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

> vorgelegt von Dipl.-Phys. Jessica Balbo aus Hemer

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2012

Transportprozesse und molekulare Wechselwirkungen: Untersuchungen biologischer Systeme mittels Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden

> Gutachter: Prof. Dr. Bernd Jähne PD Dr. Dirk-Peter Herten

## Zusammenfassung

Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurde eine Fülle detaillierter Bauanleitungen von Proteinen - den Grundbausteinen des Lebens - bekannt. Um dynamische Prozesse, wie Transportvorgänge und molekulare Wechselwirkungen, in lebenden Zellen zu untersuchen, muss aber auf andere Techniken als die der klassischen Biochemie zurückgegriffen werden. In jüngerer Zeit haben sich hierbei vor allem Methoden der Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie als wegweisend herausgestellt.

Ein wichtiger Transportmechanismus in Zellen ist die Diffusion, die durch Größe, Form, Ladung und durch die hohe Konzentration der beteiligten Proteine beeinflusst wird. Zum besseren Verständnis dieser Einflüsse wurde in dieser Arbeit die Diffusion von Proteinen bei physiologischen Proteinkonzentrationen mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht. Der Vergleich der gemessenen Diffusionskoeffizienten mit Simulationen legt nahe, dass spezifische Proteinstrukturen für abweichendes Verhalten unterschiedlicher Proteinlösungen ausschlaggebend sind. Diese Arbeit liefert Ansätze für eine systematische Studie der beteiligten Parameter zum besseren Verständnis der molekularen Wechselwirkungen in lebenden Zellen.

Neben der Diffusion von Proteinen im Zytoplasma wurde auch die Mobilität von Membranproteinen, die für die zelluläre Reaktion auf äußere Einflüsse wichtig sind, in Pflanzenzellen untersucht. Die gemessenen Diffusionskoeffizienten des Kalium-Kanals KAT1 kann ich durch die Existenz von Mikrodomänen erklären. Die Beweglichkeit in der Plasmamembran lässt sich mit Lipiden vergleichen.

Außerdem wurde eine neue Methode zur Charakterisierung der Proteinhülle von Transportvesikeln entwickelt, die, im Gegensatz zum stochastischen Markierungsansatz über Immunogoldpartikel, die auftretenden Isoformen spektral unterscheiden kann. Zur Analyse der Zusammensetzung wurde eine Kolokalisationsanalyse mit alternierender Laseranregung kombiniert. Mein Methodenansatz liefert damit einen neuen Anstoß zur quantitativen Untersuchung der Proteinbeladung von Vesikeln.

## Abstract

A vast amount of detailed building instructions for proteins - the basic modules of life - have been discovered by sequencing of the human genome. Nevertheless, one has to use approaches different from those of classical biochemistry to gain information on dynamic processes in living cells, e.g. transport processes and molecular interactions. Single-molecule spectroscopy methods have recently shown the ability to answer questions in this field.

Diffusion is one of the most important mechanisms of transport in cells. Parameters such as size, shape, charge and high concentrations of macromolecules affect diffusion. To further understand these influences, the diffusional behavior of several proteins was measured at physiological protein concentrations using fluorescence correlation spectroscopy. A comparison of the measured diffusion-times with simulations leads to the assumption that the specific shape of the proteins is crucial for diffusion in crowded solutions. This thesis provides an approach to systematically study the parameters that influence molecular interactions in living cells.

In addition to studying diffusion in the cytoplasm, I investigated the mobility of membraneproteins. This class of proteins is important for the mediation of cellular responses upon external stimuli. The diffusion coefficients that I measured for the potassium channel KAT1 can be explained by the occurrence of microdomains and are in the range of lipid mobility.

Furthermore, a new method that enables the characterization of the protein-coat of transport vesicles was developed. In contrast to stochastic labelling methods, e.g. immunogold labeling, it is now possible to spectrally distinguish different isoforms. A combination of alternating-laser excitation with colocalization analysis provides the opportunity to quantitatively analyze the protein-composition in the coat of vesicles.

# Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Einleitung         1.1. Motivation         1.2. Wissenschaftlicher Kontext         1.3. Perspektive	<b>3</b> 3 7
2.	Übersicht und Grundlagen2.1. Diffusion	<ol> <li>11</li> <li>11</li> <li>12</li> <li>14</li> <li>14</li> <li>16</li> <li>17</li> <li>18</li> <li>20</li> <li>22</li> <li>28</li> </ol>
II.	Molecular Crowding	31
3.	Experimenteller Teil und Methoden         3.1. Experimenteller Aufbau         3.2. Datenanalyse         3.3. Modellbeschreibung         3.4. Material         3.4.1. Probenvorbereitung         3.4.2. Proteinstukturen         3.5. Vorarbeiten: Charakterisierung des Messsytems im Vergleich zum Dual-Fokus FCS Systems         3.5.1. Experimentelle Vorarbeiten         3.5.2. Diskussion Vorarbeiten	<b>35</b> 35 37 38 39 39 40 41 41 41 42

	4.4. Vergleich mit modellierten Daten	50
5.	Diskussion	53
111	I. Diffusion von KAT1::GFP in der Plasmamembran von Tabakzel- len	57
6.	Experimenteller Teil und Methoden6.1. Pflanzenproben	<b>61</b> 61 62 63 64
7.	Ergebnisse         7.1. Vorarbeiten         7.1.1. Autofluoreszenz         7.1.2. Zytosolisches GFP         7.2. Membrandiffusion des KAT1::GFP	<b>65</b> 65 65 67 67
8.	Diskussion	73
IV	I. Untersuchung der Zusammensetzung von COPI-Vesikeln anhand zweier Coatomer Isotypen	77
IV 9.	/. Untersuchung der Zusammensetzung von COPI-Vesikeln anhand zweier Coatomer Isotypen         Experimenteller Teil und Methoden         9.1. Experiemteller Aufbau         9.2. Datenanalyse         9.3. Datendarstellung: ES-Hisogramme         9.4. Probenherstellung und Markierung         9.5. Probenvorbereitung und Systemeinstellungen         9.5.1. COPI-Vesikel         9.5.2. Kalibrierung mit multispektralen Nanokugeln	<b>77 81</b> 81 82 85 85 85 85 86 86
I∨ 9. 10	<ul> <li>V. Untersuchung der Zusammensetzung von COPI-Vesikeln anhand zweier Coatomer Isotypen</li> <li>Experimenteller Teil und Methoden</li> <li>9.1. Experiemteller Aufbau</li> <li>9.2. Datenanalyse</li> <li>9.3. Datendarstellung: ES-Hisogramme</li> <li>9.4. Probenherstellung und Markierung</li> <li>9.5. Probenvorbereitung und Systemeinstellungen</li> <li>9.5.1. COPI-Vesikel</li> <li>9.5.2. Kalibrierung mit multispektralen Nanokugeln</li> <li>9.6. Puffer</li> <li>9.6. Puffer</li> <li>9.7. Untersuchung homogener Vesikel mit jeweils einem markierten Isotypen</li> <li>9.8. Hintergrund und Artefakte</li> <li>9.9.4. Vesikel mit gemischten Isotypen</li> <li>9.9.5. Probenvorbereiteller Aufbau</li> <li>9.6. Puffer</li> <li>9.7. Probender Problem Problem</li></ul>	<ul> <li>77</li> <li>81</li> <li>82</li> <li>85</li> <li>85</li> <li>85</li> <li>86</li> <li>86</li> <li>87</li> <li>87</li> <li>87</li> <li>88</li> <li>90</li> <li>93</li> </ul>

V. Zusammenfassung und Ausblick	101
12. Zusammenfassung und Ausblick	103
12.1. Molecular Crowding	103
12.1.1. Zusammenfassung	103
12.1.2. Ausblick	104
12.2. Membran Diffusion	104
12.2.1. Zusammenfassung	104
12.2.2. Ausblick	105
12.3. Coatomer	106
12.3.1. Zusammenfassung	106
12.3.2. Ausblick	106
Appendizes	107

Teil I. Einleitung

## 1. Einleitung

### 1.1. Motivation

Die Zelle wird gerne als "Fabrik" des Lebens bezeichnet [1]. Wie in der Industrie ist auch hier eine reibungslose Logistik nötig, damit sowohl die Zulieferung des Nachschubs von außen, als auch die Belieferung der unterschiedlichen Abteilungen mit Baustoffen und Verbrauchsmaterial funktionieren. In der Zelle entspricht dies den Transportprozessen von großen Biomolekülen, wie Proteinen, Enzymen und Ribonukleinsäuren (RNA), sowie kleiner Moleküle wie Sauerstoff und Ionen, die in und zwischen unterschiedlichen Kompartimenten transportiert werden. Durch den Transport und die Wechselwirkung dieser Moleküle innerhalb der Zelle entsteht eine komplexe Maschinerie, die sich auf zellulärer und subzellulärer Ebene abspielt. Die Herausforderung der modernen Wissenschaft besteht darin diese Transportmechanismen und Wechselwirkungen zu verstehen um zum Beispiel nachvollziehen zu können wie und wo Medikamente wirken: Wie werden sie aufgenommen? Wohin werden Wirkstoffe gebracht? Welche Wirkung entfalten sie? Um diese komplexen Interaktionen zu verstehen, ist zunächst ein grundlegendes Wissen über die Transportprozesse und Wechselwirkungen in biologischen Systemen nötig. Gentechnische und mikroskopische Entwicklungen ermöglichen es heute, die Zelle auf molekularer Ebene zu untersuchen. Fragestellungen über die Wechselwirkung einzelner Moleküle miteinander oder Transportprozesse auf mikroskopischen Längenskalen sind heute typisch in der Biologie. Physikalische Techniken und Konzepte erlauben es auch biologische Prozesse zu beschreiben um zu versuchen diese Fragen zu beantworten. Damit hat sich die Biologie zu einem interessanten und interdisziplinären Forschungsfeld entwickelt.

### 1.2. Wissenschaftlicher Kontext

Um ein zufriedenstellendes Verständnis eines komplexen biologischen Systems zu erreichen, muss ein breites Spektrum konzeptioneller und experimenteller Werkzeuge aus unterschiedlichen Bereichen der Lebens- und Naturwissenschaften angewendet werden.

Der Erkenntisfortschritt auf dem Gebiet der Gentechnik bildet die Grundlage zur Aufschlüsslung der Bestandteile lebender Organismen und damit zur Identifizierung und Chrakterisierung von Systemkomponenten.

Die enormen Forschungsanstrengungen um das Genom mehrerer Organismen zu entschlüsseln führen zu einer Fülle von Gen-Sequenzdaten [2–4]. Damit erhält man Informationen über ein Genprodukt, die zum Beispiel einem Protein zugeordnet werden können. Sind diese Genprodukte identifiziert, lassen sich so unter anderem Expressionsmuster für die Synthese von Proteinen ableiten [5]. Zusätzlich ermöglichen Entwicklungen in der Mikroskopie einen bis dato noch nie da gewesenen Einblick in Strukturen biologischer Systeme und bringen so neue Informationen über ihre Zusammensetzung und Bestandteile.

Dass die wässrige Phase des Zytoplasmas von Zellen beispielsweise mit einer Vielzahl von Makromolekülen besetzt ist [6, 7], kann nicht direkt über ein Lichtmikroskop erkannt werden. Für einen direkten Beweis für diesen überfüllten Zustand kann aber die Technik der Kryoelektronentomographie genutzt werden [8, 9], bei der dünne, intakte Zellen sehr schnell durch Eintauchen in flüssiges Ethan eingefroren werden. Mit einem Elektronenmikroskop werden anschließend viele Bilder dieser Zellen über einen weiten Bereich von unterschiedlichen Neigungswinkeln aufgenommen. Über ein Computer-Programm können danach dreidimensionale Bilder mit einer Auflösung von  $(4 - 6) \cdot 10^{-9}$  m rekonstruiert werden. Damit lassen sich die Zellmembran, Aktin-Filamente (Teile des zellulären "Skeletts") und Proteinkomplexe, wie Ribosomen (Protein-Herstellungs Maschinen), auflösen [6].

#### Molecular Crowding

Verdrängungen und Volumenausschlüsse durch Hintergrundmoleküle (sogenannte crowder) beeinflussen die Stabilität, die Faltung und die Aggregation von Proteinen [10–18]. Der Effekt des Molecular Crowding ist daher ein aktueller und viel diskutierter Aspekt [19–33], wenn es darum geht in vitro Experimente mit Messungen in lebenden Zellen zu vergleichen [34–36]. Der Einfluss dieses Effektes auf die Protein-Wechselwirkungen ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt und Bestandteil kontroverser Diskussionen [21, 29, 32–48] in denen es darum geht, ob Verdrängung einen starken Einfluss auf die Diffusion gelöster Stoffe in der Zelle hat und damit ein entscheidender Faktor für den Stoffwechsel, Transportphänomene, Signalprozesse und Zellbewegung ist. Eine ähnliche Situation an hohen Konzentrationen von Makromolekülen wie im Zytoplasma findet sich auch auf und in Membranen. In Zellmembranen diffundieren Proteine und Lipide in einer stark überfüllten und heterogenen Landschaft in der Aggregate und dichte Bereiche von Proteinen oder Lipiden den Weg der diffundierenden Moleküle behindern [25]. In diesem Zusammenhang wird auch über das Auftreten von gehinderter (anomaler) Diffusion durch Molecular Crowding diskutiert [25, 40, 42, 43, 49–53].

### Membrandiffusion

Ionenkanäle sind über die Lipiddoppelschicht eingebaute Kanäle. Sie sind wichtige Transportproteine in zellulären Membranen, da sie die Bewegung von Ionen durch die Zellmembran erlauben. Ihre Aktivität in der Membran entscheidet zum Beispiel über die Erzeugung und Weiterleitung von Nervenimpulsen, Kontraktion von Muskeln und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials [54]. Sie spielen für die physiologischen Funktionsfähigkeit von Zellen eine wichtige Rolle und sind die Schlüsselkomponente von mehreren Signalwegen. Die Regulierung der Kanal-Aktivität ist entscheidend für eine schnelle Anpassung der Membranleitfähigkeit an sich ändernde zelluläre Erfordernisse. Bisher haben sich die Untersuchungen zur Regulation von Ionenkanälen vor allem auf die Kontrolle der Kanal-Aktivität unter verschiedenen Einflüssen, wie z.B. pH-Wert [55] oder Membranspannung, konzentriert. Neuere Arbeiten auf dem Gebiet des Membrantransports zeigen jedoch, dass die Regulierung der Ionenkanaldichte und die Beschränkung von Ionenkanälen auf Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran für die Steuerung der Kanal Funktionen entscheidend sind. Außerdem zeigten Untersuchungen des Transports von Plasmamembran-Ionenkanälen in Säugerzellen, dass die Beförderung zwischen speziellen Kompartimenten innerhalb der Zelle stark reguliert ist. Die Plasmamembran-Kanaldichte kann durch die Kontrolle der Exportrate aus einem der Kompartimente, dem endoplasmatische Retikulum (ER), angepasst werden [56].

#### Transportvesikel

Der Transport zwischen solchen Kompartimenten erfolgt über membranumhüllte Frachtcontainer, die über die Rekrutierung von Proteinhüllenkomplexen, die ihre Membranen umgibt, unterschieden werden können [57]. Coatomer coat protomer ist einer dieser wichtigen Komplexe, der aus sieben Untereinheiten, sogenannten COPs (coat Protein), besteht. Neben seiner Aufgabe beim biosynthetischen Transport innerhalb der Zelle wird eine Beteiligung bei der Regulierung von Kanalproteinen vermutet [58–61]. Aber auch die Rolle von Coatomer im Transportnetzwerk ist noch nicht vollständig verstanden. Aktuelle elektronenmikroskopische Strukturanalysen konnten drei Coatomer-Spezies an Hand ihrer Frachtspezifizität unterscheiden [62, 63]. Auf Grund dieser Ergebnisse wird ihnen eine differenzielle Aufgabenverteilung zugesprochen [64].

### Techniken

Die Elektronenmikroskopie eignet sich besonders gut, um Strukturen zu analysieren und Verteilungen in unterschiedlichen Kompartimenten festzustellen. Aber die Proben müssen speziell präpariert und fixiert werden [65], wodurch die Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen nicht möglich ist.

Zur Untersuchung von dynamischen Prozessen konnten sich in der Biologie besonders optische Messverfahren in Verbindung mit Fluoreszenz-Methoden etablieren. Der Hauptgrund für die Beliebtheit dieser Methoden besteht darin, dass sie durch ihren nicht-invasiven Eingriff die Möglichkeit bieten lebende Zellen zu untersuchen [66, 67]. Die Entdeckung und die gentechnische Weiterentwicklung von fluoreszierenden Proteinen, wie das grün fluoreszierende Protein (GFP) spielen hierbei eine wesentliche Rolle [68–71].

Bei der Untersuchung dynamischer Prozesse ist die molekulare Beweglichkeit ein wichtiger Parameter für das Verständnis der Zellphysiologie, da sie bei der Regulierung der zahlreichen biologischen Prozesse wie der intra- und interzellulären Signalwege, beteiligt ist. Die Beweglichkeit nimmt dabei in besonderem Maße Einfluss auf die Amplitude und die Zeitspane der Zellsignale. Die Messung der Mobilität kann auch ein Weg sein um molekulare Wechselwirkungen zu bewerten, wenn zum Beispiel die Komplexbildung von der Geschwindigkeit der Bindungspartner im Zytoplasma abhängt [72]. Für die Untersuchung dynamischer Prozesse wie Proteindiffussion, Protein-DNA Wechselwirkungen oder Wirkstofftransport in lebenden Zellen wurden in erster Linie folgende Techniken entwickelt und verwendet [73–75]: die Einzelmolekül-Verfolgung ( engl. Single Particle Tracking, SPT), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS) und Fluoreszenzerholung nach Photozerstörung (engl. Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP).

Mit Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) können Diffusionsprozesse in lebenden Zellen untersucht werden. Besonders häufig wird die Methode bei der Untersuchung von Diffusions- und Transportprozessen innerhalb und über die Zellmembran hinweg benutzt [75–78]. Ausgangspunkt ist ein Probenvolumen, das mit Fluorophoren gefüllt ist. Ein Bereich der Probe wird zunächst schnell durch intensive Laserbeleuchtung gebleicht. Über die Zeit diffundieren mobile Fluorophore von außerhalb der Bleichregion in den dunklen Bereich, wodurch die Regeneration der Fluoreszenz verfolgt werden kann. Die Geschwindigkeit dieser Erholung ist mit der Fluorophor-Mobilität verbunden. Trägt man die Zunahme der Fluoreszenzintensität über die Zeit auf, lässt sich der Diffusionskoeffizient extrahieren [75].

Eine weitere Methode, die sich vor allem bei Membran-Diffusionsprozessen durchgesetzt hat, ist die Verfolgung einzelner Moleküle (SPT) mithilfe einer schnellen CCD Kamera [73, 79].

Durch die Kombination einer spezifischen Markierung von Proteinen oder Lipiden, z.B. durch Fluorophore oder Goldpartikel, und die Verwendung geeigneter Kamera-Detektoren können die Molekülpfade mit einer sehr hohen räumlichen und zeitlichen Auflösung erfasst werden. Im Gegensatz zu Ensemble-gemittelten Methoden, um die Diffusion zu messen, bietet SPT Informationen zu einzelnen Molekülen. Damit können heterogene und komplexe Verhaltensweisen durch vorübergehende Einschränkungen oder Barrieren identifiziert werden. Obwohl es durch seine hohe Orts- und Zeitauflösung die bevorzugte Methode ist, eignet sie sich aufgrund der allgemeinen schnellen Diffusion, sowie der Limitierung bei der Bestimmung der z-(axialen) Position der Teilchen, nicht zum Messen der Diffusion von gelösten Stoffen in wässriger Phase in drei Dimensionen [40].

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine hoch empfindliche Methode, um die Diffusion und den Transport von Farbstoff-markierten Molekülen und deren Wechselwirkungen zu messen [80, 81]. Ursprünglich wurde FCS für Messungen in offenen Lösungssystemen benutzt [82–85], aber in den letzten Jahren wurden immer mehr Anwendungen in lebenden Zellen entwickelt [86–90]. Durch ständige Entwicklungen haben sich heute mehrere Untergruppen der FCS etabliert. Die Zwei-Photonen FCS verwendet Licht mit einer großen Wellenlänge, wodurch die Autofluoreszenz der Zellen reduziert wird, dadurch ist es eine attraktive Methode um Makromoleküle in ihrer intrazelluären Umgebung zu untersuchen [91]. Des Weiteren wurde kürzlich ein Dual-Fokus FCS-System<sup>1</sup> vorgestellt das robuster in Bezug auf optische und photophysikalische Artefakte ist, die inhärent in der Standard-FCS sind [92].

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>manchmal auch zwei Fokus-FCS (2fFCS)

Um bei Messungen in einem beschränkten Reaktionsraum, wie der Zellmembran, störende Hintergrund-Fluoreszenz, wie z.B. aus dem Zytoplasma, zu eliminieren, kann FCS mit internen Totalreflexions-Fluoreszenzanregung (engl. Total Internal Reflection Fluorescence, TIRF) [93, 94] kombiniert werden. Durch die Totalreflexion am Glasboden des Probenträgers wird nur eine sehr schmales Volumen in axialer Richtung beleuchtet [95].

Wird TIRF-Mikroskopie in Kombination mit einer alternierenden Laseranregung verwendet, kann durch den Förster Energietransfer (FRET) zweier geeigneter und spektral unterscheidbarer Farbstoffmoleküle der Abstand zueinander bestimmt werden. Daher können dynamische Prozesse, Wechselwirkungen und Strukturen von markierten Biomolekülen oder fluoreszierende Proteine mit einer erstaunlichen Zeit- und Ortsauflösung, besonders in dünnen Schichten wie der Zellmembran, untersucht werden [96–102].

Einzelpartikel-Verfolgung; engl. Single Particle Tracking (SPT), Interne-Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) und FCS gehören zu den Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden [103–108], da sie durch ihre hohe Empfindlichkeit die Möglichkeit bieten einzelne Moleküle zu beobachten und Heterogenitäten von komplexen Systemen zu untersuchen. Somit können Details über Subpopulationen innerhalb eines Ensembles aufgelöst werden [109].

Zur Erforschung von Transportprozessen in lebenden Zellen [37, 51, 88, 90, 110, 111] und der Interaktion von Biomolekülen [56, 112, 113] werden diese Einzelmolekül- und Fluoreszenzmethoden [103, 104, 106, 107, 114, 115] stetig weiterentwickelt.

### 1.3. Perspektive

Auf ausgewählte Projekte deren biologische Grundlagen in den folgenden Kapiteln der Einleitung (Kap. 2) skizziert werden, sollen Methoden der Einzelmolekülspektroskopie angewendet werden, um dynamische Prozesse und Zusammensetzungen von, für den Transport relevanten, Parametern innerhalb der Zelle zu charakterisieren und quantitativ zu analysieren.

Dazu zählen die Untersuchung von Mobilitätsparametern von Proteinen in physiologisch konzentrierten Proteinlösungen (Teil II) und der Plasmamembran von lebenden Zellen (Teil III) mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, sowie die Analyse der Zusammensetzung von Transportvesikeln mit zwei verschiedenen Coatomer-Spezies über Kolokalisationsexperimente an einem TIRF-Mikroskop (Teil IV).

Abb. 1.1 zeigt schematisch die untersuchten Reaktionsräume im Kontext zum Auftreten in der Zelle.

Zur Quantifizierung von Diffusionsprozessen wird in zwei Projekten die FCS verwendet. Daher wird bei der Ausführung der Grundlagen ein besonderes Augenmerk auf diese Technik gelegt.

Teil II: Die gängige Praxis Proteindynamiken, wie Faltung und Assoziation, in wässrigen Lösungen zu untersuchen berücksichtigt nicht den Einfluss von anderen Makromolekülen, die in hoher Konzentration als sterische Hindernisse und Kollisionspartner



Abbildung 1.1.: In der Zelle finden eine Vielzahl von Transportprozessen und molekularen Wechselwirkungen statt, die mittels Fluoreszenzmethoden auf Einzelmolekülbasis in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dazu zählt die Strukturanalyse von Hüllenproteinen in Transportvesikeln mit Interne-Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie (oben rechts) und die Untersuchung von Mobilitätsparametern von Proteinen in physiologisch konzentrierten Proteinlösungen (oben links) und der Plasmamembran von lebenden Zellen (unten rechts) mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. (Grafik inspiriert durch [116])

in lebenden Zellen zu finden sind. Um die Lücke zwischen *in vitro* Experimenten und Zellmessungen zu schließen werden daher experimentelle Methoden entwickelt, die eine hohe Konzentration an Hintergrundmolekülen berücksichtigen. Aber selbst dann ergeben sich Diskrepanzen.

Um diesen Effekt zu untersuchen sollte im Rahmen dieser Arbeit ein konfokales Messsystem aufgebaut werden (Kapitel 3) und über Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie die Diffusionseigenschaften in nativen Proteinlösungen untersucht werden. Anschließend sollten die Daten mit Simulationen der Browschen Dynamik verglichen werden. Die Ergebnisse dieser Messungen und ein Modellvergleich findet sich in Kapitel 4. Diskutiert werden die Ergebnisse in Kapitel 5.

In Teil III soll die Mobilität des Kalium<sup>+</sup>-Kanals KAT1 in der Plasmamembran von lebenden BY-2 Pflanzenzellen analysiert werden. Ein kommerzielles Laserscanning-Mikroskop soll für die Fluoreszenz-Korrelations-Analyse erweitert werden (vgl. Kap. 6). Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Kapitel 7 beschrieben und werden in Kapitel 8 diskutiert.

Teil IV: Die Zusammensetzung von Hüllenproteinkomplexen in COPI (coat protein complex I) Transportvesikeln in Bezug auf die unterschiedlichen Coatomer-Spezies ist noch völlig unbekannt. Bisher gibt es noch keine geeignete Methode diese Zusammensetzung zu untersuchen. Daher soll ein neuer Methodenansatz auf Basis von Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden entwickelt werden um die Coatomer-Isotypen in der Proteinhülle von COPI-Vesikel zu unterscheiden. Der verwendete Messaufbau und die schon vorhandene Auswerteroutine werden kurz in Kapitel 9 behandelt. Die Ergebnisse der Messungen werden in Kapitel 10 präsentiert mit einer anschließenden Diskussion in Kapitel 11.

Teil V führt nochmal kurz die wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Teile auf und gibt jeweils einen kurzen Ausblick.

# 2. Übersicht und Grundlagen

Bei der Frage warum sich jemand mit Physik beschäftigt wird gerne mit einem Zitat aus Goethes Faust argumentiert [117]: "Dass ich erkenne, was die Welt im Innersten zusammenhält." Im 21. Jahrhundert ist dies auch ein Leitspruch, der in der Biologie immer häufiger verwendet wird.

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832) hat wohl selbst nicht mehr die Begründung der Zelllehre durch Theodor Schwann und Matthias Jacob Schleiden um das Jahr 1830 mitbekommen. Sie waren es auch, die erkannten, dass der 1831 von Robert Brown (der Entdecker der Molekularbewegung) beschriebene Zellkern ein integrierter Bestandteil der Zelle ist [118].

### 2.1. Diffusion

Durch das Leben in einer Welt der hohen Reynolds-Zahlen entwickeln Menschen keine Intuition dafür, wie das Leben einer Zelle aussieht. Wir bemerken nicht die thermische Bewegung der Luftmoleküle oder die zufälligen Zitterbewegungen von Wassermolekülen, wenn wir schwimmen [119].

Selbst wenn die Transportmechanismen in Zellen meist komplexer sind als einfache passive Diffusion [120], erfolgen sie dennoch in einem System das durch Diffusion und molekulare Bewegung beherrscht wird.

Einsteins Pionierarbeit und Perrins spätere experimentelle Verifizierung seiner Theorie zur Brownschen Molekularbewegung vor über 100 Jahren führten zu der universellen Akzeptanz der Existenz von Atomen und Molekülen [121]. Durch die Verwendung einer statistischen mechanischen Beschreibung zeigte Einstein, dass die unregelmäßige Bewegung von Teilchen, die in ruhenden Lösungen suspendiert sind, durch die zufällige thermische Einwirken der Lösungsmittelmoleküle auf diese Teilchen erklärt werden kann [122]. Für die Zufallsbewegung eines Teilchens in verdünnter Lösung gilt in Abwesenheit von äußeren Potentialfeldern für die mittlere quadratischen Verschiebung der Position x nach verstrichener Zeit t:

$$\left\langle x^2 \right\rangle = 2 \cdot D \cdot t \tag{2.1}$$

Unter Berücksichtigung eines thermodynamischen Gleichgewichts und der Voraussetzung, dass es sich um sphärische Teilchen handelt, erkannte Einstein, dass der intrinsische Diffusionskoeffizient D, außer von universellen Konstanten und der absoluten Temperatur T nur vom Reibungskoeffizienten der Flüssigkeit und von der Größe der suspendierten Teilchen abhängt.

Dafür nutzte er das Stokesche Gesetz und drückte die Geschwindigkeit v, mit der sich ein kugelförmiges Teilchen mir Radius r durch die Flüssigkeit bewegt über die

Reibungskraft  $F_R$  und die Lösungesmittelviskosität  $\eta$  aus:

$$F_R = 6\pi\eta r v \tag{2.2}$$

Das so benannte Stokes-Einstein-Gesetz liefert damit für den Diffusionskoeffizienten D folgenden Zusammenhang:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \tag{2.3}$$

wobei  $k_B$  ist die Boltzmann Konstante,  $\eta$  die Viskosität der Flüssigkeit und  $r_H$  der hydrodynamische Radius ist.

Aus phänomenologischen Überlegungen konnte Adolf Fick schon 1855 die molekulare Diffusion in Wasser gelöster Salze durch einen Gradienten in der Konzentration als partielle Ableitung 2.Ordnung beschreiben [123]. Zu dieser Diffusionsgleichung (Gleichung 2.5) führten auch Einsteins Überlegungen. Aus makroskopischer Sicht lässt sich die Diffusion als ein, durch einen Konzentrationsgradienten  $\nabla C$  bedingter Teilchenstrom J formulieren (1.Ficksche Gesetz):

$$J = -D\nabla C \tag{2.4}$$

Unter Berücksichtigung der Massenerhaltung ergibt sich aus der Kontinuitätsgleichung das 2.Ficksche Gesetz (Diffusionsgleichung):

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot (D\nabla C) \tag{2.5}$$

Die letzte Gleichung beschreibt die zeitliche und räumliche Änderung der Konzentration C in einem System in dem alle Teilchen nach einer Störung des stationären Zustandes gleichmäßig verteilt sind.

Die Diffusionskonstante kann konzentrationsabhängig sein, obwohl sie in der Regel als konstant angenommen wird. Ist D konstant, lässt sich das zweite Ficksche Gesetz vereinfachen zu [40]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C \tag{2.6}$$

### 2.2. Molecular Crowding

Das Innere einer eukaryotischen Zelle (Zelle mit Zellkern) besteht aus vielen unterschiedlichen Kompartimenten, die sich durch ihre strukturellen Eigenschaften und ihre molekularen Aktivitäten unterscheiden.

Ein membranbegrenzter Reaktionsraum, der eine entscheidende Rolle in diesen Zellen einnimmt, wird als Organelle bezeichnet. Der Transport von Molekülen und Organellen in und zwischen diesen Regionen, entweder aktiv durch molekulare Motoren oder passiv durch Diffusion, ist essentiell für viele zelluläre Prozesse [90]. Organellen und Makromoleküle, wie z.B. Enzyme, Ribonukleinsäure (RNA) und Proteine diffundieren frei durch das Zytoplasma. Um zu ihrem Einsatzort zu kommen muss etwa die Hälfte der im Zytoplasma synthetisierten Proteine innerhalb einer eukaryotischen Zelle in oder über eine Membran hinweg transportiert werden [124].



Abbildung 2.1.: Skizze des Zellinneren mit einer Vergrößerung, die die hohe Anzahl und Dichte an Molekülen innerhalb einer Bakterienzelle darstellt. Makromoleküle wie Enzyme (blau) und Nukleinsäuren (rosa) bilden sterische Hindernisse und nehmen bis zu 30% des Zellvolumens ein (schwarz weißes Bild). In der farbigen Vergrößerung werden noch kleine Moleküle wie Wasser, Metallionen und Zucker sichtbar. (Bild entnommen aus [1], Originalveröffentlichung in [125].)

Die Proteindiffusion wirkt sich vom Stoffwechsel bis hin zur Signaltransduktion auf viele Aspekte der Zellbiologie aus. Die direkte Untersuchung der intrazellulären Umgebung ist jedoch komplex und schwierig. Viele wissenschaftliche Untersuchungen werden in Lösungen durchgeführt, in der die Gesamtproteinkonzentration weniger als 10 g/lbeträgt. Diese verdünnten Lösungen geben optimale Signale, allerdings fehlt oftmals die biologische Relevanz [29]. Makromoleküle nehmen bis zu 30% des Zellvolumens ein und erreichen Konzentrationen von 100-400 g/l [7]. In Abb. 2.1 ist schematisch die Situation der Molekülbesetzung im Zytoplasma einer Bakterienzelle dargestellt [1, 125]. Solche Verdrängungen und Volumenausschlüsse durch Makromoleküle, wie Enzyme und Aktinfilamente, sogenannten crowdern, beeinflussen die Stabilität von Proteinen, sowie ihre Faltung und Aggregation [10–18]. Die wichtigesten Parameter, die die traslatorische Diffusion im Zytoplasma beinflussen, sind die Viskosität, das Bindungsverhalten und Molecular Crowding. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit nur mit weniger als 40% durch die Viskosität und Bindungsprozesse beinflusst wird und hauptsächlich Molecular Crowding dafür verantwortlich ist [126].

Da die Verdrängung und die Volumenausschlüsse nicht nur Makromolekülen in Lösung, sondern auch ganzen Strukuturkomplexen in Form von Zytoskelett-Fasern und ähnlichem zugesprochen wird, werden oftmals synthetische Polymere verwendet, welche die Situation im Zytoplasma nachstellen sollen [29, 32, 36, 127]. Synthetische Polymere werden häufig auch auf Grund ihrer besseren Wasserlöslichkeit gegenüber herkömmlichen Proteinen bevorzugt. Allerdings können sich andere Nachteile ergeben, so konnte schon beobachtet werden, dass synthetische Polymere zur Ausfällung von Proteinen führen [128].

Zudem besitzen Proteine weder eine regelmäßige noch repetitive, sondern eine sehr spezifische Raumstruktur, die es jedem einzelnen Protein ermöglicht seine spezielle Funktion in der Zelle zu übernehmen [129].

Eine ähnlich hohe Konzentration von Makromolekülen wie im Zytoplasma findet sich auch auf und in Membranen. In Zellmembranen diffundieren Proteine und Lipide (unpolare organische Moleküle) in einer sehr dichten und heterogenen Landschaft, in der Aggregate und kompakte Bereiche von Proteinen oder Lipiden den Weg der diffundierenden Moleküle behindern [25]. In diesem Zusammenhang wird auch über das Auftreten von gehinderter (anomaler) Diffusion durch *Molecular Crowding* diskutiert [25, 40, 42, 43, 49–53].

## 2.3. Anomale Diffusion

Bei hohen Konzentrationen von Makromolekülen werden Abweichungen von den Stokesschen Gesetzen erwartet, da die Anzahl der Makromoleküle in der Größenordnung des gemessenen Proteins liegt und es dadurch zu ständigen Kollisionen mit Nachbarmolekülen kommt. Die Diffusion findet also nicht mehr in einer isotropen Flüssigkeit statt und es ist physikalisch nicht auszuschließen, dass auch andere Ursachen als der hydrodynamische Radius und die Viskosität den Diffusionkoeffizient beeinflussen [42]. Die Beschreibung der mittleren quadratischen Verschiebung (MSD) für die Teilchenposition, gemittelt über viele Beobachtungen bis zum Zeitpunkt t, kann für komplexe Systeme nach Gleichung 2.1 allgemeiner ausgedrückt werden als [130]:

$$\langle MSD \rangle = 2 d D_{\alpha} t^{\alpha}$$
 (2.7)

 $D_{\alpha}$  ist die generalisierte Diffusionskonstante mit der Dimension  $\frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{s}^{\alpha}}$ . d ist die Dimension und t die Zeit. Ist der Exponent der anomalen Diffusion  $\alpha = 1$ , so ist D der normale Diffusionskoeffizient in  $\frac{\mathrm{cm}}{\mathrm{s}}$ . Für  $\alpha \neq 1$  können die Diffusion in Subdiffusion  $0 < \alpha < 1$  oder Superdiffusion ( $\alpha > 1$  unterteilt werden [130]. In lebenden Zellen konnten schon beide Phänomene beobachtet werden. Superdiffusives Verhalten kann auf Grund von aktiven Transportprozessen (Steuerung durch Motorproteine, Zellbewegungen) [131–133] beobachtet werden. Subdiffusion kann vor allem bei der freien Diffusion von Proteinen im Zytoplasma und Zellmembranen beobachtet werden [25, 43, 134].

