

Untersuchung von Proteinbindung an  
Liposomen mittels  
Fluoreszenzmikroskopie und dcFCCS

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat. )

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II  
Chemie, Physik und Mathematik  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von  
Frau Diplom-Biologin Daniela Krüger  
geb. Glatte am 30.09.1981 in Eilenburg

Erstgutachter: Frau Prof. Dr. Kirsten Bacia  
Zweitgutachter: Frau Prof. Dr. Ana Garcia-Saez

Tag der Verteidigung: 31.07.2019

# Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Kirsten Bacia für die Möglichkeit die Arbeit in ihrer Gruppe anfertigen zu dürfen, das dafür entgegengebrachte Vertrauen, die freundliche Unterstützung sowie die hilfreichen Diskussionen.

Ana Garcia-Saez danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Sebastian Daum für das Bereitstellen der gereinigten Proteine, die Hilfestellung rund um die Experimente, und die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse.

Bei Frau Dr. Annette Meister möchte ich mich für die Anfertigung der Elektronenmikroskopieaufnahmen bedanken und für die Erlaubnis die Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit zeigen zu dürfen.

Bei Jan Auerswald bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Proteinaufreinigung des Sar1p und Sec12p $\Delta$ C sowie das zur Verfügung stellen des Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-markierten Sar1p. Außerdem danke ich ihm für seine unermüdlichen Diskussionen, bei denen ab und zu auch ich Recht hatte.

Jan Ebenhan und Stefan Werner danke ich für die vielen Berechnungen und Herleitungen der Bindungsparameter und für die Unterstützung bei der Interpretation meiner dcFCCS-Daten.

Claudia Müller möchte ich für die Durchführung der Phosphattests sowie für ihre Organisation des gesamten Laboralltages danken.

Dr. Caroline Haupt danke ich für die vielen hilfreichen Antworten rund um das Schreiben einer Dissertation und dafür, dass sie immer eine helfende Hand frei hat.

Heike Böcker danke ich für das Aufreinigen des MSP und die Unterstützung bei der Rekonstitution von Nanodiscs.

Mona Groß danke ich für die Hilfe und moralische Unterstützung beim Protein Aufreinigen, teilweise bis in die Nacht hinein.

Annemarie Klatt, allen Mitarbeitern und Studenten der AG Bacia und der ehemaligen AG Tanabe danke ich für ein freundschaftliches und entspanntes Verhältnis und Arbeitsklima.

Rositta Mothes, Dr. Ursula Niesbach-Klösgen, Katja Möritz und Claudia Hochbach danke ich für das Übernehmen der bürokratischen Notwendigkeiten.

Dem GRK1026 und allen seinen Mitgliedern danke ich für die zahlreichen Diskussionen und interessanten Vorträge und nicht zuletzt die finanzielle Unterstützung für einen Teil der Zeit.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meiner Familie, besonders meinem Mann Martin, meiner Tochter Henriette und meinem Sohn Konstantin, aussprechen. Ohne ihren Rückhalt, ihr Verständnis und ihre Liebe hätte ich die Arbeit nicht fertig gestellt.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AH</b>	Amphipathische Helix
<b>AFM</b>	<i>Atomic Force Microscope</i> (Rasterkraftmikroskop)
<b>APD</b>	<i>Avalanche Photo Diode</i> (Lawinenphotodiode)
<b>CCD</b>	<i>Charge-Coupled Device</i> (ladungsgekoppeltes Bauteil in Hochauflösenden Kameras)
<b>COPII</b>	Coat Protein Complex II (Hüllproteinkomplex II)
<b>dcFCCS</b>	<i>dual color Fluorescence Crosscorrelation Spectroscopy</i> (Zwei-Farben Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie)
<b>DIC</b>	<i>Differential Interference Contrast</i> (Differentialinterferenzkontrast)
<b>DLS</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dynamische Lichtstreuung)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ESR</b>	<i>Electron Spin Resonance</i> (Elektronenspinresonanz)
<b>FCS</b>	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> (Fluoreszenzkorrelationspektroskopie)
<b>FLIM</b>	<i>Fluorescence Lifetime Imaging</i> (Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie)
<b>FRAP</b>	<i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i> (Fluoreszenzrückkehr nach Photobleichen)
<b>FRET</b>	Förster-Resonanzenergietransfer
<b>GAP</b>	<i>GTPase Activating Protein</i> (GTPase-aktivierendes Protein)
<b>GEF</b>	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i> (Guaninnukleotidaustauschfaktor)
<b>GUV</b>	<i>Giant Unilamellar Vesicle</i> (Riesige Unilamellare Vesikel)
<b>ITC</b>	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Isothermale Titrationskalorimetrie)
<b>LUV</b>	<i>Large Unilamellar Vesicle</i> (Große Unilamellare Vesikel)
<b>MSP</b>	<i>Membrane Scaffold Protein</i> (Gerüstprotein für Membranen)
<b>NA</b>	Numerische Apertur
<b>NADH</b>	Nikotinamidadenindinukleotid
<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PMT</b>	<i>Photo Multiplier Tube</i> (Sekundärelektronenvervielfältiger-Detektor)
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SPR</b>	<i>Surface Plasmon Resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)
<b>SUV</b>	<i>Small Unilamellar Vesicle</i> (Kleine Unilamellare Vesikel)
<b>TEM</b>	Transmissionselektronenmikroskop
<b>tER</b>	transitorisches Endoplasmatisches Retikulum
<b>TGN</b>	Trans-Golgi-Netzwerk

## Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung
$A_P$	Fläche eines Bindungsplatzes, bzw. Fläche, die ein Protein auf der Vesikeloberfläche einnimmt
$A_L$	Oberfläche einer Lipidkopfgruppe
$A_{\text{Vesikelmembran}}$	Oberfläche der Vesikelmembran
$b_j$	alle Proteine in der FCS, leuchtend und dunkel
$B$	Dauer der Messung
$\langle c \rangle$	mittlere Konzentration der fluoreszierenden Teilchen
$c_i$	Konzentration der verschiedenen Spezies i
$c_j$	Konzentration der verschiedenen Spezies j
$c_{ij}$	Konzentration der Teilchen mit beiden Farbstoffen
$c_{g,0}$	Gesamtkonzentration der grünen Teilchen (entspricht $c_{P,\text{ges}}$ )
$c_{g,\text{free}}$	Konzentration der freien grünen Teilchen (entspricht $c_{P,\text{free}}$ )
$c_x$	Konzentration der doppelt markierten Teilchen
$c_g$	Konzentration aller grünen Teilchen
$c_r$	Konzentration aller roten Teilchen
$c_{\text{ges}}$	Gesamtkonzentration aller Teilchen (allgemein)
$c_{L,\text{tot}}$	Konzentration Gesamtlipid
$c_{L,\text{acc}}$	Konzentration des für das Protein zugänglichen Lipids
$c_{P,b}$	molare Konzentration der membrangebundenen Proteine
$c_{P,\text{free}}$	molare Konzentration des freien Proteins
$c_{P,\text{ges}}$	molare Konzentration aller Proteine in der Lösung (frei und gebunden)
$c_V$	molare Vesikelkonzentration
$c_{Dye}$	Konzentration der markierten Proteine
$d$	$R^4$ gewichteter Durchmesser der Vesikel
$D$	Diffusionskoeffizient
$F(t)$	Fluoreszenzsignal
$\delta F(t)$	Fluktuation des Fluoreszenzsignals
$\langle F(t) \rangle$	zeitliches Mittel des Fluoreszenzsignals
$F_g$	$= \langle F_g(t) \rangle$ , apparente zeitgemittelte Fluoreszenzzählrate des grünen Kanals (Helligkeit im grünen Kanal)
$F_r$	$= \langle F_r(t) \rangle$ , apparente zeitgemittelte Fluoreszenzzählrate des roten Kanals (Helligkeit im roten Kanal)
$F_{\text{Vesikel}}$	Helligkeit aller Vesikel einer Probe
$f_i$	Fraktion der Spezies i
$f_{P,b}$	Fraktion gebundenes Protein
$f_{P,\text{free}}$	Fraktion freies Protein
$g(t)$	Diffusionsterm der Autokorrelationsfunktion
$G(t)$	normierte Autokorrelationsfunktion

Symbol	Bedeutung
$G_{\text{diff}}(\tau)$	Autokorrelation diffundierender Teilchen ohne Berücksichtigung weiterer Prozesse
$G(0)$	Korrelationsamplitude
$G_{\text{trip}}(\tau)$	Korrekturterm für das Triplettblinken des Farbstoffes
$\hat{G}(0)$	wahre Korrelationsamplitude des jeweiligen Kanals
$G^*(0)$	Korrelationsamplitude, unabhängig von der Größe des Detektionsvolumens
$G_r^\ddagger(0)$	rote Autokorrelationsamplitude, unabhängig von der Größe des Detektionsvolumens und der Verteilung der Farbstoffmoleküle
$i$	Vielfaches der Helligkeit eines Farbstoffmoleküls auf den Vesikeln, entspricht den diskreten Helligkeitszahlen im roten Kanal für verschiedene Spezies
$j$	diskrete Helligkeitszahl im grünen Kanal für verschiedene Spezies
$k$	Anzahl Farbstoffmoleküle
$k_D$	mikroskopische Dissoziationskonstante zu einer Bindungsstelle
$K_{D,L}$	Dissoziationskonstante (Protein zu Lipid)
$K_{D,V}$	makroskopische Dissoziationskonstante zu einem Vesikel
$K_P$	molarer Partitionskoeffizient
$K_1$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante gemäß Massenwirkungsgesetz für Protein-Membranbindungsplatzkomplexe
$K_n$	Dissoziationskonstante für die Bindung mehrerer Proteine an einen Vesikel (allgemein)
$l$	Dicke der Lipiddoppelschicht
$m_1$	erstes Moment der Poissonverteilung
$m_2$	zweites Moment der Poissonverteilung
$[M_{\text{free}}]$	Konzentration freie Membranbindungsplätze
$M_{\text{tot}}$	Gesamtkonzentration Membranbindungsplätze
$[MP]$	Konzentration Protein-Membranbindungsplatz-Komplexe (ist gleich Konzentration gebundenes Protein)
$n$	Gesamtzahl Bindungsplätze je Vesikel
$\langle N \rangle$	mittlere Teilchenzahl
$N_{\text{abs}}$	absorbierte Photonen
$N_{\text{em}}$	emittierte Photonen
$N_L$	Anzahl Lipide je Vesikel
$p$	molarer Farbstoffanteil in der Lipidmischung
$P_\lambda(k)$	Poissonverteilung; Wahrscheinlichkeit, mit der ein zufällig gewähltes Vesikel mit $k$ Farbstoffmolekülen beladen ist

Symbol	Bedeutung
$q$	Quantenausbeute
$Q$	Setupspezifischer Qualitätsfaktor
$R$	Radius
$S$	systemabhängiger Strukturparameter
$t$	Zeit
$T$	mittlerer Anteil der Farbstoffmoleküle im Triplettzustand
$V_{\text{eff}}$	Größe des Detektionsvolumens
$[VP_i]$	Konzentration vollständig beladener Vesikel
$[VP_{i-1}]$	Konzentration nicht vollständig beladener Vesikel
$x_{Dye}$	Dotierungsgrad der Proteine
$X_r$	Verhältnis aus der korrigierten Kreuzkorrelationsamplitude zur korrigierten roten Autokorrelationsamplitude
$X_g$	Verhältnis aus der korrigierten Kreuzkorrelationsamplitude zur korrigierten grünen Autokorrelationsamplitude
$z_0$	axiale Ausdehnung des Detektionsvolumens
$Z$	Faktor aus $\alpha$ und $\zeta$
$\alpha$	Anteil bindungsfähiges Protein
$\zeta$	realer Quenchfaktor
$\eta$	Helligkeit
$\eta_{\text{Farbstoff}}$	Helligkeit eines Farbstoffmoleküls auf einem Vesikel
$\theta$	Bindungsgrad als Fraktion besetzte Membranbindungsplätze
$\kappa$	Übersprechverhältnis aus den Helligkeiten des grünen Farbstoffes in beiden Kanälen
$\lambda$	mittlere Anzahl Farbstoffmoleküle pro Vesikel (Erwartungswert und Varianz von $k$ )
$\lambda_g$	mittlere Anzahl grüne Farbstoffmoleküle pro Vesikel
$\lambda_r$	mittlere Anzahl rote Farbstoffmoleküle pro Vesikel
$\Lambda_{acc}$	Lipide je Bindungsplatz einer Lipidschicht
$\Lambda_{Bi}$	Lipide je Bindungsplatz in der Doppellipidschicht
$\Lambda_{\text{Theorie}}$	Lipide je Bindungsplatz aus Proteingröße abgeschätzt
$\mu_2$	zweites zentrales Moment
$\nu_1$	Anteil besetzte Membranbindungsplätze bei 1:1 Bindung
$\nu$	Bindungsgrad in besetzte Membranbindungsplätze je Vesikel
$\tau$	Korrelationszeit
$\tau_{\text{diff}}$	charakteristische Diffusionszeit, während der ein Molekül im Detektionsvolumen verweilt
$\tau_{\text{trip}}$	Relaxationszeit des Triplettzustandes
$\Phi$	Quenchfaktor

Symbol	Bedeutung
$\omega_0$	laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Übergreifende Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1. Zellmembranen und der sekretorische Pfad . . . . .	12
1.2. Der Hüllproteinkomplex II (COPII) . . . . .	13
1.3. <i>In vitro</i> Untersuchungen . . . . .	17
1.4. Zielstellung . . . . .	20
<b>2. Materialien</b>	<b>21</b>
2.1. Chemikalien . . . . .	21
2.2. Verbrauchsmaterialien . . . . .	22
2.3. Geräte . . . . .	23
2.4. Puffer . . . . .	24
2.5. Proteine . . . . .	25
2.5.1. Plasmide . . . . .	27
2.6. Lipide . . . . .	27
2.7. Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	27
<b>3. Theoretische Grundlagen</b>	<b>29</b>
3.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie . . . . .	29
3.1.1. Fluoreszenz . . . . .	29
3.1.2. Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	30
3.2. Fluoreszenzmikroskopie als Erweiterung der Lichtmikroskopie . . . . .	32
3.2.1. Lichtmikroskopie allgemein . . . . .	33
3.2.2. Konfokales Prinzip . . . . .	35
3.2.3. Aufbau des verwendeten Laser Scanning Mikroskops . . . . .	36
3.2.4. Aufbau des verwendeten Spinning Disc Mikroskops . . . . .	36
3.3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Zwei-Farben Fluoreszenz- kreuzkorrelationsspektroskopie (dcFCCS) . . . . .	38
3.3.1. FCS und dcFCCS als Methoden der Einzelmolekülspektroskopie . . . . .	38
3.3.2. FCS-Setup . . . . .	38
3.3.3. FCS-Theorie . . . . .	39
3.4. Bindungstheorie . . . . .	49
3.5. Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	53
<b>4. Bindungsstudien von COPII-Proteinen an GUV mittels qualitativer Fluoreszenz- mikroskopie zur Aufklärung der Vesikelabschnürung</b>	<b>54</b>
4.1. Einleitung zu Bindungsstudien von COPII an GUV mit Hilfe der Fluoreszenz- mikroskopie . . . . .	54

4.2.	Durchführung der Bindungsexperimente . . . . .	56
4.2.1.	GUV-Präparation für die Proteinrekonstitution . . . . .	56
4.2.2.	Proteingewinnung . . . . .	57
4.2.3.	Sar1p-Bindung an wenig gekrümmten Membranen . . . . .	59
4.2.4.	<i>In vitro</i> Rekonstitution der minimalen COPII-Komponenten . . . . .	60
4.2.5.	Konfokale Lichtmikroskopie . . . . .	61
4.2.6.	Negativ-Kontrastierungs- und Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	61
4.3.	Ergebnisse und Diskussion der COPII-Bindung an GUUV . . . . .	62
4.3.1.	Sar1p-Bindung an GUUV . . . . .	62
4.3.2.	COPII-Rekonstitution an GUUV . . . . .	69
4.4.	Zusammenfassung zu den COPII-Bindungsuntersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	79
<b>5.</b>	<b>dcFCCS zur Bestimmung von Bindungskonstanten</b>	<b>82</b>
5.1.	Einleitung zur Bestimmung von Bindungsparametern mittels dcFCCS . . . . .	82
5.2.	Theorie zur Bestimmung von Bindungskonstanten mittels dcFCCS . . . . .	83
5.2.1.	Berücksichtigung probenspezifischer Einflussgrößen . . . . .	85
5.3.	Durchführung der dcFCCS-Messungen . . . . .	87
5.3.1.	Präparation . . . . .	87
5.3.2.	Kalibrierung des FCS-Setups . . . . .	89
5.4.	Ergebnisse und Diskussion der dcFCCS-Messungen . . . . .	90
5.4.1.	Standard-Kreuzkorrelationsproben . . . . .	90
5.4.2.	Vorbereitende Messungen für Bindungsexperimente . . . . .	95
5.4.3.	Bindungsexperimente mit Sar1p an Vesikeln . . . . .	97
5.5.	Zusammenfassung zu den Messungen von Bindungsparametern mit Hilfe der dcFCCS . . . . .	108
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>113</b>
<b>A.</b>	<b>Anhang</b>	<b>114</b>
A.1.	Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	114
A.2.	dcFCCS . . . . .	115
A.2.1.	Abbildungen zu 5.4.1 . . . . .	115
A.2.2.	Abbildungen zu 5.4.3 . . . . .	115
A.2.3.	Abbildungen zu 5.4.3 . . . . .	117
A.2.4.	Herleitung der Gleichung auf Seite 103 . . . . .	118
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>

## Veröffentlichungen

- Kirsten Bacia, Eugene Futai, Simone Prinz, Annette Meister, Sebastian Daum, Daniela Glatte, John A.G. Briggs & Randy Schekman, "*Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes.*", Sci Rep (2011), 17. [1]
- Matthias Schulz, Daniela Glatte, Annette Meister, Peggy Scholtysek, Andreas Kerth, Alfred Blume, Kirsten Bacia & Wolfgang H. Binder, "*Hybrid lipid/polymer giant unilamellar vesicles: effects of incorporated biocompatible PIB-PEO block copolymers on vesicle properties*", Soft Matter (2011), 8100-8110. [2]
- Sebastian Daum, Daniela Krüger, Annette Meister, Jan Auerswald, Simone Prinz, John A.G. Briggs & Kirsten Bacia, "*Insights from reconstitution reactions of COPII vesicle formation using pure components and low mechanical perturbation.*", Biol Chem (2014), 801-812. [3]
- Daniela Krüger, Jan Ebenhan, Stefan Werner & Kirsten Bacia, "*Measuring Protein Binding to Lipid Vesicles By Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*", Biophysical Journal (2017) [4]

# 1. Übergreifende Einleitung

## 1.1. Zellmembranen und der sekretorische Pfad

Alle lebenden Zellen werden von Lipidmembranen umschlossen. Die Plasmamembran bildet die Barriere zur Umwelt. Des Weiteren unterteilen Membranen eukaryotische Zellen in verschiedene Reaktionsräume. In tierischen Zellen sind die bekanntesten Kompartimente neben dem Zellkern das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat und die Mitochondrien. Auch kleinere Zellbestandteile wie Lysosomen und Endosomen sind von Membranen umschlossen. In Pflanzenzellen sind Chloroplasten und Vakuolen ebenfalls membranabgegrenzte Zellorganellen.

