 μm
Höhe des Tips	17 μm
Beschichtung	Aluminium

An jedem Messungstag wurde ein *laser alignment* durchgeführt, um die Position des Lasers möglichst zentral auf der Spitze des Cantilevers zu halten. Dies geschah durch manuelle Justierung zweier Schrauben am Gerät. Auf dieselbe Weise wurde auch die Position des Lasers auf dem Detektor zentriert. Die Deflektion auf dem Detektor wurde hierbei stets unter 5% gehalten. Des Weiteren wurde vor Beginn der Messungen jeweils ein *thermal tuning* sowie ein *frequency sweep* mithilfe der Software durchgeführt, um die tatsächliche Resonanzfrequenz und Federkonstante des Cantilevers zu bestimmen. Werden bei diesen Schritten ungewöhnliche Frequenzen detektiert, kann auf Störfrequenzen geschlossen werden. Die Ergebnisse konnten anschließend mit den Herstellerangaben abgeglichen werden.

Zum Beginn der Nutzung eines Tips wurde zusätzlich eine Nullmessung durchgeführt. Hierbei wird die Bildgröße auf einen einzigen Punkt festgelegt, der Tip in Kontakt mit der Probe gebracht und die Aufnahme im *Dynamic Mode* gestartet. Der Tip misst auf diese Weise wieder und wieder denselben Bildpunkt. Aus der Höhenschwankung in der Aufnahme kann nun auf den grundsätzlichen Fehler bei der Messung geschlossen werden, da bei perfekter Messtechnik nur eine gleichbleibende z-Höhe registriert werden sollte.

Die Messungen zum Abschätzen von Schäden durch den Constant Force Mode fanden in Luft statt. Die restlichen Messungen der Biotin-Oberflächen geschahen hingegen ausschließlich in Flüssigkeit (dest. H₂O) und unter Nutzung des *Phase Contrast Mode*. Bei der Umstellung auf Flüssigkeit mussten *laser alignment* und *frequency sweep* erneut durchgeführt werden.

Setpoint und Gain-Parameter wurden für jede Aufnahme individuell angepasst. Die Aufnahmen erfolgten stets bei 256 * 256 Messpunkten und 0,78 s pro Linie auf einer Fläche von 10 µm * 10 µm.

2.2 Zellkultur und Teilen der Zellen

HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney Cells*) wurden in Zellmedium bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Inkubationsschrank auf Zellkulturschalen (14,5 cm Durchmesser) gehalten. Das Zellmedium setzte sich zusammen aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin).

Beim Teilen der Zellen wurde steril unter einer Abzugshaube gearbeitet. Zuerst wurde das alte Medium von der Platte entfernt und 3ml Trypsin zu den Zellen gegeben, um die Zellkontakte zu lösen. Nach 1-minütiger Inkubation im Schrank bei 37 °C wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 9ml Zellmedium gestoppt. Die Zellen konnten zusätzlich durch seitliches Stoßen der Platte gegen einen festen Gegenstand mechanisch gelockert werden. Das Flüssigkeitsgemisch mitsamt den Zellen wurde anschließend mit einer Pipette aufgenommen und in einem Röhrchen gesammelt. Es folgte eine Zentrifugation (Heraeus Megafuge 8, Thermo Fisher Scientific) für 4 min bei 1000 Umdrehungen, um Medium und Zellen zu trennen. Das Medium wurde vom entstandenen Zell-Pellet abgesaugt und dieses in 1 ml Zellmedium durch Auf- und Abpipettieren gründlich resuspendiert.

Von 1 ml Lösung wurden anschließend je nach Anlass 77 bis 333 μ l entnommen und auf eine neue beschriftete Platte mit frischem Medium ausgebracht. Dies entspricht einem Teilungsverhältnis von 1:13 bis 1:3.

2.3 Aussäen und Transfektion

Der erste Schritt der Transfektion war stets das Aussäen auf eine 6- oder 12-well-Platte, letztere enthielten Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen. Dazu wurden Zellen während des Teilens (siehe Kapitel 2.2) aus der 1 ml-Zellsuspension entnommen. Für 12-well-Platten wurden 70 μ l der Zellsuspension in 13 ml Transfektionsmedium (DMEM, versetzt mit 10% FCS und 1 % L-Glutamin) überführt und jeweils 1 ml dieser Lösung auf die 12 Wells verteilt. Für 6-well-Platten geschah dies entsprechend mit 120 μ l Zellsuspension in 20 ml Medium, verteilt auf 3 ml pro Well.

Zur Transfektion wurden DNA-Plasmide von der Firma Genscript (Vektor pcDNA3.1) bezogen. Einen Überblick über alle verfügbaren DNA-Plasmide gibt Tabelle 2.

Tabelle 2: Kodierungssequenzen der Plasmide

Plasmidsequenz	Wahrscheinlichste Lokalisation des exprimierten Proteins
<i>TOM70_mCherry</i>	Mitochondrien
<i>Endo_GFP_syn87_syn2</i>	Endosomen, Lysosomen, Zellmembran
<i>Stx4_syn87</i>	Zellmembran
<i>NLS_GFP_mCherry_Syn2</i>	Nucleus
<i>GFP_Snap25</i>	Zellmembran
<i>Stx7_GFP_syn2</i>	Endosomen
<i>Galnact_GFP_syn87</i>	Golgi-Apparat
<i>Life_mCherry_syn2</i>	F-Actin
<i>mCherry_GFP_syn87_KDEL</i>	Endoplasmatisches Retikulum (ER)
<i>Stx6_syn87_syn2</i>	Golgi-Apparat
<i>GFP</i>	Zytoplasma, Nucleus
<i>Stx13_mCherry_syn87</i>	Golgi-Apparat, Endosomen
<i>VAMP4_mCherry_GFP_syn87_syn2</i>	Golgi-Apparat

Fett markierte Sequenzen stellen das für die Lokalisation des Proteins dienliche Gen dar (Kernprotein), regulär gedruckte Sequenzen die angehängten Epitope. Sequenzen und Lokalisation der Kernproteine wurden mit Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) überprüft. Für die Abkürzungen der Epitope, siehe Abkürzungsverzeichnis.

Transfiziert wurde, falls nicht anders erwähnt, mit jeweils 0,5 µg DNA pro Plasmid pro Well. Für eine 4-fach transfizierte Zelle wurden also 2 µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde in 75 µl Opti-MEM® (Reduced Serum Medium, gibco) pro Well gelöst, ebenso das Lipofectamine (Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific). Die Menge des Lipofectamines entsprach jeweils dem 1,5-fachen der für das Well eingesetzten DNA, bei 2 µg DNA also 3 µg Lipofectamine.

Nach 5-minütiger Inkubation wurden beide Gemische zusammengeführt und für weitere 20 min inkubiert, um die Bildung von DNA-Lipid-Komplexen zu erlauben. Für jedes Well entstand hiermit eine Lösung aus DNA und Lipofectamine in 150 µl Opti-MEM®. Abschließend wurden 100 µl dieser Lösung in jedes Well gegeben und die Zellen über Nacht inkubiert.

Der Zeitpunkt der Transfektion gestaltete sich dabei unterschiedlich. Anfangs erfolgte die Transfektion erst am Tag nach dem Aussäen, um die Zellen nicht zu sehr zu strapazieren. Spätere Experimente zeigten, dass eine Transfektion mit exakt selbem Vorgehen, allerdings in einem Schritt mit dem Aussäen, qualitativ gleichwertige Ergebnisse brachte und natürlich einen Tag Zeitgewinn). Diese 2-in-1-Methode wurde für die Zweifachtransfektionen verwandt, während Multitransfektion und Fusionsexperimente mit der zeitaufwändigeren Variante durchgeführt wurden. Ein direkter Vergleich beider Methoden ist in den Experimenten zur Zelldichte in Kapitel 3.2.3.3 zu finden.

Die Unterschiede im Vorgehen der verschiedenen Transfektionen sowie die jeweils genutzte DNA ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

2.3.1 Zweifachtransfektion

Zur Erschaffung von Zellpopulationen mit jeweils 2 verschiedenen Proteinkonstrukten wurden die Wells mit den aus

Tabelle 3 ersichtlichen Kombinationen von DNA transfiziert. Die Kombinationen wurden so gewählt, dass beide in einer Zelle exprimierten Proteine in möglichst unterschiedlichen Zellorganellen lokalisiert waren und im besten Fall unterschiedliche Fluorophore trugen. Dies vereinfachte die Erkennung einer erfolgreichen Transfektion während der Bildgebung.

Tabelle 3: Kombination der Plasmide für die Zweifachtransfektion

	Plasmid 1	Plasmid 2
Zellpopulation A	<i>TOM70_mCherry</i>	<i>Endo_GFP_syn87_syn2</i>
Zellpopulation B	<i>Stx4_syn87</i>	<i>NLS_GFP_mCherry_Syn2</i>
Zellpopulation C	<i>GFP_Snap25</i>	<i>Stx7_GFP_syn2</i>
Zellpopulation D	<i>Galnact_GFP_syn87</i>	<i>Life_mCherry_Syn2</i>
Zellpopulation E	<i>mCherry_GFP_syn87_KDEL</i>	<i>Stx6_syn87_syn2</i>
Zellpopulation F	<i>GFP</i>	<i>Stx13_mCherry_syn87</i>

Fett markierte Sequenzen stellen das für die Lokalisation des Proteins dienliche Gen dar, regulär gedruckte Sequenzen die angehängten Epitope.

2.3.2 Multitransfektion und Co-Seeding

Für die Multitransfektion wurden 4 Wells einer 6-Well-Platte ausgesät und mit 3 bis 4 Plasmiden pro Well transfiziert, entsprechend Tabelle 4. So entstanden die 4 verschiedenen Zellpopulationen A, B, C und D, die insgesamt 13 verschiedenen Proteine exprimierten.

Tabelle 4: Plasmidkombinationen für die Multitransfektion

	Plasmid 1	Plasmid 2	Plasmid 3	Plasmid 4
Zellpopulation A	<i>NLS_GFP_mCherry_Syn2</i>	<i>GFP</i>	<i>Stx4_syn87</i>	<i>GFP_Snap25</i>
Zellpopulation B	<i>Galnact_GFP_syn87</i>	<i>VAMP4_mCherry_GFP_syn87_syn2</i>	<i>mCherry_GFP_syn87_KDEL</i>	
Zellpopulation C	<i>TOM70_mCherry</i>	<i>Endo_GFP_syn87_syn2</i>	<i>Stx13_mCherry_syn87</i>	
Zellpopulation D	<i>Life_mCherry_Syn2</i>	<i>Stx7_GFP_syn2</i>	<i>Stx6_syn87_syn2</i>	

Fett markierte Sequenzen stellen das für die Lokalisation des Proteins dienliche Gen dar, regulär gedruckte Sequenzen die angehängten Epitope.

2.3.2.1 Prinzip des Co-Seedings

Die Zellen wurden nach erfolgter Transfektion erneut ausgesät, ein Schritt, der hier als Co-Seeding bezeichnet werden soll: Nach Ablösen der Zellen aus der 6-well-Platte und Sammeln aller 4 Populationen in einem gemeinsamen Röhrchen erfolgte eine Mischung per Vortex (VV3, VWR). Das erhaltene Zellgemisch konnte anschließend erneut auf eine Poly-L-Lysin-beschichtete 12-well-Platte mit 1ml Medium pro Well ausgesät werden. In jedem Well und auf jedem Deckgläschen befand sich auf diese Weise dieselbe Mischung aus allen 4 Zellpopulationen.

2.3.3 Zweifachtransfektion mit Co-Seeding

Um übersichtlichere Aufnahmen zu erhalten, wurde das Co-Seeding aus Kapitel 2.3.2 mit zweifach transfizierten Zellen wiederholt. Hierzu wurde eine 6-Well-Platte mit den Plasmid-Kombinationen aus Kapitel 2.3.1 transfiziert. Dies ergab 6 Zellpopulationen – eine Population pro Well - mit insgesamt 12 exprimierten Proteinkonstrukten. Diese wurden im Rahmen des Co-Seedings gemischt und auf eine 12-Well-Platte wieder ausgesät.

2.3.4 Co-Seeding mit variabler Zelldichte

Zwecks Findung einer optimalen Zelldichte wurde das Co-Seeding aus Kapitel 2.3.3 in erneut abgewandelter Form wiederholt. Die Zweifachtransfektion und das Mischen der Zellpopulationen gleichen dem vorigen Experiment. Beim abschließenden Aussäen der Zellen wurden jedoch pro Well unterschiedliche Mengen an Zellsuspension genutzt, um eine Abstufung der Dichte zu erzeugen. Es wurden je zwei Wells mit 1300 μl , 1150 μl , 900 μl , 750 μl , 500 μl und 250 μl befüllt.

Das Experiment wurde parallel auf einer zweiten Platte wiederholt. Das Verfahren für beide Platten war identisch, bis auf den Zeitabstand zwischen Aussäen und Transfektion. Eine Platte wurde ausgesät und direkt transfiziert (nach 0 h), die andere erst am nächsten Tag (nach 24 h).

2.3.5 Transfektion der P2A-Plasmide

Die Transfektion der P2A-Plasmide fand auf einer 12-Well-Platte mit zwei Wells pro Plasmid statt. Um eine hohe Zahl transfizierter Zellen zu erreichen, wurde in diesem Experiment abweichend eine Menge von 2 μg DNA pro Well und Plasmid eingesetzt. Zudem kam Lipofectamine 3000® (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz, welches eine höhere Effizienz bei schwierigen Transfektionen verspricht. Der Einsatz dieses Lipofectamines unterscheidet sich in einem Punkt von den übrigen Transfektionen: Während der 5-minütigen Inkubation der DNA in Opti-MEM® (siehe Kapitel 2.3) wurde zusätzlich die doppelte Menge an P3000 Reagent® (Thermo Fisher Scientific) zum Ansatz gegeben. Erst dann erfolgte die Mischung mit Lipofectamine in Opti-MEM®.

2.4 Fusion *on plate*

Die Fusion von Zellen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Ansätze getestet. Bei der Fusion *on plate* bleibt eine der beiden Zellpopulationen stets auf einer Oberfläche, bei der Fusion *free floating* werden die Zellen in Flüssigkeit freischwimmend gemischt.

Für die Transfektionen der beiden zur Fusion bestimmten Zellpopulationen, hier Populationen A und B genannt, wurden die Plasmid-Kombinationen aus Tabelle 5 benutzt.

Tabelle 5: Plasmidkombinationen für die Multitransfektion und Fusion

Zellpopulation A	Zellpopulation B
<i>NLS_GFP_mCherry_Syn2</i>	<i>Galnact_GFP_syn87</i>
<i>GFP</i>	<i>TOM70_mCherry</i>
<i>VAMP4_mCherry_GFP_syn87_syn2</i>	<i>Stx7_GFP_syn2</i>
<i>Stx13_mCherry_syn87</i>	<i>Life_mCherry_Syn2</i>

Fett markierte Sequenzen stellen das für die Lokalisation des Proteins dienliche Gen dar, regulär gedruckte Sequenzen die angehängten Epitope.

Das methodische Vorgehen bei der Transfektion entspricht Kapitel 2.3.2.

Für die Fusion wurden zwei 6-well-Platten und eine 12-well-Platte transfiziert. Das Design der Platten für die Transfektionen sowie der Ablauf der Fusion ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

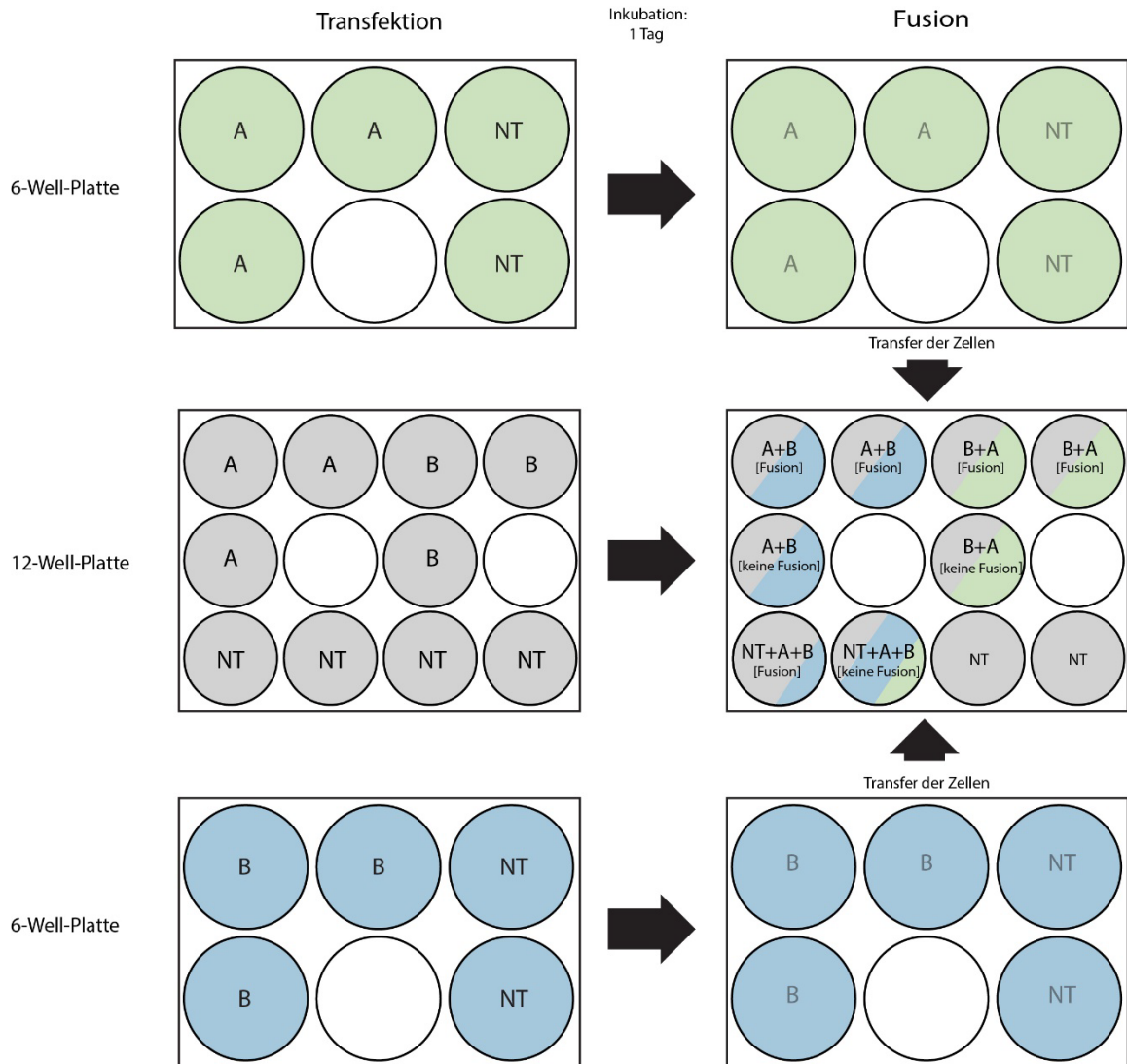


Abbildung 3: Design der Fusion *on plate*.

Dargestellt sind die 6-Well-Platten und die 12-Well-Platte, welche zuerst transfiziert (linke Seite) und am nächsten Tag fusioniert werden (rechte Seite). Dazu werden die Zellpopulationen aus den 6-well-Platten zu jenen aus der 12-well-Platte gegeben. Zwecks Übersicht sind die Zusammensetzungen farblich codiert. A = Zellpopulation A; B = Zellpopulation B; NT = nicht transfiziert.

Nach Inkubation der transfizierten Platten über Nacht begann die eigentliche Fusion. Die 6-Well-Platten wurden zuerst mit PBS (*phosphate buffered saline*, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.3) gespült, dann die Zellen erneut mit Medium bedeckt und in einem Röhrchen gesammelt. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute in einer 4 °C-Zentrifuge (Mega Star 3.0R, VWR) wurde der Zellrückstand in Fusionspuffer (GenomONE - CF EX Kit, Cosmo Bio) gelöst.

Nach Aufteilung der Zellen in einzelne Gefäße entsprechend der späteren Verteilung wurde zu den für die Fusion bestimmten Zellen jeweils 1 µl HVJ-E (*Hemagglutinating Virus of Japan /Sendai Virus – Envelope* aus GenomONE - CF EX Kit Cosmo Bio) gegeben und gründlich gemischt. Die aufgereinigte Virushülle induziert später die Membranfusion. Es folgte eine erneute Zentrifugation der Behältnisse bei 4 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 min. Die Zellen wurden in Fusionspuffer resuspendiert.

