

Untersuchungen zur Wechselwirkung von Proteinen mit Lipidmembranen durch Fluoreszenzkorrelationspektroskopie

Dissertation

zur ERLANGUNG des DOKTORGRADES
der NATURWISSENSCHAFTEN (*doctor rerum naturalium*)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der

Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Jan Ebenhan
geboren am 25.02.1988 in Wolfen

1. Gutachter: Prof. Dr. Kirsten Bacia (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Hugel (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)

Datum der Verteidigung: 01. Dezember 2022

FÜR MEINE MUTTER.

But if your theory is found to be against the second law of thermodynamics I can give you no hope; there is nothing for it but to collapse in deepest humiliation.

SIR ARTHUR STANLEY EDDINGTON
The Nature of the Physical World

Abkürzungsverzeichnis

Akronyme

2DG	2D-GAUSSmodell
2GL	2D-GAUSS-LORENTZmodell
3DG	3D-GAUSSmodell
AFM	Rasterkraftmikroskopie
APD	Lawinenphotodiode
CEF	Ortsabhängige Detektionswahrscheinlichkeit
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
COPII	Hüllproteinkomplex II
CPM	Molekulare Zählrate
dcFCCS	2-Farben-FCCS
DLS	Dynamische Lichtstreuung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERES	ER-Austrittsstellen
ERGIC	ER-Golgi-Zwischenkompartiment
FRAP	Fluoreszenzerholung nach Photobleichung
FRET	FÖRSTERresonanzenergietransfer
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital
IC	Innere Umwandlung
ICS	Bildkorrelationsspektroskopie
ISC	Interkombination
LSM	Laserrastermikroskop
LUMO	Niedrigstes unbesetztes Molekülorbital
MDF	Molekulare Detektionsfunktion
MSD	Mittlere quadratische Abweichung
PET	Photoinduzierter Elektronentransfer
PSF	Punktspreizfunktion
RICS	Rasterbildkorrelationsspektroskopie
sFCS	Rasterfluoreszenzfluktuationsspektroskopie
SPT	Einzelpartikelverfolgung

SUV	Kleinen unilamellare Vesikel
TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
UV	Ultraviolett

Symbole

a	thermodynamische Aktivität (m)
b	Breite (m)
c	Stoffmengenkonzentration ($\frac{\text{mol}}{\text{L}}$), Vakuumlichtgeschwindigkeit ($299\,792\,458 \frac{\text{m}}{\text{s}}$)
c_{2D}	Stoffmengenflächenkonzentration ($\frac{\text{mol}}{\text{m}^2}$)
d	Dicke (m), Durchmesser (m)
e	EULER'sche Zahl (2,718 282)
f	Anteil
g	Entartungsgrad
h	Planck'sches Wirkungsquantum ($6,626\,070 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$)
i	imaginäre Einheit ($\sqrt{-1}$)
k	Geschwindigkeitskonstante ($\frac{1}{\text{s}}$)
k_B	BOLTZMANN-Konstante ($1,380\,649 \cdot 10^{-23} \frac{\text{J}}{\text{K}}$)
m	Masse (kg)
m	Steigung einer Gerade
n	HILL-Koeffizient, Stoffmenge (mol), Brechungsindex, Teilchendichte ($\frac{1}{\text{m}^3}$), Anzahl
p	Druck (Pa), Impuls ($\frac{\text{kg m}}{\text{s}}$), Wahrscheinlichkeit (als Parameter einer Verteilung)
q	molekulare Helligkeit eines einzelnen Fluorophors (Hz)
r	Radius (m), Position (m)
t	Zeit (s)
v	Geschwindigkeit ($\frac{\text{m}}{\text{s}}$)
x	Besetzungsgrad, Anteil
A	Fläche (m^2)
A	Absorbanz
A	Affinität ($\frac{\text{J}}{\text{mol}}$)
\mathfrak{A}	Korrelationsamplitude
B	Hintergrundfluoreszenzintensität (Hz)
B	Binomialverteilung
Cov	Kovarianz
D	Diffusionskoeffizient ($\frac{\text{m}^2}{\text{s}}$)
\mathcal{D}	Konvergenz in Verteilung
E	Energie (J), elektrische Feldstärke ($\frac{\text{V}}{\text{m}}$)
E	Erwartungswert
\mathbb{E}	Extinktion
\mathcal{E}	Zustandsenergie (J)
F	Kraft (N), Fluoreszenzintensität (Hz)

\mathcal{F}	Fouriertransformation
G	freie Enthalpie (J), Fluoreszenzkorrelationsfunktion
$\Delta_{\text{R}}G$	freie Reaktionsenthalpie ($\frac{\text{J}}{\text{mol}}$)
H	HEAVISIDE'sche Stufenfunktion
I	Strahlungsintensität ($\frac{\text{W}}{\text{m}^2}$)
J	BESSEL-Funktion
K	Oberflächenkompressibilität ($\frac{\text{m}}{\text{N}}$)
K_{D}	Dissoziationskonstante (Potenz von $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$)
\mathbf{K}	Korrekturmatrix
N	Teilchenzahl
N_{eff}	effektive Teilchenzahl
N_{A}	AVOGADRO-Konstante ($6,022\,141 \cdot 10^{23} \frac{1}{\text{mol}}$)
\mathcal{N}	Normalverteilung
NA	numerische Apertur
P	Leistung (W), Wahrscheinlichkeit (von Ereignissen)
Q	molekulare Helligkeit (Hz)
\mathbf{Q}	Koeffizientenmatrix ($\frac{1}{\text{s}}$)
Ω	Qualitätsfaktor
R	universelle Gaskonstante ($8,314\,463 \frac{\text{J}}{\text{mol K}}$), Orientierung, Größe eines Teilchens
\mathbb{R}	Menge der reellen Zahlen
S	Entropie ($\frac{\text{J}}{\text{K}}$), Strukturparameter
S	Singulettzustand
T	Temperatur (K), Zeitdauer (s)
T	Triplettzustand
V	Volumen (m^3)
V_{eff}	effektives Fokusvolumen (m^3)
W	Molekulare Detektionsfunktion, Anzahl Mikrozustände eines Ensembles
X	relative Korrelationsamplitude
Z	Zustand
\mathcal{Z}	Zustandssumme
α	Dämpfungskonstante ($\frac{1}{\text{m}}$), halber Öffnungswinkel ($^{\circ}$), Anteil bindungsfähiger Teilchen
β	Markierungswahrscheinlichkeit
γ	Grenzflächenspannung ($\frac{\text{J}}{\text{m}^2} = \frac{\text{N}}{\text{m}}$), Anteil in Lösung vorhandener Teilchen
δ	Distanz (m), KRONECKER-Delta, DIRAC'sche Deltafunktion, Abweichung
ε	Absorptions- oder Extinktionskoeffizient ($\frac{\text{L}}{\text{mol m}}$)
ε_0	Elektrische Feldkonstante ($8,854\,188 \cdot 10^{-12} \frac{\text{C}}{\text{V m}}$)
ζ	Reibungskoeffizient ($\frac{\text{kg}}{\text{s}}$), relative molekulare Helligkeit
η	Viskosität (Pa s), molekulare Zählrate (Hz)
θ	Bindungsgrad, Winkel ($^{\circ}$)
κ	Kompressibilität ($\frac{1}{\text{Pa}}$), Übersprechverhältnis
λ	Wellenlänge (m), mittlere Anzahl Fluorophore auf einem Teilchen

μ	chemisches Potential (J), Erwartungswert
ν	Frequenz (Hz), Anzahl Markierungsstellen
ξ	Reaktionslaufzahl (mol), relative Affinität
π	Kreiszahl (3,141 593), Besetzung von Zuständen
ρ	Dichte ($\frac{\text{kg}}{\text{m}^3}$), Flächenanzahldichte ($\frac{1}{\text{m}^2}$), Korrelationskoeffizient
ϱ	reduzierter Radius
σ	Oberflächenspannung ($\frac{\text{J}}{\text{m}^2} = \frac{\text{N}}{\text{m}}$), Standardabweichung, Absorptionsquerschnitt ($\frac{\text{m}^2}{\text{J}}$)
τ	Lebensdauer (s), Korrelationszeit (s)
τ_D	Diffusionszeit (s)
φ	Winkel ($^\circ$), Amplitudenanteil
χ	Markierungsgrad
ω	Fokusradius (m)
Γ	Abklingkonstante ($\frac{1}{\text{s}}$)
Δ	Differenz
Θ	Helligkeitskorrelationsfunktion
Λ	Zahl der Lipidmoleküle pro Bindestelle
Λ	Dreiecksfunktion
Ξ	Positionskorrelationsfunktion
Π	Oberflächendruck ($\frac{\text{J}}{\text{m}^2} = \frac{\text{N}}{\text{m}}$)
Υ	relativer Beitrag zur Korrelationsamplitude
Φ	Quantenausbeute, normiertes Verhältnis von Raum- und Flächenintegralen der MDF
Ω	großkanonisches Potential (J), Raumintegrale der MDF (m^3)
Ω^A	Flächenintegrale der MDF (m^2)
\propto	proportional
\sim	gleiche Größenordnung, verteilt nach
\approx	ungefähr gleich
\gtrsim	größer als, aber gleiche Größenordnung
\mapsto	Ersetzungsoperator
$*$	Faltungsoperator
\star	Korrelationsoperator
\square^*	komplexe Konjugation
$\vec{\square}$	Vektor
$\hat{\square}$	fehlerbehaftete Größe
$\tilde{\square}$	scheinbare Größe
$ \square $	Absolutwert
$\langle \square \rangle$	Mittelung (über Zeit oder Ensemble)
$\bar{\square}$	Mittelung (sonstige)
$[\square]$	GAUSSklammer

Inhaltsverzeichnis

I. Allgemeines	1
1. Fragestellung und Ziel	3
2. Einleitung	5
3. Grundlagen	7
3.1. Untersuchte Systeme	7
3.1.1. Proteine	7
3.1.1.1. COPII-Komplex	8
3.1.1.2. Sar1	9
3.1.2. Lipide	11
3.1.2.1. Doppelschichten	13
3.1.2.2. Monoschichten	14
3.1.2.2.1. Filmwaage	15
3.1.2.2.2. Phasen	17
3.2. Fluoreszenz	18
3.2.1. Molekulare Grundlagen	18
3.2.2. Mikroskopie	24
3.2.2.1. Auflösung	28
3.2.2.2. Fokusform	29
3.3. Fluktuationen	32
3.3.1. Teilchenzahl	32
3.3.2. Diffusion	34
3.4. Korrelationen	40
3.4.1. Grundlegende Theorie	41
3.4.2. Fluoreszenz(kreuz)korrelationsspektroskopie	42
3.4.2.1. Fluoreszenzintensität	44
3.4.2.2. Fluoreszenzkorrelation	46
3.4.3. Die Helligkeitskorrelationsfunktion $\Theta(\tau)$	51
3.4.4. Die Positionskorrelationsfunktion $\Xi(\tau)$	56
3.4.5. Rasterbildkorrelationsspektroskopie	60
3.4.6. Korrelator	63
3.4.6.1. Der <i>multiple tau</i> -Korrelator	65
3.4.6.2. Normierungen	68

3.4.6.3.	Verwendeter Algorithmus	69
3.4.7.	Korrekturen	71
3.4.7.1.	Hintergrund	71
3.4.7.2.	Übersprechen und Kreuzanregung	72
3.4.7.3.	Fokusüberlappung	73
3.4.7.4.	Teilchenausdehnung	74
3.5.	Bindung	80
3.5.1.	Korrelationsamplituden	82
3.5.2.	Titrationen	87
3.5.2.1.	Ligandentitration (Variation von c_L^0)	88
3.5.2.2.	Scheinbare Dissoziationskonstante	91
3.5.2.3.	Bindestellentitration (Variation von c_M^0)	93
3.5.2.4.	Farbstofftitration (Variation von $\alpha_{L,m}$)	95
3.5.2.5.	Markierungstitration (Variation von χ_L)	97
3.5.2.6.	Bestimmung der tatsächlichen Konzentrationen in der Probe	98
II. Anwendungen		101
4. Vesikelbasierter Kalibrationsstandard für die dcFCCS		103
4.1.	Einleitung	103
4.2.	Grundlagen	105
4.2.1.	Berechnung der Polydispersität	107
4.2.2.	Einfluss auf Bindungsexperimente	109
4.3.	Experimente	109
4.3.1.	Materialien	109
4.3.2.	Geräte	110
4.3.3.	Präparation	110
4.3.4.	Messungen	110
4.4.	Ergebnisse und Diskussion	110
4.4.1.	Kalibrierung	110
4.4.2.	Vergleich dreier Objektive	111
4.4.3.	Reproduzierbarkeit	112
4.4.4.	Lipidvariation	113
4.4.5.	FRET	113
4.4.6.	Einfluss der Messzeit	114
4.4.7.	Einfluss auf Bindungsuntersuchungen	115
4.4.8.	Eigener Beitrag	116
5. dcFCCS zur Analyse der Proteinbindung an Lipidvesikel		117
5.1.	Einleitung	117
5.2.	Grundlagen	119

5.3.	Experimente	121
5.3.1.	Materialien	121
5.3.2.	Geräte	122
5.3.3.	Präparation	123
5.3.4.	Messungen	123
5.4.	Ergebnisse und Diskussion	123
5.4.1.	Kalibrierung	123
5.4.2.	Gleichgewichtseinstellung	124
5.4.3.	Einfluss des Lipidmarkierungsgrades	124
5.4.4.	Schwankungen	125
5.4.5.	Bindungsstudien	126
5.4.6.	Eigener Beitrag	130
5.5.	Ergänzung Lipidabhängigkeit	130
6.	FCS zur Analyse der Proteinbindung an Lipidmonoschichten	135
6.1.	Einleitung	135
6.2.	Grundlagen	139
6.2.1.	Messung der Einbaufläche	140
6.2.2.	Einfluss von Teilchen in der Subphase	141
6.2.3.	Alternative Auswertung der Durchlaufkurven	145
6.3.	Experimente	149
6.3.1.	Materialien	149
6.3.2.	Geräte	149
6.3.3.	Präparation	150
6.3.4.	Messungen	151
6.3.5.	Theoretische Einbaufläche	151
6.4.	Ergebnisse und Diskussion	153
6.4.1.	Kalibrierung	153
6.4.2.	Experimentelle Einbauflächen	153
6.4.3.	Unsicherheit der Einbauflächen	157
6.4.4.	Einfluss der Subphase	158
6.4.5.	Diffusionskoeffizienten	159
6.4.6.	Vergleich anderer Messmethoden	161
6.4.7.	Eigener Beitrag	162
III.	Abschluss	163
7.	Zusammenfassung	165
8.	Ausblick	167

Literaturverzeichnis	173
IV. Anhang	189
A. Daten	191
B. Abbildungen	193
C. Quellcode	195
C.1. <i>multiple tau</i> -Korrelator	195
C.2. Anpassung F(C)CS-Daten	204
C.3. RICS-Korrelator	209
C.4. Anpassung RICS-Daten	210
Publikationen	XIII
Konferenzbeiträge	XV
Eigenständigkeitserklärung	XVII

Teil I.

Allgemeines

1. Fragestellung und Ziel

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden fluoreszenzbasierten Techniken, spezieller solche, die auf zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen basieren, zur Untersuchung der spezifischen Wechselwirkung von Molekülen mit Membranen verwendet und weiterentwickelt. Untersucht wurden Bindung bzw. Einbau von Proteinen in Phospholipidmembranen in Form von Lipidmonoschichten und -doppelschichten. Dabei wurden räumlich und zeitlich möglichst hochaufgelöste Messungen angestrebt und Auswertungsstrategien entwickelt, um aus den gewonnenen Messdaten ein Höchstmaß an Informationen über besagte Wechselwirkung zu gewinnen. Das theoretische Grundlagenkapitel (Kapitel 3) enthält daher sehr allgemein gehaltene Beschreibungen, die bei der nachfolgenden Anwendung auf die durchgeführten Experimente konkretisiert und vielfach vereinfacht werden. Teile der dabei zunächst übergangenen Komplexitäten werden in Form von Korrekturen gesondert berücksichtigt.

2. Einleitung

Als zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts in rascher Folge mehrere Artikel (SUTHERLAND, 1905; EINSTEIN, 1905; SMOLUCHOWSKI, 1906) zur BROWN'schen Bewegung¹ und dem thermodynamischen Zusammenhang des Diffusionskoeffizienten kleinster Teilchen mit ihrem Strömungswiderstand veröffentlicht wurden, war damit nicht nur endlich die Atomtheorie empirisch bewiesen, sondern es wurde auch erstmals der Forschung eine Methode an die Hand gegeben, um die Größe, Form, Oberflächenbeschaffenheit und Ladung submikroskopischer Partikel zu bestimmen. Die auf diesen Arbeiten aufbauende STOKES-EINSTEIN-Gleichung ist heute die Grundlage einer Vielzahl verschiedener experimenteller Techniken, wie etwa der dynamischen Lichtstreuung, der analytischen Ultrazentrifugation, der Diffusions-Tensor-Bildgebung und der diversen Fluoreszenzfluktuationstechniken.

Die Untersuchung der Fluoreszenz hat in den letzten Jahrzehnten ein wahres Füllhorn an unterschiedlichen, auf bestimmte Problembereiche und Fachgebiete maßgeschneiderten Techniken hervorgebracht und sich zu einer der wichtigsten und vielseitigsten Methoden in Chemie, Physik und Biologie entwickelt (LAKOWICZ, 2006; SAUER *et al.*, 2011; VALEUR, 2001). Das Phänomen der Fluoreszenz war schon jahrhundertlang bekannt (ACUÑA *et al.*, 2008), als GEORGE GABRIEL STOKES ihm, in Ermangelung eines besseren Ausdrucks und in Anlehnung an die Opaleszenz, den auf das fluoreszierende Mineral Fluorit (Calciumfluorid) zurückgehenden Namen verlieh (STOKES, 1852), der sich bis heute gehalten hat². Als ein Vertreter der unter dem Begriff *Szintillation* zusammengefassten Prozesse³ eignet der Fluoreszenz als Messmethode ein sehr günstiges Signal-Rausch-Verhältnis und eine, zumindest potentiell, perfekte Empfindlichkeit: Jedes emittierte Photon kann auf eine diskrete Anregung zurückgeführt werden, desgleichen kann jedes emittierte Photon prinzipiell detektiert werden (BERLMAN, 1971).

Während die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen interagierenden chemischen Spezies –

¹Als deren ersten Beschreiber kann man mit einigem Recht den römischen Dichter TITUS LUCRETIUS CARUS auffassen, welcher in seinem Gedicht *De rerum natura* schrieb (zitiert nach der Übersetzung von HERMANN DIELS in LUKREZ, 2013):

Denn bei den Stäubchen erkennst du, wieviele die Richtung verändern,
Trifft sie ein heimlicher Stoß, und wie sie sich rückwärts wenden,
Hierhin und dorthin getrieben nach allen möglichen Seiten.
Merke, die ganze Bewegung beginnt hier bei den Atomen.

²Interessanterweise datiert die erste praktische Anwendung der Fluoreszenz bereits aus dem Jahre 1565: In seinem Buch zum medizinischen Nutzen südamerikanischer Pflanzen beschreibt der spanische Arzt NICOLÁS BAUTISTA MONARDES die bläuliche Farbe, die ein Aufguss aus dem Holz von *Eysenhardtia polystachya* annimmt und wie dies zur Unterscheidung von Fälschungen verwandt werden kann (ACUÑA *et al.*, 2008).

³Dies sind gerade jene Prozesse, bei denen ein Material nach Interaktion mit einem energetischen Partikel einen Lichtblitz erzeugt (DE BRUIN, 1982).

aufbauend auf vorhergehenden Beobachtungen zum Auftreten der Rückreaktion bei Fällungen durch CLAUDE-LOUIS BERTHOLLET⁴ – zuerst von CATO MAXIMILIAN GULDBERG und PETER WAAGE mathematisch beschrieben wurden (WAAGE *et al.*, 1865; GULDBERG *et al.*, 1879), reicht die Verwendung des Begriffes *Affinität* (bzw. *affinitas* im Lateinischen) zur Beschreibung der chemischen „Anziehung“ verschiedener Stoffe sehr viel weiter zurück und führt zu den Ursprüngen der Alchemie (DUNCAN, 1970; QUÍLEZ, 2004). Quantifiziert und in ihrer heutigen Bedeutung als negative Ableitung eines thermodynamischen Potentials nach der Reaktionslaufzahl ξ unter Konstanzhaltung der übrigen natürlichen Variablen wurde die chemische Affinität

$$\mathcal{A} = - \left(\frac{\partial G}{\partial \xi} \right)_{p,T} = -\Delta_R G \quad (2.1)$$

zuerst von THÉOPHILE DE DONDER (DE DONDER, 1922). Im vorliegenden Beispiel wurde die freie Enthalpie G mit den Variablen p und T gewählt, woraus sich die freie Reaktionsenthalpie $\Delta_R G$ ergibt.

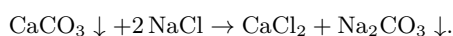
Eine Anwendung dieser neuartigen Konzepte auf biochemische und medizinische Fragestellungen erfolgte sehr rasch (FERNER *et al.*, 2015), wobei die folgenreichsten Untersuchungen wohl jene zur Bindung von Agonisten an Biomoleküle sind, welche ARCHIBALD VIVIAN HILL⁵ zu Beginn des 20. Jahrhunderts zur Formulierung der HILL-Gleichung führten (HILL, 1909, 1910):

$$\theta = \frac{c_L^n}{c_L^n + K_D} \quad (2.2)$$

Diese Gleichung beschreibt den Anteil θ von besetzten Bindestellen eines Teilchens im Gleichgewicht mit einem Liganden der Konzentration c_L in Abhängigkeit der scheinbaren Dissoziationskonstante K_D und des sogenannten HILL-Koeffizienten n . Das Teilchen verfügt über eine Anzahl m an Bindestellen, wobei stets $n \leq m$ gilt und Gleichheit nur im Grenzfall perfekter Kooperativität (WEISS, 1997), also einer starken Zunahme der Affinität des Liganden zum Partikel mit jeder weiteren besetzten Bindestelle, vorliegt. Der Fall $n = 1$ wurde später unabhängig und aus einer weitaus technischeren Richtung von IRVING LANGMUIR (LANGMUIR, 1918)⁶ hergeleitet.

Diese drei eigenständigen Gebiete – Diffusion, Fluoreszenz und Bindungsgleichgewichte – sollen nun im weiteren Verlauf der Arbeit theoretisch ausgebaut, zusammengebracht und auf das konkrete Problem der Bindung von Proteinen an Membranen angewandt werden.

⁴Diese Beobachtungen fanden an den Ufern der ägyptischen Sodaseen statt, welche BERTHOLLET als Mitglied der *Commission des sciences et des arts* im Gefolge des Feldzugs Napoleon Bonapartes untersuchte (BERTHOLLET, 1799). Dort wird durch die hohe Konzentration an Kochsalz Kalk gelöst und in Form von Soda gefällt:



BERTHOLLET postuliert noch keine exakte mathematische Abhängigkeit der Massenverhältnisse der entstehenden Verbindungen von den Massen der Ausgangsstoffe, was auch von GULDBERG und WAAGE vermerkt wird (GULDBERG *et al.*, 1867).

⁵Interessanterweise erhielt er den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin des Jahres 1922 nicht für seine Arbeiten auf dem Gebiet der Bindungsgleichgewichte, welche noch in seiner Studienzeit publiziert wurden, sondern für seine weitaus umfangreicheren Untersuchungen der Wärmeerzeugung und des Energieumsatzes von Muskeln und Nerven, durch die er als einer der Mitbegründer der Biophysik gilt (BASSETT, 2002).

⁶LANGMUIR befasste sich in seinen Arbeiten mit der Adsorption von Gasen an Festkörperoberflächen

3. Grundlagen

Dieses Kapitel dient in erster Linie der allgemeinen Beschreibung der theoretischen Grundlagen, die für das Verständnis der in Teil II vorgestellten experimentellen Arbeiten notwendig sind, geht in Teilen aber auch darüber hinaus, um einen weiteren Rahmen dafür zu schaffen, sie in die physikalisch-mathematischen Zusammenhänge einzubetten und gelegentlich auch interessante Nebenaspekte zu beleuchten. Wo einer Behauptung nicht unmittelbar eine Referenz folgt, ist diese keinesfalls als Eigenleistung des Autors aufzufassen, sondern als Wiedergabe einer in Lehrbüchern und Standardwerken weithin zu findenden Tatsache oder trivialen Folgerungen daraus. Eine Ausnahme stellen die, auf Vorarbeiten von STEFAN WERNER basierenden, Gleichungen zur Gewinnung von Titrationskurven aus FCCS-Messungen dar (Abschnitt 3.5.1 und 3.5.2), welche soweit feststellbar neuartig sind und als ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit angesehen werden können.

3.1. Untersuchte Systeme

Von einem thermodynamischen Standpunkt aus gesehen, ist Leben ein transienter Prozess, in dem hochgeordnete Systeme, gespeist durch eine Quelle freier Enthalpie als tatsächliche und metaphorische Nahrung, für begrenzte Zeit dem zweiten Hauptsatz einen Zustand der *Homöostase* abtrotzen, dabei Entropie ausscheiden und Information in Form von Polymersequenzen erhalten und weitergeben, sich an eine nicht-stationäre Umgebung anpassen und diese dabei verändern. Nach dem *zentralen Dogma der Molekularbiologie* (CRICK, 1958) befindet sich diese Information in der Sequenz der DNS und wird, normalerweise über den Umweg der RNS, in Proteine umgesetzt, wo sie ihren Bestimmungsort erreicht hat und damit in jeder Zelle ein gerichteter Informationsfluss existiert.

Die zwei stofflichen Bestandteile der experimentellen Aspekte dieser Arbeit sind nun gerade die Proteine, welche für die Aufrechterhaltung des Lebens im Kampf gegen die Entropie sorgen, und die Lipide, die als äußere und innere Umhüllungen jeder einzelnen Zelle dieses besondere thermodynamische System von seiner harschen Umwelt abgrenzen.

3.1.1. Proteine

Proteine sind lange, unverzweigte Polymere, deren Monomere den etwa 20 sogenannten proteinogenen α -Aminosäuren entstammen und durch die Bildung von Carbonsäureamiden (*Peptid-*

bindungen) verknüpft sind. Ihr Polymerisationsgrad¹, also die Anzahl der Monomere pro Polymermolekül, liegt zwischen etwa 50 und 35,000 und folgt über viele verschiedene Organismen betrachtet näherungsweise einer *logarithmischen Normalverteilung* (DESTRI *et al.*, 2007). Proteine verfügen über den nach Wasser größten Massenanteil in Zellen und liegen in Anzahldichten von mehreren Millionen Molekülen pro Femtoliter vor (MILO, 2013), entsprechend einer Konzentration von ≈ 5 mmol/L. Ihre, durch die komplexe, dreidimensionale Faltung der linearen Kette bedingt, extrem variantenreiche native Form wird auf mehreren Abstraktionsebenen unterteilt: Die *Primärstruktur* der reinen Aminosäuresequenz, die abschnittsweise diverse häufig auftretende *Sekundärstrukturen* ausbildet, welche sich schließlich zur *Tertiärstruktur* zusammenfinden und durch nicht-kovalente Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen Komplexe als *Quartärstruktur* bilden können².

Die Herstellung von Proteinen (*Translation*) geschieht *in vivo* an den *Ribosomen*, riesigen zellulären Maschinen bestehend aus RNS und Proteinen, die frei im *Zytoplasma* (Bildung zytosolischer Proteine und einiger *sezernierter* Proteine) oder, nur in *Eukaryoten* und über das *Translokon* gebunden, an der Membran des *rauen endoplasmatischen Retikulums* (ER, vom lateinischen Wort für „Netz“) vorliegen (Bildung von *integralen Membranproteinen*, Proteinen zum Weitertransport in bestimmte *Zellorganellen* sowie der meisten sezernierten Proteine); siehe etwa ALBERTS *et al.*, 2015.

3.1.1.1. COPII-Komplex

Der Transport der durch *Signalsequenzen* markierten und am rauen ER gebildeten Proteine in andere *Kompartimente* – sowohl deren *Lumen* als auch Membranen – oder über die *Zellmembran* nach außen (*Exocytose*) verläuft über den *Golgi-Apparat*, in dem sie verändert (*posttranslationale Modifikationen*) und weiter an ihre Zielorte verteilt werden. Hierzu werden von speziellen, nicht mit Ribosomen besetzten Arealen des ER – allgemein das *glatte* ER, bezogen auf den Transport wird auch vom *transitorischen* ER und konkreter den *ER-Austrittsstellen* (engl. *ER exit sites*, *ERES*) gesprochen (BUDNIK *et al.*, 2009; KUROKAWA *et al.*, 2019) – Teile der Membran abgetrennt und in Form von Lipidvesikeln (siehe Abschnitt 3.1.2), in deren Lumen und Membran sich die zu transportierenden Proteine anreichern, durch das Zytoplasma befördert³. Die Vesikel dieses *anterograden* Transportes zwischen ER und Golgi-Apparat werden von dem so-

¹Kürzere Moleküle werden allgemein als *Polypeptide* bezeichnet; die Obergrenze wird von den längsten bekannten *Isoformen* von Titin gebildet. Bezogen auf kleinere Taxone ergeben sich teilweise andere Längenverteilungen der Proteine, wobei auch die mittlere Länge stark vom betrachteten Organismus abhängt (TIESSEN *et al.*, 2012).

²Als fünfte Ebene wurde in späterer Zeit (MCCONKEY, 1982) eine *Quinärstruktur* als funktionale Zusammenlagerung verschiedener Proteine im dicht gedrängten (engl. *crowded*) Inneren von Zellen eingeführt.

³Da eine freie Diffusion durch das dicht mit Proteinen gefüllte Zytosol sehr langsam und ineffizient ist, kann durch den Einsatz von *Motorproteinen*, die sich entlang der *Mikrotubuli* des *Zellskeletts* bewegen, ein *gerichteter Transport* durchgeführt werden. Zwischen dem ER und der nächstliegenden Seite des Golgi-Apparates (*cis*-Golgi-Netzwerk) ist dies (vermittelt von *Dyneinen*) ebenfalls möglich (FOURRIERE *et al.*, 2020), aufgrund der geringen Entfernung aber für die Funktion der Zelle nicht strikt notwendig, insbesondere da sich hier noch das *ER-Golgi-Zwischenkompartiment* (engl. *ER-Golgi intermediate compartment*, *ERGIC*) befindet und den Raum überbrückt, sodass die Vesikel effektiv nur weniger als 500 nm zurücklegen müssen (PEOTTER *et al.*, 2019).

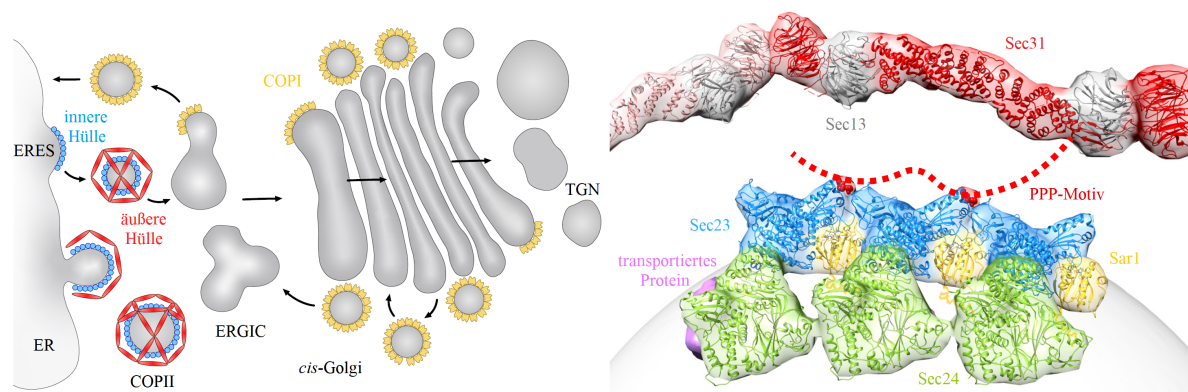


Abbildung 3.1.: Vesikulärer Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat mithilfe des COPII-Komplexes (adaptiert aus HUTCHINGS *et al.*, 2019).

Der anterograde Transport zwischen beiden Kompartimenten (links) wird durch den COPII-Komplex vermittelt, welcher die zu transportierenden Proteine an den ERES in Ausstülpungen sammelt, diese als Vesikel abschnürt und zum ERGIC überführt.

Die innere Hülle des COPII-Komplexes (rechts, in *Kryo-TEM*-Struktur eingepasste Röntgenkristallstruktur) wird aus regelmäßig aneinander gebundenen Sec23/Sec24-Dimeren gebildet, die sich an den in der Membran verankerten Sar1-Molekülen anheften. Die äußere Hülle aus den stäbchenartig miteinander verbundenen Sec13/Sec31-Tetrameren ist über einen ungeordneten Abschnitt von Sec31, der reich an der Aminosäure *Prolin* ist (PPP-Motiv), mit Sec23 verbunden.

genannten *Hüllproteinkomplex II* (engl. *coat protein complex II*, *COPII*) durch Krümmung der Membran geformt, Frachtgut in Form von Proteinen und anderen Molekülen dort angelagert und schließlich abgeschnürt (*Knospung*, engl. *budding*). Diese Vesikelhülle besteht aus insgesamt fünf zytosolischen Proteinen – Sar1, dem Heterodimer Sec23/Sec24 und einem Heterotetramer aus Sec13/Sec31 – und wird unterteilt in eine innere Hülle (Sec23/Sec24) und eine äußere Hülle (Sec13/Sec31). Wenngleich diese Komponenten zur Bildung von Vesikeln *in vitro* genügen, wird dieser Prozess in der Zelle durch weitere Proteine des ER unterstützt, etwa das transmembrane Sec12, welches als *Guaninnukleotidaustauschfaktor* (engl. *guanine nucleotide exchange factor*, *GEF*) den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an Sar1 beschleunigt (siehe nächster Abschnitt), oder das *periphere* Membranprotein Sec16, welches vermutlich sowohl als Gerüst für den Aufbau der Hülle dienen kann als auch die enzymatische Aktivität von Sar1 reguliert (SPRANGERS *et al.*, 2015). Die Proteine des COPII-Komplexes verbleiben zunächst auf den abgeschnürten Vesikeln und lösen sich kurz vor der Fusion mit den Membranen des ERGIC wieder ab (HANNA *et al.*, 2017).

3.1.1.2. Sar1

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich, insoweit die Experimente Proteine betreffen, auf das periphere Membranprotein Sar1 (engl. *secretion-associated Ras-related protein 1*, siehe Abb. 3.2), eine kleine GTPase (enzymatische Katalyse der Hydrolyse von GTP zu GDP) aus der Arf-Familie (für *ADP-Ribosylierungsfaktor*) innerhalb der Ras-Überfamilie (für *Rattensarkoma*), welches in

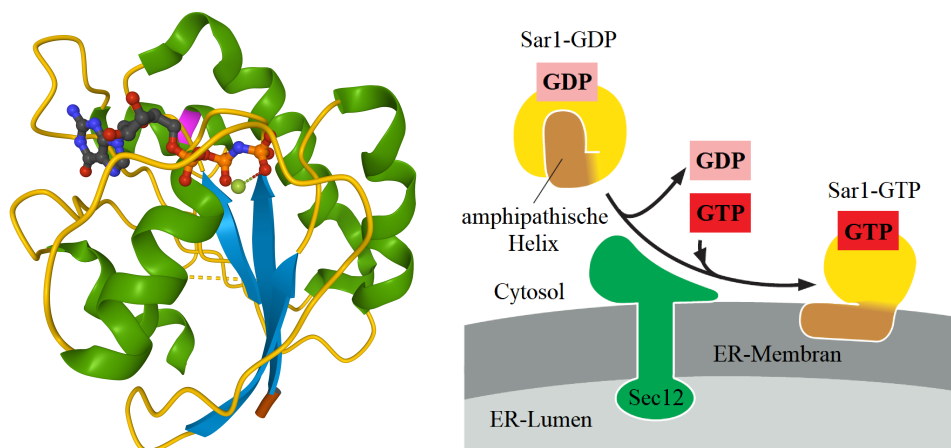


Abbildung 3.2.: Struktur und Funktion des COPII-Proteins Sar1.

Darstellung der Kristallstruktur von Sar1p (links, aus Röntgenbeugung, PDB-Eintrag *1M2O*, siehe [BERMAN *et al.*, 2000](#); [BI *et al.*, 2002](#); [SEHNAL *et al.*, 2018](#)) mit seiner Sekundärstruktur (grün: α -Helizes, blau: β -Faltblätter), einem gebundenen Molekül GMP-PNP (Kugel-Stab-Modell, koordiniertes Magnesiumion in hellgrün) in der Bindetasche, dem Ansatzpunkt der amphipathischen Helix (braun, nicht in der Struktur aufgelöst) und der für die Fluoreszenzmarkierung genutzten Aminosäure 147 (magenta). Die gestrichelte Linie kennzeichnet einen ungeordneten Bereich, für den keine Strukturdaten vorliegen. Die Membran befindet sich nach erfolgter Bindung unten im Bild ([SCHWIEGER *et al.*, 2017](#)).

Schematischer Ablauf der Bindung von Sar1 an die ER-Membran (rechts, adaptiert nach [ALBERTS *et al.*, 2015](#)). Sar1 liegt im Zytosol in einer bindungsunfähigen Konformation mit eingeklappter amphipathischer Helix vor, welche durch Austausch von GDP gegen GTP (oder das nicht hydrolysierbare Analogon GMP-PNP) in die bindungsfähige Konformation überführt wird. Der Nukleotidaustausch wird durch den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sec12 in der ER-Membran beschleunigt.

höheren Eukaryoten in zwei Isoformen vorliegt und dort eine Länge von 198 Aminosäuren aufweist. Im weiteren Verlauf wird konkret die aus Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gewonnene Variante Sar1p mit einer Länge von 190 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von rund 21,5 kg/mol eingesetzt.

Der erste Schritt des Aufbaus der COPII-Hülle ist die Bindung von Sar1 an die ER-Membran, welche über eine N-terminale *amphipathische* α -Helix vermittelt wird, die mit ihrer hydrophoben Seite in die äußere Halbschicht eingelagert wird (siehe hierzu Kapitel 6) und so zu einer leichten Krümmung der Membran führt, die anschließend durch die gebogene Form der an Sar1 bindenden weiteren COPII-Komponenten verstärkt wird.

Abhängig davon, ob GDP oder GTP in seiner Bindetasche vorhanden ist, liegt Sar1 in einer von zwei Konformationen vor: Mit GDP ist die Helix in einer Tasche der Proteinoberfläche unzugänglich eingeklappt und steht für eine Membranwechselwirkung nicht zur Verfügung, sodass erst der Austausch gegen GTP die Helix freigibt und eine effektive Bindung ermöglicht. Die Geschwindigkeitskonstante der Hydrolyse von GTP wird von einer Vielzahl an Faktoren gesteuert, unter anderem der Konzentration an Magnesiumionen und der Bindung von *GTPase aktivie-*

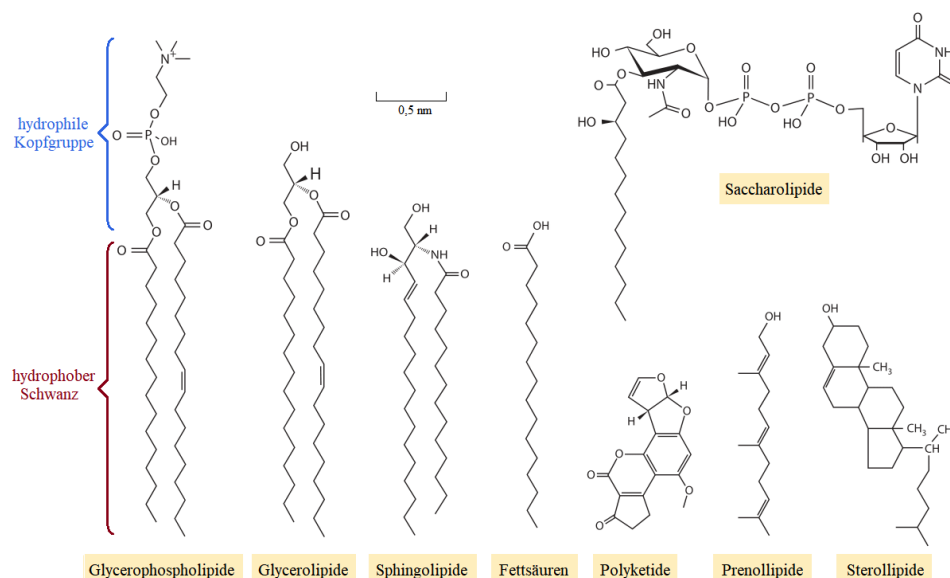


Abbildung 3.3.: Übersicht der zu den Lipiden gezählten Stoffklassen (adaptiert aus [MILO et al., 2016](#)).

renden Proteinen (*GAP*) wie hier insbesondere Sec23 (zusätzlich verstärkt in Anwesenheit des aktiven Fragments von Sec31, siehe [Bi et al., 2007](#); [AUERSWALD, 2020](#)). Für die Untersuchung der Membranbindung von Sar1 in *in vitro*-Systemen ist es wünschenswert nur einen Proteinzustand, den bindungsfähigen mit zugänglicher amphipathischer Helix, berücksichtigen zu müssen, anstatt mehrerer miteinander im Gleichgewicht vorliegender Zustände. Aus diesem Grund wird in den experimentellen Arbeiten zu diesem Thema (Kapitel 5 und 6) das nicht durch Sar1 hydrolysierbare Molekül Guanosin-5'-[β,γ -imido]-triphosphat (*GMP-PNP*) eingesetzt, welches in der Bindetasche als Analogon zu GTP wirkt, aber durch Ersatz des verbrückenden Sauerstoffatoms an der endständigen Phosphatgruppe durch ein Stickstoffatom nicht enzymatisch inaktiviert werden kann.

3.1.2. Lipide

Lipide sind überwiegend wasserunlösliche organische Moleküle meist natürlichen Ursprungs, die sowohl einen *hydrophilen* als auch einen *hydrophoben* Teil besitzen (sogenannte *Amphiphile*, siehe Abb. 3.3). Ersterer wird üblicherweise als *Kopfgruppe* bezeichnet und ist polar und teilweise auch geladen, letzterer als *Schwanz*, da es sich oftmals um eine oder mehrere, gesättigte oder ungesättigte, unpolare Kohlenwasserstoffketten handelt. Nach ihrer Wirkung auf Grenzflächen werden sie zu den *Tensiden* gezählt, welche die *Grenzflächenspannung* herabsetzen.

Die widerstrebenden Affinitäten beider Parteien führen zu einer großen Vielfalt möglicher supra-molekularer selbstorganisierter Strukturen (siehe Abb. 3.4), in denen eine der Hälften aus dem umgebenden Lösungsmittel herausgelöst und „unter ihresgleichen“ eingebettet wird; in Wasser handelt es sich dabei also um die Schwänze (*hydrophober Effekt*). Die Triebkraft dieses Effektes in polaren Lösungsmitteln, insbesondere bei Bildung von Wasserstoffbrückennetzwerken, ist die Erhöhung der Konfigurationsentropie der Solvensmoleküle, welche in der Nähe der unpolaren

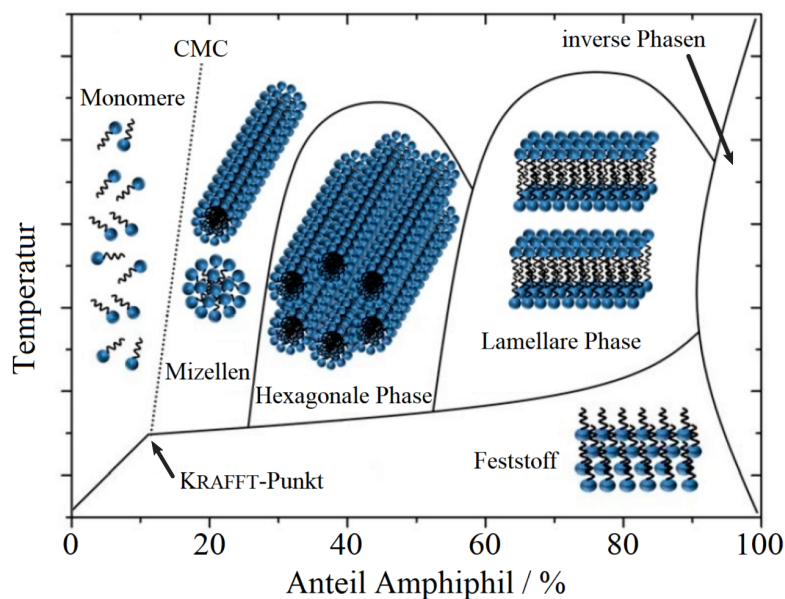


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung eines Phasendiagramms der von Amphiphilen mit Wasser gebildeten Strukturen als Funktion von Temperatur und Anteil des Amphiphils (adaptiert aus [DIERKING *et al.*, 2020](#)). Die hexagonalen Phasen entsprechen hexagonalen dichtesten Packungen von zylindrischen Mizellen, die lamellaren Phasen einer Abfolge von Doppelschichten. Inverse Phasen spiegeln die Struktur der „normalen“ Phasen mit einer umgekehrten Ausrichtung der Amphiphile wider.

Gruppen zuvor stark herabgesetzt war und den Entropieverlust durch Aggregation überkompensiert.

Der Anteil an Molekülen, der in den einzelnen Strukturen vorliegt, ist eine Funktion von Temperatur, Konzentration, Salzgehalt, *etc.*, sowie ihrer genauen Form (*Packungsparameter* nach JACOB NISSIM ISRAELACHVILI, siehe [ISRAELACHVILI, 2011](#)). Bei hohen Konzentrationen kommt es zunehmend zur Wechselwirkung der Aggregate miteinander, sodass schließlich makroskopisch geordnete Überstrukturen in Form *lyotroper Mesophasen* entstehen, welche Vertreter der *Flüssigkristalle* sind ([DEMUS *et al.*, 1999](#)). Auf der entgegengesetzten Seite bei niedrigen Konzentrationen befinden sich die monomeren und *mizellaren* Zustände, wobei letztere aufgrund ihres dafür ungünstig hohen Packungsparameters nicht bei allen Lipiden auftreten. Mizellen bestehen aus prototypisch kugelsymmetrischen Zusammenlagerungen von Amphiphilen mit Durchmessern im unteren Nanometerbereich und stellen damit *kolloidale* Lösungen dar. Die Entstehung von Mizellen ist ein hochgradig kooperativer Vorgang, was zu einem ab der sogenannten *kritischen Mizellbildungskonzentration* (engl. *critical micelle concentration, CMC*) sehr abrupt einsetzenden Auftreten dieser Strukturen führt. Die Löslichkeit von Amphiphilen in Form von Mizellen ist stark temperaturabhängig und die Existenzbereiche von Monomeren, Mizellen und ungelöstem Feststoff bilden eine Art Tripelpunkt (mit Konzentration statt Druck als Variable), der auch als **KRAFFT-Punkt** bezeichnet wird (siehe [Abb. 3.4](#)).

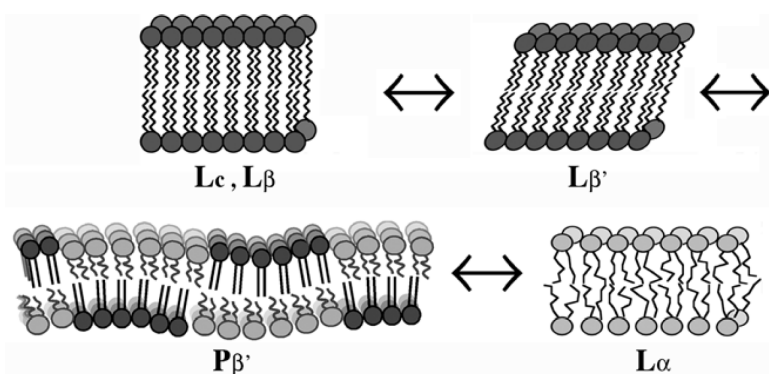


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung der Struktur von Lipiddoppelschichten in ihren verschiedenen Phasen (übernommen aus [HEIMBURG, 2007](#)).

3.1.2.1. Doppelschichten

Die in dieser Arbeit eingesetzten *Phospholipide* bilden in wässriger Lösung bevorzugt *Vesikel*, welche zu einer Kugel geschlossene Schichten von zwei Molekülen Dicke darstellen (*Lipiddoppelschicht*). Die hydrophoben Anteile sind somit vollständig vom Lösungsmittel separiert und es existiert im Inneren ein von den Kopfgruppen umhülltes Kompartiment, welches, je nach *Permeabilität* der Membran ([SHINODA, 2016](#)) und der betrachteten gelösten Teilchen, in mehr oder minder raschem Austausch mit der Umgebung steht. Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die *Lamellarität* der Vesikel, womit die Anzahl ineinander eingebetteter Membranschalen gemeint ist.

Die Größe und Lamellarität der Vesikel hängen nicht nur von der chemischen Natur ihrer Bestandteile und des umgebenden Lösungsmittels ab, sondern auch von der Herstellungsart. Die hier verwendeten kleinen unilamellaren Vesikel (engl. *small unilamellar vesicle, SUV*) können durch eine Vielzahl an Methoden präpariert werden, etwa Extrusion durch eine poröse Membran, Solvensinjektion, Ultraschallbehandlung oder mithilfe dedizierter Mikrofluidikelemente ([HAS et al., 2020](#)).

Planare Doppelschichten und, mit gewissen Modifikationen bedingt durch ihre Krümmung, auch Vesikel zeigen mit steigender Temperatur ein Abfolge verschiedener Phasen (siehe Abb. 3.5): die kristalline L_c -Phase mit Fernordnung in drei Dimensionen und vollständig gestreckt vorliegenden Alkylketten in *all-trans*-Konfiguration⁴, die gelartigen L_β - und $L_{\beta'}$ -Phasen mit Fernordnung in der Membranebene und immer noch größtenteils gestreckten Molekülen (bei $L_{\beta'}$ zur Membrannormalen geneigt), die gewellte $P_{\beta'}$ -Phase (engl. *ripple phase*) aus teilweise flexiblen Alkylketten mit einigen *gauche*-Konformeren und schließlich die fluide L_α -Phase mit völlig ungeordneten Alkylketten und gleichfalls fehlenden Fernordnung der Kopfgruppen. Der Übergang zu letzterer wird auch als „Schmelzen“ der Lipide bezeichnet.

⁴Hierbei beschreiben die Begriffe *trans* und *gauche* die beiden Konformationsisomere, oder spezieller *Rotamere*, innerhalb der gestaffelten Anordnung der Alkylkohlenstoffatome entlang einer Einfachbindung.

3.1.2.2. Monoschichten⁵

Eine *Phase* ist definiert als ein bestimmtes Volumen, in dem im thermodynamischen Gleichgewicht die makroskopischen chemischen und physikalischen Eigenschaften zeitlich und räumlich homogen sind, wobei geringe, kontinuierliche Änderungen über die Phase hinweg, etwa eine Dichtezunahme verursacht durch das Schwerfeld der Erde, davon unbenommen sind⁶. Natürlich erfüllt eine reale Phase niemals den thermodynamischen Grenzfall einer unendlichen Ausdehnung und muss folglich eine Grenzfläche besitzen, die eine mehr oder weniger sprunghafte Veränderung ihrer Eigenschaften bedeutet. Das Verhalten dieser Phase wird bei Betrachtung immer geringerer Dimensionen zunehmend von diesen Phasengrenzen bestimmt.

Eine reale Phase besteht aus Atomen bzw. Molekülen, deren Art, Anzahl und Verhalten im Volumen⁷ und an der Grenzfläche unterschiedlich sein müssen, um eine Änderung messbarer physikalischer Größen an der Phasengrenze zu bewirken. Dies schlägt sich auch in einer Abweichung der thermodynamischen Potentiale nieder, sodass etwa die *freie Enthalpie* eines Systems von der Ausdehnung seiner Phasengrenzen abhängt:

$$dG_{p,T,n_i,\dots} = \gamma \cdot dA. \quad (3.1)$$

Hierbei steht γ für die freie Grenzflächenenthalpie oder auch Grenzflächenspannung, also die Änderung der freien Enthalpie bei Vergrößerung der betrachteten Grenzfläche A um eine Einheit unter Konstanthaltung aller anderen Zustandsvariablen. Da die freie Grenzflächenenthalpie einer stabilen Phase stets positiv sein muss – anderenfalls müsste eine Phase in der anderen dispergiert werden, um ihre Grenzflächen zu maximieren –, strebt ein System stets die Verkleinerung seiner Phasengrenzen an.

Dieses Phänomen ist bei Beteiligung einer flüssigen Phase als *Oberflächenspannung* bekannt und in der Natur von herausragender Bedeutung (in diesem Zusammenhang wird statt γ meist σ verwendet). Die Dimension der Oberflächenspannung ist $\frac{\text{J}}{\text{m}^2} = \frac{\text{N}}{\text{m}}$, entsprechend derjenigen einer Linienspannung, und gibt damit auch die Kraft an, die die Oberfläche auf eine bestimmte Strecke ausübt.

Da sich die Eigenschaften zwischen Grenzfläche und Volumen unterscheiden, finden die Teilchen der Phase dort auch jeweils eine anders geartete chemische Umgebung vor. Dies führt z. B. zu einer veränderten Konzentration gelöster Ionen, welche an der Grenzfläche keine vollständige *Solvathülle* ausbilden können und somit eine geringere Solvatationsenthalpie aufweisen. Solche Stoffe, deren Konzentration an der Grenzfläche von der im Volumen abweicht, werden als *grenzflächenaktiv* bezeichnet. Ihre An- oder Abreicherung verändert die Grenzflächenspannung (*GIBBS-Isotherme*, siehe etwa [WEDLER, 2004](#)) und erlaubt so eine einfache physikalisch-

⁵Dieser Abschnitt wurde aus [EBENHAN, 2012](#) übernommen und angepasst.

⁶Die Unterscheidung kann von der betrachteten Größenskala abhängen, sodass z. B. Mizellen in Lösung als eigene Mikrophasen gezählt werden können, für andere Zwecke die mizellare Lösung aber eine homogene Phase darstellt.

⁷In diesem Zusammenhang bezeichnet der Begriff „Volumen“ nicht allein die dreidimensionale Ausdehnung im Raum, sondern auch den so weit von der Grenzfläche entfernten Teil der Phase, dass dort Randeffekte vernachlässigt werden können.

chemische Charakterisierung.

Weisen die betrachteten Teilchen eine Anisotropie etwa ihrer Polarität auf, kann es zusätzlich zu einer bevorzugten Orientierung in Bezug auf die Grenzfläche kommen. An der Wasser-Luft-Grenzfläche geschieht dies etwa bei Amphiphilen. Der hydrophile Teil wird bevorzugt hydratisiert vorliegen, während der hydrophobe Teil aus dem Wasser verdrängt wird.

Ist die Löslichkeit des Moleküls im Volumen der wässrigen Phase nun so gering, dass sie praktisch vernachlässigt werden kann, ist es bei ausreichender Verdünnung möglich, auf der Oberfläche einen Film von der Dicke eines einzigen Moleküls herzustellen (daher der Name *Monoschicht*), der eine quasi-zweidimensionale Phase bildet, in der alle Moleküle eine bevorzugte Orientierung senkrecht zur Grenzfläche aufweisen. Diese Filme werden *LANGMUIRfilme* genannt und sind bereits seit über 100 Jahren Gegenstand umfangreicher Untersuchungen (KAGANER *et al.*, 1999), insbesondere jene aus biologisch relevanten Molekülen, wie etwa *Fettsäuren* oder *Phospholipide*, die aus einem hydrophilen Kopf und einem hydrophoben Schwanz bestehen. Diese werden bevorzugt als Modellsysteme für Biomembranen und für zweidimensionale Ordnungsphänomene eingesetzt, da sie relativ einfach herstellbar, durch Variation der Kopf- und Schwanzgruppen leicht modifizierbar und durch Temperatur, Fläche und Zusammensetzung der Subphase sehr gut kontrollierbar sind (MENDELSON *et al.*, 2010). Sie sind zudem Grundlage der Herstellung von LANGMUIR-BLODGETT-Filmen, Multischichtsystemen auf festen Trägern, die eine Untersuchung auch durch Techniken wie *Rasterkraftmikroskopie* (engl. *atomic force microscopy*, *AFM*) und *Röntgenstreuung* ermöglichen (PRAKASH *et al.*, 1984; SIKES *et al.*, 1997).

3.1.2.2.1. Filmwaage Die Untersuchung von Monoschichten an der Wasser-Luft-Grenzfläche erfolgt üblicherweise auf einer sogenannten *Filmwaage*, deren Aufbau am Beispiel der für diese Arbeit verwendeten in Abb. 3.6 dargestellt ist. Die wesentliche Messgröße stellt der *Oberflächen-
druck*⁸ dar, welcher als Differenz zwischen der Oberflächenspannung der reinen *Subphase* (hier Wasser) und des untersuchten Systems definiert wird:

$$\Pi = \sigma_0 - \sigma. \quad (3.2)$$

Da die Oberflächenspannung temperaturabhängig ist⁹, muss bei der Bestimmung von Π über eine Messung von σ auf die richtige Temperatur der Referenz σ_0 geachtet werden. Der Trog wird meist aus *Polytetrafluorethylen* (*PTFE*) gefertigt, da dieses Material chemisch sehr beständig ist und eine extrem niedrige Oberflächenspannung von ca. 20 mN/m zusammen mit einer hohen Grenzflächenspannung von ca. 50 mN/m aufweist. Letzteres führt zu einem sehr großen *Kontaktwinkel* von etwa 100° – 120° und der Bildung der für diese Messtechnik notwendigen stabilen Menisken an Trogrändern und Barrieren. Mit den beweglichen Barrieren kann die Filmfläche und damit auch die Fläche A_m , die jedem Molekül einer Monoschicht zur Verfügung steht, kontrolliert werden. Wird bei Variation der Fläche und konstanter Temperatur der Oberflächen-

⁸Dieser wird im weiteren Verlauf teilweise verkürzend nur Druck genannt, wenn der Zusammenhang eindeutig ist.

⁹Eine im linearen Bereich gültige Beschreibung ist hierbei durch die *EÖTVÖS'sche Regel* gegeben (EÖTVÖS, 1886).

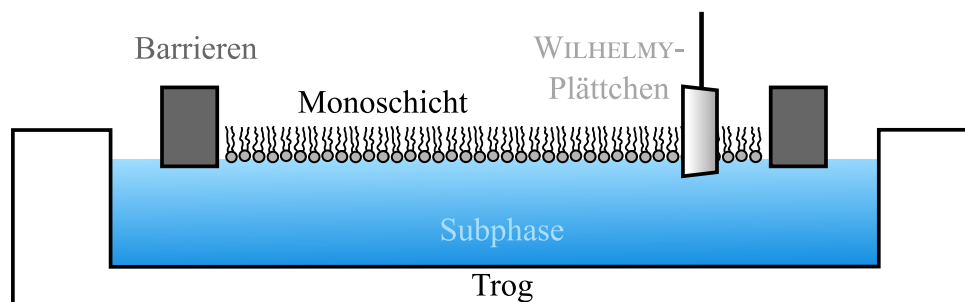


Abbildung 3.6.: Schematischer Aufbau einer Filmwaage mit einer Lipidmonoschicht zwischen zwei Barrieren und einem WILHELMY-Plättchen zur Messung des Oberflächendrucks.

druck gemessen, entstehen Π - A_m -Isothermen, welche eine der wichtigsten Informationsquellen zum Verhalten eines LANGMUIRfilms darstellen.

Die Messung von Π selbst erfolgt meist mit einem WILHELMY-Plättchen¹⁰, einem dünnen aufgerauhten Plättchen aus Platin, Glas, Glimmer oder Filterpapier, welches in die Subphase eintaucht und in dieser einen Meniskus erzeugt. Da sich dessen Oberfläche durch ein Anheben des Plättchens vergrößern würde, wirkt eine entgegengesetzte Kraft aufgrund der Oberflächenspannung, welche proportional zu dieser und der Länge der Kontaktlinie zwischen Plättchen und Flüssigkeit ist:

$$F = 2(b + d)\sigma \cos \theta. \quad (3.3)$$

Hierbei stehen b und d für Breite und Dicke des Plättchens sowie θ für den Kontaktwinkel zwischen Plättchen und Meniskus. Bei vollständiger Benetzung, welche durch eine Aufrauung verbessert werden kann (MAGET-DANA, 1999), ist dieser gleich null und unter Vernachlässigung der meist sehr geringen Dicke des Plättchens ergibt sich vereinfacht

$$F = 2\sigma b. \quad (3.4)$$

Die Messung der Kraft erfolgt durch die Bestimmung des Gewichts des Plättchens in der Flüssigkeit und in Luft¹¹. Da die Oberflächenspannung von reinem Wasser bekannt ist (ca. 72,6 mN/m, siehe etwa ADAMSON *et al.*, 1997), kann diese zur Kalibrierung benutzt werden und eine genaue Vermessung des Plättchens erübrigt sich¹². Zur Präparation der Filme wird die entsprechende Substanz in einem geeigneten, mit der Subphase nicht mischbaren Lösungsmittel gelöst und auf die Oberfläche der Subphase aufgebracht. Um eine unbeeinflusste Messung des Oberflächendrucks zu ermöglichen, muss auf eine vollständige Verdunstung des Lösungsmittels geachtet werden.

Die Aufnahme einer Π - A_m -Isotherme erfolgt meist bei einer konstanten Kompressionsgeschwindigkeit, die üblicherweise bei einigen \AA^2 je Molekül und Minute liegt. Die Geschwindigkeit kann je nach System, Phase und Fläche einen nicht vernachlässigbaren Einfluss auf den Oberflächen-

¹⁰Eine weitere, frühe Möglichkeit besteht in der direkten Messung der Kraft, die der Film bzw. die freie Subphase auf eine bewegliche Barriere ausübt.

¹¹Die hierbei auftretende unterschiedliche Auftriebskraft muss aufgrund des geringen Volumen des Plättchens meist nicht beachtet werden.

¹²Da das Volumen des Meniskus von der Eintauchtiefe abhängt, muss allerdings auf die gleiche Füllstandshöhe bei Kalibrierung und Messung geachtet werden.

druck und die Gestalt der Isotherme haben, sodass Messungen mit variierender Geschwindigkeit angeraten sein können. Zur Untersuchung von Gleichgewichtszuständen und der erforderlichen Zeitdauer, bis diese erreicht werden, kann auch ein vollständiger Halt bei bestimmten Flächen vorgenommen werden. Umgekehrt können durch eine besonders hohe Geschwindigkeit metastabile Zustände erreicht werden, deren Oberflächendruck weit höher als der im Gleichgewicht liegt (DIEP-QUANG *et al.*, 1980; RAPP *et al.*, 1990). Zuletzt können auch durch Expansion des Films Informationen gewonnen werden, etwa über die Reversibilität von Phasenübergängen (IBN-ELHAJ *et al.*, 1996) und die rheologischen Eigenschaften des Films durch periodische Kompression und Expansion des Films (VRÂNCEANU *et al.*, 2008).

3.1.2.2.2. Phasen In Abhängigkeit der jedem Molekül zur Verfügung stehenden Fläche weisen LANGMUIRFILME¹³ eine Anzahl verschiedener Phasen auf. In Abb. 3.7 ist eine prototypische Π - A_m -Isotherme einfacher kettenförmiger Amphiphile dargestellt, wie sie etwa Fettsäuren oder Lipide darstellen.

Im Bereich sehr großer molekularer Flächen ($\gg 100 \text{ \AA}^2/\text{Molekül}$) relativ zum Querschnitt der Moleküle kann der Film als ein zweidimensionales Gas beschrieben werden (G), auf das auch eine analoge Form des idealen Gasgesetzes

$$\Pi A_m = RT \quad (3.5)$$

oder der VAN-DER-WAALS-Gleichung

$$(\Pi + a/A_m^2)(A_m - b) = RT \quad (3.6)$$

angewandt werden kann (ISRAELACHVILI, 2011).

Bei abnehmender Fläche ist für kettenförmige Amphiphile wie etwa Lipide ein Phasenübergang erster Ordnung in die sogenannte *flüssig-expandierte* Phase (LE) zu beobachten, der sich in einem horizontalen Plateau manifestiert. Auch diese Phase ist in Bezug auf die Position und Kettenkonformation (Mischung von *trans*- und *gauche*-Konformeren) der Moleküle noch völlig ungeordnet. Weitere Kompression führt nach einem Druckanstieg wiederum zu einem Phasenübergang erster Ordnung in die *flüssig-kondensierte* Phase (LC), in der die Ketten in einer all-*trans*-Konfiguration vorliegen und parallel zueinander angeordnet sind (KAGANER *et al.*, 1999).

Die Dichte ist in dieser Phase weit größer als in den vorhergehenden und die (*Oberflächen*-)Kompressibilität

$$K = -\frac{1}{A_m} \frac{\partial A_m}{\partial \Pi} \quad (3.7)$$

dafür herabgesetzt. Durch weitere Verkleinerung der Fläche richten sich die in der LC-Phase noch gegen die Filmmnormale geneigten Moleküle auf, sodass weitere Kompression nur durch

¹³Diese bestehen aus in der Subphase praktisch nicht löslichen Substanzen. Das Gegenteil stellen GIBBSFILME dar, welche durch Anlagerung gelöster Substanzen an die Grenzfläche gebildet werden.

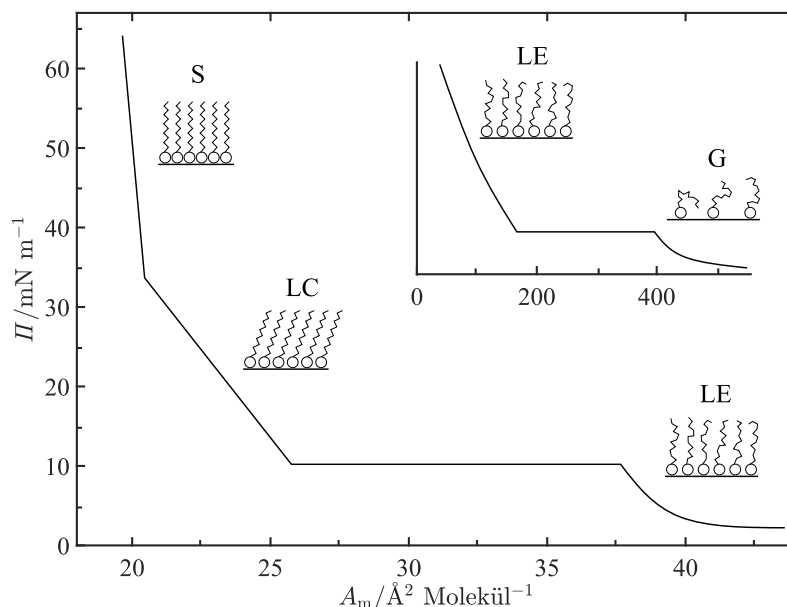


Abbildung 3.7.: Schematische Π - A_m -Isotherme einfacher Amphiphile mit den auftretenden Phasen (nach KAGANER *et al.*, 1999).

einen kleineren Abstand der Ketten erreicht werden kann, was sich in einer nochmals verringerten Kompressibilität und einem Knick in der Π - A_m -Isotherme bemerkbar macht. Diese letzte Phase wird als *festanalog* (S) bezeichnet, wobei sich die Packungsdichte kaum von der LC-Phase unterscheidet und kein Phasenübergang 1. Ordnung erfolgt (KAGANER *et al.*, 1999).

Die Oberflächendrücke, bei denen die Phasenübergänge erfolgen, sind temperaturabhängig und ermöglichen mit einer zweidimensionalen Form der CLAUSIUS-CLAPEYRON-Gleichung die Berechnung der Umwandlungsentropie, sodass aus Messungen bei verschiedenen Temperaturen auf eine Zu- oder Abnahme des Ordnungsgrades geschlossen werden kann (ADAMSON *et al.*, 1997; ISRAELACHVILI, 2011):

$$\frac{\partial \Pi_U}{\partial T} = \frac{\Delta_U S}{\Delta_U A_m}. \quad (3.8)$$

Hierbei bezieht sich $\Delta_U A_m$ auf das Flächenintervall, in dem der Phasenübergang stattfindet.

3.2. Fluoreszenz

3.2.1. Molekulare Grundlagen

Mit dem Begriff *Fluoreszenz* wird eine photophysikalische Erscheinung bezeichnet, die durch den spontanen Übergang eines Atoms, Moleküls oder Festkörpers (meist in Form von Nanopartikeln) aus einem elektronisch angeregten Zustand in einen Zustand geringer Energie unter Emission eines Photons charakterisiert wird. Der verantwortliche Teil des Moleküls, so die Veränderung der Molekülorbitale durch den elektronische Übergang sich hauptsächlich in einem solchen lokalisieren lässt, wird *Fluorophor* genannt. Die Anregung erfolgt durch vorherige Absorption eines

Photons, weshalb die Fluoreszenz als eine Form der *Photolumineszenz* beschrieben werden kann. Die Eigenschaften der emittierten Strahlung (Wellenlänge, Polarisation, räumliche Verteilung, Zeitverlauf, Intensität) enthalten eine Vielzahl von Informationen sowohl über den Fluorophor als auch über seine Umgebung auf nanoskopischer Ebene und die Eigenschaften der absorbierten Strahlung. Die Fluoreszenz wird für gewöhnlich begleitet von weiteren, konkurrierenden Prozessen, welche ebenfalls den angeregten Zustand aufheben oder modifizieren. Darunter befinden sich physikalische wie die Schwingungsrelaxation, chemische wie Photoreaktionen, intramolekulare wie Konformationsänderungen und intermolekulare wie Resonanzenergietransfer. Weiterhin können verschiedene Vorgänge der Fluoreszenz vorausgehen, etwa Übergänge zwischen verschiedenen hoch angeregten elektronischen Zuständen oder die Umorientierung der Solvathülle. Viele dieser Phänomene können mithilfe des sogenannten JABŁOŃSKI-Diagramms (JABŁOŃSKI, 1933) anschaulich gemacht werden (siehe Abb. 3.8): Eingezeichnet sind hier verschiedene elektronische Energieniveaus samt ihrer zugehörigen Schwingungs- und Rotationsunterniveaus, wobei für gewöhnlich explizit nach Singulett- und Triplettzuständen unterschieden wird. Die meisten Fluorophore verfügen über einen elektronischen Grundzustand mit vollständig gepaarten Elektronenspins, welcher als energetisch tiefster Singulettzustand die Bezeichnung S_0 erhält.

Die Anregung des Fluorophors erfolgt meist durch Verschiebung eines Elektrons aus dem (energetisch) höchsten besetzten (engl. *highest occupied molecular orbital* oder *HOMO*) in das niedrigste unbesetzte Molekülorbital (engl. *lowest unoccupied molecular orbital* oder *LUMO*). Da dieser Vorgang unter Erhalt des Gesamtspins erfolgt, ist der tiefstliegende angeregte Zustand ebenfalls ein Singulettzustand und wird mit S_1 bezeichnet. Die Energiedifferenz zwischen den beiden genannten Orbitalen bestimmt nun die Wellenlänge der Strahlung, welche zur Anregung verwendet werden kann. Für sichtbares Licht mit etwa $\lambda = 400 - 700$ nm entspricht dies einer Energie von $E = hc/\lambda \approx 1,8 - 3,1$ eV $\approx 170 - 300$ kJ/mol, was unterhalb typischer Bindungsenergien organische Moleküle liegt (LUO, 2007). Aufgrund dessen verfügen die praktisch eingesetzten organischen Fluorophore über konjugierte π -Bindungen mit delokalisierten Elektronensystemen, da diese über einen verringerten HOMO-LUMO-Abstand verfügen. Die im angeregten Zustand veränderte Reaktivität durch Zugänglichkeit neuer Reaktionspfade (z. B. aus einem diradikalischen Triplettzustand heraus) kann jedoch auch ohne einen direkten Bindungsbruch zu einer so weitgehenden Umgestaltung des Fluorophors führen, dass eine weitere Fluoreszenz nicht oder nicht in demselben Spektralbereich möglich ist. Dieser Vorgang wird als *Photobleichung* bezeichnet.

Neben der Lage einer Absorptionsbande ist für die Spektroskopie auch ihre Intensität¹⁴ und Breite von Interesse. Die Intensität der Absorption wird meist über die Abschwächung von Strahlung bekannter Intensität (mit der Lichtgeschwindigkeit c , der elektrischen Feldkonstante ϵ_0 , dem Realteil des Brechungsindex n und der Amplitude \vec{E}_0 der monochromatischen harmonischen Schwingung des elektrischen Feldvektors)

$$I = \frac{1}{2} cn\epsilon_0 |\vec{E}_0|^2 \quad (3.9)$$

¹⁴Diese Bezeichnung ist etwas unglücklich, da sie eine Verwandtschaft mit der Intensität (Leistung pro Fläche) der Strahlung suggeriert. Ein weiterer geläufiger Name für diese Größe ist „Stärke“.

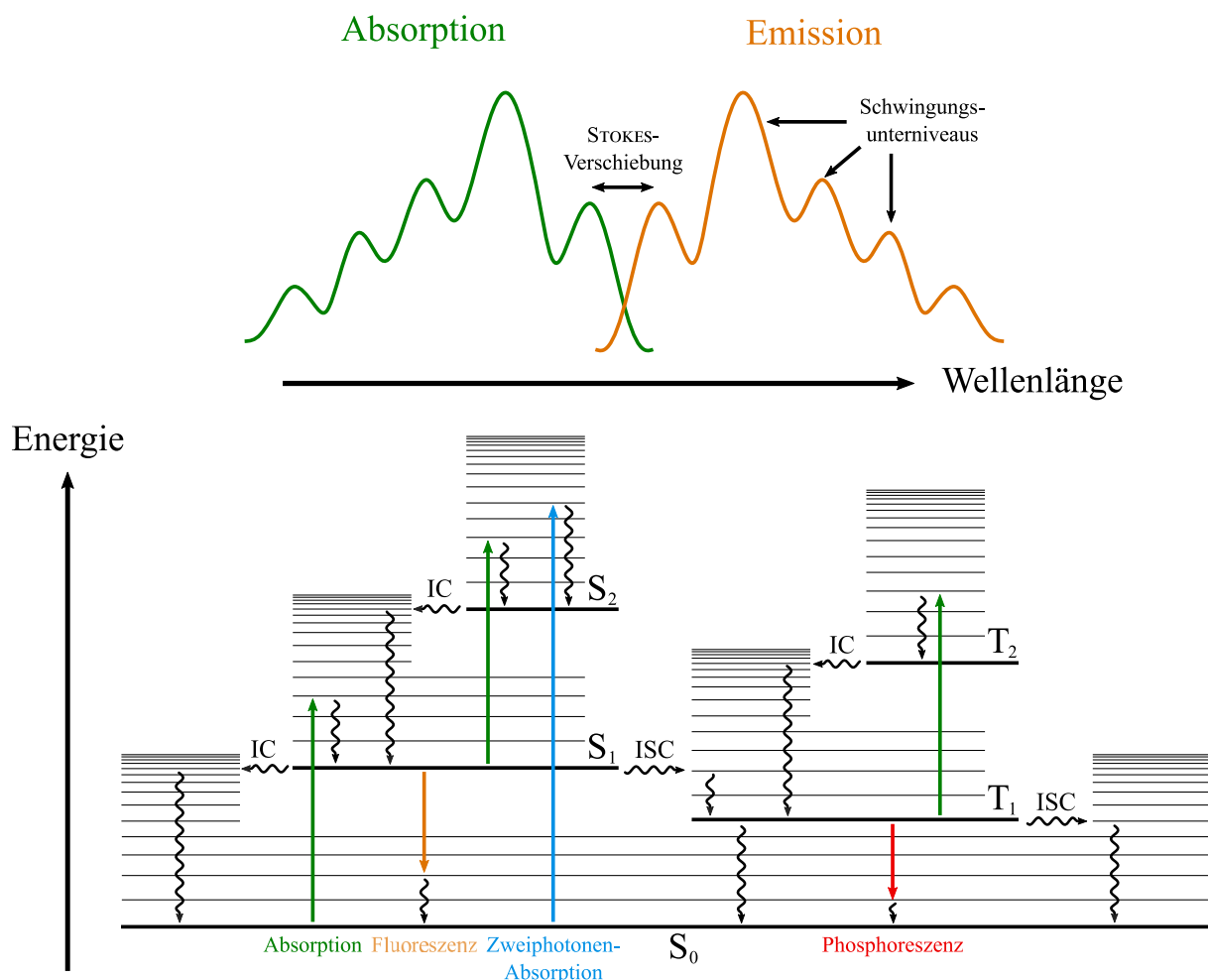


Abbildung 3.8.: Schematische Darstellung der elektronischen Energieniveaus und ihrer zugehörigen Schwingungsunter-niveaus (schwarze Balken, Grundzustand dicker) eines Moleküls nach ALEKSANDER JABŁOŃSKI (unten) und der sich daraus ergebenden Struktur des Absorptions- und Emissionsspektrums (oben). Nicht eingezeichnet sind die nochmals deutlich enger gestaffelten Rotationsniveaus.

Eingezeichnet sind der elektronische Grundzustand S_0 sowie je zwei angeregte, höherliegende Singulett- und Triplettzustände $S_{(1,2)}$ und $T_{(1,2)}$. Die möglichen Übergänge zwischen den Zuständen können entweder strahlungslos (gewellte Pfeile) oder unter Beteiligung eines oder mehrerer Photonen (gerade Pfeile) erfolgen. Die waagerechten Pfeile unter Energieerhaltung stellen Innere Umwandlungen und Interkombinationsübergänge, die senkrechten gewellten Pfeile Schwingungsrelaxation mit Energieabgabe an die Umgebung dar.

Man erkennt in den Spektren die durch verschiedene Effekte (Stöße des Lösungsmittels, DOPPLER-Verbreiterung) verbreiterten Absorptions- und Emissionsbanden der einzelnen Schwingungsunter-niveaus, deren verschieden starke Intensität (Besetzung im thermischen Gleichgewicht, FRANCK-CONDON-Faktoren) sowie die STOKES-Verschiebung.

bei Durchgang durch die zu betrachtende Probe nach dem BOUGUER-LAMBERT-BEER-Gesetz bestimmt¹⁵:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon cd}. \quad (3.10)$$

Die Größen I_0 und I bezeichnen hierbei die Intensität vor bzw. nach Durchgang durch die Probe, d die Dicke der Probe (von der Strahlung in ihr zurückgelegte Strecke), c die molare Konzentration des absorbierenden Stoffes und ε seinen molaren (dekadischen) *Extinktionskoeffizienten* bei der verwendeten Wellenlänge. Die Gültigkeit des Gesetzes ist an eine Reihe von Voraussetzungen geknüpft und versagt insbesondere bei zu hoher Konzentration oder Strahlungsintensität, da diese die bei der Herleitung angenommene Unabhängigkeit der absorbierenden Teilchen voneinander und Konstanz der Extinktionskoeffizienten verletzen (GRIFFITHS, 2002). Die Anwesenheit streuender Partikel erhöht zusätzlich die Extinktion

$$\mathbb{E} = -\log \frac{I}{I_0} = \alpha d \ln 10, \quad (3.11)$$

welche allgemein proportional zur Dämpfungskonstante der Strahlung α gesetzt werden kann¹⁶. Ist die Absorption der dominierende Prozess, kann auch statt von Extinktion und dem Extinktionskoeffizienten von der *Absorbanz* \mathbb{A} und dem molaren Absorptionskoeffizienten ε gesprochen werden.

Die Breite und Form der Absorptionsbande wird zum einen bestimmt von den zu ihr gehörigen Unterniveaus (hauptsächlich Schwingungs- und Rotationsübergänge) und zum anderen von der im jeweiligen Medium stattfindenden Verbreiterung bzw. Verzerrung dieser Absorptionslinien. Die Anzahl, Frequenz und Intensität der Übergänge der Unterniveaus hängt ab von der Geometrie des Moleküls (Normalschwingungen und Trägheitsmomente), der Symmetrie der entsprechenden Wellenfunktionen (bestimmt erlaubte und verbotene Übergänge in der Dipolnäherung sowie die relativen Intensitäten über die FRANCK-CONDON-Faktoren für verschiedene Schwingungsniveaus bzw. die HÖNL-LONDON-Faktoren für verschiedene Rotationsniveaus) und der Besetzung der Niveaus im Gleichgewicht (meist aus der kanonischen Zustandssumme im Rahmen der statistischen Thermodynamik). Die Verbreiterung (welche in Flüssigkeiten normalerweise bis zum völligen Verschmelzen zu einer einzigen Bande ausgeprägt ist) der Absorptionslinien geschieht durch eine Reihe von Mechanismen, von denen der dominante in verdünnten Lösungen meist die Stoß- oder auch Druckverbreiterung ist. Hierbei wird die Wechselwirkung des absorbierenden Moleküls durch Stöße mit Teilchen aus der Umgebung „unterbrochen“, wodurch

¹⁵Der Beitrag von AUGUST BEER besteht in der Verbindung von Extinktionskoeffizient und Konzentration des die Abschwächung verursachenden Stoffes (BEER, 1852). Die exponentielle Abnahme der Strahlungsintensität wurde wiederum zuerst von PIERRE BOUGUER in seinem *Essai d'optique, sur la gradation de la lumière* von 1729 beschrieben (BOUGUER, 1729), welches in JOHANN HEINRICH LAMBERTS Buch *Photometria* mehrfach zitiert wird (LAMBERT, 1760). Bei LAMBERT erscheint auch schon eine Proportionalität der Extinktion zur „Anzahl der in demselben Raumtheil vorhandenen Theilchen“ und der „Oberfläche der einzelnen Theilchen“ (zitiert nach der deutschen Übersetzung in OSTWALD's *Klassiker der Exakten Wissenschaften*, siehe LAMBERT, 1892).

¹⁶Da in der Optik die Dämpfung bezüglich der natürlichen Exponentialfunktion zur Basis e definiert wird, erscheint bei Verwendung des dekadischen Logarithmus wie in der Absorptionsspektroskopie üblich ein zusätzlicher Faktor von $\ln 10$.

die natürliche Lebenszeit des Übergangs stark verkürzt und dadurch sein Spektrum verbreitert wird. Dieser Effekt erzeugt ein LORENTZprofil der Absorptionslinie, welches meist durch Überlagerung mit dem GAUSSprofil der DOPPLERverbreiterung (Veränderung der Wellenlänge durch die Relativbewegung zwischen absorbierendem Teilchen und Strahlungsquelle) zu einem VOIGTprofil gefaltet wird (DEMTRÖDER, 2014).

An die Absorption eines Photons schließen sich vor der eigentlichen Fluoreszenz in der Regel verschiedene Relaxationsprozesse an, welche kollektiv zu einer Absenkung der Energiedifferenz zwischen dem eben erreichten angeregten Niveau und dem durch Fluoreszenz zugänglichen Grundzustand führen, der sogenannten STOKES-Verschiebung, welche sich durch eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu größeren Wellenlängen bemerkbar macht (*Rotverschiebung*). Die zwei wichtigsten Prozesse sind hierbei die *Schwingungsrelaxation*, wodurch das Molekül Energie aus angeregten Schwingungsniveaus durch Stöße an benachbarte Teilchen abgibt oder in eigene kinetische Energie der translatorischen Freiheitsgrade umwandelt¹⁷, und die Reorientierung des Lösungsmittels, welche durch eine Änderung des Dipolmoments im angeregten Zustand hervorgerufen wird. Letzterer Effekt wird quantitativ durch die OOSHIKA-LIPPERT-MATAGA-Gleichung (PAVLOVICH, 2012) beschrieben und kann zur Bestimmung des Unterschieds der Dipolmomente in Grund- und angeregtem Zustand verwendet werden.

Der Schwingungsgrundzustand eines angeregten elektronischen Zustandes kann nun über verschiedene Wege wieder verlassen werden, welche mit der hier interessierenden Fluoreszenz konkurrieren und damit deren Quantenausbeute (engl. *quantum yield*)

$$\Phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_D} = k_F \tau_F = \frac{\tau_F}{\tau_F^0} \quad (3.12)$$

reduzieren. Hierbei stehen k_F und k_D für die Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenz bzw. der übrigen deaktivierenden Prozesse (auch *Fluoreszenzlöschung*, engl. *quenching*, genannt), sowie τ_F und τ_F^0 für die Fluoreszenzlebensdauer (exponentielle Abklingzeit des angeregten Zustandes) in An- bzw. Abwesenheit weiterer deaktivierender Prozesse.

Existiert nur eine einzige Fluoreszenzlebensdauer (statt z. B. einer Überlagerung der Emission aus leicht verschiedenen Molekülorbitalen oder heterogenen Umgebungen, siehe LAKOWICZ, 2006), so folgt für die Besetzung des angeregten Zustandes sowie die Intensität F der emittierten Fluoreszenzphotonen

$$F(t) \propto e^{-t/\tau_F}. \quad (3.13)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer üblicher organischer Fluorophore in Lösungen beträgt einige Nanosekunden¹⁸.

¹⁷Die Tatsache, dass die Fluoreszenz somit fast immer aus dem Schwingungsgrundzustand erfolgt und damit auch unabhängig von der Wellenlänge des absorbierten Photons ist, wird auch als KASHAs Regel bezeichnet (KASHA, 1950). Die daraus folgende Unabhängigkeit von Emissionsspektrum und Quantenausbeute von der Wellenlänge der anregenden Strahlung ist als WAWILOWS Regel bekannt und deutlich älter (VAVILOV, 1922).

¹⁸Übergangsmetallkomplexe, etwa basierend auf Ruthenium, können Lebenszeiten bis in den Mikrosekundenbereich aufweisen und Lanthanide wie Europium erreichen schließlich mehrere Millisekunden (LAKOWICZ, 2006). Auf der anderen Seite weisen Stoffe wie Erythrosin B und Bengalrosa Lebenszeiten von einigen Dutzend Pikosekunden auf (FLEMING *et al.*, 1977).

Zu den deaktivierenden Prozessen gehören unter anderem die *Innere Umwandlung* (engl. *internal conversion*, *IC*, ein strahlungsloser Übergang in einen angeregten Schwingungszustand eines tieferliegenden elektronischen Zustandes¹⁹), die *Interkombination* (engl. *intersystem crossing*, *ISC*, ein strahlungsloser Übergang zwischen elektronischen Zuständen verschiedener Multiplizität), die Bildung angeregter Dimere (*Excimere*) bzw. Komplexe (*Exciplexe*), der Austausch von Energie oder Elektronen mit benachbarten Molekülen²⁰, die Anregung in höhere Singulett-niveaus durch Absorption eines weiteren Photons und schlussendlich auch eine weite Vielfalt intra- und intermolekularer chemischer Reaktionen aus dem angeregten Zustand heraus.

Der wichtigste dieser Vorgänge für die vorliegende Arbeit ist der Interkombinationsübergang, da dieser einen deutlichen Einfluss auf die in Abschnitt 3.4 besprochenen Kurven hat. In den meisten Fällen findet hierbei zunächst eine Umwandlung eines angeregten Singulett- in einen ebenfalls angeregten, energetisch tieferliegenden Triplettzustand T_1 statt, welcher eine deutlich längere Lebensdauer als ersterer aufweist, sodass in dieser Zeit das betroffene Molekül keine weiteren Fluoreszenzphotonen zu emittieren in der Lage ist. Dies wird darum auch als *Dunkelzustand* bezeichnet und der Wechsel zwischen den „hellen“ Singulettzuständen und dem „dunklen“ Triplettzustand als *Triplettblincken*²¹.

Die lange Lebensdauer, ebenso wie die meist geringe Effizienz haben ihre Ursache in der für die Interkombination nötigen Spinumkehr des angeregten Elektrons, welche für sich genommen die Erhaltung des Drehmoments verletzen würde und die entsprechenden Übergänge deshalb als „spinverboten“ bezeichnet werden. Dieses „Verbot“ gilt strikt nur bei Vernachlässigung der Spin-Bahn-Kopplung, also der Wechselwirkung zwischen magnetischem Moment der Elektronenspins und dem durch ihre Bahndrehmomente hervorgerufenen Magnetfelder, welche umso größer ist, je höher die Ladungszahl der Kerne ist, in deren Potential sich diese Elektronen befinden.²²

Der angeregte Triplettzustand kann wiederum auf verschiedenen Wegen verlassen werden: strahlungslos über eine Innere Umwandlung, strahlend zum Grundzustand (*Phosphoreszenz* mit nochmals erhöhter Rotverschiebung durch Schwingungsrelaxation), über weitere Anregung in einen höheren Triplettzustand, Rückkehr in einen angeregten Singulettzustand mit nachfolgender zeit-

¹⁹Die Innere Umwandlung ist auch einer der für die Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute von der Viskosität des Lösungsmittels verantwortlichen Prozesse: Je größer diese ist, desto mehr werden die Verdrehungen des Moleküls gedämpft, die zu einer Konformation mit effizienter Innerer Umwandlung führen und damit dieser Weg der strahlungslosen Deaktivierung erschwert. Quantitativ kann dies durch die FÖRSTER-HOFFMANN-Gleichung $\Phi_F \propto \eta^\alpha$ beschrieben werden (wobei Φ_F für große η gegen 1 ausläuft), in der η die Viskosität und α einen dimensionslosen Exponenten darstellen, dessen Wert von dem jeweiligen Molekül und verwendeten Lösungsmittel abhängt (FÖRSTER *et al.*, 1971). Fluorophore, für die diese Beziehung gültig ist, werden auch als *molekulare Rotoren* bezeichnet (HAIDEKKER *et al.*, 2010).

²⁰Dazu gehören unter anderem die Übertragung der Energie des angeregten Zustandes über Dipol-Dipol-Wechselwirkung im Nahfeld (FÖRSTERresonanzenergietransfer, *FRET*, siehe FÖRSTER, 1948) und die Elektronenübertragung durch überlappende Wellenfunktionen im direkten VAN-DER-WAALS-Kontakt in Gestalt von photoinduziertem Elektronentransfer (*PET*, siehe ROTH, 1990) und DEXTER-Transfer (DEXTER, 1953).

²¹Weitere „Blinkprozesse“, die zu ähnlichen Dunkelzuständen führen können, sind z. B. eine *cis-trans*-Isomerisierung einer Doppelbindung aus dem angeregten Zustand heraus, wobei eines der Isomere nicht oder zumindest deutlich unterscheidbar fluoresziert (CHMYROV *et al.*, 2015).

²²Die deutliche Beschleunigung des *intersystem crossing* in Anwesenheit höher geladener Atomkerne wird auch als *innerer* und *äußerer Schweratomeffekt* bezeichnet, je nachdem, ob das betreffende Atom Teil des Moleküls ist oder nur durch Stöße mit diesem interagiert. So können zur Erhöhung der Triplettausbeute oder Löschung der Fluoreszenz Halogenatome in ein Molekül substituiert werden, halogenierte Stoffe der Lösung zugesetzt oder schwere Gase wie Xenon in die Lösung eingebracht werden (HORROCKS *et al.*, 1966).

verzögerter Fluoreszenz (*thermally activated delayed fluorescence*, siehe etwa VALEUR, 2001), Austausch mit benachbarten Molekülen (Triplet-Singulett-FRET, siehe KIRCH *et al.*, 2019, DEXTER-Transfer) oder chemische Reaktionen.

Die Zeitskalen, auf denen die eben beschriebenen Prozesse ablaufen, erstrecken sich über etwa achtzehn Größenordnungen: Von der Absorption eines Photons unter Veränderung der Besetzung von elektronischen Orbitalen in circa $1 \text{ fs} = 10^{-15} \text{ s}$ (siehe etwa VALEUR, 2001; SAUER *et al.*, 2011, über die Schwingungsrelaxation im Piko- und die eigentliche Fluoreszenz im Nanosekundenbereich bis zum *intersystem crossing* in $10^{-8} - 10^{-5} \text{ s}$ und dem Verblässen der letzten Phosphoreszenz nach mehreren Stunden. Die Untersuchung und das Verständnis all dieser Vorgänge ermöglicht damit einen einzigartigen Einblick in die Komplexität der molekularen Struktur und Dynamik eines Systems. Die Ergebnisse dieser Arbeit können so als ein winziger Ausschnitt des breiten Spektrums der fluoreszenzbasierten Techniken betrachtet werden.

3.2.2. Mikroskopie

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Messungen wurden alle an einem *konfokalen* Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, genauer einem *Laserrastermikroskop* (in Abschnitt 3.4.5 wird dies relevant werden). Die wichtigsten Eigenschaften dieses Aufbaus ergeben sich aus seiner Bezeichnung: das Prinzip der Mikroskopie an sich, die Anregung mittels Laserlicht, die Verwendung von Fluoreszenzemission, die Konfokalität des Strahlengangs und schließlich die Abrasterung der Probe zur Erzeugung eines Bildes.

