

**Messung und Modulation membrannaher Prozesse in menschlichen
Zellen mit optischen Methoden**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Fakultät für Biowissenschaften
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von M. Sc. Philipp Rühl
geboren am 30.05.1990 in Kassel

Gutachter 1

Prof. Dr. Stefan H. Heinemann

Institut für Biochemie und Biophysik, Professur für Biophysik

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Hans-Knöll-Str. 2

07745 Jena

Gutachter 2

PD Dr. Helmut Pospiech

Leibniz-Institut für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V.

Beutenbergstr. 11

07745 Jena

Gutachter 3

Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

AG Zelluläre Neurophysiologie

Universität Bielefeld

Universitätsstr. 25

33615 Bielefeld

Mündliche Prüfung

bestanden am 28.02.2022

im Leibniz-Institut für Alternsforschung - Fritz-Lipmann-Institut e.V.

Beutenbergstr. 11

07745 Jena

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	V
Summary.....	VI
1. Einleitung	1
1.1. Das zelluläre Ruhepotential	3
1.1.1. Messung des Membranpotentials	5
1.1.2. Typ 1 genetisch codierter Spannungsindikatoren (GEVIs).....	7
1.1.3. Messung des Ruhepotentials mit GEVIs.....	10
1.2. Kopplung des Membranpotentials mit lokalen Signalprozessen	11
1.2.1. Photolabile Käfigverbindungen	12
1.2.2. Aufwärtskonvertierende Nanopartikel (UCNPs) als lokale Lichtquellen.....	14
1.2.3. Photomanipulierbare Fluoreszenzproteine	16
1.3. Zielstellung	18
2. Manuskripte	20
2.1. Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators	20
2.2. Fe ²⁺ -mediated activation of BK _{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe ²⁺	46
2.3. Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles.....	63
3. Diskussion	120
3.1. Optische Messung des zellulären Ruhemembranpotentials.....	120
3.1.1. Ratiometrische GEVIs zum Vergleich zellulärer Ruhemembranpotentiale	120
3.1.2. Kalibration des GEVI Signals	121
3.1.3. Optimierung der Auflösung ratiometrischer GEVIs	122
3.2. Optische Manipulation membrannaher Prozesse.....	125
3.2.1. CORM-S1 als Fe ²⁺ -freisetzendes Molekül	125
3.2.2. Regulation von BK _{Ca} -Kanälen durch Fe ²⁺ und Spannung	126
3.2.3. Biofunktionalisierte UCNPs als Quellen photochemischer Nanodomänen.....	129

3.3. Konklusion.....	133
Literaturverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XX
Publikationsliste	XXIII
Posterpräsentationen.....	XXIII
Vorträge.....	XXIII
Eigenanteil Manuskript Nr. 1	XXIV
Eigenanteil Manuskript Nr. 2	XXV
Eigenanteil Manuskript Nr. 3	XXVI
Danksagung	XXVII
Selbstständigkeitserklärung.....	XXVIII

Zusammenfassung

Die Plasmamembran ist die zentrale Barriere einer Zelle gegenüber ihrer Umwelt, gleichzeitig aber auch die Hauptplattform für Kommunikation und Stoffaustausch mit dieser. In dieser Arbeit wurden neue optische Verfahren entwickelt, mit denen quantitative Aussagen zu bisher schwer zugänglichen Fragestellungen zu Transport und Signalprozessen an der zellulären Plasmamembran getroffen werden können.

Jede bekannte lebende Zelle hält ein elektrisches Ruhemembranpotential (V_{Ruhe}) aufrecht, welches entscheidende Rollen u. a. bei der neuronalen Signalweiterleitung, elektrogenen Transportprozessen und Zellzykluskontrolle einnimmt. In dieser Arbeit wurden ratiometrische, genetisch codierte Spannungssensoren (GEVIs) etabliert, die in Kombination mit Verfahren zur automatisierten Hochdurchsatzmessung und Datenauswertung zum Vergleich der V_{Ruhe} -Werte verschiedener Zellpopulationen eingesetzt werden können. Mit diesen Methoden konnte der hyperpolarisierende Effekt der ektopischen Expression von krankheitsrelevanten Kaliumkanälen und Kaliumkanalmutanten auf das zelluläre Ruhemembranpotential nachgewiesen werden. Mit den entwickelten Methoden konnte außerdem die Latenz der Biosynthese funktioneller Kaliumkanäle von der Induktion der Transkription bis zum funktionellen Kanal bestimmt werden.

Die Regulation des elektrischen Potentials der Plasmamembran wird maßgeblich über die Aktivität von Ionenkanälen bestimmt, die ihrerseits über intrazelluläre Signalmoleküle wie Ca^{2+} , CO oder Fe^{2+} reguliert werden können. Um schnelle Änderungen der Konzentration von Fe^{2+} zu erzeugen, wurde das photolabile CO-freisetzende Molekül CORM-S1 (Dicarbonyl-Biscysteamin-Eisen(II)) auf seine Eignung als Fe^{2+} -freisetzendes Molekül untersucht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Fe^{2+} aus CORM-S1 über Beleuchtung mit blauem Licht quantitativ freigesetzt werden kann. Mit Hilfe von CORM-S1 wurde die Regulation der Ca^{2+} - und spannungsgesteuerten BK_{Ca} -Kaliumkanäle durch intrazelluläres Fe^{2+} untersucht. CORM-S1 wurde in Kombination mit einer Blitzlichtquelle zur Erzeugung schneller Fe^{2+} -Konzentrations sprünge eingesetzt und so die Geschwindigkeit der Fe^{2+} -abhängigen Aktivitätsänderung von BK_{Ca} -Kanälen bestimmt.

Die optische Manipulation von Molekülen wie CORM-S1 ist in der klassischen Lichtmikroskopie durch die Beugungsgrenze limitiert. Um Reaktionen mit einer räumlichen Präzision von wenigen nm in der Umgebung eines Zielproteins zu katalysieren, wurde in dieser Arbeit die Eignung aufwärtskonvertierender Nanopartikel (UCNPs), welche infrarotes in sichtbares bis ultraviolettes Licht umwandeln können, als Quellen photochemischer Reaktionsnanodomänen untersucht. Die Fähigkeit lokale, photochemische Reaktionen auszulösen wurde mit Hilfe des Grün-zu-Rot

photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Dendra2 evaluiert. Dazu wurden biofunktionalisierte UCNPs mit molekularer Präzision über spezifische Antikörper-Antigeninteraktionen an genetisch veränderten Membranproteinen positioniert und die Photokonversionsrate von membranständigem Dendra2 untersucht. Extrazellulär gebundene UCNPs konnten Dendra2 sowohl auf der Außenseite als auch auf der Innenseite der Membran innerhalb von Sekunden bis Minuten vollständig konvertieren. Zudem wurde nachgewiesen, dass die Reaktionsrate mit steigender Distanz zwischen Emitter (UCNP) und Empfänger (Dendra2) steil abfällt.

Summary

The plasma membrane is a cell's main barrier to its environment, but at the same time it is also the central platform for communication and material exchange with it. In this thesis, new optical methods were developed, with which quantitative statements can be made on previously difficult to access questions about transport and signaling processes across the cellular plasma membrane.

Every known living cell maintains an electrical resting membrane potential (V_{rest}) that plays crucial roles in neuronal signal transmission, electrogenic transport processes and cell cycle control. Here, ratiometric, genetically encoded voltage sensors (GEVIs) as well as methods for automated high-throughput recording and data analysis were developed to measure V_{rest} of different cell populations. Using these methods, the hyperpolarizing effect of the ectopic expression of disease-relevant potassium channels and potassium channel mutants on the cellular V_{rest} was demonstrated. In addition, the developed methods allowed to estimate the latency of the biosynthesis of functional potassium channels from the induction of transcription to the functional channel.

The regulation of the electrical potential of the plasma membrane is largely determined by the activity of ion channels, which in turn can be regulated by intracellular signaling molecules such as Ca^{2+} , CO or Fe^{2+} . In order to achieve targeted, rapid changes in the concentration of free Fe^{2+} , the photolabile CO-releasing molecule CORM-S1 (dicarbonyl-biscysteamine-iron (II)) was examined for its suitability as an Fe^{2+} -releasing molecule. In this work, it was demonstrated that Fe^{2+} can be fully released from CORM-S1 by illumination with blue light. Furthermore, the regulation of the Ca^{2+} and voltage-gated BK_{Ca} K^{+} channels by intracellular Fe^{2+} was investigated using CORM-S1. With CORM-S1 and high intensity flashlight illumination, rapid changes in free Fe^{2+} concentration were achieved, and thus the speed of the Fe^{2+} -dependent increase in activity of BK_{Ca} channels could be determined.

In classical light microscopy, the optical manipulation of molecules like CORM-S1 is restricted by the diffraction limit. In order to catalyze reactions with a spatial precision of a few nm in the vicinity of a target protein, the suitability of up-converting nanoparticles (UCNPs), which can convert infrared into visible or ultraviolet light, as sources of photochemical nanodomains was investigated. The ability to trigger local photochemical reactions was evaluated with the help of the green-to-red photoconvertible fluorescent protein Dendra2. For this purpose, biofunctionalized UCNPs were positioned with molecular precision via specific antibody-antigen interactions on genetically-modified membrane proteins and the photoconversion rate of membrane-bound Dendra2 was investigated. Extracellularly bound UCNPs were able to fully convert Dendra2 on the outside as well as on the inside of the membrane within seconds to minutes. Furthermore, it was proven that the reaction rate of the photoconversion decreases steeply with increasing distance between emitter (UCNP) and receiver (Dendra2).

1. Einleitung

Biomembranen sind grundlegende Bestandteile lebender Organismen und bilden Barrieren, die das wässrige Innere einer Zelle bzw. eines Zellkompartiments von seiner wässrigen Umgebung trennen.¹ Sie setzen sich neben Membranproteinen und Sterolen zum Großteil aus Glycerophospholipiden und Sphingolipiden zusammen, die aus je einer polaren, hydrophilen Kopfgruppe und zwei unpolaren, hydrophoben Schwanzgruppen bestehen (Abb. 1a).²

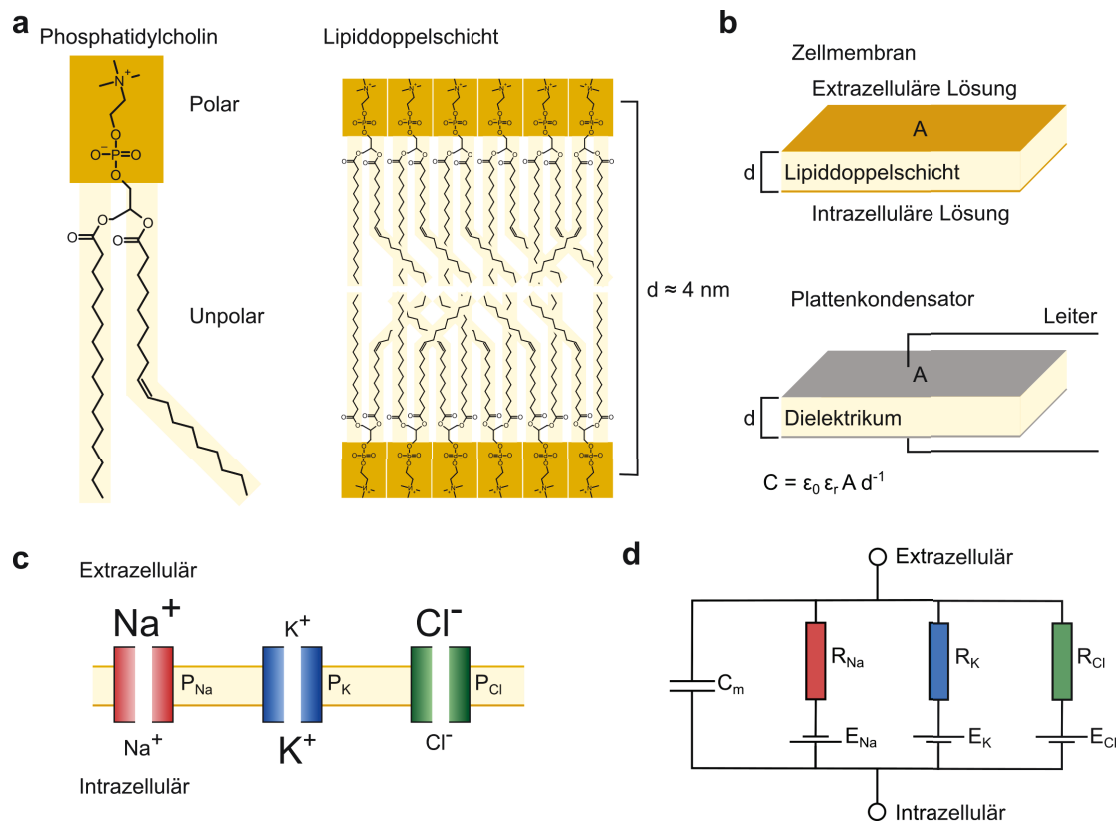


Abbildung 1. **Chemische und elektrische Eigenschaften biologischer Membranen.** **a links**, Struktur eines Membranlipids am Beispiel eines Phosphatidylcholins mit einem Palmitin- und Ölsäurerest. **a rechts**, Lipiddoppelschicht in wässriger Lösung.¹ **b**, Biomembranen bilden Diffusionsbarrieren für Ionen in wässriger Lösung und haben daher eine elektrische Membrankapazität C_m , die analog zu der eines Plattenkondensators berechnet werden kann: $\epsilon_0 = 8,854 \text{ AsV}^{-1}\text{m}^{-1}$; ϵ_r = relative Permittivität; A = Membranfläche; d = Membrandicke. **c**, Qualitative Ionenverhältnisse von Na^+ , K^+ und Cl^- in tierischen Zellen. Die Permeabilität (P_{Ion}) einer Membran für jede Ionenspezies wird über die Aktivität von ionenselektiven Kanälen, Pumpen und Austauschern bestimmt. **d**, Ersatzschaltbild einer Zelle nach Hodgkin und Huxley mit einer Membrankapazität C_m und dem Membranpotential V_m , das sich aus dem elektrochemischen Potential E_{Ion} der einzelnen Ionenspezies und deren Permeabilität nach der Goldman-Gleichung (Gl. 1) ergibt.^{3,4}

Kopf- und Schwanzgruppen der Lipide sind durch Ester- bzw. Amidbindungen über Glycerin bzw. Sphingosin miteinander verknüpft (Abb. 1a).² Phospholipide bilden in wässriger Lösung spontan Lipiddoppelschichten aus, bei denen die polaren Kopfgruppen der wässrigen Phase und die unpolaren Fettsäurereste einander zugewandt sind (Abb. 1a).^{1,2} Innerhalb der Membran können sich sogenannte Mikro-/Nanodomänen in Form von *Lipid/Membrane rafts* bilden, in denen vermehrt Lipide mit gesättigten Fettsäureresten und Cholesterin vorkommen.^{5,6} In *Lipid rafts*

befinden sich bevorzugt Proteine mit posttranslationalen Modifikationen wie z. B. Palmitoylierungen, sodass Membranproteine, die gemeinsam an Transport- oder Signalprozessen beteiligt sind, in räumliche Nähe zueinander gebracht werden können.^{6,7}

Biomembranen stellen Diffusionsbarrieren für polare und geladene Substanzen dar. In physiologischen Lösungen wirken sie daher als Dielektrika, die je zwei leitende Flüssigkeitsschichten voneinander trennen und lassen sich daher als elektrische Plattenkondensatoren, deren Kapazitäten von der Membrandicke und der Membranfläche abhängen, veranschaulichen (Abb. 1b).^{1,4} Typische Kapazitätswerte der Biomembranen von Säugerzellen liegen im Bereich von 1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$.^{8,9} Die Schichtdicke bzw. die geladenen Schicht aus Oberflächenladungen der Membranlipide und Gegenionen (Gouy-Chapman-Stern-Schicht) und die daraus resultierende Membrankapazität sind temperaturabhängig.^{10,11}

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na^+]_e + P_K[K^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e} \right)$$

Gleichung 1. **Goldmann-Gleichung für Na^+ , K^+ und Cl^-** : V_m = Membranpotential; $R = 8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$; T = absolute Temperatur in K; $F = 96,485 \text{ kC mol}^{-1}$; $[\]_e, [\]_i$ extra-, intrazelluläre Ionenkonzentration; P = Permeabilität.³

Aufgrund der elektrisch und chemisch isolierenden Wirkung der Lipiddoppelschicht können durch aktiven Transport über Transmembranproteine wie Ionenpumpen (z. B. die Na^+/K^+ -ATPase) und Ionenaustauscher elektrochemische Gradienten zwischen intra- und extrazellulärer Lösung erzeugt werden (Abb. 1c).¹² Transportraten von Ionenpumpen und -transportern liegen im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-3} s^{-1} .^{12,13} Ionenkanäle können hingegen Transportraten von 10^8 s^{-1} erreichen.¹⁴ Schnelle Änderungen in der Permeabilität der Biomembran u. a. für Na^+ und K^+ hängen daher maßgeblich von der Expression und Aktivität von Ionenkanälen ab (Abb. 1c, d). Typische Ionenkonzentrationen von Säugerzellen sind: extrazellulär 145 mM Na^+ , 4 mM K^+ , 116 mM Cl^- und intrazellulär 12 mM Na^+ , 139 mM K^+ , 4 mM Cl^- (Abb. 1 c); nach der Nernst-Gleichung ergeben sich daraus (bei einer Temperatur von 37 °C) Potentiale von +67 mV für Na^+ , -95 mV für K^+ und -90 mV für Cl^- .¹⁵ Das Membranpotential (V_m) ergibt sich aus der Permeabilität (P_{Ion}) der Membran für eine Ionenspezies und deren extra- und intrazellulärer Konzentration und lässt sich mit Hilfe der Goldmann-Gleichung berechnen (Abb. 1d, Gl. 1).³ Erhöht sich die Permeabilität der Membran für eine Ionenspezies, so verändert sich V_m in Richtung des Nernst-Potentials für diese Ionensorte.⁴ Die Öffnung von Natrium- und Calciumkanälen führt dabei in der Regel zur Depolarisation (Membraninneres positiver) und die Öffnung von Kalium- und Chloridkanälen zur Hyperpolarisation (Membraninneres negativer).¹⁶

1.1. Das zelluläre Ruhepotential

Sowohl erregbare als auch nichterregbare Zellen halten ein negatives V_m aufrecht, das Ruhemembranpotential (V_{Ruhe}). Typische V_{Ruhe} -Werte der Plasmamembranen von Säugerzelllinien liegen zwischen -5 mV in befruchteten Oozyten und -95 mV in Skelettmuskelzellen (Abb. 2a).¹⁷ V_{Ruhe} einer Zelle hängt dabei maßgeblich von der Expression bestimmter Ionenkanäle ab. Wird in HEK293T-Zellen (*Human embryonic kidney cells*) der einwärtsrichtende Kir2.1-Kaliumkanal stabil überexprimiert, so verschiebt sich V_{Ruhe} von -40 bis -50 mV auf -70 bis -90 mV.^{18–20} Es ist bekannt, dass V_{Ruhe} einen starken Einfluss auf Prozesse wie neuronale Signalweiterleitung, Membrantransport und Muskelkontraktilität, aber auch auf Wundheilung, Embryonalentwicklung, Zellvolumenkontrolle, Zellzykluskontrolle, virale Replikation, Tumorprogression und den circadianen Rhythmus hat.^{4,17,21–29}

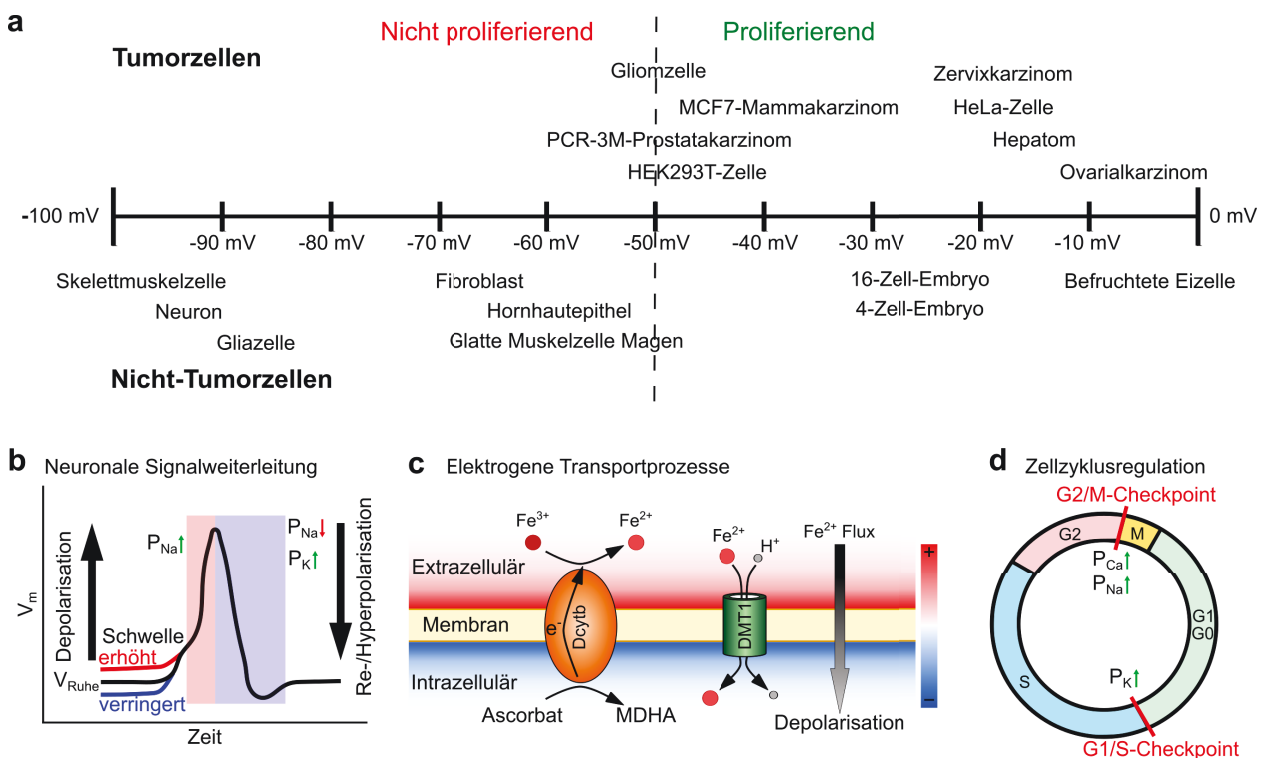


Abbildung 2. Beispiele für die physiologische Relevanz des Ruhemembranpotentials. **a**, Übersicht der V_{Ruhe} -Werte erregbarer und nichterregbarer Zellen.^{17,25} **b**, Schematische Darstellung eines Aktionspotentials in der neuronalen Signalweiterleitung. Beim Überschreiten eines Schwellenwerts werden spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet, welche P_{Na} zeitweise erhöhen und dann inaktivieren. Die daraus resultierende Depolarisation der Membran aktiviert spannungsabhängige Kaliumkanäle, die P_K erhöhen und die Membran wieder auf ein negatives V_m setzen.^{4,22} **c**, Elektrogener Transport am Beispiel der duodenalen Fe^{2+} -Aufnahme. Nicht-Häm-Eisen liegt in der Nahrung hauptsächlich als schwerlösliches Fe^{3+} vor. Zur Aufnahme wird es an der Plasmamembran der Enterozyten über eine duodenale Cytochrom-b-Reduktase (Dcytb) zu Fe^{2+} reduziert.³⁰ Dabei wird ein Elektron (e^-) von einem intrazellulären Ascorbat (Oxidation zu Monodehydroascorbat, MDHA) auf Fe^{3+} übertragen.³¹ Fe^{2+} wird von einem divalenten Metallionentransporter (DMT1) in das Cytoplasma transportiert.³² Die Fe^{2+} -Aufnahme ist durch den Fe^{2+}/H^+ -Symporter DMT1 an den pH-Gradienten gekoppelt. **d**, Die Regulation des Zellzyklus ist abhängig von der Permeabilität der Membran für verschiedene Ionen. Am Übergang von der G1- zur S-Phase ist die Permeabilität für K^+ erhöht, beim Übergang von G2 zu M die Permeabilität für Na^+ und Ca^{2+} .^{16,17,33}

In Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems führt die Öffnung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen (Nav) und deren schnelle Inaktivierung zu einer kurzzeitig erhöhten Permeabilität der Membran für Na^+ und anschließend zu einer Öffnung spannungsgesteuerter Kaliumkanäle (Kv) und einer damit einhergehenden erhöhten Permeabilität für K^+ .⁴ Da die Permeabilität der Membran für jede Ionenspezies zeitlich und räumlich begrenzt ist, ergibt sich daraus der charakteristische Spannungsverlauf eines Aktionspotentials (Abb. 2b).⁴ Damit ein Aktionspotential ausgelöst werden kann, muss V_m einen Schwellenwert überschreiten, sodass eine ausreichende Anzahl von Natriumkanälen geöffnet wird (Abb. 2b). Ein dauerhaft depolarisiertes V_{Ruhe} kann jedoch inhibierend auf die neuronale Erregbarkeit wirken, da Nav -Kanäle nicht mehr aus ihrem inaktivierten Zustand in einen aktivierbaren Zustand übergehen können.³⁴ Auf diese Weise führen z. B. zyklische Änderungen von V_{Ruhe} im suprachiasmatischen Kern, einem Teil des Hypothalamus, zu einer Änderung der neuronalen Erregbarkeit im Verlauf der Tageszeit.²²

Neben der neuronalen Erregbarkeit ist V_{Ruhe} auch in nichterregbaren Zellen für elektrogene Transportprozesse essentiell. Ein Beispiel dafür ist die Aufnahme von Fe^{2+} an der apikalen Membran der Enterozyten des Duodenums.³⁰ Eisen ist ein zentrales Spurenelement, das u. a. für die Bildung der Eisenschwefelcluster in der Atmungskette oder als zentrales Ion in Häm entscheidende Bedeutung für die zelluläre Homöostase aufweist.^{35,36} Dysregulationen des Eisenstoffwechsels stehen mit Erkrankungen wie Anämie, erblicher Hämochromatose oder Krebs in Verbindung.³⁷⁻⁴¹ In einer Reihe von Tumorzellen wie der LNCaP-Prostatakrebszelllinie (*Lymph node carcinoma of the prostate*) begünstigt die exzessive Aufnahme von Fe^{2+} die Zellproliferation.⁴² Da der Körper keinen direkten Weg besitzt, um exzessives Eisen abzugeben, muss die Aufnahme des Eisens aus der Nahrung streng reguliert werden.^{41,43} Im Darm wird das aus der Nahrung aufgenommene Eisen über einen $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$ -Symporter (DMT1) aus dem Darmlumen in die Enterozyten transportiert.³⁰ Da der pH-Wert in der extrazellulären Lösung des Duodenums niedriger ist als der des Cytoplasmas der Enterozyten, wird durch diesen sekundär aktiven Transportprozess deutlich mehr Fe^{2+} über DMT1 in das Cytoplasma transportiert als es durch einen rein passiven Transportprozess möglich wäre.³⁰ Beim Transport von einem Fe^{2+} werden insgesamt vier positive Ladungen in das Zellinnere transportiert und die Zelle somit tendenziell depolarisiert (Abb. 2c). Ein negativeres V_{Ruhe} von Zellen mit DMT1 erhöht daher die Fe^{2+} -Transportrate und verschiebt das elektrochemische Gleichgewicht in Richtung erhöhter intrazellulärer Fe^{2+} -Konzentration.¹³

Bereits seit Längerem wird vermutet, dass V_{Ruhe} die Regulation des Zellzyklus beeinflusst (Abb. 2d).^{44,45} In V79 Zellen (Lungenfibroblasten aus dem chinesischen Zwerghamster) wurden V_{Ruhe} -

Werte von -20 mV in der späten G1-, -29 mV in der S-, -22 mV in G2- und bis zu -14 mV in Ana-, Telo- und früher G1-Phase beobachtet.⁴⁵ In Astrozyten sind insbesondere Kir4.1-Kaliumkanäle für ein negatives V_{Ruhe} von -80 mV verantwortlich.²⁵ In von Astrozyten abgeleiteten Gliomzellen (Hirntumorzellen) werden Kir4.1-Kanäle nicht mehr funktionell exprimiert, sodass V_{Ruhe} im Bereich von -50 mV liegt (Abb. 2a).²⁵ In anderen Tumoren steht hingegen die Überexpression von Kaliumkanälen mit einer erhöhten Proliferationsrate in Verbindung.^{46,47} Bisher ist bekannt, dass bestimmte spannungsgesteuerte Kaliumkanäle wie z. B. Kv10.1-Kanäle oder die Ca^{2+} - und spannungsgesteuerte BK_{Ca} -Kanäle (*Big conductance K⁺*) in Krebszelllinien wie Melanomzellen, Brust- oder Prostatakrebszellen verstärkt vorkommen bzw. eine besonders hohe Aktivität aufweisen.⁴⁸⁻⁵¹ Hemmerlein *et al.* berichteten von einer Überexpression von Kv10.1-Kanäle in 80% aller von ihnen getesteten Tumorproben.⁴⁶ In LNCaP-Prostatakrebszellen finden sich BK_{Ca} -Kanäle, die mit den akzessorischen $\gamma 1$ -Untereinheiten und Cav3.2-Kanälen kolokalisiert sind und daher eine erhöhte Aktivität bei niedriger Membranspannung aufweisen.⁵⁰⁻⁵²

1.1.1. Messung des Membranpotentials

Zur Untersuchung der elektrischen Eigenschaften einer Zelle kommen bevorzugt elektrodenbasierte Methoden wie Whole-Cell-Patch-Clamp zum Einsatz.⁵³ In der Pipette, die für die Ganzzelleableitung benötigt wird, befindet sich jedoch eine vordefinierte Lösung, die sowohl die intrazelluläre Ionenkonzentration als auch die Permeabilität für die einzelnen Ionenspezies und damit V_m vorgibt (Gl. 1).^{53,54} Häufig werden daher Pipetten mit hohem elektrischen Widerstand und entsprechend geringem Öffnungsdurchmesser verwendet.⁴⁵ Leckströme verhindern aber auch bei dieser Methode eine verlässliche Messung von V_{Ruhe} .⁵⁴

Komplementär zu elektrodenbasierten Messverfahren werden zunehmend auch optische Methoden zur Spannungsmessung eingesetzt. Mit optischen Methoden lässt sich V_m einzelner Bereiche einer Zellemembran z. B. Dendriten und Axone gleichzeitig und unabhängig voneinander betrachten.⁵⁵ Zudem kann die Spannung vieler Zellen in neuronalen Zellnetzwerken simultan abgeleitet werden.⁵⁶ Bereits 1973 wurden die ersten Aktionspotentiale mit Merocyanin 540, einem spannungssensitiven, fluoreszierenden Farbstoff, gemessen.⁵⁷ Einige spannungssensitive Farbstoffe wie Di-4-ANNEPS lagern sich in die Membran ein und reagieren auf Änderungen des elektrischen Feldes durch Änderung ihrer Position/Orientierung, was zu einer Änderung ihrer Fluoreszenzeigenschaften führt.⁵⁸ Durch die Einlagerung geladener Moleküle in die Membran kann sich jedoch die Membrankapazität ändern und damit können sich physiologische Signalprozesse verändern.⁵⁹ Zudem zeigen einige spannungssensitive Farbstoffe wie DiBAC4(3) aktivierende Effekte auf Membrantransportproteine wie BK_{Ca} -Kanäle und es ist

daher fraglich, ob sie V_{Ruhe} unter physiologischen Bedingungen korrekt wiedergeben.^{60,61} Zusätzlich benötigen spannungssensitive Farbstoffe optimierte Prozeduren zur Beladung, können in Langzeitexperimenten photo-/zytotoxisch wirken, mit der Zeit aus der Zelle transportiert werden und lassen sich nicht auf eine bestimmte Zellpopulation begrenzen.⁵⁷

Als Alternative zu spannungssensitiven Farbstoffen wurden in den letzten beiden Jahrzehnten zahlreiche genetisch codierte Spannungsindikatoren (GEVIs) entwickelt.^{59,62–67} Im Allgemeinen lassen sich GEVIs grob in drei übergeordnete Klassen unterteilen (Abb. 3).⁶⁴

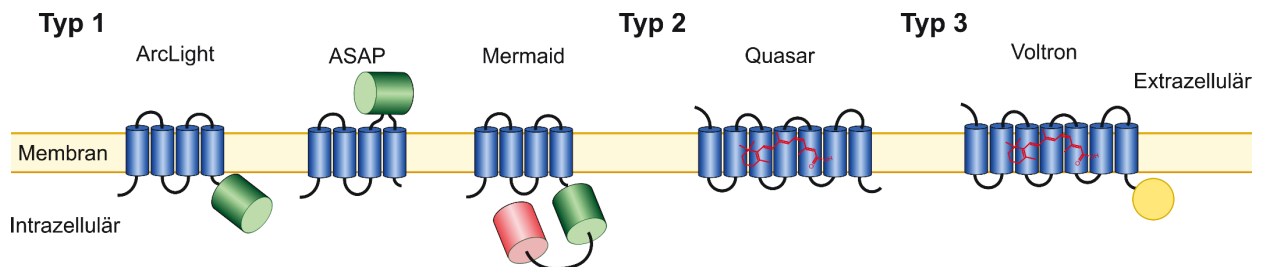


Abbildung 3. **Beispiele genetisch codierter Spannungsindikatoren (GEVIs).** GEVIs können grob in drei übergeordnete Klassen eingeteilt werden.⁶⁴ **Typ-1-GEVIs** basieren auf der Kopplung einer spannungssensitiven Transmembrandomäne (VSD, blau) eines spannungssensitiven Membranproteins mit einem (grün) oder mehreren (grün, rot) fluoreszenten Proteinen. **Typ-2-GEVIs** leiten sich von einem Archaeerhodopsin ab. Die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenz der Typ-2-Sensoren beruht auf einer spannungsabhängigen Änderung des Protonierungsgrads eines gebundenen Retinals (rot). **Typ-3-GEVIs** sind Kombinationen aus Typ-1- oder Typ-2-Sensoren mit einem chemisch gekoppelten, fluoreszenten Farbstoffmolekül (gelb), das als FRET-Donor/Akzeptor (Förster-Resonanzenergietransfer) wirken kann. FRET ist ein Prozess, bei dem die Energie eines angeregten Farbstoffs/Fluoreszenzproteins (Donor) auf einen zweiten Farbstoff oder ein zweites Fluoreszenzprotein (Akzeptor) durch Dipol-Dipolkopplung übertragen wird.^{68,69}

Typ-1-GEVIs beruhen auf der Kopplung eines oder mehrerer Fluoreszenzproteine (FPs), wie dem grünfluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, mit der spannungssensitiven Domäne (VSD) eines Membranproteins (Abb. 3, ArcLight, ASAP).⁶⁴ Alle Typ-1-GEVIs haben gemein, dass die Änderungen des elektrischen Feldes der Membran eine Reorientierung hauptsächlich positiv geladener Schaltladungen der VSD induziert.⁷⁰ Daraus resultiert eine Änderung des Anregungs-/Emissionsspektrums bzw. der Intensität des/der gekoppelten FPs.⁶⁴

Typ-2-GEVIs umfassen eine Reihe von Sensoren, die von bakteriellen Archaeerhodopsinen, lichtabhängigen Protonenpumpen, abgeleitet sind.⁷¹ Es zeigte sich, dass nichtleitende Varianten auch als fluoreszente Spannungssensoren verwendet werden können.⁷² Bei Typ-2-GEVIs wird die Fluoreszenzintensität eines kovalent gebundenen Retinals durch dessen Protonierungsgrad bestimmt (Abb. 3, Quasar).⁷² Die Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung von Typ-2-GEVIs kommt der spannungssensitiver Farbstoffe sehr nahe, sodass mit diesen auch Aktionspotentiale verlässlich nachverfolgt werden können.^{72,73} Ein großer Nachteil von Typ-2-GEVIs ist ihre geringe Fluoreszenzintensität, die mehrere Größenordnungen niedriger sein kann als die von Typ-1-GEVIs.^{64,72}

Typ-3-GEVIs beruhen auf der chemischen Kopplung eines Typ-1- oder Typ-2-GEVIs (Abb. 3, Voltron) mit niedermolekularen Farbstoffen als FRET-Donor oder Akzeptor.⁷⁴ Mit diesen konnten deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten als mit reinen Typ-2-Sensoren und höhere Geschwindigkeiten als mit Typ-1-Sensoren erreicht werden. Sie benötigen jedoch einen zusätzlichen chemischen Kopplungsschritt, der den großen Vorteil eines rein genetisch codierten Sensors unterminiert.⁶⁴

1.1.2. Typ 1 genetisch codierter Spannungsindikatoren (GEVIs)

Das erste Typ-1-GEVI war FlaSh, ein Fusionsprotein einer nichtleitenden Version des Shaker-Kaliumkanals mit GFP.⁷⁵ Die maximale Änderung der GFP-Fluoreszenz (Δr) lag bei ca. 5% und der dynamische Bereich lediglich zwischen -30 und -50 mV.⁷⁵ SPARC, ein GEVI basierend auf einem Natriumkanal, wies eine schnellere Kinetik gegenüber Spannungsänderungen auf, hatte jedoch eine geringere Signalamplitude.⁷⁶ Der erste Sensor, der auf FRET basierte, war VSFP1 ($\Delta r = 1,8\%$ pro 100 mV), ein Fusionsprotein aus einem cyan- und einem gelbfluoreszierenden Protein und der VSD eines spannungssensitiven Kaliumkanals (Kv2.1).^{68,77} Neuere Typ-1-GEVIs haben VSDs aus spannungssensitiven Phosphatasen (VSPs) (Abb. 4a).⁷⁸ Diese besitzen vier Transmembransegmente (S1-S4) aus VSPs, welche große Homologien zu der S1-S4-Region von Kv-Kanälen aufweisen (Abb. 4a), jedoch keine Porenregion, die für die Ionenleitfähigkeit der Kaliumkanäle benötigt wird.⁷⁸ Zudem wurde der intrazelluläre, katalytisch aktive Teil der VSPs entfernt. Der Vorteil von VSPs besteht darin, dass sie im Gegensatz zu Kaliumkanälen funktionelle Monomere sind.⁷⁹ Die ersten VSP-basierten GEVIs waren die FRET-Sensoren VSFP2.1 und Mermaid1 mit einer VSP aus der Schlauchseescheide (*Ciona intestinalis*, CI).^{80,81} Eine Reihe weiterer FRET-Sensoren wie VSFP-Butterfly1.2, VSFP2.42 und Mermaid2 basieren ebenfalls auf CI-VSP.^{82,83}

Die erste potentiometrische GEVI-Familie mit deutlich höherer Signaländerung war die ArcLight-Familie. Sensoren aus der ArcLight-Familie sind Fusionsproteine aus einer pH-sensitiven GFP-Variante (sePhluorin, *Super ecliptic phluorin*) und der VSD der CI-VSP (Abb. 3, Abb. 4a).⁸⁴ Für die große Signalamplitude von ArcLight sind vier Punktmutationen an Position D147, F202, T204 und A227 (im Vergleich zu EGFP) notwendig, die sich alle auf der gleichen Seite der β -Fass-Struktur des FP befinden (Abb. 4b).⁸⁵ Eine S147D-Mutation, die einen Großteil der pH-Sensitivität von sePhluorin ausmacht, ist hierbei von entscheidender Bedeutung.⁸⁵ Die Aminosäurereste 147 und 204 liegen auf benachbarten β -Strängen auf der Außenseite der β -Fass-Struktur (Abb. 4b). Interaktionen zwischen diesen Resten können das Fluoreszenzspektrum des FP beeinflussen.⁸⁶ Der Aminosäurerest 147 liegt benachbart zu einem Histidinrest, der in das Innere der β -Fass-Struktur

zeigt und mit dem Chromophor des FP interagiert.^{86,87} Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die Funktionsweise von ArcLight auf eine intermolekulare Dimerisierung zwischen zwei FPs zurückzuführen ist.^{85,88–90} Die ursprüngliche ArcLight-Variante mit der größten Signaländerung (35% pro 100 mV) war ArcLight-Q239, bei der sePhluorine an CI-VSP nach dessen Glutaminrest an Position 239 fusioniert wurde.⁸⁴ Ausführliche Untersuchungen zu Mutationen der vier Schaltladungen von CI-VSP sowie weiterer hochkonservierter Reste in den übrigen Transmembransegmenten ergaben Bongwoori, einen Sensor mit verbesserter Geschwindigkeit.⁹¹ Nachfolgende ArcLight-Versionen wurden bezogen auf die Membranlokalisierung (ArcLight-MT) oder auf die Richtung des Signals (Marina) optimiert, zeigten aber vergleichbare Signaländerungen wie oder geringere Signaländerungen als ArcLight-Q239.^{88,92,93}

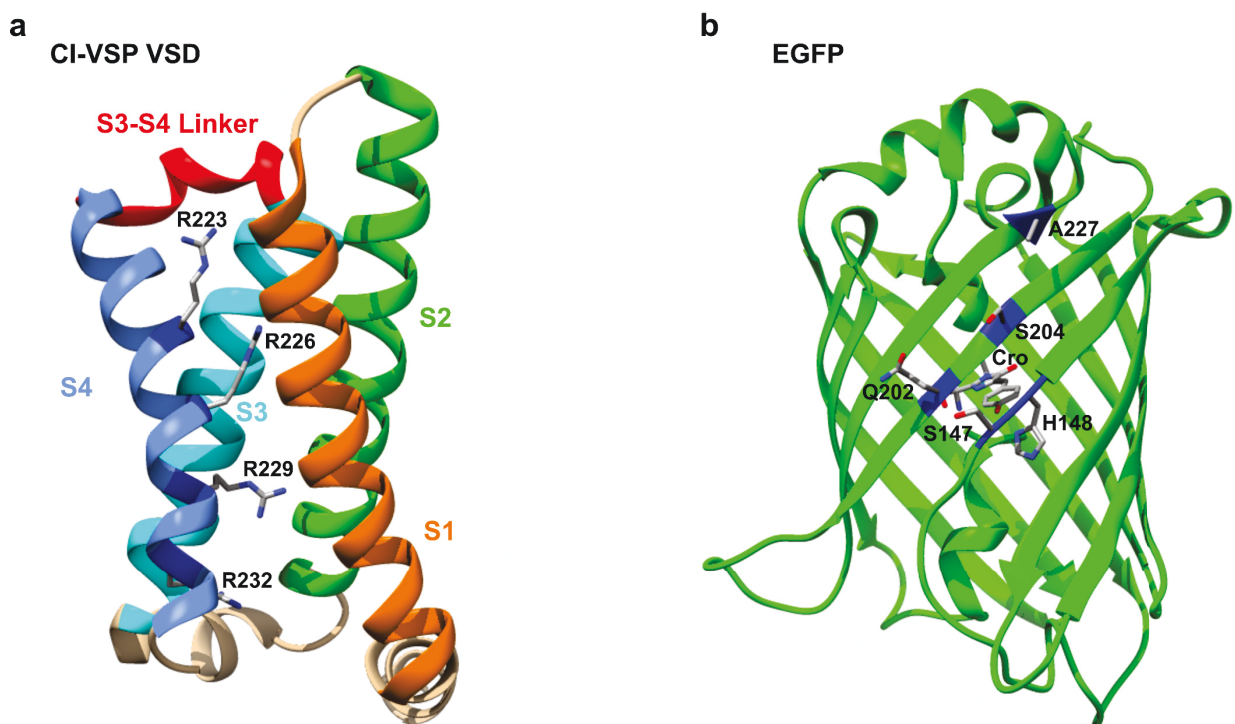


Abbildung 4. **Struktureller Aufbau von ArcLight-Sensoren.** **a**, Struktur der spannungssensitiven Transmembrandomäne (VSD) einer spannungssensitiven Phosphatase (VSP) aus der Schlauchseescheide *Ciona intestinalis* (CI) (PDB ID: 4G7V).⁹⁴ Die Argininreste R223-R232 sind sogenannte Schaltladungen (dunkelblau), die bei Depolarisation von V_m eine Bewegung des vierten Segments (S4) aus der Membran (nach oben) bewirken.⁷⁰ In Wildtyp-VSPs wird die Bewegung über einen Linker nach S4 auf eine Phosphatasedomäne übertragen.⁷⁸ In ArcLight-Sensoren wird die Bewegung auf ein fusioniertes pH-empfindliches GFP (sePhluorin) übertragen.⁸⁴ **b**, Struktur von EGFP (PDB ID: 2Y0G).⁹⁵ Mutationen an den entsprechenden Positionen in EGFP (147, 202, 204, 227), die für die große Signaländerung von ArcLight verantwortlich sind (blau), befinden sich alle auf der gleichen Seite der β -Fass-Struktur.⁸⁵ Histidin 148 ist am H^+ -Netzwerk innerhalb der β -Fass-Struktur beteiligt und befindet sich in räumlicher Nähe zum Chromophor (Cro) sowie zu Rest 147, welcher entscheidend für die pH-Empfindlichkeit von sePhluorin ist.^{85,96}

Eine weitere potentiometrische GEVI-Familie ist die ASAP-Familie (*Accelerated sensor of action potentials*). ASAP1 ist ein Fusionsprotein der VSD der VSP aus dem Huhn (*Gallus gallus*, GG) und einem zirkulär permutierten GFP (cpGFP) (Abb. 3a, b).^{97,98} cpGFP ist eine Version von GFP,

bei der die ursprünglichen Termini von GFP über einen kurzen Linker verknüpft und neue Termini so eingefügt wurden, dass sich N- und C-Terminus in räumlicher Nähe des Chromophors bzw. des mit dem Chromophor interagierenden Histidins befinden (Abb. 4b, Abb. 5).⁹⁹ Die rigide β -Fass-Struktur kann durch die relative Änderung der Position des N- und C-Terminus aufgebrochen werden (Abb. 5), was zu einem veränderten Protonierungsgrad des Chromophors und/oder zu einer Änderung von dessen Fluoreszenzquantenausbeute führt.^{100,101} Dies äußert sich in einer Änderung der Fluoreszenzintensität bzw. des Fluoreszenzspektrums.^{99,102}

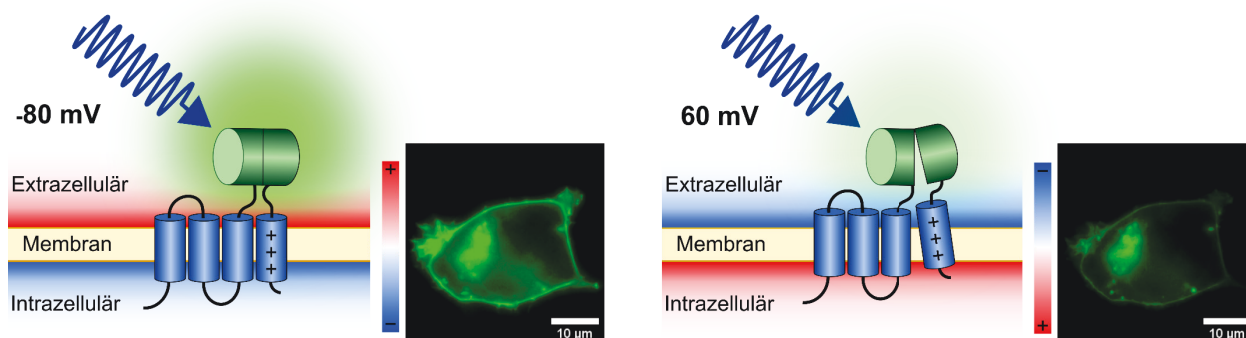


Abbildung 5. **Funktionsweise der ASAP-GEVI-Familie.** Typ-1-GEVIs aus der ASAP-Familie sind Fusionsproteine aus einem zirkulär permutierten GFP (cpGFP) und der VSD aus *Gallus gallus*.⁹⁷ Das cpGFP befindet sich dabei zwischen S3 und S4. In S4 bestimmen maßgeblich drei Schaltladungen (drei Arginine für ASAP2s und ASAP3) die Position von S4 im elektrischen Feld.¹⁰³ Bei Depolarisation der Membran (rechts, 60 mV) bewegt sich S4 aus der Membran. Die Kraft wird auf das fusionierte cpGFP mittels des S3-S4-Linkers übertragen. Dies führt zu einer Konformationsänderung des cpGFP und damit der Umgebung des Chromophors, was sich in einer Änderung der Fluoreszenzintensität äußert. Die dargestellten Fluoreszenzbilder zeigen eine mit einer ASAP-Variante transfizierte HEK293T-Zelle in Whole-Cell-Patch-Clamp-Konfiguration bei -80 mV (links) oder 60 mV (rechts).