In der Zwischenzeit wurde eiskalter Fusionspuffer zu den Zellen der 12-well-Platte gegeben und diese für 5 min auf Eis gestellt. Nach Entfernen des Puffers konnten die vorbereiteten Zellen der 6-well-Platten zu den entsprechenden Wells der 12-well-Platte gegeben werden (siehe Abbildung 3, rechte Seite). Die Platte wurde anschließend bei 4 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute für 5 min zentrifugiert und danach für 15 min im Inkubationsschrank bei 37 °C belassen. Abschließend wurde der Fusionspuffer auf den Zellen gegen Zellmedium ausgetauscht.

2.5 Fusion *free floating*

Die im Folgenden beschriebene Fusion freischwimmender Zellen wurde von den Kollegen Dr. Daniëlle de Jong und Ivan Avilov durchgeführt. Die anschließende Bildgebung erfolgte durch den Autor dieser Arbeit.

Bei der Fusion freischwimmender Zellen wurden mit *Stx7_GFP_syn2*, *mCherry_GFP_SNAP25* sowie *SNAP25_P2A_Stx7* transfizierte Zellen genutzt. Den schematischen Ablauf illustriert Abbildung 4.

Die auf einer 6-Well-Platte fertig transfizierten Zellen wurden mit kaltem Zellmedium gesammelt und nach Transfektion getrennt in 15 ml-Röhrchen verbracht. Es folgte eine Zentrifugation bei 4° C und 1500 Umdrehungen pro Minute für 5 min. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in eiskaltem Fusionspuffer (GenomONE - CF EX Kit, Cosmo Bio) resuspendiert. Eine Dichte von 3 bis 4 Mio. Zellen pro 500 µl wurde angestrebt und falls nötig durch Zählen der Zellen gesichert. In 8 weiteren Röhrchen wurden die Zellpopulationen paarweise gemischt so 8 verschiedene Konditionen erschaffen (Abbildung 4). In 4 der Konditionen wurde anschließend durch Zugabe von HVJ-E die Fusion eingeleitet. Zu den anderen 4 Konditionen wurde kein Virus gegeben, sie dienten als Kontrolle.

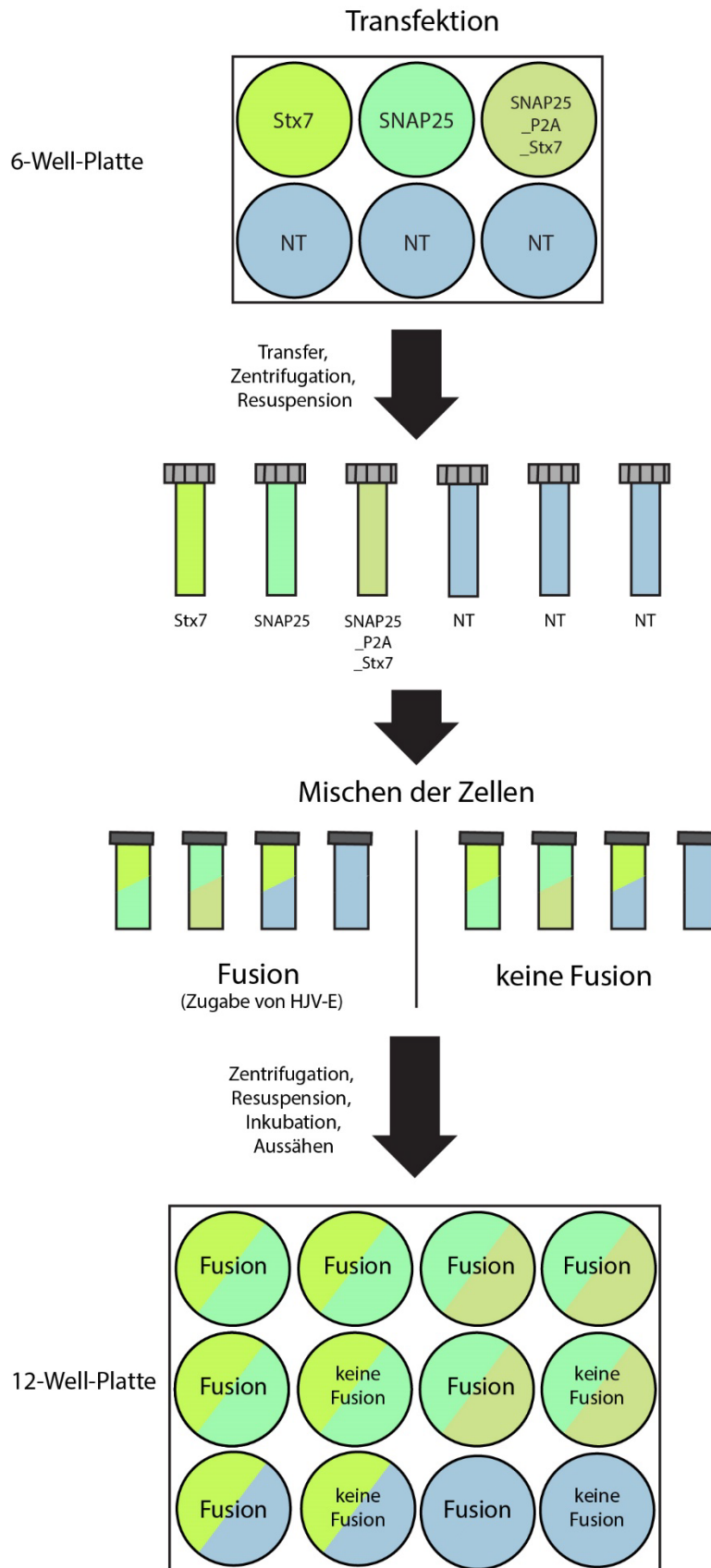


Abbildung 4: Design der Fusion *free floating*.

Überblick über die wichtigsten Arbeitsschritte. Die Zellpopulationen sind farblich gekennzeichnet. NT = nicht transfiziert.

Die Zellen wurden 5 min auf Eis gekühlt und weitere 5 min bei 4° C und 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation bei 37° C für 15 min, ohne Absaugen des Überstandes. Alle 5 min wurden währenddessen die Proben durch leichtes Anstoßen der Gefäße gemischt. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen pro Minute und Raumtemperatur konnte der Überstand entfernt werden und das Zellpellet in warmem Zellmedium gelöst werden. Die Fixierung erfolgte nach 12 h.

2.6 Fixierung und Immunfärbung durch Nanobodys

2.6.1 Fixierung

Bei jedem der durchgeführten Experimente wurde etwa 8 h nach der Transfektion - oder Fusion - die Fixierung der Zellen vorgenommen. Zuerst erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA), was zur Fixierung der Zellen führte. Es schloss sich eine 20-minütige Behandlung mit Quenching Solution (0,1 M NH₄Cl) an, jeweils 1 ml pro Well, um störende Fluoreszenz von PFA-Resten auszulöschen. Vor, zwischen und nach Zugabe der genannten Substanzen wurden die Wells mit 1x PBS gewaschen. Fertig fixierte Zellen wurden mit PBS bedeckt und lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

2.6.2 Sequentielle Immunfärbung

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Immunfärbungen fanden unter Verwendung derselben vier Nanobodys mit unterschiedlichen Fluorophoren statt (Tabelle 6; Tabelle 7). Die Synuclein Nanobodys (NbSyn2, NbSyn87) sowie LAM2 stammten aus den laboreigenen bakteriellen Beständen und wurden von den Kollegen per Maleimid-Bindung an die gewünschten Fluorophore gekoppelt. Den antiGFP-Nanobody, gekoppelt an Atto 488, lieferte die Firma Nano-Tag.

Tabelle 6: Nanobodys bei sequentieller Färbung

Nanobody-Fluorophor	Verdünnung
antiGFP-Atto 488	0,2 µl : 100 µl
NbSyn87-Alexa 488	2 µl : 100 µl
NbSyn2-Alexa 488	2 µl : 100 µl
LAM2-Alexa 546	0,5 µl : 100 µl

Es wird unterschieden zwischen sequentieller und simultaner Färbung. Die sequentielle Immunfärbung wurde bei der Fusion und beim Co-Seeding verwandt. Sie wurde vollständig unter dem Mikroskop ausgeführt. Auf diese Weise entfiel das Problem, exakt dieselben Zellen nach jedem Färbungsschritt wieder zu finden.

Das Deckgläschen, mit den darauf fixierten Zellen, wurde in einer Life Imaging Chamber befestigt und zuerst ohne Färbung vermessen und gebleicht. Das Bleichen sorgte für ein fast vollständiges Erlöschen jeglicher vorhandenen Fluoreszenz, um erneut und ohne den Einfluss ungewollter Signale fluoreszent Färben zu können (siehe Kapitel 2.7). Erst dieser Schritt ermöglichte eine sequentielle Färbung, da 3 der 4 Fluorophore dieselbe Wellenlänge besaßen und ohne vorheriges Bleichen im Bild nicht zu unterscheiden wären.

Nach dem ersten Bleichen wurden die Zellen mit einem speziellen Puffer (1x PBS + 0.1 % Triton X + 2 % Bovines Serumalbumin (BSA)), auch *Blocking Buffer* genannt, für 15 min inkubiert. Besagter Puffer soll durch Triton X die Zellpermeabilisation erhöhen und durch das BSA ein unspezifisches Binden der Nanobodys verhindern. Nach Entfernen des Puffers wurden die Zellen für 30-40 min mit Nanobody-Lösung (50 µl Blocking Buffer + 50 µl PBS + jeweiliger Nanobody in bestimmter Konzentration) inkubiert. Die Reihenfolge der Anwendung und die individuelle Verdünnung der Nanobodys ergeben sich aus Tabelle 6.

Auf die Inkubation folgte dreimaliges Waschen mit 1x PBS, dann eine Messung und der nächste Bleichvorgang.

Der gesamte Zyklus von Nanobody-Inkubation, Waschen, Messen und Bleichen wiederholte sich für jeden der 4 Nanobodys.

2.6.3 Simultane Immunfärbung

Die simultane Färbung kam bei den Experimenten zu zweifach transfizierten Zellen und den P2A-Plasmiden zum Einsatz.

Sie ähnelt im Ablauf der sequentiellen Färbung, ihr voraus ging ebenfalls eine 15-minütige Inkubation mit Blocking Buffer. Die anschließende Färbung begrenzte sich allerdings auf einen einzigen Schritt, bei dem alle Nanobodys in einer gemeinsamen Lösung (50 % Blocking Buffer, 50 % PBS + alle 4 Nanobodys) zu den Zellen gegeben wurden. Dies geschah in einer mit Parafilm ausgelegten Petrischale, auf die pro Coverslip ein 95 μ l-Tropfen der Nanobody-Lösung platziert wurde. Die Coverslips wurden mit der zellbedeckten Oberfläche nach unten in die Tropfen gelegt und auf diese Weise für rund 40 min inkubiert.

Die hier verwandten Nanobodys und ihre Verdünnung entsprachen denen der sequentiellen Färbung. Allerdings erzwang es die simultane Färbung, vier verschiedene Fluorophore zu verwenden, um eine Differenzierung zwischen den einzelnen Nanobodys zu gewährleisten.

Tabelle 7 gibt Auskunft über die hier eingesetzte Nanobody-Fluorophor-Kombination.

Tabelle 7: Nanobodys bei simultaner Färbung

Nanobody-Fluorophor	Verdünnung
antiGFP- Atto 488	0,2 μ l : 100 μ l
NbSyn87-Dylight™ 405	2 μ l : 100 μ l
NbSyn2-CF®633	2 μ l : 100 μ l
LAM2-Alexa Fluor 546	0,5 μ l : 100 μ l

Alle simultan gefärbten Populationen wurden anschließend mit 9 μ l Mowiol® (Sigma-Aldrich) auf Objektträgern fixiert und lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

2.7 Konfokale Bildgebung

Die konfokale Bildgebung für einzeln transfizierte Zellen sowie alle sequentielle Färbung wurde an einem *Laser Scanning Microscope* (LSM) des Typs LSM 510 META (Zeiss) mit einem

Objektiv 63-facher Vergrößerung unter Nutzung der Software ZEN (2009) durchgeführt. Die technische Ausstattung geht aus Tabelle 8: Ausstattung des LSM 510 META, Firma Zeiss hervor.

Tabelle 8: Ausstattung des LSM 510 META, Firma Zeiss

Eingesetzte Laser [Wellenlänge in nm]	Entsprechende Fluorophore
633	CF®633
543	mCherry, Alexa Fluor 546
488	GFP, Atto/Alexa 488
405	Dylight™ 405

Die restliche Bildgebung – soweit nicht anders erwähnt - geschah am LSM 510 mit Korrelations-Spektroskop ConfoCor 2 (Tabelle 9, Zeiss), mit zugehöriger Software und einem ebenfalls 63-fach vergrößernden Objektiv.

Tabelle 9: Ausstattung des LSM 510 - ConfoCor 2, Firma Zeiss

Eingesetzte Laser [Wellenlänge in nm]	Entsprechende Fluorophore
633	CF®633
543	mCherry, Alexa Fluor 546
488	GFP, Atto/Alexa 488
405	Dylight™ 405

Die in den Proteinkonstrukten vorhandenen Epitope mCherry und GFP sowie die Fluorophore mehrerer Nanobodys emittieren auf derselben Wellenlänge Licht, nämlich bei Anregung durch

Laser der Wellenlängen 488 nm und 543 nm. Dies würde es bei Nutzung mehrerer Nanobodys mit identischem Fluorophor erschweren, das Signal des neuen Nanobodys von dem des vorherigen zu differenzieren. Daher wurde es notwendig, die im Bildausschnitt vorhandene Fluoreszenz nach Aufnahme eines Bildes auszubleichen, bevor eine weitere Färbung und Bildgebung erfolgen konnte.

Das Bleichen geschah am LSM META mittels der „*Bleach*“-Funktion der Software. Hierbei scannt der Laser bei erhöhter Leistung das Präparat, um die Fluorophore abzuschwächen. Es erfolgten 40 Wiederholungen mit den Lasern von 488 nm, 514 nm und 543 nm. Die Stärke der Laser wurde im Dialogfeld „*Bleach*“ auf 100% festgelegt. Der Bleichvorgang wurde hierbei mit der Funktion „*Regions*“ auf einige Zellen in der Mitte des Bildes beschränkt, um im Vergleich mit den verbliebenen ungebleichten Zellen den Erfolg des Bleichens feststellen zu können.

2.7.1 Bildgebung für Fusion und Co-Seeding

Die Bildgebung der 3- oder 4-fach transfizierten Zellen aus Fusion und Co-Seeding geschah am LSM META. Die fixierten Zellen beider Experimente wurden sequentiell gefärbt und auf dieselbe Weise vermessen:

Zuerst wurden die noch ungefärbten Zellen in den Wellenlängen 488 nm und 543 nm angeregt, um die Fluoreszenz der Epitope mCherry und GFP abzubilden. Nach jedem Schritt der sequentiellen Färbung erfolgte eine erneute Aufnahme mit denselben Wellenlängen. Nach den Aufnahmen war jeweils ein Bleichvorgang erforderlich, gefolgt von einem Kontrollbild und anschließender Inkubation mit dem nächsten Nanobody.

2.7.2 Bildgebung der Einzeltransfektion

Die Bildgebung der einzeln transfizierten Zellen wurde ebenfalls am LSM META vorgenommen.

In den Messungen entfiel die Immunfärbung, da hier lediglich die Lokalisation der transfizierten Proteine in der Zelle ermittelt werden sollte, was anhand der in fast allen Proteinen vorhandenen fluoreszenten Epitope GFP und mCherry bereits möglich ist. Da die Proteinkonstrukte Stx6_syn87_syn2 und Stx4_syn87 keines der fluoreszenten Epitope enthalten, wurde hier auf Zellen zurückgegriffen, die mit einem fluoreszenten Antikörper gegen Stx6 und Stx4 angefärbt

wurden. GFP wurde mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm, mCherry mit 543 nm und der fluoreszente Antikörper mit 633 nm angeregt.

Die Messung erfolgte in zwei Runden. Zuerst entstand ein Übersichtsbild mehrerer Zellen in nur einer Ebene. Darauf folgte die Wahl einer repräsentativen Zelle und ein Zoom auf ungefähr das 3-fache, um die Zelle bildausfüllend darzustellen und die Proteinverteilung genauer abbilden zu können. Die Aufnahme erfolgte als Z-Stack mit 1 μm Intervall in den 5 für die Darstellung der Proteine günstigsten Ebenen.

2.7.3 Bildgebung der Zweifachtransfektion und P2A-Transfektion

Die Messung der zweifach transfizierten Zellpopulationen, sowie der P2A-transfizierten Zellen geschah am LSM ConfoCor 2.

Die bereits simultan gefärbten Zellen wurden entsprechend der genutzten Fluorophore nacheinander in den Wellenlängen 633 nm, 543 nm, 488 nm und 405 nm angeregt und Aufnahmen von je einer repräsentativen Zelle in einer Ebene angefertigt.

2.7.4 Bildgebung des Co-Seedings mit optimierter Zelldichte

Die Bildgebung zum Vergleich der Zelldichte bei Co-Seeding erfolgte abweichend mit einem Olympus IX71, einem Objektiv 20-facher Vergrößerung und der Software CellSens Dimension V1 in ungefärbtem Zustand. Nahaufnahmen ausgewählter Zellen erfolgten wiederum in den Wellenlängen 633 nm, 543 nm, 488 nm und 405 nm am LSM META nach simultaner Färbung.

2.8 Design der P2A-Plasmide

Ziel des Designs neuer Plasmide war, das Limit der maximal pro Zelle transfizierbaren DNA-Sequenzen zu erhöhen und die Effizienz der Transfektion zu optimieren. In diesem Zuge sollten die Plasmidsequenzen von Grund auf überarbeitet werden.

Zuerst wurden die vorhandenen Nukleotid-Sequenzen der bereits benutzten Plasmide überprüft. Zu diesem Zwecke wurde ein Abgleich mit Online-Datenbanken unter Nutzung der *Basic Local Alignment Tool* (BLAST®)-Software des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und der *Universal Protein*

Resource (UniProt, <http://www.uniprot.org/blast/>) durchgeführt. Die erfolgreich geprüften Sequenzen für die Proteine und die Nanobody-Epitope wurden übernommen. Auf der Basis von Erfahrungswerten der Arbeitsgruppe und Rücksprache mit Kollegen wurden die Linker-Sequenzen, die zwischen den einzelnen Epitop-Sequenzen stehen, gegen kürzere Sequenzen ausgetauscht, um das Plasmid kleiner zu gestalten. Ebenso wurde der bisherige pcDNA3.1-Vektor gegen den pCMV3tag3-Vektor eingetauscht, der nur eine Resistenz (Kanamycin) aufweist, aber deutlich kleiner ist.

Die entscheidendste Neuerung stellte die Einführung der P2A-Sequenz dar, die für einen selbst-teilenden Protein-Abschnitt kodiert. Zwischen zwei Proteinen in einem Plasmid platziert, können auf diese Weise mit nur einem Plasmid zwei Proteine in einer Zelle exprimiert werden (Kapitel 1.5). Für die neuen Plasmide mussten also jeweils zwei Proteinkonstrukte zu einem Plasmid zusammengeführt werden. Um die Protein-Paarung sinnvoll zu gestalten, sollten möglichst solche Proteinkonstrukte kombiniert werden, die in der Zelle ein unterschiedliches Verteilungsmuster aufweisen. Die optische Erkennung einer erfolgreichen Transfektion würde hierdurch enorm erleichtert.

Auf Basis von Bildern der einzeln transfizierten Zellen wurde die Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle verglichen und auf dieser Grundlage die P2A-Plasmide erstellt. Für die Erstellung und Überarbeitung der Nucleotid-Sequenzen wurde das Programm *A plasmid Editor* (ApE, by M. Wayne Davis) benutzt. Die fertigen Protein-kodierenden Sequenzen wurden abschließend mit einer Kozak-Sequenz versehen, um die Translationseffizienz zu steigern, und der Firma Genscript zur Bestellung übermittelt.

2.9 Transformation der Plasmide

Die in den zuvor beschriebenen Methoden verwandten Plasmide der Firma Genscript wurden in kleinen Mengen bestellt und eigenständig im Labor vervielfältigt.

Hierzu wurden 50 μl kompetenter *E. coli*-Bakterien (DH5 α -Zellen, Alpha-Select Bronze Efficiency, Bioline) pro Plasmid aus dem -80° C-Gefrierfach auf Eis aufgetaut. Die in fester Form gelieferten Plasmide in Menge von 4 μg pro Plasmid wurden in 1 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ destilliertem Wasser (dest. H₂O) gelöst und jeweils 1 μl dieser Lösung für die Transformation genutzt.