### 2.4. Zellmembranen

Zellmembranen bilden zunächst Diffusionsbarrieren, da durch sie kein ungehinderter Konzentrationsfluss möglich ist, so ermöglichen sie den räumlich vom Zytoplasma getrennten Ablauf zellulärer Prozesse.

Dennoch sind Organellen Teil eines dynamischen, zusammenhängenden Transport-

netzwerkes, wobei der kontinuierliche Austausch von Substanzen ihre spezifische Zusammensetzung und Funktion definiert. Daher müssen andere Mechanismen als die passive Diffusion für den Materialaustausch verwendet werden. Der Großteil des Transports zwischen den Organellen - beispielsweise vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran - erfolgt in kleinen, membranumhüllten Transportvesikeln. Oftmals bewegen Motorproteine diese biologischen Lasten über ein "Schienensystem", das durch Mikrotubuli und Mikrofilamente des Zytoskelettes gebildet wird [135].

Neben dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi-Apparat gehören unter anderem der Zellkern und die Mitochondrien zu diesen Membran begrenzten Reaktionsräumen. Die Protein- und Lipid-Zusammensetzung der Membranen kann sich stark unterscheiden, beispielsweise gilt das für die Zellmembranen der Organellen (Plasmamembran, endoplasmatisches Retikulum oder Mitochondrien). Es gibt auch Variationen, wenn man die Komposition der Zellmembran verscheidender Arten (Bakterien, Pflanzen oder Tiere) oder Zelltyp (Muskel, Knorpel oder Leber) miteinander vergleicht [129]. Damit sind Membranen selbst hochdynamische, komplexe Einheiten [136].

Die Plasmamembran (auch Zellmembran oder Zytoplasmamembran, bei Pflanzenzellen auch Plasmalemma genannt) dient zur Stabilisierung der Zellstruktur und als Barriere, die es ermöglicht ein internes Milieu aufrecht zu erhalten und das Eindringen von wasserlöslichen Substanzen aufgrund ihrer Molekularbewegung in die Zelle verhindert [135]. Dennoch ist sie flexibel genug, um biologische Aktivität zuzulassen [136]. Sie besteht aus Lipiden und Proteinen, die durch nicht-kovalente Bindungen zu einer dünnen Schicht verbunden werden. Grundgerüst ist dabei die Lipiddoppleschicht die in den letzten vier Jahrzehnten als ein flüssiger Zustand beschrieben werden kann in der eine laterale Bewegung von Lipiden und Transmembranproteinen möglich ist. Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich zudem mit der Existenz von Mikrodomänen, die eine spezielle Lipidzusammensetung und eine unterschiedliche Fluidität aufweisen. Insbesonders Cholesterin und Shingolipide scheinen sich zu Mikrodomänen zusammen zu schließen. Es können sich Lipidflöße dadurch "Lipidflöße" ausbilden. Die Lokalisation von Membranproteinen innerhalb dieser Mikrodomänen geschieht mit unterschiedlicher Affinität und ist Protein abhängig [135]. Für eine ausführliche Darstellung dieses komplexen Themas sei auf die folgende [137–140] weiterführende Literatur verwiesen. Die Dicke der Plasmamembran liegt zwischen 5-10 nm [129]. Die Oberflächendichte von Transmembranproteinen ist extrem hoch  $(3 \cdot 10^4 / \mu m^2)$  [33] und die Beschreibung der lateralen Bewegung ist komplex. Die Bewegungsmuster können je nach Zelltyp oder unterschiedlichen Bedingungen wie Temperatur oder osmotischer Druck verschieden sein. Mögliche Formen sind freie Diffusion, gerichtete Diffusion, eingeschränkte Diffusion durch andere Proteine oder durch Zäune aus Strukturen des Membranskeletts (Vgl. [135]).

Durch die Lipiddoppelschicht ist die Plasmamembran nicht für geladene Teilchen durchlässig. Aber nur durch den schnellen Austausch von Ionen wie Natrium, Kalium oder Calcium können wichtige Zellaktivitäten wie Nervenimpulse oder Muskelkontraktionen ausgeführt werden. Der Transport dieser Ionen erfolgt über entsprechende Ionenkanäle [129].

Der Kalium Arabidopsis thaliana channel 1 (KAT1) ist ein Kaliumkanal (K<sup>+</sup>-Kanal) und gehört sowohl zu den Transmembranproteinen, als auch zu den Kanalproteinen.



Abbildung 2.2.: Transportvesikel des sekretorische Weges, die zum gerichteten Transport von Proteinen und Lipiden innerhalb der Zelle dienen. Für weitere Erläuterungen siehe Text. Nach [129]

In der Plasmamembran liegt er als Tetramer vor. Nach der Synthese und der Zusammensetzung der Proteine zu dem Tetramer im ER wird er über Exozytose in die Plasmamenbran transportiert [141]. Exozytose verläuft über Transportvesikel und spiegelt den letzten Schritt des sekretorischen Wegs wider (Abb.2.2), der in der Regel am ER beginnt und über den Golgi-Apparat und das trans-Golgi Netzwerk (TGN) verläuft und mit dem Andocken und der Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran endet. Damit dient Exozytose nicht nur zum Transport von Frachten in den extrazellulären Raum, sondern auch zur Beförderung von Transmebranproteinen oder Lipiden in die Plasmamembran [142]. Während Materialien über den sekretorischen Weg aus der Zelle hinaus transportiert werden, verläuft der endozytotische Transportweg in die entgegengesetzte Richtung. So können unterschiedliche Kompartimente im Zytoplasma, wie Lysosomen und Endosomen, mit Materialien von außerhalb der Zelle versorgt werden [129].

### 2.5. Transportvesikel und Coatomer

Innerhalb des sekretorischen Weges konnten verschiedene Typen von Transportvesikeln identifiziert werden (Abb.2.2). Unterschieden werden diese Transportvesikel durch die Proteinhüllen, die ihre Membran umgibt.

Nach der Abknospung von der Donormembran wird die Vesikelmembran von einer spezifischen Proteinhülle umgeben. Bevor sich aber Vesikel abschnüren bedarf es noch komplexer Mechanismen, wie der Rekrutierung von Hüllenproteinen aus dem Zytoplasma. Die Beteiligung von Rezeptoren, kleinen GTPasen (Proteinfamilie, die Guanosin-5´-triphosphat bindet und hydrolisiert) und SNARE-Proteinen (engl. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor) sind Bestandteil dieses komplexen Mechanismus [54], die hier nicht weiter ausgeführt werden sollen. Beschreibungen dieser Mechanismen können in [64, 143, 144] gefunden werden.



Abbildung 2.3.: Der heptamere Proteinkomplex Coatomer in den drei nachgewiesenen Isotypen-Zusammensetzungen. Nach: [63, 64]

Die drei am besten untersuchten Vesikel sind zum einen COPI (coat protein complex I) und COPII (coat protein complex II) Vesikel. Sie sind für den Transport im Zellinneren zuständig. Der vorwärts gerichtete Transport von Fracht-Molekülen vom ER zum Golgi im frühen sekretorischen Weg wird von COPII Vesikeln übernommen. COPI transportieren Substanzen retrograd vom ER-Golgi Intermediär Kompartiment (ERGIC) und Golgi-Apparat in Richtung ER und vom cis-Golgi zurück zum ER. Und zum anderen Vesikel mit einer Clathrinhülle (Clathrin Coated Vesicles, CCVs, auch Stachelsaumbläschen genannt) sind am längsten bekannt [145]. Nach ihrer Abschnürung von der Donormembran (z.B. der Plasmamembran) fusionieren sie direkt mit der Akzeptormembran. Sie sind unter anderem Transportvesikel des Endozytoseweges.

Die Zusammensetzung der Proteinhülle von COPI-Vesikel wird durch ARF-GTP und Coatomer bestimmt. Coatomer ist ein heptamer Komplex aus den Untereinheiten (COPs):  $\alpha$ -, $\beta$ -, $\beta$ '-, $\gamma$ -, $\delta$ -, $\epsilon$ - und  $\zeta$ -COP. Die sieben Untereinheiten unterteilen sich in zwei Isotypen -  $\gamma$  und  $\zeta$ . Durch Kombination von den COPs können drei unterschiedliche Coatomere gebildet werden:  $\gamma_1\zeta_1$ ,  $\gamma_1\zeta_2$  und  $\gamma_2\zeta_1$ . Diese treten in einem molaren Verhältnis von 2:1:1 auf.  $\gamma_2\zeta_2$  gibt es prinzipiell auch, aber es tritt vermutlich seltener auf und liegt etwa bei 5% Gesamtanteil [64]. Diese Coatomere übernehmen auf Grund ihrer Lokalisation in dem Transportnetzwerk wahrscheinlich unterschiedliche Funktionen. Aktuelle Untersuchungen konnten die Coatomere an Hand ihrer Frachtspezifizität unterscheiden. Auf Grund dieser Ergebnisse wird den Isotypen eine differenzielle Rollenverteilung zugesprochen. Diese These wird auch von elektromagnetischen Strukturanalysen gestützt [58, 62–64, 146].

### 2.6. Pflanzenzellen

Pflanzenzellen besitzen, wie tierische Zellen auch, Organellen wie das ER oder den Golgi-Apparat mit ähnlichen Transportprozessen. Allerdings sind die räumliche Organisation, die dynamischen Eigenschaften, und die funktionelle Aktivität z.B. des Golgi-Apparates in Pflanzen unterschiedlich zu denen in Säugetieren. Zahlreiche Golgi-Apparate sind im Zytoplasma innerhalb von Pflanzenzellen verstreut und bewegen sich entlang von Aktin-Zytoskelett-Elementen. Vor allem Unterschiede im späteren sekretorischen Weg sind bekannt [147]. Für den frühen sekretorischen Weg gib es aber Hinweise, dass zum Beispiel KAT1 in ähnlicher Form in COPII Vesikel rekrutiert wird wie in Säuger- oder Hefezellen [61]. Wichtige strukturelle Unterschiede finden sich zudem bei den zusätzlichen Organellen in der Pflanzenzelle. Dazu gehören die Vakuolen (große Kammern mit wässriger Lösung; umgebende Membran: Tonoplast),



Abbildung 2.4.: Jablonski Diagramm eines Fluorophores mit Singulett- und Triplett-Term. Schematische Darstellung der Elektronischen Energiezustände (dicke schwarze Linien) und der zugehörigen Schwingungszustände (schmale schwarze Linien) sind für den Grundzustand  $S_0$ , den ersten angeregten Zusantd  $S_1$  und den ersten angeregten Triplett-Zustand  $T_1$  eingezeichnet. Sowie die möglichen Übergänge zwischen den einzelnen Energieniveaus. Höhere angeregte Zustände sind nicht dargestellt. Als Intersystem crossing (ISC) wird ein strahlungsloser Übergang zwischen zwei Schwingungsniveaus bezeichnet, der mit einer Spin-Umkehr verbunden ist. Bild nach [113]

Chloroplasten (Reaktionsraum der Photosynthese) und Plastide (Zellorganellen der Pflanzen, ähnlich den Chloroplasten, die u.a. an der Photosynthese beteiligt sind). Zur Stabilisierung und um dem starken osmotischen Druck entgegen zu wirken besitzen Pflanzenzellen eine Zellwand [118]. Die Tabak Zelle (englisch: *tobacco BY2 cell*) z.B. ist eine ausdifferenzierte Zelle, die auf Grund von ihren Plastiden und ihrem Vakuolensystem, nur von wenigen schmalen Zytoplasma-Brücken durchzogen wird.

### 2.7. Fluoreszenz

Fluoreszenz wird in der Biologie zur Identifizierung und Lokalisation von spezifischen Strukturen oder Funktionen in Zellen oder ganzen Organismen benutzt. Um die Position oder die Beweglichkeit einzelner Moleküle verfolgen zu können, müssen diese typischerweise mit einem Farbstoff markiert sein. Fluoreszierende Prozesse oder mit Fluoreszenz assoziierte Prozesse können in einem sogenannten Jablonski-Diagramm



Abbildung 2.5.: Die dreidimensionale Kristallstruktur des grün fluoreszierende Protein (GFP) [149] weist eine fassähnliche, zylindrische Struktur auf, wobei sich der natürliche Chromophor (dunkel grün) geschützt im Zentrum des Protein-Fasses befindet [103]. Die Fass-Hülle selbst ist ein Peptidgerüst das aus mehreren parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblätten besteht.

dargestellt werden (Vgl. Abb.2.4). Die auch als Fluorophore bezeichneten Moleküle absorbieren Licht eines bestimmten Spektrums (Absorbtionsspektrum), wodurch ein Elektron in ein vibronisches Niveau (dünne schwarze Linien) des ersten angeregten Singulett-Zustandes (S<sub>1</sub>) übergeht. Über einen strahlenden Übergang relaxiert das Elektron typischerweise innerhalb einiger Nanosekunden wieder in ein vibronisches Niveau des Grundzustandes (S<sub>0</sub>) (Fluoreszenz). Über strahlungslose Vibrationsrelxation (graue geschweifte Pfeile) gelangt das Molekül wieder in den elektronischen Grundzustand (S<sub>0</sub>). Zurück im Grundzustand, kann es erneut angeregt werden [148]. Typischerweise ist ein strahlungsloser Prozess mit der Abgabe von Wärme verbunden.

Die Abstände der Schwingungsniveaus der angeregten elektronischen Zustände sind ähnlich zu den Abständen im elektronischen Grundzustands. Dadurch besitzt das Emissionsspektrum eine ungefähre Spiegelsymmetrie zum Absorptionsspektrum beim  $S_0 \rightarrow S_1$  Übergang [114].

Mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit kann durch ("Interkombination" oder auch ISC=*intersystem crossing*) ein strahlungsloser Übergang in den Triplett-Zustand erfolgen (T<sub>1</sub>). Bei diesem Vorgang kommt es zu einer Spinumkehr des angeregten Elektrons. Mit einer relativ hohen Abklingdauer erfolgt die Emission als strahlende Triplett-Singulett-Interkombination (Phosphoreszenz). Im Vergleich zur Fluoreszenz ( $10^{-9}$ s) ist dieser Prozess im Bereich von einigen Mikrosekunden relativ langlebig.

Im Gegensatz zur irreversiblen Fluoreszenzzerstörung oder auch Photobleichen, bei dem der Fluoreszenzzyklus vollständig unterbrochen wird, gibt es noch reversible Fluoreszenzlöschung (engl. *Quenching*), die mit einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität verbunden ist. Unterschiedliche Effekte können dafür verantwortlich sein. Ein Beispiel ist die Stoßlöschung, bei dem das energetisch angeregten Molekül durch den Zusammenstoß strahlungslos in den Grundzustand übergeht [114]. Durch irreversible photochemische Reaktionen der Fluoreszenzfarbstoffe im angeregten Zustand, z.B. durch Oxidation kann es zu Photobleichen kommen [113].

Zahlreiche natürliche oder synthetisch hergestellte Farbstoffe sind kommerziell erhält-

lich und können nach ihren chemischen oder photo-physikalischen Eigenschaften ausgewählt werden. Eine gute Übersicht ist z.B. in [103] zu finden. Einen hohen Stellenwert in der in vivo Anwendung haben dabei fluoreszente Proteine, die über gentechnische Methoden in die DNA unterschiedlichster Zellen eingebaut werden können und bei Expression an ein Zielprotein fusioniert werden. Am besten beschrieben ist das von Osamu Shimomura et. al. 1962 [150] veröffentlichte, grün fluoreszierende Protein, engl. Green Fluorescent Protein (GFP), für dessen Entdeckung und Entwicklung 2008 der Chemie Nobelpreis verliehen wurde. Es wurde ursprünglich in mühevoller Handarbeit aus der pazifischen Qualle Aequorea victoria isoliert und kann mit ultraviolettem oder blauen Licht angeregt werden. Die Emission von grünem Licht (504 nm) wird durch seine Energieniveaus definiert. Abb.2.5 zeigt die fassähnliche Struktur des GFPs. Der Zylinder hat einen Durchmesser von etwa 3 nm und eine Länge von 4 nm. Im Verhältnis zu organischen Fluorophoren mit einer Abmessung von  $\leq 1$  nm ist es sehr viel größer [103]. Fluoreszente Proteine bieten dennoch eine effiziente Herangehensweise um lebende Zellen bis hin zu ganzen Organismen durch gezielte Fusionierung spezifisch zu markieren. Mittlerweile gibt es optimierte GFP Varianten mit längeren Absorptionsund Emissions-Wellenlängen mit Emissionsmaxima von 448-600 nm [114]. Weiterentwickelte Fusionsproteine, wie eGFP (enhanced GFP, Em.: 509 nm), lassen sich besser in Säugerzellen exprimieren und weisen zudem eine höhere Photostabilität auf [151].

Durch Farbstoff markierte Proteine lassen sich Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb von Zellen und in *in vitro* Experimenten untersuchen, z.B. durch die Charakterisierung ihrer Photophysik.

### 2.8. Mikroskopie

Eine grundlegende Methode zur Untersuchung von biologischen Systemen ist die Mikroskopie, die es ermöglicht Strukturen zu vergrößern und für das menschliche Auge sichtbar zu machen. Vor Beginn der Mikroskopie wurden zur Vergrößerung einfache Lupen verwendet, die es rudimentär ermöglichten Objekte zu untersuchen, die mit bloßem Auge nicht sichtbar waren. Als einfachstes Mikroskop gilt die Kombination von zwei Lupen, die zwischen dem 16. und 17. Jahrhundert von Galileo Galilei und Zacharias Janssen zum ersten Mal zur Vergrößerung von Objekten verwendet wurden [152, 153]. Diese Methode wurde von van Leeuwenhoek und Robert Hooke verbessert um Zellbestandteile zu visualisieren [154, 155]. Mit den damaligen Techniken wurden Objekte, wie etwa der Zellkern, mit bis zu 275facher Vergrößerung untersucht [156]. Fortschritte auf dem Gebiet der Mikroskopie haben zu einer deutlich besseren Auflösung geführt, wodurch es möglich ist feinere Strukturen zu unterscheiden.

Beispielsweise liegt das Auflösungsvermögen moderner Elektronenmikroskope bei etwa 1 nm. Im Prinzip ließen sich so nahezu alle biologisch relevanten Objekte untersuchen, jedoch müssen für die Untersuchungen biologische Proben mit einer dünnen leitfähigen Schicht überzogen werden und zusätzlich ist die Wahl der Proben eingeschränkt, da diese eine Dicke zwischen 10 - 500 nm besitzen muss. Dadurch ist es nicht möglich *in vivo* Messungen durchzuführen. Ein weiterer gravierender Nachteil besteht darin, dass die untersuchten Proben nach wenigen Sekunden durch die energiereichen Elektronen ( $E_{\rm kin} = 100 keV$ ) irreparabel geschädigt werden [157, 158].

Für die Untersuchung dynamischen Prozesse in lebenden Zellen werden daher weniger invasive Methoden benötigt.

Hier bietet die Fluoreszenzmikroskopie deutliche Vorteile. Sie bekam in der 60er Jahren durch die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins *GFP* einen Schub ([150, 159] und vgl. Abschnitt 2.7). Die Wurzeln der Fluoreszenzmikroskopie liegen allerdings zu Beginn des 20. Jahrhunderts als August Köhler und Carl Reichert erstmals Moleküle zum Leuchten anregten und diese mit einem Mikroskop untersuchten [160]. Dadurch, dass die Untersuchung mit Licht im sichtbaren Spektrum geschieht, ist eine Schädigung der biologisch Proben verringert. Einer der größten Vorteile der Lichtoder Fluoreszenzmikroskopie liegt aber darin, dass es möglich ist *in vivo* Messungen durchzuführen und somit dynamische Prozesse zu untersuchen. Durch stetige Weiterentwicklungen von Mikroskopen, Detektoren und Fluoreszenzfarbstoffen sind moderne, auf Licht basierende Methoden, in der Lage zelluläre Strukturen mit wenigen Nanometern aufzulösen [161–164]. Sogar die Untersuchung dynamischer Prozessen in lebenden Zellen ist heutzutage mit hohen zeitlichen Auflösungen möglich [113].

Prinzipiell kann man Fluoreszenzmikroskopie über ihre Beleuchtungsart unterscheiden. Bei einem konventionellen Fluoreszenz-Mikroskop (auch Standard Epi-Fluoreszenzmikroskop) wird die Probe von der gleichen Seite beleuchtet und detektiert. Das bietet den Vorteil, dass nur reflektiertes Anregungslicht oder emittierte Fluoreszenz das Objektiv erreichen [165]. Im Weitfeld wird über eine flächige Beleuchtung mit annähernd gleicher Intensität gearbeitet [166, 167]. Damit wird ein größerer Bereich sichtbar und Objekte in der Größenordnung einer Zelle können erkannt werden. Die Weitfeld Mikroskopie ist die klassische Beleuchtungsart für Lichtmikroskope. In der Fluorezenzmikroskopie können sowohl Lampen, wie Quecksilberdampflampen oder Xenon-Quellen mit passenden Filtern, wie auch Laser zur Anregung verwendet werden. Zur Detektion kann das bloße Auge oder CCD (engl.*charge-coupled device*) Kameras dienen [165]. Enthält die Probe einen hohen fluoreszenten Hintergrund so wird die Interner-Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) [168] bevorzugt verwendet. In der Zellbiologie wird sie häufig zur Lokalisation und zur Untersuchung von dynamischen Prozessen von Molekülen in der Plasmamembran eingesetzt [169, 170].

Im Unterschied zu Standard Epi-Fluoreszenzmikroskopen wird das Laserlicht unter einen bestimmten Winkel eingestrahlt. Nähert sich das Anregungslicht dem kritischen Winkel ( $\Theta_c = \sin^{-1}(\frac{n_2}{n_1})$ ), wird das Laserlicht an der Glas-Wasser Grenzschicht (Brechungsindex  $n_1 > n_2$ ) total reflektiert. Dieses total reflektierte Licht erzeugt ein elektromagnetisches Feld dessen Stärke exponentiell mit dem Abstand vom Deckglas abnimmt und als evaneszentes Feld bezeichnet wird. Die charakteristische Eindringtiefe in das Medium mit geringerem Brechungsindex beträgt etwa 100-200 nm [170]. Man kann also Fluorophore auf der Oberfläche in einer dünnen Schicht mit einem verbesserten Signal-zu-Rauschverhältnis beobachten.

In der wissenschaftlichen Forschung wird aber das Prinzip der konfokalen Beleuchtung wesentlich häufiger verwendet [166]. Das von Marvin Minsky 1957 angemeldete Patent [171] enthielt die Anleitung für den Aufbau eines konfokalen Mikroskops. Dafür wird das gesamte Anregungslicht auf einen Punkt fokussiert, in dem sowohl das Sichtfeld der Objektivlinse durch Raumfilter, wie auch der Bereich der Belichtung, in der gleichen Fokalebene eingeschränkt werden [172]. Diese Einschränkungen erfolgen typischerweise mit Lochblenden. Störendes Licht, dass nicht aus der Fokalebene stammt, wird durch die Lochblende im Detektionspfad gefiltert. Besonders effektiv wird Streulicht unterdrückt. Somit kann man den Kontrast wirksam erhöhen. Im Idealfall ist der Durchmesser der Lochblende unendlich klein (punktförmige Detektion). Durch die Verwendung des konfokal Prinzips wird das Sichtfeld somit auf eine Punktabbildung reduziert, die lateral durch die Größe der Lochblende bestimmt wird. Das Anregungsvolumen ist beugungsbegrenzt [173].

Für biologische Anwendungen werden heutzutage konfokale Laserscanning Mikroskope (CLSM) verwendet. Bewegliche, motorisierte Spiegel führen dabei, den über das Objektiv fokussierten Laserstrahl, über das Objekt. Eine schnelle Abtastung der Probe (wenige  $\mu$ s pro Pixel) in alle drei Raumrichtungen ist dadurch möglich [174]. Die Photonen werden Pixel für Pixel gesammelt. Üblicherweise werden dazu Photomultiplier (PMT) als Detektoren verwendet. Mit CLSM lassen sich damit fokussierte Bilder aus verschiedenen Tiefen in der Probe erfassen, in dem die punktweise aufgenommenen Daten über entsprechende Computerprogramme zusammengesetzt werden [165, 167]. Umfangreiche Informationen finden sich bei den einzelnen Mikroskop Herstelltern oder in [166, 172]

Um die Fluoreszenz einer Probe mit dem Mikroskop detektieren zu können, sollten diese mit einem Laser der passenden Wellenlänge beleuchtet werden. Vorteile bieten abstimmbare Weißlichtlaser-Systeme. Ein Laser, der weißes Licht emittiert, hat eine hohe Energiedichte über einen weiten Bereich des sichtbaren Spektrums. Ein akustooptisches Element ermöglicht die Auswahl schmaler Bänder von wenigen Nanometern Breite aus dem Emissionsspektrum, die eine Leistungsdichte von etwa 1 mW/nm im sichtbaren Bereich (von 450-700 nm) erreichen. Aufgrund ihrer Leistungsdichte und ihres Anregungsspektrums eigenen sich diese Weißlichtlaser-Quellen besonders für Anwendungen in der konfokalen Fluoreszenz-Mikroskopie [175].

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

Wie in der Einleitung schon erwähnt, ist durch die konsequente Weiterentwicklung von Fluoreszenzmethoden und mikroskopischer Techniken, die Untersuchung von dynamischen Prozessen in lebenden Zellen möglich geworden. Zu den wichtigsten Techniken gehören [73–75, 113]: Single Particle Tracking (SPT), Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP).

Da im Rahmen dieser Arbeit die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in zwei Projekten verwendet wurde, soll diese Technik etwas genauer beschrieben werden.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie basiert auf der Analyse von Schwankungen der Fluoreszenz-Intensitäten, die durch fluoreszierende Moleküle beim Betreten und Verlassen eines kleinen Beobachtungsvolumen verursacht werden.

Zur Erzeugung dieser kleinen Beobachtungsvolumina basieren typische Experimente in der FCS auf konfokalen Mikroskopaufbauten Abb. 2.6. Als Stativ wird ein gewöhnliches Lichtmikroskop eingesetzt. Dabei wird in der Regel ein inverses Mikroskop verwendet, bei dem das Objektiv unter der Probe angebracht ist.

Ein Laser wird durch das Objektiv auf die Probe fokussiert und regt dort Moleküle zur Fluoreszenz an. Aufgrund von Diffusion, im Allgemeinen thermisch bedingte Brownsche Molekularbewegung, treten diese Moleküle in das Beobachtungsvolumen ein und



Abbildung 2.6.: Schematischer Aufbau eines typischen FCS Systems. Basis ist eine konfokaler Mikroskopaufbau. Ein Laser wird durch ein Objektiv auf die Probe fokussiert und regt dort Fluorophore in der Probe an. Das Fluoreszenzsignal, das durch Fluorophore verursacht wird, die durch das Beobachtunksvolumen diffundieren (oben rechts), wird über einen Dichroiten vom Anregungslicht getrennt und räumlich durch eine Lochblende gefiltert. Das Licht wird auf einen Detektor fokussiert, der die ankommenden Photonen in einen festen Zeitintervall registriert und an den Computer weiter gibt. Über die Autokorrelationsfunktion kann das Fluoreszenzsignal korreliert werden und ist unten rechts als Autokorrelationskurve dargestellt. Nach [176] verlassen es wieder. Das entstehende Fluoreszenzsignal wird über einen Dichroiten vom Anregungslicht getrennt und räumlich durch eine Lochblende gefiltert. Das Licht wird auf einen Detektor fokussiert, der die ankommenden Photonen in einen festen Zeitintevall registriert und in digitale Impulse umgewandelt. Diese werden an eine Korrelatorkarte oder Computer weitergegeben. Anschließend erfolgt die Datenauswertung bei der nicht die Fluoreszenzintensität selber, sondern deren zeitliche Schwankungen untersucht werden. Die Korrelationsanalyse ist dabei die hauptsächlich verwendete mathematische Operation. Dabei wird das zu einem bestimmten Zeitpunkt erhaltene Signal mit einem Zeit-versetzten Signal vom gleichen Kanal (Autokorrelation), oder dem Signal eines anderen Kanals (Kreuz-Korrelation), multipliziert [105, 113]. Die mittlere Länge und Amplitude dieser Schwankungen wird durch die sogenannte zeitliche Autokorrelationsanalyse bestimmt [113]. Darüber hinaus müssen die optischen Eigenschaften für die Anregung und Detektion der Fluoreszenz berücksichtigt werden. Die am häufigsten verwendete analytische Lösung für die Autokorrelations-

werden. Die am häufigsten verwendete analytische Lösung für die Autokorrelationsfunktion setzt eine dreidimensionale Gauß-Verteilung der Detektions-Effizienz der Fluoreszenz des konfokalen Volumenelements voraus [116].

Die Auto-Korrelations-Funktion (ACF) beschreibt die Selbstähnlichkeit eines gemessenen Signals innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. Um die Fluoreszenz-Fluktuationen  $\delta F(t)$  auszuwerten wird eine normierte Form der ACF verwendet [82]. Die Fluktuation des Fluoreszenzsignals zu einer Zeit t wird mit dem Fluktuationssignal zu einem späterem Zeitpunkt  $t + \tau$  multipliziert. Die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$  des sich zeitlich ändernden Fluoreszenzsignals F(t) für eine Sorte von Teilchen ist definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t) \cdot F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} - 1 = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}$$
(2.8)

Die Schwankungen  $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$  sind die Abweichungen der gemessenen Fluoreszenzintensität von ihrem zeitlichen Mittelwert. Die Fluoreszenzintensitätsfluktuationen kann durch räumliche Integration der Konzentration Schwankungen  $\delta c(\mathbf{r})$ berechnet werden, gewichtet über eine Wahrscheinlichkeitsfunktion  $\Phi(\mathbf{r})$  ein Photon in diesem Volumenelement zu detektieren [121]:

$$\delta F(t) = \int \int \int \Phi(\mathbf{r}) \delta c(\mathbf{r}, t) d\mathbf{r}$$
(2.9)

Die Funktion  $\Phi(\mathbf{r})$  ist Zeitunabhängig und wird auch als *Molecule Detection Function* (MDF) bezeichnet [103]. Sie charakterisiert die Form und Größe des Beobachtungsvolumens und wird im Allgemeinen durch einen Gausschen Ellipsoid angenähert mit Radius  $w_0$  in der x-y-Ebene und einer Ausdehnung  $z_0$  in axialer Richtung:

$$\Phi(x,y,z) = a e^{-2\frac{(x^2+y^2)}{w_0^2}} e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}}$$
(2.10)

Dabei ist a ein Vorfaktor und hängt von der Anregungsintensität, Verluste durch Filter, sowie der Effizienz des Photodetektors ab [177].

Die Konzentrationsschwankungen lassen sich aus dem Fickschen Gesetz (siehe Glei-

chung 2.6) bestimmen:

$$\frac{\partial \delta c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D\nabla^2 \delta c(\mathbf{r}, t) \tag{2.11}$$

Unter Berücksichtigung nur einer Sorte frei diffundierender Teilchen durch das Beobachtungsvolumen kann die Auto-Korrelations-Funktion  $G(\tau)$  aus den Gleichungen 2.8,2.9,2.10 über einer Fouriertransformation berechnet werden [121, 178, 179]):

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}}$$
(2.12)

G(0) ist die Amplitude zum Zeitpunkt  $\tau = 0$  und reziprok proportional zur Gesamtzahl der Fluorophore N im Detektionsvolumen. Wobei  $N = cV_{eff}$  mit  $V_{eff} = \pi^{3/2}w_0^2 z_0^2$ und c die Konzentration ist. Der Strukturparameter  $k = \frac{z_0}{w_0}$  wird über die Größe des Laserfokus und der Lochblende festgelegt.  $z_0$  ist definiert als Abstand entlang der optischen Achse und  $w_0$  als Abstand von der optischen Achse, bei der die Laserintensität auf  $e^{-\frac{1}{2}}$  abgefallen ist.

Die Diffusionszeit ist über die den Translatorischen Diffusionskoeffizienten wie folgt verknüpft:

$$\mathbf{D}^t = \frac{w_0}{4\tau_D} \tag{2.13}$$

Um aus den zeitlichen Auto-Korrelations-Funktionen die zugrunde liegenden Dynamiken zu erhalten wird typischerweise eine Anpassungsfunktion unter Berücksichtigung des Levenberg-Marquardt-Algorithmus verwendet. Dabei wird das Anpassungsmodell nach den zugrunde liegenden physikalischen Prozessen gewählt auf denen die Ursachen der Fluktuationen basieren. Je mehr Informationen über das zu untersuchende System und dessen Dynamik bekannt sind, desto einfacher ist die Wahl einer richtigen Anpassungsfunktion. Es gibt die unterschiedlichsten Modelle, z.B.:

- Normale Diffusion in 3 Dimensionen
- Anomale oder Subdiffusion
- Membrandiffusion in 2 Dimensionen
- Korrektur von Photophysikalischen Effekten, insbesondere Triplett Anregung
- Einbeziehung von Flussgeschwindigkeiten
- Komplexbildung

Passende Modelle erlauben z.B. die Bestimmung der Konzentration und des Diffusionskoeffizientens und die Unterscheidung von kleinen ungebundenen Proteinen von großen Komplexen an die sie gebunden sind [80, 82]. Von der Diffusion unabhängige Quellen für Fluktuationen wie photophysikalische Effekte (Triplettrelaxation, Blinken oder Bleichprozesse [70, 180, 181]), ebenso wie Wechselwirkungen mit zellulären Strukturen oder deren Bewegung [182] und Bindungskinetiken, kann von der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  als Superposition der unterschiedlichen Komponenten *i* beschrieben werden [183]:

$$G_{\text{ges}}(\tau) = \sum_{i} G_{Di}(\tau) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^{z} \rho_i \mathbf{D}_i$$
 (2.14)

mit dem zeitabhängigen Diffusionsterm

$$D_{i} = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{i}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{k^{2}\tau_{i}}\right)^{-\frac{1}{2}}$$
(2.15)

unter der Voraussetzung, das die Helligkeit der Fluoreszenz für alle Komponenten gleich ist.  $\rho_i = N_i/N_{\text{ges}}$  ist der Anteil an der Gesamtmolekülzahl mit der Diffusionsgeschwindigkeit  $\tau_i = w_0^2/4 D_i$ .

Die Aufenthaltsdauer von fluoreszierenden Molekülen, die durch den Fokus diffundieren, liegt je nach Aufbau, typischerweise zwischen 30 µs für freie Fluorophore in Wasser bis hin zu einigen zehn bis hundert Millisekunden für Membran-Komplexe. Für die Datenauswertung ist es unerlässlich zwischen den unterschiedlichen Quellen zu unterscheiden, die zu Schwankungen in der Fluoreszenzintensität führen [113]. Die Abnahme der Autokorrelationsamplitude auf die Hälfte des Maximums entspricht in etwa der Zeit des zu Grunde liegenden Prozesses, der die Schwankungen verursacht (aufgrund des Wurzelterms (Gleichung 2.12) ist die Hälfte des Maximums zu kleineren  $\tau$  verschoben) [116]. Dadurch wird die Form der Kurve entscheidend beeinflusst. In

Abb.2.7 werden unterschiedlich Szenarien gezeigt, die zu einer Veränderung der Korrelationskurve führen können. Teilbild A zeigt eine normale dreidimensionale Diffusion. In Gegenwart von Tripletrelaxation (B) ist eine Schulter bei kurzen Zeitkonstanten in der Autokorrelationsfunktion (schwarz) im Vergleich zur ACF ohne Triplett (rote Kurve) ausgebildet. Durch Anlegen eines Flusses fällt die Kurve steiler ab (C). Sind zwei Komponenten vorhanden, wie beispielsweise bei der Komplexbildung eines kleinen Liganden zu einem wesentlich schwereren Substrat, können zwei Diffusionszeiten mit unterschiedlichen Verhältnissen der Amplitude beobachtet werden (D).

