

## Methoden der Mikroskopie

# Single-particle tracking von GPCRs

SEBASTIAN FRANKEN<sup>1</sup>, HENDRIK BUSSMANN<sup>1</sup>, HANNS HÄBERLEIN<sup>1</sup>, ERIK BONKE<sup>2</sup>, CAROLINE END<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, MEDIZINISCHE FAKULTÄT, UNIVERSITÄT BONN

<sup>2</sup> PROMEGA GMBH, WALLDORF

**Single-particle tracking (SPT) is a method of high-resolution microscopy to investigate the dynamics of single molecules inside cells or on the cell surface. Here we describe for the first time the applicability of the HiBiT Protein Tagging System combined with the HaloTag<sup>®</sup> self-labeling protein technology for monitoring the lateral diffusion of a pharmacological relevant G protein-coupled receptor (GPCR) by SPT.**

DOI: 10.1007/s12268-020-1400-8  
© Promega GmbH 2020

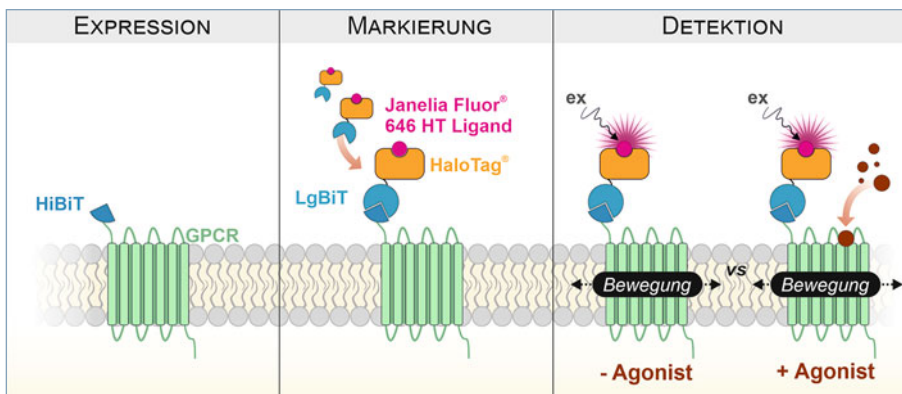
Die laterale Diffusion eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) in der Plasmamembran bestimmt seine Interaktionsfähigkeit mit nachgeschalteten Signalmolekülen und moduliert in kritischem Maße seine Funktion [1]. Die Einzelpartikelverfolgung (*single-particle tracking*, SPT) in lebenden Zellen ist ein Schlüsselansatz, um die Funktion eines GPCRs in seiner natürlichen Umgebung direkt zu untersuchen. Mittels SPT werden detaillierte Informationen über die Rezeptorbeweglichkeit gewonnen, die insbesondere für die Beurteilung der pharmakolo-

gischen Wirksamkeit von potenziellen Wirkstoffen von Interesse sind. Üblicherweise werden für die SPT-Messung Rezeptoren in Fusion mit einem fluoreszenten Protein-Tag überexprimiert. Die Überexpression der markierten Rezeptoren in Kombination mit hochmolekularen Protein-Tags führt jedoch teilweise schon zur Rezeptoraggregation, was sich negativ auf SPT-Messungen auswirken kann. Zur Umgehung dieser Problematik haben wir im Rahmen einer Machbarkeitsstudie eine andere Nachweismethode basierend auf dem HiBiT-Protein-Tagging-System

[2] und der HaloTag-*self-labeling protein*-Technologie [3] auf ihre Eignung für das SPT am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors getestet.

### Das HiBiT-HaloTag-System

HiBiT ist ein neuer, elf Aminosäuren langer Peptid-Tag, der zur Markierung von Proteinen für den Aufbau von sensitiven, biolumineszenten Proteinreporterassays eingesetzt wird. Der Nachweis erfolgt durch ein komplementäres Proteinfragment, Large BiT (LgBiT), das mit sehr hoher Affinität ( $K_D = 700$  pM) an das HiBiT-Peptid bindet. Durch die Komplementation HiBiT:LgBiT entsteht die enzymatische Aktivität einer Luciferase, die sich allerdings nicht direkt für SPT-Messungen nutzen lässt [2]. Jedoch stellt die Kombination des hochaffinen Detektionsprinzips des HiBiT durch LgBiT mit der fluoreszenten HaloTag-Technologie [3] eine Möglichkeit dar, den kleinen Peptid-Tag für die Rezeptorbewegung mittels SPT zu nutzen. Dafür wird ein aufgereinigtes LgBiT-HaloTag-Fusionsprotein in Kombination mit einem sehr hellen, fluoreszenten und photostabilen HaloTag-Liganden (Janelia Dye) verwendet (Abb. 1). Der fluoreszente Ligand bindet kovalent das HaloTag-Protein und ist geeignet für die hochauflösende Mikroskopie [4].