Zuerst wurden in einem Eppendorf-Gefäß (E-Cup) die 50 μl der Bakterien mit dem entsprechenden 1 μl des Plasmids gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen für 38 s bei 42° C im Wasserbad vorsichtig bewegt, bevor sie wieder einige

Minuten auf Eis gelagert wurden. Es folgte die Zugabe von 500 µl S.O.C.-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20mM Glucose) pro E-Cup und eine Inkubation von 1 h bei 37° C und 400 Umdrehungen pro Minute im Thermomixer (ThermoMixer F1.5, Firma Eppendorf)

Anschließend wurde den Cups 100 µl entnommen und auf einer mit Kanamycin beimpften Agar-Platte ausgestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37° C gelagert.

Am darauffolgenden Vormittag wurde eine Bakterienkolonie jeder Platte ausgewählt, per Pipettenspitze aufgenommen und in Röhrchen mit jeweils 5 ml Kanamycin/LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l NaCl, 0,1 % Kanamycin) überführt. Die Röhrchen wurden für 5 h bei 37° C und 250 Umdrehungen pro Minute im Shaker Incubator (Firma Memmert) aufbewahrt, um eine Vorkultur zu erhalten. Im Fall eines sichtbaren Bakterienwachstums im Röhrchen wurde 1 ml jeder Vorkultur in ein neues Gefäß mit 150 ml Kanamycin/LB-Medium überführt und über Nacht bei 180 Umdrehungen pro Minute und 37° C im Thermo-Mixer inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 Umdrehungen pro Minute und 4° C für 20 min. Für die nachfolgenden Schritte wurden Filter, Puffer und Lösungen des NucleoBond Xtra Midi®-Sets der Firma Macherey-Nagel genutzt. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen und das Pellet in 8 ml *Resuspension Buffer* (Macherey-Nagel) pro Ansatz gelöst.

Es folgte die Zugabe von 8 ml Lysis Buffer (Macherey-Nagel), der zur Lyse der Zellen führte. Zur Neutralisation wurde 8 ml *Neutralisation Buffer* (Macherey-Nagel) zugegeben. Zeitgleich wurden die Midi-Filterröhrchen (Macherey-Nagel) aufgestellt und mit je 15 ml *Equilibration Buffer* (Macherey-Nagel) vorbehandelt. Die lysierten Bakterien wurden bei 11000 Umdrehungen pro Minute und 4° C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in den Midi Filter gegeben, um die DNA an den Filter zu binden. Dieser wurde anschließend mit 5 ml Filter Buffer (Macherey-Nagel) und 35 ml *Endo Wash Buffer* (Macherey-Nagel) gespült. Durch Zugabe von jeweils 15 ml *Wash Buffer* (Macherey-Nagel) wurde die DNA aus den Filtern in ein neues Röhrchen gespült und mit 3,5 ml 100 % Isopropanol versetzt. Es folgte eine Zentrifugation für mehr als 1 h bei 4 °C und 11000 Umdrehungen pro Minute. Das entstandene Pellet wurde vorsichtig mit Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend wieder in 150 µl dest. H₂O gelöst.

Aus der Lösung wurden jeweils 1,3 µl entnommen, der Konzentrationsmessung (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific/Peqlab) zugeführt und das Ergebnis in ng/µl auf den Gefäßen notiert.

Zur einfacheren Handhabung erfolgte eine anschließende Verdünnung auf eine Konzentration von 1 µg/µl.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war, den *proof of principle* der kombinatorischen Proteinerkennung weiterzuführen. Es sollten mithilfe von nur 4 Nanobodys bis zu 15 Proteine zugleich bildgebend identifiziert werden. Diese multiplexe Bildgebung sollte durch Nutzung von Proteinen gelingen, die mit unterschiedlichen Kombinationen derselben 4 Epitope versehen wurden. Das Muster der bindenden Nanobodys könnte so die Proteine in eindeutiger Weise markieren, obwohl die Zahl der erkannten Proteine die der eingesetzten Nanobodys um ein Vielfaches übertrifft. Für zuverlässige und genaue Analysen sollte außerdem ein hochauflösendes Rasterkraftmikroskop zum Einsatz kommen.

Zu Beginn erfolgten grundlegende Messungen am AFM, um diese Form der Bildgebung zu erschließen. Die erste Anwendung der Kombinatorik wurde hingegen in herkömmlicher konfokaler Bildgebung mit eigens transfizierten Zellen angestrebt.

Für obige Zielsetzung waren Zellen gewünscht, die insgesamt 15 gezielt transfizierte Proteine aufweisen. Vorausgehende Experimente hatten allerdings gezeigt, dass eine Transfektion von mehr als 4 Plasmiden pro Zelle problematisch ist (Wassman M., nicht veröffentlichte Daten). Daher galt es, diese Prämisse auf andere Weise umzusetzen. Dazu zählte die Nutzung von P2A-Sequenzen, die Fusion mehrerer Zellen, sowie das Co-Seeding. Am Schluss soll ein Ausblick auf die Entwicklung einer automatischen Bildanalyse stehen, die eine schnelle und verlässliche Auswertung der hier entwickelten Methode verspricht.

3.1 Fluorophor-unabhängige Bildgebung am AFM

Das Prinzip der kombinatorischen Proteinerkennung soll in Zukunft auf das AFM übertragen werden. Um sicherzugehen, dass eine spätere Anwendung valide Ergebnisse liefert, war einige Vorarbeit am Mikroskop notwendig.

Erstens sollten die für unsere Zwecke korrekten Einstellungen und Modi für das AFM gefunden werden.

Zweitens sind in späteren Phasen des Projektes Experimente mit Streptavidin und Biotin am AFM angedacht, da die Bindungseigenschaften dieser Proteine hinlänglich bekannt sind. Um eine solide Basis für solche Versuche zu legen, sollten im Rahmen dieser Arbeit bereits Biotin-Oberflächen topographisch vermessen werden, um eine Negativkontrolle für weitergehende Experimente zu bieten.

3.1.1 Optimierung der Einstellungen am AFM

Um die Validität der Messungen sicher zu stellen, wurde an jedem Messtag die korrekte Einstellung des AFM überprüft. Ein geeigneter Cantilever musste gewählt und Laser sowie Detektor manuell auf diesen gerichtet werden (Abbildung 5).

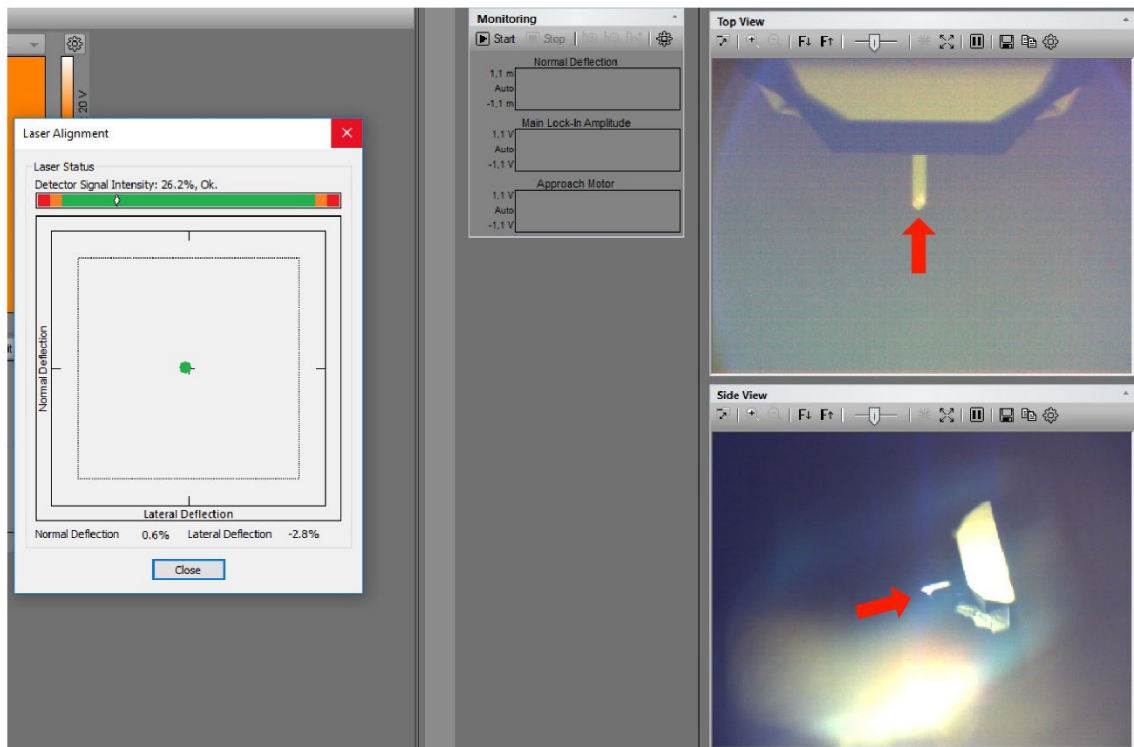


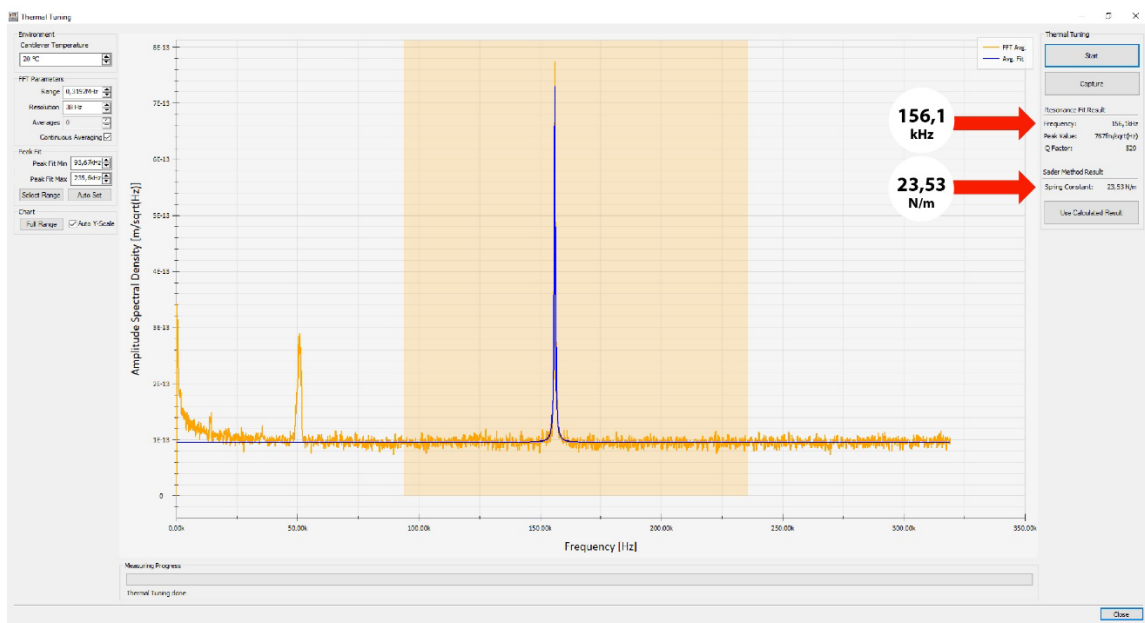
Abbildung 5: *laser alignment* eines TAP190A1-G.

Rechts die Kamerabilder des Cantilevers seitlich und von oben (Pfeile), links das Fenster "Laser Alignment". Der farbige Signalbalken verrät die Intensität des Lasers auf dem Detektor, der grüne Punkt die Position auf dem Detektor. Die Deflektion (normal und lateral) wird zusätzlich in Prozent angegeben.

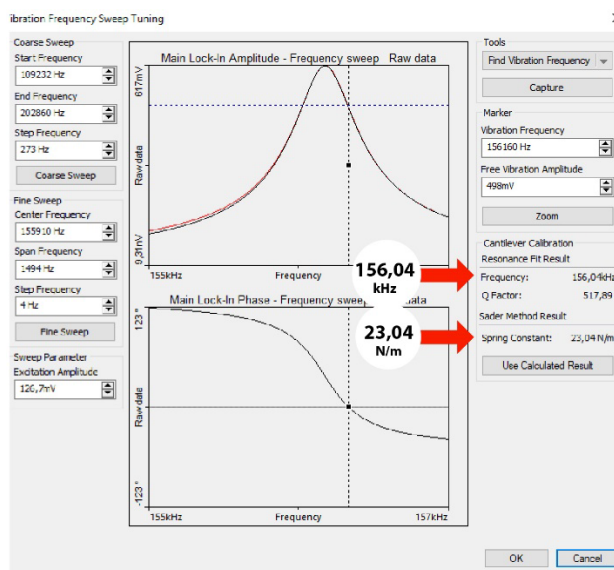
Die Kamerabilder geben einen Hinweis auf die korrekte Positionierung des Lasers auf der Spitze des Cantilevers. Der Detektor zeigt in diesem Beispiel eine Signalstärke von 26,2 %, was im Rahmen dessen liegt, was die Software benötigt. Normale Deflektion (0,6%) und laterale Deflektion (-2,8%) liegen im erwünschten Bereich von maximal 5%.

Ebenso wurde die Resonanzfrequenz und die Federkonstante bestimmt und die Herstellerangaben auf Richtigkeit geprüft, siehe Abbildung 6.

a Thermal Tuning



b Frequency Sweep in Luft



c Frequency Sweep in Flüssigkeit

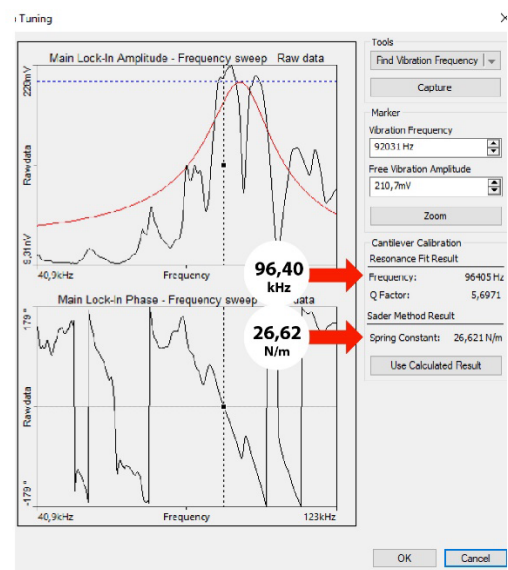


Abbildung 6: Bestimmung der Resonanzfrequenz und Federkonstante eines TAP190A1-G.

(a) Resultat des *thermal tunings*. Neben der Auftragung der Amplitude gegen die Frequenz der Schwingungen werden Resonanzfrequenz und berechnete Federkonstante angezeigt (Pfeile). (b) Resultat des *frequency sweeps* des Cantilevers in Luft. Auftragungen der Amplitude sowie Phase gegen die Frequenz der Schwingungen. Vibrationsfrequenz sowie Federkonstante ähneln den Werten aus a (Pfeile). (c) *frequency sweep* desselben Cantilevers in Flüssigkeit. Für Vibrationsfrequenz sowie Federkonstante, siehe Pfeile.

Die Angaben aus *thermal tuning* und *frequency sweep* decken sich, sowohl in der Federkonstante (23,53 N/m und 23,04 N/m) als auch in der Resonanzfrequenz (156,1 kHz und 156,04 kHz). Dies ist eine Abweichung zu den Angaben des Herstellers, der eine Frequenz von im Mittel 190 kHz und eine Federkonstante von 48 N/m verspricht.

Die ermittelten Werte werden in das System übernommen, das AFM ist somit einsatzbereit. Zusätzlich kann vorab kann per Nullmessung eine Information über die Genauigkeit der Messwerte gewonnen werden (Abbildung 7).

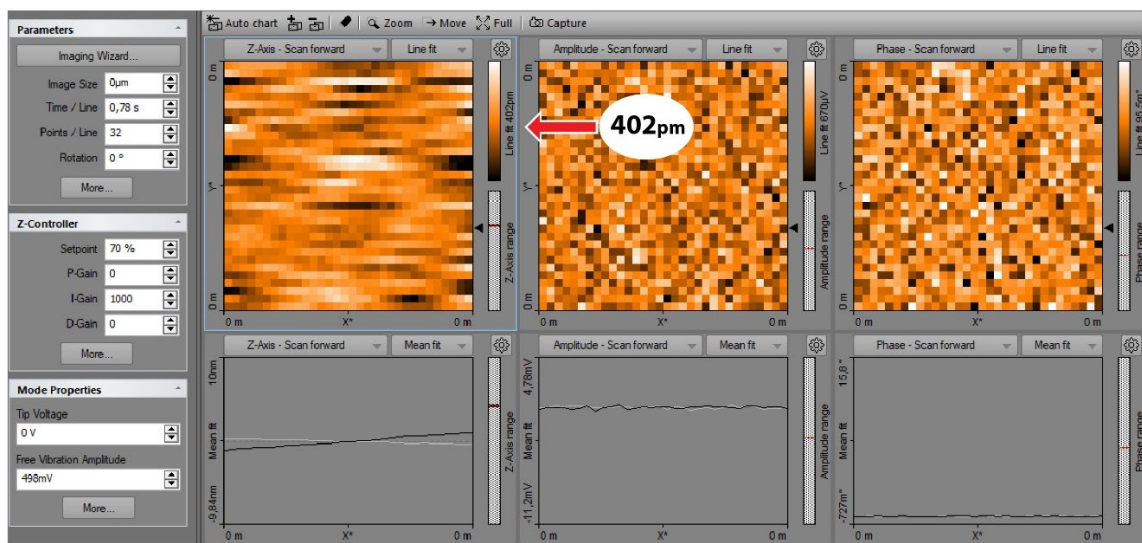


Abbildung 7: Nullmessung mit einem TAP190A1-G.

Biotin-beschichtete Oberfläche. Der Tip vermisst wiederholt denselben Punkt der Probe im Tapping Mode (siehe "Image Size" = 0). Die Höhenskala im Fenster "Z-Axis Scan forward" zeigt die gesamte Spanne der Messwerte in z-Richtung (Pfeil).

In einer idealen Nullmessung sollte das AFM wiederholt, also bei jeder Schwingung, exakt denselben Höhenwert registrieren und dadurch ein einfarbiges Bild erzeugen. In der Realität dagegen ergibt sich eine Schwankung in der Höhe. Aus der Höhenskala in Abbildung 7 beispielsweise ergibt sich eine Spanne der z-Werte von 402 pm. Dieser Wert deutet auf eine grundsätzliche Schwankung der Werte um 402 pm hin, die in weiteren Experimenten berücksichtigt werden kann.

3.1.2 Kontrollexperimente mit Biotin-Oberflächen

Damit die Übertragung der Nanostamps-Methode auf das AFM auf solidem Boden steht, sollten vorab Biotin-Oberflächen mit regulären AFM-Tips vermessen werden. So wurde ein rein topografisches Bild der Oberflächen gewonnen (Abbildung 8). Gleichzeitig konnten somit die Messparameter für diese Methode optimiert werden. So wurden die Versuche bewusst in Flüssigkeit durchgeführt und mit Cantilevern, die auch für die Messung molekularer Bindungskräfte geeignet sind.