In der ASAP-Familie wurde die VSP aus dem Huhn verwendet, da diese eine kürzere Linkersequenz zwischen S3 und S4 als CI-VSD besitzt (Abb. 4a), welche die Kopplung zwischen Spannungssensorbewegung und Konformationsänderung des cpGFP verbessern soll.^{97,101} Die erste Variante (ASAP1) reagierte signifikant schneller auf Spannungsänderungen als ArcLight-Q239 und ermöglichte es dadurch schnelle, neuronale Signalprozesse besser zu verfolgen.⁹⁷ Seit Veröffentlichung der ursprünglichen ASAP1-Version gab es eine Reihe neuer Varianten wie ASAP2s, ASAP2f, ASAP-Y und ASAP3 mit verbessertem dynamischem Bereich bzw. verbesserter Kinetik.^{103–106} Die verbesserten Eigenschaften wurden durch Änderungen der Linkersequenz zwischen S3 und cpGFP (ASAP2f, ASAP3), an den Schaltladungen in S4 (ASAP2s, ASAP3) oder durch Entfernung eines in ASAP1 beobachteten intermediären Übergangszustands (ASAP-Y) erreicht.^{103–106}

1.1.3. Messung des Ruhepotentials mit GEVIs

Langsame Änderungen von V_{Ruhe} wie sie z. B. während des Zellzyklus auftreten sowie der absolute Vergleich von V_{Ruhe} zwischen verschiedenen Zellpopulationen setzen die Kalibrierbarkeit des GEVI Signals voraus. Es gibt jedoch nur vereinzelt Publikationen, die sich mit der Kalibration des Fluoreszenzsignals auseinandersetzen. Im Vergleich dazu wurde die Messung von V_{Ruhe} mit niedermolekularen, spannungssensitiven Farbstoffen bereits mehrfach gezeigt.^{20,107–109}

Potentiometrische GEVIs aus der ASAP- und ArcLight-Familie haben den Nachteil, dass das Fluoreszenzsignal nicht nur von V_m , sondern auch von der Expressionsstärke des Proteins beeinflusst wird. In einer vorausgegangenen Studie wurden absolute V_m -Werte durch die Modulation des Photozyklus eines bakteriellen Rhodopsin in einem Typ-2-Sensor mit einem Pump-Probe-Protokoll bestimmt.¹¹⁰ FLIM-Messungen (*Fluorescence lifetime imaging*) von ASAP1 (Typ-1-Sensor) und CAESR (Typ-2-Sensor) zeigten, dass die Lebensdauer ihres angeregten Zustands spannungsabhängig ist, sodass sich aus dieser absolute V_m -Werte bestimmen lassen.¹¹¹ Beide Methoden bedürfen jedoch Messungen mit hoher Zeitauflösung und insbesondere FLIM eines hochspezialisierten Mikroskops; außerdem ist FLIM mit vielen gängigen Hochdurchsatzmessmethoden wie FLIPR- (*Fluorescent imaging plate reader*) und FACS-Messungen (*Fluorescence-activated cell sorting*) kaum verbreitet bzw. nicht kommerziell erhältlich.¹¹²

Im Prinzip sollte eine absolute Kalibration von V_m auch mit dem Verhältnis von zwei Fluoreszenzsignalen aus FRET-GEVIs wie Mermaid2 möglich sein.⁸² Hierzu finden sich jedoch bisher keine Publikationen. Eine Alternative zu FRET-basierten Sensoren ist eine Fusion eines potentiometrischen GEVI mit besonders großer Signalamplitude und eines spektral gut separierbaren, spannungsunabhängigen Fluoreszenzproteins wie z. B. dem rotfluoreszierenden Protein mCherry oder mKate2.^{113,114} Der Vorteil zu bisher existierenden FRET-basierten GEVIs wäre eine Vereinfachung der spektralen Trennung, was sowohl den dynamischen Bereich als auch die Anwendbarkeit mit etablierten Mikroskopie- und Hochdurchsatzverfahren wie FACS oder FLIPR verbessern sollte. Zudem weisen die meisten ArcLight- und ASAP-Varianten einen größeren dynamischen Bereich auf als bisher existierende FRET-basierte Sensoren.^{103–105} Das Konzept einer Fusion zwischen potentiometrischem Sensor und spannungsunabhängigem Fluoreszenzprotein wurde bereits von Yang *et al.* 2016 angeregt.⁶⁷ In früheren Studien wurden aus dem bakteriellen Rhodopsin Arch(D95H) sowie aus ASAP2s und ASAP3 ähnliche ratiometrische Spannungssensoren entwickelt.^{104,110,115} In keiner dieser Studien wurden die entwickelten Sensoren jedoch erfolgreich zur ratiometrischen Bestimmung von V_{Ruhe} eingesetzt.

1.2. Kopplung des Membranpotentials mit lokalen Signalprozessen

Das zelluläre V_{Ruhe} hängt zu einem entscheidenden Teil von der Expression von Ionenkanälen ab, deren Aktivität von intrazellulären Signal- und Transportprodukten wie dem sekundären Botenstoff Ca^{2+} reguliert werden kann. Die Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann dabei global, d. h. in der gesamten Zelle, oder lokal begrenzt, z. B. nur in der direkten Umgebung von Calciumkanälen, auftreten.¹¹⁶ Diese lokalen Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration werden Ca^{2+} -Nanodomänen genannt.¹¹⁷ Im gleichen Zelltyp können lokale und globale Änderungen von sekundären Botenstoffen grundlegend verschiedene Folgen haben (Abb. 6a, b). So führen in vaskulären glatten Muskelzellen globale Ca^{2+} -Änderungen zur Vasokonstriktion, wohingegen starke lokale Änderungen von Ca^{2+} (*Sparks*) Vasodilatation auslösen.^{116,118} In vaskulären glatten Muskelzellen werden diese unterschiedlichen Auswirkungen von lokalen und globalen Ereignissen auf den Muskeltonus über die Kolo-kalisation von Calciumkanälen mit Ca^{2+} - und spannungsabhängigen Kaliumkanälen, den sogenannten BK_{Ca} -Kanälen, realisiert (Abb. 6).^{119,120}

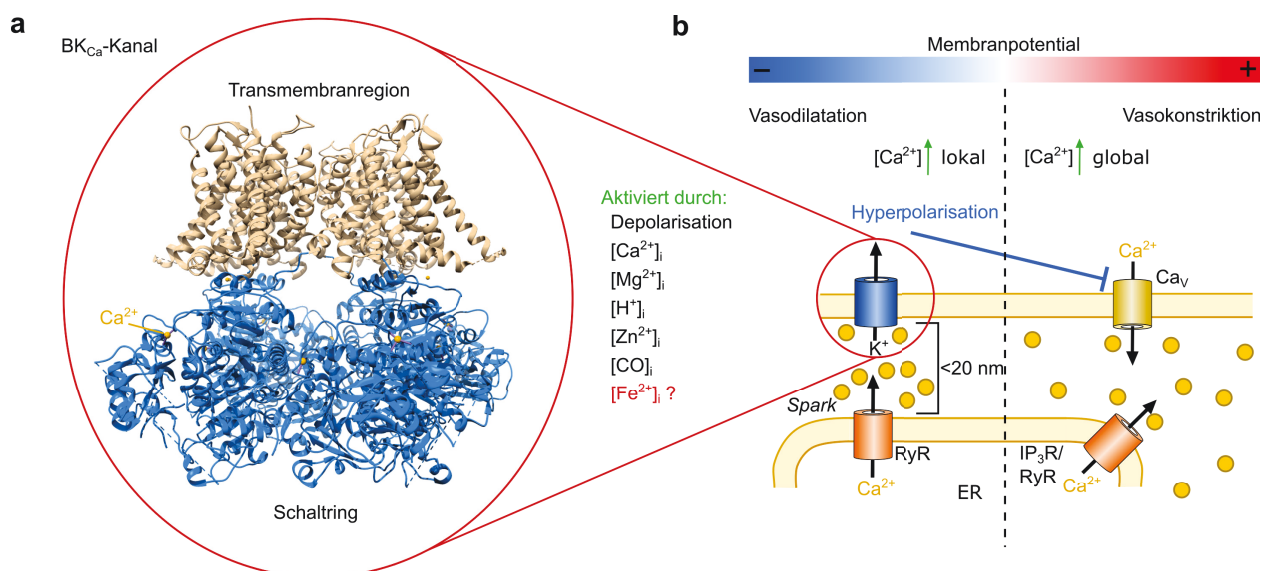


Abbildung 6. **Modulation des Tonus glatter Muskelzellen durch Kopplung des Membranpotentials mit lokalen und globalen Ca^{2+} -Signalen.** **a**, Struktur eines funktionellen BK_{Ca} -Kanals aus einem Homotetramer aus α -Untereinheiten mit gebundenen Ca^{2+} -Ionen (PDB ID: 6V38).¹²¹ Die Spannungsabhängigkeit der BK_{Ca} -Kanäle ist auf die Bewegung des Spannungssensors in der Transmembranregion (beige) zurückzuführen. Die Ca^{2+} -Abhängigkeit wird von einem intrazellulären Schaltring (blau) bestimmt, über den auch andere intrazelluläre Modulatoren ($[\text{Ca}^{2+}]_i$, $[\text{Mg}^{2+}]_i$, $[\text{H}^+]_i$, $[\text{Zn}^{2+}]_i$, $[\text{CO}]_i$, $[\text{Fe}^{2+}]_i$?) die Kanalaktivität steigern können.¹¹⁶ **b**, In glatten Muskelzellen sind spannungsabhängige Calciumkanäle (Ca_v) für die Kontraktion der Muskulatur verantwortlich. Die Öffnung von Ca_v durch Membrandepolarisation und die Öffnung von IP_3R -Calciumkanälen und Ca^{2+} -aktivierten RyR -Calciumkanäle im endo-/sarkoplasmatischen Retikulum resultiert in einer globalen Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, die zur Muskelkontraktion und damit zur Blutgefäßverengung (Vasokonstriktion) führt.^{119,120} BK_{Ca} -Kanäle sind in Muskelzellen u. a. mit Ca_v -Kanälen aber auch mit RyR -Kanälen kolo-kalisiert.¹²² Kurzzeitige, lokale Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration (*Sparks*) in der Nähe der RyR -Kanäle ändern die globale Ca^{2+} -Konzentration nur marginal, können aber lokale Ca^{2+} -Konzentrationsbereiche im μM -Bereich erzeugen, welche die kolo-kalisierten BK_{Ca} -Kanäle aktivieren.¹¹⁸ Die daraus resultierende Membranhyperpolarisation verhindert die Aktivierung von Ca_v -Kanäle und senkt die globale Ca^{2+} -Konzentration, was zu einer Muskelrelaxation und damit zur Blutgefäßweiterung (Vasodilatation) führt.

BK_{Ca}-Kanäle zeichnen sich durch einen besonders hohen Leitwert (100-300 pS) für K⁺ im geöffneten Zustand aus.¹⁴ Die Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle wird allosterisch sowohl durch Membrandepolarisation als auch durch die Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration gesteigert.¹²³ Funktionelle BK_{Ca}-Kanäle sind Homotetramere, die sich aus vier α -Untereinheiten zusammensetzen. Eine Reihe (je vier) gewebespezifischer, akzessorischer β - und γ -Untereinheiten können u. a. die Ca²⁺- und Spannungsabhängigkeit der α -Untereinheit verändern.¹²⁴ Die Öffnung von BK_{Ca}-Kanälen bewirkt einen Ausstrom von K⁺ aus der Zelle, welcher die Zellmembran hyperpolarisiert. Die Kontraktion glatter Muskelzellen wird durch Erhöhung der globalen intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ausgelöst, welche durch Membrandepolarisation und die Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanälen (Cav) initiiert wird.¹¹⁷ Obwohl die Hyperpolarisation der Membran zu einer Erhöhung der Triebkraft von Ca²⁺ in die Zelle führt, verringert die Hyperpolarisation den Ca²⁺-Einstrom, da Cav-Kanäle durch das negativere Membranpotential geschlossen werden.¹²⁵ BK_{Ca}-Kanäle wirken daher als negative Rückkopplungsregulatoren für intrazelluläre Ca²⁺-Erhöhungen (Abb. 6b). Störungen dieses Rückkopplungsmechanismus, z. B. durch die verringerte Aktivität von BK_{Ca}-Kanälen, können *in vivo* zu Bluthochdruck führen, wohingegen eine erhöhte Aktivität der Kanäle vor Bluthochdruck schützt.¹²⁶⁻¹²⁹ Die Aktivität von BK_{Ca}-Kanälen kann neben Ca²⁺ und Spannung auch durch erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von Mg²⁺, Zn²⁺, H⁺, CO oder durch Phosphorylierung gesteigert werden.¹³⁰⁻¹³⁶ BK_{Ca}-Kanäle können nicht nur mit Cav-Kanälen, sondern auch mit anderen Rezeptoren, Transportern und Enzymen wie der Hämoxygenase 2 (HO2) oder dem NDMA-Rezeptor kolokalisiert sein.¹³⁷⁻¹⁴¹ HO2 bewirkt die Spaltung von Häm und produziert dabei die Hämabbauprodukte CO, Fe²⁺ und Biliverdin.¹³⁷ Demnach sollten BK_{Ca}-Kanäle beim Abbau von Häm auch lokal erhöhten Konzentrationen von Fe²⁺ und CO ausgesetzt sein, sodass eine direkte Regulation von BK_{Ca}-Kanälen durch Fe²⁺ ebenfalls denkbar ist.

Nanodomänen sind nicht auf Ca²⁺-Signale begrenzt. Es wird auch für andere Mediatoren wie reaktive Sauerstoffspezies, cAMP oder cGMP davon ausgegangen, dass sie in räumlich und zeitlich begrenzten Domänen auftreten.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Grundsätzlich sollten alle Arten membranständiger Enzyme und Transportproteine, z. B. die Fe²⁺/Fe³⁺-Reduktase Dcytb oder der H⁺/Fe²⁺-Symporter DMT1, lokale Nanodomänen für die entsprechenden (Transport-) Produkte bilden.

1.2.1. Photolabile Käfigverbindungen

Zur zeitlich und räumlich hochaufgelösten, lichtsteuerbaren Erhöhung der Konzentration von Biomolekülen und sekundären Botenstoffen wurden sogenannte Käfigverbindungen (*Caged compounds*) entwickelt.¹⁴⁵ Diese sind chemische Verbindungen, die durch Bestrahlung mit Licht

definierter Wellenlänge zerstört werden können und so z. B. Ca^{2+} , ATP, cAMP, cGMP, Glutamat, mRNA, DNA oder Proteine lichtgesteuert freisetzen.^{145–151}

Caged- Ca^{2+} ist u. a. in Form von DM-Nitrophen verfügbar.¹⁴⁸ Ca^{2+} wird durch DM-Nitrophen chelatiert und kann mit Licht im ultravioletten Bereich (UV) freigesetzt werden (Abb. 7a). Da die Lebensdauer des angeregten Zustands im ns-Bereich liegt, können mittels Lichtquellen mit hoher Lichtintensität wie Flash-Lampen oder Lasern starke, sprunghafte Änderungen in der Ca^{2+} -Konzentration im Zeitbereich von μs erzeugt werden. Über DM-Nitrophen ließ sich so z. B. die Geschwindigkeit der Ca^{2+} -abhängigen Fusion von neurotransmittergefüllten Vesikeln mit der präsynaptischen Membran beobachten.¹⁵²

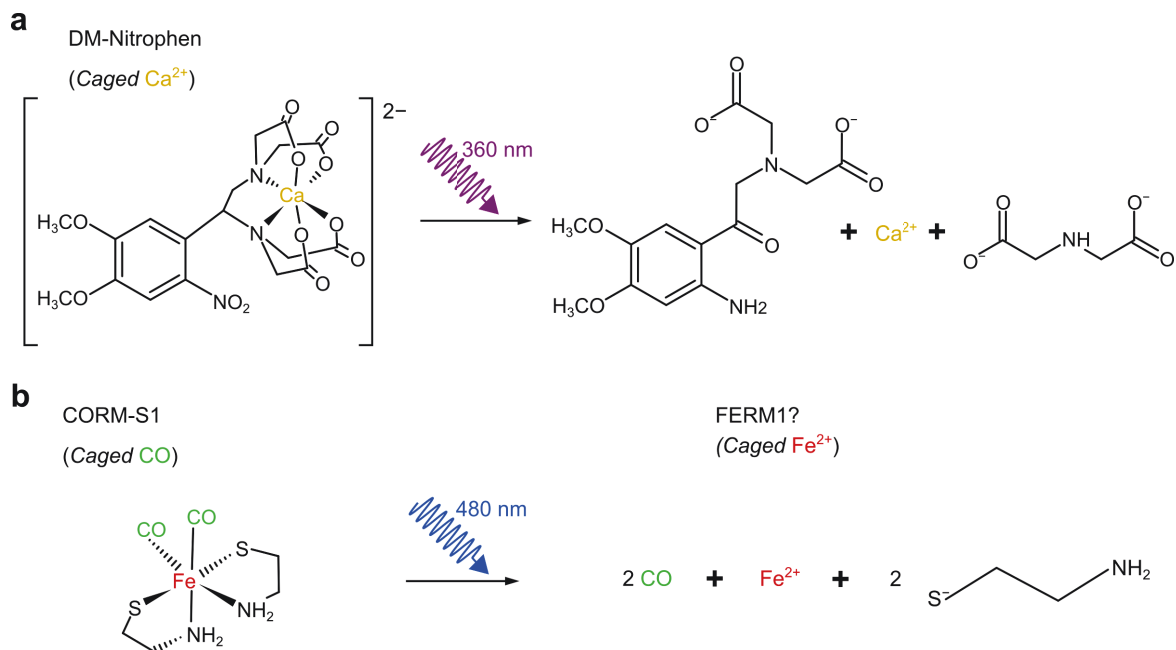


Abbildung 7. **Beispiele photolabiler Käfigverbindungen.** **a**, Strukturformel einer *Caged*- Ca^{2+} -Verbindung. UV-Licht induziert den Bruch einer kovalenten Bindung in DM-Nitrophen, sodass sich die Dissoziationskonstante (k_d) des Komplexes 600.000-fach erhöht (von 5 nM auf 3 mM).^{145,148} **b**, Das CO-freisetzende Molekül CORM-S1 (Dicarbonyl-Biscysteamin-Eisen(II)) kann durch Beleuchtung mit blauem Licht in seine Bestandteile CO, Fe^{2+} und Cysteamin zerlegt werden.¹⁵³

Ein Molekül, dessen Funktion als potentieller Modulator physiologischer Prozesse in letzter Zeit mehr Beachtung gefunden hat, ist Kohlenstoffmonoxid (CO).¹⁵⁴ Dieses wird im Körper z. B. beim Abbau von Häm über Hämoxygenase 2 freigesetzt.¹³⁷ Es soll u. a. an der Vasoregulation über BK_{Ca} -Kanäle beteiligt sein.¹⁵⁵ Da CO ein flüchtiges und toxisches Gas ist, wurden zur einfachen Applikation von CO sogenannte CORMs (CO-freisetzende Moleküle) entwickelt. Einige CORMs wie z. B. CORM2 setzen CO spontan frei.¹⁵⁶ In PhotoCORMs wie CORM-S1, CORM-S2 oder CORM-EDE1 kann die CO-Freisetzung über Licht gesteuert werden.^{153,157,158} Die meisten etablierten CORMs sind Komplexe aus einem zentralen, multivalenten Kation wie Ru^{2+} , Mn^{2+} oder Fe^{2+} sowie CO und weiteren Ligandengruppen, die Eigenschaften wie Stabilität,

Löslichkeit, Membranpermeabilität, Biokompatibilität und Lichtabhängigkeit bestimmen.^{159–161} Mehrere Studien aus den letzten Jahren legen jedoch nahe, dass eine Reihe der mit CORMs gemessenen Effekte nicht auf CO selbst, sondern auf die freigesetzten Kationen/Kationenaddukte zurückzuführen sind.^{162–165} Dies stellt Studien in Frage, in denen putative CO-Effekte lediglich unter Verwendung von CORMs getestet wurden.¹³⁸ Gleichzeitig bieten sich für existierende CORMs dadurch neue Anwendungsmöglichkeiten.

Wenn der CO-Effekt zu vernachlässigen ist, könnten PhotoCORMs auch als photosensitive Schwermetallionenkäfige dienen. CORM-S1 (Dicarbonyl-Biscysteamin-Eisen(II)) würde sich in diesem Zusammenhang als *Caged-Fe²⁺* anbieten.¹⁵³ CORM-S1 ist ein Komplex aus einem zentralen Fe²⁺, zwei Cysteamin-Liganden und zwei CO-Liganden (Abb. 7b).¹⁵³ Es könnte so z. B. als Imitator der Hämoxxygenase 2 (HO2) eingesetzt werden, die durch Oxidation von Häm lokal Fe²⁺, CO und Biliverdin produziert.¹³⁷ Ein Modellsystem, um CORM-S1 als HO2-Imitator zu charakterisieren, ist der BK_{Ca}-Kanal, der mit HO2 kolokalisiert sein kann und daher den Degradationsprodukten von CORM-S1 (CO und Fe²⁺) potentiell auch unter physiologischen Bedingungen ausgesetzt ist.^{137,138}

1.2.2. Aufwärtskonvertierende Nanopartikel (UCNPs) als lokale Lichtquellen

Die optische Untersuchung der Dynamik von Nanodomänen erweist sich als schwierig, da diese im Bereich unterhalb von 100 nm auftreten und damit unterhalb der Auflösungsgrenze für klassische Fluoreszenzmikroskopie an lebenden Zellen liegen.^{166,167} Bisher wurde die funktionelle Kolokalisation z. B. von Calciumkanälen mit anderen Ionenkanälen und Rezeptoren in elektrophysiologischen Experimenten hauptsächlich über Ca²⁺-Chelatoren mit unterschiedlich schnellen Ca²⁺-Pufferraten realisiert.^{125,139} Ein neuer Ansatz, um lokale Konzentrationsgradienten von sekundären Botenstoffen zu erzeugen und Signalprozesse in Nanodomänen zu untersuchen, wären molekular platzierbare, lokale Lichtquellen in Kombination mit photolabilen Käfigverbindungen wie DM-Nitrophen oder CORM-S1.