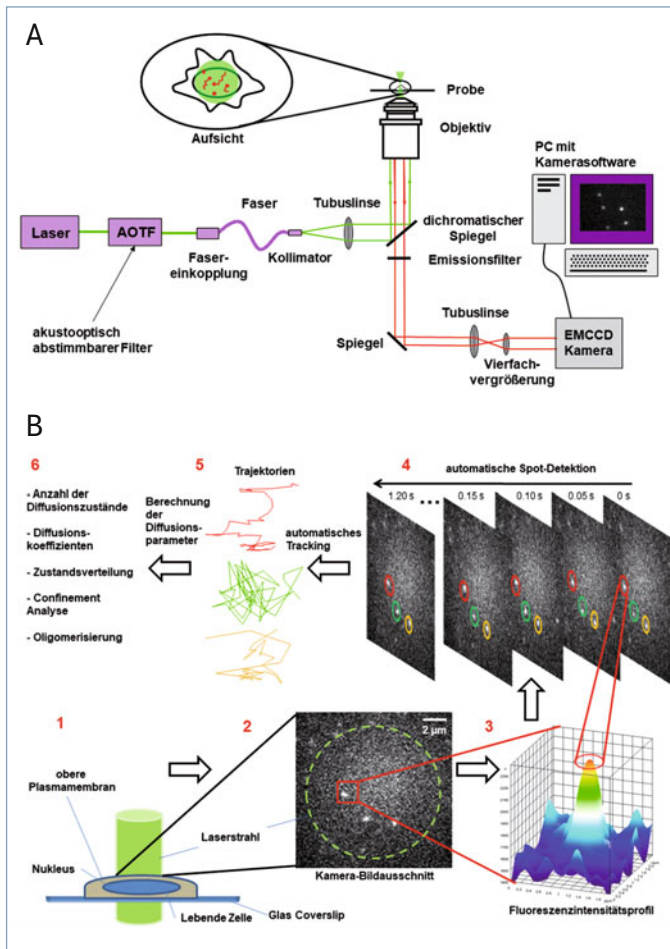
**▲ Abb. 1:** Messung der lateralen Diffusion HiBiT-markierter G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) mittels *single-particle tracking* (SPT). Der N-terminal markierte Rezeptor wird an der Zelloberfläche exprimiert und mit aufgereinigtem LgBiT-HaloTag<sup>®</sup>-Fusionsprotein und fluoreszentem HaloTag-Liganden (Janelia Fluor<sup>®</sup> 646) markiert. Der HaloTag-Ligand wird mit einem Laser angeregt (ex). Die Diffusionseigenschaften des Rezeptors werden mittels SPT bestimmt.

### Experimenteller Aufbau des *single-particle tracking*

Die Anwendbarkeit des HiBiT-HaloTag-Systems für das SPT wurde anhand des humanen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in einer Säugerzelllinie in An- und Abwesenheit des Wirkstoffs Isoprenalin nachgewiesen. Die auf der Oberseite der Plasmamembran detektierten fluoreszenten Partikel wurden automatisch detektiert und von Bild zu Bild zu Trajektorien verbunden (Abb. 2).

### Auswertung eines SPT-Experiments

In dem analysierten Zellmodell lassen sich drei Diffusionszustände (S1–S3) diskriminieren, die sich durch ihre Diffusionskoeffizienten, die Anteile der Rezeptoren und die Übergangswahrscheinlichkeiten zu anderen Zuständen unterscheiden (Abb. 3). Durch die



**Abb. 2:** Experimenteller Aufbau des *single-particle tracking* (SPT). **A**, Aufbau des SPT-Mikroskops. **B**, Experimentelle Abfolge. Fluorophore auf der Zellmembran werden durch einen Laser angeregt und durch eine Kamera detektiert (1, 2). Die Fluorophore werden anhand ihres Intensitätsprofils durch eine Software automatisch lokalisiert (3, 4). Die Positionen werden zu Trajektorien verbunden, aus denen die Diffusionseigenschaften bestimmt werden (5, 6).