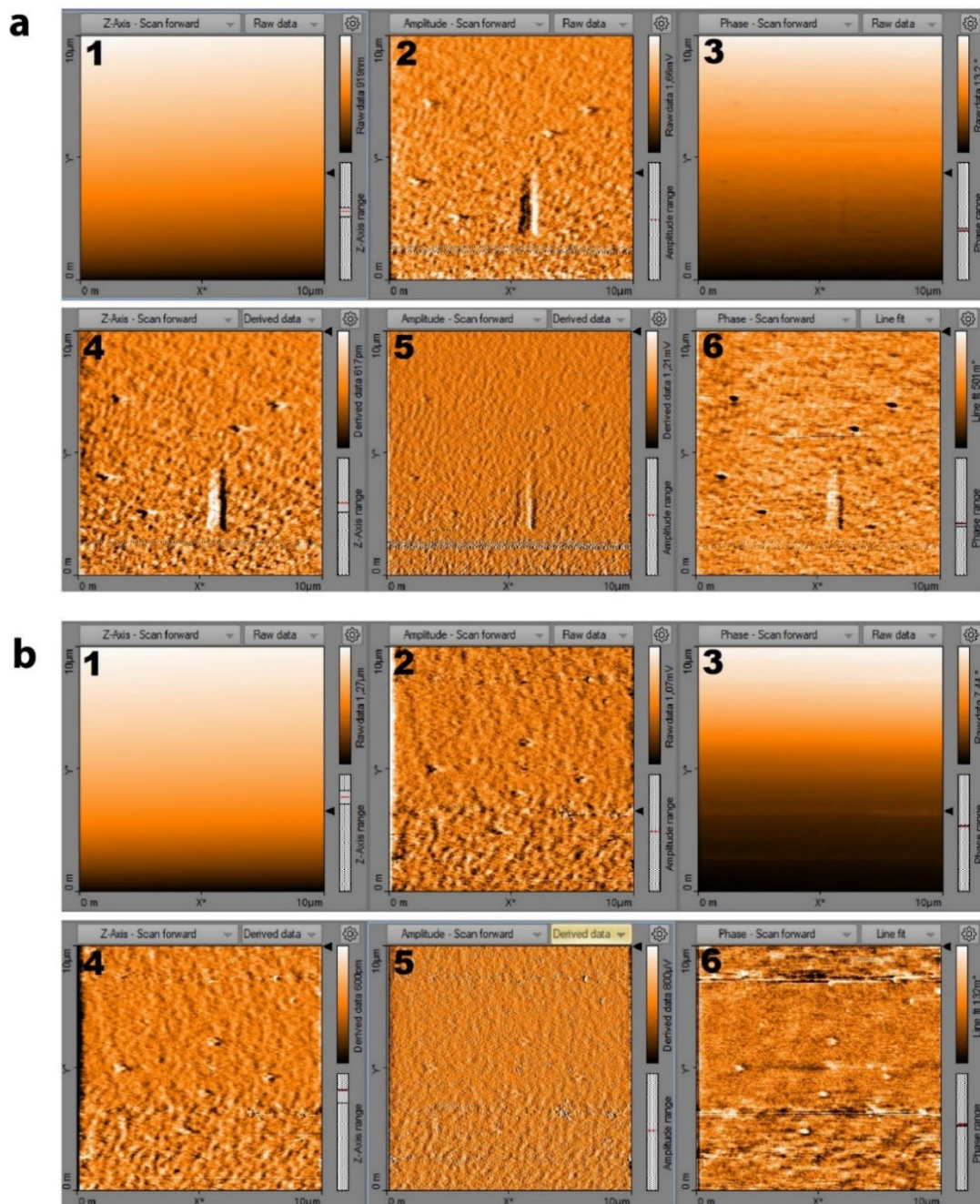


Abbildung 8: Messung einer Biotin-Oberfläche mit nicht-funktionalisierten AFM-Tips.

Zwei willkürlich gewählte Ausschnitte (a) und (b) der Biotin-Oberfläche, dargestellt in je sechs verschiedenen Auftragsungen (1) bis (6). X- und Y-Achse stellen Breite und Länge des Messfeldes dar, die z-Höhe ist farblich kodiert (weiß: höchster Punkt; schwarz: tiefster Punkt). Messungen erfolgten im *Phase Contrast Mode* in Flüssigkeit mit einem TAP190Al-G.

- (1) Rohdaten aus gemessener Z-Höhe
- (2) Rohdaten der Amplitude des Cantilevers
- (3) Rohdaten aus Phasenkontrast
- (4) *Derived Data** aus gemessener Z-Höhe
- (5) *Derived Data** der Amplitude des Cantilevers
- (6) *Line Fit** aus Phasenkontrast

**Derived Data* und *Line Fit* sind von Nanosurf entworfene Aufbereitungsformen der Daten. Für ausführliche Erläuterungen, siehe Flex AFM Operating Instructions (NANOSURF AG 2017)

Die Aufnahmen zeigen zufällig ausgewählte Ausschnitte der Oberfläche mit einer plausiblen Oberflächenstruktur. In Abbildung 8 a fällt zudem in *Derived Data*-Ansicht eine längliche Struktur auf. Eine Verunreinigung der Oberfläche oder ein Messartefakt sind hier denkbar. Eine topografische Darstellung der Oberflächen ist also mit unseren Mitteln möglich und der Weg für weitere Experimente auf Biotin-Oberflächen geebnet.

Zunächst muss unsere Methode jedoch in der konfokalen Bildgebung angewandt werden. Die Ergebnisse dieses Prozesses schildern die kommenden Kapitel.

3.2 Erhöhung der Proteinzahl bei multiplexer Bildgebung

Die Zielsetzung sah 15 Proteine vor, an denen die Methode getestet werden sollte. Um die Zahl gewünschter Proteinkonstrukte pro Zelle auf bis zu 15 Proteine zu erhöhen, wurden drei Ansätze parallel getestet.

Erstens eröffnen P2A-Sequenzen die Möglichkeit, die Ergiebigkeit der Transfektion zu verdoppeln und zwei Proteine pro Plasmid gleichmäßig zu exprimieren. Zweitens ist die Fusion mehrerer, bereits transfizierter Zellen denkbar, um eine Art Megazelle mit doppelter Proteinzahl zu erschaffen. Drittens könnten mehrere Zellpopulationen mit verschiedener Transfektion gemischt und räumlich nah aneinander gebracht werden (Co-Seeding, siehe Kapitel 2.3.3). Dies würde eine ebenso hohe Zahl an Proteinen pro Aufnahme ermöglichen.

3.2.1 P2A-Plasmide

3.2.1.1 Zielgerichtete Paarung der Proteinkonstrukte

Der Entwurf von P2A-Plasmiden erforderte zuerst eine sinnvolle Paarung der Proteinkonstrukte. Als Bedingung für die Bildung von Paaren sollte gelten, dass diese sich auf möglichst unterschiedliche Zellorganellen verteilen, z. B. den Golgi-Apparat und die Zellmembran (Abbildung 9). Zweitens sollten beide Proteine möglichst unterschiedliche Kombinationen der Epitope (GFP, mCherry, syn2, syn87) enthalten.

Als Grundlage dienten Aufnahmen von Zellen, die mit den einzelnen Plasmiden transfiziert wurden, um einen Vergleich der intrazellulären Verteilung vorzunehmen (Abbildung 9).

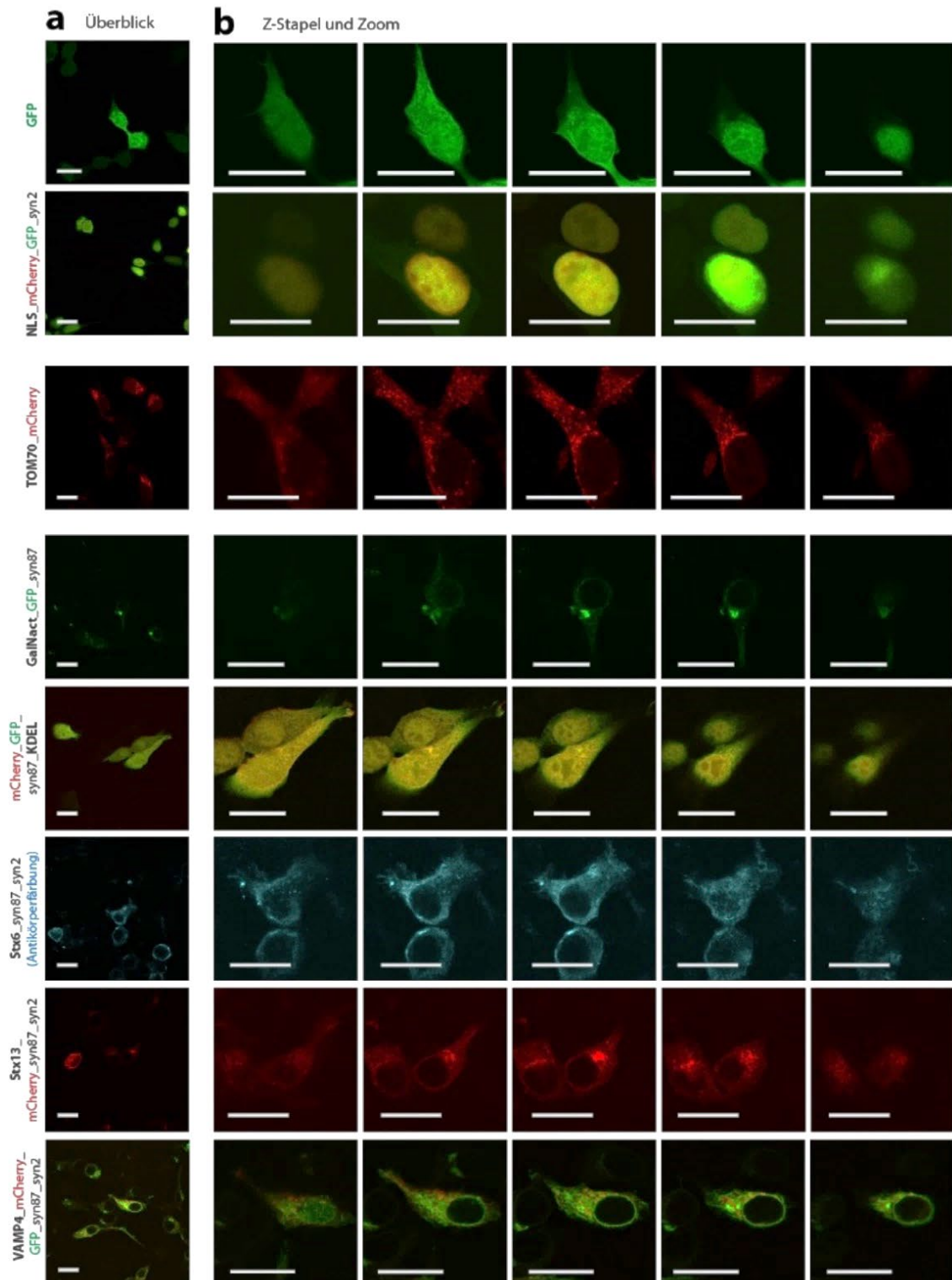


Abbildung 9: Expression der Proteinkonstrukte in einzeln transfizierten Zellen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle 13 zur Verfügung stehenden Proteine hier abgebildet **(a)** Übersichtsaufnahme repräsentativer Zellen. Aufnahmen der Epitope GFP (grün) und mCherry (rot). Konstrukte, die diese Epitope nicht enthalten, wurden mit Antikörpern gefärbt (blau). **(b)** Z-Stack der Zelle in 5 Ebenen. Skalierbalken, 20 μm .

Das Ergebnis der Paarung der Proteine ist Abbildung 10 zu entnehmen. Es entstanden 6 Paarungen.

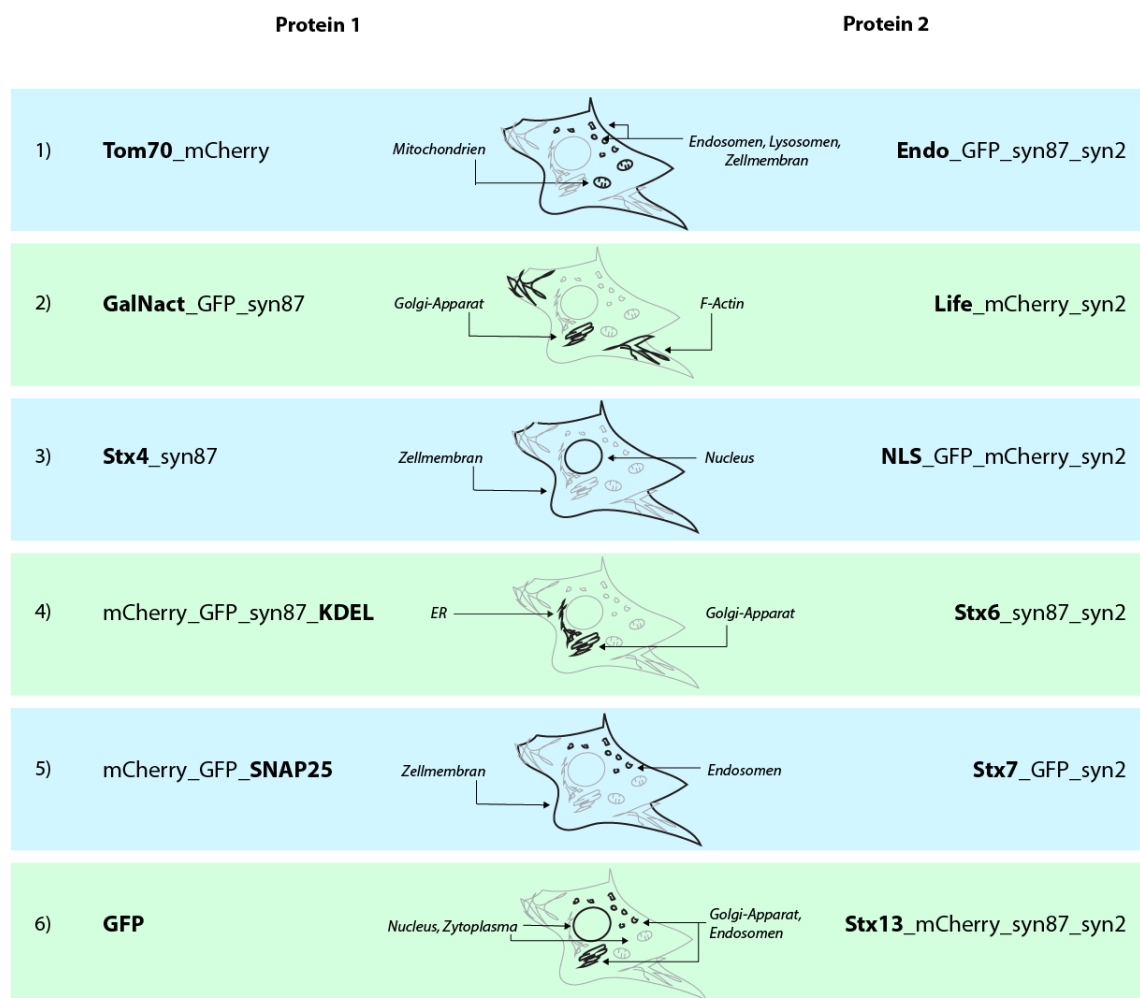


Abbildung 10: Paarung der Proteinkonstrukte als Grundlage für ein P2A-Design.

Links und Rechts: Namen der Proteinkonstrukte. Mitte: Schematische Darstellung einer Zelle mit erwarteter Lokalisation beider Proteine. Das lokalisierende Kernprotein ist fett gedruckt, die Epitope regulär.

3.2.1.2 Design der P2A-Plasmide

Der Entwurf von P2A-Plasmiden versprach nicht nur eine gesteigerte Wirksamkeit der Transfektionen durch einen doppelten Ertrag an exprimierten Proteinen. Es wurden außerdem kürzere Linker-Sequenzen zwischen den Epitopen und ein kleinerer Vektor (pCMV3tag3, siehe Abbildung 11) genutzt, um die Größe der Plasmide zu minimieren und die Aufnahme in die Zellen zu erleichtern. Abbildung 11 illustriert den schematischen Aufbau der entworfenen Plasmide anhand von *TOM70_P2A_Endo*.

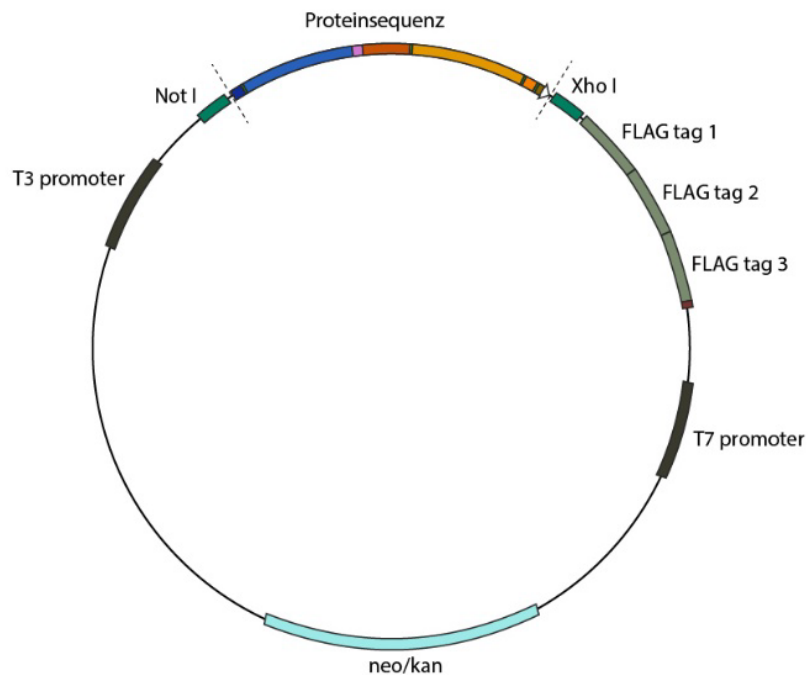
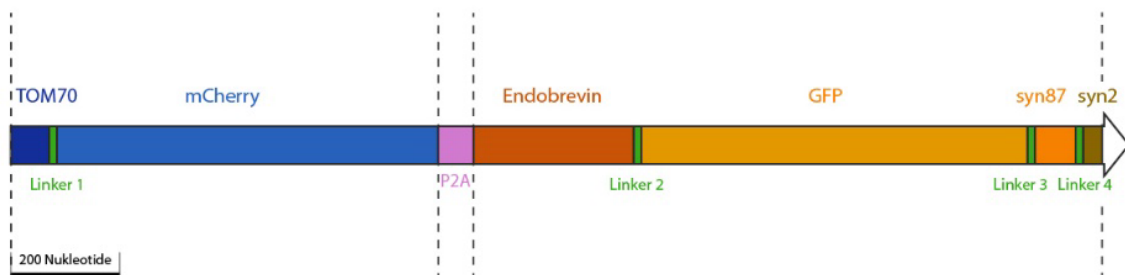
a pCMV3tag3-Vektor mit Proteinsequenz**b** Epitope von TOM70_P2A_Endobrevin

Abbildung 11: Aufbau der Plasmide und Proteinsequenzen am Beispiel *TOM70_P2A_Endobrevin*.

(a) pCMV3tag3-Vektor. Dargestellt sind wesentliche Abschnitte des Vektors sowie die Position der Protein-kodierenden Sequenz. Bis auf die Proteinsequenz ist der Vektor für alle entworfenen Plasmide identisch. Not I, Xho I: Restriktionsenzyme. Neo/kan: Neomycin/Kanamycin-Resistenz. **(b)** Nähere Aufschlüsselung der Sequenz des P2A-Proteins. Skalierbalken, 200 Nucleotide.

3.2.1.3 Transfektion mit P2A-Plasmiden

Nach Erhalt der neuen P2A-Plasmide galt es, die Funktionsfähigkeit derselben zu testen. Die Anwendung der P2A-Plasmide zeigt Abbildung 12. Zum Vergleich wurden Zellen mit je zwei herkömmlichen Plasmiden transfiziert, deren Kombination den P2A-Plasmiden entspricht. Bei

voller Funktion der P2A-Plasmide wäre ein ähnliches Proteinmuster in beiden Fällen zu erwarten.