Der Konzentrationsbereich von FCS Messungen liegt zwischen Picomolar und Mikromolar. Bei einer Konzentration von 1 µM befinden sich mehrere hundert Moleküle im Fokus und die Fluoreszenz-Fluktuationen mitteln sich raus. Auf der anderen Seite durchqueren bei Konzentrationen unter 1 nM nur sehr wenige Moleküle das Beobachtungsvolumen und das Fluoreszenz Signal kann nicht mehr vom Hintergrund oder vom Detektorrauschen unterschieden werden. Der zeitliche Bereich in dem man Prozesse beobachten kann, liegt zwischen Mikrosekunden und Sekunden. Die untere Grenze wird durch die Zeitauflösung der Hardware gegeben. Für FCS-Messungen werden meistens Lawinenphotodioden (Lawinenphotodioden; engl. avalanche photodiode (APD)) als Detektoren verwendet. Sie eigenen sich auf Grund ihrer hohen Quanteneffizienz besonders für schwach fluoreszierende Proben. Die Totzeit der APD liegt bei etwa 50-100 ns. Um einen Prozess wahrnehmen zu können, sollte die Zeitauflösung der Hardware 10-mal schneller sein, als die Korrelationszeit des zu beobachten Prozesses. Um eine gute Statistik zu erhalten, lässt sich für die obere Grenze sagen, dass die Messung wenigstens 1.000-mal länger sein sollte, als der langsamste Prozess der von Bedeutung ist. Während dieser Zeit muss sichergestellt sein, dass das System stabil ist, d.h. es sollte kein großflächiges Photobleichen, keine langsamen Bewegungen der Zellen und


Abbildung 2.7.: Die Form der Autokorrelationsfunktion ist Abhängig von den zugrundeliegenden Prozessen, die die Schwankungen verursachen.

keine Veränderungen in der Laserintensität auftreten [113].

Die meisten Modelle gehen von einer idealisierten gaußförmigen Intensitätsverteilung aus, die in alle drei kartesischen Koordinatenachsen zeigt [179]. Für ein reales Profil eines Laserfokus ist das nicht der Fall, insbesondere, wenn Aberrationen im optischen System vorhanden sind. Als Verbesserung gelten numerische Modelle, die die tatsächlichen Systemparameter mit einbeziehen [92, 179, 184].

Aus einer Standard FCS-Auswertung lassen sich daher nur relative Diffusionszeiten ermitteln, die vom Laserstrahlprofil und der Lochblende abhängen. Sind exakte Kenntnisse über die Form und die Größe des Konfokalvolumens bekannt, so lassen sich diese über  $D = \frac{w_0^2}{4r_D}$  in absolute Diffusionskoeffizienten D umrechnen. Die einfachste Methode zur Bestimmung der Parameter des Mikroskop-spezifischen Fokusprofils ist die Vermessung eines Farbstoffs mit bekannten Diffusionskoeffizienten. Eine ausführliche Beschreibung findet sich in [185].

#### Fluoreszenz-Kreuz-Korrelations-Spektroskopie (FCCS)

Die Fluoreszenz-Kreuz-Korrelations-Spektroskopie (FCCS) ist eine leistungsfähige Erweiterung der Standard FCS. In einem zwei-Farben Setup werden zwei Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge für die Anregung der Probe überlagert und bilden ein gemeinsames Beobachtungsvolumen. Mögliche Bindungspartner werden zur Analyse mit spektral unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Statt der Korrelation des Fluoreszenzsignals mit sich selbst (FCS), werden die Fluoreszenzfluktuationen von zwei spektral unterschiedlichen Detektionskanäle miteinander korreliert (Kreuz-Korrelations Analyse). Die hohe Spezifität dieser Technik ergibt sich aus der Tatsache, dass nur dann eine Kreuzkorrelationskurve gebildet wird, wenn die unterschiedlich markierten Moleküle gebunden sind und daher gemeinsam durch das Beobachtungsvolumen diffundieren. Nur so ergeben sich synchrone Fluktuationen in den beiden Detektionskanälen, die zu einer messbaren Kreuz-Korrelation führen [88, 186]. Diese Methode ist besonders empfindlich für molekulare Wechselwirkung von Biomolekülen und um das Verhältnis von gebundenen und ungebundenen Zustand bei Komplexbildung und andere Assoziationsund Dissoziations Parameter zu untersuchen [187–189]. Durch die Analyse der Amplitude und der Abklingzeit der jeweiligen Kurven (Auto- und Kreuzkorrelation) können die Bindungskonstanten und die Mobilität des gebundenen Komplexes sowie die Konzentrationen von allen Spezies bestimmt werden [88]. Ein zusätzlicher Vorteil zur Standard FCS ist, dass hier auch kleine etwa gleichgroße Bindungspartner beobachtet werden können.

#### 2.10. Förster Energietransfer (FRET)

Eine weitere Methode um die Wechselwirkung zweier Moleküle mit spektral unterschiedlicher Farbstoffenmarkierung zu untersuchen ergibt sich mit Hilfe des sogenannten Förster Energietransfers (Förster Energietransfer (FRET)) [190]. Bei diesem Prozess findet eine nicht strahlende Energieübertragung basierend auf einer Dipol-Dipol Kopplung von einem angeregten Fluorophor, dem sogenannten Donor (D), auf ein anderes Molekül, dem Akzeptor (A), statt. Dieser Vorgang kann beobachtet werden, wenn sich das Emissionsspektrum des Donors, mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, überschneidet [114]. Der Akzeptor muss nicht notwendigerweise fluoreszierend sein. Der Förster Energietransfer beruht auf der engen physischen Wechselwirkung der beiden Moleküle (Donor-und Akzeptor) und kann daher nur auftreten, wenn der Abstand zwischen Donor und Akzeptor zwischen 1-10 nm liegt [165, 191]. Die FRET Effizienz E (auch Transfereffizienz) ist unter anderem abhängig vom Abstand des Donors zum Akzeptor R und kann daher genutzt werden um molekulare Wechselwirkungen zu untersuchen:

$$E = \frac{1}{1 + \left(\frac{R}{R_0}\right)^6} \tag{2.16}$$

Die Förster-Radius ( $R_0$ ) ist eine Konstante und der charakteristische Abstand von Donor und Akzeptor bei E = 50% Bei der Untersuchung von Biomolekülen werden häufig Donor-Akzeptor-Paare untersucht, die durch einen festen Abstand getrennt sind. In dem Fall wird die FRET Effizienz typischerweise unter Verwendung der relativen Fluoreszenzintensität des Donors bei Donor Anregung  $F_{D_{ex}}^{D_{em}}$  in Abwesenheit des Akzeptors (D) und in Gegenwart des Akzeptors (DA) bestimmt oder über die Fluoreszenzlebensdauer unter den entsprechenden Bedingungen ( $\tau_{DA}$  und  $\tau_{D}$ ) [114]:

$$E = 1 - \frac{\left(F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{D}_{\mathrm{em}}}\right)_{\mathrm{DA}}}{\left(F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{D}_{\mathrm{em}}}\right)_{\mathrm{D}}} = 1 - \frac{\tau_{\mathrm{DA}}}{\tau_{\mathrm{D}}}$$
(2.17)

Auf der Basis der Einzelmolekülspektroskpie kann FRET an einem einzelnen Fluorophorenpaar (spFRET= single pair FRET) untersucht werden und bietet die Möglichkeit Details über Heterogenitäten zu erfahren, die in einem Ensemble von Molekülen nicht aufgefallen wären und Bindungsereignisse und Konformationsänderungen zu analysieren [93].

Für die Untersuchung des Förster Energietransfer (FRET) auf der Ebene von Einzelmolekülmessungen wird die FRET Effizienz häufig als Näherung auf einer Skala von 0 bis 1 als ein relatives Maß für die Entfernung der Fluorophore wie folgt berechnet [192, 193]:

$$E = \frac{F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{A}_{\mathrm{em}}}}{F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{A}_{\mathrm{em}}} + F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{D}_{\mathrm{em}}}}$$
(2.18)

 $F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{A}_{\mathrm{em}}}$  ist die Fluoreszenzintensität des Akzeptors und  $F_{\mathrm{D}_{\mathrm{ex}}}^{\mathrm{D}_{\mathrm{em}}}$  die Fluoreszenzintensität des Donors bei einer Donor Anregung (D<sub>ex</sub>).

# Teil II. Molecular Crowding

# Molecular Crowding

Der erste Schritt, um dynamische Prozesse und Wechselwirkungen von Proteinen in biologischen Systemen zu verstehen und zu beschreiben, sind häufig Messungen in Lösungen unter definierten Bedingungen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass verdünnte wässrige Lösungen die physiologischen Bedingungen nur unzureichend widerspiegeln. Insbesondere sind die Diffusion sowie die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen von Proteinen durch die Konzentration an Makromolekülen im Zytoplasma beeinflusst.

In dieser Arbeit werden als Crowder Hintergrundmoleküle bezeichnet, die im Gegensatz zu den Tracer-Molekülen nicht spezifisch über ein Fluoreszenz Signal detektiert werden können.

Im diesem Kapitel soll die Verwendung von artifiziellen Proteinlösungen als Crowdermedium zum Nachstellen von möglichst zellähnlichen Bedingungen geprüft werden. Dazu wird die translatorische Eigendiffusion verschiedener Proteine, Ovalbumin (OVA), Rinderserumalbumin (BSA) und Immunglobulin G (IgG, in Form von  $\gamma$ -Globulin), gemessen. Diese Proteine kommen als natürliche Bestandteile, z.B. im Blutplasma, vor. Aus diesem Grund und wegen ihrer globulären Form gehören sie zu den präferierten Proteincrowdern.

Wesentlich häufiger werden allerdings künstliche Polymere wie Ficoll 70, Dextran oder Polyethylenglycol (PEG) als Crowdermedium verwendet.

In den verwendeten *in vitro*-Ansätzen sollte eine möglichst zellähnliche Umgebung geschaffen werden, in dem eine extrem hohe Konzentration an Crowder-Proteinen verwendet wurde. Um ein überfülltes Milieu zu erreichen, wurden 20-30% des Gesamtvolumens der Lösungen von Proteinen gefüllt, was einer Konzentration von bis zu 400 mg/ml entspricht.

Als Methode wurde die schon in der Einleitung vorgestellte Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) verwendet, eine etablierte Technik zur Untersuchung der Diffusion in offenen Lösungssystemen unter physiologischen Bedingungen [23, 38, 126].

Das in diesem Zusammenhang aufgebaute Messsystem wird in Abschnitt 3 beschrieben.

Molecular Crowding ist ein viel diskutiertes Thema, da es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine einheitlichen phänomenologischen Beobachtungen gibt. Um existierende Modelle mit Experimenten vergleichen zu können, werden jedoch quantitative Daten benötigt. Durch Gegenüberstellung von experimentellen Daten aus dieser Arbeit und Simulationen von Brownscher Dynamik wird versucht, eine Vorhersage über die möglichen Prozesse und verschiedenen Parameter zu machen, die in einer hochkonzentrierten Proteinlösung signifikant sind.

Die Simulationen zur Brownschen Dynamik wurden von Dr. Paolo Mereghetti aus der Arbeitsgruppe von Prof. Rebecca Wade (Molecular and Cellular Modelling Group, HITS gGmbH und Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

## 3. Experimenteller Teil und Methoden

In diesem Abschnitt werden der Aufbau des konfokalen Systems zur Durchführung der FCS-Messungen, die Probenvorbereitung, sowie das für die Simulationen verwendete Modell beschrieben. Vergleichsmessungen mit einem Dual-Fokus FCS Aufbau zur Validierung finden sich in Kapitel 3.5.

#### 3.1. Experimenteller Aufbau

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein FCS-Aufbau (Abb.2.6) entstanden. Der Aufbau umfasst zusätzlich zur Standard-Ausstattung einige optionale Erweiterungsmöglichkeiten. Diese beinhalten die Wahl der Lichtquellen und deren Steuerung über einen Akustooptischer Filter, engl. *Acousto-Optical Tunable Filter* (AOTF) sowie die Möglichkeit, fixierte Proben über einen Piezo-Tisch abzutasten.

Der aktuelle Mikroskopaufbau (Aufbau II) zur Durchführung der FCS für den ersten Teil der Arbeit ist in Abb. 3.1 schematisch gezeigt. Basis ist ein inverses Mikroskop (Axiovert S100 TV, Carl Zeiss Jena GmbH) mit Olympus Objektiv (UPlanSApo 60x, 1,2 NA, Wasserimmersion; Olympus Tokyo, Japan). Zusätzlich verfügt das System über einen Piezo-Tisch mit einer Kontrolleinheit (E300, Physik Instrumente (PI), Karlsruhe, Deutschland) die eine x-,y- und z-Positionierung der Probe ermöglicht.

Zwei orthogonal zueinander polarisierte, gepulste Laserdioden mit einer Emmisionswellenlänge von 640 nm von der Firma PicoQuant GmbH (Berlin) wurden in eine Faser-Einkopplungseinheit (FCU II- Fibre coupling unit) eingekoppelt [194] und in das System integriert. Der Mehrkanaltreiber (PDL808, Sepia, PicoQuant) ermöglicht die Ansteuerung der gepulsten Lichtquellen mit einer Repetitionsrate von bis zu 80 MHz. Das System wurde zusätzlich mit einem grünen Laserdiodenmodul (532 nm, cw, DPT-532-30G, Topag, Darmstadt), das ebenfalls in die Faser eingekoppelt wurde, erweitert. Der Anregungsstrahlengang wurde mit passenden Filtern zur Aufreinigung der Laserlinien ausgestattet (Laser Clean-up Filter z 640/10 und z 532/5, AHF, Analysetechnik, Tübingen). Das Faserende wurde über einen Kollimator (Linos, Göttingen) ausgekoppelt und durch einen Akustooptischer Filter, engl. Acousto-Optical Tunable Filter (AOTF) (AOTF.nC-VIS, AA Optoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich) geführt. Über die Frequenz der am AOTF angelegten Spannung ist ein Auswählen der transmittierten Laserlinien möglich. Zudem kann die gewünschte Laserintensität über die Spannungsamplitude reguliert werden. Der Strahlengang führt den Strahl 1.Ordnung auf einen Dichroiten (Dual Line Beam Splitter z 532/635, AHF, Analysentechnik, Tübingen), der das Anregungslicht auf das Objektiv lenkt.

Das aus der Probe stammende Fluoreszenzlicht passiert dasselbe Objektiv und den gleichen dichroitischen Spiegel wie zuvor bei der Anregung und trifft auf die Tubuslinse. Die Tubuslinse fokussiert das Emmissionslicht auf eine Lochblende mit 50 oder  $80 \,\mu\text{m}$  (Tab. 3.1). Nach der Lochblende wird das Fluoreszenzlicht über einen Langpass-



Abbildung 3.1.: Schematisch: Aktueller konfokaler Aufbau. Die Anregung erfolgt über fasergekoppelte Laserdioden, die nach der Auskopplung einen Akustooptischer Filter, engl. Acousto-Optical Tunable Filter (AOTF) passieren, über den die Intensität und Wellenlänge des transmittierten Lichtes ausgewählt werden kann. Über einen dichroitischen Spiegel wird das Laserlicht in das Objektiv gelenkt. Die aus der Probe stammende Fluoreszenz wird über dasselbe Objektiv gesammelt und vom Anregungslicht über den dichroitischen Spiegel getrennt. Die Tubuslinse fokussiert das Anregungslicht auf die Lochblende, um störende Hintergrundsignale zu verhindern. Danach wird es über eine Linse fokussiert und mittels eines Strahlteilers zur Detektion auf zwei Lawinenphotodioden gesendet.

Lochblende	Laserintensität $(\mu W)$ Strahlradius	
Aufbau I		
$50\mu\mathrm{m}$	$175\mu\mathrm{W}$	$(515\pm10)\mathrm{nm}$
$80\mu{ m m}$	$175\mu\mathrm{W}$	$(590\pm30)\mathrm{nm}$
Aufbau II AOTF		
50 μm	$65\mu\mathrm{W}$	$(518 \pm 10) \mathrm{nm}$
$80\mu{ m m}$	$100\mu W$	$(580\pm20)\mathrm{nm}$

Tabelle 3.1.: Die verwendeten Lochblenden und Laserintensitäten mit den daraus resultierenden charakteristischen  $(1/e^2)$ -Ausdehnungen des gaußförmigen Fokus.

und einen Emmissionsfilter (HQ 645 LP, HQ 675/50, AHF) nochmals aufgereinigt. Das Signal wird über eine weitere Linse fokussiert und über einen 50:50 Strahlteilerwürfel (Linos) auf die optisch aktive Fläche der Detektoren gelenkt. Detektiert wird das Fluoreszenzsignal mit zwei APDs (Optoelectronics Perkin-Elmer, Kanada) im selben Abstand und kann mittels Korrelatorkarte ALV 5000/E (ALV GmbH,Langen) miteinander korreliert werden.

Für die Messungen wurde die parallel zur optischen Achse polarisierte 640 nm Laserdiode verwendet. Der Durchmesser der Lochblende betrug entweder  $50 \,\mu\text{m}$  oder  $80 \,\mu\text{m}$ und die verwendete Laserintensität lag im Bereich von  $65\text{-}175 \,\mu\text{W}$  (siehe Tab.3.1). Dabei wurde die Intensität immer vor dem dichroitischen Spiegel (Dual Line Beam Splitter z 532/635, AHF, Analysentechnik, Tübingen) gemessen.

Die laterale Ausdehnung wurde in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Justierungen der Lochblenden über Kalibrierungsmessungen des freien Farbstoffs Atto655 mit Carboxygruppe (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland), der einen bekannten Diffusionskoeffizienten, wie in [103] nachzulesen, von  $D = (4, 26 \pm 0, 08) \cdot 10^6 \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$  aufweist, (vgl. Tab.3.1) bestimmt.

Dabei ist zu beachten, dass erst im Laufe der Arbeit der Kollimator und ein AOTF in den Anregungstrahlengang integriert wurden, der die Faserauskopplung über zwei Teleskope abgelöst hat (Aufbau I). Die Systemparameter wurden beim Umbau so angepasst, dass die konfokalen Volumina vergleichbar sind. Dies ist der wichtigste Parameter um später den Diffusionskoeffizienten aus den gemessenen Diffusionszeiten zu bestimmen. Die Laserintensität sowie Lochblendendurchmesser und die entsprechenden Strahltaillien sind in Tab. 3.1 zu finden.

#### 3.2. Datenanalyse

Für die Analyse der Korrelationskurven wurde mit Origin (OriginLab,USA) eine Modellfunktion mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus an eine aus 10 Einzelmessungen gemittelte Autokorrelationskurve angepasst. Der Fehler des Diffusionskoeffizienten wurde zunächst über Gaußsche Fehlerfortpflanzung aus dem Fehler des Strahlradius  $w_0$  und dem Anpassungsfehler der Diffusionszeit  $\tau_D$  bestimmt. Da dieser Fehler allerdings den eigentlichen Systemfehler aufgrund von Brechungsindexunterschieden und Autofluoreszenz der Proteine bei weitem unterschätzt (siehe Abschnitt 3.5), wurde noch eine Werteungenauigkeit von 10%angenommen.

Für die mit Atto633 markierten Proteine wurde als Anpassungsmodell eine freie dreidimensionaler Diffusion mit Triplettkorrektur verwendet (siehe Abschnitt.2).

$$G(\tau) = G_{\text{Trip}}(\tau)G_D(\tau) \tag{3.1}$$

mit der Korrektur der Triplettrelaxation:

$$G_{\rm Trip} = \left[1 - T + T e^{\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right)}\right]$$
(3.2)

und einen translationsabhängigen Term:

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left( \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left[\tau/\left(k^2 \tau_D\right)\right]}} \right)$$
(3.3)

#### 3.3. Modellbeschreibung

Dynamische und strukturelle Eigenschaften von Protein-Lösungen können durch Modelle beschrieben und vorhergesagt werden. Die in dieser Arbeit dargestellten Modellergebnisse zur Eigendiffusion von Proteinen hat Paolo Mereghetti (Molecular and Cellular Modelling Group, HITS GmbH) erarbeitet und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Auf der Basis der Brownschen Dynamik (BD)-Methode haben Mereghetti und Mitarbeiter ein Modell für die Simulation vieler Makromoleküle  $(10^2 - 10^3)$  entwickelt, das detaillierte atomare, starre Körper in einem Kontinuum aus Lösungsmittel in einem periodischen Potential verwendet. Basis für die Simulation der Proteine sind die in 3.4.2 gezeigten Kristallstrukturen. Mit dem Modell können Kollisionen zwischen Lösungsmittelmolekülen und Proteinen und Protein-Protein-Wechselwirkungen berücksichtigt werden [195].

Die Kräfte wurden über ein numerisches Verfahren (Finite-Differenzen-Methode) zur Bestimmung der paarweisen freien Energie  $\Delta G^{1-2}$  der Wechselwirkungen zwischen Proteinen berechnet. Dies geschah unter Berücksichtigung elektrostatischer Terme, nicht polarer Wechselwirkung und repulsiver Potentiale (*soft-core* Modell):

$$\Delta G^{1-2} = \frac{1}{2} \sum_{i_2} \Phi_{\text{el}_1}(\mathbf{r}_{i_2}) \cdot q_{i_2} + \frac{1}{2} \sum_{j_1} \Phi_{\text{el}_2}(\mathbf{r}_{j_1}) \cdot q_{j_1} + \sum_{i_2} \Phi_{\text{edes}_1}(\mathbf{r}_{i_2}) \cdot q_{i_2}^2 + \sum_{j_1} \Phi_{\text{edes}_2}(\mathbf{r}_{j_1}) \cdot q_{j_1}^2 + \sum_{m_2} \Phi_{\text{npdes}_1}(\mathbf{r}_{m_2}) \cdot A_{m_2} + \sum_{n_1} \Phi_{\text{npdes}_2}(\mathbf{r}_{n_1}) \cdot A_{n_1} + \sum_{m_2} E_{\text{softcore}_1}(\mathbf{r}_{m_2}) + \sum_{n_1} E_{\text{softcore}_2}(\mathbf{r}_{n_1})$$
(3.4)

Wobei  $\Phi$  die Wechselwirkungspotentiale, q die effektive Ladung, A die Lösungsmittel zugänglichen Oberflächen,  $E_{\text{softcore}}$  die *soft-core* Abstoßungsenergien und **r** die Atom-

koordinaten sind. Über  $\Phi_{\text{edes}_i}$  wird die elektrostatische Solvatationsenergie unter Berücksichtigung der Wechselwirkung elektrischer Ladungskräfte des einen Proteins mit Proteindipolen des anderen sowie nicht polarer Wechselwirkungen  $\Phi_{\text{npdes}_i}$  beschrieben. Details finden sich in [195, 196].

Für die BD-Simulationen wurden 250 Protein-Moleküle mit zunächst zufälliger Positionierung in einem rechteckigen Kasten mit periodischen Randbedingungen bei 300 K angesetzt. Die Kastengröße wurde der Konzentration der Proteinlösung angepasst und variierte entsprechend.

Hydrodynamische Wechselwirkungen wurden unter Verwendung der Molekularfeldtheorie berücksichtigt. Bei diesem Verfahren wird ein isotroper Kurzzeit-Translations-Diffusionkoeffzient $(D_{kurz}^t)$  einem bestimmten Typ von Protein zugeordnet und unter Berücksichtigung des durch Proteine besetzten lokalen Volumenanteils  $(\phi_i)$  neu skaliert. Dieser Wert wird dann für die Aktualisierung der Protein-Position eingesetzt.

Die verwendeten Ergebnisse nach dem Modell von Tokuyama und Mitarbeiter [197, 198] gehören ebenfalls zu den von Paolo Mereghetti zur Verfügung gestellten Daten. Entwickelt wurde das Modell, um die Eigendiffusion von Biomolekülen in Lösung zu beschreiben und zwar unter Verwendung eines repulsiven Potentials und unter Berücksichtigung hydrodynamischer Wechselwirkung. Dabei wird zwischen einem Langzeit-Diffusionskoeffizienzten und einem Kurzzeit-Diffusionskoeffizienten unterschieden. Makroskopisch messbare Größen liegen im Bereich des Langzeit-Diffusionskoeffizienztens:

$$D_{\text{lang}}^{t}(\phi) = \frac{D_{\text{kurz}}^{t}(\phi)}{1 + \kappa H(\phi) \left(\frac{\phi}{\phi_c}\right) \left(1 - \frac{\phi}{\phi_c}\right)^{-2}}$$
(3.5)

 $\phi_c = (4/3)^3/(7 \ln 3 - 8 \ln 2 + 2)$  ist ein fiktiver singulärer Punkt und wird durch Kurvenanpassung bestimmt. Unter Berücksichtigung eines repulsiven Potentials ist  $\kappa=2$ .  $\phi = \pi \sigma^3 N/6V$  ist der Volumenanteil, wobei N die Gesamtzahl der Teilchen und V das Gesamtvolumen des Systems sind.  $\sigma$  ist eine positive Konstante, die aus der Potentialbeschreibung hervorgeht. Der Kurzzeit-Diffusionskoeffizient lässt sich analytisch für harte Kugeln lösen, zur Validierung wurden unabhängige Molekularer Dynamik (MD) und Brownscher-Dynamik (BD) Simulationen durchgeführt [197, 198].

#### 3.4. Material

#### 3.4.1. Probenvorbereitung

Die verwendeten Proteine wurden von der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim bezogen. Dabei wurden die Proteinlösungen ohne weitere Aufreinigung durch Lösen in 1 ml phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) entsprechend im Konzentrationsbereich von 200-400 mg hergestellt. Diese unmarkierten Proteine in Lösung bilden die Crowder-Lösung. Die markierten Proteine wurden unspezifisch über ihre Aminogruppen mit Atto633-N-Hydroxysuccinimid (NHS) Ester (ATTO-TEC GmbH, Siegen) markiert und werden als Tracer bezeichnet. Der getrocknete Farbstoff wurde in N,N-Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich, Steinheim) immer auf eine Ausgangslösung von 2 mg/ml gebracht (c=2,67 mmol/l). Für alle Markierungen wurde eine 2 mg/ml Proteinlösung mit 0,01 M PBS-Puffer (pH 7,4) hergestellt und ein fünfacher Farbstoffüberschuss verwendet. Um eine optimale Kopplung zu erreichen empfiehlt der Hersteller einen pH-Wert von 8,0 - 9,0. Für  $\gamma$ -Globulin wurde der pH-Wert auf 8,3 gebracht. Dazu wurde eine 0,1 M Natriumcarbonat Pufferlösung zum Markierungsansatz dazugegeben. Für den Markierungsansatz der anderen Proteine wurde nur 0,01 M PBS (pH 7.4) verwendet, da eine Erhöhung des pH-Wertes zu einem zu hohen Markierungsgrad, engl. degree of labelling (DOL) von bis zu 25 geführt hat. Messungen wurden mit einem DOL von bis zu 5 durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 1,5 Stunden (mit Natriumcarbonat) bzw. für 3 Stunden (mit PBS) bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und alle 30 Min geschwenkt. Durch einen Gravitationsfluss wurde der freie Farbstoff vom markierten Protein getrennt. Dazu wurden nach Umpuffern der Säule mit 10 ml PBS  $250\mu$ l der Reaktionslösung +  $250\mu$ l PBS über eine mit Sephadex G-25 gefüllten NAP-5 Säule (NAP<sup>TM</sup>-5 Column, GE Healthcare, Freiburg) geschickt und mit 750µl PBS eluiert. Die Konzentration der markierten Proteine wurde über die Absorption mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten (aus Datenblatt, Tabelle 3.2) bei 280 nm bestimmt (siehe Markierungsprotkoll [199] S.69-71).

Zu Beginn der Messungen wurden 8-Kammer-Deckgläser (Lab-Tek<sup>TM</sup>) der Firma Nunc (Thermo Fisher Scientific) benutzt. Diese besitzen ein Deckglas der Stärke 170 µm als Boden. Darin wurden Proteinlösung mit einem Gesamtvolumen von 310µl vermessen. Im Verlauf der Arbeit wurde auf 384-Wellenplatten (Greiner Bio-One, Germany) mit 175 µm dickem Glasboden gewechselt. Da hier das benötigte Mindestvolumen wesentlich kleiner ist, war ein Ansatz von 31 µl ausreichend.

Um eine unspezifische Absorption der Proteine an der Glasoberfläche zu verhindern, wurde die Oberfläche der Kammern mit PLL-g-PEG (Poly(L-Lysin) und Poly(Ethylen Glykol), SuSoS AG, Schweiz) beschichtet (Für eine Beschreibung und Oberflächenherstellung siehe [200] mit einer 1:5 Extran Lösung zu Oberflächenreinigung und - aktivierung; Abschnitt 3.6.4).

Die Proben wurden aus folgenden Materialien erstellt:

- Albumin chicken egg grade V (A5503) hier OVA
- Gamma-globulins from bovine blood (G5009) hier  $\gamma$ -Globulin <sup>1</sup>
- Albumin bovine (A7030) hier BSA
- Ficoll (R) PM 70 (F2878) hier Ficoll 70
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (MO D8537) hier PBS

#### 3.4.2. Proteinstukturen

In Abb.3.2 sind die Kristallstrukturen der in dieser Arbeit verwendeten Proteine,  $\gamma$ -Globulin, Ovalbumin (OVA) und Rinderserumalbumin (BSA) gezeigt auf deren Basis die BD-Simulationen aufgebaut sind.  $\gamma$ -Globulin ist eine Mischung aus drei Immunoglobinen, mit 80% ist Immunglobulin G (IgG) der Hauptbestandteil. Die verwendeten Moleküle gehören zu der Klasse der globulären Proteine. Die Angabe über den hydrodynamischen Radius ist aus Tabelle 3.2 zu entnehmen. Jedes der Proteine weist

 $<sup>^1\</sup>mathrm{Der}$  Hauptbestandteil von  $\gamma\text{-}\mathrm{Globulin}$  ist IgG (80%), dann folgen IgM (10%), und IgA (<10%).



Abbildung 3.2.:	${\rm Kristall strukturen} \; {\rm der}$	verwendeten	Proteine: Ovalbu	umin (OVA) [201],
	Rinderserumalbumin (	(BSA) [202],	Immunglobulin (	G (IgG) [203].

MW	$E_{280}^{1\%}$	r <sub>H</sub>
[kDa]	200	[nm]
66	6,67	$3,2-3,7^{-1}$
155	14	5,29-5.41 <sup>2</sup>
44	6,9-7,6	$2,8-3,1^{-1}$
70		$^{5,5}$
	MW [kDa] 66 155 44 70	$\begin{array}{c c} \text{MW} & E_{280}^{1\%} \\ \hline \text{[kDa]} & & \\ \hline 66 & 6,67 \\ 155 & 14 \\ 44 & 6,9\text{-}7,6 \\ \hline 70 & & \\ \end{array}$

<sup>2</sup> [205] \*bezogen <sup>3</sup> [126]

Tabelle 3.2.: Molekulargewicht, Extinktion und hydrodynamischer Radius der verwendeten Proteine.

jedoch eine einzigartige Struktur auf. Ovalbumin (OVA) wird als am kugelähnlichsten beschrieben, Rinderserumalbumin (BSA) bildet eine herzförmige Struktur und  $\gamma$ -Globulin bzw. der Hauptbestandteil Immunglobulin G besitzt eine Y-ähnliche Struktur.

#### 3.5. Vorarbeiten: Charakterisierung des Messsytems im Vergleich zum Dual-Fokus FCS Systems

#### 3.5.1. Experimentelle Vorarbeiten

Zur Charakterisierung des Standard-FCS System wurden Vergleichsmessungen mit einem Dual-Fokus FCS Aufbau durchgeführt. Bei dieser Technik werden zwei lateral versetzte Laserfoki erzeugt mit einem festen Abstand im Bereich von etwa 400 nm. Ist der Abstand bekannt lässt sich dieser als externer Maßstab verwenden. Die Auto-Korrelations-Funktion für jeden Fokus und die Kreuz-Korrelations-Funktion zwischen den beiden Foki werden durch die Verwendung eines einfachen zwei-Parameter Modell beschrieben. Mit einer Software-Routine lassen sich über das Dual-Fokus System direkt absolute Diffusionskoeffizienten bestimmen [92, 206]. Die Dual-Fokus FCS Messungen wurden an einem konfokalen Mikroskop der Firma PicoQuant (MicoTime200-System; Inverse Time-resolved Fluorescence Microscope) im Labor von Prof. Dr. Jörg Enderlein in Göttingen durchgeführt. Zur Kurvenanpassung der Korrelationen wurde eine MatLab-Auswertroutine verwendet, die auf Anfrage von Jörg Enderlein zur Verfügung gestellt wurde. Eine ausführliche Anwendungsbeschreibung für die Auswertroutine und die Mikroskopsteuerung sind über den Mikroskopsystem-Hersteller erhältlich.

Für die Systemvalidierung wurde eine möglichst einfaches Modellsystem gewählt: Die Diffusion von freien Farbstoff (Atto655COOH, 5nM) in einem häufig verwendeten Crowder, dem Zuckerpolymer Ficoll 70. In Abhängigkeit der Ficoll 70 Konzentration wurde eine Messreihe von 0 mg/ml bis 400 mg/ml in 11 Schritten mit einer festen Farbstoffkonzentration von 5 nM mit beiden Systemen vermessen. Für das Standard System können die Diffusionskoeffizienten nur über die Abschätzung des Strahlradius und der gemessenen Diffusionszeit bestimmt werden (siehe 3.1). Für die Kurvenanpassung wurde für beide Systeme ein einfaches Diffusionsmodel in drei Dimensionen verwendet (3.3). Die aus den Messungen resultierenden translatorischen Diffusionskoeffizienten mit Fehlern sind in Abb. 3.5 in Abhängigkeit der Ficoll 70 Konzentration für beide Messsysteme dargestellt. Grüne Kreise repräsentieren die Messungen am Dual-Fokus-System und schwarze Quadrate die Datenpunkte aus dem neuaufgebauten Standard-FCS System. Jeder grüne Datenpunkt wurde aus einer 180s Messung an dem Dual-Fokus-Sytem generiert. Für das Standard System wurde je Datenpunkt 10 Messungen zu 60s aufgenommen und der Mittelwert zur Datenanalyse verwendet. Die Fehlerabschätzung ist in 3.5 und 3.2 beschrieben.

Abb. 3.3 zeigt die Autokorrelationskurve für Ficoll 70 bei 400 mg/ml in Schwarz und die verwendete Anpassungsfunktion für freie Diffusion in Rot. Oben rechts ist ein Zoombereich zwischen 5-150 ms eingetragen. Die Anpassungsfunktion weist in diesem Bereich Abweichungen von der idealen Passform auf.

Im Vergleich dazu ergibt sich aus der Matlab Auswertroutine für die Dual-Fokus FCS Messungen bei gleich hoher Konzentration an Ficoll 70 die in Abb. 3.4 gezeigte Kurvenanpassung.

Über die 2fFCS-Auswertung erhält man den Diffusionskoeffizienten direkt als Parameter aus der Kurvenanpassung. Für das Standard-Verfahren wurde D über  $D = \frac{w_0}{4\tau_D}$ bestimmt. Dabei wurde  $w_0$  vorher aus Kalibierungsmessungen ermittelt. In Abb. 3.5 ist der Diffusionskoeffizient über die Ficoll 70-Konzentration aufgetragen und fällt mit steigender Konzentration für beide Messsysteme gleichermaßen ab. Im Rahmen ihrer Messgenauigkeit stimmen die Werte überein.