Chloroplasten und Mitochondrien sind prokaryotischen Ursprungs und haben eigene DNA und eine zum Teil vom Zellkern unabhängige Proteinbiosynthese. Alle anderen Zellorganellen und -bestandteile sind auf die zentrale Proteinbiosynthese, ausgehend von der DNA des Zellkerns, angewiesen. Nach der Transkription der DNA in RNA im Zellkern bindet die RNA im Zytoplasma an Ribosomen. Anhand von Signalsequenzen wird unterschieden, ob die RNA für Aminosäuresequenzen von löslichen Proteinen des Zytoplasmas, sekretorischen Proteinen oder Membranproteinen codiert. Die Translation in lösliche Proteine findet direkt ins Zytoplasma statt, wo diese nach erfolgter korrekter Faltung der Aminosäureketten verbleiben. Sekretorische, lysosomale und Zellmembran durchspannende Proteine werden an Ribosomen am rauen ER translatiert. Diese Ribosomen lagern sich an sogenannte Translokons an. Ein Translokons ist ein Membranprotein in der ER-Membran, welches die Aminosäurekette direkt nach der Translation in das Innere des ER überführt oder es in die Lipiddoppelschicht einbaut. Auch diese Mechanismen werden über Signalsequenzen in der Aminosäureabfolge gesteuert. Im Lumen des ER werden die Aminosäureketten teilweise mit Hilfe von Chaperonen zu funktionalen Proteinen gefaltet und posttranslational durch die Glykosilierung freier Aminogruppen modifiziert. Damit ist das ER das erste Zellorganell im sekretorischen Pfad einer Zelle und hat eine zentrale Funktion in der Proteinbiosynthese. Das ER spielt ebenfalls eine große Rolle bei der Cholesterol- und Phospholipidsynthese und es dient als Speicherort für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

Vom ER werden Proteine und Lipide über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche oder zu den Zielkompartimenten, wie Lysosomen oder Vakuolen, gebracht. Besonders das Abgeben der Proteine an die Umgebung dient der Kommunikation mit anderen Zellen. Der Transport entlang dieses sekretorischen Pfades wird durch kleine proteinumhüllte Lipidvesikel vermittelt. Diese Vesikel werden von zytoplasmatischen Hüllproteinen gebildet und von der Donormembran abgeschnürt. Drei unterschiedliche Komplexe dieser Hüllproteine sind bisher bekannt. Für den ersten Abschnitt des anterograden Transportes zwischen ER und Golgi-Apparat ist die COPII-Hülle zuständig. Der retrograde Transport,

um beispielsweise ER-ansässige Proteine zurückzuführen, wird durch die COPI-Hülle vermittelt. Die Clathrin-Hülle hingegen transportiert Proteine zwischen dem Golgi-Apparat, Endosomen, Lysosomen, Vakuolen und der Plasmamembran (siehe Abbildung 1.1) [5, 6].

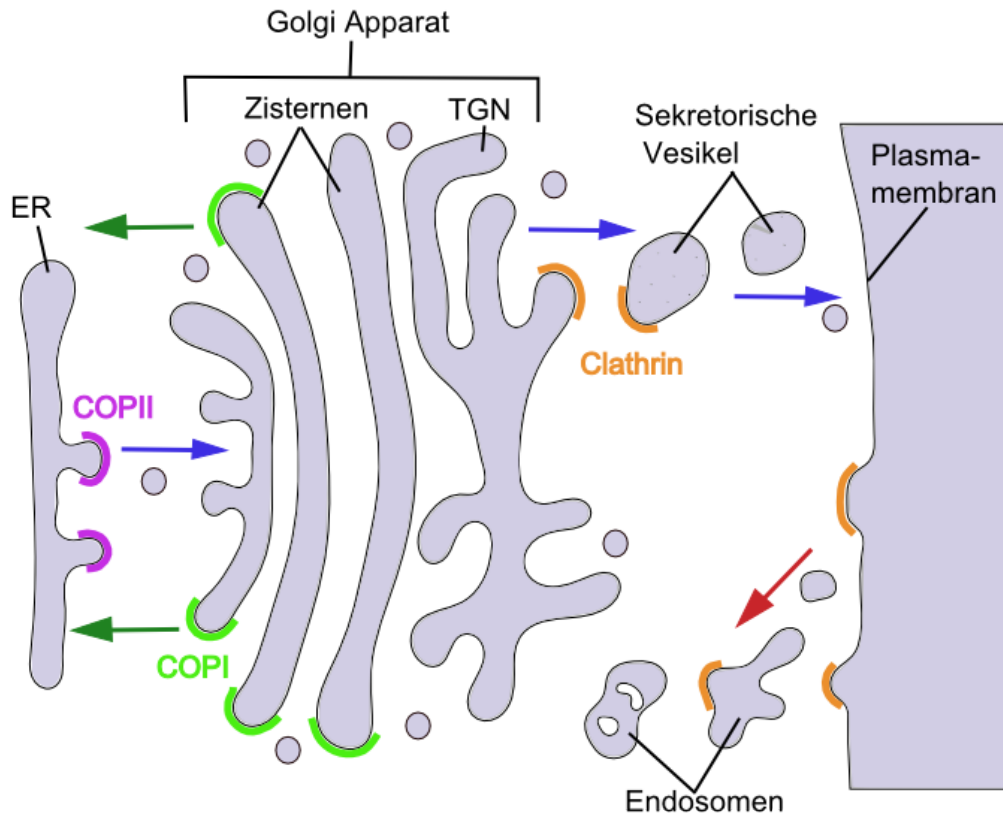


Abbildung 1.1.: **Die Transportwege in der Zelle.** Zwischen ER, Golgi-Apparat, trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und Plasmamembran wird der Transport durch Proteine der COPII- (magenta), COPI- (hellgrün) und Clathrin-Hülle (orange) vermittelt. Blaue Pfeile markieren den anterograden Transport entlang des sekretorischen Pfades, dunkelgrüne Pfeile markieren den retrograden Transport, wodurch Proteine wie Frachtrezeptoren zur Wiederverwendung zurück zum ER transportiert werden. Mit einem roten Pfeil ist der endozytotische Weg gekennzeichnet, der die Aufnahme von Stoffen von außerhalb der Zelle ermöglicht. Der Transport zwischen diesen Kompartimenten findet mit Hilfe kleiner Lipidvesikel statt.

## 1.2. Der Hüllproteinkomplex II (COPII)

Der Transport von Proteinen und Lipiden vom ER zum Golgi-Apparat wird in spezialisierten, ribosomenfreien Bereichen des ER [7], die auch als transitorisches ER (tER) bezeichnet werden, initiiert. Für einen effektiven Transport wird die Fracht ausgewählt

und aufkonzentriert. Des Weiteren wird an den tER sichergestellt, dass ER-ansässige Proteine im ER verbleiben. Allen eukaryotischen Zellen gemein ist die Lokalisation der Proteine des Hüllproteinkomplex II (*Coat Protein Complex II*, COPII), die für die Vesikelbildung zuständig sind, am tER [8, 9, 10, 11].

Der COPII ist für den Transport verschiedenster Proteine und auch Lipide vom ER zum Golgi-Apparat notwendig. Dieser Komplex besteht aus minimal fünf zytosolischen Proteinkomponenten [12]: der kleinen GTPase Sar1, Sec23 und Sec24, die als Heterodimer die innere Hülle bilden und Sec13 und Sec31, die als Heterotetramer zur äußeren Hülle polymerisieren.

In einem ersten Schritt bindet die kleine Ras-ähnliche GTPase Sar1 (*secretion-associated Ras-related 1*) an die ER-Membran. Die treibende Kraft ist hierbei der Austausch von GDP zu GTP im aktiven Zentrum des Proteins. Diese GTP-induzierte Aktivierung bewirkt das Exponieren einer N-terminalen amphipathischen  $\alpha$ -Helix (AH) (Abbildung 1.2), welche sich in die äußere Seite der Lipiddoppelschicht einbettet. Dadurch wird die COPII-Vesikelbiogenese initiiert [13, 14, 15, 16].

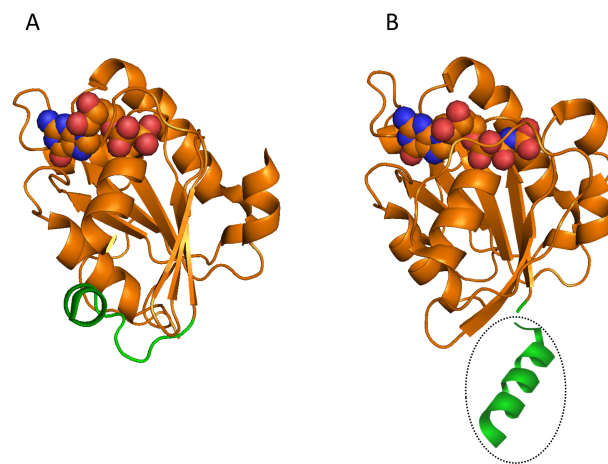


Abbildung 1.2.: **Kristallstruktur des löslichen und membrangebundenen Sar1.** (A) Sar1 in der löslichen Form mit gebundenem GDP (pdb 2GAO). In grün sind die Aminosäurereste 14-25 dargestellt, die einen Teil der AH ausmachen. (B) Sar1 in der aktivierten Form mit gebundenem GMP-PNP (pdb 1M2O). Die Aminosäure 24 ist grün markiert, hier befindet sich die AH (eingekreist), die in dieser aktivierten Form in die Membran eingebettet wird (nachträglich eingezeichnet, nicht in der Kristallstruktur vorhanden). (dargestellt mit PyMOL[17])

Im Folgenden rekrutiert Sar1 das Heterodimer Sec23/Sec24, welches die innere Hülle des Komplexes bildet. Dieses Dimer weist eine konkave Oberfläche auf, mit der es möglicherweise den entstehenden Vesikel stabilisiert (Abbildung 1.3 A) [18]. Der nächste Schritt in der Vesikelbildung ist die Rekrutierung des Heterotetramer Sec13/Sec31 an den Sar1-Sec23-Komplex (Abbildung 1.3 B) [19, 20]. Sec13/Sec31 bildet die äußere Hülle. Es treibt durch Polymerisieren benachbarter Sec23/Sec24-Komplexe die Membrandeformation und die Vesikelknospung weiter voran und stabilisiert diese [21] (Abbildung

1.4). Nachdem alle Proteine des COPII an die Membran gebunden haben kommt es zur Abschnürung des gebildeten Vesikels.

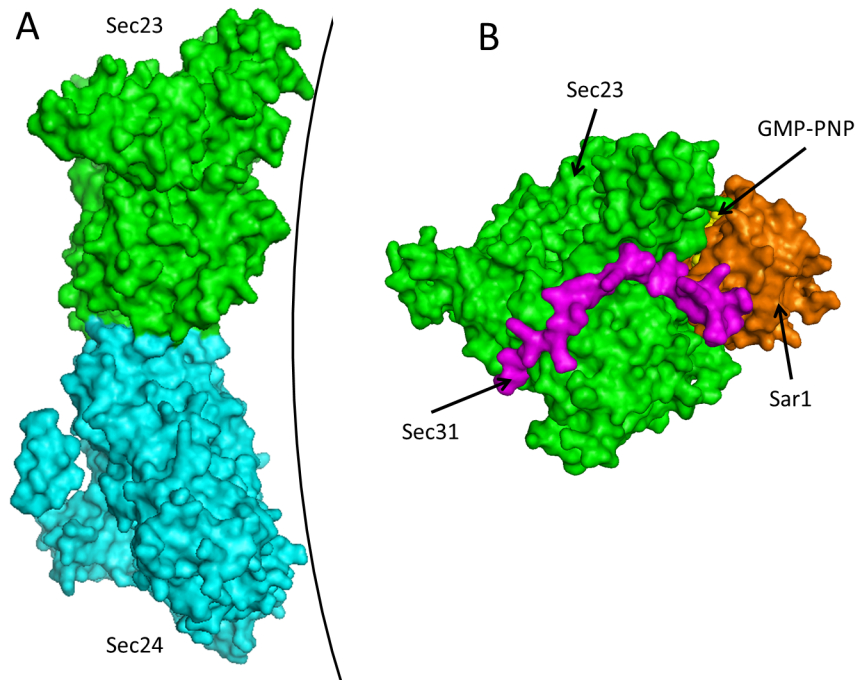


Abbildung 1.3.: **Die innere Hülle.** (A) Die Seitenansicht des Komplexes aus Sec23 (grün) und Sec24 (cyan) in ihrer vermuteten Lage zu einer Membran (Linie rechts) mit der Krümmung eines 60-nm-Vesikels (pdb 1M2V). (B) Kristallstruktur in der Oberflächenansicht des Sec23-Sar1-Komplexes mit einem Sec31-Fragment. Sec23 ist grün, Sar1 orange und das Sec31-Fragment ist magentafarben dargestellt. Sar1 befindet sich in der aktivierten Form mit GMP-PNP (GppNHp, gelb) (pdb 2QTV). Die Membran befindet sich in dieser Darstellung in der Papierebene, unterhalb des Proteins. (dargestellt mit PyMOL[17])

Die Rolle von Sar1 für die Initiierung der Vesikelbildung und die Rekrutierung der Hüllproteine ist gut untersucht und aufgeklärt. Weniger klar ist die Rolle der GTP-Hydrolyse durch das Sar1 bei der Bildung und Abschnürung der Vesikel.

Sar1 besitzt eine niedrige intrinsische Fähigkeit das gebundene GTP zu GDP zu hydrolysieren [22]. Als Folge dieser Hydrolyse kommt es zum Einklappen der AH und damit zur Dissoziation des Sar1 von der ER-Membran. Sec23 hat neben der strukturellen Funktion zusätzlich die Funktion des GTPase aktivierendes Proteins (*GTPase Activating Protein*, GAP). Durch die Interaktion einer Loopregion des Sec23 mit Sar1 und das Einschieben eines Argininrestes des Sec23 in das aktive Zentrum des Sar1 wird die GTP-Hydrolyse beschleunigt [18]. Weiterhin hat Sec13/Sec31 ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf die Hydrolyseaktivität des Sar1. Ein Teil des Sec31 interagiert mit dem Komplex aus Sar1 und Sec23 (Abbildung 1.3 B). Diese Interaktion stimuliert die GAP-Aktivität des Sec23

indem der katalytische Aminosäurerest des Argininingers optimal positioniert wird [20]. Damit wird ein Ansteigen der GTPase-Aktivität des Sar1-Sec23-Komplexes auf das 10-fache erreicht [23]. Dies führt anscheinend zu einem schnellen Abfallen des Sar1 von der Membran, wobei die restliche Hülle um den Vesikel intakt bleibt [24].

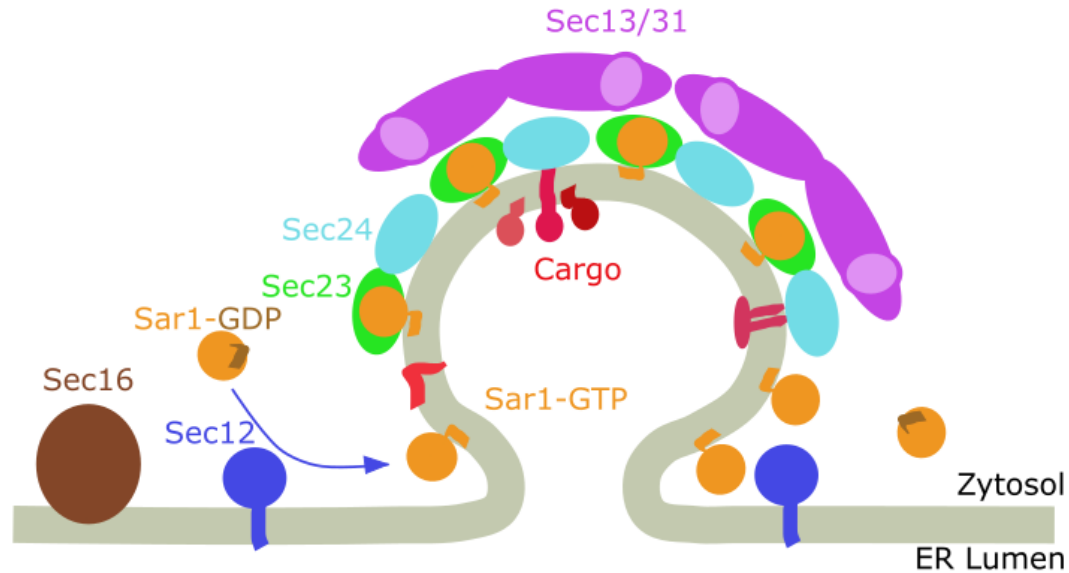


Abbildung 1.4.: **An der COPII-Hülle und dessen Assemblierung beteiligte Proteine.** Nachdem Sar1 (orange) durch den von Sec12 (blau) vermittelten Austausch von GDP zu GTP an die Membran gebunden hat, lagert sich das Heterodimer Sec23/Sec24 (hellgrün/cyan) an die Membran an. Hierbei bindet Sec24 auch Frachtproteine und Frachtrezeptoren (verschiedene, rot). Die Bindung des Heterotetramers Sec13/Sec31 (magenta) stabilisiert die entstandene Vesikelknospe. Weiterhin hat auch das periphere Membranprotein Sec16 (braun) Anteil an der Bindung der COPII-Proteine und dem folgenden Abschnüren eines Vesikels.

Unter Verwendung von nicht-hydrolysierbarem GMP-PNP konnte in Flotations- und Lichtsteuungsexperimenten beobachtet werden, dass diese minimale COPII-Hülle sich *in vitro* auf Membranen zusammen lagern kann [13, 23]. Unter hydrolysierenden Bedingungen hingegen scheint in diesen *in vitro* Experimenten der Proteinkomplex weniger stabil zu sein [23].

In der Zelle liegt das Nukleotid GTP jedoch in seiner hydrolysierbaren Form vor, dennoch kommt es zur Ausbildung von Vesikeln an der ER-Membran.

Dies führt zu der Vermutung, dass *in vivo* noch weitere Faktoren wesentliche Rollen bei der Abschnürung von COPII-Vesikeln spielen. Als weitere Faktoren sind unter anderem Sec12, Sec16, verschiedene Frachtproteine und die Lipidzusammensetzung der Membran denkbar. Bekannt ist, dass der Austausch von GDP zu GTP am Sar1 durch



den Guaninnukleotidaustauschfaktor (*Guanin nucleotide Exchange Factor*, GEF) Sec12 beschleunigt wird [25, 26]. Sec12 ist ein transmembranes Protein, welches nach Abschnürung der Transportvesikel im ER verbleibt [27, 28]. In Bindungsexperimenten *in vitro* mit den Hefeproteinen Sar1p, Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p in Anwesenheit von GTP führte die Zugabe der löslichen Domäne des Sec12p zu einer verlängerten Verweilzeit des COPII auf der Membran. Wahrscheinlich wird durch das wiederholte Beladen des Sar1p mit GTP durch das Sec12p die Dissoziation von der Membran verhindert und die Abschnürung kleiner proteinumhüllter Vesikel ermöglicht [29].