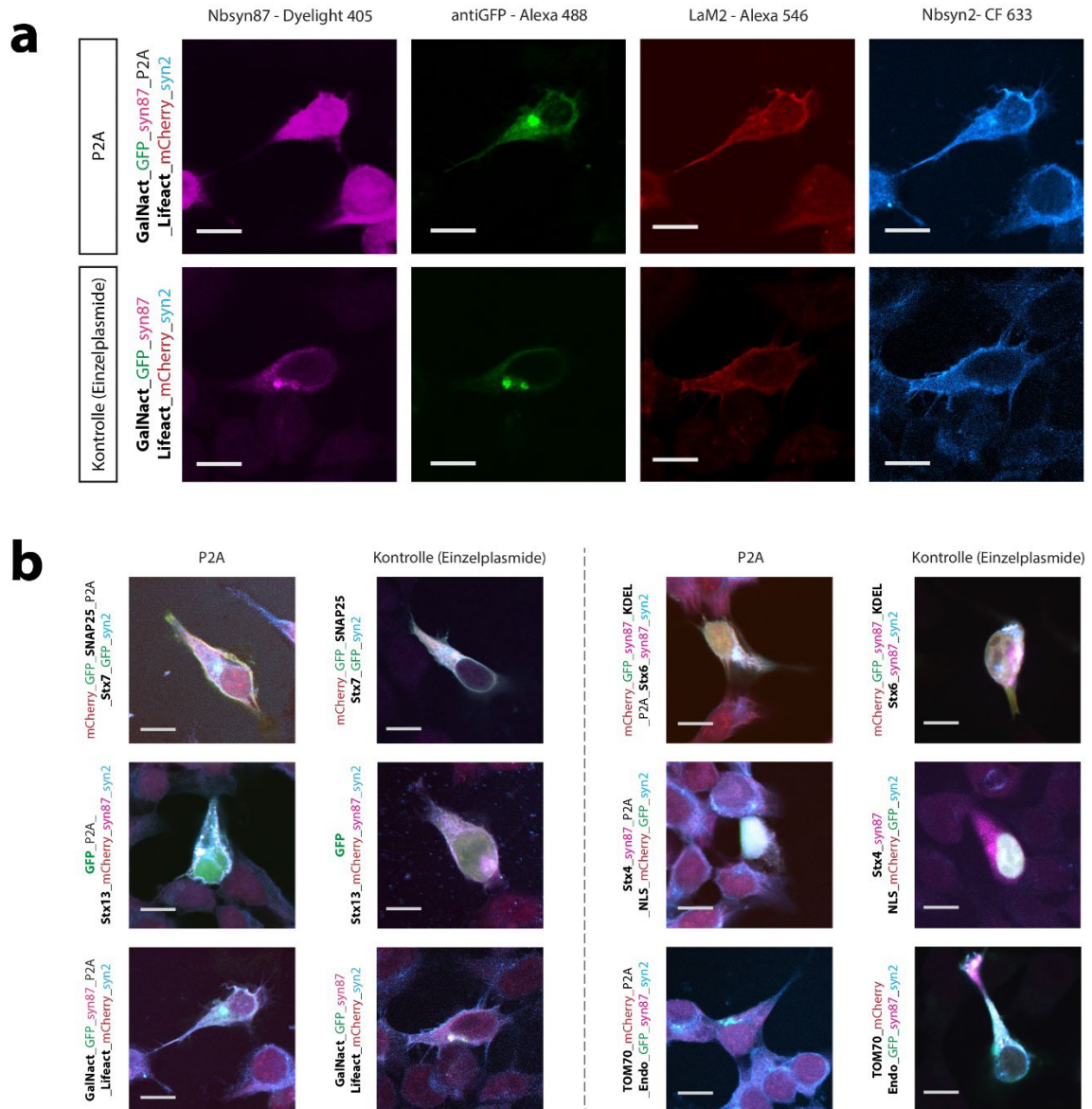


Abbildung 12: Anwendung der P2A-Plasmide.

(a) Aufschlüsselung der einzelnen Epitope eines Proteins anhand des Beispiels GalNact_P2A_Lifeact. Die zusammen transfizierten Einzel-Plasmide *GalNact* und *Lifeact* dienen als Kontrolle. Die Epitope sind in Beschriftung und Aufnahmen farbig identisch kodiert. **(b)** Bilder aller P2A-Populationen im Vergleich mit Einzel-Plasmiden gleicher Kombination. Aufnahmen der Epitope wurden überlagert, die farbige Kodierung entspricht a. Skalierbalken, 15µm.

Die Überlagerung der farbigen Aufnahmen lässt auf die Lokalisation der verschiedenen Proteine schließen (Abbildung 12, a). Dies sei am Beispiel des Paares **GalNact/Lifeact** erläutert.

Das Protein **GalNact** besitzt die Epitope syn87 und GFP, **Lifeact** dagegen die Epitope mCherry und syn2. Einzeln betrachtet geben die Epitope daher die Struktur und Lokalisation ihres Proteins wieder (Abbildung 12, a). Das Signal von Dyelight 405 und Alexa 488 lässt deswegen auf Galnact schließen. Alexa 546 und CF 633 wiederum zeigen die Struktur von Lifeact. Die farbige Überlagerung der Einzelbilder ergibt so für jedes Proteinpaar ein typisches Erscheinungsbild (Abbildung 12, b).

Die exakte Funktion der Sequenz lässt sich zwar mit diesen Aufnahmen nicht nachweisen. Die Strukturen in den P2A-Zellen und ihren Kontrollen zeigen aber durchweg Ähnlichkeit, eine grundlegende Funktion der P2A-Sequenz ist also anzunehmen. Daher stellen P2A-Sequenzen ein nützliches Werkzeug dar, erreichen aber keinesfalls das Ziel von 15 Proteinen pro Zelle. Ein möglicher Ansatz hierfür wäre die Fusion transfizierter Zellen, wie im nächsten Kapitel aufgezeigt wird.

3.2.2 Fusion multitransfizierter Zellen

Die Fusion stellt ein theoretisch einfaches Mittel dar, große Zellen mit großer Zahl an Proteinen zu erhalten. Zwei verschiedene Fusionsmethoden sollten verglichen werden: Die Fusion von Zellen auf einer Oberfläche und die Fusion freischwimmender Zellen (Abbildung 13).

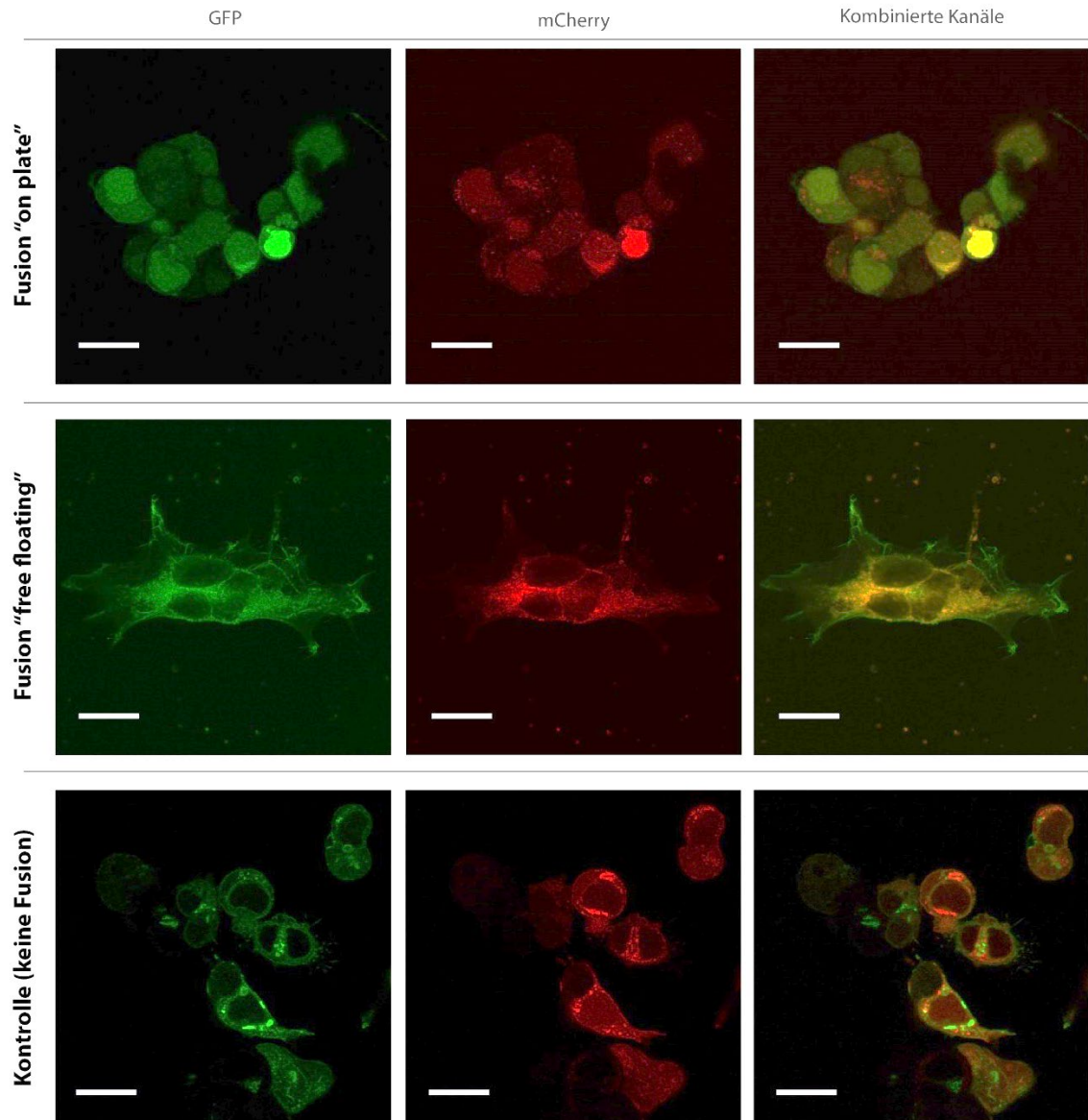


Abbildung 13: Fusion transfizierter Zellen *on plate* und *free floating*.

Die Kontrolle zeigt Zellen, die keiner Fusion unterzogen wurden. In beiden Fusionsmethoden liegen die Zellkerne eng zusammen. Die Anordnung der Zellen unterscheidet sich. Skalierbalken, 20 μm .

Die Zellen beider Ansätze zeigen eine rundliche Morphologie. Die Zellkerne sind eng und gruppenweise angeordnet.

In der Fusion *on plate* scheint die Kern-Plasma-Relation vergrößert, die Zellen als Ganzes aber verkleinert zu sein. Die Zellen liegen hier in ungeordneten Gruppen. Die Morphologie lässt auf eher ungesunde und gestresste Zellen schließen, es ist unwahrscheinlich, dass hier eine erfolgreiche Fusion stattgefunden hat.

In den Aufnahmen der Fusion *free floating* hingegen scheinen die Zellkerne um ein gemeinsames Zentrum herum gruppiert zu sein. Die um die Zellkerne angefärbten Organellen lassen keine Grenzen von Zelle zu Zelle erkennen. Daher ist eine erfolgreiche Fusion in diesem Ansatz anzunehmen. Betrachtet man dagegen die Kontrollbilder, so sind erwartungsgemäß einzelne Zellen gut abgrenzbar.

Obwohl grundsätzlich erfolgreich, liefert auch die Fusion kein sicheres Mittel, um zweistellige Zahlen an Proteinen in einer Zellpopulation darzustellen.

3.2.3 Co-Seeding

3.2.3.1 Co-Seeding transfizierter Zellen

Dieses Verfahren soll auf einfachem und zuverlässigem Wege die Zahl der Proteinkonstrukte pro Aufnahme weiter erhöhen.

Im ersten Experiment wurden vier Zellpopulationen mit 3- bis 4-facher Transfektion erzeugt. (siehe Kapitel 2.3.2). Durch die Mischung dieser Zellen wäre die Untersuchung von bis zu 13 der gewünschten Proteine mit nur einer Aufnahme möglich (Abbildung 14).

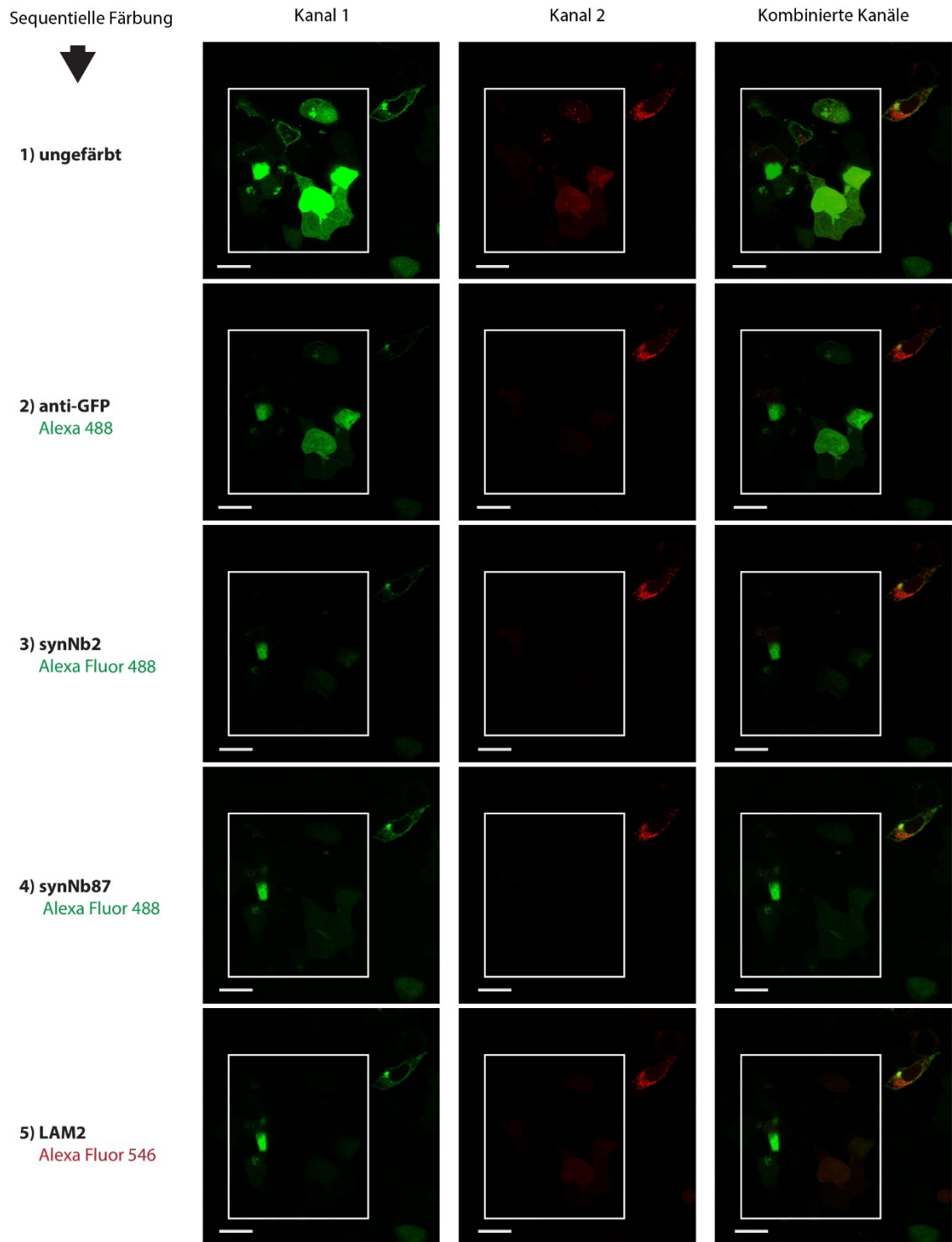


Abbildung 14: Co-Seeding mehrfach transfizierter Zellen.

Aufnahmen erfolgten bei sequentieller Färbung (Schritte 1-5) in zwei Kanälen (Kanal 1: 488 nm Exzitation, Kanal 2: 543 nm Exzitation). Ein Teil des Bildausschnittes wurde vor jeder erneuten Färbungen gebleicht (weißer Rahmen; Bleichvorgang nicht abgebildet). Zellen außerhalb des Rahmens dienen als Kontrolle, in ihnen überlagern sich die Färbungen. Pfeile 1 und 2: verschieden transfizierte Zellen. Skalierbalken, 20 μm .

In den Aufnahmen lassen sich bereits optisch zwei Zellgruppen unterscheiden. Ziel war es, die Zellen anhand ihres Erscheinungsbildes den entworfenen Populationen A-D zuzuordnen. Wie in Kapitel 3.2.1.3 erläutert, lässt das Wissen um die Lokalisation der Proteine in der Zelle sowie die Zugehörigkeit der Epitope zu den Proteinkonstrukten genau diese Rückschlüsse zu.

Es sei darauf hingewiesen, dass in diesem Experiment die Erkennung der Populationen bereits auf Grundlage der Epitope GFP und mCherry möglich ist. Die Durchführbarkeit einer sequentiellen Färbung auch der beiden anderen Epitope (syn2, syn87) wurde hiermit zwar gezeigt, allerdings nicht zur Identifizierung der Proteine genutzt.

Die erste sichtbare Gruppe (Abbildung 14, Pfeil 2) weist eine flächige Färbung des Zytoplasmas und Zellkerns auf. Das dafür verantwortliche Epitop ist GFP. Da die Konstrukte **NLS** und **GFP** beide das Epitop GFP besitzen und sich in Zytoplasma und Zellkern anreichern, muss auf diese beiden Proteine geschlossen werden. Beide gehören zu Population A (**NLS**, **GFP**, **Stx4**, **SNAP25**).

Die andere Gruppe im Bild (Abbildung 14, Pfeil 1) weist eine Färbung der Membran, des Golgi-Apparates und punktförmiger Organellen im Zytoplasma auf. Die Population, die am ehesten die entsprechenden Proteinkonstrukte auf sich vereint, ist Population C (**Tom70**, **Endobrevin**, **Stx13**).

Die grobe Differenzierung von verschiedenen, mehrfach transfizierten Populationen ist also mit dem bloßen Auge möglich. Schwierigkeiten ergeben sich allerdings bei der genauen Benennung einzelner Proteine innerhalb ein- und derselben Zelle.

Zum Ersten erschwert das Auftreten unvollständig transfizierter Zellen und ungleichmäßiger Färbung den eindeutigen Nachweis der Proteine. Zum Zweiten akkumulieren oft mehrere Proteine innerhalb eines Zellorganells, sodass sich ihre Färbungen überlagern. Die folgenden Kapitel befassen sich mit einer Verbesserung des Co-Seedings und damit der Umgehung dieser Probleme.

3.2.3.2 Co-Seeding mit optimierter Proteinkombination

Eine übersichtlichere Verteilung der Proteine, also eine klare räumliche Trennung derselben, ist auf zwei Ebenen denkbar: Erstens können die Proteine innerhalb der Zelle auf verschiedene Organellen verteilt werden. Zweitens ist auch die Dichte der Zellen entscheidend, sodass keine Überlappungen entstehen. Dieses Kapitel löst das Problem auf zellulärer Ebene.

Das Co-Seeding (Kapitel 3.2.3.1) wurde hier auf die bewährten, zweifach transfizierten Zellen (Kapitel 473.2.1.1) angewandt. Dies führte zu einer gleich hohen Anzahl sichtbarer Proteine pro Aufnahme, während die Unterscheidung einzelner Proteine innerhalb der Zellen erleichtert wird.

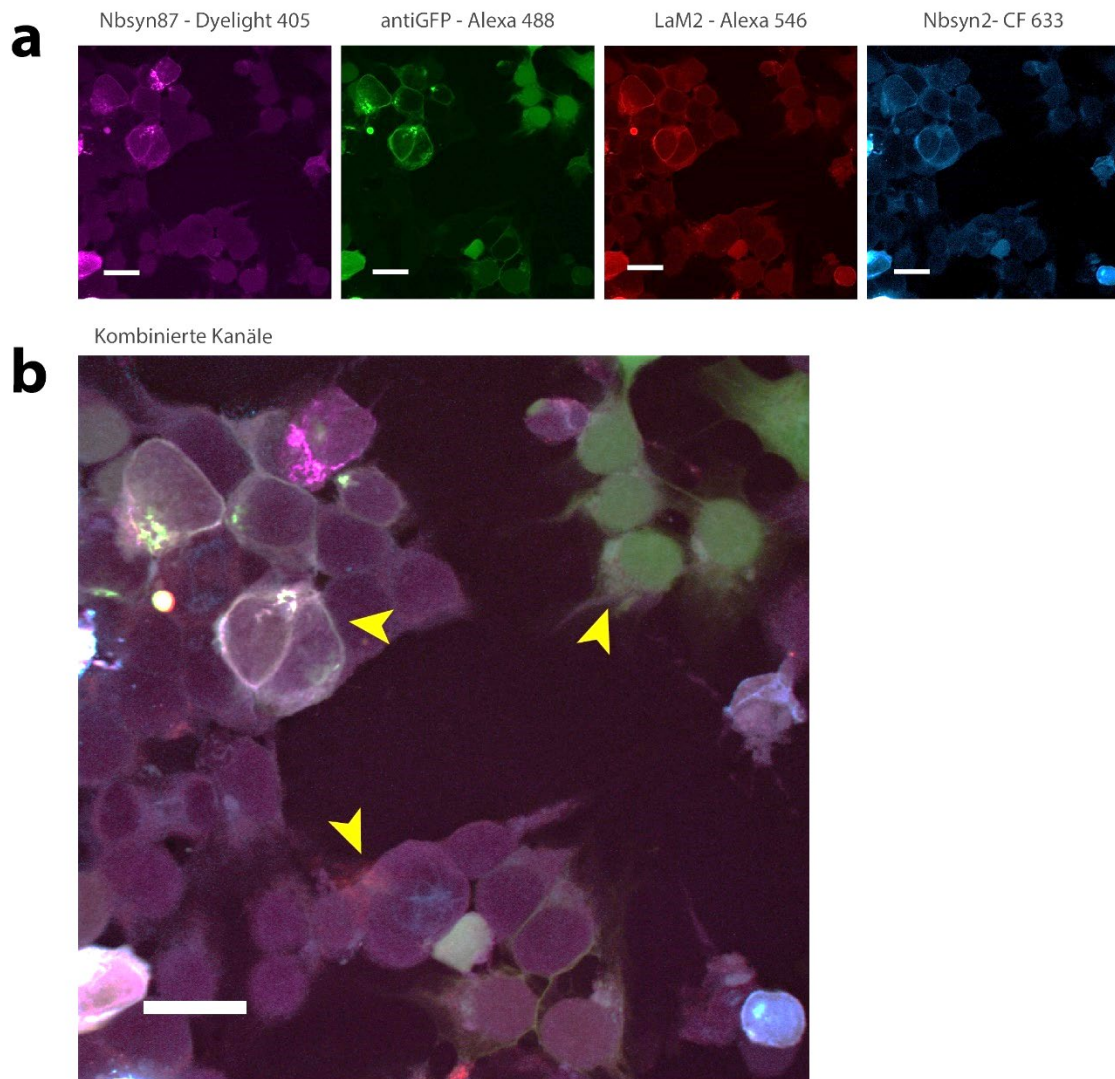


Abbildung 15: Co-Seeding zweifach transfizierter Zellen.