Als lokale Lichtquellen bieten sich insbesondere aufwärtskonvertierende Nanopartikel (UCNPs) an. UCNPs absorbieren mehrere Photonen im nahen infraroten (NIR) Bereich und emittieren, je nach Dotierung und Wirtsgitter, Photonen im sichtbaren bis ultravioletten Bereich des elektromagnetischen Spektrums (Abb. 8a).¹⁶⁸ Typische 2-Photonenmikroskopie, welche auf Frequenzverdopplung durch virtuelle Energiezustände beruht, benötigt gepulste Laseranregung mit sehr hoher Anregungsintensität. Im Gegensatz dazu lassen sich in UCNPs auch bei vergleichsweise geringer Anregungsleistung effiziente Mehrphotonenprozesse (bis zu 1000-fach

höhere Effizienz als 2-/3-Photonenmikroskopie) erzeugen.¹⁶⁹ Der nichtlineare Effekt der Emission in UCNPs ergibt sich aus der mehrfachen Anregung von langlebigen Energiezuständen in Lanthanoiden wie Yb^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} .^{168,170,171} Dadurch können UCNPs nach der Absorption mehrerer NIR-Photonen ein kurzwelliges Photon im sichtbaren Bereich emittieren. Je nach Energieniveaus der Sensibilisatoren lässt sich bei NIR-Anregungsintensitäten von W cm^{-2} bis kW cm^{-2} hauptsächlich rotes und grünes (Er^{3+}) oder blaues und UV-Licht (Tm^{3+}) erzeugen (Abb. 8b).¹⁶⁸ Da bestimmte Lanthanoide Energieniveaus mit einem ähnlichen energetischen Abstand (ΔE) besitzen, können für die Multiphotonenanregung monochromatische Lichtquellen wie Laserdioden verwendet werden.¹⁶⁸ Um möglichst lange Lebensdauern zu erreichen, besitzen UCNPs kristalline Wirtsgitter mit geringer Phononenenergie wie NaYF_4 sowie häufig inerte äußere Schalen, sodass Verluste über strahlungslose Relaxationsprozesse minimiert werden.¹⁶⁸

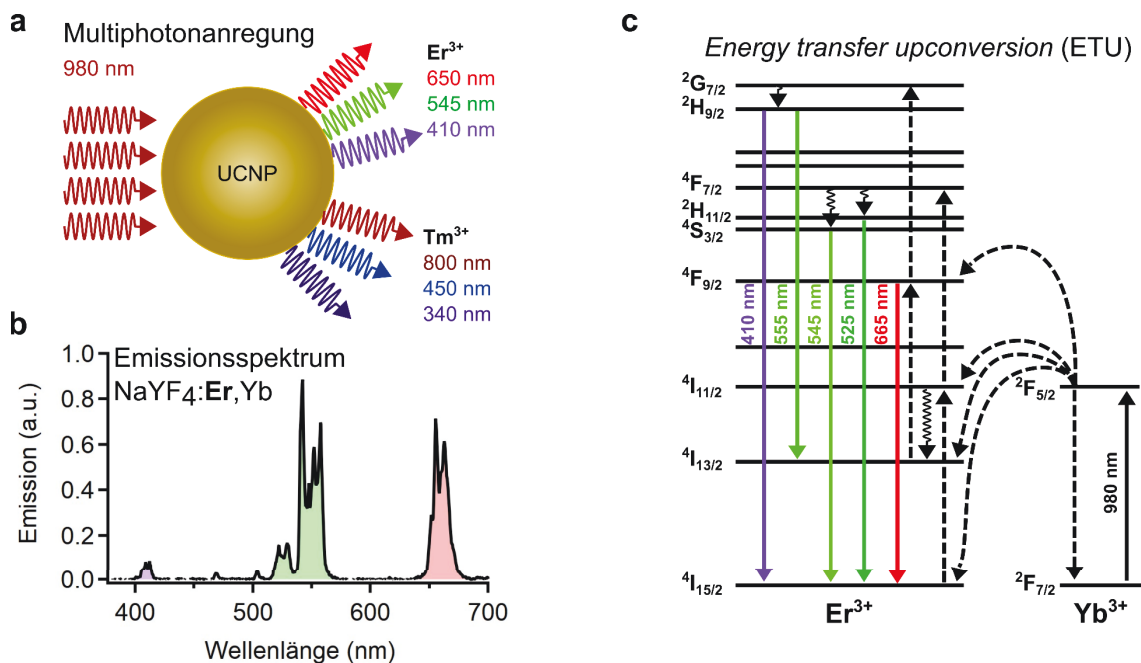


Abbildung 8. **Aufwärtskonvertierende Nanopartikel (UCNPs).** **a**, Schematische Darstellung eines UCNPs als lokale Lichtquelle. Nach Absorption mehrerer NIR-Photonen emittieren UCNPs, abhängig von ihrer Dotierung, lokal Licht kürzerer Wellenlänge. **b**, Emissionsspektrum von Er^{3+} -dotiertem aufwärtskonvertierendem Material bei Anregung mit NIR-Licht im Intensitätsbereich von kW cm^{-2} . Es ergeben sich relativ scharfe Emissionsbanden ähnlich der von Atomspektren, da die für die Übergänge verantwortlichen weiter innenliegenden f-Orbitale der Lanthanoide von Valenzeffekten abgeschirmt sind.¹⁷⁰ **c**, Schematische Darstellung der Elektronenübergänge in UCNPs. In modernen UCNPs führt *Energy transfer upconversion* (ETU) zur Aufwärtskonvertierung. Ein Photon wird von einem Aktivator (hier Yb^{3+}) absorbiert und über einen resonanten Energietransferprozess auf einen Sensibilisator (Er^{3+} , Tm^{3+}) übertragen. Läuft dieser Prozess mehrfach ab, kann ein Photon kürzerer Wellenlänge emittiert werden. Durchgezogene Linien: Photonenabsorption/-emission; gestrichelte Linie: Energietransfer; geschwängelte Linie: strahlungslose Relaxation.¹⁶⁸

UCNPs bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in biologischen Systemen. Er^{3+} -UCNPs können neben der Anwendung als lokale Lichtquellen auch als lokale Temperatursensoren verwendet werden. Er^{3+} -dotierte UCNPs besitzen zwei Energieniveaus mit ΔE (0,089 eV) im Bereich von $k_B T$ bei Raumtemperatur (0,026 eV) (Abb. 8c). Das Besetzungsverhältnis der beiden

Banden bei Raumtemperatur folgt einer Boltzmann-Verteilung, sodass sich aus deren Emission im grünen Bereich bei 525 nm ($^2H_{11/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$) und bei 545 nm ($^4S_{3/2} \rightarrow ^4I_{15/2}$), bei sauberer Trennung einer temperaturunabhängigen Emissionsbande bei 555 nm ($^2H_{9/2} \rightarrow ^4I_{13/2}$), die absolute Umgebungstemperatur auch *in vivo* messen lässt (Abb. 8c).¹⁷²⁻¹⁷⁵ *Ex vivo* wurde zudem gezeigt, dass sich durch UCNPs, die spezifisch an lichtabhängige Ionenkanäle gekoppelt wurden, Neuronen gezielt modulieren ließen.¹⁷⁶ Des Weiteren konnte mit einer Kombination von UCNPs und einem lichtsteuerbaren System aus CRAC-Calciumkanälen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch NIR reguliert werden.¹⁷⁷ Mit Komplexen aus *Caged*-DNA/-siRNA und Tm^{3+} -dotierten UCNPs konnte die Expression von GFP in Zellen, welche mit diesen Komplexen transfiziert wurden, durch NIR-Licht gesteuert werden.¹⁵⁰ Nach der Injektion von biofunktionalisierten Er^{3+} -UCNPs in den subretinalen Raum von Mäusen konnten diese NIR-Licht wahrnehmen und sogar Muster erkennen.¹⁷⁸ Biofunktionalisierte UCNPs konnten über gezielte Antikörpermarkierung auch für FRET verwendet werden, um direkte und indirekte Protein-Proteininteraktionen in Proteinkomplexen nachzuweisen.¹⁷⁹ Dabei wurde eines der Proteine über mit Antikörpern gekoppelte UCNPs markiert (FRET-Donor) und das andere Protein mit einem Fluoreszenzprotein (FRET-Akzeptor).¹⁷⁹ Mit Antikörpern gekoppelte UCNPs sollten sich daher auch prinzipiell als molekular platzierbare Quellen für photochemische Reaktionsnanodomänen einsetzen lassen. Es wurde bereits gezeigt, dass an Tm^{3+} -UCNPs gebundenen CORMs CO durch IR-Bestrahlung freisetzen können.¹⁸⁰ In Kombination mit gelösten Käfigverbindungen wie RuBi-Glutamat, CORM-S1 oder DM-Nitrophen könnten UCNPs steile Konzentrationsgradienten von Glutamat, Fe^{2+} oder Ca^{2+} erzeugen, um Nanodomänen in der Umgebung von Glutamatrezeptoren, Calciumkanälen oder Fe^{2+} -produzierenden Enzymen wie HO2 oder Dcytb zu generieren.

1.2.3. Photomanipulierbare Fluoreszenzproteine

Um die Eignung von UCNPs als Lichtquellen für die Katalyse lokaler, photochemischer Prozesse an Biomembranen zu charakterisieren, bieten sich photomanipulierbare Fluoreszenzproteine an (Abb. 9a). Diese werden in hochauflösenden Mikroskopieverfahren wie z. B. PALM (*Photo activated localization microscopy*) verwendet.¹⁸¹ Photoaktivierbare Fluoreszenzproteine (paFPs) wie PAmCherry können durch UV/Vis-Licht (ultraviolettes/sichtbares Licht) von einem nichtfluoreszierenden Zustand in einen fluoreszierenden Zustand überführt werden, photokonvertierbare Fluoreszenzproteine (pcFPs) wie Dendra2 von einem fluoreszierenden Zustand in einen Zustand veränderter Anregungs-/Emissionswellenlänge und photoschaltbare Fluoreszenzproteine (psFPs) wie Dronpa über UV/Vis-Licht zwischen zwei Zuständen geschaltet werden.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Während psFPs einen reversiblen Schaltprozess unterlaufen (cis-trans-

Isomerisierung des Chromophors), durchlaufen paFPs und pcFPs irreversible Modifikationen der Struktur ihres Chromophors (Abb. 9b).^{182,184}

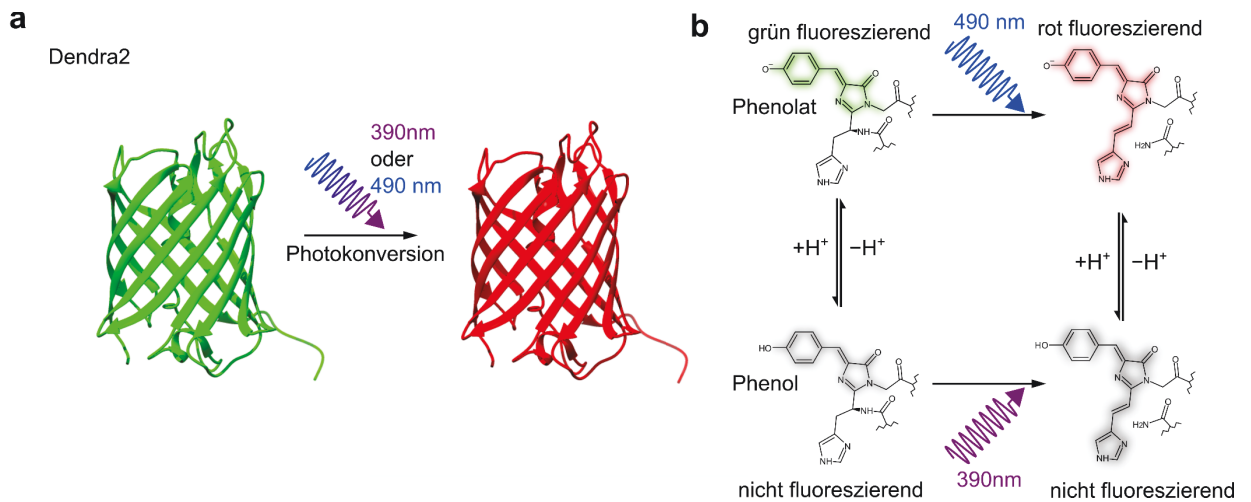


Abbildung 9. **Photokonversion von Dendra2.** **a**, Schematische Darstellung der Konversion von Dendra2 (PDB ID: 2VZX).¹⁸⁵ Durch Beleuchtung mit UV/violett oder blauem Licht kann es von einer grünemittierenden Form irreversibel in eine rot emittierende Form überführt werden. **b**, Photokonversions-Mechanismus des Chromophors von Dendra2. Das Chromophor liegt im ursprünglichen Zustand in einer protonierten (Phenol, dunkel) oder deprotonierten (Phenolat, fluoreszent) Form vor. Je nach Form kann entweder durch blaues oder UV/violettes Licht an einem Histidinrest die Verbindung zum Proteinrückgrat gekappt werden. Die neue Doppelbindung erweitert das konjugierte π -Elektronensystem und verschiebt das Absorptions-/Emissionsspektrum in Richtung längerer Wellenlänge.^{182,186}

Photomanipulierbare FPs könnten als Akzeptoren für das von den UCNP's ausgesendete UV/Vis-Licht eingesetzt werden, da die Emissionswellenlängen von gängigen Er^{3+} - und Tm^{3+} -UCNP's in einem Bereich liegen, mit denen sich Photoaktivierungs-/Konversionsprozesse in paFPs/pcFPs wie Dendra2 katalysieren lassen (Abb. 8a, 9a, b). Typische Försterradien liegen unterhalb von 10 nm; oberhalb wird die Effizienz der Übertragung so gering, dass sich die Emission des Akzeptors nicht mehr ohne größeren Aufwand messen lässt.⁶⁸ Da pcFPs/paFPs jedoch einen irreversiblen photochemischen Prozess durchlaufen, sollten konvertierte pcFPs über die Zeit akkumulieren. Aus der Photokonversionsrate (k_{pc}), welche ihrerseits von der lokalen Lichtintensität abhängt, sollten sich daher indirekt auch Entfernungen >10 nm zwischen Akzeptor und Emitter abschätzen lassen. Es sollte sich so auch feststellen lassen, ob UCNP's an der Außenseite der Membran membran-nahe, photochemische Prozesse sowohl auf der Außenseite als auch auf der Innenseite der Membran katalysieren können.

1.3. Zielstellung

Biomembranen sind grundlegende Bestandteile von Zellen, die sowohl als physische Barriere gegenüber der Außenwelt als auch als integrale Bestandteile von Transport- und Signalprozessen in allen bekannten Lebensformen dienen. Optische/optogenetische Methoden bieten die Möglichkeit, diese Prozesse unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung neuer optischer Methoden und Werkzeuge, mit denen sich fundamentale, membrannahe Prozesse beobachten und spezifisch mit hoher räumlicher und temporaler Auflösung modulieren lassen.

Eine jede lebende Zelle hält ein elektrisches Potential aufrecht, das Ruhemembranpotential (V_{Ruhe}). Bisher existieren nur vereinzelte, wenig verbreitete Methoden, mit denen sich V_{Ruhe} unter physiologischen Bedingungen bestimmen lässt. Ein einfach zu verwendender, kalibrierbarer, genetisch codierter Sensor, der den gesamten physiologischen Spannungsbereich abdeckt, könnte dabei helfen, viele bisher wenig untersuchte physiologische und pathophysiologische Funktionen von V_{Ruhe} in nichterregbaren Zellen, u. a. in Bezug auf Zellteilung, Tumorprogression oder Embryonalentwicklung zu entschlüsseln. Aufbauend auf den potentiometrischen, genetisch codierten Spannungsindikatoren ArcLight-Q239 und ASAP2s-I61T-Q397R sollen durch Fusion spannungsunempfindlicher, rotfluoreszierender Proteine, ratiometrische, genetisch codierte Spannungssensoren entwickelt werden. Diese sollen auf ihre Eignung zur absoluten Bestimmung des Membranpotentials überprüft werden. Ziel ist es, einen kalibrierbaren, genetisch codierten Sensor sowie Methoden zu entwickeln, die mit Standard-Fluoreszenzmikroskopen und Lichtquellen eingesetzt werden können.

Lokale, elektrochemische Signale sind häufig nicht nur räumlich, sondern auch zeitlich stark begrenzt. Für eine Vielzahl von Signalmolekülen wie Ca^{2+} , cAMP, Glutamat und CO wurden daher sogenannte Käfigverbindungen entwickelt, die durch kurze Lichtpulse mit hoher Intensität freigesetzt werden können. Für einige essentielle Metabolite und Signalmoleküle wie Fe^{2+} existieren jedoch bisher keine etablierten Käfigverbindungen. Das photosensitive CO-freisetzende Molekül CORM-S1 wurde bisher lediglich in Bezug auf die Freisetzung von CO untersucht. Da es ein zentrales Fe^{2+} -Ion besitzt, könnte es sich jedoch auch als lichtsteuerbare Quelle für Fe^{2+} eignen. Damit wäre es das erste charakterisierte Fe^{2+} -freisetzende Molekül (FERM). Ziel ist es, die Freisetzung von Fe^{2+} aus CORM-S1 sowie die Stabilität von CORM-S1 zu quantifizieren und CORM-S1 auf seine Eignung als lichtsteuerbares FERM für sprunghafte Fe^{2+} -Konzentrationsänderungen zur Aufklärung physiologisch relevanter Fragestellungen zu evaluieren.

Elektrochemische Signale an Biomembranen, wie z. B. der Einstrom von Ca^{2+} über spannungsgesteuerte Calciumkanäle, sind häufig auf einen Bereich von wenigen nm (Nanodomänen) um den Signalgeber begrenzt. Diese Prozesse laufen im Bereich unterhalb der Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskopie ab und lassen sich daher mit bisherigen optischen Methoden in lebenden Zellen nur schwer untersuchen. Es soll daher die Eignung von biokompatiblen, molekular platzierbaren, aufwärtskonvertierenden Nanopartikeln (UCNPs) als potentielle Quelle für lokales UV-Licht untersucht werden. Ziel ist es, räumlich stark begrenzte photochemische Reaktionen im Bereich weniger nm im Umkreis der UCNPs auszulösen. Insbesondere soll untersucht werden, ob über Antikörper molekular platzierte, extrazelluläre UCNPs spezifische, photochemische Reaktionen an der Plasmamembran auslösen können. Um dieses Konzept zu evaluieren, sollen membrannahe, photokonvertierbare Fluoreszenzproteine durch extrazellulär gebundene UCNPs photochemisch modifiziert werden. Zudem soll der Einfluss des Abstands zwischen Emitter und Akzeptor auf die photochemische Reaktionsrate untersucht werden.

2. Manuskripte

2.1. Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators

Autoren: Philipp Rühl, Johanna M. Langner, Jasmin Reidel, Roland Schönherr, Toshinori Hoshi, Stefan H. Heinemann

Inhalt: Das zelluläre Ruhemembranpotential ist ein zentraler Faktor einer jeden lebenden Zelle. In dieser Arbeit wurden ratiometrische, genetisch codierter Spannungssensoren und Methoden zur optischen Messung des Ruhemembranpotentials entwickelt. Mit den Sensoren und Methoden wurde der Einfluss der ektopischen Expression krankheitsrelevanter Ionenkanäle und Ionenkanalmutante auf das Ruhemembranpotential von menschlichen Zellen untersucht. Zudem konnte in Langzeitmessungen des Ruhemembranpotentials die Synthesegeschwindigkeit funktioneller Kaliumkanäle bestimmt werden.

Reprinted with permission from:

Rühl, P., Langner, J. M., Reidel, J., Schönherr, R., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators. *Communications Biology* 2021 **4**, 1–11 (2021).¹⁸⁷

CC-BY license

DOI: [10.1038/s42003-021-02675-0](https://doi.org/10.1038/s42003-021-02675-0)

Der Kandidat ist Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation

Autor/- in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Philipp Rühl	60%	100%	90%	50%	-

2.2. Fe²⁺-mediated activation of BK_{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe²⁺

Autoren: Guido Gessner, Philipp Rühl, Matthias Westerhausen, Toshinori Hoshi, Stefan H. Heinemann

Inhalt: Käfigverbindungen wie das Ca²⁺-freisetzenden DM-Nitrophen werden bereits seit Jahrzehnten zur gezielten Manipulation der Konzentration von sekundären Botenstoffen eingesetzt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das CO-freisetzende Molekül CORM-S1 auch als lichtsteuerbare Quelle von Fe²⁺ verwendet werden kann. Durch Blitzlichtphotolyse von CORM-S1 konnten sprunghafte Änderungen der freien Fe²⁺-Konzentration an der Plasmamembran erzeugt werden und so die Geschwindigkeit der Aktivitätsänderung der Ca²⁺- und spannungsgesteuerten BK_{Ca}-Kanälen durch Fe²⁺ quantifiziert werden.

Reprinted with permission from:

Gessner, G., **Rühl, P.**, Westerhausen, M., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Fe²⁺-mediated activation of BK_{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe²⁺. *ACS Chemical Biology* **15**, 2098–2106 (2020).¹⁸⁸

Copyright {2020} American Chemical Society.

DOI: [10.1021/acscchembio.0c00282](https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00282)

Der Kandidat ist Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation

Autor/-in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Philipp Rühl	20%	20%	25%	10%	-

2.3. Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles

Autoren: Christoph Drees, Philipp Rühl, Janosch Bajorath, Jacqueline Czerny, Gemini Chandra, Markus Haase, Stefan H. Heinemann, Jacob Piehler

Inhalt: Die räumliche Auflösung der photochemischen Manipulation u. a. von Käfigverbindungen ist in der klassischen Lichtmikroskopie auf einen Bereich von mehreren 100 nm begrenzt. In dieser Arbeit wurden aufwärtskonvertierende Nanopartikel (UCNPs), welche nahes Infrarotlicht in sichtbares bis ultraviolettes Licht umwandeln, auf ihre Eignung als lokale Quellen photochemischer Reaktionsnanodomänen untersucht. Als Modellsystem wurde die lokale Photokonversion des photokonvertierbaren Fluoreszenzproteins Dendra2 durch UCNPs untersucht. Mit diesem Modellsystem konnte gezeigt werden, dass molekular platzierte UCNPs zur räumlich begrenzten Manipulation von membrannahen Prozessen mit einer Auflösung weit unterhalb der optischen Auflösungsgrenze klassischer Lichtmikroskopie geeignet sind.

Reprinted with permission from:

Drees, C., **Rühl, P.**, Bajorath, J., Czerny, J., Chandra, G., Haase, M., Heinemann, S. H. & Piehler, J. Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles. *Nano Letters* **21**, 8025–8034 (2021).¹⁸⁹

Copyright {2021} American Chemical Society.

DOI: [10.1021/acs.nanolett.1c02267](https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.1c02267)

Der Kandidat ist Erstautor/-in, Ko-Erstautor/-in, Korresp. Autor/-in, Koautor/-in.

Anteile (in %) der Autoren / der Autorinnen an der Publikation

Autor/- in	Konzeptionell	Datenanalyse	Experimentell	Verfassen des Manuskriptes	Bereitstellung von Material
Philipp Rühl	30%	30%	25%	20%	-

3. Diskussion

3.1. Optische Messung des zellulären Ruhemembranpotentials

3.1.1. Ratiometrische GEVIs zum Vergleich zellulärer Ruhemembranpotentiale

Die Aufrechterhaltung eines konstanten elektrischen Potentials an der zellulären Plasmamembran ist zentral für eine jede lebende Zelle. Das Ruhemembranpotential (V_{Ruhe}) ist u. a. in die neuronale Signalweiterleitung, den elektrogenen Membrantransport, die Zellzyklusregulation und die Tumorgenese involviert.¹⁷ Die Messung von V_{Ruhe} mit elektrodenbasierter Verfahren wie Whole-Cell-Patch-Clamp geht mit einer Beeinflussung der intrazellulären Ionenkonzentration einher und kann dadurch u. a. die Aktivität von Ionenkanälen verändern. Etablierte optische Methoden, welche auf spannungssensitive Farbstoffe zurückgreifen, weisen ebenfalls intrinsische Schwächen auf. So können spannungssensitive Farbstoffe u. a. photo- und zytotoxisch sein, mit der Zeit aus der Zelle transportiert werden und ebenfalls die Aktivität von Ionenkanälen verändern.^{54,57,60} Es ist daher fraglich, ob die mit diesen Methoden ermittelten V_{Ruhe} -Werte tatsächlich denen unter physiologischen Bedingungen entsprechen. Bisher gab es nur wenig verbreitete Methoden, um das Ruhemembranpotential von Zellen mit genetisch codierten Spannungssensoren (GEVIs) zu messen.^{110,111} Ein Ziel dieser Arbeit war daher, eine GEVI-basierte Methode zur Messung von V_{Ruhe} verschiedener Zellpopulationen zu entwickeln, die mit klassischen Epifluoreszenzmikroskopen verwendet werden kann.