#### 3.5.2. Diskussion Vorarbeiten

Zu Vergleichszwecken wurden an einem Dual-Fokus FCS System die Diffusionskoeffizienten für die freie Diffusion von Atto655-COOH in Abhängigkeit von der Ficoll 70 Konzentration im Bereich von 0-400 mg/ml gemessen. In gleicher Weise wurden diese Experimente auch an dem für diesen Teil der Arbeit aufgebauten Messsystem durchgeführt. Die Autokorrelationsfunktionen der Standard-FCS Messungen zeigen Abweichungen bei der Kurvenanpassung für hohe Ficoll-Konzentrationen. Die Analyse der Dual-Fokus FCS Messungen zeigt, im Vergleich zum Standard-System, auch bei hohen Konzentrationen keine Unterschiede in der Anpassungsqualität. Dennoch stimmen die Werte für die Diffusionskoeffizienten im Rahmen der Messgenauigkeit sehr gut überein. Damit scheint das Standard-FCS-System dafür geeignet zu sein, quantitative Daten über den Diffusionskoeffizienten zu liefern. Aus diesem Grund wurde entschieden, das



Abbildung 3.3.: Gemittelte Autokorrelationskurve aus 10 gemessenen Korrelationskurven und die dazugehötige Anpassung in Rot. Oben rechts: Zoombereich für 5-150 ms



Abbildung 3.4.: Dual Focus FCS Kurven für Atto655COOH in einer 400 mg/ml Ficoll-Lösung. Autokorrealationskurven (Blau/Grün) der unabhängigen Foki und Kreuzkorrelation (Rot) wurden mit einer für 2fFCS erweiterten Modelanpassung. Farblich unterschiedliche offene Kreise sind die Messwerte für die jeweiligen Foki.



Abbildung 3.5.: Vergleich der Diffusionskoeffizienten für den freien Frabstoff Atto655COOH in einer Lösung aus Ficoll 70 bis zu einer Endkonszentration von 400 mg/ml. Schwarze Datenpunkte stammen vom Standard-FCS Aufbau, wohingegen grüne mit einem Dual-Fokus Aufbau angenommen wurden.

Molecular Crowding mit dem selbst aufgebauten System zu untersuchen.

## 4. Ergebnisse

Die Beschreibung von Proteindiffusion in zellähnlichen Umgebungen ist bis jetzt nur unzureichend verstanden.

Im folgenden Abschnitt soll daher untersucht werden, ob sich Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie prinzipiell eignet, um die Diffusionseigenschaften von Proteinen in physiologisch relevanten Proteinkonzentrationen bis zu 400 mg/ml zu untersuchen.

Bei den ausgeführten Studien werden die translatorischen Diffusionskoeffizienten von drei globulären Proteinen in Abhängigkeit der Konzentration in der jeweiligen Proteinlösung untersucht. Für den späteren Modell-Vergleich wurden die experimentellen Daten von  $\gamma$ -Globulin und BSA verwendet und mit Simulationen von Brownscher Dynamik verglichen.

#### 4.1. Eigendiffusion von OVA, BSA und $\gamma$ -Globulin

Als erstes wurde die Eigendiffusion von OVA, BSA und  $\gamma$ -Globulin gemessen. Als Tracer, d.h. zu beobachtendes, markiertes Molekül, wurden jeweils mit Atto633 gekoppeltes OVA, BSA und  $\gamma$ -Globulin verwendet. Bezogen auf den Farbstoff wurde eine feste Konzentration zwischen 17-55 nM an markiertem Protein in einer Lösung aus dem jeweiligen unmarkierten Protein mittels FCS vermessen. OVA-633 wurde in einer Konzentrationsreihe bis 400 mg/ml angesetzt. Für BSA wurde eine Maximalkonzentration von 300 mg/ml gewählt. Da  $\gamma$ -Globulin bei dem gewählten pH-Wert am schlechtesten löslich ist, konnte hier nur eine Lösung mit maximal 200 mg/ml hergestellt werden.

Die aus den Konzentrationsreihen gemessenen Autokorrelationskurven wurden mit einem einfachen 3D Modell mit Triplett angepasst und die Diffusionszeiten in Diffusionskoeffizienten umgerechnet, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. In Abb.4.1 wurden die resultierenden normierten Diffusionskoeffizienten über die entsprechende Proteinkonzentration aufgetragen. Bei der Normierung wurde durch den Diffusionskoeffizienten des markierten Tracers in PBS geteilt. Eventuelle Änderungen des Diffusionskoeffizienten durch leichte Temperaturunterschiede sollen so keinen Einfluss auf die Vergleichbarkeit haben. Wenn der hydrodynamische Radius unabhängig von der Konzentration ist, sollte auch diese damit keinen Einfluss mehr haben. Die grauen Dreiecke beschreiben die normierten Diffusionskoeffizienten von  $\gamma$ -Globulin-633 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Die roten Kreise entsprechen BSA-633 und die orangenen Quadrate OVA-633 in Abhängigkeit der Proteinkonzentration.

Der Diffusionskoeffizient fällt für alle Proteine mit zunehmender Konzentration an Hintergrund-Proteinen ab. Dabei zeigen OVA und BSA einen ähnlichen Verlauf von 1 bis 0,2. Für  $\gamma$ -Globulin zeigt sich ein nahezu linearer schneller Abfall bis hin zu etwa 0,2 bei der maximalen Proteinkonzentration von 200 mg/ml. Im gleichen Konzentrationsbereich fallen BSA und OVA dagegen für 200 mg/ml Protein auf nur etwa 0,46.



Abbildung 4.1.: Normierte Diffusionskoeffizienten zur Untersuchung der jeweiligen Eigendiffusion von OVA-633 in OVA (orangene Quadrate), BSA-633 in BSA (rote Kreise) und  $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin (graue Dreiecke) in Abhängigkeit ihrer Konzentration.

Ein kleiner Diffusionskoeffizient entspricht einer langsameren Diffusionszeit. Es zeigt sich, dass OVA und BSA in ihrem Diffusionsverhalten ähnlich sind und im Rahmen ihrer Messgenauigkeit sogar übereinstimmen, im Gegensatz zu  $\gamma$ -Globulin. Die Ergebnisse decken sich mit den von Muramatsu und Minton 1988 [207] angegebenen Daten für BSA. Dort beobachteten sie auch, dass der Abfall der normierten Diffusionskoeffizienten für markiertes BSA in BSA (200 mg/ml) etwa im selben Verhältnis abnimmt wie in den vorliegenden Messungen, d.h. etwa um das Vierfache im Bezug auf die Diffusionskonstante in Puffer  $D/D_0 = 0, 25$ . Für drei der vier untersuchten Proteine in ihrer Studie fanden sie, desto größer der Tracer ist, umso größer ist die Abnahme des normierten Diffusionskoeffizienten und umso kleiner die Hintergrund-Spezies, desto stärker die Abnahme des Diffusionskoeffizienten mit zunehmender Crowder-Konzentration stärker vom Tracer geprägt.

#### 4.2. Diffusion im Vergleich: BSA und $\gamma$ -Globulin

Um zu klären, ob der Unterschied zwischen  $\gamma$ -Globulin und BSA bzw. OVA aufgrund einer Tracer- oder Crowder-Abhängigkeit entsteht, sollte die Diffusion von  $\gamma$ -Globulin-633 in einer BSA-Lösung und BSA-633 in einer  $\gamma$ -Globulin Lösung verglichen werden. BSA-633 wurde in  $\gamma$ -Globulin (0-200 mg/ml) und  $\gamma$ -Globulin in BSA (0-400 mg/ml) gemessen. Die höhere Konzentration von BSA sollte zum einen zeigen, ob die Kon-



Abbildung 4.2.: Normierte Diffusionskoeffizienten zur Untersuchung der Crowder-Tracer Abhängikeit mit BSA-633 in BSA (0-300 mg/ml)(Rot gefüllte Kreise),  $\gamma$ -Globulin in BSA (0-400 mg/ml)(graue offene Kreise) und  $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin (Grau gefüllte Dreieicke) (0-200 mg/ml), sowie BSA-633 in  $\gamma$ -Globulin (0-200 mg/ml) (rote offene Dreieicke).

zentration einen Effekt auf die Diffusion hat und zum anderen wird der Vergleich der Datenpunkte übersichtlicher, wie sich beim Vergleich der Eigendiffusion von OVA und BSA gezeigt hat. Für  $\gamma$ -Globulin wurde die Maximalkonzentration aus zuvor genannten Gründen beibehalten.

Die Abb.4.2 zeigt die Ergebnisse der Eigendiffusion von  $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin und BSA-633 in BSA im Vergleich zu  $\gamma$ -Globulin-633 in BSA und BSA-633 in  $\gamma$ -Globulin. Auch hier wurde wieder die Darstellung der normierten Diffusionskoeffizienten gewählt. Wurde BSA-633 als Tracer benutzt wird dies durch rote Symbole gekennzeichnet. Bei grauen Symbolen ist  $\gamma$ -Globulin-633 der Tracer. Runde Symbole zeigen, dass es sich um BSA als Crowder handelt und Dreiecke bedeuten, dass als  $\gamma$ -Globulin als Crowder verwendet wurde.

 $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin und BSA-633 in  $\gamma$ -Globulin fallen beide von 1 auf 0,2 in einem Konzentrationsbereich von 0-200 mg/ml ab. Dieses Verhalten zeigen BSA-633 in BSA und  $\gamma$ -Globulin-633 in BSA für einen Konzentrationsbereich von 0-300 mg/ml. Die Abnahme des Diffusionskoeffizienten auf einen festen Wert von 0,2 ist damit in dieser Studie stärker Crowder-abhängig.

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen Crowder und Tracer auftreten, deren Auswirkungen von Art des Lösungsmittels, der Konzentration der Hintergrund-Spezies und weiterer Parameter wie der Temperatur, dem pH-Wert oder der Ionenstärke abhängen. Bis auf die Konzentration sind die restlichen Parameter im Experiment vergleichbar. Vermutlich haben daher vor allem repulsive und hydrodynamische Wechselwirkungen entscheidende Auswirkungen auf die translatorische Diffusion.

# 4.3. Vergleich der Diffusionskoeffizienten von OVA, BSA und $\gamma$ -Globulin mit einem etablierten analytischen Modell

Zur theoretische Beschreibung der Eigendiffusion von Biomolekülen in Lösung kann ein analytisches Modell verwendet werden (siehe Abschnitt 3.3, [197, 198]), das repulsive Potentiale und hydrodynamische Wechselwirkungen auf kurzen Zeitskalen berücksichtigt. Die Proteinlösung wird dabei als monodisperses System von sphärischen kolloidalen Teilchen angesehen, aus denen sich über Lösung analytischer Gleichungen ein Kurzzeit- und Langzeit-Eigendiffusionskoeffizient ergibt.

In Abb. 4.3 ist das theoretische Modell als schwarze Linie eingetragen und zeigt die normierten Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Die Konzentration wurde über den Volumenanteil bestimmt, den jedes Molekül in Abhängigkeit seines Volumens besetzt. Zusätzlich sind noch die experimentellen Daten der Eigendiffusion von OVA (orangene Quadrate), BSA (rote Kreise) und  $\gamma$ -Globulin (graue Dreiecke) gezeigt.

Die theoretischen Werte und die experimentellen Daten von OVA und BSA beschreiben einen ähnlichen Verlauf. Der Abfall des Diffusionskoeffizienten wird durch das Modell daher gut wiedergegeben. Für  $\gamma$ -Globulin gibt es deutliche Abweichungen. Deshalb wurde für die folgenden Simulationen von Brownschen Dynamik die Eigendiffusion auf Grundlage der Kristallstrukturen von IgG und BSA durchgeführt.



Abbildung 4.3.: Normierte Diffusionskoeffizienten zur Untersuchung der jeweiligen Eigendiffusion. Experimentelle Daten aus 4.1 von OVA-633 in OVA (orange Quadrate), BSA-633 in BSA (rote Kreise) und  $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin (graue Dreiecke) und das analytisch von Tokuyama [197, 198]) gelöste Modell für harte Kugeln (schwarze Kurve).

#### 4.4. Vergleich mit modellierten Daten

Für die vergleichenden BD-Simulationen wurden drei Modelle mit unterschiedlichen Wechselwirkungspotententialen getestet. Diese sind in verschieden Farben in der Grafik 4.4 dargestellt:

- I ) In blau wird Brownsche Dynamik mit direkter und hydrodynamische Wechselwirkungen angenommen.
- II ) Cyanfarbene Kreise stellen Brownsche Dynamik mit direkter Wechselwirkung ohne hydrodynamische Wechselwirkung dar.
- III ) In grün wird ein einfaches soft-core Potential vorausgesetzt.

In der Abbildung 4.4 A) wurde für die Simulation des translatorischen Diffusionskoeffizienten die Struktur von BSA zu Grunde gelegt und mit den unterschiedlichen Wechselwirkungen berechnet. Die roten Kreise repräsentieren die gemessenen Werte für BSA in 300 mg/ml BSA Lösung. Vergleichend daneben die Simulationen für  $\gamma$ -Globulin. Die zu Grunde gelegte Struktur ist Immunglobulin G, auch hier sind die gemessenen Daten über die Proteinkonzentration aufgetragen. Für beide ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit einem einfachen *soft-core* Potential. Im Fall von BSA überschätzen beide Ansätze mit zusätzlichen Wechselwirkungspotentialen die Abnahme der Diffusion bei Zunahme der Konzentration. Für IgG stimmen die Modelle ohne hydrodynamische Wechselwirkung im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Auch hier passt das Modell mit hydrodynamischer Wechselwirkung am schlechtesten.

Die Minderung der translatorischen Diffusion ist also scheinbar unabhängig von hydrodynamischen Wechselwirkungen.



Abbildung 4.4.: Normierte translatorische Diffusionskoeffizienten A) BSA-633 in BSA (0-300 mg/ml, rote Kreise) und B)  $\gamma$ -Globulin-633 in  $\gamma$ -Globulin (0-200 mg/ml, graue Dreiecke) mit den drei Simulationsmodellen Brownsche Dynamik mit voller Wechselwirkung und hydrodynamischer Interaktion (blau), Brownsche Dynamik mit voller Wechselwirkung ohne hydrodynamische Interaktion (cyan), Brownsche Dynamik als *softcore* Modell (grün).

## 5. Diskussion

In den vorangegangenen Experimenten wurden die Translationskomponeten der Diffusion von den Proteinen Ovalbumin (OVA), Rinderserumalbumin (BSA) und  $\gamma$ -Globulin<sup>1</sup> (IgG) untersucht und mit Simulationen von Brownscher Dynamik (BD) verglichen. Dazu wurden mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) die Diffusionskoeffizienten D ermittelt und als normierte Werte D/D<sub>0</sub> in Abhängigkeit der Proteinkonzentration dargestellt. Der Normierungsfaktor D<sub>0</sub> ist der Tracer-Diffusionskoeffizient in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Eine derartige Darstellung ermöglicht einen unabhängigen Vergleich bei eventuellen Temperaturschwankungen an unterschiedlichen Messtagen.

Die Ergebnisse der FCS Messungen für die Eigendiffusion von  $\gamma$ -Globulin, BSA und OVA zeigen eine deutliche Abnahme des Diffusionskoeffizienten bei Zunahme der Proteinkonzentration. Diese Ergebnisse stehen mit in der Literatur beschriebenen experimentellen Studien und Computersimulationen unter anderem von [32, 126, 198, 208– 210] im Einklang. Eine einheitliche Theorie, die dieses Verhalten für alle Proteine erklärt oder vorhersagen kann, konnte noch nicht gefunden werden. Die Beschreibung des Diffusionsverhaltens erfolgt oft über empirische Parameter aus einer gestreckten exponentiellen Anpassungsfunktion. Grundlage dafür ist, dass die thermodynamischen Daten quantitativ durch einfache geometrische Modelle beschrieben werden können, die nur die Existenz von Kurzstrecken-Abstoßung zwischen Makromolekülen voraussetzten [126, 207, 211]. Ein analytisches Modell, das auf der Basis harter Kugeln gelöst werden konnte [197, 198], gibt die Eigendiffusion von globulären Proteinen wie BSA und OVA ([208]) in stark konzentrierter Umgebung gut wieder. Die Abweichungen für  $\gamma$ -Globulin von den Modellrechnungen lassen sich am ehesten durch den Umrechnungsmodus erklären, der notwendig ist, um modellierte Volumenanteile in vergleichbare Konzentrationen von Messdaten zu transformieren.

#### Vergleich mit BD-Simulationen

Ein Höchstmaß an Genauigkeit bieten Simulationen der Brownschen Dynamik (BD) von einzelnen Molekülen, die die Regulierung einer Vielzahl von Parametern zulassen, z.B. pH-Wert, Ladungsverteilungen, Temperatur und Konzentration [12, 195]. Es können unterschiedliche Potentiale und hydrodynamische Wechselwirkungen berücksichtigt werden sowie Modelle als harte oder weiche Kugeln. Allerdings ist damit auch ein erheblicher Rechenaufwand verbunden. Zudem gibt es auch hier, wie bei allen Modellen, die Limitierung durch Randbedingungen. Insbesondere bei Systemen, die nicht eine einfache Struktur, wie die der harten Kugel mit einfacher repulsiver Abstoßung, haben, bietet es die Möglichkeit, theoretische Rückschlüsse auf das Verhalten einzelner Moleküle zu ziehen. Um die Modelle zu validieren, wurden im Rahmen dieser

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Hauptbestandteil IgG

Arbeit experimentelle Daten für  $\gamma$ -Globulin und BSA den entsprechenden Simulationen der Modelle gegenübergestellt. Die modellierten Daten von Paolo Mereghetti zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentell ermittelten Daten. So können die experimentellen Studien die BD Simulationen begleiten – ein wichtiger Aspekt, um theoretische und experimentelle Daten zu verstehen. Die experimentellen Daten eignen sich zur Modellvalidierung, im gleichen Maße aber können Simulationen experimentelle Defizite aufdecken, wie z.B. systematische Fehler.

Im Rahmen dieser Arbeit bestätigen die Modellierungen, dass es sich bei der gemessenen stärkeren Abnahme des Diffusionskoeffizient bei Zunahme der  $\gamma$ -Globulin Konzentration um einen tatsächliche Unterschied zu BSA und OVA handelt und nicht nur um ein Artefakt der FCS-Messung, welches vielleicht durch systematische Fehler verursacht wurde.

BSA lässt sich durch das Modell mit einfachem *soft-core* Potential und ohne Wechselwirkung am besten beschreiben.  $\gamma$ -Globulin kann sowohl mit einem einfachen *soft-core* Modell als auch mit einem Modell, das hydrodynamische Wechselwirkung beschreibt, simuliert werden. Damit ist die hydrodynamische Wechselwirkung nicht der entscheidende Faktor, der einen Unterschied im verschiedenartigen Diffusionsverhalten widerspiegelt.

Das analytische Modell bezieht sowohl hydrodynamische Wechselwirkung als auch ein leicht erweitertes *soft-core* Modell mit etwas veränderten repulsiven Potential ein, um einen effektiven Kern für Biomoleküle zu berücksichtigen. Dieses Modell beschreibt das Diffusionsverhalten von BSA und insbesondere für OVA in hoher Übereinstimmung. Auch die BD-Simulationen stimmen für das *soft-core* Modell bei BSA besonders gut überein. Allerdings ist dieses Modell im Gegensatz zum analytischen Modell besser geeignet, die Messergebnisse für  $\gamma$ -Globulin wiederzugeben.

Dabei beschreibt das einfache *soft-core* Potential die gemessenen Werte genauso gut wie die BD-Simulation mit direkter Wechselwirkung, also z.B. elektrostatische Wechselwirkungen, aber ohne hydrodynamische Wechselwirkung. Werden alle Wechselwirkungen berücksichtigt, überschätzt das Modell die Abnahme des Diffusionskoeffizienten. Dies lässt vermuten, dass hydrodynamische Wechselwirkungen einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Diffusionsverhalten von  $\gamma$ -Globulin haben. Wenn die Wechselwirkungen als Parameter ausgeschlossen werden können, bleibt der Strukturunterschied zwischen BSA und  $\gamma$ -Globulin als ausschlaggebender Unterschied übrig.

Inwieweit eine Strukturabhängigkeit bei der translatorischen Diffusion von Proteinen eine physiologischen Konsequenz hat, muss noch geklärt werden.

Ando [17] konnte mit seinen BD-Simulierungen eines Bakterien-Zytoplasmas (Ecoli) den Volumenausschluss und die hydrodynamischen Wechselwirkungen als stärkste Einflüsse auf die Bewegung identifizieren. Allerdings ist für die Darstellung der 15 unterschiedlichen Proteine ein anderer Formalismus verwendet worden um die Strukturen zu beschreiben. Als Ergebnis stellt er noch fest, dass eine Kugel eine adäquate Möglichkeit ist, Proteine im Zytoplasma darzustellen.

Es besteht damit die Möglichkeit, das bei nicht monodispersen Lösungen der Strukturparameter seine Bedeutung verliert und durch die Erhöhung unterschiedlicher Komponenten die hydrodynamischen Wechselwirkungen wieder in den Vordergrund treten. Die Verwendung von mehr Komponentensystemen bietet zusätzliche Vorteile, so konnte unter Verwendung von Crowder Mischungen aus zwei Komponenten beispielsweise die Proteinrückfaltung verstärkt werden und ein optimales Mischungsverhältnis bestimmen werden [13].

Vergleich artifizieller Proteinlösungen mit in vivo Experimenten

Zudem besteht die Frage, ob eine monodisperse Proteinlösung geeignet ist, um das Verhalten in zellulärer Umgebung zu imitieren. In den gemessenen Proteinlösungen mit physiologisch relevanten Konzentrationen zeigen die Proteine eine Verlangsamung ihrer Diffusion um das 5- bis 6-fache. Vergleicht man die entsprechenden Proteine mit Messungen der Diffusion im Zytoplasma von lebenden Zellen, so zeigt sich, dass im Fall von IgG eine, im Vergleich zur Diffusion in wässriger Lösung, um 6-fach verlangsamte Diffusion gemessen wurde. BSA und OVA hingegen zeigen eine bis zu 11-fache Reduzierung ihrer Diffusionskonstante im Vergleich zur Messung in wässrigen Lösung. In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen steht eine Studie die 1985 von Lupy-Phelps und Mitarbeitern im gleichen Zelltyp (im Zytoplasma von 3T3 Zellen) mit unterschiedlichen Proteinen mit analoger Farbstoffmarkierung durchgeführt wurde [7, 212]. Das heißt unter vergleichbaren Bedingungen ergeben sich Unterschiede in der Diffusion, die für BSA und OVA einen stärkeren Einfluss haben als für IgG.

#### Vergleich artifizieller Proteinlösungen mit Ficoll 70

Durch den vergleichbaren hydrodynamischen Radius von IgG mit Ficoll 70 würde man eigentlich erwarten, dass sie auch vergleichbare Crowder-Eigenschaften besitzen. Dem ist jedoch nicht so. Dauty und Verkman führten 2004 [126] eine umfangreiche Studie durch, bei der sie die Größenabhängigkeit von unterschiedlichen Tracern in hochkonzentrierten Ficoll 70 Lösungen untersuchten. Sie bestimmten einen reduzierten Diffusionskoeffizienten mittels FCS und erhielten unabhängig von der Tracergröße bis etwa 500 kDa einen exponentiellen Zusammenhang zwischen diesem und der Ficoll 70 Konzentration. Sie führten auch einen Vergleich mit BSA als Crowder durch und identifizierten eine Abhängigkeit der Diffusion von der makroskopischen Viskosität. Ein Aspekt, der bei zukünftigen Untersuchungen mit berücksichtigt werden sollte.

#### Fehlerabschätzung und Anomale Diffusion

Mögliche Fehlerquellen für die FCS-Messungen sind optische Aberrationen oder Brechungsindexunterschiede, die das konfokale Volumen verzerren. Die Voraussetzung eines Gaußschen Volumens, aus der sich die Anpassungsfunktion ableitet, ist damit nicht mehr gewährleistet [39, 184, 213]. Dieser Effekt kann eine scheinbare Abweichung von der normalen Diffusion induzieren, indem die Kurvenanpassung besser durch ein anomales Anpassungsmodell beschrieben wird, mit einem zusätzlichen Exponenten  $\alpha$ , der die Anomalie berücksichtigt [33]. Alle Werte, die von 1 abweichen, beschreiben eine Anomale Diffusion. Das Dual-Fokus FCS ist durch sein Konzept robuster in Bezug auf diese Artefakte. Vergleichsmessungen zeigen aber, dass zwar der systematische Fehler bei Messungen mit einem herkömmlichen FCS Aufbau erhöht ist, es lassen sich jedoch Diffusionskoeffizienten abschätzen, die mit dem absoluten Diffusionskoeffizienten aus den 2fFCS Messungen vergleichbar sind (Abschnitt 3.4). Neben der scheinbaren anomalen Diffusion, die durch das verzerrte konfokale Volumen der Anlage verursacht wird, gibt es aber auch eine molekular-bedingte anomale Diffusion. Für  $\gamma$ -Globulin wurden die  $\alpha$ -Werte aus den FCS Kurven bestimmt und lagen zwischen 0,97-0,81 für 0-200 mg/ml und zwischen 0,97-0,84 für BSA in einem Konzentrationsbereich von 0-300 mg/ml. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb in einem Bereich von 0,5 <  $\alpha$  < 0,8 von anomaler Diffusion (Subdiffusion) gesprochen, dem Beispiel von [33] folgend. Vermutlich haben die gemessenen Abweichungen von der normalen Diffusion ihren Ursprung im systematischen Fehler des Messsaufbaus. Aus den BD-Simulationen lassen sich nur für kurze Zeiten (unter 0, 1 µs) Subdiffusion zeigen. Zu späteren Zeit verhält sich das System wieder normal.

Im Vergleich zu Messungen in Zellen zeigen sich Unterschiede zu den Proteinlösungen. Weiss und Mitarbeiter konnten für die Diffusion von IgG im Zytoplasma einen Anomalie Term von  $\alpha \approx 0,55$  bestimmen, das ist in einem signifikant anderen Bereich.

# Teil III.

# Diffusion von KAT1::GFP in der Plasmamembran von Tabakzellen

# Diffusion von KAT1::GFP in der Plasmamembran von Tabakzellen

Innerhalb der Zelle bilden Membranen ihren eigenen dynamischen und heterogenen Bereich. Bisherige Studien auf dem Gebiet zur Untersuchung der lateralen Diffusion von Membranproteinen oder Lipiden in der Plasmamembran von lebenden Zellen zeigen, dass es signifikante Unterschiede zwischen unterschiedlichen Zelltypen und Membranproteinen gibt, und dass sich kein allgemeingültiges Verhalten zuordnen lässt [40]. Um daher ein System zu charakterisieren, werden häufig mehrere Methoden vergleichend verwendet oder mit einander verknüpft.

Neben den Techniken der Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP) und des Single Particle Tracking (SPT), die hauptsächlich zur Untersuchung von membranassoziierten Prozessen verwendet werden (Vgl. Kap. 1.2 Membrandiffusion und Techniken), kann Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ebenfalls verwendet werden um die laterale Mobilität von Lipiden und Proteinen in Membranen zu untersuchen [44, 76, 78, 214–216].

Die Untersuchung von Membranproteinen, insbesondere von Ionenkanälen, ist auf Grund von neueren Arbeiten auf dem Gebiet des Membrantransports verstärkt in den Vordergrund der Aufmerksamkeit gerückt. Ein Grund dafür liegt darin, dass essich gezeigt hat, dass die Regulierung der Ionenkanaldichte und die Beschränkung von Ionenkanälen auf Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran entscheidend sind für die Steuerung der Kanalfunktionen und damit für wichtige physiologische Prozesse wie die Signalübertragung [56]. Daher besteht ein verstärktes Interesse in der Bestimmung der lateralen Mobilität von Ionenkanälen.

In Kooperation mit Alice Kress aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gerhard Thiel (Abteilung: Membrane Biophysics, TU Darmstadt) und Nachwuchsgruppenleiter Dr. Tobias Meckel (Abteilung: Membrane Dynamics, TU Darmstadt) wurde die Fragestellung über die Diffusion des einwärtsgleichrichter (Kalium *Arabidopsis thaliana* channel 1) in der Plasmamembran von lebenden Tabakzellen untersucht. Im Rahmen meiner Arbeit sollte die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten des KAT1 mittels FCS einen Ansatz bieten um den Prozess der lateralen Mobilität zu quantifizieren.

Als Modellsystem wurde der KAT1 mit GFP Markierung in der Plasmamembran von (Tabak Linie *Bright Yellow* 2 (BY-2)) an einem erweiterten konfokalen Laserscanning Mikroskop (CLSM) untersucht.

# 6. Experimenteller Teil und Methoden

#### 6.1. Pflanzenproben

In Zusammenarbeit mit Alice Kress wurde die Fragestellung über die Diffusion des einwärtsgleichrichter (Kalium Arabidopsis thaliana channel 1) in der Plasmamembran von Tabakzellen (Tabak Linie Bright Yellow 2 (BY-2)) untersucht. Dabei wurde die gesamte Zellkultur, Fusionierung und Bereitstellung der Pflanzenzellproben von ihr übernommen. Die Konstruktion des KAT1 mit dem Fusionsprotein GFP ist in [141] beschrieben. Außerdem wurde ein Messkammer-Aufsatz für die Zellsuspension mit passenden Deckgläsern (Karl Hecht GmbH&CoKG Assistent, 25 mm Durchmesser) für die Dauer der Messungen zur Verfügung gestellt .

BY-2 Zellen sind Zellen einer Zellkultur aus der Tabakpflanze (*Nicotianatabacum L. cv. Bright Yellow No.2*). Sie wurde 1968 von Dr. Kawashima in Japan initiiert und findet heute eine breite Anwendung in der Pflanzenphysiologie, da BY-2 Zellen mit ihrer großen Homogenität und hohen Wachstumsrate relativ unkompliziert in Kultur gehalten werden können und ein gutes Modellsystem für höhere Pflanzen darstellen. Je nach Bedarf wurden BY-2 Zellen als Wildtyp verwendet oder stabil mittels *Agrobacteriumtumefaciens* transfiziert. Als Plasmid wurde pCambia 1302 mit und ohne KAT1 benutzt (persönliche Kommunikation mit Alice Kress).

#### 6.2. Experimenteller Aufbau

Zur Untersuchung von lebenden Zellen eigenen sich insbesondere Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM), da sie durch die Konfokalität ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis liefern und die Möglichkeit bieten mit dem Fokus in allen drei Raumrichtungen die ganze Zelle abzutasten.

Die in diesem Abschnitt gezeigten Fluoreszenzbilder und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen wurden mit dem Superkontinuum-Konfokal-System Leica TCS SP5 X (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) aufgenommen. Die Weißlicht-Laserquelle (SuperK Extreme, Koheras, Dänemark) ermöglicht es mit Nanometer-Genauigkeit eine Anregungswellenlänge im Bereich von 472-670 nm zu wählen. Der Aufbau folgt prizipiell einem Standard CLSM Aufbau, allerdings erfolgt die Auswahl der Anregungswellenlänge nicht über die Aufreinigung an ein einem Filter oder Filterrad, sondern über ein akusto-optisches Element. Über diesen sogenannten Akustooptischer Filter, engl. *Acousto-Optical Tunable Filter* (AOTF) kann ein flexibler Bereich moduliert werden, der die Anregungswellenlänge durchlässt und es ist zudem möglich die Intensität des Anregungslichts zu regulieren [217].

Da der Hersteller dieses Mikroskopsystems nicht direkt mit einer Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Erweiterung anbietet, wurde diese im Rahmen der Arbeit selbst



Abbildung 6.1.: Anordungsskizze des erweiterten Superkontinuum-Konfokal-System Leica TCS SP5 X (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit dem LSM-Upgrade Kit der Firma PicoQuant, Berlin.

implementiert. Mit der zusätzlich Verknüpfung eines Systems zur zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) [218] konnten die Datenerfassung und Korrelation über die SymphoTime-Software (PicoQuant, Berlin) erfolgen (Abb.6.1). Grundlage dafür war das LSM-Upgrade Kit der Firma PicoQuant, Berlin. Darin waren die Software, die TCSPC-Einheit (PicoHarp 300) zur Datenerfassung und ein 4-Kanal Detektor Router (PHR 800) zur Signalkorrelation von bis zu vier APDs enthalten. Die technischen Anmerkungen des Herstellers bieten eine Beschreibung für die Erweiterung eines Standard Leica SP5 Systems mit dem Upgrade-Kit [219]. In Abb.6.1 ist schematisch dargestellt wie die Erweiterung aufgebaut ist. Der Weißlichtlaser stellt ein Transistor-Transistor-Logik (TTL) Signal mit 1,5 V bereit. Der SMA-Anschluß an der PicoHarp ist "Ch0" und erwartet ein Signal zwischen 0 und -1 V. Daher wird noch der Puls-Inverter "SIA 100"(PicoQuant, Berlin) benötigt.

#### 6.3. Datenaufnahme und Systemeinstellungen

Für die FCS-Messungen wurden zwei fasergekoppelte Lawinenphotodioden (APDs) verwendet und der Detektionsstrahl mittels eines 50:50 Strahlteilers auf die Detektoren aufgeteilt. Der hierbei verwendete Leica-Filterwürfel wurde mit je einem Bandpassfilter( ET515/30,AHF Analysetechnik) vor jedem Detektor versehen. Zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde der Laser mit 489 nm zeilenweise, mit ei-
ner Frequenz von 400 Hz,rasternd über die Probe bewegt.

Mittels galvanometrischer steuerbarer Spiegel gibt es die Option den Laserstrahl rasternd über die Probe zu bewegen oder eine stationäre Position als Bleichpunkt (*bleachingpoint*) in der Probe festzulegen. Für alle FCS-Messungen wurde ein stationärer Punkt in der Zelle gewählt. Der Fokus innerhalb der Zellen wurde so gesetzt, dass die maximale Intensität innerhalb der Zelle getroffen wurde. Für die freien GFP Messungen war das typischerweise innerhalb eines Zytoplasma-Stranges und für die KAT1::GFP Messungen die basale Seite der Plasmamembran, die parallel zum Deckglas lag. Um das Fluoreszenzsignal besser im Kontext der ganzen Zelle zu lokalisieren wurden, parallel zu den Fluoreszenzaufnahmen, Durchlichtbilder mit den im System integrierten Photomultiplier; engl. *photomultiplier tube* (PMT)s aufgenommen.

Die Größe der Lochblende betrug eine Airy-Disk, dies entspricht einem Durchmesser von  $111,5 \,\mu$ m.

Für alle FCS-Messungen und Fluoreszenzbilder wurde ein Wasser Immersions-Objektiv (HCX PL APO CS 63.0x/1.20W, Leica) verwendet.

Da die Zellen durch unterschiedliche Expressionslevel nicht immer eine gleiche Fluoreszenzverteilung aufweisen musste die Anregungsintensität entsprechend angepasst werden.

Für die Messungen wurden die integrierten Software Einstellungen für GFP mit einer Anregungswellenlänge von 489 nm benutzt. Die Gesamtlaserintensität des Weißlichtlasers wurde manuell auf 70% reduziert um störende Rückreflexionen bei 100% Leistung zu vermeiden. Die Laserintensität der einzelnen Anregungslinien lässt sich zusätzlich noch über die Software (Leica Application Suite (LAS), Leica) steuern. Typischerweise wurde eine konstanten Prozent-Einstellung 50% gewählt.

Um die Dimensionen des fokalen Volumens zu bestimmen wurden Kalibrierungsmessungen mit Rhodamin6G (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst in Dimethylformamid (DMF) und verdünnt in PBS in einem Konzentrationsbereich von 1-100 nM gemacht. Die Kalibration erfolgte analog zu 3.1 über den für Rhodamin6G bekannten Diffusionskoeffizienten von  $D = (4, 15 \pm 0, 05) \cdot 10^6 \frac{\text{cm}^2}{\text{s}}$  [103]. Der so bestimmte laterale Strahlradius  $w_0$  variierte zwischen 0, 16 µm und 0,18 µm mit einem Strukturfaktor zwischen 3,12 und 4,80.

### 6.4. Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurden die Intensitätsspuren der beiden Detektionskanäle mit der SymphoTime-Software kreuzkorreliert und als ASCII Dateien exportiert. Die Kurvenanpassung erfolgt dann mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus in Origin (OriginLab,USA).

Bei der Auswertung der Autokorrelationskurven wurden zwei Modelle als Anpassungsfunktion verwendet.

Die am häufigsten verwendeten Modelle um markierte diffundierende Moleküle in lebenden Zellen zu beschreiben sind die anomale Diffusion und ein zwei-Komponenten System [42, 52, 216, 220]. Für die Diffusion innerhalb von Membranen wird typischerweise ein zweidimensionaler Ansatz gewählt [33, 214, 215].