(a) Aufnahme in vier Kanälen. Jeder Kanal bildet einen Fluorophor und damit das entsprechende Epitop ab. (b) Überlagerung aller vier Kanäle, die Farbkodierung entspricht a. Mehrere Zellpopulationen lassen sich anhand ihrer Proteinverteilung unterscheiden (Pfeile). Skalierbalken, 20 µm.

Als Beispiel dient Abbildung 15. Hier können 3 Zellpopulationen unterschieden werden (siehe Pfeile). Mithilfe von Abbildung 10 und der üblichen Kombinatorik ist es dem Betrachter möglich, die Zellen im Bild den entworfenen Populationen zuzuordnen. Zu einer Population

(rechts oben) passt die Proteinpaarung **GFP / Stx13**, zur nächsten (links oben) **SNAP25 / Stx7** und zur letzten (unten) **Tom70 / Endobrevin**.

Das Ziel, in diesem Ansatz die Erkennung der Proteine innerhalb der Zellen zu vereinfachen, wurde erreicht.

3.2.3.3 Co-Seeding mit optimierter Zelldichte

Im Anschluss an die Ergebnisse des vorigen Kapitels galt es, eine Zelldichte zu erhalten, die Überschneidungen der Zellen untereinander vermeidet, um auch hier Überlagerungen zu vermeiden.

Für die Praktikabilität der Methode sollte an dieser Stelle zusätzlich getestet werden, ob sich der Zeitpunkt der Transfektion auf den Erfolg des Experimentes auswirkt. Sowohl eine Transfektion direkt nach dem Aussäen als auch am Folgetag wurden zuvor in dieser Arbeit angewandt, allerdings nicht im direkten Vergleich.

Die Zellen wurden daher in unterschiedlicher Dichte ausgesät und in zwei verschiedenen Zeitabständen transfiziert (nach 0 h und nach 24 h), um anschließend die günstigste Kondition zu finden (Abbildung 16).

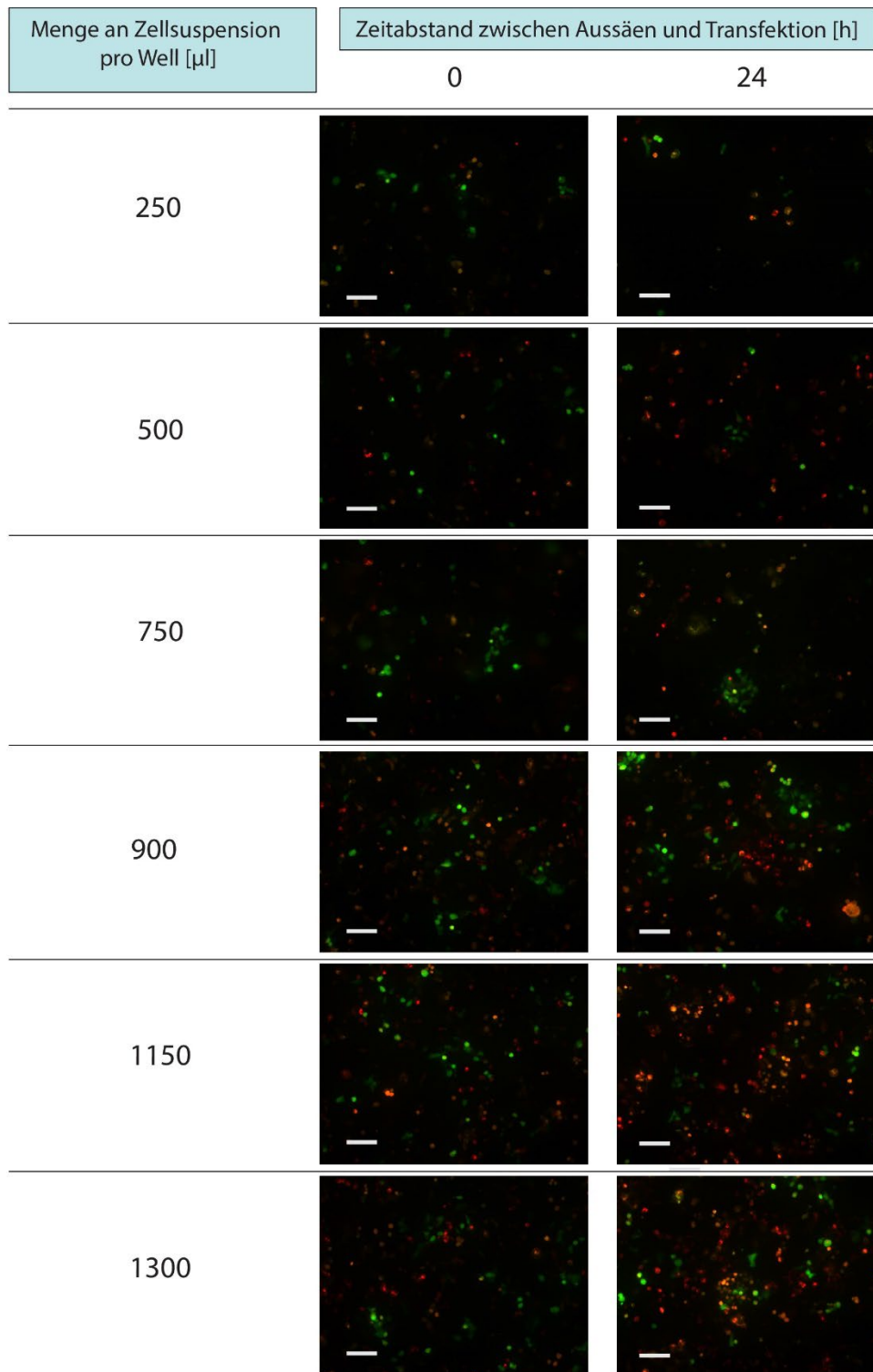


Abbildung 16: Vergleich des Effektes von Zelldichte und Zeitpunkt der Transfektion auf das Co-Seeding.

Co-Seeding zweifach transfizierter Zellen. Eine Gruppe wurde am Tag des Aussäens transfiziert (0 h, mittlere Spalte), die andere einen Tag später (24 h, rechte Spalte). Die Zellen wurden beim Co-Seeding in unterschiedlicher Dichte ausgesät (linke Spalte). Abgebildet sind repräsentative Ausschnitte der Coverslips. Sichtbar sind die Epitope GFP (grün) und mCherry (rot). Skalierbalken, 50 μ m.

Der Zeitpunkt der Transfektion hat in diesem Versuch keinen sichtbaren Einfluss auf den Erfolg der Transfektion oder das Zellwachstum. Die Ergebnisse beider Methoden ähneln sich. Eine frühe Transfektion ist daher zwecks Zeitersparnis zu empfehlen.

Außerdem zeigen die Aufnahmen, wie erwartet, eine Zunahme der Zelldichte bei zunehmendem Einsatz von Zellsuspension. Angestrebt ist für kommende Experimente eine Dichte, in der die Zellen möglichst nah beieinander liegen, ohne zu überlappen. Eine Dichte von etwa 750 μl Zellsuspension pro Well kommt diesem Zustand am nächsten.

Um die Wirksamkeit dieses optimierten Co-Seedings zu veranschaulichen, wurden in Abbildung 17 Zellen desselben Experimentes bei günstiger Dichte (750 μl Zellsuspension pro Well) ausgewählt.

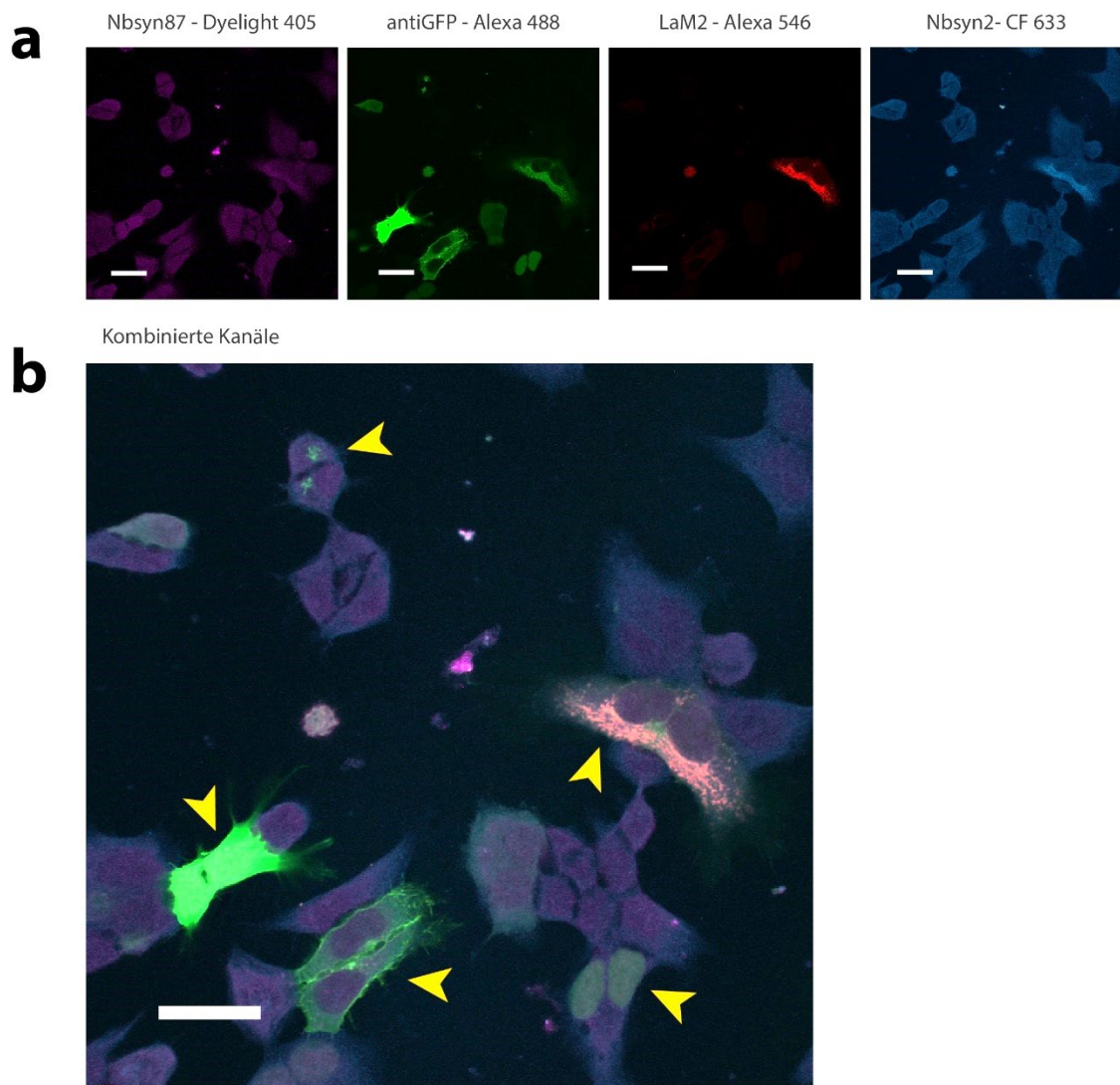


Abbildung 17: Co-Seeding zweifach transfizierter Zellen mit optimierter Dichte.

(a) Aufnahme in vier Kanälen. Jeder Kanal bildet einen Fluorophor und damit das entsprechende Epitop ab. (b) Überlagerung aller vier Kanäle, die Farbkodierung entspricht a. Mehrere Zellpopulationen lassen sich anhand ihrer Proteinverteilung unterscheiden (Pfeile). Skalierbalken, 20 μm .

Die angepasste Zelldichte vereinfacht weiter die Erkennung einzelner Populationen im Vergleich zu vorigen Co-Seeding-Experimenten (Kapitel 3.2.3.1 und 3.2.3.2). Die einzelnen Proteine sind nun ausreichend deutlich zu erkennen und bieten günstige Bedingungen, einer digitalen Bildanalyse zugeführt zu werden.

3.2.4 Pixel-basierte automatische Bildanalyse

Um eine exakte und quantifizierbare Auswertung der Ergebnisse zu gewährleisten, soll eine automatische Analyse-Software die Auswertung des Bildmaterials langfristig übernehmen.

Zum Entwurf eines solchen Programms bestand eine Zusammenarbeit mit Kollegen aus der Arbeitsgruppe. Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse sind Dr. Guobin Bao, unterstützt von Dr. Danielle de Jong, zuzuschreiben und werden hier der Vollständigkeit halber aufgeführt, um dem Leser ein umfassenderes Bild der Ergebnisse zu liefern. Die Entwicklung des Algorithmus ist noch nicht abgeschlossen, die hier präsentierten Methoden sind daher als vorläufig anzusehen.

Als Grundlage für die Entwicklung der Bildanalyse dienten Bilder aus dem optimierten Co-Seeding (Kapitel 3.2.3.3). Hierbei wurden zwei Methoden parallel untersucht: Die Auswertung auf Basis von Cross-Correlation und die probabilistische Klassifizierung.

In beiden Fällen erfolgte die Zuordnung von Templates zu jedem gesuchten Proteinkonstrukt, basierend auf der Epitop-Kombination, z. B. **GFP** (0010) oder **NLS_GFP_mCherry_syn2** (1110) (siehe Tabelle 10). Die Templates besagen also, welche Epitope das Protein besitzen soll bzw. in welchem Kanal ein Signal für dieses Protein auftreten sollte. Diese Zuordnung dient als Schlüssel zur Erkennung der Proteine und wird visualisiert durch eine Farbkodierung. Je intensiver die Farbe im Bild, desto sicherer liegt das Protein vor, dem diese Farbe zugeordnet ist.

Tabelle 10: Farbkodierung und Templates für die Bildanalyse

Klassifizierung		Template Vektor				Farbcode		
Targets	C	T(1)	T(2)	T(3)	T(4)	1	0.5	0
Stx4_syn87	1	0	0	0	1			
GFP	2	0	0	1	0			
Tom70_mCherry	3	0	1	0	0			
Pro_4	4	1	0	0	0			
GalNact_GFP_syn87	5	0	0	1	1			
mCherry_GFP_SNAP25	6	0	1	1	0			
Lifeact_mCherry_syn2	7	1	1	0	0			
Pro_8	8	0	1	0	1			
Stx7_GFP_syn2	9	1	0	1	0			
Stx6_syn87_syn2	10	1	0	0	1			
mCherry_GFP_syn87_KDEL	11	0	1	1	1			
Endobrevin_GFP_syn87_syn2	12	1	0	1	1			
Stx13_mCherry_syn87_syn2	13	1	1	0	1			
NLS_GFP_mCherry_syn2	14	1	1	1	0			
VAMP4-mCherry-GFP-syn87-syn2	15	1	1	1	1			
Background	16	0	0	0	0			

Anmerkung: Pro_4 und Pro_8 sind Platzhalter für Templates, denen kein Protein zugeordnet wurde.

Das Ergebnis einer wahrscheinlichkeitsbasierten Klassifizierung Abbildung 18. Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit (0=unmöglich – 1=sicher) bestimmt, mit der ein Pixel einem der Protein-Templates entspricht. Vergleichend wird hier (a) das Ergebnis der Analyse, (b) eine intensitäts-multiplizierte Version des Ergebnisses sowie (c) die Rohaufnahme aus Kapitel 3.2.3.3 dargestellt.

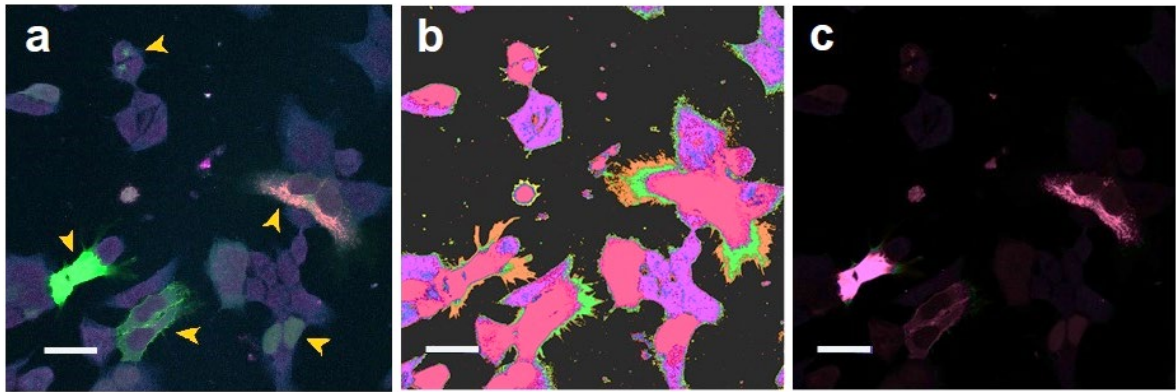


Abbildung 18: Bildanalyse durch probabilistische Klassifizierung

(a) Nicht-analytierte Aufnahme aus dem optimierten Co-Seeding. (b) Probabilistische Klassifizierung derselben Aufnahme. (c) Intensitäts-multiplizierte Version. Skalierbalken, 20 μm .

In Abbildung 18 b wird ersichtlich, dass diese Klassifizierung bis zu vier oder mehr Farben (orange, grün, lila und pink in verschiedenen Tönen) pro Zelle zuordnet. Die Zellstrukturen sind dabei im Vergleich zur Originalaufnahme verbreitert und die Zellgrenzen aufgeweicht. Die intensitäts-multiplizierte Version erscheint deutlich übersichtlicher, es verbleibt nur eine Farbe (pink) und wenige Zellen, deren Struktur dem Originalbild wieder stark ähneln.

Die Resultate der nächsten Methode, einer Cross-Correlation, zeigt Abbildung 19. Diese Methode korreliert das Signalprofil der vier Kanäle in den Aufnahmen mit den Templates der Proteine und misst, wie ähnlich diese einander sind (Abbildung 19, a und c). Um Templates ohne Varianz, namentlich VAMP4 mit dem Template 1111, besser zu erfassen, wurde außerdem ein erweitertes Template eingesetzt (Abbildung 19, b und d). Dieses erweiterte Template basiert zusätzlich auf Differenzvektoren der einzelnen Signale untereinander, sodass VAMP4 den erweiterten Template 1111000000 erhält.