Die Verwendung von Lasern ermöglicht einerseits eine sehr schmalbandige, spektral präzise Anregung der Fluorophore, schränkt andererseits aber auch die nutzbaren Wellenlängen auf die der vorhandenen Laser ein. Zudem erlaubt die (nahezu) monochromatische und räumlich kohärente Laserstrahlung eine optimale Fokussierung des Anregungslichtes auf einen beugungsbegrenzten Fleck²³ und damit eine hohe optische Auflösung zur Differenzierung kleiner Strukturen in der Probe.

Die Tatsache, dass bei einem Fluoreszenzmikroskop das zu detektierende Signal gegenüber der Beleuchtung rotverschoben ist, vereinfacht immens die Abtrennung von unerwünschtem Anregungslicht im Vergleich zu einem gewöhnlichen, auf Streuung und Absorption basierenden Lichtmikroskop. Durch den Einbau von, auf die verwendeten Fluorophore und Laser abgestimmten, *dichroitischen* Strahlteiler und Filter wird die emittierte Strahlung auf dem Weg zwischen Probe und Detektor nahezu vollständig von der Laserstrahlung befreit. Dies erhöht den Bildkontrast, da die Hintergrundhelligkeit sehr stark reduziert wird.

Einen ähnlichen Vorteil bewirkt der konfokale Strahlengang des Mikroskops: Eine sich vor dem Detektor in einer zum Laserfokus *konjugierten Ebene*²⁴ befindliche *Lochblende* (engl. *pinhole*)

²³Es kann jedoch nicht im Allgemeinen davon gesprochen werden, dass kohärente Strahlung eine höhere Auflösung erlaubt als inkohärente, siehe Fußnote 32 auf Seite 28. Laser weisen aber zusätzlich ein sehr geringes *Etendue* auf und erlauben damit als schmale, parallele Strahlung eine starke Fokussierung (CHAVES, 2016). Schließlich erzeugen sie auch eine deutlicher höhere Intensität als eine durch Zwischenschaltung einer Lochblende kohärent gemachte konventionelle Lichtquelle.

²⁴In der Optik zeichnen sich zueinander konjugierte Ebenen dadurch aus, dass jeder Punkt auf einer der Ebenen

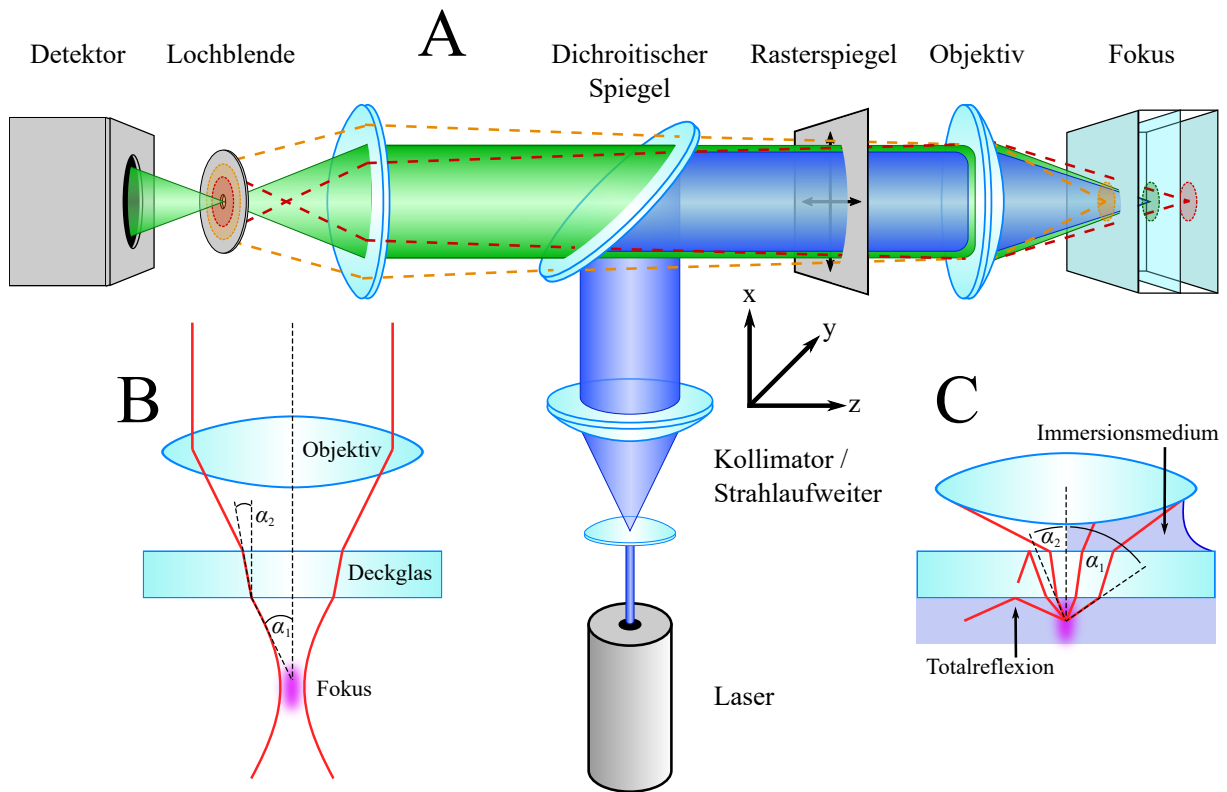


Abbildung 3.9.: Schematische Darstellung des Lichtweges in einem konfokalen Laserrastermikroskop und Details der Fokussierung durch die Objektivlinse.

A: Der Anregungslaser (blau) wird durch ein Teleskopsystem aufgeweitet und kollimiert, durch einen dichroitischen Spiegel in den Strahlengang eingekoppelt und nach Verschiebung durch das System aus Rasterspiegeln (nicht einzeln dargestellt) vom Objektiv in der Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht (grün) wird vom Objektiv eingesammelt, passiert den dichroitischen Spiegel und wird von einer Sammellinse auf die Lochblende fokussiert, um danach vom Detektor registriert zu werden. Emission aus Ebenen, die nicht konfokal zur Lochblende sind (gelbe und rote gestrichelte Linien) werden von dieser zurückgehalten.

B: Die Objektivlinse fokussiert den Laser (rot) nach Brechung durch das Deckglas in der Probe, wobei die numerische Apertur den (halben) Öffnungswinkel α und damit die Größe des entstehenden Brennflecks (magenta) bestimmt. Die Winkel im Glas und in der Probe sind untereinander durch das SNELLIUS'sche Brechungsgesetz verbunden. Die gebogene Form der Strahlen in der Probe symbolisiert den Verlauf eines GAUSSstrahls.

C: Durch die Verwendung eines Immersionsmediums (hier identisch zur Probe) zwischen Objektivlinse und Deckglas erhöht sich die numerische Apertur, da Strahlen, die unter einem größeren Winkel den Fokus verlassen, noch eingesammelt werden können. Das Maximum des Winkels wird durch Totalreflexion an den Grenzflächen und die Größe der Eintrittspupille beschränkt.

blockiert Licht, das aus einer anderen als der Fokusebene in der Probe kommt und erlaubt damit die Aufnahme von „optischen Schnitten“ in *axialer*²⁵ Richtung (engl. *optical sectioning*), also die dreidimensionale Abbildung der Probe in Form eines Stapels dünner Schichten (engl. *z-stack*). Diese können anschließend im Computer zu einem virtuellen 3D-Bild verrechnet und betrachtet werden (siehe Abb. 3.9, Teil A).

Der Durchmesser der Lochblende d_{PH} (meist in Vielfachen der AIRY-Einheit angegeben, welche dem doppelten Radius des Beugungsscheibchens in Gl. 3.17 entspricht) beeinflusst die erreichbare Auflösung (siehe Abschnitt 3.2.2.1) und die Helligkeit ($\propto d_{PH}$ mit Sättigung ab etwa 0,75 AIRY-Einheiten, siehe KUBITSCHKEK, 2017) und muss auf das verwendete Objektiv und die Wellenlänge der Emission abgestimmt werden²⁶. Ebenfalls ist auf die exakt konzentrische Positionierung von Lochblende und Objektiv zu achten, da anderenfalls die Emission von Punkten abseits des Fokus eingesammelt werden würde²⁷.

Da die Bedingung der Konfokalität nur die gleichzeitige scharfe Abbildung eines Bereiches in der Größe des Laserfokus erlaubt, muss die Probe um ein vollständiges Bild zu erhalten mit dem Laserstrahl abgerastert werden (engl. *laser scanning microscopy, LSM*). Dies geschieht üblicherweise durch den Einsatz zweier beweglicher *Abtastspiegel*, die den (nahezu) parallelen Laserstrahl in einem veränderlichen Winkel auf die hintere Aperturblende (die sogenannte *Rückapertur*) des Objektivs lenken, welches ihn in einen beugungsbegrenzten Fokuspunkt in der vorderen Brennebene verwandelt. Der Winkel, unter dem dies geschieht, bestimmt die genaue *laterale* (also in der Ebene senkrecht zum Strahlengang liegende) Position dieses Punktes und wird zur Abtastung der Probe periodisch so verändert, dass sich eine zeilenweise, möglichst lineare²⁸ Bewegung ergibt. Die emittierten Photonen nehmen schließlich denselben Weg über die Spiegel zurück zu Strahlteiler und Detektor (sogenannte *descanned detection*, im Gegensatz zur *non-descanned detection* ohne eine zweite Passage der Abtastoptik etwa in Mehrphotonenmikroskopen, siehe LE GRAND *et al.*, 2008; KUBITSCHKEK, 2017).

Die Detektoren müssen für die hier angewandten Techniken (insbesondere jene in Abschnitt 3.4.2) hohe Anforderungen an Empfindlichkeit und zeitliche Auflösung erfüllen: Im Idealfall sollte ein Großteil der emittierten Photonen detektiert (hohe Quantenausbeute) und jedes einzelne davon als diskretes Ereignis mit einem präzisen Zeitstempel versehen werden (zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung, engl. *time-correlated single photon counting, TCSPC*). Gleichzeitig sollte

auf jeder anderen davon scharf abgebildet wird. Somit betrachtet man in einem Lichtmikroskops alle zur Bildebene konjugierten Ebenen (z. B. die der Feldblende) immer mit.

²⁵Als optische Achse wird hier die Normale auf die optischen Bauteile bezeichnet, welche meist mit der Ausbreitungsrichtung des Lichtstrahls zusammenfällt.

²⁶Die mehrfarbigen Experimente in Teil II wurden demgemäß mit einem Blendendurchmesser, der einen Kompromiss zwischen grüner und roter Emission darstellt, durchgeführt.

²⁷Diese Verschiebung verringert zwar stark die Helligkeit, erhöht aber gleichzeitig auch die Auflösung durch Beschränkung des Ursprungsortes der detektierten Photonen auf den Überlappungsbereich von Anregung und Detektion. Eine Aufnahme des Beugungsbildes in der Ebene der Lochblende erlaubt dadurch eine Verringerung der kleinsten auflösbaren Strukturen um den Faktor 2, siehe BERTERO *et al.*, 1987; HUFF, 2019 (nach BERTERO *et al.*, 1989 beläuft sich dieser Effekt bei inkohärenter Detektion – wie in der Fluoreszenzmikroskopie – nur auf einen Faktor von 1,8).

²⁸Dies ist insbesondere für die quantitative Auswertung von Helligkeiten oder deren Korrelation zwischen verschiedenen Bildbereichen (siehe Abschnitt 3.4.5) unerlässlich, da ansonsten unterschiedlich lange Belichtungszeiten für jeden Bildpunkt entstünden und hinterher korrigiert werden müssten.

in Abwesenheit von Licht kein Signal generiert werden (geringes *Dunkelrauschen*) und die elektronische Verarbeitung des Signals eines Photons den Detektor nicht zu lange für weitere blind machen (geringe *Totzeit*).

Das generelle Prinzip eines Mikroskops, siehe etwa [BORN *et al.*, 1999](#); [PAWLEY, 2006](#), soll hier nicht weiter ausgeführt werden, da der Fokus der Arbeit nicht auf der Bildgebung zur Untersuchung mikroskopisch sichtbarer Strukturen liegt, sondern auf der Messung der Helligkeitsschwankungen in einem möglichst kleinen Laserfokus. Allein zwei dafür besonders relevante Parameter sollen hier näher beleuchtet werden: Dies ist zuerst die *numerische Apertur* (NA) des verwendeten Objektivs, welche generell die Lichtsammelfähigkeit eines optischen Elementes beschreibt:

$$\text{NA} = n \sin \alpha. \quad (3.14)$$

Hierbei steht n für den Brechungsindex des umgebenden Mediums und α für den halben Öffnungswinkel des Lichtkegels, welcher das Element erreicht oder es verlässt. Für ein leistungsfähiges Mikroskop ist nun eine möglichst große $\text{NA}_{\text{Objektiv}}$ anzustreben, da diese sowohl die Helligkeit der produzierten Bilder bestimmt ($\propto \text{NA}^2$ in der konventionellen Mikroskopie und sogar $\propto \text{NA}^4$ in der Fluoreszenzmikroskopie^{29,30}) als auch die in diesen erreichbare Auflösung (siehe Abschnitt 3.2.2.1).

Nach dem SNELLIUS'schen Brechungsgesetz ($n_i \sin \varphi_i = n_t \sin \varphi_t$ mit den Brechungsindizes $n_{i/t}$ und Einfallswinkel φ_i bzw. Brechungswinkel φ_t , siehe [KWAN *et al.*, 2002](#)) ist die numerische Apertur über eine Anzahl paralleler, nicht-fokussierender Grenzflächen eine Konstante (siehe Abb. 3.9, Teil B), sodass von einem Emitter in der Probe aus gesehen der größte Winkel zur optischen Achse, unter dem von ihm abgestrahltes Licht noch detektiert werden kann, sich aus

$$\theta_{\max} = \arcsin \frac{\text{NA}}{n_{\text{Probe}}} \quad (3.15)$$

berechnet. Dies verdeutlicht die Nützlichkeit von Immersionsobjektiven, in denen ein Immersionsmedium (meist Wasser oder Öl) den Luftspalt zwischen Linse und Probe ausfüllt und damit für $n_{\text{Immersion}} \approx n_{\text{Probe}}$ der Öffnungswinkel voll ausgenutzt wird (siehe Abb. 3.9, Teil C): $\theta_{\max} \approx \alpha_{\text{Objektiv}}$.

Weiterhin ist die relative Ausdehnung des Anregungslasers in der Ebene der oben erwähnten Rückapertur des Objektivs von Belang (engl. *pupil filling*), welche auch als Über- bzw. Unterfüllung bezeichnet wird. Je stärker diese ausgefüllt ist, desto stärker wird die numerische Apertur des Objektivs ausgenutzt, da eine zunehmende Intensität unter dem maximalen Beleuchtungswinkel auf die Probe trifft, und desto kleiner ist die Ausdehnung des Laserfokus' in den hier

²⁹Da im Idealfall die gesamte Leistung des Lasers im Fokus konvergiert und dessen Fläche $A_{\text{Fokus}} \propto \text{NA}^{-2}$ ist, steigt die Intensität $I = P/A$ dort mit dem Quadrat der numerischen Apertur an. Da in der (Einphotonen)-Fluoreszenzmikroskopie die Laserleistung heutzutage selten den begrenzenden Faktor darstellt, ist dieser Einflussfaktor des Objektivs meist als nachrangig anzusehen.

³⁰Beide angegebenen Proportionalitäten beziehen sich auf die Beobachtung ausgedehnter Objekte, deren Flächen als LAMBERT-Strahler behandelt werden können. Für die Einsammeleffizienz von Punktemittern ist jeweils ein NA^2 durch $1 - \cos \theta_{\max} \approx 1 - \sqrt{1 - \sin^2 \frac{\text{NA}}{n_{\text{Probe}}}}$ zu ersetzen ([KUBITSCHKEK, 2017](#)).

verwendeten Mikroskopen³¹. Nachteilig kann sich auch mit der Überfüllung ansteigende Elliptizität der Fokusform und Elongation in Richtung der Polarisation der Strahlung auswirken (NOVOTNY *et al.*, 2012). Zusätzlich verstärkt Überfüllung (ebenso wie jedwede Erhöhung der numerischen Apertur der Beleuchtungsoptik) die Intensität von Nebenmaxima des Laserfokus' (HESS *et al.*, 2002), welche die Näherung der Fokusform mittels einfacher Funktionen (siehe auf der nächsten Seite) komplexer gestaltet und somit die Auswertung der Messdaten erschweren oder gar verfälschen kann. Wird die Rückapertur dadurch unterfüllt, dass nicht der Laserstrahl verengt, sondern die Blende geschlossen wird, verringert sich auch für die Fluoreszenzmission die effektive numerische Apertur, was eine Vergrößerung der Lochblende nötig macht (da anderenfalls zu wenig Licht eingesammelt wird) und weiter die Auflösung reduziert.

3.2.2.1. Auflösung

Die optische Auflösung kann anhand verschiedener Kriterien definiert werden und hängt nicht zuletzt auch vom Bezug auf beleuchtete oder selbstleuchtende Objekte ab³². Die klassische Auflösungsgrenze in lateraler Ebene nach ERNST KARL ABBE für den Fall eines mit passendem Kondensator $NA_{\text{Kondensator}} = NA_{\text{Objektiv}}$ und Strahlung der Wellenlänge λ beleuchteten, unendlich ausgedehnten Beugungsgitters ist durch

$$r_{\min}^{\text{lateral}} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (3.16)$$

gegeben (ABBE, 1873). Da sich diese Arbeit allein mit fluoreszenten Proben beschäftigt, wäre hier das RAYLEIGH-Kriterium der optischen Auflösbarkeit zweier Punktemitter in unmittelbarer Nähe zueinander relevant:

$$r_{\min}^{\text{lateral}} = \frac{0,61 \lambda}{NA_{\text{Objektiv}}}. \quad (3.17)$$

In axialer Richtung ergibt sich hingegen eine stärkere Abhängigkeit von der numerische Apertur (NOVOTNY *et al.*, 2012):

$$r_{\min}^{\text{axial}} = \frac{2n\lambda}{NA_{\text{Objektiv}}^2}. \quad (3.18)$$

³¹Für eine starke Überfüllung muss der Laserstrahl aufgeweitet werden, sodass das Objektiv bei der häufig verwendeten TEM₀₀-Mode eines GAUSSstrahls effektiv mit einer ebenen Welle bestrahlt wird, ein Großteil der Leistung die Probe jedoch gar nicht erreicht.

³²In beiden Fällen wird die Bildentstehung als Beugungsproblem behandelt: Das Objekt beugt das eingestrahlte Licht bzw. agiert selbst als punktförmige Lichtquelle und die Linsen und Blenden des optischen Aufbaus beugen diese Strahlung weiter. Je größer nun der Beugungswinkel des in die Bildentstehung einfließenden Lichts ist, desto kleiner sind die gerade noch auflösbaren Strukturen. Der Unterschied liegt nun nicht zuletzt in der Kohärenz der Strahlung, die sich in der Bildebene überlagert, da die Emission von verschiedenen Fluorophoren als zueinander perfekt inkohärent angenommen werden kann (solange keine stimulierte Emission vorliegt). Die an einem transparenten Objekt gebeugte Strahlung wird je nach den Eigenschaften der Beleuchtung zumindest teilweise kohärent sein, wobei die numerische Apertur des Kondensators den Grad der räumlichen Kohärenz bestimmt (parallele Beleuchtung mit $NA_{\text{Kondensator}} = 0$ wäre z.B. perfekt kohärent, siehe HOPKINS *et al.*, 1950; BORN *et al.*, 1999). Das Auflösungsvermögen hängt aber weiterhin von der relativen Phase (GOODMAN, 2005), die zwei Objektpunkte dem gebeugten Licht aufprägen, der genauen Form der Aperturblende und dem Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge ab, sodass eine allgemeine Gleichung für den kleinsten optisch auflösbaren lateralen Abstand zweier Punkte die Form $r_{\min}^{\text{lateral}} = a \frac{\bar{\lambda}}{NA_{\text{Objektiv}}}$ annimmt, wobei $\bar{\lambda}$ eine mittlere Wellenlänge und a einen numerischen Faktor der Größenordnung 1 darstellen.

Die Formel geht von einer inkohärenten Emission von Licht aus, welches durch die Mikroskopoptik in ein *Beugungsscheibchen* transformiert wird, in dem die Intensität der zuerst von GEORGE BIDDELL AIRY, allerdings als Reihenentwicklung gegebenen (AIRY, 1835), Gleichung

$$I(\theta) = \left[\frac{J_1\left(\frac{\pi}{\lambda} d_{\text{Blende}} \sin \theta\right)}{\frac{\pi}{\lambda} d_{\text{Blende}} \sin \theta} \right]^2 \quad (3.19)$$

folgt. Hierbei stehen θ für den Winkel zwischen optischer Achse und dem betrachteten Punkt und J_1 für die BESSEL-Funktion erster Art und erster Ordnung. Nach dem RAYLEIGH-Kriterium gelten zwei Punkte nun als aufgelöst, wenn das Maximum der Intensität des einen AIRYScheibchens (siehe Abb. 3.10, links) mit der ersten Nullstelle des zweiten zusammenfällt (LORD RAYLEIGH, 1879), wobei man (rechnerisch wie auch historisch bei der Betrachtung von Teleskopen statt Mikroskopen) zuerst den kleinsten auflösbaren Winkel

$$\sin \theta_{\min} = \frac{1,22 \lambda}{d_{\text{Blende}}} \quad (3.20)$$

erhält, woraus mit der Kleinheit des Winkels ($\sin \theta_{\min} \approx \theta_{\min}$), der Lage der Emitter nahe der Objektivbrennebene ($\theta_{\min} \approx \frac{r_{\text{min}}^{\text{lateral}}}{f_{\text{Objektiv}}}$) und der ABBE'schen Sinusbedingung ($\frac{d_{\text{Blende}}/2}{f_{\text{Objektiv}}} = n \sin \alpha$) schließlich Gl. 3.17 folgt.

Es existieren weitere Kriterien zur Quantifizierung der Auflösbarkeit von selbstleuchtenden Strukturen in optischen Systemen: Das DAWES-Kriterium verlangt ein Minimum zwischen beiden Intensitätsmaxima von 5% relativ zu diesen, während nach SPARROW die Existenz eines Minimums jeglicher Tiefe genügt (LIPSON *et al.*, 2010).

3.2.2.2. Fokusform

Alle vorgenannten Kriterien befassen sich mit mikroskopischer Bildgebung, während die experimentellen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit vordergründig nur Rauschen auf zeitlicher oder räumlicher Skala produzieren, welchen anschließend durch mathematische Verfahren ihr Informationsgehalt³³ entlockt werden muss. Aus diesem Grund ist die traditionelle Auflösung des Mikroskops weniger wichtig als die möglichst kleine Ausdehnung des Bereiches, aus welchem diese Informationen stammen: das Volumen, in dem Fluorophore angeregt und aus dem Photonen detektiert werden können. Die mathematische Beschreibung, die zu diesem Zweck eingeführt wird, beinhaltet³⁴ die *molekulare Detektionsfunktion* (engl. *molecular detection function*, *MDF*) bzw. *Punktspreizfunktion* (engl. *point spread function*, *PSF*, eigentlich die Abbildung eines Punktemitters im optischen Aufbau, siehe etwa LIPSON *et al.*, 2010) des Systems, welche die orts- und unter Umständen auch zeitabhängige Wahrscheinlichkeit angibt, ein Photon von

³³Dieser umfasst tatsächlich auch solche auf Distanzen weit unterhalb der mit den eingesetzten Geräten erzielbaren bildlichen Auflösung, siehe hierzu die sehr interessante Debatte in ENDERLEIN, 2012; KRICHEVSKY, 2013.

³⁴Die Nomenklatur folgt hier ENDERLEIN *et al.*, 2005, wobei eine vollständige theoretische Berechnung unter Berücksichtigung der Polarisation und des Einflusses der Lochblende, aufbauend auf den grundlegenden Arbeiten von BERNARD RICHARDS und EMIL WOLF (RICHARDS *et al.*, 1959), bereits durch TÖRÖK *et al.*, 1998 gegeben wurde.

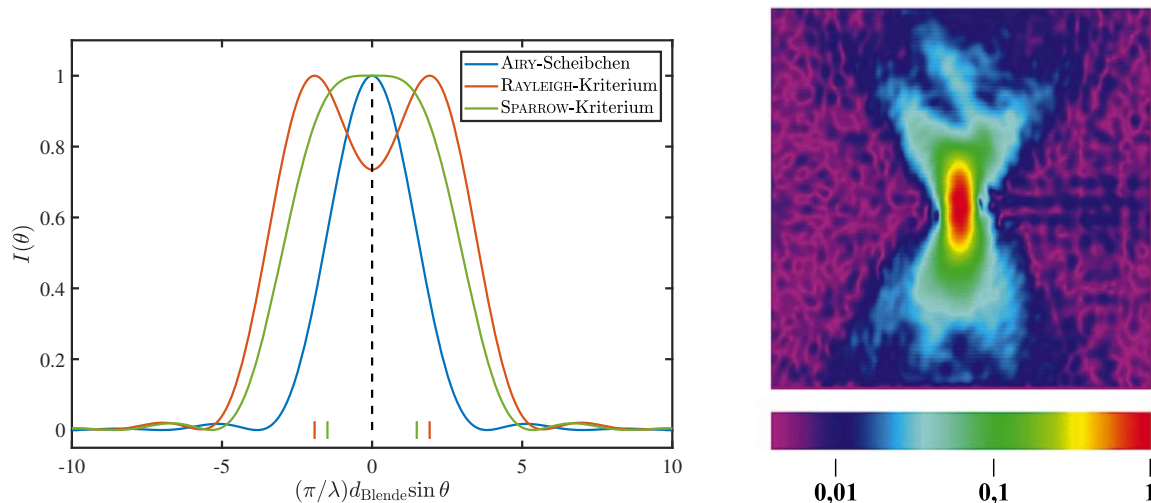


Abbildung 3.10.: Darstellung des theoretischen Abbildes eines Punktemitters nach AIRY (links) und der gemessenen MDF eines konfokalen Mikroskops (rechts, adaptiert aus [JUŠKAITIS et al., 1998](#)).

Die theoretischen Kurven folgen Gl. 3.19 und stellen einen Querschnitt durch die angenäherte Intensitätsverteilung bei Abbildung von einem (blau) bzw. zwei (rot und grün) Punktemittern durch ein perfektes Linsensystem mit Kreisblenden dar. Die Position der Einzelbilder beider Emitter ist im unteren Bereich als senkrechte Striche angezeigt und ihr Abstand entspricht dem durch das RAYLEIGH- (rot) bzw. SPARROW-Kriterium (grün) gegebene Minimum für eine optische Auflösbarkeit.

Die MDF wurde mithilfe von streuenden Goldkugeln (Durchmesser 100 nm) an einem Wasserimmersionsobjektiv ($NA = 1,2$) gemessen. Die optische Achsen verläuft im Bild senkrecht. Man beachte die logarithmische Skala, durch welche auch die laterale Aufweitung ober- und unterhalb des Zentrums deutlich wird. Diese gleicht dem in Kapitel 6 eingesetzten 2D-GAUSS-LORENTZmodell (siehe Abschnitt 3.4.4).

einem Fluorophor in der Probe zu detektieren. Die MDF ergibt sich als Produkt der Wahrscheinlichkeit der Anregung und der Detektion des nachfolgend emittierten Photons, zumeist unter Integration über die beide Vorgänge verbindenden molekularen Veränderungen (Rotation, photophysikalische Prozesse, etc.).

Die Anregung wird meist nach dem Modell der Absorption eines Photons in der elektrischen Dipolnäherung unter resonanten Bedingungen behandelt, sodass die Wahrscheinlichkeit des Übergangs in einen angeregten Zustand proportional zum Quadrat des Skalarproduktes zwischen der Amplitude \vec{E}_0 des elektrischen Feldvektors und dem Übergangsdipolmoment³⁵ $\vec{\mu}_A$ der an der Absorption beteiligten Niveaus:

$$P_A \propto \left| \vec{E}_0 \cdot \vec{\mu}_A \right|^2. \quad (3.21)$$

Die Stärke und Polarisierung des elektrischen Feldes hängt von der verwendeten Optik und der Mode des Lasers, so ein solcher verwendet wird, ab. In unserem Aufbau kann näherungsweise von der linear polarisierten TEM_{00} -Mode eines GAUSSstrahls ([DEMTRÖDER, 2014](#)) ausgegangen

³⁵Dessen Stärke und Richtung kann von der exakten Wellenlänge der Strahlung abhängen ([LAKOWICZ, 2006](#)), sodass die MDF eine spektrale Abhängigkeit zeigt.

werden. Da die Anzahl nicht angeregter Fluorophore mit der Intensität der anregenden Strahlung sinkt, tritt eine *Sättigung* der Absorption und damit auch der Emission ein, sodass die MDF auch von der Besetzung des Grundzustandes abhängt (GREGOR *et al.*, 2005).

Die Detektionswahrscheinlichkeit des emittierten Photons (auch CEF genannt, engl. *collection efficiency function*) kann durch Berechnung des Anteils

$$P_D = \frac{1}{I_G} \int I_D dA_D \quad (3.22)$$

des Energieflusses des Emitters (in Form der Intensität am Detektor I_D als Betrag des zeitgemittelten POYNTINGvektors \vec{S} integriert über die Detektorfläche) am Gesamtfluss bestimmt werden (ENDERLEIN *et al.*, 2005). Dazu wird das Fluorophor meist als HERTZ'scher Dipol mit

$$I = \left| \langle \vec{S} \rangle \right| = \frac{\pi^2 n \nu^4 |\vec{\mu}_E|^2 \sin^2 \theta}{2 \varepsilon_0 c^3 r^2} \quad (3.23)$$

$$I_G = \frac{4\pi^3 n \nu^4 |\vec{\mu}_E|^2}{3 \varepsilon_0 c^3} \quad (3.24)$$

modelliert (GRIFFITHS, 2013). Hier bezeichnen $\vec{\mu}_E$ das Übergangsdipolmoment der an der Emission beteiligten Niveaus, ν die Frequenz der Strahlung, n den Brechungsindex des Mediums, r den Abstand zum Fluorophor und θ den Winkel zwischen der betrachteten Richtung und der Achse des Übergangsdipolmoments. Die Bestimmung von I_D aus I muss den gesamten dazopischen Aufbau mit seinen zahlreichen beugenden Grenzflächen berücksichtigen und kann sich dadurch sehr aufwendig gestalten.

Ist die Rotation des Fluorophors schnell genug, sodass die Orientierung, aus der heraus die Emission erfolgt, unabhängig von der Orientierung zum Zeitpunkt der Absorption ist, sind die Anregungs- und Detektionswahrscheinlichkeiten voneinander entkoppelt und die MDF ist einfach das Produkt aus beiden. Anderenfalls muss über alle relative Orientierungen der Übergangsdipolmomente beider Prozesse integriert werden, gewichtet mit der zeitabhängigen Korrelationsfunktion und der abklingenden Fluoreszenzintensität (siehe Gl. 3.13).

Die MDF wird üblicherweise auf ihr Maximum normiert und die anfallenden Vorfaktoren als molekulare Helligkeit

$$Q = I_0 \sigma_A \Phi_F \quad (3.25)$$

definiert. Hierbei stehen I_0 für die maximale Laserintensität, Φ_F für die Fluoreszenzquantenausbeute³⁶ und σ_A für den Absorptionsquerschnitt. Die Effizienz des Detektionssystems Φ_D kann zusätzlich in die molekulare Helligkeit mit aufgenommen werden.

Für ein konfokales Mikroskop muss die MDF gemessen (siehe Abb. 3.10, rechts) oder numerisch errechnet werden (siehe etwa NASSE *et al.*, 2010), oftmals kann sie aber durch relativ einfache analytische Funktionen angenähert werden (DERTINGER *et al.*, 2007; MARROCCO, 2008). Diese Ansätze haben jedoch stets den Nachteil, dass die in Abschnitt 3.4.2 entwickelten und von der

³⁶Diese kann über Prozesse wie ISC von der Besetzung aller Zustände und damit der Intensität und schließlich vom Ort abhängen (WIDENGREN *et al.*, 1995).

MDF abhängigen Funktionen nur numerisch darstellbar sind. In vielen Anwendungen wird infolgedessen eine entsprechend skalierte GAUSSfunktion als MDF verwendet, was gerade in Fällen schwach fokussierender Objektive einen annehmbaren Kompromiss darstellt (HESS *et al.*, 2002). Leider ist die Wahl eines falschen Fokusmodells nicht unmittelbar aus den hier vorgestellten Messungen ersichtlich, da auch stark abweichende MDFs in Kombination mit abweichenden Molekülparametern eine gute Anpassung an die Daten erlauben (HESS *et al.*, 2002). Eine Überprüfung mittels unabhängiger Methoden (siehe etwa TRÄGÅRDH *et al.*, 2015) ist daher stets angeraten, wenn eine hohe Präzision der abgeleiteten Parameter angestrebt wird.

3.3. Fluktuationen

Ein homogenes, makroskopisches System im thermodynamischen Gleichgewicht verfügt üblicherweise über eine Anzahl zeitlich und räumlich konstanter Variablen, die seinen Zustand nach außen hin eindeutig beschreiben. Eine Messung dieser Variablen liefert im thermodynamischen Grenzfall eines unendlich ausgedehnten Systems stets den gleichen, die Entropie maximierenden Erwartungswert. Dann muss aber gleichermaßen auch jegliche Fluktuation als Abweichung von diesem Wert mit einer Verringerung der Entropie einhergehen: Der zweite Hauptsatz der Thermodynamik verbietet diese nicht, macht sie aber umso unwahrscheinlicher, je größer die Abweichung vom angestrebten Gleichgewichtszustand ausfällt³⁷ und je größer das System selbst ist³⁸. Da diese Abhängigkeit exponentieller Natur ist, sind messbare Abweichungen in großen Systemen von überwältigender Seltenheit. Die Betrachtung eines genügend kleinen, in den hier interessierenden Fällen gar mikroskopischen Subsystems offenbart jedoch ein breites Spektrum an zufälligen Fluktuationen, welche erst die Bezeichnung als *dynamisches* Gleichgewicht rechtfertigen.

3.3.1. Teilchenzahl

Die wichtigste und zugleich einfachste Art der Fluktuation für die in dieser Arbeit vorgestellten Techniken betrifft jene der Teilchenzahl N in einem Volumenelement. Mehr noch als ihre in Abschnitt 3.3.2 abgeleitete zeitliche Entwicklung ermöglicht dieses Phänomen praktisch alle in

³⁷Die Wahrscheinlichkeit der Fluktuationen hängt exponentiell von der Entropie des Gesamtsystems ab, $P(x) \propto e^{S(x)}$, und kann durch Entwicklung am Maximum als $S(x) \approx S(x_{eq}) - \frac{1}{2}a(x - x_{eq})^2$ mit einer GAUSSverteilung $P(x) \propto e^{-\frac{1}{2}a(x-x_{eq})^2}$ beschrieben werden, wobei die Varianz durch $\sigma^2(x) = \frac{1}{a} = 1 / \left. \frac{\partial^2 S}{\partial x^2} \right|_{x=x_{eq}}$ gegeben ist (LANDAU *et al.*, 1980; REBHAN, 2010; PATHRIA *et al.*, 2011; MISHIN, 2015). Da jede beliebig große Abweichung vom „erwarteten“ Zustand des Systems prinzipiell möglich ist, wird sie bei unendlicher Beobachtungsdauer unendlich oft eintreten (POINCARÉ'scher *Wiederkehrsatz*). Der Unterschied zwischen Schwankungen *im* Gleichgewicht und irreversiblen Gang *ins* Gleichgewicht ist somit lediglich eine Frage der Geduld des Beobachters, welche umso mehr strapaziert wird, je größer das System und die verlangte Abweichung sind (COFFEY, 1985). In einem mikrokanonischen Ensemble tritt zusätzlich das (menschliche) Phänomen der willkürlichen Unterscheidung der gleichwahrscheinlichen Zustände auf: Die zufällig auftretende vollständige räumliche Trennung zweier Gasisotope ist nicht unwahrscheinlicher als jede andere exakte Anordnung, wird aber als „besonders“ wahrgenommen.

³⁸Für intensive Zustandsvariablen ist die Varianz umgekehrt proportional zur Systemgröße, für extensive ist es das Quadrat ihres Variationskoeffizienten (LANDAU *et al.*, 1980).

Teil II vorgestellten Messungen und bestimmt ihre Ergebnisse, weswegen es etwas ausführlicher beleuchtet werden soll (siehe etwa LANDAU *et al.*, 1980; PATHRIA *et al.*, 2011).

Der schnellste Weg zur Varianz der Teilchenzahl

$$\sigma^2(N) = \langle (N - \langle N \rangle)^2 \rangle = \langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2 \quad (3.26)$$

führt über die Definition des betrachteten Volumens als Vertreter eines großkanonischen Ensembles in Kontakt mit einem Teilchenreservoir konstanten chemischen Potentials μ (sowie konstanter Temperatur T) und Verwendung der großkanonischen Zustandssumme

$$\mathcal{Z}_{\text{gk}} = \sum_{N=0}^{\infty} \mathcal{Z}_{\text{k}}(N) e^{\frac{\mu N}{k_{\text{B}} T}} = \sum_{N=0}^{\infty} \sum_i \mathcal{Z}_{\text{mk}}(N, \mathcal{E}_i) e^{\frac{\mu N - \mathcal{E}_i}{k_{\text{B}} T}} \quad (3.27)$$

(mit der kanonischen Zustandssumme \mathcal{Z}_{k} , der Energie \mathcal{E}_i des i -ten unterscheidbaren Mikrozustandes, der BOLTZMANN-Konstante k_{B} und der mikrokanonischen Zustandssumme \mathcal{Z}_{mk} , welche identisch dem Entartungsgrad g ist) und des großkanonischen Potentials

$$\Omega = -k_{\text{B}} T \ln \mathcal{Z}_{\text{gk}}. \quad (3.28)$$

Unter der Annahme, dass die Wahrscheinlichkeit des einzelnen Mikrozustandes des Systems proportional zur Anzahl der damit kompatiblen Mikrozustände W_{R} des Reservoirs ist und alle Mikrozustände zum gleichen $\{N, \mathcal{E}_i\}$ -Paar gleichwahrscheinlich sind

$$P(N, \mathcal{E}_i) \propto g(N, \mathcal{E}_i) W_{\text{R}} = g(N, \mathcal{E}_i) e^{S_{\text{R}}(N, \mathcal{E}_i)} \approx g(N, \mathcal{E}_i) e^{S_{\text{R}}^0 + \frac{\mu N - \mathcal{E}_i}{k_{\text{B}} T}} \quad (3.29)$$

$$P(N) = \sum_i P(N, \mathcal{E}_i) \propto \mathcal{Z}_{\text{k}}(N) e^{S_{\text{R}}^0 + \frac{\mu N}{k_{\text{B}} T}}, \quad (3.30)$$

folgt nun unmittelbar daraus

$$-\left(\frac{\partial \Omega}{\partial \mu}\right)_{T, V} = \frac{\sum_{N=0}^{\infty} N \mathcal{Z}_{\text{k}}(N) e^{\frac{\mu N}{k_{\text{B}} T}}}{\mathcal{Z}_{\text{gk}}} = \sum_{N=0}^{\infty} N P(N) = \langle N \rangle \quad (3.31)$$

$$-k_{\text{B}} T \left(\frac{\partial^2 \Omega}{\partial \mu^2}\right)_{T, V} = k_{\text{B}} T \left(\frac{\partial \langle N \rangle}{\partial \mu}\right)_{T, V} = \langle N^2 \rangle - \langle N \rangle^2 = \sigma^2(N). \quad (3.32)$$

Weiterhin kann die partielle Ableitung nach dem chemischen Potential mit der EULER'schen Kettenregel angewandt auf $\langle N \rangle = f(\mu, V, T)$ bei konstantem $\langle N \rangle, T$ umgeformt werden zu

$$\left(\frac{\partial \langle N \rangle}{\partial \mu}\right)_{T, V} = -\frac{\left(\frac{\partial V}{\partial \mu}\right)_{\langle N \rangle, T}}{\left(\frac{\partial V}{\partial \langle N \rangle}\right)_{\mu, T}} = -\frac{\left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_{\langle N \rangle, T} \left(\frac{\partial p}{\partial \mu}\right)_{\langle N \rangle, T}}{\left(\frac{\partial V}{\partial \langle N \rangle}\right)_{\mu, T}} \quad (3.33)$$

und mit dem Satz von SCHWARZ angewandt auf Ω (eine Form der MAXWELL-Beziehungen)

$$\left(\frac{\partial p}{\partial \mu}\right)_{\langle N \rangle, T} = -\left(\frac{\partial^2 \Omega}{\partial \mu \partial V}\right)_T = \left(\frac{\partial \langle N \rangle}{\partial V}\right)_{\mu, T} \quad (3.34)$$

ergibt sich (bei konstanter Teilchenzahldichte $C = f(\mu, T)$ und damit³⁹ $\langle N \rangle = CV = \left(\frac{\partial \langle N \rangle}{\partial V}\right)_{\mu, T} V$ sowie der isothermen Kompressibilität κ_T) schließlich

$$\sigma^2(N) = -k_B T \frac{\langle N \rangle^2}{V^2} \left(\frac{\partial V}{\partial p}\right)_{\langle N \rangle, T} = k_B T \frac{\langle N \rangle^2}{V} \kappa_T. \quad (3.35)$$

Damit ist zumindest für konstante Kompressibilität und Teilchenzahldichte die Varianz der Teilchenzahl in einem Volumenelement proportional zu dieser selbst und für ein ideales Gas mit $pV = \langle N \rangle k_B T$ gilt sogar exakt $\sigma^2(N) = \langle N \rangle$. Für die verdünnten Lösungen fluoreszenter Moleküle, mit denen sich die experimentellen Arbeiten in Teil II ausschließlich befassen, kann unter der Bedingung konstanter Aktivitätskoeffizienten ($\left(\frac{\partial \mu}{\partial c}\right)_{p, T} = RT/c$ mit der Stoffmengenkonzentration c) ebenfalls $\sigma^2(N) = \langle N \rangle$ hergeleitet werden⁴⁰ (LANDAU *et al.*, 1980).

Die Teilchenzahlfluktuationen können für sehr kleine Volumina nun nicht wie in Fußnote 37 auf Seite 32 als einer GAUSS-Verteilung folgend angenommen werden, da in diesem Fall die relative Abweichung nicht mehr als klein angenommen werden kann. Stattdessen ergibt sich für ideal wechselwirkungsfreie Teilchen (wiederum in einem idealen Gas oder in einer stark verdünnten Lösung) eine POISSON-Verteilung (LANDAU *et al.*, 1980)

$$P(N) = \frac{\langle N \rangle^N}{N!} e^{-\langle N \rangle}. \quad (3.36)$$

Das für die weitere Betrachtung wichtige Charakteristikum dieser ist die Gleichheit von Varianz und Erwartungswert $\sigma^2(N) = \langle N \rangle$, welche in Abschnitt 3.4.2.2 ausschlaggebend für die Abhängigkeit der relevanten Korrelationsfunktion von der Konzentration sein wird.

3.3.2. Diffusion

Wenn Fluktuationen eine Möglichkeit darstellen, dem thermodynamischen Gleichgewicht zumindest kurzzeitig zu entkommen, ist die Diffusion, und allgemeiner die Dissipation, der unvermeid-

³⁹Dies gilt nur in homogenen Systemen ohne langreichweitige Wechselwirkungen und Grenzflächen, nicht aber für thermodynamisch kleine Systeme (siehe HILL, 1994). Für erstere ergibt sich mit dem EULER-*Theorem über homogene Funktionen* zusätzlich $\Omega = -pV$.

⁴⁰In konzentrierteren Lösungen oder bezogen auf die Flüssigkeitsmoleküle selbst ist die Fluktuation stark verringert, da die abstoßenden Wechselwirkungen untereinander dem Entstehen von größeren Hohlräumen bzw. Zusammenballungen entgegenwirken. Aus dem nämlichen Grunde sind die Fluktuationen räumlich stark korreliert und es ergibt sich die typische Nahordnung kondensierter Phasen. Eine Anwendung auf die in dieser Arbeit verwendeten Techniken findet sich unter dem Namen *inverse F(C)CS* in der Literatur (WENNMALM, 2018). Umgekehrt kann das Überwiegen attraktiver Wechselwirkungen zu einer Erhöhung der Fluktuationen führen, was dem Fall von mit steigender Konzentration abnehmenden Aktivitätskoeffizienten entspricht. Das Extrem der divergierenden Fluktuationen (bei unendlicher Korrelationslänge selbiger) wird etwa am kritischen Punkt zwischen zwei Phasen verwirklicht, wo $\kappa_T \rightarrow \infty$ (siehe etwa CHIMOWITZ, 2005; PATHRIA *et al.*, 2011).

liche Weg hinein⁴¹: Der räumliche Ausgleich jeglicher physikalischen Größe, welcher schließlich zur perfekten Homogenität und Unveränderlichkeit allen Seins führt, dem Wärmetod des Universums.

Die Diffusion strebt nun die gleichmäßige Verteilung nicht nur der Konzentration, sondern der Aufenthaltswahrscheinlichkeit jedes Teilchens nach dessen initialer Beobachtung an. Der Ort, an welchem eine spätere Beobachtung das Teilchen wiederfindet, muss als Zufallsgröße aufgefasst werden, da selbst unter Vernachlässigung möglicher quantenmechanischer Effekte ihre deterministische Bestimmung nicht praktikabel ist und somit hier notwendigerweise das Reich der statistischen Physik betreten wird.

Die Untersuchung und mathematische Beschreibung der Diffusion erfolgte nahezu zeitgleich mit der Entdeckung ihrer Ursache in Form der ungerichteten Bewegung aller Objekte als Ausdruck der ihnen innewohnenden thermischen Energie, der sogenannten BROWN'schen Molekularbewegung⁴² (COFFEY, 1985). Im thermodynamischen Gleichgewicht entfällt auf jeden Translationsfreiheitsgrad eines jeden Teilchens nach dem Äquipartitionstheorem eine mittlere Energie von

$$\langle E_{\text{kin},x} \rangle = \frac{1}{2} m \langle v_x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T, \quad (3.37)$$

welche sich als eine nie versiegende Quelle quasizufälliger Änderungen von momentaner Position und Impuls äußert. Im Folgenden soll jeweils kurz auf die Phänomenologie der Diffusion und die zugehörige Mathematisierung eingegangen werden.

Hier soll zuerst eine Sekunde im Leben eines diffundierenden Teilchens betrachtet werden. Unser kugelförmiges Teilchen mit Radius r_T und Masse m_T befinde sich zur Zeit $t = 0$ am Ort $\vec{r} = 0$ und hat die Geschwindigkeit \vec{v}_0 . Um es herum existiert eine dichte Wolke von Solvensmolekülen (Masse m_S), welche mit ähnlichen Bedingungen starten (siehe Abb. 3.11). Der Einfachheit halber sei $m_T \gg m_S$.

Die bis hierhin eingefrorene Zeit beginnt zu laufen und das Teilchen ist sofort einer großen Anzahl von Stößen mit dem Lösungsmittel ausgesetzt (mittlere Stoßzeit $1/\tau_{\text{Stoß}} = \nu_{\text{Stoß}} \sim A_T n_S \langle |\vec{v}_S| \rangle \approx A_T \rho_S \sqrt{k_B T / m_S^3}$ oder ~ 10 THz/nm² Oberfläche in Wasser bei Raumtemperatur mit der MAXWELL'schen Geschwindigkeitsverteilung). Auf dieser Zeitskala ist das deutlich größere Teilchen nahezu statisch ($\langle |\vec{v}_T| \rangle \lesssim 1$ pm/ps für $r_T > 10$ nm) und erfährt das Lösungsmittel als kontinuierlichen Strom, wodurch das Problem der Hydrodynamik zugänglich wird.

In den nächsten Pikosekunden befindet sich das Teilchen in der *ballistischen* Phase⁴³ seiner Bewegung und verändert seine Richtung nur wenig, während sein ursprünglicher Impuls $\vec{p}_T = m_T \vec{v}_0$ fortwährend durch das Auseinanderschieben der vor ihm befindlichen Solvensmoleküle aufgezehrt

⁴¹Dissipative Vorgänge, wie Viskosität und Wärmeleitung, sind zusätzlich mit den Fluktuation eng verknüpft über das *Dissipations-Fluktuationstheorem*, siehe etwa KUBO, 1966; LANDAU *et al.*, 1980; PATHRIA *et al.*, 2011.

⁴²Der Begriff *Molekül* oder *Molekel* würde im 19. Jahrhundert noch uneingeschränkt für alle in einem Sinne „kleinsten“ Teilchen der Materie verwendet, seien es Atome oder Nanopartikel (PAIS, 1988).

⁴³Diese Phase wurde wegen ihrer kurzen Dauer schon von EINSTEIN für nicht beobachtbar gehalten (EINSTEIN, 1907), was 100 Jahre später schließlich zuerst an Teilchen in verdünnten Gasen im *Bremer Fallturm* (!) gelang (BLUM *et al.*, 2006). Die Beobachtung von Teilchen in einer *optischen Falle* wurde bereits ein Jahr zuvor berichtet (LUKIĆ *et al.*, 2005).

wird. Die Dauer bis zum völligen Verlust der Korrelation mit der ursprünglichen Bewegungsrichtung kann aus einer exponentiellen Abnahme des Impuls durch die hydrodynamische Reibungskraft abgeschätzt werden. Dabei wird bei den hier vorkommenden geringen Geschwindigkeiten von einer laminaren Strömung ausgegangen (sehr kleine REYNOLDS-Zahl, Viskosität η dominiert Trägheit), sodass mit dem Reibungskoeffizienten ζ gilt:

$$\frac{d\vec{p}_T}{dt} = \vec{F}_R = -\zeta \vec{v}_T \quad (3.38)$$

$$\vec{v}_T = \vec{v}_0 e^{-t/\tau_B} \quad (3.39)$$

$$\tau_B = \frac{m_T}{\zeta} = \frac{m_T}{6\pi\eta r_T} = \frac{2\rho_T}{9\eta} r_T^2. \quad (3.40)$$

In der letzten Formel wurde das STOKES'sche Reibungsgesetz (STOKES, 1851) verwendet, welches für die stetige, translatorische Bewegung einer Kugel in einem unendlich ausgedehnten, laminaren strömenden, an der Kugeloberfläche anhaftenden (*no-slip*-Bedingung) Fluid der Viskosität η gilt. Man erhält für ein Teilchen mit einer ähnlichen Dichte wie Wasser $\tau_B \approx 2$ ns für $r_T = 100$ nm und damit wie gefordert $\tau_B \gg \tau_{\text{Stoß}} \approx 2$ as.

Der entstandene Pfad ist glatt und frei von Sprüngen und seine Länge hängt linear von der Zeit ab. Damit wächst die *mittlere quadratische Abweichung* (engl. *mean square displacement, MSD*) für $t \ll \tau_B$ quadratisch mit der Zeit (siehe Abb. 3.11, Teil C):

$$\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle = \vec{v}_0^2 t^2. \quad (3.41)$$

Die während dieser Phase maximal zurückgelegte Strecke ergibt sich aus dem Zeitintegral über Gl. 3.39 zu $|\Delta \vec{r}|_B = \vec{v}_0 \tau_B$ bzw. $|\Delta \vec{r}|_B \approx 0,12$ nm für $r_T = 100$ nm (mit $\vec{v}_0 = \sqrt{\langle |\vec{v}_T|^2 \rangle}$) und damit weniger als ein einziges Wassermolekül weit. Man erkennt hieran nicht allein die Schwierigkeit der Beobachtung der ballistischen Phase für Mikroteilchen, sondern auch die zunehmende Irrelevanz für makroskopische Objekte: Die Länge dieser thermisch angeregten „Sprünge“ relativ zur Ausdehnung des Teilchens ist umgekehrt proportional zur Wurzel dieser Ausdehnung ($|\Delta \vec{r}|_B / r_T \sim \sqrt{k_B T \rho_T r_T / \eta}$) und damit würde sich ein 10 cm großes Objekt um lediglich ein Millionstel seines Durchmessers innerhalb einer Stunde verschieben.

Um zu ergründen, wann sich unser Teilchen eine relevante Strecke von seinem Startpunkt entfernt hat, muss die scheinbare Zufälligkeit seiner Richtungsänderungen und Schrittlängen berücksichtigt werden. Das Teilchen führt eine sogenannte *Irrfahrt* (heute meist engl. *random walk*, siehe PEARSON, 1905) aus, welche im simpelsten Fall als Folge diskreter Schritte in Form unabhängig und identisch verteilter Zufallszahlen definiert werden kann (damit auch eine MARKOW-Kette, siehe etwa VAN KAMPEN, 2007), deren zugehörige Reihe die Position des Teilchens nach einer Anzahl Schritten abbildet. Ist die Bewegung isotrop und damit die Raumrichtungen unkorre-

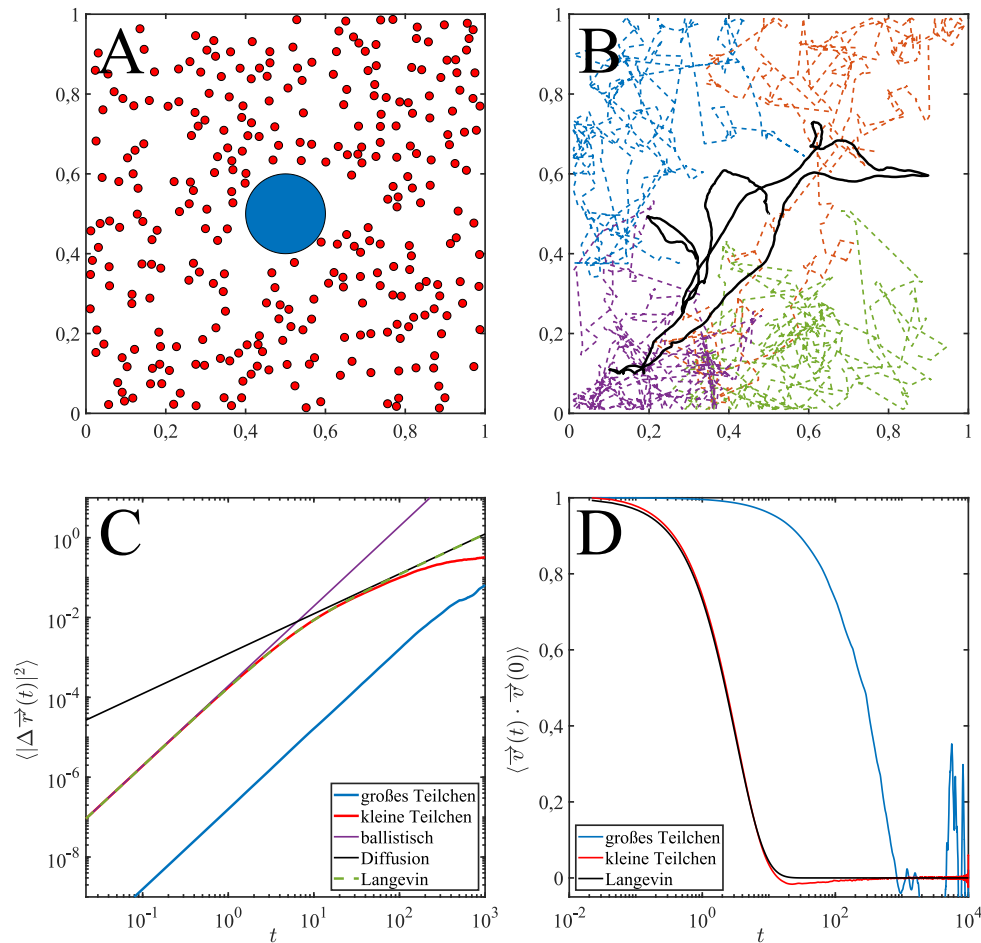


Abbildung 3.11.: Beispielhafte Darstellung der Eigenschaften von Diffusionsprozessen anhand einer zweidimensionalen, ballistischen Simulation scheibenförmiger Teilchen.

A: Ein großes Teilchen (blau) und 300 kleine Teilchen als „Lösungsmittel“ bewegen sich innerhalb eines quadratischen Kastens. Die Teilchen interagieren allein durch elastische Stöße miteinander und mit der Begrenzung des Kastens. Das große Teilchen ist zehnfach größer und tausendfach schwerer als die kleinen Teilchen, was grob den Verhältnissen zwischen einem Sar1p-Molekül und einem Wassermolekül entspricht.

B: Gezeigt sind die sich nach einer Zeit von 10.000 (willkürliche Einheiten) ergebende Trajektorie des großen Teilchens (durchgezogen) und diejenigen von vier kleinen Teilchen nach einer Zeit von 1.000 (gestrichelt). Die kleinen Teilchen bewegen sich in deutlich schneller voran und zeigen die für Diffusion typischen unstetigen Pfade, welche sich bei detaillierterer Betrachtung in einzelne ballistische Phasen auflösen würden. Das große Teilchen weist einen glatteren Pfad auf, da seine Bewegungsrichtung sich viel langsamer verändert (τ_B größer).

C: Die mittlere quadratische Abweichung der kleinen Teilchen (rot, gemittelt über alle) zeigt für kurze Zeiten die ballistische Phase mit $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle \propto t^2$ (lila) und anschließend die Diffusionsphase mit $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle \propto t$ (schwarz). Die entsprechende Lösung der LANGEVIN-Gleichung (gestrichelt grün) beschreibt das Verhalten auf allen Zeitskalen (aufgrund der Begrenzung konvergiert hier allerdings die MSD gegen einen Wert von nicht ganz einem Drittel, was dem Abstand zwischen zwei uniform zufällig gewählten Punkten in dem Kasten entspricht). Das große Teilchen befindet sich im gesamten Zeitbereich in der ballistischen Phase (blau).

D: Die Autokorrelationsfunktion der Geschwindigkeitsvektoren $\langle \vec{v}(t) \cdot \vec{v}(0) \rangle$ zeigt das exponentielle Abklingen der Korrelation der Bewegung beider Teilchenarten, wobei das große Teilchen (blau) seine Richtung etwa hundertmal länger beibehält als die kleinen Teilchen (rot). Der Bereich negativer Werte wird wiederum durch die Beschränkung des Kastens hervorgerufen und ähnelt dem Ergebnis für Diffusion in einem *harmonischen Potential* (siehe CLERCX *et al.*, 1992; HUANG *et al.*, 2011a).

liert⁴⁴, können die einzelnen Koordinaten unabhängig voneinander betrachtet werden:

$$x_i^{n+1} = x_i^n + \delta_i^n \quad (3.42)$$

$$x_i^n = x_i^0 + \sum_{j=1}^n \delta_i^j \quad (3.43)$$

$$\langle (\Delta x_i^n)^2 \rangle = \left\langle \left(\sum_j \delta_i^j \right)^2 \right\rangle = \left\langle \sum_j (\delta_i^j)^2 \right\rangle = n\sigma^2(\delta_i). \quad (3.44)$$

Das zweite Gleichheitszeichen der letzten Zeile folgt aus der Unabhängigkeit der δ_i^j , das dritte aus der identischen Verteilung. Die Varianz der Distanzen δ_i^j bestimmt nun die mittlere quadratische Entfernung nach einer Anzahl Schritten, während ihre genaue Verteilungsfunktion nur das Verhalten auf kurzen Zeitskalen beeinflusst⁴⁵: Der *Zentrale Grenzwertsatz* garantiert die Konvergenz in Verteilung der Summe in Gl. 3.43 zu einem Zeitpunkt gegen eine Normalverteilung ($\sum_{j=1}^n \delta_i^j \xrightarrow{\mathcal{D}} \mathcal{N}(0, n\sigma^2(\delta_i))$, siehe etwa [CRAMÉR, 1946](#)) und der *Funktionale Zentrale Grenzwertsatz* nach DONSKER schließlich (für $\Delta t = t/n_{\text{Schritt}}$ und $n_{\text{Schritt}} \rightarrow \infty$) die Konvergenz in Verteilung der gesamten Irrfahrt gegen den WIENERprozess als Standardbeschreibung der BROWN'schen Bewegung.

Für unser Teilchen kann vereinfachend $|\Delta \vec{r}|_{\text{B}} / \sqrt{n_{\text{D}}}$ als feste Schrittlänge (in jeder der n_{D} Dimensionen) definiert werden, die zufällig in positive oder negative Richtung ausgeführt wird ($\delta_i^j = \pm |\Delta \vec{r}|_{\text{B}}$), wodurch sich eine Binomialverteilung der Anzahl positiver Schritte und für viele Schritte $n_{\text{Schritt}} = t/\tau_{\text{B}}$ eine Normalverteilung der Position in jeder Koordinate ergibt:

$$x_i(t) \sim \mathcal{N}\left(0, \frac{|\Delta \vec{r}|_{\text{B}}^2}{n_{\text{D}}\tau_{\text{B}}}\right) \quad (3.45)$$

$$\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle = \frac{|\Delta \vec{r}|_{\text{B}}^2}{\tau_{\text{B}}} t = t\tau_{\text{B}} \langle |\vec{v}_{\text{S}}|^2 \rangle = \frac{n_{\text{D}}k_{\text{B}}T}{\zeta} t. \quad (3.46)$$

Die mittlere quadratische Abweichung $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle$ wächst damit im Gegensatz zur ballistischen Bewegung linear mit der Zeit (und der Dimensionalität): man spricht nun von Diffusion, genauer

⁴⁴Dies bedeutet $\langle \Delta x_i(t) \Delta x_j(t) \rangle = \langle \Delta x_i^2(t) \rangle \delta_{ij}$ mit dem KRONECKER-Delta $\delta_{ij} = \begin{cases} 1 & i=j \\ 0 & i \neq j \end{cases}$ und damit

$$\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle = \sum_i \langle \Delta x_i^2(t) \rangle \text{ für } \vec{r} = \sum_i x_i \vec{e}_i.$$

⁴⁵Dies gilt nicht mehr, wenn Erwartungswert oder Varianz nicht existieren oder unendlich sind, etwa im Falle einer CAUCHY-Verteilung, die zu einem Irrflug nach LÉVY (engl. LÉVY flight) führt, welcher sich durch das gelegentliche Auftreten extrem großer Schritte, oder „Flüge“, auszeichnet.

von *normaler* oder FICK'scher Diffusion⁴⁶. Der Proportionalitätsfaktor

$$D = \frac{k_B T}{\zeta} \quad (3.47)$$

wird als Diffusionskoeffizient bezeichnet, wobei Gl. 3.46 nur für den Fall diskreter Schritte gültig ist. In Verbindung mit dem oben verwendeten Reibungskoeffizienten ergibt sich schließlich noch die wichtige STOKES-EINSTEIN-Gleichung⁴⁷

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_T}. \quad (3.48)$$

Bei einer stetigen Bewegung erhält man stattdessen – über eine partielle Differentialgleichung für die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Teilchens (FOKKER-PLANCK-Gleichung als Vereinfachung der CHAPMAN-KOLMOGOROW-Gleichung, siehe VAN KAMPEN, 2007), die LANGEVIN-Gleichung als stochastische Differentialgleichung der Teilchenposition (COFFEY *et al.*, 2004) oder die makroskopischen FICK'schen Gesetze für die Konzentration (CRANK, 1975) – die modifizierte Gleichung

$$\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle = \frac{2n_D k_B T}{\zeta} t = 2n_D D t. \quad (3.49)$$

Diese Zeitabhängigkeit in Verbindung mit der beständigen Richtungsänderung der Bewegung hat weitreichende Folgen für die Eigenschaften der entstehenden Trajektorie: Sie ist fraktal (MINKOWSKI-BOULIGAND-Dimension $D_H = 2$, siehe DEBRUNNER, 1955; MAZO, 2002), statistisch selbstähnlich, fast nirgends differenzierbar (unendliche Beschleunigung durch Vernachlässigung der Trägheit, siehe COFFEY *et al.*, 2004) und die momentane Geschwindigkeit divergiert (bei Vernachlässigung der ballistischen Phase) bei kürzeren Beobachtungsintervallen dt nach

$$\lim_{dt \rightarrow 0} v_m(t) = \lim_{dt \rightarrow 0} \frac{\sqrt{\langle |\vec{r}(t+dt) - \vec{r}(t)|^2 \rangle}}{dt} = \infty. \quad (3.50)$$

Somit ist der „wahre“ Pfad, den unser Teilchen zurücklegt, im Bereich $dt \gg \tau_B$ immer deutlich

⁴⁶Anomale Diffusion mit $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle \propto t^\gamma$ und $\gamma \neq 1$ für bestimmte Zeit- bzw. Entfernungsbereiche ergibt sich somit durch Verletzung zumindest einer der Voraussetzungen der Gültigkeit des Satzes von DONSKER:

- unendliche oder nicht definierte erste und zweite Momente der Schrittlängenverteilung: siehe Fußnote 45 auf der vorherigen Seite
- fehlende Unabhängigkeit der Schritte: Aufgabe der MARKOW-Eigenschaft, *persistente* Irrfahrten mit „Gedächtnis“
- zufällige Wartezeiten zwischen den Schritten: *zeitstetige* Irrfahrten (engl. *continuous-time random walk*).

Der Fall $\gamma < 1$ wird als *Subdiffusion* bezeichnet und z. B. durch die Interaktion mit Hindernissen und Gitterstrukturen verursacht, der Fall $\gamma > 1$ wird als *Superdiffusion* und entsteht etwa durch *aktiven Transport* von Teilchen in Zellen (HÖFLING *et al.*, 2013).

Eine Abweichung der Schrittlängen von einer „reinen“ GAUSS-Verteilung erzeugt folglich nicht automatisch auch eine Abweichung von der FICK'schen Diffusion, solange man z. B. die Verteilung als Mischverteilung von GAUSS-Verteilungen (Faltung mit einer Verteilung von Diffusionskoeffizienten) darstellen kann, wodurch sich nach dem Satz von der totalen Varianz und mit $\langle \Delta \vec{r}(t) \rangle = 0$ schließlich wieder $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle \propto \bar{D} t$ ergibt (WANG *et al.*, 2012).

⁴⁷Für eine eher thermodynamische Herleitung ohne Rückgriff auf die MSD siehe auch EINSTEIN, 1905; KUBO, 1966

länger und seine Geschwindigkeit deutlich höher, als die gemessenen Positionen erwarten lassen (COFFEY *et al.*, 2004). Während also der Pfad langsam den Raum „ausfüllt“, kommt das Teilchen nur langsam voran: Auch wenn es mit einer winzigen Wahrscheinlichkeit eine Strecke $|\Delta \vec{r}(t)| \propto t$ zurückgelegt haben könnte, hat es sich im (quadratischen) Mittel doch lediglich um $|\Delta \vec{r}(t)| \propto \sqrt{t}$ vom Ausgangspunkt entfernt.

Damit kann auch die Frage beantwortet werden, wie lange es dauert, bis sich ein diffundierendes Teilchen um seinen eigenen Radius vom Startpunkt entfernt hat:

$$\tau_R = \frac{r_T^2 \zeta}{n_D k_B T} = \frac{2\pi\eta r_T^3}{k_B T}. \quad (3.51)$$

Für eine Kugel mit $r_T = 100$ nm in Wasser bei Raumtemperatur ergibt sich damit $\tau_R \approx 1,5$ ms $\approx 10^6 \tau_B$, für das 10 cm große Objekt hingegen fast 25 My! Diffusion ist ein erkennbar langsamer Vorgang auf makroskopischer Ebene.

3.4. Korrelationen

Die im vorhergehenden Abschnitt vorgestellten Arten von Fluktuation in einem System im thermodynamischen Gleichgewicht stellen allesamt auch Quellen der Information über ebenjene Systeme dar. Die vollständigst mögliche Abschöpfung dieses Wissens gelänge über die Angabe der gemeinsamen Wahrscheinlichkeitsverteilung für die angenommenen Werte aller – auch mikroskopischen – Freiheitsgrade der beteiligten Teilchen. Natürlich ist dies weder praktikabel, noch auch nur theoretisch möglich für die gewaltige Anzahl an möglichen Kombinationszuständen in einem System moderater Größe. Für die ganz überwiegende Zahl der Fälle wäre eine derart genaue Beschreibung auch gar nicht nötig, da die Bestimmung einiger weniger Parameter der Verteilung makroskopisch messbarer Größen vollauf genügt. Beispielsweise ist die Kenntnis der exakten Position aller Atome eines Proteins zu jedem Zeitpunkt für die Messung seiner Affinität zu einer Membran überflüssig.

Nach dem Erwartungswert einer Messgröße als dem ersten Moment ihrer Verteilung, welches bei Fluktuationen definitionsgemäß gleich null ist, ist nun die Varianz bzw. die Kovarianz zwischen zwei Größen als das zweite (zentrierte) Moment die nächstliegende Fortentwicklung der mathematischen Beschreibung. Der überzufällige Zusammenhang zweier Größen, also das Vorliegen einer statistischen Abhängigkeit zwischen den sie beschreibenden Zufallsvariablen, führt zum Verlust der Separierbarkeit ihrer bivariaten Wahrscheinlichkeitsverteilung in das Produkt der jeweiligen Randverteilungen, d. h. $P(X \cap Y) \neq P(X) \cdot P(Y)$, und meist – aber nicht notwendigerweise! – zu einer Korrelation und damit einer Kovarianz ungleich null: $\text{Cov}(X, Y) = E((X - E(X)) \cdot (Y - E(Y))) = E(XY) - E(X) \cdot E(Y)$. Das Vorliegen der Korrelation an sich und der spezifische Wert dieser Kovarianz gestatten nun Aussagen über das zugrundeliegende System und können mit theoretischen Vorhersagen verglichen werden, um dessen Eigenschaften zu quantifizieren.

3.4.1. Grundlegende Theorie

In der vorliegenden Arbeit sind es nicht allein die Korrelationen zwischen zwei einzelnen Messgrößen, welche von Interesse sind, sondern die Abhängigkeit der Stärke dieser Korrelationen von einem Parameter und damit *Korrelationsfunktionen*. Der Parameter, oder auch die Parameter bei höherdimensionalen Funktionen, kann nahezu beliebig sein, solange er veränderbar (oder zumindest messbar) ist und eine Auswirkung auf zu bestimmenden Korrelationen hat. Im Folgenden wird es sich dabei um die Zeit- und Ortskoordinaten von Helligkeitsmessungen handeln; möglich sind aber auch Größen wie die Wellenlänge von Photonen, die Magnetfeldstärke oder die Konzentration eines bestimmten Stoffes.

Formal mathematisch betrachtet handelt es sich bei den zu untersuchenden Korrelationskoeffizienten um die auf die Standardabweichungen normierten und von zwei (Zeit-)Variablen abhängigen Kovarianzfunktionen

$$\rho_{XY}(t_1, t_2) = \frac{\text{Cov}(X_{t_1}, Y_{t_2})}{\sigma_x(t_1) \sigma_Y(t_2)} \quad (3.52)$$

von *Zufallsprozessen* (auch *stochastische Prozesse* genannt, siehe ØKSENDAL, 2003), wobei man von *Autokorrelationen* spricht, wenn die zu korrelierenden Zufallsvariablen beide Mitglieder desselben Zufallsprozesses sind ($X = Y$), und von *Kreuzkorrelation*, wenn sie verschiedenen Prozessen entstammen ($X \neq Y$). Für zumindest *schwach stationäre* Prozesse⁴⁸ – wie sie für die hier betrachteten Messgrößen in realen Systemen im thermodynamischen Gleichgewicht angenommen werden können – lässt sich Gl. 3.52 zu

$$\rho_{XY}(\tau) = \frac{\text{Cov}(X_t, Y_{t+\tau})}{\sigma_x \sigma_Y} = \frac{\text{E}((X_t - \mu_X) \cdot (Y_{t+\tau} - \mu_Y))}{\sigma_x \sigma_Y} \quad (3.53)$$

vereinfachen, sodass nur noch eine funktionale Abhängigkeit von der Korrelationszeit τ besteht. Zur praktischen Berechnung, aber auch tieferen theoretischen Betrachtung ist es nützlich, die Auto- und Kreuzkovarianzen als Integraltransformationen mit einfachen Beziehungen zu ihren jeweiligen Fouriertransformierten anzugeben. Dazu wird zunächst der abstrakte Zufallsprozess als konkrete, stetige und unendliche Zeitreihe $x(t)$ mit dem Erwartungswert

$$\langle x(t) \rangle = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T x(t) dt \quad (3.54)$$

formuliert⁴⁹. Die tatsächlichen Messreihen sind notwendigerweise endlich und diskret, sodass die Integrale jeweils durch Summen zu ersetzen und eventuell auftretende Randeffekte und Diskretisierungsartefakte gesondert zu betrachten sind.

Die Kovarianzfunktionen können nun als Auto- und Kreuzkorrelationen der allgemeinen Form

⁴⁸Diese verfügen über eine endliche Varianz σ_X^2 und zeitunabhängige Erwartungswerte μ_X und Autokovarianzen. *Stark stationäre* Prozesse besitzen hingegen darüber hinaus eine zeitunabhängige Verteilungsfunktion: $F_X(x_{t_1}, x_{t_2}, \dots, x_{t_n}) = F_X(x_{t_1+\tau}, x_{t_2+\tau}, \dots, x_{t_n+\tau})$ für $t_1, \dots, t_n, \tau \in \mathbb{R}$ und $n \in \mathbb{N}$.

⁴⁹Die Ersetzung des Erwartungswertes einer Größe (zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Ensemble) durch den zeitlichen Mittelwert ist exakt nur unter (quasi-)ergodischen Bedingungen möglich.

$(f \star g)(\tau)$ ausgedrückt werden; hier unter expliziter Berücksichtigung komplexer Größen:

$$\text{Cov}(X_t, Y_{t+\tau}) \mapsto \langle x(t) \cdot y(t+\tau)^* \rangle - \langle x(t) \rangle \cdot \langle y(t)^* \rangle \quad (3.55)$$

$$\langle x(t) \cdot y(t+\tau)^* \rangle = \langle y(t)^* \cdot x(t-\tau) \rangle = (y \star x)(-\tau) \quad (3.56)$$

$$(f \star g)(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T f(t)^* g(t+\tau) dt. \quad (3.57)$$

Für die weitere theoretische wie praktische Berechnung von Korrelationsfunktionen erweist sich deren Beziehung zur *Faltung* $(f^* * g)(\tau)$ als sehr nützlich:

$$(f(t) \star g(t))(\tau) = (f^*(-t) * g(t))(\tau) \quad (3.58)$$

$$(f * g)(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} f(t) g(\tau - t) dt. \quad (3.59)$$

Die Faltungsoperation (hier für einen n -dimensionalen EUKLIDISCHEN Raum) kann nun aufgrund des sogenannten *Faltungstheorems*

$$\mathcal{F}(f * g) = (2\pi)^{n/2} \mathcal{F}(f) \cdot \mathcal{F}(g) \quad (3.60)$$

auf die FOURIERtransformation $\mathcal{F}(f)$ (hier mit ihrer Rücktransformation $\mathcal{F}^{-1}(F)$)

$$\mathcal{F}(f(\vec{x}))(\vec{k}) = F(\vec{k}) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}} \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{x}) e^{-i\vec{k} \cdot \vec{x}} d^n \vec{x} \quad (3.61)$$

$$\mathcal{F}^{-1}(F(\vec{k}))(\vec{x}) = f(\vec{x}) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}} \int_{\mathbb{R}^n} F(\vec{k}) e^{i\vec{k} \cdot \vec{x}} d^n \vec{k} \quad (3.62)$$

zurückgeführt werden, was eine wichtige Vereinfachung der oftmals schwierigen Faltungsintegrale darstellt.

Zusammengefasst lässt sich die (zeitliche) Korrelation zweier Größen wie folgt über Fouriertransformationen darstellen:

$$\langle x(t) \cdot y(t+\tau)^* \rangle = (y(t) \star x(t))(-\tau) = (y^*(-t) * x(t))(-\tau) \quad (3.63)$$

$$= \sqrt{2\pi} \mathcal{F}^{-1}(\mathcal{F}(y^*(-t)) \cdot \mathcal{F}(x(t)))(-\tau) \quad (3.64)$$

$$= \sqrt{2\pi} \mathcal{F}^{-1}(\mathcal{F}(x)^* \cdot \mathcal{F}(y))(\tau)^*. \quad (3.65)$$

3.4.2. Fluoreszenz(kreuz)korrelationsspektroskopie

Die *Fluoreszenz(kreuz)korrelationsspektroskopie* (engl. *fluorescence (cross) correlation spectroscopy*, *F(C)CS*) ist wie schon die *dynamische Lichtstreuung* (engl. *dynamic light scattering*, *DLS*) eine auf der zeitlichen Korrelation von Helligkeitsschwankungen basierende, nichtinvasive und einzelmolekülsensible⁵⁰ Technik, mit der vornehmlich die Größe, die Konzentration und die pho-

⁵⁰Dieser Begriff beschreibt den Umstand, dass zwar bereits das Signal einzelner Moleküle detektiert wird, das Messergebnis aber im Gegensatz zu echten Einzelmolekültechniken erst durch die Mittelung über eine große

tophysikalischen Eigenschaften fluoreszierender Teilchen in kleinsten Flüssigkeitsvolumina und im thermodynamischen Gleichgewicht untersucht werden kann. Sie wurde 1972 erstmalig von ELLIOT L. ELSON, DOUGLAS MAGDE und WATT WETMORE WEBB beschrieben (MAGDE *et al.*, 1972) und 1974 ausführlich theoretisch und praktisch ausgearbeitet (ELSON *et al.*, 1974; MAGDE *et al.*, 1974).

Die FCS wurde als ein Beispiel für Konzentrationskorrelationsspektroskopiemethoden angeführt (ELSON *et al.*, 1975), die auf der Messung von Fluktuationen der Teilchenkonzentration in kleinen Bereichen einer Probe basieren (siehe Abschnitt 3.3.1) und prinzipiell für jede Art von Messgröße adaptiert werden könnten, die von diesen Konzentrationen abhängt (etwa Dichte, Brechungsindex, Extinktion, *etc.*). Während bei der DLS das Signal die Amplitude des (gestreuten) Lichtes ist und damit von der Phasenverteilung des elektrischen Feldes und der räumlichen Variation der *Permittivität* in der Probe abhängt, tritt bei der FCS als inhärent inkohärente Methode an dessen Stelle die Intensität des Strahlungsfeldes und damit, nach Abtrennung des eingestrahlt Lichtes, die detektierten Fluoreszenzphotonen mit all ihren messbaren Eigenschaften (Anzahl, Ankunftszeit, Energie, Polarisation, Impulsrichtung).

Im Gegensatz zur DLS wird bei der FCS meist ein möglichst kleines Beobachtungsvolumen in Form eines beugungsbegrenzten Laserfokus⁵¹ verwendet, um den Hintergrund verursacht durch fluoreszente Verunreinigungen oder RAMANstreuung an Lösungsmittelmolekülen zu reduzieren⁵¹. Der Grund für diesen praktizierten Unterschied zwischen den Techniken liegt abermals in der Kohärenz des Signals: Die Intensitätskorrelationsfunktionen (siehe Gl. 3.70) enthalten zwar jeweils denselben, auf die inkohärent überlagerten Teilchenzahlfuktuationen zurückführbaren und linear mit der Konzentration wachsenden Term (BERNE *et al.*, 1976), weisen jedoch für die kohärente Überlagerung der Bewegung streuender Teilchen im Wellenfeld des Lasers bei der DLS einen zweiten, quadratisch mit der Konzentration wachsenden Term auf, der normalerweise dominiert und allein für die Auswertung herangezogen wird. Durch die Normierung auf das Quadrat der mittleren Intensität verschwindet der erstgenannte Term für hohe Konzentrationen bzw. Fokusvolumina, sodass bei der FCS möglichst kleine Werte beider Variablen angestrebt werden⁵². Bei der DLS wiederum ist der zweite Term nach Normierung unabhängig von der Konzentration, sodass ein größeres Fokusvolumen die Amplitude der Korrelationsfunktion unverändert lässt, die proportional steigende Streuintensität aber leichter messbar ist⁵³.

Ziel der nachfolgenden Abschnitte wird es sein, die Erwartungswerte und Korrelationen der für die FCS relevanten Messgrößen als Funktion der interessierenden Systemparameter zu berechnen und so die in Teil II diskutierten Experimente theoretisch vorzubereiten.

Zahl von Molekülen zustande kommt.

⁵¹Dies ist so zu verstehen, dass eine bestimmte Anzahl Fluorophore im Fokus untersucht werden sollen und somit der Hintergrund mit dem Fokusvolumen skaliert, das eigentliche Signal jedoch konstant bleibt.

⁵²Theoretisch ist dies nicht notwendig, da das Rauschen der berechneten Korrelationsfunktionen in demselben Maße wie ihre Amplitude sinkt (KASK *et al.*, 1997). In der Praxis sinkt der Beitrag der zu untersuchenden Teilchen bei zunehmender Konzentration indessen unter jenen aus anderen Quellen, wie etwa Fluktuationen der Laserleistung oder dem Beitrag von Verunreinigungen und des Lösungsmittels.

⁵³Eine Synthese beider Prinzipien – Detektion von Streulicht aus einem kleinen Fokusvolumen – stellt die Resonanzstreuungskorrelationsspektroskopie (engl. *resonance light scattering correlation spectroscopy*, siehe ZHANG *et al.*, 2013) dar.

3.4.2.1. Fluoreszenzintensität

Eine bestimmte Intensität der emittierten Strahlung der Fluorophore (kurz Fluoreszenzintensität⁵⁴) verursacht einen Strom von „Photonen“, welcher wiederum in eine Abfolge von Zählereignissen im Detektor umgewandelt wird. Für die in der F(C)CS betrachteten Korrelationsfunktionen wirken sich deren stochastische Eigenschaften vornehmlich als Artefakte bei kleinen Korrelationszeiten aus, wo Schrotrauschen und Nachpulse sich als teils stark positive Korrelationen zeigen. Insbesondere der Nullwert ist durch die Varianz der POISSONverteilten Zählereignisse kontaminiert und nicht als Maß für die wahre Amplitude brauchbar⁵⁵. Die Betrachtungen in diesem Abschnitt beziehen sich deshalb auf die Korrelationen der Fluoreszenzintensität selbst, welche durch molekulare Vorgänge in der Probe verursacht werden, und machen zudem keinen Unterschied mehr zwischen der Fluoreszenzintensität vor dem optischen System und der tatsächlichen Zählrate des Detektors. Die Quantenausbeute der Detektion Φ_D wird in die molekulare Helligkeit Q aufgenommen und das Signal allgemein als F bezeichnet.

Die gesamte detektierte Helligkeit kann mit der molekularen Detektionsfunktion W aus Abschnitt 3.2.2.2 nun entweder als räumliches Integral (mit dem differentiellen Volumenelement $d^3\vec{r} = dx dy dz$) über die Teilchendichte C der fluoreszierenden Teilchen

$$F(t) = \int W(\vec{r}, t) Q C(\vec{r}, t) d^3\vec{r} \quad (3.66)$$

geschrieben werden (siehe etwa PETROV *et al.*, 2008), oder aber als Summe

$$F(t) = \sum_i Q W(\vec{r}_i, t) \quad (3.67)$$

über die diskreten Beiträge einzelner Teilchen⁵⁶ in der Probe. In dieser Arbeit wird der zweite Ansatz verfolgt, da er intuitiver den Beitrag einzelner Fluorophore herausstellt und die Verwendung von Wahrscheinlichkeitsverteilungen bezüglich ihrer Bewegung und Interaktion natürlicher handhabt. Der erste Ansatz benötigt dahingehend keine Grenzübergänge unendlicher Summen und erleichtert die Berücksichtigung räumlicher Korrelationen in nicht mehr unabhängig diffundierenden Teilchen (LANDAU *et al.*, 1980) sowie chemischer Reaktionen, welche Zahl und Identität der Teilchen als weitere Zufallsgröße einbringen.

⁵⁴In der überprüften Literatur wurde der Begriff entweder für eine dimensionslose Größe, eine Größe in willkürlichen Einheiten oder eine Leistung verwendet, jedoch nie als eine physikalische Intensität der Dimension W/m^2 . Die genaue Detektorfläche ist normalerweise nur von Belang, wenn eine Richtungsabhängigkeit ermittelt werden soll, und die üblichen Detektoren nehmen nur einen sehr kleinen Raumwinkel ein, sodass der Begriff „Fluoreszenzintensität“ durchaus für eine Leistung verwendet werden kann. Da diese Größe stets in Zusammenhang mit einer molekularen Helligkeit steht, müssen lediglich beide Größen dieselbe Einheit aufweisen. In Analogie mit der praktisch gemessenen Detektorzählrate wird darum hier die Dimension einer Frequenz gewählt.

⁵⁵Wenn in der Literatur von $G(0)$ die Rede ist, meint man damit in vielen Fällen bereits die Extrapolation der Funktion auf $\tau = 0$, zumal in der üblichen halblogarithmischen Darstellung der exakte Nullwerte ohnehin nicht abbildbar ist.

⁵⁶Die zweite Formel geht aus der ersten hervor, wenn man die Konzentration als Summe der Positionen der Teilchen in Form von DIRAC'schen Deltadistribution $C \mapsto \sum_i \delta(\vec{r} - \vec{r}_i)$ schreibt und die Integration ausführt.

Der Erwartungswert und die (Kreuz-)Korrelation des Signals können nun ausgehend von

$$\langle F(t) \rangle = \sum_i \langle Q(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_i, t) \rangle \quad (3.68)$$

$$= \sum_i \int \int \int Q(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_i, t) \cdot P(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) d^3 \vec{r}_i d^3 \vec{R}_i dZ_i \quad (3.69)$$

$$\begin{aligned} \langle F_a(t) \cdot F_b(t + \tau) \rangle &= \sum_{i,j} \int \int \int \int \int \int [Q_a(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) Q_b(\vec{r}_j, \vec{R}_j, Z_j, t + \tau) \\ &\cdot P(\{\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t\} \cap \{\vec{r}_j, \vec{R}_j, Z_j, t + \tau\}) \\ &\cdot W_a(\vec{r}_i, t) W_b(\vec{r}_j, t + \tau) d^3 \vec{r}_i d^3 \vec{r}_j d^3 \vec{R}_i d^3 \vec{R}_j dZ_i dZ_j]. \end{aligned} \quad (3.70)$$

definiert werden, wobei die Indizes a und b verschiedene Signalkanäle mit ihrer jeweils eigenen molekularen Helligkeit und MDF bezeichnen. Für $a = b$ handelt es sich um eine Autokorrelation, für $a \neq b$ um eine Kreuzkorrelation. In dieser Arbeit stellen die Kanäle verschiedene Farben, also unterschiedliche angeregte und detektierte Bereiche des Spektrums, dar (*2-Farben-FCCS*, engl. *dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy, dcFCCS*), es sind jedoch viele andere Möglichkeiten denkbar bzw. schon verwirklicht worden, z. B. räumlich gegeneinander verschobene MDFs (*2-Fokus-FCCS*, siehe [DERTINGER et al., 2007](#)) oder verschiedene detektierte Polarisations- und Ausbreitungsrichtungen des Lichtes.

Die gemeinsame Verteilung $P(\{\vec{r}_i, \vec{R}_i, t\} \cap \{\vec{r}_j, \vec{R}_j, t + \tau\})$ gibt die Wahrscheinlichkeitsdichte an, zur Zeit t das Teilchen i am Ort \vec{r}_i mit der Orientierung \vec{R}_i im (quantenmechanischen) Zustand Z_i und zusätzlich zur Zeit $t + \tau$ das Teilchen j am Ort \vec{r}_j mit der Orientierung \vec{R}_j im Zustand Z_j vorzufinden. Über die sich relativ zum elektrischen Feldvektor des Lasers und der Durchlassrichtung des Detektionspolfilters verändernde Richtung der Übergangsdipolmomente der Absorption und Emission trägt die molekulare Rotation zur zeitlich korrelierten Veränderung der Helligkeit des Fluorophors bei, was zur Bestimmung seines Rotationsdiffusionskoeffizienten und damit seiner Größe und Form genutzt werden kann ([LOMAN et al., 2010](#); [PETROV et al., 2012](#)).

Die molekulare Helligkeit wurde hier explizit als Funktion von Zeit und Ort formuliert, da photophysikalische Phänomene zu einer variablen Helligkeit führen können, die eine eigene Korrelation aufweist und über die räumlich ungleiche Laserintensität auch ortsabhängig ist. In den meisten Fällen ist Q proportional zum Produkt aus der Besetzung des angeregten S_1 -Zustandes (genauer der spezifischen Schwingungsniveaus, deren Fluoreszenz detektiert wird) und der Geschwindigkeitskonstanten k_F des strahlenden Übergangs in den Grundzustand⁵⁷. Da der Grad der Besetzung einerseits von der Intensität der Anregung abhängt, andererseits aber auch nach oben begrenzt ist, muss die Helligkeit ebenfalls immer ortsabhängig sein und für zunehmende Anregung dem Grenzwert der Sättigung zustreben. Die exakte funktionale Abhängigkeit von

⁵⁷Im Bild der diskreten Detektionsereignisse gibt Q die Wahrscheinlichkeit an, zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Photon zu detektieren und im Rahmen der Korrelationsfunktionen auch die bedingte Wahrscheinlichkeit, nach dem ersten Photon ein zweites nach einer bestimmten Zeitspanne zu detektieren.

der Intensität kann sehr kompliziert sein (siehe WIDENGRÉN *et al.*, 1995), im einfachsten Fall (zeitlich konstante Laserintensität; ISC deutlich langsamer als Fluoreszenz; Vernachlässigung von *antibunching*) ergibt sich aber (GREGOR *et al.*, 2005)

$$Q \propto \frac{I}{1 + I/I_{\text{Sätt}}} \quad (3.71)$$

$$I_{\text{Sätt}} = \frac{k_{\text{F}} + k_{\text{D}}}{1 + k_{\text{ISC}}/k_{\text{Phos}}}. \quad (3.72)$$

Existieren mehrere Spezies unterschiedlicher Helligkeit in der Probe, ergibt sich $F(t)$ als Summe über die einzelnen Intensitäten gemäß

$$F(t) = \sum_j F_j(t) = \sum_{i,j} Q_j \left(\vec{r}_{i,j}, \vec{R}_{i,j}, Z_{i,j}, t \right) W \left(\vec{r}_{i,j}, t \right). \quad (3.73)$$

3.4.2.2. Fluoreszenzkorrelation

Als eigentliche Grundgleichung der F(C)CS dient nun die normierte Korrelationsfunktion

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{\langle F_a(t) \cdot F_b(t+\tau) \rangle}{\langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle} - 1 = \frac{\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t+\tau) \rangle}{\langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle} = \frac{\text{Cov}(F_{a,t}, F_{b,t+\tau})}{\text{E}(F_{a,t}) \text{E}(F_{b,t+\tau})} \quad (3.74)$$

mit $\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle$ als der Abweichung der Fluoreszenzintensität vom Erwartungswert. Diese Formel ähnelt stark Gl. 3.53, mit dem Unterschied, dass für die Standardabweichung hier der Erwartungswert eingesetzt wird. Prinzipiell werden nur positive Korrelationszeiten τ betrachtet, wobei immer $G_{a,b}(-\tau) = G_{b,a}(\tau)$ gilt und Unterschiede zwischen $G_{a,b}(\tau)$ und $G_{b,a}(\tau)$ für die Kreuzkorrelation eines nicht-stationären Prozesses zu erwarten sind.