Die in dieser Arbeit entwickelten GEVIs rArc und rASAP sind die ersten GEVIs, die erfolgreich zur ratiometrischen Messung des absoluten Membranpotentials eingesetzt wurden. Die wenigen bisher publizierten Verfahren zur absoluten Spannungsmessung mit GEVIs benötigen zeitaufgelöste Messung und spezialisierte Messapparaturen/-verfahren.^{110,111} Entsprechend existieren praktisch keine Studien, in denen diese Messmethoden zur Beantwortung physiologisch relevanter Fragestellungen Anwendung gefunden haben. Im Vergleich dazu können die hier entwickelten Methoden und Sensoren mit Standard-Fluoreszenzmikroskopen verwendet werden. Sie bieten daher einem größeren Anwenderkreis die Möglichkeit, das zelluläre V_{Ruhe} zu messen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl mit rArc als auch mit rASAP Ionenkanalinduzierte Änderungen von V_{Ruhe} in HEK293T-Zellen beobachtet werden können. Mit Hilfe der entwickelten Verfahren zur Hochdurchsatzmessung von Zellpopulationen konnten, trotz breiter, spannungsunabhängiger Streuung des Fluoreszenzverhältnisses von $F_{\text{grün}}$ und F_{rot} (R_{gr}), moderate Änderungen des mittleren V_{Ruhe} von Zellpopulationen detektiert werden. Mit den neuentwickelten Methoden ist es zudem erstmals gelungen, die Geschwindigkeit der Biosynthese funktioneller Ionenkanäle (Kir2.1) in Echtzeit zu verfolgen.

rArc und rASAP sind nicht die ersten ratiometrischen GEVIs. Einige der bereits etablierten GEVIs wie z. B. Mermaid1 und 2 basieren auf FRET (Förster Resonanz Energietransfer).^{81,82} Neuere ratiometrische Sensoren, wie ein Fusionsprotein aus ASAP3 und mCyRFP2., sind rASAP und rASAP-al konzeptionell sehr ähnlich, sie bestehen aus einem spannungssensitiven, grünfluoreszierenden Protein und einem spannungsinsensitiven, rotfluoreszierenden Protein.¹¹⁵ Keiner dieser Sensoren wurde jedoch bisher zur absoluten Spannungsmessung eingesetzt. Prinzipiell sollte sich mit den in dieser Arbeit entwickelten Methoden V_{Ruhe} auch mit anderen etablierten ratiometrischen GEVIs bestimmen lassen. Da einige der neueren ratiometrischen GEVIs eine größere relative Fluoreszenzänderung im Bereich von V_{Ruhe} als rASAP und rArc haben, könnte so potentiell eine noch bessere Spannungsauflösung erreicht werden.¹¹⁵

3.1.2. Kalibration des GEVI Signals

Das absolute Fluoreszenzverhältnis (R_{gr}) des grünen ($F_{grün}$) und roten (F_{rot}) Fluoreszenzsignals lässt sich zwischen verschiedenen Mikroskopen nur bedingt vergleichen, da dieses maßgeblich von den verwendeten Lichtquellen, Kameras und den Fluoreszenzfiltersets abhängt. Dennoch lassen sich die Parameter aus der Patch-Clamp-Kalibration unter bestimmten Randbedingungen auch auf andere Mikroskope ohne Patch-Clamp-Kontrolle übertragen.

$$R_{gr}(V) = R_{max} * \left(1 - \frac{\Delta r}{1 + e^{\frac{V - V_{halb}}{k_s}}} \right)$$

Gleichung 2. **Boltzmann-Funktion:** R_{gr} = Fluoreszenzverhältnis ($F_{grün}/F_{rot}$); R_{max} = maximales $F_{grün}/F_{rot}$; Δr = relative Änderung von $F_{grün}/F_{rot}$; V_{halb} = Spannung der halbmaximalen Änderung in mV; k_s = Steigungsfaktor in mV.

R_{gr} als Funktion der Spannung ($R_{gr}(V)$) folgt einem sigmoidalen Kurvenverlauf (Gl. 2). Die beiden Parameter V_{halb} (Spannung der halbmaximalen Fluoreszenzänderung) und k_s (Steigungsfaktor) sind unabhängig von der verwendeten Messapparatur. Da F_{rot} spannungsunabhängig ist, wird die relative Änderung (Δr) von R_{gr} ausschließlich von der relativen Änderung von $F_{grün}$ bestimmt. Solange sichergestellt wird, dass sowohl die Hintergrundfluoreszenz als auch ein Übersprechen der beiden Kanäle (F_{rot} und $F_{grün}$) vernachlässigt werden kann, ist Δr daher ebenfalls geräteunabhängig. Damit verbleibt nur die unbekannte R_{max} , R_{gr} für $V \rightarrow -\infty$. Um diesen Parameter zu bestimmen, wird R_{gr} für eine bekannte Spannung benötigt. Zu diesem Zweck wurden Zellen mit einer Mischung porenbildender Peptid-Antibiotika (Gramicidin-D) behandelt, die die Permeabilität der Membran für monovalente Kationen wie Na^+ und K^+ stark erhöht.¹⁰⁷ Dies bewirkt einen Kurzschluss der Membran, der V_m annähernd auf 0 mV setzen sollte.¹⁰⁷ Aus dem gemessenen $R_{gr}(0 \text{ mV})$ und den aus den Patch-Clamp-Messungen bekannten Parametern V_{halb} , k_s

und Δr kann dementsprechend R_{\max} bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Kalibrationsmethode wurde ein mittleres V_{Ruhe} von ≈ -40 mV für HEK293T-Zellen abgeschätzt, ein Wert, der sich mit den Werten aus früheren Publikationen deckt.^{19,20}

Aus dem R_{gr} -Signal von rASAP kann mit Hilfe der beschriebenen Kalibration das mittlere V_{Ruhe} von Zellpopulationen abgeschätzt werden. Keines der entwickelten GEVIs bietet jedoch die Möglichkeit, anhand von R_{gr} Aussagen über V_{Ruhe} von Einzelzellen zu treffen. Dies wird insbesondere im Experiment mit Gramicidin-D deutlich, da durch den Kurzschluss der Membran alle behandelten Zellen ein konstantes V_{Ruhe} von ≈ 0 mV aufweisen sollten. Unter der Annahme von $V_{\text{Ruhe}} \rightarrow 0$ mV kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Verteilung die spannungsunabhängige Variation von R_{gr} anzeigt. Die geometrische Zell-zu-Zell-Standardabweichung (σ_{g}) von R_{gr} von rASAP entspricht dabei einem Faktor von ≈ 1.3 . 68% der Werte der R_{gr} Zell-zu-Zell-Verteilung liegen demnach in einem Bereich der Verteilung um $\text{Median} \cdot 1.3$ also um $\pm 130\%$. Die beobachtete Änderung von R_{gr} zwischen 0 und -100 mV liegt bei $\approx 40\%$. Es ist daher direkt ersichtlich, dass eine Abschätzung von V_{Ruhe} einer Einzelzelle nicht möglich ist. Dennoch lassen sich mit einer ausreichenden Anzahl von Zellen Aussagen über das mittlere V_{Ruhe} der Gesamtzellpopulation treffen. Um einen geometrischen Standardfehler von 1.01 (also 101%) zu erreichen, würden mit einem Sensor mit einer Genauigkeit von $1.3 \approx (30\%/1\%)^2$ Zellen also 900 Zellen benötigt. Dies zeigt, dass der Vergleich von V_{Ruhe} zwischen Zellpopulationen nur mit Verfahren zur Hochdurchsatzmessung sinnvoll anwendbar ist. Mit dem verwendeten Verfahren wurden regelmäßig R_{gr} -Werte von >3600 Zellen pro Zellkulturschale bestimmt, welches einem Standardfehler von $\approx 30/\sqrt{3600}$, also 0.5% entspricht. Die Standardabweichung der R_{gr} zwischen Zellkulturschalen lag für die Messung bei $\pm 2\%$. Um mit den entwickelten Verfahren eine bessere Auflösung zur Bestimmung von V_{Ruhe} zu erreichen, wäre demnach eine Optimierung der relativen Änderung der Fluoreszenz als Funktion der Spannung im physiologisch relevanten Bereich sinnvoller als eine verbesserte Zell-zu-Zell Auflösung.

3.1.3. Optimierung der Auflösung ratiometrischer GEVIs

Neben der absoluten Helligkeit ist die relative Änderung der Fluoreszenz als Funktion der Spannung einer der wichtigsten Parameter eines GEVIs. Ein linearer Sensor mit 100% Signaländerung, der ausschließlich der Bestimmung von V_{Ruhe} dient (-100 mV bis 0 mV), hätte somit eine Steigung von 1%/mV.¹⁷ Die Spannungsabhängigkeit der Fluoreszenz aller Typ1-GEVIs beruht auf der Bewegung des Spannungssensors (VSD) eines spannungssensitiven Proteins im elektrischen Feld der Membran und folgt einem sigmoidalen Boltzmann-Kurvenverlauf (Gl. 2). Die Auflösung der Sensoren ist dementsprechend spannungsabhängig.¹⁹⁰ Die maximale

Auflösung wird bei V_{halb} erreicht und k_s bestimmt, wie stark diese sich als Funktion der Spannung ändert (Abb. 10a, b).

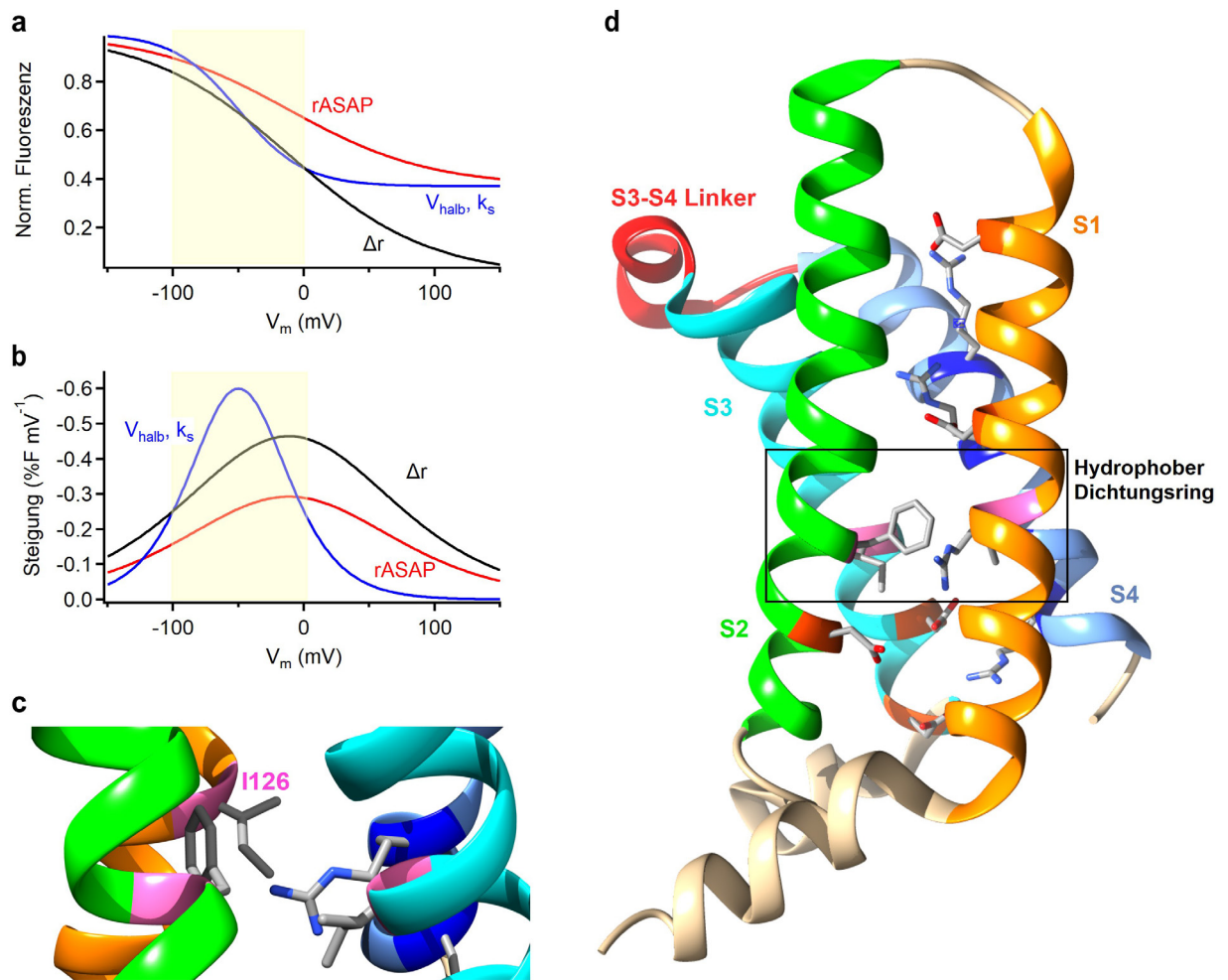


Abbildung 10. **Optimierung der Auflösung VSP-basierter GEVIs.** **a**, Spannungsabhängigkeit des Fluoreszenzsignals von rASAP (rot) mit den Parametern $V_{\text{halb}} = -11.4$ mV, $k_s = 53.8$ mV, $\Delta r = 63\%$ (Gl. 2); der physiologisch relevante Bereich für V_{Ruhe} ist gelb unterlegt. Zum Vergleich sind zwei hypothetische Konstrukte mit optimiertem Δr (100%, schwarz) und unverändertem k_s und V_{halb} oder mit optimiertem k_s und V_{halb} (25 mV und -50 mV, blau) und unverändertem Δr dargestellt. **b**, Spannungsauflösungsvermögen der drei Konstrukte als Funktion der Spannung. Insbesondere dann, wenn hyperpolarisierende Effekte z. B. von Kaliumkanälen (im Bereich von -100 mV bis -40 mV) beobachtet werden sollen, bringt eine Optimierung der Lage der halbmaximalen Signaländerung und der Steilheit der Kurve eine größere Verbesserung der Spannungsauflösung als eine Optimierung der Gesamtsignaländerung. **c**, Darstellung des hydrophoben Dichtungsring (pink, siehe **d**) der spannungssensitiven Phosphatase (VSP) aus der Schlauchseescheide *Ciona intestinalis* (CI) (PDB ID: 4G7V).⁹⁴ Bei einer Depolarisation der Membran bewegen sich das S4-Segment und damit die Schaltladungen (dunkelblau) kornenzieherartig nach oben (extrazellulär). Einige der Schaltladungen müssen sich dabei am hydrophoben Dichtungsring, der intra- und extrazelluläre Lösung voneinander trennt, vorbeibewegen.⁷⁰ Durch Mutationen in Resten des Dichtungsring (I126 in CI-VSP, I67 in ASAP1) konnte V_{halb} der CI-VSP in Abstufung zwischen 80 mV (A126) und -40 mV (F126) gelegt werden.¹⁹¹ **d**, Struktur von CI-VSP mit Gegenladungen (Glutamat- und Aspartatreste, orangerot) der Schaltladungen in S4 (Arginine, dunkelblau). Es wurde bereits in ArcLight-basierten Sensoren gezeigt, dass Mutationen an den Gegenladungen V_{halb} und k_s beeinflussen können.⁹¹

Für Messungen von V_{Ruhe} wäre demnach ein V_{halb} von -50 mV ideal. Für rArc liegt V_{halb} bereits bei -49 mV, für rASAP hingegen bei -11.4 mV. Dadurch und durch die größere relative Änderung

(Δr) sowie den größeren Steigungsfaktor (k_s) ist rASAP besser für die Abdeckung des gesamten physiologischen Spannungsbereichs zwischen -100 mV und 60 mV geeignet, hat jedoch eine geringere Auflösung im Bereich von V_{Ruhe} als rArc.¹⁷

Die V_{halb} -Werte der ursprünglichen ASAP-Varianten liegen bei -136 mV (ASAP1), -104 mV (ASAP2s) und -88 mV (ASAP3) und damit zu weit im negativen Spannungsbereich.¹⁰³ In CI-VSP zeigte die R217Q-Mutation (R397/R396 in ASAP/ASAP3) eine Verschiebung von V_{halb} um -80 mV.⁷⁰ Ein Arginin im S3-S4-Linker in der Nähe des Spannungssensors wurde in ArcLight-Q239 sowie ASAP1 und allen folgenden Konstrukten gegen ein Glutamin ausgetauscht.^{84,97,103–105} Um V_{halb} in einen physiologisch relevanten Spannungsbereich zu verschieben, wurde Q397/396 in dieser Arbeit deshalb in rASAP und rASAP-al wieder in ein Arginin umgewandelt. Die neueste ASAP-Variante (ASAP3) weist den größten Δr - sowie den geringsten k_s -Wert aller ASAP-Varianten auf.¹⁰³ Um die Sensorauflösung von rASAP weiter zu optimieren, wurde deshalb rASAP-al konstruiert. rASAP-al zeigte jedoch eine geringere Δr als ASAP3 und ein Auflösungsoptimum ($V_{halb} \pm k_s$; 19 ± 37 mV), welches zu weit im positiven Spannungsbereich liegt, um für V_{Ruhe} -Messungen geeignet zu sein. Neben der Fusion des Fluoreszenzproteins mKate2 unterscheidet sich rASAP-al von ASAP3 nur an zwei Positionen (I67T und Q396R). I67 (I126 in CI-VSP) ist ein hochkonservierter Rest, der an der Ausbildung eines hydrophoben Dichtungsringes aus unpolaren Aminosäuren beteiligt ist (Abb. 10c, d).^{191,192} In CI-VSP wurde gezeigt, dass V_{halb} durch Austausch von Isoleucin gegen andere Aminosäuren in Abstufungen zwischen 80 mV (A126) und -40 mV (F126) gelegt werden kann.^{104,191} Eine Strategie, um einen Sensor basierend auf rASAP-al zu entwickeln, welcher eine größere Auflösung im physiologischen V_{Ruhe} -Bereich aufweist, wäre demnach eine Rückmutation von R396 zu Q396 und eine Sättigungsmutagenese an Aminosäureposition 67. Ergänzend könnten weitere hochkonservierte Aminosäurereste in der VSD modifiziert werden, insbesondere von negativen Gegenladungen in S1 und S2, die mit den Schaltladungen des Spannungssensors interagieren; für ArcLight-basierte Konstrukte wurde bereits gezeigt, dass durch Modifikation der Gegenladungen der Schaltladungen V_{halb} und k_s verändert werden können (Abb. 10d).⁹¹

Unter idealen Bedingungen stammt das gesamte Fluoreszenzsignal eines GEVIs aus der Plasmamembran. Für die meisten Sensoren lassen sich jedoch intrazelluläre, fluoreszente Strukturen erkennen.^{62,81,82,115} Diese tragen zum Gesamtsignal bei, reagieren aber nicht auf Spannungsänderungen der Plasmamembran. Eine unvollständige Membranlokalisation verringert Δr und damit die Auflösung insbesondere in nichtbildgebenden Verfahren. Außerdem erschwert es die Kalibration des GEVI-Signals, da der Anteil intrazellulärer Aggregate zwischen Zelltypen schwanken kann. Für die mCherry-basierte rArc-Variante konnte in dieser Arbeit eine

Akkumulation von rotfluoreszierenden, punktförmigen Strukturen in der Zelle beobachtet werden. Ähnliche Strukturen wurden bereits für Mermaid1 und Mermaid2 β aber auch in ASAP3-Fusionproteinen beobachtet.^{82,115} Es ist bekannt, dass von DsRed abgeleitete Fluoreszenzproteine (FPs) wie mCherry in Lysosomen nicht vollständig abgebaut werden können. Dies führt zu einer Akkumulation des roten Signals als punktförmige, intrazelluläre Strukturen.¹⁹³ Für mKate2-basierte Konstrukte (rArc, rASAP und rASAP-al) waren diese Strukturen nicht zu beobachten. Dies stimmt mit den Berichten anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls keine punktförmigen Strukturen für mKate2-Fusionsproteine beobachten konnten.¹¹³ Insbesondere in Zellen mit hoher Expressionsstärke waren hingegen auch für mKate2-basierte Konstrukte intrazelluläre fluoreszente Strukturen zu beobachten. Obwohl viele FPs ursprünglich als Monomere bezeichnet wurden, tendieren einige FPs in Membranfusionsproteinen dazu, di-/multimere Strukturen auszubilden.¹⁹⁴ Daher können sich sogenannte OSER- (*Organized smooth ER*) Wirbelstrukturen formen. Die Anzahl und Stärke dieser Wirbelstrukturen hängt sowohl von der Expressionsstärke der FP-Fusionsproteine als auch der Tendenz der FPs zur Di-/Multimerisierung ab.¹⁹⁵ Nicht zuletzt aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Zellen mit hoher Expressionsstärke systematisch von der Analyse ausgeschlossen. Alternativ könnte mKate2 jedoch auch gegen FPs mit verringerter Tendenz zur Multimerisierung wie FusionRed oder mCyRFP3 ausgetauscht werden; dies könnte die Spannungsauflösung insbesondere in nichtbildgebenden Verfahren weiter verbessern und die Kalibration des ratiometrischen Signals erleichtern.¹¹⁵

3.2. Optische Manipulation membrannaher Prozesse

3.2.1. CORM-S1 als Fe²⁺-freisetzendes Molekül

Fe²⁺ ist ein wichtiges Spurenelement, das u. a. in den Eisenschwefelclustern in der Atmungskette oder als zentrales Ion in Form von Häm physiologisch relevante Funktionen einnimmt.³⁵ Fe²⁺ wird in den Enterozyten des Duodenums in einem elektrogenen Transportprozess von einem Metallionentransporter für divalente Kationen (DMT1) aufgenommen.³⁰ Um dynamische Prozesse des Fe²⁺-Stoffwechsels, wie die putative Regulation von Ionenkanälen oder den elektrogenen Transport von Fe²⁺ an der Zellmembran, zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit das etablierte Fe²⁺-basierte CO-freisetzende Molekül CORM-S1 auf seine Eignung als optisch steuerbares Fe²⁺-freisetzendes Molekül (FERM) evaluiert.¹⁵³

Ohne Licht ist CORM-S1 in Messpufferlösung bei Raumtemperatur auch nach 30 min weitgehend aktiv ($\approx 95\%$ Aktivität). Damit ist es stabiler als freies Fe²⁺, welches in Lösung bei physiologischen pH-Werten im Verlauf weniger Minuten oxidiert wird ($\tau \approx 10$ min bei pH 7,4). Nach Beleuchtung

mit einer Kaltlichtquelle zeigte CORM-S1 eine Freisetzung in einer Stöchiometrie $\text{Fe}^{2+}:\text{CORM-S1}$ von 1:1 und $\text{CO}:\text{CORM-S1}$ von 2:1 und damit eine vollständige Freisetzung des zentralen Fe^{2+} . Es bilden sich demnach keine langlebigen CO-Kationenaddukte, wie sie für rutheniumbasierte CORMs wie CORM-2 oder CORM-3 beobachtet wurden.^{162,165} CORM-S1 ist damit das erste charakterisierte, photolabile Fe^{2+} -freisetzende Molekül. Die apparente lichtabhängige Freisetzung folgt einer Reaktion erster Ordnung und damit einem monoexponentiellen Zerfallsprozess, dessen Geschwindigkeit von Intensität und Wellenlänge des Lichts bestimmt wird und ein Maximum bei 480 nm erreicht. Experimente mit einer Blitzlichtquelle zeigten, dass CORM-S1 fast vollständig im sub-ms-Bereich freigesetzt werden kann. Die tatsächliche Freisetzungsrage konnte nicht bestimmt werden, da die Messmethode die Bildung eines Ferroin-Komplexes aus drei 1,10-Phenanthrolinmolekülen und einem Fe^{2+} beinhaltet. Der beobachtete Transient nach Blitzlichtbeleuchtung ist eine Mischung aus Freisetzungsrage und Produktbildungsrage von Ferroin, wobei letztere wahrscheinlich geschwindigkeitsbestimmend ist.¹⁹⁶

Um die Bindekinetik von Liganden an Rezeptoren oder Kanäle zu bestimmen, bedarf es schneller Änderungen der Konzentration des zu untersuchenden Liganden. Dies wird häufig durch Applikation mit einer zweiten Pipette (Applikationspipette) oder einem Mehrkanalsystem erreicht.^{139,197} Dazu muss der Ligand jedoch gelöst vorliegen. Ein großes Problem bei der Applikation von Fe^{2+} ist dessen sofort einsetzende Oxidation zu Fe^{3+} . Dies erschwert die Applikation definierter Fe^{2+} -Konzentration, da die Fe^{2+} -Konzentration zeitabhängig ist. Dadurch, dass CORM-S1 ohne Licht in einem Zeitraum von 30 min weitgehend stabil ist, erleichtert es den experimentellen Umgang mit Fe^{2+} . In dieser Arbeit wurde dazu eine beispielhafte Anwendung von CORM-S1 als schnelle, lichtsteuerbare Fe^{2+} -Quelle für zeitlich hochaufgelöste Fe^{2+} -Konzentrationsänderungen dargestellt. Mit einer Kombination aus CORM-S1 und Blitzlichtbeleuchtung konnten sprunghafte Änderungen der freien Fe^{2+} -Konzentration in der Nähe der Patch-Pipette erzeugt werden. Nur durch diese schnellen Fe^{2+} -Sprünge im μs - bis ms -Bereich konnte die Geschwindigkeit der Fe^{2+} -bedingten Aktivierung von BK_{Ca} -Kanälen bestimmt werden ($\tau \approx 70 \text{ ms}$). Potentiell könnte CORM-S1 auch zur räumlich aufgelösten Katalyse chemischer Reaktionen eingesetzt werden. Mit einem fokussierten Laser und einem Fe^{2+} -Puffersystem könnten räumlich begrenzte, Fe^{2+} -katalysierte Reaktionen z. B. auf organischen Oberflächen ausgelöst werden.