Um die photophysikalischen Effekte zu berücksichtigen, die bei GFP in unterschied-

lichen Umgebungen zu beobachten sind [33, 70, 181, 221], wird bei der Analyse der Messungen für beide Modelle ein Triplett-Term berücksichtigt. Für die dargestellten Daten wurden die folgenden Modelle zur Kurvenanpassung verwendet:

1. Anomale Diffusion in 2 Dimensionen (anomale 2D Diffusion)

$$G_{\text{anom}}(\tau) = \left[1 - T + Te^{\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right)}\right] \frac{1}{N} \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D}\right)^{\alpha}\right)^{-1}$$
(6.1)

Mit dem Exponenten der Anomalie  $\alpha$ . Mit der Definition der anomalen Diffusion (Gl.2.7) ergibt sich  $D(t) = \Gamma t^{\alpha-1}$  als scheinbarer Diffusionskoeffizient, da er von der Zeitskala der Messung abhängt [42].  $\Gamma$  ist eine zeitunabhängige Konstante und erhält eine allgemeinere Bezeichnung als Transportkoeffizient [216].

2. Zwei-KomponentenModell

$$G_{2\text{Komp}}(\tau) = \left[1 - T + Te^{\left(-\frac{\tau}{\tau_t}\right)}\right] \frac{1}{N} \left(\frac{\rho - 1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D1}}} + \frac{\rho}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D2}}}\right)$$
(6.2)

 $\rho$  beschreibt den Anteil der jeweiligen Komponente [216].

## 6.5. Probenvorbereitung

Für die Messungen wurden ca. 200  $\mu$ l Zellsuspension mit 400-600  $\mu$ l destilliertem Wasser (MilliQ-Aufreinigung) in der Messkammer gemischt.

Die erste Begutachtung der Proben geschah mit dem Mikroskopstativ LEICA DMI6000B, das im LSM-System (Leica TCS SP5 X, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) integriert ist. Die Zellen wurden über das Durchlicht fokussiert um ihren Gesamtzustand zu begutachten und im Anschluss mit 488 nm über einen Monochromator (Halogenlampe) beleuchtet, um zu prüfen, ob die Zellen ein gleichmäßiges und detektierbares Fluoreszenzsignal aufweisen. Wenn dies zutraf wurden die eigentlichen Messungen durchgeführt.

Alle Messungen wurden bei  $21, 5 - 22, 8^{\circ}$ C durchgeführt.

## 7. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen zur Untersuchung von Diffusionsprozessen innerhalb der Plasmamembran von Pflanzenzellen dargestellt. Als Modellsystem dient ein einwärtsgleichrichter K<sup>+</sup>-Kanal KAT1 der *Arabidopsisthaliana* in Tabakzellen (Tabak Linie *Bright Yellow* 2 (BY-2)).

## 7.1. Vorarbeiten

### 7.1.1. Autofluoreszenz

Die verwendete BY-2 Zelllinie sollte eine möglichst geringe Autofluoreszenz im verwendeten Wellenlängenbereich (Anregung bei 489 nm, Detektion bei 500-530 nm) haben und damit einen vernachlässigbaren Beitrag zur Korrelationsanalyse durch Hintergrundfluoreszenz liefern. Um dies für die verwendeten Systemeinstellungen zu überprüfen wurden die Fluktuationen der Autofluoreszenz in Wildtyp Zellen aufgenommen. Abb.7.4 zeigt links das Durchlichtbild einer Wildtyp Tabakzelle und rechts daneben das entsprechende Fluoreszenzbild mit unterschiedlichen fokalen Ebenen innerhalb der Zellen. In A/B liegt die fokale Ebene in der Mitte der Zelle und geht zentral durch den Zellkern (N), in C/D liegt die Ebene auf der Zellunterseite der Zelle, unterhalb des Nukleus. Der schwarze Bereich im Fluoreszenzbild kennzeichnet das Gebiet in dem keine Photonen detektiert wurden. In den Fluoreszenzaufnahmen ist nahezu keine Autofluoreszenz detektiert worden. Ein schwacher Anteil an Autofluoreszenz konnte lediglich um den Zellkern lokalisiert werden. Daher wurden dort FCS-Messungen durchgeführt. Mit ROI (Region of Interest) ist der Punkt des Laserfokus innerhalb der Zelle markiert, bei dem der Laser eine feste Position einnimmt, die für die Datenaufnahme der Fluoreszenz-Korrelations Messungen nötig ist.

Die in Abb.7.2 gezeigten Autokorrelationskurven zeigen exemplarisch zwei Messungen an Wildtyp BY-2 Zellen, korrespondierend zu den oben gezeigten Fluoreszenzaufnahmen. Die schwarze Kurve zeigt die Autokorrelationsfunktion der Zelle A/B, also innerhalb vom Nukleus und in Rot die Autokorrelationskurve unterhalb des Nukleus an der basalen Plasmamembran für Zelle C/D. Es lässt sich für beide Kurven ein leichter Offset von der Nullposition feststellen, der für die Messung im Nukleus ausgeprägter ist. Zusätzlich lässt sich dort noch eine abfallende Flanke zu negativen Werten bemerken. Der Offset in der Autokorrelationskurve wird vermutlich durch die Autofluoreszenz von festen Zellstrukturen hervorgerufen, die zwar ein schwaches Fluoreszenzsignal liefern, aber in der Messzeit von 60 s das Beobachtungsvolumen nicht verlassen. Die abfallende Flanke könnte dem zu Folge als Bleichprozess interpretiert werden, der das Fluoreszenzsignal reduziert, da durch fehlende Bewegung keine neuen Fluorophore ins Detektionsvolumen treten. Dadurch wird eine negativ korrelierte Fluktuation der Fluoreszenzintensität verursacht. Die Zellstrukturen, die die Autofluo-



Abbildung 7.1.: Durchlicht (A/C) und Fluoreszenzbild (B/D) unterschiedlicher Wildtyp Tabakzellen in zwei verschiedenen fokal Ebenen. N=Nukleus, Z=Zytoplasmastrang, V=Vakuole, M=Medium, W=Zellwand.



Abbildung 7.2.: Autokorrelationskurven für Wildtyp Zellen im Nukleus (schwarz) und unterhalb des Nukleus (rot).

reszenz verursachen befinden sich anscheinend in der Nähe des Zellkerns. Daher wurde es vermieden Messungen im Zellkern durchzuführen, wo die Autofluoreszenz am ausgeprägtesten ist. Zudem ist mit keiner zusätzlichen Komponente der Diffusionszeit durch Autofluoreszenz zu rechnen.

### 7.1.2. Zytosolisches GFP

Um den GFP-markierten Kaliumkanal KAT1::GFP in BY-2 Zellen zu charakterisieren muss noch geklärt werden, ob sich das erweiterte konfokale Mikroskopsystem prinzipiell eignet um die Diffusionskoeffizienten in lebenden Zellen zu bestimmen. Daher wurden neben den eigentlichen KAT1::GFP Messungen zusätzlich noch GFP-exprimierende BY-2 Zellen untersucht. Dies wird als zytosolisches GFP bezeichnet, da es frei im Zytosol diffundieren kann und nicht Membran gebunden ist. In Pflanzenzellen, die GFP ohne verknüpfte Proteinsequenz exprimieren, wird es aus allen membranumschlossenen Kompartimenten, wie Vakuolen und Plastiden, ausgeschlossen und ist im Zytosol und im Zellkern beobachtbar [68]. Abb.7.4 A) F zeigt ein Fluoreszenzbild einer typischen BY-2 Zelle mit zytosolischem GFP. Zu erkennen sind die dünnen Zytoplasma-Stränge und der Zellkern, die unmarkierten Bereiche sind Vakuolen und andere Organellen sowie Medium. Für die FCS-Messungen wurde der Laserfokus auf einem Zystoplasma-Strang außerhalb vom Zellkern geparkt und Punktmessungen mit einer Dauer von 60s durchgeführt. Abbildung 7.3 zeigt die gemessenen Autokorrelationskurven  $(G(\tau))$  je Punktmessung in unterschiedlichen Farben. Die Punktmessungen stammen aus verschiedenen Zellen. Ein Anpassungsmodell, das Brownsche Diffusion in drei Dimensionen und Triplettrelaxation (3.1) berücksichtigt, reicht aus um die gemessenen Autokorrelationskurven adäquat zu beschreiben. Die jeweilige Kurvenanpassung ist in schwarz dargestellt. Insgesamt wurden 11 Zellen an 3 unterschiedlichen Tagen berücksichtigt. Die aus der Kurvenanpassung erhaltenen Diffusionszeiten ergeben einen Diffusionskoeffizienten von  $(42 \pm 11) \,\mu m^2/s$  (n=11). Dieser Wert stimmt hervorragend mit bereits publizierten Diffusionskoeffizienten von GFP im Zvtosol von Tabak-Zellen überein  $((40 \pm 20) \,\mu\text{m}^2/\text{s}, [222])$ . Das erweiterte Messsystem liefert also vergleichbare Daten und sollte daher auch für die eigentlichen FCS-Messungen verwendet werden können.

### 7.2. Membrandiffusion des KAT1::GFP

Der eigentliche Interessensschwerpunkt liegt auf der Charakterisierung der Mobilität des Kalium<sup>+</sup>-Kanals KAT1 in der Plasmamembran. Hierzu wurden ebenfalls FCS-Messungen durchgeführt. Als erstes wurden wie zuvor Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Abb. 7.4 B) zeigt eine typische Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme von BY-2 Zellen mit markieren KAT1::GFP. Abgesehen von der Plasmamembran sind noch die Plasmastränge und der Nukleus zu erkennen. Dies ist vergleichbar mit der freien GFP Fluoreszenzverteilung in der BY-2 Zelle. Die Ursache ist vermutlich der Transportweg von KAT1::GFP innerhalb der Zelle, der am ER exprimiert wird und über den Golgi-Apparat und Exozytosevesikeln in die Plasmamembran befördert wird.

Ein qualitativer Vergleich der Autokorrelationskurven von freien GFP (grüne Kurve) und KAT1::GFP (schwarze Kurve) ist exemplarisch in Abb. 7.5 dargestellt. Die



Abbildung 7.3.: Autokorrelationsfunktion von zytosolischem GFP in unterschiedlichen BY-2 Zellen. Die Aufnahmezeit betrug 60 s. In schwarz ist die Kurvenanpassung einer freien Diffusion in 3D mit Triplett dargestellt.



Abbildung 7.4.: Durchlicht- und Fluoreszenzbild markierter BY-2 Zellen. Oben: freies GFP im Zytosol. Unten: KAT1::GFP gefärbte Plasmamembran.



Abbildung 7.5.: Abgebildet sind die gemessenen und Amplituden-normierten Korrelationskurven  $\left(\frac{G(\tau)}{G(0)}\right)$  für zytosolisches GFP (grüne Kurve) und KAT1::GFP (schwarze Kurve) in jeweils unterschiedlichen BY-2 Zellen. Eine deutlich langsamere Diffusionszeit für KAT1::GFP ist zu erkennen. Die Laserintensität, sowie die Lochblenden-Durchmesser, waren für beide Proben gleich.



Abbildung 7.6.: Repräsentative Autokorrelationskurve von KAT1::GFP (schwarze Kurve) mit einer einfachen 2D Kurvenanpassung mit Triplettrelaxation.

Amplituden-normierte Autokorrelationskurve  $G(\tau)/G(0)$  von zytosolischem GFP fällt deutlich schneller ab als für KAT1::GFP. Eine Verschiebung des Sattelpunktes der Autokorrelationskurve zu längeren Zeiten bedeutet eine langsamere Diffusion für den KAT1.

Um die Diffusionszeit zu bestimmen wurde als erstes eine laterale Diffusion mit Triplett als Anpassungsfunktion gewählt. Abb.7.6 zeigt eine repräsentative Autokorrelationsfunktion des KAT1::GFP als schwarze Kurve mit einer zweidimensionalen Kurvenanpassung mit Triplettrelaxation in rot. Die Kurvenanpassung gibt die gemessene Korrelationskurve nur unzureichend wieder. Daher musste das Anpassungsmodell erweitert werden. Die bei der Membrandiffusion am häufigsten verwendeten Anpassungsmodelle sind ein 2-Komponenten Modell und eine anomales Diffusionsmodell. Um der ausgeprägten Photophysik von GFP Genüge zu tun wird dies üblicherweise mit eine Triplett-Term berücksichtigt (siehe auch Abschnitt 6.4). In Abbildung 7.7 ist eine typische gemessene Autokorrelationskurve mit Modellanpassung für das 2-Komponenten Modell (links) und das anomale 2D Modell (rechts) mit entsprechendem Residuum gezeigt. Aus den Residuen lässt sich nicht schließen welches Modell besser geeignet ist. Insgesamt konnten 20 Zellen an 4 Messtagen analysiert werden. Um zu klären ob es eine Tagesabhängigkeit gibt wurden die Parameter der Anpassungsfunktionen als Histogramme in Abb.7.8 und 7.8 aufgetragen. Jeder Messtag repräsentiert eine Farbe. Die Häufigkeiten aus dem 2-Komponenten Modell setzten sich aus den Diffusionskoeffizienten  $D_1$  bzw.  $D_2$  und dem prozentualen Anteil der 2. Komponente  $\rho$  zusammen. Für das anomale Anpassungsmodell ergibt sich der Parameter  $\alpha$  der als Exponent die Anomalie beschreibt. Dazu kommt noch der Transportkoeffizient  $\Gamma$  in Einheiten von  $\left\lceil \frac{\mu m^2}{s^{\alpha}} \right\rceil$ . Es zeigt sich nirgendwo eine Subpopulation von nur einer Farbe. Viel mehr ist zu erkennen, dass die Tag zu Tag Varianz nicht größer ist als die Varianz der Messungen an einem Messtag.

In Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse aus der Kurvenanpassung als Mittelwert mit Standardabweichung für alle 20 Messungen angeben.

2-Komponentenmodell	Anomale Diffusion
$\frac{D_1 = (57 \pm 12) \mu \text{m}^2/\text{s}}{\rho_1 = 65 \pm 12 \%}$	$\Gamma = (31 \pm 18)  \mu m^2/s^\alpha$
$\frac{D_2 = (1, 4 \pm 0, 5) \mu \text{m}^2/\text{s}}{\rho_2 = 35 \pm 12 \%}$	$\alpha = (0, 63 \pm 0, 03)$

Tabelle 7.1.: Ergebnisse der unterschiedlichen Diffusionsmodelle.



Abbildung 7.7.: Vergleich der Anpassungsfunktionen für eine typische Korrelationskurve. A) 2-Komponenten Modell zur Kurvenanpassung der gemessenen Autokorrelationskurve und dessen Residuum. B) Annahme eines anomalen 2D-Diffusions Modells und dessen Residuum.



Abbildung 7.8.: Häufigkeitsverteilung des scheinbaren Diffusionskoeffizienten und des Exponenten  $\alpha$  als Ergebnisse aus dem anomalen 2D-Diffusionsmodell. Jede Farbe repräsentiert einen anderen Messtag.



Abbildung 7.9.: Diffusionskoeffizienten  $D_1$  und  $D_2$  sowie der prozentuale Anteil der jeweiligen Komponente  $\rho$  aus der Anpassungsfunktion des 2-Komponenten Modells. Unterschiedliche Farben repräsentieren verschiedene Messtage.

## 8. Diskussion

Der Diffusionskoeffizient von Membranproteinen ist ein grundlegendes Maß für die molekulare Beweglichkeit in Membranen. Zur Bestimmung dieses Diffusionskoeffizienten wurde der GFP-markierte Kaliumkanal KAT1 mittels FCS in der Plasmamembran von lebenden BY-2 Pflanzenzellen untersucht. Dazu wurde ein CLSM so erweitert, dass FCS-Messungen durchgeführt werden konnten.

#### Autofluoreszenz

Zur Charakterisierung der biologischen Proben wurden zunächst Wildtyp BY-Zellen vermessen. Die Autofluoreszenz war sehr gering und in den Fluoreszenzbildaufnahmen kaum wahrnehmbar. Im Nukleus war sie am stärksten und in den Autokorrelationsfunktionen zeigte sie sich als Offset. Je weiter vom Zellkern entfernt gemessen wurde, desto geringer war der Offset. Deshalb wurde grundsätzlich möglichst weit entfernt vom Nukleus gemessen.

#### Zytosolisches GFP

Der gemessene Diffusionskoeffizient von freiem GFP innerhalb der Tabak-Zellen  $D = (42 \pm 11) \,\mu\text{m}^2/\text{s}$  lässt sich mit anderen Untersuchungen des Diffusionskoeffizienten im Zytoplasma in lebenden Zellen in vergleichbaren Systemen [69, 110, 222] sehr gut vereinbaren.

Im Vergleich zu GFP in wässriger Lösung  $(D = 87 \pm 11 \,\mu\text{m}^2/\text{s}, [50])$  sind die Beobachtungen konform, dass die Diffusion im Zytoplasma um die Hälfte reduziert ist.

#### KAT1::GFP

Im Fluoreszenzbild eines Standards konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) lässt sich freies GFP in den schmalen Zytoplasmabrücken von Tabakzellen gegebenenfalls von dem Fluoreszenzsignal der markierten Plasmamembran trennen (Abb.7.4). Mit 5-10 nm liegt der Durchmesser der Plasmamembran jedoch unter der Auflösungsgrenze eines Fluoreszenzmikroskops. Ein offensichtlicher Unterschied lässt sich aber durch die gemessenen Korrelationskurven darstellen. In Abb. 7.5 sind exemplarisch zwei normierte Autokorrelationskurven gezeigt. Die in Schwarz dargestellte Kurve von KAT1::GFP ist zu deutlich langsameren Zeiten verschoben.

Es wurden zwei häufig verwendete Modelle zur Kurvenanpassung der lateralen Diffusion in Membranen verwendet um die Kurvenanpassung vorzunehmen (siehe Abschnitt 6.4). Ein zwei-dimensionales Modell, das Anomale Diffusion berücksichtigt, und ein 2-Komponenten Modell, bei dem es unerheblich ist, ob die zweite Komponenten eine freie Diffusion oder ebenfalls eine laterale Diffusion darstellt. Es ergeben sich für die zweite Komponente keinen erheblichen Unterschied für den Diffusionskoeffizienten, unabhängig ob man zwei- und drei-dimensionale Diffusion voraussetzt. Die Abbildungen 7.8 und 7.9 zeigen die Häufigkeitsverteilung der Anpassungswerte an unterschiedlichen Tagen. Aus den Histogrammen ist ersichtlich, dass die Varianzen von Tag zu Tag nicht größer sind als die Varianzen innerhalb eines Tages.

#### Anomale Diffusion

Vor allem die Annahme einer eingeschränkten Diffusion wäre im Fall des Kaliumkanals in der Plasmamembran gut vorstellbar, da der Transport und die Integration des KAT1 in die Plasmamembran in Form von Clustern erfolgt [56, 141, 223, 224]. Diese Cluster konnten auch innerhalb der Plasmamembran identifiziert werden. Ein Grund dafür ist der pflanzliche K<sup>+</sup>-Kaliumkanal an sich, für den gezeigt werden konnte, das dessen Aminosäuresequenz eine C-terminalen Domäne umfasst, die die Formation von K<sup>+</sup>-Kanal Clustern begünstigt [141, 225].

In einer Fluoreszenzerholung nach Photobleichen; engl. *Fluorescence Recovery after Photobleaching* (FRAP)-Studie von Reuff und Mitarbeitern [56] wurde bei der Untersuchung von KAT1::GFP in pflanzlichen Schließzellen wie auch in tierischen Zellen eine mobile Fraktion des KAT1-Kanals von lediglich  $15 \pm 4\%$  [226] bzw.  $21 \pm 9\%$  gemessen während der Hauptteil immobil ist.

Das Modell der anomalen Diffusion beschreibt eine stark eingeschränkte Diffusion mit einem Exponenten, der eine Anomalie von  $\alpha = (0, 63 \pm 0, 03)$  besitzt. Der Transportkoeffizient ist mit  $\Gamma = (31 \pm 18) \,\mu\text{m}^2/\text{s}^{\alpha}$  aber viel zu hoch, um sinnvolle Werte für die Beschreibung der Diffusion in Membranen zu liefern. Mit einer mittleren Diffusionszeit von 1 ms und einem Maximalwert von 4 ms ist die Diffusion schneller als der Erwartungswert für Transmembranproteine von etwa 10 ms [51].

#### 2-Komponenten Modell

Für das zwei-Komponenten Modell ergeben sich die beiden Diffusionskoeffizienten von  $D_1 = (57 \pm 12) \,\mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_2 = (1, 4 \pm 0, 5) \,\mu\text{m}^2/\text{s}$ , wobei die zweite, langsamere Komponente, mit  $\rho_2 = 35 \pm 12 \,\%$  anteilig vertreten ist. Die langsame Komponente  $D_2$  lässt sich sehr gut erklären, da sie im typischen Größenbereich der Diffusionskoeffizienten für Transmembranproteine oder Lipiden liegt [33, 51, 77, 227].

Hink [227] hat in seiner Doktorarbeit, in Zusammenarbeit mit Visser, markierte Lipid-Analoge mittels FCS in der Plasmamembran von BY-2 Protoplasten untersucht und konnte für diese ebenfalls zwei Komponenten identifizieren. Sie fanden Diffusionszeiten in einem Wertebereich von  $D_1 = (0, 7 - 1, 0) \mu m^2/s$  und  $D_2 = (8 - 68) \mu m^2/s$  für drei unterschiedliche Lipid-Proben, wobei deren Einzelabweichungen geringer waren. Die Werte die sich aus dem 2-Komponenten Modell ergeben liegen in vergleichbarer Größenordnung wie die hier gemessenen (siehe Tab.7.1). Allerdings ist die langsame Komponente mit 76-86% als Hauptanteil vertreten.

Auch in dieser Studie konnte über die Anpassungsqualität nicht zwischen Anomaler Diffusion und 2-Komponenten Modell unterschieden werden. Allerdings lagen die Werte für den Transportkoeffizienten  $\Gamma \operatorname{mit}(0, 9-2, 1) \,\mu \mathrm{m}^2/\mathrm{s}^{\alpha}$  eine Größenordnung unter den in dieser Arbeit ermittelten. Welches Modell für die Lipid-Analoge zutreffender ist, konnte abschließend nicht geklärt werden. Sowohl eine gehinderte Diffusion als auch die Lokalisation in Mikrodomänen halten die Autoren für möglich. Die Beschränkung des Kalium<sup>+</sup>-Kanal KAT1 auf Mikrodomänen konnte schon gezeigt werden [56, 224]. Lenne und Mitarbeiter [228] konnten zeigen, dass das Auftreten von 2-Komponenten bei FCS-Messungen durch das Vorhandensein von Mikrodomänen erklärt werden kann. Dazu wurde ein FCS Diffusionsgesetzaufgestellt, welches eine graphische Auftragung der Diffusionszeit (d.h. die durchschnittliche Zeit, die ein fluoreszierendes Molekül innerhalb der beleuchteten Fläche verbringt) über die Beobachtungsfläche (Strahlradius zum Quadrat) benötigt. Aus dem Schnittpunkt mit der y-Achse lässt sich ein Wert mit der Bezeichnung  $t_0$  bestimmen. Auf Grundlage umfangreicher modellierter Diffusionsstudien wurde festgestellt, dass bei einer dynamischen Aufteilung in Mikrodomänen der Wert für  $t_0$  positiv ist und im Fall von negativen Werten die Diffusion in einem Geflecht aus mehreren benachbarten Domänen, deren Barrieren nicht überschritten werde können (Ausbildung von sogenannten Korallen auf Grund des Aktin-basierten Cytoskeletts), erfolgt. Die mittlere Diffusionszeit für den Kalium<sup>+</sup>-Kanal KAT1, die im Rahmen dieser Arbeit gemessen wurde, liegt bei 9,4 ms mit einer hohen Standardabweichung von 7 ms bei einen Strahlradius von ca.160 nm. Im Vergleich mit den in der Studie von Lenne et. al. untersuchten Transmembranproteinen, Lipid-Analogen und Membrankomponenten, zeigt sich, dass sich in den Graphen der Transmembranproteine die Werte für die gemessenen Werte für KAT1 nur auf den Geraden für Transmembranproteine wiederfinden lassen. Für diese ergeben sich im entsprechenden Beobachtungsbereich eine Diffusionszeit von etwa 10 ms und der y-Achsenabschnitt liegt bei negativen Werten zwischen -10 und -20. Allerdings lässt sich darüber nur eine sichere Aussage treffen, wenn weitere FCS-Studien in Abhängigkeit des Strahlradius durchgeführt werden.

Dennoch scheint der geringe Anteil an der langsamen Diffusionskomponente mit  $\rho_2 = 35 \pm 12 \%$  für KAT1::GFP dafür zu sprechen, dass eine Lokalisation auf kleine, beschränkte Domänen nicht die einzige Diffusionskomponente ist, die die Beweglichkeit des pflanzlichen Kalium<sup>+</sup>-Kanal beeinflusst.

Im Vergleich liegen die mobile Fraktion in FRAP Messungen aus [228] für die GFP markierten Transmembranproteine Dipeptidyl-Transferase und den Transferin-Rezeptor bei 85% und 77%.

Die axiale Ausdehnung (z-Achse) des konfokalen Volumens lässt sich aus dem Strukturfaktor und dem lateralen Strahlradius bestimmen und liegt bei  $z \approx 1, 4 \,\mu\text{m}$ . Damit ist das Anregungsvolumen nicht nur auf die Plasmamembran beschränkt, sondern reicht bis ins Zytoplasma. Damit können auch dort markierte Komponenten angeregt werden.

Eine gänzlich freie Diffusionskomponente von "freiem Farbstoff" oder von frei im Zytoplasma diffundierender Kalium<sup>+</sup>-Kanal KAT1::GFP kann ausgeschlossen werden. GFP wird an das Transmembranprotein fusioniert und kommt nicht als freie Komponente im Zytosol vor. KAT1 ist zudem ein Transmembranprotein und kommt auch nicht als freie Komponente im Zytoplasma vor, sondern wird über Transportvesikel vom ER zur Plasmamembran transportiert.

Als Begründung für eine zusätzliche drei-dimensionale Komponente in lebenden Zellen werden in anderen Studien neben einer freien Diffusion auch Transportprozesse über Frachtcontainer genannt, wie endozytotische Vesikel, deren Mobilitätsparameter im Bereich von Membranlipiden liegen [214, 229]. Allerdings handelt es sich im Vergleich zu den hier gemessenen Diffusionskomponenten höchstens um die langsame Komponente [230]. Teilweise liegen die Diffusionkoeffizienten für Endozytose-Vesikel sogar noch drei bis vier Größenordnungen unterhalb des gemessenen langsamen Diffusionskoeffizienten [7, 231]. Da die Diffusion aber Hauptsächlich von der schnellen Komponente mit  $\rho_1 = 65 \pm 12 \%$  dominiert wird, sollte vor allem dieser Ursprung abgeklärt werden.

Wenn nicht von einem Mikrodomänen-Ansatz ausgegangen wird, dann könnte die schnelle Komponente noch durch zusätzliche photophysikalische Effekte des GFPs verursacht werden, die durch Protein-Protein oder Protein-Lipid Wechselwirkungen verursacht werden könnten.

#### Vergleiche mit anderen Messsystemen

Bei der Untersuchung der lateralen Diffusion kann nicht nur bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zwischen einer langsamen und schnellen Komponente unterschieden werden, sondern auch bei FRAP [49] und TIR-FCS Messungen (eine Kombination aus TIRFM und FCS,[232]) finden solche Modelle Anwendung. In [232] wurde ein Membran bindender GFP-Mutant (EGFP-F) mit unterschiedlichen Einzelmolekülmethoden (TIR-FCS, FCS,SPT) in HeLa-Zellen untersucht und der Diffusionskoeffizienten verglichen. Dabei konnten gleichzeitig zwei Arten von Diffusion beobachtet werden. Eine schnelle drei-dimensionale im Bereich von  $11-27 \,\mu m^2 s^{-1}$  mit einem Anteil von 59-72% und eine viel langsamere zweidimensionale zwischen  $0, 5-0, 7 \,\mu m^2 s^{-1}$  mit 28-42%. Mittels herkömmlicher FCS-Messungen und der Einzelmolekül-Verfolgung konnte die Annahme einer freien Diffusion im Zytosol nahe der Plasmamembran und einer langsamen lateralen Diffusion innerhalb dieser bekräftigt werden. Die Einzelmolekül-Verfolgung ergab nur eine langsame Komponente mit einem Wert von 4, 7 ± 4, 6  $\mu m^2 s^{-1}$  [232].

# Teil IV.

Untersuchung der Zusammensetzung von COPI-Vesikeln anhand zweier Coatomer Isotypen

# Untersuchung der Zusammensetzung von COPI-Vesikeln anhand zweier Coatomer Isotypen

Die Kenntnis der Zusammensetzung der Proteinhülle von COPI-Vesikeln ist notwendig, um zu verstehen, durch welche Einflüsse frachtspezifische Unterschiede in der Zelle erkannt und gesteuert werden.

Bisher gibt es allerdings keine Methode, um die Zusammensetzung in Bezug auf unterschiedliche Coatomer-Spezies zu unterschieden und zu quantifizieren.

Daher besteht ein grundlegendes Interesse darin, neue Ansätze auszuprobieren, um ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Isotypen-Kompositionen in den COPI-Vesikeln unterschieden werden können.

Um Heterogenitäten innerhalb einer Probe zu erkennen, eignen sich insbesondere Fluoreszenzmethoden in Verbindung mit der Einzelmolekülspektroskopie. Auf Basis einer Einzelmolekül-FRET-Analyse soll die alternierende Laseranregung genutzt werden, um den zusätzlichen Parameter der Stöchiometrie zu erhalten.

In diesem Kapitel wurde auf Basis bereits in der Arbeitsgruppe etablierter Techniken ein Ansatz zur Kolokalisationsanalyse getestet. In Kooperation mit Dr. Vincent Popoff aus der Arbeitsgruppe von Prof. Felix Wieland (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) wurde die biologische Fragestellung der Zusammensetzung der COPI-Vesikel, die für den Transport innerhalb des frühen sekretorischen Weges zuständig sind, aus unterschiedlichen Coatomer-Isotypen untersucht.

## 9. Experimenteller Teil und Methoden

In diesem Abschnitt sollen kurz die Grundideen des Methodenansatzes sowie der apparative Aufbau und die Softwareanalyse vorgestellt werden. Der apparative Aufbau und die Softwareentwicklung waren nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit, sondern wurden nur genutzt, um den neuen Methodenansatz auszutesten.

Die Grundidee der Datenauswertung und der Kernpunkt zur Charakterisierung der Proteinhülle von Transportvesikeln besteht in dem Ansatz der Einzelpaar-FRET-Analyse unter Verwendung einer alternierenden Laseranregung [191]. Dabei wird jedes COPI-Vesikel als einzelnes Donor-Akzeptor-Wertepaar angesehen. Dies ist möglich, da die Vesikel mit einer durchschnittlichen Größe von 70-80 nm [146] unter der Auflösungsgrenze des verwendeten Fluoreszenzmikroskops von ca. 200 nm [233] liegen. In dieser Arbeit wird als Donor ein markierter Coatomer-Isotyp mit einer Atto-488 Farbstoffmarkierung bezeichnet. Eine blaue Beleuchtung erfolgte bei einer Laseranregung mit einer Wellenlänge von 488 nm. Als Akzeptor dient ein Coatomer-Isotyp mit einer Atto-680 Farbstoffmarkierung. Eine rote Beleuchtung entspricht einer Anregungswellenlänge von 633 nm.

## 9.1. Experiemteller Aufbau

Für die Messungen der COPI-Vesikel wurde ein bereits in der Arbeitsgruppe etabliertes TIRFM-System verwendet [233]. Als Basis dient ein kommerzielles Zeiss-Mikroskopstativ (Zeiss Axiovert 200M, Carl Zeiss, Jena). Zur Anregung wurden ein roter 635 nm Laser (World Star Tech TECGL-25GC-635,25 mW, Toronto, Kanada) und ein blauer 488 nm Laser (40 mW Cyan Laser, Newport, Kanada) verwendet. Beide Laser sind in eine optische Einzelmodenfaser (Thorlabs, Newton, New Jersey) eingekoppelt. Zur Intensitätseinstellung und Wellenlängenselektion sowie zur alternierenden Laseranregung wird ein AOTF (AOTF.nC-VIS, AA Optoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich) verwendet, der hinter der Faserauskopplung eingebaut ist. Über mehrere Spiegel und ein Teleskop werden die überlagerten Laserstrahlen über den rückseitigen Eingang in das Mikroskop geschickt, so dass die Strahlen nach Reflexion an einem Dichroiten genau auf der rückseitigen fokalen Ebene des Objektivs fokussiert sind. Über einen Spiegel vor der Mikroskopeinkopplung kann reguliert werden, an welcher Position das Anregungslicht in das Objektiv eintritt. Wird die rückwärtige Linse des Objektivs zentral getroffen, ist eine Weitfeldanregung möglich. Wird die Linse jedoch weit außen getroffen, so fällt der Lichtstrahl schräg auf die Probe und ab einem bestimmten Winkel wird das Licht im sogenannten TIR-Modus (totale interne Reflexion) total reflektiert. Um diesen Modus zu erreichen, wurde ein Öl-Immersionsobjektiv mit hoher numerischer Apertur verwendet (Nikon CFI TIRF Apochromat 100x Oil, NA 1,49, Nikon Deutschland, Düsseldorf, Immersionsöl Zeiss Immersol TM 518F n =1,518 (23°C), Carl Zeiss, Jena). Mit dem gleichen Dichroiten (Dual Line BeamSplitter,



Abbildung 9.1.: Prinzip der internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie mittels alternierender Laseranregung. Überarbeitete Grafik aus [234]

z 488/633, AHF Analysentechnik, Tübingen), wie zuvor bei der Anregung verwendet, wird das Fluoreszenzlicht in den Detektionspfad gelenkt. Das Fluoreszenzsignal wird zusätzlich über einen Notch-Filter (Dual-Notch Filter 488/631-640nm (AHF)) von der Anregungswellenlänge bereinigt. Die verwendeten Bandpassfilter Sperrfilter HQ 530/60 und HQ 710/50 (AHF, Analysetechnik, Tübingen) haben eine schmale Transmissionsbande, die auf das jeweilige Fluoreszenzspektrum des verwendeten Farbstoffs ausgerichtet ist. Als Detektor dient eine CCD-Kamera mit 512x512 Pixeln (Andor iXon<sup>EM</sup>+ 897 CCD, Andor, Dublin). Die beiden Fluoreszenz-Emissionswellenlängen werden gesondert erfasst. Dies wird durch die Fokussierung des jeweiligen Kanals auf einen Teil des Detektors erreicht. Um dies zu ermöglichen, ist der Detektionsstrahlengang so aufgebaut, dass der Strahl durch einen Schlitz eingeschränkt wird, und über entsprechende Filter die Wellenlängen in zwei unterschiedliche Emissionspfade geteilt werden, welche auf jeweils eine Hälfte des EM-CCD-Chips (engl. electron multiplying charge-coupled device) fokussiert sind. Für eine ausführliche Beschreibung des Aufbaus siehe [233]. Über eine LabView-Routine kann ein alternierender Anregungsmodus gewählt werden, der direkt mit der Kamerasteuerung verbunden ist. Bei der alternierenden Laseranregung (ALEX) internen Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie wird im Allgemeinen mit einem Akustooptischen Filter (AOTF) die abwechselnde Transmission von zwei Wellenlängen eingestellt [104]. Abb.9.1 zeigt die Grenzschicht zwischen Glas  $(n_1)$  und Lösung  $(n_2)$  in der durch Totalreflexion bei alternierender Anregung ein evaneszentes Feld erzeugt wird.

## 9.2. Datenanalyse

Die Datenanalyse beruht hauptsächlich auf einem MATLAB(7.10.0.2010a)-Programm, das meine Arbeitskollegin Kristin Grußmayer während ihrer Diplomarbeit entwickelt hat, um die Effizienzen des Förster-Resonanz-Energietransfers und die Stöchiometrien von markierten Transkriptionsfaktoren mit immobilisierten Nukleinsäure-Biosensoren zu messen (Vgl. [235]). Eine ausführliche Programmbeschreibung findet sich daher in [234].

Die ALEX-TIRF-Analyse-Software ist ein maßgeschneidertes MATLAB-Programm. Es wurde entwickelt, um Videos von Fluorophoren, die mit alternierender Laseranregung unter TIRF-Beleuchtung mit einer EM-CCD-Kamera aufgenommen wurden, zu analysieren.