Prinzipiell hängt das detektierte Strahlungsfeld vom genauen Zustand und der Bewegung aller Moleküle in der Probe ab und müsste zudem quantenelektrodynamisch berechnet werden. Da dieses Problem praktisch nicht lösbar ist, müssen zahlreiche Annahmen und Vereinfachungen getroffen werden, die, soweit nicht anders vermerkt, im Folgenden stets gelten sollen:

- die MDF ist zeitunabhängig ($W(\vec{r}_i, t) \mapsto W(\vec{r}_i)$)
- die Polarisation ist uniform (bei Objektiven mit niedriger numerischer Apertur eher gültig)
- das System lässt sich als ein schwach stationärer Prozess beschreiben ($\langle F_a(t) \cdot F_b(t+\tau) \rangle \mapsto \langle F_a(0) \cdot F_b(\tau) \rangle$)
- Stationarität und Isotropie der Probe ($P(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) \mapsto \frac{1}{4\pi} P(\vec{r}_i, Z_i)$ mit der Normierung $\int d^3 \vec{R}_i = 4\pi$)
- Homogenität der Teilchendichte ($P(\vec{r}_i) = \frac{1}{V}$ ist konstante Aufenthaltswahrscheinlichkeit der Teilchen im Probenvolumen V)
- einzelne Fluorophore emittieren unabhängig voneinander (keine Kohärenz der Fluoreszenzstrahlung, keine Energieübertragung untereinander wie bei FRET oder Fluoreszenzlöschung)

- die Teilchen diffundieren und rotieren unabhängig voneinander
 $(P(\{\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t\} \cap \{\vec{r}_j, \vec{R}_j, Z_j, t + \tau\}) = P(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) \cdot P(\vec{r}_j, \vec{R}_j, Z_j, t + \tau)$ für $i \neq j$)
- Rotation und Diffusion hängen nicht voneinander ab (Ausschluss *roto-translatorischer Kopplung*, siehe etwa FREZZATO *et al.*, 2005) und werden auch nicht vom Zustand des Teilchen beeinflusst (keine dynamische Veränderung seiner Form, $P(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) = P(\vec{r}_i, t) \cdot P(\vec{R}_i, t) \cdot P(Z_i, t)$)
- die (Rotations-)Diffusionskoeffizienten hängen nicht von Position und Zeit ab (Ausschluss *thermophoretischer Effekte, etc.*)
- photophysikalische Effekte hängen nicht von der räumlichen Position ab
 $(Q(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) \mapsto Q(\vec{R}_i, Z_i, t))$
- das Lösungsmittel trägt nur als Hintergrundrauschen zur Fluoreszenz bei und stellt ansonsten den Brechungsindex der Probe.

Damit vereinfacht sich Gl. 3.69 nun zu

$$\langle F(t) \rangle = \sum_i \int \int \int Q(\vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_i) \frac{1}{4\pi V} d^3 \vec{r}_i d^3 \vec{R}_i dZ_i \quad (3.75)$$

$$= \frac{\bar{Q}}{V} \sum_i \int W(\vec{r}_i) d^3 \vec{r}_i = \frac{\bar{Q}}{V} \sum_i \Omega_1 = \frac{N}{V} \bar{Q} \Omega_1 \quad (3.76)$$

$$\lim_{V \rightarrow \infty} \langle F(t) \rangle = C \bar{Q} \Omega_1 = c N_A \bar{Q} \Omega_1. \quad (3.77)$$

Hierbei wurden zunächst die über die Orientierungen und mögliche photophysikalische Prozesse gemittelte Helligkeit (in Teil II der Einfachheit halber nur als Q bezeichnet)

$$\bar{Q} = \int \int Q(\vec{R}, Z, t) \frac{1}{4\pi} d^3 \vec{R} dZ \quad (3.78)$$

und die Raumintegrale der MDF (der Kanalindex in $\Omega_{a,n}$ kann gegebenenfalls entfallen)

$$\Omega_{a,n} = \int_V [W_a(\vec{r})]^n d^3 \vec{r} \quad (3.79)$$

$$\Omega_{n,a;m,b} = \int_V [W_a(\vec{r})]^n [W_b(\vec{r})]^m d^3 \vec{r} \quad (3.80)$$

definiert. Der Beitrag aller (identischen) Teichen ist gleich damit proportional zur Zahl N der Teilchen im Volumen V und nach Grenzübergang zu einer – für praktische Zwecke – unendlich großen Probe proportional zur Teilchendichte C bzw. Stoffmengenkonzentration c (mit der AVOGADRO-Konstanten N_A). Bei Vorliegen mehrerer Spezies ergibt sich daraus schließlich⁵⁸

$$\langle F(t) \rangle = N_A \Omega_1 \sum_j c_j \bar{Q}_j. \quad (3.81)$$

⁵⁸Für Fluorophore stark unterschiedlicher spektraler Charakteristika kann gegebenenfalls die MDF und damit Ω_1 untereinander abweichen und muss in die Summe mit aufgenommen werden.

Zur Auswertung von Gl. 3.70 wird die Doppelsumme über die Teilchen gleicher Spezies in Korrelationen zwischen identischen und verschiedenen Teilchen unterteilt und für erstere die bedingte Wahrscheinlichkeit $P(B|A) = \frac{P(A \cap B)}{P(A)}$ eingeführt. Zur besseren Unterscheidbarkeit der verschiedenen Positionen desselben Teilchen wird die Zeitabhängigkeit von Position, Orientierung und Zustand dort in der Form $x = x(0)$ und $x' = x(\tau)$ angegeben:

$$\begin{aligned} \langle F_a(0) \cdot F_b(\tau) \rangle &= \sum_i \langle Q_a(\vec{R}_i, Z_i, 0) Q_b(\vec{R}'_i, Z'_i, \tau) W_a(\vec{r}'_i) W_b(\vec{r}'_i) \rangle \\ &+ \sum_{i \neq j} \langle Q_a(\vec{R}_i, Z_i, 0) Q_b(\vec{R}_j, Z_j, \tau) W_a(\vec{r}'_i) W_b(\vec{r}'_j) \rangle \end{aligned} \quad (3.82)$$

$$\begin{aligned} &= \sum_i \langle Q_a(\vec{R}_i, Z_i, 0) Q_b(\vec{R}'_i, Z'_i, \tau) \rangle \cdot \langle W_a(\vec{r}'_i) W_b(\vec{r}'_i) \rangle \\ &+ \sum_{i \neq j} \langle Q_a(\vec{R}_i, Z_i, 0) W_a(\vec{r}'_i) \rangle \cdot \langle Q_b(\vec{R}_j, Z_j, \tau) W_b(\vec{r}'_j) \rangle \end{aligned} \quad (3.83)$$

$$\begin{aligned} &= N \left[\int \int \int \int Q_a(\vec{R}, Z, 0) Q_b(\vec{R}', Z', \tau) P(\vec{R}, Z, 0) \right. \\ &\quad \left. \cdot P(\{\vec{R}', Z', \tau\} | \{\vec{R}, Z, 0\}) d^3 \vec{R} d^3 \vec{R}' dZ dZ' \right] \\ &\quad \cdot \int \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}') \frac{1}{V} P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) d^3 \vec{r} d^3 \vec{r}' \\ &\quad + \frac{N(N-1)}{V^2} \overline{Q_a} \overline{Q_b} \Omega_{1,a} \Omega_{1,b} \end{aligned} \quad (3.84)$$

$$= \overline{Q_a} \overline{Q_b} \left(\Omega_{1,a;1,b} \frac{N}{V} \Theta(\tau) \Xi(\tau) + \Omega_{1,a} \Omega_{1,b} \frac{N(N-1)}{V^2} \right). \quad (3.85)$$

Die Funktionen $\Theta(\tau)$ und $\Xi(\tau)$ beschreiben hier die dimensionslosen normierten Korrelationen der molekularen Helligkeit selbst bzw. der scheinbaren Helligkeitsänderungen durch Diffusion durch den Fokus:

$$\begin{aligned} \Theta(\tau) &= \frac{1}{\overline{Q_a} \overline{Q_b}} \int \int \int \int Q_a(\vec{R}, Z, 0) Q_b(\vec{R}', Z', \tau) P(\vec{R}, Z, 0) \\ &\quad \cdot P(\{\vec{R}', Z', \tau\} | \{\vec{R}, Z, 0\}) d^3 \vec{R} d^3 \vec{R}' dZ dZ' \end{aligned} \quad (3.86)$$

$$\Xi(\tau) = \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}') P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) d^3 \vec{r} d^3 \vec{r}'. \quad (3.87)$$

Da für unendliche Korrelationszeiten von einer vollständigen Entkoppelung aller Fluktuationen ausgegangen werden kann, nimmt die bedingte Wahrscheinlichkeit wieder den Gleichgewichtswert $P(\vec{r}', \vec{R}, Z, 0) = \frac{1}{4\pi V}$ an und es gilt

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \Theta(\tau) = 1 \quad (3.88)$$

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \Xi(\tau) \propto \frac{1}{V}, \quad (3.89)$$

wobei eine praktisch unendlich ausgedehnten Probe damit zu $\lim_{V \rightarrow \infty} \Xi(\tau) = 0$ und

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle F_a(0) \cdot F_b(\tau) \rangle = C^2 \overline{Q_a} \overline{Q_b} \Omega_{1,a} \Omega_{1,b}. \quad (3.90)$$

führt. Die Vernachlässigung des einen, mit sich selbst korrelierten Teilchens in der zweiten Summe ($N(N-1) \approx N^2$) macht sich erst in extrem kleinen Kompartimenten bemerkbar, etwa bei Messung im Plasma weniger Mikrometer großer Zellen oder dem Inneren eines Vesikels⁵⁹.

Nach Einsetzen der gerade erhaltenen Ergebnisse in Gl. 3.74 ergibt sich schließlich

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{\bar{Q}_a \bar{Q}_b \left(\Omega_{1,a;1,b} \frac{N}{V} \Theta(\tau) \Xi(\tau) + \Omega_{1,a} \Omega_{1,b} \frac{N(N-1)}{V^2} \right)}{\left(\frac{N}{V} \bar{Q}_a \Omega_{1,a} \right) \left(\frac{N}{V} \bar{Q}_b \Omega_{1,b} \right)} - 1 \quad (3.91)$$

$$\approx \frac{\bar{Q}_a \bar{Q}_b \left(\Omega_{1,a;1,b} C \Theta(\tau) \Xi(\tau) + \Omega_{1,a} \Omega_{1,b} C^2 \right)}{\left(C \bar{Q}_a \Omega_{1,a} \right) \left(C \bar{Q}_b \Omega_{1,b} \right)} - 1 \quad (3.92)$$

$$= \frac{1}{C} \frac{\Omega_{1,a;1,b}}{\Omega_{1,a} \Omega_{1,b}} \Theta(\tau) \Xi(\tau). \quad (3.93)$$

Hier zeigt sich endlich die in Abschnitt 3.3.1 vorweggenommene und dort auf unabhängigem Weg erhaltene Proportionalität zwischen Varianz und Erwartungswert der POISSONverteilten Teilchenzahl in einem bestimmten Volumen: Der Zähler der Korrelationsfunktionen skaliert linear mit der Konzentration, aber quadratisch mit der molekularen Helligkeit, sodass durch die Normierung auf die quadrierte mittlere Fluoreszenzintensität letztere nicht mehr in die Gleichung eingeht, die Funktion als Ganzes aber umgekehrt proportional mit der Konzentration ansteigt.

Aus praktischen Gründen wird der Term $\frac{\Omega_{1,a;1,b}}{\Omega_{1,a} \Omega_{1,b}}$ mit der Teilchendichte zusammengeführt und das sogenannte *effektive Fokusvolumen* V_{eff} als Verhältnis von Raumintegralen über die MDF definiert:

$$V_{\text{eff}} = \frac{\Omega_{1,a} \Omega_{1,b}}{\Omega_{1,a;1,b}} \quad (3.94)$$

$$V_{\text{eff},(a,b)} = \frac{\Omega_{1,(a,b)}^2}{\Omega_{2,(a,b)}}. \quad (3.95)$$

Hier steht $V_{\text{eff},(a,b)}$ für das Fokusvolumen bei Autokorrelation einer der beiden Kanäle, während das Fokusvolumen bei Kreuzkorrelation der Kanäle miteinander ($a \neq b$) als $V_{\text{eff},x}$ bezeichnet wird. Durch Einführung der *effektiven Teilchenzahl*

$$N_{\text{eff}} = C V_{\text{eff}} \quad (3.96)$$

ergibt sich die allgemeine Form der F(C)CS-Korrelationsfunktion zu

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{N_{\text{eff}}} \Theta(\tau) \Xi(\tau). \quad (3.97)$$

Der Nullwert der Positionskorrelationsfunktion $\Xi(0)$, und damit bei konstanter oder auf deutlich

⁵⁹Genauer gesagt muss die näherungsweise ausgewertete Gl. 3.74 um einen additiven Term von $-\frac{1}{CV}$ ergänzt werden. Da bei Betrachtung nur einer Spezies $G_{a,b}(\tau) \propto \frac{1}{CV_{\text{eff}}}$ gilt, wird dieser Term erst relevant, wenn V in die Größenordnung von V_{eff} (siehe 3.94) absinkt.

kürzeren Zeitskalen korrelierter Helligkeit ($\lim_{\tau \rightarrow 0} \Theta(\tau) \approx 1$) auch die F(C)CS-Amplitude⁶⁰

$$\mathfrak{A} = \lim_{\tau \rightarrow 0} G_{a,b}(\tau) = \frac{1}{N_{\text{eff}}}, \quad (3.98)$$

kann bereits ohne Kenntnis der Diffusionseigenschaften der Teilchen angegeben werden, da für verschwindende Korrelationszeiten keine Bewegung möglich ist und somit

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) = \delta(\vec{r}' - \vec{r}) \quad (3.99)$$

gilt. Das doppelte reduziert sich dadurch auf ein einfaches Raumintegral in Gl. 3.87 und man sieht die Herkunft des obigen Normierungsfaktors:

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \Xi(\tau) = \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}') \delta(\vec{r}' - \vec{r}) d^3\vec{r} d^3\vec{r}' \quad (3.100)$$

$$= \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}) d^3\vec{r} = 1 \quad (3.101)$$

Anhand der effektiven Teilchenzahl der Autokorrelation und der mittleren Fluoreszenzintensität kann als praktisch leicht messbare Näherung an die molekulare Helligkeit (bei Vorliegen einer einzelnen Spezies) der Wert

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{N_{\text{eff}}} = \frac{\bar{Q}}{\Omega_1} \quad (3.102)$$

als die *molekulare Zählrate* (engl. *counts per molecule, CPM*) eingeführt werden.

Liegen mehrere Spezies Fluorophore vor, die in Abwesenheit (oder auf der Zeitskala der Diffusion sehr langsamer) chemischer Reaktionen ebenso voneinander unabhängig agieren wie einzelne Teilchen einer einzigen Spezies und für deren Beitrag zur Fluoreszenzintensität $F_{(a,b),i}$ infolgedessen

$$\langle \delta F_{a,i}(t) \cdot \delta F_{b,j}(t + \tau) \rangle = \delta_{ij} \langle \delta F_{a,i}(t) \cdot \delta F_{b,i}(t + \tau) \rangle \quad (3.103)$$

gilt, so ergibt sich aus der *Bilinearität* der Kovarianz die Additivität der Beiträge der einzelnen Spezies zum Zähler – und damit der Zeitabhängigkeit – von Gl. 3.74 als

$$\langle F_{(a,b)}(t) \rangle = \sum_i \langle F_{(a,b),i}(t) \rangle \quad (3.104)$$

$$\delta F_{(a,b)}(t) = \sum_i \delta F_{(a,b),i}(t) \quad (3.105)$$

$$\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle = \sum_{i,j} \langle \delta F_{a,i}(t) \cdot \delta F_{b,j}(t + \tau) \rangle = \sum_i \langle \delta F_{a,i}(t) \cdot \delta F_{b,i}(t + \tau) \rangle \quad (3.106)$$

und die Normierung auf die Erwartungswerte führt zu einem nichtlinear abhängigen Vorfaktor

⁶⁰Der Grenzübergang wurde wiederum eingeführt, um Detektorartefakte und Schrotrauschen nicht mit einzubeziehen.

(Teilamplituden \mathfrak{A}_i mit dem Amplitudenanteil φ_i):

$$G_{a,b}(\tau) = \frac{\sum_i \langle \delta F_{a,i}(t) \cdot \delta F_{b,i}(t+\tau) \rangle}{\sum_i \langle F_{a,i}(t) \rangle \cdot \sum_j \langle F_{b,j}(t) \rangle} = \mathfrak{A} \sum_i \varphi_i \Theta_i(\tau) \Xi_i(\tau) \quad (3.107)$$

$$\mathfrak{A} = \sum_i \mathfrak{A}_i = \sum_i \frac{1}{V_{\text{eff}}} \frac{C_i \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i}}{\sum_j C_j \bar{Q}_{a,j} \cdot \sum_k C_k \bar{Q}_{b,k}} \quad (3.108)$$

$$\varphi_i = \frac{\mathfrak{A}_i}{\mathfrak{A}} = \frac{C_i \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i}}{\sum_j C_j \bar{Q}_{a,j} \bar{Q}_{b,j}}. \quad (3.109)$$

Man erkennt, dass der Amplitudenanteil quadratisch von der Helligkeit, aber linear von der Konzentration einer Spezies abhängt, sodass beispielsweise bei gleichem Farbstoffanteil in der Membran Vesikel mit dem doppelten Radius und damit der vierfachen Oberfläche bereits den 16-fachen Anteil an der Amplitude haben!⁶¹

Für die Auswertungen der Experimente in Teil II bildet Gl. 3.108 die Grundlage, muss zur verlässlichen Bestimmung aber durch Anpassung von Gl. 3.107 an die gemessenen Korrelationsfunktionen gewonnen werden, was eine genauere Beschäftigung mit $\Theta(\tau)$ und $\Xi(\tau)$ nötig macht. Davor soll noch versucht werden, ein anschauliches Beispiel für den Zusammenhang zwischen Teilchenanzahl, Teilchenbewegung, Helligkeit und der Korrelationsfunktion zu geben (siehe Abb. 3.12).

3.4.3. Die Helligkeitskorrelationsfunktion $\Theta(\tau)$

Die hauptsächlichen Beiträge zu einer zeitlich variierenden Helligkeit der Fluorophore liefern ihre Rotation, die Interaktion mit weiteren Teilchen (z. B. FRET, Fluoreszenzlöschung), chemische und photochemische Reaktionen (z. B. *cis-trans*-Isomerisierungen, Photobleichung) sowie photophysikalische Prozesse im (z. B. ISC, *antibunching*). All diese Phänomene können ebenfalls genutzt werden, um Informationen über molekulare Parameter und Wechselwirkungen der Teilchen miteinander zu gewinnen (Form und Größe aus der Rotation, Abstände aus FRET, Bindungsenergien aus Isomerisierungsgeschwindigkeiten, Oligomerisierung aus *antibunching*).

Wenn, wie oben angegeben, die Wahrscheinlichkeitsdichte komplett faktorisiert werden kann und zudem die molekulare Helligkeit multiplikativ von Ausrichtung und Zustand abhängen, so kann auch $\Theta(\tau)$ in ein Produkt aus Rotations- und Zustandskorrelationsfunktionen zerlegt werden, wobei für diese Arbeit insbesondere jene Prozesse relevant sind, die sich als Übergänge zwischen Zuständen verschiedener Helligkeit eines einzelnen Fluorophors in Form von unimolekularen Reaktionen erster Ordnung schreiben lassen (ISC, Photobleichung, *antibunching*). Gehören zu dem beschriebenen Teilchen mehrere Fluorophore (Anzahl n_F), existieren Zustände mit mehreren

⁶¹Interessanterweise gilt bei Hohlkugeln derselbe Zusammenhang auch für die Streustärke in der DLS, wo es bei gleicher *molarer Polarisierbarkeit* die Anzahl der Moleküle pro Teilchen ist, die quadratisch in die Amplituden eingeht. Für eine konstante dünne Hülle aus z.B. Lipidmolekülen skaliert diese Anzahl quadratisch mit dem Radius. Dasselbe Resultat erhält man aus den Gleichungen für Hohlkugeln aus kontinuierlicher Materie (KERKER *et al.*, 1962) durch Grenzübergang zu einer Dicke von null.

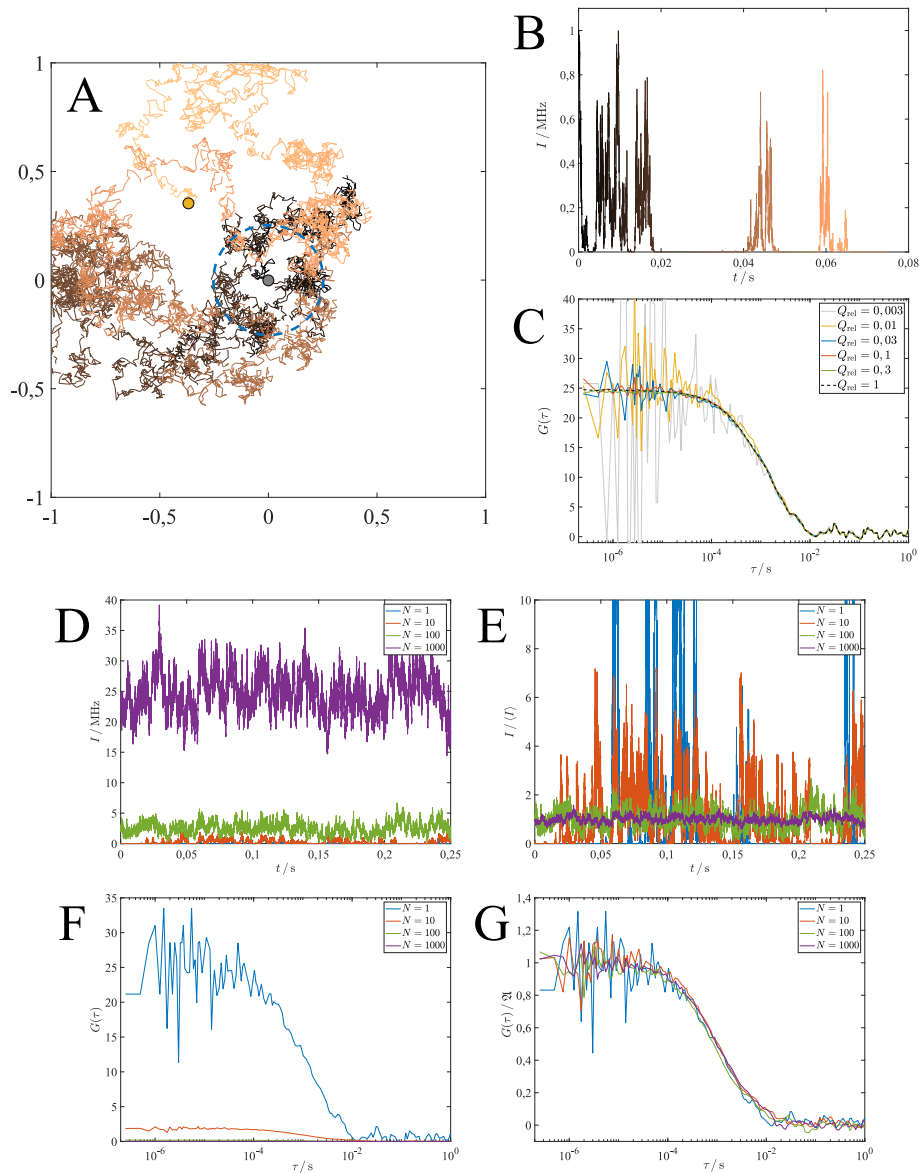


Abbildung 3.12.

Veranschaulichung der Zusammenhänge zwischen der Korrelationsfunktion und den zugrundeliegenden mikroskopischen Vorgängen anhand einer Simulation von zweidimensional diffundierenden Partikeln in einem Kasten (Seitenlänge $2\ \mu\text{m}$). Ein Simulationsschritt dauert $10\ \mu\text{s}$ und wird durch Veränderung der Teilchenpositionen um einer zweidimensionalen, unkorrelierten Normalverteilung folgenden Inkremente realisiert (Diffusionskoeffizient $D = 16\ \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

A: Darstellung der Trajektorie eines einzelnen diffundierenden Teilchens durch einen Fokus (gestrichelter blauer Kreis). Dieser wird hier als 2DG-Modell (siehe Abschnitt 3.4.4) angenommen, wobei der abgebildete Radius $\omega_{xy} \approx 250\ \text{nm}$ entspricht. Der Startpunkt wird durch den grauen Kreis dargestellt, der Endpunkt durch einen orangenen Kreis. Die Farbe des Pfades korrespondiert mit der jeweiligen Zeit.

B: Die detektierte Intensität des Teilchens auf seiner Trajektorie ist nur bei starker Annäherung an das Fokuszentrums deutlich von null verschieden. Das Maximum liegt hier bei einem Wert der (virtuellen) Zählrate von $1\ \text{MHz}$.

C: Die Autokorrelationsfunktion desselben Teilchens wird aus der gesamten simulierten Messzeit von $10\ \text{s}$ berechnet. Der Effekt des Schrotrauschens wird durch verschiedene relative Helligkeiten dargestellt ($Q_{\text{rel}} = 1$ entspricht Teil B), wobei diese jeweils mit der detektierten Intensität multipliziert und mit diesem Wert als Erwartungswert eine POISSONverteilte Zufallszahl ermittelt wird.

D-G: Simulationen mit mehr gleichzeitig diffundierenden Teilchen (insgesamt N im Kasten) zeigen den Effekt der Überlagerung vieler einzelner Fluoreszenzsignale auf die Korrelationsfunktion: Die mittlere Helligkeit steigt proportional zur simulierten Teilchenzahl (D), aber die relative Streuung sinkt dabei stark (E). Dadurch sinkt ebenfalls die Amplitude von $G(\tau)$, die nach Gl. 3.98 umgekehrt proportional zur Teilchenzahl ist (F). Die normierte Korrelationsfunktion wiederum zeigt das mit steigender Teilchenanzahl sinkende Rauschen der Kurve (G). Hierbei tritt jedoch ein Sättigungseffekt bei $N_{\text{eff}} \sim 1$ auf (KASK *et al.*, 1997).

angeregten Fluorophoren zugleich, die die Korrelation erhöhen. Sind diese, abgesehen von ihrer gemeinsamen Diffusion, unabhängig voneinander, kann analog zu Gl. 3.103 die Summe ihrer Beiträge betrachtet werden:

$$Q_{(a,b)}(t) = \sum_{i=1}^{n_F} Q_{(a,b),i}(t) \quad (3.110)$$

$$\langle Q_a(t) \cdot Q_b(t + \tau) \rangle = \sum_{i,j}^{n_F} \langle Q_{a,i}(t) \cdot Q_{b,j}(t + \tau) \rangle \quad (3.111)$$

$$\begin{aligned} &= \sum_{i=1}^{n_F} \langle Q_{a,i}(t) \cdot Q_{b,i}(t + \tau) \rangle \\ &\quad + \sum_{i \neq j}^{n_F} \langle Q_{a,i}(t) \rangle \cdot \langle Q_{b,j}(t + \tau) \rangle \end{aligned} \quad (3.112)$$

$$= \sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} \Theta_i(\tau) + \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j} \quad (3.113)$$

$$\left(\sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \right) \left(\sum_{j=1}^{n_F} \bar{Q}_{b,j} \right) = \sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} + \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j}. \quad (3.114)$$

Damit ergibt sich für die gesamte Korrelationsfunktion

$$\Theta(\tau) = \frac{\sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} \Theta_i(\tau) + \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j}}{\sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} + \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j}} \quad (3.115)$$

$$\Theta(\tau) - 1 = \sum_{i=1}^{n_F} \frac{\bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i}}{\sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} + \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j}} [\Theta_i(\tau) - 1], \quad (3.116)$$

was für identische Fluorophore zu

$$\Theta_{n_F}(\tau) = \frac{n_F \bar{Q}_a \bar{Q}_b \Theta_1(\tau) + n_F (n_F - 1) \bar{Q}_a \bar{Q}_b}{n_F \bar{Q}_a \bar{Q}_b + n_F (n_F - 1) \bar{Q}_a \bar{Q}_b} = \frac{\Theta_1(\tau) - 1}{n_F} + 1 \quad (3.117)$$

vereinfacht werden kann.

Photophysikalische Prozesse hängen meist von der Intensität der anregenden Strahlung und damit indirekt auch von der Position in Relation zum Fokus, ab, wodurch nicht mehr alle der oben getroffenen Annahmen erfüllt und Diffusion und Helligkeit nicht mehr entkoppelt sind. Eine Vereinfachung ist möglich für den Fall langsamer Diffusion, bei dem sich überall ein lokales photophysikalisches Gleichgewicht einstellt und Q zwar von \vec{r} abhängt, aber zumindest $\langle Q_{(a,b)}(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) W_a(\vec{r}_i) \rangle = \langle Q_{(a,b)}(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) \rangle \cdot \langle W_a(\vec{r}_i) \rangle$ gilt. Wurde nun $\Theta(\tau, \vec{r})$ als Funktion von $I(\vec{r})$ berechnet, kann für kurze Korrelationszeiten mit $\Xi(\tau) \approx 1$ wieder $P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) = \delta(\vec{r}' - \vec{r})$ gesetzt werden und Gl. 3.86 wird, ausgehend von Gl. 3.84 und unter Beachtung von Gl. 3.116, um eine mit dem Produkt der MDFs gewichtete Mittelung

über den Raum ergänzt⁶²:

$$\bar{\Theta}(\tau) = \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \frac{\bar{Q}_a(\vec{r}') \bar{Q}_b(\vec{r}')}{\bar{Q}_a \bar{Q}_b} \Theta(\tau, \vec{r}') W_a(\vec{r}') W_b(\vec{r}') d^3 \vec{r}' \quad (3.118)$$

$$\bar{Q}_{(a,b)} = \int \bar{Q}_{(a,b)}(\vec{r}') W_{(a,b)}(\vec{r}') d^3 \vec{r}'. \quad (3.119)$$

Nach dieser Vorbetrachtung soll schließlich der praktisch relevante Fall des Dreiniveausystems (S_0 , S_1 und T_1) berechnet werden (BERNARD *et al.*, 1993). Aufgrund der angenommenen Reaktionen erster Ordnung, welche deren Besetzung untereinander verbinden, kann das entsprechende System linearer Differentialgleichungen mit konstanten Koeffizienten für den Vektor $\vec{\pi}$ der Besetzung der einzelnen Niveaus als Matrixgleichung formuliert werden:

$$\frac{d\vec{\pi}(t)}{dt} = \mathbf{Q} \vec{\pi}(t). \quad (3.120)$$

Damit ergibt sich für \mathbf{Q} eine 3x3-Matrix mit insgesamt 4 Koeffizienten (kein ISC in höhergelegene Niveaus), die mit den entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten (k_A : Anregung, k_F : Fluoreszenz, k_{ISC} : Interkombination, k_{Ph} : Phosphoreszenz) der deterministischen Differentialgleichungen der Konzentrationen identifiziert werden können^{63,64}:

$$\mathbf{Q} = \begin{pmatrix} -k_A & k_F & k_{Ph} \\ k_A & -k_F - k_{ISC} & 0 \\ 0 & k_{ISC} & -k_{Ph} \end{pmatrix}. \quad (3.121)$$

Aus der Besetzungswahrscheinlichkeit der Niveaus erhält man $\Theta(\tau)$ nach Gl. 3.86 zu

$$\Theta(\tau) = \frac{1}{\bar{Q}_a \bar{Q}_b} \sum_{i,j}^3 Q_a(Z = z_j, 0) Q_b(Z' = z_i, \tau) \pi_{GGW,j} \pi_i(\tau) \quad (3.122)$$

$$= \frac{1}{\bar{Q}_a \bar{Q}_b} \vec{Q}_b^T e^{\tau \mathbf{Q}} \left(\vec{\pi}_{GGW} \circ \vec{Q}_a \right), \quad (3.123)$$

wobei $Q_{(a,b)}$ die Helligkeit der einzelnen Zustände und $\pi_{GGW,j} = P(Z = z_j, 0)$ deren Besetzung im Gleichgewicht darstellt.

Der Helligkeitsvektor enthält nur den Eintrag $Q_{(a,b),S_1}$ ungleich null, da die Phosphoreszenz aus T_1 meist vernachlässigbar ist (geringe Quantenausbeute, spektrale Verschiebung, lange Lebensdauer). Die Lösung des Matrixexponentials

$$\vec{\pi}(t + \tau) = e^{\tau \mathbf{Q}} \vec{\pi}(t) \quad (3.124)$$

⁶²Da die MDF als Faktor bereits $I(\vec{r})$ enthält, muss hier entweder anstatt $W(\vec{r})$ nur die CEF (siehe Abschnitt 3.2.2.2) verwendet werden oder alternativ $\Theta(\tau, \vec{r})$ wieder auf die lokale Intensität normiert werden.

⁶³Dies gilt streng nur für unimolekulare Reaktionen, bei denen die Erwartungswerte der Teilchenzahlen derselben Gleichung wie die Konzentrationen folgen (LECCA *et al.*, 2013).

⁶⁴Der Einfachheit halber wird hier die strahlungslose Deaktivierung (k_D) mit in k_F aufgenommen. Die reduzierte Helligkeit wird durch Multiplikation von $Q_{(a,b),S_1}$ mit der Quantenausbeute Φ_F berücksichtigt.

führt schließlich auf

$$\Theta(\tau) = \sum_{i=1}^3 c_i e^{\tau \lambda_i} \quad (3.125)$$

mit den Konstanten

$$\vec{\pi}_{\text{GGW}} = \begin{pmatrix} \bar{x}_{S_0} \\ \bar{x}_{S_1} \\ \bar{x}_{T_1} \end{pmatrix} \propto \begin{pmatrix} k_{\text{Ph}}(k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}}) \\ k_{\text{A}}k_{\text{Ph}} \\ k_{\text{A}}k_{\text{ISC}} \end{pmatrix} \quad (3.126)$$

$$\vec{\lambda} = \begin{pmatrix} 0 \\ -\frac{1}{2}(k_{\text{A}} + k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{Ph}} + h_1) \\ -\frac{1}{2}(k_{\text{A}} + k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{Ph}} - h_1) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ -1/\tau_{\text{Anti}} \\ -1/\tau_{\text{Trip}} \end{pmatrix} \quad (3.127)$$

$$\vec{c} = \begin{pmatrix} 1 \\ -\frac{k_{\text{A}}(h_2 + k_{\text{A}}k_{\text{ISC}} - k_{\text{Ph}}(k_{\text{Ph}} - h_3))}{2h_2h_3} \\ \frac{k_{\text{A}}(h_2 + k_{\text{A}}k_{\text{ISC}} - k_{\text{Ph}}(k_{\text{Ph}} + h_3))}{2h_2h_3} \end{pmatrix}. \quad (3.128)$$

Hierbei stehen $\bar{x}_{(S_0, S_1, T_1)}$ für die in der Summe auf eins normierten Besetzungsgrade der einzelnen Niveaus im Gleichgewicht, τ_{Anti} für die Korrelationszeit des *antibunching*, τ_{Trip} für jene des Triplettübergangs und $h_{(1,2,3)}$ für die Hilfsgrößen

$$h_1 = \sqrt{k_{\text{A}}^2 + 2k_{\text{A}}(k_{\text{F}} - k_{\text{ISC}} - k_{\text{Ph}}) + (k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}} - k_{\text{Ph}})^2} \quad (3.129)$$

$$h_2 = k_{\text{A}}(k_{\text{ISC}} + k_{\text{Ph}}) + k_{\text{Ph}}(k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}}) \quad (3.130)$$

$$h_3 = \sqrt{(k_{\text{A}} + k_{\text{F}} + k_{\text{ISC}} + k_{\text{Ph}})^2 - 4h_2}. \quad (3.131)$$

Für den üblichen Fall $k_{\text{F}} \gg k_{\text{ISC}}, k_{\text{Ph}}$ lassen sich die Formeln stark vereinfachen ([WIDENGREN et al., 1995](#)) und man erhält für die Zeitkonstanten und Vorfaktoren der beiden Exponentialfunktionen

$$1/\tau_{\text{Anti}} = k_{\text{A}} + k_{\text{F}} \quad (3.132)$$

$$1/\tau_{\text{Trip}} = k_{\text{Ph}} + \frac{k_{\text{A}}k_{\text{ISC}}}{k_{\text{A}} + k_{\text{F}}} \quad (3.133)$$

$$c_{\text{Anti}} = \frac{1}{1 - \bar{x}_{T_1}} \quad (3.134)$$

$$c_{\text{Trip}} = \frac{\bar{x}_{T_1}}{1 - \bar{x}_{T_1}} \quad (3.135)$$

und unter Ausnutzung von Gl. 3.117 endlich

$$\Theta_{n_{\text{F}}}(\tau) = 1 + \frac{\bar{x}_{T_1} e^{-\tau/\tau_{\text{Trip}}} - e^{-\tau/\tau_{\text{Anti}}}}{n_{\text{F}}(1 - \bar{x}_{T_1})}. \quad (3.136)$$

Zuletzt können noch, wie oben beschrieben, die unterschiedlichen Anregungsgeschwindigkeiten im Fokus durch Integration über den Raum unter Verwendung von $k_{\text{A}} = \sigma_{\text{A}} I(\vec{r})$ berücksichtigt

Diffusionsart	FICK'sch	nicht FICK'sch
GAUSS'sch	$\langle \Delta \vec{r}(t) ^2 \rangle \propto t$ $ \Delta \vec{r}(t) \sim \mathcal{N}\left(0, \langle \Delta \vec{r}(t) ^2 \rangle\right)$	$ \Delta \vec{r}(t) \sim \mathcal{N}\left(0, \langle \Delta \vec{r}(t) ^2 \rangle\right)$
nicht GAUSS'sch	$\langle \Delta \vec{r}(t) ^2 \rangle \propto t$ —	— —

Tabelle 3.1.: Unterscheidung von Diffusionsarten nach der Zeitabhängigkeit ihrer MSD und der Verteilung der Aufenthaltswahrscheinlichkeiten.

werden.

3.4.4. Die Positionskorrelationsfunktion $\Xi(\tau)$

Die Grundlage der Berechnung der Positionskorrelationsfunktion ist die Kenntnis der Zeitabhängigkeit von $P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\})$, wobei die beiden Endpunkte $\lim_{\tau \rightarrow 0} P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) = \delta(\vec{r}' - \vec{r})$ und $\lim_{\tau \rightarrow \infty} P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) = \frac{1}{V}$ bereits feststehen. Zusätzlich kann für homogene und isotrope Diffusion, die nicht vom Laserfokus beeinflusst wird

$$P(\{\vec{r}', \tau\} | \{\vec{r}, 0\}) = P(|\vec{r}' - \vec{r}|, \tau) = P(|\Delta \vec{r}|, \tau) \quad (3.137)$$

angenommen werden, sodass eine Funktion von nur zwei Parametern zu bestimmen verbleibt, welche die Wahrscheinlichkeit angibt, ein Teilchen nach einer bestimmten Zeitspanne in einer bestimmten Entfernung vom Ursprungsort anzutreffen.

Im Weiteren wird es hilfreich sein, die Diffusionsmodelle anhand zweier Kriterien zu unterteilen: FICK'sche Diffusion mit einer linear in der Zeit steigenden mittleren quadratischen Abweichung (MSD) und GAUSS'sche Diffusion mit einer Normalverteilung als Aufenthaltswahrscheinlichkeit, deren Varianz von der MSD bestimmt wird (siehe Tabelle 3.1). Der Quadrant oben links enthält den idealen Fall der freien Diffusion eines Teilchens im Raum, ohne jedwede störende Wechselwirkung mit anderer Materie. Der Quadrant oben rechts wird meist als anomale Diffusion mit $\langle |\Delta \vec{r}(t)|^2 \rangle \propto t^\gamma$ bezeichnet. Der Quadrant unten links tritt etwa bei der Überlagerung verschiedener Diffusionskoeffizienten in komplexen Strukturen auf (WANG *et al.*, 2012). Der Quadrant unten rechts enthält schließlich den Großteil der Realität und soll hier nicht weiter beachtet werden.

In Verbindung mit Gl. 3.137 kann eines der Integrale in Gl. 3.87 als Faltung beschrieben werden, sodass das verbliebene Integral über ein Produkt zweier Funktionen mit Hilfe des Satzes von PLANCHEREL in ein ebensolches über die Fouriertransformierten dieser Funktionen umgewandelt werden kann (PLANCHEREL, 1910):

$$\Xi(\tau) = \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}') P(|\Delta \vec{r}|, \tau) d^3 \vec{r} d^3 \vec{r}' \quad (3.138)$$

$$= \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int W_a(\vec{r}) \cdot (W_b * P(\tau))(\vec{r}) d^3 \vec{r} \quad (3.139)$$

$$= \frac{1}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \cdot \mathcal{F}(W_b * P(\tau))(\vec{k})^* d^3 \vec{k} \quad (3.140)$$

$$= \frac{(2\pi)^{n/2}}{\Omega_{1,a;1,b}} \int \mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \cdot \mathcal{F}(W_b)(\vec{k})^* \cdot \mathcal{F}(P(\tau))(\vec{k})^* d^3 \vec{k}. \quad (3.141)$$

Für radialsymmetrische Funktionen $f(|\vec{r}|)$ kann die Fouriertransformation in beliebigen Dimensionen unter Verwendung der BESSEL-Funktionen erster Art und ν -ter Ordnung $J_\nu(x)$ auf ein einfaches Integral reduziert werden

$$\mathcal{F}(f(|\vec{r}|))(\vec{k}) = \mathcal{F}(f(r))(k) = \int_0^\infty f(r) \frac{r^{n/2}}{k^{n/2-1}} J_{n/2-1}(kr) dr, \quad (3.142)$$

wodurch sich für den dreidimensionalen Fall der isotropen Diffusion (mit der Abkürzung $r = |\Delta \vec{r}|$ und $k = |\vec{k}|$)

$$\mathcal{F}(P(\tau))(\vec{k}) = \int_0^\infty P(r, \tau) \frac{r^{3/2}}{k^{1/2}} J_{1/2}(kr) dr \quad (3.143)$$

$$= \int_0^\infty P(r, \tau) \frac{r^{3/2}}{k^{1/2}} \left[\sqrt{\frac{2}{\pi kr}} \sin(kr) \right] dr \quad (3.144)$$

$$= \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty P(r, \tau) \sin(kr) \frac{r}{k} dr \quad (3.145)$$

ergibt. Für die isotrope GAUSS'sche Diffusion mit unabhängiger Bewegung in allen Raumrichtungen und damit allgemein

$$P(|\Delta \vec{x}|, \tau) = \prod_{i=1}^n \frac{e^{-\frac{|\Delta x_i(\tau)|^2}{2\langle |\Delta x_i(\tau)|^2 \rangle}}}{\sqrt{2\pi \langle |\Delta x_i(\tau)|^2 \rangle}} \quad (3.146)$$

$$= \frac{e^{-\frac{|\Delta \vec{x}|^2}{2\langle |\Delta \vec{x}(\tau)|^2 \rangle/n}}}{(2\pi \langle |\Delta \vec{x}(\tau)|^2 \rangle/n)^{n/2}} \quad (3.147)$$

lässt sich dies analytisch lösen zu

$$\mathcal{F}(P(\tau))(\vec{k}) = \sqrt{\frac{2}{\pi}} \int_0^\infty \frac{e^{-\frac{r^2}{2\langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle/3}}}{(2\pi \langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle/3)^{3/2}} \sin(kr) \frac{r}{k} dr \quad (3.148)$$

$$= \frac{e^{-\frac{k^2}{6} \langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle}}{(2\pi)^{3/2}}. \quad (3.149)$$

Dieses Ergebnis ist mit angepassten Koeffizienten auch für andere Dimensionen gültig und speziell für die FICK'sche Diffusion mit $\langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle = 2nD\tau$ (siehe Gl. 3.49) erhält man eine mit

der Zeit zunehmend schmaler werdende Glockenkurve im Fourierraum:

$$\mathcal{F}(P(\tau))(\vec{k}) = \frac{e^{-k^2 D \tau}}{(2\pi)^{n/2}}. \quad (3.150)$$

Steht nun eine Referenzmessung für $\Xi(\tau)$ an einem System zur Verfügung, das der FICK'schen Diffusion folgt und dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist, so ergibt sich jeweils eine eindeutige Beziehung zwischen τ , $\langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle$ und $\Xi(\tau)$, woraus zunächst $\Xi(\tau) = f(\langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle)$ und durch (numerische) Inversion schließlich $\langle |\Delta \vec{r}(\tau)|^2 \rangle = f^{-1}(\Xi(\tau))$ gewonnen werden kann. Damit ist eine Untersuchung anomaler Diffusion auch ohne explizite Kenntnis von $W_{(a,b)}$ möglich, was z. B. für die Berechnung viskoelastischer Eigenschaften im Rahmen der *passiven Mikrorheologie* genutzt werden kann (RATHGEBER *et al.*, 2009).

Für die praktische Verwendung der Korrelationsfunktionen für die nachfolgenden experimentellen Arbeiten sollte dennoch ein Modell für die MDF gefunden und $\Xi(\tau)$ analytisch berechnet werden. Das einfachste und verbreitetste Modell hierfür ist eine dreidimensionale GAUSSfunktion (3DG) mit Zylindersymmetrie (Elongation des Fokus in axialer Richtung mit dem *Strukturparameter* $S = \omega_z/\omega_{xy}$ und den lateralen und axialen Fokusradii ω_{xy} bzw. ω_z , Zentrum des Fokus bei $\vec{r} = \vec{0}$):

$$W_{3DG}(\vec{r}) = e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_{xy}^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{\omega_z^2}} = e^{-\frac{2(x^2+y^2+z^2/S^2)}{\omega_{xy}^2}} \quad (3.151)$$

$$\mathcal{F}(W_{3DG})(\vec{k}) = \frac{1}{8} S \omega_{xy}^3 e^{-\frac{1}{8} \omega_{xy}^2 (k_x^2 + k_y^2 + k_z^2 S^2)} \quad (3.152)$$

$$V_{\text{eff},x} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} (\omega_{xy,a}^2 + \omega_{xy,b}^2) \sqrt{S_a^2 \omega_{xy,a}^2 + S_b^2 \omega_{xy,b}^2} \quad (3.153)$$

$$V_{\text{eff},(a,b)} = \pi^{3/2} S_{(a,b)} \omega_{xy,(a,b)}^3. \quad (3.154)$$

Dank der Exponentialfunktionen ist die Integration in Gl. 3.141 analytisch möglich und mit der Definition

$$\tau_{D,(a,b)} = \frac{\omega_{xy,(a,b)}^2}{4D} \quad (3.155)$$

der Diffusionszeit als charakteristischen Zeit für die Durchquerung des Fokus erhält man schließlich

$$\Xi(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{(\tau_{D,a} + \tau_{D,b})/2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{(S_a^2 \tau_{D,a} + S_b^2 \tau_{D,b})/2}\right)^{-1/2} \quad (3.156)$$

und für den später wichtigen Fall verschieden heller Spezies mit einer einzigen Diffusionszeit ohne Berücksichtigung photophysikalischer Effekte

$$G_{(a,b)}(\tau) = \mathfrak{A} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,(a,b)}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{S_{(a,b)}^2 \tau_{D,(a,b)}}}}. \quad (3.157)$$

Für den Spezialfall eines zweidimensionalen Systems in der xy-Ebene (2DG-Modell) erhält man

aus Gl. 3.150 für $n = 2$ und mit

$$W_{2\text{DG}}(\vec{r}) = e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_{xy}^2}} \quad (3.158)$$

$$A_{\text{eff},x} = \pi \frac{\omega_{xy,a}^2 + \omega_{xy,b}^2}{2} \quad (3.159)$$

$$A_{\text{eff},(a,b)} = \pi \omega_{xy,(a,b)}^2, \quad (3.160)$$

unter Verwendung der effektiven Fokusflächen A_{eff} anstatt der effektiven Fokusvolumina, nun noch

$$G_{(a,b)}(\tau) = \mathfrak{A} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,(a,b)}}}. \quad (3.161)$$

und man erkennt zudem die Ununterscheidbarkeit zwischen der Korrelationsfunktion eines „wahren“ zweidimensionalen System und der eines dreidimensionalen System mit $S \rightarrow \infty$ und damit unendlicher „Tiefenschärfe“. Die Korrelationsfunktion ist normalerweise nicht empfindlich gegenüber Bewegungen der Fluorophore, die ihre Helligkeit um Größenordnungen langsamer verändern als andere überlagerte Bewegungen, da die Wahrscheinlichkeit, zu deutlich späterer Zeit in diesen „schnelleren“ Richtungen nochmals in den Fokus zu gelangen, verschwindend gering ist.

Eine für den in dieser Arbeit verwendeten experimentellen Aufbau realistischeres Fokusmodell ist das 2D-GAUSS-LORENTZmodell (2GL) mit⁶⁵

$$W_{2\text{GL}}(\vec{r}) = \left(1 + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right)^{-2} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\left(1 + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\omega_{xy,0}^2}} = \frac{\omega_{xy,0}^4}{\omega_{xy}^4} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_{xy}^2}} \quad (3.162)$$

$$\omega_{xy}^2 = \left(1 + \frac{z^2}{\omega_z^2}\right)\omega_{xy,0}^2 = \omega_{xy,0}^2 + \frac{z^2}{S^2} \quad (3.163)$$

$$V_{\text{eff},x} = \frac{\pi^2}{2} \frac{\left(S_a^2\omega_{xy,0,a}^2 - S_b^2\omega_{xy,0,b}^2\right)^2}{S_a^3\omega_{xy,0,a} + S_b^3\omega_{xy,0,b} - \frac{\left(S_a^2 + S_b^2\right)^{3/2}\omega_{xy,0,a}\omega_{xy,0,b}}{\sqrt{\omega_{xy,0,a}^2 + \omega_{xy,0,b}^2}}} \quad (3.164)$$

$$V_{\text{eff},(a,b)} = \frac{8}{3}\pi^2 S_{(a,b)}\omega_{xy,0,(a,b)}^3$$

welches jedoch den Nachteil hat, dass die resultierenden Integrale für $\Xi(\tau)$ nicht mehr geschlossen lösbar sind. Zum Vergleich mit den anderen Modellen sind die entsprechenden Korrelationskurven numerisch berechnet und in Abb. 3.13 dargestellt worden⁶⁶.

Eine Ausnahme stellt der Fall lateraler zweidimensionaler Diffusion in einer verschwindend dicken Schicht parallel zur xy-Ebene dar, bei dem $P(\vec{r}, 0) = \delta(z)P(\vec{r}_{xy}, 0)$ und $P(|\Delta\vec{r}|, \tau) = \delta(\Delta z)P(|\Delta\vec{r}_{xy}|, \tau)$ gelten und $\Xi(\tau)$ somit auf den 2DG-Fall mit z-abhängigem Fokusradius

⁶⁵Hier ist ω_{xy}^2 ein Hilfsparameter, der den sich mit der axialen Position verändernden effektiven Fokusradius darstellt und bei $z = 0$ in den „wahren“, minimalen Fokusradius $\omega_{xy,0}^2$ übergeht.

⁶⁶Die Berechnung folgt Gleichung 13 in [MARROCCO, 2008](#). Da die dortigen Formeln für Zweiphotonenmikroskopie entwickelt wurden, muss aufgrund des abweichenden Faktors 4 im Exponenten der MDF (Gleichung 4 ebenda) eine Ersetzung des Strukturparameters gemäß $S \rightarrow S/\sqrt{2}$ durchgeführt werden.

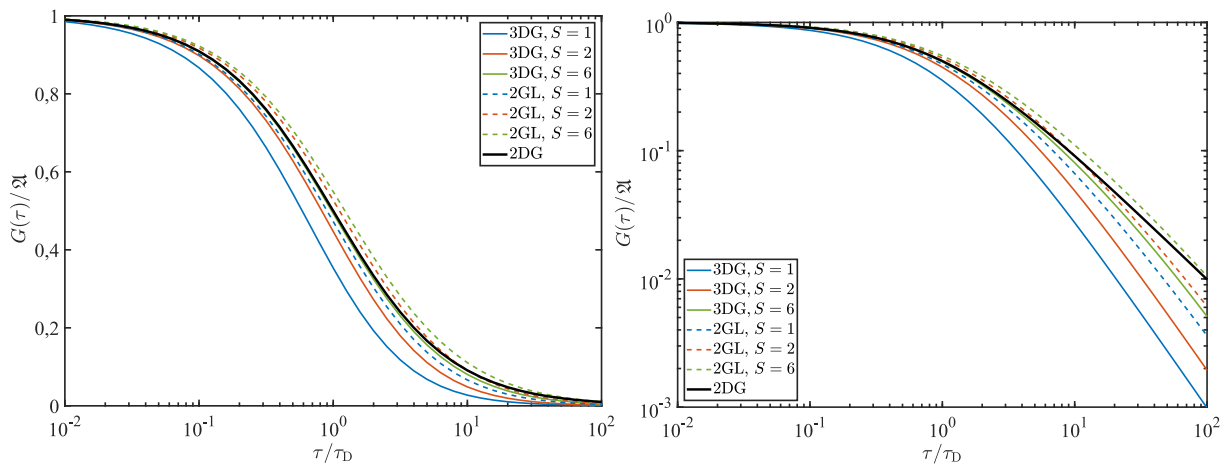


Abbildung 3.13.: Darstellung der Abhängigkeit der normierten Korrelationskurven $G(\tau)/2l$ für die isotrope GAUSS'sche Diffusion einer Spezies in zwei bzw. drei Dimensionen von der relativen Korrelationszeit τ/τ_D für verschiedene Fokusmodelle und Strukturparameter S (in 3D). Die Auftragung erfolgt in halblogarithmischer (links) bzw. doppeltlogarithmischer Form (rechts), um die Unterschiede der einzelnen Kurven besser herauszustellen. Man erkennt rechts gut den langsameren Abfall der Kurve bei Verringerung der Dimensionalität der Diffusion und links die rasche Konvergenz der 3D-Modelle für steigenden Strukturparameter.

ω_{xy} zurückführbar ist. Dieses Ergebnis und insbesondere die damit einhergehende Abhängigkeit von A_{eff} werden in Kapitel 6 Gegenstand tiefergehender Untersuchungen sein. Als mögliche Abwandlung wird dort auch ein 2GL-Modell mit unterschiedlichen Strukturparametern besprochen:

Im 2GL-Modell stellt $\frac{\omega_{xy,0}^2}{\omega_{xy}^2} e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{\omega_{xy}^2}}$ mit $S = \omega_z/\omega_{xy,0}$ den Laserfokus als ideale TEM₀₀-Mode eines GAUSSstrahls dar und der zweite Faktor $\frac{\omega_{xy,0}^2}{\omega_{xy}^2}$ mit $S_{\text{PH}} = \omega_{z,\text{PH}}/\omega_{xy,0}$ nähert die Wirkung der Lochblende an, die Strahlung außerhalb der Fokusebene in axialer Richtung abschwächt. Beide Faktoren müssen nicht notwendigerweise denselben Strukturparameter besitzen, eine Unterscheidung ist durch Messung der Abhängigkeit der Diffusionszeit oder effektiven Teilchenzahl, beide $\propto 1 + \frac{z^2}{\omega_z^2}$, und der mittleren Helligkeit, $\langle F(t) \rangle \propto \Omega_1 \propto \left(1 + \frac{z^2}{\omega_{z,\text{PH}}^2}\right)^{-1}$, in einer zweidimensionalen Schicht von der axialen Position möglich.

3.4.5. Rasterbildkorrelationspektroskopie

Bei der Definition der Kreuzkorrelation wurde weiter oben bereits die Möglichkeit der Verwendung versetzter Foki für beide Kanäle erwähnt. In den *Bildkorrelationsspektroskopie*-Methoden (engl. *image correlation spectroscopy, ICS*) wird dieses Konzept auf die Korrelation der einzelnen *Bildpunkte* (engl. *pixel*) eines Mikroskopiebildes untereinander ausgeweitet

$$G_{a,b}(\xi, \eta, \tau) = \frac{\langle \delta F_a(x, y, t) \cdot \delta F_b(x + b\xi, y + b\eta, t + \tau) \rangle}{\langle F_a(x, y, t) \rangle \langle F_b(x + b\xi, y + b\eta, t + \tau) \rangle}, \quad (3.165)$$

hier unter der Annahme quadratischer Bildpunkte der Breite b , welche als eine Vielzahl gleichzeitig oder auch zeitversetzt aufgenommener Intensitätswerte an verschiedenen Positionen aufgefasst werden können. Dadurch ist die Korrelationsfunktion sowohl von der Korrelationszeit τ als auch von der Differenz der Positionen der Bildpunkte in zwei lateralen Dimensionen (ξ, η) abhängig⁶⁷.

Die erste Erwähnung findet sich 1993 bei [PETERSEN *et al.*, 1993](#), wo als Weiterentwicklung der *Rasterfluoreszenzfluktuationsspektroskopie* (engl. *scanning fluctuation correlation spectroscopy, sFCS*) die Korrelation eines Laserrastermikroskop-Bildes zur Bestimmung der Flächendichte fluoreszenter Strukturen in Zellen beschrieben wird. Da die Zellen fixiert und damit die abgebildeten Objekte unbeweglich waren, können alle Bildpunkte als zeitgleich belichtet angesehen werden, was die Grundlage für die eigentliche ICS ist, bei der die relevanten Probenparameter nur Anzahl und Größe der „hellen Flecken“ in den Bildern sind und keine zeitliche Abhängigkeit existiert.

In den folgenden Jahrzehnten wurden viele weitere verwandte Techniken entwickelt, die alle die räumliche und zeitliche Abhängigkeit der Helligkeit einzelner Bildpunkte untereinander ausnutzen und auch als Kreuzkorrelation von Bildern verschiedener Kanäle ausgeführt werden können ([KOLIN *et al.*, 2007](#)).

Für diese Arbeit ist hiervon die *Rasterbildkorrelationsspektroskopie* (engl. *raster image correlation spectroscopy, RICS*, siehe [DIGMAN *et al.*, 2005](#)) von Interesse, bei der der Rasterprozess des Laserstrahls in der Probe auf einer der Diffusion vergleichbaren Zeitskala erfolgt (siehe Abb. 3.14). Dadurch verändert sich der Beitrag eines bestimmten Fluorophors zur detektierten Helligkeit nicht allein durch seine Bewegung durch den Fokus, sondern auch umgekehrt durch die Bewegung des Fokus über das Teilchen hinweg. Dies stellt nun eine direkte Verletzung der oben aufgestellten Annahme einer zeitunabhängigen MDF dar, welche aufgrund der vorausgesetzten Unabhängigkeit von Diffusion und Position (und damit hier auch von der MDF) aber lediglich zur Folge hat, dass sich die MDFs für verschiedene zu korrelierende Bildpunkte voneinander unterscheiden. Da die Probe stationär und homogen sein soll, hängen die einzusetzenden MDFs weiterhin nur von der Differenz der Position der Bildpunkte ab und die nötige Modifikation der Gleichungen braucht erst in Gl. 3.141 zu erfolgen. Bleibt die Form des Fokus gleich, lässt sich der Rasterprozess als Verschiebung des Nullpunktes der MDF nach $W(\vec{r}) \mapsto W(\vec{r} - \vec{r}_0)$ beschreiben, woraus sich im Fourierraum eine Multiplikation mit einem komplexen Vorfaktor ergibt, der die Verschiebung zwischen beiden korrelierten Zeitpunkten $\Delta \vec{r}_0 = \vec{r}_{0,b}(t + \tau) - \vec{r}_{0,a}(t)$ enthält:

$$\mathcal{F}(W)(\vec{k}) \mapsto e^{-i\vec{r}_0 \cdot \vec{k}} \mathcal{F}(W)(\vec{k}) \quad (3.166)$$

$$\mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \cdot \mathcal{F}(W_b)(\vec{k})^* \mapsto e^{i\Delta \vec{r}_0 \cdot \vec{k}} \mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \cdot \mathcal{F}(W_b)(\vec{k})^* . \quad (3.167)$$

Die Besonderheit bei der RICS ist nun die feste Beziehung zwischen der Korrelationszeit τ und

⁶⁷In der Literatur wird meist kein Unterschied gemacht zwischen der realen räumlichen Position (in Metern) und der Position im Bild (in Bildpunkten). In dieser Arbeit sollen ξ und η jeweils für eine Anzahl an Bildpunkten stehen.

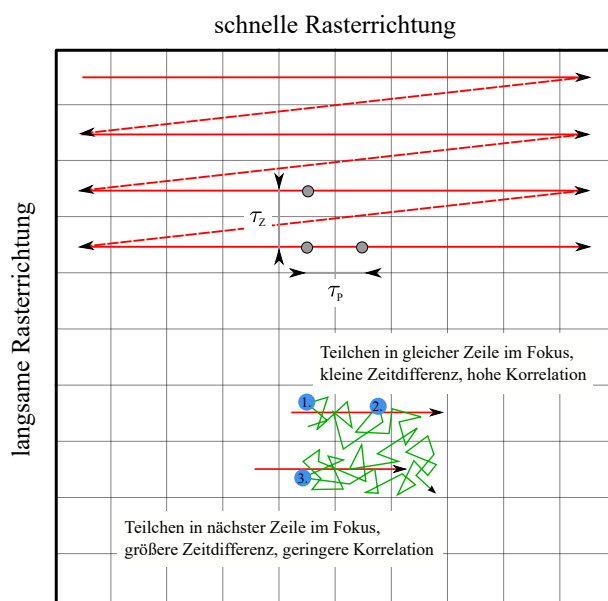


Abbildung 3.14.: Schematische Darstellung des Rasterprozesses als Grundlage der RICS. Der Fokus wandert im Zickzack über den abgebildeten Ausschnitt der Probe, wobei hier nur auf dem Weg nach rechts der Laser angeschaltet ist (durchgezogene rote Linie) und bei der Rückkehr nach links nicht detektiert wird (gestrichelte rote Linie). Es ergibt sich eine schnelle (horizontal) und eine langsame (vertikal) Rasterrichtung. Die schwarzen Linien unterteilen das Sichtfeld in quadratische Bildpunkte, deren Zentren (graue Kreise) vom Fokus im Abstand der der Verweilzeiten τ_P bzw. τ_Z überstrichen wird. Ein diffundierendes Teilchen (blauer Kreis) kann zur Korrelation beitragen, indem es nach kurzer Zeit vom Fokus in derselben Zeile ein zweites Mal detektiert wird oder nach längerer Zeit in nachfolgenden Zeilen. Letzteres ist deutlich seltener – die Aufenthaltswahrscheinlichkeit hat sich bereits über ein größeres Volumen „verschmiert“ – und die Korrelation zwischen den Zeilen deshalb kleiner.

der Verschiebung $\Delta \vec{r}_0$, der Verweilzeit von τ_P in jedem Bildpunkt in der schnellen Rasterrichtung (hier o. B. d. A. die x-Achse mit der Verschiebung ξ) und der Zeitdifferenz der Aufnahme entsprechender Bildpunkte in aufeinanderfolgender Zeilen⁶⁸ von τ_Z :

$$\tau = \tau_P \xi + \tau_Z \eta \quad (3.168)$$

$$\Delta \vec{r}_0 = b \begin{pmatrix} \xi \\ \eta \\ 0 \end{pmatrix}. \quad (3.169)$$

Für den einfachen Fall eines 3DG-Fokus erhält man allgemein für den Effekt der Verschiebung

⁶⁸Aufgrund der üblicherweise verwendeten mechanischen Rasterung (in dieser Arbeit durch Abtastspiegel) ergibt sich stets eine gewisse Zeitdifferenz zwischen der Aufnahme des letzten Bildpunktes einer Zeile und dem ersten der nächsten Zeile, sodass τ_Z nicht einfach aus τ_P und der Anzahl der Bildpunkte pro Zeile berechnet werden kann.

der MDF zwischen beiden Zeitpunkten bei homogener Diffusion in n Dimensionen

$$\Xi(\tau) \mapsto \Xi(\tau) \prod_{i=1}^n e^{-\frac{|\Delta x_{0,i}(\tau)|^2}{2\langle |\Delta x_i(\tau)|^2 \rangle + \frac{\omega_{i,a}^2 + \omega_{i,b}^2}{2}}} \quad (3.170)$$

und damit speziell für den in Abschnitt 6.4.1 relevanten Fall Autokorrelation bei FICK'scher Diffusion in zwei Dimensionen mit Gl. 3.168 und Gl. 3.169 (DIGMAN *et al.*, 2009):

$$\Xi(\xi, \eta) = \left(1 + \frac{\tau_P |\xi| + \tau_Z |\eta|}{\tau_D}\right)^{-1} e^{-\frac{b^2/\omega_{xy}^2 (\xi^2 + \eta^2)}{1 + \frac{\tau_P |\xi| + \tau_Z |\eta|}{\tau_D}}}. \quad (3.171)$$

Die Betragsstriche ergeben sich hier aus der Notwendigkeit einer positiven Korrelationszeit bei der Berechnung des diffusiven MSD in Zusammenhang mit der üblichen Darstellung von $G_{a,b}(\xi, \eta)$ für positive wie negative Verschiebungen. Man erkennt anhand von Gl. 3.171 unmittelbar die Notwendigkeit kleiner Bildpunkte und schneller Rasterung ($\tau_P \ll \tau_D$ und $b \ll \omega_{xy}$), da ansonsten bereits für die kleinstmögliche Verschiebung $\xi = 1$ die Korrelation gegen null geht. Zudem offenbart die Formel die später genutzte Möglichkeit der unabhängigen Bestimmung von Diffusionskoeffizient, Konzentration und Fokusgröße: Im Gegensatz zu Gl. 3.161 sind diese nicht mehr nur in den zwei Parametern Diffusionszeit und effektiver Teilchenzahl vereinigt, sondern können – bei genauer Kenntnis der Bildpunktgröße! – getrennt ermittelt werden.

Die praktische Korrelation der Bilddaten (siehe 6.4.1) erfolgte nach Gl. 3.65 direkt über den in MATLAB integrierten *FFTW*-Algorithmus (FRIGO *et al.*, 1998) der *schnellen Fouriertransformation* (engl. *fast Fourier transform, FFT*). Es kommt wie bei den F(C)CS-Messungen eine symmetrisierte Normierung zur Anwendung (siehe Abschnitt 3.4.6.2). Der genaue Programmcode für Korrelator und Anpassung der theoretischen Kurven ist im Anhang C zu finden.

3.4.6. Korrelator

Der *Korrelator*, mithin das Herzstück der Auswertungsroutine für F(C)CS-Rohdaten, bezeichnet dasjenige Unterprogramm (Softwarekorrelator) oder elektronische Bauteil (Hardwarekorrelator), welches aus den zeit- und ortsabhängigen Fluoreszenzdaten die Funktion $G_{a,b}(\tau)$ bzw. $G_{a,b}(\xi, \eta, \tau)$ generiert. Diese Daten können sich als kontinuierliche Intensitätswerte oder aber als Ankunftszeiten einzelner Photonen darstellen, in jedem Falle handelt es sich um diskrete Zahlen, wodurch die bisher genutzten Integrationen und stetigen Transformationen keine Anwendung mehr finden und problemspezifische Algorithmen vonnöten sind.

Eine besondere Schwierigkeit stellen bei den Korrelationstechniken die sich über etliche Größenordnungen erstreckenden charakteristischen Zeiten der einzelnen Phänomene. Möchte man etwa in einer Messung den Effekt des *antibunchings* wie auch die Diffusion größerer Teilchen untersuchen, müssen die Korrelationsfunktionen vom Pikosekunden- bis in den Millisekundenbereich berechnet werden. Würde dies auf einer linearen Zeitskala geschehen, also mit konstantem Abstand auf der Abszisse, umfasste jede zu analysierende Messkurve dutzende Millionen von

Datenpunkten! Dies ist nicht nur rechentechnisch aufwendig, sondern vor allem unnötig: Die durch Diffusion hervorgerufene Korrelation verändert sich beispielsweise selbst im Verlaufe von vielen Nanosekunden nur in völlig vernachlässigbarem Maße, während die Korrelation durch Triplettblinken meist schon nach einigen Mikrosekunden auf null ausgelaufen ist. Auch unter einem statistischen Gesichtspunkt schadete die hohe Anzahl von Datenpunkten im Bereich langer Korrelationszeiten, da sie ohne gegenläufige Gewichtung die Anpassung der theoretischen Modelle dominieren würde.

Im Ergebnis hat sich ein als *multiple tau*-Korrelation bezeichneter Ansatz etabliert, bei dem die Abstände auf der Zeitachse exponentiell mit dieser steigen⁶⁹, sodass, wie auf einer Tonleiter jede Oktave dieselbe Anzahl Töne enthält, hier jede Dekade gleich viele Datenpunkte umfasst. Auf diese Weise besteht eine experimentelle Korrelationskurve nurmehr aus wenigen Hundert Punkten und die sich auf verschiedenen Größenordnungen abspielenden Phänomene erhalten vergleichbares Gewicht bei der Regression. Unbeantwortet bleibt damit noch die Frage, welcher genaue Rhythmus der Abstände adäquat ist und wie, gerade im Falle diskreter Detektionsereignisse, mit den nicht mehr in dieses Schema passenden Korrelationszeiten verfahren wird.

Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Algorithmus orientiert sich diesbezüglich an den Arbeiten von KLAUS SCHÄTZEL aus den 1980er Jahren (SCHÄTZEL, 1985), der zuerst⁷⁰ den heute zum Standard gewordenen *multiple tau*-Schema beschrieb. Ein Softwarekorrelator, der nach diesem Ansatz arbeitet, findet sich schließlich bei MAGATTI *et al.*, 2001 im Jahre 2001⁷¹, wohingegen der in dieser Arbeit implementierte Algorithmus der Arbeit von WAHL *et al.*, 2003 folgt. Der relevante Unterschied zwischen beiden liegt nicht im Ergebnis, sondern vielmehr in der Optimierung auf verschiedene Datenstrukturen: zeitlich äquidistante Intensitätswerte einerseits und Ankunftszeiten der Photonen andererseits. Das für die experimentellen Arbeiten hier verwendete Laserrastermikroskop speichert die bei F(C)CS-Messungen erzeugten Rohdaten nun in der zweiten Form ab; genauer gesagt als Zeitdifferenzen, welche noch aufsummiert werden müssen. Wollte man ohne Verlust der Zeitaufösung (hier 50 ns) äquidistanten Intensitäten generieren, würde sich, bei einer mittleren Zählrate von deutlich unter 1 MHz, der Speicherbedarf auf das mehr als Zwanzigfache erhöhen, da auf jedes Zeitsegment, in dem ein Photon registriert wurde, mehr als zwanzig ereignislose kämen. Im Endeffekt müsste man eine binäre Zahlenkolonne korrelieren, die zu über 95 % aus Nullen besteht. Der effizientere Ansatz ist darum die direkte Rechnung mit den Ankunftszeiten, welche bei WAHL *et al.*, 2003 verfolgt wird. Im Weiteren

⁶⁹Dies wird meist auch als *logarithmische Skalierung* bezeichnet, da die Abstände auf einer logarithmischen Zeitachse äquidistant verteilt sind. In älteren Arbeiten findet sich auch der Begriff *exponentielle Abtastung* (engl. *exponential sampling*), allerdings meist bezogen auf die gleichfalls auf logarithmischer Skala berechneten Abklingkonstanten bei der dynamischen Lichtstreuung (OSTROWSKY *et al.*, 1981).

⁷⁰Bereits vorher existierte ein sogenannter *log-lin*-Korrelator (SCHÄTZEL, 1985), der ebenfalls eine logarithmische Skalierung erlaubte, jedoch aufgrund der fehlenden Vergrößerung ein unverhältnismäßig großes Rauschen bei längeren Korrelationszeiten erzeugte.

⁷¹Bereits ein Jahr früher wurde eine Messkarte zur Datenerfassung bei FCS-Experimenten entwickelt (EID *et al.*, 2000), bei der die Korrelation nicht in der Hardware stattfindet. Da der eigentliche Korrelator in diesem Artikel nur anonym als „Software“ beschrieben wird, ist dies hierfür nicht von Belang.

Zudem ist ein vergleichbarer Algorithmus schon 1997 im Rahmen der Berechnung von Geschwindigkeitskorrelationen in einem Buch von DAAN FRENKEL und BEREND SMIT über Molekülsimulationen publiziert worden (FRENKEL *et al.*, 1996).

soll zuerst das allgemeine Prinzip des *multiple tau*-Korrelators beschrieben werden, bevor die möglichen Normierungen der praktischen Korrelationskurven dargelegt werden und zuletzt der konkrete Algorithmus in Pseudocode gegeben wird.

3.4.6.1. Der *multiple tau*-Korrelator

Der rechnerisch anspruchsvolle Teil bei der praktischen Bestimmung der Korrelationsfunktion nach Gl. 3.74 ist der Zähler, für den die um τ zueinander verschobenen Zeitreihen der Intensität miteinander multipliziert und aufsummiert werden müssen. Dabei ist die Korrelationszeit stets ein ganzzahliges Vielfaches der Zeitaufösung oder Integrationszeit (genauer der Zeitspanne, über die gemittelt wird), die sich in der Zeitdifferenz t_{Bin} aufeinanderfolgender Intensitätswerte, die als Zeitintegrale der theoretischen Werte nach

$$\hat{F}_{a,i} = \frac{1}{t_{\text{Bin}}} \int_{t_i - t_{\text{Bin}}/2}^{t_i + t_{\text{Bin}}/2} F_a(t) dt \quad (3.172)$$

dargestellt werden können, bzw. der kleinsten Ankunftszeitdifferenz niederschlägt (engl. *bin width*). Im Falle einer äquidistanten Zeitreihe mit n_M Messpunkten innerhalb der Messzeit T_M ist die Verschiebung trivial als Indexaddition

$$\langle F_a(t) \cdot F_b(t + \tau) \rangle \mapsto \frac{1}{T_M - \tau} \sum_{i=1}^{n_M - \tau/t_{\text{Bin}}} \hat{F}_{a,i} \cdot \hat{F}_{b,i + \tau/t_{\text{Bin}}} \quad (3.173)$$

zu realisieren, wohingegen bei Vorliegen von Ankunftszeitdaten das Eintreffen von Photonen passender Zeitdifferenz durch eine lineare Suche über alle Paare der n_P Detektionsereignisse festgestellt werden muss⁷²:

$$\langle F_a(t) \cdot F_b(t + \tau) \rangle \mapsto \frac{1}{T_M - \tau} \sum_{i=1}^{n_{P,a}} \sum_{j=1}^{n_{P,b}} \delta[t_{a,i} - t_{b,j} - \tau]. \quad (3.174)$$

Die Berechnung der Korrelationskurve auf einer streng logarithmischen Skala ist bei diskreten Daten prinzipiell nicht möglich, kann aber auf verschiedene Weisen angenähert werden. Die erstmals in SCHÄTZEL, 1985 eingeführte Methode besteht, vornehmlich wegen der einfachen Implementation mit damaliger Rechentechnik, aus einer Konkatenation stückweise linearer Zeitskalen, deren Abstände alle acht Punkte verdoppelt werden. Die wichtigste Verbesserung gegenüber früheren Korrelatoren war die zunehmende Glättung der Kurve bei größeren Zeiten, die durch die Aufsummierung jeweils zweier benachbarter Werte erreicht wurde. Bei dem k -ten Vergrößerungsschritt werden beispielsweise alle detektierten Photonen von je 2^k konsekutiven Messpunkten der Zeit des ersten Punktes zugewiesen, wodurch sich auch die Anzahl an Daten-

⁷²Hierbei wurde das modifizierte KRONECKER-Delta mit $\delta[x] = \begin{cases} 1 & x = 0 \\ 0 & x \neq 0 \end{cases}$ verwendet.

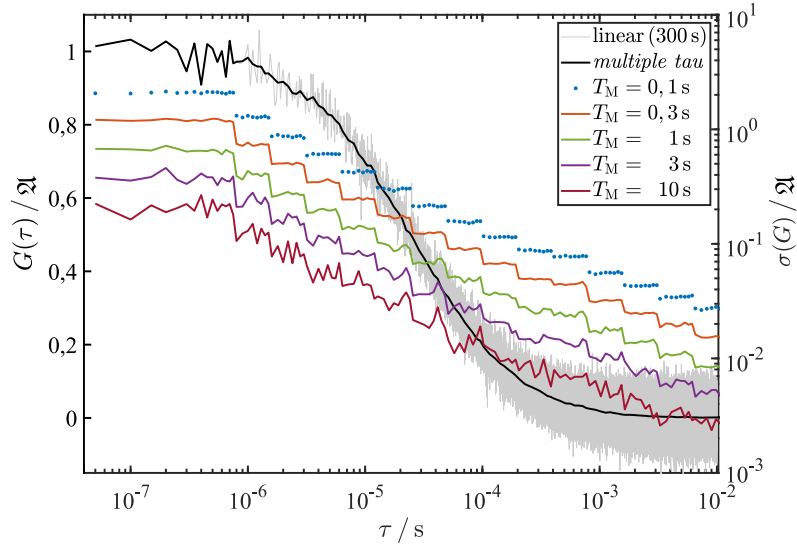


Abbildung 3.15.: Darstellung der Abhängigkeit der Streuung der mit dem verwendeten *multiple tau*-Korrelator erzeugten Korrelationskurven von der Korrelationszeit τ und der Messzeit T_M . Aufgetragen sind auf der rechten Achse die auf die Amplitude normierte Standardabweichung, bestimmt aus der Zerlegung und separaten Korrelation einer insgesamt 300 s langen Messung einer wässrigen Lösung von Alexa Fluor 488 Hydravid (Konzentration 25 nmol/L, $\tau_D \approx 25 \mu\text{s}$) in einzelne Segmente der angegebenen Länge, und auf der linken Achse die gleichfalls normierte Korrelationskurve (berechnet aus der gesamten Messdauer) selbst. Letztere ist sowohl mit dem *multiple tau*-Korrelator (schwarz) als auch mit einem linearen Korrelator (grau) berechnet worden. Man erkennt hieran deutlich den starken Glättungseffekt durch die sukzessiven Vergrößerungsschritte, deren abrupte Verringerung der Standardabweichung alle acht Punkte auch gut an der Kurve mit der kürzesten Messzeit (blaue Punkte) ablesbar sind. Der Effekt verliert sich bei größeren Messzeiten in der Streuung der Werte aufgrund sinkender Anzahl zu mittelnder Segmente.

punkten um diesen Faktor reduziert (unvollständige Segmente am Ende werden verworfen):

$$\hat{F}_i^{(k)} = \frac{1}{2} \left(\hat{F}_{2i-1}^{(k-1)} + \hat{F}_{2i}^{(k-1)} \right) \quad (3.175)$$

$$= \frac{1}{2^k} \sum_{j=1}^{2^k} \hat{F}_{2^k(i-1)+j}^{(0)} \quad (3.176)$$

$$t_i^{(k)} = 2^k (i-1) t_{\text{Bin}}^{(0)} \quad (3.177)$$

$$n_M^{(k)} = \left\lfloor n_M^{(0)} / 2^k \right\rfloor. \quad (3.178)$$

Insgesamt steigt somit auch die effektive Integrationszeit des Detektors näherungsweise exponentiell mit der Korrelationszeit ($t_{\text{Bin}}^{(k)} = 2^k t_{\text{Bin}}^{(0)}$), wodurch die absolute Streuung entlang der Kurve sinkt und, wiederum für den Fall exponentiell abklingender Korrelationen bei der DLS, das Signal-Rausch-Verhältnis konstant gehalten werden kann. Diese zwischen den einzelnen Vergrößerungsschritten sprunghaft variierende Streuung ist bei Mittelung über viele kurze Messungen gut sichtbar (Abb. 3.15).

Ein Grund für die Verwendung von jeweils acht Punkten im linearen Abstand ist die Minimierung des unerwünschten Mittelungseffektes über die wahre Korrelationskurve, welcher durch die Zusammenfassung von Zeitabschnitten zu einem einzelnen Intensitätswert entsteht⁷³:

$$\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau) \propto \sum_{i=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \hat{F}_{a,i}^{(k)} \cdot \hat{F}_{b,i+\tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}}^{(k)} \quad (3.179)$$

$$= \sum_{i=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \left(\frac{1}{2^{2k}} \sum_{j,l}^{2^k} \hat{F}_{a,2^k(i-1)+j}^{(0)} \cdot \hat{F}_{b,2^k(i-1)+l+\tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}}^{(0)} \right) \quad (3.180)$$

$$= \frac{1}{2^{2k}} \sum_{i=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \left(\sum_{j=1}^{2^k} \hat{F}_{a,2^k(i-1)+j}^{(0)} \cdot \sum_{l=-j+1}^{2^k-j} \hat{F}_{b,2^k(i-1)+j+l+\tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}}^{(0)} \right) \quad (3.181)$$

$$= \frac{1}{2^{2k}} \sum_{i=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \left[\sum_{l=-2^k+1}^0 \sum_{j=-l+1}^{2^k} \hat{F}_{a,2^k(i-1)+j}^{(0)} \cdot \hat{F}_{b,2^k(i-1)+j+l+\tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}}^{(0)} \right. \\ \left. + \sum_{l=1}^{2^k-1} \sum_{j=1}^{2^k-l} \hat{F}_{a,2^k(i-1)+j}^{(0)} \cdot \hat{F}_{b,2^k(i-1)+j+l+\tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}}^{(0)} \right] \quad (3.182)$$

$$= \frac{1}{2^{2k}} \sum_{j=-2^k}^{2^k} (2^k - |j|) \left(\sum_{i=1}^{2^k n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}} \hat{F}_{a,i}^{(0)} \cdot \hat{F}_{b,i+j+\tau/t_{\text{Bin}}^{(0)}}^{(0)} \right) \quad (3.183)$$

$$\propto \frac{1}{2^k} \sum_{j=-2^k}^{2^k} (1 - |j|/2^k) \hat{G}^{(0)}(\tau + jt_{\text{Bin}}^{(0)}) = \frac{1}{2^k} (\Lambda_{2^{k+1}} * \hat{G}_{a,b}^{(0)})(\tau). \quad (3.184)$$

Die experimentellen Korrelationsfunktionen in der k -ten Vergrößerungsstufe $\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau)$ ergeben sich somit als gewichtete Summe der nicht vergrößerten Korrelationsfunktionen $\hat{G}_{a,b}^{(0)}(\tau)$, was auch als diskrete Faltung mit einer Dreiecksfunktion $\Lambda_{2^{k+1}}$ der Gesamtbreite 2^{k+1} geschrieben werden kann. Mit Gl. 3.172 erhält man schließlich $\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau)$ als (kontinuierliche) Faltung der theoretischen Korrelationsfunktion:

$$\hat{G}_{a,b}^{(0)}(\tau) = \frac{1}{t_{\text{Bin}}^{(0)}} \left(\Lambda_{2t_{\text{Bin}}^{(0)}} * G_{a,b} \right) (\tau) \quad (3.185)$$

$$\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau) = \frac{1}{t_{\text{Bin}}^{(k)}} \left(\Lambda_{2t_{\text{Bin}}^{(k)}} * G_{a,b} \right) (\tau). \quad (3.186)$$

Um nun sicherzustellen, dass der *multiple tau*-Algorithmus durch diesen Mittelungseffekt die experimentelle Korrelationskurve nicht zu stark verzerrt, darf das Verhältnis $t_{\text{Bin}}^{(k)}/\tau$ nicht zu groß werden. Für DLS-Experimente wurde in SCHÄTZEL, 1990 und MAGATTI *et al.*, 2001 diese Verzerrung berechnet und ein Grenzwert von $t_{\text{Bin}}^{(k)} \leq 7\tau$ für eine maximale absolute⁷⁴ Abwei-

⁷³Hier werden äquidistante Intensitätswerte angenommen. Da eine Zeitreihe von Ankunftszeiten durch Hinzufügen der Nullwerte jederzeit in eine solche überführt werden kann, ist das Ergebnis auf für solcherart Daten gültig.

⁷⁴Der relative Fehler ist unabhängig von der Korrelationszeit und stattdessen nach $\left(\frac{\sinh t_{\text{Bin}}^{(k)} \Gamma}{t_{\text{Bin}}^{(k)} \Gamma} \right)^2 - 1$ eine Funktion des Produktes von Integrationszeit und Abklingkonstante Γ , wodurch er sich entlang der Kurve alle acht

chung von 0,1 % gefunden⁷⁵. Für F(C)CS-Kurven ist der Verlauf der Abweichungen hingegen weniger günstig, da diese weniger stark als exponentiell abnehmen. Im einfachsten Fall einer einzelnen Spezies, die durch einen 2DG-Fokus diffundiert (Gl. 3.161), ist der relative Fehler für $\tau \rightarrow \infty$ maximal⁷⁶ und liegt für einen Vergrößerungsschritt alle 8 Punkte bei $\approx 0,25\%$. Bei all dem muss noch beachtet werden, dass $t_{\text{Bin}}^{(k)}/\tau = 1/8$ jeweils nur für den ersten Punkt nach der Vergrößerung gültig ist und der letzte Punkt dieses Intervalls bereits $t_{\text{Bin}}^{(k)}/\tau = 1/15$ erreicht, da die Korrelationszeit hier um $7 t_{\text{Bin}}^{(k)}$ weitergerückt ist und der relative Fehler auf $\approx 0,075\%$ absinkt.

3.4.6.2. Normierungen

Nachdem im vorherigen Abschnitt der Zähler von Gl. 3.74 im Rahmen des *multiple tau*-Ansatzes behandelt wurde, soll hier kurz auf die verschiedenen Möglichkeiten der Ermittlung des Nenners, also der Normierung auf das Produkt der mittleren Intensitäten in beiden Kanälen eingegangen werden. Ersetzt man den exakten Ensembleerwartungswert der Intensität durch einen Schätzwert der entsprechenden Zeitreihe, führt dies selbst bei einem erwartungstreuen Schätzer wie dem arithmetischen Mittel zu einer Verzerrung der normierten Korrelationsfunktion, da dieser nichtlinear in das Ergebnis einfließt und somit nicht nur die Varianz der experimentellen Korrelationsfunktion erhöht, sondern, wären Zähler und Nenner unabhängig voneinander, auch ihren Erwartungswert erhöhen würde⁷⁷. Da eine größere mittlere Intensität aber auch mit einer Vergrößerung des Zählers einhergeht, kompensieren sich beide Effekte partiell und Verzerrung wie Varianz werden verringert.

Eine weitere Verringerung kann dadurch erzielt werden, dass die Mittelung der Intensitäten nicht über die gesamte Zeitreihe erfolgt

$$\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau) = \frac{\frac{1}{n_{\text{M}}^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \sum_{i=1}^{n_{\text{M}}^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \hat{F}_{a,i}^{(k)} \cdot \hat{F}_{b,i+\tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}}^{(k)}}{\left(\frac{1}{n_{\text{M}}^{(k)}} \sum_{j=1}^{n_{\text{M}}^{(k)}} \hat{F}_{a,j}^{(k)} \right) \cdot \left(\frac{1}{n_{\text{M}}^{(k)}} \sum_{j=1}^{n_{\text{M}}^{(k)}} \hat{F}_{b,j}^{(k)} \right)} - 1, \quad (3.187)$$

sondern in beiden Kanälen jeweils nur über den für einen bestimmten Wert der Korrelationszeit

Punkte vervierfacht und bei $\tau = 1/\Gamma$ etwa 0,5 % beträgt. Die starke Zunahme des relativen Fehlers bei großen Korrelationszeiten ist durch die exponentielle Abnahme des Funktionswertes selbst allerdings vernachlässigbar.

⁷⁵Der Wert von 8τ in SCHÄTZEL, 1990 ist durch die Verwendung einer Näherungsrechnung bedingt.

⁷⁶Die genaue Funktion lautet $\alpha \ln\left(\frac{\alpha+1}{\alpha-1}\right) + \alpha^2 \ln(1 - \alpha^{-2}) - 1$, wobei $\alpha = \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}$.

⁷⁷Da $1/x$ und $1/x^2$ beides konvexe Funktionen sind, erhält man durch Anwendung der JENSEN'schen Ungleichung (JENSEN, 1906) $E(f(X)) \geq f(E(X))$ im Mittel eine positive Verzerrung der Korrelationsfunktion durch die Unsicherheit in der gemittelten Fluoreszenzintensität.

in die Korrelationsfunktion eingehenden Abschnitte:

$$\hat{G}_{a,b}^{(k)}(\tau) = \frac{\left(n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}\right) \sum_{i=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \hat{F}_{a,i}^{(k)} \cdot \hat{F}_{b,i+\tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}}^{(k)}}{\left(\sum_{j=1}^{n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}} \hat{F}_{a,j}^{(k)}\right) \cdot \left(\sum_{j=\tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}+1}^{n_M^{(k)}} \hat{F}_{b,j}^{(k)}\right)} - 1. \quad (3.188)$$

Nach Gl. 3.173 entspricht dies für Kanal a den ersten und für Kanal b den letzten $n_M^{(k)} - \tau/t_{\text{Bin}}^{(k)}$ Segmenten. Dieses Normierungsschema wird in der Literatur als *symmetrisierte Normierung* (engl. *symmetrized normalization*) bezeichnet (SCHÄTZEL *et al.*, 1988) und wurde auch in dem hier beschriebenen Korrelator berücksichtigt. Bei konstantem Erwartungswert der Intensitäten ist der Effekt dieser Normierung gering, sorgt aber bei – z. B. durch Photobleichung – kontinuierlich sinkenden Werten zu einer Stabilisierung der Korrelationskurven im Bereich großer Zeiten.

3.4.6.3. Verwendeter Algorithmus

Der Vektor *tau* enthält die alle acht Einträge vergrößerten Korrelationszeiten in Vielfachen von $t_{\text{Bin}}^{(0)}$ und beginnt mit dem Muster (0, 1, ..., 16, 18, ..., 32, 36, ...). Der Vektor *zeit_a* enthält zu Beginn die Ankunftszeiten aller Photonen in Kanal a , wiederum in Vielfachen von $t_{\text{Bin}}^{(0)}$, *zeit_b* jene in Kanal b . Die Vektoren *gew_a* und *gew_b* besitzen zu Beginn dieselbe Länge wie die entsprechenden Zeitvektoren und enthalten nur Einsen. Später stellen sie die Anzahl an Photonen dar, die zu den dann vergrößerten Ankunftszeiten gehören. Die Variablen *T_mess* und *t_bin* entsprechen $T_M/t_{\text{Bin}}^{(0)}$ bzw. $t_{\text{Bin}}^{(0)}$.

Der tatsächliche Programmcode in der Sprache MATLAB zur Korrelation von Rohdaten des verwendeten Mikroskops inklusive sprachspezifischer Optimierungen und Aufteilung in Unterfunktionen, Möglichkeit zur Segmentierung der Zählratenkurve und weiterer Programmverwaltung ist im Anhang C zu finden. Dort wird ebenfalls das zur Anpassung der theoretischen Kurven verwendete Programm aufgeführt.

```

1  grob=0;
2  i:=2;
3  tau[1]:=0;
4  %tau erhöhen bis Wert inklusive Vergrößerung länger als Messung:
5  solange tau[i-1]+2^grob < T_mess
6      tau[i]:=tau[i-1]+2^grob;
7      i:=i+1;
8      %Vergrößerungsschritt alle acht tau-Werte:
9      wenn 8 teilt i-2 und i > 8 dann
10         grob:=grob+1;
11     ende
12 ende
13 %letzter tau-Wert überragt Messung:

```

```

14 entferne tau[i];
15
16 grob:=0;
17 für i von 1 bis länge(tau)
18     summe_a:=0;
19     für j von 1 bis länge(zeit_a)
20         wenn zeit_a[j] <= T_mess - tau[i]
21             summe_a:=summe_a+gew_a[j];
22         ende
23     ende
24     %Teilung durch Anzahl in die Summe eingeflossener Segmente:
25     summe_a:=summe_a/(T_mess - tau[i])*2^grob;
26
27     summe_b:=0;
28     für j von 1 bis länge(zeit_b)
29         wenn zeit_b[j] >= tau[i]
30             summe_b:=summe_b+gew_b[j];
31         ende
32     ende
33     summe_b:=summe_b/(T_mess - tau[i])*2^grob;
34
35     G[i]:=0;
36     für j von 1 bis länge(zeit_a)
37         für k von 1 bis länge(zeit_b)
38             wenn zeit_b[k] = zeit_a[j] + tau[i] dann
39                 G[i]:=G[i]+gew_a[j]*gew_b[k];
40             ende
41         ende
42     ende
43     G[i]:=G[i]/(T_mess-tau[i])*2^grob/summe_a/summe_b-1;
44
45     wenn 8 teilt i und i > 8 dann
46         grob:=grob+1;
47         k:=1;
48         gew_neu[1]:=0;
49         für j von 1 bis länge(zeit_a)
50             zeit_a[j]:=abrunden(zeit_a[j]/2^grob)*2^grob;
51             %auffinden von Photonen in identischen Segmenten:
52             wenn j > 1 und zeit_a[j] = zeit_a[j-1] dann
53                 gew_neu[k]:=gew_neu[k]+gew_a[j];
54             sonst
55                 zeit_neu[k]:=zeit_a[j];
56                 k:=k+1;
57             ende
58         ende
59         zeit_a:=zeit_neu;
60         gew_a:=gew_neu/2;
61
62         k:=1;
63         gew_neu[1]:=0;

```

```

64         für j von 1 bis länge(zeit_b)
65             zeit_b[j]:=abrunden(zeit_b[j]/2^grob)*2^grob;
66             wenn j > 1 und zeit_b[j] = zeit_b[j-1] dann
67                 gew_neu[k]:=gew_neu[k]+gew_b[j];
68             sonst
69                 zeit_neu[k]:=zeit_b[j];
70                 k:=k+1;
71             ende
72         ende
73         zeit_b:=zeit_neu;
74         gew_b:=gew_neu/2;
75     ende
76 ende
77 %umrechnen von Segmenten auf Zeit:
78 tau:=tau*t_bin;

```

3.4.7. Korrekturen

Die mit dem im vorherigen Abschnitt vorgestellten Programm erhaltenen experimentellen Korrelationskurven können aus einer Vielzahl von Gründen von den theoretisch erwarteten abweichen. Für einen Teil davon wurden Korrekturmöglichkeiten entwickelt, die im Folgenden vorgestellt und zum Teil in Teil II angewandt werden.