3.2.2. Regulation von BK_{Ca} -Kanälen durch Fe^{2+} und Spannung

BK_{Ca} -Kanäle sind Ca^{2+} - und spannungsgesteuerte Kaliumkanäle, deren Aktivität von intrazellulären Mediatoren wie Mg^{2+} , Zn^{2+} , H^+ oder reaktiven Sauerstoffspezies beeinflusst

werden kann.¹³¹⁻¹³⁵ Mit Hilfe der neuentwickelten Methoden zur Messung von V_{Ruhe} konnte gezeigt werden, dass die α -Untereinheit der BK_{Ca} -Kanäle V_{Ruhe} von HEK293T-Zellen nicht beeinflusst. Die ektopische Expression von BK_{Ca} -Kanalmutanten mit erhöhter Offenwahrscheinlichkeit bei negativen Membranspannungen bewirkte hingegen eine permanente Hyperpolarisation von HEK293T-Zellen.

Die Aktivität von BK_{Ca} -Kanälen wurde bereits durch intrazelluläre Fe^{2+} -Konzentrationen im niedrigen μM Bereich (EC_{50} : 25 μM bei pH 7,4, 5 μM bei pH 6,8) durch Linksverschiebung der Strom-Spannungskurve gesteigert (ΔV_{halb} : -50 mV bei pH 7,4, -29 mV bei pH 6,8). Diese Verschiebung konnte ebenfalls mit vergleichbaren Konzentrationen an CORM-S1 erreicht werden. Die beiden weiteren Degradationsprodukte von CORM-S1 CO und Cysteamin zeigten nur geringfügig aktivierende Effekte auf BK_{Ca} -Kanäle.¹⁶² In einer Studie an glatten Muskelzellen aus der Pulmonalarterie der Ratte wurde hingegen ein deutlich stärkerer Effekt von CO auf die Aktivität von BK_{Ca} -Kanälen beobachtet.¹⁵⁵ Dies deutet an, dass weitere Untereinheiten/Faktoren an der Regulation von BK_{Ca} -Kanälen durch CO beteiligt sind. Eine putative Mg^{2+} -Bindestelle konnte als Hauptbindestelle für Fe^{2+} identifiziert werden. Diese verbindet den C-terminalen Schaltring der BK_{Ca} -Kanäle mit der Transmembrandomäne der Kanäle über elektrostatische Interaktionen.¹³⁶ Die Aktivität von BK_{Ca} -Kanälen wurde auch in Gegenwart von μM Konzentrationen an Ca^{2+} und mM Konzentrationen an Mg^{2+} durch μM Konzentrationen an Fe^{2+} reguliert. Das spricht dafür, dass Fe^{2+} BK_{Ca} -Kanäle auch unter physiologischen Bedingungen regulieren kann; zum Vergleich: die Gesamtkonzentration von Eisen (frei und gebunden) im Blutplasma liegt im Bereich von 10-30 μM .⁴³

Da Fe^{2+} zwar essentiell, aber aufgrund seiner Redoxaktivität zytotoxisch ist, wird ein Großteil des Eisens in der Zelle als Fe^{3+} in Ferritin gespeichert; exzessive Erhöhungen von freiem Fe^{2+} können Ferroptose bewirken, einen Zelltod, der durch die eisenkatalysierte Oxidation von Membranlipiden eingeleitet wird.^{35,36,198} Um die Dissoziation von Fe^{2+} von Metalloenzymen zu verhindern, muss jedoch ein gewisser Anteil des zellulären Eisens als labiler Fe^{2+} -Pool in der Zelle im Bereich von 10^{-6} - 10^{-7} M vorliegen.¹⁹⁹ Der Fe^{2+} -Pool wird meist durch Eisenchelatoren wie Citrat, reduziertes Glutathion oder Eisenchaperone wie PCBP2 (*Poly(rC)-binding protein*) stabilisiert.^{30,200} Es ist daher plausibel, dass Fe^{2+} in Zellen wie z. B. den Enterozyten des Duodenums zumindest kurzzeitig hohe μM Konzentrationen erreichen kann. Alternativ könnten auch nur lokale Erhöhungen der Fe^{2+} -Konzentration z. B. in der Nähe von DMT1 oder der Hämoxygenase 2 auftreten.^{137,138}

Für die Hypothese einer funktionellen Kopplung zwischen Fe^{2+} -Stoffwechsel und Membranpotential durch BK_{Ca} -Kanäle spricht die beobachtete Kollokalisierung von BK_{Ca} -Kanälen

und Hämoxigenase 2.¹³⁸ Zudem werden an der apikalen Membran der Enterozyten des Duodenums (dem Darmlumen zugewandt) neben DMT1 und Dcytb auch BK_{Ca}-Kanäle exprimiert.^{30,137,138,201,202} In Prostatakrebszelllinien finden sich in der Plasmamembran sogenannte STEAP-Proteine (*Six-transmembrane epithelial antigen of prostate*), welche ebenfalls als membranständige Fe³⁺/Fe²⁺-Reduktasen fungieren.²⁰³ Die LNCaP-Prostatakrebszelllinie weist einen erhöhten intrazellulären labilen Fe²⁺-Pool auf und exprimiert zudem BK_{Ca}-Kanäle, die mit der stark aktivierenden γ 1-Untereinheit und Cav3.2-Kanälen in Nanodomänen kolokalisiert sind.^{50–52,204} Es ist daher plausibel, dass BK_{Ca}-Kanäle an der Regulation von Fe²⁺-Transportprozessen und darüber am Wachstum von Tumorzellen beteiligt sind.

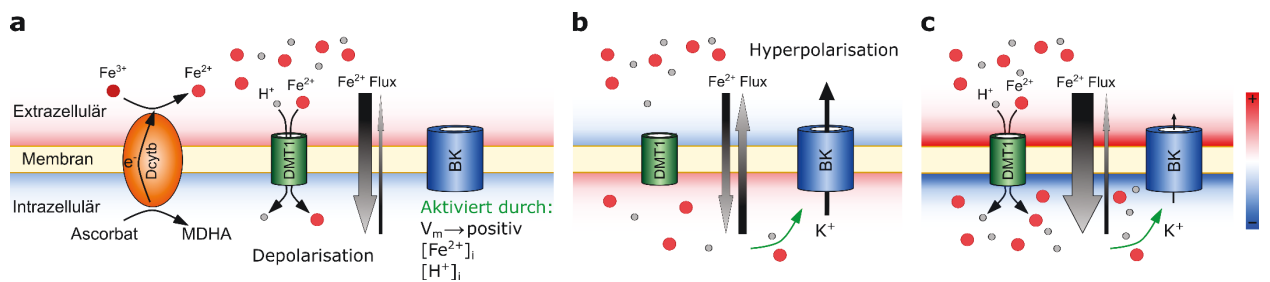


Abbildung 11. **Modell eines positiven Rückkopplungsmechanismus des Eisentransports durch BK_{Ca}-Kanäle.** **a**, In Zellen des Duodenums kommt sowohl der BK_{Ca}-Kanal als auch die Fe²⁺/Fe³⁺-Reduktase Dcytb, sowie der Fe²⁺-Transporter DMT1 vor.²⁰² Dcytb reduziert das in der Nahrung hauptsächlich als Fe³⁺ auftretende Eisen zu Fe²⁺, welches von DMT1 in die Zelle transportiert wird. Der Transport von vier positiven Ladungen pro transportiertem Fe²⁺ in die Zelle (Ausstrom von einem Elektron (e⁻) und Koimport von je einem Fe²⁺ und H⁺) bewirkt tendenziell eine Depolarisation der Plasmamembran. **b**, Geht man von einem pH-Unterschied zwischen intra- und extrazellulärer Lösung von einer pH-Einheit aus (pH_i > pH_a), entspräche dies nach der Nernst-Gleichung einem Umkehrpotential für H⁺ bei 37°C von ≈ 62 mV. Oberhalb dieser Spannung würde der Fe²⁺-Transport durch den Kotransport mit H⁺ im Vergleich zu einem Uniport verlangsamt bis sich ein Gleichgewicht zwischen Import und Export einstellt. BK_{Ca}-Kanäle werden sowohl durch eine positivere Membranspannung als auch durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von H⁺ und Fe²⁺ aktiviert. Die Öffnung der BK_{Ca}-Kanäle bewirkt einen Ausstrom von K⁺ und damit eine Re-/Hyperpolarisation der Membran. **c**, Die Aktivität der BK_{Ca}-Kanäle steigt mit steigender intrazellulärer H⁺- und Fe²⁺-Konzentration. Die Triebkraft für den Transport von Fe²⁺ steigt durch die Hyperpolarisation von V_m, welche das Gleichgewicht in Richtung erhöhter intrazellulärer Fe²⁺-Konzentration verschiebt.

Eine Möglichkeit, wie BK_{Ca}-Kanäle in den Eisenstoffwechsel involviert sein könnten, ist ein positiver Rückkopplungsmechanismus. Eine Fe²⁺-bedingte Öffnung von BK_{Ca}-Kanälen würde zu einer Hyperpolarisation der Plasmamembran führen, welche die treibende Kraft für Fe²⁺ in die Zelle erhöht (Abb. 11). Eine Verschiebung von V_{Ruhe} von -40 auf -90 mV würde bei einem rein passiven Transportprozess von Fe²⁺ laut Nernst-Gleichung bei 37°C eine ≈ 40 -fach höhere intrazelluläre Fe²⁺-Konzentration im Gleichgewicht bedeuten. Da die Aufnahmegeschwindigkeit von Fe²⁺ durch DMT1 spannungsabhängig ist, würde eine hyperpolarisierte Plasmamembran zudem verhindern, dass sich das von Dcytb produzierte Fe²⁺ von der Membran entfernt, bevor es von der Zelle durch DMT1 aufgenommen wird.

Wenn eine Hyperpolarisation der Plasmamembran eine erhöhte Aufnahme von Metaboliten bewirkt, könnte dies ein Erklärungsmodell dafür sein, warum Tumorzellen wie z. B. Prostata- oder Brustkrebszellen besonders aktive Varianten von Ionenkanälen wie BK_{Ca}- oder Kv10.1-Kanälen aufweisen. Unter Verwendung von rASAP wurde gezeigt, dass Kv10.1-Kanäle, die in einer Vielzahl von Tumorzellen vorkommen, nichterregbare Zellen unter Ruhebedingungen prinzipiell hyperpolarisieren können.⁴⁶⁻⁴⁸ Es ist denkbar, dass eine Membranhyperpolarisation elektrogene Transportprozesse wie z. B. die Aufnahme von Glukose über den sekundär aktiven Glukosetransporter SGLT1 (Natrium-D-Glukose-Kotransporter) beschleunigt.²⁰⁵ Eine hyperpolarisierte Plasmamembran könnte so z. B. auch den Warburg-Effekt begünstigen, den beobachteten erhöhten Katabolismus von Glukose durch Krebszellen.²⁰⁶

3.2.3. Biofunktionalisierte UCNPs als Quellen photochemischer Nanodomänen

Um dynamische Prozesse von sekundären Botenstoffen zu untersuchen, wurden photolabile Käfigverbindungen wie DM-Nitrophen oder CORM-S1 entwickelt.^{148,153} Die Auflösung der Freisetzung aus diesen Komponenten ist jedoch davon abhängig, wie präzise das Licht auf die Umgebung des zu untersuchenden Zielgebiets begrenzt werden kann.¹⁶⁷ Für die Erzeugung von Nanodomänen sollte es auf unter 100 nm um das Zielprotein begrenzt sein. Dazu wurden in dieser Arbeit aufwärtskonvertierende Nanopartikel auf ihre Eignung als lokale Lichtquellen zur Erzeugung von photochemischen Nanodomänen untersucht.

Tm³⁺-dotierte UCNPs wurden mit Polyethylenglykol und einer nichtfluoreszierenden Variante des grünfluoreszierenden Proteins (XFP) gekoppelt. Durch die gentechnische Fusion eines GFP-Einzeldomänenantikörpers (aGFP) und eines membranständigen Zielproteins konnten XFP-gekoppelte UCNPs mit molekularer Präzision an der Membran befestigt werden. Das photokonvertierbare Fluoreszenzprotein Dendra2, welches nach Absorption eines Photons im ultravioletten oder blauen Wellenlängenbereich von einer grün- in eine rotfluoreszierende Form konvertiert werden kann, diente als Reporter. Mit NIR-Licht angeregte Tm³⁺-UCNPs konnten extrazellulär am Zielprotein verankertes Dendra2 innerhalb weniger Sekunden vollständig konvertieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch extrazellulär gebundene UCNPs Dendra2 prinzipiell auch auf der Innenseite der Membran konvertiert werden kann. In beiden Fällen befanden sich Dendra2 und UCNP am gleichen Protein. Die Konversionsrate (k_{pc}) des intrazellulär fusionierten Dendra2 (5 ms^{-1}) war jedoch fast achtfach niedriger als die des extrazellulär fusionierten Dendra2 (38 ms^{-1}) bei mehr als der doppelten NIR-Anregungsintensität.

Die durchgeführten *in vitro* Experimente mit fixierten UCNPs zeigen, dass die Konversionsrate für Abstände unter 5 nm zwischen Dendra2 und Partikeloberfläche stark abfällt. Der schnelle Abfall von k_{pc} als Funktion des Abstands von der Oberfläche spricht dafür, dass photochemische Reaktionen in einem Abstand unter 5 nm von der Oberfläche der UCNPs hauptsächlich durch direkten Energietransfer ausgelöst werden. Dass sich k_{pc} von Dendra2 bei Abständen zwischen 5 und 10 nm kaum verändert, deutet an, dass photochemische Reaktionen bei größeren Abständen hauptsächlich über Prozesse ausgelöst werden, die einem anderen Abstandsgesetz folgen, also im Fall von Reemission und Absorption von Photonen einem inversen quadratischen Abstandsgesetz folgen.

Durch die Kalibration von k_{pc} mit einer UV-LED (365 nm) mit definierter Lichtintensität kann die lokale Äquivalenzlichtintensität abgeschätzt werden. Daraus kann abgeleitet werden, wie gut photochemische Reaktionen im Vergleich zu einer UV-LED katalysiert werden können. Geht man im Mittel von einer Steigung der Lichtabhängigkeit der k_{pc} von Dendra2 von $0.064 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ W}^{-1}$ für aGFP-TM-Dendra2 aus, bei dem sich UCNP und Dendra2 am gleichen Protein aber auf verschiedenen Seiten der Plasmamembran befinden, entspräche eine k_{pc} von 5 ms^{-1} einer lokalen Äquivalenzlichtintensität von $\approx 78 \text{ mW cm}^{-2}$. Bei Dendra2 und UCNP an unterschiedlichen Membranproteinen (aGFP-TM, Kir2.1-Dendra2) wäre dies äquivalent zur einer lokalen Lichtintensität von 43 mW cm^{-2} . Für freies Dendra2 im Cytoplasma ergibt sich eine lokale Äquivalenzlichtintensität von 25 mW cm^{-2} . Vergleicht man die lokale Äquivalenzlichtintensität von spezifisch markiertem Zielprotein (aGFP-TM-Dendra2) und unspezifischer Bindung an ein anderes Protein in der Zellmembran (aGFP-TM, Kir2.1-Dendra2), so ergibt sich ein kleiner als zweifacher Unterschied in der Reaktionsrate. In Zellen mit entsprechendem Epitop sind extrazellulär gebundene UCNPs somit in der Lage intrazelluläre, membrannahe, photochemische Reaktionen auszulösen, durch die geringe Auflösung zwischen spezifisch und unspezifisch markierten Membranproteinen ist der Prozess über Reemission jedoch eher ungeeignet, um spezifische intrazelluläre Nanodomänen zu untersuchen.

Der Unterschied in der k_{pc} von intra- und extrazellulärem Dendra2 liegt im Bereich von mehr als einer Größenordnung und zeigt, dass über einen direkten Energietransfer potentiell jedoch eine ausreichend hohe Auflösung erzielt werden kann. Die lokale UV-Äquivalenzlichtintensität in der direkten Umgebung des Partikels ($<5 \text{ nm}$) sollte bei einer NIR-Anregungsintensität von 10^5 W cm^{-2} im Bereich von 1 W cm^{-2} liegen. Um Nanopartikel als Lichtquellen für die Erzeugung von Nanodomänen mit Hilfe von Käfigverbindungen zu verwenden, müssten sich beide Komponenten auf der gleichen Seite der Membran befinden (Abb. 12a, b).

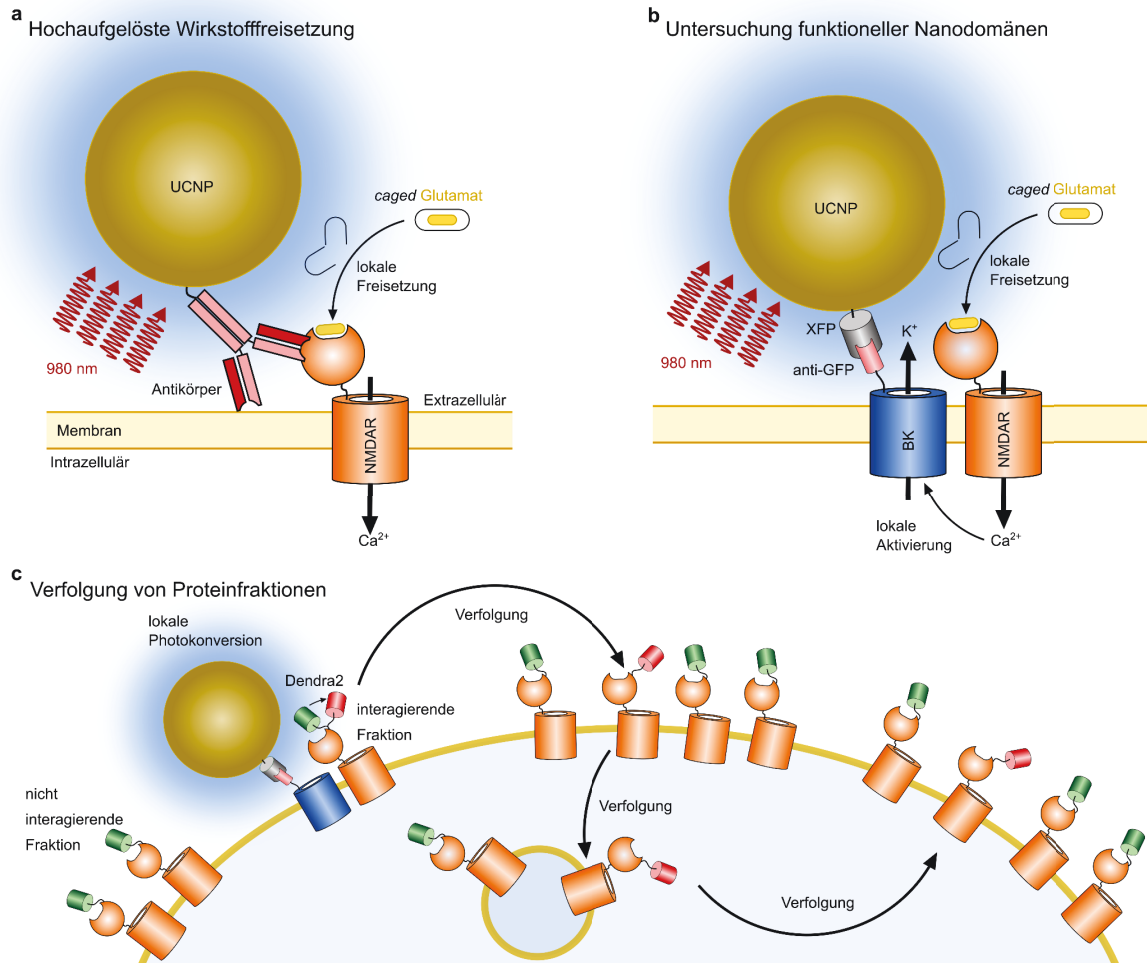


Abbildung 12. **Potentielle Anwendungen für aufwärtskonvertierende Nanopartikel als lokale Lichtquellen.** **a**, Hoचाufgelöste Wirkstofffreisetzung mit UCNP als lokale Lichtquellen am Beispiel des NMDA-Glutamatrezeptors (NMDAR).¹⁴⁰ Nanopartikel können mit molekularer Präzision über Antikörper-Antigeninteraktion an einem Zielprotein (NMDAR) an der Zelloberfläche befestigt werden. Der Wirkstoff (Glutamat) liegt in der gesamten Lösung als inaktive, photolabile Vorstufe vor (*Caged*-Glutamat, z. B. RuBi-Glutamat).¹⁵¹ Durch NIR-Licht (980 nm) wird der Wirkstoff im Abstand von wenigen nm von der Partikeloberfläche freigesetzt, sodass ein lokal begrenzter Bereich mit hoher Wirkstoffkonzentration entsteht. Ausschließlich die Rezeptoren, an welche UCNP gebunden sind, werden durch den Wirkstoff aktiviert. **b**, Untersuchung funktioneller Kopplungen von Membranproteinen in Nanodomänen am Beispiel der BK_{Ca}-NMDAR-Interaktion.^{139,141} UCNP binden an ein Zielprotein (BK_{Ca}-Kanal). Ein Rezeptorprotein (NMDAR), welches durch das Spaltprodukt eines photolabilen Wirkstoffs aktiviert wird, führt nur dann zur Aktivierung des Zielproteins (BK_{Ca}), wenn beide Proteine kolokalisiert vorliegen. **c**, Verfolgung von selektiv aktivierten Proteinfractionen am Beispiel der BK_{Ca}-NMDAR-Interaktion. Rezeptorproteine sind mit einem photokonvertierbaren Fluoreszenzprotein (Dendra2) markiert, der Interaktionspartner (BK_{Ca}) mit einem UCNP. Die Beleuchtung mit NIR-Licht bewirkt eine Markierung der Fraktion der Rezeptorproteine, die zu diesem Zeitpunkt mit dem Interaktionspartner kolokalisiert waren.

Es können also entweder extrazelluläre Nanodomänen untersucht werden oder UCNP müssten durch Mikroinjektionen in das Cytoplasma gebracht werden. Eine Mikroinjektion von biofunktionalisierten UCNP wurde von Drees *et al.* bereits für die Bestimmung von Protein-Proteininteraktionen mit FRET in lebenden Zellen verwendet und sollte daher prinzipiell auch für die Untersuchung von intrazellulären Nanodomänen möglich sein.¹⁷⁹ In Kombination mit CORM-S1 könnten so intrazelluläre Fe²⁺-Nanodomänen in einem Bereich weniger nm in der Umgebung

der UCNPs erzeugt werden oder mit RuBi-Glutamat z. B. die Interaktion von BK_{Ca}-Kanälen mit NMDA-Rezeptoren untersucht werden (Abb. 12b).^{139,151,153}

Aufwärtskonvertierende Nanopartikel wurden schon in der Vergangenheit verwendet, um gezielt Wirkstoffmoleküle über NIR-Bestrahlung *in* und *ex vivo* freizusetzen. Häufig wird dabei ein Molekül direkt mit einer Vorstufe des Wirkstoffs über kovalente oder nichtkovalente Bindungen gekoppelt. In dieser Konstellation sorgt ebenfalls direkter Energietransfer für die Freisetzung des Wirkstoffmoleküls. Beispiele dafür beinhalten Komplexe aus UCNPs mit DNA, siRNA oder CORMs.^{57,150,180,207} Im Unterschied dazu liegen bei dem hier vorgestellten Konzept Licht-Donor und inaktiver Wirkstoff getrennt vor (Abb. 12a). Bei einer direkten Kopplung kann der Wirkstoff lediglich einmal freigesetzt werden. Wenn der inaktive Wirkstoff jedoch gelöst vorliegt, kann durch Rückdiffusion der Ausgangszustand wiederhergestellt werden. Da der Wirkstoff nur in einem lokal begrenzten Bereich in der Nähe der Partikeloberfläche in relevantem Maß freigesetzt wird, kann der Rezeptor über Licht gezielt an- und ausgeschaltet werden, sodass sich mit dem dargestellten System prinzipiell Bindekinetiken z. B. von Rezeptoren und deren Liganden bestimmen lassen sollten (Abb. 12a, b).