Auch die Frachtproteine und Frachtrezeptoren tragen wahrscheinlich zum Entstehen und Stabilisieren des COPII bei. Sec24 erkennt und bindet über eines seiner drei bekannten, unabhängigen Bindungszentren verschiedene Aminosäuremotive der Frachtproteine [14, 30, 31]. Dadurch selektiert Sec24 den zu transportierenden Vesikelinhalt und reichert ihn an [32, 33, 34]. Durch die Bindung an Frachtmoleküle bleibt Sec23/Sec24 anscheinend trotz mehrerer GTP-Hydrolyse-Zyklen des Sar1 an Liposomen gebunden [35]. Die Anwesenheit von Frachtproteinen scheint die Affinität des Sec23/Sec24 an die Membran auch nach der Hydrolyse von GTP durch Sar1 deutlich zu erhöhen [36]. Ohne Frachtproteine hingegen zerfällt der COPII scheinbar sofort nach der Hydrolyse des GTP und dem damit verbundenen Herauslösen des Sar1 aus der Membran [35].

Ein weiteres Protein, das im Zusammenhang mit den tER und der COPII-Vesikelbildung steht ist Sec16. Das große Multidomänenprotein ist *in vivo* für den Transport aus dem ER wichtig [37]. Es unterstützt die Assemblierung des COPII durch Interaktion mit jeder seiner Komponenten [38, 39, 40, 41, 42, 43] und scheint auch an der Abschnürung der Vesikel von der ER-Membran beteiligt zu sein [39, 44, 42]. Während die COPII-Proteine und die Frachtproteine das ER nach Abschnürung des Vesikels verlassen, bleiben Sec12 und Sec16 als ER-ansässige Proteine an der ER-Membran zurück (Abbildung 1.4).

### 1.3. *In vitro* Untersuchungen

„Selbst die einfachste (lebende) Zelle ist in ihrer Chemie weitaus komplizierter als irgendein bekanntes chemisches System“ [6]. Ausgehend davon hat die Natur durch den Zusammenschluss von Zellen zu Geweben und Organismen diese Komplexität noch weiter erhöht. Biologen, Biochemiker und Mediziner versuchen die Geheimnisse des Lebens seit Jahrhunderten zu entschlüsseln und entwickeln dafür immer neue Möglichkeiten, die Komplexität der Systeme zu Gunsten einer besseren Kontrolle der ablaufenden Prozesse zu verringern (Abbildung 1.5). Für das Beispiel des intrazellulären Transportes zwischen den Zellkompartimenten kann anhand von Krankheitsbildern [45] oder dem gezielten Ausschalten von Genen [46, 47] die Auswirkung auf den gesamten Organismus betrachtet werden. Die Funktion einzelner Komponenten lässt sich aber nur sehr schwer bestimmen. Mit modernen Methoden der Fluoreszenzmikroskopie können Untersuchungen an Zellkulturen schon wesentlich mehr Aufschluss über Lokalisation und Funktion während der Transportprozesse in der Zelle geben [42, 48]. Zellen, deren Membran durch die kurze Einwirkung von Digitonin durchlässig für Puffer und Nukleotide gemacht werden, können genutzt werden um Auswirkung auf eine Störung des zellulären Gleichgewichtes oder

den Einfluss von nicht-hydrolysierbaren GTP-Analoga auf die Transportmechanismen zu betrachten [49]. Alle für den Transportprozess notwendigen Proteine in den Membranen und im Zytosol bleiben erhalten oder können von der Zelle neu synthetisiert werden, wodurch zwar der Einfluss der zugefügten Substanz auf den Gesamtmechanismus untersucht werden kann, nicht aber die Komponente, die unmittelbar beeinflusst wird. Ähnlich verhält es sich bei der Arbeit mit isolierten ER- und Golgi-Membranen sowie Zytosol aus den Zellen, allerdings können in diesem System keine Proteine neu synthetisiert werden. Die Komplexität kann noch um einen weiteren Schritt verringert werden, indem gereinigte Proteine mit künstlichen Liposomen verwendet werden. Hierbei können von der Lipidzusammensetzung bis zu den Pufferbestandteilen alle Chemikalien kontrolliert und auf ihre Auswirkung untersucht werden. So können durch *in vitro* Studien molekulare Modelle bestätigt und verbessert werden, unerwartetes Verhalten kann nur durch bestehende physikalische Regeln erklärt werden und mathematische Modelle, die eine überschaubare Anzahl Variablen benötigen, können angewandt werden [50].

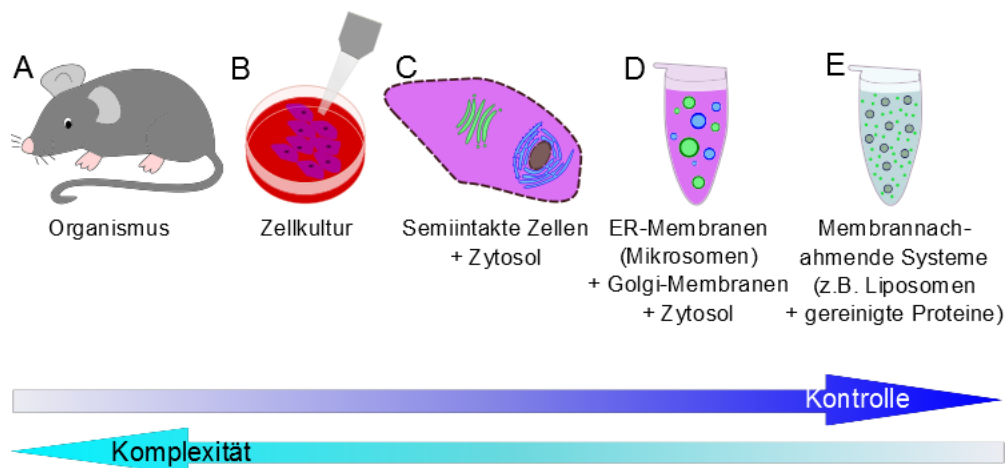


Abbildung 1.5.: **Beispiele für Modelle zur Untersuchung biologischer und biochemischer Fragestellungen.** Je einfacher das System, desto besser lässt es sich kontrollieren. Jedoch geht mit zunehmender Kontrolle die ursprüngliche Komplexität verloren. Das jeweilige Modell muss daher der Fragestellung angepasst werden. Ergebnisse aus rein artifiziellen *in vitro* Versuchen sollten in einem komplexeren Zusammenhang verifiziert werden.

Häufig kommt in *in vitro* Untersuchungen eine Mischung aus den in Abbildung 1.5 D und E dargestellten „Kontrollstufen“ zum Einsatz, in denen Mikrosomen mit gereinigten Proteinen oder künstliche Liposomen in Gegenwart von Zytosol untersucht werden [51]. Auch rein artifizielle Systeme (Abbildung 1.5 E) werden häufig verwendet um einzelne Schritte der Vesikelbildung aufzuklären oder Aussagen über die Strukturen der Proteinkomplexe zu treffen [52, 21, 53]. Für die Untersuchungen der COPII-Hülle sind besonders Liposomen aus Lipidextrakten oder synthetisierten Lipiden weit verbreitet. Diese freistehenden Lipiddoppelschichten wurden oft als kleine und große unilamellare Vesikel in Lichtstreuungs- oder Flotationsuntersuchungen verwendet [13, 23], als riesige Vesikel sind sie bestens für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet [54].

Zwar ist es notwendig die Komplexität eines Systems auf ein Minimum zu reduzieren, um mit mehr Kontrolle bessere Aussagen über einzelne Komponenten zu erlangen. Um aber die Prozesse, die in der Zelle ablaufen verstehen zu können, ist es wichtig zu versuchen die *in vitro* erhaltenen Erkenntnisse *in vivo* zu überprüfen.

## 1.4. Zielstellung

Eines der Ziele dieser Arbeit war es, eine *in vitro* Untersuchungsmethode zu etablieren, mit der die Bindung peripherer Membranproteine, und die dadurch verursachte Strukturänderung, an Riesigen Unilamellaren Vesikeln (GUV) *in situ* und ohne mechanische Manipulation beobachtet werden kann. Diese sollte mit der konfokalen Mikroskopie nicht invasiv visualisiert und qualitativ ausgewertet werden. Als Modellproteine dienten die kleine GTPase Sar1p sowie der gesamte COPII. Der Untersuchungsschwerpunkt lag auf dem Einfluss der Hydrolyse auf die Ausbildung der Membranveränderungen.

Dazu wurden neben einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogen auch nicht hydrolysierende Proteinvarianten untersucht. Es sollte gezeigt werden, ob die Hydrolyse von GTP durch das Sar1p notwendig ist um kleine Vesikel aus den riesigen Liposomen abzuschneiden. Um detailliertere Informationen über die entstehenden Membranstrukturen zu erlangen wurden die Proben ebenfalls in der Elektronenmikroskopie beobachtet. Diese Untersuchungen werden in Kapitel 4 detailliert dargestellt und die Ergebnisse diskutiert.

Da die Sar1-Bindung an die Membran bedeutsam für die COPII-Funktion ist, bestehende Methoden diese aber nur sehr eingeschränkt quantifizieren können sollte in einem zweiten Teil eine auf der Zwei-Farben-Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie basierende Methode experimentell optimiert werden. Damit sollten Bindungsstudien von fluoreszenzmarkierten Proteinen an andersfarbig fluoreszenzmarkierten Vesikeln durchgeführt werden und die zugrundeliegende Theorie angepasst und weiterentwickelt werden. Als Grundlage dienten Arbeiten von Rusu *et al.* und Melo *et al.*, die derartige Bindungsexperimente bereits mit unmarkierten Vesikeln in der Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCS) durchführten [55, 56]. Es sollte gezeigt werden, welche zusätzlichen Informationen aus der Kreuzkorrelationsanalyse zu entnehmen sind, um bessere Aussagen über die Bindungsparameter zuzulassen. Als Modellprotein sollte hier ebenfalls die kleine GTPase Sar1p genutzt werden. Eine Einführung in die Theorie der Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie wird in Abschnitt 3.3.3 gegeben. Die weiterentwickelte Theorie zur Übertragung auf Bindungsmessungen, die erhaltenen Ergebnisse sowie deren Diskussion finden sich in Kapitel 5.

## 2. Materialien

### 2.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden die verwendeten Chemikalien in der Reinheitsstufe p.A. von den Firmen Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Weitere Chemikalien und deren Bezugsquellen waren:

- GDP, GTP und GMP-PNP, Ergosterol, Casein aus Kuhmilch und Bradfordreagenz (Sigma Aldrich, München, Deutschland)
- cOmplete-Protease-Inhibitor (EDTA free), Thrombin (Roche, Basel, Schweiz)
- Benzamidinsepharose (GE Healthcare)
- Phospholipide (Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA)
- Fluoreszenzfarbstoffe (Thermo Fisher (Invitrogen), Carlsbad, Kalifornien, USA)
- Atto633-DMPE (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Deutschland)

Für die Puffer und alle weiteren Anwendungen wurde doppelt entionisiertes Wasser verwendet.

## 2.2. Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller bzw. Lieferant
Deckgläser 1.5	Menzel/ Thermo Fisher Scientific (Braunschweig, Deutschland)
ITO-Beschichtung auf Deckgläsern	GeSim (Großerkmannsdorf, Deutschland)
Glasspritzen	Hamilton (Bonaduz, Schweiz)
ITO-Glasplatten	Delta Technologies (Loveland, USA)
Glasgefäße	Roth/ VWR
Nuclepore® Polykarbonat-Membranen und Filterplättchen	Whatman/GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
PD10 Säule mit Sephadex G-25M	GE Healthcare UK Ltd (Buckinghamshire, UK)
FPLC-Säule Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Kupfergrid mit Formvarfilm beschichtet	PLANO (Wetzlar, Deutschland)
Kohlenstoff beschichtete Elektronenmikroskopiegrids (C-flat™)	Protochips Inc. (Raleigh, NC, USA)
UV Küvette Mikro	Brand GmbH + Co KG (Wertheim, Deutschland)

## 2.3. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller bzw. Lieferant
analoger Funktionsgenerator	Voltcraft 8202	Voltcraft/ Conrad Electronic AG (Wollerau, Schweiz)
digitaler Funktionsgenerator	DDS 4025	Peak tech (Ahrensburg, Deutschland)
Mini-Extruder	Set mit Halter	Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)
Rotationsverdampfer	Hei-VAP Advantage	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Osmometer	Vapro 5520	Elitech (Puteaux, Frankreich) (früher Wescor)
Leitfähigkeitsmessgerät	Mettler Toledo Five Easy	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Reinstwasseranlage	TKA-Gen Pure	TKA (Thermo Fisher Scientific) (Braunschweig, Deutschland)
FPLC-Anlage (Äkta)	Äkta purifier	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Zentrifuge	Avanti J-30I	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Rotoren für Zentrifuge		Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge	centrifuge 5804 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Thermo Scientific (Braunschweig, Deutschland)
French Press	Gaulin Homogenisator LAB 60/60 bzw. Micro LAB 40/60	APV Schröder GmbH (Lübeck, Deutschland) (jetzt: SPX Corporation, Charlotte, NC, USA)
Fluoreszenz- und Absorptionsscanner Tecan Plate reader	infinite M200 Pro	Tecan (Maennedorf, Schweiz)
DLS-Gerät	Zetasizer Nano S	Malvern (Herrenberg, Deutschland)

Gerät	Typ	Hersteller bzw. Lieferant
Fluoreszenzmikroskopaufbau zur Verwendung mit Spinning Disc Einheit	Observer Z1 mit SD	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Spinning Disk Modul	Yokogawa CSU-Xi spinning disc	Yokogawa Electric (Musashino, Japan)
CCD-Kamera	Axiocam MRm charge-coupled device Kamera	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Mikroskopaufbau mit Laserscanning Modul und FCS Modul	Observer Z1 mit LSM 710 und Confocor 3	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Transmissionselektronenmikroskop	EM 900	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
SSCCD Kamera	SM-1k-120	TRS (Moorenweis, Deutschland)
FEI Elektronenmikroskop	Tecnai F30, 300kV	FEI (Hillsboro, OR, USA)
Kamera	4K FEI Eagle camera	FEI (Hillsboro, OR, USA)
Handmessgerät mit Photodiode	Modell 842-PE	Newport Corporations (Irvine, USA)

## 2.4. Puffer

Tabelle 2.1.: TBS-Mg pH 7,4 - Resuspendierungspuffer und Puffer für die Reinigung mittels GSH für Sar1p und dessen Varianten (Substanzen gelöst in doppelt entionisiertem Wasser, pH eingestellt mit Salzsäure 37 % p.a.)

Substanz	Konzentration
Tris base	50 mM
Natriumchlorid	150 mM
Magnesiumchlorid	5 mM

Tabelle 2.2.: TCB pH 8,0 - Puffer für Thrombinspaltung und Lagerpuffer für Sar1p und dessen Varianten (Substanzen gelöst in doppelt entionisiertem Wasser, pH eingestellt mit Kaliumhydroxidlösung)

Substanz	Konzentration
Tris·HCl	25 mM
Kaliumacetat	250 mM
Kalziumchlorid	5 mM
Magnesiumchlorid	5 mM



Tabelle 2.3.: Resuspendierungspuffer pH 8,0 für den Aufschluss der *E. coli*-Zellen mittels Ultraschall zur Reinigung von Sec12p- $\Delta$ C (Substanzen gelöst in doppelt entionisiertem Wasser, pH mittels Salzsäure 37 % p.a.)

Substanz	Konzentration
Tris base	25 mM
Kaliumchlorid	400 mM
Glyzerin	10 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	5 mM
Proteaseinhibitor	1 Tablette
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	0,1 mg/ml
Lysozym	1 mg/ml

Tabelle 2.4.: HKM-Puffer pH 6,8. Reaktionspuffer für alle durchgeführten Sar1p/COPII-Bindungsexperimente (Substanzen gelöst in doppelt entionisiertem Wasser)

Substanz	Konzentration
Hepes pH 6,8	20 mM
Kaliumacetat	50 mM
Magnesiumchlorid	1,2 mM

Tabelle 2.5.: Probenpuffer zum Auftragen von Proteinen auf ein SDS-PAGE-Gel (Substanzen gelöst in doppelt entionisiertem Wasser)

Substanz	Anteil
Tris base	4,7 % (v/v)
SDS	5,8 % (w/v)
Glyzerin	10 % (w/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	0,01 % (v/v)
Bromphenolblau	eine Spatelspitze auf 1-2 ml

## 2.5. Proteine

In dieser Arbeit werden Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* mit einem nachgestellten „p“ kenntlich gemacht. Bei Proteinen ohne diese Bezeichnung sind die Säugetierproteine oder eine allgemeine Beschreibung der Proteine ohne Zuordnung zu einem bestimmten Organismus gemeint.

Tabelle 2.6.: Die Tabelle führt alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine und Proteinvarianten mit ihren Mutationen und deren Funktion auf, sowie Referenzen und Benennung der Personen, die die Reinigung durchgeführt haben und sie anschließend für Untersuchung zur Verfügung stellten.

Proteinname	Mutation	Eigenschaften der Mutation	Reinigung durchgeführt	Referenz
COPII-Proteine				
Sar1p	Wildtyp		Jan Auerswald/ Daniela Krüger	[51]
$\Delta$ N23-Sar1p	N-terminale amphipatische Helix aus Aminosäureresten 1-23 fehlt	keine Bindung des Proteins an Membranen bei erhaltener GTPase-Aktivität	Sebastian Daum	[18, 16]
Sar1p-H77L	His gegen Leu in Position 77 ausgetauscht	verminderte Aktivierbarkeit der GTPase durch GAP	Sebastian Daum	[57, 1]
Sar1p-S147C/C171S (Sar1p-SCCS)	Austausch von Ser zu Cys an Position 147 und von Cys zu Ser an Position 171	stöchiometrische Markierung des Sar1p mit einem fluoreszierenden Farbstoff möglich	Jan Auerswald/ Daniela Krüger	
Sar1p-SCCS-Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Markierung der Cys 147 durch einen Alexa Fluor <sup>®</sup> 488-Farbstoff		Jan Auerswald	
Sec12p- $\Delta$ C(1-354) (Sec12p- $\Delta$ C)	Nur Aminosäurereste 1 - 354 vorhanden, die transmembrane C-terminale Domäne fehlt	lösliche Domäne des Sec12p mit GEF-Funktion	Jan Auerswald/ Daniela Krüger	[29]
Sec23p/Sec24p	Wildtyp		Sebastian Daum	[33]
Sec23p-R722A/Sec24p	ersetzen des Arg 722 durch ein Ala	verminderte GAP-Aktivität	Sebastian Daum	[3]
Sec13p/Sec31p	Wildtyp		Sebastian Daum	[58]
myristyliertes Arf1p	Wildtyp		Sebastian Daum	[59]
MSP1D1	Variante des ApoA-1 für biophysikalische Studien	es entstehen Nanodiscs mit ca. 10 nm Durchmesser	Heike Böcker AG Prof Balbach	[60, 61]

## 2.5.1. Plasmide

Tabelle 2.7.: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Stämme und Vektoren mit jeweiligem Translationsprodukt und Quelle. Bei allen drei Translationsprodukten befand sich eine Proteaseschnittstelle für Thrombin zwischen dem GST und dem funktionalen Protein.