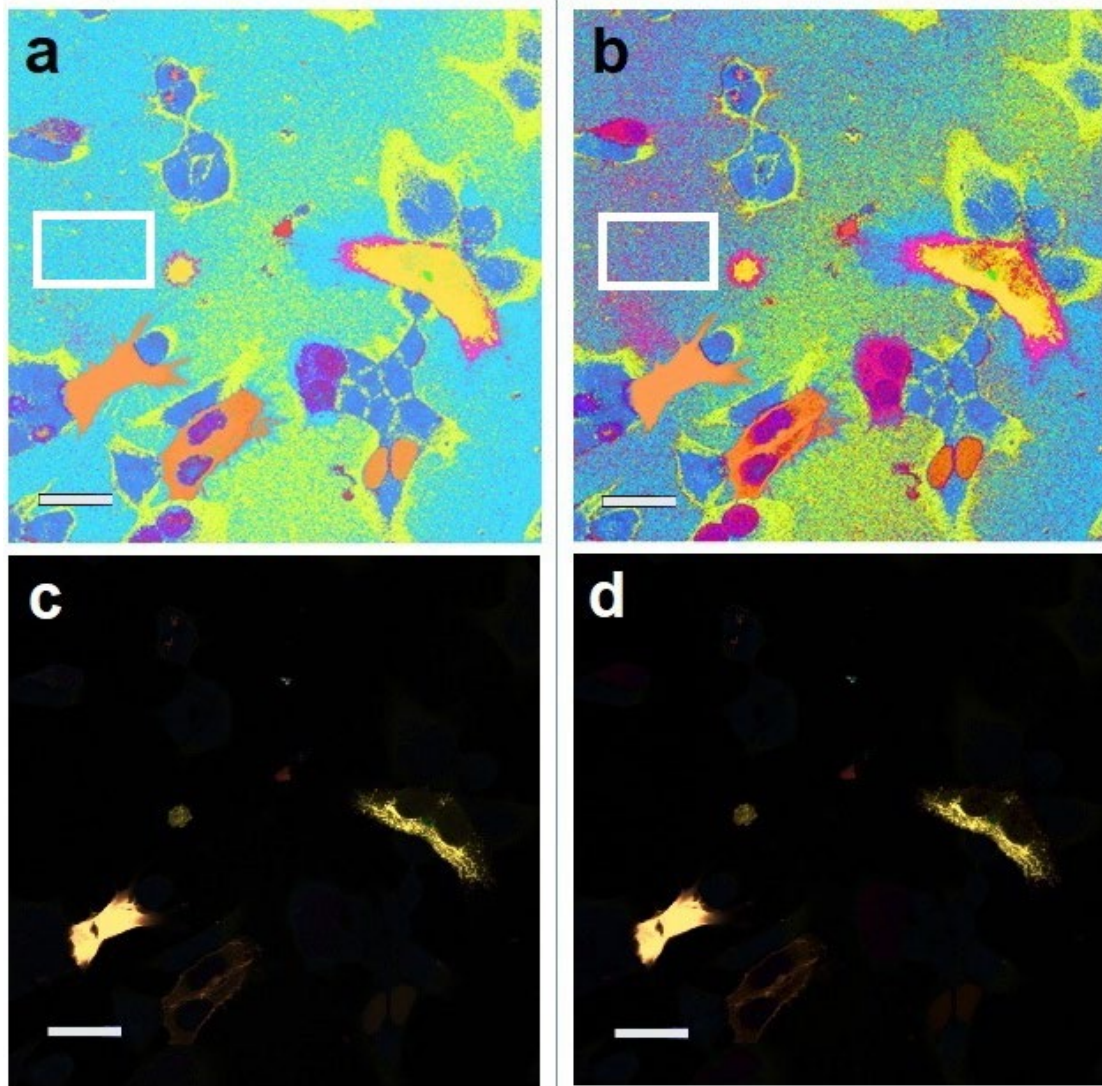


Abbildung 19: Bildanalyse durch Cross-Correlation - Einfaches und erweitertes Template

(a) Cross-Correlation anhand eines einfachen, vierstelligen Templates. (b) Cross-Correlation auf Basis eines mit Differenzvektoren erweiterten, zehnstelligen Templates. Weiße Kästen: Vergleich unterschiedlicher Hintergrundklassifizierung (c) - (d) Intensitäts-multiplizierte Version der Aufnahmen. Skalierbalken, 20 μm .

In der Analyse per einfachem Template (Abbildung 19, a) fällt die ausgeprägte Hintergrundfärbung in Blau und Grün auf. Die Zellen wirken wiederum in ihren Strukturen verwaschen, die Analyse weist jeder Zelle allerdings nur zwei, maximal drei verschiedene Proteine zu. Obwohl die Analyse mit erweitertem Template (Abbildung 19, b) strukturell fast identisch ausfällt, ist eine Änderung in der Farbgebung zu erkennen. Im Hintergrund (siehe weiße Kästen) sowie in den Zellen treten vermehrt pinke Felder auf. Das lässt sich auf die

Erkennung von VAMP4 durch dieses Template zurückführen. In den intensitäts-multiplizierten Bildern fällt auf, dass nun die Farbe Gelb dominiert.

Um die Genauigkeit der Cross-Correlation weiter zu optimieren, wurden anschließend Bilder von einzeln transfizierten Zellen verwandt, um ein exakteres Template zu erstellen (Abbildung 20, a und c). Den Bildern wurden je 200 charakteristische Pixel entnommen und als Template eingesetzt.

Die Bilder zeigen nun Zellen, deren Struktur stärker an jene im Originalbild erinnern als in den vorherigen Analysen. Erstmals unterscheidet sich auch die Farbgebung der Zellen untereinander deutlich, sodass sich verschiedene Zellgruppen abgrenzen lassen: Es können Zellgruppen mit gelb, blau oder orange dominiertem Zellkörper ausgemacht werden sowie Zellen mit grün gefärbter Membran.

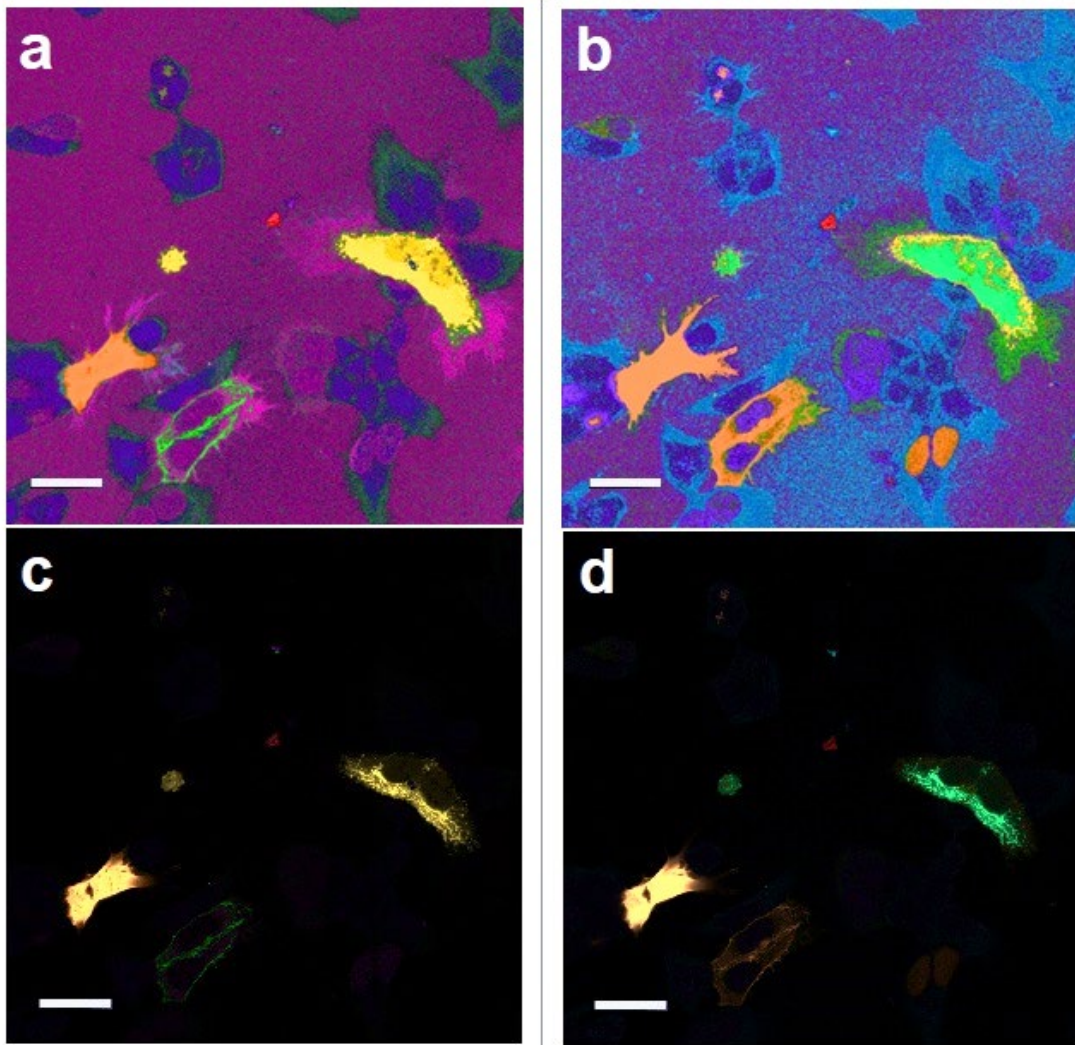


Abbildung 20: Bildanalyse durch Cross-Correlation - Template aus transfizierten Zellen
(a) Cross-Correlation auf Basis eines Templates aus Aufnahmen einzeln transfizierter Zellen. **(b)** Cross-Correlation anhand eines Templates aus Aufnahmen doppelt transfizierter Zellen. **(c) - (d)** Intensitätsmultiplizierte Version der obigen Aufnahmen. Skalierbalken, 20 μm .

Im Versuch einer weiteren Verbesserung kamen Aufnahmen doppelt transfizierter Zellen, wie sie im Co-Seeding Anwendung finden, zum Einsatz. Auch hier wurden 200 Pixel als Template herangezogen (Abbildung 20, b und d). Im Vergleich zur vorigen Methode ist hier die Farbgebung ins Blaue und Grüne hinein verschoben. Zudem verschwimmt die farbliche Differenzierung der verschiedenen Zellgruppen.

Insgesamt unterscheiden sich die Ergebnisse der verschiedenen Methoden deutlich und sollen, aufgrund ihrer Bedeutung für die Auswertung der Arbeit, wegweisender Bestandteil der Diskussion sein.

4 Diskussion

Kann multiplexe Bildgebung also durch kombinatorische Epitoperkennung mit Nanobodys realisiert werden? Kann für diese Methode ein Einstieg in die Rasterkraftmikroskopie gelingen? Und ist die Methode reif für eine automatisierte Bildanalyse? In der Einleitung dieser Arbeit wurden einige zentrale Fragestellungen formuliert, denen wir uns an dieser Stelle widmen wollen.

Im Kern sollte der *proof of principle* erfolgen, dass multiplexe Bildgebung durch eine Kodierung der Proteine mittels Epitop-Markern erfolgen kann, sogenannten Nanostamps.

Zu diesem Zwecke musste eine Zellpopulation erschaffen werden, in der bis zu 15 künstlich generierte Proteine exprimiert werden, um an ihnen die Methode zu erproben. In eine einzige Zelle können erfahrungsgemäß kaum mehr als vier Plasmide transfiziert werden, ohne die Zelle nachhaltig zu schädigen. Auch die HVJ-E-induzierte Fusion mehrerer transfizierter Zellen scheint hierfür laut unserer Ergebnisse kein geeignetes Instrument zu sein. Wir erhielten sehr dicht gepackte Zellen, die eine spätere Analyse erschweren (Kapitel 3.2.2). Da allerdings für die HVJ-E-vermittelte Fusion eine hohe Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Virus bekannt ist (Okada und Murayama 1968), könnten in weiterführenden Experimente noch günstigere Ergebnisse erzielt werden. Nichtsdestotrotz bleibt jedoch zu bezweifeln, dass eine fusionierte, gesunde HEK-Zelle mit zweistelliger Zahl an Proteinkonstrukten auf diesem Wege erreicht werden kann.

Wir entschieden uns zu einem alternativen Lösungsansatz. Durch Verwendung von P2A-Plasmiden sollte die simultane Expression mehrerer Proteine ermöglicht werden (Kapitel 3.2.1). Obwohl die Anwendung der 2A-Sequenzen in ersten Experimenten erfolgreich zu sein schien, lässt sich bezweifeln, dass mit ihrer Nutzung ausreichend hohe Proteinzahlen erreicht werden. Letztendlich stehen Aufwand und Nutzen in ungünstigem Verhältnis. Sie bleiben damit eher der Co-Expression von Genen vorbehalten, wofür sie in der Wissenschaft bereits geschätzt werden (Chng et al. 2015; Burén et al. 2012; Daniels et al. 2014; Felipe 2004; Lewis et al. 2015). Nichtsdestotrotz konnten Erkenntnisse wie die gezielte paarweise Transfektion von Proteinen unterschiedlicher intrazellulärer Lokalisation aus diesen Versuchen auf spätere Experimente übertragen werden.

Die Lösung des Problems erfolgte schließlich durch die Entwicklung des Co-Seedings (Kapitel 3.2.3), welches später weiter optimiert wurde. In diesem Verfahren wurden verschieden transfizierte Zellpopulationen gemischt und eine Bildgebung von bis zu 12 Proteinen pro Aufnahme ermöglicht.

Daher lässt sich mit Gewissheit sagen, dass unsere Methode bereits multiplexe Bildgebung mit bis zu 12 Analyten zulässt (siehe Kapitel 3.2.3.3). Die Möglichkeiten unseres Assays übertreffen in dieser Hinsicht die einiger etablierter multiplexer Verfahren, für die selten konkrete Zahlen genannt werden (Dickinson et al. 2001; Ellington et al. 2010; Elshal und McCoy 2006; Gordon und Michel 2012; Tighe et al. 2015; Fu et al. 2010).

Gleichwohl weist unser Verfahren zum jetzigen Stand einige Limitationen auf und Bedarf weiterer intensiver Arbeit, bis es vielseitig und verlässlich zur Anwendung kommen kann.

Das Eingangs gesetzte Ziel von 15 Analyten bei Einsatz von vier Nanobodys wurde beispielsweise nicht erreicht. Grund hierfür ist schlicht der Mangel an geeigneten Proteinen, die möglichst spezifisch in einem oder einigen wenigen Zellorganellen exprimiert werden. Diese intrazelluläre räumliche Zuordnung bleibt bisher eine Voraussetzung für die Anwendung der Methode. Dem Prinzip der Methode selbst tut dies natürlich keinen Abbruch.

Trotzdem begegnen wir in der jetzigen Form des Verfahrens einigen essentiell limitierenden Faktoren. Sie lassen sich anhand der Ergebnisse der digitalen Auswertung veranschaulichen. Unter idealen Bedingungen sollte die Zuordnung der Pixel zu dem jeweiligen Protein aufgrund des Signalprofils aus den vier Kanälen eindeutig sein. Diesen Ansatz nutzen sowohl die probabilistische Klassifikation als auch die Cross-Correlation, die zur Auswertung der Aufnahmen herangezogen wurden. Wie die sehr uneinheitlichen Ergebnisse der digitalen Auswertung allerdings zeigen, treten in der Praxis offensichtlich Fehler in der Zuordnung auf. Das Kernproblem der Methode bleibt also die eindeutige und korrekte Zuordnung der Pixel zu ihrem Protein im Zuge der Analyse.

Genauer gesagt muss das Photonensignal für jeden einzelnen Pixel und Kanal als entweder positiv, also „Epitop vorhanden“, oder negativ, also „Epitop nicht vorhanden“ (=Hintergrund), klassifiziert werden. Fehler in der Zuordnung geschehen, wenn das Signal eines Kanals entweder stärker ist als erwartet oder schwächer. In diesem Fall kann das entsprechende Epitop als vorhanden gewertet werden, obwohl es im zugrunde liegenden Protein nicht existiert (im Sinne eines falsch Positiven). Oder es kann anders herum als nicht vorhanden klassifiziert werden, obwohl es existiert (im Sinne eines falsch Negativen). In der Summe dieser Fehler kommt es zur Zuordnung eines völlig falschen Proteins.

Betrachten wir die mögliche Entstehung von Fehlern in dieser Einordnung: Falsch Positive drohen hauptsächlich durch übermäßig helle Färbungen. Die Färbung mancher Nanobodys/Fluorophore wie antiGFP - Atto 488 ist deutlich stärker als die der simultan verwendeten Marker, wie weiter unten näher erläutert werden soll. Das Hintergrundsignal dieses

Nanobodys wird dadurch im Vergleich mit den anderen Kanälen leicht falsch positiv klassifiziert. Zu schwache Färbungen können umgekehrt zu falsch Negativen führen, betroffen hiervon sind vor allem NbSyn87-Dylight™ 405 und NbSyn2-CF®633. Guilliams et al. beziffern die Bindungsaffinität von NbSyn87 mit einer Dissoziationskonstante (K_d) von $41,9 \pm 4,8$ nM und die von NbSyn2 mit $264,4 \pm 69,0$ nM (Guilliams et al. 2013; Genst et al. 2010). Damit liegt bereits zwischen diesen beiden Nanobodys ein deutlicher Unterschied in der Affinität vor, der vermutlich in der unterschiedlichen Größe der Epitope begründet liegt (Guilliams et al. 2013).

Für LaM2 auf der anderen Seite wurden noch weit niedrigere K_d bei 0,49 nM gemessen und für antiGFP sind K_d von bis unter 0,2 nM bekannt (Fridy et al. 2014). Eine stärkere Färbung der entsprechenden Epitope **GFP** und **mCherry** ist so nur folgerichtig. Diese Betrachtungen erklären zumindest teilweise das breite Auftreten von **GFP**-klassifizierten Flächen (orange) in fast allen Analysen (Abbildung 19, Abbildung 20). Die Problematik der Unterschiedlichkeit in der Helligkeit und Photostabilität verschiedener Immunfärbungen überrascht allerdings wenig, sie ist lange bekannt (Dickinson et al. 2001). Die Erkennung solcher Schwankungen ist Aufgabe der Analysesoftware und wurde zum Teil durch die Cross-Correlation auf Basis von Templates aus Einzeltransfekt-Zellen (Abbildung 20, a) bereits in Angriff genommen. Sie zeigen ein differenzierteres Bild als andere Cross-Correlationen, die lediglich auf einfachen oder erweiterten binären Templates beruhen (Abbildung 19). Theoretisch sollten Templates aus Doppeltransfekt-Zellen (Abbildung 20, c) eine noch präzisere Cross-Correlation erlauben, scheinen allerdings die Genauigkeit der Analyse wieder zu verringern. Sie führen in besagter Abbildung zu unrealistisch hoher Korrelation breiter Flächen mit **GFP** (orange) und ähneln damit den Ergebnissen binärer Templates.

Vergleicht man die Cross-Correlation mit der Wahrscheinlichkeitsklassifizierung (Abbildung 18), so unterscheiden sich die Ergebnisse deutlich. Zwar gelingt die Klassifizierung des Hintergrunds besser als in der Cross-Correlation, jedoch weist die Analyse jeder Zelle bis zu 4 Proteine zu, was methodisch absolut unwahrscheinlich ist. Hier scheinen sich die Epitope von außen nach innen schicht zu addieren. Es folgen **GFP** (orange, 0010), **SNAP25** (grün, 0110) und **NLS** (pink, 1110) aufeinander. Die vielversprechendste Methode bleibt daher zum jetzigen Zeitpunkt die Cross-Correlation mit Einzeltransfekt-Templates. In den von uns genutzten Aufnahmen (Abbildung 20) erkennt sie vier Zellgruppen mit mindestens vier unterschiedlichen Proteinen. Erkennbar sind **TOM70** (gelb), **GFP** (orange), **SNAP25** (grün) und **NLS** (lila).

Ein Problem, welches die Analyse hingegen definitiv nicht lösen kann, ist die Überlagerung mehrerer Proteine, die dem Algorithmus ein weiteres Protein vortäuschen. Dies ist der Grund für die Einführung einer räumlichen Separation der Zielproteine. Sie wurde angestrebt durch

die Begrenzung der Zahl der Proteine im Co-Seeding auf zwei pro Zelle, gleichzeitiger Limitierung der Zelldichte und Aufteilung der Proteine auf verschiedene Zellkompartimente. Trotzdem scheinen weitere Maßnahmen erforderlich zu sein, um Überlappungen zu vermeiden. Denkbar wäre z. B. die Anwendung auf Proteine, die auf einer künstlichen Oberfläche immobilisiert und somit beliebig in ihrer Dichte variiert werden können.

Zudem kann *Super-Resolution Microscopy* in Erwägung gezogen werden, um eine genauere Lokalisierung der Proteine durch höhere Auflösung zu garantieren. Dazu gehören Techniken wie STED oder STORM, PALM und fPALM (Schermelleh et al. 2010; Hell 2007). Mit STED-Mikroskopie werden laterale Auflösungen von etwa 30 nm und weniger (Hell und Wichmann 1994), mit STORM sogar von 20 nm erreicht (Rust et al. 2006). Die Genauigkeit liegt damit um ein zehnfaches höher als die der in dieser Arbeit genutzten konfokalen Mikroskope. Dennoch könnte der Einsatz dieser Technologien neben Kosten- und Zeitaufwand einige entscheidende Nachteile mit sich bringen: Zum einen bleibt die Anzahl der geeigneten Fluorophore, die für STED oder STORM simultan genutzt werden kann, beschränkt (Sanderson et al. 2014). Dies würde die Ausweitung unserer Methode auf höhere Zahlen an Analyten, und damit gleichzeitig Epitopen und Nanobodys, verhindern. Zum anderen neigt gerade bei STED das Bleichen der Fluorophore in wässrigen Medien, die Untersuchung zu erschweren (Hell 2003). Bereits in den hier gezeigten, mit herkömmlichem LSM durchgeführten Aufnahmen, wurde dieser Effekt zum Hindernis.