Die hier entwickelte UCNP-assistierte Photoaktivierung/Photokonversion kann zur Detektion von Protein-Proteininteraktionen eingesetzt werden. Beispielhaft wurde dazu die induzierte Dimerisierung von Interleukin-Rezeptoren in fixierten Zellen nachgewiesen. Prinzipiell sollten sich mit diesem System jedoch auch Interaktionen in lebenden Zellen bestimmen lassen. Der Nachweis von Protein-Proteininteraktionen durch resonanten Energietransfer ist nicht neu und es existieren zahlreiche Fluoreszenzproteine, Farbstoffe und Nanopartikel, die routinemäßig zur Bestimmung der Distanz zwischen Proteinen durch FRET verwendet werden.^{68,69,179} Der neue Aspekt der UCNP-assistierte Photoaktivierung /Photokonversion besteht darin, dass Proteine, die einmal aktiviert wurden, auch nach Verlassen des Energietransferbereichs (<10 nm) markiert bleiben. Ein zellbiologisch relevantes Anwendungsszenario für diese Methode wäre die Nachverfolgung von Proteinen, welche mit einem photomanipulierbaren Protein gekoppelt sind und zu einem bestimmten Zeitpunkt mit einem UCNP-markierten Protein interagieren (Abb. 12c). NIR-Beleuchtung würde in diesem Szenario lediglich die Fraktion akzessorischer Proteine markieren, welche mit den Rezeptoren oder Kanälen zu genau diesem Zeitpunkt direkt oder indirekt interagiert. Darüber könnte selektiv das Schicksal dieser Proteinfraktion im zellulären Kontext verfolgt werden, da die nichtinteragierende Proteinfraktion nichtfluoreszierend bzw. nicht in diesem Wellenlängenbereich fluoreszierend vorliegt.

3.3. Konklusion

Die Relevanz schneller Änderungen des Membranpotentials in erregbaren Zellen ist bereits seit Mitte des letzten Jahrhunderts bekannt.⁴ Die Bedeutung des elektrochemischen Ungleichgewichts an der Membran ist aber auch in nichterregbaren Zellen nicht zu verkennen, was bereits daran ersichtlich ist, dass alle Zellen ein negatives elektrisches Potential an ihrer Plasmamembran aufrechterhalten.^{3,17} Das elektrochemische Potential der Zellen ist dabei nicht statisch, sondern verändert sich dynamisch durch die Aktivität, Lokalisation und Expressionsstärke von zellulären Transportproteinen, welche ihrerseits durch zahlreiche intrazelluläre und extrazelluläre regulatorische Proteine und Signalmoleküle auf Gen- sowie Proteinebene reguliert werden.^{12,17,22,79,116} Das Membranpotential hat durch die Regulation der Aktivität spannungssensitiver Membranproteine wiederum seinerseits Einfluss auf intrazelluläre Prozesse.^{32,51,79,133} In einer Vielzahl pathophysiologischer Zustände wie Krebs, viralen Infektionen oder schwerwiegenden, erblichen Entwicklungsdefekten wurden Störungen des elektrischen Potentials bzw. elektrogener Transportprozesse beobachtet.^{17,21,25,27,29,33,34,41,49} Um das hochkomplexe Zusammenspiel von Signal- und Transportprozessen intra- und extrazellulärer Stimuli auch nur ansatzweise in einem gesamtzellphysiologischen bzw. systembiologischen Modell verstehen zu können, ist daher die Entwicklung verbesserter Methoden, mit denen diese Prozesse unter möglichst physiologischen Umständen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ beschrieben werden können, unentbehrlich.

In dieser Arbeit wurden optische Verfahren weiterentwickelt bzw. vollständig neue Methoden etabliert, die Ausgangspunkt für die Beantwortung bisher schwer zugänglicher Fragestellungen sind. So konnte das zelluläre Ruhemembranpotential verschiedener Zellpopulationen mit Hilfe ratiometrischer GEVIs verglichen werden. Dadurch konnte erstmals die funktionelle Implikation einer Mutation in Kv10.1-Kanälen, welche in Betroffenen das Temple-Baraitser-Syndrom auslöst, auf das zelluläre Ruhemembranpotential (Hyperpolarisation) beobachtet werden sowie erstmals die Biosynthesegeschwindigkeit funktioneller Kir2.1-Ionenkanäle in Echtzeit in lebenden Zellen bestimmt werden. Mit CORM-S1 wurde das erste Fe²⁺-freisetzende Molekül etabliert, mit welchem sich die freie Konzentration von Fe²⁺ mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung modulieren lässt. Dadurch konnte die Geschwindigkeit der Fe²⁺-abhängigen Aktivitätsänderung von BK_{Ca}-Kanälen quantifiziert werden. Abschließend wurde nachgewiesen, dass sich molekular platzierte UCNPs als Quellen räumlich hochaufgelöster photochemischer Reaktionsnanodomänen eignen. Mit der Weiterentwicklung optischer Methoden zur quantitativen Untersuchung membrannaher Prozesse kann diese Arbeit dazu beitragen, der Etablierung eines systembiologischen Verständnisses zellulärer Prozesse einen Schritt näher zu kommen.

Literaturverzeichnis

1. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720–731 (1972).
2. Van Meer, G., Voelker, D. R. & Feigenson, G. W. Membrane lipids: Where they are and how they behave. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 112–124 (2008).
3. Goldman, D. E. Potential, impedance, and rectification in membranes. *Journal of General Physiology* **27**, 37–60 (1943).
4. Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of Physiology* **117**, 500–544 (1952).
5. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
6. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 31–39 (2000).
7. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46–50 (2010).
8. Sukhorukov, V. L., Arnold, W. M. & Zimmermann, U. Hypotonically induced changes in the plasma membrane of cultured mammalian cells. *The Journal of Membrane Biology* **132**, 27–40 (1993).
9. Gentet, L. J., Stuart, G. J. & Clements, J. D. Direct measurement of specific membrane capacitance in neurons. *Biophysical Journal* **79**, 314–320 (2000).
10. Shapiro, M. G., Homma, K., Villarreal, S., Richter, C. P. & Bezanilla, F. Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance. *Nature Communications* **3**, 1–11 (2012).
11. Ojha, N. K., Jin, J., Arifin, J. C., Rühl, P. & Heinemann, S. H. Membrane potential manipulation with visible flash lamp illumination of targeted microbeads. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **517**, (2019).
12. Lüpfer, C. *et al.* Rate limitation of the Na⁺,K⁺-ATPase pump cycle. *Biophysical Journal* **81**, 2069–2081 (2001).
13. Mackenzie, B., Takanaga, H., Hubert, N., Rolfs, A. & Hediger, M. A. Functional properties of multiple isoforms of human divalent metal-ion transporter 1 (DMT1). *Biochemical Journal* **403**, 59–69 (2007).
14. Lee, U. S. & Cui, J. BK channel activation: Structural and functional insights. *Trends in Neurosciences* **33**, 415–423 (2010).
15. Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S. Intracellular ion environment and membrane electric potential. in *Molecular Cell Biology, 4th Edition* 1–5 (W. H. Freeman, 2000).
16. Huang, X. & Jan, L. Y. Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of Cell Biology* **206**, 151 (2014).
17. Kadir, L. A., Stacey, M. & Barrett-Jolley, R. Emerging roles of the membrane potential: Action beyond the action potential. *Frontiers in Physiology* **9**, 1661 (2018).

18. Zhang, D. Y., Lau, C. P. & Li, G. R. Human Kir2.1 channel carries a transient outward potassium current with inward rectification. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* **457**, 1275–1285 (2009).
19. Lazzari-Dean, J. R., Gest, A. M. M. & Miller, E. W. Optical estimation of absolute membrane potential using fluorescence lifetime imaging. *eLife* **8**, (2019).
20. Saminathan, A. *et al.* A DNA-based voltmeter for organelles. *Nature Nanotechnology* **16**, 96–103 (2021).
21. Simons, C. *et al.* Mutations in the voltage-gated potassium channel gene KCNH1 cause Temple-Baraitser syndrome and epilepsy. *Nature Genetics* **47**, 73–77 (2015).
22. Belle, M. D. C., Diekmann, C. O., Forger, D. B. & Piggins, H. D. Daily electrical silencing in the mammalian circadian clock. *Science* **326**, 281–284 (2009).
23. Clark, R. B. *et al.* Voltage-gated K⁺ currents in mouse articular chondrocytes regulate membrane potential. *Channels* **4**, 179–191 (2010).
24. Netti, V. *et al.* TRPV4 contributes to resting membrane potential in retinal müller cells: Implications in cell volume regulation. *Journal of Cellular Biochemistry* **118**, 2302–2313 (2017).
25. Higashimori, H. & Sontheimer, H. Role of Kir4.1 channels in growth control of glia. *Glia* **55**, 1668–1679 (2007).
26. Chifflet, S., Hernández, J. A. & Grasso, S. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **288**, 1420–1430 (2005).
27. Nieva, J. L., Madan, V. & Carrasco, L. Viroporins: Structure and biological functions. *Nature Reviews Microbiology* **10**, 563–574 (2012).
28. Ma, D., Tang, X. D., Rogers, T. B. & Welling, P. A. An Andersen-Tawil syndrome mutation in Kir2.1 (V302M) alters the G-loop cytoplasmic K⁺ conduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 5781–5789 (2007).
29. Hamilton, M. J. & Suri, M. “Electrifying dysmorphology”: Potassium channelopathies causing dysmorphic syndromes. *Advances in Genetics* **105**, 137–174 (2020).
30. Yanatori, I. & Kishi, F. DMT1 and iron transport. *Free Radical Biology and Medicine* **133**, 55–63 (2019).
31. Su, D. & Asard, H. Three mammalian cytochromes b561 are ascorbate-dependent ferrireductases. *FEBS Journal* **273**, 3722–3734 (2006).
32. Gao, G., Li, J., Zhang, Y. & Chang, Y.-Z. Cellular iron metabolism and regulation. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1173**, 21–32 (2019).
33. Yang, M. & Brackenbury, W. J. Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in Physiology* **4**, 185 (2013).
34. Leipold, E. *et al.* A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics* **45**, 1399–1407 (2013).
35. Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W. & Galy, B. A red carpet for iron metabolism. *Cell* **168**, 344–361 (2017).

36. Harrison, P. M. & Arosio, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1275**, 161–203 (1996).
37. Camaschella, C. Iron deficiency: New insights into diagnosis and treatment. *Hematology (United States)* **2015**, 8–13 (2015).
38. Lemler, D. J. *et al.* DCYTB is a predictor of outcome in breast cancer that functions via iron-independent mechanisms. *Breast Cancer Research* **19**, 25 (2017).
39. Wang, W. *et al.* IRP2 regulates breast tumor growth. *Cancer Research* **74**, 497–507 (2014).
40. Brown, R. A. M. *et al.* Altered iron metabolism and impact in cancer biology, metastasis, and immunology. *Frontiers in Oncology* **10**, 476 (2020).
41. Pietrangelo, A. Hereditary hemochromatosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Gastroenterology* **139**, 393–408.e2 (2010).
42. Deng, Z., Manz, D. H., Torti, S. V. & Torti, F. M. Iron-responsive element-binding protein 2 plays an essential role in regulating prostate cancer cell growth. *Oncotarget* **8**, 82231–82243 (2017).
43. Ganz, T. & Nemeth, E. Heparin and disorders of iron metabolism. *Annual Review of Medicine* **62**, 347–360 (2011).
44. Cone, C. D. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *Journal of Theoretical Biology* **30**, 151–181 (1971).
45. Sachs, H. G., Stambrook, P. J. & Ebert, J. D. Changes in membrane potential during the cell cycle. *Experimental Cell Research* **83**, 362–366 (1974).
46. Hemmerlein, B. *et al.* Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. *Molecular Cancer* **5**, 1–13 (2006).
47. Cázares-Ordoñez, V. & Pardo, L. A. Kv10.1 potassium channel: From the brain to the tumors. *Biochemistry and Cell Biology* **95**, 531–536 (2017).
48. Meyer, R., Schönherr, R., Gavrilova-Ruch, O., Wohlrab, W. & Heinemann, S. H. Identification of ether a go-go and calcium-activated potassium channels in human melanoma cells. *Journal of Membrane Biology* **171**, 107–115 (1999).
49. Lobikin, M., Chernet, B., Lobo, D. & Levin, M. Resting potential, oncogene-induced tumorigenesis, and metastasis: The bioelectric basis of cancer in vivo. *Physical Biology* **9**, 065002 (2012).
50. Gessner, G. *et al.* BK_{Ca} channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells. *Journal of Membrane Biology* **208**, 229–240 (2006).
51. Yan, J. & Aldrich, R. W. LRRC26 auxiliary protein allows BK channel activation at resting voltage without calcium. *Nature* **466**, 513–516 (2010).
52. Gackière, F. *et al.* Functional coupling between large-conductance potassium channels and Cav3.2 voltage-dependent calcium channels participates in prostate cancer cell growth. *Biology Open* **2**, 941–951 (2013).
53. Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **391**, 85–100 (1981).

54. Wilson, J. R., Clark, R. B., Banderali, U. & Giles, W. R. Measurement of the membrane potential in small cells using patch clamp methods. *Channels* **5**, 530 (2011).
55. Popovic, M. *et al.* Imaging submillisecond membrane potential changes from individual regions of single axons, dendrites and spines. *Advances in experimental medicine and biology* **859**, 57–101 (2015).
56. Frost, W. N. *et al.* Monitoring spiking activity of many individual neurons in invertebrate ganglia. *Advances in experimental medicine and biology* **859**, 127–145 (2015).
57. Salzberg, B. M., Davila, H. V. & Cohen, L. B. Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* **246**, 508–509 (1973).
58. Loew, L. M. Design and Use of Organic Voltage Sensitive Dyes. *Advances in experimental medicine and biology* **859**, 27–53 (2015).
59. Baker, B. J. *et al.* Genetically encoded fluorescent sensors of membrane potential. *Brain Cell Biology* **36**, 53–67 (2008).
60. Morimoto, T. *et al.* Voltage-sensitive oxonol dyes are novel large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel activators selective for $\beta 1$ and $\beta 4$ but not for $\beta 2$ subunits. *Molecular Pharmacology* **71**, 1075–1088 (2007).
61. Scornik, F. S. *et al.* DiBAC₄ (3) hits a “sweet spot” for the activation of arterial large-conductance Ca^{2+} -activated potassium channels independently of the $\beta 1$ -subunit. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **304**, H1471–H1482 (2013).
62. St-Pierre, F., Chavarha, M. & Lin, M. Z. Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators. *Current Opinion in Chemical Biology* **27**, 31–38 (2015).
63. Xu, Y., Zou, P. & Cohen, A. E. Voltage imaging with genetically encoded indicators. *Current Opinion in Chemical Biology* **39**, 1–10 (2017).
64. Bando, Y., Grimm, C., Cornejo, V. H. & Yuste, R. Genetic voltage indicators. *BMC Biology* **17**, 1–12 (2019).
65. Platasa, J. & Pieribone, V. A. Genetically encoded fluorescent voltage indicators: are we there yet? *Current Opinion in Neurobiology* **50**, 146–153 (2018).
66. Antic, S. D., Empson, R. M. & Knöpfel, T. Voltage imaging to understand connections and functions of neuronal circuits. *Journal of Neurophysiology* **116**, 135–152 (2016).
67. Yang, H. H. & St-Pierre, F. Genetically encoded voltage indicators: Opportunities and challenges. *Journal of Neuroscience* **36**, 9977–9989 (2016).
68. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55–75 (1948).
69. Bajar, B. T., Wang, E. S., Zhang, S., Lin, M. Z. & Chu, J. A guide to fluorescent protein FRET pairs. *Sensors (Switzerland)* **16**, (2016).
70. Villalba-Galea, C. A., Frezza, L., Sandtner, W. & Bezanilla, F. Sensing charges of the *Ciona intestinalis* voltage-sensing phosphatase. *Journal of General Physiology* **142**, 543–555 (2013).
71. Ihara, K. *et al.* Evolution of the archaeal rhodopsins: Evolution rate changes by gene duplication and functional differentiation. *Journal of Molecular Biology* **285**, 163–174 (1999).

72. Kralj, J. M., Douglass, A. D., Hochbaum, D. R., MacLaurin, D. & Cohen, A. E. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin. *Nature Methods* **9**, 90–95 (2012).
73. Hochbaum, D. R. *et al.* All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins. **11**, 825–833 (2014).
74. Abdelfattah, A. S. *et al.* Bright and photostable chemigenetic indicators for extended in vivo voltage imaging. *Science* **365**, 699–704 (2019).
75. Siegel, M. S. & Isacoff, E. Y. A genetically encoded optical probe of membrane voltage. *Neuron* **19**, 735–741 (1997).
76. Ataka, K. & Pieribone, V. A. A genetically targetable fluorescent probe of channel gating with rapid kinetics. *Biophysical Journal* **82**, 509–516 (2002).
77. Sakai, R., Repunte-Canonigo, V., Raj, C. D. & Knöpfel, T. Design and characterization of a DNA-encoded, voltage-sensitive fluorescent protein. *European Journal of Neuroscience* **13**, 2314–2318 (2001).
78. Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K. & Okamura, Y. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* **435**, 1239–1243 (2005).
79. Kohout, S. C., Ulbrich, M. H., Bell, S. C. & Isacoff, E. Y. Subunit organization and functional transitions in Ci-VSP. *Nature Structural and Molecular Biology* **15**, 106–108 (2008).
80. Dimitrov, D. *et al.* Engineering and characterization of an enhanced fluorescent protein voltage sensor. *PLoS ONE* **2**, e440 (2007).
81. Tsutsui, H., Karasawa, S., Okamura, Y. & Miyawaki, A. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins. *Nature Methods* **5**, 683–685 (2008).
82. Tsutsui, H. *et al.* Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase. *The Journal of Physiology* **591**, 4427–4437 (2013).
83. Akemann, W. *et al.* Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *Journal of Neurophysiology* **108**, 2323–2337 (2012).
84. Jin, L. *et al.* Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe. *Neuron* **75**, 779–785 (2012).
85. Han, Z. *et al.* Mechanistic studies of the genetically encoded fluorescent protein voltage probe ArcLight. *PLoS ONE* **9**, e113873 (2014).
86. Hanson, G. T. *et al.* Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 13044–13053 (2004).
87. Xu, F., Shi, D. Q., Lau, P. M., Lin, M. Z. & Bi, G. Q. Excitation wavelength optimization improves photostability of ASAP-family GEVIs. *Molecular Brain* **11**, 32 (2018).
88. Platasa, J., Vasani, G., Yang, A. & Pieribone, V. A. Directed evolution of key residues in fluorescent protein inverses the polarity of voltage sensitivity in the genetically encoded indicator ArcLight. *ACS Chemical Neuroscience* **8**, 513–523 (2017).
89. Leong, L. M., Kang, B. E. & Baker, B. J. Improving the flexibility of genetically encoded voltage indicators via intermolecular FRET. *Biophysical Journal* **120**, 1927–1941 (2021).

90. Kang, B. E. *et al.* Mechanism of ArcLight derived GEVIs involves electrostatic interactions that can affect proton wires. *Biophysical Journal* **120**, 1916–1926 (2021).
91. Piao, H. H., Rajakumar, D., Kang, B. E., Kim, E. H. & Baker, B. J. Combinatorial mutagenesis of the voltage-sensing domain enables the optical resolution of action potentials firing at 60 Hz by a genetically encoded fluorescent sensor of membrane potential. *Journal of Neuroscience* **35**, 372–385 (2015).
92. Kwon, T., Sakamoto, M., Peterka, D. S. & Yuste, R. Attenuation of synaptic potentials in dendritic spines. *Cell Reports* **20**, 1100–1110 (2017).
93. Bando, Y., Sakamoto, M., Kim, S., Ayzenshtat, I. & Yuste, R. Comparative evaluation of genetically encoded voltage indicators. *Cell Reports* **26**, 802–813.e4 (2019).
94. Li, Q. *et al.* Structural mechanism of voltage-dependent gating in an isolated voltage-sensing domain. *Nature Structural and Molecular Biology* **21**, 244–252 (2014).
95. Royant, A. & Noirclerc-Savoye, M. Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *Journal of Structural Biology* **174**, 385–390 (2011).
96. Campanini, B. *et al.* Role of histidine 148 in stability and dynamics of a highly fluorescent GFP variant. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1834**, 770–779 (2013).
97. St-Pierre, F. *et al.* High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor. *Nature Neuroscience* **17**, 884–889 (2014).
98. Cabantous, S., Terwilliger, T. C. & Waldo, G. S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **23**, 102–107 (2005).
99. Baird, G. S., Zacharias, D. A. & Tsien, R. Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 11241–11246 (1999).
100. Molina, R. S. *et al.* Understanding the fluorescence change in red genetically encoded calcium ion indicators. *Biophysical Journal* **116**, 1873–1886 (2019).
101. Nasu, Y., Shen, Y., Kramer, L. & Campbell, R. E. Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors. *Nature Chemical Biology* **17**, 509–518 (2021).
102. Nagai, T., Sawano, A., Eun Sun Park & Miyawaki, A. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3197–3202 (2001).
103. Villette, V. *et al.* Ultrafast two-photon imaging of a high-gain voltage indicator in awake behaving mice. *Cell* **179**, 1590–1608.e23 (2019).
104. Chamberland, S. *et al.* Fast two-photon imaging of subcellular voltage dynamics in neuronal tissue with genetically encoded indicators. *eLife* **6**, (2017).
105. Yang, H. H. H. *et al.* Subcellular imaging of voltage and calcium signals reveals neural processing in vivo. *Cell* **166**, 245–257 (2016).
106. Lee, E. E. L. & Bezanilla, F. Biophysical characterization of genetically encoded voltage sensor ASAP1: Dynamic range improvement. *Biophysical Journal* **113**, 2178–2181 (2017).

107. Klapperstück, T. *et al.* Calibration procedures for the quantitative determination of membrane potential in human cells using anionic dyes. *Cytometry Part A* **83A**, 612–626 (2013).
108. Gross, E., Bedlack, R. S. & Loew, L. M. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophysical Journal* **67**, 208–216 (1994).
109. Bonzanni, M. *et al.* Defined extracellular ionic solutions to study and manipulate the cellular resting membrane potential. *Biology Open* **9**, (2020).
110. Hou, J. H., Venkatachalam, V. & Cohen, A. E. Temporal dynamics of microbial rhodopsin fluorescence reports absolute membrane voltage. *Biophysical Journal* **106**, 639–648 (2014).
111. Brinks, D., Klein, A. J. & Cohen, A. E. Two-photon lifetime imaging of voltage indicating proteins as a probe of absolute membrane voltage. *Biophysical Journal* **109**, 914–921 (2015).
112. Houston, J. P. *et al.* Overview of fluorescence lifetime measurements in flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* **1678**, 421–446 (2018).
113. Shcherbo, D. *et al.* Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues. *Biochemical Journal* **418**, 567–574 (2009).
114. Shaner, N. C. *et al.* Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567–1572 (2004).
115. Kim, B. B. *et al.* A red fluorescent protein with improved monomericity enables ratiometric voltage imaging with ASAP3. *bioRxiv* 2020.10.09.328922 (2020) doi:10.1101/2020.10.09.328922.
116. Latorre, R. *et al.* Molecular determinants of BK channel functional diversity and functioning. *Physiological Reviews* **97**, 39–87 (2017).
117. Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S. P. & Jonas, P. Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nature Reviews Neuroscience* **13**, 7–21 (2012).
118. Cheng, H., Lederer, W. J. & Cannell, M. B. Calcium sparks: Elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* **262**, 740–744 (1993).
119. Bolton, T. B. & Imaizumi, Y. Spontaneous transient outward currents in smooth muscle cells. *Cell Calcium* **20**, 141–152 (1996).
120. Wu, R. S. & Marx, S. O. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney: α - and β -subunits. *Kidney International* **78**, 963–974 (2010).
121. Tao, X. & Mackinnon, R. Molecular structures of the human Slo1 K⁺ channel in complex with β 4. *eLife* **8**, (2019).
122. Ohi, Y. *et al.* Local Ca²⁺ transients and distribution of BK channels and ryanodine receptors in smooth muscle cells of guinea-pig vas deferens and urinary bladder. *Journal of Physiology* **534**, 313–326 (2001).
123. Horrigan, F. T. & Aldrich, R. W. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *Journal of General Physiology* **120**, 267–305 (2002).