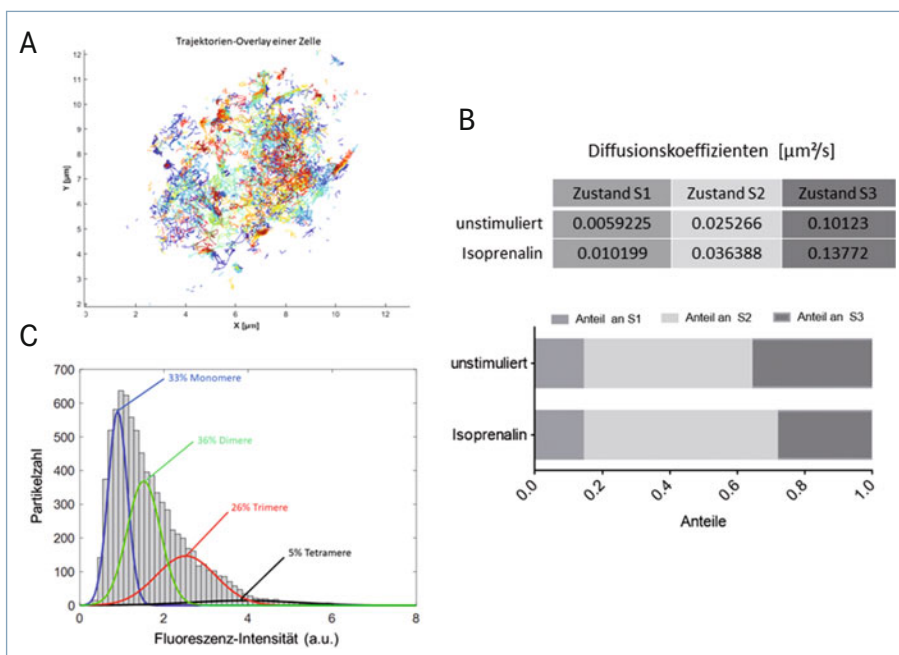
Isoprenalin-Stimulation erhöhen sich die Diffusionskoeffizienten leicht in allen Diffusionszuständen. Ebenso verringert sich der Anteil der Rezeptoren im Zustand S3 zugunsten von S2 (**Abb. 3B**). Das bedeutet, dass sich ein größerer Anteil der Rezeptoren in einem Zustand der langsameren Diffusion befindet. Darüber hinaus lässt sich anhand der Fluoreszenzintensität auf die Existenz von Monomeren bis hin zu Tetrameren schließen (**Abb. 3C**).

### Schlussfolgerung und Ausblick

Die Kombination HiBiT-HaloTag eignet sich für die Untersuchung von Pharmazeutika auf der Ebene von einzelnen Rezeptoren. Dies zeigen insbesondere die erzielten Tracklängen von ungefähr 14 Bildfolgen und entsprechende Werte, die üblicherweise auch durch Fusionsrezeptoren mit hochmolekularen fluoreszenten Protein-Tags gewonnen werden. Gegenüber diesen hat die HiBiT-HaloTag-Kombination den Vorteil, dass der Rezeptor im ersten Schritt nur mit einem Tag geringer Größe exprimiert wird. Die geringe Größe des HiBiT-Tags vereinfacht darüber hinaus die Anwendung in Kombination mit Techniken wie CRISPR zur Markierung von Rezeptoren auf Genomebene [2].

### Literatur

- [1] Snaar-Jagalska BE, Cambi A, Schmidt T et al. (2013) Single-molecule imaging technique to study the dynamic regulation of GPCR function at the plasma membrane. *Methods Enzymol* 521:47–67
- [2] Schwinn MK, Machleidt T, Zimmerman K et al. (2018) CRISPR-mediated tagging of endogenous proteins with a luminescent peptide. *ACS Chem Biol* 13:467–474
- [3] Benink HA, Uhr M (2015) HaloTag technology for specific and covalent labeling of fusion proteins. *Methods Mol Biol* 1266:119–128
- [4] Erdmann RS, Baguley SW, Richens JH et al. (2019) Labeling strategies matter for super-resolution microscopy: a comparison between HaloTags and SNAP-tags. *Cell Chem Biol* 26:584–592.e6
- [5] Persson F, Lindén M, Unoson C et al. (2013) Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nat Methods* 10:265–269



**Abb. 3:** Auswertung eines *single particle tracking* (SPT)-Experiments. Aus den unterschiedlichen Trajektorien (**A**) können die Diffusionszeiten und die Anteile an den verschiedenen Zuständen der Rezeptoren (**B**) sowie der Grad der Oligomerisierung berechnet werden (**C**). Zur Berechnung von Diffusionszuständen fand das vbSPT-Paket von Persson *et al.* Anwendung [5].

### Korrespondenzadressen:

Dr. Sebastian Franken  
 Institut für Biochemie und Molekularbiologie (IBMB)  
 Molekulare Wirkstoffforschung  
 Universität Bonn  
 Nussallee 11  
 D-53115 Bonn  
 sfranken@uni-bonn.de

Dr. Caroline End  
 Promega GmbH  
 Gutenbergring 1  
 D-69190 Walldorf  
 Caroline.end@promega.com