3.4.7.1. Hintergrund

Die häufigste und zugleich am einfachsten zu korrigierende Art von Abweichungen ist eine nicht auf die betrachteten Spezies zurückzuführende Fluoreszenzintensität $B(t)$, deren Quelle unter anderem das Dunkelrauschen der Detektoren, einfallendes Umgebungslicht, RAMAN-Streuung am Lösungsmittel, nicht herausgefiltertes Anregungslicht und fluoreszente Verunreinigungen sind. Bis auf den letzten Punkt weisen diese Phänomene normalerweise entweder keine merkliche Korrelation auf oder diese klingt deutlich schneller ab als die interessierenden Prozesse, sodass

$$\langle \delta B_a(t) \cdot \delta B_b(t + \tau) \rangle \approx 0. \quad (3.189)$$

In diesem Fall machen sie sich nur im Nenner von $\tilde{G}_{a,b}(\tau)$ bemerkbar und man erhält mit Gl. 3.106 sofort (KOPPEL, 1974)

$$\tilde{G}_{a,b}(\tau) = \frac{\langle \delta(F_a(t) + B_a(t)) \cdot \delta(F_b(t + \tau) + B_b(t + \tau)) \rangle}{\langle F_a(t) + B_a(t) \rangle \langle F_b(t) + B_b(t) \rangle} \quad (3.190)$$

$$= \frac{\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle}{(\langle F_a(t) \rangle + \langle B_a(t) \rangle) (\langle F_b(t) \rangle + \langle B_b(t) \rangle)} \quad (3.191)$$

$$= \frac{\langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle}{(\langle F_a(t) \rangle + \langle B_a(t) \rangle) (\langle F_b(t) \rangle + \langle B_b(t) \rangle)} G_{a,b}(\tau). \quad (3.192)$$

Hier und im weiteren Verlauf dieses Abschnitts bezeichnet die Tilde auf einer Variable die von dem jeweiligen Effekt beeinflusste, zu korrigierende Größe. Durch den unkorrelierten Hintergrund

verringert sich die Amplitude der Korrelation, sodass diese gemäß

$$\mathfrak{A} = \frac{\langle \tilde{F}_a(t) \rangle \langle \tilde{F}_b(t) \rangle}{\left(\langle \tilde{F}_a(t) \rangle - \langle B_a(t) \rangle \right) \left(\langle \tilde{F}_b(t) \rangle - \langle B_b(t) \rangle \right)} \tilde{\mathfrak{A}} \quad (3.193)$$

korrigiert werden müssen. Fluoreszente Verunreinigungen mit nicht vernachlässigbarer Korrelation auf den interessierenden Zeitskalen tragen nach Gl. 3.109 proportional zum Produkt ihrer Konzentration und dem Quadrat ihrer molekularen Helligkeit bei, sodass auch größere Mengen sehr dunkler Teilchen sich noch nicht störend auswirken müssen, wohingegen schon sehr wenige, aber helle Teilchen in der Auswertung berücksichtigt werden sollten.

3.4.7.2. Übersprechen und Kreuzanregung

In den meisten praktischen Anwendungen werden bei der dcFCCS die eingesetzten Fluorophore so gewählt, dass jedes davon möglichst von nur einem Laser angeregt und in nur einem Kanal detektiert wird, also $\overline{Q}_{a,i} \overline{Q}_{b,i} \approx 0$. Kann dies nicht garantiert werden, finden sich Beiträge der idealisierten Korrelationsfunktionen im jeweils anderen Kanal wieder und die Kreuzkorrelationsamplitude wird artifiziell erhöht, da die Emission jeder Spezies eine perfekte Kreuzkorrelation mit sich selbst produziert. *Übersprechen* bezeichnet hierbei die Detektion eines Fluorophors in seinem weniger hellen Kanal und *Kreuzanregung* die Anregung mit dem Laser der schwächer absorbierten Wellenlänge. Letzteres ist bei Verwendung von Dauerstrichlasern meist nicht relevant, da es lediglich die Helligkeit der Fluorophore in beiden Kanälen um den gleichen Faktor erhöht.

Zur Quantifizierung wird hier das Übersprechverhältnis $\kappa_{a \rightarrow b}$ eingeführt, welches als Verhältnis der mittleren Intensität einer (allein vorliegenden) Spezies im unerwünschten Kanal (hier b) zu derjenigen im erwünschten Kanal (hier a) definiert wird:

$$\kappa_{a \rightarrow b, i} = \frac{\langle \tilde{F}_b(t) \rangle}{\langle F_a(t) \rangle} = \frac{\overline{Q}_{b,i} \Omega_b}{\overline{Q}_{a,i} \Omega_a}. \quad (3.194)$$

Hieraus ergibt sich nun für die Fluoreszenzintensität eines Kanals

$$\tilde{F}_a(t) = F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \quad (3.195)$$

und für die Korrelationsfunktionen

$$\tilde{G}_a(\tau) = \frac{\langle (F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t)) \cdot (F_a(t + \tau) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t + \tau)) \rangle}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle^2} - 1 \quad (3.196)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{G_a(\tau) \langle F_a(t) \rangle^2 + \kappa_{b \rightarrow a}^2 G_b(\tau) \langle F_b(t) \rangle^2}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle^2} \\ &+ \frac{\kappa_{b \rightarrow a} (G_{a,b}(\tau) + G_{b,a}(\tau)) \langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle^2} \end{aligned} \quad (3.197)$$

$$\tilde{G}_{a,b}(\tau) = \frac{\langle (F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t)) \cdot (F_b(t + \tau) + \kappa_{a \rightarrow b} F_a(t + \tau)) \rangle}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle \langle F_b(t) + \kappa_{a \rightarrow b} F_a(t) \rangle} - 1 \quad (3.198)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{(G_{a,b}(\tau) + \kappa_{a \rightarrow b} \kappa_{b \rightarrow a} G_{b,a}(\tau)) \langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle \langle F_b(t) + \kappa_{a \rightarrow b} F_a(t) \rangle} \\ &\quad + \frac{\kappa_{a \rightarrow b} G_a(\tau) \langle F_a(t) \rangle^2 + \kappa_{b \rightarrow a} G_b(\tau) \langle F_b(t) \rangle^2}{\langle F_a(t) + \kappa_{b \rightarrow a} F_b(t) \rangle \langle F_b(t) + \kappa_{a \rightarrow b} F_a(t) \rangle}. \end{aligned} \quad (3.199)$$

Die „Korrektur“ entspricht nun der Lösung dieses Gleichungssystems mit den Werten der beiden Auto- sowie der Kreuzkorrelationsfunktion zur Berechnung der idealisierten Kurven in Abwesenheit der unerwünschten Effekte (BACIA *et al.*, 2012). Hierzu werden zuvor die mittleren Fluoreszenzintensitäten nach

$$\langle F_a(t) \rangle = \frac{\langle \tilde{F}_a(t) \rangle - \kappa_{b \rightarrow a} \langle \tilde{F}_b(t) \rangle}{1 - \kappa_{a \rightarrow b} \kappa_{b \rightarrow a}} \quad (3.200)$$

gleichfalls um diese bereinigt und die korrigierten Intensitäten wiederum zur Korrektur der Korrelationen herangezogen (hierfür wurde $G_{b,a}(\tau) = G_{a,b}(\tau)$ vorausgesetzt):

$$\begin{pmatrix} G_a(\tau) \langle F_a(t) \rangle^2 \\ G_b(\tau) \langle F_b(t) \rangle^2 \\ G_{a,b}(\tau) \langle F_a(t) \rangle \langle F_b(t) \rangle \end{pmatrix} = \mathbf{K} \begin{pmatrix} \tilde{G}_a(\tau) \langle \tilde{F}_a(t) \rangle^2 \\ \tilde{G}_b(\tau) \langle \tilde{F}_b(t) \rangle^2 \\ \tilde{G}_{a,b}(\tau) \langle \tilde{F}_a(t) \rangle \langle \tilde{F}_b(t) \rangle \end{pmatrix}. \quad (3.201)$$

Die KorrekturmatriX \mathbf{K} setzt sich schließlich aus den beiden Übersprechverhältnissen zusammen:

$$\mathbf{K} = \frac{1}{(1 - \kappa_{a \rightarrow b} \kappa_{b \rightarrow a})^2} \begin{pmatrix} 1 & \kappa_{b \rightarrow a}^2 & -2\kappa_{b \rightarrow a} \\ \kappa_{a \rightarrow b}^2 & 1 & -2\kappa_{a \rightarrow b} \\ -\kappa_{a \rightarrow b} & -\kappa_{b \rightarrow a} & 1 + \kappa_{a \rightarrow b} \kappa_{b \rightarrow a} \end{pmatrix}. \quad (3.202)$$

Diese Prozedur ist nur anwendbar, wenn entweder nur eine Spezies in jedem Kanal registriert wird oder alle in einem Kanal registrierten Spezies dasselbe Übersprechverhältnis aufweisen, da nur so Gl. 3.195 mit den messbaren Gesamtintensitäten erfüllt sein kann. Weiterhin verbleibt notwendigerweise eine leichte Abweichung auch im besten Falle, da die Emission eines Fluorophors im „richtigen“ und „falschen“ Kanal aufgrund der verschiedenen Filter üblicherweise nicht bei den gleichen Wellenlängen erfolgen und damit auch neue MDFs aufweisen, insofern beispielsweise der grüne Laserfokus mit der CEF des roten Kanals kombiniert wird.

3.4.7.3. Fokusüberlappung

Kennt man bei der FCCS die MDF jedes einzelnen Kanals, hängt das effektive Kreuzkorrelationsvolumen nur noch von der räumlichen Position und Ausrichtung dieser zueinander ab. Das kleinste Volumen und damit die höchste Amplitude ergibt sich bei einer möglichst starken Überlappung im Sinne eines Zusammentreffens der jeweiligen Bereiche mit den größten Werten der MDF. Für die hier betrachteten zylindersymmetrischen Foki ist dies bei konzentrischer Überlagerung und Parallelität der Symmetrieachsen der Fall. Die Quantifizierung des

Grades der Überlappung, die Korrektur unvollständiger Überlappung sowie deren Einfluss auf die Durchführung von Bindungsexperimenten sind Gegenstand von Kapitel 4 und sollen hier nicht vorweggenommen werden.

3.4.7.4. Teilchenausdehnung

In allen bisherigen Ausführungen wurde implizit angenommen, dass die betrachteten Teilchen jeweils einen so kleinen Bereich der MDF einnehmen, dass deren Wert über ihre Ausdehnung hinweg nur vernachlässigbar variiert und somit näherungsweise von *Punktteilchen* gesprochen werden kann. Für die in Kapitel 4 und 5 eingesetzten Lipidvesikel mit Durchmessern bis über 100 nm ist das nicht mehr ohne Weiteres gegeben und der Einfluss dieser verletzten Annahme auf die interessierenden F(C)CS-Parameter muss quantifiziert werden.

Ein ausgedehntes Teilchen ist in Bezug auf die Korrelationsamplitude nur als solches erkennbar, wenn es mehr als nur ein Fluorophor trägt, da das restliche „Material“ nicht sichtbar ist⁷⁸. Ist dies gegeben, können diese Teilchen nun als Verbund gemeinsam diffundierender Fluorophore beschrieben werden, wobei jene untereinander keine feste räumliche Beziehung aufrechterhalten müssen (etwa bei Diffusion in der Membran eines selbst durch den Fokus diffundierenden Vesikels). Der Beitrag jedes einzelnen dieser Fluorophore zur Gesamthelligkeit des Teilchens ergibt sich wiederum als Produkt seiner molekularen Helligkeit und der MDF an dessen Position (im Teilchenkoordinatensystem als $\vec{r}_i = \vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i$ geschrieben), weswegen die Summe selbst nicht mehr als ein solches Produkt mit der MDF an einem einzelnen, dem Teilchen zuzuweisenden Ort \vec{r}_T geschrieben werden kann:

$$F_T(t) = \sum_{i=1}^{n_F} Q_i(\vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_i) P(\vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) \quad (3.203)$$

$$= \sum_{i=1}^{n_F} Q_i(\vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i) P(\Delta \vec{r}_i, \vec{R}_i, Z_i, t) P(\vec{r}_T, t). \quad (3.204)$$

In der zweiten Zeile wurde angenommen, dass die Bewegung der Fluorophore auf dem Teilchen und dessen übergeordnete Bewegung durch den Fokus voneinander unabhängig sind.

Eine mögliche Lösung ist nun die Zuweisung einer eigenen, modifizierten MDF $\widetilde{W}(\vec{r}_T)$ für jede Spezies, die genau diese Bedingung erfüllt (MÜLLER *et al.*, 2008):

$$Q_T(\vec{R}_T, Z_T, t) \widetilde{W}(\vec{r}_T) = \sum_{i=1}^{n_F} Q_i(\vec{R}_i, Z_i, t) W(\vec{r}_i). \quad (3.205)$$

Leider ist eine vollständige Aufteilung der Positions- und anderen Abhängigkeiten auf zwei unabhängige Faktoren, und damit auch die Aufteilung von $G_{a,b}(\tau)$ in $\Theta(\tau)$ und $\Xi(\tau)$, im Allgemeinen nicht möglich, da etwa eine Rotation des Teilchens als Ganzes einzelne Fluorophore in verschiedene Bereiche des Fokus bringt, was die Gesamthelligkeit für verschiedene \vec{r}_T verschieden stark be-

⁷⁸Dieses könnte aber zu einer Verzerrung der MDF führen, insoweit es einen von der Umgebung verschiedenen Brechungsindex hat und die Anregungs- oder Fluoreszenzstrahlung dadurch streut oder absorbiert (ZUSTIAK *et al.*, 2012).

einflusst. Die Vektoren $\Delta \vec{r}'_i$ unterliegen ihrerseits ebenfalls einer Wahrscheinlichkeitsverteilung und einer möglichen zeitlichen Korrelation, sodass eine weitere Ebene zufälliger Fluktuationen entsteht, deren Auswirkungen auf die Gesamthelligkeit wieder von \vec{r}'_T bestimmt werden. Durch die – möglicherweise von der Position auf dem Teilchen eingeschränkte – Rotation individueller Fluorophore und der – wegen der auf dem Teilchen erzwungenen größeren räumlichen Nähe noch verstärkten – Wechselwirkung untereinander (Fluoreszenzlöschung, FRET, *etc.*) kann darüber hinaus auch Q_i nicht mehr als unabhängig von $\Delta \vec{r}'_i$ angesehen werden.

Die erwartete Intensität eines Teilchens zumindest ist von der Zuordnung der Fluorophore zu einem Teilchen unbeeinflusst, da, in einer praktisch unbegrenzten Probe, weiterhin jede Position mit derselben Wahrscheinlichkeit eingenommen wird⁷⁹:

$$\int_{-\infty}^{\infty} W(x_T + \Delta x_i) P(x_T) dx_T = \int_{-\infty}^{\infty} W(x_T) P(x_T) dx_T \quad (3.206)$$

$$\langle F_T(t) \rangle = \int \int \int \int F_T(t) d^3 \Delta \vec{r}' d^3 \vec{R} d^3 Z d^3 \vec{r}'_T \quad (3.207)$$

$$= \frac{\Omega_1}{V} \sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_i = \frac{\Omega_1}{V} \bar{Q}_T. \quad (3.208)$$

Die Korrelation identischer Teilchen spaltet sich hier nochmals auf in die Kombination identischer oder verschiedener Fluorophore auf einem bestimmten Teilchen

$$\begin{aligned} \langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle &= \sum_{i=1}^{n_F} \left\langle Q_{i,a}(\vec{R}_i, Z_i, t) W_a(\vec{r}'_i) Q_{i,b}(\vec{R}'_i, Z'_i, t) W_b(\vec{r}'_i) \right\rangle \\ &+ \sum_{\substack{i=1 \\ i \neq j}}^{n_F} \left\langle Q_{i,a}(\vec{R}_i, Z_i, t) W_a(\vec{r}'_i) Q_{j,b}(\vec{R}_j, Z_j, t) W_b(\vec{r}'_j) \right\rangle, \end{aligned} \quad (3.209)$$

wobei im Gegensatz zu frei diffundierenden Fluorophoren die Korrelation hier auch für $\tau \rightarrow \infty$ nicht vollständig verschwindet, da ihre Positionen auf die Ausdehnung des gemeinsamen Teilchens beschränkt sind. Die genaue zeitliche Abhängigkeit dieser Korrelation hängt sowohl von der Form des Teilchens als auch der Verteilung und Bewegungsmöglichkeiten der Fluorophore auf ihm ab und soll hier nicht weiter konkretisiert werden. Stattdessen wird angenommen, dass bei τ die Korrelationen der relativen Positionen und der Helligkeit bereits abgeklungen sind, sodass $P(\{\Delta \vec{r}'_i, 0\} \cap \{\Delta \vec{r}'_j, \tau\}) \approx P(\Delta \vec{r}'_i, 0) \cdot P(\Delta \vec{r}'_j, 0)$ gilt, und zusätzlich die Positionen als unabhängig von den anderen Variablen angesehen werden können⁸⁰:

$$\langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle \approx \sum_{i,j}^{n_F} \left\langle Q_{i,a}(\vec{R}_i, Z_i, t) W_a(\vec{r}'_i) Q_{j,b}(\vec{R}_j, Z_j, t) W_b(\vec{r}'_j) \right\rangle \quad (3.210)$$

$$\approx \sum_{i,j}^{n_F} \left\langle Q_{i,a}(\vec{R}_i, Z_i, t) Q_{j,b}(\vec{R}_j, Z_j, t) \right\rangle \langle W_a(\vec{r}'_i) W_b(\vec{r}'_j) \rangle \quad (3.211)$$

⁷⁹Die drei inneren Integrale stehen hier jeweils für n_F Integrale der Form $\int \dots \int f(x_1, \dots, x_{n_F}) dx_1 \dots dx_{n_F}$.

⁸⁰Die Helligkeitskorrelationsfunktionen $\Theta_{i,j}(\tau)$ können für sich für verschiedene Fluorophore unterscheiden und sind für $i \neq j$, aufgrund des Ausschlusses abstandsabhängiger Helligkeitsvariationen wie etwa FRET, normalerweise gleich eins.

$$\begin{aligned}
&= \sum_{i,j}^{n_F} \bar{Q}_{i,a} \bar{Q}_{j,b} \Theta_{i,j}(\tau) \int \int \int \int W_a(\vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i) W_b(\vec{r}'_T + \Delta \vec{r}_j) P(\Delta \vec{r}_i, 0) \\
&\quad P(\Delta \vec{r}_j, 0) P(\{\vec{r}'_T, \tau\} | \{\vec{r}_T, 0\}) \frac{1}{V} d^3 \Delta \vec{r}_i d^3 \Delta \vec{r}_j d^3 \vec{r}_T d^3 \vec{r}'_T. \tag{3.212}
\end{aligned}$$

Das Integral der damit zeitunabhängigen Verteilungen der relativen Positionen hat die Form einer (mathematischen) Kreuzkorrelation und kann nach Gl. 3.58 als Faltung geschrieben werden, welche über eine Fouriertransformation nach Gl. 3.60 zu einem Produkt wird:

$$\int W_{(a,b)}(\vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i) P(\Delta \vec{r}_i, 0) d^3 \Delta \vec{r}_i = (W_{(a,b)} \star P_i)(\vec{r}_T) \tag{3.213}$$

$$= \widetilde{W}_{(a,b),i}(\vec{r}_T) \tag{3.214}$$

$$\mathcal{F}(\widetilde{W}_{(a,b),i}) = (2\pi)^{n/2} \mathcal{F}(W_{(a,b)}) \cdot \mathcal{F}(P_i)^*. \tag{3.215}$$

Hierbei wurde nun mit $\widetilde{W}(\vec{r})$ eine (teilchen- und möglicherweise auch fluorophorspezifische) modifizierte MDF eingeführt, welche die Gleichgewichtsverteilung der relativen Positionen der Fluorophore berücksichtigt und Gl. 3.212 in dieselbe Form wie in Gl. 3.84 überführt. Der Einfachheit halber wird ab hier von Fluorophoren mit identischer Helligkeit und Verteilung ausgegangen:

$$\begin{aligned}
\langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle &\approx \sum_{i,j}^{n_F} \bar{Q}_{i,a} \bar{Q}_{j,b} \Theta_{i,j}(\tau) \int \int \widetilde{W}_{a,i}(\vec{r}_T) \widetilde{W}_{b,j}(\vec{r}'_T) \\
&\quad \cdot P(\{\vec{r}'_T, \tau\} | \{\vec{r}_T, 0\}) \frac{1}{V} d^3 \vec{r}_T d^3 \vec{r}'_T \tag{3.216}
\end{aligned}$$

$$= \frac{1}{V} \sum_{i,j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j} \Theta_{i,j}(\tau) \widetilde{\Xi}_{i,j}(\tau) \widetilde{\Omega}_{1,a,i;1,b,j} \tag{3.217}$$

$$= \frac{1}{V} \bar{Q}_{a,T} \bar{Q}_{b,T} \Theta_{n_F}(\tau) \widetilde{\Xi}(\tau) \widetilde{\Omega}_{1,a;1,b}. \tag{3.218}$$

Die modifizierte Positionskorrelationsfunktion $\widetilde{\Xi}(\tau)$ verläuft weiterhin zwischen den Randwerten null und eins, ist aber in ihrem Zeitverlauf verändert, was, mit der Abkürzung $P_\Delta = P(\Delta \vec{r}, 0)$ und unter den oben aufgeführten Vorbedingungen, über eine Ergänzung von Gl. 3.141 dargestellt werden kann:

$$\widetilde{\Xi}(\tau) = \frac{(2\pi)^{3n/2}}{\widetilde{\Omega}_{1,a;1,b}} \int [\mathcal{F}(W_a) \mathcal{F}(P_\Delta)^*] \cdot [\mathcal{F}(W_b) \mathcal{F}(P_\Delta)^*]^* \cdot \mathcal{F}(P(\tau))^* d^3 \vec{k} \tag{3.219}$$

$$= \frac{(2\pi)^{3n/2}}{\widetilde{\Omega}_{1,a;1,b}} \int \mathcal{F}(W_a) \mathcal{F}(W_b)^* |\mathcal{F}(P_\Delta)|^2 \mathcal{F}(P(\tau))^* d^3 \vec{k}. \tag{3.220}$$

Von besonderem Interesse für die praktischen Experimente in Teil II ist der Einfluss der Teilchengröße auf die F(C)CS-Amplituden, sodass zuletzt noch der Grenzfall $\tau \rightarrow 0$ behandelt werden

soll⁸¹:

$$\begin{aligned} \lim_{\tau \rightarrow 0} \langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle &= \sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} \Theta_{i,i}(\tau) \langle W_a(\vec{r}_i) W_b(\vec{r}_i) \rangle \\ &+ \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j} \Theta_{i,j}(\tau) \langle W_a(\vec{r}_i) W_b(\vec{r}_j) \rangle \end{aligned} \quad (3.221)$$

$$\begin{aligned} \langle W_a(\vec{r}_i) W_b(\vec{r}_i) \rangle &= \int \int W_a(\vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i) W_b(\vec{r}_T + \Delta \vec{r}_i) \\ &\cdot P(\Delta \vec{r}_i, 0) \frac{1}{V} d^3 \Delta \vec{r}_i d^3 \vec{r}_T \end{aligned} \quad (3.222)$$

$$= \frac{1}{V} \int (W_a W_b \star P_i)(\vec{r}_T) d^3 \vec{r}_T \quad (3.223)$$

$$= \frac{1}{V} (2\pi)^{n/2} \mathcal{F}(W_a W_b \star P_i)(\vec{0}) \quad (3.224)$$

$$= \frac{1}{V} (2\pi)^n \mathcal{F}(W_a W_b)(\vec{0}) \cdot \mathcal{F}(P_i)(\vec{0})^*. \quad (3.225)$$

In der vorletzten Zeile wurde hier (siehe Gl. 3.61)

$$\mathcal{F}(f(\vec{x}))(\vec{0}) = \frac{1}{(2\pi)^{n/2}} \int_{\mathbb{R}^n} f(\vec{x}) d^n \vec{x} \quad (3.226)$$

benutzt, wobei der Vorfaktor in der letzten Zeile durch Verwendung von Gl. 3.60 quadriert wird. Da die Wahrscheinlichkeitsdichten stets auf ein Raumintegral von eins normiert sind, gilt mit dem eben gesagten auch $\mathcal{F}(P_i)(\vec{0}) = (2\pi)^{-n/2}$ und damit

$$\int (W_a W_b \star P_i)(\vec{r}_T) d^3 \vec{r}_T = (2\pi)^{n/2} \mathcal{F}(W_a W_b)(\vec{0}) \quad (3.227)$$

$$= \int W_a(\vec{r}) W_b(\vec{r}) d^3 \vec{r} = \Omega_{1,a;1,b}. \quad (3.228)$$

Der Fall $\langle W_a(\vec{r}_i) W_b(\vec{r}_j) \rangle$ mit $i \neq j$ wurde bereits mit Gl. 3.217 behandelt, sodass sich zusammen

$$\begin{aligned} \lim_{\tau \rightarrow 0} \langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle &= \sum_{i=1}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i} \Theta_{i,i}(0) \frac{1}{V} \Omega_{1,a;1,b} \\ &+ \sum_{i \neq j}^{n_F} \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,j} \frac{1}{V} \tilde{\Omega}_{1,a;i;1,b,j} \end{aligned} \quad (3.229)$$

$$= \frac{1}{V} \bar{Q}_a \bar{Q}_b \left[n_F \Theta_1(0) \Omega_{1,a;1,b} + n_F (n_F - 1) \tilde{\Omega}_{1,a;1,b} \right]. \quad (3.230)$$

ergibt, wobei die zweite Zeile wieder den Fall identischer Fluorophore auf dem Teilchen darstellt. Man erkennt hierbei die Ähnlichkeit zu Gl. 3.117. Für die modifizierte Amplitude $\tilde{\mathfrak{A}}$ – abermals mit der Teilchenzahl N , dem Grenzübergang $V \rightarrow \infty$, dem Wegfallen der Korrelation unterschiedlicher Teilchen und wie oben unter Ausschluss der zusätzlichen Helligkeitskorrelation nach

⁸¹Hier wird $\lim_{\tau \rightarrow 0} P(\{\vec{r}'_T, \tau\} | \{\vec{r}_T, 0\}) = \delta(\vec{r}'_T - \vec{r}_T)$ und $\lim_{\tau \rightarrow 0} P(\{\Delta \vec{r}'_i, \tau\} | \{\Delta \vec{r}_i, 0\}) = \delta(\Delta \vec{r}'_i - \Delta \vec{r}_i)$ sowie eine unabhängige Verteilung verschiedener Fluorophore auf einem Teilchen nach $P(\Delta \vec{r}_i \cap \Delta \vec{r}_j, 0) = P(\Delta \vec{r}_i, 0) \cdot P(\Delta \vec{r}_j, 0)$ vorausgesetzt.

$\Theta_1(0) \approx 1$ – relativ zur Amplitude äquivalenter Punktteilchen mit derselben Zahl Fluorophore erhält man nun

$$\tilde{\mathfrak{A}} = \lim_{\tau \rightarrow 0} \frac{N \langle F_{T,a}(0) \cdot F_{T,b}(\tau) \rangle}{\langle N F_{T,a}(t) \rangle \langle N F_{T,b}(t) \rangle} \quad (3.231)$$

$$V \rightarrow \infty$$

$$= \frac{\bar{Q}_a \bar{Q}_b \left[n_F \Omega_{1,a;1,b} + n_F (n_F - 1) \tilde{\Omega}_{1,a;1,b} \right]}{\bar{Q}_{T,a} \bar{Q}_{T,b} \Omega_{1,a} \Omega_{1,b}} \quad (3.232)$$

$$= \frac{1}{\Omega_{1,a} \Omega_{1,b}} \left[\frac{1}{n_F} \Omega_{1,a;1,b} + \frac{n_F - 1}{n_F} \tilde{\Omega}_{1,a;1,b} \right] \quad (3.233)$$

$$\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} = \frac{1}{n_F} + \frac{n_F - 1}{n_F} \frac{\tilde{\Omega}_{1,a;1,b}}{\Omega_{1,a;1,b}}. \quad (3.234)$$

Für einzelne Fluorophore auf einem ausgedehnten Teilchen bestätigt sich das zu Anfang des Abschnitts Behauptete, da für $n_F = 1$ tatsächlich $\tilde{\mathfrak{A}} = \mathfrak{A}$ folgt. In den experimentellen Arbeiten gilt hingegen $n_F \gg 1$, weshalb für Quantifizierung der Abweichungen

$$\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} \approx \frac{\tilde{\Omega}_{1,a;1,b}}{\Omega_{1,a;1,b}} \quad (3.235)$$

angenommen wird und somit

$$\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} = (2\pi)^n \frac{\int \mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \mathcal{F}(W_b)(\vec{k})^* \left| \mathcal{F}(P_\Delta)(\vec{k}) \right|^2 d^3 \vec{k}}{\int \mathcal{F}(W_a)(\vec{k}) \mathcal{F}(W_b)(\vec{k})^* d^3 \vec{k}}. \quad (3.236)$$

Dieses Verhältnis muss stets unter eins liegen, da, aufgrund der oben bereits erwähnten Normierung der Wahrscheinlichkeitsdichte, $\left| \mathcal{F}(P_\Delta)(\vec{0}) \right|^2 = (2\pi)^{-n}$ gelten muss und für die überall positive Funktion P_Δ bei $k \neq 0$, wo Bereiche der Funktion negativ gewichtet werden, die Fouriertransformierte $\mathcal{F}(P_\Delta)(\vec{k})$ unter diesen Wert sinken muss. Das Maximum ergibt sich damit für die, einem Punktteilchen entsprechende, DIRAC'schen Deltadistribution mit ihrer konstanten Fouriertransformierten.

Als Beispiel soll eine homogene Verteilung auf einer (unendlichen dünnen) Kugelschale des Radius R dienen, womit man (mit Gl. 3.145, siehe auch [VEMBU, 1961](#))

$$P_{\Delta,KS} = \frac{1}{4\pi R^2} \delta(|\Delta \vec{r}| - R) \quad (3.237)$$

$$\left| \mathcal{F}(P_{\Delta,KS})(\vec{k}) \right|^2 = \frac{1}{8\pi^3} \left[\frac{\sin(kR)}{kR} \right]^2 \quad (3.238)$$

erhält. Selbst für den einfachsten Fall des 3DG-Modells kann das obige Integral nur bei kugelsymmetrischer MDF mit $S = 1$ analytisch gelöst werden:

$$\left(\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} \right)_{KS} = \frac{1 - e^{-4\varrho^2}}{4\varrho^2} \quad (3.239)$$

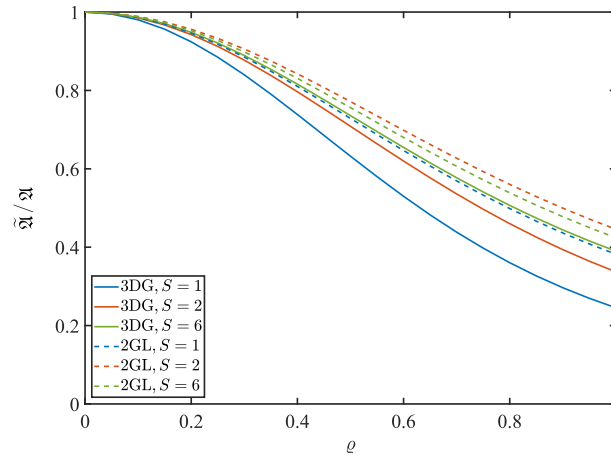


Abbildung 3.16.: Darstellung der Abhängigkeit der durch die endliche Ausdehnung der fluoreszenten Teilchen modifizierten Amplitude $\tilde{\mathfrak{A}}$ der Korrelationsfunktion relativ zum Fall eines Punktteilchens mit \mathfrak{A} vom reduzierten Teilchenradius ϱ . Die Form wird als eine Kugelschale angenommen. Die MDF entspricht dem 3DG- bzw. 2GL-Modell mit verschiedenen Strukturparametern S .

$$\varrho = R/\sqrt{\frac{\omega_{xy,a}^2 + \omega_{xy,b}^2}{2}}. \quad (3.240)$$

Die relative Amplitude hängt hierbei allein vom reduzierten Teilchenradius ϱ ab und sinkt bis $\varrho = 0,16$ um lediglich 5 % ab. Für steigende Strukturparameter verringert sich diese Abweichung zusätzlich, was durch numerische Lösung der Integrale ersichtlich ist (siehe Abb. 3.16). Die entsprechende Berechnung für das 2GL-Modell erfordert wegen der nicht geschlossen darstellbaren Fouriertransformation einen deutlich erhöhten Aufwand bei der numerischen Integration.

Der Vollständigkeit halber sollen noch Formeln für das 2DG-Modell bei homogener Verteilung auf einer Kreisscheibe (mit der HEAVISIDE'schen *Stufenfunktion* H)

$$P_{\Delta, \text{Kreis}} = \frac{1}{\pi R^2} H(R - |\Delta \vec{r}'|) \quad (3.241)$$

$$\left| \mathcal{F}(P_{\Delta, \text{Kreis}})(\vec{k}) \right|^2 = \frac{1}{\pi} \frac{J_1(kR)}{kR} \quad (3.242)$$

$$\left(\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} \right)_{\text{Kreis}} = \frac{1 - e^{-\varrho^2}}{\varrho^2} \quad (3.243)$$

und auf einem (unendlichen dünnen) Kreisring vorgestellt werden:

$$P_{\Delta, \text{Ring}} = \frac{1}{2\pi R} \delta(|\Delta \vec{r}'| - R) \quad (3.244)$$

$$\left| \mathcal{F}(P_{\Delta, \text{Ring}})(\vec{k}) \right|^2 = \frac{1}{2\pi} J_0(kR) \quad (3.245)$$

$$\left(\frac{\tilde{\mathfrak{A}}}{\mathfrak{A}} \right)_{\text{Ring}} = e^{-\varrho^2}. \quad (3.246)$$

3.5. Bindung

Unter dem Schlagwort „Bindung“ wird hier das primär aus der Biochemie und Pharmazie stammende Konzept der meist reversiblen, meist nicht-kovalenten Wechselwirkung eines *Liganden* mit einer *Bindestelle* (engl. *binding site*) eines meist größeren *Zielmolekül* (engl. *target*), oft einem Protein, oder auch einer Grenzfläche (dann auch als *Adsorption* bezeichnet) verstanden, deren Stärke, oder Affinität, oft in Form der thermodynamischen Gleichgewichtskonstanten der entsprechenden Umkehrreaktion, der *Dissoziationskonstanten*

$$K_D = \frac{a_L a_M}{a_{LM}} \approx \frac{c_L c_M}{c_{LM}} \quad (3.247)$$

als Zusammenhang der Aktivitäten (bzw. näherungsweise der Konzentrationen) von Ligand (a_L), Zielmolekül (a_M) und Bindungspaar (a_{LM}), angegeben wird. Die Untersuchung von Bindungsprozessen und die Entwicklung spezifischer Liganden für bestimmte Zielproteine sind wichtige Bereiche der modernen Biowissenschaften und insbesondere der Medikamentenforschung.

Die Komplexität des betrachteten Systems steigt rasch an, wenn das Zielmolekül mehrere, wöglich verschiedene, Bindestellen aufweist und zusätzlich mehr als eine Spezies von Liganden an diese binden können. Das klassische Beispiel hierfür ist das Hämoglobin, welches ein Heterotetramer aus zwei verschiedenen Untereinheiten mit insgesamt vier Bindestellen darstellt. Letztere können von verschiedenen Gasteilchen (Sauerstoff, Kohlenmonoxid und -dioxid, *etc.*) besetzt werden, was die räumliche Struktur des Proteins und damit wiederum die Affinität für weitere Bindungen verändert (sogenannter *allosterischer Effekt*, eine Form der *Kooperativität* zwischen Bindestellen). Der Besetzungsgrad

$$\theta = \frac{c_{LM}}{c_M + c_{LM}} = \frac{c_{LM}}{c_M^0} \quad (3.248)$$

einer Bindestelle (also der bei einem Ensemble im Gleichgewicht in besetzter Form vorliegende Anteil an der Gesamtkonzentration c_M^0 , später auch *Bindungsgrad* genannt) mit einem bestimmten Liganden ist damit eine komplexe Funktion der Konzentration aller Liganden, sowie der Temperatur und des pH-Wertes. Die Assoziation der Untereinheiten hängt weiterhin von der Besetzung mit Sauerstoff ab (CHU *et al.*, 1984), wie generell außer der Affinität anderer Bindestellen noch weitere molekulare Parameter (Oligomerisierung, Löslichkeit, Schmelzpunkt, *etc.*) an die Bindung *gekoppelt* sein können (engl. *linkage*, siehe WYMAN *et al.*, 1990).

Die Charakterisierung einer bestimmten Bindung erfolgt meist durch Angabe ihrer *Bindungskurve*, die den quantitativen Zusammenhang zwischen dem Bindungsgrad und der Konzentration des ungebundenen Liganden wiedergibt. Für den einfachsten Fall einer einzigen Bindestelle konstanter Affinität ergibt sich aus Gl. 3.247 und 3.248 das bereits in der Einleitung vorgestellte LANGMUIR-Modell (wegen der vorausgesetzten konstanten Temperatur auch LANGMUIR-Isotherme genannt):

$$\theta = \frac{c_L}{c_L + K_D} \quad (3.249)$$

Die zugehörige Bindungskurve hat auf linearer Skala eine hyperbolische Form (Abb. 3.17, links),

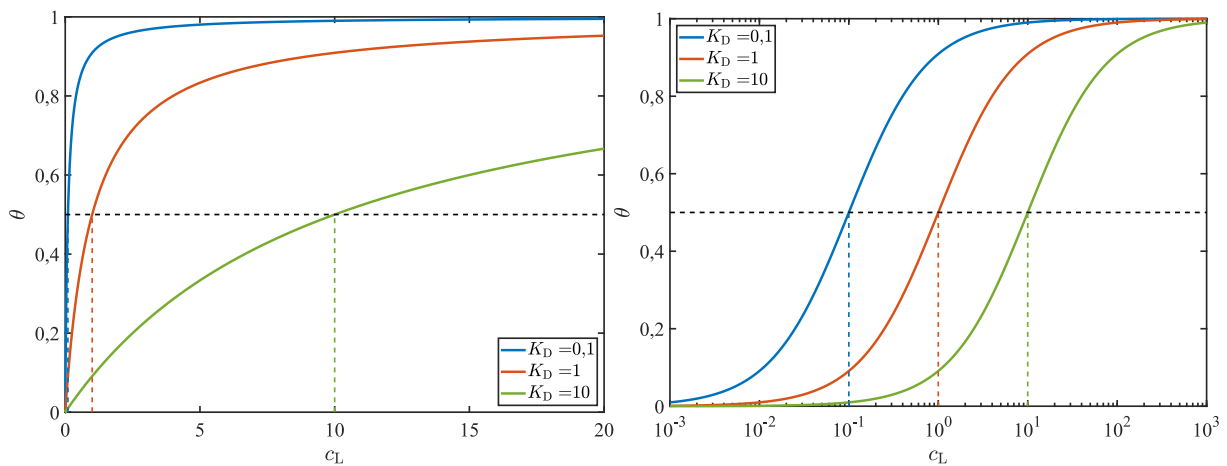


Abbildung 3.17.: Theoretische Bindungskurven nach dem LANGMUIR-Modell. Dargestellt ist die Abhängigkeit des Bindungsgrades θ von der Konzentration des ungebundenen Liganden c_L für verschiedene Werte der Dissoziationskonstanten K_D (durchgezogen) sowie die Positionen der Wendepunkte der Kurven (farbig gestrichelt), welche hier mit dem Halbhöhenwert (schwarz gestrichelt) zusammenfallen. Es wird sowohl eine lineare Auftragung der Abszisse (links) als auch eine logarithmische Auftragung (rechts) verwendet. Man erkennt die im letzteren Fall konstante Kurvenform und bessere visuelle Ablesbarkeit der Kurvenparameter über mehrere Größenordnungen der Affinität. Alle Konzentrationen sind in willkürlichen Einheiten gegeben.

wird aber oftmals, und so auch in dieser Arbeit, halblogarithmisch dargestellt, wodurch sie eine sigmoidale Form gewinnt (Abb. 3.17, rechts), deren großer Vorteil in der unmittelbaren Ablesbarkeit der Dissoziationskonstante als der Abszissenwert des Wendepunktes (bzw. Halbhöhenwertes) besteht. Die funktionelle Form gleicht vollkommen der FCS-Korrelationskurve für das 2DG-Modell (siehe 3.4.4 auf Seite 56).

Im hier wichtigen Fall von N_B identischen und unabhängig voneinander zu besetzenden Bindestellen auf einem Teilchen werden lediglich die Beiträge aller Bindestellen zur Gesamtzahl gebundener Liganden N_L addiert und man erhält

$$\langle N_L \rangle = N_B \frac{c_L}{c_L + K_D}. \quad (3.250)$$

Hierbei wurde nun explizit der Mittelwert von N_L eingeführt, da natürlich auf einem konkreten Teilchen auch im thermodynamischen Gleichgewicht eine zufällig fluktuierende Anzahl von Liganden vorgefunden würde (siehe auch Abschnitt 3.3.1). Da nach Voraussetzung alle Bindestellen dieselbe Wahrscheinlichkeit haben müssen, besetzt zu sein, ergibt sich eine Binomialverteilung für N_L bzw. für die zugehörigen Konzentrationen $c_{L,iM}$. Der Wert N_B entspricht dem Sättigungs- oder Endwert der Bindungskurve und ist neben ihrem Wendepunkt der zweite wichtige Parameter, da er die Stöchiometrie der Bindung an das Zielmolekül als Ganzes beschreibt.

Die unabhängige Bestimmung der freien Ligandenkonzentration kann im Idealfall umgangen werden, indem die experimentellen Bedingungen dergestalt gewählt werden, dass für die Konzentration der Bindestellen $N_B c_M^0 \ll K_D$ und $N_B c_M^0 \ll c_L^0$ erfüllt sind. Damit gilt in vertretbarer

Näherung $c_L \approx c_L^0$ und die Abszisse ist so genau bestimmbar wie die eingesetzte Konzentration des Liganden⁸². Dieser Ansatz versagt bei hochaffinen Liganden, da c_{LM} dort selbst im Sättigungsbereich unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten Messmethode liegen kann (BELLELLI *et al.*, 2018). In diesen Fällen muss entweder c_L direkt gemessen werden oder aus der Massenerhaltung zurückgerechnet werden⁸³:

$$c_L^0 = c_L + \sum_{i=1}^{N_B} i \cdot c_{L_iM} = c_L + \langle N_L \rangle c_M^0 = c_L + c_M^0 N_B \frac{c_L}{c_L + K_D}. \quad (3.251)$$

Für den Spezialfall der unabhängigen Bindestellen erhält man hieraus eine Gleichung zweiten Grades in c_L und daraus schließlich

$$c_L = \frac{1}{2} \left(c_L^0 - K_D - c_M^0 N_B + \sqrt{4c_L^0 K_D + (c_L^0 - K_D - c_M^0 N_B)^2} \right). \quad (3.252)$$

Wird diese Vorgehensweise zur Erstellung der Bindungskurve gewählt, kann als Abszisse nicht mehr die freie Ligandenkonzentration genutzt werden – dafür müssten die Bindungsparameter bereits im Vorhinein bekannt sein –, weshalb dann in ihrer Form verzerrte Kurven als Funktion der Gesamtkonzentration des Liganden erhalten wird (diese gleichen jenen in Abb. 3.18, links). Eine alternative Methode wird in Kapitel 5 vorgestellt werden, wo, unter Inkaufnahme einer Vergrößerung des Fehlers der Abszisse und Korrelation dieses mit jenem der Ordinate, die freie Ligandenkonzentration allein aus der Massenerhaltung über

$$c_L = c_L^0 - \langle N_L \rangle c_M^0 \quad (3.253)$$

gewonnen wird.

3.5.1. Korrelationsamplituden

In diesem Abschnitt sollen zur Vorbereitung der folgenden Anwendung von FCCS-Experimenten auf Bindungsphänomene zuerst die dafür genutzten Amplituden als Funktion der interessierenden bzw. notwendigerweise mitzubehaltenden Parameter gegeben werden.

Auf Grundlage von Gl. 3.108 und unter der Annahme bereits korrigierten oder zu vernachlässigenden Übersprechens sowie weiterer die Helligkeit in verschiedenen Kanälen und von verschiedenen Fluorophoren verbindenden Effekten wie FRET kann die Teilamplitude jeder Spezies der Korrelationsfunktionen als

$$\mathfrak{A}_{(a,b),i} = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},(a,b)}} \frac{c_i \bar{Q}_{(a,b),i}^2}{\left(\sum_j c_j \bar{Q}_{(a,b),j} \right)^2} \quad (3.254)$$

⁸²Aus Gl. 3.252 ergibt sich für die maximale relative Abweichung von dieser Annahme $\frac{N_B c_M^0}{N_B c_M^0 + K_D}$, sodass bei einer Fehlertoleranz von 1% die Bindestellenkonzentration einen Wert von $K_D/100$ nicht überschreiten sollte.

⁸³Das zweite Gleichheitszeichen ergibt sich aus der Erweiterung der Untergrenze der Summe auf den Fall gänzlich unbesetzter Zielmoleküle, da diese für $i = 0$ das Ergebnis nicht verändern.

$$\mathfrak{A}_{x,i} = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},x}} \frac{c_i \bar{Q}_{a,i} \bar{Q}_{b,i}}{\sum_j c_j \bar{Q}_{a,j} \cdot \sum_k c_k \bar{Q}_{b,k}} \quad (3.255)$$

geschrieben werden, wobei

$$\bar{Q}_{(a,b),i} = \sum_j n_{i,j} \bar{q}_{(a,b),j} \quad (3.256)$$

die Summe der Helligkeiten der mit einem Teilchen der i -ten Spezies assoziierten Fluorophoren ist, welche jeweils die einzelne Helligkeit $\bar{q}_{(a,b),j}$ besitzen und in der (möglicherweise stochastisch verteilten) Anzahl $n_{i,j}$ auf diesen Teilchen vertreten sind.

Allgemein betrachtet kann jeder Ligand in einer fluoreszenzmarkierten und einer unmarkierten Form vorhanden sein (Anteil der markierten Form χ_L , auch *Markierungsgrad* genannt) und die markierte Form mit mehreren, chemisch identischen und voneinander unabhängigen Fluorophoren stochastisch markiert sein (deren Anzahl folgt somit einer Binomialverteilung $B(\nu_L, \beta_L)$ mit der Zahl der Markierungsstellen ν_L und der Wahrscheinlichkeit ihrer Besetzung β_L). Für die Zielmoleküle bzw. größere Teilchen mit einer Anzahl Bindestellen N_B gilt nun dasselbe mit Fluorophoren einer anderen Farbe. Somit existieren in diesem System nur drei Anzahlvariablen: die Anzahl von Fluorophoren auf einem Liganden ($n_{L,a}$, Kanal a zugeordnet) und die Anzahl von Fluorophoren auf einem Zielmolekül ($n_{M,a}$ von den gebundenen Liganden und $n_{M,b}$ von dem Teilchen selbst).

Als durch die praktische Erfahrung mit den in Teil II betrachteten Systemen notwendig gewordenen Ergänzungen werden zusätzlich die Möglichkeit der Fluoreszenzlöschung bei Bindung, der nicht-bindungsfähigen Liganden, der Abweichung der in der Probe tatsächlich vorhandenen von der anvisierten Stoffmenge der Bindungspartner, des Einflusses der Fluoreszenzmarkierung auf die Bindungseigenschaften sowie des Vorliegens von Teilchen unterschiedlicher Anzahl von Bindestellen in Betracht gezogen:

- Die molekulare Helligkeit der Fluorophore der Liganden sinkt bei Bindung von \bar{q}_a auf $\zeta_a \bar{q}_a$ ab. Die Helligkeit der Fluorophore der Zielmoleküle ist davon nicht prinzipiell ausgenommen, allerdings hinge deren genaue Abnahme damit auf nicht vorhersagbare Weise von der Zahl gebundener Liganden ab, weshalb diese Möglichkeit hier nicht weiter behandelt wird.
- Lediglich der Anteil α_L des Liganden ist in der Lage an die Zielmoleküle zu binden, der Rest stellt beispielsweise falsch gefaltetes Protein oder von der Markierung zurückgebliebenen Farbstoff dar. Dieser Anteil ist unter Umständen abhängig von der Anwesenheit einer Fluoreszenzmarkierung ($\alpha_{L,m}$ und $\alpha_{L,u}$), wodurch der Markierungsgrad χ_L über alle Liganden betrachtet nicht mehr für die Teilmenge der freien Liganden gilt ($c_{L,m} \neq \chi_L c_L$). Für die Zielmoleküle gelten analoge Überlegungen, wenngleich die nicht mit Liganden besetzten Teilchen nicht gesonderte Beachtung finden und folglich χ_M zusammen mit $\alpha_{M,(u,m)}$ das System bereits vollständig charakterisiert.
- Von der eingesetzten Konzentration c_L^0 befindet sich nur $\gamma_L c_L^0$ in der Lösung, der übrige Ligand ist etwa durch Wechselwirkung mit den Probengefäßen oder Pipettenspitzen unbe-

absichtlich entfernt worden oder durch (konzentrationsabhängige) Aggregation ausgefallen. Auch hier ist eine Abhängigkeit sowohl von der Markierung als auch der Bindungsfähigkeit denkbar und das Konzept auf die Zielmoleküle erweiterbar. Der Einfachheit halber wird mit den tatsächlich in der Lösung vorhandenen Anteilen gerechnet und entsprechende Formeln zur Umrechnung auf die eingesetzten Anteile am Ende des Abschnitts gegeben.

- Die Dissoziationskonstante unterscheidet sich für markierte und unmarkierte Liganden der Konzentrationen $c_{L,m}$ bzw. $c_{L,u}$, sodass beide um dieselben Bindestellen konkurrieren. Der Bindungsgrad einer Bindestelle muss für beide Spezies unterschieden werden und für den Fall unabhängiger identischer Bindestellen bleibt die Form von Gl. 3.250 für beide Spezies getrennt erhalten, allerdings mit von der Konzentration der jeweils anderen Spezies abhängigen effektive Dissoziationskonstanten $K_{D,m} \mapsto \frac{1}{\xi} K_{D,u} + \frac{1}{\xi} c_{L,u}$ und $K_{D,u} \mapsto K_{D,u} + \xi c_{L,m}$ mit der relativen Affinität der markierten Liganden $\xi = K_{D,u}/K_{D,m}$. Für gleiche Affinitäten ($\xi = 1$) ergibt sich wieder eine Besetzung der Bindestellen entsprechend dem eingesetzten Markierungsgrad nach $\langle N_{L,m} \rangle = \chi_L (\langle N_{L,m} \rangle + \langle N_{L,u} \rangle)$, sofern nicht gleichzeitig noch $\alpha_{L,m} \neq \alpha_{L,u}$ gilt.
- Die Variable N_B ist abhängig von z. B. der Größe des individuellen Teilchens, sodass sie für praktische Zwecke einer Wahrscheinlichkeitsverteilung folgt. Die „Größe“ R kann dabei für verschiedene Eigenschaften stehen, wie Radius eines Vesikels, Länge eines Polymers, Anzahl von Proteinuntereinheiten. Die Zahl der Markierungsstellen ν_M kann nicht mehr als unabhängig von N_B angesehen werden.

Die Berechnung der Amplituden unter Berücksichtigung all dieser Wahrscheinlichkeitsverteilungen und Korrekturfaktoren erfordert allein die Ermittlung der Mittelwerte und Kovarianzen der Fluorophoranzahlen $\langle n_{i,j} \rangle$ und $\text{Cov}(n_{i,j}, n_{i,k}) = \langle n_{i,j} n_{i,k} \rangle - \langle n_{i,j} \rangle \langle n_{i,k} \rangle$, wobei zur Vereinfachung die Unabhängigkeit der Verteilungen der einzelnen Fluorophorspezies voneinander vorausgesetzt werden soll, ebenso wie die Unabhängigkeit der Dissoziationskonstanten von der Anzahl auf dem Zielmolekül vorhandenen Fluorophore. Die Anzahlvariablen werden zudem nur auf den Anteil der Liganden und Zielmoleküle bezogen, die prinzipiell in der Lage sind, die jeweiligen Fluorophore aufzuweisen (also etwa bindungsfähig oder fluoreszenzmarkiert).

Die Gleichungen für die Amplituden reduzieren sich damit auf⁸⁴

$$\mathfrak{A}_a = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_{L,m} \langle n_{L,a}^2 \rangle + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a^2 \langle n_{M,a}^2 \rangle}{(c_{L,m} \langle n_{L,a} \rangle + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a \langle n_{M,a} \rangle)^2} \quad (3.257)$$

$$\mathfrak{A}_b = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},b}} \frac{\langle n_{M,b}^2 \rangle}{\chi_M \gamma_M c_M^0 \langle n_{M,b} \rangle^2} \quad (3.258)$$

$$\mathfrak{A}_x = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},x}} \frac{\alpha_{M,m} \chi_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a \langle n_{M,a} n_{M,b} \rangle}{(c_{L,m} \langle n_{L,a} \rangle + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a \langle n_{M,a} \rangle) \cdot (\chi_M \gamma_M c_M^0 \langle n_{M,b} \rangle)}. \quad (3.259)$$

⁸⁴Die Asymmetrie in der Verwendung der freien Ligandenkonzentration und der Gesamtkonzentration der Zielmoleküle ist dem Standpunkt geschuldet, dass die Fluorophore der gebundenen Liganden dem jeweiligen Zielmolekül zugerechnet werden. Eine umgekehrte Behandlung wäre ebenso denkbar, siehe auch Abschnitt 3.5.2.

Die Variable α_M bezeichnet hier den Anteil bindungsfähiger Zielmoleküle ungeachtet ihrer Markierung und berechnet sich zu

$$\alpha_M = \alpha_{M,u}\chi_M (1 - \chi_M) + \alpha_{M,m}\chi_M. \quad (3.260)$$

Die gesamte über die Bindung des Liganden verfügbare Information ist in den Ausdrücken $\langle n_{M,a}n_{M,b} \rangle$, $\langle n_{M,a}^2 \rangle$ und $\langle n_{M,a} \rangle$ enthalten, insofern die anderen Erwartungswerte ausschließlich die Art und Weise der Fluoreszenzmarkierung beider Spezies betreffen. Zudem gilt $\langle n_{M,a}n_{M,b} \rangle = \langle n_{M,a} \rangle \cdot \langle n_{M,b} \rangle$ wann immer die Zahl der Bindestellen unabhängig ist von der Zahl der Markierungsstellen der Zielmoleküle ($N_B \perp \nu_M$ zusätzlich zu $K_{D,(u,m)} \perp n_{M,b}$).

Als nützlich für die weitere Rechnung wird sich die Aufstellung einer Verallgemeinerung des Gesetzes des totalen Erwartungswertes (auch engl. *Adam's Law*) und der totalen (Ko-)Varianz (auch engl. *Eve's Law*, siehe für beide [BLITZSTEIN et al., 2019](#)):

$$E(X) = E(E(X|Z_1, \dots, Z_n)) \quad (3.261)$$

$$\begin{aligned} \text{Cov}(X, Y) &= E(\text{Cov}(X, Y|Z_1, \dots, Z_n)) \\ &+ \sum_{i=1}^n E(\text{Cov}(E(X|Z_i, \dots, Z_n), E(Y|Z_i, \dots, Z_n)|Z_{i+1}, \dots, Z_n)). \end{aligned} \quad (3.262)$$

Diese Gleichungen geben Erwartungswert und Kovarianz der Zufallsvariablen X und Y an, welche voneinander und zusätzlich von den Variablen Z_i abhängen. Die interessierenden Variablen sind hier die Fluorophoranzahlen und die weiteren Variablen die Zahl der gebundenen Liganden, der davon markierten Liganden, der an diese gebundenen Fluorophore und so weiter. Nach Voraussetzung sind alle bedingten Verteilungen Binomial- oder BERNOULLI-Verteilungen und aufgrund der Reproduktivität der Binomialverteilung gilt dies gleichfalls für die summierten Fluorophorzahlen mehrerer auf einem Teilchen gebundener Liganden.

Im Ergebnis erhält man folgende Ausdrücke für die in den Amplituden auftretenden Erwartungswerte⁸⁵:

$$\langle n_{L,a} \rangle = \nu_L \beta_L \quad (3.263)$$

$$\langle n_{M,b} \rangle = \langle \nu_M \rangle \beta_M \quad (3.264)$$

$$\langle n_{M,a} \rangle = \nu_L \beta_L \langle N_{L,m} \rangle = \nu_L \beta_L \langle N_B \rangle \theta_m \quad (3.265)$$

$$\langle n_{L,a}^2 \rangle = \langle n_{L,a} \rangle^2 + \nu_L \beta_L (1 - \beta_L) = \nu_L \beta_L [(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L] \quad (3.266)$$

$$= \nu_L \beta_L [(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L] \quad (3.267)$$

$$\langle n_{M,b}^2 \rangle = \langle n_{M,b} \rangle^2 + \langle \nu_M \rangle \beta_M (1 - \beta_M) + \beta_M^2 \sigma^2(\nu_M) \quad (3.268)$$

$$= \langle \nu_M \rangle \beta_M \left[(1 - \beta_M) + \frac{\langle \nu_M^2 \rangle}{\langle \nu_M \rangle} \beta_M \right] \quad (3.269)$$

⁸⁵Die Varianz der Anzahl gebundener markierter Liganden auf einem Teilchen bei einer bestimmten Anzahl von Bindestellen ergibt sich aus der *Multinomialverteilung*, da jede Bindestelle entweder leer oder mit einem markierten oder unmarkierten Liganden besetzt sein kann. Die jeweilige Wahrscheinlichkeit ergibt sich zu $\theta_{(u,m)}$.

$$\begin{aligned} \langle n_{M,a}^2 \rangle &= \langle n_{M,a} \rangle^2 + \left[\nu_L \beta_L (1 - \beta_L) + \nu_L^2 \beta_L^2 \right] \langle N_{L,m} \rangle \\ &\quad + \nu_L^2 \beta_L^2 \langle \sigma^2 (N_{L,m} | N_B) \rangle + \nu_L^2 \beta_L^2 \sigma^2 (\langle N_{L,m} | N_B \rangle) \end{aligned} \quad (3.270)$$

$$\begin{aligned} &= \nu_L^2 \beta_L^2 \langle N_B \rangle^2 \theta_m^2 + \left[\nu_L \beta_L (1 - \beta_L) + \nu_L^2 \beta_L^2 \right] \langle N_B \rangle \theta_m \\ &\quad + \nu_L^2 \beta_L^2 \langle N_B \rangle \theta_m (1 - \theta_m) + \nu_L^2 \beta_L^2 \sigma^2 \langle N_B \rangle \theta_m^2 \end{aligned} \quad (3.271)$$

$$= \nu_L^2 \beta_L^2 \left[\langle N_B^2 \rangle - \langle N_B \rangle \right] \theta_m^2 + \nu_L \beta_L \left[(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L \right] \langle N_B \rangle \theta_m \quad (3.272)$$

$$\langle n_{M,a} n_{M,b} \rangle = \beta_M \nu_L \beta_L \langle \nu_M N_B \rangle \theta_m. \quad (3.273)$$

Wie im weiteren Verlauf deutlich wird, ist die wichtigste der drei Amplituden ob ihrer simpleren theoretischen Berechenbarkeit und geringeren Empfindlichkeit gegenüber Unsicherheiten in den einzelnen Markierungsgraden damit jene der Kreuzkorrelationskurve, weshalb sie auch die Grundlage der experimentellen Bestimmung von Dissoziationskonstanten in Kapitel 5 darstellt. Abgesehen von den absoluten Amplituden kann noch, sofern Liganden und Zielmoleküle anhand ihrer Diffusionszeiten in der Korrelationskurve ausreichend unterscheidbar sind, der Amplitudenanteil (siehe Gl. 3.109) der freien Liganden aus der Anpassung einer Korrelationskurve mit mehreren Komponenten nach Gl. 3.107 als weitere Messgröße genutzt werden:

$$\varphi_{L,a} = \frac{c_{L,m} \langle n_{L,a}^2 \rangle}{c_{L,m} \langle n_{L,a}^2 \rangle + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a^2 \langle n_{M,a}^2 \rangle}. \quad (3.274)$$

Die obigen Gleichungen wurden allein unter der Annahme unabhängiger Besetzung aller Bindestellen hergeleitet. Die konkrete Berechnung von θ_m erfordert weiterhin die Vorgabe einer Konzentrationsabhängigkeit wie Gl. 3.249 und der Erhaltungsgleichungen des Liganden nach

$$\theta_m = \frac{c_{L,m,b}}{c_{L,m,b} + \frac{1}{\xi} K_{D,u} + \frac{1}{\xi} c_{L,u,b}} \quad (3.275)$$

$$\theta_u = \frac{c_{L,u,b}}{c_{L,u,b} + K_{D,u} + \xi c_{L,m,b}} = \frac{\theta_m c_{L,u,b}}{\xi c_{L,m,b}} \quad (3.276)$$

$$c_L = c_{L,u} + c_{L,m} = c_{L,u,b} + c_{L,u,n} + c_{L,m,b} + c_{L,m,n} \quad (3.277)$$

$$\chi_L \gamma_L c_L^0 = c_{L,m} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m \quad (3.278)$$

$$(1 - \chi_L) \gamma_L c_L^0 = c_{L,u} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_u, \quad (3.279)$$

sodass sich ein quadratisches Gleichungssystem mit den zwei unbekanntem Konzentrationen des freien Liganden ergibt. Als weitere Indizes wurden hier b und n für „bindungsfähig“ bzw. „nicht bindungsfähig“ verwendet. Die bindungsfähigen Anteile des Liganden unterscheiden sich nach Bindung eines Teils davon an die Zielmoleküle zwischen den freien und den gebundenen Fraktionen, da notwendigerweise nur bindungsfähige Liganden auf den Zielmolekülen zu finden sind und damit eine Abreicherung unter den freien Liganden stattfindet (siehe auch Abschnitt 3.5.2.2). Der Parameter $\alpha_{L,(u,m)}$ bezeichnet weiterhin den bindungsfähigen Anteil über alle Liganden in der Probe gerechnet. Ist die freie Ligandenkonzentration unterdessen bekannt, kann auch die

effektive Bindungsfähigkeit der freien Liganden $\alpha_{L,m,f}$ bestimmt werden:

$$\alpha_{L,m,f} = \frac{c_{L,m,b}}{c_{L,m}} = \frac{c_{L,m} - (1 - \alpha_{L,m}) \chi_L \gamma_L c_L^0}{c_{L,m}} \quad (3.280)$$

$$\alpha_{L,u,f} = \frac{c_{L,u,b}}{c_{L,u}} = \frac{c_{L,u} - (1 - \alpha_{L,u}) (1 - \chi_L) \gamma_L c_L^0}{c_{L,u}}. \quad (3.281)$$

Zuletzt kann noch eine Beziehung zwischen den Anteilen markierter und bindungsfähiger Liganden in der Probe und jenen vor dem Auftreten von Präparationsverlusten:

$$\gamma_L = \frac{\gamma_{L,u,b}^0 c_{L,u,b}^0 + \gamma_{L,u,n}^0 c_{L,u,n}^0 + \gamma_{L,m,b}^0 c_{L,m,b}^0 + \gamma_{L,m,n}^0 c_{L,m,n}^0}{c_L^0} \quad (3.282)$$

$$= \gamma_{L,u,b}^0 \alpha_{L,u}^0 (1 - \chi_L^0) + \gamma_{L,u,n}^0 (1 - \alpha_{L,u}^0) (1 - \chi_L^0) + \gamma_{L,m,b}^0 \chi_L^0 \alpha_{L,m}^0 + \gamma_{L,m,n}^0 \chi_L^0 (1 - \alpha_{L,m}^0) \quad (3.283)$$

$$\chi_L = \frac{\gamma_{L,m,b}^0 c_{L,m,b}^0 + \gamma_{L,m,n}^0 c_{L,m,n}^0}{\gamma_L c_L^0} \quad (3.284)$$

$$= \chi_L^0 \frac{\gamma_{L,m,b}^0 \alpha_{L,m}^0 + \gamma_{L,m,n}^0 (1 - \alpha_{L,m}^0)}{\gamma_L} \quad (3.285)$$

$$\alpha_{L,u} = \frac{\gamma_{L,u,b}^0 c_{L,u,b}^0}{\gamma_L c_L^0 (1 - \chi_L)} = \frac{\gamma_{L,u,b}^0 \alpha_{L,u}^0 (1 - \chi_L^0)}{\gamma_L (1 - \chi_L)} \quad (3.286)$$

$$= \alpha_{L,u}^0 \frac{\gamma_{L,u,b}^0}{\gamma_{L,u,b}^0 \alpha_{L,u}^0 + \gamma_{L,u,n}^0 (1 - \alpha_{L,u}^0)} \quad (3.287)$$

$$\alpha_{L,m} = \alpha_{L,m}^0 \frac{\gamma_{L,m,b}^0}{\gamma_{L,m,b}^0 \alpha_{L,m}^0 + \gamma_{L,m,n}^0 (1 - \alpha_{L,m}^0)}. \quad (3.288)$$

Die Formeln für die Parameter der Zielmoleküle sind bis auf die Indizes identisch.

Die bis hierhin erarbeiteten Gleichungen sollen zuallererst die Problemstellung in einer möglichst großen Allgemeinheit behandeln. In den späteren Abschnitten werden sie auf spezifischere Fragestellungen angewandt und dabei im Sinne der besseren Handhabbarkeit weiter vereinfacht.

3.5.2. Titrationsen

Die experimentelle Ermittlung einer Bindungskurve wird (real oder gedacht) durch schrittweise Zugabe des Liganden zu einer definierten Stoffmenge des Zielmoleküls und gleichzeitige Messung einer mit dem Bindungsgrad in Zusammenhang stehenden Größe realisiert. Aufgrund der Ähnlichkeit mit dem Verfahren zur Bestimmung der Konzentration einer vorgelegten Lösung wird auch hier allgemein von *Titration* gesprochen, nicht zuletzt bei einer der wichtigsten Techniken zur Messung von Affinitäten, der *isothermen Titrationskalorimetrie* (engl. *isothermal titration calorimetry, ITC*, siehe [WISEMAN et al., 1989](#)). Später werden weitere Varianten von konzentrationsabhängigen, mit diesen Bindungsprozessen zusammenhängenden, jedoch nicht mehr vorrangig zu deren direkter Charakterisierung dienenden, Messkurven eingeführt, welche trotz ihrer

Verschiedenheit von klassischen Titrationsen in weiterer Analogie zu erstgenannten Experimenten mit dieser Bezeichnung belegt werden sollen.

Die Benennung eines der Bindungspartner als Liganden ist prinzipiell eine artifizielle, welche oftmals nur anhand seiner Größe oder Funktion in der Titration festgelegt wird. Die zutitrierte Spezies, der sogenannte *Titrant*, wird meist als Ligand aufgefasst, weshalb im Folgenden für das vorliegende System aus Lipidmembran und daran bindendes Protein beide Richtungen behandelt werden und damit auch beide Spezies die Rolle des Liganden in Gl. 3.249 einnehmen⁸⁶.

3.5.2.1. Ligandentitration (Variation von c_L^0)

Die in Kapitel 5 aufgeführten Experimente stellen alle Ligandentitrationsen dar, bei welchen eine stets gleiche Konzentration der Zielmoleküle mit einer über mehrere Größenordnungen variierenden Ligandenkonzentration versetzt und analysiert wird. Der Konzentrationsbereich der Liganden ist im Idealfall auf einer logarithmischen Skala um die zu erwartende Dissoziationskonstante zentriert und umfasst um das Hundertfache kleinere wie größere Werte als diese.

Unter geeigneten Umständen – Kenntnis der tatsächlichen Gesamtkonzentrationen in der Probe, Abwesenheit von Helligkeitsveränderungen bei Bindung ($\zeta_a = 1$), vollständige Bindungsfähigkeit zumindest der markierten Zielmoleküle ($\alpha_{M,m} = 1$) – erlaubt die Kreuzkorrelationsamplitude die direkteste Gewinnung einer Bindungskurve, da der Zähler nach Gl. 3.273 linear vom Bindungsgrad abhängt und der Nenner die Gesamtkonzentration des Liganden in der Probe enthält:

$$\frac{\chi_M c_M^0 \langle n_{M,a} n_{M,b} \rangle}{\chi_M c_M^0 \langle n_{M,b} \rangle} = \theta_m \frac{\nu_L \beta_L \langle \nu_M N_B \rangle}{\langle \nu_M \rangle} \quad (3.289)$$

$$c_{L,m} \langle n_{L,a} \rangle + \alpha_M c_M^0 \langle n_{M,a} \rangle = c_{L,m} \nu_L \beta_L + \alpha_M c_M^0 \nu_L \beta_L \langle N_B \rangle \theta_m \quad (3.290)$$

$$= \nu_L \beta_L \chi_L c_L^0 \quad (3.291)$$

$$N_A V_{\text{eff},x} c_L^0 \mathfrak{A}_x = \frac{\theta_m \langle \nu_M N_B \rangle}{\chi_L \langle \nu_M \rangle}. \quad (3.292)$$

Der Quotient $\frac{\langle \nu_M N_B \rangle}{\langle \nu_M \rangle}$ hängt von der Verteilung der Größe R der Zielmoleküle ab und kann für bekannte Funktionen $\nu_M = f(R)$ und $N_B = g(R)$ vereinfacht werden. Können beide als Potenzfunktionen geschrieben werden, etwa wenn die Zahl der Bindestellen von der Oberfläche oder Länge des Teilchens abhängt und so mit R^2 bzw. R skaliert, ergibt sich ein Produkt aus der mittleren Anzahl Bindestellen und einem dimensionslosen Verhältnis von Momenten der Wahrscheinlichkeitsverteilung der Größe, welches für schmale Verteilungen gegen eins konvergiert:

$$\nu_M = aR^m \quad (3.293)$$

$$N_B = bR^n \quad (3.294)$$

⁸⁶Strenggenommen ist der zweite Bindungspartner die diskrete Bindungsstelle auf der Membran, welche wiederum selbst in Form von diskreten Vesikeln zugegeben wird. Unter Annahme nicht miteinander interagierender gebundener Proteine und Berücksichtigung der großen Zahl in einer Probe vorhandener Vesikel ist diese Unterscheidung aber nicht relevant, weil so allein die Gesamtzahl der Bindungsplätze und ihr im Mittel besetzter Anteil in die Gleichungen einfließt, nicht aber ihre Verteilung auf einzelne Teilchen. Würde in Kapitel 5 hingegen auch die Autokorrelation der fluoreszenten Proteine Verwendung finden, schließe sie sich in deren Amplitude nieder, da in jene die auch Varianz von N_L (bzw. N_P in der dortigen Nomenklatur) einfließt.

$$\frac{\langle \nu_M N_B \rangle}{\langle \nu_M \rangle} = b \frac{\langle R^{m+n} \rangle}{\langle R^m \rangle} = \langle N_B \rangle \frac{\langle R^{m+n} \rangle}{\langle R^m \rangle \langle R^n \rangle}. \quad (3.295)$$

Der Quotient $\frac{\theta_m}{\chi_L}$ ist für gleiche Bindungsfähigkeit und Dissoziationskonstante der Ligandenspezies einfach gleich dem gesamten Bindungsgrad $\theta = \theta_u + \theta_m$, da der Markierungsgrad unter den gebundenen Liganden identisch mit demjenigen aller Liganden in der Probe sein muss:

$$\theta_m = \frac{c_{L,m,b}}{c_{L,m,b} + K_D + c_{L,u,b}} = \chi_L \frac{c_{L,b}}{c_{L,b} + K_D} = \chi_L \theta. \quad (3.296)$$

Insgesamt erhält man damit verschwindenden Einfluss der Fluoreszenzmarkierung des Liganden

$$N_A V_{\text{eff},x} c_L^0 \mathfrak{A}_x = \theta \langle N_B \rangle \frac{\langle R^{m+n} \rangle}{\langle R^m \rangle \langle R^n \rangle} = \langle N_L \rangle \frac{\langle R^{m+n} \rangle}{\langle R^m \rangle \langle R^n \rangle} \quad (3.297)$$

und so, zusammen mit der Gesamtkonzentration der Liganden aus Abschnitt 3.5.2.6, die Ordinate der gesuchten Bindungskurve. Kann die Abnahme der Helligkeit der Liganden bei Bindung nicht mehr vernachlässigt werden, ist es vorteilhafter, direkt den entsprechenden Term aus Gl. 3.361 mit der Amplitude zu multiplizieren:

$$N_A V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x = \frac{\zeta_a \theta_m \langle \nu_M N_B \rangle}{(c_{L,m} + \alpha_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m \zeta_a) \langle \nu_M \rangle} \quad (3.298)$$

$$\frac{1}{\zeta_a} \frac{\langle F_a(t) \rangle V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x}{\langle \eta_L^0 \rangle V_{\text{eff},a}} = \theta_m \langle N_B \rangle \frac{\langle R^{m+n} \rangle}{\langle R^m \rangle \langle R^n \rangle}. \quad (3.299)$$

Die freie Ligandenkonzentration kann unter diesen Annahmen entweder (wenn nicht für sehr geringe Bindestellenkonzentrationen $c_L \approx c_L^0$ gesetzt werden kann) im Zuge der nichtlinearen Regression aus einer Abwandlung von Gl. 3.252 als

$$c_L = (1 - \alpha_L) c_L^0 + \frac{1}{2} \left[\alpha_L c_L^0 - K_D - \alpha_M c_M^0 \langle N_B \rangle + \sqrt{4\alpha_L c_L^0 K_D + (\alpha_L c_L^0 - K_D - \alpha_M c_M^0 \langle N_B \rangle)^2} \right] \quad (3.300)$$

ermittelt werden oder nach Gl. 3.253 ebenfalls aus \mathfrak{A}_x . Die Gesamtkonzentration der (bindungs-fähigen) Zielmoleküle in der Probe muss hierzu bekannt sein oder aus der Autokorrelationsamplitude ermittelt werden (siehe Abschnitt 3.5.2.6).

Für den einfachen Fall komplett markierter Teilchen⁸⁷ ($\chi_M = 1$ und $\beta_M = 1$) und bei Gültigkeit von Gl. 3.293 sowie $\alpha_{M,m} = \alpha_M$ reduziert sich damit die freie Ligandenkonzentration auf

$$c_L = c_L^0 - \alpha_M c_M^0 \langle N_L \rangle \quad (3.301)$$

$$= c_L^0 - c_L^0 \frac{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle \nu_M^2 \rangle \langle \nu_M \rangle \langle N_B \rangle}{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle \nu_M \rangle^2 \langle \nu_M N_B \rangle} \quad (3.302)$$

⁸⁷Der entgegengesetzte Fall geringer Werte für β_M bei gleichzeitig hohem ν_M überführt die Binomial- in einer POISSON-Verteilung und wird ausführlicher in Kapitel 4 und 5 behandelt, wobei speziell Gl. 4.8 hiervon relevant ist.

$$= c_L^0 \left(1 - \frac{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle} \right). \quad (3.303)$$

Gilt weiterhin $m = n$, muss die Größenverteilung der Zielmoleküle damit für diese Vorgehensweise nicht gesondert beachtet werden. Der kompliziertere Fall $\zeta_a \neq 1$ kann wiederum unter Einbeziehung von $\langle F_a(t) \rangle$ behandelt werden:

$$\alpha_M c_M^0 \langle N_L \rangle = \frac{1}{\chi_L} \left(\frac{1}{\zeta_a} \frac{\langle F_a(t) \rangle}{\langle n_L^0 \rangle} \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \right) \frac{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle}. \quad (3.304)$$

Aus Gl. 3.274 lässt sich auch eine direktere, wenngleich durch die Notwendigkeit der Anpassung mehrerer Komponenten an die Korrelationskurve stärker fehlerbehaftete, Methode zur Bestimmung der freien Ligandenkonzentration ableiten:

$$\varphi_{L,a} = \frac{c_{L,m}}{c_{L,m} + \alpha_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m \zeta_a^2 \left(\frac{\nu_L \beta_L}{(1-\beta_L) + \nu_L \beta_L} \frac{\langle N_B^2 \rangle - \langle N_B \rangle}{\langle N_B \rangle} \theta_m + 1 \right)} \quad (3.305)$$

$$\approx \frac{c_{L,m}}{c_{L,m} + \chi_L c_L^0 x_{L,m}^{\text{geb}} \zeta_a^2 \left(\frac{\nu_L \beta_L}{(1-\beta_L) + \nu_L \beta_L} \langle N_B \rangle \theta_m + 1 \right)} \quad (3.306)$$

$$\approx \frac{c_L}{c_L + c_L^0 x_L^{\text{geb}} \zeta_a^2 \left(\frac{\nu_L \beta_L}{(1-\beta_L) + \nu_L \beta_L} \langle N_L \rangle + 1 \right)} \quad (3.307)$$

$$= \frac{x_L^{\text{frei}}}{x_L^{\text{frei}} + (1 - x_L^{\text{frei}}) \zeta_a^2 \left(\frac{c_L^0}{\alpha_M c_M^0} \frac{\nu_L \beta_L}{(1-\beta_L) + \nu_L \beta_L} (1 - x_L^{\text{frei}}) + 1 \right)}. \quad (3.308)$$

In der dritten Zeile wurde wieder von gleicher Bindungsfähigkeit und Dissoziationskonstante der markierten und unmarkierten Liganden ausgegangen und der Anteil der freien Liganden in der Probe x_L^{frei} eingeführt. Sind nun alle Ausgangskonzentrationen und weiteren Parameter des Systems bekannt, kann $c_L = x_L^{\text{frei}} c_L^0$ allein aus der Autokorrelationsamplitude ohne nochmaligen Rückgriff auf die Kreuzkorrelation berechnet werden. Für die 1:1-Bindung mit $N_B = 1$) reduziert sich die Formel noch weiter zu

$$\varphi_{L,a} = \frac{x_L^{\text{frei}}}{x_L^{\text{frei}} + (1 - x_L^{\text{frei}}) \zeta_a^2} \quad (3.309)$$

und bei unveränderter Helligkeit der gebundenen Liganden ergibt sich mit $\varphi_{L,a} = x_L^{\text{frei}}$ sogar die völlige Gleichheit beider Variablen.

Kann nicht von $\xi = 1$ ausgegangen werden (siehe hierzu Abschnitt 3.5.2.5), lässt sich mit diesem Vorgehen dennoch die effektive Dissoziationskonstante der markierten Liganden $\frac{1}{\xi} K_{D,u} + \frac{1}{\xi} \alpha_{L,u} c_{L,u}$ bestimmen und durch zusätzliche Variation des Markierungsgrades eine Verdrängungstitration gegen den unmarkierten Liganden durchführen und somit beide Dissoziationskonstanten ermitteln.

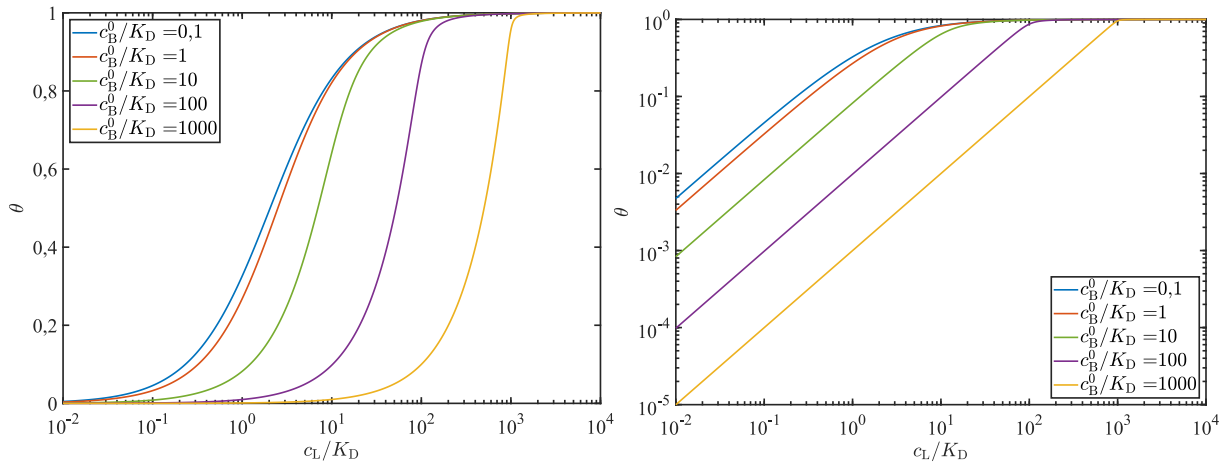


Abbildung 3.18.: Darstellung der Abhängigkeit des Bindungsgrades θ als Funktion der freien Ligandenkonzentration c_L für verschiedene Bindestellenkonzentrationen c_B^0 nach Gl. 3.311. Beide Konzentrationen sind auf die Dissoziationskonstante K_D bezogen, da eine Änderung dieser Größe nur die Skalierung der Kurven, nicht aber ihre Form verändert. Gleichfalls wurde o. B. d. A. $\alpha_L = 0,5$ gesetzt, da dieser Parameter nach Gl. 3.312 lediglich die effektiven Konzentrationen der Bindungspartner variiert. Die Kurven sind halb- (links) bzw. doppeltlogarithmisch (rechts) dargestellt, um sowohl die veränderte Steigung im Bereich der Sättigung als auch die von der Bindestellenkonzentration unabhängige Linearität im Anfangsbereich der Kurve herauszustellen.

3.5.2.2. Abhängigkeit der scheinbaren Dissoziationskonstante von der Bindestellenkonzentration

Ein ebenso schwerwiegender wie leicht zu übersehender Fehler besteht in der impliziten Annahme $\alpha_{L,(u,m),f} = \alpha_{L,(u,m)}$ und damit der Vernachlässigung der differentiellen Abreicherung der freien bindungsfähigen Liganden. Um eine korrekte Bindungskurve zu erhalten, muss stets $\langle N_{L,m} \rangle$ gegen $c_{L,m,b}$ oder, bei vernachlässigbarem Einfluss der Fluoreszenzmarkierung wie in diesem Abschnitt der Einfachheit halber angenommen, $\langle N_L \rangle$ gegen $c_{L,b}$ aufgetragen werden.

Wird die freie Ligandenkonzentration nach Gl. 3.300 ermittelt, kann zu diesem Zwecke einfach der erste Summand $(1 - \alpha_L) c_L^0$ weggelassen werden, wohingegen dasselbe Vorgehen bei Verwendung von Gl. 3.301 leicht zu kleine oder gar negative Werte produziert, insbesondere für hohe Gesamtkonzentrationen an Bindestellen ($c_B^0 = \alpha_M c_M^0 \langle N_B \rangle$). Dies ist darin begründet, dass in letzterem Falle der überwiegende Teil aller bindungsfähigen Liganden nicht mehr frei vorliegt und damit $c_L \approx c_{L,n} = (1 - \alpha_L) c_L^0$ gilt. Im Extremfall ist die Anreicherung nicht bindungsfähiger Liganden so stark, dass $c_{L,b}$ mehrere Größenordnungen kleiner ist als c_L und damit im Messfehler von $\langle N_L \rangle$ verschwindet.

Kann $c_{L,b}$ nicht verlässlich ermittelt werden, erhält man aus $y = \langle N_L \rangle / \langle N_B \rangle = \theta$ (Normierung auf den Sättigungswert) als Funktion von $x = c_L$ eine verzerrte Bindungskurve der Form

$$y = \frac{x - (1 - \alpha_L) c_L^0}{x - (1 - \alpha_L) c_L^0 + K_D}, \quad (3.310)$$

deren scheinbare Dissoziationskonstante stets über dem wahren Wert liegt und linear mit c_M^0 anwächst. Je kleiner α_L wird, desto stärker wird zudem die Aufsteilung der Kurve kurz vor Eintritt der Sättigung (siehe Abb. 3.18). Da die Variable c_L^0 vom Abszissenwert abhängig ist, muss für die explizite Berechnung diese über Gl. 3.300 auf $x = c_L$ zurückgeführt werden, woraus schließlich

$$y = \frac{f(x)}{f(x) + K_D} \quad (3.311)$$

resultiert. Die Hilfsfunktion

$$f(x) = \frac{1}{2} \left(\alpha_L x - K_D - (1 - \alpha_L) c_B^0 + \sqrt{[\alpha_L x - K_D - (1 - \alpha_L) c_B^0]^2 + 4\alpha_L x K_D} \right) \quad (3.312)$$

enthält die durch nicht bindungsfähigen Liganden verursachten Abweichungen in der Abszisse und konvergiert in dessen Abwesenheit nach $\lim_{\alpha_L \rightarrow 1} f(x) = x$. Hiermit kann nun als Korrektur die scheinbare Dissoziationskonstante in Form des Halbhöhenwertes $\widetilde{K}_D = x_{1/2}$ mit $y(x_{1/2}) = \frac{1}{2}$ und damit $f(x_{1/2}) = K_D$ – als Funktion der wahren Parameter formuliert werden:

$$\widetilde{K}_D = f^{-1}(K_D) \quad (3.313)$$

$$= \frac{1}{\alpha_L} K_D + \frac{1 - \alpha_L}{2\alpha_L} c_B^0. \quad (3.314)$$

In dieser Gleichung spiegelt sich die oben erwähnte starke Verzerrung der Abszisse bei hohen Bindestellenkonzentrationen deutlich: \widetilde{K}_D hängt selbst für geringste Anteile nicht bindungsfähiger Liganden irgendwann allein von c_B^0 ab, ist aber selbst für $c_B^0 \ll K_D$ noch nicht gleich der wahren Dissoziationskonstante, weil hierfür zwar $c_L \approx c_L^0$ gilt, aber damit auch $c_{L,b} \approx \alpha_L c_L$ beachtet werden muss.

Soll allein der Wert von \widetilde{K}_D bestimmt werden, ist die simple Herangehensweise die direkte Verwendung von Gl. 3.310 in Verbindung mit $x = c_L^0 - y c_B^0$. Bei $y = \frac{1}{2}$ ist damit

$$K_D = x - (1 - \alpha_L) c_L^0 = \alpha_L c_L^0 - \frac{c_B^0}{2} \quad (3.315)$$

und der entsprechende Abszissenwert

$$x_{1/2} = c_L^0 - \frac{c_B^0}{2} = \frac{1}{\alpha_L} \left(K_D + \frac{c_B^0}{2} \right) - \frac{c_B^0}{2} \quad (3.316)$$

führt nach Umstellen sofort zu Gl. 3.314.

Ist aus messtechnischen Gründen nur der Bereich $c_B^0 \gg K_D$ zugänglich, so ist die direkte Berechnung nach dieser Gleichung nicht sinnvoll, da hierzu bei einem um Größenordnungen höheren Wert des zweiten Terms eine extrem präzise Kenntnis von α_L , \widetilde{K}_D und c_B^0 vonnöten wäre. Alternativ empfiehlt sich dann die Messung bei einer Reihe verschiedener Bindestellenkonzentrationen und eine anschließende lineare Regression der ermittelten scheinbaren Dissoziationskonstanten, wodurch sowohl K_D als auch α_L erhalten werden.

Da die veränderte Form bei $c_B^0 \gg K_D$ eine verlässliche Anpassung der LANGMUIR-Isotherme erschwert, bietet sich eine lineare Regression in der doppelt logarithmischen Auftragung (siehe Abb. 3.18, rechts) an. Die Linearisierung von Gl. 3.310 ergibt mit $c_L^0 = x + \theta c_B^0$ zunächst

$$\lim_{c_L^0 \rightarrow 0} y = \frac{x - (1 - \alpha_L) c_L^0}{K_D} \quad (3.317)$$

$$= \frac{x - (1 - \alpha_L)(x + y c_B^0)}{K_D} = \frac{\alpha_L x - (1 - \alpha_L) y c_B^0}{K_D} \quad (3.318)$$

und durch Umstellen nach y schließlich

$$y = \frac{\alpha_L x}{K_D + (1 - \alpha_L) c_B^0}. \quad (3.319)$$

Die scheinbare Dissoziationskonstante ist hier das Reziproke der Steigung der Geraden und weicht von Gl. 3.314 nur im Vorfaktor der Bindestellenkonzentration ab:

$$\widetilde{K}_D = \frac{1}{\alpha_L} K_D + \frac{1 - \alpha_L}{\alpha_L} c_B^0. \quad (3.320)$$

Die Verwendung der linearisierten Form der Bindungskurve ist unter der Voraussetzung bekannter Stöchiometrie der Bindungspartner generell vorteilhaft, da Mengen des Liganden eingesetzt werden müssen. Ist hingegen $\langle N_B \rangle$ nicht im Vorhinein bekannt, muss zumindest einmalig der Sättigungswert $\lim_{c_L^0 \rightarrow \infty} \langle N_L \rangle$ bestimmt werden.

3.5.2.3. Bindestellentitration (Variation von c_M^0)

Unter dieser Überschrift ist hier nicht allein die Vertauschung der Rollen der beiden Bindungspartner zu verstehen – dabei würde auch die Bezeichnung „Ligand“ zwischen beiden wechseln –, sondern vielmehr die Anwendung der oben entwickelten Gleichungen auf den in Teil II wichtigen Spezialfall der Bindung von Proteinen an Lipidvesikel, der als zusätzliche Komplikation *a priori* eine große Unsicherheit bezüglich der Variablen c_M^0 und $\langle N_B \rangle$ mit sich bringt.

Bei der Bindung eines Proteins an eine Membran existieren, falls diese nicht selektiv an einzelne Lipide mit bestimmten funktionellen Gruppen erfolgt, keine definierten Bindestellen, sondern fluktuierende Gruppen von mit dem Protein in Wechselwirkung stehender Lipidmoleküle, wobei die Proteine selbst auch relativ zur Membranoberfläche eine zweidimensionale Diffusion ausführen. Überdies ist zwar die Gesamtkonzentration der Lipide c_{Li}^0 meist noch gut bestimmbar, die Größe von Vesikeln, und unter Umständen das Ausmaß ihrer Multilamellarität, unterliegt herstellungsbedingt aber immer einer gewissen Verteilungsbreite (HAS *et al.*, 2020). Eine Bestimmung kann beispielsweise mittels DLS erfolgen (siehe etwa Abb. 4.1), wobei jedoch eine nicht zu unterschätzende Unsicherheit verbleibt.