124. Gonzalez-Perez, V. & Lingle, C. J. Regulation of BK channels by beta and gamma subunits. *Annual Review of Physiology* **81**, 113–137 (2019).
125. Vivas, O., Moreno, C. M., Santana, L. F. & Hille, B. Proximal clustering between BK and Cav1.3 channels promotes functional coupling and BK channel activation at low voltage. *eLife* **6**, (2017).
126. Brenner, R. *et al.* Vasoregulation by the β 1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* **407**, 870–876 (2000).
127. Grimm, P. R., Irsik, D. L., Settles, D. C., Holtzclaw, J. D. & Sansom, S. C. Hypertension of *Kcnmb1*^{-/-} is linked to deficient K secretion and aldosteronism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 11800–11805 (2009).
128. Yang, Y. *et al.* Function of BK_{Ca} channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from han chinese patients with hypertension. *Hypertension* **61**, 519–525 (2013).
129. Fernández-Fernández, J. M. *et al.* Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *Journal of Clinical Investigation* **113**, 1032–1039 (2004).
130. Alioua, A. *et al.* The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, hSlo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 32950–32956 (1998).
131. Horrigan, F. T. & Ma, Z. Mg²⁺ enhances voltage sensor/gate coupling in BK channels. *Journal of General Physiology* **131**, 13–32 (2008).
132. Hou, S. *et al.* Zn²⁺ activates large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel via an intracellular domain. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 6434–6442 (2010).
133. Hou, S., Heinemann, S. H. & Hoshi, T. Modulation of BK_{Ca} channel gating by endogenous signaling molecules. *Physiology* **24**, 26–35 (2009).
134. Hou, S., Xu, R., Heinemann, S. H. & Hoshi, T. The RCK1 high-affinity Ca²⁺ sensor confers carbon monoxide sensitivity to Slo1 BK channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 4039–4043 (2008).
135. Leinders, T., van Kleef, R. G. D. M. & Vijverberg, H. P. M. Divalent cations activate small-(SK) and large-conductance (BK) channels in mouse neuroblastoma cells: selective activation of SK channels by cadmium. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **422**, 217–222 (1992).
136. Cui, J., Yang, H. & Lee, U. S. Molecular mechanisms of BK channel activation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 852–875 (2009).
137. Maines, M. D. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**, 517–554 (1997).
138. Williams, S. E. J. *et al.* Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* **306**, 2093–2097 (2004).
139. Zhang, J. *et al.* Glutamate-activated BK channel complexes formed with NMDA receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E9006–E9014 (2018).
140. Hansen, K. B. *et al.* Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors. *Journal of General Physiology* **150**, 1081–1105 (2018).

141. Gómez, R. *et al.* Synaptic plasticity of somatosensory neurons is determined by functional coupling between NMDA receptors and BK channels. *bioRxiv* 2020.12.30.424719 (2020) doi:10.1101/2020.12.30.424719.
142. Booth, D. M., Enyedi, B., Geiszt, M., Várnai, P. & Hajnóczky, G. Redox nanodomains are induced by and control calcium signaling at the ER-mitochondrial interface. *Molecular Cell* **63**, 240–248 (2016).
143. Jackson, P. K. cAMP signaling in nanodomains. *Cell* **182**, 1379–1381 (2020).
144. Kuhn, M. Molecular physiology of membrane guanylyl cyclase receptors. *Physiological Reviews* **96**, 751–804 (2016).
145. Ellis-Davies, G. C. R. Caged compounds: Photorelease technology for control of cellular chemistry and physiology. *Nature Methods* **4**, 619–628 (2007).
146. Ando, H., Furuta, T., Tsien, R. Y. & Okamoto, H. Photo-mediated gene activation using caged RNA/DNA in zebrafish embryos. *Nature Genetics* **28**, 317–325 (2001).
147. Wieboldt, R. *et al.* Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**, 8752–8756 (1994).
148. Kaplan, J. H. & Ellis-Davies, G. C. R. Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations (caged calcium/caged magnesium). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 6571–6575 (1988).
149. Hagen, V. *et al.* Highly efficient and ultrafast phototriggers for cAMP and cGMP by using long-wavelength UV/Vis-activation. *Angewandte Chemie - International Edition* **40**, 1045–1048 (2001).
150. Jayakumar, M. K. G., Idris, N. M. & Zhang, Y. Remote activation of biomolecules in deep tissues using near-infrared-to-UV upconversion nanotransducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8483–8488 (2012).
151. Salierno, M., Marceca, E., Peterka, D. S., Yuste, R. & Etchenique, R. A fast ruthenium polypyridine cage complex photoreleases glutamate with visible or IR light in one and two photon regimes. *Journal of Inorganic Biochemistry* **104**, 418–422 (2010).
152. Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. & Matthews, G. Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. *Nature* **371**, 513–515 (1994).
153. Kretschmer, R., Gessner, G., Görls, H., Heinemann, S. H. & Westerhausen, M. Dicarboxyl-bis(cysteamine)iron(II): A light induced carbon monoxide releasing molecule based on iron (CORM-S1). *Journal of Inorganic Biochemistry* **105**, 6–9 (2011).
154. Wegiel, B., Hanto, D. W. & Otterbein, L. E. The social network of carbon monoxide in medicine. *Trends in Molecular Medicine* **19**, 3–11 (2013).
155. Dubuis, E., Potier, M., Wang, R. & Vandier, C. Continuous inhalation of carbon monoxide attenuates hypoxic pulmonary hypertension development presumably through activation of BK_{Ca} channels. *Cardiovascular Research* **65**, 751–761 (2005).
156. Motterlini, R. *et al.* Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circulation research* **90**, (2002).
157. Mede, R. *et al.* CORM-EDE1: A highly water-soluble and nontoxic manganese-based photoCORM with a biogenic ligand sphere. *Inorganic Chemistry* **55**, 104–113 (2016).

158. Velásquez, V. P. L. *et al.* Derivatives of photosensitive CORM-S1 - CO complexes of iron and ruthenium with the (OC)₂M(S-C-C-NH₂)₂ fragment. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2012**, 1072–1078 (2012).
159. Abeyrathna, N., Washington, K., Bashur, C. & Liao, Y. Nonmetallic carbon monoxide releasing molecules (CORMs). *Organic & Biomolecular Chemistry* **15**, 8692–8699 (2017).
160. Christin Kautz, A., C. Kunz, P. & Christoph Janiak. CO-releasing molecule (CORM) conjugate systems. *Dalton Transactions* **45**, 18045–18063 (2016).
161. Sakla, R. & Jose, D. A. Vesicles functionalized with a CO-releasing molecule for light-induced CO delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **10**, 14214–14220 (2018).
162. Gessner, G. *et al.* CO-independent modification of K⁺ channels by tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer (CORM-2). *European Journal of Pharmacology* **815**, 33–41 (2017).
163. Southam, H. M. *et al.* A thiol-reactive Ru(II) ion, not CO release, underlies the potent antimicrobial and cytotoxic properties of CO-releasing molecule-3. *Redox Biology* **18**, 114–123 (2018).
164. Nielsen, V. G. Ruthenium, not carbon monoxide, inhibits the procoagulant activity of atheris, echis, and pseudonaja venoms. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 2970 (2020).
165. Yuan, Z., Yang, X., Ye, Y., Tripathi, R. & Wang, B. Chemical reactivities of two widely used ruthenium-based CO-releasing molecules with a range of biologically important reagents and molecules. *Analytical Chemistry* **93**, 5317–5326 (2021).
166. Ma, Y., Hinde, E. & Gaus, K. Nanodomains in biological membranes. *Essays in Biochemistry* **57**, 93–107 (2015).
167. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**, 780 (1994).
168. Haase, M. & Schäfer, H. Upconverting nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **50**, 5808–5829 (2011).
169. Cohen, B. E. Biological imaging: Beyond fluorescence. *Nature* **467**, 407–408 (2010).
170. Zhang, K. Y. *et al.* Long-lived emissive probes for time-resolved photoluminescence bioimaging and biosensing. *Chemical Reviews* **118**, 1770–1839 (2018).
171. Bünzli, J.-C. G. Benefiting from the unique properties of lanthanide ions. *Accounts of Chemical Research* **39**, 53–61 (2005).
172. Rühl, P. *et al.* Notes on thermometric artefacts by Er³⁺ luminescence band interference. *Journal of Luminescence* **232**, 117860 (2021).
173. Martins, J. C. *et al.* Primary luminescent nanothermometers for temperature measurements reliability assessment. *Advanced Photonics Research* **2**, 2000169 (2021).
174. Zhu, X. *et al.* Temperature-feedback upconversion nanocomposite for accurate photothermal therapy at facile temperature. *Nature Communications* **7**, 1–10 (2016).
175. Dong, B. *et al.* Multifunctional NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺@Ag core/shell nanocomposites: integration of upconversion imaging and photothermal therapy. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 6193–6200 (2011).

176. Wang, Z., Hu, M., Ai, X., Zhang, Z. & Xing, B. Near-infrared manipulation of membrane ion channels via upconversion optogenetics. *Advanced Biosystems* **3**, 1800233 (2019).
177. He, L. *et al.* Near-infrared photoactivatable control of Ca²⁺ signaling and optogenetic immunomodulation. *eLife* **4**, (2015).
178. Ma, Y. *et al.* Mammalian near-infrared image vision through injectable and self-powered retinal nanoantennae. *Cell* **177**, 243-255.e15 (2019).
179. Drees, C. *et al.* Engineered upconversion nanoparticles for resolving protein interactions inside living cells. *Angewandte Chemie International Edition* **55**, 11668–11672 (2016).
180. Opoku-Damoah, Y. *et al.* Lipid-encapsulated upconversion nanoparticle for near-infrared light-mediated carbon monoxide release for cancer gas therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **158**, 211–221 (2021).
181. Subach, F. V. *et al.* Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy. *Nature Methods* **6**, 153–159 (2009).
182. Chudakov, D. M., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nature Protocols* **2**, 2024–2032 (2007).
183. Gurskaya, N. G. *et al.* Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nature Biotechnology* **24**, 461–465 (2006).
184. Ando, R., Mizuno, H. & Miyawaki, A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science* **306**, 1370–1373 (2004).
185. Adam, V., Nienhaus, K., Bourgeois, D. & Nienhaus, G. U. Structural basis of enhanced photoconversion yield in green fluorescent protein-like protein Dendra2. *Biochemistry* **48**, 4905–4915 (2009).
186. Turkowyd, B. *et al.* A general mechanism of photoconversion of green-to-red fluorescent proteins based on blue and infrared light reduces phototoxicity in live-cell single-molecule imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 11634–11639 (2017).
187. Rühl, P. *et al.* Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators. *Communications Biology* **4**, 1–11 (2021).
188. Gessner, G., Rühl, P., Westerhausen, M., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Fe²⁺-mediated activation of BK_{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe²⁺. *ACS Chemical Biology* **15**, 2098–2106 (2020).
189. Drees, C. *et al.* Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles. *Nano Letters* **21**, 8025–8034 (2021).
190. Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels. *Physiological Reviews* **80**, 555–592 (2000).
191. Lacroix, J. J. & Bezanilla, F. Tuning the voltage-sensor motion with a single residue. *Biophysical Journal* **103**, L23–L25 (2012).
192. Chen, X., Wang, Q., Ni, F. & Ma, J. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11352–11357 (2010).

193. Katayama, H., Yamamoto, A., Mizushima, N., Yoshimori, T. & Miyawaki, A. GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes. *Cell Structure and Function* **33**, 1–12 (2008).
194. Cranfill, P. J. *et al.* Quantitative assessment of fluorescent proteins. *Nature Methods* **13**, 557–562 (2016).
195. Costantini, L. M., Fossati, M., Francolini, M. & Snapp, E. L. Assessing the tendency of fluorescent proteins to oligomerize under physiologic conditions. *Traffic* **13**, 643–649 (2012).
196. Adhikamsetty, R. K., Gollapalli, N. R. & Jonnalagadda, S. B. Complexation kinetics of Fe²⁺ with 1,10-phenanthroline forming ferrioxalate in acidic solutions. *International Journal of Chemical Kinetics* **40**, 515–523 (2008).
197. Komal, P., Evans, G. & Nashmi, R. A rapid agonist application system for fast activation of ligand-gated ion channels. *Journal of Neuroscience Methods* **198**, 246–254 (2011).
198. Battaglia, A. M. *et al.* Ferroptosis and cancer: Mitochondria meet the “Iron Maiden” cell death. *Cells* **9**, 1505 (2020).
199. Hider, R. C. & Kong, X. Iron speciation in the cytosol: An overview. *Dalton Transactions* **42**, 3220–3229 (2013).
200. Hider, R. C. & Kong, X. L. Glutathione: A key component of the cytoplasmic labile iron pool. *BioMetals* **24**, 1179–1187 (2011).
201. Dong, H., Smith, A., Hovaida, M. & Chow, J. Y. Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in duodenal mucosal ion transport and bicarbonate secretion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* **291**, G1120–G1128 (2006).
202. Wang, D. *et al.* A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular Systems Biology* **15**, e8503 (2019).
203. Ohgami, R. S., Campagna, D. R., McDonald, A. & Fleming, M. D. The Steap proteins are metallo-reductases. *Blood* **108**, 1388–1394 (2006).
204. Bordini, J. *et al.* Iron induces cell death and strengthens the efficacy of antiandrogen therapy in prostate cancer models. *Clinical Cancer Research* **26**, 6387–6398 (2020).
205. Panayotova-Heiermann, M., Loo, D. D. F. & Wright, E. M. Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 27099–27105 (1995).
206. Potter, M., Newport, E. & Morten, K. J. The Warburg effect: 80 years on. *Biochemical Society Transactions* **44**, 1499–1505 (2016).
207. Ding, B. *et al.* Large-pore mesoporous-silica-coated upconversion nanoparticles as multifunctional immunoadjuvants with ultrahigh photosensitizer and antigen loading efficiency for improved cancer photodynamic immunotherapy. *Advanced Materials* **30**, 1802479 (2018).

Abkürzungsverzeichnis

ASAP	<i>Accelerated sensor of action potentials</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav	Spannungsgesteuerter Ca ²⁺ -Kanal
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI	<i>Ciona intestinalis</i>
CORM	CO-freisetzendes Molekül
CORM-S1	Dicarbonyl-Biscysteamin-Eisen(II)
cpGFP	Zirkulär permutiertes, grünfluoreszierendes Protein
Cro	Chromophor
Dcytb	Duodenale Cytochrom-b Reduktase
DMT1	Divalenter Metallionentransporter 1
EC ₅₀	Konzentration halbmaximaler Aktivität
ETU	<i>Energy transfer upconversion</i>
F	Fluoreszenzintensität
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FERM	Fe ²⁺ -freisetzendes Molekül
F _{grün}	Grünfluoreszenz
FLIM	<i>Fluorescence lifetime imaging</i>
FLIPR	<i>Fluorescent imaging plate reader</i>
FP	Fluoreszenzprotein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
F _{rot}	Rotfluoreszenz
GEVI	Genetisch codierter Spannungsindikator
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GG	<i>Gallus gallus</i>
HEK293	<i>Human embryonic kidney cells 293</i>
HO2	Hämoxygenase 2
IP ₃ R	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
k _b	Boltzmann-Konstante

K _{Ca}	Ca ²⁺ -gesteuerter Kaliumkanal
k _d	Dissoziationskonstante
K _{ir}	Einwärtsrichtender Kaliumkanal
k _{pc}	Photokonversionsrate
k _s	Steigungsfaktor
K _v	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
NIR	Nahes Infrarot
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
OSER	<i>Organized smooth ER</i>
P	Permeabilität
paFP	Photoaktivierbares Fluoreszenzprotein
PALM	<i>Photo activated localization microscopy</i>
PCBP2	<i>Poly(rC)-binding protein</i>
pcFP	Photokonvertierbares Fluoreszenzprotein
psFP	Photoschaltbares Fluoreszenzprotein
rArc	Ratiometrisches ArcLight-Q239
rASAP	Ratiometrisches ASAP
rASAP-al	Ratiometrisches ASAP mit alternativem Linker
R _{gr}	F _{grün} /F _{rot}
R _{max}	Maximales R _{gr}
RyR	Ryanodin-Rezeptor
S	Transmembransegment
sePhluorin	<i>Super ecliptic Phluorin</i>
SGLT1	Natrium-D-Glukose-Kotransporter
STEAP	<i>Six-transmembrane epithelial antigen of prostate</i>
STORM	<i>Stochastic optical reconstruction microscopy</i>
UCNP	Aufwärtskonvertierender Nanopartikel
UV	Ultraviolett
V _{halb}	Spannung der halbmaximalen Fluoreszenzänderung

VIS	Sichtbar
V_m	Membranpotential
V_{Ruhe}	Ruhemembranpotential
VSD	Spannungssensitive Domäne
VSP	Spannungssensitive Phosphatase
ΔE	Energiedifferenz
Δr	Relative Änderung von R_{max}
ΔV_{halb}	Änderung von V_{halb}

Publikationsliste

Rühl, P., Langner, J. M., Reidel, J., Schönherr, R., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators. *Communications Biology* 2021 **4**, 1–11 (2021).

Drees, C., **Rühl, P.**, Bajorath, J., Czerny, J., Chandra, G., Haase, M., Heinemann, S. H. & Piehler, J. Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles. *Nano Letters* **21**, 8025–8034 (2021).

Rühl, P., Wang, D., Garwe, F., Müller, R., Haase, M., Krämer, K.W., Paa, W., Heintzmann, R., Heinemann, S. H. and Stafast, H. Notes on thermometric artefacts by Er^{3+} luminescence band interference. *Journal of Luminescence* **232**, 117860 (2021).

Gessner, G., **Rühl, P.**, Westerhausen, M., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Fe^{2+} -mediated activation of BK_{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe^{2+} . *ACS Chemical Biology* **15**, 2098–2106 (2020).

Ojha, N. K., Jin, J., Arifin, J. C., **Rühl, P.** & Heinemann, S. H. Membrane potential manipulation with visible flash lamp illumination of targeted microbeads. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **517**, (2019).

Posterpräsentationen

rArc - a ratiometric genetically encoded voltage indicator, The 6th Symposium of the Young Physiologists, 28-29. September 2017, Jena

rArc - Ratiometric genetically-encoded voltage indicators, Europhysiology 2018, 14-16. September 2018, London, Großbritannien

Vorträge

Brief intro to BK and nanoparticles, 6th HHDP Retreat, 26-28. September 2016, Dresden

BK stimulation with upconverting nanomaterials, 7th HHDP Retreat, 17-20. September 2017, Bonn

BK_{Ca} channels and iron, 28th HHDP Workshop, 26. Januar 2018, Jena

Eigenanteil Manuskript Nr. 1

Rühl, P., Langner, J. M., Reidel, J., Schönherr, R., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Monitoring of compound resting membrane potentials of cell cultures with ratiometric genetically encoded voltage indicators. *Communications Biology* 2021 **4**, 1–11 (2021).

Beitrag des Doktoranden zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben.

Abbildungen 1-5 SI 1, 4-12	<input checked="" type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
Abbildung SI 3	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 80% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Die molekularbiologische Konstruktion der in der Abbildung verwendeten Spannungssensorproteine wurde zu 2/3 vom Kandidaten durchgeführt. Teilabbildung SI 2, b-d entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat durchgeführt hat.</i>
Abbildung SI 2	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 20% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Die Analyse der Daten wurden vom Kandidaten durchgeführt. Die Daten wurden vollständig von Johanna Langner aufgenommen.</i>

Eigenanteil Manuskript Nr. 2

Gessner, G., Rühl, P., Westerhausen, M., Hoshi, T. & Heinemann, S. H. Fe²⁺-mediated activation of BK_{Ca} channels by rapid photolysis of CORM-S1 releasing CO and Fe²⁺. *ACS Chemical Biology* **15**, 2098–2106 (2020).

Beitrag des Doktoranden zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben.

Abbildungen 6 SI 3	<input checked="" type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
Abbildung 1	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 50% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Teilabbildungen c, d entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat durchgeführt hat.</i>
Abbildung 2-5 SI 1, 2, 4-6	<input checked="" type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)

Eigenanteil Manuskript Nr. 3

Drees, C., Rühl, P., Bajorath, J., Czerny, J., Chandra, G., Haase, M., Heinemann, S. H. & Piehler, J. Diffraction-unlimited photomanipulation at the plasma membrane via specifically targeted upconversion nanoparticles. *Nano Letters* **21**, 8025–8034 (2021).

Beitrag des Doktoranden zu Abbildungen, die experimentelle Daten wiedergeben.

Abbildungen SI 8, 9, 20	<input checked="" type="checkbox"/>	100% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten entstammen vollständig experimentellen Arbeiten, die der Kandidat/die Kandidatin durchgeführt hat)
Abbildung 5 SI 21	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 75% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Molekularbiologie sowie Konzeption der Experimente und Datenauswertung wurden vollständig vom Kandidaten durchgeführt. Die Datenaufnahme wurde zu 50% vom Kandidaten durchgeführt. Replikate der Experimente wurden von Gemini Chandra aufgenommen.</i>
Abbildung 1	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 33% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Das Konzept wurde vom Kandidaten mitentwickelt. Die Abbildung wurde von Christoph Drees erstellt.</i>
Abbildung S1	<input checked="" type="checkbox"/>	Etwaiger Beitrag des Doktoranden / der Doktorandin zur Abbildung: 33% Kurzbeschreibung des Beitrages: <i>Ein vergleichbarer Mikroskopaufbau wurde vom Kandidaten entwickelt. Die Abbildung wurde von Christoph Drees erstellt.</i>
Abbildung 2-4 SI 2-7, 10-19, 21	<input checked="" type="checkbox"/>	0% (die in dieser Abbildung wiedergegebenen Daten basieren ausschließlich auf Arbeiten anderer Koautoren)

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan H. Heinemann für die langjährige kompetente Betreuung und für die kreative Freiheit, die mir bei der Bearbeitung meiner Arbeit gewährt wurde. Ich bedanke mich bei PD Dr. Roland Schönherr, der sich als Zweitbetreuer zur Verfügung gestellt hat und mich bei allen Projekten unterstützt hat. Insbesondere danke ich Dr. Guido Gessner sowie Dr. Christoph Drees, die beide maßgeblich für den Erfolg unserer gemeinsamen Projekte verantwortlich sind. Ich bedanke mich bei Gemini Chandra, Jasmin Reidel und Dr. Johanna M. Langner sowie allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die direkt oder indirekt an dieser Arbeit mitgewirkt haben. Zum Schluss danke ich meiner Freundin Anna, meinen Eltern, meiner Schwester sowie meinen Freunden und dem Rest meiner Familie, die mich auf meiner jahrelangen, akademischen Reise bis zu diesem Punkt begleitet und unterstützt haben.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich, gemäß § 5 Abs. 1, Nr. 4 der Promotionsordnung der Fakultät für Biowissenschaften der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom 23. September 2019, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, kenntlich gemacht sind und die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung war.

_____ Jena, 27.10.2021

Philipp Rühl