Für die Zuordnung von kolokalisierten Punkten in den beiden Detektionskanälen wurde eine Transformationsmatrix angewendet, um Translationen und Verzerrungen, die aus der Fokussierung auf unterschiedliche Bereiche des Kamera-Sensors und aus optischen Aberrationen resultieren, auszugleichen. Dazu wurden an jedem Messtag Kalibrierungsmessungen an multispektralen Nanokugeln (TetraSpeck<sup>TM</sup>, Invitrogen) vorgenommen. Die anhand der Nanokugel-Detektion berechnete Bild-Transformationsmatrix wird als Kalibrierung gespeichert und auf die folgenden Videos angewendet. Grundlage bildet die "*Image Processing Toolbox*<sup>TM</sup>" von MATLAB. Die Qualität der Transformationsmatrix kann anhand eines überlagerten Bildes der beiden Kanäle überprüft werden. Über die Software kann der zu verwendende Bild-Bereich zugeschnitten und in einer Kalibrierungsdatei abgespeichert werden. In der darauf folgenden Videoanalyse wird nur der ausgewählte Bereich in allen Videos analysiert und die daraus stammende Transformation angewendet. Die Kanäle können durch die alternierende Laseranregung in vier Photonenströme aufgeteilt werden:

- 1. Akzeptor Emission bei roter Beleuchtung
- 2. Donor Emission bei roter Beleuchtung
- 3. Donor Emission bei blauer Beleuchtung
- 4. Akzeptor Emission bei blauer Beleuchtung

Mit einem Spot-Picking-Algorithmus können Punkte in einem 8-Bit-Intensitäts-reskalierten und aufsummierten Bild identifiziert werden. Für die ausgewählten Punkte hat sich bei einer Pixelgröße von etwa 90 nm ein zu berücksichtigender Punktradius von 3 Pixeln als sinnvoll erwiesen. Abb. 9.2 zeigt ein aufsummiertes Bild aus jeweils 20 Bildern nach Kanal separiert. Zu sehen ist eine Oberfläche mit COPI (coat protein complex I) Transportvesikeln, die den Proteinhüllenkomplex aus zwei unterschiedlichen Isotypen tragen mit spektral unterschiedlicher Farbstoffmarkierung (Vgl. Probenvorberietung 9.4 und Grundlagen 2.5) mit  $\gamma 1\zeta 1$ -680 auf der linknen Seite (roter Kanal) und  $\gamma 2\zeta 1$ -488 auf der rechten Seite (im grünen Kanal). Die Vesikel sind als beugungsbegrenzte Sopts zu identifiezieren. Die weißen Kreise entsprechen der gleichen Position im linken und rechten transformierten Bild. Die Verbindungslinie zeigt die zugeordneten Spots im entsprechend anderen Kanal. Spots die in den Kreisen lokalisiert sind und über eine Linie verbunden, zeigen eine Kolokalisation.

Aus den mit dem Spot-Picking-Algorithmus ausgewählten Punkten und dem festgelegten Punktradius wird die summierte Internsität zur Berechnung der Stöchiometrie (S) und der FRET-Effizienz (E) verwendet [191]:

$$E_{\rm raw} = \frac{F_{\rm Dex}^{\rm Aem}}{F_{\rm Dex}^{\rm Aem} + F_{\rm Dex}^{\rm Dem}}$$
(9.1)

(9.2)

$$S_{\rm raw} = \frac{F_{\rm D_{ex}}^{\rm A_{em}} + F_{\rm D_{ex}}^{\rm D_{em}}}{F_{\rm D_{ex}}^{\rm A_{em}} + F_{\rm D_{ex}}^{\rm D_{em}} + F_{\rm A_{ex}}^{\rm A_{em}}}$$
(9.3)



Abbildung 9.2.: Kolokalisation von Donor und Akzeptor Farbstoffen. Links: Akzeptor-Emission bei roter Anregung (633 nm); Rechts: Donor-Emission bei blauer Anregung (488 nm). Zu sehen ist eine Oberfläche mit COPI-Vesikeln die eine Mischung aus Atto-680 (roter Kanal, Akzeptor) und Atto-488 (grüner Kanal, Donor) markierten Hüllenproteinkomplexe tragen. Die Vesikel sind als beugungsbegrenzte Spots im Bild erkennbar. Kreise, die mit einer durchgezogenen Linie verbunden sind, entsprechen der gleichen Position im linken und rechten transformierten Bild. So können kolokalisierte Spots identifiziert werden. Hier entspricht  $F_{\text{Dex}}^{\text{A}_{\text{em}}}$  der Akzeptor-Emission bei Donor-Anregung, d.h. bei einer Donor-Anregung des Isotypen mit 488 nm wird die Fluoreszenzintensität bei 680 nm detektiert und geht als Term zur Berechnung der FRET Effizient und Stöchiometrie ein. Entsprechendes gilt für das Fluoreszenzsignal  $F_{\text{Dex}}^{\text{Dem}}$  bei Donor-Anregung und Emission bei 488 nm u.s.w.. Liegen die Kanäle spektral nah beieinander, müssen bestimmte Korrekturfaktoren berücksichtigt werden, wie das Überlappen des Donor-Kanals in den Akzeptor-Kanal als Crosstalk oder unterschiedliche Quanteneffizienzen der Farbstoffe. Bei den Donor- und Akzeptor-Farbstoffen und den Bandpassfiltern, die in dieser Arbeit verwendet wurden, findet kein Crosstalk statt.

## 9.3. Datendarstellung: ES-Hisogramme

Die Darstellung erfolgt in sogenannten ES-Histogrammen. Ein einzelner Eintrag im ES-Histogramm stellt einen Werteintrag aus der FRET-Effizienz (E) und der Stöchiometrie (S) dar, der sich aus zwei aufeinanderfolgenden Bildern bei alternierender Anregung für einen gewählten Punkt ergibt, die Darstellung ist als zweidimensional. Alle ES-Histogramme sind über die Bin-Größe (0,02) und die Gesamtzahl aller Einträge normiert und repräsentieren die Häufigkeitsverteilung für ein ES-Wertepaar. Zusätzlich werden die eindimensionalen Häufigkeitsverteilungen als Projektionen mit dargelegt.

## 9.4. Probenherstellung und Markierung

Die Herstellung der untersuchten Proben ist durch Vincent Popoff aus der Arbeitsgruppe von Prof. Felix Wieland (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg) erfolgt. Rekombinantes, isotypenreines Coatomer wurde über die Expression der Komplexe in Insektenzellen erstellt. Eine ausführliche Material- und Methodenbeschreibung findet sich in [236].

Die Markierung der einzelnen Coatomer-Isotypen erfolgte unspezifisch mit Atto488-NHS und Atto680-NHS (ATTO-TEC GmbH, Siegen) über im Protein vorhandene Amine, z.B an Lysin-Aminosäureresten. Die Markierungsprozedur erfolgte nach dem Herstellerprotkoll [199] S.69-71). Der getrocknete Farbstoff wurde in N,N-Dimethylformamid (DMF, Sigma-Aldrich, Steinheim) immer auf eine Ausgangskonzentration von 2 mg/ml gebracht. Der Markierungsansatz erfolgte mit 1,2 nmol (660 µg) Coatomer und 10-fachen Farbstoffüberschuss. Der pH-Wert wurde mit 3 M KOH Lösung auf 8 eingestellt und für drei Stunden auf Eis im Dunkeln inkubiert. Als Puffer für den Markierungsansatz und die Säulenaufreinigung (Sephadex G-25) wurde der im Folgenden aufgelistete COPs Puffer verwendet (siehe Tab.9.1).

## 9.5. Probenvorbereitung und Systemeinstellungen

#### 9.5.1. COPI-Vesikel

Die COPI-Vesikel (coat Protein I) wurden in einem *in vitro* Rekonstitutionsverfahren von aufgereinigten Golgi-Membranen generiert. Dazu wurden markiertes und unmar-

kiertes Coatomer (je nach Markierungseffizienz etwa im Verhältnis 1:7) und rekombinanter, myristoylierter ADP-Ribosylierungsfaktor 1 (ARF1) (aus Rattenleber) in Gegenwart von Guanosin-5´-3-O-(thio)-triphosphat(GTP $\gamma$ S), einer nur sehr langsam hydrolysierbaren Form von Guanosin-5´-triphosphat (GTP), für 10 Min bei 37°C inkubiert und von der Golgi-Membran gelöst (Protokoll in [237]).

Für alle TIRF-Messungen wurden die COPI-Vesikel im Verhältnis 1:50 in einem Sucrosepuffer (siehe Tab.9.2) verdünnt. Für die Herstellung der fixierten Vesikel wurden noch 15% Glutaraldehyd zum 37,5% Sucrospuffer dazugegeben.

 $50 \,\mu$ l der Lösung wurden in eine von 8-LabTek Kammern ((Lab-Tek<sup>TM</sup>, Thermo Fisher Scientific) gegeben. Die Vesikel sinken auf die Oberfläche und werden so unspezifisch immobilisiert. Die Glasoberfläche wurde zuvor für 30 s mit einer wässrigen Lösung aus Fluorwasserstoff (0,1 M HF Lösung) und 5-maligem Waschen mit destilliertem Wasser (MilliQ-Qualität) gereinigt. Alle Proben wurden bis kurz vor den TIRF-Messungen auf Eis aufbewahrt um Hydrolyse oder Verlust der Proteinhülle zu vermeiden.

Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Zugabe der verdünnten COPI-Vesikel-Lösung wurde nach einer Wartezeit von ca. 15 Min mit dem Messvorgang begonnen. Nach Fokussierung auf die Oberfläche wurde die Probe mit jeweils einer Laserleistung von ca. 175  $\mu W/cm^2$  mit 488 nm und 680 nm alternierend beleuchtet. Bei einer Belichtungszeit von 100 ms und einem Gain von 800 wurden 40 Bilder aufgenommen.

### 9.5.2. Kalibrierung mit multispektralen Nanokugeln

1 μl der Tetraspeck Suspension wurde in eine gereinigte Lab-Tek Kammer (30 s 1x0,1 M HF Lösung, 5xWaschen) gegeben und nach Eintrocknung (ca. 1 Stunde) mit den Lasereinstellungen aus 9.5.1 gemessen. Die Belichtungszeit betrug ebenfalls 100 ms und der Gain wurde je nach Signalstärke reguliert, typischerweise zwischen 25 und 50.

## 9.6. Puffer

HEPES (4-(2-hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure)	$25\mathrm{mM}$
pH-Wert mit Kaliumhydroxid (KOH) auf $pH = 7, 4$ einstellen	
Kaliumchlorid (KCL)	$200\mathrm{mM}$
Glycerin	$10\%({ m w/v})$
frisches Dithiothreitol (DTT)	$1\mathrm{mM}$

Tabelle 9.1.: Herstellung des COPs Puffers

HEPES (4-(2-hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure)	$25\mathrm{mM}$
pH-Wert mit Kaliumhydroxid (KOH) auf $pH = 7, 2$ einstellen	
Magnesiumacetat	$2,5\mathrm{mM}$
Saccharose	$40\%(\mathrm{w/v})$

Tabelle 9.2.: Herstellung des Saccharose Puffers

## 10. Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse aus den TIRFM-Messungen der beiden Coatomer Isotypen  $\gamma 1\zeta 1$  und  $\gamma 2\zeta 1$  präsentiert. Dabei sollte geklärt werden, ob COPI-Vesikel mit einer homogenen Coatomer-Spezies Hülle gebildet werden oder ob unterschiedliche Coatomer-Isotypen in eine Vesikel-Hülle eingebaut sind.

#### 10.0.1. Vergleich Weitfeld- mit TIRF-Mikroskopie

Da bei dem verwendeten Aufbau des Interne-Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie die Eindringtiefe des evanezenten Feldes bei ca.100 nm liegt, sollte zunächst geprüft werden, ob die 70-80 nm großen Vesikel ganz ausgeleuchtet werden oder ob andernfalls eine Weitfeldbeleuchtung geeigneter für die Probenanregung ist. Als Probe dienten COPI-Vesikel, die eine Proteinhülle aus einem Isotypen besaßen. Es wurden bei der Probenvorbereitung ein 1:1 Gemisch aus zwei unterschiedlich markierten Coatomer verwendet mit  $\gamma 1 \zeta 1$ -488 und  $\gamma 1 \zeta 1$ -680. Die Probenoberfläche wurde einmal mit einer Weitfeld-Einstellung (A) und einmal mit einer TIRFM Beleuchtung (B) aufgenommen und analysiert. Mit einem Markierungsgrad von 2,0 für  $\gamma 1\zeta$ 1-488 und 2,3 für  $\gamma 1 \zeta$ 1-680. Insgesamt wurden 15 Videos mit einer Belichtungszeit von 0,1 s in getrennten Kanälen aufgenommen und jeweils die ersten zwei Bilder der 15 Videos für die Bestimmung des ES-Histogramm kombiniert. Die aus der Datenauswertung resultierenden ES-Histogramme sind in Abb. 10.1 gezeigt. Die Proben mit  $\gamma 1\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 zeigen für beide Histogramme eine Breite Verteilung auf der Stöchiometrie-Achse. Die Verteilung der FRET-Effizienz ist für E = 0 maximal und hat nur eine Population. Zur Auwertung wurden jeweils 15 Videos berücksichtigt bei denen unabhängig von der Beleuchtung fast gleich viele Spots für die Auswertung berücksichtigt werden konnten. Für die Weitfeldbeleuchtung wurden 623 Vesikel berücksichtigt und für die TIRRM Beleuchtung waren es 632. Es lässt sich kein offensichtlicher Unterschied zwischen den beiden Beleuchtungsarten feststellen. Beide scheinen gleich gut geeignet zu sein um die COPI-Vesikel zu messen. Da aber bei einer Anregung über ein evaneszentes Feld die Hintergundfluoreszenz reduziert wird, wurde für alle folgenden Messungen die TIRFM Anregung gewählt.

### 10.0.2. Untersuchung homogener Vesikel mit jeweils einem markierten Isotypen

Zur Kontrolle der Kolokalisationsanalyse wurden homogen, mit nur einem Isotypen, umhüllte COPI-Vesikel untersucht. Nur wenn sich dabei zwei Populationen unterscheiden lassen, ist gewährleistet, dass sich unterschiedliche Zusammensetzungen der Proteinhülle bei verschiedenen Coatomer-Isotypen mit dieser Methode feststellen lassen. Dazu wurden die unabhängig voneinander hergestellten COPI-Vesikel aus den



Abbildung 10.1.: Beleuchtungstest: ES-Histogramme für eine COPI Probe mit einer Hülle aus einem Coatomer-Isotypen mit einem 1:1 Gemisch aus  $\gamma 1\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -680 in der Zusammensetzung A) Weitfeldbeleuchtung B) TIRFM Beleuchtung

markierten Isotypen  $\gamma 2\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 in einem Verhältnis 1:1 in Puffer gemischt und bei alternierender Laseranregung gemessen. Insgesamt wurden 15 Videos mit einer Belichtungszeit von 0,1 s in getrennten Kanälen aufgenommen und jeweils die ersten zwei Bilder für die Bestimmung des ES-Histogramm kombiniert. Es konnten 621 Punkte berücksichtigt werden. Das entsprechende Histogramm ist in Abb. 10.2 gezeigt. Mit diesem Histogramm können zwei Verteilungen identifiziert werden. Eine eindeutig lokalisierte Population bei einer FRET-Effizienz bei E = 0 und einer Stöchiometrie S = 1 und eine zweite, über die FRET-Effizienz breiter verteilte, Population bei S = 0. Die normierte FRET Effizienz zeigt ein Maximum bei 0. Im Stöchiometrie-Histogramm zeigen sich zwei deutlich voneinander getrennte Populationen bei 0 und 1. Dies entspricht einem typischen ES-Histogramm ohne FRET. Eine klar lokalisierte Donor Population bei einer Stöchiometrie von 1 zeigt die Verteilung der mit Atto-488 markierten Coatomere. Die Akzeptorpopulation für S = 0, in diesem Fall Atto-680 läge im Idealfall auch bei E = 0, aber diese Abweichungen sind typisch. Durch photophysikalische Effekte gibt es immer eine gewisse Wahrscheinlichkeit im roten Kanal etwas zu sehen, wenn mit Blau angeregt wird.

Die beiden Populationen der Stöchiometrie bei S = 1 und S = 0 können somit durch die beiden spektral unterschiedlich markierten COPI-Vesikel erklärt werden. Die einzige Population für die die FRET Effizient im Histogramm bei 0, bestätigt, dass wie erwartet kein Förster Energietransfer stattfindet. Damit scheint das System geeignet Vesikel mit einer homogenen Proteinenhülle zu unterscheiden.

#### 10.0.3. Hintergrund und Artefakte

Im Folgenden sollte geklärt werden, ob die gemessenen Signale tatsächlich von COPI-Vesikeln verursacht wurden. Da die Vesikel mit einer Größe von 70-80 nm unter der Auflösungsgrenze des TIRFM von ca. 200 nm liegen, konnte eine direkte Vermessung der Punktgröße nicht zeigen, ob es sich um intakte Vesikel oder Fragmente handelte. Eine Wechselwirkung mit der Oberfläche oder eine Änderung des osmotischen Drucks kann zu einem Platzen der Vesikel führen. Auch freier Farbstoff oder die Verwen-



Abbildung 10.2.: ES-Histogram von COPI-Vesikel mit jeweils nur einem markiertem Isotypen. Für diese Messung wurden reine  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -680 Isotypen verwendet.

dung von Puffern mit autofluoreszenten Bestandteilen, sowie über die Aufreinigung nicht entfernte Proteinverunreinigungen und Aggregate können bei Einzelmolekül-Untersuchungen zu detektierbaren Signalen führen. Daher wurden COPI-Vesikel mit einer homogenen Isotyp-Hülle  $\gamma 1\zeta 1$ , aber unterschiedlicher Markierung mit und ohne Guanosintriphosphat (GTP) hergestellt, sowie ein 1:1 Gemisch aus  $\gamma 2\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 mit und ohne GTP. Da GTP ein entscheidender Faktor bei der Vesikelbildung ist, sollten sich ohne GTP in beiden Fällen keine Frachtcontainer mit intakter Proteinhülle ausbilden.

Die Proben wurden unter denselben Bedingungen wie die Vesikel mit homogenem Hüllenprotein vorbereitet und analysiert. Unterschiede ergaben sich bei der Datenaufnahme dadurch, dass für die Messungen ohne GTP bewusst nach Fluoreszenzsignal gesucht worden ist.

Aus der Datenanalyse ergaben sich die in Abb. 10.3 gezeigten ES-Histogramme. Für alle vier Histogramme zeigen sich FRET Effizienzen bei 0. Die Probe mit  $\gamma 1\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 zeigt mit GTP eine Breite Verteilung auf der Stöchiometrie-Achse mit einem Mittelpunkt bei 0,5. Für  $\gamma 2\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 mit GTP ist die Stöchiometrie-Verteilung nicht eindeutig einem Peak zuzuordnen. Für die beiden unteren Bilder ohne GTP ist jeweils eine unspezifische Verteilung zu erkennen. Die Anzahl der Punkte die ohne GTP gefunden wurden liegt etwa bei 20% der Anzahl der gefundenen Punkte für Vesikel mit GTP. Im Vergleich ist in Abb.10.4 die Intensität der entsprechenden Isotypen mit Markierung als Häufigkeit über die beiden Kanäle im roten und blauen Kanal dargestellt. Auch hier liegt im Vergleich zu Vesikeln mit GTP die Intensität bei etwa 20%. Daraus lässt sich schließen, dass mindestens 80% des Signals von Intakten COPI-Vesikeln stammt.



Abbildung 10.3.: ES-Histogramme: links  $\gamma 1 \zeta 1$ -488  $\gamma_1 \zeta_1$ -680 mit und ohne GTP, rechts  $\gamma 2 \zeta 1$ -488  $\gamma 1 \zeta_1$ -680 mit und ohne GTP.

#### 10.0.4. Vesikel mit gemischten Isotypen

Aus der Analyse zur Untersuchung des Hintergrunds (10.0.3) wurde schon  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -680 als Isotypen-Gemisch untersucht ohne einen Vergleich der der Stöchiometrie Werte vorzunehmen. Um festzustellen, ob es einen quantitativen Unterschied gibt zwischen Vesikel aus gemischten Isotypen, wurden eine Messungen unter den selben Bedingungen, wie zuvor bei der Hintergrund Messung, wiederholt. Dazu wurde sowohl die selbe Charge an markierten Coatomer als auch die gleiche Golgi-Apparat Charge verwendet. In Abb.10.5 sind die beiden Tage für den gleichen Vesikeltyp untereinander dargestellt.

Die Verteilungen für  $\gamma 1\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 im linken Teil haben visuell geschätzt eine etwa gleich breite Verteilung der Stöchiometrie um 0,5. Um dies zu prüfen wurde die Stöchiometrie für den unteren Messtag über die Häufigkeit aufgetragen. Auf der linken Seite in Abb.10.6 ist die Stöchiometrie für  $\gamma 1\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 als eindimensionales Histogramm dargestellt. Für die Kurvenanpassung wurde eine Gaußverteilung zu Grunde gelegt (schwarze Kurve). Das Maximum der Verteilung liegt tatsächlich bei 0,5 und hat eine Halbwertsbreite von 0,75. Für  $\gamma 2\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 besitzt die äquivalente Kurvenanpassung ein Zentrum der Verteilung bei 0,62 bei einer Halbwertsbreite von 1,18. Unter der Annahme, dass der Verteilung mehr als eine Population zu Grunde liegt, wurde eine zweite Gaußfunktion zur Kurvenanpassung, dargestellt in der rechten Abb.10.6, angesetzt. Es ergibt sich ein Zentrum bei x = 0, 44 mit einer Halbertsbreite von 5,33 und ein zweiter Peak bei x = 0, 94 mit einer Halbwertsbreite von 0,22. Sowohl Verteilungen die sich aus einer, als auch aus zwei Populationen zusammensetzen wä-



Abbildung 10.4.: Intensitätsverteilung im roten und blauer Kanal nach Auswertung von 15 Videos der beiden unterschiedlichen Isotypen  $\gamma 1\zeta 1$ -488 $\gamma 1\zeta 1$ -680, sowie  $\gamma 2\zeta 1$ -488 $\gamma 1\zeta 1$ -680 im Verhältnis 1:1 mit und ohne GTP.



Abbildung 10.5.: Unterschiedliche Messtage im Vergleich. Links  $\gamma 1\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -488, sowie rechts  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -488.



Abbildung 10.6.: Stöchiometrie-Histogramm und Kurvenanpassung mittels Gaußfunktion für  $\gamma 1\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 unter der Annahme einer vorhandenen Population, sowie die  $\gamma 2\zeta 1$ -488  $\gamma 1\zeta 1$ -680 Stöchiometrie-Verteilung unter Berücksichtigung zweier Gaußfunktionen.

ren denkbar. Allerdings ist keine vollständige Separation wie in Abb. 10.2 ersichtlich. Damit scheint es keine vollständige Separation der Isotypen in den COPI-Vesikel zu geben.

### 10.0.5. Einfluss der Farbstoffmarkierung

Um eine quantitative Aussagen über die Verteilung der Coatomer-Isotypen zu machen muss geklärt werden, wie sensitiv die Kolokalisationsanalyse auf unterschiedliche Coatomerverteilungen reagiert. Bisher wurden immer Vesikel mit einer 1:1 Verteilung untersucht. Das heißt, je nach Markierungsgrad wurden  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 in der selben Konzentration zum COPI Bildungsansatz dazu gegeben. Jetzt sollten noch die Verhältnisse getestet werden, wenn  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 im Verhältnis 4:1 oder 1:4 verwendet werden.

Dazu sollten COPI-Vesikel mit nur einer Coatomer-Spezies  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 und COPI-Vesikel mit zwei Coatomer-Spezies  $\gamma 2\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 in der Proteinhülle untersucht werden. Für den Herstellungsansatz wurden unterschiedliche Verhältnisse von markiertem Coatomer verwendet. D.h. bei einem 1:1 Verhältnis wurde  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 zu gleichen Teilen verwendet. Bei einem 1:4 Verhältnis wurde vier mal mehr  $\gamma 1\zeta 1$ -680 als  $\gamma 1\zeta 1$ -488 verwendet und entsprechend für 4:1 wurde vier mal mehr  $\gamma 1\zeta 1$ -488 als  $\gamma 1\zeta 1$ -680 eingesetzt. Genauso wurde mit dem Isotypen Gemisch verfahren. Die Einstellungen der Datenaufnahme und Kamera wurden beibehalten (siehe voeherige Messungen).

Die aus der Datenanalyse resultierenden ES-Histogramme sind in Abb. 10.7 gezeigt. Die Histogramme A-C zeigen die verschiedenen Markierungsverhältnise für  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680. Das 1:1 Verhältnis ist in schwarz dargestellt. Für 1:4 wurde ein roter Rand gewählt und eine blaue Umrandung zeigt ein Verhältnis von 4:1. Entsprechendes gilt für die Umrandungen für die Graphen D-F, wobei die Proteinhülle aud zwei Coatomer Isotypen gebildet wurde  $\gamma 2\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680.

Es zeigen sich unterschiedliche Verteilungen sowohl für die verschiedene Farbstoffverhältnissse, wie auch für COPI-Vesikel mit nur einem Isotypen bzw. mit zweien. Festgestellt werden kann, dass der Wert für die FRET Effizient immer ein Maximum für E=0 hat. Allerdings ist die Verteilung für Graph C breiter als für die übrigen Histogramme. Es lässt sich auch noch sagen, dass für einen vierfachen Überschuss an Atto-488 Markierung die Stöchiometrie bei eins liegt. Das gleiche gilt für Abbilddung E. Das Histogramm in Abbilung C zeigt eine relativ breite Streuung, wobei B und F eine breitere Häufigeitsverteilung besitzen. Insbesondere für die Abbildung E bei einem 1:1 Verhältnis der beiden Coatomer Spezies ist es verwunderlich, da für E = 1quasi nur eine Komponenten mit Atto-488 detektiert wird. Dies Verhalten lässt sich nur erklären, wenn man zu Grunde legt, dass für diese Messungen ein neuer Markierungsansatz für alle Coatomere verwendet wurden musste. Dabei hatte  $\gamma 2\zeta$ 1-488 einen Markierungsgrad von 4,2 und  $\gamma 1\zeta 1$ -488 von 1,4 sowie  $\gamma 1\zeta 1$ -680 von 1,2. Durch diesen sehr viel höheren Markierungsgrad von  $\gamma 2\zeta$ 1-488 ist die Häufigkeitsverteilung scheinbar dominiert vom 488 nm Farbstoff. Verwendet man vier mal mehr  $\gamma 1 \zeta 1$ -680 dann können sich zwei etwa gleich hohe Verteilungen Populationen im Stöchiometrie Histogramm erkennen lassen. Aber trotz unterschiedlicher Markierungseffizienzen zeigt sich eine Verhältnisabhängigkeit, die sich für  $\gamma 1 \zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1 \zeta 1$ -680 in der Beobachtung zeigt, dass für einen vier fach höheren Anteil an  $\gamma 1\zeta 1$ -488 nur eine Population in der Stöchiometrie für S=1 zu sehen ist. Bei dem 1:1 Verhältnis ist keine so abgegrenzte Population erkennbar, auch wenn es ein Maximum bei 1 gibt ist der Rest der Verteilung bis 0 etwa halb so oft vertreten. Für 1:4 ist dann wieder eine erkennbare Dominanz der Stöchiometrie bei S = 0 zu sehen.



Abbildung 10.7.: Unterschiedliche Verhältnisse an markierten Coatomer Isotypen in der Proteinhülle von COPI-Vesikeln. Rote Umrandung 1:4, schwarze Umrandung 1:1 und blaue Umrandung 4:1. Einmal für  $\gamma 1\zeta$ 1-488 bzw.  $\gamma 1\zeta$ 1-680 und zum anderen für  $\gamma 2\zeta$ 1-488 bzw.  $\gamma 1\zeta$ 1-680

## 11. Diskussion

Um die Zusammensetzung der Proteinhülle von COPI-Vesikel zu bestimmen wurde ein neuer Ansatz gewählt und über eine alternierende Laseranregung die Stöchiometrie bestimmt.

#### Vergleich Weitfeld- mit TIRF-Mikroskopie

Da die Größe der Vesikel varierren kann wurde getestet, ob mit einer TIRF Beleuchtung die ganze Probe erfasst werden kann. Im Gegensatz zur Weitfeldbeleuchtung konnte kein Unterschied festgestellt werden. Daher wurde auf Grund eines besseren Singal-zu-Rausch Verhältnisses eine TIRF-Beleuchtung gewählt für alle folgenden Experimente gewählt.

Die Messungen wurden an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Als Probe dienten COPI-Vesikel, die eine Proteinhülle aus  $\gamma 1\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -680 Vesikel hatten und in einem Verhältnis von 1:1 gemischt waren. Das Verhältnis von markiert zu unmarkiert lag bei 1:4.

Die markierten Coatomere stammten aus einem Markierungsansatz, die Inkubation über die Golgi-Membran erfolgte über zwei verschiedene Präparate. Die resultierenden ES-Histogramme in Abb.10.1 zeigen trotz unterschiedlicher Beleuchtung und verschiedenen Golgi-Membranen vergleichbare Häufigkeitsverteilungen. Die FRET Effizienz zeigt keinen Energietransfer, da die Verteilung ein einzelnes Maximum um 0 hat. Die Stöchiometrie ergibt für beide Proben eine breite Verteilung mit einem Maximum um 0,5. Dies ist für eine Probe mit gleichem Coatomer-Isotyp mit zwei unterschiedlichen Markierungen, die allerdings im gleichen Verhältnis der Probenvorbereitung zugesetzt wurden, zu erwarten.

#### Hintergrund und Artefakte

Messungen mit und ohne Guanosin-5´-triphosphat (GTP) wurden durchgeführt. GTP beeinflusst die Vesikelbildung, bei Abwesenheit sollten sich keine COPI Vesikel formen. Dies sollte klären, ob die beobachten Spots, tatsächlich Vesikel sind. Es konnte gezeigt werden, dass ohne GTP wesentlich weniger Spots identifiziert werden können. Trotz bewußter Suche nach fluoreszierenden Anteilen auf der Oberfläche bei der Probe ohne GTP, zeigt sich, dass sie Häufigleitsverteilung der Intensität im roten und grünen Kanal nur etwa 20% des Signals ausmachen, die für Proben mit gemessen werden. Der 3-D Graphen der die Häufigkeitsverteilung der Intensität über die beiden Emissionskannäle zeigt ist ist in Abb. 10.4 zu sehen. Diese Analyse ist nur quantitativ und gib nur einen grobe Abschätzung wie viel unspezifische Spots man detektiert. Im Prinzip lässt sich dadurch aber nicht sagen, ob die Vesikel bei Kontakt mit Glasoberfläche Platzen. Erfahrungswerte in der AG Wieland zeigen, dass COPI-Vesikel relativ robust gegenüber osmotischen Druckunterschieden in Wasser sind und auch beim Kontakt mit einer Glasfläche nicht Platzen. Um dies zu Testen wurden mit 1,5-Pentandial fixierte Vesikel untersucht (Daten nicht gezeigt). Diese weisen vergleichbare Intensitäten und Stöchiometrien wie die unfixierten auf, daher wurde entschieden die Experimente ohne Fixierung durchzuführen.

#### Untersuchung homogener Vesikel

Es konnte gezeigt werden, dass, bei einer vollständigen Separation der beiden spektral voneinander getrennt markierten Isotypen, die FRET Effizienz E = 0 ist und es zwei Populationen für die Stöchiometrie gibt. S = 1 für  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und S = 0 für  $\gamma 1\zeta 1$ -680 (Vgl. Abb. 10.2). Bilden sich homogene Vesikel mit nur einem Isotypen, sollten diese damit im ES-Histogramm identifiziert werden können.

#### Vesikel mit gemischten Isotypen

Um zu untersuchen, ob sich COPI-Vesikel mit einer spezifischen Coatomer Hülle aus einem Isotypen bilden, wurde ein Gemisch aus  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1\zeta 1$ -680 bei der Herstellung der Transportvesikel verwendet. Es ist nicht bekannt, ob es einen Mechanismus gibt, wodurch spezifisch Vesikel gebildet werden, die nur einen Isotypen als Hüllenproteinlomplex tragen. Zum Vergleich wurden noch COPI-Vesikel mit alternierender Laseranregung vermessen, die nur einen Isotypen mit zwei Farbstoffmarkieungen  $\gamma 1\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1 \zeta$  1-680 trugen. Die gemessenen ES-Histogramme sind in Abb. 10.5 gezeigt. Bei nur einem Isotypen wahr die Annahme, dass die Stöchiometrie bei 0.5 liegen sollte. Pro Vesikel sollten etwa gleich viele  $\gamma 1 \zeta 1$ -488 und  $\gamma 1 \zeta 1$ -680 im Hüllenproteinkomplex vertreten sein und im Mittel die gleiche Komposition besitzen. Aufgrund der Verdünnung mit unmarkiertem Coatomer sollte sich kein FRET ergeben. Für  $\gamma 1\zeta 1$ - $488 \gamma 1 \zeta$ 1-680 zeigt sich genau diese Bild für das ES-Histogramm (Vgl. 10.5 Graph A,C). Um den Stöchiometrie-Wert abzuschätzen wurde eine Gaußfunktion angepasst. Es konnte tatsächlich ein Mittelwert von 0,5 gefunden werden mit einer Halbwertsbreite von 0,75. Wie bei der Untersuchung von homogenen Vesikeln gezeigt, ergeben sich für die Stöchiometrie zwei Populationen, wenn eine 100% Separation vorliegt. Aus dem ES-Histgram für das Gemisch ergibt sich weniger eindeutiges Bild  $\gamma 2\zeta 1$ -488 und  $\gamma 1 \zeta 1$ -680. Unter der Anname es könnte sich vielleicht um zwei Populationen für die eindimensionale Häufigkeitsverteilung der Stöchiometrie handeln, habe ich noch eine zweite Gaußfunktion angepasst. Woraus sich eine Population bei 0,44 und eine bei 0,94 liegt. Die Verteilung mit 0,44 hat allerdindings eine Halbwertsbreite von 5,33. Verwendet man nur einen Gaußanpassung, dann ergibt sich ein Wert von 0,62 und eine Halbwertsbrteit von 1,18. Daher könnte durchaus nur eine Population vorhanden sein. Unterschiede können sich auch aus verschiedenen Markierungsgraden ergeben, wie bei den Messungen der unterschiedlichen Markierungsverhältnisse zusehen ist. Dabei lag  $\gamma 1 \zeta 1$ -488 bei einem Markierungsgrad von 2,0,  $\gamma 1 \zeta 1$ -680 bei 2,3 und  $\gamma 2 \zeta 1$ -488 bei 1,6.
#### Einfluss der Farbstoffmarkierung

Es wurden unterschiedlicher Verhältnisse mit einem Markierungsverhältnis von 1:4, 1:1 und 4:1 untersucht. Es konnte prinzipiell eine quantitative Verschiebung zum entsprechenden korrespondierenden Stöchiometrie Wert beobachten werden. Damit sollte der Methodenansat auch bei keiner 100%-igen Seperation der Isotypen eine Trennung der Verteilung zeigen.

Die Verteilung von  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 konnte allerdings nicht für jeden Markierungsgrad bei einem Stöchiometrie Wert von 0,5 reproduziert werden. Für diese Messungen musste ein neuer Markierungsansatz vorgenommen werden aus dem sich für  $\gamma 1\zeta 1$ -488 ein Farbstoff zu Proteinverhältnis von 4,3 ergab. Für  $\gamma 1\zeta 1$ -680 war der DOL 1,2 und für  $\gamma 1\zeta 1$ -488 2,5.

Die Vermutung ist, dass durch die unspezifische Markierung und die ungewisse Anzahl an markiertem Coatomer pro Vesikel, zwei unbekannte Parameter das System beherrschen wodurch ich keine quantitative Aussage über eine unterschiedliche Verteilung der zwei getesteten Isotypen machen kann.