Als Konsequenz kann zwar die Anzahl von Bindestellen auf einem Vesikel aus der Bindungskurve gewonnen werden, jedoch nicht unmittelbar die Zahl der Lipidmoleküle A , die eine solche

konstituieren⁸⁸. Lässt sich c_M^0 , z. B. durch Gl. 3.351, mit genügender Sicherheit ermitteln, kann hierfür der Zusammenhang

$$\frac{c_{Li}^0}{A} = c_B^0 = \langle N_B \rangle c_M^0 \quad (3.321)$$

genutzt werden. Ist dies nicht möglich, kann eine Messreihe bei konstanter Ligandenkonzentration und über mehrere Größenordnungen variierender Lipid- und damit Bindestellenkonzentration durchgeführt werden, aus der bei Auftragung des Anteils gebundener Liganden x_L^{geb} gegen die Konzentration freier Bindestellen c_B eine äquivalente Bindungskurve entsteht, die sich durch Einsetzen von

$$c_{L,b} = (\alpha_L - x_L^{\text{geb}}) c_L^0 = (\alpha_L - x_L^{\text{geb}}) \frac{c_B^0 - c_B}{x_L^{\text{geb}}} \quad (3.322)$$

in Gl. 3.250 zu

$$x_L^{\text{geb}} = \frac{c_L^0 - c_L}{c_L^0} = \alpha_L \frac{c_B}{c_B + K_D} \quad (3.323)$$

$$= \alpha_L \frac{(1 - \theta) c_B^0}{(1 - \theta) c_B^0 + K_D} \quad (3.324)$$

$$= \alpha_L \frac{(1 - \theta) c_{Li}^0}{(1 - \theta) c_{Li}^0 + \Lambda K_D} \quad (3.325)$$

ergibt. Die linke Seite der Gleichung kann, für gleiche Bindungseigenschaften markierter und unmarkierter Liganden, durch Kombination von Gl. 3.304 und 3.364 bestimmt werden:

$$x_L^{\text{geb}} = \frac{\theta c_B^0}{c_L^0} = \frac{c_M^0 \langle N_L \rangle}{c_L^0} \quad (3.326)$$

$$= \frac{1 \langle \eta_L^{\text{eff}} \rangle V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{\zeta_a \langle \eta_L^0 \rangle V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle} \quad (3.327)$$

$$= \left[1 - (1 - \zeta_a) x_L^{\text{geb}} \right] \frac{1 V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{\zeta_a V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle}. \quad (3.328)$$

Durch Umstellen ergibt sich hieraus anschließend

$$x_L^{\text{geb}} = \left[\zeta_a \frac{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle}{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle} + (1 - \zeta_a) \right]^{-1}, \quad (3.329)$$

womit auch die rechte Seite der Gleichung nach

$$\alpha_L \frac{(1 - \theta) c_{Li}^0}{(1 - \theta) c_{Li}^0 + \Lambda K_D} = \alpha_L \frac{\left(1 - x_L^{\text{geb}} \frac{c_L^0}{c_B^0} \right) c_{Li}^0}{\left(1 - x_L^{\text{geb}} \frac{c_L^0}{c_B^0} \right) c_{Li}^0 + \Lambda K_D} \quad (3.330)$$

⁸⁸Normalerweise ist allein die Außenseite der Vesikel den Proteinen in der Probe zugänglich, sodass nur durch Vorwissen über ihre Lamellarität – und bei, im Vergleich zur Membrandicke, kleinen Durchmessern unter Berücksichtigung des Beitrages aller inneren „Schalen“ – eine Umrechnung von Λ auf die in einer Halbschicht der Membran an der Bindestelle beteiligten Lipide möglich ist. Im einfachsten Fall nicht zu kleiner unilamellarer Vesikel ergibt sich (mit den Flächen der Bindestellen A_B und der Lipide A_{Li}) einfach $\Lambda = 2A_B/A_{Li}$.

$$= \alpha_L \frac{(c_{Li}^0 - x_L^{geb} \Lambda c_L^0)}{(c_{Li}^0 - x_L^{geb} \Lambda c_L^0) + \Lambda K_D} \quad (3.331)$$

erhalten wird. Zur Vereinfachung kann dank der mittels FCCS noch messbaren sehr geringen Konzentrationen oftmals $c_L^0 \ll K_D$ gewählt werden, sodass sich die theoretische Bindungskurve auf

$$x_L^{geb} \approx \alpha_L \frac{c_{Li}^0}{c_{Li}^0 + \Lambda K_D} \quad (3.332)$$

reduzieren lässt. Eine wichtige Information aus der Bindestellentitration stellt allgemein der Grenzwert

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} x_L^{geb} = \alpha_L \quad (3.333)$$

dar, während speziell für vesikuläre Proben der Halbhöhenwert der Bindungskurve von Interesse ist. Analog zu Gl. 3.314 kann dieser aus $x_L^{geb}(\tilde{K}_D) = \frac{1}{2}\alpha_L$ errechnet werden:

$$c_{Li}^0 - x_L^{geb} \Lambda c_L^0 = \Lambda K_D \quad (3.334)$$

$$\tilde{K}_D = \Lambda K_D + \frac{1}{2}\alpha_L \Lambda c_L^0. \quad (3.335)$$

Wird folglich die Lipidkonzentration nach Gl. 3.332 als Abszisse verwendet, erhält man eine um den Faktor Λ höhere scheinbare Dissoziationskonstante, deren Reziprokes als eine Art Affinität zu einem einzelnen Lipid aufgefasst werden kann. Durch Vergleich mit der aus einer Ligandentitration erhaltenen Dissoziationskonstanten ist schließlich auch die Anzahl der Lipidmoleküle in einer Bindestelle der Messung zugänglich.

3.5.2.4. Farbstofftitration (Variation von $\alpha_{L,m}$)

Wird bei der Berechnung von x_L^{geb} der Effekt der Fluoreszenzlöschung bei Bindung der Liganden nicht bereits berücksichtigt (gleichbedeutend mit $\zeta_a = 1$ in Gl. 3.329), ergibt sich im Vergleich zu Gl. 3.333 als veränderter Grenzwert des scheinbaren Anteils gebundener Liganden

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \tilde{x}_L^{geb} = \frac{\zeta_a \alpha_L}{1 - \alpha_L + \zeta_a \alpha_L}, \quad (3.336)$$

was zur Bestimmung des Parameters ζ_a genutzt werden kann, wenn zugleich α_L variiert wird. Dies wird dadurch ermöglicht, dass das System um eine weitere Komponente ergänzt wird, die fluoresziert, aber nicht an der Bindung teilnimmt. Im Idealfall wird hierzu derselbe Farbstoff (Konzentration c_F) eingesetzt, mit welchem auch die Liganden markiert sind, sodass seine Fluoreszenzcharakteristika – bis auf den Einfluss der Bindung auf die Helligkeit – mit diesen identisch sind. Damit kann die effektive Bindungsfähigkeit

$$\tilde{\alpha}_L = \alpha_L \frac{\gamma_L c_L^0}{\gamma_L c_L^0 + c_F} = \alpha_L f_L \quad (3.337)$$

der markierten Liganden, und nur diese sollten, um die Komplexität der theoretischen Beschreibung nicht unnötig zu erhöhen, eingesetzt werden, von α_L bis hinunter zu null eingestellt werden. Die Variable f_L stellt hierbei den Anteil Liganden an allen fluoreszenten Spezies (dieses Farbkanaals) dar.

Da sich die effektive molekulare Zählrate nach Gl. 3.364 ebenfalls mit $\tilde{\alpha}_L$ ändert, enthält die mittlere Fluoreszenzintensität ebenfalls Informationen über die relevanten Parameter:

$$\langle F_a(t) \rangle = N_A \Omega_{1,a} \bar{q}_a \left(c_F + c_L \nu_L \beta_L + x_L^{\text{geb}} \gamma_L c_L^0 \nu_L \beta_L \zeta_a \right) \quad (3.338)$$

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \langle F_a(t) \rangle = N_A \Omega_{1,a} \bar{q}_a \left(c_F + (1 - \alpha_L) \gamma_L c_L^0 \nu_L \beta_L + \alpha_L \gamma_L c_L^0 \nu_L \beta_L \zeta_a \right) \quad (3.339)$$

$$= N_A V_{\text{eff},a} \langle \eta_L^0 \rangle \left[\frac{c_F}{\nu_L \beta_L} + \gamma_L c_L^0 (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a) \right]. \quad (3.340)$$

Ist zudem γ_L nicht im Vorhinein bekannt, so weicht weiterhin der reale Anteil f_L vom angestrebten Wert f_L^0 ab:

$$f_L^0 = \frac{\gamma_L c_L^0}{\gamma_L c_L^0 + c_F} \quad (3.341)$$

$$f_L = \frac{\gamma_L f_L^0}{1 - f_L^0 (1 - \gamma_L)}. \quad (3.342)$$

Im allgemeinsten Falle ergibt sich für die beiden Messgrößen folglich

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \frac{\langle F_a(t) \rangle}{N_A V_{\text{eff},a} (c_L^0 + c_F) \langle \eta_L^0 \rangle} = \frac{1 - f_L^0}{\nu_L \beta_L} + f_L^0 \gamma_L (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a) \quad (3.343)$$

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \frac{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle} = \frac{\alpha_L \gamma_L c_L^0 \zeta_a}{\frac{c_F}{\nu_L \beta_L} + \gamma_L c_L^0 (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a)} \quad (3.344)$$

$$= \frac{\gamma_L \alpha_L \zeta_a f_L^0}{\frac{1 - f_L^0}{\nu_L \beta_L} + f_L^0 \gamma_L (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a)}, \quad (3.345)$$

wobei für eine konstante Gesamtkonzentration fluoreszenter Spezies $c_L^0 + c_F$ vorteilhafterweise $\langle F_a(t) \rangle$ auf den entsprechenden Wert in Abwesenheit freien Farbstoffes bezogen wird, um die zusätzliche Unsicherheit aus der sonst nötigen Kenntnis von $\langle \eta_L^0 \rangle$ zu eliminieren:

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \frac{\langle F_a(t) \rangle}{\langle F_a(t) \rangle_{f_L^0=1}} = \frac{\frac{1 - f_L^0}{\nu_L \beta_L} + f_L^0 \gamma_L (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a)}{\gamma_L (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a)}. \quad (3.346)$$

Die Parameter γ_L und ζ_a erscheinen für $\alpha_L = 1$ nur als Produkt in den Formeln und haben auch für $\alpha_L < 1$ einen sehr ähnlichen Einfluss auf Form und Lage der Kurven in Abhängigkeit von f_L^0 (siehe Abb. 3.19), sodass eine getrennte Bestimmung aller Parameter nur bei hoher Qualität der Messdaten möglich ist. Außerdem kann nicht ohne Weiteres davon ausgegangen werden, dass γ_L unabhängig von c_L^0 ist: Ein Verlust durch Haftung an den Gefäßwänden mag etwa bei hoher Konzentration eine Sättigung aufweisen, weshalb es empfehlenswert sein kann, bei konstantem c_L^0 nur den Wert von c_F zu variieren.

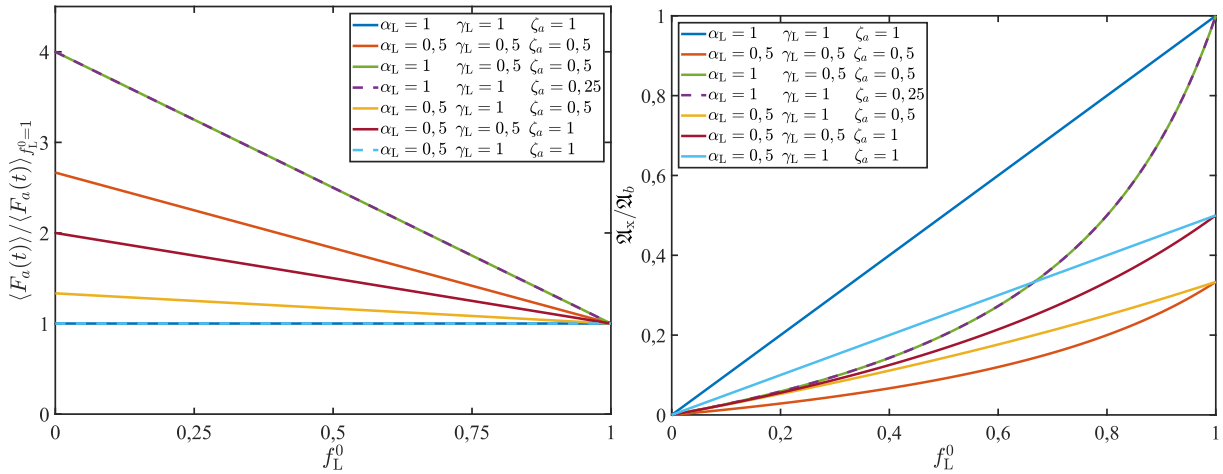


Abbildung 3.19.: Darstellung der Abhängigkeit der relativen Helligkeiten (links) und Amplituden (rechts) vom eingesetzten Ligandenanteil f_L^0 für verschiedene Sätze der Parameter α_L , γ_L und ζ_a . Wo zur Unterscheidung vonnöten, wurden einzelne Kurven gestrichelt gezeichnet.

Insofern davon ausgegangen werden kann, dass bei genügend großem Überschuss von Zielmolekülen gegenüber den Liganden jeweils maximal eine Bindestelle besetzt ist ($N_L \leq 1$ und damit $\theta_m^2 \ll \theta_m$ in Gl. 3.272), liefert die Berechnung der molekularen Zählrate aus der Autokorrelationsamplitude

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \mathfrak{A}_a = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{\nu_L \beta_L [(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L] [(1 - \alpha_L) \gamma_L c_L^0 + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a^2 \langle N_L \rangle]}{((1 - \alpha_L) \gamma_L c_L^0 \nu_L \beta_L + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a \nu_L \beta_L \langle N_L \rangle)^2} \quad (3.347)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{[(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L] (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a^2)}{\gamma_L c_L^0 \nu_L \beta_L (1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a)^2} \quad (3.348)$$

als Produkt mit der mittleren Fluoreszenzintensität, ohne weitere Annahmen über das Bindungsmodell, einen weiteren Zusammenhang

$$\lim_{c_B^0 \rightarrow \infty} \mathfrak{A}_a \langle F_a(t) \rangle = \langle \eta_L^0 \rangle \frac{(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L}{\nu_L \beta_L} \frac{1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a^2}{1 - \alpha_L + \alpha_L \zeta_a}, \quad (3.349)$$

durch den, im Verbund mit den obigen Messungen, im besten Falle alle unbekanntnen Parameter einzeln festgelegt werden können.

3.5.2.5. Markierungstitration (Variation von χ_L)

Eine sichere Bestimmung der Dissoziationskonstanten aus den Ligandentitrationsen ist auf einfache Weise nur möglich, wenn $\xi = 1$ und $\alpha_{L,m} = \alpha_{L,u}$ gilt und damit die Fluoreszenzmarkierung die Affinität zu den Bindestellen und die generelle Bindungsfähigkeit nicht beeinflusst. Um diese Annahme zu überprüfen, kann eine Messreihe bei konstanter Gesamtkonzentration der Liganden und Zielmoleküle, aber variierendem Markierungsgrad χ_L durchgeführt werden. Die Auftragung von $\frac{\theta_m}{\chi_L}$ als Funktion des Markierungsgrades nach Gl. 3.292 liefert bei gleichem Verhalten der

	$\xi < 1$	$\xi > 1$
$\alpha_{L,m} < \alpha_{L,u}$	monoton steigend	beides möglich
$\alpha_{L,m} > \alpha_{L,u}$	beides möglich	monoton fallend

Tabelle 3.2.: Aus den unterschiedlichen Bindungsfähigkeiten und Affinitäten markierter und unmarkierter Liganden sich ergebende Verläufe für die Markierungstitration.

Liganden eine Konstante; jede (im Rahmen der Messgenauigkeit) systematische Abweichung davon deutet auf einen Einfluss der Markierung hin.

Die genaue Formel ergibt sich aus der Lösung von Gl. 3.275 bis 3.279 und soll wegen ihrer unhandlichen Längen hier nicht wiedergegeben werden. Von Interesse ist vor allem der allgemeine Trend bezüglich der Parameter, der in Tabelle 3.2 zu finden ist. In den mit „beides möglich“ bezeichneten Quadranten kompensieren sich die Effekte teilweise gegenseitig, sodass die Kurve sowohl monoton steigend als auch fallend sein kann, wobei eine verbesserte Bindungsfähigkeit bei gleichzeitig verringerter Affinität durch eine Fluoreszenzmarkierung (bzw. umgekehrt) als eher unwahrscheinlich angesehen werden kann. Im Falle einer fallenden Kurve kann der Wert $\lim_{\chi_L \rightarrow 0} \frac{\theta_m}{\chi_L}$ zudem deutlich oberhalb von eins liegen, da die Formel effektiv den Bindungsgrad der markierten auf alle Liganden hochrechnet. Im Extremfall sind die Zielmoleküle stark mit ersteren besetzt, während von den in der gesamten Probe zahlenmäßig überwiegenden unmarkierten Liganden so gut wie keine gebunden sind und damit die Division durch den Markierungsgrad eine extreme „Überfüllung“ der Zielmoleküle mit diesen erwarten lässt.

Um einen deutlichen Effekt zu erzielen, sollten die Bedingungen so gewählt werden, dass θ_m so groß als möglich wird, also $K_D \ll c_L^0$ und $c_B^0 \ll c_L^0$ gegeben ist.

3.5.2.6. Bestimmung der tatsächlichen Konzentrationen in der Probe

Die Konzentration der Zielmoleküle ergibt sich bei Kenntnis ihrer Markierungseigenschaften aus der Autokorrelationsamplitude zu

$$\mathfrak{A}_b \propto \frac{1}{\gamma_M c_M^0} \quad (3.350)$$

$$\gamma_M c_M^0 = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \chi_M} \frac{1}{\langle \nu_M \rangle \beta_M} \left[(1 - \beta_M) + \frac{\langle \nu_M^2 \rangle}{\langle \nu_M \rangle} \beta_M \right]. \quad (3.351)$$

Die Gesamtkonzentration des Liganden in der Probe kann gleichfalls aus Fluoreszenzmessungen geschlossen werden. Die Verwendung der entsprechenden Autokorrelationsamplitude ist dabei zwar theoretisch möglich, setzt aber bereits, selbst unter den oben getroffenen Annahmen $\zeta_a = 1$ und $\alpha_M = 1$, Kenntnis des Bindungsgrades in Bezug auf die markierten Liganden voraus. Auch im simpelsten Fall vollständig und jeweils einfach markierter Liganden ($\chi_L = 1$, $\nu_L = 1$ und $\beta_L = 1$) ergibt sich noch

$$\mathfrak{A}_a = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_L + c_M^0 ([\langle N_B^2 \rangle - \langle N_B \rangle] \theta^2 + \langle N_B \rangle \theta)}{(c_L^0)^2} \quad (3.352)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_L^0 + c_M^0 [\langle N_B^2 \rangle - \langle N_B \rangle] \theta^2}{(c_L^0)^2}. \quad (3.353)$$

Lediglich bei einer 1:1-Bindung zwischen Liganden und Zielmolekülen ($N_B = 1$) erhält man mit

$$\mathfrak{A}_a = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_L + c_M^0 \theta}{(c_L^0)^2} \quad (3.354)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{1}{c_L^0} \quad (3.355)$$

einen vergleichbar einfachen Zusammenhang wie in Gl. 3.350. Der entgegengesetzte Fall sehr vieler Bindestellen und geringer Variabilität der Teilchengröße, also $\langle N_B^2 \rangle \approx \langle N_B \rangle^2 \gg \langle N_B \rangle$, ergibt mit

$$\mathfrak{A}_a = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_L^0 + c_M^0 \langle N_B \rangle^2 \theta^2}{(c_L^0)^2} \quad (3.356)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{c_L^0 + (c_L^0 - c_L) \langle N_B \rangle \theta}{(c_L^0)^2} \quad (3.357)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{1 + x_L^{\text{geb}} \langle N_L \rangle}{c_L^0} \quad (3.358)$$

für einen geringen Anteil gebundener Liganden x_L^{geb} wieder Gl. 3.355, wohingegen die vollständige Bindung mit $c_L \approx 0$ die Erstellung einer Bindungskurve allein aus der Autokorrelationskurve ermöglichen könnte, würde dabei nicht stets auch $\theta \approx 0$ gelten.

Als einfacher und verlässlicher hat sich die direkte Nutzung der mittleren Fluoreszenzzählrate in Kombination mit einer sorgfältigen Kalibrierung über die mittlere molekulare Zählrate (siehe Gl. 3.102) der markierten Liganden erwiesen:

$$\langle F_a(t) \rangle = N_A \Omega_{1,a} (c_{L,m} \bar{Q}_{a,L} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \bar{Q}_{a,M}) \quad (3.359)$$

$$= N_A \Omega_{1,a} \bar{q}_a \nu_L \beta_L (c_{L,m} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m \zeta_a) \quad (3.360)$$

$$= N_A \langle \eta_L^0 \rangle \frac{\Omega_{1,a}^2}{\Omega_{2,a}} (c_{L,m} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m \zeta_a) \quad (3.361)$$

$$= N_A \langle \eta_L^0 \rangle V_{\text{eff},a} (\chi_L \gamma_L c_L^0 - (1 - \zeta_a) \alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m) \quad (3.362)$$

$$\gamma_L c_L^0 = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},a}} \frac{\langle F_a(t) \rangle}{\chi_L \langle \eta_L^{\text{eff}} \rangle} \quad (3.363)$$

$$\langle \eta_L^{\text{eff}} \rangle = \langle \eta_L^0 \rangle \left[1 - (1 - \zeta_a) \frac{\chi_L \gamma_L c_L^0 - c_{L,m}}{\chi_L \gamma_L c_L^0} \right] = \langle \eta_L^0 \rangle \left[1 - (1 - \zeta_a) x_{L,m}^{\text{geb}} \right]. \quad (3.364)$$

In der vierten Zeile wurde Gl. 3.278 eingesetzt, um eine effektive molekulare Zählrate zu definieren, welche die verringerte Helligkeit durch teilweise Bindung miteinbezieht. Hier bezeichnet $x_{L,m}^{\text{geb}}$ den Anteil der markierten Liganden, die an Zielmoleküle gebunden sind.

Die Größe $\langle \eta_L^0 \rangle = \bar{q}_a \nu_L \beta_L \frac{\Omega_{2,a}}{\Omega_{1,a}}$ stellt die mittlere molekulare Zählrate der freien Liganden dar

und muss in einem Kontrollexperiment gesondert ermittelt werden⁸⁹. Dafür kann $x_{L,m}^{\text{geb}}$ über

$$\frac{V_{\text{eff},x} \mathfrak{A}_x \langle R^{2m} \rangle \langle R^n \rangle}{V_{\text{eff},b} \mathfrak{A}_b \langle R^m \rangle \langle R^{m+n} \rangle} = \frac{\alpha_{M,m} \zeta_a \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m}{(c_{L,m} + \alpha_M \gamma_M c_M^0 \zeta_a \langle N_B \rangle \theta_m)} \quad (3.365)$$

$$\approx \frac{\alpha_M \gamma_M c_M^0 \langle N_B \rangle \theta_m}{\chi_L \gamma_L c_L^0} = x_{L,m}^{\text{geb}} \quad (3.366)$$

näherungsweise aus der Kreuzkorrelationsamplitude gewonnen werden, solange $\beta_M = 1$, $\alpha_{M,m} \approx \alpha_M$ und ζ_a nicht zu verschieden von eins ist⁹⁰. Solange $x_{L,m}^{\text{geb}} \approx x_L^{\text{geb}}$ gilt, ist eine genauere Bestimmung zudem mithilfe von Gl. 3.329 möglich.

⁸⁹Im Idealfall geschieht dies anhand einer Probe möglichst genau bekannter Ligandenkonzentration. Ist dies, etwa durch Verluste während der Präparation, nicht möglich, kann für $\beta_L = 1$ einfach $\langle \eta_L^0 \rangle = \mathfrak{A}_a \langle F_a(t) \rangle$ verwendet werden. Anderenfalls muss noch umgerechnet werden ausgehend von

$$\mathfrak{A}_a \langle F_a(t) \rangle = \bar{q}_a [(1 - \beta_L) + \nu_L \beta_L] \frac{\Omega_{2,a}}{\Omega_{1,a}} = \langle \eta_L^0 \rangle \left(1 + \frac{1 - \beta_L}{\nu_L \beta_L} \right).$$

⁹⁰Der maximale relative Fehler der Ligandenkonzentration verringert sich um bis zu 40 Prozentpunkte gegenüber der Verwendung des unkorrigierten Wertes $\langle \eta_L^0 \rangle$, wo er für vollständige Bindung am größten ist und dort $1 - \zeta_a$ beträgt. Wird dagegen obige Näherung eingesetzt, ergibt sich ein Maximum mit einem relativen Fehler von $\left(\frac{1 - \zeta_a}{1 + \zeta_a} \right)^2$ bei $x_{L,m}^{\text{geb}} = \frac{1}{1 + \zeta_a}$.

Teil II.

Anwendungen

4. Ein vesikelbasierter Kalibrationsstandard für die 2-Farben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie

4.1. Einleitung

Die Grundlage jeder quantitativen Auswertung einer Messung ist die genaue Kenntnis der Qualität der verwendeten Geräte. Mögliche Abweichungen und Fehlerquellen müssen sorgsam erfasst und, wo möglich, beseitigt werden. Ist eine Beseitigung nicht möglich, bleibt nur die Einbeziehung der Abweichung in die Theorie selbst. Im Falle der Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie mit zwei Farbkanälen (dcFCCS) ist, neben Ausdehnung und Form der molekularen Detektionsfunktion (MDF) jedes einzelnen Farbkanals, vor allem auch die räumliche Position beider zueinander ausschlaggebend für die erreichbare maximale Kreuzkorrelation. Da in Kapitel 5 die Bindungseigenschaften von Proteinen aus der Kreuzkorrelation bestimmt wird, wirkt sich eine Verminderung selbiger verzerrend auf die ermittelten Werte aus und verringert den erreichbaren Messbereich (in Form der minimalen messbaren Bindungsgrade) des Aufbaus.

Der Qualitätsfaktor Ω als praktisch erreichbare Kreuzkorrelation relativ zum maximalen theoretischen Wert ergibt sich als theoretisches effektives Kreuzkorrelationsvolumen für ein „perfektes“ System $V_{\text{eff},x}$ relativ zum tatsächlichen Wert $\hat{V}_{\text{eff},x}$ ¹:

$$\Omega = \frac{\hat{\mathfrak{A}}_x}{\mathfrak{A}_x} = \frac{V_{\text{eff},x}}{\hat{V}_{\text{eff},x}} \quad (4.1)$$

In Kapitel 4 wird aus Gründen der Praktikabilität stattdessen ein Qualitätsfaktor des Systems definiert, der die gemessene Amplitude der Kreuzkorrelation relativ zur gemessenen Amplitude einer Autokorrelation (hier rot r oder grün g) in Beziehung setzt zu den theoretisch zu erwartenden Werten:

$$\Omega_{(r,g)} = \frac{\hat{\mathfrak{A}}_x / \hat{\mathfrak{A}}_{(r,g)}}{\mathfrak{A}_x / \mathfrak{A}_{(r,g)}} = \frac{\hat{X}_{(r,g)}}{X_{(r,g)}}. \quad (4.2)$$

Dieser Ansatz ist äquivalent zu dem vorgenannten, solange keine Fehler in der Bestimmung der effektiven Autokorrelationsvolumina entstehen.

Der wichtigste Faktor in Bezug auf die optische Qualität eines FCS-geeigneten konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist das Objektiv, welches sowohl einen beugungsbegrenzten Laserfokus er-

¹Hierbei wären beide MDFs perfekt konzentrisch überlagert und entsprächen in ihren Parametern den erwarteten oder durch Kalibrierung festgestellten Werten.

zeugt als auch, in Kombination mit einer Lochblende vor dem Detektor, ein in axialer Richtung begrenztes Detektionsvolumen erzeugt und somit eine möglichst kompakte und gut definierte MDF generiert. Für dcFCFS muss das Objektiv dasselbe leisten, allerdings für zwei verschiedene Wellenlängen, die zusätzlich perfekt räumlich überlappende MDFs erhalten sollen². Alternative Ansätze hierzu verwenden etwa eine Zweiphotonenanregung ohne Lochblende oder regen mehrere Fluorophore mittels desselben Lasers an, was jedoch aus sich heraus noch keine perfekte Überlappung garantiert (HEINZE *et al.*, 2000; HWANG *et al.*, 2004; FOO *et al.*, 2012). Selbst in einem „perfekten“ Aufbau ergibt sich schließlich noch die Problematik, dass schon ein einfacher Wechsel des Objektivs, selbst zwischen zwei nominell identischen Fabrikaten desselben Herstellers, eine dramatische Änderung der erreichbaren relativen Kreuzkorrelation nach sich ziehen kann, wodurch die Verfügbarkeit einer einfachen Kalibrierprozedur umso wichtiger wird.

Die simple Feststellung der unvollständigen Überlappung in lateraler und axialer Richtung, etwa durch Messung der Intensität beider Laser in Abhängigkeit der Lochblendenposition bzw. axialer Abrasterung einer zweifarbigigen Membran (BACIA *et al.*, 2007), zeigt zwar die Existenz einer Abweichung auf, erlaubt aber noch keine Berechnung oder Korrektur der zu erwartenden maximalen relativen Kreuzkorrelation. Hierzu wird eine Kalibrierprobe benötigt, an die eine Reihe von Anforderungen zu stellen sind:

- ein bekannter und genügend hoher Markierungsgrad in beiden Kanälen, welcher eine hohe und verlässliche Kreuzkorrelation erzeugt
- keine Einflüsse photophysikalischer Effekte, die die Kreuzkorrelation verzerren, wie etwa FRET
- ein vernachlässigbarer Grad an Photobleichung
- eine einfache und reproduzierbare Herstellungsmethode oder langfristige Haltbarkeit
- die Möglichkeit einer einfachen Anpassung an verschiedene Anregungswellenlängen.

Eine Probe mit genau bekannter theoretischer Kreuzkorrelation erlaubt die Verortung einer gefundenen Abweichung zu einem perfekten System im optischen Aufbau, anstatt in der suboptimal gewählten Probe. Frühere Publikationen benutzten zu diesem Zwecke doppelt markierte DNA, was aber spezifische Probleme mit sich bringt; insbesondere ist durch den komplexen Markierungs- und Reinigungsprozess die Stöchiometrie der Markierung nur unzureichend bekannt, die einzelnen Chargen untereinander zu variabel und die Probe zudem kostspielig. Konstrukte aus mehreren fluoreszenten Proteinen (FOO *et al.*, 2012) wiederum sind in ihrem Einsatz durch stärkeres Bleichen und unvollständige Reifung der Proteine mit fehlender Fluoreszenz eingeschränkt.

Es wurden aus diesen Gründen kleine unilamellare Vesikel (engl. *small unilamellar vesicles*, SUV) aus dem ungesättigten Phospholipid DOPC eingesetzt, welches hierzu mit jeweils 0,025 % zweier fluoreszenzmarkierter Lipidanaloga versetzt und durch Membranen mit einer Porengröße

²Eine zusätzliche Schwierigkeit sind hierbei die widersprüchlichen Anforderungen an die verwendeten Wellenlängen: Einerseits müssen sie weit genug voneinander entfernt sein, um sie durch dichroitische Spiegel und Filter zu trennen und das Auftreten von FRET zu verringern, andererseits erhöht genau das die chromatische Aberration, also die Verschiebung des Fokus' einer Linse mit der Wellenlänge des Lichtes. Letzteres ist in den hier eingesetzten *apochromatischen* Objektiven weitgehend korrigiert.

von 50nm extrudiert wurde. Die so erhaltenen Vesikel weisen eine relativ schmale Größenverteilung und einen Radius deutlich unter dem der beiden MDFs auf³.

Die Verwendung von synthetischen Fluorophoren in einer Lipidmembran erlaubt eine einfache Anpassung der spektralen Eigenschaften und Helligkeit der Probe, sowie die Verminderung von FRET durch die wählbare mittlere Entfernung der in der Membran verteilten Fluorophore. Die Vesikelproben sind darüber hinaus mehrere Wochen bei 4°C haltbar.

4.2. Grundlagen

Wie oben bereits beschrieben, wird hier der Qualitätsfaktor aus den relativen Kreuzkorrelationsamplituden $\hat{X}_{(r,g)}$ berechnet, welche unabhängig sind von der Gesamtkonzentration der Vesikel c_V und aus einer Anpassung der in Gl. 3.157 gegebenen theoretischen F(C)CS-Kurven für eine einzige diffundierende Komponente an die gemessenen Korrelationsdaten erfolgt⁴. Die Basis für die weitere Berechnung bilden somit Gl. 3.108 für die Korrelationsamplituden einer Mischung verschieden heller, unabhängig diffundierender Teilchen, sowie Gl. 3.153 und 3.154 für die effektiven Korrelationsvolumina im 3D-GAUSSmodell.

Selbst bei einer monodispersen Vesikelprobe verbleibt ein nicht vernachlässigbarer Einflussfaktor: die stochastische Verteilung der Anzahl der auf einem Vesikel befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe. Diese kann unter der Annahme einer homogenen Verteilung des Farbstoffes auf die Vesikel als eine Binomialverteilung (mit der Anzahl „zu ersetzender“ Lipide N_{Li} und dem Markierungsgrad $\chi_{(r,g)}$ als Wahrscheinlichkeit p einer solchen Ersetzung) modelliert werden, welche hier aufgrund der verschwindend geringen Anzahl markierter Lipide als POISSON-Verteilung (siehe Gl. 3.36) mit dem Erwartungswert

$$\langle N_{(r,g)} \rangle = \lambda_{(r,g)} = \chi_{(r,g)} N_{Li} \quad (4.3)$$

und der Varianz

$$\sigma^2(N_{(r,g)}) = \langle N_{(r,g)}^2 \rangle - \langle N_{(r,g)} \rangle^2 = \lambda_{(r,g)} = \chi_{(r,g)} N_{Li} \quad (4.4)$$

angenähert wurde. Die Gesamthelligkeit eines Vesikels in einem der Kanäle wird (unter Vernachlässigung von spektralem Übersprechen, Energietransfer, Fluoreszenzlöschung) schließlich als Summe der Helligkeiten aller Fluorophore der jeweiligen Farbe angenommen:

$$Q_{(r,g)} = N_{(r,g)} q_{(r,g)}. \quad (4.5)$$

Die Polydispersität der Vesikel erfordert nun eine weitere „Ebene der Zufälligkeit“, um sie in den Amplituden zu berücksichtigen: N_{Li} selbst folgt einer Verteilung⁵ als Funktion des Vesikelradius

³Beide Effekte spielen gleichwohl eine nicht zu vernachlässigende Rolle, senken sie doch die mit einem optisch perfekten System erreichbare Kreuzkorrelation um einige Prozent. In Abschnitt 3.4.7.4 werden die Fehler der endlichen Vesikelgröße theoretisch abgeschätzt und in Abschnitt 4.2 für den Effekt der Größenverteilung Korrekturmöglichkeiten aufgezeigt.

⁴Eine Berücksichtigung photophysikalischer Phänomene auf der Ebene der einzelnen Fluorophore ist hierbei unnötig, da sich deren Einfluss durch deren große Anzahl (≈ 20 Stück in beiden Farben) nahezu herausmittelt (siehe Gl. 3.136).

⁵Ein interessanter Aspekt ist hierbei die Verknüpfung der vorher unabhängigen Zufallsgrößen N_g und N_r . Diese

r_V – von der aber nur die ersten beiden Momente benötigt werden – und damit gilt auch $\lambda_{r_V,(r,g)} \sim f(r_V)$.

Unter Berücksichtigung aller angesprochenen Mittelungen und dem Kürzen der molekularen Helligkeiten $q_{(r,g)}$ reduziert sich Gl. 4.2 mit

$$\mathfrak{Q}_{(r,g)} = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},(r,g)}} \frac{\langle N_{(r,g)}^2 \rangle}{\langle N_{(r,g)} \rangle^2} = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},(r,g)}} \frac{\langle \lambda_{r_V,(r,g)} \rangle + \langle \lambda_{r_V,(r,g)}^2 \rangle}{\langle \lambda_{r_V,(r,g)} \rangle^2} \quad (4.6)$$

$$\mathfrak{Q}_x = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},x}} \frac{\langle N_g N_r \rangle}{\langle N_g \rangle \langle N_r \rangle} = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},x}} \frac{\langle \lambda_{r_V,g} \lambda_{r_V,r} \rangle}{\langle \lambda_{r_V,g} \rangle \langle \lambda_{r_V,r} \rangle} \quad (4.7)$$

und für den hier verwendeten Spezialfall $\chi_g = \chi_r$ auf

$$\mathfrak{Q}_{(r,g)} = \frac{\hat{X}_{(r,g)}}{X_{(r,g)}} = \hat{X}_{(r,g)} \frac{V_{\text{eff},x}}{V_{\text{eff},(r,g)}} \frac{\langle \lambda_{r_V} \rangle + \langle \lambda_{r_V}^2 \rangle}{\langle \lambda_{r_V}^2 \rangle} \approx \hat{X}_{(r,g)} \frac{V_{\text{eff},x}}{V_{\text{eff},(r,g)}} \frac{1 + \lambda_{r_V,(r,g)}}{\lambda_{r_V,(r,g)}}, \quad (4.8)$$

wobei die letzte Näherung für nahezu monodisperse Vesikelproben und auch für $\chi_g \neq \chi_r$ gilt.

Die Bestimmung von $\lambda_{r_V,(r,g)}$ erfolgt über den Radius der Vesikel – berechnet mittels der Diffusionszeit und der STOKES-EINSTEIN-Gleichung (Gl. 3.48) – und mit dem aus der Literatur bekannten Volumen (KUČERKA *et al.*, 2005) eines Lipidmoleküls $V_{\text{Li}} = 1,303 \text{ nm}^3$. Das Vesikel wird hierbei als Kugelschale mit einer Dicke $d_V = 3,89 \text{ nm}$ (KUČERKA *et al.*, 2009) entsprechend einer Lipiddoppelschicht modelliert:

$$\lambda_{r_V,(r,g)} = \frac{4\pi (r_V^2 d_V + r_V d_V^2 + d_V^3/3)}{V_{\text{Li}}} \chi_{(r,g)}. \quad (4.9)$$

Ist der Einsatz genügend hoher Markierungsgrade möglich oder werden genügend große Vesikel eingesetzt, so geht Gl. 4.8 mit $\lambda_{r_V,(r,g)} \gg 1$ in $\mathfrak{Q}_{(r,g)} \approx \hat{X}_{(r,g)} \frac{V_{\text{eff},x}}{V_{\text{eff},(r,g)}}$ über, sodass nach Gl. 4.11 allein die FCCS-Messungen an den Vesikeln genügen und eine externe Referenz überflüssig wird.

Das ideale $V_{\text{eff},x}$ muss vorher zusätzlich aus den Größen der beiden einzelnen Foki ermittelt werden (siehe Gl. 3.153 und 3.154), wobei entweder zwei verschiedene Referenzfarbstoffe mit bekannten Diffusionskoeffizienten Anwendung finden können oder, wie hier ein einziger Farbstoff in Kombination mit der zweifarbigen Probe selbst. Da die Vesikel in beiden Farbkanälen verschiedene Diffusionszeiten aufweisen, aber natürlich nur über einen einzigen Diffusionskoeffizienten verfügen, erlaubt dies eine einfache Berechnung des Verhältnisses der beiden lateralen Fokusradien:

$$\frac{\tau_{D,g}}{\tau_{D,r}} = \frac{4D\omega_{xy,g}^2}{4D\omega_{xy,r}^2} = \sqrt{\frac{\omega_{xy,g}}{\omega_{xy,r}}}. \quad (4.10)$$

Tatsächlich genügt die Kenntnis von

$$\frac{V_{\text{eff},x}}{V_{\text{eff},g}} = 2^{-3/2} \left(1 + \frac{\tau_{D,r}}{\tau_{D,g}} \right) \sqrt{\left(1 + \frac{S_r^2 \tau_{D,r}}{S_g^2 \tau_{D,g}} \right)} \quad (4.11)$$

sind durch die identische Abhängigkeit von N_{Li} nun korreliert: $\langle N_g N_r \rangle \neq \langle N_g \rangle \langle N_r \rangle$.

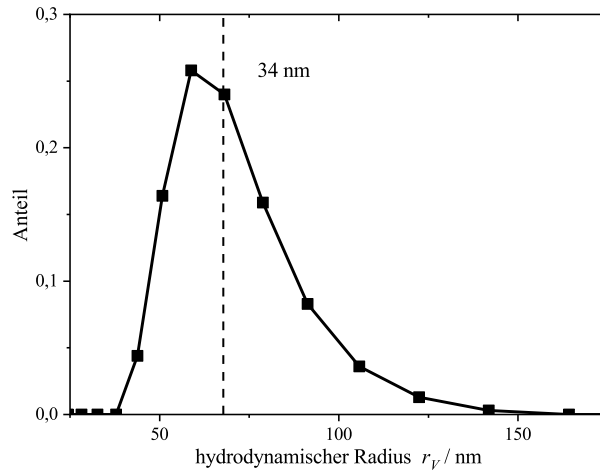


Abbildung 4.1.: Aus DLS-Messungen bestimmte Größenverteilung der in Abb. 4.3 verwendeten Vesikel. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert an.

bzw. die entsprechende Gleichung mit $V_{\text{eff},r}$ für die Berechnung von $\mathfrak{Q}_{(r,g)}$. Allein für die Ermittlung von r_V aus $\tau_{D,(r,g)}$ nach Gl. 3.155 wird das absolute Korrelationsvolumen und damit der bekannte Diffusionskoeffizient eines Farbstoffs benötigt. Die Strukturparameter $S_{(r,g)}$ werden aus der Anpassung von Gl. 3.157 an die Messungen zweier verschiedener Farbstoffe gewonnen, deren Diffusionskoeffizient jedoch keine Rolle spielt.

Zuletzt soll eine Methode vorgestellt werden, mit deren Hilfe das Vorliegen einer nicht-idealen Überlappung der Foki schnell und ohne größere Berechnungen festgestellt werden kann: Die Diffusionszeit der Kreuzkorrelationskurve ergibt sich für das 3D-GAUSSmodell nach Gl. 3.156 als arithmetisches Mittel der Diffusionszeiten der einzelnen Kanäle:

$$\tau_{D,x} = \frac{1}{4D} \frac{\omega_{xy,g}^2 + \omega_{xy,r}^2}{2} = \frac{\tau_{D,g} + \tau_{D,r}}{2}. \quad (4.12)$$

Der gemessene Wert $\hat{\tau}_{D,x}$ sollte folglich genau zwischen $\hat{\tau}_{D,g}$ und $\hat{\tau}_{D,r}$ liegen. Eine größere Abweichung deutet auf eine ungenügende Überlappung hin.

4.2.1. Berechnung der Polydispersität

Kann die Verteilungsbreite der Vesikelradien nicht mehr vernachlässigt werden (eine beispielhafte DLS-Messung ist in Abb. 4.1 gezeigt), so sind verschiedene Methoden diese einzubeziehen denkbar: Die Verteilung kann direkt aus einer Messung, etwa mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS), ermittelt und $\langle \lambda_{r_V} \rangle$ sowie $\langle \lambda_{r_V} \rangle^2$ berechnet werden⁶. Steht diese externe Information nicht zur Verfügung, kann für $\chi_g = \chi_r$ und bei genauer Kenntnis der Gesamtkonzentration der Farbstoffe $c_F = \langle \lambda_{r_V} \rangle c_V$ auch auf die Autokorrelationsamplitude zurückgegriffen werden. Aus

⁶Dabei ist zu beachten, dass in den hier verlangten Erwartungswerten implizit eine ungewichtete Vorgehensweise angenommen wurde, im Gegensatz etwa zum „rohen“ Ergebnis einer DLS-Messung, welche eine mit der Streuintensität der jeweiligen Vesikel gewichtete Verteilung liefert. Deren komplexe Abhängigkeit vom Radius muss gerade bei breiten Verteilungen und großen Vesikeln unbedingt einbezogen werden (PENCER *et al.*, 2003).

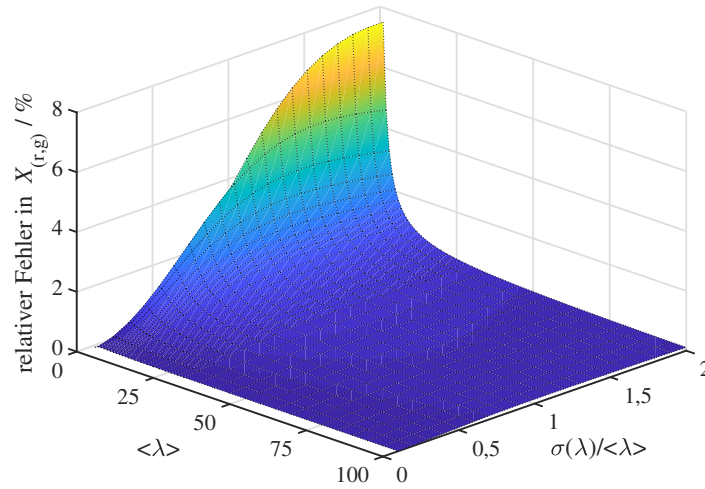


Abbildung 4.2.: Relativer Fehler in $X_{(r,g)}$ bei Verwendung der Näherung $\langle \lambda_{r_V}^2 \rangle / \langle \lambda_{r_V} \rangle \approx \lambda_{\hat{r}_V}$ als Funktion von Mittelwert und Variationskoeffizient der Anzahl Fluorophore auf einem Vesikel. Der Markierungsgrad χ entspricht hier $\approx 0,02\%$ und hat einen vernachlässigbaren Einfluss bei Konstanzhaltung der anderen Größen. Die Doppelschicht wurde unter Vernachlässigung ihrer endlichen Dicke als zwei identische Kugeloberflächen behandelt mit einer Fläche pro Lipidmolekül von $A_{Li} = 0,67 \text{ nm}^2$, womit sich die mittleren Radien der Vesikel hier zu $r_V \approx 20 \text{ nm} - 200 \text{ nm}$ ergeben. \hat{r}_D wurde als Halbhöhenwert der mit dem Produkt aus $\lambda^2(r_V)$ und Wahrscheinlichkeitsdichte gewichteten und über die logarithmischen Normalverteilungen $P(r_V) = (2\pi r_V^2 \sigma^2(r_V))^{-1/2} e^{-\frac{(\ln r_V - \langle r_V \rangle)^2}{2\sigma^2(r_V)}}$ integrierten Autokorrelationskurven ermittelt.

Gl. 4.6 folgt

$$\mathfrak{A}_{(r,g)} c_V N_A V_{\text{eff},(r,g)} \langle \lambda_{r_V} \rangle = \mathfrak{A}_{(r,g)} c_{F,(r,g)} N_A V_{\text{eff},(r,g)} = 1 + \frac{\langle \lambda_{r_V}^2 \rangle}{\langle \lambda_{r_V} \rangle} \quad (4.13)$$

und damit unmittelbar

$$\mathfrak{Q}_{(r,g)} = \hat{X}_{(r,g)} \frac{V_{\text{eff},x}}{V_{\text{eff},(r,g)}} \left(1 + \frac{1}{\mathfrak{A}_{(r,g)} c_{F,(r,g)} N_A V_{\text{eff},(r,g)} - 1} \right). \quad (4.14)$$

Als simple und dennoch verlässliche Alternative hat sich die Verwendung des unkorrigierten Wertes \hat{r}_V (gewonnen aus der Diffusionszeit in einem der beiden Kanäle) in Gl. 4.9 erwiesen. Simulationen mit logarithmischen Normalverteilungen, welche den empirisch gefundenen Radienverteilungen vergleichbar sind, bestätigen die geringe Abweichung zwischen der Verwendung von $\lambda_{\hat{r}_V}$ und $\langle \lambda_{r_V}^2 \rangle / \langle \lambda_{r_V} \rangle$ für einen weiten Parameterraum (siehe Abb. 4.2).

Neben dem Einfluss der Polydispersität selbst kann mit dem mittleren Radius aus Abb. 4.1 zusätzlich derjenige der realen Ausdehnung der Vesikel auf die Amplitude überprüft werden. Unter Bezug auf die für verschiedene Fokusmodelle in Abschnitt 3.4.7.4 durchgeführten Rechnungen für Hohlkugeln erhält man für einen mittleren Vesikelradius von 34 nm und einen Fokusradius

von mindestens 216 nm (siehe Tabelle 4.1) eine Verzerrung von unter 5 %, welche sich durch die Verhältnisbildung im Qualitätsfaktor weiter reduziert und hier nicht weiter berücksichtigt wird.

4.2.2. Einfluss auf Bindungsexperimente

Zur Illustration des Einflusses des Qualitätsfaktors auf Bindungsexperimente wird noch die Bestimmung der Dissoziationskonstante einer 1:1-Bindung aus dcFCCS-Messungen behandelt: Man erhält durch Reduktion von Gl. 3.109 auf den Fall von nur grün markierten (Konzentration c_G^{frei}), nur rot markierten (Konzentration c_R^{frei}) und grün-rot markierten Teilchen (Konzentration c_{RG}) mit den Gesamtkonzentrationen

$$c_{(R,G)}^0 = c_{(R,G)}^{\text{frei}} + c_{RG}, \quad (4.15)$$

den Bindungsgraden

$$\theta_{(R,G)} = \frac{c_{RG}}{c_{(R,G)}^0} \quad (4.16)$$

und der Dissoziationskonstante (siehe Gl. 3.247)

$$K_D = \frac{c_R^{\text{frei}} c_G^{\text{frei}}}{c_{RG}} = \frac{(1 - \theta_G)(1 - \theta_R) c_G^0}{\theta_R} \quad (4.17)$$

zunächst

$$\mathfrak{A}_x \propto \frac{c_{RG}}{c_R^0 c_G^0} = \frac{\theta_R}{c_G^0} \quad (4.18)$$

und mit Gl. 4.1 schließlich

$$\hat{\theta}_{(R,G)} = \mathfrak{Q} \theta_{(R,G)} \quad (4.19)$$

und

$$\frac{\hat{K}_D}{K_D} = \frac{(1 - \mathfrak{Q}\theta_G)(1 - \mathfrak{Q}\theta_R)}{\mathfrak{Q}(1 - \theta_G)(1 - \theta_R)}. \quad (4.20)$$

4.3. Experimente

4.3.1. Materialien

Die Lipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DOPC) und 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) wurden von der Firma *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, USA), die Farbstoffe 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin (DiD-C₁₈), 3,3'-Dioctadecyloxycarbocyanin (DiO-C₁₈), 2-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (β -BODIPY FL C₁₂-HPC), Alexa Fluor 488 Hydrazid und Alexa Fluor 633 Hydrazid von der Firma *Invitrogen* (Carlsbad, Kalifornien, USA) und das Chloroform von der Firma *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Für die Vesikelextrusion wurden spurgeätzten Polycarbonatmembranen mit 50 nm Porendurchmesser von der Firma *Whatman* (Maidstone, UK) eingesetzt.

Die verwendeten Deckgläser der Firma *Gerhard Menzel* (Braunschweig, Deutschland) besaßen die Stärke Nr. 1,5 und wiesen somit eine Dicke von im Mittel 170 µm auf.

4.3.2. Geräte

Die Vesikelextrusion erfolgte in einem *mini-extruder* der Firma *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, USA).

Die DLS-Messungen wurden an einem *Zetasizer Nano S* der Firma *Malvern* (Herrenberg, Deutschland) durchgeführt.

Alle dcFCCS-Experimente wurden an einem Laserrastermikroskop der Marke *LSM 710* mit FCS-Funktionalität (*ConfoCor 3*) der Firma *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Ionenlaser der Wellenlänge 488 nm und einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm, welche über einen dichroitischen Spiegel (Reflexion bei 488 nm, 561 nm und 633 nm) als Hauptstrahlteiler eingekoppelt wurden. Das Fluoreszenzlicht wurde durch dasselbe Objektiv (*C-Apochromat* 40x mit $NA = 1,2$) eingesammelt, über eine quadratische Lochblende (Durchmesser 40 µm) dessen Konfokalität sichergestellt und mittels eines dichroitischen Strahlteilers bei 635 nm aufgetrennt und über Farbfilter (ein Bandpass-Filter von 505 nm bis 610 nm und ein Langpass-Filter ab 655 nm) auf zwei Detektoren (APDs) geleitet.

4.3.3. Präparation

DOPC in chloroformischer Lösung wurde in definierten Volumina mit den methanolischen Lösungen der Farbstoffe in einem Glasfläschchen vermischt und das Lösungsmittel unter einem Stickstoffstrom abgezogen. Die getrockneten Mischungen wurden mit Reinstwasser rehydratisiert und 21 Mal durch zwei Membranen extrudiert.

4.3.4. Messungen

Die dcFCCS-Messungen erfolgten bei einer Temperatur von zirka 24°C und umfassten jeweils zehn Einzelmessungen à 60 s in einem Tropfen der Vesikellösung auf einem Deckglas. Die Auto- und Kreuzkorrelationskurven wurden in dem Programm *ZEN 2009* von *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) berechnet und in dem Programm *OriginPro 8* der Firma *OriginLab* (Northampton, Massachusetts, USA) ausgewertet.

4.4. Ergebnisse und Diskussion

4.4.1. Kalibrierung

Die FCS-Messungen des freien Farbstoffs Alexa Fluor 488 Hydrazid (grüner Kanal, Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm) zur Bestimmung des Fokusradius wurden mit einem Wert des Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Alexa488}} = 435 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ aus der Literatur ([PETRÁŠEK et al., 2008](#))

	$\tau_{D,g} / \mu\text{s}$	$\omega_{xy,g} / \text{nm}$	$V_{\text{eff},g} / \mu\text{m}^3$	$\tau_{D,r} / \mu\text{s}$	$\omega_{xy,r} / \text{nm}$	$V_{\text{eff},r} / \mu\text{m}^3$
Objektiv 1	27,1	217	0,34	42,5	260	0,59
Objektiv 2	27,9	220	0,36	42,2	263	0,61
Objektiv 3	26,7	216	0,33	43,3	258	0,57

Tabelle 4.1.: Optische Parameter der hier untersuchten Objektive des Typs C-Apochromat 40x mit $\text{NA} = 1,2$.

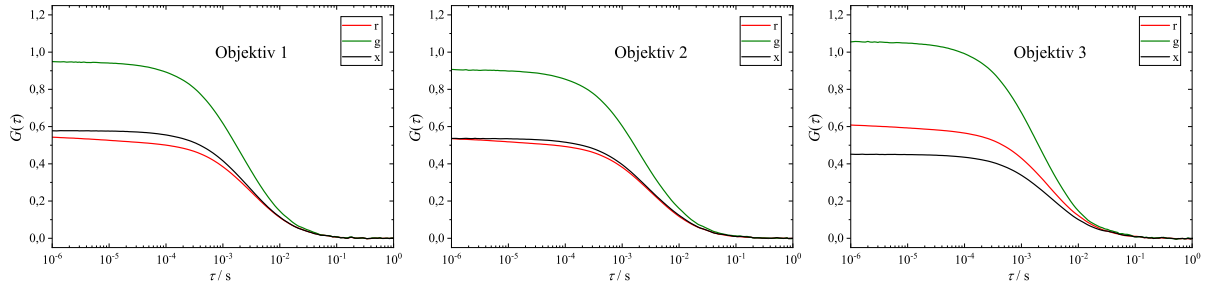


Abbildung 4.3.: Experimentelle dcFCCS-Kurven von einer der zweifarbigen DOPC-Vesikelproben, gemessen an den drei untersuchten Objektiven. Die Autokorrelationskurven sind in grün bzw. rot dargestellt, die Kreuzkorrelationskurve in schwarz. Aufgrund der hohen molekularen Zählrate der einzelnen Vesikel gibt es kaum sichtbares Rauschen in den Kurven. Die hohen relativen Kreuzkorrelationsamplituden des besten Objektivs 1 im Vergleich zum schlechtesten Objektiv 3 sind deutlich sichtbar.

ausgewertet und daraus, sowie aus dem Strukturparameter (in beiden Kanälen näherungsweise identisch mit $S = 6$, im roten Kanal mit einer Anregung mit einer Wellenlänge von 633 nm und Alexa Fluor 633 Hydrazid bestimmt) und dem Verhältnis der Diffusionszeiten der Vesikel in beiden Kanälen (berechnet mit dem Objektiv mit dem höchsten Qualitätsfaktor zu $\frac{\tau_{D,r}}{\tau_{D,g}} = 1,43$), die Fokusradien und -volumina beider Kanäle berechnet (siehe Tabelle 4.1).

Man erkennt eine sehr gute Übereinstimmung aller Parameter zwischen den einzelnen Objektiven, was die hier vorausgesetzte Unabhängigkeit der Qualität der Überlappung der Foki von der Qualität der einzelnen Foki unterstützt. Für die weiteren Berechnungen wurden die Radien der Vesikel aus den Diffusionszeiten des grünen Kanals sowie für $\omega_{xy,g}$ der Wert des „besten“ Objektivs, Nummer 1, gewählt. Die für die Bestimmung von λ_{rV} nach Gl. 4.9 nötigen übrigen Parameter wurden zu $T = 297,15 \text{ K}$, $\eta = 0,91 \text{ mPa s}$, $\chi_g = \chi_r = 0,025 \%$ festgelegt.

4.4.2. Vergleich dreier Objektive

Hier wurden bei drei Objektiven des selben Typs mit mehreren Präparationen der oben beschriebenen SUVs dcFCCS-Experimente durchgeführt (siehe Abb. 4.3), um ihren individuellen Qualitätsfaktor zu ermitteln. Die Korrelationsamplituden und anderen Messgrößen aller Objektivs, welche in diese Berechnung eingeflossen sind, finden sich in Tabelle 4.2. Man erkennt neben der deutlich verschiedenen Qualität der drei Objektivs auch gut den bei Gl. 4.12 dargelegten Zusammenhang zwischen Qualitätsfaktor und Diffusionszeit der Kreuzkorrelationskurve relativ zur erwarteten Zeit ($\hat{\tau}_{D,x}/\tau_{D,x}$). Das deutlich schlechtere Objektiv 3 weist einen rund 30 % erhöh-

	Objektiv 1	Objektiv 2	Objektiv 3
$\hat{\mathfrak{Q}}_g$	0,93	0,88	1,04
$\hat{\mathfrak{Q}}_r$	0,52	0,51	0,59
$\hat{\mathfrak{Q}}_x$	0,58	0,54	0,45
\hat{X}_g	0,62	0,61	0,43
\hat{X}_r	1,12	1,06	0,76
X_g	0,70	0,71	0,69
X_r	1,19	1,21	1,19
\mathfrak{Q}_g	0,90	0,84	0,65
\mathfrak{Q}_r	0,93	0,89	0,63
$\bar{\mathfrak{Q}}$	0,92	0,86	0,64
$\hat{\tau}_{D,g}/\text{ms}$	2,0	2,3	1,9
$\hat{\tau}_{D,r}/\text{ms}$	2,9	3,2	2,8
$\hat{\tau}_{D,x}/\text{ms}$	2,6	3,0	3,1
$\hat{\tau}_{D,x}/\tau_{D,x}$	1,04	1,07	1,29
\hat{r}_V/nm	41	47	39
$\lambda_{\hat{r}_V}$	14	19	13

Tabelle 4.2.: Für die drei untersuchten Objektive an zweifarbigen DOPC-Vesikelproben (je 0,025 % β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈, Lipidkonzentration 0,25 mmol/L) bestimmte Messgrößen der dcFCCS-Experimente. Die Rechnungen wurden jeweils mit den exakten Werten durchgeführt und für die Tabelle gerundet. Die Lipidkonzentration betrug jeweils 0,25 mmol/L und die Farbstoffe β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈ wurden zu je 0,025 % eingesetzt.

ten Wert der letzteren Größe auf. Die aus den Diffusionszeiten des grünen Kanals errechneten Vesikelradien stimmen sehr gut untereinander überein, insbesondere da es sich jeweils um eine Mittelung über verschiedene Vesikelpräparationen handelt. Ein Vergleich der Messwerte bei Verwendung einer einzigen Präparation ist in Tabelle A.2 zu finden und bestätigt diesen Befund.

4.4.3. Reproduzierbarkeit

Für das Objektiv mit dem höchsten Qualitätsfaktor wurden zudem aus insgesamt 19 unabhängigen Präparationen die Schwankung der berechneten Parameter bestimmt. Der aus den relativen Amplituden beider Farbkanäle gemittelte Qualitätsfaktor

$$\bar{\mathfrak{Q}} = \frac{\mathfrak{Q}_r + \mathfrak{Q}_g}{2} \quad (4.21)$$

zeigte einen Variationskoeffizient von lediglich 1,1 % und belegt damit die hohe Genauigkeit und Wiederholbarkeit der Methodik⁷. Auch das als Indiz für ungenügende Überlappung der Foki dienende Verhältnis $\hat{\tau}_{D,x}/\tau_{D,x}$ weist einen Variationskoeffizienten von nur 1,8 % auf. Die Mittelwerte und Standardabweichungen aller relevanten Messwerte befinden sich im Anhang A.1.

⁷Die geringe Variation ist hier die Folge der sehr präzisen Präparation von Vesikeln, sowohl in Bezug auf ihre Größenverteilung als auch auf ihren Farbstoffgehalt. Eine wichtige Voraussetzung sind die Wahl eines geeigneten Lipids sowie optimierte Bedingungen bei der Extrusion.

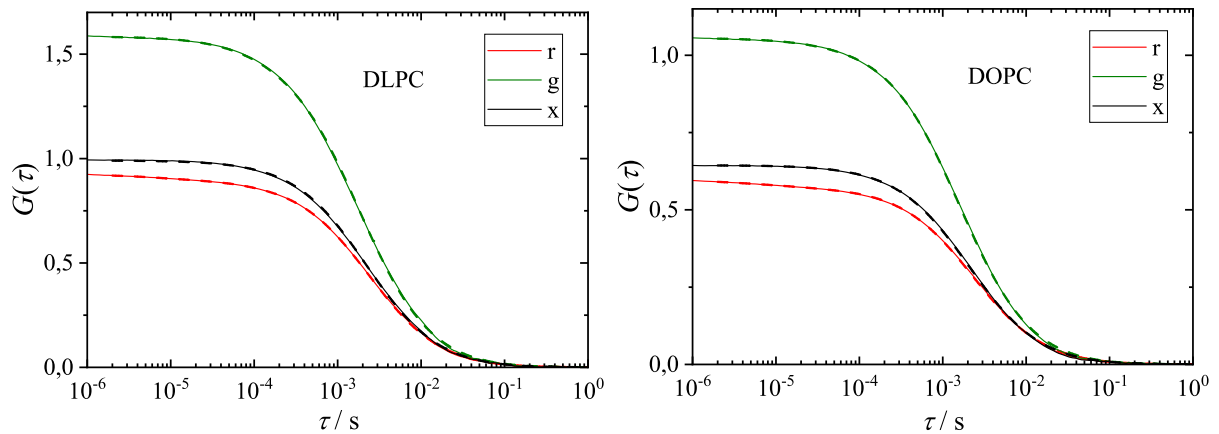


Abbildung 4.4.: Vergleich von dcFCCS-Experimenten an zweifarbigen Vesikelproben (je 0,05% β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈, Lipidkonzentration 0,25 mmol/L) aus DLPC (links) und DOPC (rechts). Die Autokorrelationskurven sind in grün bzw. rot dargestellt, die Kreuzkorrelationskurve in schwarz.

4.4.4. Lipidvariation

Um einen Einfluss des Lipides auf die Messergebnisse zu überprüfen bzw. ausschließen zu können, wurden weiterhin Vesikel aus dem deutlich kürzerkettigen, gesättigten Phospholipid DLPC hergestellt und gleichartige Experimente daran durchgeführt. Abb. 4.4 zeigt die weitgehende Übereinstimmung der Korrelationskurven für beide Lipide. Die daraus berechneten Qualitätsfaktoren (für Objektiv 1) sind mit $\bar{\Omega} = 0,91$ für DLPC und $\bar{\Omega} = 0,90$ für DOPC im Rahmen der Messgenauigkeit ebenfalls ununterscheidbar.

4.4.5. FRET

Zur Demonstration der in Gegenwart von FRET auftretenden Abweichungen wurden Messungen mit einer weiteren Farbstoffkombination durchgeführt (DiD-C₁₈ mit DiO-C₁₈ anstatt DiD-C₁₈ mit β -BODIPY FL C₁₂-HPC), welche vermittels ihrer größeren räumlichen Nähe in der Lipidmembran (DiD-C₁₈ und DiO-C₁₈ sind im Bereich der hydrophilen Kopfgruppen lokalisiert, β -BODIPY FL C₁₂-HPC hingegen im hydrophoben Kettenbereich) und ihrer günstigeren Ausrichtung der entsprechenden Übergangsdipolmomente zueinander (parallel zur Membran bei DiD-C₁₈ und DiO-C₁₈, senkrecht dazu bei β -BODIPY FL C₁₂-HPC) eine höhere FRET-Effizienz aufweisen. Wie aus Abb. 4.5 ersichtlich, führt diese Konstellation zu einer Vertauschung der relativen Lage der Korrelationskurven, sodass beide Werte für $\hat{X}_{(r,g)} < 1$ und sich ohne weitere Korrektur unsinnige Qualitätsfaktoren ergeben ($\Omega_g = 1,23$ und $\Omega_r = 0,69$).

Der Grund für die Veränderungen in den Amplitudenwerten ist in der durch die intrinsisch zufällige Umverteilung von Helligkeit zwischen den beiden Kanälen begründete zusätzliche Variabilität des Systems zu finden. Diese beeinflusst die Varianz der Helligkeit der Vesikel in jedem einzelnen Kanal sowie die Kovarianz zwischen den Kanälen und damit gleichfalls die Korrelationsamplituden.

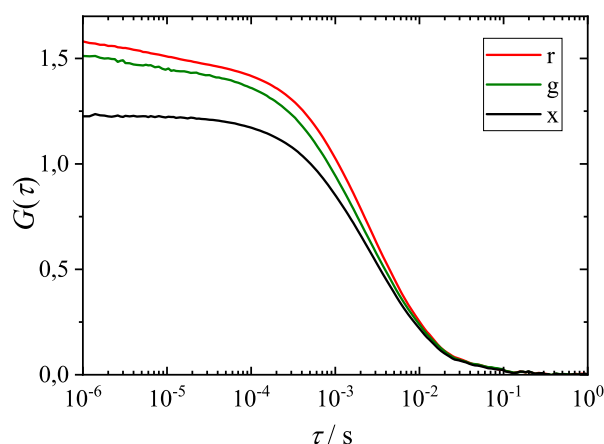


Abbildung 4.5.: Vergleich von dcFCCS-Experimenten an zweifarbigen DOPC-Vesikelproben (je 0,05 % DiO-C₁₈ und DiD-C₁₈, Lipidkonzentration 0,25 mmol/L). Die Autokorrelationskurven sind in grün bzw. rot dargestellt, die Kreuzkorrelationskurve in schwarz.

Für die praktische Anwendung des Systems als Kalibrierstandard ist folglich unbedingt auf die Minimierung von FRET zu achten. Eine Möglichkeit dies zu kontrollieren stellt beispielsweise die Untersuchung von Vesikeln verschiedener Markierungsgrade $\chi_{(r,g)}$ dar, welche in Anwesenheit von durch FRET eingebrachten Verzerrungen eine systematische Abhängigkeit der ermittelten Qualitätsfaktoren zeigen. Die Ursache ist die, bei vernachlässigbarer Interaktion der Farbstoffe in der Membran, mit sinkendem Markierungsgrad zunehmende mittlere Entfernung der Farbstoffe voneinander und damit einhergehend eine abnehmende FRET-Effizienz.

4.4.6. Einfluss der Messzeit

Sowohl die Streuung der Amplitudenmesswerte als auch ihre etwaige Verzerrung hängen von der Messzeit der F(C)CS-Experimente ab. In potentiell heterogenen Vesikelproben gilt dies umso mehr, da eine korrekte Mittelung über alle Vesikelhelligkeiten und damit auch -radien die Passage einer repräsentativen Stichprobe aller verschiedenartigen Teilchen durch den Fokus voraussetzt. Größere und damit langsamer diffundierende Teilchen wie Vesikel erfordern zudem für die gleiche Anzahl an Passagen eine abermals längere Messzeit.

Beispielhaft wurden daher die Autokorrelationsamplituden und Diffusionszeiten von Proben kleiner, homogener Teilchen (hier wässrige Lösungen von Alexa Fluor 488 Hydrazid und Alexa Fluor 633 Hydrazid für den grünen bzw. roten Kanal) mit denen von zweifarbigen Vesikeln bei verschiedenen effektiven Messzeiten⁸ verglichen (siehe Abb. 4.6).

Man erkennt eine Verzerrung der Amplitude der Vesikelprobe hin zu kleineren Werten bei kurzen Messzeiten, da der Einfluss von wenigen großen und damit hellen und stark in der Korrelationsamplitude gewichteten Teilchen erst in sehr langen Messungen vollständig zur Geltung kommt. Durch die Normierung auf die mittlere Helligkeit (siehe Gl. 3.74) rufen die hellen Teilchen, so-

⁸Es wurde jeweils dieselbe lange Messung verwendet, aber diese in eine Anzahl verschieden großer Intervalle zerlegt und einzeln korreliert und die FCS-Parameter von diesen bestimmt. Daraus ergaben sich ebenfalls die Variationskoeffizienten.

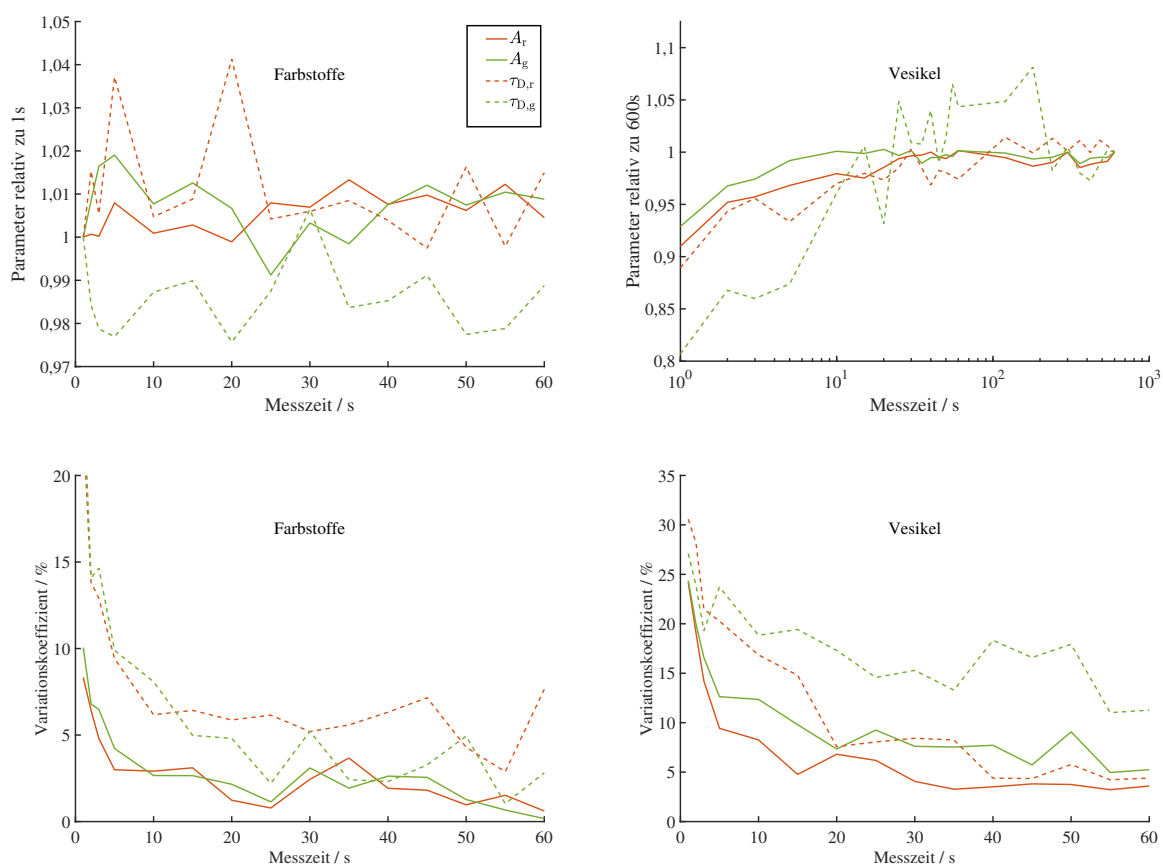


Abbildung 4.6.: Vergleich des Einflusses der Messzeit auf Verzerrung (obere Reihe) und Variationskoeffizient (untere Reihe) der Amplituden (durchgezogen) und Diffusionszeiten (gestrichelt) in FCS-Experimenten an zweifarbigen DOPC-Vesikelproben (rechte Spalte, je 0,025 % β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈, Lipidkonzentration 0,25 mmol/L) und freien Farbstoffen (linke Spalte, grüner Kanal Alexa Fluor 488 Hydrazid und rechter Kanal Alexa Fluor 633 Hydrazid). Man beachte die unterschiedlichen Skalen zwischen Vesikeln und Farbstoffen sowie der Bezug der Parameter zur Berechnung der Verzerrung auf verschiedene Zeitpunkte.

lange sie in kurzen Segmenten der Messung vereinzelt vorliegen, keine höhere Amplitude hervor. Erst in Kombination mit den dunkleren Teilchen steigt die Varianz der detektierten Helligkeit relativ zu deren mittlerem Wert und damit auch die Amplitude.

Der Variationskoeffizient der Parameter verläuft hingegen für beide Proben sehr ähnlich, einzig der absolute Wert ist für die Vesikelprobe höher, da deren langsamere Diffusion eine kleinere Anzahl von Fokuspassagen bedingt, über die gemittelt werden kann.

4.4.7. Einfluss auf Bindungsuntersuchungen

Die große Streuung der Qualitätsfaktoren der drei Objektive ($\bar{\Omega} = 0,64 - 0,92$) belegt anschaulich die Wichtigkeit der vorgestellten Prozedur: Berechnete man die Dissoziationskonstante einer 1:1-Bindung aus der unkorrigierten Kreuzkorrelationsamplitude und den beiden Autokorrela-

tionsamplituden einer einzelnen Probe (siehe Gl. 4.20), so wüchse der relative Fehler in der Dissoziationskonstante in erster Näherung mit der inversen optischen Qualität des Aufbaus⁹:

$$\frac{\hat{K}_D}{K_D} \propto \frac{1}{\Omega}. \quad (4.22)$$

Der Fehler ist minimal bei verschwindendem Anteil gebundener Teilchen und steigt mit zunehmendem Bindungsgrad stark an. Liegen etwa beide Bindungspartner je zur Hälfte in gebundener Form vor, so erhält man für das Objektiv mit dem schlechtesten Qualitätsfaktor bereits eine dreifach erhöhte Dissoziationskonstante. Soll die Stärke einer Bindung besser als auf eine Größenordnung bestimmt werden, ist folglich eine vorherige Messung des Qualitätsfaktors unumgänglich.

Die hier dargelegte Methodik zur Korrektur einer verringerten Kreuzkorrelation bei dcFCCS-Experimenten ist somit sowohl reproduzierbar und experimentell wenig aufwendig als auch unabdingbar für eine exakte Untersuchung von Bindungszusammenhängen.

4.4.8. Eigener Beitrag

Der Autor wirkte an der Entwicklung der Auswertungsmethodologie, der Datenanalyse und der Publikation der Ergebnisse (siehe [WERNER *et al.*, 2018](#)) in einer Fachzeitschrift mit.

⁹Dies steht im Kontrast zu den in Kapitel 5 untersuchten Titrationsen mit einer Anpassung der Dissoziationskonstante an eine größere Zahl von Messpunkten mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen der Bindungspartner. Der Einfluss des Qualitätsfaktors ist entlang dieser Kurve nicht konstant und während die Höhe der Titrationskurve proportional zu Ω sinkt, verschiebt sich die Kurve maximal um die halbe Konzentration des konstantgehaltenen Bindungspartners. Die scheinbare Dissoziationskonstante als Wendepunkt der Kurve folgt damit $\hat{K}_D = K_D + \frac{1-\Omega}{2}c_B$, was sich daraus ergibt, dass für $c_P^{\text{frei}} = K_D$ genau die Hälfte aller Bindungspartner besetzt ist ($c_P^0 = c_P^{\text{frei}} + \frac{1}{2}c_B$). Zusätzlich wird am Wendepunkt die Kurve mit sinkendem Ω auch steiler, wobei auch dieser Effekt umso ausgeprägter ist, je kleiner das Verhältnis K_D/c_B ist.

5. 2-Farben- Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie zur Analyse der Proteinbindung an Lipidvesikel

5.1. Einleitung

Ein quantitatives Verständnis der Bindung von Proteinen an Lipidmembranen ist unerlässlich für die Untersuchung biologischer Prozesse wie auch die Entwicklung von Medikamenten, welche oftmals diese Prozesse beeinflussen sollen. Ein vielseitiges Modellsystem sind hierbei die schon in Kapitel 4 vorgestellten kleinen unilamellaren Lipidvesikel (SUVs). Obgleich eine Reihe von Messtechniken auf dieses System anwendbar ist, fehlt bisher eine Methode, die alle folgenden Vorzüge in sich vereint:

- quantitative und spezifische Bestimmung von Bindungsaffinitäten
- Messung unter Gleichgewichtsbedingungen
- Verwendung frei beweglicher Teilchen ohne störende Trägerstrukturen
- Erstellung von Titrationskurven ohne vorherige Spezifikation eines Bindungsmodells
- nur geringe Probenmenge vonnöten.

FCS erfüllt als Fluoreszenztechnik bereits aus sich selbst heraus die Anforderungen hoher Spezifität und Empfindlichkeit durch selektive Markierung von Bindungspartnern und erlaubt durch die Verwendung konfokaler Lasermikroskope ein extrem kleines Probenvolumen von wenigen Mikrolitern. Unter optimalen Bedingungen (helle Fluorophore, homogene Probe, *etc.*) genügt zudem eine Messzeit von wenigen Sekunden bis Minuten zur Aufnahme eines Datenpunktes. Neben frei diffundierenden Vesikeln können auch (nahezu) planare Membransysteme eingesetzt werden, etwa in Form von riesigen unilamellaren Vesikeln (engl. *giant unilamellar vesicles*, *GUV*), Monoschichten auf einer Filmwaage (siehe auch Kapitel 6) oder gestützten Lipiddoppelschichten. Diese können den Nachteil aufweisen, dass einerseits die Diffusion membrangebundener und freier Spezies zugleich in der Messung auftaucht, andererseits die relative Lage des Laserfokus zur Membran berücksichtigt werden muss, um keinen verfälschten Bindungsgrad zu erhalten. Eine Übersicht der möglichen Konfigurationen von F(C)CS-Messungen und der hier konkret verwendeten gibt Abb. 5.1.

Die Bindung von Proteinen und anderen Biomolekülen wurde bereits Anfang der 1990er Jah-

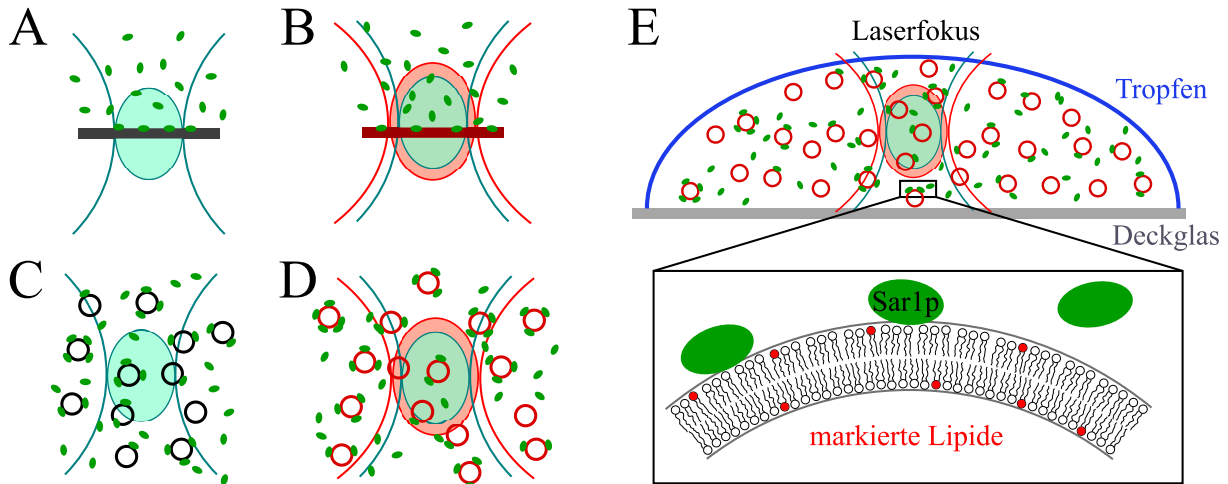


Abbildung 5.1.: Mögliche Konfigurationen zur Durchführung von F(C)CS-Messungen an membranbindenden Proteinen.

A: Bindung markierter Proteine an eine unmarkierte planare Membran.

B: Wie A, jedoch ermöglicht die zusätzlich markierte Membran die Nutzung der Kreuzkorrelationsamplituden.

C: Bindung markierter Proteine an frei diffundierende unmarkierte Vesikel.

D: Wie C, jedoch mit markierten Vesikeln zur Nutzung der Kreuzkorrelationsamplituden.

E: Konkrete Anwendung der Konfiguration D in dieser Arbeit. Zur Verdeutlichung wurden Abstandshalter und zweites Deckglas zur Vermeidung von Verdunstung weggelassen.

re unter Ausnutzung ihrer Diffusionseigenschaften mittels FCS-Messungen untersucht ([EIGEN *et al.*, 1994](#)). In diesen Experimenten wurden die Veränderung der Diffusion eines Bindungspartners untersucht, welche sich durch die Bindung an ein anderes Teilchen ergibt. Im Idealfall ist dieses Teilchen deutlich größer als der fluoreszenzmarkierte Partner, sodass sich eine genügend große Erhöhung der Diffusionszeit τ_D ergibt. Eine Verlangsamung der Diffusion kann nun nicht allein durch eine Bindung an den zu untersuchenden Bindungspartner verursacht werden, sondern auch durch jeglichen anderen Prozess, der zu einer Veränderung von Größe oder Form des markierten Teilchens führt, z. B. Aggregation von Proteinen oder Verformung von Vesikeln. Diese fehlende Spezifität in Bezug auf das eigentliche Bindungsereignis kann so zu einer Verzerrung der erhaltenen Parameter führen.

Da stets gebundene und ungebundene Teilchen nebeneinander vorliegen, ist die sich ergebende FCS-Kurve eine Überlagerung aus langsamer und schneller Diffusion, die eine Anpassung mit zwei Komponenten nötig machen, um den jeweiligen Anteil zu bestimmen. Wenn sich die Diffusionszeiten vor und nach Bindung nicht sehr deutlich unterscheiden (kleiner als ein Faktor von zehn), fließen die FCS-Kurven beider Komponenten ineinander und die Bestimmung wird in Anwesenheit von Rauschen schwierig (siehe auch [WOHLAND *et al.*, 2001](#)). Meist wird in diesem Fall τ_D für eine oder beide Komponenten auf einen separat bestimmten Wert festgelegt, um die Anzahl der freien Parameter zu verringern¹.

¹Da sich die Diffusionszeit eines Vesikels, beispielsweise durch einen Mantel gebundener Proteine oder eine

Beide der eben vorgebrachten Schwierigkeiten können durch die Fluoreszenzmarkierung beider Bindungspartner und die Verwendung von dcFCCS praktisch vollständig eliminiert werden: Die Verwendung der Kreuzkorrelation beseitigt den Einfluss unspezifischer Bindungen oder Aggregate, welche die Diffusionszeit beeinflussen würden, und macht die fehlerträchtige Mehrkomponentenanpassung der FCS-Kurven überflüssig. Einzig die Amplituden $\mathfrak{A}_{(x,r,g)}$ der Kreuz- und Autokorrelationen müssen akkurat bestimmt werden, um durch Titration eines Liganden zu einem Bindungspartner konstanter Konzentration eine Bindungskurve zu berechnen. Diese kann hernach an ein theoretisches Modell für die Bindung angepasst werden, um die Affinität des Liganden zu ermitteln.

Während dcFCCS-Messungen bereits zur Untersuchung von Proteintransport in endozytotischen Vesikeln (BACIA *et al.*, 2012), dem Andocken von Vesikeln (CYPIONKA *et al.*, 2009) und der Rekonstitution von Membranproteinen (SIMEONOV *et al.*, 2013) Verwendung fanden, existierte bisher keine quantitative Auswertung zur Bestimmung von Bindungskonstanten (zur Bestimmung von Bindungsgraden siehe aber WEIDEMANN *et al.*, 2002). Hier wird nun dieses Vorgehen anhand der Bindung des Proteins Sar1p (siehe dazu auch Abschnitt 3.1.1.2) an SUVs aus einer speziellen, neunkomponentigen Lipidmischung – dem von MATSUOKA *et al.*, 1998 entwickelten sogenannten *Major-Minor-Mix* – exemplifiziert und die besonderen Vorteile gegenüber anderen F(C)CS-Methoden herausgestellt.

5.2. Grundlagen

Vergleichbar den Ausführungen in Abschnitt 4.2 werden die theoretischen F(C)CS-Kurven für eine diffundierende Komponente an die Korrelationsdaten angepasst und die erhaltenen Amplituden weiterverwendet. Photophysikalische Effekte können anders als in Kapitel 4 hier nicht ignoriert werden, da ein geringerer Markierungsgrad verwendet wurde und damit sich die Beiträge verschiedener Fluorophore auf einem Vesikel nicht herausmitteln. Als Konsequenz werden die roten Autokorrelationskurven mit einem Modell

$$G_r(\tau) = \mathfrak{A}_r \frac{1 + a_{\text{Blink}} e^{-\tau/\tau_{\text{Blink}}}}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,r}}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{S_r^2 \tau_{D,r}}}} \quad (5.1)$$

entsprechend der Verbindung von Gl. 3.157 und 3.136 ausgewertet, wobei aufgrund der variablen Anzahl dazu beitragender Fluorophore dem Blinkterm nur ein generischer Vorfaktor a_{Blink} zugewiesen wird. Die Kreuzkorrelationskurven werden allein mit Gl. 3.157 ausgewertet, während die Autokorrelationskurven des grünen Kanals (markiertes Protein) für diese Methode überhaupt nicht benötigt werden. Die Amplituden des roten Kanals (markierte Vesikel) sowie die Kreuzkorrelationsamplituden werden für die Anwesenheit unkorrelierten Hintergrundes sowie spektralen Übersprechens korrigiert und die Kreuzkorrelationsamplitude mit dem in Kapitel 4 ermittelten Qualitätsfaktor des Objektivs verrechnet.

nachfolgende Verformung, im Verlauf der Bindung durchaus substanziell ändern kann, werden durch diesen Ansatz unter Umständen systematische Fehler eingebracht.

Wiederum wird die Gesamthelligkeit eines Vesikels (unter Vernachlässigung von Energietransfer und Fluoreszenzlöschung) als Summe der Helligkeiten aller Fluorophore der jeweiligen Farbe beschrieben, siehe Gl. 4.6. Anders als in Kapitel 4 muss für die Berechnung der mittleren Helligkeit im grünen Kanal $\langle F_g \rangle$ zusätzlich das Vorhandensein ungebundener und damit frei diffundierender Proteine mit der Konzentration c_P^{frei} Berücksichtigung finden:

$$\langle F_g \rangle \propto c_V \langle Q_{V,g} \rangle + c_P^{\text{frei}} \langle Q_{P,g} \rangle \quad (5.2)$$

$$= c_V \langle N_g \rangle q_{P,g} + c_P^{\text{frei}} q_{P,g} \chi_g \quad (5.3)$$

$$= c_V \langle N_P \rangle \chi_g q_{P,g} + c_P^{\text{frei}} \chi_g q_{P,g}. \quad (5.4)$$

Hierbei stehen $q_{P,g}$ und $\langle Q_{P,g} \rangle$ für die molekulare Helligkeit eines markierten Proteins bzw. die mittlere Helligkeit eines beliebigen Proteins² sowie N_g und N_P für die Anzahl auf einem Vesikel gebundener grün markierter bzw. beliebiger Proteine.

Damit ergibt sich in Analogie zu Gl. 4.6 für die Amplituden

$$\mathfrak{A}_r = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},r}} \frac{\langle N_r^2 \rangle}{\langle N_r \rangle^2} = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},r}} \frac{\lambda_r + \lambda_r^2}{\lambda_r^2} = \frac{1}{c_V N_A V_{\text{eff},r}} \frac{1 + \lambda_r}{\lambda_r} \quad (5.5)$$

$$\mathfrak{A}_x = \frac{1}{V_{\text{eff},x}} \frac{q_{P,g} \langle N_g N_r \rangle}{\langle F_g \rangle \langle N_r \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff},x}} \frac{q_{P,g} \langle N_g \rangle}{\langle F_g \rangle} = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},x}} \frac{q_{P,g} \langle N_g \rangle}{(c_V \langle N_P \rangle \chi_g q_{P,g} + c_P^{\text{frei}} \chi_g q_{P,g})} \quad (5.6)$$

$$= \frac{1}{N_A V_{\text{eff},x}} \frac{\langle N_P \rangle}{(c_V \langle N_P \rangle + c_P^{\text{frei}})} = \frac{1}{N_A V_{\text{eff},x}} \frac{\langle N_P \rangle}{c_P^0}, \quad (5.7)$$

wobei die Größenverteilung der Vesikel keine explizite Berücksichtigung erfährt und der Einfluss von λ_r stattdessen gesondert behandelt und als vernachlässigbar erkannt wird (siehe Abschnitt 5.4.3). Diese Herleitung setzt zum einen die Unabhängigkeit der Anzahl gebundener, markierter Proteine N_g von der Anzahl sich auf dem Vesikel befindlicher roter Farbstoffe N_r und demnach $\langle N_g N_r \rangle = \langle N_g \rangle \langle N_r \rangle$ voraus, zum anderen die gleiche Wahrscheinlichkeit, ein markiertes Protein unter den gebundenen, wie auch den frei diffundierenden Proteinen zu finden und damit implizit auch die Gleichheit der Bindungseigenschaften markierter und unmarkierter Sar1p-Moleküle (siehe auch Abschnitt 3.5.2.5). Letzteres erlaubt die Eliminierung des Markierungsgrades χ_g aus den Gleichungen, da sowohl $\langle Q_{P,g} \rangle = q_{P,g} \chi_g$ als auch $\langle N_g \rangle = \langle N_P \rangle \chi_g$ zugleich erfüllt sind.

Da nun aus \mathfrak{A}_r die Konzentration der Vesikel

$$c_V = \frac{1}{\mathfrak{A}_r N_A V_{\text{eff},r}} \frac{\lambda_r + \lambda_r^2}{\lambda_r^2} \quad (5.8)$$

bekannt ist und \mathfrak{A}_x deren mittlere Besetzung mit Proteinen

$$\langle N_P \rangle = \mathfrak{A}_x N_A V_{\text{eff},x} c_P^0 \quad (5.9)$$

enthält, kann die Konzentration des freien Proteins c_P^{frei} aus der Massenerhaltung geschlossen

²Die relative Helligkeit $Q_{P,g}/q_{P,g}$ eines beliebigen Proteins kann als einer BERNOULLI-Verteilung mit $p = \chi_g$ folgend angenommen werden, womit sich für die relative Helligkeit eines Vesikels eine Binomialverteilung nach $Q_{V,g}/q_{P,g} \sim B(N_P, \chi_g)$ ergibt.

werden:

$$c_{\text{P}}^{\text{frei}} = c_{\text{P}}^0 - \langle N_{\text{P}} \rangle c_{\text{V}} = c_{\text{P}}^0 (1 - \mathfrak{A}_{\text{x}} N_{\text{A}} V_{\text{eff,x}} c_{\text{V}}) = c_{\text{P}}^0 \left(1 - \frac{\mathfrak{A}_{\text{x}} V_{\text{eff,x}}}{\mathfrak{A}_{\text{r}} V_{\text{eff,r}}} \frac{1 + \lambda_{\text{r}}}{\lambda_{\text{r}}} \right). \quad (5.10)$$

Die Darstellung von $\langle N_{\text{P}} \rangle$ in Abhängigkeit von $c_{\text{P}}^{\text{frei}}$ liefert schließlich die gewünschte Titrationskurve ohne vorherige Festlegung eines Bindungsmodells. Um einen Wert für die Affinität bzw. äquivalent die Dissoziationskonstante K_{D} der Protein-Membran-Bindung zu erhalten, wird hier als einfaches Modell einer unabhängigen Bindung mit einer Höchstzahl Bindungsplätzen pro Vesikel von N_{max} die LANGMUIR-Isotherme Gl. 3.250 verwendet:

$$\langle N_{\text{P}} \rangle = N_{\text{max}} \frac{c_{\text{P}}^{\text{frei}}}{c_{\text{P}}^{\text{frei}} + K_{\text{D}}}. \quad (5.11)$$

5.3. Experimente

5.3.1. Materialien

Der *Major-Minor-Mix* setzt sich aus acht verschiedenen Phospholipiden, die jeweils von der Firma *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, USA) bezogen wurden, und Ergosterol, welches von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) bezogen wurde, zusammen. Die genauen Anteile an der Mischung sind in Tabelle 5.1 enthalten. Weiterhin wurden als Fluoreszenzfarbstoffe 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin (DiD-C₁₈) und Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid von der Firma *Invitrogen* (Carlsbad, Kalifornien, USA), Alexa Fluor 488 Hydrazid und Alexa Fluor 633 Hydrazid von der Firma *Life Technologies* (Carlsbad, Kalifornien, USA), sowie ATTO 647N DPPE von der Firma *ATTO-TEC* (Siegen, Deutschland) verwendet. Das nicht-hydrolysierbare Nukleotidanalogen Guanosin-5'-[β,γ -imido]-triphosphat (GMP-PNP) und das zur Beschichtung der Deckgläser eingesetzte Casein wurde von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) bezogen.