Stamm	Plasmid	Translationsprodukt	Quelle
<i>Escherichia coli</i> BL21	pTY40	GST-Sar1p	Randy Schekman
<i>Escherichia coli</i> BL21	pTY40	GST-Sar1p-SCCS	Jan Auerswald
<i>Escherichia coli</i> BL21	pGEX-2T	GST-Sec12p- $\Delta$ C	Randy Schekman

## 2.6. Lipide

Tabelle 2.8.: Alle in der Arbeit einzeln oder als Mischung verwendete Lipide und ihre verwendete Abkürzungen

Lipid	Abkürzung
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-Pphosphocholin (18:1)	DOPC
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin (18:1)	DOPE
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-L-Serin (18:1) (Natriumsalz)	DOPS
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphat (18:1) (Natriumsalz)	DOPA
L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol (Soja) (Natriumsalz)	PI
L- $\alpha$ -Phosphatidylinositol-4-phosphat (Gehirn, Schwein) (Ammonium Salz)	PI(4)P
L- $\alpha$ -Pphosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Gehirn, Schwein) (Ammonium Salz)	PI(4,5)P2
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-(Cytidin diphosphat) (Ammonium Salz)	CDP-DAG
Ergosterol	

## 2.7. Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 2.9.: Wasserlösliche Fluoreszenzfarbstoffe zum Kalibrieren des Fluoreszenzkorrelationsspektroskopes

Farbstoff	Anregungswellenlänge
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488 Hydrazid	488 nm
Alexa Fluor <sup>®</sup> 633 Hydrazid	633 nm

Tabelle 2.10.: Verwendete reaktive Fluoreszenzfarbstoffe für die Markierung von Proteinen zur Untersuchung in der Fluoreszenzmikroskopie und FCS

Farbstoff	Reaktive Gruppe	Anregungswellenlänge
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Maleinimid	488 nm

Tabelle 2.11.: Fluoreszierende Lipidanaloga zum Einbau in die Lipiddoppelschicht zum Sichtbar machen von Vesikelmembranen

Lipidanaloga	Abkürzung	Anregungswellenlänge
$\beta$ -BODIPY <sup>®</sup> FL C <sub>12</sub> - HPC (2-(4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza- <i>s</i> -indacene-3-dodecanoyl)-1-hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin)	Bodipy <sup>®</sup> -FL C <sub>12</sub> -HPC	488 nm
Oregon Green <sup>®</sup> 488 1,2-Dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin	Oregon Green - DHPE	488 nm
Lissamin <sup>™</sup> Rhodamin B (Xanthylium,9-[4-(chlorosulfonyl)-2-sulfophenyl]-3,6-bis(diethylamino)-, hydroxid) - 1,2-dihexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin, Triethylammonium Salz (Rhodamine DHPE)	Rhodamin B - DHPE	561 nm
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanin Perchlorat (DiD' oil, DiIC <sub>18</sub> (5) oil)	DiD C <sub>18</sub>	633 nm
1,2-Dimyristoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoethanolamin markiert mit Atto 633	Atto 633 - DMPE	633 nm

# 3. Theoretische Grundlagen

## 3.1. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

### 3.1.1. Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz als eine Art der Lumineszenz wird der photophysikalische Prozess zur Relaxation eines elektromagnetisch angeregten Moleküls vom  $S_1$ -Zustand in seinen energetischen Grundzustand  $S_0$  bezeichnet. Alle im folgenden beschriebenen Vorgänge werden in Abbildung 3.1 verdeutlicht. Die unterschiedlich langen Pfeile spiegeln die Energiebeträge der einzelnen Prozesse wieder, es gilt:  $\nu_1 > \nu_2 > \nu_3$ .

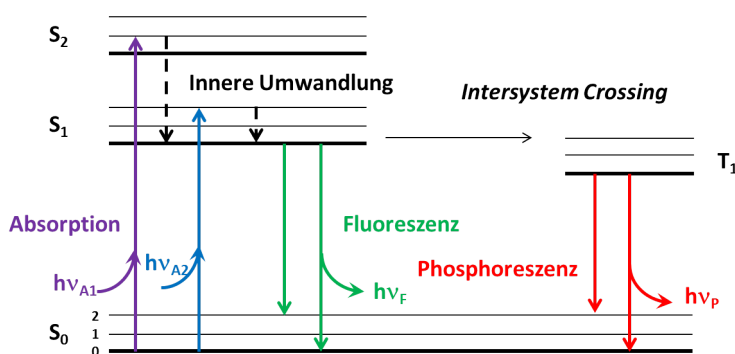


Abbildung 3.1.: Vereinfachtes Jablonski-Diagramm.  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  und  $T_1$  stellen die jeweiligen Energiezustände dar. Mit den Pfeilen werden die Übergänge zwischen diesen symbolisiert. ( $\nu_{A1} > \nu_{A2} > \nu_F > \nu_P$ ) angepasst nach Lakowicz 2006 [62].

Bei Raumtemperatur befinden sich alle Elektronen eines Moleküls im niedrigsten Schwingungsniveau des Grundzustandes  $S_0$ . Durch Energiezufuhr in Form sichtbarer (oder nicht sichtbarer) elektromagnetischer Wellen (Licht) einer geeigneten Wellenlänge wird ein Elektron in einen angeregten Singulettzustand  $S_1$  oder  $S_2$  angehoben. Dies kann in alle vorhandenen Schwingungsniveaus geschehen, allerdings erfolgt sofort ein strahlungsloser Übergang in das niedrigste Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustandes. Von hier aus kommt es zum Zurückfallen in den Grundzustand und zum Emittieren eines Lichtquants, was als Fluoreszenz bezeichnet wird. Das Emissionslicht ist gegenüber dem Absorptionslicht zu längeren Wellenlängen (rot) verschoben. Dieser sogenannte „Stokes Shift“ ist auf den Energieverlust durch die strahlungslose Schwingungsrelaxation (auch als innere Umwandlung oder *Internal Conversion* bezeichnet) auf das jeweils untere Schwingungsniveau des  $S_1$  bzw.  $S_0$ -Zustandes zurückzuführen.

Ein weiterer Prozess, der nach der Absorption stattfinden kann, ist der Übergang vom

ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den ersten Triplettzustand  $T_1$ . Dies wird als „*Intersystem Crossing*“ bezeichnet und beschreibt einen für fluoreszenzspektroskopische Methoden eher ungünstigen Prozess, da er mit dem Verlust von Fluoreszenz einhergeht. Da es sich hierbei um einen spinverbotenen Übergang handelt, verweilt das Elektron deutlich länger im Triplettzustand als im  $S_1$ -Zustand. Die Rückkehr zum Grundzustand erfolgt im Vergleich zur Fluoreszenz zeitversetzt in Form von Phosphoreszenz.

Im Bereich der Biophysik findet die Fluoreszenz weitreichende Anwendungen. Neben bildgebenden Verfahren wie der Fluoreszenzmikroskopie, *Fluorescence lifetime imaging* (FLIM) und *Fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) werden auch spektroskopische Methoden wie *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (FCS) und *Fluorescence Crosscorrelation Spectroscopy* (FCCS) vielfach zur Aufklärung verschiedenster Fragestellungen *in vivo* und *in vitro* verwendet. Phänomene wie beispielsweise der Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) können sowohl bildgebend als auch spektroskopisch genutzt werden (Theorie zusammengefasst nach [62]).

### 3.1.2. Fluoreszenzfarbstoffe

Um Fluoreszenztechniken anwenden zu können sind Fluorophore nötig. Natürliche bzw. in Proteinen vorkommende (intrinsische) Fluorophore sind z.B. die Aminosäure Tryptophan, deren Indolring nahe 280 nm absorbiert und bei ca. 340 nm emittiert. Das Emissionsspektrum des Indols zeigt sehr sensitiv Veränderungen der Polarität seiner Umgebung an. Damit ist die Tryptophanfluoreszenz gut geeignet, um Faltungsprozesse von Proteinen zu beobachten. Für Einzelmolekülfluoreszenzanwendungen ist diese intrinsische Fluoreszenz jedoch meist zu gering. Einige Proteine besitzen fluoreszierende Co-Faktoren wie Nikotinamidadenindinukleotid (NADH), Flavine oder Chlorophylle, die als natürliche Fluoreszenzsonden verwendet werden können. Wenn diese, wie bei den meisten Proteinen, nicht vorhanden sind, können zahlreiche maßgeschneiderte extrinsische Fluoreszenzsonden wie z.B. Dansyl, Fluorescein oder Rhodamin eingesetzt werden, um Aussagen über ein Protein mittels Fluoreszenztechniken treffen zu können.

Membranen zeigen typischerweise keine intrinsische Fluoreszenz. Um diese sichtbar zu machen werden fluoreszierende Lipidanaloga oder mit Fluoreszenzsonden, wie z.B. Rhodamin, markierte Lipide eingesetzt, die sich spontan mit in die Membran einbauen.

Um sich mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und der Zweifarben-Fluoreszenzkreuzkorrelationspektroskopie (*dual color Fluorescence Crosscorrelation Spectroscopy*, dcFCCS) Membran-Protein-Interaktionen untersuchen zu können, ist es notwendig, sowohl Membranen als auch Proteine mit Fluoreszenzsonden zu markieren. Dies hat den Vorteil, dass die Fluorophore mit für das Experiment günstigen Eigenschaften ausgewählt werden können. Neben einer hohen Quantenausbeute  $q$ , also dem Verhältnis aus Anzahl emittierter Fluoreszenzphotonen ( $N_{em}$ ) und der Anzahl absorbierter Photonen ( $N_{abs}$ ) ( $q = N_{em}/N_{abs}$ ), und einer hohen Photostabilität müssen diese Farbstoffe vor allem zum verwendeten Versuchsaufbau passen. Um in der dcFCCS die Artefakte durch Übersprechen und Über-Kreuz-Anregen (*cross excitation*) zu minimieren, sollten die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden verwendeten Farbstoffe gut voneinander getrennt sein (Abbildung 3.2) [63].

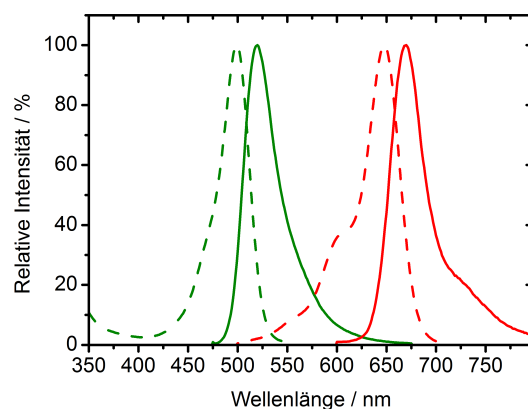


Abbildung 3.2.: **Absorptions- und Emissionsspektrum von Alexa Fluor<sup>®</sup>488 und DiD C<sub>18</sub>.** Die gestrichelten Linien repräsentieren das jeweilige Absorptionsspektrum, die durchgehenden Linien das Emissionsspektrum. In grün sind die Spektren für Alexa Fluor<sup>®</sup>488 und in rot die Spektren für DiD C<sub>18</sub> dargestellt. Es wird deutlich, dass sich sowohl Absorptions- als auch die Emissionsspektren kaum überlagern, so dass es bei geeigneter Filterwahl nur in geringem Maße zum Anregen oder Detektieren des „falschen“ Farbstoffes kommen kann.

Der leichte Überlapp von grüner Emission mit roter Absorption ermöglicht einen geringen Anteil FRET. Für einen effektiven FRET ist zusätzlich zur Spektrenüberlagerung eine geringe Entfernung beider Farbstoffe zueinander von max. 10 nm nötig und die Dipolmomente beider Fluorophore müssen möglichst parallel zueinander sein. Durch Messungen mit beiden Farbstoffen in der Probe, aber nur mit dem kurzwelligeren Laser als Anregungswellenlänge, kann der Anteil von FRET an der Gesamthelligkeit in der Detektion des roten Farbstoffes abgeschätzt werden, wenn keine Überkreuzanregung stattfindet oder Vergleichsproben ohne FRET herangezogen werden.

Für die Markierung der verwendeten Proteine wurde, wie bereits in Abschnitt 2.7 erwähnt, Alexa Fluor<sup>®</sup>488 verwendet. Dieser Farbstoff hat eine hohe Quantenausbeute, ist photostabil und als Maleinimid zur Reaktion mit Cysteinen kommerziell erhältlich. Die Markierung von Sar1p-SCCS wird in Abschnitt 4.2.2 beschrieben.

Als Lipidanalogen für die Bindungsversuche mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488-markiertem Protein wurde der bei 633 nm anregbare Farbstoff DiD C<sub>18</sub> verwendet (Abbildung 3.3 A). Dabei handelt es sich um einen Cyaninfarbstoff, der sich im hydrophilen Teil der Lipiddoppelschicht befindet und über zwei C<sub>18</sub>-Alkylketten in die Membran eingebaut ist. Wie in Abbildung 3.2 deutlich wird, sind die Spektren dieser beiden Farbstoffe gut voneinander getrennt. Für die Versuche mit doppelt markierten Vesikeln, bzw. Mizellen und Nanodiscs wurde als Farbstoff der bei 488 nm anregbare Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub>-HPC eingesetzt (Abbildung 3.3 C). Hierbei handelt es sich um ein Phosphatidylcholin, an dessen einer Alkylkette sich der Fluorophor in *sn2*-Position befindet. Der Fluorophor ist damit nach Einbau in die Membran im hydrophoben Teil der Lipiddoppelschicht lokalisiert. Dieses Farbstoffpaar wurde von Stefan Werner in seiner Masterarbeit als für Kreuzkorrelationsproben an einem 488/633 nm-Setup optimal ermittelt [64].

Alternativ verwendete Farbstoffe in den Kreuzkorrelationsproben ist Oregon Green 488 - DHPE (Abbildung 3.3 D) für die Anregung bei 488 nm. Hierbei handelt es sich um ein mit Fluorophor markiertes Phospholipid. Das Gleiche gilt für das bei Anregung mit 633 nm Wellenlänge eingesetzte Atto 633 - DMPE.

Die GUVs für die Mikroskopie wurden mit Lissamin Rhodamin B-DHPE (Abbildung 3.3 B) markiert. Dieser Farbstoff ist bei 561 nm anregbar und konnte an allen für die Arbeit zur Verfügung stehenden Mikroskopen sichtbar gemacht werden.

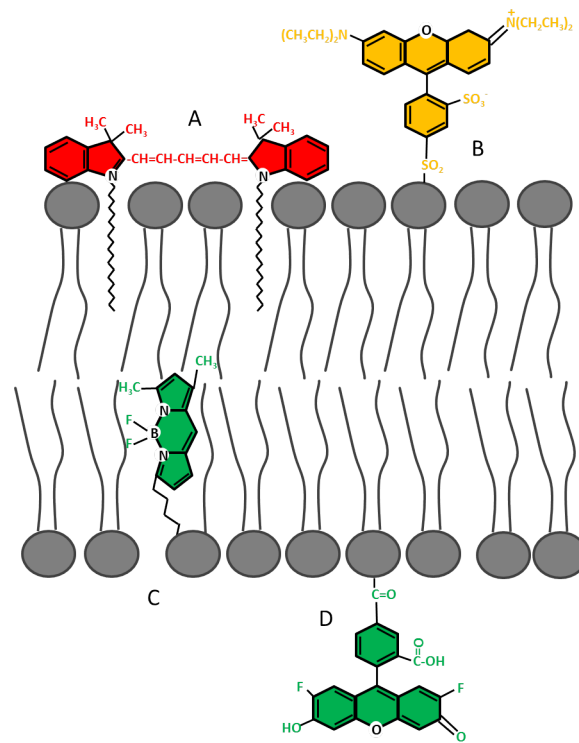


Abbildung 3.3.: **Fluoreszierende Lipidanaloga und deren Einbau in die Lipiddoppelschicht.** (A) DiDC<sub>18</sub> ist ein Cyaninfarbstoff, der sich im hydrophilen Teil der Lipiddoppelschicht befindet und über zwei C<sub>18</sub>-Alkylketten in die Membran eingebaut wird. DiDC<sub>18</sub> ist mit 633 nm anregbar. (B) Lissamin Rhodamin B wird mit Licht von 561 nm Wellenlänge angeregt. Der Fluorophor ist an die hydrophile Kopfgruppe eines Phospholipids gebunden. (C) Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub>-HPC ist ein hydrophober Fluorophor, der eine der Alkylketten eines Phospholipids ersetzt. (D) Oregon Green 488 wird ebenfalls als ein an ein Phospholipid gebundener Fluorophor eingesetzt. (C) und (D) sind beide bei 488 nm anregbar. Skizze nach Invitrogen

## 3.2. Fluoreszenzmikroskopie als Erweiterung der Lichtmikroskopie

Auf die Grundlagen der Fluoreszenz, wurde bereits in Abschnitt 3.1 eingegangen. In diesem Abschnitt sollen kurz die technischen Grundlagen der Lichtmikroskopie sowie die



Erweiterungen zur Fluoreszenzmikroskopie erläutert werden.

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Weiterentwicklung der Standardlichtmikroskopie durch einige Modifikationen. Zum einen wird ein starkes Beleuchtungssystem, dessen Lichtstrahl auf spezifische Wellenlängen eingeschränkt ist, benötigt, um ausgewählte Fluorophore anregen zu können. Zum anderen werden Filter eingesetzt um Wellenlängenbereiche, welche nicht von Interesse sind, herauszufiltern. Es handelt sich jedoch um den gleichen grundlegenden Aufbau eines Lichtmikroskopes.

### 3.2.1. Lichtmikroskopie allgemein

Lichtmikroskope, bestehend aus einer oder mehreren Linsen, wurden seit Anfang des 17. Jahrhunderts in den Niederlanden (Hans und Zacharias Janssen, Christian Huygens, Antony van Leeuwenhoek) und in Rom (Galileo) entwickelt. Erst um 1873 erarbeitete Ernst Abbe die Wellentheorie des Lichts und beschrieb das Auflösungslimit  $d$  von Objektiven. Dieser wird als Abstand zweier Linien in einem Gitter definiert, der diese gerade noch als getrennte Linien erkennen lässt. Dafür gilt  $d = \lambda / (2 \cdot NA)$ , wobei  $\lambda$  die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes und  $NA$  die Numerische Apertur des Objektivs angibt. Diese Arbeit führte zur Revolutionierung des Designs optischer Instrumente. Das sogenannte Abbe'sche Limit gilt auch für die in dieser Arbeit verwendeten Aufbauten. Erst seit Mitte der 1990er Jahre gibt es erweiterte optische Aufbauten, die in der Lage sind, dieses Auflösungslimit zu unterschreiten. Diese Methoden werden auch als optische Nanoskopie bezeichnet [65, 66].

Das in Abbildung 3.4 dargestellte Schema zeigt den Lichtweg eines heute üblichen Weitfeldlichtmikroskopes. Die Vergrößerung des Objektes wird durch das Verhältnis aus der Brennweite der Tubuslinse ( $f_r$ ) und der Brennweite der Objektivlinse ( $f_o$ ) bestimmt ( $M_{obj} = f_r / f_o$ ). Der Raum zwischen Objektiv- und Tubuslinse wird als „Unendlichkeitsraum“ (*infinity space*) bezeichnet. Hier können verschiedene optische Elemente eingebracht werden, ohne die optische Leistung zu beeinflussen.