Eine Antwort auf einige dieser Hemmnisse könnte der Transfer der Methode auf das AFM bieten. Das AFM ist zwar – im Vergleich zur Immunhistochemie – eine weniger verbreitete und stärker benutzerabhängige Technologie und erfordert daher einige Einarbeitung, um valide und reproduzierbare Ergebnisse zu garantieren. Die schiere Vielfalt an Betriebsmodi und Cantilevern (wie beschrieben durch den Hersteller, NANOSURF AG 2017) sowie Störfaktoren gestalten eine einheitliche Anwendung durch unerfahrene Nutzer schwierig. Dennoch versprechen Reviews der letzten Jahre hervorragende Ergebnisse im Bereich der Spektroskopie, besonders für Antikörper-Antigen-Bindungen (Neuman und Nagy 2008; Noy 2011; Puchner und Gaub 2009; Carvalho et al. 2013). Zudem umgeht das AFM die Einschränkungen, die mit der Nutzung von Fluorophoren einhergehen - beispielsweise die spektrale Überlappung und Unterschiede in Photostabilität/Intensität - und bietet gleichzeitig eine höhere Auflösung im Nanometer-Bereich (Giessibl 2005; Meyer und Amer 1988), die zur genaueren Zuordnung der Epitope beitragen kann. Der Grundstein für die Anwendung des AFMs auf unsere Methode wurde mit dieser Arbeit gelegt. Da multiplexe Bildgebung mit dem AFM unüblich ist, darf diese Entwicklung mit Interesse verfolgt werden.

Zur weiteren Etablierung des Verfahrens bedarf es vor allem folgender Schritte: Erstens gilt es, die Optimierung der automatischen Bildanalyse voranzutreiben und oben genannte Fehler zu beheben. Erst eine differenzierte Bildanalyse ermöglicht später eine valide und praktische Anwendung. Zweitens muss die Kopplung von Streptavidin und später Nanobodys an einen AFM-Tip realisiert werden, ein in erster Linie chemisches Problem, zu welchem bereits Protokolle bekannt sind (van Es et al. 2014; Gruber 2016). Anschließend kann die Messung von Nanobody-Epitop-Interaktionen am AFM erfolgen, um schlussendlich auch hier Nanostamps einzusetzen.

Am Ende steht so eine aussichtsreiche Methode zur einfachen, materialsparenden und exakten multiplexen Bildgebung zur Verfügung, um komplexe zellbiologische bis medizinische Zusammenhänge darzustellen.

5 Abstract

Die Funktion oder Fehlfunktion eines Organismus hängen entscheidend von der Gesamtheit seiner exprimierten Proteine ab, dem Proteom. Forschung und angewandte Medizin sind daher zunehmend an der Entwicklung von Verfahren interessiert, die nicht nur eines - sondern mehrere Proteine simultan - präzise bestimmen können. Innerhalb der multiplexen Verfahren finden besonders Immunoassays große Verbreitung, da Antikörper hervorragende spezifische Bindungseigenschaften besitzen. In den letzten Jahrzehnten finden allerdings zunehmend Nanobodys Verwendung, die als rekombinante und kleinere Alternative einige Vorteile versprechen. Der *proof of principle* eines innovativen und multiplexen Bildgebungsverfahrens mittels Nanobodys ist daher Gegenstand dieser Arbeit.

Um die Voraussetzung für multiplexe Bildgebung in Zellen zu schaffen, sollte zuerst die Expression von bis zu 15 künstlichen Proteinen in einer Zellpopulation erreicht werden. Es wurden HEK293-Zellen eingesetzt, in denen per Transfektion gezielt zu diesem Zwecke entworfene Proteinkonstrukte exprimiert wurden. Hierzu wurden drei verschiedene Ansätze getestet: Die Fusion transfizierter Zellen, die Anwendung von 2A-Sequenzen und das eigens zu diesem Zwecke entworfene Co-Seeding. Das Co-Seeding erwies sich als geeignetste Methode.

Die hier genutzten Proteinkonstrukte bestanden aus einem Kernprotein und angehängten Epitopen, die als Marker fungieren. Diese Epitop-Marker kodieren in eindeutiger Weise jedes Protein und werden auch „Nanostamps“ genannt. Mithilfe von Nanobodys, die gegen besagte Epitope gerichtet waren, konnte in immunfluoreszenter Bildgebung anschließend die Identifizierung der Proteine anhand ihres Epitop-Codes vorgenommen werden. Die Auswertung kann von einer automatischen digitalen Bildanalyse übernommen werden. Eine solche Bildgebung verspricht die Einsparung von Kosten und Zeit für die Entwicklung neuer Liganden, in diesem Fall Nanobodys, gerade wenn hohe Zahlen an Analyten gefordert sind.

Um in Zukunft eine Bildgebung in hoher Auflösung im nm-Bereich und unabhängig von den Limitierungen Fluoreszenz-abhängiger Verfahren zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit außerdem die Anwendung eines Rasterkraftmikroskops (*Atomic Force Microscope*, AFM) erprobt. Im späteren Verlauf des Projektes soll ein Transfer unserer - im immunhistochemischen Bereich nun erprobten - Methode auf diese vielversprechende Technologie vorgenommen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alexander A, Steinmetz M, Barritault D, Frangione B, Franklin EC, Hood L, Buxbaum JN (1982): gamma Heavy chain disease in man: cDNA sequence supports partial gene deletion model. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 3260–3264
- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S (1997): Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Letters* 414, 521–526
- Baral TN, Magez S, Stijlemans B, Conrath K, Vanhollebeke B, Pays E, Muyldermans S, Baetselier P de (2006): Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor. *Nat Med* 12, 580–584
- Baral TN, Murad Y, Nguyen T-D, Iqbal U, Zhang J (2011): Isolation of functional single domain antibody by whole cell immunization: Implications for cancer treatment. *J Immunol Methods* 371, 70–80
- Bedford R, Tiede C, Hughes R, Curd A, McPherson MJ, Peckham M, Tomlinson DC (2017): Alternative reagents to antibodies in imaging applications. *Biophys Rev* 9, 299–308
- 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
- Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986): Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56, 930–933
- Blanc MR, Anouassi A, Ahmed Abed M, Tsikis G, Canepa S, Labas V, Belghazi M, Bruneau G (2009): A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera. *Biotechnol Appl Biochem* 54, 207–212
- Boja ES, Rodriguez H (2011): The path to clinical proteomics research: Integration of proteomics, genomics, clinical laboratory and regulatory science. *Korean J Lab Med* 31, 61–71
- Broisat A, Hernot S, Toczek J, Vos J de, Riou LM, Martin S, Ahmadi M, Thielens N, Wernery U, Caveliers V et al. (2012): Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. *Circ Res* 110, 927–937
- Burén S, Ortega-Villasante C, Ötvös K, Samuelsson G, Bakó L, Villarejo A (2012): Use of the Foot-and-Mouth Disease Virus 2A Peptide Co-Expression System to Study Intracellular Protein Trafficking in Arabidopsis. *PLoS ONE* 7, e51973

- Carvalho FA, Martins IC, Santos NC (2013): Atomic force microscopy and force spectroscopy on the assessment of protein folding and functionality. *Arch Biochem Biophys* 531, 116–127
- Chng J, Wang T, Nian R, Lau A, Hoi KM, Ho SCL, Gagnon P, Bi X, Yang Y (2015): Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells. *MAbs* 7, 403–412
- Cogné M, Preud'homme J-L, Guglielmi P (1989): Immunoglobulin gene alterations in human heavy chain diseases. *Research in Immunology* 140, 487–502
- Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, Baetselier P de, Muyltermans S, Revets H (2004): Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res* 64, 2853–2857
- Daniels RW, Rossano AJ, Macleod GT, Ganetzky B (2014): Expression of Multiple Transgenes from a Single Construct Using Viral 2A Peptides in *Drosophila*. *PLoS ONE* 9, [e100637](#)
- Dickinson ME, Bearman G, Tille S, Lansford R, Fraser SE (2001): Multi-spectral imaging and linear unmixing add a whole new dimension to laser scanning fluorescence microscopy. *BioTechniques* 31, 1272, 1274–6, 1278
- Dolk E, van der Vaart M, Lutje Hulsik D, Vriend G, Haard H de, Spinelli S, Cambillau C, Frenken L, Verrrips T (2005): Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl Environ Microbiol* 71, 442–450
- Donnelly ML, Luke G, Mehrotra A, Li X, Hughes LE, Gani D, Ryan MD (2001): Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein 'cleavage' mechanism indicates not a proteolytic reaction, but a novel translational effect: A putative ribosomal 'skip'. *J Gen Virol* 82, 1013–1025
- Donzella V, Crea F (2011): Optical biosensors to analyze novel biomarkers in oncology. *J Biophotonics* 4, 442–452
- Drucker A, Skedgel C, Virik K, Rayson D, Sellon M, Younis T (2008): The cost burden of trastuzumab and bevacizumab therapy for solid tumours in Canada. *Curr Oncol* 15, 136–142
- Eghiaian F, Rico F, Colom A, Casuso I, Scheuring S (2014): High-speed atomic force microscopy: Imaging and force spectroscopy. *FEBS Letters* 588, 3631–3638
- Ellington AA, Kullo IJ, Bailey KR, Klee GG (2010): Antibody-based protein multiplex platforms: Technical and operational challenges. *Clin Chem* 56, 186–193

- Elshal MF, McCoy JP (2006): Multiplex bead array assays: Performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods* 38, 317–323
- Fan A, Cao Z, Li H, Kai M, Lu J (2009): Chemiluminescence platforms in immunoassay and DNA analyses. *Anal Sci* 25, 587–597
- Felipe P de (2004): Skipping the co-expression problem: The new 2A "CHYSEL" technology. *Genet Vaccines Ther* 2, 13
- Flajnik MF, Kasahara M (2010): Origin and evolution of the adaptive immune system: Genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet* 11, 47–59
- Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, Geus B de, Verrips CT (2000): Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol* 78, 11–21
- Fridy PC, Li Y, Keegan S, Thompson MK, Nudelman I, Scheid JF, Oeffinger M, Nussenzweig MC, Fenyö D, Chait BT et al. (2014): A robust pipeline for rapid production of versatile nanobody repertoires. *Nat Methods* 11, 1253–1260
- Fu Q, Zhu J, van Eyk JE (2010): Comparison of Multiplex Immunoassay Platforms. *Clin Chem* 56, 314–318
- Galbraith CG, Galbraith JA (2011): Super-resolution microscopy at a glance. *J Cell Sci* 124, 1607–1611
- Genst EJ de, Williams T, Wellens J, O'Day EM, Waudby CA, Meehan S, Dumoulin M, Hsu S-TD, Cremades N, Verschueren KHG et al. (2010): Structure and properties of a complex of α -synuclein and a single-domain camelid antibody. *J Mol Biol* 402, 326–343
- Giessibl FJ (2005): AFM's path to atomic resolution. *Mater Today* 8, 32–41
- Gordon J, Michel G (2012): Discerning trends in multiplex immunoassay technology with potential for resource-limited settings. *Clin Chem* 58, 690–698
- Govaert J, Pellis M, Deschacht N, Vincke C, Conrath K, Muyldermans S, Saerens D (2012): Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. *J Biol Chem* 287, 1970–1979
- Gruber HJ (2016): Flexible attachment of antibodies and other sensor molecules to the measuring tips of force microscopes. Johannes Kepler Universität, Linz 2016
https://www.jku.at/fileadmin/gruppen/216/01_simple_introduction_2016_05_06.pdf,
abgerufen am: 12.01.2018

- Guilliams T, El-Turk F, Buell AK, O'Day EM, Aprile FA, Esbjörner EK, Vendruscolo M, Cremades N, Pardon E, Wyns L et al. (2013): Nanobodies raised against monomeric α -synuclein distinguish between fibrils at different maturation stages. *J Mol Biol* 425, 2397–2411
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448
- Hara S, Takano T, Ogata M, Yamakami R, Sato Y, Kono T, Obata Y (2014): Establishment of a conditional transgenic system using the 2A peptide in the female mouse germline. *J Reprod Dev* 60, 250–255
- Harmsen MM, Fijten HPD, Engel B, Dekker A, Eblé PL (2009): Passive immunization with llama single-domain antibody fragments reduces foot-and-mouth disease transmission between pigs. *Vaccine* 27, 1904–1911
- Hartmann M, Roeraade J, Stoll D, Templin MF, Joos TO (2009): Protein microarrays for diagnostic assays. *Anal Bioanal Chem* 393, 1407–1416
- Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, Pauw P de, Vincke C, Muyldermans S (2013): Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine (Lond)* 8, 1013–1026
- Hell SW (2003): Toward fluorescence nanoscopy. *Nat Biotechnol* 21, 1347, -1355
- Hell SW (2007): Far-field optical nanoscopy. *Science* 316, 1153–1158
- Hell SW, Wichmann J (1994): Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett* 19, 780–782
- Hess ST, Girirajan TPK, Mason MD (2006): Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J* 91, 4258–4272
- Hober S, Uhlén M (2008): Human protein atlas and the use of microarray technologies. *Curr Opin Biotechnol* 19, 30–35
- Holliger P, Hudson PJ (2005): Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat Biotechnol* 23, 1126–1136
- Hsu H-Y, Wittemann S, Schneider EM, Weiss M, Joos TO (2008): Suspension microarrays for the identification of the response patterns in hyperinflammatory diseases. *Med Eng Phys* 30, 976–983
- Human Proteome Organization (HUPO) (2017): HPP Questions & Answers. <https://hupo.org/HPP-Q&A>, abgerufen am: 20.07.2018

- Jun B-H, Kang H, Lee Y-S, Jeong DH (2012): Fluorescence-based multiplex protein detection using optically encoded microbeads. *Molecules* 17, 2474–2490
- Kim JH, Lee S-R, Li L-H, Park H-J, Park J-H, Lee KY, Kim M-K, Shin BA, Choi S-Y (2011): High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS ONE* 6, e18556
- Lee J-R, Magee DM, Gaster RS, LaBaer J, Wang SX (2013): Emerging protein array technologies for proteomics. *Expert Rev Proteomics* 10, 65–75
- Legrain P, Aebersold R, Archakov A, Bairoch A, Bala K, Beretta L, Bergeron J, Borchers CH, Corthals GL, Costello CE et al. (2011): The human proteome project: Current state and future direction. *Mol Cell Proteomics* 10, M111.009993
- Lewis JE, Brameld JM, Hill P, Barrett P, Ebling FJP, Jethwa PH (2015): The use of a viral 2A sequence for the simultaneous over-expression of both the vgf gene and enhanced green fluorescent protein (eGFP) in vitro and in vivo. *J Neurosci Methods* 256, 22–29
- Li M, Xiao X, Liu L, Xi N, Wang Y, Dong Z, Zhang W (2013): Atomic force microscopy study of the antigen-antibody binding force on patient cancer cells based on ROR1 fluorescence recognition. *J Mol Recognit* 26, 432–438
- Li Y, Reichert WM (2003): Adapting cDNA Microarray Format to Cytokine Detection Protein Arrays †. *Langmuir* 19, 1557–1566
- Luke GA, Felipe P de, Lukashov A, Kallioinen SE, Bruno EA, Ryan MD (2008): Occurrence, function and evolutionary origins of ‘2A-like’ sequences in virus genomes. *J Gen Virol* 89, 1036–1042
- Meyer G, Amer NM (1988): Novel optical approach to atomic force microscopy. *Appl Phys Lett* 53, 1045–1047
- Minskaia E, Nicholson J, Ryan MD (2013): Optimisation of the foot-and-mouth disease virus 2A co-expression system for biomedical applications. *BMC Biotechnol* 13, 67
- Moxon JV, Padula MP, Herbert BR, Golledge J (2009): Challenges, current status and future perspectives of proteomics in improving understanding, diagnosis and treatment of vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 38, 346–355
- Muyldermans S (2013): Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82, 775–797

- Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R (1994): Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7, 1129–1135
- NANOSURF AG S (2017): Nanosurf FlexAFM Operating Instructions for C3000: Control Software Version 3.8. Version 5, 326–328
- Neuman KC, Nagy A (2008): Single-molecule force spectroscopy: Optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy. *Nat Methods* 5, 491–505
- Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S (2001): Functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Adv Immunol* 79, 261–296
- Noy A (2011): Force spectroscopy 101: How to design, perform, and analyze an AFM-based single molecule force spectroscopy experiment. *Curr Opin Chem Biol* 15, 710–718
- Okada Y, Murayama F (1968): Fusion of cells by HVJ: Requirement of concentration of virus particles at the site of contact of two cells for fusion. *Exp Cell Res* 52, 34–42
- Puchner EM, Gaub HE (2009): Force and function: Probing proteins with AFM-based force spectroscopy. *Curr Opin Struct Biol* 19, 605–614
- Ries J, Kaplan C, Platonova E, Eghlidi H, Ewers H (2012): A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nat Methods* 9, 582–584
- Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC et al. (2006): Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3, 887–889
- Rust MJ, Bates M, Zhuang X (2006): Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods* 3, 793–795
- Ryan MD, King AM, Thomas GP (1991): Cleavage of foot-and-mouth disease virus polyprotein is mediated by residues located within a 19 amino acid sequence. *J Gen Virol* 72 (Pt 11), 2727–2732
- Sanderson MJ, Smith I, Parker I, Bootman MD (2014): Fluorescence microscopy. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 1042-1065
- Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H (2010): A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol* 190, 165–175

- Spindel S, Sapsford KE (2014): Evaluation of optical detection platforms for multiplexed detection of proteins and the need for point-of-care biosensors for clinical use. *Sensors (Basel)* 14, 22313–22341
- Spurrier B, Honkanen P, Holway A, Kumamoto K, Terashima M, Takenoshita S, Wakabayashi G, Austin J, Nishizuka S (2008): Protein and lysate array technologies in cancer research. *Biotechnol Adv* 26, 361–369
- Stewart CS, MacKenzie CR, Hall JC (2007): Isolation, characterization and pentamerization of alpha-cobrotoxin specific single-domain antibodies from a naïve phage display library: Preliminary findings for antivenom development. *Toxicon* 49, 699–709
- Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, van Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, Baetselier P de, Muyldermans S, Magez S (2004): Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem* 279, 1256–1261
- Strokappe N, Szynol A, Aasa-Chapman M, Gorlani A, Forsman Quigley A, Hulsik DL, Chen L, Weiss R, Haard H de, Verrips T (2012): Llama antibody fragments recognizing various epitopes of the CD4bs neutralize a broad range of HIV-1 subtypes A, B and C. *PLoS ONE* 7, e33298
- Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DAA (2012): Verification of 2A peptide cleavage. *Cold Spring Harb Protoc* 2012, 255–257
- Tighe PJ, Ryder RR, Todd I, Fairclough LC (2015): ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls. *Proteomics Clin Appl* 9, 406–422
- van der Linden RH, Frenken LG, Geus B de, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, Ron L de, Wilson S, Davis P, Verrips CT (1999): Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1431, 37–46
- van Es MH, Tang J, Preiner J, Hinterdorfer P, Oosterkamp TH (2014): Single molecule binding dynamics measured with atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 140, 32–36
- Vaneycken I, Devoogdt N, van Gassen N, Vincke C, Xavier C, Wernery U, Muyldermans S, Lahoutte T, Caveliers V (2011a): Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J* 25, 2433–2446
- Vaneycken I, D'huyvetter M, Hernot S, Vos J de, Xavier C, Devoogdt N, Caveliers V, Lahoutte T (2011b): Immuno-imaging using nanobodies. *Curr Opin Biotechnol* 22, 877–881

Wang Y, Wang F, Wang R, Zhao P, Xia Q (2015): 2A self-cleaving peptide-based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Sci Rep* 5, 16273

Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F et al. (2009): Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 198, 157–174

Danksagung

„Das Wiederfinden dessen, was der Mensch in die Dinge gesteckt hat, heißt sich Wissenschaft.“

-Friedrich W. Nietzsche

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank für all jene zum Ausdruck bringen, die mich beim Verfassen dieser Arbeit unterstützt haben. Dazu gehört die gesamte Arbeitsgruppe Rizzoli im Institut für Sinnes- und Neurophysiologie, die mich stets willkommen hieß.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rizzoli selbst, dessen Zuverlässigkeit, sichere Leitung und Zuversicht mich stets aufs Neue beeindruckten. Mehr noch bedanke ich mich bei Daniëlle de Jong, die durch ihre unermüdliche Betreuung und Anleitung, stundenlangen Erklärungen und akribische Planung diese Arbeit begleitet hat. Diese Zusammenarbeit auf Augenhöhe wird mir in ausgezeichneter Erinnerung bleiben.