Es gibt zwei unbekannte Parameter, die die Stöchiometrie bei den hier durchgeführten Kolokalisationsexperimenten beeinflussen. So kann unter anderem nur grob abgeschätzt werden wie viele Coatomere ein Vesikel umhüllen. Um Förster Energietransfer zu vermeiden wurden die Isotypen je nach Markierungsgrad zwischen 1:4-1:7 mit ummarkierem Coatomer vom gleichen Isotypen gemischt. Dadurch ergeben sich Variationen in der Anzahl an markiertem Coatomer pro Vesikel. Ein Lösungsansatz besteht darin alle Coatomere zu markieren. Coatomer bildet eine dichte Packung um das Vesikel, wodurch sich auch die Fluorophore räumlich nähern und die FRET Effizienz vermutlich nicht mehr vernachlässigbar wäre. Zwar ist FRET eine geeignete Methode um Molekülwechselwirkungen zu untersuchen und Abstände zu bestimmen, doch würde sich darüber hinaus keine zusätzliche Information über die Zusammensetzung der Isotypen eines COPI-Vesikels ergeben. Durch eine nicht vernachlässigbare FRET-Effizienz müsste man ferner eine 2-dimensionale Verteilung annehmen, was die Datenauswertung erschwert.

Ein zweiter offener Parameter ist die Markierung der einzelnen Coatomere. Durch eine unspezifische Markierung können sich mehrere Fluorophore an einem Coatomer befinden. Desweiteren ist auch nicht bekannt welche Untereinheit markiert wird. Der Markierungsgrad wurde im Ensemble über die Absorption von Küvettenmessungen gewonnen. Hält man den Markierungsgrad besonders niedrig, also ein Fluorophor oder weniger pro Protein, zeigt sich bei der Einzelmolekülauswertung, dass es zu ausgeprägten statistisch Schwankungen kommt, wodurch es passieren kann, dass nur ein Isotyp mit einem höheren Markierungsgrad nachgewiesen werden kann. Das macht aufwändige Kontrollexperimente nötig um für alle Farbstoff- und Isotyp-Kombinationen die exakten Verteilungen zu bestimmen. Zumal beim nächsten Markierungsansatz diese Experimente wiederholt werden müssen und nicht sichergestellt ist, dass bei der Verwendung des selben Protokolls ein gleicher Markierungsgrad erreicht wird. Dadurch wäre die sinnvollste Lösung eine spezifische Markierung des Coatomer. Für Coatomer, das aus Hasenleber aufgereinigt wurde, konnte schon eine spezifische Markierung der  $\alpha$ -Untereinheit durch pH-Wert- und Markierungsverhältnis-Einstellungen mittels eines

Fluorophor-NHS-Esters gezeigt und für FRET Analysen genutzt werden [102]. Dieser Ansatz lässt sich bis jetzt aber noch nicht auf rekombinantes Coatomer anwenden, welches die experimentelle Unterscheidung der Isotypen ermöglicht.

## Teil V.

## Zusammenfassung und Ausblick

### 12. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden dynamische Prozesse in drei unterschiedlichen zellulären Bereichen mittels Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie analysiert: Proteindiffusion in einem biomimetischen Modell des Zytoplasmas, die Diffusion von Kalium-Kanälen in der Plasmamembran und die Zusammensetzung der Hülle von Transportvesikeln aus unterschiedlichen Isoformen des Coatproteins.

#### 12.1. Molecular Crowding

#### 12.1.1. Zusammenfassung

Unter Berücksichtigung einer hohen Konzentration an Biomolekülen (100-400 mg/ml) in einer Lösung können verschiedene kinetische und thermodynamische Eigenschaften beobachtet werden, die sich nicht in gering konzentrierten Lösungen (unter 10 mg/ml) zeigen.

Die Untersuchung der Wirkungen von Crowdern (unmarkierten Hintergrundmolekülen) auf biologische Prozesse und das Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Details stellen aufgrund der breiten Palette an Auswirkungen durch verdrängende Moleküle eine Herausforderung dar. Zwar hat sich schon in vielen Ansätzen gezeigt, dass *Molecular Crowding* einen Einfluss auf die Diffusion, die Faltung und die Assoziation von Proteinen hat, aber es besteht noch kein Konsens über das richtige Design eines *in vitro* Experiments, um möglichst vergleichbare Bedingungen zu Zellmessungen zu schaffen.

Um ein grundlegendes Verständnis über die Abhängigkeit der Wahl eines Proteincrowders zu verstehen, wurden die Diffusionseigenschaften in nativen Proteinlösungen mit Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie untersucht. Für die Experimente wurde ein Standard-Messsystem aufgebaut.

Ein in aktuellen Forschungsarbeiten häufig verwendeter Crowder ist Ficoll 70. In dieser Arbeit wurden die Proteine Ovalbumin (OVA), Rinderserumalbumin (BSA) und  $\gamma$ -Globulin gewählt, da sie eine dem Ficoll 70 vergleichbare Größe aufweisen.

Die translatorische Eigendiffusion von OVA, BSA und  $\gamma$ -Globulin wurde gemessen und ein Vergleich zeigte eine Abhängigkeit von der Größe des verwendeten Hintergrundmoleküls. Vergleiche mit Messungen aus publizierten *in vivo* Experimenten zeigen, dass das Diffusionsverhalten von markierten Proteinen in natürlicher Umgebung (lebenden Zellen) eine starke Abhängigkeit von der Beschaffenheit des markierten Proteins zeigt, wodurch die Diffusion stärker als zu erwarten wäre reduziert wird.

Ergänzend zu den experimentellen Ergebnissen wurden, in Kooperation mit Paolo Mereghetti, die Translationsdiffusionkoeffizienten von BSA und IgG über Simulationen der Brownschen Dynamik verglichen. Hierbei wurden verschiedene Parameter zur hydrodynamischen und elektrodynamischen Wechselwirkung sowie verschiedene Modelle harter Kugeln und halbelastischer Kugeln variiert. Es konnte herausgearbeitet werden, dass die Berücksichtigung hydrodynamischer Wechselwirkungen im Model zu einer Überschätzung des Effekts des Molekular Crowding führt, also eine zu hohe Abnahme der Diffusion vorhersagt. Die beste Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen wurde unter Annahme eines einfachen soft-core Potentials, unter Berücksichtigung der Strukturparameter der Proteine erreicht. Damit scheint die Form der Proteine ein entscheidender Faktor zu sein, wenn es darum geht, *in vitro* Messungen in monodispersen Proteinlösungen als Ersatz für eine natürliche Umgebung durchzuführen. Der Vergleich der Experimente mit den simulierten Daten liefert Ansatzpunkte für weitere Studien, um die Abhängigkeit von Crowdern in Lösungsmessungen besser zu verstehen.

#### 12.1.2. Ausblick

Für die Zukunft ist geplant, die vorhandene Kooperation auszubauen. Die Untersuchung der Diffusionseigenschaften von unterschiedlich strukturierten Proteinen und deren Mischungen ist der nächste Schritt, um zu überprüfen, ob das strukturabhängige Diffusionsverhalten von IgG auch physiologisch relevant ist. Solche Rückschlüsse könnten aus Experimenten gezogen werden, die in realitätsnahen Crowder-Lösungen, zusammengesetzt aus Proteinmischungen und Polymeren oder Zelllysat, durchgeführt werden und mit Zellexperimenten verglichen werden.

Zugleich sind Untersuchungen in artifiziellen Proteinlösungen in Bezug auf die Abhängigkeit des Crowding Effekts von der Proteinstruktur bzw. -form von besonderem Interesse.

Der nächste Schritt für den Vergleich von BD-Simulationen mit Experimenten ist die Untersuchung von Bindungen in hochkonzentrierten artifiziellen Proteinlösungen und deren Abhängigkeiten von der Konzentration oder der Struktur. Das Ziel solcher Messreihen wäre es, experimentell bestimmte Assoziationseigenschaften von Proteinen direkt mit Modellen verknüpfen zu können.

#### 12.2. Membran Diffusion

#### 12.2.1. Zusammenfassung

Transportprozesse an Grenzflächen, wie der Plasmamembran, konnten im Rahmen dieser Arbeit mit optischen Methoden untersucht werden. Dazu wurde ein abstimmbares Weißlichtlasersystem eines kommerziellen Laserscanning Mikroskops mit der Möglichkeit der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung erweitert. Dies gestattet Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messungen im sichtbaren Spektralbereich von 472-680 nm. Dieses Mikroskop konnte erfolgreich zur Messung des Diffusion des freien grün fluoreszierende Protein (GFP) im Zytoplasma von Tabak-Zellen (BY-2) verwendet werden. Der Diffusionskoeffizient liegt mit  $D = (42 \pm 11) \,\mu\text{m}^2/\text{s}$  in sehr guter Übereinstimmung mit bereits publizierten Werten in vergleichbaren Systemen. Diese Messungen galten der Quantifizierung und Validierung des Messsystems.

Der Interessenschwerpunkt lag, auf Grund der Kooperation mit Alice Kress, auf der Untersuchung eines Kaliumkanals in Pflanzenzellen. Als Modellsystem diente ein mit dem Fusionsprotein GFP markierter Kaliumkanal KAT1 in Tabakzellen. Im Vergleich zu freiem GFP im Zytoplasma konnte ein deutlicher Unterschied in der Diffusionszeit des Kaliumkanals in der Plasmamembran der Zellen gemessen werden. Außerdem wurde die Mobilität des KAT1::GFP unter dem Aspekt der anomalen Diffusion diskutiert und auf Grund seiner ungewöhnlich schnellen Diffusion ausgeschlossen. Aus der Anpassung der Messdaten mit einem 2-Komponenten Modell ergeben sich eine schnelle Diffusionskonstante mit  $D_1 = (57 \pm 12) \,\mu \text{m}^2/\text{s}$  mit einem Anteil von  $65 \pm 12 \,\%$  und eine langsamer Diffusionskoeffizient  $D_2 = (1, 4 \pm 0, 5) \,\mu \text{m}^2/\text{s}$  mit  $35 \pm 12 \,\%$ . Die langsame Komponente  $D_2$  liegt in der Größenordnung von anderen Membranproteinen.

Eine mögliche und wahrscheinliche Argumentation für zwei Komponenten basiert auf der Existenz von Mikrodomänen. Die schnellere Komponente  $D_1$  kann so durch Störungen in der Lipid-abhängigen und Zytoskelett-basierten Organisation der Plasmamembran verursacht werden.

#### 12.2.2. Ausblick

Da mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie die Fluoreszenzfluktuationen in einem bestimmten Zeitintervall innerhalb des Beobachtungsvolumen untersucht werden, ist diese Methode nicht geeignet, um stationäre Proteine zu untersuchen. Die in der Nachwuchsgruppe von Tobias Meckel (TU Darmstadt) geplanten SPT und FRAP Messungen können genutzt werden, um die Diffusionskoeffizienten zu vergleichen und klären, ob es neben einer schnellen und einer langsamen Spezies noch eine dritte, stationäre, gibt.

Um zu klären, welcher Effekt ursächlich ist für die schnelle Komponente im 2-Komponenten Modell, können weitere FCS-Studien durchgeführt werden. Insbesondere wäre es interessant, die Anreicherung des KAT1 in der Plasmamembran durch geeignete Inhibitoren, die zum Beispiel auf den sekretorischen Weg Einfluss nehmen, zu unterbinden und zu vergleichen, ob auch unter solchen Bedingungen eine schnelle Komponente messbar ist.

Durch den abstimmbaren Superkontinuum-Laser erhält man beträchtliche Möglichkeiten, um dynamische Prozesse mit neuentwickelten Fluoreszenzsonden in Lösung und in lebenden Zellen zu untersuchen, ohne durch eine beschränkte Wahl der Anregungswellenlänge limitiert zu sein.

Neben der Standard Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in lebenden Zellen ist durch den abstimmbaren Superkontinuum-Laser eine Mehrfarben-Anregung möglich. Dadurch können mögliche Bindungspartner mit spektral unterscheidbaren Farbstoffen über einen weiten spektralen Bereich markiert werden und die Komplexbildung durch Kreuz-Korrelationsanalyse von zwei getrennten Detektionskanälen untersucht werden. So können in Zukunft Assoziations- und Dissoziations-Parameter studiert werden. In Lösung konnte diese Methode schon angewendet werden. So konnten Kreuz-Korrelationsmessungen zur Validierung eines, im Rahmen der Diplomarbeit von Kristin Grußmayer entwickelten, Modells für die Beschreibung von Transkriptionsfaktorgebundenen Biosensoren verwendet werden [234].

#### 12.3. Coatomer

#### 12.3.1. Zusammenfassung

Um die Zusammensetzung der Proteinhülle von COPI-Vesikel zu bestimmen wurde ein neuer Ansatz gewählt und über eine alternierende Laseranregung die Stöchiometrie bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass, bei einer vollständigen Separation der beiden spektral voneinander getrennt markierten Isotypen, diese als homogene Vesikel im ES-Histogramm identifiziert werden können.

Bei Untersuchung unterschiedlicher Verhältnisse einer Markierung zu 1:4, 1:1 und 4:1 kann man prinzipiell eine quantitative Verschiebung zum entsprechenden korrespondierenden Stöchiometrie Wert beobachten. Damit sollte der Ansatz auch bei keiner 100%-igen Seperation der Isotypen eine Trennung der Verteilung zeigen.

Die Verteilung von  $\gamma 1\zeta 1$ -488 bzw.  $\gamma 1\zeta 1$ -680 konnte allerdings nicht für jeden Markierungsgrad bei einem Stöchiometrie Wert von 0,5 reproduziert werden. Bei ungleichmäßiger Markierung war immer ein signifikant größerer Anteil derAtto488 Probe sichtbar. Die Vermutung ist, dass durch die unspezifische Markierung und die ungewisse Anzahl an markiertem Coatomer pro Vesikel, zwei unbekannte Parameter das System beherrschen wodurch ich keine quantitative Aussage über eine unterschiedliche Verteilung der zwei getesteten Isotypen machen kann. Die untersuchten Proben wurden im Rahmen einer Kooperation von Vincent Popoff zur Verfügung gestellt.

#### 12.3.2. Ausblick

Für die Zukunft wäre eine spezifische einfache Markierung von Coatomer wünschenswert. Diese ist vielleicht mit Protein-Tags erreichbar. Damit könnte eine Mehrfachmarkierung eines Isotypen vermieden werden und die Farbstoffverteilung pro coat protein complex I (COPI)-Vesikel wäre nur durch die Coatomer Anzahl bestimmt.

Insgesamt lässt sich die Markierung auch variieren in dem man unterschiedlich Farbstoffe ausprobiert. Desweiteren wurden hier nur die zwei Isotypen ausgetestet, die den größten molaren Anteil bei der Proteinhüllenzusammensetzung der COP Vesikel bilden . Aber prinzipiell könnte man auch andere Kombinationen wählen.

Allgemein liefert die Methode einen neuen Ansatz zur quantitativen Untersuchung der Proteinbeladung von Vesikeln.

# A. Abkürzungen

alternierende Laseranregung, engl. alternating-laser excitation
Akustooptischer Filter, engl. Acousto-Optical Tunable Filter
Auto-Korrelations-Funktion
Lawinenphotodioden; engl. avalanche photodiode
ADP-Ribosylierungsfaktor 1
Rinderserumalbumin
Tabak Linie Bright Yellow 2
engl.charge-coupled device
coat protomer
coat Protein
coat protein complex I
coat protein complex II
Konfokales Laserscanning Mikroskop
Dimethylformamid
Markierungsgrad, engl. degree of labelling
endoplasmatische Retikulum
Fluoreszenzerholung nach Photobleichen; engl. Fluorescence Recovery
after Photobleaching
Förster Energietransfer
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
Fluoreszenz-Kreuz-Korrelations-Spektroskopie
grün fluoreszierende Protein
Guanosintriphosphat
Immunglobulin G
Interkombination Intersystem Crossing
Kalium Arabidopsis thaliana channel 1
engl.Laser Scanning Microscope
N-Hydroxysuccinimid
Ovalbumin
phosphatgepufferte Salzlösung
Polyethylenglycol
Photomultiplier; engl. photomultiplier tube
Ribonukleinsäure
Einzelpartikel-Verfolgung; engl. Single Particle Tracking
Time-Correlated Single Photon Counting, zeitkorrelierte
Einzelphotonenzählung
Interne-Totalreflexions-Fluoreszenzmikroskopie
Transistor-Transistor-Logik
ER-Golgi Intermediär Kompartiment
Guanosin-5´-triphosphat

#### SNARE engl. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment receptor

HEPES 4-(2-hydroxyethyl-)piperazin-1-ethansulfonsäure

### Literaturverzeichnis

- Marta Cascante et Al. "The Metabolic Productivity of the Cell Factory". In: Journal of Theoretical Biology 182.3 (1996), S. 317–325.
- [2] David R. Bentley u. a. "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry." In: *Nature* 456.7218 (Nov. 2008), S. 53–9. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature07517.
- Herman J. Pel u. a. "Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88." In: *Nature biotechnology* 25.2 (Feb. 2007), S. 221–31. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt1282.
- [4] Richard A. Gibbs u. a. "Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome." In: *Science* 316.5822 (Apr. 2007), S. 222–34. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1139247.
- [5] A.S. Spirin und J.R. Swartz. Cell-Free Protein Synthesis: Methods and Protocols. John Wiley & Sons, 2008. ISBN: 9783527622696.
- [6] R. John Ellis und Allen P. Minton. "Join the crowd". In: Nature 425 (Feb. 2003), S. 27–28. ISSN: 1742-481X. DOI: 10.1111/j.1742-481X.2011.00929.x.
- [7] K. Luby-Phelps. "Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area." In: *International Review of Cytology* 192 (Jan. 2000), S. 189–221. ISSN: 0074-7696.
- [8] Ohad Medalia u. a. "Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography." In: *Science* 298.5596 (Nov. 2002), S. 1209–13. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1076184.
- [9] Achilleas S Frangakis u. a. "Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99.22 (Okt. 2002), S. 14153–8. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.172520299.
- [10] Akira Kinjo und Shoji Takada. "Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation studied by density functional theory: Statics". In: *Physical Review E* 66.3 (Sep. 2002), S. 1–9. ISSN: 1063-651X. DOI: 10.1103/ PhysRevE.66.031911.
- [11] Fen Du u. a. "Mixed macromolecular crowding accelerates the refolding of rabbit muscle creatine kinase: implications for protein folding in physiological environments." In: *Journal of molecular biology* 364.3 (Dez. 2006), S. 469–82. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.09.018.
- [12] Sean R McGuffee und Adrian H Elcock. "Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm." In: *PLoS computational biology* 6.3 (März 2010), e1000694. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/ journal.pcbi.1000694.

- [13] Huan-Xiang Zhou. "Effect of Mixed Macromolecular Crowding Agents on Protein Folding". In: *Proteins* 72.4 (2008), S. 1109–1113. DOI: 10.1002/prot. 22111.Effect.
- [14] Steven B. Zimmerman. "Macromolecular crowding effects on macromolecular interactions: some implications for genome structure and function." In: *Biochimica et biophysica acta* 1216.2 (Nov. 1993), S. 175–85. ISSN: 0006-3002.
- [15] Allen P. Minton. "How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes?" In: *Journal of cell science* 119.Pt 14 (Juli 2006), S. 2863–9. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.03063.
- [16] Allen P. Minton. "Influence of excluded volume upon macromolecular structure and associations in crowded media." In: *Current opinion in biotechnology* 8.1 (Feb. 1997), S. 65–9. ISSN: 0958-1669.
- Tadashi Ando und Jeffrey Skolnick. "Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo macromolecular motion." In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 107.43 (Okt. 2010), S. 18457–62. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas. 1011354107.
- [18] Antonios Samiotakis, Pernilla Wittung-Stafshede und Margaret S Cheung. "Folding, stability and shape of proteins in crowded environments: experimental and computational approaches." In: *International journal of molecular sciences* 10.2 (Feb. 2009), S. 572–88. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms10020572.
- [19] Sharlene Denos, Apratim Dharb und Martin Gruebele. "Crowding effects on the small, fast-folding protein λ6-85". In: *Faraday Discussions* (2012), akzeptiertes Manuskript. DOI: 10.1039/C2FD20009K.
- [20] Carlos Echeverria und Raymond Kapral. "Molecular crowding and protein enzymatic dynamics". In: *Physical Chemistry Chemical Physics* 14 (2012), S. 6755– 6763. DOI: 10.1039/C2CP40200A.
- Marco J. Morelli, Rosalind J. Allen und Pieter Rein Ten Wolde. "Effects of macromolecular crowding on genetic networks." In: *Biophysical Journal* 101.12 (Dez. 2011), S. 2882–91. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.10.053.
- [22] Tomasz Kalwarczyk u. a. "Comparative analysis of viscosity of complex liquids and cytoplasm of mammalian cells at the nanoscale." In: *Nano letters* 11.5 (Mai 2011), S. 2157–63. ISSN: 1530-6992. DOI: 10.1021/nl2008218.
- [23] Silviya P Zustiak, Ralph Nossal und Dan L Sackett. "Hindered diffusion in polymeric solutions studied by fluorescence correlation spectroscopy." In: *Bio-physical Journal* 101.1 (Juli 2011), S. 255–64. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/ j.bpj.2011.05.035.
- [24] Felix Roosen-Runge u. a. "Protein self-diffusion in crowded solutions." In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108.29 (Juli 2011), S. 11815–11820. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1107287108.
- [25] Margaret R Horton, Felix Höfling, Joachim O Rädler und Thomas Franosch. "Development of anomalous diffusion among crowding proteins". In: Soft Matter 6.12 (2010), S. 2648.

- [26] Sean R McGuffee und Adrian H Elcock. "Diffusion, crowding & protein stability in a dynamic molecular model of the bacterial cytoplasm." In: *PLoS computational biology* 6.3 (März 2010), e1000694. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/ journal.pcbi.1000694.
- [27] Duncan Kilburn, Joon Ho Roh, Liang Guo, Robert M Briber und Sarah A Woodson. "Molecular crowding stabilizes folded RNA structure by the excluded volume effect." In: Journal of the American Chemical Society 132.25 (2010), S. 8690–8696.
- [28] Marie Z Markarian und Joseph B Schlenoff. "Effect of molecular crowding and ionic strength on the isothermal hybridization of oligonucleotides." In: *The Journal of Physical Chemistry B* 114.32 (2010), S. 10620–10627.
- Yaqiang Wang, Conggang Li und Gary J Pielak. "Effects of proteins on protein diffusion." In: Journal of the American Chemical Society 132.27 (Juli 2010), S. 9392-7. ISSN: 1520-5126. DOI: 10.1021/ja102296k.
- [30] Hao Dong, Sanbo Qin und Huan-Xiang Zhou. "Effects of macromolecular crowding on protein conformational changes." In: *PLoS computational biology* 6.7 (Jan. 2010), e1000833. ISSN: 1553-7358. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000833.
- [31] Douglas Tsao, Allen P Minton und Nikolay V Dokholyan. "A didactic model of macromolecular crowding effects on protein folding." In: *PloS one* 5.8 (Jan. 2010), e11936. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0011936.
- [32] Adrian H Elcock. "Models of macromolecular crowding effects and the need for quantitative comparisons with experiment." In: *Current opinion in structural biology* 20.2 (Apr. 2010), S. 196–206. ISSN: 1879-033X. DOI: 10.1016/j.sbi. 2010.01.008.
- [33] Nina Malchus und Matthias Weiss. "Elucidating anomalous protein diffusion in living cells with fluorescence correlation spectroscopy-facts and pitfalls." In: *Journal of fluorescence* 20.1 (Jan. 2010), S. 19–26. ISSN: 1573-4994. DOI: 10. 1007/s10895-009-0517-4.
- [34] R.J. Ellis. "Macromolecular crowding: obvious but underappreciated." In: Trends in biochemical sciences 26.10 (Okt. 2001), S. 597–604. ISSN: 0968-0004.
- [35] Huan-Xiang Zhou, Germán Rivas und Allen P Minton. "Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences." In: Annual review of biophysics 37.1 (2008), S. 375–397.
- [36] Matthew G S Norris und Naglis Malys. "What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase." In: *Biochemical* and biophysical research communications 405.3 (Feb. 2011), S. 388–92. ISSN: 1090-2104. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.01.037.
- [37] David M. Jameson und Justin A. Ross. "Fluorescence fluctuation spectroscopy: ushering in a new age of enlightenment for cellular dynamics". In: *Biophysics* 1.3 (2011), S. 105–118. DOI: 10.1007/s12551-009-0013-8.Fluorescence.

- [38] Silvia Zorrilla und M Pilar Lillo. "Quantitative investigation of biomolecular interactions in crowded media by fluorescence spectroscopy, a good choice." In: *Current protein & peptide science* 10.4 (Aug. 2009), S. 376–87. ISSN: 1875-5550.
- [39] Claus B. Müller, Thomas Eckert, Anastasia Loman, Jörg Enderlein und Walter Richtering. "Dual-focus fluorescence correlation spectroscopy: a robust tool for studying molecular crowding". In: Soft Matter 5.7 (2009), S. 1358. ISSN: 1744-683X. DOI: 10.1039/b812289j.
- [40] James a Dix und a S Verkman. "Crowding effects on diffusion in solutions and cells." In: Annual review of biophysics 37 (Jan. 2008), S. 247–63. ISSN: 1936-122X. DOI: 10.1146/annurev.biophys.37.032807.125824.
- [41] Kiminori Ushida, Michio Tokuyama, Irwin Oppenheim und Hideya Nishiyama. "Anomalous Diffusion in Polymer Solution as Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy and Its Universal Importance in Biological Systems". In: AIP Conference Proceedings 982 (2008), S. 464–469. ISSN: 0094243X. DOI: 10.1063/1.2897838.
- [42] Daniel S Banks und Cécile Fradin. "Anomalous Diffusion of Proteins Due to Molecular Crowding". In: *Biophysical Journal* 89.5 (2005), S. 2960–2971. ISSN: 00063495. DOI: 10.1529/biophysj.104.051078.
- [43] Matthias Weiss, Markus Elsner, Fredrik Kartberg und Tommy Nilsson. "Anomalous Subdiffusion Is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells". In: *Biophysical Journal* 87.5 (2004), S. 3518–3524. DOI: 10.1529/biophysj. 104.044263.
- [44] Laure Wawrezinieck. "Fluorescence correlation spectroscopy to determine diffusion laws: application to live cell membranes". In: *Proceedings of SPIE* 5462 (2004), S. 92–102. ISSN: 0277786X. DOI: 10.1117/12.545014.
- [45] Allen P. Minton. "The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media." In: *The Journal of biological chemistry* 276.14 (Apr. 2001), S. 10577–80. ISSN: 0021-9258. DOI: 10.1074/jbc.R100005200.
- [46] Allen P. Minton. "Implications of macromolecular crowding for protein assembly." In: *Current opinion in structural biology* 10.1 (Feb. 2000), S. 34–9. ISSN: 0959-440X.
- [47] Daisuke Miyoshi und Naoki Sugimoto. "Molecular crowding effects on structure and stability of DNA." In: *Biochimie* 90.7 (2008), S. 1040–1051.
- [48] Florin Despa, Dennis P Orgill und Raphael C Lee. "Molecular crowding effects on protein stability." In: Annals Of The New York Academy Of Sciences 1066 (2005), S. 54–66.
- [49] Miriam L. Greenberg und Daniel Axelrod. "Anomalously slow mobility of fluorescent lipid probes in the plasma membrane of the yeast Saccharomyces cerevisiae." In: *The Journal of membrane biology* 131.2 (Jan. 1993), S. 115–27. ISSN: 0022-2631.

- [50] Malte Wachsmuth, Waldemar Waldeck und Jörg Langowski. "Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatiallyresolved fluorescence correlation spectroscopy." In: *Journal of molecular biology* 298.4 (Mai 2000), S. 677–89. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3692.
- [51] Matthias Weiss, Hitoshi Hashimoto und Tommy Nilsson. "Anomalous Protein Diffusion in Living Cells as Seen by Fluorescence Correlation Spectroscopy". In: *Biophysical Journal* 84.6 (2003), S. 4043–4052.
- [52] N Periasamy und a S Verkman. "Analysis of fluorophore diffusion by continuous distributions of diffusion coefficients: application to photobleaching measurements of multicomponent and anomalous diffusion." In: *Biophysical Journal* 75.1 (Juli 1998), S. 557–67. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(98) 77545-9.
- [53] Gernot Guigas, Claudia Kalla und Matthias Weiss. "The degree of macromolecular crowding in the cytoplasm and nucleoplasm of mammalian cells is conserved." In: *FEBS letters* 581.26 (Okt. 2007), S. 5094–8. ISSN: 0014-5793. DOI: 10.1016/j.febslet.2007.09.054.
- [54] B. Jacobi und S. Partovi. BASICS Molekulare Zellbiologie. Urban & Fischer bei Elsev, 2010. ISBN: 9783437426865.
- [55] Xia Wang u. a. "pH-dependent channel gating in connexin26 hemichannels involves conformational changes in N-terminus." In: *Biochimica et biophysica acta* 1818.5 (Jan. 2012), S. 1148–1157. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbamem. 2011.12.027.
- [56] M. Reuff, M. Mikosch und U. Homann. "Trafficking, lateral mobility and segregation of the plant K channel KAT1." In: *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 12 Suppl 1 (Sep. 2010), S. 99–104. ISSN: 1438-8677. DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00355.x.
- [57] Changwook Lee und Jonathan Goldberg. "Structure of coatomer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats." In: *Cell* 142.1 (Juli 2010), S. 123–32. ISSN: 1097-4172. DOI: 10.1016/j.cell.2010.05. 030.
- [58] Britta Brügger und Felix Wieland. "Mechanismen der COPI-Vesikelbiogenese". In: *Biospektrum* 10 (2004), S. 30–33.
- [59] Ita O'Kelly, Margaret H Butler, Noam Zilberberg und Steve A.N. Goldstein. "Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals." In: *Cell* 111.4 (Nov. 2002), S. 577–88. ISSN: 0092-8674.
- [60] Hebao Yuan, Kai Michelsen und Blanche Schwappach. "14-3-3 Dimers Probe the Assembly Status of Multimeric Membrane Proteins". In: *Current Biology* 13 (2003), S. 638–646. DOI: 10.1016/S.
- [61] Christian Sieben, Melanie Mikosch, Federica Brandizzi und Ulrike Homann. "Interaction of the K(+)-channel KAT1 with the coat protein complex II coat component Sec24 depends on a di-acidic endoplasmic reticulum export motif." In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56.6 (Dez. 2008), S. 997– 1006. ISSN: 1365-313X. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03658.x.

- [62] Jörg Moelleken u. a. "Differential localization of coatomer complex isoforms within the Golgi apparatus." In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104.11 (März 2007), S. 4425–30. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0611360104.
- [63] Dominik Wegmann, Pablo Hess, Carola Baier, Felix T. Wieland und Constanze Reinhard. "Novel Isotypic gamma/zeta Subunits Reveal Three Coatomer Complexes in Mammals". In: *Molecular and Cellular Biology* 24.3 (2004), S. 1070– 1080. DOI: 10.1128/MCB.24.3.1070.
- [64] R. Beck, M. Rawet, M. Ravet, F.T. Wieland und D. Cassel. "The COPI system: molecular mechanisms and function." In: *FEBS letters* 583.17 (Sep. 2009), S. 2701–9. ISSN: 1873-3468. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.07.032.
- [65] G. Hermey, M. Schwake und C. Mahlke. Der Experimentator: Neurowissenschaften. Der Experimentator. SPEKTRUM-ALEMANHA, 2010. ISBN: 9783827423689.
- [66] A. Diaspro. Optical Fluorescence Microscopy: From the Spectral to the Nano Dimension. Springer, 2010. ISBN: 9783642151743.
- [67] X. Shen und R. Wijk. Biophotonics: optical science and engineering for the 21st century. Springer, 2005. ISBN: 9780387249957.
- [68] Rainer H. Köhler. "GFP for in vivo imaging of subcellular structures in plant cells". In: *Trends in Plant Science* 3.8 (1998), S. 317–320.
- [69] Hiroko Yokoe und Tobias Meyer. "Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement". In: *Nature biotechnology* 14 (1996), S. 1252 –1256.
- [70] U. Haupts, S. Maiti, P. Schwille und W.W. Webb. "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95.23 (Nov. 1998), S. 13573–8. ISSN: 0027-8424.
- [71] Conrad W. Mullineaux, Anja Nenninger, Nicola Ray und Colin Robinson. "Diffusion of Green Fluorescent Protein in Three Cell Environments in Escherichia Coli". In: *J Bacteriol.* 188.10 (2006), S. 3442–3448.
- [72] C. Klein und F. Waharte. "Analysis of Molecular Mobility by Fluorescence Recovery After Photobleaching in Living Cells". In: *MICROSCOPY: SCIENCE, TECHNOLOGY, APPLICATIONS AND EDUCATION*. Hrsg. von A. Mendez-Vilas und J.Diaz. Vol.1. Formatex Research Center, 2010, S. 772–783.
- [73] Kevin Braeckmans, Hendrik Deschout und Jo Demeester. "Measuring Molecular Dynamics by FRAP, FCS, and SPT". In: *Optical Fluorescence Microscopy*. Hrsg. von Alberto Diaspro. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. Kap. 9, S. 153–163. ISBN: 978-3-642-15174-3. DOI: 10.1007/978-3-642-15175-0.
- [74] Lin Guo u. a. "Molecular diffusion measurement in lipid bilayers over wide concentration ranges: a comparative study." In: *ChemPhysChem* 9.5 (Apr. 2008), S. 721–8. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.200700611.

- [75] Dylan M Owen, David Williamson, Carles Rentero und Katharina Gaus. "Quantitative microscopy: protein dynamics and membrane organisation." In: *Traffic* 10.8 (2009), S. 962–971.
- [76] Yun Chen, B Christoffer Lagerholm, Bing Yang und Ken Jacobson. "Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins". In: *Methods* 39.2 (Juni 2006), S. 147–53. ISSN: 1046-2023. DOI: 10.1016/j.ymeth.2006.05.008.
- [77] Anne K Kenworthy u. a. "Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface." In: *The Journal of cell biology* 165.5 (Juni 2004), S. 735–46. ISSN: 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.200312170.
- [78] Ian R Bates, Paul W. Wiseman und John W. Hanrahan. "Investigating membrane protein dynamics in living cells". In: *Cell* 831 (2006), S. 825–831. DOI: 10.1139/006-189.
- [79] C. Bräuchle, D.C. Lamb und J. Michaelis. Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer. John Wiley & Sons, 2010. ISBN: 9783527322961.
- [80] Elliot L. Elson. "Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future". In: *Biophysical Journal* 101.12 (Dez. 2011), S. 2855–2870. ISSN: 00063495. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.012.
- [81] Michelle a Digman und Enrico Gratton. "Lessons in fluctuation correlation spectroscopy." In: Annual review of physical chemistry 62 (Mai 2011), S. 645– 68. ISSN: 0066-426X. DOI: 10.1146/annurev-physchem-032210-103424.
- [82] Douglas Magde, Elliot L Elson und Watt W. Webb. "Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization". In: *Biopolymers* 13 (1974), S. 29–61.
- [83] Elliot L. Elson und Douglas Magde. "Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory". In: *Biopolymers* 13 (1974), S. 1–27.
- [84] Antonie J.W.G Visser und Mark A. Hink. "New Perspectives of Fluorescence Correlation Spectroscopy". In: *Journal of Fluorescence* 9.1 (1999).
- [85] T. Wohland, K. Friedrich, R. Hovius und H. Vogel. "Study of ligand-receptor interactions by fluorescence correlation spectroscopy with different fluorophores: evidence that the homopentameric 5-hydroxytryptamine type 3As receptor binds only one ligand." In: *Biochemistry* 38.27 (Juli 1999), S. 8671–81. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi990366s.
- [86] Francesco Cardarelli, Luca Lanzano und Enrico Gratton. "Fluorescence correlation spectroscopy of intact nuclear pore complexes." In: *Biophysical Journal* 101.4 (Aug. 2011), S. L27–9. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.04. 057.
- [87] Ariel Michelman-Ribeiro u. a. "Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy." In: *Biophysical Journal* 97.1 (Juli 2009), S. 337–46. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.027.
- [88] Sally A. Kim, Katrin G. Heinze und Petra Schwille. "Fluorescence correlation spectroscopy in living cells." In: *Nature Methods* 4.11 (2007), S. 963–973.