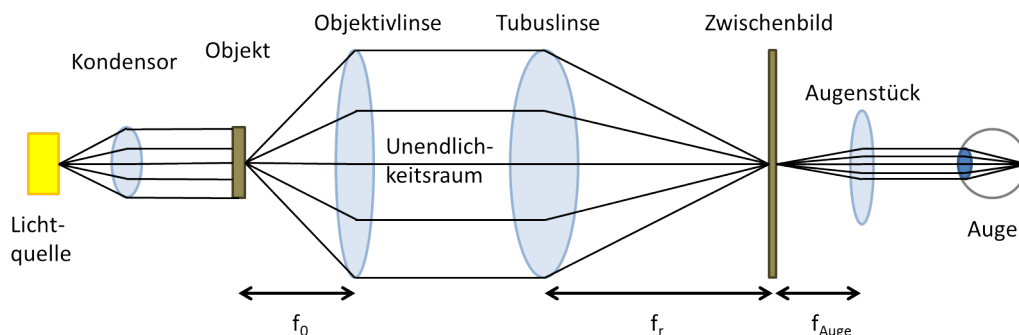


Abbildung 3.4.: Vereinfachtes Schema eines Weitfeldlichtmikroskopes. Weißlicht wird durch die Kondensatorlinse parallelisiert, wodurch große Bereiche des Objektes beleuchtet werden. Durch die Kombination aus Objektiv- und Tubuslinse entsteht ein vergrößertes Zwischenbild, welches wiederum über das Augenstück betrachtet werden kann. Der Zwischenraum zwischen Objektiv- und Tubuslinse wird als Unendlichkeitsraum (*infinity space*) bezeichnet. Hier können optische Elemente wie Filter eingebracht werden.

Eine Variante der Lichtmikroskopie ist die Fluoreszenzmikroskopie. Hierfür werden die in Abschnitt 3.1 vorgestellten Eigenschaften einiger Moleküle, sogenannter Fluorophore, genutzt um Photonen bestimmter Wellenlänge aufzunehmen und durch Energieverlust rotverschobene Photonen wieder abzugeben. Um diese Eigenschaft zu nutzen, wird Licht eines definierten Wellenlängenbereiches eingestrahlt und ein spektrales Band von Emissionswellenlängen beobachtet. Zur Beleuchtung können hierfür u.a. Breitbandlichtquellen genutzt. Diese werden mit einem Bandpassfilter (Anregungsfilter) auf den gewünschten Ausschnitt des Spektrums eingeschränkt und durch einen dichroischen Spiegel (Strahlteiler) in die Probe reflektiert (Abbildung 3.5). Die Fluoreszenzemission passiert den Spiegel und wird durch einen Barrierefilter erfasst, der das Spektrum, welches von Interesse ist, durch lässt.

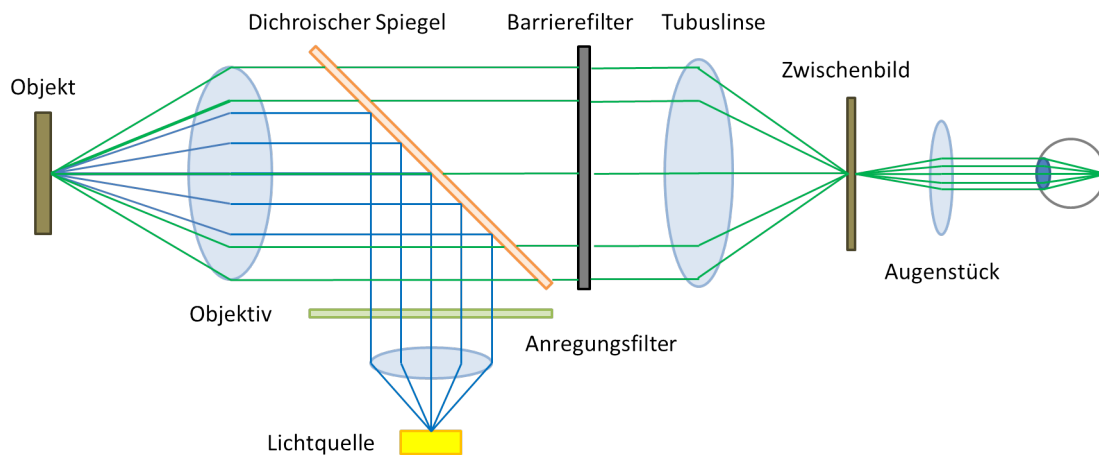


Abbildung 3.5.: **Schema eines Fluoreszenzmikroskops.** Hierbei handelt es sich um ein Auflichtmikroskop. Licht einer Breitbandlichtquelle (wie beispielsweise eine Quecksilberdampfampe) wird mit dem Anregungsfilter spektral gefiltert. Nur Licht eines definierten Wellenlängenbereiches wird über den dichroischen Spiegel über das Objektiv in die Probe eingestrahlt. Dabei werden im Sinne eines Weitfeldmikroskops große Bereiche der Probe beleuchtet. Das zu längeren Wellenlängen verschobene Emissionslicht kann nach dem Einsammeln, was wiederum durch das Objektiv geschieht, den Strahlteiler passieren. Der anschließende Barrierefilter selektiert den interessierenden Wellenlängenbereich. Nachfolgend wird das Licht wieder über Tubuslinse und Augenstück oder Kamera betrachtet. Die in der Abbildung dargestellten Linien stellen nicht die korrekten Lichtstrahlen im Sinne der Strahlenoptik dar, sondern verdeutlichen lediglich den Weg des Lichts im optischen Aufbau.

Während es sich bei der zuerst beschriebenen Weitfeldlichtmikroskopiemethode um Durchlichtmikroskopie handelt, d.h. das Licht muss durch die Probe hindurch, ist die Fluoreszenzmikroskopie eine Auflichtmethode, wobei das emittierte Licht durch die gleiche Linse eingesammelt wird, durch die das Anregungslicht zuvor eingestrahlt wurde [67]. Ein großer Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie besteht darin, dass nur entsprechend angeregte Fluorophore (natürlich oder eingebracht) sichtbar sind und der Rest der Probe dunkel bleibt, dadurch ist es möglich nur die interessierenden Objekte nach vorheriger

oder intrinsischer Markierung (siehe Abschnitt 3.1.2) darzustellen. Lediglich bei der Mikroskopie mit kurzwelligem Licht (unterhalb 500 nm) in Zellen besteht ein etwas höheres Hintergrundsignal. Ein Nachteil dieser Methode ist die störende Fluoreszenzemission der Fluorophore, die sich nicht in der Fokusebene befinden und damit die Bildqualität durch Kontrastverlust herabsetzen.

Im nächsten Abschnitt soll beschrieben werden, wie diese Problematik durch die Nutzung von Lochblenden verbessert wurde.

### 3.2.2. Konfokales Prinzip

Das erste konfokale Mikroskop wurde von Marvin Minsky 1957 zum Patent angemeldet. Der größte Vorteil der konfokalen Mikroskopie ist eine axiale Auflösungsverbesserung, was besonders bei dickeren Objekten bemerkbar ist. Anstelle der Beleuchtung des gesamten Objektes, wie für die Weitfeldmikroskopie beschrieben, wird hier nur jeweils ein Punkt beleuchtet und auch ein punktförmiger Detektor benutzt. Dafür wird der Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops (Abbildung 3.5) durch den Einsatz einer punktförmigen Beleuchtung und einer sehr kleinen Lochblende, ein sogenanntes *pinhole*, am Ende des Strahlengangs verbessert (Abbildung 3.6).

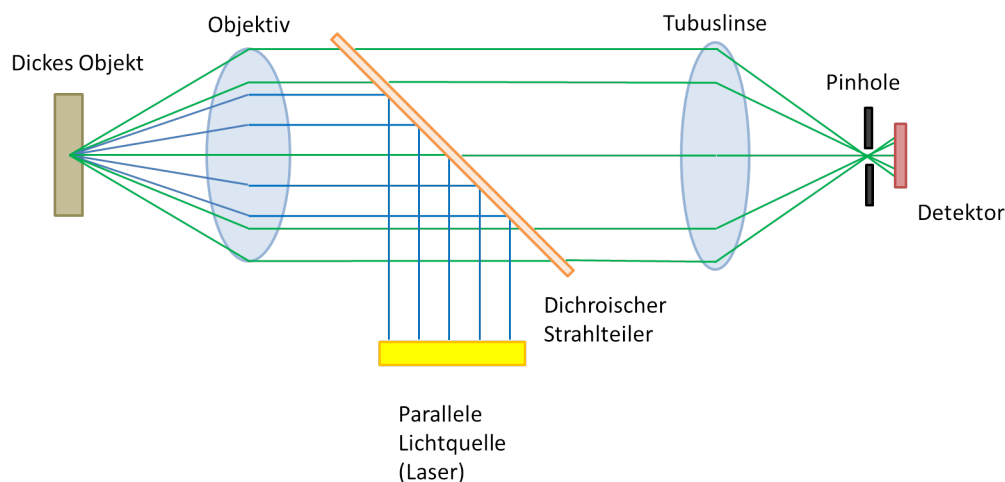


Abbildung 3.6.: **Schema eines konfokalen Mikroskops.** Punktförmiges Anregungslicht (z.B. Laser) einer definierten Wellenlänge wird parallelisiert über einen dichroischen Strahlteiler durch das Objektiv in die Probe fokussiert. Längerwelliges Emissionslicht passiert den Strahlteiler und wird mit der Tubuslinse auf eine Lochblende fokussiert, wodurch Licht von außerhalb der Fokusebene abgeschirmt wird. Nach dem Pinhole befindet sich der Detektor, der das Emissionslicht detektiert.

Die Beleuchtung des Objektes erfolgt über eine punktförmige Lichtquelle. Dies kann durch einen mit einer Glasfaser eingekoppelten Laser oder mit einem ersten Pinhole direkt hinter der Lichtquelle geschehen. Ein weiteres Pinhole direkt vor dem Detektor sorgt dafür, dass nur das Licht aus der Fokusebene den Detektor erreicht und damit die Auflösung in z-Richtung deutlich verbessert wird. Zusätzlich wird der Hintergrund,

der beispielsweise durch die Ramanstreuung des Lösungsmittels bzw. des Umgebungsmediums erzeugt wird, deutlich verringert. Um mit dieser Methode ein ganzes Bild einer Probe zu erzeugen, ist es notwendig den Lichtstrahl über die Probe zu bewegen und die Emission aller Punkte unter Zuhilfenahme eines Computers zu einem Bild zu vereinen. Eine weitere Möglichkeit ist es viele Pinholes auf einer drehbaren Scheibe zu verwenden, die gleichzeitig das Laserlicht in die Probe fokussieren und durch geeignete Belichtungszeiten einer Kamera ein komplettes Bild entstehen lassen. Die technischen Umsetzungen werden in den folgenden Abschnitten 3.2.3 und 3.2.4 etwas genauer erklärt [68].

### 3.2.3. Aufbau des verwendeten Laser Scanning Mikroskops

Alle in Kapitel 4 beschriebenen Arbeiten wurden an einem kommerziell erhältlichen konfokalen Mikroskopsetup der Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland) durchgeführt. Bei diesem Setup handelt es sich um einen Laser Scanning Aufbau (LSM710), welcher an einem inversen Stativ vom Typ Z1 Observer angeschlossen ist. Als Lichtquellen dienen verschiedene Laser. Es kann zwischen den Anregungswellenlängen 405, 458, 488, 514, 561 und 633 nm gewählt werden. Über einen dichroischen Spiegel (Hauptfarbteiler) wird das Anregungslicht durch ein C-Appochromat-Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,2 in die Probe fokussiert. Das Emissionslicht wird durch das gleiche Objektiv geleitet und durch den dichroischen Spiegel hindurch auf das detektionsseitige Pinhole fokussiert. Zwischen dichroischem Spiegel und Detektor ist weiterhin ein stufenlos regelbarer Bandpassfilter eingebaut um das Emissionslicht, welches den Detektor erreicht, regulieren zu können. Das Abrastern des Objektes wird über Scanspiegel zwischen Tubuslinse und Objektiv realisiert. Zur Detektion werden Sekundärelektronenvervielfacher (*Photo Multiplier Tube* - PMT) verwendet, welche die Signale über einen Echtzeitrechner (*Realtime Controller*) in die ZEN 2009 - Software übertragen, wo die Helligkeitsinformationen der einzelnen Punkte zu einem Bild zusammengesetzt werden.

### 3.2.4. Aufbau des verwendeten Spinning Disc Mikroskops

Neben dem konfokalen Scanning Mikroskop stellten Egger und Petran 1967 eine weitere Möglichkeit der technischen Umsetzung eines konfokalen Aufbaus vor. Sie modifizierten eine bereits 1884 von Paul Nipkow entwickelte Scheibe, in der Löcher spiralförmig angeordnet waren, indem sie weitere Lochspiralen zu dieser drehenden Scheibe („*Spinning Disc*“) hinzufügten. Sowohl das Anregungslicht, als auch das Emissionslicht wird durch diese Löcher fokussiert, um damit die konfokale Bildaufnahme zu ermöglichen [68]. Das Licht wird durch mehrere Lochblenden gleichzeitig in der Probe fokussiert. Ebenso wird das Emissionslicht aus der Probe durch die Lochblenden zurück auf einen Detektor, eine Kamera oder das Auge, fokussiert. Wie in Abbildung 3.6 dargestellt, erreicht auch hier nur Licht aus der Fokusebene den Detektor. Da im Falle des Spinning Disc Mikroskops viele Punkte in der Probe gleichzeitig angeregt werden, können die Bilder mit einer sensiblen Kamera, deren Belichtungszeit auf die Drehgeschwindigkeit der Nipkow-Scheibe abgestimmt ist, aufgenommen werden [68].

Ein Teil der durchgeführten mikroskopischen Studien wurden an einem konfokalen

Spinning Disc Mikroskop durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen kommerziell erhältlichen Aufbau der Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland). Dieser besteht aus einem inversen Stativ vom Typ Z1 Observer, an den eine Yokogawa CSU-Xi Spinning Disc Einheit angeschlossen ist. Laserlicht mit einer Wellenlänge von 561 nm wird über die Spinning Disc Einheit und ein C-Appochromat-Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,2 in der Probe fokussiert. In der Spinning Disc Einheit ist neben der sich drehenden Lochblendenscheibe eine zweite sich ebenso drehende Scheibe mit kleinen Linsen eingebaut, die dafür sorgt, dass der Laser auf die einzelnen Lochblenden fokussiert und der Helligkeitsverlust minimiert wird. Das Emissionslicht aus der Probe wird zurück durch die Lochblendenscheibe auf eine CCD-Kamera (*Charge-Coupled Device*, hier: Axio Cam MRm) projiziert. Dafür ist zwischen den beiden Scheiben ein dichroischer Spiegel angebracht. Die Belichtungszeit wird computergesteuert mit der Drehgeschwindigkeit der Nipkow-Scheibe abgestimmt. So entsteht innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums ein komplettes Bild der Probe. Dies geschieht deutlich schneller als das Abrastern einer Probe mit dem Punktscanner nach dem Prinzip des Laser Scanning Mikroskops. Die Bildverarbeitung und -bearbeitung wurde mit der Auswertesoftware ZEN 2011 blue durchgeführt.

### 3.3. Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Zwei-Farben Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (dcFCCS)

#### 3.3.1. FCS und dcFCCS als Methoden der Einzelmolekülspektroskopie

Mit der Mikroskopie lassen sich durch das Markieren bestimmter Proteine oder Lipide die Strukturen, in denen sie wirken oder auch Strukturveränderungen, die sie verursachen untersuchen. Aber es ist schwierig Aussagen über einzelne Moleküle und ihren Einfluss auf die beobachteten Strukturen zu treffen. Bei den Beobachtungen handelt es sich immer um die gemittelte Wirkung vieler Moleküle.

Die Methoden der Einzelmolekülspektroskopie erlauben es einzelne fluoreszierende Teilchen hinsichtlich ihrer verschiedenen Eigenschaften zu untersuchen. Dies wird unter anderem durch die Verwendung des konfokalen Detektionsvolumens, welches weniger als ein Femtoliter beträgt, und einer geeigneten Verdünnung des zu untersuchenden Partikels auf Konzentrationen von wenigen Nanomol pro Liter möglich. Wichtigste Voraussetzung zur Detektion einzelner fluoreszierender Partikel ist ein sehr sensitiver Detektor, wie die hochempfindliche und schnelle Avalanche Photodiode (APD), die einzelne Photonen detektieren kann. Um die Eigenschaften eines fluoreszierenden Teilchens bestimmen zu können, werden die Fluoreszenzsignale der durch den Fokus wandernden Partikel ausgewertet. Dafür können verschiedene Verfahren angewandt werden. Diese sind unter anderem Fluoreszenzanisotropiebestimmungen, um Aussagen über Rotationsdiffusion treffen zu können, Fluoreszenzlebensdauermessungen, zur Trennung verschiedener molekularer Spezies und FCS zur Analyse des Diffusionsverhaltens. Mit Hilfe der FCS können intermolekulare Bindungsvorgänge und der Co-Transport von Molekülen in kleinen Transporteinheiten charakterisiert werden.

#### 3.3.2. FCS-Setup

Alle FCS-Messungen wurden an dem um ein Confocor3-Element erweiterten Setup aus Abschnitt 3.2.3 der Carl Zeiss AG durchgeführt. Es wurde ein C-Appochromat-Wasserimmersionsobjektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer NA von 1,2 verwendet. Für die Anregung der grünen Farbstoffe (Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> und Alexa Fluor<sup>®</sup>488) wurde die 488 nm Hauptlinie des Argon-Ionen-Laser verwendet. Die roten Farbstoffe (DiD C<sub>18</sub> und Atto 633) wurden mit einem Helium-Neon-Laser bei 633 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde im Kreuzkorrelationssetup im Confocor3 vom Nebenfarteiler „NTF635vis“ getrennt um anschließend durch den Bandpassfilter „BP 505 - 610 IR“ für die Emission der mit 488 nm angeregten Farbstoffe und dem Langpassfilter „LP 650“ für die rote Emission von APDs detektiert zu werden.

Die Korrelation des fluktuierenden Fluoreszenzsignals erfolgte in Echtzeit. Die Darstellung der Fluoreszenzzählratenspur, der Korrelationskurven sowie deren Anpassungen mit einer nicht-linearen Funktion wurden mittels der von Zeiss zur Verfügung gestellten systemeigenen Software ZEN 2009 durchgeführt. Die Darstellung der Graphen erfolgte mit Origin 8 (Originlab, Massachusetts, USA).

Die Messungen wurden bei Laserleistungen von 7  $\mu\text{W}$  bei Anregung mit 488 nm und zwischen 0,5 und 7  $\mu\text{W}$  bei der Anregung mit dem Laser mit 633 nm durchgeführt. Die Laserintensitäten wurden jährlich mittels eines Handmessgerätes mit Photodiode (Newport Corporations, Kalifornien, USA) ohne Objektiv im Strahlengang bestimmt.

Für die Messungen mit Vesikeln und Nanodiscs mit und ohne Protein wurden Deckgläser verwendet, die mit Casein beschichtet waren um ein Anhaften der Proben an das Glas zu verringern. Diese Deckgläser wurden zu einer kleinen Kammer zusammengeklebt und direkt auf dem Immersionswasser des Objektivs platziert. Die genaue Beschreibung der jeweiligen Kammern erfolgt in 5.3.1

### 3.3.3. FCS-Theorie

In diesem Abschnitt werden die theoretischen Grundlagen der FCS und dcFCCS zusammengefasst und Erweiterungen oder Änderungen hervor gehoben werden [69, 70, 71]. Weiterhin soll die von Stefan Werner (Masterarbeit 2011) erarbeitete Theorie zum Einfluss der Farbstoffverteilung dargestellt werden. Alle neuen Theorien zur Anwendung der dcFCCS-Technik zur Ermittlung von Bindungskurven Bestimmung einer Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) wurden gemeinsam mit Jan Ebenhan und Stefan Werner erarbeitet, siehe dazu auch Krüger *et al.* [4].