Der HKM-Puffer setzt sich aus 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 20 mmol/L), Kaliumacetat (50 mmol/L) und Magnesiumchlorid (1,2 mmol/L) zusammen und wurde mit Kaliumhydroxid auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt. Die dabei verwendeten Salze sowie Chloroform wurden von der Firma *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Für die Vesikelextrusion wurden spurgeätzten Polycarbonatmembranen mit 50 nm Porendurchmesser von der Firma *Whatman* (Maidstone, UK) eingesetzt.

Die verwendeten Deckgläser der Firma *Gerhard Menzel* (Braunschweig, Deutschland) besaßen die Stärke Nr. 1,5 und wiesen somit eine Dicke von im Mittel 170 μm auf.

Das Protein Sar1p aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde wie in DAUM *et al.*, 2014 beschrieben synthetisiert und gereinigt. Die Variante Sar1p-S147C/C171S wurde gleichermaßen gewonnen und zusätzlich mit Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid an dem einzigen Cystein-Rest fluoreszenzmarkiert (Details siehe AUERSWALD, 2020). Die Funktionalität der Proteine wurde mittels eines COPII-Komplex-Bindungstests (DAUM *et al.*, 2014) und eines Enzymaktivitätstests bestätigt.

Bestandteil	Anteil / %
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin (DOPC)	34,4
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (DOPE)	14,8
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-serin (DOPS, als Natriumsalz)	3,4
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat (DOPA, als Natriumsalz)	5,4
L- α -Phosphatidylinositol (PI, als Natriumsalz)	5,4
L- α -Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P, als Ammoniumsalz)	1,5
L- α -Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P ₂ , als Ammoniumsalz)	0,5
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-cytidindiphosphat (CDP-DAG, als Ammoniumsalz)	1,3
Ergosterol	33

Tabelle 5.1.: Zusammensetzung des *Major-Minor-Mix* aus neun Komponenten unter Angabe des Herstellernamens, des verwendeten Akronyms und des Stoffmengenanteils in Prozent. Wo Gegenionen vorliegen, wurden diese als Salz angegeben.

Die jeweilige Konzentration wurde durch UV-Absorptionsspektroskopie und BRADFORD-Tests (BRADFORD, 1976) bestimmt. Das BRADFORD-Reagenz wurde von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) und das dabei als Proteinstandard verwendete Rinderserumalbumin (BSA) von der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

5.3.2. Geräte

Die Vesikelextrusion erfolgte in einem *mini-extruder* der Firma *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, USA).

Die UV-Absorptionsmessungen wurden an einem *Infinite M200 PRO* der Firma *Tecan* (Männedorf, Schweiz) durchgeführt.

Die DLS-Messungen wurden an einem *Zetasizer Nano S* der Firma *Malvern* (Herrenberg, Deutschland) durchgeführt.

Zur Entfernung von Lösungsmitteln wurde ein Rotationsverdampfer der Marke *Hei-VAP Advantage* der Firma *Heidolph* (Schwabach, Deutschland) eingesetzt.

Alle dcFCCS-Experimente wurden an einem Laserrastermikroskop der Marke *LSM 710* mit FCS-Funktionalität (*ConfoCor 3*) der Firma *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Ionenlaser der Wellenlänge 488 nm (Leistung hinter dem Objektiv 1,1 μ W – 5,7 μ W) und einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm (Leistung hinter dem Objektiv 0,8 μ W – 5,5 μ W), welche über einen dichroitischen Spiegel (Reflexion bei 488 nm, 561 nm und 633 nm) als Hauptstrahlteiler eingekoppelt wurden. Das Fluoreszenzlicht wurde durch dasselbe Objektiv (*C-Apochromat* 40x mit NA = 1,2) eingesammelt, über eine quadratische Lochblende (Durchmesser 40 μ m) dessen Konfokalität sichergestellt und mittels eines dichroitischen Strahlteilers bei 635 nm aufgetrennt und über Farbfilter (ein Bandpass-Filter von 505 nm bis 610 nm und ein Langpass-Filter ab 655 nm) auf zwei Detektoren (APDs) geleitet.

5.3.3. Präparation

Der *Major-Minor-Mix* wurde durch Vereinigen der entsprechenden Volumina der Lipide in chloroformischer Lösung mittels Glaspipetten und nachfolgendes Verdampfen des Lösungsmittels unter einem Stickstoffstrom hergestellt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Argon aufbewahrt.

Zur Herstellung der Vesikellösungen wurde die so präparierte Lipidmischung in organischem Lösungsmittel (Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 nach Volumen) aufgenommen, mit 0,004 % des Farbstoffes DiD-C₁₈ versetzt und das Lösungsmittel unter Vakuum in einem Rotationsverdampfer abgezogen. Der Lipidfilm wurde mit HKM-Puffer rehydratisiert und durch eine Polycarbonatmembran extrudiert. Die Größe der so hergestellten SUVs wurde mittels DLS bestimmt, die Lipidkonzentration mittels eines Malachitgrün-Phosphattests (siehe etwa [LEONARD *et al.*, 2005](#)). Jede Präparation maximal eine Woche bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Für jede Titrationskurve wurden 11-16 Bindungsansätze präpariert und zeitgleich zwischen zwei von einem Abstandhalter aus Silikongummi (Dicke ca. 0,5 mm) getrennten und mit Casein beschichteten Deckgläsern inkubiert. Jede Probe enthielt dabei 4 μL HKM-Puffer, GMP--PNP (1 mmol/L), extrudierte Vesikel (Gesamtlipidkonzentration 0,09 mmol/L), sowie Sar1p (20 nmol/L–200 $\mu\text{mol/L}$) mit variierenden Stoffmengenanteilen an markiertem Protein (0,08 %–100 %).

5.3.4. Messungen

Die dcFCCS-Messungen umfassten jeweils 5 Einzelmessungen à 60 s. Die Auto- und Kreuzkorrelationskurven wurden in dem Programm *ZEN 2009* von *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) berechnet und die Anpassung der theoretischen Modelle vorgenommen. Die so erhaltenen Daten wurden zur Erstellung und Auswertung von Bindungskurven in dem Programm *MATLAB* der Firma *Math Works* (Natick, Massachusetts, USA) weiterverwendet.

5.4. Ergebnisse und Diskussion

5.4.1. Kalibrierung

Wie schon in Abschnitt 4.4.1 beschrieben wurden durch FCS-Messungen der freien Farbstoffe Alexa Fluor 488 Hydrazid (grüner Kanal, Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm) und Alexa Fluor 633 Hydrazid (roter Kanal, Anregung mit einer Wellenlänge von 633 nm) und mit einem Wert des Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Alexa488}} = 435\text{ }\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ sowie einem Verhältnis der Diffusionszeiten der Vesikel in beiden Kanälen von $\frac{\tau_{\text{D,r}}}{\tau_{\text{D,g}}} = 1,43$ die Strukturparameter (näherungsweise identisch mit $S = 6,5$) und effektiven Volumina der einzelnen Kanäle ($V_{\text{eff,g}} = 0,385\text{ }\mu\text{m}^3$, $V_{\text{eff,r}} = 0,658\text{ }\mu\text{m}^3$ und $V_{\text{eff,x}} = 0,515\text{ }\mu\text{m}^3$) bestimmt.

Das Übersprechverhältnis wurde durch Messung des markierten Sar1p in Abwesenheit von Vesikeln als $\kappa_{\text{g}\rightarrow\text{r}} = 0,0087$ ermittelt. Die Zählrate des Hintergrundes belief sich stets auf deutlich unter 1 kHz und damit weniger als 1 % der Gesamtzählrate in allen Messungen.

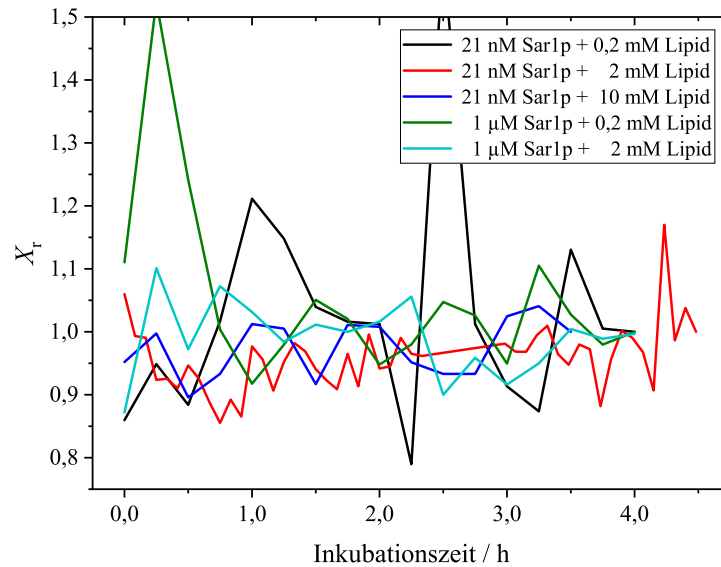


Abbildung 5.2.: Darstellung der Abhängigkeit der relativen Kreuzkorrelationsamplituden $\hat{X}_r = \hat{\mathcal{A}}_x / \hat{\mathcal{A}}_r$ für fünf verschiedene Bindungsansätze (Sar1p, Vesikel und jeweils 1 mmol/L GMP-PNP), jeweils normiert auf den letzten Wert. Abgesehen von vereinzelt Ausreißern schwanken die Werte bereits nach kurzer Inkubation um einen konstanten Mittelwert.

5.4.2. Gleichgewichtseinstellung

Um sicherzugehen, dass die Bestimmung der Bindungskonstanten im Zustand des Gleichgewichtes erfolgt, wurden fünf Ansätze verschiedener Konzentrationen an Vesikeln und Protein präpariert und für mehrere Stunden in regelmäßigen Abständen dcFCCS-Messungen vorgenommen. Die resultierenden Korrelationsamplituden sind in Abb. 5.2 dargestellt. Es treten keine weiteren systematischen Veränderungen nach etwa einstündiger Inkubation auf, sodass alle weiteren Messungen mit einer Inkubationszeit von zwei Stunden durchgeführt wurden.

5.4.3. Einfluss des Lipidmarkierungsgrades

Der Einfluss von λ_r auf die angepassten Parameter wurde detailliert untersucht und die Abhängigkeit ihrer über die sechs Kurven gemittelten Werte von dem angenommenen λ_r in einem Bereich um dessen erwarteten wahren Wert (abgeschätzt aus DLS-Messungen und der Diffusionszeit der Vesikel) nach Gl. 4.9 berechnet. Hierzu wurde c_p^{frei} jeweils für alle sechs Kurven nach Gl. 5.10 neu berechnet, die LANGMUIR-Isotherme angepasst und die erhaltenen Parameter über die einzelnen Kurven gemittelt.

Es zeigt sich generell, dass ein höherer Markierungsgrad der Lipide die genaue Kenntnis der mittleren Anzahl Fluorophore pro Vesikel überflüssig macht und schon für $\lambda_r \geq 1,5$ die Dissoziationskonstante sich nur noch um weniger als 5% ändert (siehe Abb. 5.3). Der Wert von \hat{N}_{max} wird von der für λ_r gemachten Annahme so gut wie nicht beeinflusst. Für die weiteren Berechnungen wird ein Vesikeldurchmesser von 80 nm und damit $\lambda_r = 2,5$ angenommen.

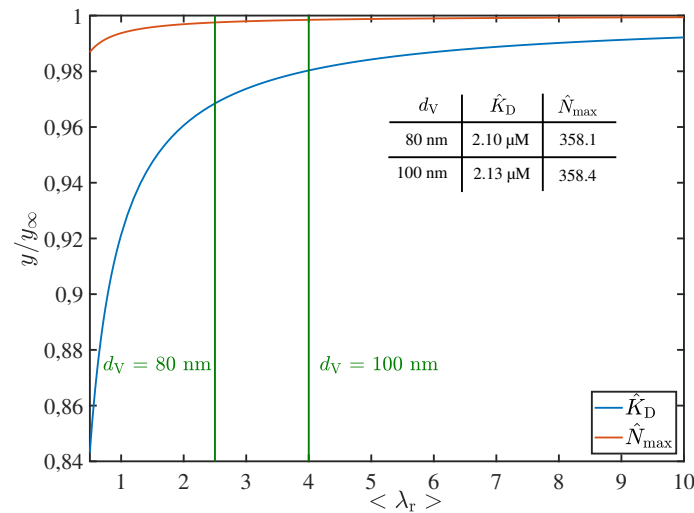


Abbildung 5.3.: Abhängigkeit der über alle sechs Experimente gemittelten Bindungsparameter \hat{K}_D (blau) und \hat{N}_{\max} (rot) von der angenommenen mittleren Anzahl roter Fluorophore λ_r auf den Vesikeln. Die Werte sind jeweils bezogen auf den Grenzwert $\lambda_r \rightarrow \infty$. Für zwei beispielhafte Vesikeldurchmesser wurden die sich aus den angenommenen Lipidparameter und dem Markierungsgrad ergebenden Werte für λ_r eingezeichnet und die daraus resultierenden Bindungsparameter angegeben.

5.4.4. Schwankungen

Die in Abb. 5.5 sichtbaren deutlichen Schwankungen der für die Titrationskurven ermittelten Parameter sind hier nicht allein der Fluoreszenztechnik anzulasten, sondern gehen vielmehr zu großen Teilen auf die Schwierigkeit der reproduzierbaren Präparation der Proben und der exakten Kenntnis der eingesetzten Konzentrationen in einem kleinen Volumen in Anwesenheit eines stark oberflächenaktiven Proteins zurück. Die hier verwendete Beschichtung der Deckgläser mit Casein als Mittel gegen den Verlust von Sar1p durch Bindung an Glas hat sich später noch als sehr diffizil und nicht vollständig wirksam erwiesen.

Auch die Stabilität und Gleichförmigkeit der SUVs ist gerade bei Verwendung des *Major-Minor-Mix* im Vergleich zu dem in Kapitel 4 eingesetzten DOPC deutlich herabgesetzt. Weiterhin neigt Sar1p bei höherer Konzentration vermehrt zur Aggregatbildung und beeinflusst zudem die Form der Vesikel, an die es bindet.

All diese Faktoren bedingen zum einen die reale Abhängigkeit der über jedes Bindungsexperiment als konstant angenommenen Bindungsparameter von Proteinkonzentration und individuellem Messansatz, zum anderen auch die Verzerrung der angepassten Korrelationsamplituden und zusätzlich – über die in die Berechnungen einfließende Gesamtproteinkonzentration – der daraus gewonnenen Titrationskurve.

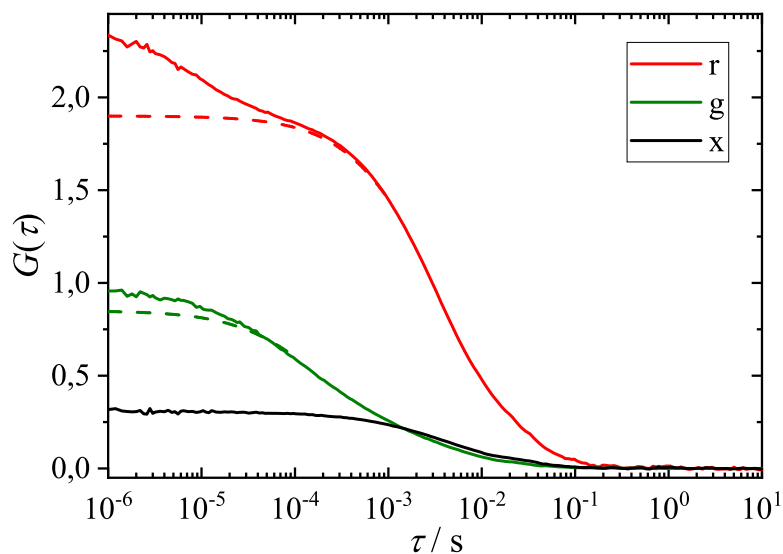


Abbildung 5.4.: Beispielhafte dcFCCS-Messung eines einzelnen Bindungsansatzes (200 $\mu\text{mol/L}$ Sar1p, 0,2 mmol/L Gesamtlipid und 1 mmol/L GMP-PNP, zugehörig zur Bindungskurve rechts unten in Abb. 5.5) mit experimentellen (durchgezogen) und daran angepassten theoretischen Korrelationskurven (gestrichelt). Zur besseren Sichtbarkeit der relevanten Amplitude des Diffusionsanteils sind die theoretischen Kurven ohne den Blinkterm berechnet. Die Autokorrelationskurven sind in grün bzw. rot dargestellt, die Kreuzkorrelationskurve in schwarz.

5.4.5. Bindungsstudien

Es wurden an sechs unabhängigen Bindungskurven mit je 11-16 einzelnen Proben verschiedener Gesamtproteinkonzentration³ c_p^0 dcFCCS-Messungen (typische Korrelationskurven sind in Abb. 5.4 zu sehen) durchgeführt und die Kreuz- und rote Autokorrelationsamplitude bestimmt (siehe Abb. 5.5). Hierzu wurde ein variabler Bruchteil des eingesetzten Proteins mit der grün fluoreszenzmarkierten Variante und die Vesikel mit 0,004 % eines roten fluoreszenzmarkierten Lipidanalogons versetzt. Die Tatsache, dass c_p^0 über fast vier Größenordnungen variiert werden konnte, ist gerade der erwähnten Variabilität des Markierungsgrades von Sar1p geschuldet: Da bei der hier vorgestellten Auswertung die grüne Autokorrelationsamplitude überhaupt nicht ver-

³Diese wurden näherungsweise äquidistant auf einer logarithmischen Skala gewählt, was folgende Vorteile mit sich bringt:

- Abdeckung der Abszisse über mehrere Größenordnungen ermöglicht stabile Regression auch bei vorher nicht gut abschätzbarer Affinität
- logarithmische Darstellung der Abszisse erlaubt optische Kontrolle von systematischen Abweichungen und Lage von K_D , da Kurvenform und Steigung hier konstant sind
- die gemeinsame Darstellung von Bindungskurven mit über mehrere Größen variierenden Affinitäten ist übersichtlich in einem einzigen Graphen möglich
- Proben höchster Konzentration erleichtern die sichere Bestimmung von N_{max} im Sättigungsbereich der Kurve
- Proben niedrigster Konzentration erlauben durch lineare Regression die unabhängige Bestimmung von K_D im Bereich geringer Bedeckung der Vesikel mit Protein, was Hinweise auf das Vorhandensein von Wechselwirkungen zwischen diesen geben kann.

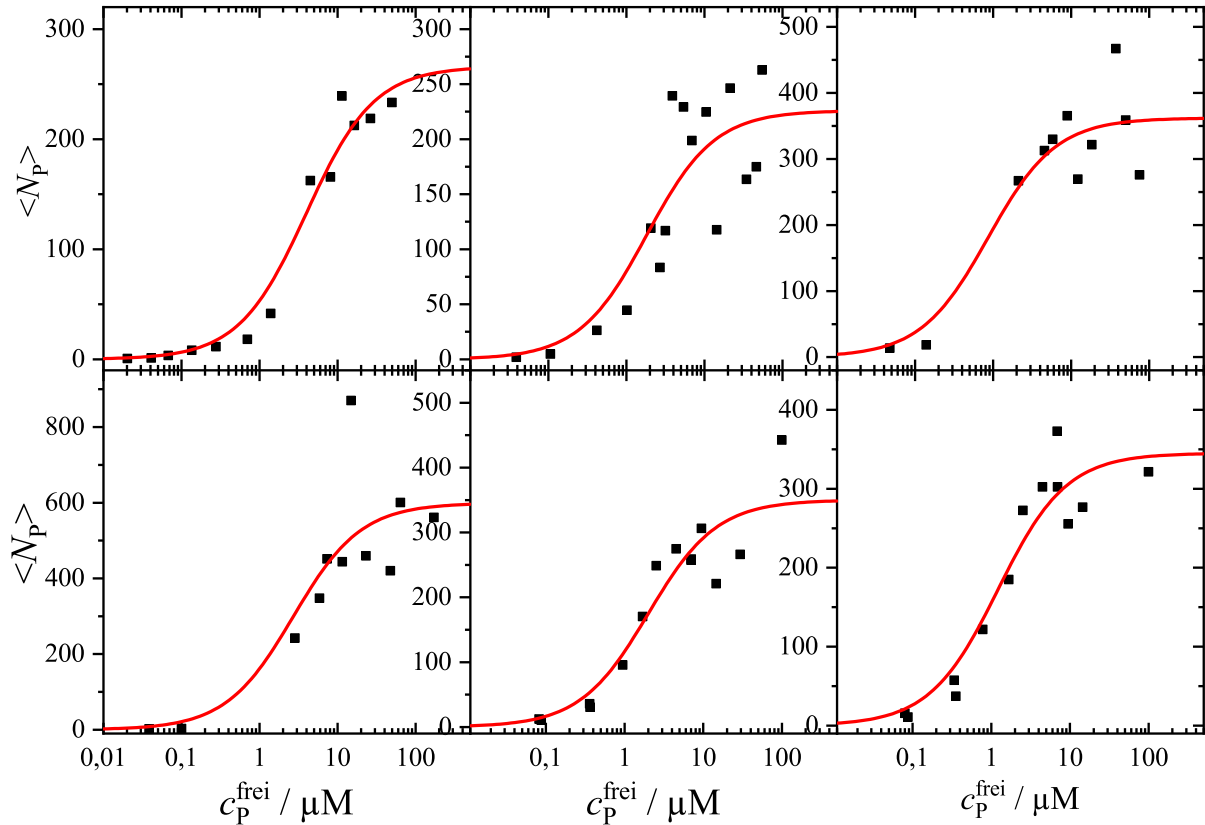


Abbildung 5.5.: Titrationskurven der Bindung von Sar1p an extrudierte Vesikel aus *Major-Minor-Mix* in Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren Nukleotids GMP-PNP mit den experimentell bestimmten Werten (schwarz) und den daran angepassten LANGMUIR-Isothermen (rot).

wendet wird und die anderen beiden Amplituden unbeeinflusst sind von diesem Markierungsgrad, kann die Konzentration markierten Proteins und damit des grünen Fluorophors so eingestellt werden, dass eine für die dcFCCS-Messungen optimale Helligkeit und effektive Teilchenzahl erreicht wird.

Die Berechnung der für die Kurven aufzutragenden Größen – mittlere Anzahl der auf einem Vesikel gebundenen Proteinmoleküle $\langle N_P \rangle$ und Konzentration des ungebundenen Proteins c_P^{frei} – erfordert weiterhin die Werte für das effektive Kreuz- und rote Autokorrelationsvolumen sowie der mittleren Anzahl markierter Lipide pro Vesikel λ_r . Zusätzlich wurden die Amplituden um den Einfluss verschiedener mikroskopinterner Abweichungen korrigiert: unkorreliertes Hintergrundrauschen (Streuung in der Lösung, Detektorrauschen, *etc.*), spektrales Übersprechen zwischen den Farbkanälen und verringerte Kreuzkorrelation durch unvollständige Überlappung der Foki.

Nachdem die Bindungskurven auf diese Weise erstellt waren, wurde eine LANGMUIR-Isotherme als Modell unabhängiger, diskreter Bindestellen auf der Vesikeloberfläche an die Daten angepasst⁴. Die hier verwendete Version dieses Modells benötigt zwei Parameter, die maximale

⁴Hier wurde eine ungewichtete Anpassung nach der Methode der kleinsten Quadrate angewendet. Dabei wird implizit die Abszisse (hier c_P^{frei}) als fehlerfrei angenommen, während die Schwankung in der Ordinate (hier $\langle N_P \rangle$) unabhängig von beiden Achsen sein muss. Da sowohl $\langle N_P \rangle$ als auch c_P^{frei} aus den gemessenen Amplitu-

Anzahl auf einem Vesikel gebundener Proteine N_{\max} und die Dissoziationskonstante zwischen Protein und Bindestelle auf der Membran K_D , welche für jede Bindungskurve einzeln bestimmt wurden. Die Dissoziationskonstante als eigentlich interessierende Größe wurde über die sechs Kurven gemittelt und zu $\hat{K}_D = (2,1 \pm 1,1) \mu\text{mol/L}$ erhalten.

Als Alternative zur Aufnahme einer vollständigen Bindungskurve ist die Bestimmung von \hat{K}_D auch aus einem einzelnen Messpunkt möglich, sofern aus weiteren Experimenten im Sättigungsbereich N_{\max} abgeschätzt werden kann. Ausgehend von Gl. 4.17 wird die Konzentration der freien und besetzten Bindungsplätze $c_B^{\text{frei}} = (N_{\max} - \langle N_P \rangle) c_V$ bzw. $c_B^{\text{bes}} = \langle N_P \rangle c_V$ eingeführt:

$$\hat{K}_D = \frac{c_P^{\text{frei}} c_B^{\text{frei}}}{c_B^{\text{bes}}} = \frac{(\hat{N}_{\max} - \langle N_P \rangle)}{\langle N_P \rangle} c_P^{\text{frei}}. \quad (5.12)$$

Ein Wertepaar für c_P^{frei} und $\langle N_P \rangle$ erlaubt somit die Berechnung von \hat{K}_D , vorausgesetzt, die Messung findet weit ab vom Sättigungsbereich statt, wo der Term $\hat{N}_{\max} - \langle N_P \rangle$ verschwinden würde. Diese Auswertungsmethode benötigt zwar eine geringere Zahl an Bindungsansätzen, erlaubt jedoch keinerlei Einschätzung der Streuung der Messpunkte oder der Kurvenform. Durch die fehlende Redundanz sind die bestimmten Parameter zudem weniger verlässlich, weshalb auf diese Methode hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Die Werte für N_{\max} zeigten eine starke Abweichung zwischen den verschiedenen Kurven ($\hat{N}_{\max} = 225 - 600$), was zumindest teilweise dadurch verursacht worden sein dürfte, dass die einzelnen Messkurven verteilt über mehrere Monate an verschiedenen Vesikelpräparationen durchgeführt wurden. Die Größenverteilung mittels Extrusion hergestellter Vesikelproben unterliegt stets einer gewissen Schwankung, wodurch die von ihrer Oberfläche abhängige Anzahl von Bindestellen ebenfalls nicht immer konstant ist⁵.

Als ein ebenfalls nicht zu unterschätzender Einflussfaktor kann die Gesamtkonzentration von Sar1p in der Probe angesehen werden, welche linear in \hat{K}_D wie auch \hat{N}_{\max} eingeht (siehe Gl. 5.9 und 5.10). Durch die je nach Qualität der Beschichtung der Deckgläser, der Präparation der Vesikel und des verwendeten Proteinaliquots stark variierende Neigung zu Aggregation und Kleben von Sar1p ist der während der eigentlichen Messung in der Probe für die Membranbindung verfügbare Teil der angestrebten Proteinmenge ebenfalls mit großen Unsicherheiten belastet. Aufgrund des geringen Probenvolumens ist eine externe Konzentrationsbestimmung nach der Inkubation leider kaum möglich.

Die gefundene Dissoziationskonstante im unteren mikromolaren Bereich hat sich in späteren Replikationen der Bindungsexperimente sehr gut bestätigt und harmoniert auch gut mit dem von [LOFTUS et al., 2012](#) an einer abgewandelten Lipidmischung mit einer anderen Methode gewonnenen Wert von $\hat{K}_D = (10,5 \pm 3,1) \mu\text{mol/L}$.

den berechnet werden, ist diese Annahme selbstverständlich nicht realistisch und führt unweigerlich zu einer systematischen Verzerrung der ermittelten Parameter.

⁵Dieses Problem zusätzlich dadurch erschwert, dass N_{\max} eigentlich als Mittel über die Größenverteilung der Vesikel aufzufassen ist, siehe hierzu auch Fußnote 3 auf Seite 105 und Gl. 3.297. Dadurch wird insbesondere $\langle N_P \rangle$ verfälscht und man erhält mit den Momenten der Vesikelradien $\langle r^n \rangle = \int r^n P(r) dr$ näherungsweise

$$N_{\max} = \frac{\langle r^2 \rangle^2}{\langle r^4 \rangle} \hat{N}_{\max}. \text{ Bei der hier verwendeten Präparationsweise ergibt sich gewöhnlich } \frac{\langle r^2 \rangle^2}{\langle r^4 \rangle} \leq XXX.$$

Zusammenfassend erwies sich die dcFCCS als eine verlässliche und sensitive, wenn auch apparativ aufwendige Methodik zur Untersuchung von Protein-Membran-Bindungen. Die sehr kleinen Probenvolumina (hier lediglich 4 μ l) sind ideal für die meist sehr begrenzte einsetzbare Proteinmenge, ebenso sind die relativ kurzen Messzeiten von wenigen Minuten und die Möglichkeit der Quantifizierung von Konzentrationen mehrerer im Gleichgewicht vorliegender Spezies deutliche Vorteile gegenüber verwandten Techniken, wie etwa der *Oberflächenplasmonenresonanz* (PATCHING, 2014) und der isothermen Titrationskalorimetrie (ARCHER *et al.*, 2020).

Speziell gegenüber der Nutzung von FCS-Messungen mit nur einer fluoreszenzmarkierten Spezies (RUSU *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2011, 2014) ergeben sich deutliche Vorteile:

Spezifität Bindungsereignisse können leichter von z. B. Aggregation unterschieden werden.

Verlässlichere Regression Die Bestimmung einer Korrelationsamplitude ist meist einfacher als eine Mehrkomponentenanpassung.

Modellunabhängigkeit Bindungskurven können ohne vorhergehende Festlegung eines theoretischen Modells erstellt werden.

Keine Annahmen zur Varianz Im Gegensatz etwa zu LOFTUS *et al.*, 2012 wird das zweite Moment der Anzahl gebundener Proteine und damit deren Varianz bei der Auswertung nicht verwendet, sondern nur der Mittelwert, was eine weitere Modellannahme überflüssig macht.

Toleranz gegenüber Vesikelverformungen Da die Diffusionskoeffizienten der einzelnen Spezies nicht in die Auswertung mit eingehen, verursacht eine potentiell Morphologieänderung der Vesikel bei Bindung von Sar1p keine Verzerrung der Bindungskurven.

Auch in Bezug auf die sonst bei dcFCCS-Experimenten üblichen Vorbedingungen weist die vorgestellte Methode Vorzüge auf:

Definierter Markierungsgrad Da die Autokorrelationsamplitude des Kanals des markierten Proteins (bzw. anderer Liganden) für die Erstellung der Titrationskurven nicht benötigt wird und der Markierungsgrad wie oben beschrieben nicht in die Kreuzkorrelationsamplitude mit eingeht, ist sowohl eine nicht-stöchiometrische Markierung als auch eine stochastische Mehrfachmarkierung des Proteins zulässig.

Enger Konzentrationsbereich Solange die Markierung die Bindungseigenschaften nicht beeinflusst, erlaubt obiger Punkt die Verwendung von Proteinkonzentrationen weit außerhalb des üblicherweise nutzbaren Bereiches für F(C)CS-Messungen⁶.

Notwendigkeit hoher Affinität Durch den erweiterten Konzentrationsbereich sind auch schwächere Bindungen mit höheren Werten der Dissoziationskonstante der Messung zugänglich.

⁶Dies muss insofern eingeschränkt werden, dass ein sehr geringer Markierungsgrad die „sichtbare“ Konzentration der zweifach fluoreszierenden Spezies entsprechend verringert und damit zwar der Erwartungswert der Kreuzkorrelationsamplitude unverändert lässt, das Rauschen in selbiger aber stark erhöht (siehe KASK *et al.*, 1997) und damit bei konstanter Messzeit auch die Varianz der Amplitude. Dieser Effekt wird hier dadurch abgemildert, dass $N_{\max} \gg 1$ ist und damit auch bei $\chi_g \ll 1$ noch ein großer Teil der Vesikel zumindest ein markiertes Protein trägt.

5.4.6. Eigener Beitrag

Der Autor wirkte an der Entwicklung der Auswertungsmethodologie, der Datenanalyse und der Publikation der Ergebnisse (siehe KRÜGER *et al.*, 2017) in einer Fachzeitschrift mit.

5.5. Ergänzung Lipidabhängigkeit

Sowohl als Nachreichung aktueller, wenngleich noch vorläufiger, Forschungsergebnisse als auch im Sinne einer beispielhaften praktischen Anwendung der in Abschnitt 3.5.2.2 entwickelten Theorien soll an dieser Stelle noch kurz auf die Abhängigkeit der eben dargestellten Bindungsstudien von der Konzentration der den Proteinen zur Verfügung stehenden Bindestellen in Form von Lipidvesikeln eingegangen werden. Die Experimente entsprechen größtenteils den oben aufgeführten und wurden in Zusammenarbeit mit MARIA-TERESA ROHDE durchgeführt und ausgewertet.

Abweichend wurde statt der komplexen Lipidmischung reines DOPC eingesetzt und mit 0,04 % des fluoreszenzmarkierten Lipides ATTO 647N DPPE versetzt, wobei der höhere Markierungsgrad die in Abschnitt 5.4.3 beschriebenen Unsicherheiten praktisch vollständig beseitigt. Das Übersprechverhältnis des markierten Sar1p wurde hier zu $\kappa_{g \rightarrow r} = 0,01$ ermittelt. Die Werte der effektiven Fokusvolumina wurden nicht verändert und die Strukturparameter auf $S = 6$ festgesetzt. Für jede Titrationskurve wurden 12 Bindungsansätze auf Casein-beschichteten Deckglas präpariert und für jeweils zwei Stunden inkubiert. Jede Probe bestand wiederum aus 4 μL HKM-Puffer mit GMP-PNP (1 mmol/L), extrudierten Vesikel (Gesamtlipidkonzentration 5 $\mu\text{mol/L} - 5 \text{ mmol/L}$), sowie Sar1p (20 nmol/L – 100 $\mu\text{mol/L}$) mit variierenden Stoffmengenanteilen an markiertem Protein (0,2 % – 100 %).

Die dcFCCS-Messungen wurden bestanden jeweils aus einer einzelnen Messung mit einer Dauer von 5 min – 15 min, wobei die längeren Messzeiten bei den geringsten Lipidkonzentrationen aufgrund der geringen Teilchenzahl im roten Kanal und dadurch erheblich größeren Rauschens notwendig waren. Die Auto- und Kreuzkorrelationskurven wurden mittels selbst verfasster Skripte (siehe Abschnitt 3.4.6) in dem Programm *MATLAB* der Firma *MathWorks* (Natick, Massachusetts, USA) berechnet und auf gleichem Wege die Anpassung der theoretischen Modelle vorgenommen. Dazu wurden die aufgenommenen Fluoreszenzzählraten in konsekutive Segmente der Länge 10 s unterteilt, einzeln korreliert und die Regression durchgeführt. Die Mediane der ermittelten Amplituden wurden für die weitere Analyse verwendet⁷.

Die sich ergebenden Bindungskurven sind in Abb. 5.6 dargestellt. Es fällt unmittelbar die stark Abhängigkeit der scheinbaren Affinitäten von der Menge der zur Verfügung stehenden Bindestellen auf, welche sich hier über mehrere Größenordnungen erstreckt. Zugleich erkennt man bei den höheren Konzentrationen die bereits in Abb. 3.18 gezeigte Aufsteilung der Kurven, dies je-

⁷Die Länge der einzelnen Segmente muss dabei so gewählt werden, dass einerseits ein genügend hohes Signal-Rausch-Verhältnis und vernachlässigbare Verzerrung durch verschieden helle Vesikel entsteht (siehe Abschnitt 4.4.6), andererseits aber auch den Fokus passierenden Aggregaten und anderen Messartefakten kein übermäßiger Einfluss auf das Ergebnis zukommt.

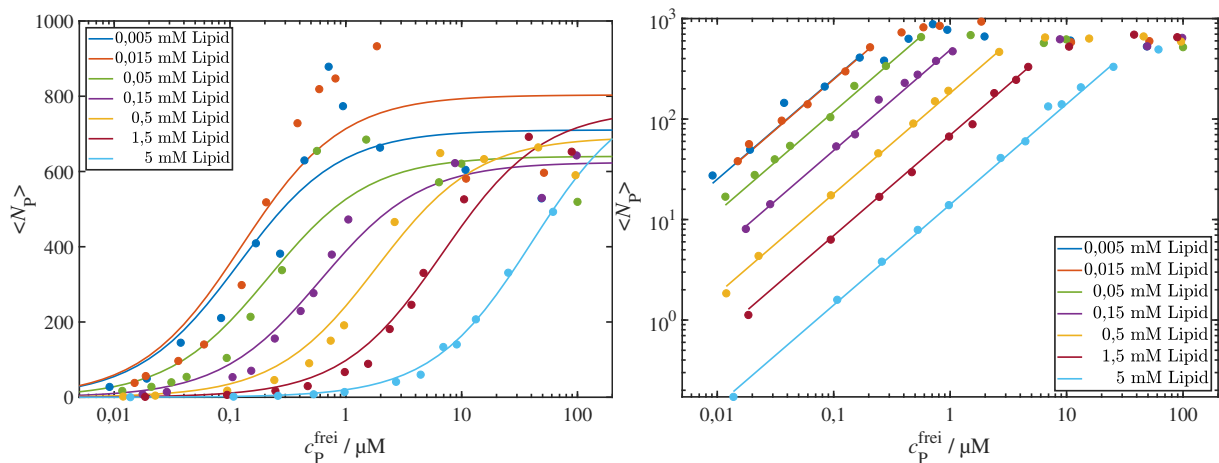


Abbildung 5.6.: Titrationskurven der Bindung von Sar1p an extrudierte Vesikel aus DOPC in Gegenwart des nicht-hydrolysierbaren Nukleotids GMP-PNP mit den experimentell bestimmten Werten (Punkte) und den daran angepassten LANGMUIR-Isothermen (Linien), in halblogarithmischer (links) und doppeltlogarithmischer (rechts) Auftragung.

doch aufgrund der relativ geringen Anzahl an Messpunkten und des nicht zu vernachlässigenden Rauschens gerade im Bereich der Sättigung nur unsicher.

Um die Qualität der Regression zu verbessern und eine besser bestimmte Dissoziationskonstante zu erhalten, wurden diese anhand der doppeltlogarithmischen Auftragung (Abb. 5.6, rechts) durchgeführt. Die theoretischen Geraden passen gut zu den Datenpunkten und auch die Steigung, die hier der vorausgesetzten Linearität im Anfangsbereich der Titration entspricht, zeigt keine Abweichung vom erwarteten Wert von eins. Die Umrechnung der Steigung der Bindungskurve (also des Achsenabschnittes auf doppeltlogarithmischer Skala) in die scheinbare Dissoziationskonstante erfolgt über

$$\frac{d \langle N_P \rangle}{d c_P^{\text{frei}}} = \frac{N_{\text{max}}}{\widetilde{K_D}}, \quad (5.13)$$

wobei für N_{max} der Endpunkt \hat{N}_{max} aus der nichtlinearen Anpassung an die vollständige Titrationskurve verwendet wird. Dieser ist gewöhnlich weniger stark von Schwankungen einzelner Datenpunkte betroffen und variiert hier auch zwischen den einzelnen Kurven nicht zu stark (Variationskoeffizient $\approx 10\%$).

Die gewonnenen Konstanten sind, wiederum in doppeltlogarithmischer Auftragung, in Abb. 5.7 zusammen mit einer linearen Regression an diese dargestellt. Für letztere wurde der Wert bei der höchsten Lipidkonzentration nicht verwendet, da die zugehörige Titrationskurve wegen der begrenzten Proteinkonzentration nicht vollständig aufgenommen werden konnte. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit der angepassten Geraden und eine asymptotische Annäherung der Dissoziationskonstanten an einen Grenzwert für verschwindende Gesamtkonzentration an Lipid c_{Li}^0 . Nach Gl. 3.320 entspricht dieser Wert (hier $\approx 0,21 \mu\text{mol/L}$) der um den Anteil bin-

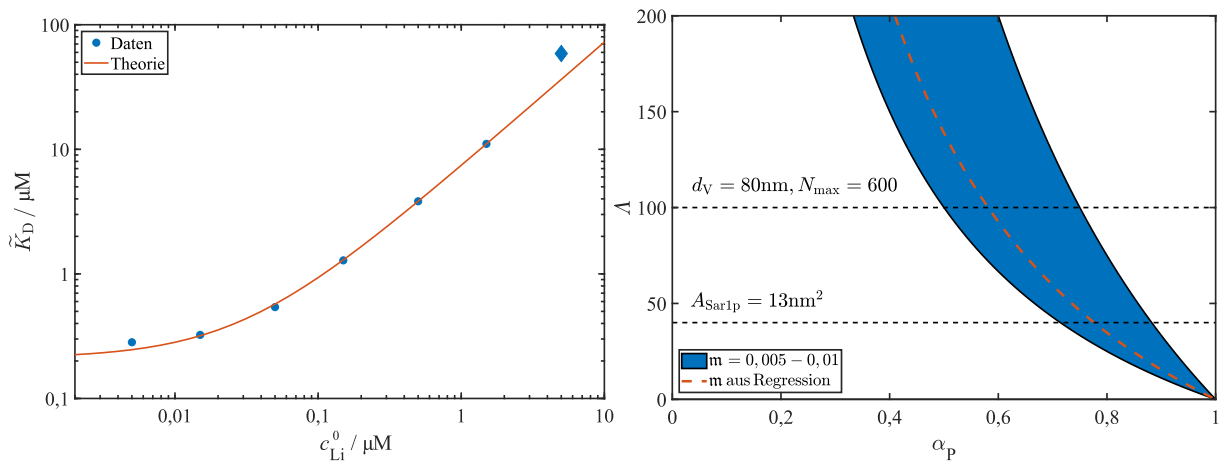


Abbildung 5.7.: Auftragung der aus den Titrationskurven erhaltenen scheinbaren Dissoziationskonstanten \tilde{K}_D (blaue Punkte, die mit einer blauen Raute markierte Messung wurde nicht in die Regression mit einbezogen) in Abhängigkeit der Lipidkonzentration c_{Li}^0 mit daran angepasster Gerade (rote Linie, links) und den mit der daraus ermittelten Steigung \mathbf{m} kompatiblen Parametern α_P und Λ (rechts). Neben der Steigung aus der Regression selbst (rote gestrichelte Kurve) sind die mit Steigungen zwischen 0,005 und 0,01 verträglichen Parameter dargestellt (blaue Fläche). Zwei sich aus der maximalen Besetzung eines Vesikels mit Protein bzw. der theoretischen, von einem Sar1p-Molekül belegten Fläche ergebenden Grenzen für Λ sind ebenfalls eingezeichnet (schwarze gestrichelte Linien).

dungsfähigen Proteins α_P zu korrigierenden „wahren“ Dissoziationskonstanten

$$\lim_{c_{Li}^0 \rightarrow 0} \tilde{K}_D = \frac{K_D}{\alpha_P}, \quad (5.14)$$

während die Steigung (hier $\mathbf{m} \approx 0,0072$) eine Funktion von α_P und der Anzahl Lipide pro Bindestelle $\Lambda = c_{Li}^0 / c_B^0$ (siehe Abschnitt 3.5.2.5) ist:

$$\mathbf{m} = \frac{d\tilde{K}_D}{dc_{Li}^0} = \frac{1 - \alpha_P}{\alpha_P \Lambda}. \quad (5.15)$$

Eine genauere Eingrenzung der Werte beider Variablen ist mit den durchgeführten Experimenten noch nicht möglich, es soll jedoch abschließend zumindest eine Abschätzung vorgenommen werden, die sich der in diesem und dem nächsten Kapitel gewonnenen Hinweise bezüglich der Größe Λ bedient. In Abb. 5.7 (rechts) sind die mit dem erhaltenen \mathbf{m} kompatiblen Wert von α_P und Λ dargestellt, sowohl für das Ergebnis der linearen Regression selbst (rote gestrichelte Kurve) als auch für den weiteren Bereich $\mathbf{m} = 0,005 - 0,01$ (blaue Fläche), um die Auswirkungen der Unsicherheiten aufzuzeigen. Als sinnvolle Grenzen von Λ (schwarze gestrichelte Linien) wurden zum einen als Tiefstwert

$$\Lambda_{\min} = 2 \frac{A_{Sar1p}}{A_{Li}} \approx 40 \quad (5.16)$$

die Anzahl Lipide, die von der projizierten Fläche von Sar1p bedeckt werden, genutzt (siehe Tabelle 6.1, $A_{\text{Sar1p}} \approx 13 \text{ nm}^2$ und $A_{\text{Li}} \approx 0,67 \text{ nm}^2$), zum anderen als Höchstwert

$$A_{\text{max}} = \frac{2\pi d_{\text{V}}^2}{A_{\text{Li}} \hat{N}_{\text{max}}} \approx 100 \quad (5.17)$$

die kleinste hier vorgefundene maximale Besetzungszahl pro Vesikel von $\hat{N}_{\text{max}} \approx 600$ bei einem Vesikeldurchmesser von $d_{\text{V}} \approx 80 \text{ nm}$ (Berechnung der Lipidanzahl pro Vesikel unter Vernachlässigung der Dicke der Doppelschicht als zwei Kugeloberflächen).

Es ergibt sich mit diesen Überlegungen und unter Berücksichtigung des Intervalls $m = 0,005 - 0,01$ endlich eine Spanne von $\hat{\alpha}_{\text{P}} = 0,5 - 0,9$ für den Anteil bindungsfähigen Proteins in den hier vorgestellten Messreihen. Damit folgt für die vermutete „wahre“ Dissoziationskonstante $\hat{K}_{\text{D}} = 0,11 \text{ } \mu\text{mol/L} - 0,19 \text{ } \mu\text{mol/L}$, mithin eine Größenordnung unterhalb des obigen Wertes für den *Major-Minor-Mix*. Ob dieser Befund spezifisch für das eingesetzte Lipid DOPC ist oder auch den *Major-Minor-Mix* betraf, kann bisher nicht gesagt werden.

So offensichtlich der Effekt der Lipidkonzentration auf die scheinbare Affinität ist, so unbestimmt ist leider bisher auch der Grund für das Vorliegen nicht bindungsfähigen Proteins bzw. auch in Anwesenheit hoher Bindestellenkonzentrationen frei diffundierender fluoreszierender Teilchen. Eine nicht auf das Protein selbst bezogene Erklärung bietet sich hinsichtlich der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff an: Die Reaktion wird in großem Überschuss an letzterem durchgeführt, um eine möglichst vollständige Umsetzung zu garantieren, was jedoch hohe Ansprüche an die nachfolgende Reinigung stellt. Dieser Aspekt wurde in [AUERSWALD, 2020](#) untersucht und im Rahmen der Genauigkeit der verschiedenen eingesetzten Methoden kein freier Farbstoff nachgewiesen.

Eine verringerte Bindungsfähigkeit des Proteins mag auch durch Reinigung und Lagerung bedingt auftreten oder selbst *in vivo* vorhanden sein, wozu bisher allerdings keine Hinweise aus Literatur und eigenen Arbeiten vorgebracht werden können. Nicht auszuschließen ist natürlich auch ein methodischer Fehler oder ein bisher übersehener Aspekt in der theoretischen Herleitung, was erst durch zukünftige Experimente, insbesondere unter Einbeziehung komplementärer Techniken wie der isothermen Titrationskalorimetrie, entschieden werden kann.

6. Fluoreszenzkorrelationspektroskopie zur Analyse der Proteinbindung an Lipidmonoschichten

6.1. Einleitung

Neben der Affinität und der möglichen Besetzungsdichte der Bindung eines Moleküls an eine Membran ist für membrankrümmende bzw. von der Membrankrümmung abhängige Proteine auch ihr jeweiliger Platzbedarf in der Membranebene von Relevanz: Ein Protein mit großer Querschnittsfläche in der Membran verdrängt viele Lipide und vergrößert damit die für die Membran oder die betroffene Halbschicht bei konstantem Oberflächendruck benötigte Fläche. In einem System konstanter Fläche hingegen baut sich eine Spannung auf, welche entweder zur lateralen Kompression der Lipide oder einer Krümmung der Membran führt. All dies kann eine wichtige Informationsquelle bezüglich der natürlichen Funktion eines Proteins und seiner spezifischen Bindungseigenschaften (Affinität, bevorzugte Krümmung, Kontaktfläche, Eindringtiefe) sein.

Hier wird dieser Platzbedarf als Einbaufläche und damit – makroskopisch – als Nettoänderung der Fläche einer Membran oder auch ihrer Lipiddichte bei konstantem Druck aufgefasst¹, wobei, anders als in Kapitel 5, eine Lipidmonoschicht in Form eines LANGMUIRfilms (siehe Abschnitt 3.1.2.2) zur Anwendung kam. Diese ermöglicht auf einfache Weise die Einstellung eines gewünschten Druckes bzw. einer Lipiddichte und damit auch die Untersuchung des druckabhängigen Proteineinbaus (SCHWIEGER *et al.*, 2017).

Die Schwierigkeit bei der Bestimmung der Einbaufläche mittels einer Filmwaage liegt in der Berechnung der die Flächenänderung verursachenden Anzahl an Proteinmolekülen, welche die Kombination mit einer weiteren Messtechnik erfordert. Oftmals muss hierzu der Film transferiert oder anderweitig gestört werden, sodass das System nicht mehr im Gleichgewicht untersucht werden kann und auch eine etwaige Zeit- und Ortsabhängigkeit nicht zugänglich ist (siehe auch Abschnitt 6.4.6). Hier wird dieses Problem durch die gleichzeitige Durchführung von

¹Diese Fläche stimmt nicht notwendigerweise mit der auf die Membran projizierten Querschnittsfläche des eingebrachten Objektes überein. Aufgrund beispielsweise elektrostatischer Wechselwirkung mit den Lipiden ist sowohl eine größere Einbaufläche, etwa durch abstoßende Kräfte und Störung der Lipidordnung als auch eine kleinere Einbaufläche, durch anziehende Kräfte und eine Verdichtung der benachbarten Lipide, denkbar. Zudem ist es eigentlich nicht korrekt, unterschiedslos den Ausdruck „Einbau“ zu gebrauchen, da mit den hier angewandten Methoden der Einbau *in* die Monoschicht nicht von einer bloßen Adsorption *an* die Monoschicht unterschieden werden kann. Letzteres könnte gleichfalls eine Flächenänderung bewirken, durch einen rein „kondensierenden“ Effekt auf die Lipide sogar eine negative (HÄDICKE *et al.*, 2016).

FCS-Messungen an der Filmwaage umgangen (siehe hierzu Abb. 6.1), die eine direkte Bestimmung der eingebauten Proteinmenge erlauben und zuerst von GUDMAND *et al.*, 2009 publiziert wurden².

Apparativ sind diese Messungen durch die Kombination einer Filmwaage mit einem inversen konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt worden (siehe Abb. 6.2): Ein Wasserimmersionsobjektiv mit einem besonders großem Arbeitsabstand von rund 600 μm wird von unten durch eine mit einem Deckglas verschlossene Öffnung im Boden der Filmwaage an den Film herangeführt, wodurch sich an dieser Stelle eine sehr geringe Wassertiefe ergibt. Der letzte Aspekt bedingt nicht nur eine erhöhte Empfindlichkeit des Lipid- und Wasserfilmes gegenüber Erschütterungen, was gerade beim Spreiten des Lipides durch kurzzeitiges Anheben des Wasserstandes kompensiert werden muss, sondern auch eine stark verlangsamte Durchmischung der Subphase durch Strömung.

Um dennoch einen gleichmäßigen Einbau von Protein zu erreichen, wurde mit den Barrieren der Film als Ganzes über die seitlichen, tieferen Bereiche der Filmwaage bewegt, die Proteinlösung dort unter der Barriere durch injiziert und mittels eines kleinen Magnetrührers in der Subphase verteilt. Die FCS-Messung erfolgt nach Ablauf einer für den Einbau hinreichenden Zeitspanne durch erneute Bewegung des Filmes zurück über das Objektiv.

Aufgrund der unvollkommenen Gasdichtigkeit des Gehäuses um Filmwaage und Mikroskop ist eine fortwährende Verdunstung der Subphase unvermeidlich und wurde in den experimentellen Ablauf integriert: Die – mehr oder weniger – gleichmäßige Bewegung des Filmes nach unten bei abnehmendem Volumen der Subphase erzeugt bei konstanter Höhe des Objektivs einen Durchlauf durch den Laserfokus³ und damit einen charakteristischen, von der MDF vorgegebenen Verlauf der mittleren Helligkeit sowie der FCS-Parameter (N_{eff} , τ_D und ω_{xy}^2). Erstere beschreibt, wie für ein 2D-GAUSS-LORENTZmodell zu erwarten, recht genau eine LORENTZkurve (siehe Abb. 6.3) nach

$$\langle F(z) \rangle = \frac{\langle F_0 \rangle}{1 + z^2/\omega_{z,\text{PH}}^2}, \quad (6.1)$$

letztere hingegen eine Parabel nach⁴

$$N_{\text{eff}}(z) = N_{\text{eff},0} \left(1 + z^2/\omega_z^2 \right), \quad (6.2)$$

²Bereits vorher wurden sowohl FCS-Experimente an Monoschichten auf festen Trägerstrukturen (ELLIOTT *et al.*, 2003) und Flüssig-Flüssig-Grenzflächen durchgeführt (BENDA *et al.*, 2003) als auch Diffusionsprozesse in Monoschichten mittels anderer Techniken, beispielsweise *Einzelpartikelverfolgung* (engl. *single particle tracking*, *SPT*, siehe SCHÜTZ *et al.*, 1997; KE *et al.*, 2001 oder *Fluoreszenzzerholung nach Photobleichung* (engl. *fluorescence recovery after photobleaching*, *FRAP*, siehe PETERS *et al.*, 1983), untersucht.

³Dies kann als „freiwillig“ ablaufende Variante der sogenannten *z-Scan-FCS* (BENDA *et al.*, 2003), bei der die Probe in axialer Richtung mechanisch abgerastert wird (eine verdunstungsgetriebene Messung wurde an gleicher Stelle ebenfalls beschrieben). Da hier die axiale Abhängigkeit der FCS-Parameter nicht zum Zwecke der Kalibrierung herangezogen wird (ALLGEYER *et al.*, 2011), sind kleinere Bewegungen von Filmwaage und Wasseroberfläche nicht von Relevanz.

⁴Praktisch entsteht diese Parabel aus der Zerlegung der Fluoreszenzintensitätsverlaufs in viele kurze Segmente und deren unabhängiger Autokorrelation und Anpassung an die theoretische Kurve für zweidimensionale Diffusion in der *xy*-Ebene.

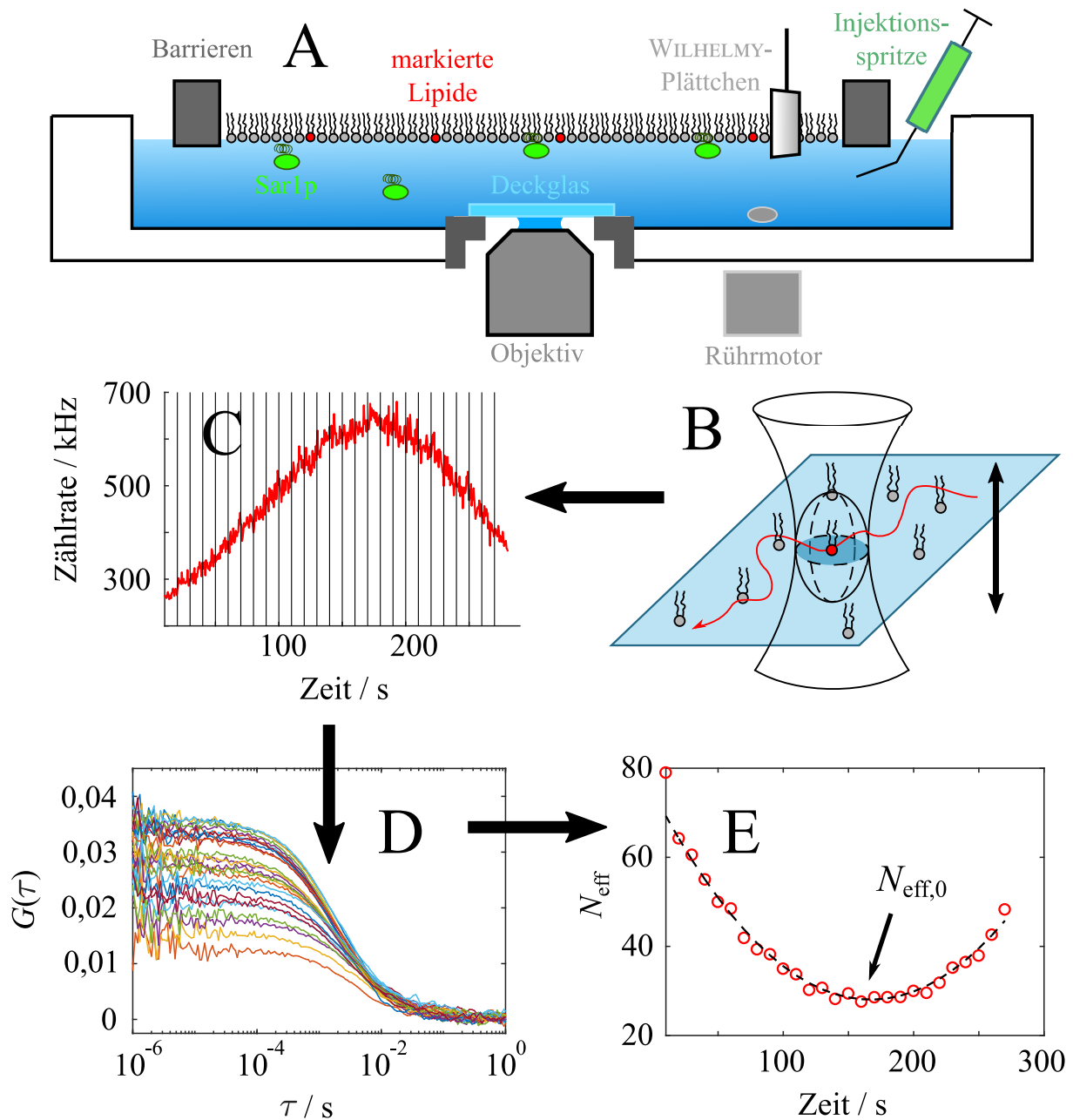


Abbildung 6.1.: Schematische Darstellung des Messaufbaus und der stufenweisen Auswertung der gewonnenen Daten zur Bestimmung von Einbauflächen in einer Monoschicht.

A: Seitenansicht der Filmwaage über dem Mikroskopobjektiv mit Lipidmonoschicht, injiziertem Protein, WILHELMY-Plättchen und Rührer.

B: Fluoreszenzmarkierte Lipidmoleküle diffundieren innerhalb der in ihrer Höhe veränderlichen Wasser-Luft-Grenzfläche durch den Fokus (fokussierter Laserstrahl als Hyperboloid, effektives $F(C)CS$ -Volumen als Ellipsoid).

C: Die Zählratenkurve bei einem Fokusdurchlauf wird für die Korrelation in einzelne Abschnitte zerteilt.

D: Die sich ergebenden Autokorrelationskurven zeigen eine von der Position der Monoschicht abhängige Amplitude.

E: Durch Anpassung der theoretischen Kurven wird die parabelförmig verlaufende effektive Teilchenzahl gewonnen und deren Minimalwert bestimmt.

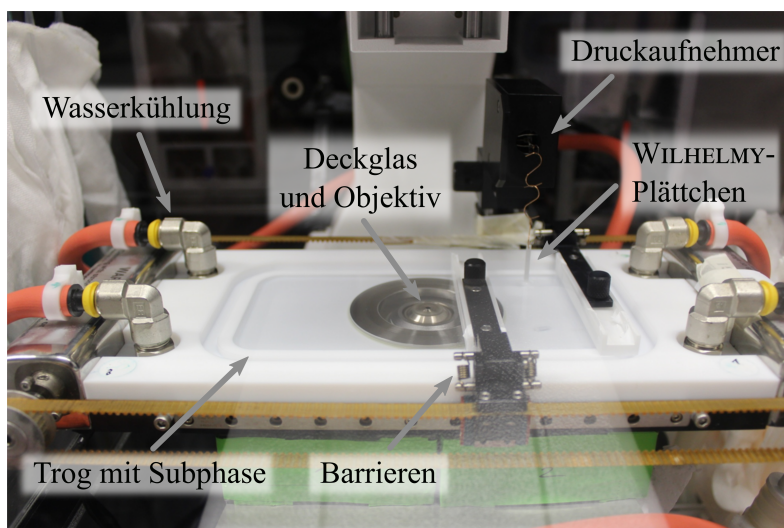


Abbildung 6.2.: Fotografie der verwendeten Filmwaage in ihrem Gehäuse auf dem Mikroskop. Der Film zwischen den Barrieren wurde zur Proteininjektion neben dem Objektiv platziert, wo sich auch der Magnetrührer befindet.

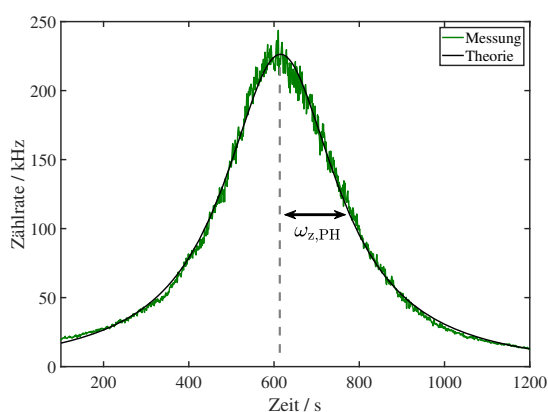


Abbildung 6.3.: Beispielhafte Anpassung einer LORENTZKurve mit dem axialen Fokusradius $\omega_{z,PH}$ an den Verlauf der Zählrate während eines Fokusradiusdurchlaufs (entspricht Abb. 6.12, mittlere Spalte).

deren Minimum ausgewertet⁵ und diese „wahre“ Teilchenzahl $N_{\text{eff},0}$ zur Berechnung der Flächendichten der markierten Lipide und Proteine herangezogen wird. Der auf die Lochblende zurückzuführende axiale Fokusradius $\omega_{z,PH}$ weicht in unserem System zudem nicht merklich von ω_z ab, sodass im Folgenden stets ein einziger Parameter verwendet wird.

Die Flächenänderung selbst wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt: makroskopisch über die Position der bei konstantem Druck automatisch nachgeführten Barrieren und mikroskopisch über die aus der Teilchenzahl eines andersfarbig fluoreszenzmarkierten Lipidanalogs bestimmten Änderung der Flächendichte des Lipidfilms.

Alle Messungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, bei einem Oberflächendruck von $\Pi =$

⁵Tatsächlich liegen die Daten in Abhängigkeit der Zeit vor und werden unter der Annahme einer konstanten Wandergeschwindigkeit mit der Ersetzung $z/\omega_z \mapsto (t - t_0)/t_z$ angepasst.

30 mN/m durchgeführt, welcher aufgrund der bei etwa diesem Druck vorliegenden Gleichheit der Lipidflächendichten von Mono- und Doppelschicht (sogenannter *monolayer-bilayer equivalence pressure*, siehe [BLUME, 1979](#); [SEELIG, 1987](#)) als für den biologischen Vergleich relevant angesehen werden kann. Für Sar1p und eine *Major-Minor-Mix*-Monoschicht fällt dieser Druck ebenfalls mit dem sogenannten *maximalen Einbaudruck* (engl. *maximum insertion pressure, MIP*) zusammen [SCHWIEGER et al., 2017](#), welcher den aus Filmwaageexperimenten extrapolierten Druck angibt, bis zu dem sich Moleküle in eine Monoschicht einbauen. Somit ist damit zu rechnen, dass nur sehr geringe Mengen Proteins eingebaut werden und sowohl die akkurate Bestimmung der Teilchenzahlen als auch der Flächenänderungen eine Herausforderung darstellen. Hinzu kommt bei diesen, relativ zum maximalen Druck, dem die aus den verwendeten Lipiden gebildeten Monoschichten ohne zu kollabieren ausgesetzt werden können, sehr hohen Drücken eine erhebliche Instabilität der Filme, die sich in einem Druckabfall (bei konstanter Fläche) bzw. einer stetigen Verringerung der Fläche (bei konstantem Druck) bemerkbar macht.

Da der kontinuierliche Abfall der Filmfläche der zu messenden Erhöhung entgegenwirkt, verfälscht dieser die berechnete Einbaufläche in jedem Fall hin zu kleineren Werten. Die Verwendung der aus FCS-Messungen bestimmten Flächendichten der Lipide erlaubt nun die Umgehung dieser Schwierigkeiten⁶. solange der Verlust an Filmfläche nicht selektiv einzelne Komponenten der Lipidmischung betrifft.

6.2. Grundlagen

Wie in den beiden vorangegangenen Kapiteln werden die theoretischen FCS-Kurven für eine diffundierende Komponente an die Korrelationsdaten angepasst, wobei wegen der auf die laterale Bewegung in der Monoschicht beschränkte Diffusion der fluoreszierenden Teilchen hier Gl. 3.161 genutzt werden muss. Photophysikalische Effekte können hier ebenfalls ignoriert werden, da bei den verwendeten Farbstoffen und Laserleistungen diese kaum ausgeprägt sind und auch nicht im für die langsame Diffusion in der Lipidmembran charakteristischen Zeitbereich stattfinden. Die Autokorrelationsamplituden des grünen (markiertes Sar1p) und gegebenenfalls des roten Kanals (markierter Lipidfilm) werden nach Gl. 3.98 in effektive Teilchenzahlen umgewandelt und für die Auswertung verwendet. Eine Korrektur wie oben ist unter den hier verwendeten Bedingungen nicht notwendig, weil die Helligkeiten in beiden Kanälen einerseits so groß sind, dass sich unkorrelierter Hintergrund nicht bemerkbar macht, andererseits die Helligkeit des roten Kanals (wo verwendet) jene des grünen Kanals um eine Größenordnung übertrifft und damit das (deutlich stärkere) Übersprechen von grün nach rot ebenfalls vernachlässigt werden kann.

Während in den Vesikelexperimenten die effektiven Fokusvolumina zur Auswertung der erhaltenen Korrelationsamplituden unverzichtbar waren und mittels Messungen an Fluorophoren

⁶Dies gilt unter der Maßgabe, dass der Verlust an Filmfläche unabhängig von deren Zusammensetzung erfolgt. Würden bestimmte Lipide selektiv in die Subphase übergehen und damit die übrige Monoschicht in ihren Eigenschaften verändern oder der Druckverlust durch eine langsame Phasenumwandlung der Lipide hervorgerufen werden, könnte auch die Auswertung mithilfe markierter Lipide nicht mehr die korrekten Einbauflächen reproduzieren.

bekannter Diffusionskoeffizienten ermittelt wurden, treten bei der Untersuchung zweidimensionaler Phasen wie hier die effektiven Fokusflächen im axialen Zentrum des Fokus an ihre Stelle. Da keine verlässlichen Diffusionskoeffizienten von Fluorophoren an der Wasser-Luft-Grenzfläche zur Verfügung standen, wurde für deren Bestimmung auf eine der FCS verwandte Technik, die Rasterbildkorrelationspektroskopie (RICS) zurückgegriffen (siehe Abschnitt 3.4.5). Unter Ausnutzung der vom Hersteller kalibrierten Positionierung des Laserstrahls und damit genau bekannten Größe der Bildpunkte der in einem Laserrastermikroskop erzeugten Bilder ermöglicht diese eine unabhängige, absolute Berechnung des Fokusradius'. Dessen Quadrat beschreibt nach Gl. 3.163 eine Parabel, deren Minimum aus einer nichtlinearen Anpassung einer solchen ermittelt wird.

6.2.1. Messung der Einbaufläche

Die Einbaufläche A_{Einbau} kann zunächst aus der makroskopischen Flächenänderung des Filmes ΔA , gemessen mittels der Position der Barrieren der Filmwaage (Fläche vor Einbau A_1 und nach Einbau A_2), und der Anzahl in der Monoschicht eingebauter Proteine $N_{\text{P}}^{\text{M}} = N_{\text{g}}^{\text{M}}/\chi_{\text{g}}$ (mit der Gesamtzahl grün markierter Teilchen N_{g}^{M} nach FCS und dem Markierungsgrad des Proteins χ_{g}) errechnet:

$$A_{\text{Einbau}} = \frac{\Delta A}{N_{\text{P}}^{\text{M}}} = \frac{A_2 - A_1}{N_{\text{g}}^{\text{M}}} \chi_{\text{g}}. \quad (6.3)$$

N_{g}^{M} wird schließlich – unter Annahme überall gleicher Einbaudichten – hochgerechnet aus der Anzahl grüner Teilchen N_{g} in der effektiven Fokusfläche A_{g} und deren Verhältnis zur Filmfläche nach Einbau A_2 :

$$N_{\text{g}}^{\text{M}} = \frac{A_2}{A_{\text{g}}} N_{\text{g}} \quad (6.4)$$

$$A_{\text{Einbau}} = \left(1 - \frac{A_1}{A_2}\right) \frac{A_{\text{g}}}{N_{\text{g}}} \chi_{\text{g}}. \quad (6.5)$$

Als Alternative zur Verwendung der mithilfe der Filmwaage bestimmten makroskopischen Fläche der Monoschicht kann die Einbaufläche auch auf Grundlage der Verdünnung der Lipidmoleküle nach Proteineinbau ermittelt werden. Dazu wird ein Anteil an fluoreszenzmarkierten Lipidanaloga dem Film zugesetzt und in einem zweiten Farbkanal FCS-Messungen für diese durchgeführt. Die Gesamtlipidanzahl N_{Li} wird als konstant angenommen, da das eingebaute Protein die Lipide lediglich auf eine größere Fläche verdrängt (siehe Abb. 6.4) und somit ihre Flächendichte vor ($\rho_{\text{Li},1}$) bzw. nach dem Einbau ($\rho_{\text{Li},2}$) unterschiedlich ist.

Man erhält mit dieser Methode nun über die Ersetzung der Gesamtflächen über

$$\rho_{\text{Li},(1,2)} = \frac{N_{\text{Li}}}{A_{(1,2)}} \quad (6.6)$$

und mit der Zahl rot markierter Lipide vor ($N_{\text{r},1}$) bzw. nach Einbau des Proteins ($N_{\text{r},2}$) sowie

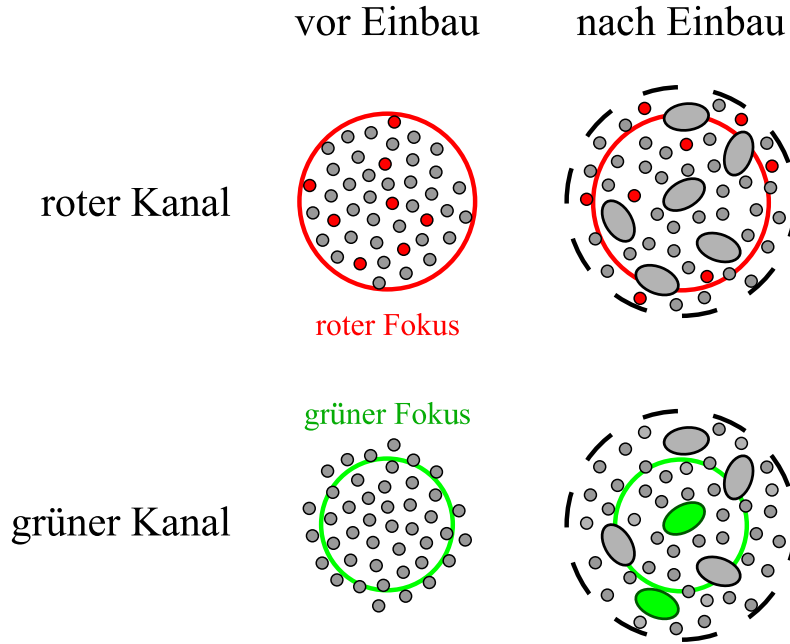


Abbildung 6.4.: Schematische Darstellung des Effektes von eingebautem Protein (Ellipsen) auf die Flächendichte der Lipide (Kreise). Die farbigen Kreise symbolisieren die Größe des effektiven Fokus in beiden Kanälen, welche jeweils den Bruchteil fluoreszenzmarkierter Lipide bzw. Proteine detektieren. Der gestrichelte Kreis stellt die nach dem Einbau von der (konstanten) Anzahl Lipide eingenommene größere Fläche dar.

der roten Fokusfläche A_r und dem Markierungsgrad der Lipide χ_r

$$N_{r,(1,2)} = \rho_{Li,(1,2)} A_r \chi_r \quad (6.7)$$

die Einbaufläche zu

$$A_{\text{Einbau}} = \left(1 - \frac{N_{Li} A_r \chi_r / N_{r,1}}{N_{Li} A_r \chi_r / N_{r,2}}\right) \frac{A_g}{N_g} \chi_g = \left(1 - \frac{N_{r,2}}{N_{r,1}}\right) \frac{A_g}{N_g} \chi_g. \quad (6.8)$$

Ein Verlust von Lipiden durch Abtauchen in die Subphase oder Übertreten der Barrieren und Trogränder hat nun keinen unmittelbaren Einfluss auf die Messung, was als ein deutlicher Vorteil dieses Ansatzes zu sehen ist. Wichtig ist dabei allein der homogene Verlust von Material, sodass sich weder die globale, noch die lokale Zusammensetzung des Filmes verändert.

6.2.2. Einfluss von Teilchen in der Subphase

Bisher wurden allein die in die Monoschicht integrierten bzw. an sie gebundenen Fluorophore betrachtet, was etwa für Lipidanaloga in einem LANGMUIRFilm auch sinnvoll ist. Da das hier untersuchte Protein aber in gelöster Form in der Subphase vorliegt und nur partiell aus dieser an die Monoschicht bindet, muss auch der Einfluss dieser in der Subphase verbliebenen Fluorophore quantifiziert und gegebenenfalls in der Auswertung berücksichtigt werden. In diesem Abschnitt sollen daher für den Fall vernachlässigbarer Geschwindigkeiten des Übergangs zwischen 2D- und

3D-Phasen obere und untere Grenzen für den relativen Beitrag der Subphase zu den während eines Fokusdurchlaufs gewonnenen Korrelationskurven entwickelt werden ⁷.

Ausgehend von Gl. 3.107 wird nun, unter Annahme unabhängiger Spezies in der Monoschicht und der Subphase und Vernachlässigung photophysikalischer Prozesse,

$$F(t) = F_{2D}(t) + F_{3D}(t) \quad (6.9)$$

$$\langle F_{2D}(t) \cdot F_{3D}(t) \rangle = \langle F_{2D}(t) \rangle \cdot \langle F_{3D}(t) \rangle \quad (6.10)$$

angesetzt und in die Autokorrelationsfunktion eingefügt:

$$G(\tau) = \frac{\langle F_{2D}(t) + F_{3D}(t) \rangle \cdot \langle F_{2D}(t + \tau) + F_{3D}(t + \tau) \rangle}{\langle F_{2D}(t) + F_{3D}(t) \rangle^2} - 1 \quad (6.11)$$

$$= \frac{\langle F_{2D}(t) \cdot F_{2D}(t + \tau) \rangle - \langle F_{2D}(t) \rangle^2 + \langle F_{3D}(t) \cdot F_{3D}(t + \tau) \rangle - \langle F_{3D}(t) \rangle^2}{\langle F_{2D}(t) \rangle^2 + \langle F_{3D}(t) \rangle^2 + 2 \langle F_{2D}(t) \rangle \langle F_{3D}(t) \rangle} \quad (6.12)$$

$$= \frac{G_{2D}(\tau) \langle F_{2D}(t) \rangle^2 + G_{3D}(\tau) \langle F_{3D}(t) \rangle^2}{\langle F_{2D}(t) \rangle^2 + \langle F_{3D}(t) \rangle^2 + 2 \langle F_{2D}(t) \rangle \langle F_{3D}(t) \rangle}. \quad (6.13)$$

Der Beitrag des, hier unerwünschten, Signals aus der Subphase relativ zum eigentlich untersuchten Signal der Monoschicht ist somit durch

$$\Upsilon(\tau) = \frac{G_{3D}(\tau) \langle F_{3D}(t) \rangle^2}{G_{2D}(\tau) \langle F_{2D}(t) \rangle^2} = \frac{\langle \delta F_{3D}(t) \cdot \delta F_{3D}(t + \tau) \rangle}{\langle \delta F_{2D}(t) \cdot \delta F_{2D}(t + \tau) \rangle} \quad (6.14)$$

gegeben. Hierbei sind $G_{2D}(\tau)$ und $G_{3D}(\tau)$ die hypothetischen Autokorrelationsfunktionen beider Spezies in Abwesenheit der jeweils anderen.

Da für die vorliegende Arbeit allein die Amplituden (unter Vernachlässigung photophysikalischer Prozesse, Schrotrauschen, *etc.*) von Interesse sind, beschränkt sich die Herleitung im Weiteren auf diesen mathematischer deutlich simpleren Fall:

$$\Upsilon_0 = \frac{\langle \delta F_{3D}(t)^2 \rangle}{\langle \delta F_{2D}(t)^2 \rangle} = \frac{Q_{3D}^2 c_{3D} N_A \int_{V^-} W(\vec{r})^2 d^3 \vec{r}}{Q_{2D}^2 c_{2D} N_A \int_A W(\vec{r})^2 d^3 \vec{r}} = \frac{Q_{3D}^2 c_{3D} \int_{-\infty}^{z_M} \Omega_2^A(z) dz}{Q_{2D}^2 c_{2D} \Omega_2^A(z_M)}. \quad (6.15)$$

Hierbei stellt c_{2D} die Flächenkonzentration der fluoreszierenden Teilchen der Monoschicht mit der Einheit mol/m² dar. Die Integrale über die Quadrate der MDF erstrecken sich für die Monoschicht über deren Fläche in der xy -Ebene (hier als Ω_2^A bezeichnet in Analogie zu Gl. 3.79) auf der axialen Höhe z_M , wobei die Position des Fokuszentrums als $z = 0$ angenommen wird, und für die Subphase damit auf den negativen Halbraum bis zur Höhe z_M .

Die Konzentrationen können nun für unser System⁸ in Beziehung gesetzt werden zu der Gesamtfläche der Monoschicht A_M , dem Gesamtvolumen der Subphase V_S und den Subphasenkonzen-

⁷Rein auf Intensitätsmessungen bezogene Vorläufer dieser Analyse finden sich in [MACDONALD *et al.*, 2010](#); [SMITH *et al.*, 2015](#)

⁸Dieselben Formeln gelten für nicht vollständig fluoreszenzmarkierte Teilchen, da sich der Markierungsgrad aus den Konzentrationen herauskürzt, siehe auch Abschnitt 5.2 auf Seite 120.

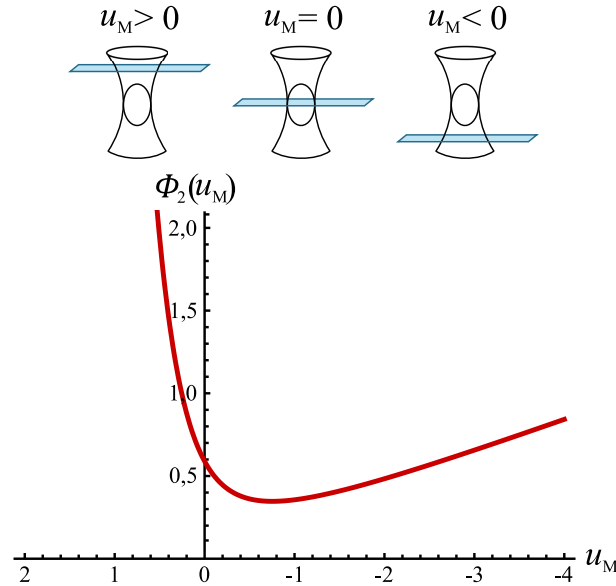


Abbildung 6.5.: Abhängigkeit des Verhältnisses der Beiträge von Subphase und Monoschicht Φ_2 zur FCS-Amplitude von der Position der Wasser-Luft-Grenzfläche in Relation zum Fokuszentrums $u_M = z_M/\omega_z$.

trationen freier Proteine und besetzter Bindungsplätze⁹:

$$c_{3D} = c_P^{\text{frei}} \quad (6.16)$$

$$c_{2D} = \frac{n_B^{\text{bes}}}{A_M} = \frac{c_B^{\text{bes}} V_S}{A_M}, \quad (6.17)$$

womit sich schließlich

$$\gamma_0 = \frac{Q_{3D}^2 c_P^{\text{frei}} A_M}{Q_{2D}^2 c_B^{\text{bes}} V_S} \int_{-\infty}^{z_M} \frac{\Omega_2^A(z)}{\Omega_2^A(z_M)} dz = \frac{1}{\zeta_M^2} \frac{c_P^{\text{frei}} A_M \omega_z}{c_B^{\text{bes}} V_S} \Phi_2(u_M) \quad (6.18)$$

ergibt. Hier wurde der Faktor der Fluoreszenzlöschung (siehe hierzu auch Seite 83) bei Interaktion mit der Monoschicht $\zeta_M = Q_{2D}/Q_{3D}$ eingeführt, sowie nach Substitution $z = u\omega_z$ die dimensionslose Funktion

$$\Phi_n(u_M) = \int_{-\infty}^{u_M} \frac{\Omega_n^A(u\omega_z)}{\Omega_n^A(u_M\omega_z)} du \quad (6.19)$$

definiert, deren wichtiger Spezialfall mit $n = 2$ für das hier angenommene 2D-GAUSS-LORENTZmodell in Abb. 6.5 dargestellt ist.

Eine Abschätzung des Verhältnisses $c_P^{\text{frei}}/c_B^{\text{bes}}$ kann nun durch Umstellen der zugehörigen Bindungsisotherme erfolgen, für den vorliegenden Fall also die LANGMUIR-Isotherme Gl. 3.249 mit

⁹Die Frage nach der thermodynamischen Aktivität oberflächengebundener Moleküle und der Stellung der Membranen als eigene Phase (siehe etwa ISRAELACHVILI, 2011) ist hier nur scheinbar relevant, da zwar eine nominelle Volumenkonzentration der Bindestellen Verwendung findet, diese aber lediglich eine pragmatische Umrechnung des Besetzungsgrades der Bindungsplätze darstellt und nicht als thermodynamische Größe in die Berechnung eines Gleichgewichtes eingeht.

der Gesamtmenge Bindungsplätze n_B^0 :

$$\frac{n_B^{\text{bes}}}{n_B^0} = \frac{c_B^{\text{bes}}}{c_B^0} = \frac{c_P^{\text{frei}}}{c_P^{\text{frei}} + K_D} \quad (6.20)$$

$$\frac{c_P^{\text{frei}}}{c_B^{\text{bes}}} = \frac{K_D + c_P^{\text{frei}}}{c_B^0}. \quad (6.21)$$

Da die freie Proteinkonzentration nicht negativ sein kann, ergibt sich folglich eine Untergrenze des Beitrages der Subphasenproteine zur Autokorrelationsfunktion von

$$\mathcal{Y}_0 \geq \frac{1}{\zeta_M^2} \frac{K_D}{c_B^0} \frac{A_M \omega_z}{V_S} \Phi_2(u_M) = \frac{1}{\zeta_M^2} \frac{K_D N_A \omega_z}{\rho_B^0} \Phi_2(u_M), \quad (6.22)$$

welche für gegebene optische Parameter allein vom Verhältnis der Dissoziationskonstante zur Flächendichte der Bindungsplätze ρ_B^0 abhängt. Je affiner also die Bindung der Proteine und je dichter ihre Besetzung der Monoschicht, desto weniger stellt in der Subphase verbliebenes Protein also ein Problem für die Messungen dar.

Eine Obergrenze für \mathcal{Y}_0 kann direkt aus der Messung selbst gewonnen werden und damit im Nachhinein als Indikator für die Notwendigkeit einer Berücksichtigung der freien Fluorophore bei weiteren Auswertung dienen. Hierzu wird das theoretische Helligkeitsverhältnis

$$\frac{\langle F_{3D}(t) \rangle}{\langle F_{2D}(t) \rangle} = \frac{Q_{3D} c_{3D} N_A \int_{V^-} W(\vec{r}) d^3 \vec{r}}{Q_{2D} c_{2D} N_A \int_A W(\vec{r}) d^3 \vec{r}} = \frac{Q_{3D} c_{3D} \int_{-\infty}^{z_M} \Omega_1^A(z) dz}{Q_{2D} c_{2D} \Omega_1^A(z_M)} \quad (6.23)$$

mit experimentell zugänglichen Daten verglichen. Man erkennt die Analogie zur Berechnung von \mathcal{Y}_0 und erhält direkt

$$\frac{\langle F_{3D}(t) \rangle}{\langle F_{2D}(t) \rangle} = \frac{1}{\zeta_M} \frac{c_P^{\text{frei}}}{c_B^{\text{bes}}} \frac{A_M \omega_z}{V_S} \Phi_1(u_M) \quad (6.24)$$

und durch Vergleich mit Gl. 6.18 schließlich

$$\mathcal{Y}_0 = \frac{\langle F_{3D}(t) \rangle}{\langle F_{2D}(t) \rangle} \frac{1}{\zeta_M} \frac{\Phi_2(u_M)}{\Phi_1(u_M)}. \quad (6.25)$$

Für die Bestimmung von $N_{\text{eff},0}$ ist insbesondere der zentrale Abschnitt der Durchlaufkurve mit $u_M = 0$ relevant. Gleichzeitig gilt, dass der Beitrag der Subphase zur Helligkeit dort maximal halb so groß ist wie die Gesamthelligkeit bei Positionierung des Fokus tief unterhalb der Monoschicht ($u_M \gg 0$), da exakt der untere Halbraum des Fokus' von der Subphase eingenommen wird und $\lim_{u_M \rightarrow \infty} \langle F_{2D}(t) \rangle = 0$:

$$\mathcal{Y}_0(u_M = 0) = \frac{\langle F_{3D}(t) \rangle}{\langle F_{u_M=0}(t) \rangle - \langle F_{3D}(t) \rangle} \frac{1}{\zeta_M} \frac{\Phi_2(0)}{\Phi_1(0)} \quad (6.26)$$

$$\leq \frac{\frac{1}{2} \langle F_{u_M \gg 0}(t) \rangle}{\langle F_{u_M=0}(t) \rangle - \frac{1}{2} \langle F_{u_M \gg 0}(t) \rangle} \frac{1}{\zeta_M} \frac{3}{8}. \quad (6.27)$$

In der zweiten Zeile wurden die entsprechenden Werte von $\Phi_n(0)$ für das 2D-GAUSS-LORENTZmodell eingesetzt¹⁰. Diese Abschätzung wird umso genauer, je tiefer in der Subphase der Wert $\langle F_{u_M \gg 0}(t) \rangle$ gemessen wird. Sollte dies nicht praktikabel sein, kann – unter der Voraussetzung einer noch nicht allzu stark durch den Einfluss der Subphase verzerrten Helligkeitskurve, also hier einer nur geringfügigen Abweichung von Gl. 6.1 – auch die leichte Asymmetrie dieser Kurve ausgenutzt werden, die durch die zusätzliche Helligkeit der nicht an die Monoschicht gebundenen Fluorophore hervorgerufen wird:

$$\langle F_{+z_M}(t) \rangle - \langle F_{-z_M}(t) \rangle = Q_{3D}c_{3D} \left[\int_{-\infty}^{+z_M} \Omega_1^A(z) dz - \int_{-\infty}^{-z_M} \Omega_1^A(z) dz \right] \quad (6.28)$$

$$+ Q_{2D}c_{2D} \left[\Omega_1^A(+z_M) - \Omega_1^A(-z_M) \right]$$

$$= Q_{3D}c_{3D} \int_{-z_M}^{+z_M} \Omega_1^A(z) dz \quad (6.29)$$

$$\leq Q_{3D}c_{3D} \int_{-\infty}^{+\infty} \Omega_1^A(z) dz = \langle F_{z_M \rightarrow \infty}(t) \rangle. \quad (6.30)$$

Aus der Differenz der Helligkeiten zwischen axialen Positionen gleichen Abstandes der Monoschicht vom Fokuszentrum ($\langle F_{+z_M}(t) \rangle$ und $\langle F_{-z_M}(t) \rangle$) fällt der in beiden Fällen identische Beitrag der gebundenen Fluorophore heraus ($\Omega_1^A(z)$ ist eine gerade Funktion) und es verbleibt ein Bruchteil der maximalen Helligkeit der Subphase $\langle F_{z_M \rightarrow \infty}(t) \rangle$, welcher als Näherung für $\langle F_{u_M \gg 0}(t) \rangle$ in Gl. 6.27 eingesetzt werden kann.

6.2.3. Alternative Auswertung der Durchlaufkurven

Anstatt die gemessene Fluoreszenzintensität in kurze zeitliche Abschnitte zu zerlegen, in denen die Monoschicht nahezu an derselben Position relativ zum Fokus verharrt, kann auch ein größerer Teil der Durchlaufkurve als Ganzes autokorreliert und eine veränderte theoretische Kurve daran angepasst werden (siehe Abb. 6.6). Durch die Bewegung der Monoschicht durch den Fokus, welche der diffusiven Bewegung der Fluorophore überlagert ist, wird die MDF selbst eine Funktion der Zeit und es findet bei der Berechnung der Korrelationsfunktionen eine zweite, deterministische Mittelung über diese statt.

Da die Normierung auf die mittlere Helligkeit im Nenner ebenfalls – und getrennt vom Zähler – auf diese Weise gemittelt wird, kann nicht einfach $G(\tau)$ selbst gemittelt werden, sondern Zähler und Nenner getrennt. Bei der hier verwendeten symmetrisierten Normierung erstreckt sich zusätzlich die Helligkeitsmittelung auf verschiedene Abschnitte des Fokusdurchlaufs, sodass auch in der theoretischen Kurve nicht einfach das Quadrat der erwarteten Helligkeit bei der Berechnung der Autokorrelationsfunktion benutzt werden darf.

¹⁰Interessanterweise konvergiert dieses als auf die Helligkeit normierter relativer Einfluss der Subphase auffassbare Verhältnis $\Phi_2(u_M)/\Phi_1(u_M)$ für $u_M \rightarrow -\infty$ gegen $1/5$, da beide Phasen schließlich gleichermaßen an Einfluss verlieren und die Lage der Fluorophore in Monoschicht oder Subphase nur noch einen konstanten Faktor beisteuert. Umgekehrt gilt wie zu erwarten $\lim_{u_M \rightarrow \infty} \Phi_2(u_M)/\Phi_1(u_M) = \infty$.

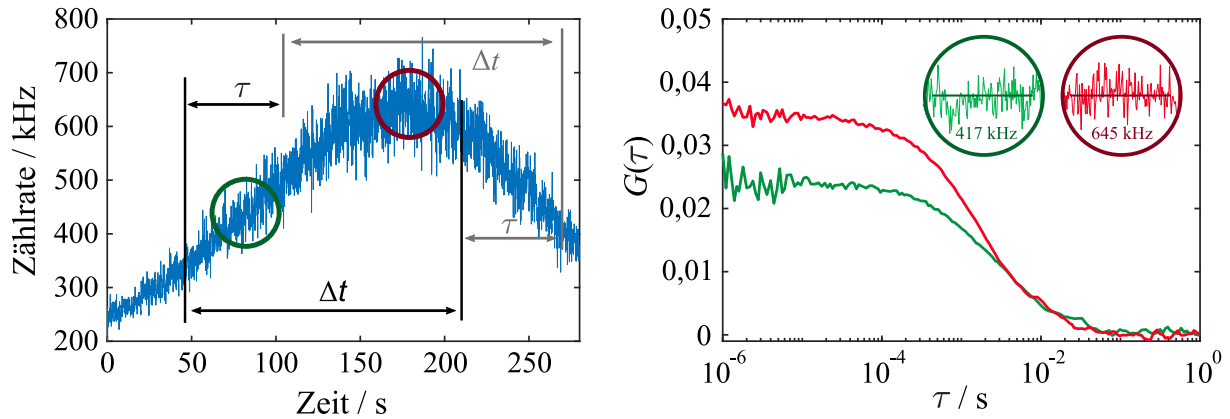


Abbildung 6.6.: Beispielhafter Fokurdurchlauf (links) mit den über ein Korrelationsfenster der Länge Δt zu berücksichtigenden unterschiedlichen mittleren Intensitäten (Kreise rechts) und Amplituden (Kurven rechts). Bei der Korrelationszeit τ fließt nur der Überlappungsbereich des originalen (schwarz) und verschobenen (grau) Zeitfensters in die Rechnung ein. Die roten und grünen Kreise zeigen die lokale Fluktuation der Zählrate um den auf kleineren Zeitskalen nahezu konstanten, aber insgesamt positionsabhängigen Mittelwert (Balken und Werte) an. Man erkennt die im Zentrum des Fokus (rot) höhere Amplitude und damit kleinere effektive Teilchenzahl.