- [89] E. Gratton, S. Breusegem, N. Barry, Q. Ruan und J. Eid. "Fluctuation Correlation Spectroscopy in Cells: Determination of molecular aggregation". In: *Biophotonics* (2004), S. 1–16.
- [90] Elliot L. Elson. "Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells." In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2.11 (Nov. 2001), S. 789–96. ISSN: 1398-9219.
- K. M. Berland, P. T. So und E. Gratton. "Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment." In: *Biophysical Journal* 68.2 (Feb. 1995), S. 694–701. ISSN: 0006-3495. DOI: 10. 1016/S0006-3495(95)80230-4.
- [92] Thomas Dertinger u. a. "Two-focus fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for accurate and absolute diffusion measurements." In: *ChemPhysChem* 8.3 (Feb. 2007), S. 433–443. ISSN: 1439-4235. DOI: 10.1002/cphc.200600638.
- [93] W.J.A. Koopmans, R. Buning, T. Schmidt und J. van Noort. "spFRET using alternating excitation and FCS reveals progressive DNA unwrapping in nucleosomes." In: *Biophysical Journal* 97.1 (Juli 2009), S. 195–204. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.030.
- [94] Tedman Torres und Marcia Levitus. "Measuring conformational dynamics: a new FCS-FRET approach." In: *The journal of physical chemistry*. B 111.25 (Juni 2007), S. 7392–400. ISSN: 1520-6106. DOI: 10.1021/jp070659s.
- [95] Jonas Ries und Petra Schwille. "Fluorescence correlation spectroscopy." In: BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology (März 2012), S. 1–8. ISSN: 1521-1878. DOI: 10.1002/bies.201100111.
- [96] Yuansheng Sun, Horst Wallrabe, Soo-Ah Seo und Ammasi Periasamy. "FRET Microscopy in 2010: The Legacy of Theodor Förster on the 100th Anniversary of his Birth." In: *ChemPhysChem* (Dez. 2010), S. 1–14. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.201000664.
- [97] Hernán E Grecco und Peter J Verveer. "FRET in Cell Biology: Still Shining in the Age of Super-Resolution?" In: *ChemPhysChem* (Dez. 2010), S. 1–8. ISSN: 1439-7641. DOI: 10.1002/cphc.201000795.
- [98] Tobias Kohl, Katrin G Heinze, Rene Kuhlemann, Andre Koltermann und Petra Schwille. "A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99.19 (Sep. 2002), S. 12161–6. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.192433499.
- [99] Andrei Yu Kobitski, Alexander Nierth, Mark Helm, Andres Jäschke und G Ulrich Nienhaus. "Mg2+-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis." In: *Nucleic acids research* 35.6 (Jan. 2007), S. 2047–59. ISSN: 1362-4962. DOI: 10.1093/nar/gkm072.
- [100] Tw Gadella, G N M Van Der Krogt und T Bisseling. "GFP-based FRET microscopy in living plant cells." In: *Trends in Plant Science* 4.7 (1999), S. 287– 291. ISSN: 18784372. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01426-0.

- Benjamin Schuler und William a Eaton. "Protein folding studied by singlemolecule FRET." In: *Current opinion in structural biology* 18.1 (März 2008), S. 16-26. ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/j.sbi.2007.12.003.
- [102] Julian David Langer. "Conformational dynamics of coatomer: functional and structural studies." Diss. Univ. Heidelberg, 2008.
- [103] M. Sauer, J. Hofkens und J. Enderlein. Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles. Wiley-VCH, 2011. ISBN: 9783527316694.
- [104] P.R. Selvin und T. Ha. Single-molecule Techniques: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2008. ISBN: 9780879697754.
- [105] R. Rigler, M. Orrit und T. Basché. Single molecule spectroscopy: nobel conference lectures. Springer series in chemical physics. Springer, 2001. ISBN: 9783540424536.
- [106] R. Rigler und H. Vogel. Single molecules and nanotechnology. Springer series in biophysics. Springer, 2008. ISBN: 9783540739234.
- [107] C. Zander, J. Enderlein und R.A. Keller. Single molecule detection in solution: methods and applications. Wiley-VCH, 2002. ISBN: 9783527403103.
- [108] T. Yanagida und Y. Ishii. Single Molecule Dynamics in Life Science. Wiley-VCH, 2008. ISBN: 9783527312887.
- W. E. Moerner und David P. Fromm. "Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy and microscopy". In: *Review of Scientific Instruments* 74.8 (2003), S. 3597. ISSN: 00346748. DOI: 10.1063/1.1589587.
- [110] Mark A Hink, Jan Willem Borst und Antonie J W G Visser. "Fluorescence correlation spectroscopy of GFP fusion proteins in living plant cells." In: *Methods* in Enzymology 361.1995 (2003), S. 93–112.
- [111] Arne Gennerich und Detlev Schild. "Fluorescence correlation spectroscopy in small cytosolic compartments depends critically on the diffusion model used." In: *Biophysical Journal* 79.6 (Dez. 2000), S. 3294–306. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76561-1.
- [112] M Eigen und R Rigler. "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology". In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91.13 (Juni 1994), S. 5740–5747.
- [113] S.L. Shorte und F. Frischknecht. Imaging Cellular and Molecular Biological Functions. Principles and Practice. Springer, 2007. ISBN: 9783540713319.
- J.R. Lakowicz. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer, 2006. ISBN: 9780387312781.
- [115] W. Becker. Advanced time-correlated single photon counting techniques. Springer series in chemical physics. Springer, 2005. ISBN: 9783540260479.
- [116] R. Brock. "Fluorescence Correlation Spectroscopy in Cell Biology". In: Fluorescence spectroscopy in biology: advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells. Springer series on fluorescence. 2005. Kap. 14, S. 245–262. ISBN: 9783540223382.

- [117] Johann Wolfgang Goethe. *Faust- Erster Teil.* Band 29. Hamburger Lesehefte. ISBN: 3-87291-028-0.
- [118] J. Ude und M. Koch. Die Zelle: Atlas der Ultrastruktur. Spektrum Akademischer Verlag, 2002. ISBN: 9783827411730.
- Joseph Peidle u. a. "Inexpensive microscopy for introductory laboratory courses". In: American Journal of Physics 77.10 (2009), S. 931. ISSN: 00029505. DOI: 10.1119/1.3153502.
- [120] M.H. Friedman. Principles and models of biological transport. Springer, 2008. ISBN: 9780387792392.
- [121] Robert Rieger, Carlheinz Röcker und G. Ulrich Nienhaus. "Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory". In: American Journal of Physics 73.12 (2005), S. 1129.
- [122] Albert Einstein. "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen." In: Annalen der Physik 322.8 (1905), S. 549–560. DOI: 10.1002/andp. 19053220806.
- [123] Adolf Fick. "Über Diffusion". In: Annalen der Physik 170.1 (1855), S. 1855.
- [124] Milit Marom, Abdussalam Azem und Dejana Mokranjac. "Understanding the molecular mechanism of protein translocation across the mitochondrial inner membrane: still a long way to go." In: *Biochimica et biophysica acta* 1808.3 (März 2011), S. 990–1001. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbamem.2010.07.011.
- [125] D.S. Goodsell. *The Machinery of Life*. Copernicus Books, 2009. ISBN: 9780387849249.
- [126] Emmanuel Dauty und a S Verkman. "Molecular crowding reduces to a similar extent the diffusion of small solutes and macromolecules: measurement by fluorescence correlation spectroscopy." In: Journal of molecular recognition : JMR 17.5 (2004), S. 441–7. ISSN: 0952-3499. DOI: 10.1002/jmr.709.
- [127] Zheng Zhou u.a. "Fibril Formation of the Rabbit/Human/Bovine prion proteins". In: *Biophysical Journal* 101.6 (Sep. 2011), S. 1483–92. ISSN: 1542-0086.
   DOI: 10.1016/j.bpj.2011.08.018.
- [128] Jacob Wilf, Jules A Gladner und Allen P Minton. "Acceleration of Fibrin Gel Formation by Unrelated Proteins". In: *Thrombosis Research* 37 (1985), S. 681– 688.
- [129] G. Karp. *Cell biology*. Wiley, 2010. ISBN: 9780470505762.
- [130] Ralf Metzler und Joseph Klafter. "The restaurant at the end of the random walk
  : Recent developments in the description of anomalous transport by fractional dynamics." In: J. Phys. A: Math. Gen. 37.31 (2004).
- [131] Arpita Upadhyaya, Jean-Paul Rie, James A. Glazier und Yasuji Sawada. "Anomalous diffusion and non-Gaussian velocity distribution of Hydra cells in cellular aggregates". In: *Physica A* 293 (2001), S. 549–558.

- [132] Iva Tolić-Nø rrelykke, Emilia-Laura Munteanu, Genevieve Thon, Lene Oddershede und Kirstine Berg-Sø rensen. "Anomalous Diffusion in Living Yeast Cells". In: *Physical Review Letters* 93.7 (Aug. 2004), S. 1–4. ISSN: 0031-9007. DOI: 10.1103/PhysRevLett.93.078102.
- [133] F Matthäus, M Jagodic und J Dobnikar. "E. coli superdiffusion and chemotaxissearch strategy, precision, and motility." In: *Biophysical Journal* 97.4 (Aug. 2009), S. 946–57. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.04.065.
- [134] Ariel Lubelski und Joseph Klafter. "Fluorescence correlation spectroscopy: the case of subdiffusion." In: *Biophysical Journal* 96.6 (März 2009), S. 2055–63. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2008.10.069.
- [135] G. Karp, K. Beginnen, S. Vogel und S. Kuhlmann-Krieg. Molekulare Zellbiologie. Springer, 2005, S. 1022. ISBN: 9783540238577.
- [136] V. Schünemann. Biophysik: Eine Einführung. Springer-Lehrbuch. Springer, 2004. ISBN: 9783540211631.
- [137] I.R. Nabi. Cellular Domains. John Wiley & Sons, 2011. ISBN: 9781118015735.
- [138] T.J. McIntosh. *Lipid Rafts*. Methods in Molecular Biology. Humana Press, 2007. ISBN: 9781588297297.
- [139] C.J. Fielding. Lipid Rafts and Caveolae: From Membrane Biophysics to Cell Biology. John Wiley & Sons, 2007. ISBN: 9783527607501.
- [140] P.J. Quinn. Membrane Dynamics And Domains. Sub-Cellular Biochemistry. Kluwer Academic/Plenum, 2004. ISBN: 9780306484254.
- [141] Annette C Hurst, Tobias Meckel, Sascha Tayefeh, Gerhard Thiel und Ulrike Homann. "Trafficking of the plant potassium inward rectifier KAT1 in guard cell protoplasts of Vicia faba". In: *The Plant Journal* 37.391-397 (2004). DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.01972.x.
- [142] Vera Bandmann. "Mechanisms and Kinetics of Exocytosis and Endocytosis in Plant and in Yeast Cells". Diss. TU Darmstadt, 2011.
- [143] J. Béthune, F. Wieland und J. Moelleken. "COPI-mediated transport." In: *The Journal of membrane biology* 211.2 (Jan. 2006), S. 65–79. ISSN: 0022-2631. DOI: 10.1007/s00232-006-0859-7.
- [144] Frank Anderl. "Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der kleinen GTPase Arf1 während der COPI Vesikel-Biogenese". Diss. Univ. Heidelberg, 2008, S. 260.
- [145] S.L. Schmid. "Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process". In: Annu. Rev. Biochem. 66 (Jan. 1997), S. 511–48. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.66.1.511.
- [146] Rainer Beck. "Molecular Mechanisms of COPI Vesicle Biogenesis". Diss. Univ. Heidelberg, 2008.
- [147] Kiminori Toyooka u.a. "A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior." In: *The Plant cell* 21.4 (Apr. 2009), S. 1212–29. ISSN: 1040-4651. DOI: 10.1105/tpc.108.058933.

- [148] H. Haken und H.C. Wolf. Molekülphysik und Quantenchemie: Einführung in die experimentellen und theoretischen Grundlagen. Springer-Lehrbuch. Springer, 2006. ISBN: 9783540303145.
- [149] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Crystal Structure of a Zn-bound Green Fluorescent Protein Biosensor. http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1KYS. DOI: 10.2210/ pdb1kys/pdb.
- [150] O. Shimomura, F. H. Johnson und Y. Saiga. "Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous". In: J. Cell. Comp. Physiol. 59.3 (1962), S. 223–239. DOI: 10.1002/jcp.1030590302.
- [151] M. Chalfie und S. Kain. Green fluorescent protein: properties, applications, and protocols. Methods of biochemical analysis. Wiley-Interscience, 2006. ISBN: 9780471736820.
- [152] Institute and Museum of the History of Science in Florence. *Galileo 's micros-cope*. Techn. Ber.
- [153] Nobel Media AB 2011. "Timeline of Microscopes". In: (2011).
- [154] Robert Hooke. Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses: with observations and inquiries thereupon. London: Martin, Jo., 1665.
- [155] Samuel Hoole. The select works of Antony van Leeuwenhoek. Bibliobazaar, 2009.
- [156] Henry Harris. The Birth of the Cell. New Haven: Yale University Press, 1999, S. 76–81.
- [157] C Kisielowski u. a. "Detection of single atoms and buried defects in three dimensions by aberration-corrected electron microscope with 0.5-A information limit." In: *Microscopy and microanalysis* 14.5 (Okt. 2008), S. 469–77. ISSN: 1431-9276. DOI: 10.1017/S1431927608080902.
- [158] Peter W. Hawkes und John C.H. Spence. Science of Microscopy. Springer-Verlag, 2007.
- [159] O Shimomura. "The discovery of aequorin and green fluorescent protein." In: Journal of microscopy 217.Pt 1 (Jan. 2005), S. 1–15. ISSN: 0022-2720. DOI: 10.1111/j.0022-2720.2005.01441.x.
- [160] Wolfgang Piersig. Mikroskop und Mikroskopie Ein wichtiger Helfer auf vielen Gebieten. first. GRIN Verlag, 2009. ISBN: 978-3640482009.
- [161] S W Hell und J Wichmann. "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy." In: *Optics letters* 19.11 (Juni 1994), S. 780–2. ISSN: 0146-9592.
- [162] Eric Betzig u.a. "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution." In: Science 313.5793 (Sep. 2006), S. 1642–5. ISSN: 1095-9203. DOI: 10.1126/science.1127344.
- Teresa Klein u. a. "Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins." In: Nature methods 8.1 (Jan. 2011), S. 7–9. ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth0111-7b.

- [164] Michael J Rust, Mark Bates und Xiaowei Zhuang. "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)." In: *Nature methods* 3.10 (Okt. 2006), S. 793–5. ISSN: 1548-7091. DOI: 10.1038/nmeth929.
- [165] Hellen C Ishikawa-Ankerhold, Richard Ankerhold und Gregor P C Drummen. "Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM." In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 17.4 (Jan. 2012), S. 4047–132. ISSN: 1420-3049. DOI: 10.3390/molecules17044047.
- [166] J.B. Pawley. Handbook Of Biological Confocal Microscopy. Language of science. Springer, 2006. ISBN: 9780387259215.
- [167] Petra Schwille. "Einblicke ins Leben". In: Physik Journal 6 (2007), S. 35–38.
- [168] Daniel Axelrod. "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence." In: *The Journal of cell biology* 89.1 (Apr. 1981), S. 141–5. ISSN: 0021-9525.
- [169] Alexa L Mattheyses, Sanford M Simon und Joshua Z Rappoport. "Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist." In: *Journal of cell science* 123.Pt 21 (Nov. 2010), S. 3621–8. ISSN: 1477-9137. DOI: 10.1242/jcs.056218.
- [170] G.J. Schütz und P. Hinterdorfer. "Single molecule fluorescence and force microscopy." In: *Experimental gerontology* 37.12 (Dez. 2002), S. 1495–511. ISSN: 0531-5565.
- [171] Marvin Minsky. Microscopy Aperatus; U.S. Patent #3013467. 1957.
- [172] John M Murray. "Methods for imaging thick specimens: confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination." In: *Cold Spring Harbor protocols* 2011.12 (Dez. 2011), S. 1399–437. ISSN: 1559-6095. DOI: 10.1101/pdb. top066936.
- [173] Www.zeiss.de/lsm. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie.
- [174] Becker & Hickl GmbH. User Handbook Leica MP-FLIM and D-FLIM. 2006.
- [175] Rolf Borlinghaus. "Optical Fluorescence Microscopy". In: Optical Fluorescence Microscopy: From the Spectral to the Nano Dimension. Hrsg. von Alberto Diaspro. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, S. 37–55. ISBN: 978-3-642-15174-3. DOI: 10.1007/978-3-642-15175-0.
- [176] T. Wohland u. a. "The Characterization of a Transmembrane Receptor Protein by Fluorescence Correlation Spectroscopy". In: Single molecule spectroscopy: nobel conference lectures. Hrsg. von R. Rigler, M. Orrit und T. Basché. Springer, 2001. Kap. 11, S. 195–210. ISBN: 0172-6218.
- [177] Simon Keller. "Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie in Polymerlösungen". Diss. Univ. München, 2004.
- S. R. Aragoón und R. Pecora. "Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics". In: *The Journal of Chemical Physics* 64.4 (1976), S. 1791. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.432357.
- [179] Thorsten Wohland, Rudolf Rigler und Horst Vogel. "The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy". In: *Biophysical Journal* 80 (2001), S. 2987–2999.

- [180] Jerker Widengren, Rudolf Rigler und Ülo Mets. "Triplet-State Monitoring by Fluorescence Correlation Spectroscopy". In: Journal of Fluorescence 4.3 (1994), S. 255–258. DOI: 10.1007/BF01878460.
- [181] Jerker Widengren, Ülo Mets und Rudolf Rigler. "Photodynamic properties of green fluorescent proteins investigated by fluorescence correlation spectroscopy". In: *Chemical Physics* (1999), S. 171–186.
- [182] Roland Brock, Mark A. Hink Hink und Thomas M. Jovin. "Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence." In: *Biophysical Journal* 75.5 (Nov. 1998), S. 2547–57. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77699-4.
- [183] Katrin G. Heinze. "Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie und Zweiphotonenanregung in der biomolekularen Analytik". Diss. Univ. Oldenburg, 2002.
- [184] Jörg Enderlein, Ingo Gregor, Digambara Patra und Jörg Fitter. "Art and artefacts of fluorescence correlation spectroscopy." In: *Current pharmaceutical biotechnology* 5.2 (Apr. 2004), S. 155–61. ISSN: 1389-2010.
- [185] Volker Buschmann, Benedikt Krämer, Felix Koberling, Rainer Macdonald und Steffen Rüttinger. "Quantitative FCS : Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime 200". In: Application Note. PicoQuant GmbH, Berlin, 2009.
- J. Rika und Th. Binkert. "Direct measurement of a distinct correlation function by fluorescence cross correlation". In: *Phys. Rev. A* 39 (1989), S. 2646–2652. DOI: 10.1103/PhysRevA.39.2646.
- [187] Kirsten Bacia und Petra Schwille. "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy." In: Methods San Diego Calif 29.1 (2003), S. 74–85.
- [188] Kirsten. Bacia, Sally A. Kim und Petra Schwille. "Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells." In: *Nature Methods* 3.2 (2006), S. 83–89.
- Thomas Weidemann, Malte Wachsmuth, Michael Tewes, Karsten Rippe und Jörg Langowski. "Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy". In: Single Molecules 3.1 (Apr. 2002), S. 49–61. ISSN: 1438-5163. DOI: 10.1002/1438-5171(200204)3:1<49::AID-SIM049>3.0.CO; 2-T.
- [190] Th. Förster. "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz". In: Annalen der Physik 437.1-2 (1948), S. 55–75.
- [191] Achillefs N. Kapanidis u. a. "Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules". In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101.24 (Juni 2004), S. 8936–41. ISSN: 0027-8424.
- [192] N-G. Blanco M. und Walter. "Methods in Enzymology, Volume 472: Analysis of Complex Single-Molecule FRET Time Trajectories:" In: Methods in Enzymology, Volume 472: Single Molecule Tools: Fluorescence Beased Approches, Part A. Methods in Enzymology. Elsevier, 2010, S. 153–178. ISBN: 9780123749543.

- [193] Taekjip Ha. "Single-molecule fluorescence resonance energy transfer." In: Methods (San Diego, Calif.) 25.1 (Sep. 2001), S. 78-86. ISSN: 1046-2023. DOI: 10.1006/meth.2001.1217.
- [194] Benedikt Krämer, Volker Buschmann und Felix Koberling. "Coupling of pulsed laser sources into the Olympus FluoView FV300 / FV1000 via the IR port using a polarization beam splitter". In: *Technical Note*. PicoQuant GmbH, Berlin, 2008, S. 1–3.
- [195] Paolo Mereghetti, Razif R. Gabdoulline und Rebecca C. Wade. "Brownian dynamics simulation of protein solutions: structural and dynamical properties." In: *Biophysical Journal* 99.11 (Dez. 2010), S. 3782–91. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.10.035.
- [196] Razif R. Gabdoulline und Rebecca C. Wade. "On the contributions of diffusion and thermal activation to electron transfer between Phormidium laminosum plastocyanin and cytochrome f: Brownian dynamics simulations with explicit modeling of nonpolar desolvation interactions and electron transfer event". In: JACS 131.26 (Juli 2009), S. 9230–9238. DOI: 10.1021/ja809567k.
- [197] Michio Tokuyama und Irwin Oppenheim. "Dynamics of hard-sphere suspensions". In: *Physical Review E* 50.1 (Juli 1994), R16–R18.
- [198] Michio Tokuyama, Tatsuo Moriki und Yuto Kimura. "Self-diffusion of biomolecules in solution". In: *Physical Review E* 83.5 (Mai 2011), S. 1–8. ISSN: 1539-3755. DOI: 10.1103/PhysRevE.83.051402.
- [199] Atto-Tec. Fluorescent Labels and Dyes, catalogue 2009/2010.
- [200] Daniel Siegberg. "Hochspezifische Markierung des Chemotaxisproteins CheY in lebenden E. coli Bakterien zur Untersuchung der Diffusion mit Hilfe der bildgebenden Diffusionsmikroskopie". Diss. Univ. Heidelberg, 2009.
- [201] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Crystal Structure of Uncleaved Ovalbumin. http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=10VA. DOI: 10.2210/ pdb1ova/pdb.
- [202] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Crystal structure of Bovine Serum Albumin. http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3V03. DOI: 10.2210/ pdb3v03/pdb.
- [203] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Structure of Immunoglobulin. http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1IGT. DOI: 10.2210/pdb1igt/pdb.
- [204] Anastasia Loman, Ingo Gregor, Christina Stutz, Markus Mund und Jörg Enderlein. "Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy." In: *Photochemical & photobiological sciences* 9.5 (Mai 2009), S. 627–36. ISSN: 1474-9092. DOI: 10.1039/b9pp00029a.

- [205] J K Armstrong, R B Wenby, H J Meiselman und T C Fisher. "The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation." In: *Biophysical Journal* 87.6 (Dez. 2004), S. 4259–70. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1529/biophysj.104.047746.
- [206] T. Dertinger. Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. VDM Verlag, 2008. ISBN: 9783639027747.
- [207] Nobuhiro Muramatsu und Allen P. Minton. "Tracer diffusion of globular proteins in concentrated protein solutions." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85.9 (Mai 1988), S. 2984–8. ISSN: 0027-8424.
- [208] Irina V Nesmelova, Vladimir D Skirda und Vladimir D Fedotov. "Generalized concentration dependence of globular protein self-diffusion coefficients in aqueous solutions." In: *Biopolymers* 63.2 (Feb. 2002), S. 132–40. ISSN: 0006-3525. DOI: 10.1002/bip.10023.
- [209] Gerolf Gros. "Concentration Dependence of the Self-Diffusion of Human and Lumbricus Terrestris Hemoglobin". In: *Biophysical Journal* 22 (1978), S. 453– 468.
- [210] Silvia Zorrilla, Mark a Hink, Antonie J W G Visser und M Pilar Lillo. "Translational and rotational motions of proteins in a protein crowded environment." In: *Biophysical Chemistry* 125.2-3 (Feb. 2007), S. 298–305. ISSN: 0301-4622. DOI: 10.1016/j.bpc.2006.09.003.
- [211] Steven B. Zimmerman und Allen P. Minton. "MACROMOLECULAR CROW-DING: Biochemical, Biophysical, and Physiological Consequences". In: Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 22 (1993), S. 27–65.
- [212] K. Luby-Phelps, F. Lanni und D. L. Taylor. "Behavior of a fluorescent analogue of calmodulin in living 3T3 cells." In: *The Journal of cell biology* 101.4 (Okt. 1985), S. 1245–56. ISSN: 0021-9525.
- [213] Iris von der Hocht und Jörg Enderlein. "Fluorescence correlation spectroscopy in cells: confinement and excluded volume effects." In: *Experimental and molecular pathology* 82.2 (Apr. 2007), S. 142–6. ISSN: 0014-4800. DOI: 10.1016/j. yexmp.2006.12.009.
- [214] Radek Macháň und Martin Hof. "Recent developments in fluorescence correlation spectroscopy for diffusion measurements in planar lipid membranes." In: *International journal of molecular sciences* 11.2 (Jan. 2010), S. 427–57. ISSN: 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms11020427.
- [215] Ana J García-Sáez und Petra Schwille. "Fluorescence correlation spectroscopy for the study of membrane dynamics and protein/lipid interactions." In: *Methods (San Diego, Calif.)* 46.2 (Okt. 2008), S. 116–22. ISSN: 1095-9130. DOI: 10.1016/j.ymeth.2008.06.011.
- [216] Petra Schwille, Jonas Korlach und Watt W Webb. "Fluorescence Correlation Spectroscopy With Single-Molecule Sensitivity on Cell and Model Membranes". In: *Cytometry* 36 (1999), S. 176–182.

- [217] K. Jalink, A. Diaspro, V. Caorsi und P. Bianchini. "Solving the Challenge of Fluorescence Leica TCS SP5 X: The First COMPLETELY Tunable Confocal System". In: *Confocal Application Letter* reSOLUTION.29 (2008).
- [218] A. Benda u. a. "TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope". In: Review of Scientific Instruments 76.3 (2005), S. 33106. DOI: 10.1063/1.1866814.
- [219] Benedikt Krämer u. a. "Compact FLIM and FCS Upgrade Kit for Laser Scanning Microscopes (LSMs )". In: *Technical Note*. PicoQuant GmbH, Berlin, 2011, S. 1–11.
- [220] FRANK Oehlenschlaeger, Petra Schwille und MANFRED Eigen. "Detection of HIV-1 RNA by nucleic acid sequence-based amplification combined with fluorescence correlation spectroscopy". In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93.23 (1996), S. 12811–12816.
- [221] Petra Schwille, Susanne Kummer, Ahmed A. Heikal, W.E. Moerner und Watt W. Webb. "Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitationdriven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97.1 (Jan. 2000), S. 151–6. ISSN: 0027-8424.
- [222] R H Köhler, W R Zipfel, W W Webb und M R Hanson. "The green fluorescent protein as a marker to visualize plant mitochondria in vivo." In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 11.3 (März 1997), S. 613–21. ISSN: 0960-7412.
- [223] Tobias Meckel, Annette C Hurst, Gerhard Thiel und Ulrike Homann. "Endocytosis against high turgor: intact guard cells of Vicia faba constitutively endocytose fluorescently labelled plasma membrane and GFP-tagged K-channel KAT1." In: *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39.2 (Juli 2004), S. 182–93. ISSN: 0960-7412. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02119.x.
- [224] Jens-Uwe Sutter, Prisca Campanoni, Matthew Tyrrell und Michael R. Blatt.
   "Selective Mobility and Sensitivity to SNAREs Is Exhibited by the Arabidopsis KAT1 K+ Channel at the Plasma Membrane". In: *The Plant Cell* 18.April (2006), S. 935–954. DOI: 10.1105/tpc.105.038950.1.
- [225] T. Ehrhardt, S. Zimmermann und B. Müller-Röber. "Association of plant K+(in) channels is mediated by conserved C-termini and does not affect subunit assembly." In: *FEBS Lett.* 409 (1997), S. 166–170.
- [226] Muriel Reuff. "Raumzeitliche Dynamik des pflanzlichen K+-Kanals KAT1". Diss. TU Darmstadt, 2009.
- [227] Mark Hink. "Fluorescence Fluctuation Spectroscopy Applied to Living Plant Cells". Diss. Wageningen Univ. Niederlande, 2002.
- [228] Pierre-François Lenne u.a. "Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork." In: *The EM-BO journal* 25.14 (Juli 2006), S. 3245–56. ISSN: 0261-4189. DOI: 10.1038/sj. emboj.7601214.
- [229] Jonas Ries und Petra Schwille. "New concepts for fluorescence correlation spectroscopy on membranes." In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 10.24 (Juni 2008), S. 3487–97. ISSN: 1463-9076. DOI: 10.1039/b718132a.

- [230] Markus Elsner u. a. "Spatiotemporal dynamics of the COPI vesicle machinery." In: *EMBO reports* 4.10 (Okt. 2003), S. 1000–4. ISSN: 1469-221X. DOI: 10.1038/ sj.embor.embor942.
- [231] Laura Aschenbrenner, Samia N Naccache und Tama Hasson. "Uncoated Endocytic Vesicles Require the Unconventional Myosin, Myo6, for Rapid Transport through Actin Barriers". In: *Molecular Biology of the Cell* 15.May (2004), S. 2253–2263. DOI: 10.1091/mbc.E04.
- [232] Yu Ohsugi, Kenta Saito, Mamoru Tamura und Masataka Kinjo. "Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy". In: *Biophysical Journal* 91.9 (Nov. 2006), S. 3456–64. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1529/biophysj.105.074625.
- [233] Michael Schwering. "Die Entwicklung neuer Methoden in der Fluoreszenzmikroskopie auf Basis reversibler chemischer Reaktionen". Diss. Univ. Heidelberg, 2012.
- [234] Kristin Grußmayer. "DNA Biosensors for Transcription Factor Detection with Single Molecule Fluorescence Spectroscopy". Magisterarb. Univ. Heidelberg.
- [235] Konstantinos Lymperopoulos u. a. "Single-molecule DNA biosensors for protein and ligand detection." In: Angewandte Chemie (International ed. in English) 49.7 (Feb. 2010), S. 1316–20. ISSN: 1521-3773. DOI: 10.1002/anie.200904597.
- [236] Monika C Sahlmüller u. a. "Recombinant heptameric coatomer complexes: novel tools to study isoform-specific functions." In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 12.6 (Juni 2011), S. 682–92. ISSN: 1600-0854. DOI: 10.1111/j.1600-0854. 2011.01177.x.
- [237] Rainer Beck u.a. "Membrane curvature induced by Arf1-GTP is essential for vesicle formation." In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105.33 (Aug. 2008), S. 11731–6. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0805182105.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Dr. Dirk-Peter Herten für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Förderung meiner Doktorarbeit bedanken. Im speziellen für die Erörterung von vielen spannenden Fragestellungen und der daraus resultierenden Möglichkeiten mit zahlreichen internationalen Forschern zusammenzuarbeiten.

Herrn Prof. Dr. B. Jähne danke ich für die formelle Erstbetreuung meiner Promotion sowie Herrn Prof. Dr. J. Wolfrum für die Unterstützung bei der Anmeldung zur Dissertation.

Especially, I would like to thank my collaboration partners:

Dr. Paolo Mereghetti and Prof. Dr. Rebecca Wade for a fruitful collaboration and the simulated data which they have provided in context of the molecular crowding project.

Dr. Vincent Popoff for a gladsome and exciting collaboration, for the generous support with COPI samples and for keeping me company during numerous measurements in the dark lab.

It was a pleasure to work with you.

Alice Kress, Dr. Tobias Meckel und Prof. Dr. Gerhard Thiel für eine spannende Kooperation zum Thema Diffusion von Membranproteinen in lebenden Zellen. Danke Alice für die Bereitstellung der Zellproben und deine Bereitschaft sie nach Heidelberg zu bringen sowie für deine Gesellschaft während deren Messungen.

Des Weitern möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei:

Gudrun Plundrich und Thimon Schwaebel, die mich als Forschungspraktikantin und wissenschaftliche Hilfskraft durch fleißige und engagierte Messungen von Proteinlösungen unterstützt haben.

Kristin Grußmayer für die Programmierung der verwendeten MatLab-Auswertungsroutine für die ALEX-TIRFM-Daten und ihre stetige Bereitschaft, Änderungen vorzunehmen und Fragen zu beantworten.

Allen meinen Arbeitskollegen, ehemaligen und gegenwärtigen, in der Arbeitsgruppe für Einzelmolekülspektroskopie und unserem Arbeitsgruppenleiter Dr. Dirk-Peter Herten für eine spannende Zeit auch außerhalb des Labors und für ihre Bereitschaft bei sportlichen Aktivitäten mitzumachen:

Daniel Barzan, Dominik Brox, Tanja Ehrhard, Kristin Grußmayer, Anton Kurz,

Dr. Konstantinos Lymperopoulos, Arina Rybina, Dr. Michael Schwering, Anne Seefeld und Christina Spassova sowie Dr. Pia Heinlein, Dr. Mike Heilemann, Dr. Alexander Kiel, Dr. Daniel Siegberg, Dr. Katharina Stöhr und Dr. Haisen Ta.

Und natürlich für den Beitrag, den jeder auf seine oder ihre besondere Art und Weise zum hervorragenden Arbeitsklima geleistet hat.

Dr. Michael Schwering, Kristin Grußmayer, Dr. Alexander Kiel, Daniel Barzan, Tanja Ehrhard und Catherina Gladigau für die hilfreichen Kommentare und für das schnelle Korrekturlesen meiner Arbeit und nicht zuletzt für ihren Optimismus und ihre aufmunternden Worte.

Christoph Pieper, Dr. Claus Bernhard Müller, Dr. Thomas Dertinger und Prof. Dr. Jörg Enderlein für die Möglichkeit, Vergleichsmessungen in Göttingen durchzuführen und für hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen, insbesondere über 2fFCS.

Allen Beteiligten im Graduiertenkolleg "Optische Messtechniken für die Charakterisierung von Transportprozessen an Grenzflächen" der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die schöne Zeit auf zahlreichen GRK-Veranstaltungen und den für mich sehr wichtigen wissenschaftlichen und persönlichen Kontakt.

In diesen Rahmen bedanke ich mich auch bei der DFG für die finanzielle Förderung in Form eines Doktorandenstipendiums.

Den Mitarbeitern der Firma PicoQuant für die technischen Informationen und Diskussionen sowie die interessanten und hilfreichen Workshops.

Bernd Eckstein und Dr. Constantin Kappel von der Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH für die stetige Fehlerbehebung bei dem Weißlichtlaser-Mikroskopsystem zu Beginn meiner Arbeit und den hilfreichen Diskussionen.

Der gesamten AG Hell im BioQuant für das Aushelfen mit optischen Bauelementen und das gute Betriebsklima.

Für die vielfältigen, spannenden Diskussionen, Kooperationen und Möglichkeiten Messinstrumente zu benutzen, die zwar keinen direkten Weg in diese Arbeit gefunden haben, aber nicht weniger meinen wissenschaftlichen Horizont und meine Erfahrungen erweitert haben, also vielen Dank an:

Iva Ganeva, Dr. Rainer Beck und Prof. Dr. Felix Wieland (Biochemie-Zentrum der Universität Heidelberg )

André Krause und Prof. Dr. Andres Jäschke (Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie, Universität Heidelberg)

Simon Stahl (Institut für Druckmaschinen und Druckverfahren, TU Darmstadt)

Christof Christophis, Max Hanke und Priv.-Doz. Dr. Axel Rosenhahn (Angewandte Physikalische Chemie, Universität Heidelberg)

Stefan Bollmann und Prof. Dr. Markus Sauer (Lehrstuhl für Biotechnologie und Biophysik, Julius-Maximilians-Universität Würzburg)

Thanks to Dr. Zhi Ping (Gordon) Xu and group members as well as Dr. Harendra (Harry) Parekh for varied and new experiences, many fruitful discussions and an exciting time at the Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology.

Danke an alle, die nicht explizit erwähnt wurden, aber ohne die eine Arbeit in dieser Form trotzdem nicht möglich gewesen wäre, wie z.B. der elektronischen und feinmechanischen Werkstatt im PCI und im Theoretikum sowie der Laborbetreuung, Verwaltung und IT im BioQuant.

Zum Schluss danke ich den wichtigsten Menschen - meinen Freunden und meiner Familie. Vielen Dank für die moralische Unterstützung und dass ihr mir immer wieder zeigt, dass es auch noch ein Leben außerhalb der Uni gibt. Insbesondere bedanken muss ich mich bei Daniela Polag für ihre optimistische und beruhigende Art und ein ganz lieber Dank geht an meine Mitbewohnerin Catherina Gladigau, die während meiner ganzen Zeit als Doktorandin für mich da war und die mich in der Schlussphase meiner Arbeit besonders unterstützt hat, sei es mit Einkäufen oder Korrekturlesen.