#### Autokorrelationsanalyse

Mit Hilfe der Autokorrelation wird die Selbstähnlichkeit eines zeitlichen Signals gemessen. Bei konstanter Laserleistung ist die Fluktuation  $\delta F(t)$  des Fluoreszenzsignals  $F(t)$  als Abweichung vom zeitlichen Mittel dieses Signals  $\langle F(t) \rangle$  definiert.

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3.1)$$

Dabei ist

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{B} \int_0^B F(t) dt \quad (3.2)$$

wobei  $B$  die Dauer der Messung angibt.

Die normierte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  wird definiert als:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.3)$$

wobei das Fluoreszenzsignal zum Zeitpunkt  $t$  mit dem Signal zum Zeitpunkt  $t + \tau$  multipliziert und über die Zeit gemittelt wird. Dieser Faktor wird durch Division durch das Quadrat des zeitlichen Mittels der Fluoreszenz normiert.

Die Helligkeit  $\eta$  eines fluoreszierenden Teilchens (auch *counts per molecule*) ist über die mittlere Teilchenzahl  $\langle N \rangle$  im Detektionsvolumen mit dem zeitlichen Mittel der Fluoreszenzzählrate verknüpft:

$$\eta = \frac{\langle F(t) \rangle}{\langle N \rangle} \quad (3.4)$$

Für eine einzelne Molekülspezies, deren Helligkeit  $\eta$  während der Messung konstant ist und deren Konzentration aufgrund der dreidimensionalen Brown'schen Molekularbewegung in einem offenen Detektionsvolumen fluktuiert, hat die Autokorrelation  $G_{\text{diff}}(\tau)$  in Abwesenheit chemischer und photophysikalischer Prozesse folgende Form:

$$G_{\text{diff}}(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot g_{\text{diff}}(\tau) \quad (3.5)$$

mit dem Diffusionsterm

$$g_{\text{diff}}(\tau) = \frac{1}{(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}})} \cdot \frac{1}{\sqrt{(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{\text{diff}}})}} \quad (3.6)$$

$\tau_{\text{diff}}$  ist die charakteristische laterale Diffusionszeit, während der ein Molekül im Detektionsvolumen verweilt. Sie stellt ein Maß für Verweildauer eines Teilchens im Fokus dar.

Die räumliche Verteilung der Detektionswahrscheinlichkeit des emittierten Lichts kann näherungsweise mit einer dreidimensionalen Gaußfunktion beschrieben werden:

$$W(\underline{r}) = e^{-2\frac{x^2+y^2}{\omega_0^2}} \cdot e^{-2\frac{z^2}{z_0^2}} \quad (3.7)$$

Diese hat eine charakteristische axiale ( $z_0$ ) und eine laterale ( $\omega_0$ ) Ausdehnung (siehe Abbildung 3.7). Das Verhältnis aus  $z_0$  und  $\omega_0$  wird als Strukturparameter  $S$  bezeichnet und geht in Gleichung 3.6 ein.

$$S = \frac{z_0}{\omega_0} \quad (3.8)$$

Die Korrelationsamplitude  $G_{\text{diff}}(0)$  (bei  $\tau = 0$ ) entspricht, wie aus Gleichung 3.5 ersichtlich, einer inversen mittleren Teilchenzahl. Diese ist über das effektive Detektionsvolumen  $V_{\text{eff}}$  (Gleichung 3.9) mit dem zeitlichen Mittel der Konzentration fluoreszierender Teilchen  $\langle c \rangle$  (Gleichung 3.10) verknüpft

$$V_{\text{eff}} = \pi \cdot \sqrt{\pi} \omega_0^2 z_0 \quad (3.9)$$

$$G_{\text{diff}}(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{\text{eff}} \cdot \langle c \rangle} \quad (3.10)$$



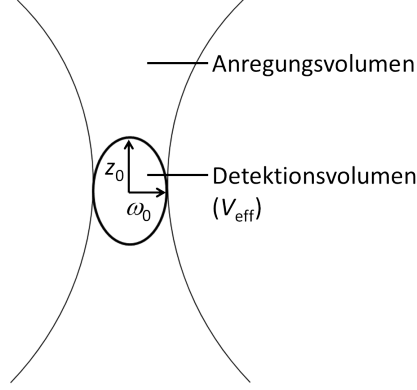


Abbildung 3.7.: **Anregungs- und Detektionsvolumen in einem konfokalen FCS-Setup.** Das Detektionsvolumen ist nicht scharf begrenzt, sondern die Detektionseffizienz fällt in alle Richtungen annähernd gaußförmig ab.  $\omega_0$  und  $z_0$  sind demzufolge der laterale und axiale Abstand vom Mittelpunkt, bei dem die Detektionseffizienz relativ zum Zentrum auf  $1/e^2$  abgefallen ist.

Aus den Gleichungen 3.8 und 3.11 eingesetzt in Gleichung 3.9 entsteht Gleichung 3.12. Damit kann mit Hilfe einer Farbstofflösung mit bekanntem Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{Farbstoff}}$  und gemessenem  $\tau_{\text{diff}}$  das effektive Detektionsvolumen bestimmt werden.

$$\tau_{\text{diff}} = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (3.11)$$

$$V_{\text{eff}} = 8 \cdot S \cdot (\pi D \cdot \tau_{\text{diff}})^{\frac{3}{2}} \quad (3.12)$$

Allgemein kann für mehrere unabhängige Spezies (Index  $i$ ), die unterschiedliche Diffusionskoeffizienten ( $D_i$ ), Helligkeiten ( $\eta_i$ ) und Konzentrationen ( $c_i$ ) aufweisen, die Autokorrelationsfunktion der freien Diffusion in 3 Dimensionen wie folgt geschrieben werden:

$$G_{\text{diff}}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \cdot \frac{\sum_i \eta_i^2 c_i}{\left[ \sum_i \eta_i c_i \right]^2} \cdot g_{\text{diff},i}(\tau) \quad (3.13)$$

Für die Autokorrelationsamplitude  $G_{\text{diff}}(0)$  ( $G_{\text{diff}}(\tau)$  bei  $\tau = 0$ , somit  $g_{\text{diff},i}(0) = 1$ ) folgt:

$$G_{\text{diff}}(0) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \cdot \frac{\sum_i \eta_i^2 c_i}{\left[ \sum_i \eta_i c_i \right]^2} \quad (3.14)$$

Alle bisher dargestellten Gleichungen basieren auf der Annahme, dass die Helligkeit  $\eta$  jedes Teilchens konstant bleibt und keine chemischen und photophysikalischen Prozesse während der Messung stattfinden, die die Helligkeit beeinflussen. Diese Bedingungen sind für reale Fluoreszenzfarbstoffe nicht erfüllt. In vielen Fällen kommt es zu einem sogenannten „Blinken“, das typischerweise durch den Übergang der Elektronen vom ersten angeregten Zustand ( $S_1$ ) in den Triplettzustand ( $T_1$ ) hervorgerufen wird (vergleiche Abbildung 3.1). Während der Lebensdauer des  $T_1$  kann kein Photon emittiert werden und der Fluorophor bleibt dunkel. Um diesen reversiblen Prozess bei der Anpassung der Autokorrelationskurven zu berücksichtigen, wird die Gleichung 3.5 um einen Korrekturterm ( $G_{\text{trip}}$ ) erweitert.

$$G_{\text{tot}}(\tau) = G_{\text{trip}}(\tau) \cdot G_{\text{diff}}(\tau) \quad (3.15)$$

$$G_{\text{trip}}(\tau) = 1 + \frac{T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{trip}}}}}{1 - T} \quad (3.16)$$

Hierbei gibt  $T$  den mittleren Anteil der Farbstoffmoleküle im Triplettzustand an und  $\tau_{\text{trip}}$  die Relaxationszeit der Hell-Dunkel-Reaktion.

### Zwei-Farben Kreuzkorrelation

Während bei der Autokorrelation die Selbstähnlichkeit eines fluktuierenden Fluoreszenzsignals untersucht wird, wird bei der Kreuzkorrelationsspektroskopie die Ähnlichkeit zweier unterschiedlicher Fluoreszenzsignale zueinander analysiert.

Im Folgenden und allen weiteren Abschnitten wird der Diffusionsterm  $G_{\text{diff}}(\tau)$  mit  $G(\tau)$  bezeichnet. Weiterhin werden die Variablen des „grünen“ Kanals mit dem Index „g“, des „roten“ Kanals mit „r“ und der Kreuzkorrelation mit „x“ bezeichnet. Die Auswertung der einzelnen Kanäle (grün und rot) erfolgt mittels Autokorrelationsanalyse wie oben beschrieben.

Die Definition der Kreuzkorrelationsfunktion  $G_x(\tau)$  erfolgt analog zu der Autokorrelationsfunktion (Gleichung 3.3):

$$G_x(\tau) = \frac{\langle \delta F_g(t) \cdot \delta F_r(t + \tau) \rangle}{\langle F_g(t) \rangle \langle F_r(t) \rangle} \quad (3.17)$$

Die Messkurven können ebenfalls mit Gleichung 3.5 angepasst werden. Für die Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x(0)$  gilt analog zu Gleichung 3.14:

$$G_x(0) = \frac{1}{V_{\text{eff},x}} \cdot \frac{\sum_i \eta_{i,g} \cdot \eta_{i,r} \cdot c_i}{\left[ \sum_i \eta_{i,g} \cdot c_i \right] \left[ \sum_i \eta_{i,r} \cdot c_i \right]} \quad (3.18)$$

Hierbei stellt  $\eta_{i,g}$  die Helligkeit der Spezies  $i$  im grünen Kanal und  $\eta_{i,r}$  entsprechend die Helligkeit im roten Kanal dar.

Nach Gleichung 3.10 wird die Autokorrelationsamplitude der einzelnen Kanäle für den Fall, dass jeweils nur eine Spezies mit einer roten bzw. einer grünen Helligkeit vorhanden ist, formuliert nach:

$$G_g(0) = \frac{1}{V_{\text{eff},g} \cdot c_g} \quad (3.19)$$

$$G_r(0) = \frac{1}{V_{\text{eff},r} \cdot c_r} \quad (3.20)$$

$$G_x(0) = \frac{1}{V_{\text{eff},x} \cdot c_x} \quad (3.21)$$

Bei  $V_{\text{eff},x}$  handelt es sich um das effektive Kreuzkorrelationsvolumen. Dieses kann unter Berücksichtigung der Gleichungen 3.8, 3.9 und 3.11 wie folgt berechnet werden [72]:

$$V_{\text{eff},x} = \pi \cdot \sqrt{\pi} \cdot \frac{(\omega_g^2 + \omega_r^2)}{2} \cdot \sqrt{\frac{z_g^2 + z_r^2}{2}} \quad (3.22)$$

wobei  $\omega_g = \omega_{0,\text{grün}}$ ,  $\omega_r = \omega_{0,\text{rot}}$ ,  $z_g = z_{0,\text{grün}}$  und  $z_r = z_{0,\text{rot}}$  ist.

Analog zu 3.12 kann in dieser Gleichung  $\omega_g$ ,  $\omega_r$ ,  $z_g$  und  $z_r$  ersetzt werden. Dadurch ist  $V_{\text{eff},x}$  aus den Kalibriermessungen mit freiem grünen und roten Farbstoff und den sich hieraus ergebenden Werten für Strukturparameter  $S$  und Diffusionszeit  $\tau_{\text{diff}}$  bei bekanntem Diffusionskoeffizienten  $D$  errechenbar.

$$V_{\text{eff},x} = \pi \sqrt{\pi} \cdot \frac{(4D_g \cdot \tau_g + 4D_r \cdot \tau_r)}{2} \cdot \sqrt{\frac{S_g^2 \cdot 4D_g \cdot \tau_g + S_r^2 \cdot 4D_r \tau_r}{2}} \quad (3.23)$$

Neben der Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x(0)$  können besonders die Verhältnisse der Kreuzkorrelationsamplitude zu den Autokorrelationsamplituden für Aussagen über die gemeinsame Diffusion von roten und grünen Teilchen herangezogen werden.

Dafür werden die folgenden Beziehungen verwendet:

$$\frac{G_x(0)}{G_r(0)} \propto \frac{N_x}{N_g} \quad (3.24)$$

$$\frac{G_x(0)}{G_g(0)} \propto \frac{N_x}{N_r} \quad (3.25)$$

Bei  $N_x$  handelt es sich um die rot-grünen (also in beiden Kanälen detektierten) Teilchen.  $N_r$  steht für alle roten und  $N_g$  für alle grünen Teilchen, unabhängig davon, ob sie die jeweils andere Farbe ebenfalls tragen. Diese Beziehungen gelten für den einfachsten Fall einer 1:1 Bindung von roten und grünen Teilchen ohne eine Veränderung der Helligkeiten.

## **Einflussgrößen auf die Amplitudenverhältnisse und deren Berücksichtigung**

Da bei der Methode der dcFCCS mit sehr niedrigen Konzentrationen und kleinen Volumina gearbeitet wird, kann ein nicht perfektes Setup, oder eine nicht ideale Probe die Messergebnisse deutlich verfälschen. Um Fehlinterpretationen der Messergebnisse durch diese Nichtidealitäten zu vermeiden, ist es notwendig diese Störgrößen zu kennen und zu berücksichtigen.

Sowohl die beiden Autokorrelationsamplituden als auch die Kreuzkorrelationsamplitude können in falsch-positiver oder falsch-negativer Weise beeinflusst werden. Bei der Verwendung der Proben zur Charakterisierung des Setups (als „Standardkreuzkorrelationsproben“ bezeichnet - Abschnitt 5.4.1) findet der Gehalt beider verwendeter Farbstoffe und deren statistische Verteilung Beachtung [64]. Für die Proben zur Bindungsanalyse des Sar1p werden hauptsächlich die Störgrößen mit Einfluss auf die rote Autokorrelationsamplitude sowie auf die Kreuzkorrelationsamplitude berücksichtigt. Neben dem Übersprechen (*cross talk*), wird die statistische Verteilung der roten Farbstoffmoleküle auf den Vesikeln sowie die Größenverteilung der Vesikel berücksichtigt. Die Beachtung der wellenlängenbedingt unterschiedlichen  $V_{\text{eff}}$  bei der Korrektur der Amplituden aller Proben ist außerdem erforderlich um die Amplituden unabhängig vom verwendeten Farbstoff vergleichen zu können. Weitere Einflussgrößen, wie eine gegebenenfalls verwendete Dotierung des Proteins und ein Quenchen des grünen Farbstoffes, werden in Abschnitt 5.2.1 näher beleuchtet.

Wie im weiteren Verlauf deutlich wird, sind für die Bestimmung der Bindungskonstanten aus dcFCCS-Messungen neben der Kreuzkorrelationsamplitude nur die Amplitude der roten Autokorrelation sowie das Verhältnis dieser beiden Amplituden (siehe Gleichung 3.24) notwendig. Aus diesem Grund wird auf die Berücksichtigung der Störgrößen im Bezug auf die grüne Autokorrelationsamplitude weitestgehend verzichtet.

**Übersprechen (cross talk)** Aufgrund der Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe und der Bandpassfilter des Setups ist ein Übersprechen besonders des grünen Farbstoffes in den roten Kanal nicht zu verhindern (siehe Abbildung 3.2). Alle Messungen werden entsprechend der von Bacia *et al.* [63] vorgeschlagenen Theorie für dieses Übersprechen in den langwelligeren Kanal korrigiert.

Dafür wird aus Kalibriermessungen ein Übersprechverhältnis  $\kappa$  aus den Helligkeiten des grünen Farbstoffes in beiden Kanälen berechnet:

$$\kappa = \frac{\eta_r^G}{\eta_g^G} \quad (3.26)$$

Hierbei bezeichnet  $\eta_r^G$  die Helligkeit des grünen Farbstoffes im roten Kanal und  $\eta_g^G$  die Helligkeit des grünen Farbstoffes im grünen Kanal. Bei beiden Helligkeiten handelt es sich um die hintergrundkorrigierten Helligkeiten des Farbstoffes. Mit Hilfe dieses Quotienten können im Folgenden die wahren Auto- und Kreuzkorrelationsamplituden (durch  $\hat{G}$  gekennzeichnet) berechnet werden:

$$\hat{G}_g(0) = G_g(0) \quad (3.27)$$

$$\hat{G}_r(0) = \frac{\kappa^2 \cdot F_g^2 \cdot G_g(0) + F_r^2 \cdot G_r(0) - 2 \cdot \kappa \cdot F_g \cdot F_r \cdot G_x(0)}{(F_r - \kappa \cdot F_g)^2} \quad (3.28)$$

$$\hat{G}_x = \frac{-\kappa \cdot F_g \cdot G_g(0) + F_r \cdot G_x(0)}{F_r - \kappa \cdot F_g} \quad (3.29)$$

Bei  $F_r$  und  $F_g$  handelt es sich um die apparenten (gemessenen) zeitgemittelten Fluoreszenzzählraten der beiden Kanäle.

**Normierung der Amplituden auf die Detektionsvolumina** Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Wellenlängen, auch bei Verwendung nur einer Lochblende, sind die minimalen Detektionsvolumina unterschiedlich groß und lassen sich nach Gleichung 3.9 berechnen. Das effektive Kreuzkorrelationsvolumen (Gleichung 3.22) ist ebenfalls verschieden zu den beiden anderen Volumina. Um die Amplituden besser vergleichen zu können, kann aus den Gleichungen 3.19 bis 3.21 durch Multiplikation mit dem jeweiligen  $V_{\text{eff}}$  eine von diesem Volumen unabhängige Amplitude  $G^*$  erhalten werden:

$$G^*(0) = \hat{G}(0) \cdot V_{\text{eff}} = \frac{1}{c} \quad (3.30)$$

Der Kehrwert dieser um das Volumen korrigierten Amplitude  $G^*(0)$  entspricht der Teilchenkonzentration in der Lösung. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, dass nun gleiche Konzentrationen auch die gleiche Amplitude aufweisen, unabhängig von der Wellenlänge des emittierten Lichts der Partikel. Wie in Abbildung 5.1 B deutlich wird, können somit direkt aus der Korrelationskurve die Verhältnisse von Kreuzkorrelationsamplitude zu den Autokorrelationsamplituden abgeschätzt werden. Bei 100 % doppelt markierten Partikeln sollten in einem perfekten Setup beide Quotienten gegen 1 laufen.

**Farbstoffgehalt der Vesikel** Wie Stefan Werner [64] zeigen konnte, sind mit Lipidfarbstoff markierte, kleine unilamellare Vesikel (SUV) gut für die FCS geeignet. Allerdings müssen einige Eigenschaften dieser Proben berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu 1:1 stöchiometrisch, kovalent markierten Oligonukleotiden werden Vesikel durch den Einbau von fluoreszierenden Lipidanaloga markiert. Diese Farbstoffe verteilen sich statistisch auf die Vesikel, so dass jeder Vesikel mit einer unterschiedlichen Anzahl an fluoreszierenden Teilchen markiert sein kann. Diese Tatsache muss bei der Berechnung der Amplitudenverhältnisse berücksichtigt werden.