All dies sorgt dafür, dass die Helligkeit keine stationäre Funktion mehr ist und damit die Korrelationsfunktionen nicht mehr nur von der Korrelationszeit τ abhängt, sondern zusätzlich von der Startposition $z_{M,1}$ der Monoschicht relativ zum Fokuszentrum, seiner (axialen) Wandergeschwindigkeit v_M durch den Fokus¹¹, sowie der Länge des Korrelationsfensters Δt . Die Position des Fokuszentrums wird abermals als konstant $z = 0$ angenommen, sodass der die Monoschicht umfassende Teil der MDF eine zeitabhängige Funktion mit $W(\vec{r}) \mapsto W(x, y, z_{M,1} + v_M(t - t_1))$ wird.

Zusammengenommen ergibt sich damit nun für eine Korrelation der Kanäle a und b

$$\overline{G_{a,b}(\tau)} = \frac{\overline{\langle F_a(t) \cdot F_b(t + \tau) \rangle}}{\overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}} - 1 = \frac{(\overline{G_{a,b}(\tau)} + 1) \overline{\langle F_a(t) \rangle} \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}}{\overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}} - 1 \quad (6.31)$$

$$= \frac{\overline{\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle}}{\overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}} + \frac{\overline{\langle F_a(t) \rangle} \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle} - \overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}}{\overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle}}. \quad (6.32)$$

Hierbei ist zusätzlich zu beachten, dass

$$\overline{\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle} = \overline{\langle F_a(t) \cdot F_a(t + \tau) \rangle} + \overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle} \quad (6.33)$$

$$\neq \overline{\langle F_a(t) \cdot F_b(t + \tau) \rangle} + \overline{\langle F_a(t) \rangle} \cdot \overline{\langle F_b(t + \tau) \rangle} \quad (6.34)$$

gilt und dadurch ein zweiter Term in Gl. 6.32 auftritt, welcher einen Versatz auf der Ordinate darstellt und unabhängig ist von den diffusiven und photophysikalischen Prozessen in der

¹¹Hier wird grundsätzlich eine konstante Wandergeschwindigkeit angenommen, sodass die Position der Monoschicht nach Versatz um die Korrelationszeit als $z_{M,2} = z_{M,1} + v_M \tau$ geschrieben werden kann. Bei den hier betrachteten Experimenten mit verdunstender Subphase ist damit $v_M < 0$.

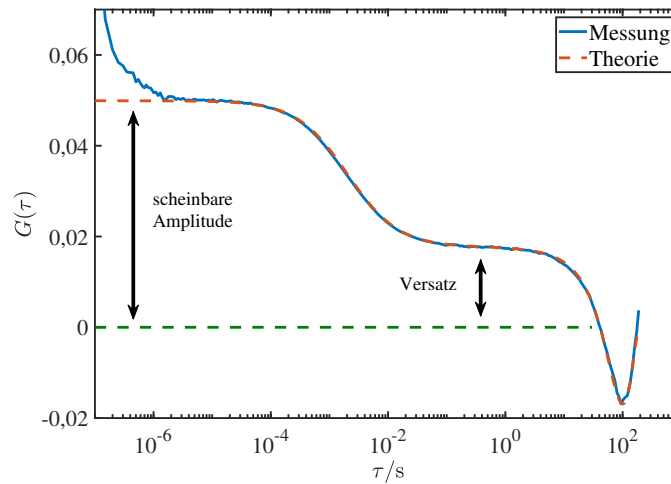


Abbildung 6.7.: Vergleich einer aus Filmwaagemessungen erhaltenen Korrelationskurve mit dem hier entwickelten theoretischen Modell für $\Delta t = 200$ s. Die scheinbare Amplitude $\hat{\mathfrak{A}}$ und der Versatz G_0 können nach Gl. 6.37 zur Berechnung der „wahren“ Teilchenzahl genutzt werden.

Fluorophore¹².

Die Berechnung der theoretischen Werte für $\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle$ und $\langle F_{(1,2)}(t) \rangle$ erfolgt nun wie gewohnt, während die Mittelungen über den Durchlauf nach folgendem Schema erfolgen:

$$\overline{f(t)} = \frac{1}{\Delta t - \tau} \int_{t_1}^{t_1 + \Delta t - \tau} f(t) dt. \quad (6.35)$$

Die entstehenden Formeln sind auch für den einfachsten Fall der freien Diffusion einer Komponente recht sperrig und in ihrer exakten Form für die weitere Arbeit nicht von Belang, weshalb hier nur ein beispielhafter Vergleich mit einem Fokusdurchlauf gezeigt werden soll (Abb. 6.7). Man erkennt den Versatz der Kurve nach oben und eine Mulde bei Korrelationszeiten im Bereich der Länge des Korrelationsfensters. Solange $v_M \tau_D \ll \omega_{z,PH}$ gewährleistet ist, kann eine scheinbare Amplitude $\hat{\mathfrak{A}}$ durch Anpassung der theoretischen Kurven für den Fall einer statischen Monoschicht nach Gl. 3.161 unter Berücksichtigung dieses Versatzes G_0 gewonnen und die „wahre“ Teilchenzahl $N_{\text{eff},0}$ daraus mithilfe von Korrekturfaktoren berechnet werden (hier wiederum für eine Komponente ohne photophysikalische Effekte und mit einem auf die Fokusmitte zentrierten Korrelationsfenster der axialen Ausdehnung relativ zum Fokusradius von $b_r = \Delta z / \omega_{z,PH} = v_M \tau_D / \omega_{z,PH}$, Abb. 6.8 zeigt ebenfalls die Abhängigkeit von der Mitte des

¹²Dies würde nicht passieren, wenn eine praktische Berechnung von $\overline{\langle \delta F_a(t) \cdot \delta F_b(t + \tau) \rangle}$ möglich wäre. Da sich die Fluktuationen aber auf zeitabhängige Mittelwerte $\langle F_{(a,b)}(t) \rangle$ beziehen, die nicht aus den Daten einer Durchlaufkurve ermittelt werden können, muss stattdessen der über das Korrelationsfenster gemittelte Wert $\overline{\langle F_{(a,b)}(t) \rangle}$ verwendet werden.

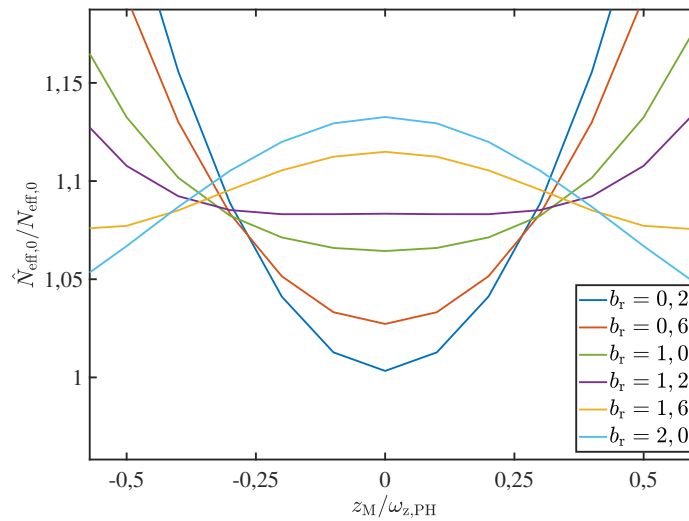


Abbildung 6.8.: Darstellung der Abhängigkeit des Verhältnisses von scheinbarer zu „wahrer“ Teilchenzahl bei der Verwendung langer Korrelationsfenster von seiner Ausdehnung $b_r = \Delta z/\omega_{z,\text{PH}}$ und der Position z_M der Monoschicht in dessen Mitte. Für einen Wert von $b_r \approx 1,2$ muss die genaue Lage des Fensters nur auf etwa ein Viertel des axialen Fokusradius' genau bekannt sein, um die erhaltene Teilchenzahl korrigieren zu können.

Korrelationsfensters in axialer Richtung):

$$\hat{N}_{\text{eff},0} = \frac{1}{\hat{\mathfrak{A}} - G_0} \quad (6.36)$$

$$\frac{\hat{N}_{\text{eff},0}}{N_{\text{eff},0}} = \frac{16(4 + b_r^2)^2 \left(\arctan \frac{b_r}{2}\right)^2}{b_r \left(40b_r + 6b_r^3 + 3(4 + b_r^2)^2 \arctan \frac{b_r}{2}\right)}. \quad (6.37)$$

Da der relative Fehler von $\hat{N}_{\text{eff},0}$ unter diesen Bedingungen weniger als 5% beträgt, solange $b_r < 0,85$ gilt¹³, kann ein sehr großer Anteil der Durchlaufkurve als Ganzes korreliert und ausgewertet werden, ohne eine sekundäre Auswertung anhand der oben besprochenen parabolischen Abhängigkeit der einzelnen N_{eff} vorzunehmen oder exakte Korrekturfaktoren zu ermitteln. Nachteilig ist hierbei allerdings zum einen die Voraussetzung einer bekannten MDF zur Herleitung von Gl. 6.37 (die genaue Form von Gl. 6.2 ist für das Auffinden des Minimums nicht zwingend erforderlich), zum anderen die Empfindlichkeit gegenüber Ausreißern, wie etwa sehr hellen Proteinaggregaten, welche vor der Korrelation aus der Kurve entfernt werden müssten, was wiederum den Zusammenhang zwischen $\hat{N}_{\text{eff},0}$ und $N_{\text{eff},0}$ verkomplizieren würde. Aus diesen Gründen wird im weiteren Verlauf die oben beschriebene Zerteilung und getrennte Auswertung der Durchlaufkurven angewandt.

¹³Für diese Breite eines zentrierten Korrelationsfensters ist die mittlere Helligkeit an den Rändern bereits auf weniger als 60% der des Maximums abgefallen. In den meisten Fällen ist eine Auswertung der Daten noch weiter in den Flanken der Durchlaufkurve aufgrund des stark zunehmenden Rauschens ohnehin nicht sinnvoll.

6.3. Experimente

6.3.1. Materialien

Der *Major-Minor-Mix* setzt sich aus acht verschiedenen Phospholipiden, die, zusammen mit den getrennt davon verwendeten zwei Phospholipiden 1,2-Dilauryl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DLPC) und 1,2-Dilauryl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serin (DLPS), jeweils von der Firma *Avanti Polar Lipids* (Alabaster, Alabama, USA) bezogen wurden, und Ergosterol, welches von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) bezogen wurde, zusammen. Die genauen Anteile an der Mischung sind in Tabelle 5.1 enthalten. Weiterhin wurden als Fluoreszenzfarbstoffe Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid von der Firma *Invitrogen* (Carlsbad, Kalifornien, USA), sowie ATTO 488 DOPE und ATTO 633 DOPE von der Firma *ATTO-TEC* (Siegen, Deutschland) verwendet. Das nicht-hydrolysierbare Nukleotidanalogen Guanosin-5'-[β,γ -imido]-triphosphat (GMP-PNP) wurde von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) bezogen.

Der HKM-Puffer setzt sich aus 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES, 20 mmol/L), Kaliumacetat (50 mmol/L) und Magnesiumchlorid (1,2 mmol/L) zusammen und wurde mit Kaliumhydroxid auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt. Die dabei verwendeten Salze sowie Chloroform wurden von der Firma *Carl Roth* (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

Das Protein Sar1p aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde wie in DAUM *et al.*, 2014 beschrieben synthetisiert und gereinigt. Die Variante Sar1p-S147C/C171S wurde gleichermaßen gewonnen und zusätzlich mit Alexa Fluor 488 C₅ Maleimid an dem einzigen Cystein-Rest fluoreszenzmarkiert (Details siehe AUERSWALD, 2020). Die Funktionalität der Proteine wurde mittels eines COPII-Komplex-Bindungstests (DAUM *et al.*, 2014) und eines Enzymaktivitätstests bestätigt. Die jeweilige Konzentration wurde durch UV-Absorptionsspektroskopie und BRADFORD-Tests (BRADFORD, 1976) bestimmt. Das BRADFORD-Reagenz wurde von der Firma *Sigma-Aldrich* (Schnelldorf, Deutschland) und das dabei als Proteinstandard verwendete Rinderserumalbumin (BSA) von der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

Als Immersionsmedium für das Mikroskopobjektiv wurde *Immersol W* von der Firma *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) eingesetzt.

Die verwendeten Deckgläser der Firma *Gerhard Menzel* (Braunschweig, Deutschland) besaßen die Stärke Nr. 1,5 und wiesen somit eine Dicke von im Mittel 170 μm auf.

Die Reinigungslösung *Hellmanex III* wurde von der Firma *Hellma* (Mühlheim, Deutschland) bezogen.

6.3.2. Geräte

Gasdichte Dosierspritzen wurden von der Firma *Hamilton* (Reno, Nevada, USA) bezogen.

Die UV-Absorptionsmessungen wurden an einem *Infinite M200 PRO* der Firma *Tecan* (Männedorf, Schweiz) durchgeführt.

Die LANGMUIRfilme wurden auf einer modifizierten Filmwaage des Herstellers *Nima Technology* (Coventry, UK) präpariert, welche aus einem Trog aus PTFE mit einer maximalen Fläche von

70 cm² zwischen zwei beweglichen Barrieren aus *Polyoxymathylen* (POM) besteht. Zur Messung der Oberflächenspannung kam ein Sensor mit einem WILHELMY-Plättchen zum Einsatz, der auf einer der Barrieren befestigt wurde. Die Subphase hatte ein Volumen von 30 mL und bestand aus HKM-Puffer mit GMP-PNP in einer Konzentration von 10 µmol/L. Der Trog wurde mit einem Thermostaten vom Typ *Alpha RA8* und das Objektiv zusätzlich mit einem Thermostaten vom Typ *Ecoline Staredition RE 107* der Firma *Lauda* (Lauda-Königshofen, Deutschland) gekühlt. Der Trog enthielt ein rundes Loch im Boden, das von einem Metallring umrahmt und von einem Deckglas der Stärke 1,5 der Firma *Menzel* (Braunschweig, Deutschland) mit dem UV-härtendem Exposedharz *Loctite 3201* der Firma *Henkel* (Braunschweig, Deutschland) verschlossen wurde. In den Bereichen links und rechts neben diesem Zugang für das Mikroskopobjektiv wurde jeweils ein Magnetrührer der Marke *Variomag Mini Rührer* der Firma *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, Massachusetts, USA) eingesetzt.

Alle FCS-Experimente wurden an einem Laserrastermikroskop der Marke *LSM 710* mit FCS-Funktionalität (*ConfoCor 3*) der Firma *Carl Zeiss* (Jena, Deutschland) durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit einem Argon-Ionenlaser der Wellenlänge 488 nm (Leistung hinter dem Objektiv 0,5 µW – 27,5 µW) und einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm (Leistung hinter dem Objektiv 0,25 µW – 0,8 µW), welche über einen dichroitischen Spiegel (Reflexion bei 488 nm, 561 nm und 633 nm) als Hauptstrahlteiler eingekoppelt wurden. Das Fluoreszenzlicht wurde durch dasselbe Objektiv (*LD C-Apochromat 40x* mit NA = 1,1) eingesammelt, über eine quadratische Lochblende (Durchmesser 43 µm) dessen Konfokalität sichergestellt und mittels eines dichroitischen Strahlteilers bei 635 nm aufgetrennt und über Farbfilter (zwei Bandpass-Filter von 505 nm bis 540 nm bzw. von 655 nm bis 710 nm) auf zwei Detektoren (APDs) geleitet. Die Filmwaage wurde auf dem Mikroskop montiert und zur Verlangsamung der Verdunstung der Subphase von einer Inkubationskammer von *Zeiss* umschlossen.

6.3.3. Präparation

Der *Major-Minor-Mix* wurde durch Vereinigen der entsprechenden Volumina der Lipide in chloroformischer Lösung mittels Glaspipetten und nachfolgendes Verdampfen des Lösungsmittels unter einem Stickstoffstrom hergestellt und bei –20 °C unter Argon aufbewahrt.

Vor jedem Experiment wurde der Filmwaagentrog mit *Hellmanex III* gereinigt und gründlich mit Reinstwasser gespült, bis der Druckanstieg nach Befüllung mit der Subphase bei Zusammenfahren der Barrieren weniger als 0,2 mN/m betrug. Anschließend wurde der Füllstand durch Abnehmen oder Hinzufügen von Puffer mittels einer Pipette auf die optimale Höhe über dem Deckglas eingestellt¹⁴, indem die vertikale Position des Objektivs anhand der Reflexion eines der Laser an der Deckglas-Wasser- und an der Wasser-Luft-Grenzfläche mit den Detektoren bestimmt wurde. Um ein Reißen des dünnen Wasserfilmes oberhalb des Deckglases zu verhindern, wurde vor dem Aufbringen der Lipide der Füllstand um zirka 500 µm erhöht.

¹⁴Diese wurde als der Punkt gewählt, an dem die Maxima der Helligkeitskurven beider Kanäle beim Fokusbereich einer zweifarbig markierten Monoschicht bei der gleichen Zeit auftreten und somit kein axialer Versatz des Fokus auftritt. Siehe hierzu AUERSWALD, 2020.

Zur Herstellung der LANGMUIRFilme wurde die gewünschte Lipidmischung in organischem Lösungsmittels (Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 nach Volumen) aufgenommen, in einigen Experimenten mit 0,005 % des fluoreszenzmarkierten Lipides ATTO 633 DOPE (Proteineinbau) bzw. 0,01 % oder 0,1 % ATTO 488 DOPE (RICS-Messungen) versetzt und mittels einer gasdichten Dosierspritze mit Gewindekolben auf der Subphase gespreitet. Nachdem das Lösungsmittel für mindestens 30 min verdunsten konnte, wurde der Film durch Schließen der Barrieren bis der gewünschte Druck wurde komprimiert und erneut die optimale Höhe eingestellt.

Für Einbauexperimente mit Protein wurde der so präparierte Film zunächst bei konstanter Fläche zwischen beiden Barrieren seitlich über den tieferen Teil des Troges gefahren und die Proteinlösung – Sar1p (20 nmol/L – 200 μ mol/L) mit variierenden Stoffmengenanteilen an markiertem Protein (0,08 % – 100 %) – mit einer Spritze unterhalb einer Barriere unter den Film injiziert. Anschließend wurde der Film wieder über dem Deckglas positioniert und durch Rühren eine homogene Verteilung des Proteins in der Subphase herbeigeführt. Die finale Konzentration an Sar1p betrug jeweils \approx 80 nmol/L.

6.3.4. Messungen

Die Messungen fanden bei einer Temperatur von 22°C statt und erfolgten zur Vermeidung von Vibrationen stets bei ausgeschaltetem Rührer. Durch laterale Bewegung des Films durch den Fokus mit den Barrieren wurde verschiedene Positionen innerhalb des Films angefahren und für jeden Fokusdurchlauf der Füllstand soweit erhöht, dass die Wasser-Luft-Grenzfläche etwas oberhalb des Laserfokus verlief. Während der FCS-Messung bewegte sich der Film durch die Verdunstung der Subphase durch den Fokus hindurch, was anhand der Fluoreszenzzählrate verfolgt werden konnte.

Die Autokorrelationskurven wurden mittels selbst verfasster Skripte (siehe Abschnitt 3.4.6) in dem Programm *MATLAB* der Firma *MathWorks* (Natick, Massachusetts, USA) berechnet und auf gleichem Wege die Anpassung der theoretischen Modelle vorgenommen. Dazu wurden die aufgenommenen Fluoreszenzzählraten in konsekutive Segmente der Länge 1 s unterteilt, einzeln korreliert und die Regression durchgeführt.

Die für die RICS-Auswertung vorgesehenen Bilder wurden mit einer Auflösung von 1024x1024 Bildpunkten, einer Verweilzeit pro Bildpunkt von $\tau_P = 0,41 \mu$ s (entsprechend einer Aufnahmedauer von zirka 1 s pro Bild) und einer Seitenlänge der Bildpunkte von $b = 5,2$ nm aufgenommen.

6.3.5. Theoretische Einbaufläche

Als Vergleich mit den experimentell ermittelten Einbauflächen wurden von ANDREA SCRIMA anhand publizierter Strukturen von Sar1p¹⁵ (PDB-Eintrag *1M2O*, siehe BERMAN *et al.*, 2000; BI *et al.*, 2002) bzw. Modellierung der amphipathischen Helix theoretische Flächen als Projektion

¹⁵Die Röntgenkristallstruktur enthält nicht die ersten 23 Aminosäuren, welche die amphipathische Helix bilden. Da sich diese bei Einbau in die Monoschicht aber sehr wahrscheinlich zwischen dem restlichen Protein und der Monoschicht befinden dürfte und dann nur wenig über die hier verwendete projizierte Fläche hinausragt, kann ihr Einfluss vernachlässigt werden.

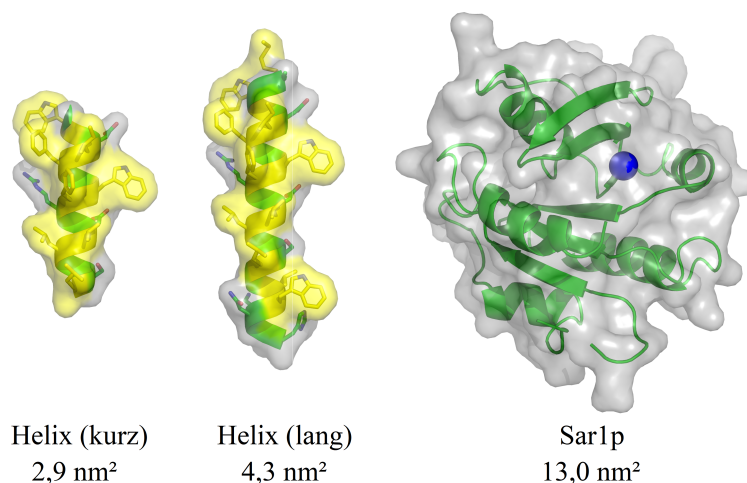


Abbildung 6.9.: Zur Berechnung der theoretisch erwarteten Einbaufläche von Sar1p und seiner amphipathischen Helix herangezogene Strukturen (lösungsmittelzugängliche Oberflächen in *PyMOL*). Für die Helix wurden zwei verschieden lange Abschnitte der Proteinsequenz in *Coot* modelliert (kurz: Aminosäuren 3-17, lang: Aminosäuren 1-23). Die Struktur des Gesamtproteins entstammt röntgenkristallographischen Messungen (PDB-Eintrag *1M2O*).

Struktur	$A_{\text{Einbau}} / \text{nm}^2$
amphipathische Helix (geknickt, Aminosäuren 3-17)	2,9
amphipathische Helix (gerade, Aminosäuren 1-23)	4,3
Sar1p (ohne Helix, Aminosäuren 24-190)	13,0

Tabelle 6.1.: Theoretische Einbauflächen von Sar1p und seiner amphipathischen Helix aus der Projektion der in *PyMOL* erstellten lösungsmittelzugänglichen Oberflächen. Die Struktur von Sar1p wurde dem PDB-Eintrag *1M2O* entnommen, die Helizes wurden in *Coot* modelliert.

der in dem Programm *PyMOL* der Firma *Schrödinger* (New York City, New York, USA) erstellten lösungsmittelzugänglichen Oberfläche (mit dem voreingestellten Sondenradius von 140 pm) in die angenommene Richtung der Wechselwirkung mit der Membran (die hydrophobe Seite der Helix bzw. für das Gesamtprotein siehe [SCHWIEGER et al., 2017](#)). Für die amphipathische Helix wurden verschiedene Längen verwendet, um die in der älteren (gerade Helix aus den *N*-terminalen Aminosäuren 1-23) und neueren Literatur (geknickte Helix mit den *N*-terminalen Aminosäuren 3-17 in der Membran) vertretenen Ansichten zu deren Form und Zusammensetzung widerzuspiegeln. Die in *PyMOL* verwendete Struktur der Helix wurde zuvor in dem Programm *Coot* ([EMSLEY et al., 2010](#)) aus der Aminosäuresequenz von Sar1p unter der Annahme einer α -helikalen Struktur erstellt und die Bindungswinkel unter Beachtung der geometrischen Randbedingungen angepasst. Die auf diese Art erhaltenen Strukturen sind in Abb. 6.9 abgebildet und die zugehörigen Werte für die Einbaufläche befinden sich in Tabelle 6.1.

6.4. Ergebnisse und Diskussion

6.4.1. Kalibrierung

Die RICS-Messungen an mit ATTO 488 DOPE markierten DLPC-Monoschichten wurden Bild für Bild mit Gl. 3.171 ausgewertet (siehe Abb. 6.10) und an die sich ergebenden (quadrierten) Werte des lateralen Fokusradius' eine parabolische Gleichung analog zu Gl. 6.2 angepasst. Aus den Ergebnissen von drei Durchlaufkurven von zwei verschiedenen markierten Filmen ergab sich für den Radius des grünen Fokus zunächst $\hat{\omega}_{xy,g} = (187 \pm 8)$ nm und damit schließlich $\hat{A}_g = (0,110 \pm 0,009)$ μm^2 .

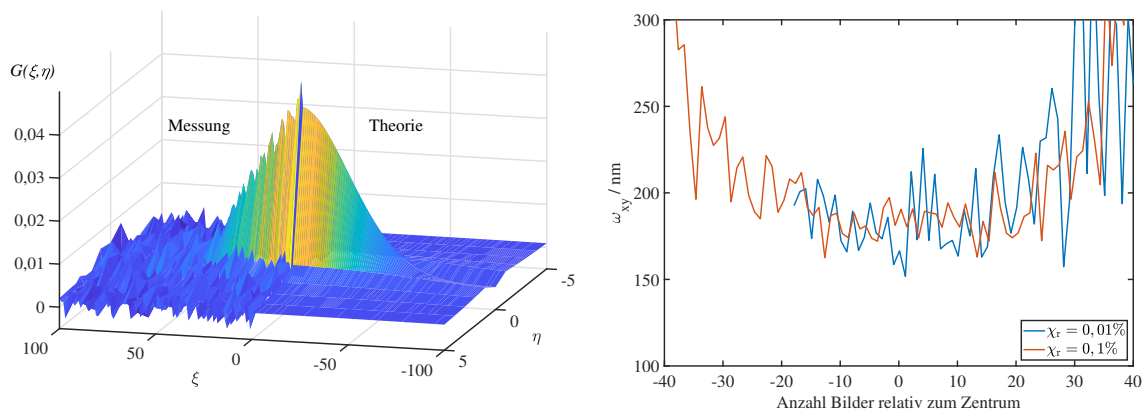


Abbildung 6.10.: Ergebnisse der RICS-Messungen an mit ATTO 488 DOPE markierten DLPC-Monoschichten zur Bestimmung der effektiven Fokusfläche des grünen Kanals.

Als Beispiel für die Anpassung der theoretischen Flächen aus Gl. 3.171 an die Messungen ist eine über zehn korrelierte Bilder gemittelte Autokorrelationsfunktion dargestellt (links, $\chi_r = 0,1\%$), wobei zur besseren Unterscheidbarkeit jeweils nur eine der (theoretisch symmetrischen) Hälften gezeigt wird. Die ξ -Achse entspricht der schnelleren Bewegung des Laserstrahls in einer Bildzeile, die η -Achse der langsameren Bewegung senkrecht dazu.

Der Fokusradius $\omega_{xy,g}$ zeigt beim Durchwandern der Monoschicht einen parabelförmigen Verlauf, dessen Minimum zur Abschätzung des „wahren“ Wertes $\hat{\omega}_{xy,g}$ dient. Hier dargestellt sind zwei Fokusradiusverläufe mit unterschiedlichem Markierungsgrad χ_r (rechts).

6.4.2. Experimentelle Einbauflächen

Hier wurden zuerst die Einbauflächen von teilweise fluoreszenzmarkiertem Sar1p in unmarkierten Lipidmonoschichten verschiedener Zusammensetzung bestimmt. Es ergab sich für eine Monoschicht aus gesättigten Lipiden (DLPC und DLPS im molaren Verhältnis 80:20, siehe Abb. 6.11) aus jeweils einer Messung an drei Filmpräparationen $\hat{A}_{\text{Einbau}} = (11,4 \pm 3,6)$ nm^2 . Dieser Wert liegt deutlich über der berechneten Querschnittsfläche der amphipathischen Helix ($A_{\text{Einbau}} \approx 2,9 \text{ nm}^2 - 4,3 \text{ nm}^2$, siehe Abschnitt 6.3.5) und spricht somit für den Einbau eines großen Teils des gesamten Proteins ($A_{\text{Einbau}} \approx 13,0 \text{ nm}^2$).

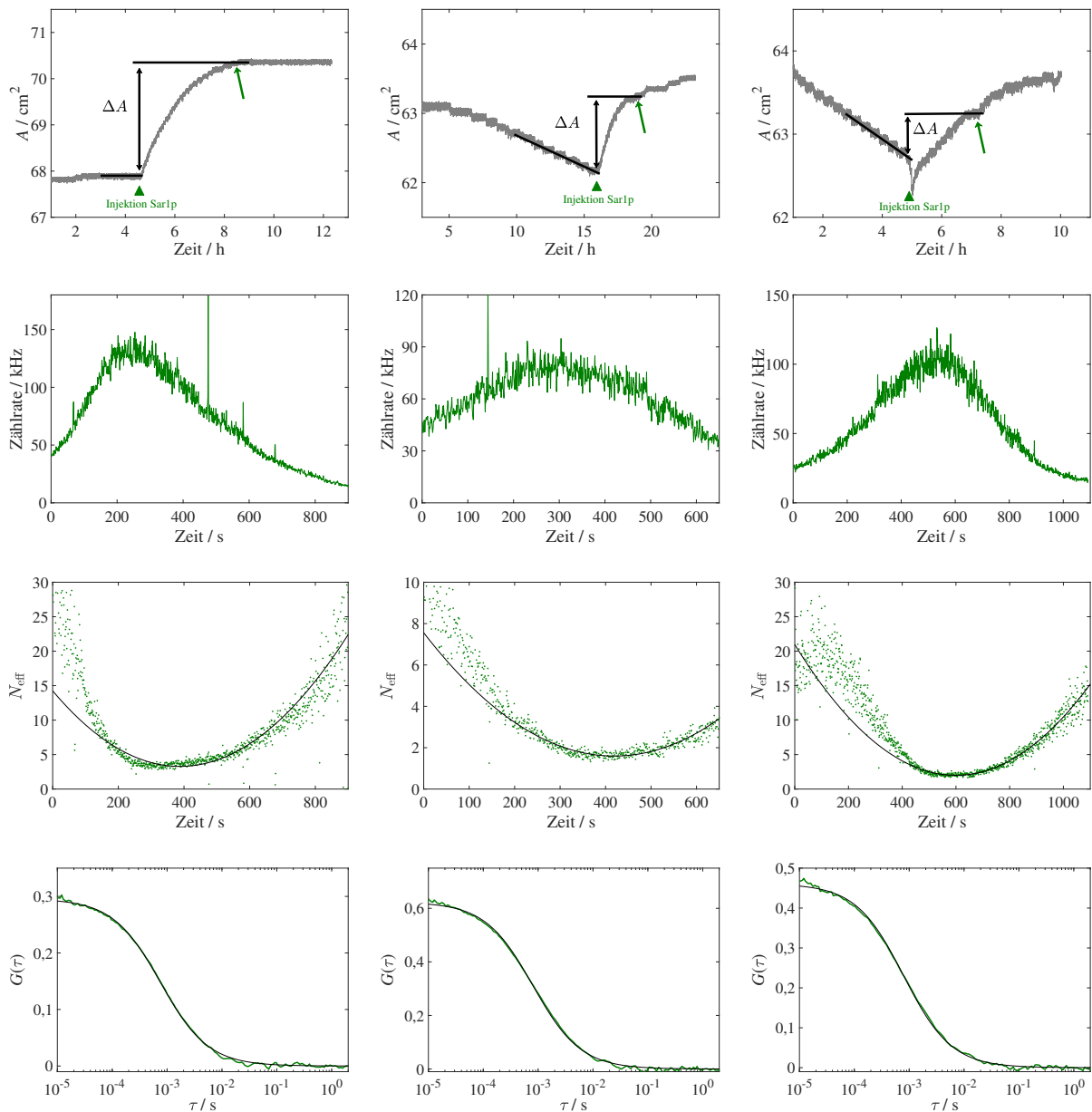


Abbildung 6.11.: Einbauexperimente mit Sar1p und unmarkierten Monoschichten aus gesättigten Lipiden (DLPC und DLPS im molaren Verhältnis 80:20). Jede Spalte stellt eine getrennt Präparation dar.

Erste Reihe: Makroskopische Filmfläche als Funktion der Zeit. Der Zeitpunkt der Injektion von Sar1p (grünes Dreieck) in die Subphase, der Zeitpunkt der FCS-Messungen (grüner Pfeil) und die zur weiteren Berechnung herangezogene Flächenänderung ΔA sind markiert.

Zweite Reihe: Fluoreszenzzählrate des markierten Sar1p während eines Fokusbereichs.

Dritte Reihe: Effektive Teilchenzahlen aus den mit einem Korrelationsfenster der Länge 1 s ausgewerteten FCS-Kurven (grün) und daran angepasste Parabel zur Bestimmung des Minimums (schwarz).

Vierte Reihe: Beispielhafte Korrelationskurven aus dem Zentrum der Durchlaufkurven (grün, zur Verminderung des Rauschens über 10 s) und daran angepasste theoretische Autokorrelationsfunktion nach Gl. 3.161 (schwarz).

Nachfolgend wurde auf gleiche Weise die Einbaufläche von Sar1p in eine *Major-Minor-Mix*-Monoschicht (siehe Abb. 6.12) aus vier Präparationen zu $\hat{A}_{\text{Einbau}} = (4,1 \pm 2,2) \text{ nm}^2$ bestimmt¹⁶. Dieser Wert ist deutlich kleiner als der für DLPC/DLPS-Monoschichten erhaltene und liegt im Bereich der erwarteten Fläche bei alleinigem Einbau der amphipathischen Helix. Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass Sar1p unter Einlagerung seiner amphipathischen Helix in die proximale Halbschicht einer Membran bindet (HUANG *et al.*, 2001). Dies konnte zwischenzeitlich auch in einer aus Kryo-TEM-Messungen gewonnenen Struktur gezeigt werden (HUTCHINGS *et al.*, 2018).

Ein möglicher Grund für die verringerte Einbaufläche in *Major-Minor-Mix*-Monoschichten ist deren hoher Gehalt an Ergosterol, welches die Fluidität des Films durch Verringerung des freien Volumens reduziert (siehe ALMEIDA *et al.*, 1992b sowie Abschnitt 6.4.5) und eine energetische Hürde beim Einbau des ganzen Proteins darstellen könnte. Aufgrund der im Vergleich deutlich kürzeren hydrophoben Schwänze in den DLPC/DLPS-Monoschichten und dem Fehlen von Sterolen kann auch vermutet werden, dass Sar1p beim Einbau in diese bis zur Wasser-Luft-Grenzfläche vordringt¹⁷ und somit eine größere Fläche einnimmt. Eine starke Änderung der Einbaufläche von Proteinen bei Veränderung der Zusammensetzung oder des Druckes der Monoschicht wurde auch in früheren Arbeiten bereits beobachtet, siehe DOMÈNECH *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2011b.

Um die Genauigkeit der Messungen zu steigern sowie die Abhängigkeit von makroskopisch bestimmten Flächen zu beseitigen, wurde eine neue Methode zur Berechnung der Größe ΔA allein aus Fluoreszenz des Films eingeführt. Hierzu werden einzubauendes Protein und Lipidfilm jeweils mit Fluorophoren verschiedener Emissionswellenlängen markiert und die effektiven Teilchenzahlen in beiden Kanälen mittels FCS bestimmt¹⁸. Dabei wurden Messungen an verschiedenen Stellen innerhalb der Monoschicht vorgenommen, um einen Einfluss möglicher räumlicher Heterogenitäten zu eliminieren. Die dazu nötige Bewegung des Filmes mittels der Barrieren führte zu merklichen Verlusten an Filmfläche, welche unter der Annahme nicht-selektiven Lipidverlustes die hier vorgestellte Auswertungsmethode nicht beeinflussen. Die Berechnung der Einbaufläche erfolgt schließlich über Gl. 6.8.

Die mit dieser Methode aus drei Präparationen (siehe Abb. 6.13) nach Gl. 6.8 erhaltene Einbaufläche von Sar1p in eine *Major-Minor-Mix*-Monoschicht stimmt mit $\hat{A}_{\text{Einbau}} = (3,4 \pm 0,8) \text{ nm}^2$ im Rahmen der Unsicherheit gut mit dem aus der makroskopischen Fläche erhaltenen Fläche überein und bestärkt die Vorstellung eines alleinigen Einbaus der amphipathischen Helix.

¹⁶Hierbei wurden im Unterschied zu den vorgenannten Messungen für einen einzelnen Film teilweise mehrere Durchlaufkurven aufgenommen und die daraus berechneten Einbauflächen als Wert für diese Präparation gemittelt.

¹⁷Die hohe Affinität zu dieser wurde bereits in SCHWIEGER *et al.*, 2017 gezeigt.

¹⁸Eine Interaktion kann dabei zusätzlich über dcFCCS-Experimente ermittelt werden, was hier jedoch aufgrund des geringen Markierungsgrades weder möglich noch angestrebt war: Die Kreuzkorrelationsamplitude ist proportional zum Erwartungswert des Produkts der Anzahl der Fluorophore beider Farben in einem hypothetischen Molekülaggregate, welches als Einheit durch den Fokus diffundiert. Bei einem sehr geringem Markierungsgrad wird nur ein winziger Bruchteil dieser Aggregate in beiden Farben emittieren und damit zur Korrelation beitragen.

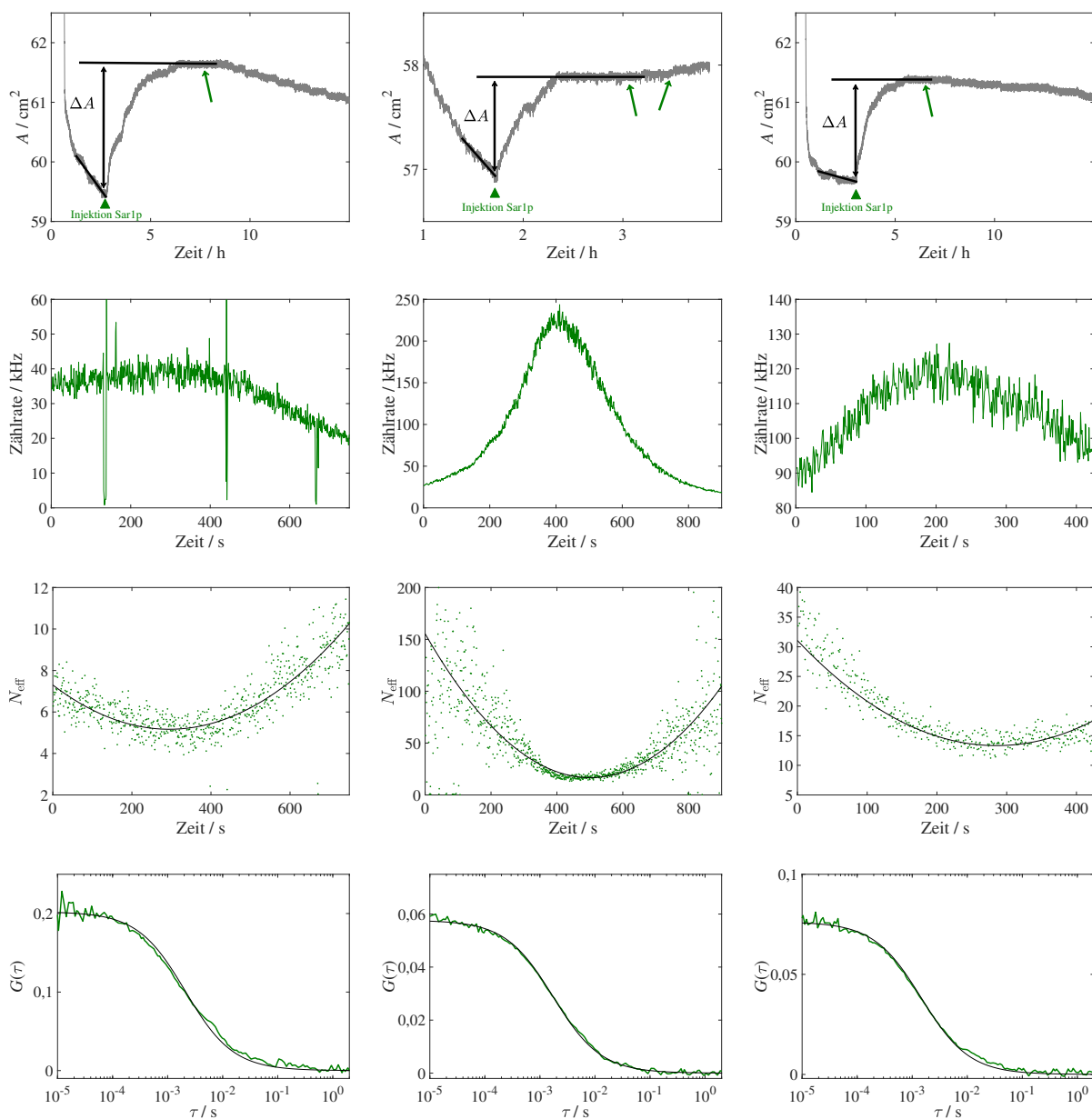


Abbildung 6.12.: Einbauexperimente mit Sar1p und unmarkierten Monoschichten aus *Major-Minor-Mix*. Details wie in Abb. 6.11. Die entsprechenden Kurven der zweiten FCS-Messung der Präparation in der zweiten Spalte sowie jene der vierten Präparation sind im Anhang B.1 bzw. B.2 zu finden.

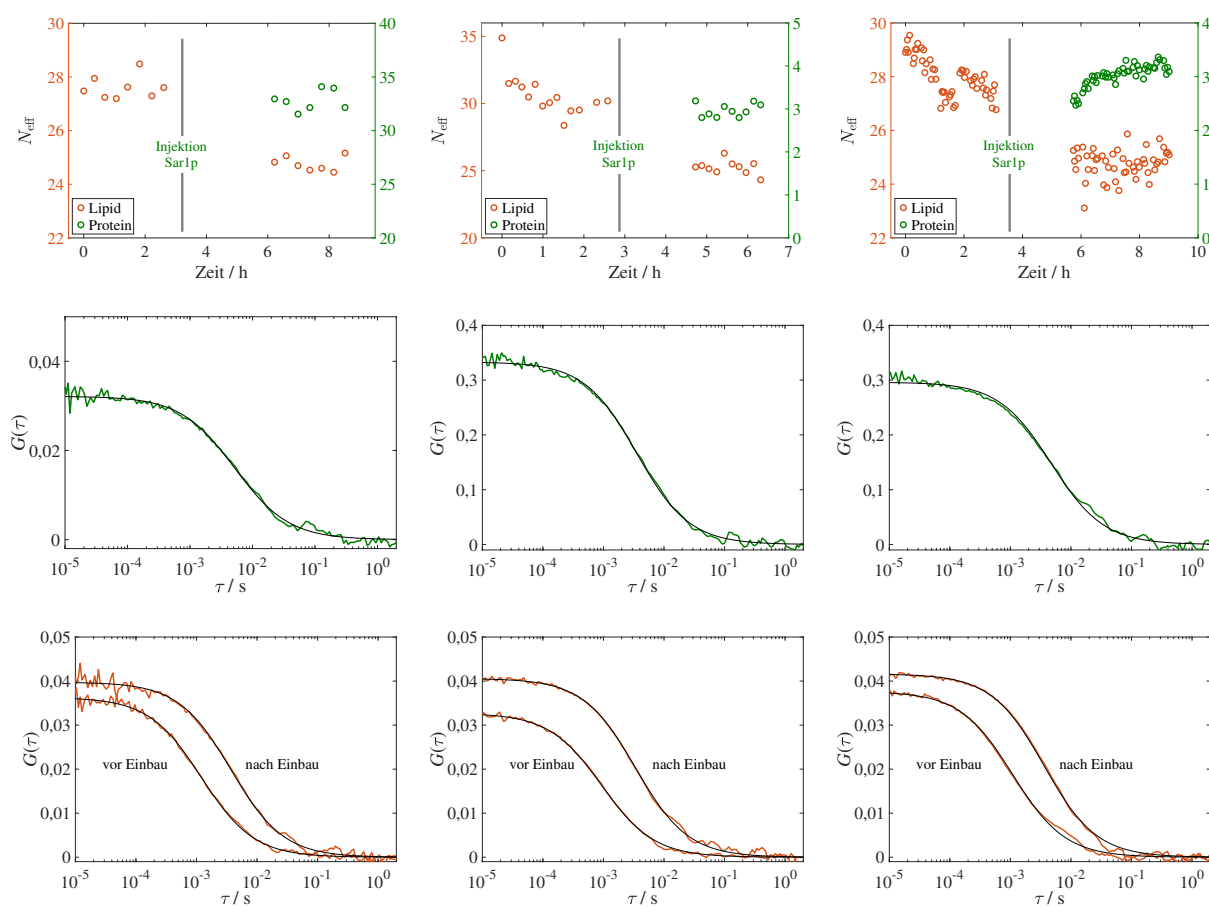


Abbildung 6.13.: Einbauexperimente mit Sar1p und rot markierten Monoschichten aus *Major-Minor-Mix*. Jede Spalte stellt eine getrennt Präparation dar.

Erste Reihe: Als Minimum über die einzelnen Durchlaufkurven bestimmten effektiven Teilchenzahlen der markierten Lipid- und Proteinmoleküle. Der Zeitpunkt der Injektion von Sar1p (grauer Balken) in die Subphase ist markiert. Die Teilchenzahlen der Lipide verringern sich nachfolgend durch die von in die Monoschicht eingelagertem Protein beanspruchten Fläche.

Zweite Reihe: Beispielhafte Korrelationskurven des grünen Kanals aus dem Zentrum der Durchlaufkurven (grün, zur Verminderung des Rauschens über 10 s) und daran angepasste theoretische Autokorrelationsfunktion nach Gl. 3.161 (schwarz).

Dritte Reihe: Beispielhafte Korrelationskurven des roten Kanals vor und nach Einbau von Sar1p aus dem Zentrum der Durchlaufkurven (rot, zur Verminderung des Rauschens über 10 s) und daran angepasste theoretische Autokorrelationsfunktion nach Gl. 3.161 (schwarz). Man erkennt gut die Verlangsamung der Diffusion (Verschiebung der Kurve zu größeren Zeiten) und die Verringerung der Flächendichte (höhere Amplitude entsprechend einer kleineren Teilchenzahl) der Lipide durch das eingelagerte Protein.

6.4.3. Unsicherheit der Einbauflächen

Beide hier vorgestellte Herangehensweisen der Flächenbestimmung erfordern eine gewisse Mindestmenge an eingebautem Protein: Je weniger Protein eingebaut ist und je kleiner dessen Einbaufäche ist, desto kleiner ist das Meßsignal und desto schwieriger die genaue Bestimmung.

Die Filmwaagenfläche ist, gerade bei fehlender Stabilität des Films, in dem hier verwendeten Aufbau nur auf wenig genauer als $0,1 \text{ cm}^2$ bzw. $\approx 0,2\%$ zu bestimmen. Ein schmalerer Trog zusammen mit einem größeren Film könnte die erreichbare Genauigkeit der Einbaufläche hier deutlich steigern, da so die absolute Bewegung der Barrieren beim Proteineinbau vergrößert wird. Die Bestimmung aus FCS-Messungen der markierten Lipide hingegen ist unabhängig von der Ausdehnung des Filmes und nur über das Signal-Rausch-Verhältnis der Messung selbst zu beeinflussen. Die Aufnahme einer größeren Zahl von Durchlaufkurven verringert durch Mittelung die Varianz der Teilchenzahlen und ergab in den hier vorgestellten Arbeiten im besten Fall einen Variationskoeffizienten des Mittelwertes von $\approx 0,3\%$.

Da die berechnete Einbaufläche proportional zur relativen Flächenänderung

$$A_{\text{Einbau}} = \frac{\Delta A}{A_2} \frac{A_{\text{Fokus}}}{N_{\text{Fokus}}} \quad (6.38)$$

bzw. zur relativen Änderung der Teilchenzahl

$$A_{\text{Einbau}} = \frac{\Delta N}{N_1} \frac{A_{\text{Fokus}}}{N_{\text{Fokus}}} \quad (6.39)$$

ist, wird, aufgrund der hier sehr geringen relativen Änderungen, die relative Unsicherheit der Einbaufläche von der dieser Änderungen dominiert und deutlich größer als jene:

$$\frac{\sigma(A_{\text{Einbau}})}{A_{\text{Einbau}}} \approx \frac{\sqrt{A_1^2 + A_2^2}}{\Delta A} \frac{\sigma(A)}{A} \approx 40 \cdot \frac{\sigma(A)}{A} \approx 8\% \quad (6.40)$$

$$\frac{\sigma(A_{\text{Einbau}})}{A_{\text{Einbau}}} \approx \frac{\sqrt{N_1^2 + N_2^2}}{\Delta N} \frac{\sigma(N)}{N} \approx 10 \cdot \frac{\sigma(N)}{N} \approx 3\%. \quad (6.41)$$

6.4.4. Einfluss der Subphase

Eine Schwierigkeit bei der Auswertung der Messreihe mit einer DLPC/DLPS-Monoschicht war die geringe Menge Protein, die im Gleichgewicht in die Monoschicht eingebaut wurde. Dadurch verblieb ein großer Teil des eingesetzten Proteins in der Subphase und beeinflusste durch seine Fluoreszenz das Experiment. Dies ist deutlich erkennbar an der starken Abweichung der Parabelform der effektiven Teilchenzahlen beim Durchlauf durch den Fokus (siehe Abb. 6.11, dritte Reihe), sowie an der nicht zu vernachlässigenden Helligkeit in der Subphase.

Entsprechend Gl. 6.27 wurden die Helligkeiten bei Lage des Fokus in der Monoschicht und tief in der Subphase verwendet, um den Einfluss auf die Korrelationskurven abzuschätzen. Mit einer Zählrate von zirka 130 kHz bzw. zirka 10 kHz, sowie der Annahme gleicher molekularer Helligkeiten $\zeta_M = 1$, ergibt sich ein relativer Anteil der Subphasenteilchen an der Amplitude von $\approx 1,5\%$ und damit ein vernachlässigbarer Einfluss auf unsere Ergebnisse.

Zur Kontrolle wurden die einzelnen Autokorrelationskurven zusätzlich mit einem Zweikomponentenmodell ausgewertet (Kombination von Gl. 3.107, 3.157 und 3.161), was zu einer etwas geringeren Teilchenzahl der membrangebundenen Fraktion und damit zu einer größeren Fläche

von $\hat{A}_{\text{Einbau}} = (15,5 \pm 4,0) \text{ nm}^2$ führte. Dieses Ergebnis deutet somit ebenfalls auf den Einbau des gesamten Proteins hin. Der Unterschied zu der oben genannten Einbaufläche ist deutlich größer als der nach der Abschätzung mittels Gl. 6.27 erwartete Wert, was vor allem an der generellen Schwierigkeit der Anpassung eines Mehrkomponentenmodells an nicht völlig rauschfreie FCS-Kurven sowie der gerade zur Mitte der Durchlaufkurve hin abnehmenden Helligkeit der Teilchen der Subphase liegen dürfte.

Um die Stabilität der Regression zu verbessern, wurde die Diffusionszeit der nicht an die Monoschicht gebundenen Proteine auf den Wert festgesetzt, der mit einem Einkomponentenmodell bei Positionierung des Fokus tief in der Subphase erhalten wurde. Dieses Modell ist korrekterweise nicht auf den vorliegenden Fall anwendbar, da es die freie Diffusion einer Komponente in allen Richtungen voraussetzt, während die Teilchen der Subphase sich nur in einem Halbraum aufhalten können. Dies führt allerdings zu einer nicht mehr analytisch lösbaren Differentialgleichung und würde eine numerische Berechnung der anzupassenden FCS-Kurven nötig machen (FRADIN *et al.*, 2003). Zusätzlich müsste in dem Regressionsmodell auch die selbst bei $\zeta_M = 1$ ungleiche effektive molekulare Helligkeit in Betracht gezogen werden: Die Helligkeit der Monoschicht nimmt in dem Maße ab, wie die ihr zugeordnete effektive Teilchenzahl zunimmt. Da der Zähler von Gl. 3.107 jedoch nicht allein vom Produkt beider Größen abhängt, muss diese Veränderung analog zu Gl. 6.18 explizit und unter Kenntnis der exakten Lage der Monoschicht berücksichtigt werden. Da hier eher die Teilchenzahl als die (zwischen 2D- und 3D-Phasen ohnehin schwer vergleichbare) Konzentration interessiert, können jene über Gl. 3.98 ersetzt und die verschiedenen $\Omega_{(1,2)}^{(A,V^-)}$ zu dimensionslosen Größen zusammengefasst werden, wodurch man schließlich für die Amplituden

$$\mathfrak{A}_{3D} = \frac{N_{\text{eff},3D} (\Phi_2/\Phi_1)^2}{(N_{\text{eff},3D}\Phi_2/\Phi_1 + N_{\text{eff},2D}\zeta_M)^2} \quad (6.42)$$

$$\mathfrak{A}_{2D} = \frac{N_{\text{eff},2D}\zeta_M^2}{(N_{\text{eff},3D}\Phi_2/\Phi_1 + N_{\text{eff},2D}\zeta_M)^2} \quad (6.43)$$

erhält. Hierbei ist zu beachten, dass die Teilchenzahlen positionsabhängig sind und nur für $z_M \rightarrow \infty$ (Subphase) bzw. $z_M = 0$ (Monoschicht) ihren jeweiligen „wahren“ Werten entsprechen. Ein weit extremeres, und damit besser auswertbares, Beispiel ist in Abb. 6.14 dargestellt. Hier wurde eine DLPC/DLPS-Monoschicht auf $\Pi = 35 \text{ mN/m}$ komprimiert, sodass sich kaum noch Proteine einbauen und ein erheblicher Anteil in der Subphase verbleibt, deren Helligkeit etwa halb so hoch ist wie das Maximum auf der Durchlaufkurve. Man erkennt ebenfalls gut, dass die Maxima der Helligkeit und der Amplitude der Teilchen in der Monoschicht nicht länger zusammenfallen.

6.4.5. Diffusionskoeffizienten

Die durchgeführten FCS-Messungen erbrachten zusätzlich zu den für die Berechnung der Einbauflächen benötigten Teilchenzahlen auch die Diffusionszeiten der in die Monoschicht eingebauten Proteine, sowie die der fluoreszenzmarkierten Lipidanaloga.

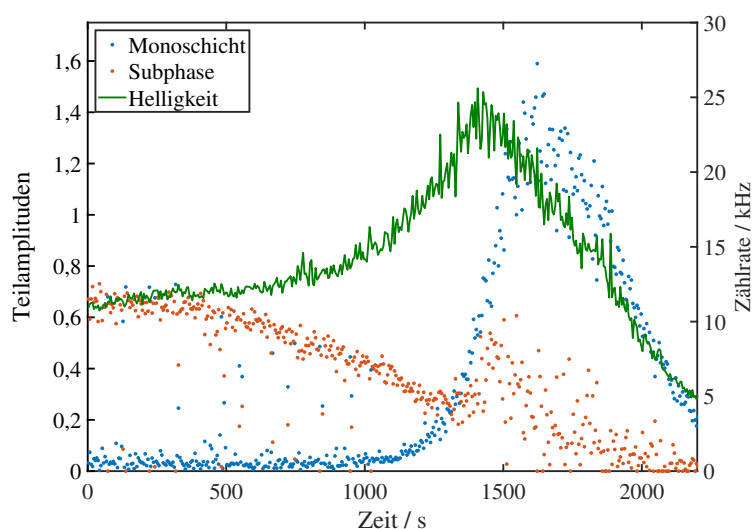


Abbildung 6.14.: Darstellung der Fluoreszenzzählrate und der aus einem Zweikomponentenmodell erhaltenen Teilamplituden für in der Subphase bzw. an der Monoschicht diffundierende fluoreszenzmarkierte Sar1p-Moleküle über einen Fokusbereich einer DLPC/DLPS-Monoschicht. Aufgrund des hohen Oberflächendrucks von $\Pi = 35 \text{ mN/m}$ baut sich nur ein kleiner Teil der Proteine in die Monoschicht ein, sodass die Helligkeit beider Phasen vergleichbar ist. Bei dem vorliegenden starken Einfluss der Subphase fallen die Maxima der Helligkeit und des Beitrages der Monoschicht zur Amplitude der Korrelationskurve nicht länger zusammen.

Wie oben bereits angeführt, sind die aus *Major-Minor-Mix* aufgebauten Filme weniger fluide, was sich in einer mindestens doppelt so großen Diffusionszeit von an diese gebundenem Sar1p im Vergleich zu DLPC/DLPS-Monoschichten zeigt: Mit den Werten aus Abschnitt 6.4.1 ergeben sich damit Diffusionskoeffizienten von $D_{\text{Sar1p}} = 2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1} - 5,4 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bzw. $D_{\text{Sar1p}} = 12 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Die große Spanne in *Major-Minor-Mix*-Monoschichten ergibt sich aus der ausgeprägten Abhängigkeit von der Dichte gebundenen Proteins in dem Film.

Der Einbau von Protein behindert zudem die Diffusion der Lipide innerhalb der Monoschicht, was sich in einem sehr starken Anstieg der Diffusionszeit¹⁹ bemerkbar macht ($\tau_{\text{D,Lipid}} \approx 1,1 \text{ ms}$ vor bzw. $\tau_{\text{D,Lipid}} \approx 3,4 \text{ ms}$ nach Einbau). Dies deutet auf eine Wirkung der Sar1p-Moleküle als bewegliche Diffusionshindernisse hin, wie sie z. B. von SAXTON, 1987 beschrieben wird.

Der sich aus der jeweiligen Einbaufläche und der Teilchenzahl ergebende von Protein bedeckte Anteil der Filmfläche beträgt hierbei $\approx 10\% - 18\%$; das Lipid-zu-Protein-Verhältnis der Monoschicht liegt bei ca. 35 – 50. Die relative Reduktion der Diffusionsgeschwindigkeit fügt sich damit gut in die von BLACKWELL *et al.*, 1990 für verschiedene in Vesikel eingebaute Proteine mit Transmembranhelices gegebenen Werte für diesen Flächenanteil ein²⁰. Theoretische Model-

¹⁹Die gegebenen Werte gelten für *Major-Minor-Mix*-Monoschichten, da nur diese fluoreszenzmarkiert wurden. Zudem entsprechen diese Messungen denjenigen, mit der langsamsten Proteindiffusion und der höchsten Teilchenzahl eingebaute Proteine unter allen *Major-Minor-Mix*-Experimenten. Auf eine Umrechnung auf Diffusionskoeffizienten wurde in Ermangelung an verlässlichen RICS-Messungen im roten Kanal verzichtet.

²⁰Eine Schwierigkeit bei dem Vergleich von Diffusionskoeffizienten in Monoschichten mit der Literatur stellt die große Diskrepanz zwischen den verschiedenen Methoden dar: Die mittels FCS und FRAP gewonnenen

lierungen von SAXTON, 1987 wiederum ließen, gerade eingedenk der im Vergleich zu den Lipiden in derselben Größenordnung liegenden Beweglichkeit von Sar1p, deutlich geringere Effekte auf die Lipiddiffusion erwarten (Reduktion des Diffusionskoeffizienten um ca. 30 %).

Obgleich diese Abweichungen durch die vergleichsweise simplen Simulation erklärt werden könnten (neuere Arbeiten weisen teilweise größere Effekte auf, siehe etwa GUIGAS *et al.*, 2016), eröffnet die Berücksichtigung des Einflusses von eingebautem Protein auf die Lipide über seine unmittelbare Wirkung als „harte Scheibe“ in der Membran hinaus einen alternativen Erklärungsansatz: Die sich unmittelbar um die amphipathische Helix befindlichen Lipide erfahren eine Wechselwirkung (etwa elektrostatischer Natur), die ihren Ordnungsgrad und ihre Dichte erhöht und damit ihre Beweglichkeit verringert. Der beobachtete Diffusionskoeffizient ist damit eine Überlagerung von Beiträgen „freier“ Lipide, die zwischen den Proteininseln diffundieren, und solchen, die – mehr oder weniger locker – an diese gebunden sind. Das entsprechende Modell von ALMEIDA *et al.*, 1992a erfordert für den hier vorliegenden Fall einen Einflussbereich weit größer als die Einbaufäche selbst. Da Sar1p bei Einbau seiner Helix den Lipidkopfgruppen gezwungenermaßen nahekommt und seine projizierte Fläche (siehe Tabelle 6.1) rund 13 nm² beträgt, erscheint diese Interpretation durchaus plausibel.

6.4.6. Vergleich anderer Messmethoden

Im Gegensatz zur Einbautiefe, also der Position eines Proteins entlang der Membrannormale, welche durchaus häufig Thema der Forschung ist (siehe LONDON *et al.*, 2002; SU *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2013 sowie die darin enthaltenen Referenzen), wurde bisher die Einbaufäche nur sporadisch untersucht (SEELIG *et al.*, 1996; SHANK-RETZLAFF *et al.*, 1998; GIRARD-EGROT *et al.*, 2004; DOMÈNECH *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2011b). Die Gründe dafür sind wohl zweierlei: zum einen die seltene Anwendung des Konzeptes generell für biologische und biochemische Betrachtungen, zum anderen die durchaus beträchtlichen technischen Hürden, die es dabei zu überwinden gilt²¹.

Die bisher angewandten Methoden zur Bestimmung der Einbaufäche stützen sich auf jeweils verschiedene Annahmen und Prozeduren, die alle ihre eigenen Einschränkungen zur Folge haben: Sei dies die Gültigkeit der GIBBS-Isotherme für die Konzentrationsabhängigkeit des Oberflächendruckes (SHANK-RETZLAFF *et al.*, 1998), die Messung der Flächenänderung bei verschiedenen

Werten liegen mindestens eine Größenordnung über jenen aus SPT-Untersuchungen. Beispielsweise findet man für DMPC (1,2-Dimyristyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) bei $\Pi = 30 \text{ mN/m}$ mit FCS $D = 16 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (GUDMAND *et al.*, 2009) und mit SPT $D = 0,3 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ (KE *et al.*, 2001). Aufgrund der bei Doppelschichten übereinstimmenden Diffusionskoeffizienten zwischen der verschiedenen Techniken gehen GUDMAND *et al.*, 2009 von einer systematischen Unterschätzung aufseiten der SPT-Literatur aus.

Die von BLACKWELL *et al.*, 1990 verwendete Methode nutzt die in Abhängigkeit der Diffusion zueinander verschieden effiziente Fluoreszenzlöschung eines Fluorophors durch ein weiteres Molekül in der Membran aus. Die Autoren verweisen selbst auf systematische Unterschiede zu FRAP-Messungen, wobei die die Abhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von der Proteindichte der Membran im Gegensatz zu ihren absoluten Werten nicht notwendigerweise von diesen Differenzen betroffen sein müssen.

²¹Die reproduzierbare Präparation stabiler Monoschichten unter hohem Oberflächendruck sowie die Bereitstellung konstanter Mengen möglichst gleich verteilten Proteins in der Subphase erfordern, gerade in Hinblick auf die ausgeprägte Empfindlichkeit von Filmwaagesystemen gegenüber Verunreinigungen, ein hohes Maß an experimenteller Fertigkeit und Erfahrung.

Oberflächendrücken (SEELIG *et al.*, 1996), die vollständige Bindungen aller in die Subphase injizierten Liganden an die Monoschicht (GIRARD-EGROT *et al.*, 2004) oder den Transfer des Filmes in einen weiteren Messapparat zur Bestimmung seiner Zusammensetzung (HUANG *et al.*, 2011b). Der hier vorgestellte Ansatz macht sich nun wiederum die besonderen Eigenschaften der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie zunutze und weist gegenüber den in der Literatur zu findenden einige deutliche Vorteile auf:

Messung im Gleichgewicht Der Film wird nicht transferiert, sondern *in situ* analysiert: Abgesehen von der Anregung von Fluorophoren findet keinerlei Manipulation des Filmes statt. Gerade wenn reversible Vorgänge betrachtet werden, deren Gleichgewichtslage sich durch Veränderungen der intensiven Variablen des Systems verschieben kann, können auf diese Weise Verzerrungen der Messwerte vermieden werden.

Orts- und Zeitauflösung Die Einbaufläche kann lokal bestimmt und im Zeitverlauf verfolgt werden, z. B. zur Untersuchung von phasenseparierten Membranen oder Entfaltungskinetiken integraler Membranproteine. Die Ortsauflösung wird allein durch die Mikroskopoptik bestimmt²², bei dem hier verwendeten konfokalen Aufbau also rund 0,25 µm. Die Zeitaufklärung ist begrenzt durch die Messdauer, welche für eine statistisch hinreichend genaue Bestimmung der FCS-Parameter vonnöten ist, und damit abhängig von der Anzahl und molekularen Helligkeit der fluoreszenten Teilchen²³.

Erweiterte Analysen Neben der reinen Einbaufläche sind zugleich weitere Parameter der Analyse zugänglich, wie etwa Diffusionseigenschaften, Konzentrationen, photophysikalische Eigenschaften oder Aggregationsverhalten. Bei Markierung der Membran kann mittels dcFCCS weiterhin die Interaktion zwischen dieser und dem eingebauten oder adsorbierten Protein bestimmt werden, beispielsweise zur Untersuchung spezifischer Wechselwirkungen mit einzelnen Lipidbestandteilen oder Membranproteinen.

Quantifizierung des Proteins Es müssen keine Annahmen über die Menge des eingebauten Proteins getroffen werden, da diese mittels FCS bestimmt wird. Dies ermöglicht des Weiteren auch die Bestimmung der Affinität des Proteins zur Monoschicht, ähnlich der Herangehensweise in Kapitel 5.

6.4.7. Eigener Beitrag

Der Autor programmierte den verwendeten FCS-Korrelator und wirkte an der Entwicklung der Auswertungsmethodologie, der Datenanalyse, der Durchführung von Kalibriermessungen und der Publikation der Ergebnisse (in Begutachtung, Vorveröffentlichung siehe AUERSWALD *et al.*, 2020) in einer Fachzeitschrift mit.

²²Hierbei wird in erster Näherung die Eigenbewegung des Filmes vernachlässigt, welche bei fortwährender Kompression zur Aufrechterhaltung des Oberflächendruckes durchaus erheblich sein kann.

²³Eine Erhöhung der Zeitaufklärung kann theoretisch durch kontinuierliche Messung an einem, im Gegensatz zu dem weiter oben beschriebenen Verfahren, exakt im Laserfokus „festgehaltenen“ Film erreicht werden. Dies erfordert allerdings entweder eine extrem genaue Nachführung von Film oder Objektiv (mindestens eine Größenordnung unterhalb der axialen Fokausausdehnung), oder aber einen völlig konstanten Wasserstand und Abwesenheit von Schwingungen.

Teil III.

Abschluss

7. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Anwendung und Weiterentwicklung von Fluoreszenzfluktuationstechniken zur Untersuchung der Wechselwirkung von Proteinen mit Phospholipidmembranen, sowohl ihre Bindung an Lipiddoppelschichten als auch ihr Einbau in Lipidmonoschichten. Dazu wurde ein umfassendes Rahmenwerk von theoretischen Grundlagen an die spezifische Problemstellung angepasst und diese – besonders in Hinblick auf die Auswertung von Titrationsexperimenten – fortgeführt und wesentlich erweitert. Um eine effiziente und an die Erfordernisse der jeweiligen Experimente flexibel anpassbare Auswertung der Fluoreszenzdaten zu gewährleisten, wurde zudem ein Software-Korrelator nach dem *multiple tau*-Prinzip programmiert und Skripte für die weitere Verwendung bei Bindungs- und Einbauexperimenten bereitgestellt.

Die Grundlage für eine quantitative Auswertung von dcFCCS-Messungen ist eine akkurate Bestimmung nicht nur der Form und Größe des Fokusvolumens aller beteiligten Kanäle, sondern auch des Ausmaßes ihrer Überlappung, ausgedrückt als Qualitätsfaktor, welcher hier die maximal erreichbare relative Kreuzkorrelationsamplitude im Vergleich zu einem idealen System beschreibt. Dieses Maß wurde theoretisch definiert und eine einfach herstellbare und verlässliche Standardprobe zu dessen Bestimmung entwickelt. Kleine unilamellare Lipidvesikel wurden mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert und ihre Korrelationsamplituden mit den erwarteten Werten verglichen, um für mehrere Mikroskopobjektive den jeweiligen Qualitätsfaktor zu ermitteln. Mögliche Abweichungen, etwa verursacht durch die stochastische Verteilung der Fluorophore über die Vesikel, deren endliche Ausdehnung im Vergleich zur Fokusgröße und ihre präparationsbedingte Polydispersität, wurden besprochen und dafür geeignete Korrekturen vorgestellt. Zusätzlich wurden die Auswirkungen von Energietransfer zwischen den Fluorophoren dargestellt und die Abhängigkeit der statistischen Parameter der gewonnenen Amplituden von der Messzeit untersucht.

Aufbauend auf dieser Grundlage wurden Bindungskurven des Proteins Sar1p an Lipiddoppelschichten mittels dcFCCS erstellt und die Affinität und Bindestellenanzahl der verwendeten Vesikel bestimmt. Dabei lag ein besonderes Augenmerk auf dem Einfluss des Markierungsgrades der Vesikel und der Inkubationszeit, die bis zur Einstellung einer gleichbleibenden Bindung vonnöten ist. Die Markierung beider Bindungspartner verleiht diesem Ansatz eine mit anderen Methoden nicht erreichbare Spezifität und Empfindlichkeit, sodass auch bei höchsten Affinitäten noch eine quantitative Bestimmung der freien wie auch der gebundenen Liganden möglich ist.

Für die verwendete komplexe Lipidmischung (*Major-Minor-Mix*) wurde eine Dissoziationskonstante von rund $2 \mu\text{mol/L}$ und eine Kapazität jedes Vesikel zur Bindung mehrerer Hundert

Proteinmoleküle gefunden. Vorläufige Ergebnisse aus Bindungsstudien mit über mehrere Größenordnungen variierten Konzentrationen eines einzelnen Lipides (DOPC) lassen zudem auf die Anwesenheit eines relevanten Anteils nicht bindungsfähiger Teilchen schließen, deren Herkunft bisher ungeklärt ist, deren Einfluss auf die bestimmte scheinbare Dissoziationskonstante hingegen sehr gut zu der für diesen Spezialfall entwickelten Theorie passt. Diese erweitert das Anwendungsgebiet der dcFCCS auf komplexe Systeme mit nicht einheitlicher Affinität und zeigt das große Potential der Methodik bei ihrer detaillierten Charakterisierung.

Zuletzt wurde der Einbau von Sar1p in Lipidmonoschichten, LANGMUIRFILME präpariert auf einer speziell für das verwendete inverse Fluoreszenzmikroskop adaptierten Filmwaage, untersucht und zwei verschiedene Herangehensweisen beschrieben, um die dabei auftretende Flächenänderung pro Proteinmolekül – die sogenannte Einbaufläche – zu bestimmen: Die makroskopische Änderung der Filmfläche kann durch die aus der effektiven Teilchenzahl der markierten Proteinmoleküle im Fokus hochgerechnete Gesamtzahl eingebauter Proteine geteilt werden, oder, in einem rein mikroskopischen und auf FCS-Messung in zwei Farbkanälen basierenden Verfahren, die Filmfläche wird durch die Dichte der Lipidmoleküle, von welchen ein Bruchteil fluoreszenzmarkiert ist, ersetzt. Die Dichte nimmt bei Einbau von Proteinen ab, da die Lipidmoleküle effektiv in der Membran verdünnt werden, um den zusätzlichen Teilchen Raum zu gewähren. Weiterhin wurden theoretische Modelle zur Berücksichtigung des Einflusses von in der Subphase verbleibenden markierten Teilchen auf die Korrelationsamplituden sowie der Auswirkung einer in Bezug auf die Länge des Korrelationsfensters nicht mehr vernachlässigbaren Bewegung der Monoschicht entwickelt und ihre Relevanz für die vorliegenden Experimente untersucht.

Bei beiden Auswertungsmethoden wird die durch Verdunstung der Subphase hervorgerufene Bewegung der Monoschicht durch den Fokus ausgenutzt, sodass eine sonst nötige, auf wenige Nanometer genaue Positionierung desselben umgangen werden kann. Die so aufgezeichnete Fluoreszenzintensität, eine LORENTZKURVE beschreibend, wird in kurze Abschnitte segmentiert, einzeln autokorreliert und die effektiven Teilchenzahlen der markierten Moleküle in Abhängigkeit der Zeit, und damit mittelbar der Fokusposition, ermittelt. Deren Minimum stellt schließlich die für die weitere Auswertung maßgebliche Größe dar.

Für den *Major-Minor-Mix* wurde mit beiden Methoden eine vergleichbare Einbaufläche von $3,4 \text{ nm}^2 - 4,1 \text{ nm}^2$ gefunden, die sehr gut mit der theoretisch erwarteten Fläche bei alleinigem Einbau der amphipathischen Helix von Sar1p übereinstimmt. Eine ebenfalls untersuchte binäre Lipidmischung (DLPC/DLPS im molaren Verhältnis 80:20) lieferte deutlich höhere Werte von $11,4 \text{ nm}^2$, was nahezu der gesamten, aus der Projektion der Kristallstruktur auf die Richtung der Membranbindung bestimmten, Fläche von Sar1p entspricht und als tiefer in die Lipidmonoschicht reichender Einbau, möglicherweise unter Wechselwirkung mit der Wasser-Luft-Grenzfläche, gedeutet werden kann. Weiterhin wurden in diesem Zusammenhang auch theoretische Modelle zur Berücksichtigung des Einflusses von in der Subphase verbleibenden markierten Teilchen auf die Korrelationsamplituden sowie der Auswirkung einer in Bezug auf die Länge des Korrelationsfensters nicht mehr vernachlässigbaren Bewegung der Monoschicht entwickelt und ihre Relevanz für die vorliegenden Experimente untersucht.

8. Ausblick

Die bisher durchgeführten Forschungsarbeiten zur Wechselwirkung von peripheren Membranproteinen im Allgemeinen und Sar1p im Besonderen mit Membranen, gleich ob als Mono- oder Doppelschichten, schaffen eine Grundlage für umfassendere Untersuchungen der vielfältigen Phänomene dieses umfangreichen Themenfeldes. Die hier entwickelten Techniken müssen weiter ausdifferenziert werden, um auch anspruchsvollere Bindungsmodelle – insbesondere unter Berücksichtigung kooperativer Effekte der gebundenen Proteine untereinander – auf die gewonnenen Daten anwenden zu können. In biologisch relevanten Systemen ist auch der Einsatz von mehr als zwei Farbkanälen zur Untersuchung von Proteinkomplexen ein vielversprechender Ansatz, etwa zur Quantifizierung der Affinitäten der einzelnen COPII-Komponenten, sowohl zu Lipiden als auch anderen Proteinen. Während hier stets Dauerstrichlaser verwendet wurden, würden gepulste Laser zudem eine Unterscheidung von Spezies anhand ihrer Fluoreszenzlebensdauer und ihrer Rotationsdiffusion erlauben und über die Stärke des beobachteten *antibunchings* auch eine Bestimmung des Oligomerisierungsgrades. Weiterhin können Techniken wie die isotherme Titrationskalorimetrie zur Ergänzung und Bestätigung der gesammelten Erkenntnisse herangezogen werden und so dabei helfen, die Genauigkeit der Fluoreszenzexperimente bestätigen bzw. deren Grenzen auszuloten.

Eine Variation der untersuchten Systeme hinsichtlich der Lipidzusammensetzung, Pufferbedingungen, Temperatur und pH-Wert erlaubt zudem die Gewinnung umfangreicher thermodynamischer Daten, die ein genaueres Verständnis des Verhaltens amphipathischer Helizes in Umgebungen unterschiedlicher Hydrophobizität und Ladungsdichte versprechen. Die hierfür benötigte Anzahl an Messungen und Präzision bei der Vermischung kleinster Probenvolumina macht diese Experimente zu einer idealen Anwendung von Mikrofluidik- und Hochdurchsatztechniken, mit deren Hilfe der bisher kaum gestreifte Parameterraum systematisch durchforscht werden könnte. Auch kinetische Aspekte, die in dieser Arbeit zugunsten der Messung von Gleichgewichtszuständen zurückgestellt wurden, sind mit den vorgestellten Methoden zugänglich: Unter der Voraussetzung von Proben genügender Helligkeit und Homogenität können die Messzeiten auf wenige Sekunden reduziert und so die Geschwindigkeitskonstanten der interessierenden Assoziations- und Dissoziationsreaktionen bestimmt werden. Eine Verbesserung der Auflösung nicht in zeitlicher, sondern räumlicher Hinsicht – beispielsweise durch Einsatz der mittlerweile in den Biowissenschaften fest etablierten Superauflöstechniken bei der Fluoreszenzmikroskopie – würde eine Ausdehnung der experimentellen Methoden auf einzelne Domänen phasenseparierter Membranen oder kleinste Zellkompartimente erlauben. Damit wird schließlich auch die Untersuchung von Einbauflächen und Affinitäten in sonst ansonsten schwer zugänglichen Umgebungen ermöglicht.

Literaturverzeichnis

- ABBE, E. (1873): *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*, Archiv für Mikroskopische Anatomie, 9, S. 413–468, DOI: 10.1007/BF02956173.
- ACUÑA, A. U., AMAT-GUERRI, F. (2008): *Early History of Solution Fluorescence: The Lignum nephriticum of Nicolás Monardes*, Kap. 1, S. 3–20, Nr. 04 in Springer Series on Fluorescence, Springer, Berlin Heidelberg.
- ADAMSON, A. W., GAST, A. P. (1997): *Physical Chemistry of Surfaces*, 6. Aufl., John Wiley & Sons.
- AIRY, G. B. (1835): *On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture*, Transactions of the Cambridge Philosophical Society, 5, S. 283–291.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., MORGAN, D., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (2015): *Molecular Biology of the Cell*, 6. Aufl., Garland Science.
- ALLGEYER, E. S., STERLING, S. M., NEIVANDT, D. J., MASON, M. D. (2011): *Low axial drift stage and temperature controlled liquid cell for z-scan fluorescence correlation spectroscopy in an inverted confocal geometry*, Review of Scientific Instruments, 82(5), S. 1–6, DOI: 10.1063/1.3590017.
- ALMEIDA, P. F. F., VAZ, W. L. C., THOMPSON, T. E. (1992a): *Lateral Diffusion and Percolation in Two-Phase, Two-Component Lipid Bilayers. Topology of the Solid-Phase Domains In-Plane and Across the Lipid Bilayer*, Biochemistry, 31(31), S. 7198–7210, DOI: 10.1021/bi00146a024.
- ALMEIDA, P. F. F., VAZ, W. L. C., THOMPSON, T. E. (1992b): *Lateral Diffusion in the Liquid Phases of Dimyristoylphosphatidylcholine/Cholesterol Lipid Bilayers: A Free Volume Analysis*, Biochemistry, 31(29), S. 6739–6747, DOI: 10.1021/bi00144a013.
- ARCHER, W. R., SCHULZ, M. D. (2020): *Isothermal titration calorimetry: practical approaches and current applications in soft matter*, Soft Matter, 16(38), S. 8760–8774, DOI: 10.1039/D0SM01345E.
- AUERSWALD, J. (2020): *Etablierung eines Messsystems zur einzelmolekülsensitiven Analyse von Protein-Monoschicht-Interaktionen am Beispiel von Sar1p*, Dissertation (unveröffentlicht), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- AUERSWALD, J., EBENHAN, J., SCHWIEGER, C., SCRIMA, A., MEISTER, A., BACIA, K. (2020): *Measuring Protein Insertion Areas in Lipid Monolayers by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, bioRxiv, 2020.09.23.310425, S. 1–18, DOI: 10.1101/2020.09.23.310425.

- BACIA, K., PETRÁŠEK, Z., SCHWILLE, P. (2012): *Correcting for Spectral Cross-Talk in Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, ChemPhysChem, 13(5), S. 1221–1231, DOI: 10.1002/cphc.201100801.
- BACIA, K., SCHWILLE, P. (2007): *Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Nature Protocols, 2(11), S. 2842–2856, DOI: 10.1038/nprot.2007.410.
- BASSETT, D. R., JR. (2002): *Scientific contributions of A. V. Hill: exercise physiology pioneer*, Journal of Applied Physiology, 93(5), S. 1567–1582, DOI: 10.1152/jappphysiol.01246.2001.
- BEER, A. (1852): *Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten*, Annalen der Physik und Chemie, 162(5), S. 78–88, DOI: 10.1002/andp.18521620505.
- BELLELLI, A., CAREY, J. (2018): *Reversible Ligand Binding*, John Wiley & Sons, Hoboken.
- BENDA, A., BENEŠ, M., MAREČEK, V., LHOTSÝ, A., HERMENS, W. T., HOF, M. (2003): *How To Determine Diffusion Coefficients in Planar Phospholipid Systems by Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Langmuir, 19(10), S. 4120–4126, DOI: 10.1021/la0270136.
- BERLMAN, I. B. (1971): *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, 2. Aufl., Academic Press.
- BERMAN, H. M., WESTBROOK, J., FENG, Z., GILLILAND, G., BHAT, T. N., WEISSIG, H., SHINDYALOV, I. N., BOURNE, P. E. (2000): *The Protein Data Bank*, Nucleic Acids Research, 28(1), S. 235–242, DOI: 10.1093/nar/28.1.235.
- BERNARD, J., FLEURY, L., TALON, H., ORRIT, M. (1993): *Photon bunching in the fluorescence from single molecules: A probe for intersystem crossing*, Journal of Chemical Physics, 98(2), S. 850–859, DOI: 10.1063/1.464249.
- BERNE, B. J., PECORA, R. (1976): *Dynamic Light Scattering*, John Wiley & Sons, New York.
- BERTERO, M., BOCCACCI, P., DEFRISE, M., MOL, C. D., PIKE, E. R. (1989): *Super-resolution in confocal scanning microscopy: II. The Incoherent case*, Inverse Problems, 5(4), S. 441–461, DOI: 10.1088/0266-5611/5/4/003.
- BERTERO, M., BRIANZI, P., PIKE, E. R. (1987): *Super-resolution in confocal scanning microscopy*, Inverse Problems, 3(2), S. 195–212, DOI: 10.1088/0266-5611/3/2/006.
- BERTHOLLET, C.-L. (1799): *Observations sur le natron*, Bd. 1, S. 271–279.
- BI, X., CORPINA, R. A., GOLDBERG, J. (2002): *Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat*, Nature, 419, S. 271–277, DOI: 10.1038/nature01040.
- BI, X., MANCIAS, J. D., GOLDBERG, J. (2007): *Insights into COPII Coat Nucleation from the Structure of Sec23 • Sar1 Complexed with the Active Fragment of Sec31*, Developmental Cell, 13(5), S. 635–645, DOI: 10.1016/j.devcel.2007.10.006.
- BLACKWELL, M. F., WHITMARSH, J. (1990): *Effect of integral membrane proteins on the lateral mobility of plastoquinone in phosphatidylcholine proteoliposomes*, Biophysical Journal, 58(5), S. 1259–1271, DOI: 10.1016/S0006-3495(90)82466-8.
- BLITZSTEIN, J. K., HWANG, J. (2019): *Introduction to Probability*, Texts in Statistical Science, 2. Aufl., CRC Press, Boca.

- BLUM, J., BRUNS, S., RADEMACHER, D., VOSS, A., WILLENBERG, B., KRAUSE, M. (2006): *Measurement of the Translational and Rotational Brownian Motion of Individual Particles in a Rarefied Gas*, Physical Review Letters, 97(23), S. 1–4, DOI: 10.1103/PhysRevLett.97.230601.
- BLUME, A. (1979): *A comparative study of the phase transitions of phospholipid bilayers and monolayers*, Biochimica et Biophysica Acta, 557(1), S. 32–44, DOI: 10.1016/0005-2736(79)90087-7.
- BORN, M., WOLF, E. (1999): *Principles of Optics*, 7. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge.
- BOUGUER, P. (1729): *Essai d'optique, sur la gradation de la lumière*, Claude Jombert, Paris.
- BRADFORD, M. M. (1976): *Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*, Analytical Biochemistry, 72(1–2), S. 248–254, DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- DE BRUIN, M. (1982): *Glossary of terms used in nuclear analytical chemistry (Provisional)*, Pure and Applied Chemistry, 54(8), S. 1533–1554, DOI: 10.1351/pac198254081533.
- BUDNIK, A., STEPHENS, D. J. (2009): *ER exit sites - localization and control of COPII vesicle formation*, FEBS Letters, 583(23), S. 3796–3803, DOI: 10.1016/j.febslet.2009.10.038.
- CHAVES, J. (2016): *Introduction to Nonimaging Optics*, 2. Aufl., CRC Press, Boca.
- CHIMOWITZ, E. H. (2005): *Introduction to Critical Phenomena in Fluids*, Topics in Chemical Engineering, Oxford University Press, Oxford.
- CHMYROV, V., SPIELMANN, T., HEVEKERL, H., WIDENGREN, J. (2015): *Trans–Cis Isomerization of Lipophilic Dyes Probing Membrane Microviscosity in Biological Membranes and in Live Cells*, Analytical Chemistry, 87(11), S. 5690–5697, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00863.
- CHU, A. H., TURNER, B. W., ACKERS, G. K. (1984): *Effects of Protons on the Oxygenation-Linked Subunit Assembly in Human Hemoglobin*, Biochemistry, 23(4), S. 604–617, DOI: 10.1021/bi00299a004.
- CLERCX, H. J. H., SCHRAM, P. P. J. M. (1992): *Brownian particles in shear flow and harmonic potentials: A study of long-time tails*, Physical Review A, 46(4), S. 1942–1950, DOI: 10.1103/PhysRevA.46.1942.
- COFFEY, W. (1985): *Development and Application of the Theory of Brownian Motion*, Bd. 63 in *Advances in Chemical Physics*, S. 69–252, John Wiley & Sons, New York.
- COFFEY, W. T., KALMYKOV, Y. P., WALDRON, J. T. (2004): *The Langevin Equation*, Bd. 14 in *Series in Contemporary Chemical Physics*, 2. Aufl., World Scientific, New Jersey.
- CRAMÉR, H. (1946): *Mathematical Methods of Statistics*, Princeton University Press, Princeton.
- CRANK, J. (1975): *The Mathematics of Diffusion*, 2. Aufl., Clarendon Press, Oxford.
- CRICK, F. H. C. (1958): *On protein synthesis*, Bd. XII in *Symposia of the Society for Experimental Biology*, S. 138–163, Cambridge University Press.
- CYPIONKA, A., STEIN, A., HERNANDEZ, J. M., HIPPCHEM, H., JAHN, R., WALLA, P. J. (2009): *Discrimination between docking and fusion of liposomes reconstituted with neuronal*

- SNARE-proteins using FCS*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, *106*(44), S. 18.575–18.580, DOI: 10.1073/pnas.0906677106.
- DAUM, S., KRÜGER, D., MEISTER, A., AUERSWALD, J., PRINZ, S., BRIGGS, J. A. G., BACIA, K. (2014): *Insights from reconstitution reactions of COPII vesicle formation using pure components and low mechanical perturbation*, Biological Chemistry, *395*(7–8), S. 801–812, DOI: 10.1515/hsz-2014-0117.
- DEBRUNNER, H. (1955): *Zur Minkowskischen Dimensions- und Maßbestimmung beschränkter Punktmengen des euklidischen Raumes*, Commentarii Mathematici Helvetici, *29*, S. 258–278, DOI: 10.1007/BF02564282.
- DEMTRÖDER, W. (2014): *Laser Spectroscopy 1*, 5. Aufl., Springer, Berlin.
- DEMUS, D., GOODBY, J., GRAY, G. W., SPIESS, H.-W., VILL, V. H. (1999): *Physical Properties of Liquid Crystals*, Wiley-VCH, Weinheim.
- DERTINGER, T., PACHECO, V., VON DER HOCHT, I., HARTMANN, R., GREGOR, I., ENDERLEIN, J. (2007): *Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements*, ChemPhysChem, *8*(3), S. 433–443, DOI: 10.1002/cphc.200600638.
- DESTRI, C., MICCIO, C. (2007): *Simple stochastic model for the evolution of protein lengths*, Physical Review E, *76*(1), S. 1–12, DOI: 10.1103/PhysRevE.76.011924.
- DEXTER, D. L. (1953): *A Theory of Sensitized Luminescence in Solids*, Journal of Chemical Physics, *21*(5), S. 836–850, DOI: 10.1063/1.1699044.
- DIEP-QUANG, H., UEBERREITER, K. (1980): *Monolayers of some liquid-crystal forming compounds*, Colloid and Polymer Science, *258*(9), S. 1055–1061, DOI: 10.1007/BF01382402.
- DIERKING, I., FIGUEIREDO NETO, A. M. (2020): *Novel Trends in Lyotropic Liquid Crystals*, Crystals, *10*(7), S. 1–24, DOI: 10.3390/cryst10070604.
- DIGMAN, M. A., SENGUPTA, P., WISEMAN, P. W., BROWN, C. M., HORWITZ, A. R., GRATTON, E. (2005): *Fluctuation Correlation Spectroscopy with a Laser-Scanning Microscope: Exploiting the Hidden Time Structure*, Biophysical Journal, *88*(5), S. L33–L36, DOI: 10.1529/biophysj.105.061788.
- DIGMAN, M. A., WISEMAN, P. W., HORWITZ, A. R., GRATTON, E. (2009): *Detecting Protein Complexes in Living Cells from Laser Scanning Confocal Image Sequences by the Cross Correlation Raster Image Spectroscopy Method*, Biophysical Journal, *96*(2), S. 707–716, DOI: 10.1016/j.bpj.2008.09.051.
- DOMÈNECH, , REDONDO, L., MONTERO, M. T., HERNÁNDEZ-BORRELL, J. (2007): *Specific Adsorption of Cytochrome c on Cardiolipin–Glycerophospholipid Monolayers and Bilayers*, Langmuir, *23*(10), S. 5651–5656, DOI: 10.1021/la0634241.
- DE DONDER, T. (1922): *L’Affinité. Applications aux gaz parfaits.*, Bulletin de la Classe des Sciences de l’Académie Royale de Sciences, des Lettres et des Beaux-Arts de Belgique, S. 197–205.

- DUNCAN, A. M. (1970): *The Functions of Affinity Tables and Lavoisier's List of Elements*, *Ambix*, 17(1), S. 28–42, DOI: 10.1179/amb.1970.17.1.28.
- EBENHAN, J. (2012): Orientierung amphiphiler Terphenylderivate an der Wasser-Luft-Grenzfläche, Masterarbeit (unveröffentlicht), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- EID, J. S., MÜLLER, J. D., GRATTON, E. (2000): *Data acquisition card for fluctuation correlation spectroscopy allowing full access to the detected photon sequence*, *Review of Scientific Instruments*, 71(2), S. 361–368, DOI: 10.1063/1.1150208.
- EIGEN, M., RIGLER, R. (1994): *Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(13), S. 5740–5747, DOI: 10.1073/pnas.91.13.5740.
- EINSTEIN, A. (1905): *Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen*, *Annalen der Physik*, 322(8), S. 549–560, DOI: 10.1002/andp.19053220806.
- EINSTEIN, A. (1907): *Theoretische Bemerkungen über die Brownsche Bewegung*, *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*, 13(6), S. 41–42, DOI: 10.1002/bbpc.19070130602.
- ELLIOTT, J. T., BURDEN, D. L., WOODWARD, J. T., SEHGAL, A., DOUGLAS, J. F. (2003): *Phospholipid Monolayers Supported on Spun Cast Polystyrene Films*, *Langmuir*, 19(6), S. 2275–2283, DOI: 10.1021/la0260640.
- ELSON, E. L., MAGDE, D. (1974): *Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory*, *Biopolymers*, 13(1), S. 1–27, DOI: 10.1002/bip.1974.360130102.
- ELSON, E. L., WEBB, W. W. (1975): *Concentration Correlation Spectroscopy: A New Biophysical Probe Based on Occupation Number Fluctuations*, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 4, S. 311–334, DOI: 10.1146/annurev.bb.04.060175.001523.
- EMSLEY, P., LOHKAMP, B., SCOTT, W. G., COWTAN, K. (2010): *Features and development of Coot*, *Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography*, 66(4), S. 486–501.
- ENDERLEIN, J. (2012): *Polymer Dynamics, Fluorescence Correlation Spectroscopy, and the Limits of Optical Resolution*, *Physical Review Letters*, 108(10), S. 1–4, DOI: 10.1103/PhysRevLett.108.108101.
- ENDERLEIN, J., GREGOR, I., PATRA, D., DERTINGER, T., KAUPP, U. B. (2005): *Performance of Fluorescence Correlation Spectroscopy for Measuring Diffusion and Concentration*, *ChemPhysChem*, 6(11), S. 2324–2336, DOI: 10.1002/cphc.200500414.
- EÖTVÖS, R. (1886): *Ueber den Zusammenhang der Oberflächenspannung der Flüssigkeiten mit ihrem Molecularvolumen*, *Annalen der Physik*, 263(3), S. 448–459, DOI: 10.1002/andp.18862630309.
- FERNER, R. E., ARONSON, J. K. (2015): *Cato Guldberg and Peter Waage, the history of the Law of Mass Action, and its relevance to clinical pharmacology*, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 81(1), S. 52–55, DOI: 10.1111/bcp.12721.