Da die Vesikel immer mit einer diskreten Anzahl an Lipidfarbstoffen markiert sind, ist die Helligkeit eines Vesikels  $\eta_i$  ein Vielfaches  $i$  der Helligkeit eines Farbstoffmoleküls  $\eta_{\text{Farbstoff}}$ .

$$\eta_i = i \cdot \eta_{\text{Farbstoff}} \quad (3.31)$$

Die Konzentrationen  $c_i$  der verschiedenen hellen Teilchen können auch als Fraktionen  $f_i$  von der Gesamtteilchenkonzentration geschrieben werden:

$$f_i = \frac{c_i}{c_{ges}} \quad (3.32)$$

Werden die Beziehungen 3.31 und 3.32 in die Gleichung 3.14 eingesetzt, die zuvor nach Gleichung 3.30 volumennormiert wurde, ergibt sich für die rote Autokorrelation:

$$G_r^*(0) = \frac{\sum_i i^2 \cdot f_i}{\left[ \sum_i i \cdot f_i \right]^2} \cdot \frac{1}{c_{ges}} \quad (3.33)$$

Wenn nur Teilchen mit einheitlicher roter Helligkeit und Teilchen ohne roten Farbstoff vorkommen kann mit Gleichung 3.33 aus der volumennormierten Amplitude  $G_r^*(0)$  direkt die Konzentration der roten Teilchen abgelesen werden.

Ebenso kann diese Korrektur für die grüne Autokorrelationsamplitude durchgeführt werden:

$$G_g^*(0) = \frac{\sum_j j^2 \cdot f_j}{\left[ \sum_j j \cdot f_j \right]^2} \cdot \frac{1}{c_{ges}} \quad (3.34)$$

$j$  ist hierbei der Helligkeitsfaktor der grünen Teilchen,  $f_j$  sind die Fraktionen von Teilchen mit verschiedenen grünen Helligkeiten inklusive grüne Helligkeit = 0.

Für die Kreuzkorrelationsamplitude ergibt sich basierend auf Gleichung 3.18 anstelle Gleichung 3.14 analog:

$$G_x^*(0) = \frac{\sum_j \sum_i j \cdot i \cdot f_{ji}}{\left[ \sum_j j \cdot f_j \right] \left[ \sum_i i \cdot f_i \right]} \cdot \frac{1}{c_{ges}} \quad (3.35)$$

Wie oben bereits erwähnt, muss die statistische Verteilung der Farbstoffe auf den diffundierenden Teilchen (den Vesikeln) berücksichtigt werden. Dies soll am Beispiel der roten Autokorrelation verdeutlicht werden. Grundlage der Berechnung ist die Poissonverteilung:

$$P_\lambda(i) = \frac{\lambda^i}{i!} \cdot e^{-\lambda}, \quad i = 0, 1, 2, \dots \quad (3.36)$$

$P_\lambda(i)$  bezeichnet hierbei die Wahrscheinlichkeit, mit der ein zufällig gewähltes Vesikel mit  $i$  Farbstoffmolekülen beladen ist.  $\lambda$  ist eine reelle positive Zahl und gibt die mittlere Anzahl Farbstoffmoleküle pro Vesikel an. Zur weiteren Vereinfachung werden das erste Moment  $m_1$ , das zweite Moment  $m_2$  und das zweite zentrale Moment  $\mu_2$  der Poissonverteilung eingeführt:

$$m_1 = \sum_{i=0}^{\infty} i \cdot P_\lambda(i) = \lambda \quad (3.37)$$

$$m_2 = \sum_{i=0}^{\infty} i^2 \cdot P_\lambda(i) = \lambda + \lambda^2 \quad (3.38)$$

$$\mu_2 = \sum_{i=0}^{\infty} (i - \lambda)^2 \cdot P_\lambda(i) = \lambda \quad (3.39)$$

Aus Gleichung 3.37 und 3.39 ist ersichtlich, dass  $\lambda$  gleichzeitig Erwartungswert und Varianz von  $k$  ist.

Da nicht alle Teilchen dieselbe Helligkeit haben, beinhaltet die volumennormierte Amplitude die verschiedenen Helligkeiten  $\eta_i$  der Spezies  $i$ , deren einzelne Konzentrationen  $c_i$  als Fraktionen  $f_i = \frac{c_i}{c_{\text{ges}}}$  von der Gesamtkonzentration geschrieben werden können:

$$G_r^*(0) = \frac{\sum_i \eta_i^2 \cdot c_i}{\left[ \sum_i \eta_i \cdot c_i \right]^2} = \frac{\sum_i f_i \cdot \eta_i^2}{\left[ \sum_i f_i \cdot \eta_i \right]^2} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} \quad (3.40)$$

mit den Fraktionen der Spezies  $i$ ,  $f_i$ , die sich aus dem Verhältnis der Konzentration der Spezies  $i$  zur Gesamtkonzentration ergeben:  $f_i = \frac{c_i}{c_{\text{ges}}}$ .

Aus Gleichung 3.31 und 3.40 kann für die rote volumennormierte Autokorrelationsfunktion geschrieben werden.

Das Produkt aus Fraktion und Helligkeit jeder Spezies  $i$  kann mit dem ersten Moment (Gleichung 3.37) gleichgesetzt werden  $f_i \cdot \eta_i = P_\lambda(i) \cdot i \cdot \eta_{\text{Farbstoff}}$  und ergibt eingesetzt in Gleichung 3.33 die für Volumen und Farbstoffverteilung korrigierte Amplitude des roten Kanals:

$$G_r^*(0) = \frac{\sum_i f_i \cdot (i \cdot \eta_{\text{Farbstoff}})^2}{\left[ \sum_i f_i \cdot i \cdot \eta_{\text{Farbstoff}} \right]^2} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} \quad (3.41)$$

Für die Fraktionen oder Häufigkeitsverteilung  $f_i$  wird die Wahrscheinlichkeitsverteilung  $P_\lambda(i)$  eingesetzt. Damit kann Gleichung 3.41 auf der vorherigen Seite geschrieben werden als:

$$G_r^*(0) = \frac{1}{c_{\text{ges}}} \frac{\sum_i P_\lambda(i) \cdot i^2}{\left[ \sum_i P_\lambda(i) \cdot i \right]^2} = \frac{\lambda + \lambda^2}{\lambda^2} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} = \frac{1 + \lambda}{\lambda} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} \quad (3.42)$$

$\lambda$  gibt die mittlere Anzahl der Farbstoffmoleküle pro Teilchen an. Mit Hilfe dieses Wertes kann im folgenden eine um die Farbstoffverteilung korrigierte Autokorrelationsamplitude für den roten Kanal  $G_r^\ddagger(0)$  berechnet werden:

$$G_r^\ddagger(0) = \frac{1}{c_{\text{ges}}} = G_r^*(0) \cdot \frac{\lambda}{1 + \lambda} \quad (3.43)$$

Gleiches gilt für die grüne Autokorrelation im Falle Poisson-verteilter Farbstoffmoleküle.

Für die Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x^*(0)$  muss die Farbstoffverteilung nicht berücksichtigt werden. Dies wird deutlich, wenn Gleichung 3.35 (mit  $f_i = \sum_j f_{ji}$  und  $f_j = \sum_i f_{ji}$ ) durch Einsetzen des Ersten Moments aus Gleichung 3.37 umgeschrieben werden kann nach:

$$G_x^*(0) = \frac{\left[ \sum_j P_{\lambda_g}(j) \cdot j \right] \left[ \sum_i P_{\lambda_r}(i) \cdot i \right]}{\left[ \sum_j P_{\lambda_g}(j) \cdot j \right] \left[ \sum_i P_{\lambda_r}(i) \cdot i \right]} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} = \frac{\lambda_g \cdot \lambda_r}{\lambda_g \cdot \lambda_r} \cdot \frac{1}{c_{\text{ges}}} \quad (3.44)$$

Dabei bezeichnen  $\lambda_g$  und  $\lambda_r$  die mittlere Anzahl Farbstoffmoleküle des grünen und roten Farbstoffes. Die dargestellte Beziehung gilt nur, wenn beide Farbstoffe unabhängig voneinander auf den Vesikeln verteilt sind und wenn sich kein freier Farbstoff in der Lösung befindet.

Zur Berechnung von  $\lambda$  wird die Oberfläche der Vesikelmembran  $A_{\text{Vesikelmembran}}$ , die Oberfläche einer Lipidkopfgruppe (für DOPC:  $A_L \cong 0,6 \text{ nm}^2$ ) [73] und der molare Anteil an Farbstoff in der Lipidmischung  $p$  herangezogen:

$$\lambda = \frac{A_{\text{Vesikelmembran}}}{A_L} \cdot p \quad (3.45)$$

Dabei setzt sich  $A_{\text{Vesikelmembran}}$  aus der äußeren und inneren Monoschicht zusammen und lässt sich über die Außen- und Innenfläche einer Hohlkugel berechnen:

$$A_{\text{Vesikelmembran}} = 4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi\left(\frac{d}{2} - l\right)^2$$



$$\lambda = \frac{2\pi \cdot (d^2 - 2 \cdot l \cdot d + 2 \cdot l^2)}{A_L} \cdot p \quad (3.46)$$

Der  $r^4$ -gewichtete Durchmesser  $d$  der Vesikel kann in der FCS bestimmt werden. Die Dicke der Lipidmembran mit  $l = 3,7 \text{ nm}$  wird der Literatur entnommen [74].

Nach Berücksichtigung der Farbstoffverteilung auf den Vesikeln kann aus  $G_r^\ddagger(0)$  die Vesikelkonzentration berechnet werden, da  $c_{\text{ges}} = \frac{1}{G_r^\ddagger(0)} = c_V$ .

**Größenverteilung** Da die Vesikel durch die Präparationsmethode der Extrusion nicht einheitlich groß werden, muss von einer Größenverteilung ausgegangen werden. Diese kann mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung (*Dynamic Light Scattering*, DLS) gemessen und in der Auswertung der FCS-Daten berücksichtigt werden. Allerdings konnten Werner und Bacia [75] zeigen, dass die direkt in der FCS ermittelten Vesikelgrößen näherungsweise auch ohne Berücksichtigung dieser Verteilung für dcFCCS-Messungen verwendet werden können. Da die dabei entstehende Abweichung klein ist (nur wenige %), wird die Größenverteilung im vorliegenden Fall vernachlässigt [75, Manuskript in Vorbereitung].

**Setup spezifischer Qualitätsfaktor** Neben den bisher berücksichtigten farb- und probenspezifischen Einflüssen auf die Korrelationsamplituden hat auch der Geräteaufbau selbst durch Nichtidealität Einfluss auf die Messwerte. Dieser kann allerdings durch Kalibrierproben, die im Idealfall einer perfekten Kreuzkorrelationsprobe entsprechen, ermittelt werden [75, Manuskript in Vorbereitung]. Da die volumen- und farbstoffkorrigierten Amplitudenverhältnisse den Wert 1 annehmen, kann aus dem maximal erreichbaren Verhältnis von  $G_x^*(0)/G_r^\ddagger(0) = X_r$  bzw.  $G_x^*(0)/G_g^\ddagger(0) = X_g$  anhand von Messungen der Kalibrierprobe der Qualitätsfaktor  $Q$  bestimmt werden.

$$Q_r = \frac{(G_x^*(0)/G_r^\ddagger(0))_{\text{Kalibrierprobe}}}{(G_x^*(0)/G_r^\ddagger(0))_{\text{theor}}} = (G_x^*(0)/G_r^\ddagger(0))_{\text{Kalibrierprobe}} \quad (3.47)$$

$$Q_g = \frac{(G_x^*(0)/G_g^\ddagger(0))_{\text{Kalibrierprobe}}}{(G_x^*(0)/G_g^\ddagger(0))_{\text{theor}}} = (G_x^*(0)/G_g^\ddagger(0))_{\text{Kalibrierprobe}} \quad (3.48)$$

Für das verwendete Setups beträgt das mittlere  $Q = 0,92$ .

### 3.4. Bindungstheorie

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten für die Bindung von Proteinen an Vesikel mittels FCS sind in der Literatur bisher nur Titrationsdaten von Vesikeln bei sehr kleiner Protein- bzw. Peptidkonzentration bekannt [55, 56, 76]. Die Auswertung basiert auf Arbeiten von Tamm, Peitzsch und Laughlin und Ben-Tal *et al.*, die dafür die Beschreibung

eines molaren Verteilungskoeffizienten nutzen [77, 78, 79].  $K_P$  ist ein Proportionalitätsfaktor zwischen der Fraktion gebundenem Peptid  $f_{P,b}$  und der molaren Konzentration der freien Peptide in der Lösung  $c_{P,free}$ . Für den Fall, dass die Konzentration des für das Protein zugänglichen Lipids  $c_{L,acc}$  sehr viel größer ist als die Konzentration des gebundenen Proteins  $c_{P,b}$ , kann die Beziehung geschrieben werden als [55]:

$$c_{P,b} = K_P \cdot c_{P,free} \cdot c_{L,acc} \quad (3.49)$$

Die Fraktion  $f_{P,b}$  ergibt sich aus der Konzentration membrangebundener Peptide  $c_{P,b}$  und der molaren Konzentration aller Peptide in Lösung  $c_{P,tot}$ . Für die Berechnung wird die Gleichung 3.50 verwendet:

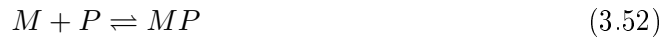
$$f_{P,b} = \frac{c_{P,b}}{c_{P,tot}} = \frac{K_P \cdot c_{L,acc}}{1 + K_P \cdot c_{L,acc}} = \frac{c_{L,acc}}{K_{D,L} + c_{L,acc}} \quad (3.50)$$

$$2 \cdot c_{L,acc} \cong N_L \cdot c_V \quad (3.51)$$

$c_{L,acc} \cong c_L/2$  gibt die Konzentration zugänglichen Lipids an, da sich nur ungefähr die Hälfte der Lipide in der äußeren Monoschicht befindet und die Vesikel als impermeabel für Protein angenommen werden. Über die Beziehung 3.51 kann diese in eine Vesikelkonzentration  $c_V$  umgerechnet werden, wobei  $N_L$  die Anzahl Lipide je Vesikel wiedergibt.,

Eine alternative Herangehensweise ist es, die allgemeine Theorie der Bindung von Liganden (z.B. kleine Moleküle, Peptide, Proteine) an ein Matrixmolekül (z.B. DNA, Bindepotein oder Vesikel) mit mehreren Bindeplätzen zugrunde zu legen. Diese Bindeplätze werden als identisch und unabhängig angenommen.

Für die Bindung von Proteinen an einen einzigen Membranbindungsplatz pro Vesikel wird die Beziehung 3.52 verwendet:



Darin ist  $M$  der Bindungsplatz auf dem Vesikel,  $P$  das Protein und  $MP$  der besetzte Bindungsplatz. In einer Gleichung kann dies wie folgt ausgedrückt werden:

$$K_1 = \frac{[M_{free}] \cdot c_{P,free}}{[MP]} \quad (3.53)$$

$[M_{free}]$  bezeichnet die Konzentration freier Bindungsplätze,  $c_{P,free}$  die Konzentration freier Proteine in der Lösung und  $[MP]$  ist die Konzentration der Protein-Membranbindungsplatz-Komplexe. Die zugehörige Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Reaktion gemäß dem Massenwirkungsgesetz wird mit  $K_1$  bezeichnet. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante  $K_P$  der Reaktion ist demnach  $1/K_1$ .

Der häufig experimentell bestimmbare Grad der Sättigung der verfügbaren Matrixmoleküle ( $\nu$ ), welcher Werte zwischen 0 und  $n$  annehmen kann, wird durch Gleichung 3.54 beschrieben [80]:

$$\nu = \frac{c_{P,b}}{c_V} = n \cdot \frac{c_{P,b}}{n \cdot c_V} = n \cdot \theta \quad (3.54)$$

$c_V$  entspricht der Gesamtkonzentration der Matrixmoleküle (hier Vesikel). Wenn jedes Matrixmolekül nur über einen Bindungsplatz ( $n = 1$ ) verfügt (1:1 Bindung) nimmt  $\nu_1$  Werte zwischen null und eins an und ist damit gleich dem relativen Bindungsgrad  $\theta$  („fractional saturation“ [80]). Dieser kann durch Gleichung 3.55 beschrieben werden.

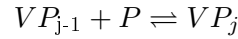
$$\theta = \nu_1 = \frac{[MP]}{[M_{\text{free}}] + [MP]} \quad (3.55)$$

Wird Gleichung 3.53 in Gleichung 3.55 eingesetzt, ergibt sich:

$$\theta = \nu_1 = \frac{c_{P,\text{free}}}{K_1 + c_{P,\text{free}}} \quad (3.56)$$

Dies gilt für  $K_D = K_1$ .

Werden statt Vesikeln mit nur einem Membranbindungsplatz ( $M$ ) Vesikel betrachtet, die eine Vielzahl von Bindungsplätzen haben können ( $V$ ), wird folgendes Gleichgewicht verwendet:



mit der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten:

$$K_j = \frac{[VP_{j-1}] \cdot c_{P,\text{free}}}{[VP_j]} \quad (3.57)$$

Der Index  $j$  gibt die Anzahl der besetzten Bindungsplätze pro Vesikel an. Der Bindungsgrad  $\nu$ , für die Bindung mehrerer Proteine an einen Vesikel kann ausgedrückt werden als:

$$\nu = \frac{[VP] + 2[VP_2] + \dots + n[VP_n]}{[V] + [VP] + [VP_2] + \dots + [VP_n]} = \frac{\sum_{j=0}^n j \cdot [VP_j]}{\sum_{j=0}^n [VP_j]} \quad (3.58)$$

$\nu$  kann Werte zwischen 0 und  $n$  annehmen.

Für unabhängige und identische Bindungsplätze auf einem Vesikel stellt  $\theta$  in Gleichung 3.56 den Bindungsgrad bezogen auf einen einzelnen Bindungsplatz dar; aus Gleichung 3.54 folgt:

$$\nu = n \cdot \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D + c_{P,\text{free}}} \quad (3.59)$$

In Gleichung 3.59 entspricht  $\nu$  dem messbaren Bindungsgrad einer jeden Probe,  $k_D$  ist die mikroskopische Dissoziationskonstante für eine Bindungsstelle.  $n$  gibt die maximale

Anzahl Bindungsplätze je Vesikel an. Wird nicht die Bindung an einen Bindungsplatz betrachtet, sondern an einen Vesikel mit  $n$  Bindungsplätzen, die noch allesamt unbesetzt sind, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit der Bindung des ersten Proteins an diesen Vesikel um den Faktor  $n$  [80]. Die Dissoziationskonstante  $K_{D,V}$  für die Bindung eines Proteins an einen bis dahin völlig unbeladenen Vesikel ist daher um den Faktor  $n$  niedriger als die mikroskopische Dissoziationskonstante für einen einzelnen Bindungsplatz:

$$K_{D,V} = \frac{k_D}{n} \quad (3.60)$$

Aus bekannter zugänglicher Lipid- und Vesikelkonzentration ( $c_{L,acc}$  und  $c_V$ ) kann über die Gleichung 3.51 die zugängliche Lipidanzahl je Vesikel ( $N_{L,acc} = \frac{1}{2}N_L$ ) berechnet werden, woraus Anzahl Lipide je Bindungsplatz ( $\Lambda_{acc}$ ) ermittelt werden kann:

$$\Lambda_{acc} = \frac{N_{L,acc}}{n} \quad (3.61)$$

Gleichung 3.50 beschreibt die Bindung an Bindungsstellen. Meist wird jedoch die Lipidkonzentration verwendet, da diese leichter messbar ist:

$$\frac{c_{P,b}}{c_{P,ges}} = \frac{c_{\text{Bindungsplätze}}}{k_D + c_{\text{Bindungsplätze}}} = \frac{\frac{c_{L,acc}}{\Lambda_{acc}}}{k_D + \frac{c_{L,acc}}{\Lambda_{acc}}} = \frac{c_{L,acc}}{\Lambda_{acc} \cdot k_D + c_{L,acc}} \quad (3.62)$$

also kann  $K_{D,L}$  auch geschrieben werden als:

$$\Lambda_{acc} \cdot k_D = K_{D,L} \quad (3.63)$$

Bei der Dissoziationskonstanten  $K_{D,L}$  als Dissoziationskonstante bezogen auf das Lipid handelt es sich um eine Hilfsgröße, damit anstelle der meist unbekanntes Bindungsplatzkonzentration die messbare Lipidkonzentration verwendet werden kann.