- FLEMING, G. R., KNIGHT, A. W. E., MORRIS, J. M., MORRISON, R. J. S., ROBINSON, G. W. (1977): *Picosecond Fluorescence Studies of Xanthene Dyes*, Journal of the American Chemical Society, *99*(13), S. 4306–4311, DOI: 10.1021/ja00455a017.
- FOO, Y. H., NAREDI-RAINER, N., LAMB, D. C., AHMED, S., WOHLAND, T. (2012): *Factors Affecting the Quantification of Biomolecular Interactions by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, Biophysical Journal, *102*(5), S. 1174–1183, DOI: 10.1016/j.bpj.2012.01.040.
- FOURRIERE, L., JIMENEZ, A. J., PEREZ, F., BONCOMPAIN, G. (2020): *The role of microtubules in secretory protein transport*, Journal of Cell Science, *133*(2), S. 1–10, DOI: 10.1242/jcs.237016.
- FRADIN, C., ABU-ARISH, A., GRANEK, R., ELBAUM, M. (2003): *Fluorescence Correlation Spectroscopy Close to a Fluctuating Membrane*, Biophysical Journal, *84*(3), S. 2005–2020, DOI: 10.1016/S0006-3495(03)75009-7.
- FRENKEL, D., SMIT, B. (1996): *Understanding Molecular Simulation*, Academic Press, San Diego.
- FREZZATO, D., MORO, G. J., ZANNONI, C. (2005): *Molecular diffusion in liquid crystals and chiral discrimination. I. Theory*, Journal of Chemical Physics, *122*(16), S. 1–11, DOI: 10.1063/1.1884110.
- FRIGO, M., JOHNSON, S. G. (1998): *FFTW: an adaptive software architecture for the FFT*, Bd. 3, S. 1381–1384, Seattle.
- FÖRSTER, T. (1948): *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, Annalen der Physik, *437*(1–2), S. 55–75, DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- FÖRSTER, T., HOFFMANN, G. (1971): *Die Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten einiger Farbstoffsysteme*, Zeitschrift für Physikalische Chemie, *75*(1–2), S. 63–76, DOI: 10.1524/zpch.1971.75.1_2.063.
- GIRARD-EGROT, A., CHAUVET, J.-P., GILLET, G., MORADI-AMÉLI, M. (2004): *Specific Interaction of the Antiapoptotic Protein Nr-13 with Phospholipid Monolayers is Prevented by the BH3 Domain of Bax*, Journal of Molecular Biology, *335*(1), S. 321–331, DOI: 10.1016/j.jmb.2003.10.028.
- GOODMAN, J. W. (2005): *Introduction to Fourier Optics*, 3. Aufl., Roberts & Company, Englewood.
- GREGOR, I., PATRA, D., ENDERLEIN, J. (2005): *Optical Saturation in Fluorescence Correlation Spectroscopy under Continuous-Wave and Pulsed Excitation*, ChemPhysChem, *6*(1), S. 164–170, DOI: 10.1002/cphc.200400319.
- GRIFFITHS, D. J. (2013): *Introduction to Electrodynamics*, 4. Aufl., Pearson, Boston.
- GRIFFITHS, P. R. (2002): *Beer’s Law*, Bd. 3, Kap. Quantitative Analysis, S. 1–10, John Wiley & Sons.
- GUDMAND, M., FIDORRA, M., BJØRNHOLM, T., HEIMBURG, T. (2009): *Diffusion and Partitioning of Fluorescent Lipid Probes in Phospholipid Monolayers*, Biophysical Journal, *96*(11), S. 4598–4609, DOI: 10.1016/j.bpj.2009.01.063.

- GUIGAS, G., WEISS, M. (2016): *Effects of protein crowding on membrane systems*, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1858(10), S. 2441–2450, DOI: 10.1016/j.bbamem.2015.12.021.
- GULDBERG, C. M., WAAGE, P. (1867): *Études sur les affinités chimiques*, Brøgger & Christie, Oslo, Norwegen.
- GULDBERG, C. M., WAAGE, P. (1879): *Ueber die chemische Affinität*, Journal für Praktische Chemie, 19, S. 69–114, DOI: 10.1002/prac.18790190111.
- HAIDEKKER, M. A., THEODORAKIS, E. A. (2010): *Environment-sensitive behavior of fluorescent molecular rotors*, Journal of Biological Engineering, 4, S. 1–14, DOI: 10.1186/1754-1611-4-11.
- HANNA, M. G., IV, BLOCK, S., FRANKEL, E. B., HOU, F., JOHNSON, A., YUAN, L., KNIGHT, G., MORESCO, J. J., YATES, J. R., III, ASHTON, R., SCHEKMAN, R., TONG, Y., AUDHYA, A. (2017): *TFG facilitates outer coat disassembly on COPII transport carriers to promote tethering and fusion with ER-Golgi intermediate compartments*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114(37), S. E7707–E7716, DOI: 10.1073/pnas.1709120114.
- HAS, C., SUNTHAR, P. (2020): *A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes*, Journal of Liposome Research, 30(4), S. 336–365, DOI: 10.1080/08982104.2019.1668010.
- HEIMBURG, T. (2007): *Thermal Biophysics of Membranes*, Tutorials in Biophysics, Wiley-VCH.
- HEINZE, K. G., KOLTERMANN, A., SCHWILLE, P. (2000): *Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(19), S. 10.377–10.382.
- HESS, S. T., WEBB, W. W. (2002): *Focal Volume Optics and Experimental Artifacts in Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Biophysical Journal, 83(4), S. 2300–2317, DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73990-8.
- HILL, A. V. (1909): *The mode of action of nicotine and curari, determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients*, The Journal of Physiology, 39(5), S. 361–373, DOI: 10.1113/jphysiol.1909.sp001344.
- HILL, A. V. (1910): *The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves*, Journal of Physiology, 40(Suppl.), S. iv–vii, DOI: 10.1113/jphysiol.1910.sp001386.
- HILL, T. L. (1994): *Thermodynamics of Small Systems*, Dover Publications, New York.
- HOPKINS, H. H., BARHAM, P. M. (1950): *The Influence of the Condenser on Microscopic Resolution*, Proceedings of the Physical Society. Section B, 63(10), S. 737–744, DOI: 10.1088/0370-1301/63/10/301.
- HORROCKS, A. R., KEARVELL, A., TICKLE, K., WILKINSON, F. (1966): *Mechanism of fluorescence quenching in solution. Part 2.—Quenching by Xenon and Intersystem Crossing Efficiencies*, Transactions of the Faraday Society, 62, S. 3393–3399, DOI: 10.1039/TF9666203393.

- HUANG, M., WEISSMAN, J. T., BÉRAUD-DUFOUR, S., LUAN, P., WANG, C., CHEN, W., ARIDOR, M., WILSON, I. A., BALCH, W. E. (2001): *Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH₂ terminus in ER export*, Journal of Cell Biology, 155(6), S. 937–948, DOI: 10.1083/jcb.200106039.
- HUANG, R., CHAVEZ, I., TAUTE, K. M., LUKIĆ, B., JENEY, S., RAIZEN, M. G., FLORIN, E.-L. (2011a): *Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid*, Nature Physics, 7, S. 576–580, DOI: 10.1038/NPHYS1953.
- HUANG, W.-N., CHEN, Y.-H., CHEN, C.-L., WU, W. (2011b): *Surface Pressure-Dependent Interactions of Secretory Phospholipase A₂ with Zwitterionic Phospholipid Membranes*, Langmuir, 27(11), S. 7034–7041, DOI: 10.1021/la200255r.
- HUFF, J. (2019): *The Airyscan Detector: Confocal Microscopy Evolution for the Neurosciences*, Bd. 5 in *Progress in Optical Science and Photonics*, Kap. 4, S. 83–102, Springer, Singapur.
- HUTCHINGS, J., STANCHEVA, V., MILLER, E. A., ZANETTI, G. (2018): *Subtomogram averaging of COPII assemblies reveals how coat organization dictates membrane shape*, Nature Communications, 9(1), S. 1–8, DOI: 10.1038/s41467-018-06577-4.
- HUTCHINGS, J., ZANETTI, G. (2019): *Coat flexibility in the secretory pathway: a role in transport of bulky cargoes*, Current Opinion in Cell Biology, 59, S. 104–111, DOI: 10.1016/j.ceb.2019.04.002.
- HWANG, L. C., WOHLAND, T. (2004): *Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy Using Single Laser Wavelength Excitation*, ChemPhysChem, 5(4), S. 549–551, DOI: 10.1002/cphc.200301057.
- HÄDICKE, A., BLUME, A. (2016): *Binding of the Cationic Peptide (KL)₄K to Lipid Monolayers at the Air–Water Interface: Effect of Lipid Headgroup Charge, Acyl Chain Length, and Acyl Chain Saturation*, Journal of Physical Chemistry B, 120(16), S. 3880–3887, DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b01558.
- HÖFLING, F., FRANOSCH, T. (2013): *Anomalous transport in the crowded world of biological cells*, Reports on Progress in Physics, 76(4), S. 1–50, DOI: 10.1088/0034-4885/76/4/046602.
- IBN-ELHAJ, M., RIEGLER, H., MÖHWALD, H. (1996): *Layering Transitions and Reentrant-Like Phenomenon in Thin Films of Three-Block Organosiloxane Smectogens at the Air/Water Interface*, Journal de Physique I, 6(7), S. 969–980, DOI: 10.1051/jp1:1996110.
- ISRAELACHVILI, J. N. (2011): *Intermolecular and Surface Forces*, 3. Aufl., Academic Press.
- JABŁOŃSKI, A. (1933): *Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes*, Nature, 131(3319), S. 839–840, DOI: 10.1038/131839b0.
- JENSEN, J. L. W. V. (1906): *Sur les fonctions convexes et les inégalités entre les valeurs moyennes*, Acta Mathematica, 30(1), S. 175–193, DOI: 10.1007/BF02418571.
- JUŠKAITIS, R., WILSON, T. (1998): *The measurement of the amplitude point spread function of microscope objective lenses*, Journal of Microscopy, 189(1), S. 8–11, DOI: 10.1046/j.1365-2818.1998.00295.x.

- KAGANER, V. M., MÖHWALD, H., DUTTA, P. (1999): *Structure and phase transitions in Langmuir monolayers*, Reviews of Modern Physics, *71*(3), S. 779–819, DOI: 10.1103/RevModPhys.71.779.
- VAN KAMPEN, N. G. (2007): *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*, 3. Aufl., Elsevier, Amsterdam.
- KASHA, M. (1950): *Characterization of electronic transitions in complex molecules*, Discussions of the Faraday Society, *9*, S. 14–19, DOI: 10.1039/DF9500900014.
- KASK, P., GÜNTHER, R., AXHAUSEN, P. (1997): *Statistical accuracy in fluorescence fluctuation experiments*, European Biophysics Journal, *25*(3), S. 163–169, DOI: 10.1007/s002490050028.
- KE, P. C., NAUMANN, C. A. (2001): *Single Molecule Fluorescence Imaging of Phospholipid Monolayers at the Air–Water Interface*, Langmuir, *17*(12), S. 3727–3733, DOI: 10.1021/la010116o.
- KERKER, M., KRATOHVIL, J. P., MATIJEVIĆ, E. (1962): *Light Scattering Functions for Concentric Spheres. Total Scattering Coefficients, $m_1 = 2.1050$, $m_2 = 1.4821$* , Journal of the Optical Society of America, *52*(5), S. 551–561, DOI: 10.1364/JOSA.52.000551.
- KIRCH, A., GMELCH, M., REINEKE, S. (2019): *Simultaneous Singlet–Singlet and Triplet–Singlet Förster Resonance Energy Transfer from a Single Donor Material*, Journal of Physical Chemistry Letters, *10*(2), S. 310–315, DOI: 10.1021/acs.jpcllett.8b03668.
- KOLIN, D. L., WISEMAN, P. W. (2007): *Advances in Image Correlation Spectroscopy: Measuring Number Densities, Aggregation States, and Dynamics of Fluorescently labeled Macromolecules in Cells*, Cell Biochemistry and Biophysics, *49*(3), S. 141–164, DOI: 10.1007/s12013-007-9000-5.
- KOPPEL, D. E. (1974): *Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy*, Physical Review A, *10*(6), S. 1938–1945, DOI: 10.1103/PhysRevA.10.1938.
- KRICHEVSKY, O. (2013): *Comment on “Polymer Dynamics, Fluorescence Correlation Spectroscopy, and the Limits of Optical Resolution”*, Physical Review Letters, *110*(15), S. 1–2, DOI: 10.1103/PhysRevLett.110.159801.
- KRÜGER, D., EBENHAN, J., WERNER, S., BACIA, K. (2017): *Measuring Protein Binding to Lipid Vesicles by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, Biophysical Journal, *113*(6), S. 1311–1320, DOI: 10.1016/j.bpj.2017.06.023.
- KUBITSCHKEK, U. H. (2017): *Fluorescence Microscopy*, 2. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.
- KUBO, R. (1966): *The fluctuation-dissipation theorem*, Reports on Progress in Physics, *29*(1), S. 255–284, DOI: 10.1088/0034-4885/29/1/306.
- KUROKAWA, K., NAKANO, A. (2019): *The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus*, Journal of Biochemistry, *165*(2), S. 109–114, DOI: 10.1093/jb/mvy080.
- KUČERKA, N., GALLOVÁ, J., UHRÍKOVÁ, D., BALGAVÝ, P., BULACU, M., MARRINK, S.-J., KATSARAS, J. (2009): *Areas of monounsaturated diacylphosphatidylcholines*, Biophysical Journal, *97*(7), S. 1926–1932, DOI: 10.1016/j.bpj.2009.06.050.

- KUČERKA, N., TRISTRAM-NAGLE, S., NAGLE, J. F. (2005): *Structure of Fully Hydrated Fluid Phase Lipid Bilayers with Monounsaturated Chains*, Journal of Membrane Biology, 208(3), S. 193–202, DOI: 10.1007/s00232-005-7006-8.
- KWAN, A., DUDLEY, J., LANTZ, E. (2002): *Who really discovered Snell's law?*, Physics World, 15(4), S. 64–64, DOI: 10.1088/2058-7058/15/4/44.
- LAKOWICZ, J. R. (2006): *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. Aufl., Springer.
- LAMBERT, J. H. (1760): *Photometria sive de mensura et gradibus luminis, colorum et umbrae*, Eberhard Klett, Augsburg.
- LAMBERT, J. H. (1892): *Photometrie*, Bd. 32 in *Ostwald's Klassiker der Exakten Wissenschaften*, Wilhelm Engelmann, Leipzig.
- LANDAU, L. D., LIFSHITZ, E. M. (1980): *Statistical Physics, Part 1*, Bd. 5 in *Course of Theoretical Physics*, 3. Aufl., Pergamon Press, Oxford.
- LANGMUIR, I. (1918): *THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM*, Journal of the American Chemical Society, 40(9), S. 1361–1403, DOI: 10.1021/ja02242a004.
- LE GRAND, Y., LERAY, A., GUILBERT, T., ODIN, C. (2008): *Non-descanned versus descanned epifluorescence collection in two-photon microscopy: Experiments and Monte Carlo simulations*, Optics Communications, 281(21), S. 5480–5486, DOI: 10.1016/j.optcom.2008.07.027.
- LECCA, P., LAURENZI, I., JORDAN, F. (2013): *Deterministic versus stochastic modelling in biochemistry and systems biology*, Woodhead Publishing Series in Biomedicine, Woodhead Publishing, Oxford.
- LEONARD, M., SONG, B. D., RAMACHANDRAN, R., SCHMID, S. L. (2005): *Robust Colorimetric Assays for Dynamin's Basal and Stimulated GTPase Activities*, Bd. 404 in *Methods in Enzymology*, Kap. 43, S. 490–503, Academic Press, Cambridge.
- LIPSON, A., LIPSON, S. G., LIPSON, H. (2010): *Optical Physics*, 4. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge.
- LOFTUS, A. F., HSIEH, V. L., PARTHASARATHY, R. (2012): *Modulation of membrane rigidity by the human vesicle trafficking proteins Sar1A and Sar1B*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 426(4), S. 585–589, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.131.
- LOMAN, A., GREGOR, I., STUTZ, C., MUND, M., ENDERLEIN, J. (2010): *Measuring rotational diffusion of macromolecules by fluorescence correlation spectroscopy*, Photochemical & Photobiological Sciences, 9(5), S. 627–636, DOI: 10.1039/B9PP00029A.
- LONDON, E., LADOKHIN, A. S. (2002): *Measuring the Depth of Amino Acid Residues in Membrane-Inserted Peptides by Fluorescence Quenching*, Bd. 52 in *Current Topics in Membranes*, Kap. 4, S. 89–115, Academic Press, Cambridge.
- LUKIĆ, B., JENEY, S., TISCHER, C., KULIK, A. J., FORRÓ, L., FLORIN, E.-L. (2005): *Direct Observation of Nondiffusive Motion of a Brownian Particle*, Physical Review Letters, 95(16), S. 1–4, DOI: 10.1103/PhysRevLett.95.160601.
- LUKREZ (2013): *Über die Natur der Dinge*, Holzinger, Berlin.

- LUO, Y.-R. (2007): *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*, CRC Press, Boca.
- MACDONALD, P. J., CHEN, Y., WANG, X., CHEN, Y., MUELLER, J. D. (2010): *Brightness Analysis by Z-Scan Fluorescence Fluctuation Spectroscopy for the Study of Protein Interactions within Living Cells*, *Biophysical Journal*, 99(3), S. 979–988, DOI: 10.1016/j.bpj.2010.05.017.
- MAGATTI, D., FERRI, F. (2001): *Fast multi-tau real-time software correlator for dynamic light scattering*, *Applied Optics*, 40(24), S. 4011–4021, DOI: 10.1364/ao.40.004011.
- MAGDE, D., ELSON, E., WEBB, W. W. (1972): *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *Physical Review Letters*, 29(11), S. 705–708, DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705.
- MAGDE, D., ELSON, E. L., WEBB, W. W. (1974): *Fluorescence Correlation Spectroscopy. II. An Experimental Realization*, *Biopolymers*, 13(1), S. 29–61, DOI: 10.1002/bip.1974.360130103.
- MAGET-DANA, R. (1999): *The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1462(1–2), S. 109–140, DOI: 10.1016/S0005-2736(99)00203-5.
- MARROCCO, M. (2008): *Two-Photon Excitation Fluorescence Correlation Spectroscopy of Diffusion for Gaussian-Lorentzian Volumes*, *Journal of Physical Chemistry A*, 112(17), S. 3831–3836, DOI: 10.1021/jp710677z.
- MATSUOKA, K., ORCI, L., AMHERDT, M., BEDNAREK, S. Y., HAMAMOTO, S., SCHEKMAN, R., YEUNG, T. (1998): *COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes*, *Cell*, 93(2), S. 263–275, DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81577-9.
- MAZO, R. M. (2002): *Brownian Motion*, Bd. 112 in *International Series of Monographs on Physics*, Oxford University Press, Oxford.
- MCCONKEY, E. H. (1982): *Molecular evolution, intracellular organization, and the quinary structure of proteins*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(10), S. 3236–3240.
- MELO, A. M., PRIETO, M., COUTINHO, A. (2011): *The effect of variable liposome brightness on quantifying lipid–protein interactions using fluorescence correlation spectroscopy*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(10), S. 2559–2568, DOI: 10.1016/j.bbamem.2011.06.001.
- MELO, A. M., PRIETO, M., COUTINHO, A. (2014): *Quantifying Lipid-Protein Interaction by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)*, Bd. 1076 in *Methods in Molecular Biology*, Kap. 26, S. 575–595, Humana Press, Totowa.
- MENDELSON, R., MAO, G., FLACH, C. R. (2010): *Infrared reflection–absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid–protein interaction in Langmuir films*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1798(4), S. 788–800, DOI: 10.1016/j.bbamem.2009.11.024.
- MILO, R. (2013): *What is the total number of protein molecules per cell volume? A call to rethink some published values*, *BioEssays*, 35(12), S. 1050–1055, DOI: 10.1002/bies.201300066.

- MILO, R., PHILIPS, R. (2016): *Cell Biology by the Numbers*, Garland Science.
- MISHIN, Y. (2015): *Thermodynamic theory of equilibrium fluctuations*, *Annals of Physics*, 363, S. 48–97, DOI: 10.1016/j.aop.2015.09.015.
- MÜLLER, C. B., LOMAN, A., RICHTERING, W., ENDERLEIN, J. (2008): *Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy of Colloidal Solutions: Influence of Particle Size*, *Journal of Physical Chemistry B*, 112(28), S. 8236–8240, DOI: 10.1021/jp802280u.
- NASSE, M. J., WOEHLE, J. C. (2010): *Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy*, *Journal of the Optical Society of America A*, 27(2), S. 295–302, DOI: 10.1364/JOSAA.27.000295.
- NOVOTNY, L., HECHT, B. (2012): *Principles of Nano-Optics*, 2. Aufl., Cambridge University Press, Cambridge.
- OSTROWSKY, N., SORNETTE, D., PARKER, P., PIKE, E. R. (1981): *Exponential sampling method for light scattering polydispersity analysis*, *Optica Acta*, 28(8), S. 1059–1070, DOI: 10.1080/713820704.
- PAIS, A. (1988): *Inward Bound*, Oxford University Press, Oxford.
- PATCHING, S. G. (2014): *Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein–ligand interactions and its potential for drug discovery*, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(1, Part A), S. 43–55, DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.04.028.
- PATHRIA, R. K., BEALE, P. D. (2011): *Statistical Mechanics*, 3. Aufl., Elsevier, Amsterdam.
- PAVLOVICH, V. S. (2012): *Solvatochromism and Nonradiative Decay of Intramolecular Charge-Transfer Excited States: Bands-of-Energy Model, Thermodynamics, and Self-Organization*, *ChemPhysChem*, 13(18), S. 4081–4093, DOI: 10.1002/cphc.201200426.
- PAWLEY, J. B. H. (2006): *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3. Aufl., Springer, New York.
- PEARSON, K. (1905): *The Problem of the Random Walk*, *Nature*, 72(1865), S. 294, DOI: 10.1038/072294b0.
- PENCER, J., HALLETT, F. R. (2003): *Effects of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements*, *Langmuir*, 19(18), S. 7488–7497, DOI: 10.1021/la0345439.
- PEOTTER, J., KASBERG, W., PUSTOVA, I., AUDHYA, A. (2019): *COPII-mediated trafficking at the ER/ERGIC interface*, *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 20(7), S. 491–503, DOI: 10.1111/tra.12654.
- PETERS, R., BECK, K. (1983): *Translational diffusion in phospholipid monolayers measured by fluorescence microphotolysis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(23), S. 7183–7187.
- PETERSEN, N. O., HÖDDELIUS, P. L., WISEMAN, P. W., SEGER, O., MAGNUSSON, K.-E. (1993): *Quantitation of Membrane Receptor Distributions by Image Correlation Spectroscopy: Concept and Application*, *Biophysical Journal*, 65(3), S. 1135–1146, DOI: 10.1016/S0006-3495(93)81173-1.

- PETROV, E. P., PETROSYAN, R., SCHWILLE, P. (2012): *Translational and rotational diffusion of micrometer-sized solid domains in lipid membranes*, *Soft Matter*, 8(29), S. 7552–7555, DOI: 10.1039/C2SM25796C.
- PETROV, E. P., SCHWILLE, P. (2008): *State of the Art and Novel Trends in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, S. 145–197, Springer Series on Fluorescence, Springer, Berlin.
- PETRÁŠEK, Z., SCHWILLE, P. (2008): *Precise Measurement of Diffusion Coefficients using Scanning Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *Biophysical Journal*, 94(4), S. 1437–1448, DOI: 10.1529/biophysj.107.108811.
- PLANCHEREL, M. (1910): *Contribution à l'étude de la représentation d'une fonction arbitraire par des intégrales définies*, *Rendiconti del Circolo Matematico di Palermo (1884-1940)*, 30, S. 289–335, DOI: 10.1007/BF03014877.
- PRAKASH, M., DUTTA, P., KETTERSON, J. B., ABRAHAM, B. M. (1984): *X-ray diffraction study of the in-plane structure of an organic multilayer ("langmuir—blodgett") film*, *Chemical Physics Letters*, 111(4–5), S. 395–398, DOI: 10.1016/0009-2614(84)85527-X.
- QUÍLEZ, J. (2004): *A HISTORICAL APPROACH TO THE DEVELOPMENT OF CHEMICAL EQUILIBRIUM THROUGH THE EVOLUTION OF THE AFFINITY CONCEPT: SOME EDUCATIONAL SUGGESTIONS*, *Chemistry Education Research and Practice*, 5(1), S. 69–87, DOI: 10.1039/B3RP90031B.
- RAPP, B., GRULER, H. (1990): *Phase transitions in thin smectic films at the air-water interface*, *Physical Review A*, 42(4), S. 2215–2218, DOI: 10.1103/PhysRevA.42.2215.
- RATHGEBER, S., BEAUVISAGE, H.-J., CHEVREAU, H., WILLENBACHER, N., OELSCHLAEGER, C. (2009): *Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy*, *Langmuir*, 25(11), S. 6368–6376, DOI: 10.1021/la804170k.
- REBHAN, E. (2010): *Thermodynamik und Statistik*, Theoretische Physik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- LORD RAYLEIGH (1879): *XXXI. Investigations in Optics, with special reference to the Spectroscope*, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 8(49), S. 261–274, DOI: 10.1080/14786447908639684.
- RICHARDS, B., WOLF, E. (1959): *Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system*, *Proceedings of the Royal Society A*, 253(1274), S. 358–379.
- ROTH, H. D. (1990): *A Brief History of Photoinduced Electron Transfer and Related Reactions*, Bd. 156 in *Topics in Current Chemistry*, S. 1–19, Springer, Berlin.
- RUSU, L., GAMBHIR, A., MCLAUGHLIN, S., RÄDLER, J. (2004): *Fluorescence Correlation Spectroscopy Studies of Peptide and Protein Binding to Phospholipid Vesicles*, *Biophysical Journal*, 87(2), S. 1044–1053, DOI: 10.1529/biophysj.104.039958.
- SAUER, M., HOFKENS, J., ENDERLEIN, J. (2011): *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*, Wiley-VCH.

- SAXTON, M. J. (1987): *LATERAL DIFFUSION IN AN ARCHIPELAGO. The Effect of Mobile Obstacles*, Biophysical Journal, *52*(6), S. 989–997, DOI: 10.1016/S0006-3495(87)83291-5.
- SCHWIEGER, C., MEISTER, A., DAUM, S., BLUME, A., BACIA, K. (2017): *Binding of the GTPase Sar1 to a Lipid Membrane Monolayer: Insertion and Orientation Studied by Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy*, Polymers, *9*(11), S. 1–25, DOI: 10.3390/polym9110612.
- SCHÄTZEL, K. (1985): *New concepts in correlator design*, Bd. 77 in *Institute of Physics Conference Series*, S. 175–184, Adam Hilger, Bristol.
- SCHÄTZEL, K. (1990): *Noise on photon correlation data. I. Autocorrelation functions*, Quantum Optics: Journal of the European Optical Society Part B, *2*(4), S. 287–305, DOI: 10.1088/0954-8998/2/4/002.
- SCHÄTZEL, K., DREWEL, M., STIMAC, S. (1988): *Photon correlation measurements at large lag times: improving statistical accuracy*, Journal of Modern Optics, *35*(4), S. 711–718, DOI: 10.1080/09500348814550731.
- SCHÜTZ, G. J., SCHINDLER, H., SCHMIDT, T. (1997): *Single-Molecule Microscopy on Model Membranes Reveals Anomalous Diffusion*, Biophysical Journal, *73*(2), S. 1073–1080.
- SEELIG, A. (1987): *Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers*, Biochimica et Biophysica Acta, *899*(2), S. 196–204, DOI: 10.1016/0005-2736(87)90400-7.
- SEELIG, A., ALT, T., LOTZ, S., HÖLZEMANN, G. (1996): *Binding of Substance P Agonists to Lipid Membranes and to the Neurokinin-1 Receptor*, Biochemistry, *35*(14), S. 4365–4374, DOI: 10.1021/bi952434q.
- SEHNAL, D., ROSE, A. S., KOČA, J., BURLEY, S. K., VELANKAR, S. (2018): *Mol*: towards a common library and tools for web molecular graphics*, S. 29–33, MolVA '18, Eurographics Association, Goslar.
- SHANK-RETZLAFF, M. L., RANER, G. M., COON, M. J., SLIGAR, S. G. (1998): *Membrane Topology of Cytochrome P450 2B4 in Langmuir–Blodgett Monolayers*, Archives of Biochemistry and Biophysics, *359*(1), S. 82–88, DOI: 10.1006/abbi.1998.0889.
- SHINODA, W. (2016): *Permeability across lipid membranes*, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, *1858*(10), S. 2254–2265, DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.03.032.
- SIKES, H. D., SCHWARTZ, D. K. (1997): *Two-dimensional melting of an anisotropic crystal observed at the molecular level*, Science, *278*(5343), S. 1604–1607, DOI: 10.1126/science.278.5343.1604.
- SIMEONOV, P., WERNER, S., HAUPT, C., TANABE, M., BACIA, K. (2013): *Membrane protein reconstitution into liposomes guided by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy*, Biophysical Chemistry, *184*, S. 37–43, DOI: 10.1016/j.bpc.2013.08.003.
- SMITH, E. M., HENNEN, J., CHEN, Y., MUELLER, J. D. (2015): *Z-scan fluorescence profile deconvolution of cytosolic and membrane-associated protein populations*, Analytical Biochemistry, *480*, S. 11–20, DOI: 10.1016/j.ab.2015.03.030.

- SMOLUCHOWSKI, M. V. (1906): *Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen*, Annalen der Physik, 326(14), S. 756–780, DOI: 10.1002/andp.19063261405.
- SPRANGERS, J., RABOUILLE, C. (2015): *SEC16 in COPII coat dynamics at ER exit sites*, Biochemical Society Transactions, 43(1), S. 97–103, DOI: 10.1042/BST20140283.
- STOKES, G. G. (1851): *On the Effect of the Internal Friction of Fluids on the Motion of Pendulums*, Transactions of the Cambridge Philosophical Society, IX, S. 8–106.
- STOKES, G. G. (1852): *XXX. On the Change of Refrangibility of Light*, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 142, S. 463–562, DOI: 10.1098/rstl.1852.0022.
- SU, Y., MANI, R., HONG, M. (2008): *Asymmetric Insertion of Membrane Proteins in Lipid Bilayers by Solid-State NMR Paramagnetic Relaxation Enhancement: A Cell-Penetrating Peptide Example*, Journal of the American Chemical Society, 130(27), S. 8856–8864, DOI: 10.1021/ja802383t.
- SUTHERLAND, W. (1905): *LXXV. A dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin*, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 9(54), S. 781–785, DOI: 10.1080/14786440509463331.
- TIESSEN, A., PÉREZ-RODRÍGUEZ, P., DELAYE-ARREDONDO, L. J. (2012): *Mathematical modeling and comparison of protein size distribution in different plant, animal, fungal and microbial species reveals a negative correlation between protein size and protein number, thus providing insight into the evolution of proteomes*, BMC Research Notes, 5(1), S. 1–22, DOI: 10.1186/1756-0500-5-85.
- TRÄGÅRDH, J., MACRAE, K., TRAVIS, C., AMOR, R., NORRIS, G., WILSON, S. H., OPPO, G.-L., MCCONNELL, G. (2015): *A simple but precise method for quantitative measurement of the quality of the laser focus in a scanning optical microscope*, Journal of Microscopy, 259(1), S. 66–73, DOI: 10.1111/jmi.12249.
- TÖRÖK, P., HIGDON, P. D., WILSON, T. (1998): *Theory for confocal and conventional microscopes imaging small dielectric scatterers*, Journal of Modern Optics, 45(8), S. 1681–1698, DOI: 10.1080/09500349808230662.
- VALEUR, B. (2001): *Molecular Fluorescence*, 1. Aufl., Wiley-VCH.
- VAVILOV, S. I. (1922): *XXIX. The Dependence of the Intensity of the Fluorescence of Dyes upon the Wave-Length of the Exciting Light*, The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 43(254), S. 307–320, DOI: 10.1080/14786442208565217.
- SEMBU, S. (1961): *FOURIER TRANSFORMATION OF THE n -DIMENSIONAL RADIAL DELTA FUNCTION*, Quarterly Journal of Mathematics, 12, S. 165–168, DOI: 10.1093/qmath/12.1.165.
- VRÂNCEANU, M., WINKLER, K., NIRSCHL, H., LENEWEIT, G. (2008): *Surface Rheology and Phase Transitions of Monolayers of Phospholipid/Cholesterol Mixtures*, Biophysical Journal, 94(10), S. 3924–3934, DOI: 10.1529/biophysj.107.104851.
- WAAGE, P., GULDBERG, C. M. (1865): *Studier over Affiniteten*, S. 35–45, Brøgger & Christie, Oslo.

- WAHL, M., GREGOR, I., PATTING, M., ENDERLEIN, J. (2003): *Fast calculation of fluorescence correlation data with asynchronous time-correlated single-photon counting*, Optics Express, 11(26), S. 3583–3591, DOI: 10.1364/oe.11.003583.
- WANG, B., KUO, J., BAE, S. C., GRANICK, S. (2012): *When Brownian diffusion is not Gaussian*, Nature Materials, 11(6), S. 481–485, DOI: 10.1038/nmat3308.
- WANG, T., YAO, H., HONG, M. (2013): *Determining the depth of insertion of dynamically invisible membrane peptides by gel-phase ^1H spin diffusion heteronuclear correlation NMR*, Journal of Biomolecular NMR, 56(2), S. 139–148, DOI: 10.1007/s10858-013-9730-1.
- WEDLER, G. (2004): *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 5. Aufl., Wiley-VCH.
- WEIDEMANN, T., WACHSMUTH, M., TEWES, M., RIPPE, K., LANGOWSKI, J. (2002): *Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, Single Molecules, 3(1), S. 49–61, DOI: 10.1002/1438-5171(200204)3:1<49::AID-SIMO49>3.0.CO;2-T.
- WEISS, J. N. (1997): *The Hill equation revisited: uses and misuses*, The FASEB Journal, 11(11), S. 835–841, DOI: 10.1096/fasebj.11.11.9285481.
- WENNMALM, S. (2018): *Potentials and pitfalls of inverse fluorescence correlation spectroscopy*, Methods, 140–141, S. 23–31, DOI: 10.1016/j.ymeth.2018.01.005.
- WERNER, S., EBENHAN, J., HAUPT, C., BACIA, K. (2018): *A Quantitative and Reliable Calibration Standard for Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*, ChemPhysChem, 19(24), S. 3436–3444, DOI: 10.1002/cphc.201800576.
- WIDENGREN, J., METS, U., RIGLER, R. (1995): *Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study*, Journal of Physical Chemistry, 99(36), S. 13.368–13.379, DOI: 10.1021/j100036a009.
- WISEMAN, T., WILLISTON, S., BRANDTS, J. F., LIN, L.-N. (1989): *Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter*, Analytical Biochemistry, 179(1), S. 131–137, DOI: 10.1016/0003-2697(89)90213-3.
- WOHLAND, T., RIGLER, R., VOGEL, H. (2001): *The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy*, Biophysical Journal, 80(6), S. 2987–2999, DOI: 10.1016/S0006-3495(01)76264-9.
- WYMAN, J., GILL, S. J. (1990): *Binding and Linkage*, University Science Books, Mill Valley.
- ZHANG, B., LAN, T., HUANG, X., DONG, C., REN, J. (2013): *Sensitive Single Particle Method for Characterizing Rapid Rotational and Translational Diffusion and Aspect Ratio of Anisotropic Nanoparticles and Its Application in Immunoassays*, Analytical Chemistry, 85(20), S. 9433–9438, DOI: 10.1021/ac4023956.
- ZUSTIAK, S., RILEY, J., BOUKARI, H., GANDJBAKHCHE, A., NOSSAL, R. (2012): *Effects of multiple scattering on fluorescence correlation spectroscopy measurements of particles moving within optically dense media*, Journal of Biomedical Optics, 17(12), S. 1–9, DOI: 10.1117/1.JBO.17.12.125004.
- ØKSENDAL, B. (2003): *Stochastic Differential Equations*, 5. Aufl., Springer, Berlin.

Teil IV.

Anhang

A. Daten

	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient
\hat{X}_g	0,59	0,015	0,025
\hat{X}_r	1,07	0,023	0,021
X_g	0,68	0,005	0,007
X_r	1,16	0,008	0,007
$\hat{\Omega}_g$	0,88	0,023	0,026
$\hat{\Omega}_r$	0,92	0,025	0,027
$\bar{\Omega}$	0,90	0,010	0,011
$\hat{\tau}_{D,g}/\text{ms}$	1,64	0,060	0,036
$\hat{\tau}_{D,r}/\text{ms}$	2,34	0,087	0,037
$\hat{\tau}_{D,x}/\text{ms}$	2,13	0,065	0,030
$\hat{\tau}_{D,r}/\hat{\tau}_{D,g}$	1,43	0,029	0,020
$\hat{\tau}_{D,x}/\tau_{D,x}$	1,07	0,019	0,018
\hat{r}_V/nm	68,0	2,47	0,036
$\lambda_{\hat{r}_V}$	9,68	0,745	0,077

Tabelle A.1.: Für Objektiv 1 an 19 unabhängig präparierten zweifarbigen DOPC-Vesikelproben (je 0,025% β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈, Lipidkonzentrationen von 0,05 mmol/L bis 0,25 mmol/L) bestimmte Messgrößen der dcFCCS-Experimente. Die Rechnungen wurden jeweils mit den exakten Werten durchgeführt und für die Tabelle gerundet.

	Objektiv 1	Objektiv 2	Objektiv 4
\hat{X}_g	0,74	0,71	0,81
\hat{X}_r	1,08	0,91	0,94
X_g	0,77	0,82	0,91
X_r	1,14	1,11	1,02
Ω_g	0,96	0,87	0,89
Ω_r	0,95	0,82	0,92
$\bar{\Omega}$	0,96	0,85	0,91
$\hat{\tau}_{D,g}/\text{ms}$	3,29	3,36	3,80
$\hat{\tau}_{D,r}/\text{ms}$	4,36	4,14	4,14
$\hat{\tau}_{D,x}/\text{ms}$	3,43	3,54	3,60
$\hat{\tau}_{D,r}/\hat{\tau}_{D,g}$	1,33	1,23	1,09
$\hat{\tau}_{D,x}/\tau_{D,x}$	0,90	0,94	0,91
\hat{r}_V/nm	132	139	139
$\lambda_{\hat{r}_V}$	38,9	45,1	43,8

Tabelle A.2.: Für die drei untersuchten Objektive an einer einzigen zweifarbigen DOPC-Vesikelprobe (je 0,025 % β -BODIPY FL C₁₂-HPC und DiD-C₁₈, Lipidkonzentration 0,25 mmol/L) bestimmte Messgrößen der dcFCCS-Experimente. Die Rechnungen wurden jeweils mit den exakten Werten durchgeführt und für die Tabelle gerundet. Objektiv 4 ist ein anderes Objektiv als Objektiv 3 und wurde aufgrund seines höheren Qualitätsfaktors zwischenzeitlich gegen dieses ausgetauscht.

B. Abbildungen

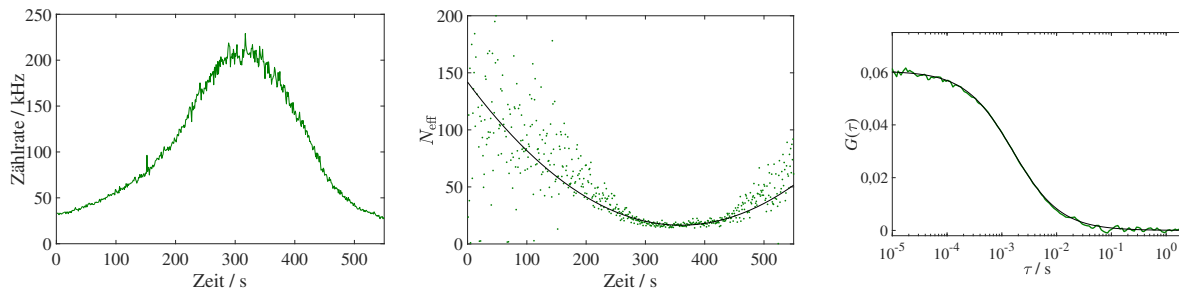


Abbildung B.1.: Einbauexperimente mit Sar1p und unmarkierten Monoschichten aus *Major-Minor-Mix*. Ergänzende Kurven der zweiten Präparation in Abb. 6.12.

Links: Fluoreszenzzählrate des markierten Sar1p während eines Fokusbereichdurchlaufs.

Mitte: Effektive Teilchenzahlen aus den mit einem Korrelationsfenster der Länge 1 s ausgewerteten FCS-Kurven (grün) und daran angepasste Parabel zur Bestimmung des Minimums (schwarz).

Rechts: Beispielhafte Korrelationskurven aus dem Zentrum der Durchlaufkurven (grün, zur Verminderung des Rauschens über 10 s) und daran angepasste theoretische Autokorrelationsfunktion nach Gl. 3.161 (schwarz).

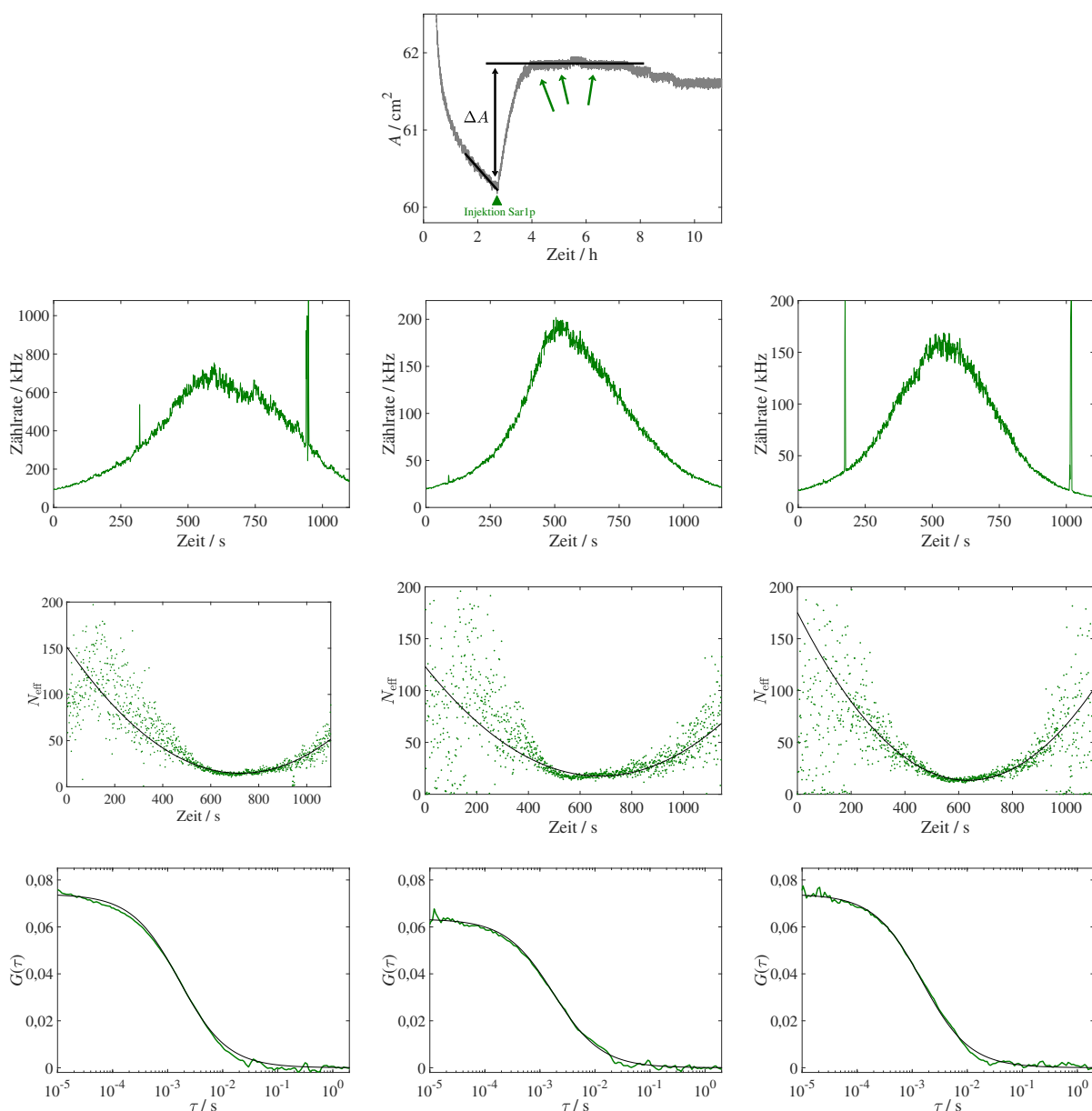


Abbildung B.2.: Einbauexperimente mit Sar1p und unmarkierten Monoschichten aus *Major-Minor-Mix*.

Ergänzende Präparation zu Abb. 6.12.

Erste Reihe: Makroskopische Filmfläche als Funktion der Zeit. Der Zeitpunkt der Injektion von Sar1p (grünes Dreieck) in die Subphase, der Zeitpunkt der FCS-Messungen (grüner Pfeil) und die zur weiteren Berechnung herangezogene Flächenänderung ΔA sind markiert.

Zweite Reihe: Fluoreszenzzählrate des markierten Sar1p während eines Fokusbereichs.

Dritte Reihe: Effektive Teilchenzahlen aus den mit einem Korrelationsfenster der Länge 1 s ausgewerteten FCS-Kurven (grün) und daran angepasste Parabel zur Bestimmung des Minimums (schwarz).

Vierte Reihe: Beispielhafte Korrelationskurven aus dem Zentrum der Durchlaufkurven (grün, zur Verminderung des Rauschens über 10 s) und daran angepasste theoretische Autokorrelationsfunktion nach Gl. 3.161 (schwarz).

C. Quellcode

C.1. *multiple tau*-Korrelator

```
1 function [tau ,G0 ,count]=FCCS(b,n ,segzeit , off_t ,maxseg ,kreuz ,graph , varargin)
2 %b,n: parameters for multiple-tau algorithm (bin size is multiplied with b
   every n values of tau), most often 2 and 8 are used
3 %segzeit: length of segments the whole measurement is cut into in seconds; set
   to 'inf' if whole measurement should be correlated into one ACF
4 %only one correlation time vector tau will be used, so setting segzeit to 'inf'
   and having measurements of different lengths will result in an error!
5 %off_t: this time in seconds will be cut from the beginning of every
   measurement
6 %maxseg: cut every measurement into maximum of maxseg segments (the residual
   data is ignored), 'inf' to use all available data
7 %kreuz: 1 for FCCS, 0 for FCS
8 %graph: 1 for graph figures of ACF for every measurement, 0 otherwise
9 %without varargin, a GUI is opened to choose measurement files
10 %varargin: 1. argument: path for 1st (or only) channel (character vector)
11 %varargin: 2. argument: file names for 1st (or only) channel (cell array of
   character vectors)
12 %varargin: 3. argument: path for 2nd channel (character vector); only if kreuz
   ==1
13 %varargin: 4. argument: file names for 2nd channel (cell array of character
   vectors); only if kreuz==1
14 if size(varargin ,2)<2
15     [file ,path ,~]=uigetfile('*', 'Choose measurement raw-data for first channel'
   , 'MultiSelect', 'on'); %ask with GUI if file names not in varargin
16 else
17     path=varargin{1};
18     file=varargin{2};
19 end;
20 if ~ischar(path)
21     return;
22 end;
23 file2=[];
24 if kreuz
25     if size(varargin ,2)<4
26         [file2 ,path2 ,~]=uigetfile('*', 'Choose measurement raw-data for second
   channel', 'MultiSelect', 'on'); %same for 2nd channel in FCCS
27     else
28         path2=varargin{3};
29         file2=varargin{4};
```

```

30     end;
31     if ~ischar(path2)
32         return;
33     end;
34     while (numel(file)~=numel(file2)&&iscell(file)&&iscell(file2))||(iscell(
        file)~=iscell(file2)) %ask again if different number of files in both
        channels
35         [file2 ,path2 ,~]= uigetfile('*','Choose measurement raw-data for second
            channel','MultiSelect','on');
36     end;
37 end;
38 if ~iscell(file)
39     file={file};
40     file2={file2};
41 end;
42 G0=cell(numel(file),1);
43 tau=[];
44 count=G0; %count-rate in Hz
45 f=20e6; %detector frequency; can be read from raw-files if necessary!; here 50
        ns bins
46 segbins=floor(segzeit*f); %transform segzeit to whole bins
47 if isnan(maxseg)||maxseg<=0 %unify maxseg
48     maxseg=inf;
49 end;
50 if ~isinf(segzeit) %tau can be determined before looking at measurements, if
        preset segzeit is used
51     kmax=ceil(log((segbins*(b-1)-n*(b-2))*b^2/(b*(n-1)+1))/log(b)); %maximal
        number of batches of n tau-values (bin sizes increased from n==3)
        necessary to reach segzeit
52     kmax=real(kmax); %log produces kmax+0*i sometimes
53     if segbins<n %if one batch minimum
54         kmax=1;
55     end;
56     tau=zeros(kmax*n,1);
57     tau(1:2*n)=0:2*n-1; %first two batches linearly increasing tau
58     for k=3:kmax
59         expo=b^(k-2); %bin size multipliers
60         tau(n*(k-1)+1:n*k)=tau(n*(k-1))+(expo/b:expo:expo*(n-1+1/b)); %example
            for n==3, b==2: tau=[0 1 2 3 4 5 6 8 10 12 16 20 24 32 40 .. ]
61     end;
62     tau(tau>segbins)=[]; %cut all tau-values that exceed segzeit
63 end;
64 h=waitbar(0,['Datei 1 / ',num2str(numel(file)),' Segment 0 / 0'],'Name','
        Bitte warten...','CreateCancelBtn','setappdata(gcf,'canceling',1)'); %
        waitbar for all segments in one measurement
65 for ndat=1:numel(file)
66     offbins=floor(off_t*f); %transform offset to whole bins; done very file
        since set to 0 when used
67     if getappdata(h,'canceling') %interspersed multiple times to abort
        immediately when cancel button pressed by user

```

```

68     break;
69 end;
70 segtot=0; %total number of segments generated, to be compared with maxseg
71 fid=fopen([path, file{ndat}]);
72 fseek(fid,32*4,-1); %skip file header
73 dat=dir([path, file{ndat}]);
74 if dat.bytes/4<33 %file contains no actual data
75     fclose('all');
76     continue;
77 end;
78 [~,mem]=memory;
79 teiler=ceil(dat.bytes/(mem.PhysicalMemory.Available/2*0.75)); %file read in
    parts if too big; max. 3/4 of free RAM, 1/2 since double format takes
    twice the memory
80 if kreuz
81     fid2=fopen([path2, file2{ndat}]); %open second file for FCCS
82     fseek(fid2,32*4,-1);
83     dat2=dir([path2, file2{ndat}]);
84     if dat2.bytes/4<33
85         fclose('all');
86         continue;
87     end;
88     teiler=ceil((dat.bytes+dat2.bytes)/(mem.PhysicalMemory.Available
        /2*0.75)); %sum of data from both channels determines behaviour
89 end;
90 tdiff=0; %difference between nominal ending time of last part and arrival
    time of its last photon
91 tdiff2=0; %same in 2nd channel
92 maxteiler=teiler+1-(teiler==1); %additional iteration for leftover data (e.
    g. if last part can't fit one more segment -> last segment loaded from
    file as extra part)
93 for teil=1:maxteiler
94     if getappdata(h, 'canceling')
95         break;
96     end;
97     if segtot>=maxseg %stop if enough segments generated
98         break;
99     end;
100    if teil==teiler+1
101        phot=double(fread(fid, '*uint')); %read remainder of file in last
            part
102    else
103        phot=double(fread(fid, floor((dat.bytes/4-32)/teiler), '*uint')); %
            convert to double to not lose photons to large integer not
            representable in float
104    end;
105    phot=cumsum(phot)-tdiff; %cumsum to have arrival time relative to start
        of part (stored as time between photons in raw-file); subtract
        tdiff so part starts at t==0

```

```

106     if (phot(end)<offbins+segbins)&&offbins>0&&~isinf(segzeit) %go to next
107         part if offset + one segment is longer than this part
108         offbins=offbins-phot(end); %offset is reduced by lenth of this part
109         ; no special consideration of 2nd channel!
110         continue;
111     end;
112     ueberhang=0; %is set to 1 if last segment of this part is slightly too
113     short
114     phot=phot(phot>offbins)-offbins; %all photons in offset are dropped
115     if isinf(segzeit)
116         segbins=phot(end); %segment length equals length of measurement
117         anzseg=1; %only one segment
118         if teil==1 %tau is calculated from length of first file
119             kmax=ceil(log((segbins*(b-1)-n*(b-2))*b^2/(b*(n-1)+1))/log(b));
120             kmax=real(kmax);
121             if segbins<n
122                 kmax=1;
123             end;
124             tau=zeros(kmax*n,1);
125             tau(1:2*n)=0:2*n-1;
126             for k=3:kmax
127                 expo=b^(k-2);
128                 tau(n*(k-1)+1:n*k)=tau(n*(k-1))+(expo/b:expo:expo*(n-1+1/b)
129                 );
130             end;
131             tau(tau>segbins)=[];
132         end;
133     else
134         anzseg=floor(phot(end)/segbins); %floor for whole segments
135         if floor(phot(end)*1.01/segbins)>anzseg %to avoid chopping 59.999s
136             measurement into 2x20s and throwing away one third
137             anzseg=anzseg+1;
138             ueberhang=1;
139         end;
140         if anzseg==0 %if not even one segment fits into RAM, allow for 5%
141             slack...
142             if floor(phot(end)/segbins*1.05)==0 %but not more
143                 continue;
144             else
145                 anzseg=1;
146                 ueberhang=1;
147             end;
148         end;
149     end;
150     if kreuz %same for 2nd channel
151         if teil==teiler+1
152             phot2=double(fread(fid2, '*uint'));
153         else
154             phot2=double(fread(fid2, floor((dat2.bytes/4-32)/teiler), '*uint'
155             ));

```

```

149     end;
150     phot2=cumsum(phot2)-tdiff2;
151     phot2=phot2(phot2>offbins)-offbins;
152     if isinf(segzeit)
153         if phot2(end)<phot(end) %shortest channel determines segment
154             length
155             segbins=phot2(end);
156         end;
157     else
158         if phot2(end)<phot(end)
159             anzseg=floor(phot2(end)/segbins); %shortest channel
160             determines number of segment
161             if floor(phot2(end)*1.01/segbins)>anzseg
162                 anzseg=anzseg+1;
163                 ueberhang=1;
164             end;
165         end;
166         if anzseg==0
167             if floor(phot2(end)/segbins*1.05)==0
168                 continue;
169             else
170                 anzseg=1;
171                 ueberhang=1;
172             end;
173         end;
174     end;
175     cut=length(phot2)-sum(phot2<anzseg*segbins); %number of photons
176     that didn't fit into the segments
177     phot2=phot2(1:end-cut); %drop those photons from calculation in
178     this part
179     tdiff2=anzseg*segbins-phot2(end); %see above
180     if ueberhang==1
181         tdiff2=0;
182     end;
183     fseek(fid2,-cut*4,0); %roll back file position indicator to catch
184     dropped photons in next part; one photon takes up 4 bytes!
185 end;
186 offbins=0; %since offset has been used up already
187 if segtot+anzseg>maxseg %reduce number of segments to remaining number
188 til maxseg
189     anzseg=maxseg-segtot;
190     teiler=teiler-1; %just for the waitbar
191 end;
192 segtot=segtot+anzseg; %update segtot
193 cut=length(phot)-sum(phot<anzseg*segbins); %same for 1st channel
194 phot=phot(1:end-cut);
195 tdiff=anzseg*segbins-phot(end);
196 if ueberhang==1
197     tdiff=0; %important to avoid negative values in phot in next part!
198     tdiff could be higher than arrival time difference between last

```

```

                photon here and first in next part!
192     end;
193     fseek(fid,-cut*4,0);
194     if teil==1 %initialize variables in 1st part...
195         seg0=0;
196         G0{ndat}=zeros(length(tau),anzseg);
197         count{ndat}=zeros(anzseg,1+kreuz); %for FCCS count-rate has 2
                channels
198     else
199         seg0=size(G0{ndat},2); %and concatenate new data after that
200         G0{ndat}=[G0{ndat},zeros(length(tau),anzseg)];
201         count{ndat}=[count{ndat};zeros(anzseg,1+kreuz)];
202     end;
203     if teil==teiler+1
204         waitbar(seg0/(seg0+anzseg),h,['Datei ',num2str(ndat),' / ',num2str(
                numel(file)),' Segment ',num2str(seg0),' / ',num2str(seg0+
                anzseg)]);
205     else
206         waitbar(seg0/(seg0+anzseg*(teiler-teil+1)),h,['Datei ',num2str(ndat)
                ],' / ',num2str(numel(file)),' Segment ',num2str(seg0),' / '
                ,num2str(seg0+anzseg*(teiler-teil+1))]);
207     end;
208     for seg=1:anzseg
209         if getappdata(h,'canceling')
210             break;
211         end;
212         cum=phot(phot>(seg-1)*segbins&phot<=seg*segbins)-(seg-1)*segbins; %
                extract appropriate photons for segment and start at t==0
213         count{ndat}(seg0+seg,1)=length(cum)/cum(end)*f; %number of photons
                divided by bins to last one times frequency equals Hertz
214         if kreuz
215             cum2=phot2(phot2>(seg-1)*segbins&phot2<=seg*segbins)-(seg-1)*
                segbins; %same for 2nd channel
216             count{ndat}(seg0+seg,2)=length(cum2)/cum2(end)*f;
217         end;
218         w=ones(length(cum),1); %number of photons per bin, at smallest bin
                size only one possible (with this detector!)
219         if kreuz
220             w2=ones(length(cum2),1); %same for 2nd channel
221         end;
222         G=zeros(length(tau),1);
223         s1=G; %sum of photons in first part of correlation
224         s2=G; %second part can have different count-rate: asymmetric
                normalization (misleadingly called 'symmetric' in literature,
                rather 'symmetrizing')
225         if kreuz
226             for i=1:length(tau) %used part of measurement depends on tau-
                value and so does the count-rate
227                 expo=b.^floor(max((i-1)/n-1,0));

```



```

228     s1(i)=sum(cum>=tau(i)&floor(cum/expo)<floor(cum(end)/expo))
        ; %for higher bin sizes the last bin extends over end
        of segment is is ignored in calculation (but never
        dropped!)
229     s2(i)=sum(cum2<=floor(cum2(end)/expo)*expo-tau(i)); %floor
        takes into account the allocation of photons to higher
        bin sizes that happens later on
230     end;
231     else
232     for i=1:length(tau)
233         expo=b.^floor(max((i-1)/n-1,0));
234         s1(i)=sum(cum>=tau(i)&floor(cum/expo)<floor(cum(end)/expo))
            ;
235         s2(i)=sum(cum<=floor(cum(end)/expo)*expo-tau(i));
236     end;
237 end;
238 for k=1:kmax
239     expo=b^(k-2);
240     if k==1
241         expo=1;
242     end;
243     if kreuz
244         for i=n*(k-1)+1:min(n*k, length(tau))
245             if getappdata(h, 'canceling')
246                 break;
247             end;
248             G(i)=schnitt3_cross(cum(1:end-1),cum2(1:end-1)+tau(i),w
                (1:end-1),w2(1:end-1)); %end-1 to ignore last
                incomplete bin
249             G(i)=G(i)*floor(((cum(end)+cum2(end))/2-tau(i))/expo)/
                s1(i)/s2(i)-1; %floor for when channels last
                photons are in different bins
250         end;
251     else
252     for i=n*(k-1)+1:min(n*k, length(tau))
253         if getappdata(h, 'canceling')
254             break;
255         end;
256         G(i)=schnitt3(cum(1:end-1),tau(i),w(1:end-1));
257         G(i)=G(i)*(cum(end)-tau(i))/expo/s1(i)/s2(i)-1; %(cum(
            end)-tau(i))/expo equals number of bins (at current
            size) minus one for the last incomplete bin
258     end;
259 end;
260 cum=floor(cum/b^(k-1))*b^(k-1); %time points are rounded to new
        bin size
261 seq=[1;diff(cum)]; %unique time points at new bin size are
        found by looking for non-zero differences
262 seq=seq~=0;
263 cum=cum(seq); %only unique time points kept

```

```

264         seq=cumsum(seq); %bins with same time point get same number
265         w=accumarray(seq,w'); %weights for same time points are summed
           -> photons are pooled in bigger bins
266         if kreuz %same for 2nd channel
267             cum2=floor(cum2/b^(k-1))*b^(k-1);
268             seq=[1; diff(cum2)];
269             seq=seq~=0;
270             cum2=cum2(seq);
271             seq=cumsum(seq);
272             w2=accumarray(seq,w2');
273             if length(w2)<2 %stop when not enough bins after pooling
274                 break;
275             end;
276         end;
277         if length(w)<2 %same for 2nd channel
278             break;
279         end;
280     end;
281     G(isnan(G))=0; %remove divisions by zero and 0/0 cases
282     G(isinf(G))=0;
283     G0{ndat}{:,seg0+seg}=G;
284     if graph %plot all segments of all aprts of current file in one
           graph
285         if seg==1&&teil==1
286             figure;
287             ax=gca;
288             semilogx(ax,tau/f,G);
289             hold on;
290             xlabel('\tau / s');
291             ylabel('G(\tau)');
292             title(['FCS der ',num2str(ndat),'. Messung']);
293         else
294             semilogx(ax,tau/f,G);
295         end;
296     end;
297     if teil==teiler+1
298         waitbar((seg0+seg)/(seg0+anzseg),h,['Datei ',num2str(ndat),' /
           ',num2str(numel(file)),' Segment ',num2str(seg0+seg),' /
           ',num2str(seg0+anzseg)]);
299     else
300         waitbar((seg0+seg)/(seg0+anzseg*(teiler-teil+1)),h,['Datei ',
           num2str(ndat),' / ',num2str(numel(file)),' Segment ',
           num2str(seg0+seg),' / ',num2str(seg0+anzseg*(teiler-teil+1))
           ]]);
301     end;
302 end;
303 clear phot phot2
304 end;
305 fclose('all');
306 end;

```

```

307 tau=tau/f; %convert tau from bins to seconds
308 if isinf(segzeit) %average all parts of each file if maximal correlation time
    is wanted
309     if kreuz
310         G0=cellfun(@(x,y)mean((x+1).*y(:,1)'.*y(:,2)')^2)/mean(y(:,1))/mean(y
            (:,2))-1,G0,count,'UniformOutput',0); %numerator and denominator
            must be averaged separately!
311     else
312         G0=cellfun(@(x,y)mean((x+1).*y'.^2,2)/mean(y)^2-1,G0,count,'
            UniformOutput',0);
313     end;
314     count=cellfun(@(x)mean(x,1),count,'UniformOutput',0); %average count-rates
315 end;
316 delete(h);
317
318 function [G]=schnitt3(v,t,w) %finds coincidences in time point vectors v
    with v+t and sums product of weights w for both
319 %is faster for lots of missing time points in v (mostly darkness) than
    expanding v with zeros and directly use sum(v(t:end).*v(1:end-t))
320 n1=1;n2=1;G=0;
321 l=length(v);
322 while (n1<=l&& n2<=l) %as long as indices n1 and n2 are lower than length...
323     if (v(n1)>v(n2)+t) %alternately increase the one with earlier time
324         n2=n2+1;
325     elseif v(n1)<v(n2)+t
326         n1=n1+1;
327     else
328         G=G+w(n1)*w(n2); %add correlation if photons came at same time
329         n1=n1+1;
330         n2=n2+1;
331     end
332 end
333 end
334
335 function [G]=schnitt3_cross(v1,v2,w1,w2) %same with different channels
336 n1=1;n2=1;G=0;
337 l1=length(v1);
338 l2=length(v2);
339 while (n1<=l1&& n2<=l2)
340     if (v1(n1)>v2(n2))
341         n2=n2+1;
342     elseif v1(n1)<v2(n2)
343         n1=n1+1;
344     else
345         G=G+w1(n1)*w2(n2);
346         n1=n1+1;
347         n2=n2+1;
348     end
349 end
350 end

```

351
352 end

C.2. Anpassung F(C)CS-Daten

```

1  function [varargout]=FCCS_Fit(tau0,G0,anf,ende,fun,param,fit,zus,S0,Sfit,Szus,
   Off,graph,varargin)
2  %tau0: correlation time vector; same dimension as fitted diffusion times!;
   separately in cells for different lengths of the ACFs
3  %G0: ACFs as vectors in cells or one matrix with 1st dimension the same as tau0
4  %anf: vector of starting points for fitting (index of respective tau0); scalar
   value is expanded for all ACFs
5  %ende: vector of end points for fitting (index of respective tau0); scalar
   value is expanded for all ACFs; NaN is converted to last point of
   respective tau0
6  %fun: dimensionality of used Gaussian PSF and diffusion model (1: 2D, 2: 3D)
7  %param: matrix of start parameters (1st dimension: different species, 2nd
   dimension: different quantities (Neff,tauD,triplet fraction, triplet
   lifetime),
8  %3rd dimension: different ACFs); quantities not used (like triplet if not
   wanted) are just omitted!
9  %for multiple species particle numbers are apparent numbers with equal
   brightness assumed!
10 %if 3rd dimension is omitted, same start parameters are used for all
   measurements
11 %fit: same size as param, 1 if parameter fitted, 0 if parameter to be kept
   constant, 3rd dimension automatically copied if omitted
12 %zus: same size as param, 1 if parameter to be fitted globally for all curves
   in ACF, 0 if individual fits, no 3rd dimension!
13 %S0: starting values for structure parameter in 3D
14 %Sfit: 0 if S not fitted, 1 otherwise; can only be scalar!
15 %Szus: 1 for global fit of S, 0 otherwise
16 %Off: 1 for fitting of offset, 0 otherwise; starting value always zero and no
   global fit possible!
17 %graph: graph with data and residuals for every image in ACF generated if 1,
   not if 0
18 %varargin: possible weighting vector, separately in cells for different lengths
   of the ACFs
19 %depending on 'fun' varargout is to be set as 'param,Off' for 2D or as 'param,
   S0,Off' for 3D
20 options=optimset('Display','off','MaxFunEvals',inf,'MaxIter',inf); %change
   stopping criteria if fit too slow; but sometimes needed for many parameters
21 if ~iscell(G0)
22     G0=mat2cell(G0,size(G0,1),ones(size(G0,2),1)); %matrix is split into cells
23     tau0={tau0};
24 end;
25 if ~iscell(tau0)
26     tau0={tau0};

```

```

27 end;
28 if iscell(G0)&&length(G0)~=length(tau0)
29     tau0= repmat(tau0(1), size(G0)); %first tau replicated for all ACFs
30 end;
31 fit=(~zus).* fit; %fit needs to be 0 if zus is 1
32 Szus= Szus*~ Sfit; %same for S
33 mess= max(numel(G0)); %number of ACFs
34 if size(param,3)==1 %if param is 2D matrix, it's expanded to correctly sized 3D
    matrix, otherwise must be same size as number of ACFs
35     param= repmat(param, [1,1, mess]);
36 end;
37 if size(fit,3)==1 %if fit is 2D matrix, it's expanded to correctly sized 3D
    matrix, otherwise must be same size as number of ACFs
38     fit= repmat(fit, [1,1, mess]);
39 end;
40 if isscalar(S0) %if S0 is scalar, it's expanded to correctly sized vector,
    otherwise must be same size as number of ACFs
41     S0= S0*ones(mess,1);
42 end;
43 if isscalar(ende) %if ende is scalar, it's expanded to correctly sized vector,
    otherwise must be same size as number of ACFs
44     ende= repmat(ende, mess,1);
45 end;
46 ende(isnan(ende))= cellfun(@length, tau0(isnan(ende))); %all NaNs are converted
    to fit til end of tau
47 if isscalar(anf) %if anf is scalar, it's expanded to correctly sized vector,
    otherwise must be same size as number of ACFs
48     anf= repmat(anf, mess,1);
49 end;
50 if all(zus(:)==0)&&Szus==0&&mess>1 %running loop over independent fits is
    faster than one huge fit
51     param0= param;
52     Off0= Off;
53     S00= S0;
54     for i=1:mess
55         if fun==1
56             [param0(:,:,i), Off0(i,1)]= FCCS_Fit(tau0{i}, G0{i}, anf(i), ende(i), fun
                , param(:,:,i), fit(:,:,i), zus, S0(i), Sfit, Szus, Off, graph, varargin
                );
57         else
58             [param0(:,:,i), S00(i,1), Off0(i,1)]= FCCS_Fit(tau0{i}, G0{i}, anf(i),
                ende(i), fun, param(:,:,i), fit(:,:,i), zus, S0(i), Sfit, Szus, Off,
                graph, varargin);
59         end;
60     end;
61     if fun==1
62         varargout={param0, Off0};
63     else
64         varargout={param0, S00, Off0};
65     end;

```

```
66     return;
67 end;
68 anz=size(param,1); %number of species
69 f1=sum(fit(:)); %number of separately fitted parameters
70 Off0=zeros(mess,1);
71 trip=false; %triplet only used if enough parameters in param
72 if size(param,2)>=3
73     trip=true;
74 end;
75 lb0=[0,0]; %generic lower bounds
76 ub0=[20000,100]; %generic upper bounds
77 if trip
78     lb0=[lb0,0,0];
79     ub0=[ub0,1,0.001];
80 end;
81 lb0=lb0(ones(1,anz),:,ones(1,mess)); %bounds repeated for global fit of
    multiple ACFs
82 ub0=ub0(ones(1,anz),:,ones(1,mess));
83 start1=param(logical(fit)); %start parameters for lsqnonlin extracted
84 start1=start1(:)';
85 start2=param(logical(zus));
86 start2=start2(:)';
87 lb1=lb0(logical(fit));
88 lb1=lb1(:)';
89 ub1=ub0(logical(fit));
90 ub1=ub1(:)';
91 lb2=lb0(logical(zus));
92 lb2=lb2(:)';
93 ub2=ub0(logical(zus));
94 ub2=ub2(:)';
95 if Sfit
96     start1=[start1,S0']; %multiple start parameters...
97     lb1=[lb1,ones(1,mess)*0];
98     ub1=[ub1,ones(1,mess)*20];
99 elseif Szus
100     start1=[start1,S0(1)]; %or nly one if global fit
101     lb1=[lb1,0];
102     ub1=[ub1,20];
103 end;
104 if Off
105     start1=[start1,Off0'];
106     lb1=[lb1,-ones(1,mess)]; %offset between -1 and 1
107     ub1=[ub1,ones(1,mess)];
108 end;
109 start=[start1,start2]; %globally fitted parameters added behind
110 lb=[lb1,lb2];
111 ub=[ub1,ub2];
112 if isempty(start) %if only graph is wanted and all parameters are fixed
113     start=0;
114 end;
```

```

115 if isempty (lb)
116     start=0;
117 end;
118 if isempty (ub)
119     start=0;
120 end;
121 G1=[]; %all fitted data will be concatenated in here...
122 SD=[]; %along with weighting vectors
123 if ~isempty (varargin)&&~isempty (varargin{1}) %test both since varargin gets
    repackaged in recursive call
124     SD0=varargin{1};
125     if ~iscell (SD0) %either one cell per ACF...
126         if isvector (SD0)
127             SD0= repmat ({SD0 (:)}, mess); %or one vector...
128         else
129             SD0= mat2cell (SD0, size (SD0,1), ones (mess,1)); % or matrix with 2dn
                dimension equal to number of ACFs
130         end;
131     end;
132 end;
133 for i=1:mess
134     G1=[G1;G0{i}(anf(i):ende(i))]; %ok<#AGROW> %ACF cropped to anf and ende
135     if ~isempty (varargin)&&~isempty (varargin{1})
136         SD=[SD;SD0{i}(anf(i):ende(i))];
137     else
138         SD=[SD;ones(ende(i)-anf(i)+1,1)]; %equal weights if no extra data
                specified in varargin
139     end;
140 end;
141 lsqnonlin (@(x)(FCSvar2(x)-G1)./SD, start, lb, ub, options); %result not assigned,
    since param is changed from inside FCSvar2
142 if graph
143     for i=1:mess
144         x1=tau0{i}(anf(i):ende(i));
145         G2=FCSvar(x1, param (:, :, i), S0(i), Off0(i));
146         figure; subplot (3,1,[1,2]); %subplot with ACF and fit on top and
                residuals below
147         semilogx(x1, G0{i}(anf(i):ende(i)), x1, G2);
148         xlabel ('\tau / s');
149         ylabel ('G(\tau)');
150         subplot (3,1,3);
151         semilogx(x1, G0{i}(anf(i):ende(i))-G2);
152         ylabel ('residuals');
153         xlabel ('\tau / s');
154     end;
155 end;
156 if fun==1
157     varargout={param, Off0};
158 else
159     varargout={param, S0, Off0};

```

```

160 end;
161
162 function [G2]=FCSvar2(x)
163 param(logical(fit))=x(1:f1); %fitted parameters are updated from lsqnonlin'
   s variable x
164 if any(zus(:))
165     param(logical(repmat(zus,[1,1,mess])))=repmat(x(f1+(Sfit+Off)*mess+Szus
   +1:end),1,mess); %global parameters are copied for all ACFs
166 end;
167 if Sfit
168     S0=x(f1+1:f1+mess); %same for S
169 elseif Szus
170     S0=x(f1+1)*ones(mess,1);
171 end;
172 if Off
173     Off0=x(f1+Sfit*mess+Szus+1:f1+(Sfit+1)*mess+Szus); %same for offset
174 end;
175 G2=[];
176 for m=1:mess
177     G2=[G2;FCSvar(tau0{m}(anf(m):ende(m)),param(:,m),S0(m),Off0(m))]; %
   simulated ACFs are concatenated
178 end;
179 end
180
181 function [G]=FCSvar(tau,par,S0,Off0)
182 tau1=tau(:)*ones(1,anz);
183 N=par(:,1);tD=par(:,2);
184 N=ones(length(tau),1)*N(:)';
185 tD=ones(length(tau),1)*tD(:)';
186 if ~trip
187     if fun==2
188         G=1/sum(par(:,1))^2*sum(N./(1+tau1./tD)./sqrt(1+tau1./tD/S0^2),2)+
   Off0; %3D without triplet
189     elseif fun==1
190         G=1/sum(par(:,1))^2*sum(N./(1+tau1./tD),2)+Off0; %2D without
   triplet
191     end;
192 else
193     xT=par(:,3);tT=par(:,4);
194     xT=ones(length(tau),1)*xT(:)';
195     tT=ones(length(tau),1)*tT(:)';
196     if fun==2
197         G=1/sum(par(:,1))^2*sum(N./(1+tau1./tD)./sqrt(1+tau1./tD/S0^2).*(1+
   xT./(1-xT).*exp(-tau1./tT)),2)+Off0; %3D with triplet
198     elseif fun==1
199         G=1/sum(par(:,1))^2*sum(N./(1+tau1./tD).*(1+xT./(1-xT).*exp(-tau1./
   tT)),2)+Off0; %2D with triplet
200     end;
201 end;
202 end

```


203 end

C.3. RICS-Korrelator

```

1  function [ACF0]=RICS(data,dim1,dim2,bg,varargin)
2  %data: image stack as intensity values, stacked in 3rd dimension, will be made
   square!
3  %dim1: keep correlation from -dim1 to dim1 in 1st dimension
4  %dim2: same in 2nd direction
5  %bg: scalar background intensity
6  %varargin: 1. argument: use images from this pixel on in 1st dimension ('anf1')
7  %varargin: 2. argument: use images from this pixel on in 2nd dimension ('anf2')
8  %varargin: 3. argument: use images for this number of pixels in each direction
   ('len')
9  seite=size(data,2);
10 anz=size(data,3);
11 if nargin>5
12     anf1=round(abs(varargin{1}));
13     anf2=round(abs(varargin{2}));
14     len=round(abs(varargin{3}));
15     if anf1==0
16         anf1=1;
17     end;
18     if anf2==0
19         anf2=1;
20     end;
21     if len+anf1>seite || len+anf2>seite
22         return;
23     end;
24     seite=len;
25 else
26     anf1=1;
27     anf2=1;
28 end;
29 if isnan(dim1)
30     dim1=seite-1;
31 end;
32 if isnan(dim2)
33     dim2=seite-1;
34 end;
35 ACF0=zeros(2*dim1+1,2*dim2+1,anz,1); %correlation in both directions -> twice
   the size + zero-value
36 for i=1:anz
37     l=data(:,: ,i);
38     l(:,1:(size(l,2)-size(l,1)))=[]; %makes it square
39     l=double(l);
40     l=l(anf1:anf1+seite-1,anf2:anf2+seite-1); %crop image
41     norm=[1:seite,seite-1:-1:1]*[1:seite,seite-1:-1:1]; %normalize by number
   of used pixels

```

```

42 F2D=fft2(1,2*seite-1,2*seite-1); %correlation by IFT of product of FT of
    image (convolution theorem)
43 ACF=fftshift(iff2(F2D.*conj(F2D))); %fftshift moves zero-value to middle
44 temp=cumsum(cumsum(1,2),1); %normalize by division with summed intensity
    for both shifted image parts
45 A=zeros(2*seite-1,2*seite-1); %same size as ACF
46 A(seite:2*seite-1,seite:2*seite-1)=temp(end:-1:1,end:-1:1); %fill every
    quadrant separately with correctly summed intensities
47 A(1:seite,1:seite)=cumsum(cumsum(1(end:-1:1,end:-1:1),2),1);
48 temp=cumsum(cumsum(1(end:-1:1,:),2),1);
49 A(1:seite,seite:end)=temp(:,end:-1:1);
50 temp=cumsum(cumsum(1(:,end:-1:1),2),1);
51 A(seite:end,1:seite)=temp(end:-1:1,:);
52 ACF=ACF./A./A(end:-1:1,end:-1:1);
53 ACF=ACF.*norm-1; %divide numerator by norm and denominator by norm^2; -1
    for ACF(inf)->0
54 ACF(A==0)=0; %remove infinities
55 ACF(A(end:-1:1,end:-1:1)==0)=0;
56 ACF=ACF.*A.*A(end:-1:1,end:-1:1)./(A-bg)./(A(end:-1:1,end:-1:1)-bg); %
    correct amplitude for background
57 ACF0(:,:,i)=ACF(seite-dim1:seite+dim1,seite-dim2:seite+dim2); %crop ACF
58 end;
59 end

```

C.4. Anpassung RICS-Daten

```

1 function [varargout]=RICS_Fit(ACF,ende1,ende2,aver,tauP,tauZ,b,fun,param,fit,
    zus,graph)
2 %ACF: RICS-data as coming from correlation function (individual iamges in 3rd
    dimension), can be oblong
3 %ende1: ACF is cropped to middle - ende1 to middle + ende1 in 1st dimension
4 %ende2: ACF is cropped to middle - ende2 to middle + ende2 in 2nd dimension
5 %aver: moving mean average over 3rd dimension of ACF with window length of aver
6 %tauP: pixel dwell time in seconds
7 %tauZ: line dwell time in seconds
8 %b: pixel size; determines unit of focus radius
9 %fun: dimensionality of used Gaussian PDF (1: 2D, 2: 3D)
10 %param: matrix of start parameters (1st dimension: different species, 2nd
    dimension: different quantities (Neff,tauD,omega0,offset,structure
    parameter S,triplet fraction, triplet lifetime in s),
11 %3rd dimension: different images); quantities not used (like S in 2D) are just
    omitted!
12 %Neff becomes apparent particle number for multiple species; use 1./Neff as
    amplitudes then
13 %if 3rd dimension is omitted, same start parameters are used for all
    measurements
14 %fit: same size as param, 1 if parameter fitted, 0 if parameter to be kept
    constant, 3rd dimension automatically copied if omitted

```

```

15 %zus: same size as param, 1 if parameter to be fitted globally for all images
    in ACF, 0 if individual fits, no 3rd dimension!
16 %graph: graph with data and residuals for every image in ACF generated if 1,
    not if 0
17 options=optimset('Display','off');
18 fit=(~zus).*fit; %fit needs to be 0 if zus is 1
19 mess=size(ACF,3); %number of images
20 if aver>mess
21     disp('aver longer than number of images in ACF'); %error if aver too long
22     return;
23 end;
24 if aver>1&&aver<=mess
25     ACF=movmean(ACF,aver,3); %moving mean in 3rd dimension
26 end;
27 if length(tauP)==1 %if tauP is scalar, it's expanded to correctly sized vector,
    otherwise must be same size as 3rd dimension of ACF
28     tauP=tauP*ones(mess,1);
29 end;
30 if length(tauZ)==1 %same
31     tauZ=tauZ*ones(mess,1);
32 end;
33 if length(b)==1 %same
34     b=b*ones(mess,1);
35 end;
36 if size(param,3)==1 %same
37     param= repmat(param,[1,1,mess]);
38 end;
39 if size(fit,3)==1 %same
40     fit= repmat(fit,[1,1,mess]);
41 end;
42 if all(zus(:)==0)&&mess>1
43     param0=param;
44     for i=1:mess %running loop over independent fits is faster than one huge
        fit
45         [param0(:,:,i)]=RICS_Fit(ACF(:,:,i),ende1,ende2,1,tauP(i),tauZ(i),b(i),
            fun,param(:,:,i),fit(:,:,i),zus,graph);
46     end;
47     varargout={param0};
48     return;
49 end;
50 anz=size(param,1); %number of species
51 f1=sum(fit(:)); %number of separately fitted parameters
52 mitte1=(size(ACF,1)+1)/2;
53 mitte2=(size(ACF,2)+1)/2;
54 if isnan(ende1)
55     ende1=(size(ACF,1)-1)/2;
56 end;
57 if isnan(ende2)
58     ende2=(size(ACF,2)-1)/2;
59 end;

```

```
60 trip=false; %triplet only used if enough parameters in param
61 lb0=[0,0,0,-10]; %generic lower bounds
62 ub0=[10000,1,1000,10]; %generic upper bounds
63 if fun==1&&size(param,2)==6
64     trip=true;
65 end;
66 if fun==2
67     lb0=[lb0,0];
68     ub0=[ub0,20];
69     if size(param,2)==7
70         trip=true;
71     end;
72 end;
73 if trip
74     lb0=[lb0,0,0];
75     ub0=[ub0,1,0.001];
76 end;
77 lb0=lb0(ones(1,anz),:,:ones(1,mess)); %bounds repeated for global fit of
    multiple images
78 ub0=ub0(ones(1,anz),:,:ones(1,mess));
79 start1=param(logical(fit)); %start parameters for lsqnonlin extracted
80 start1=start1(:)';
81 start2=param(logical(zus));
82 start2=start2(:)';
83 lb1=lb0(logical(fit));
84 lb1=lb1(:)';
85 ub1=ub0(logical(fit));
86 ub1=ub1(:)';
87 lb2=lb0(logical(zus));
88 lb2=lb2(:)';
89 ub2=ub0(logical(zus));
90 ub2=ub2(:)';
91 start=[start1,start2]; %globally fitted parameters added behind
92 lb=[lb1,lb2];
93 ub=[ub1,ub2];
94 if isempty(start) %if only graph is wanted and all parameters are fixed
95     start=0;
96 end;
97 if isempty(lb)
98     start=0;
99 end;
100 if isempty(ub)
101     start=0;
102 end;
103 [X,Y]=meshgrid(-ende2:ende2,-ende1:ende1); %pixel shift coordinates generated
104 W=ones(size(ACF));
105 W(mitte1,mitte2)=0; %used to ignore noisy zero-shift correlation
106 ACF(mitte1,mitte2)=0;
107 ACF=ACF(mitte1-ende1:mitte1+ende1,mitte2-ende2:mitte2+ende2,:); %ACF is cropped
```

```

108 W=W(mitte1-ende1:mitte1+ende1,mitte2-ende2:mitte2+ende2,:); %weights are
      cropped
109 [x,~,res]=lsqnonlin(@(x)(RICSvar(x)-ACF).*W,start,lb,ub,options); %result only
      assigned for graph, since param is changed from inside RICSvar
110 if graph
111     l1=RICSvar(x);
112     for i=1:mess
113         figure;subplot(3,1,[1,2]); %subplot with ACF and fit on top and
      residuals below
114         surf(X(:,1:ende2+1),Y(:,1:ende2+1),l1(:,1:ende2+1,i));
115         hold;
116         surf(X(:,ende2+1:end),Y(:,ende2+1:end),ACF(:,ende2+1:end,i));
117         xlabel('\xi');
118         ylabel('\eta');
119         zlabel('ACF');
120         subplot(3,1,3);
121         surf(X,Y,res(:, :, i));
122         zlabel('residuals');
123         xlabel('\xi');
124         ylabel('\eta');
125     end;
126 end;
127 varargout={param};
128
129 function [ACF1]=RICSvar(x)
130 param(logical(fit))=x(1:f1); %fitted parameters are updated from lsqnonlin'
      s variable x
131 if any(zus(:))
132     param(logical(repmat(zus,[1,1,mess])))=repmat(x(f1+1:end),1,mess); %
      global parameters are copied for all images
133 end;
134 ACF1=repmat(X*0+Y*0,[1,1,mess]); %initialized with zeros
135 for m=1:mess
136     for j=1:anz %contributions of all species are summed
137         tau=abs(X)*tauP(m)+abs(Y)*tauZ(m); %total time shift calculated
      from pixel shifts in both dimensions
138         if ~trip
139             if fun==1
140                 ACF1(:, :, m)=ACF1(:, :, m)+1/param(j,1,m)./(1+tau/param(j,2,m)
      ).*exp(-1./(1+tau/param(j,2,m)).*((X.^2+Y.^2)*b(m)^2/
      param(j,3,m)^2))+param(j,4,m); %2D without triplet
141             elseif fun==2
142                 ACF1(:, :, m)=ACF1(:, :, m)+1/param(j,1,m)./(1+tau/param(j,2,m)
      )./sqrt(1+tau/param(j,2,m)/param(j,5,m)^2).*exp(-1./(1+
      tau/param(j,2,m)).*((X.^2+Y.^2)*b(m)^2/param(j,3,m)^2))
      +param(j,4,m); %3D without triplet
143             end;
144         else
145             if fun==1
146                 xT=param(j,5,m);tT=param(j,6,m); %to shorten it

```

```
147     ACF1(:, :, m) = ACF1(:, :, m) + (1 + xT / (1 - xT) * exp(-tau / tT)) / param(j
      , 1, m) ./ (1 + tau / param(j, 2, m)) .* exp(-1 ./ (1 + tau / param(j, 2, m)
      )) .* ((X.^2 + Y.^2) * b(m)^2 / param(j, 3, m)^2) + param(j, 4, m);
      %2D with triplet
148     elseif fun == 2
149         xT = param(j, 6, m); tT = param(j, 7, m);
150         ACF1(:, :, m) = ACF1(:, :, m) + (1 + xT / (1 - xT) * exp(-tau / tT)) / param(j
      , 1, m) ./ (1 + tau / param(j, 2, m)) ./ sqrt(1 + tau / param(j, 2, m) /
      param(j, 5, m)^2) .* exp(-1 ./ (1 + tau / param(j, 2, m))) .* ((X.^2 + Y
      .^2) * b(m)^2 / param(j, 3, m)^2) + param(j, 4, m); %3D with
      triplet
151         end;
152     end;
153 end;
154 end;
155 end
156
157 end
```

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Ebenhan
Vorname Jan
Geburtsdatum 25.02.1988
Geburtsort Wolfen
Staatsangehörigkeit Deutsch
Familienstand Ledig

Schulbildung

1994 – 1998 **Grundschule I**, Wolfen-Nord
1998 – 2000 **Sekundarschule I**, Wolfen-Nord
2000 – 2007 **Heinrich-Heine-Gymnasium**, Wolfen-Nord
07 / 2007 **Abschluss Abitur**, Note 1,0

Akademischer Werdegang

2007 – 2010 **Bachelorstudium der Chemie**, *MLU Halle-Wittenberg*,
Halle (Saale)
09 / 2010 **Abschluss Bachelor of Science**, *Physikalische Chemie (AG Blume)*,
Note 1,4
2010 – 2012 **Masterstudium der Chemie**, *MLU Halle-Wittenberg*, Halle (Saale)
12 / 2012 **Abschluss Master of Science**, *Physikalische Chemie (AG Blume)*,
Note 1,1
04 / 2013 – jetzt **Promotion**, *Physikalische Chemie (AG Bacia)*, *MLU Halle-
Wittenberg*, Halle (Saale)

Publikationen

D. Krüger*, J. Ebenhan*, S. Werner, K. Bacia: Measuring Protein Binding to Lipid Vesicles by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, *Biophysical Journal* **2017**, *113*, 1

S. Werner, J. Ebenhan, M. Poppe, S. Poppe, H. Ebert, C. Tschierske, K. Bacia: Effects of Lateral and Terminal Chains of X-Shaped Bolapolyphiles with Oligo(phenylene ethynylene) Cores on Self-Assembly Behavior. Part 2: Domain Formation by Self-Assembly in Lipid Bilayer Membranes, *Polymers* **2017**, *9*, 476

S. Werner*, J. Ebenhan*, C. Haupt, K. Bacia: A Quantitative and Reliable Calibration Standard for Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, *ChemPhysChem* **2018**, *19*, 1

J. Auerswald*, J. Ebenhan*, C. Schwieger, A. Scrimm, A. Meister, K. Bacia: Measuring Protein Insertion Areas in Lipid Monolayers by Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Biophysical Journal* (in Begutachtung)

*Die markierten Autoren sind als gleichberechtigte Erstautoren anzusehen.

Konferenzbeiträge

10. – 11. Oktober 2013 J. Ebenhan, S. Werner, M. Schulz, W. H. Binder and K. Bacia: Probing the membrane structure of hybrid lipid-polymer GUVs on different scales with advanced fluorescence correlation techniques, Vortrag und Poster, *Workshop “Fluorescence Correlation Spectroscopy in Polymer Science”*, München
15. – 19. Februar 2014 J. Ebenhan, S. Werner, M. Schulz, W. H. Binder and K. Bacia: Investigation of hybrid lipid-polymer GUVs by fluorescence correlation spectroscopy, Poster, *58. Biophysical Society Annual Meeting*, San Francisco
1. – 3. September 2014 J. Auerswald, J. Ebenhan, A. Meister, S. Daum, K. Bacia: Scanning through membranes: RICS and FCS on monolayer and bilayer systems, Poster, *Biomembrane Days*, Berlin
14. – 17. September 2014 J. Auerswald, J. Ebenhan, A. Meister, S. Daum, K. Bacia: Scanning through membranes: RICS and FCS on monolayer and bilayer systems, Poster, *DGfB Jahrestagung*, Berlin
7. – 11. Februar 2015 J. Auerswald, J. Ebenhan, S. Daum, K. Bacia: Scanning through membranes: Focus calibration and protein dynamics in monolayer and bilayer systems, Poster, *59. Biophysical Society Annual Meeting*, Baltimore
18. – 22. Juli 2015 J. Auerswald, J. Ebenhan, S. Daum, K. Bacia: FCS Techniques on Monolayer Systems for Measuring Protein Dynamics and Aggregation Behaviour, Poster, *10. European Biophysics Congress*, Dresden
11. – 15. Februar 2017 J. Ebenhan, S. Werner, K. Bacia: Morphology and diffusion behavior in lipid-polymer-membranes made from ternary mixtures, Poster, *61. Biophysical Society Annual Meeting*, New Orleans
20. – 24. Juli 2019 J. Auerswald, J. Ebenhan, C. Schwieger, A. Scrimm, A. Meister, K. Bacia: Measuring Protein Insertion Areas in Lipid Monolayers by Fluorescence Correlation Spectroscopy, Poster, *12. European Biophysics Congress*, Dresden

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir eigenständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt wurde. Zitate sind als solche gekennzeichnet und inhaltliche Übernahmen mit ihrer Herkunft vermerkt. Inhalt und Thema dieser Arbeit waren nicht bereits Gegenstand eines Promotionsverfahrens.

Halle (Saale), den 15. Dezember 2020

Jan Ebenhan