### 3.5. Transmissionselektronenmikroskopie

Das erste Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wurde 1931 von Ernst Ruska und Max Knoll konstruiert. Die Untersuchung biologischer Proben mittels eines Transmissionselektronenmikroskops wurde erstmals 1934 von Ladislaus Laslo Marton durchgeführt und seit den 1940er Jahren wurde die Verwendung der TEM für biologische Untersuchungen immer verbreiteter [81].

Im Prinzip ist ein TEM wie ein Lichtmikroskop aufgebaut, bei dem die Probe durchstrahlt und über ein Linsensystem und die Erzeugung eines Zwischenbildes vergrößert dargestellt wird (Abbildung 3.4 auf Seite 33). Das Durchstrahlen der Probe geschieht hier mittels Elektronen, die eine Wellenlänge  $\lambda$  aufweisen, welche von der Beschleunigungsspannung in der Elektronenkanone abhängt. Zum Beispiel beträgt die Wellenlänge bei einer Beschleunigungsspannung von 300 kV ca. 0,002 nm, damit kann in der Praxis ein Auflösungsvermögen von 0,1 nm erreicht werden [82]. Das Fokussieren des Elektronenstrahls geschieht mit Hilfe von magnetischen Elektronenlinsen, die durch ihre Anordnung und Magnetfeldstärke analog zum Lichtmikroskop das Objekt vergrößern. Um das Objekt betrachten zu können, müssen die Elektronen in sichtbares Licht umgewandelt werden. Dafür werden Materialien wie beispielsweise Cadmiumsulfid verwendet, die nach Anregung durch die Strahlenelektronen sichtbares Licht abgeben. Dieses Licht wiederum wird in modernen Geräten von CCD-Kameras registriert. Die so erzeugten Bilder können anschließend mit einem Computer ausgelesen und bearbeitet werden [82]. Eine Neuentwicklung sind zudem sogenannte Direkt-Elektronen-Detektoren, die die Elektronen ohne Umwandlung in Photonen registrieren können [83].

Um Proben im TEM betrachten zu können, ist es nötig, dass diese sich im Vakuum befinden. Zudem ist wichtig zu beachten, dass nur sehr dünne Proben von den Elektronen durchdrungen werden können. Neben ultradünnen Mikrotomschnitten von Geweben ist es möglich gewebe- und zellfreie Partikel auf Kohle- oder Kunststofffilmen aufzutragen, die auf einem Stützgitter aus Kupfer aufgebracht sind. Diese dünnen zellfreien Proben, die auf einem derartigen Kupfergitter getrocknet sind, können z.B. mit Uranylacetat kontrastiert werden. D.h. durch Anlagerung von schweren Uranylkationen erscheinen die Partikel durch die Streuung der Elektronen dunkler, wodurch der Kontrast zwischen Objekt und Hintergrund erhöht werden kann.

Eine weitere häufig verwendete Art der Probenfixierung ist die *Plunge-freezing* Technik (Eintauch-gefrieren). Dabei wird ein dünner wässriger Probenfilm durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan (-170 °C) schockgefroren. Das führt dazu, dass das zwischen den Probenpartikeln verbliebene Wasser vitrifiziert und damit eine glasähnliche, kristallfreie und kontrastarme Schicht bildet. Um sich diese Proben im Elektronenmikroskop anschauen zu können, ist es daher ebenfalls notwendig, die Probe im EM bei -170°C zu halten.

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde in dieser Arbeit zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Ausgewählte Proben des COPII-Tubulierungsversuches wurden mit beiden Mikroskopiemethoden untersucht, um genauere Aussagen über die entstehenden Strukturen treffen zu können.

## 4. Bindungsstudien von COPII-Proteinen an GUV mittels qualitativer Fluoreszenzmikroskopie zur Aufklärung der Vesikelabschnürung

Dieses Kapitel beinhaltet Daten zur Bindung von COPII-Proteinen an GUV, die bereits in zwei Artikeln veröffentlicht wurden [1, 3].

### 4.1. Einleitung zu Bindungsstudien von COPII an GUV mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die Bildung von COPII-Vesikeln an der ER-Membran ist bereits gut untersucht. Ebenso ist die Rolle von Sar1 für die Initiierung der Vesikelbildung und die Rekrutierung der Hüllproteine in der Vergangenheit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Beides wird in Abschnitt 1.2 ausführlich dargestellt. Dass Sar1 auch bei der Vesikelabschnürung eine wesentliche Rolle spielt, konnte ebenfalls schon gezeigt werden [16]. Hierbei blieb jedoch bislang die Rolle der GTP-Hydrolyse unklar.

Während *in vivo* mit einer hydrolyseblockierten Sar1-Variante (Sar1-H79G) kaum abgeschnürte Vesikel beobachtet werden konnten und der Cargotransport vom ER blockiert war [84, 57], zeigten *in vitro* Flotations- und Elektronenmikroskopiestudien unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen (unter Verwendung von GMP-PNP oder GTP $\gamma$ S) dass die Hydrolyse von GTP für das Abschnüren nicht notwendig zu sein scheint [13, 23, 29, 49]. Im letzteren Fall könnte die Hydrolyse von GTP durch das Sar1 hauptsächlich eine Rolle beim Zerfallen des COPII von abgeschnürten Vesikeln spielen. Erst dadurch wird die Fusion mit der Golgi-Membran ermöglicht [51, 23]. Bisher gibt es keine abschließenden Erkenntnisse darüber, in welche Weise die GTP-Hydrolyse entscheidend für die Vesikelabschnürung ist oder ob ebenfalls eine Regulation durch verschiedene Faktoren stattfindet [85].

Ein ähnlicher Mechanismus wie beim Sar1 sorgt auch beim Arf1 für eine Bindung des Proteins an die Membran. Arf1 ist ebenfalls eine kleine GTPase, die zu einem weiteren vesikelumhüllenden Proteinkomplex, dem COPI, gehört. Die kleine GTPase Arf1 (*ADP-ribosylation factor*) rekrutiert den Komplex des COPI an die Golgi-Membran. Arf1 besitzt im Gegensatz zu Sar1 einen Myristylanker an der N-terminalen AH, der sich bei Aktivierung durch den Austausch von GDP durch GTP mit in die Membran einlagert.

Neben der Rolle der GTP-Hydrolyse oder dem Einfluss unterschiedlicher Proteine auf die COPII-Vesikelabschnürung spielt zudem die Membran selbst, bzw. deren Zusam-

mensetzung eine entscheidende Rolle. Einer der ersten systematischen Bindungsversuche *in vitro* an nicht-native Membranen wurde von Matsuoka *et al.* durchgeführt [13]. Sie etablierten einen gut definierten Lipidmix, an dessen Liposomen COPII-Bindung und Vesikelabschnürung, untersucht mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation, am effizientesten war [13, 86]. Dieser Lipidmix, auch als „Major-Minor-Mix“ bezeichnet, wurde seit der Einführung in vielen *in vitro* Studien mit Hefe-COPII-Proteinen eingesetzt [13, 86, 87, 88].

Diese Studien zeigen auch, dass Sar1p in Abwesenheit von sauren Phospholipiden an die Membran bindet und die Zugabe von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) oder Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) kaum die Menge an gebundenem Sar1p erhöht. Die Proteine Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p hingegen binden nur, wenn neben gebundenem Sar1 auch saure Phospholipide wie 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphat (DOPA), 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-L-Serin (DOPS) oder Phosphatidylinositole (PIs) in den Liposomen vorhanden sind. Das deutet darauf hin, dass die COPII-Hülle durch elektrostatische Interaktion der Proteine mit der Membran stabilisiert wird [13]. Blumenthal-Perry *et al.* konnten in *in vivo* Zellstudien zeigen, dass durch Bindung von aktiviertem Sar1 an das tER die Konzentration von PI4P in diesen Bereichen kurzzeitig ansteigt und damit die Bindung von Sec23/Sec24 sowie Sec13/Sec31 begünstigt wird [89]. Ein Einfluss des Ergosterols auf die Bindung der COPII-Proteine konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Da dieses Sterol jedoch ein Bestandteil des ER in Hefezellen ist [90], wurde es zugefügt, um eine künstliche Lipidmischung zu erhalten, die bezüglich der Kopfgruppenzusammensetzung dem natürlichen System nahe kommt.

In *in vitro* Studien gibt es, anders als bei *in vivo* Untersuchungen, die Möglichkeit, alle Schritte der Vesikelabschnürung durch die COPII-Proteine zu kontrollieren. Der Einfluss der Umgebung, die Membranzusammensetzung und -krümmung und die Abfolge der Proteinzugabe können untersucht werden. Oft unbeachtet bleibt der Einfluss, den eine Methode selbst auf die zu untersuchenden Mechanismen hat.

Möglicherweise können die widersprüchlichen Untersuchungsergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen hinsichtlich der Rolle der GTP-Hydrolyse mit dem Einfluss der Untersuchungsmethode selbst erklärt werden. So wurden zur Untersuchung des Einflusses nicht-hydrolysierbarer GTP-Analoga auf die Entstehung kleiner Liposomen aus Großen Unilamellaren Vesikeln (LUV) meist Dichtegradientenzentrifugation oder Ultrazentrifugation zur Sedimentation verwendet [13, 29, 91]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Scherkräfte an den Tubuli und Vesikeln ein Abschnüren bewirken.

Um derartige mechanische Einflüsse möglichst gering zu halten, wurde in den folgenden Untersuchungen auf eine Zentrifugation verzichtet und mit der Lichtmikroskopie eine wenig invasive Methode gewählt, die sehr gut zur Beobachtung kleiner Strukturen *in vivo* und *in vitro* geeignet ist.

Zellen und deren Strukturen sowie Proteine und durch sie verursachte Veränderungen können dank der Verwendung der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie bis ca. 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  genau lokalisiert und abgebildet werden [68]. Ein Vorteil der Fluoreszenzmikroskopie ist, dass durch gezieltes Einsetzen fluoreszierender Farbstoffe nur die Bereiche oder Objekte sichtbar gemacht werden können, die in der jeweiligen Untersuchung von Interesse

sind, z.B. die Membran oder einzelne Proteine eines Komplexes. Weiterhin kann hierbei nicht nur ein Endpunkt betrachtet werden, wie es zum Beispiel bei Bindungsversuchen mittels Flotation der Fall ist, sondern der Prozess selbst ist in räumlicher und zeitlicher Auflösung, also *in situ*, verfolgbar.

Durch die Verwendung von GUV, die mit einem Durchmesser von 20 - 50  $\mu\text{m}$  etwa der Größe einer Zelle entsprechen und im Mikroskop gut sichtbar sind, ist die konfokale Fluoreszenzmikroskopie auch für *in vitro* Untersuchungen von Vesikeln interessant geworden [92, 93, 94]. Vesikel dieser Größe weisen eine geringe Krümmung auf. Damit sind sie gute Modellmembranen für die Beobachtung von Proteinen, die Krümmung induzieren und Abschnürung bewirken, wie die Proteine des COPII.

Zur besseren Analyse der entstehenden Strukturen im Bereich von 50 - 100 nm bietet die Elektronenmikroskopie inzwischen ebenfalls Möglichkeiten, Objekte mit geringer mechanischer Beeinflussung zu untersuchen.

Ziel der in diesem Kapitel vorgestellten Arbeiten war die mikroskopische Untersuchung der Bindung von Sar1p bzw. aller COPII-Proteine an GUV mit besonderem Augenmerk auf der Rolle der GTP-Hydrolyse durch das Sar1p. Dafür wurden die durch die Proteinbindung hervorgerufenen Veränderungen der Membranstrukturen *in vitro* mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie beobachtet. Zur besseren Auflösung der Strukturen wurden ebenfalls elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob der komplexe Major-Minor-Mix notwendig ist, um die typischen Strukturen des COPII unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen zu erhalten, oder ob eine vereinfachte Lipidmischung gleiche Ergebnisse liefern kann.

## 4.2. Durchführung der Bindungsexperimente

### 4.2.1. GUV-Präparation für die Proteinrekonstitution

Die GUV wurden nach der klassischen Methode der Elektroformation im Wechselstromfeld hergestellt [95]. Es wurden die in Tabelle 4.1 aufgeführten Lipidmischungen, Major-Minor-Mix, Major-Mix [13] sowie die einfacheren Mischungen aus DOPC/DOPE und DOPC/DOPA verwendet.



Tabelle 4.1.: **Lipidmischungen für die COPII-Rekonstitutionsexperimente.** Alle Angaben sind in mol%. Der Major-Minor-Mix und der Major-Mix wurde von [13] eingeführt.

Lipid	Major-Minor-Mix	Major-Mix	DOPC/DOPE	DOPC/DOPA
DOPC	34,4	53	80	80
DOPE	14,8	23	20	
DOPA	3,4	5		20
DOPS	5,4	8		
PI	5,4	11		
PI(4)P	1,5			
PI(4,5)P <sub>2</sub>	0,5			
CDP-DAG	1,3			
Ergosterol	33			

Diese Lipidmischungen wurden jeweils mit 0,5 mol% (bezogen auf die Gesamtlipidmenge) des fluoreszierenden Lipidanalogs Rhodamin B - DHPE versetzt.

Die in Chloroform/Methanol (2/1 v/v) gelösten Lipide wurden bei 60 °C auf einem Heizblock auf der ITO-Schicht von großen Glasplatten ausgestrichen. Zwei dieser Glasplatten wurden, getrennt durch einen 2 mm dicken Silikonring, zu einer Kammer zusammengebaut und mit 500 mosmol/l Saccharoselösung luftblasenfrei befüllt. Anschließend wurde ein Wechselstromfeld mit einer Spannung von  $U_{\text{eff}} = 1,5 \text{ V}$  und einer Frequenz von  $f = 10 \text{ Hz}$  an die innen liegenden ITO-Schichten angelegt. Die Elektroformation wurde für ca. 6 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt, bevor die GUV geerntet und in äquiosmolare Glukoselösung überführt wurden. Die durch Sedimentation über Nacht bei 4 °C gewonnene konzentrierte GUV-Suspension enthielt ca. 0,8 mM Lipid, was mittels Phosphattest (durchgeführt von Claudia Müller) bestimmt werden konnte. Die GUV wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

#### 4.2.2. Proteingewinnung

##### Überexpression von Sar1p, Sar1p-H77L, Sar1p-SCCS und Sec12p- $\Delta$ C

Die Gensequenzen sowohl für Sar1p (Vektor pTY40) [51] als auch für die zytoplasmatische Domäne von Sec12p (Sec12p- $\Delta$ C) [29] waren in einen pGEX-2T-Expressionsvektor eingebracht und wurden freundlicherweise von Randy Schekmann zur Verfügung gestellt. Die Sar1p-H77L-Variante wurde durch ortsgerichtete Mutagenese erzeugt (durchgeführt von Sebastian Daum), ebenso die Sar1p-SCCS-Variante (durchgeführt von Jan Auerswald). Die Überexpression der Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionskonstrukte mit Thrombinschnittstelle erfolgte in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Die Zellen wurden in Schüttelkolben in 1,5 l LB-Medium auf dem Schüttelinkubator bei 150 rpm und 37 °C bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,6 inkubiert. Dann folgte die Induktion zur Expression von GST-Sar1p mit Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) (f.c. 1 mM) für zwei Stunden bei 30 °C. (Die Induktion mit IPTG zur Expression von GST-Sec12p- $\Delta$ C erfolgte für drei Stunden bei 37 °C.) Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifu-

gation in der Beckmann Zentrifuge Avanti J30-I mit Rotor JLA9.1000 bei  $5000\times g$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min sedimentiert. Die Zellpellets wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **Reinigung von Sar1p und Sar1p-SCCS**

Sofern nicht anders erwähnt, wurde die Reinigung der Proteine bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Das Zellpellet (ca. 5 g) wurde in 45 ml TBS-Puffer, versetzt mit 5 mM Magnesium und  $5\text{ }\mu\text{M}$  GDP [29] sowie 1 mg/ml Lysozym, gelöst. Nach dem Zellaufschluss per Gaulin Homogenisator und Zentrifugation (JA30.50-Rotor,  $20000\times g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min) wurde der Überstand auf eine Gravitationsflusssäule mit 5 ml-GSH-Agarose aufgebracht. Nach dem Waschen mit fünf Säulenvolumen TBS-Mg mit  $5\text{ }\mu\text{M}$  GDP wurde die Säule mit TCB-Puffer, versetzt mit  $5\text{ }\mu\text{M}$  GDP, umgepuffert. Durch Zugabe von vier Einheiten Thrombin und vorsichtiges Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur wurde das GST-Fusionsprotein an der Thrombinschnittstelle zwischen GST und Protein gespalten. Das abgespaltene Sar1p sowie die Protease Thrombin wurde mit TCB-Puffer von der Säule eluiert. Zum Abtrennen des Thrombin wurde eine 1 ml Benzamidinsepharosesäule nachgeschaltet. Thrombin bindet an die Benzamidinsepharose und kann damit aus der Sar1p-Lösung entfernt werden. Die einzelnen Zwischenschritte sowie die Elutionsfraktionen nach der Benzamidinsepharosesäule wurden in der SDS-PAGE kontrolliert. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradfordmethode bestimmt. Alle Sar1p enthaltenden Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **Reinigung von Sec12p- $\Delta\text{C}$**

Die Reinigung von Sec12p- $\Delta\text{C}$  erfolgte nach einem ähnlichen Protokoll wie Sar1p, mit einzelnen Abweichungen: Die Zellen wurden in Resuspendierungspuffer für Sec12p- $\Delta\text{C}$  (siehe Tabelle 2.3) gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte per Ultraschall für 20 min. Das Einspülen der Säule vor der Thrombin-Spaltung und das Waschen danach erfolgte mit TCB-Puffer ohne GDP-Zugabe.

### **Kontrolle der Proteinreinigung mittels SDS-PAGE**

Um die Schritte der Proteinreinigung zu kontrollieren wurde die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Dabei wurden die Proteine durch das im Gel und Probenpuffer enthaltene SDS denaturiert und negativ geladen. Somit war es möglich, die Proteine anhand ihrer molaren Masse durch Anlegen einer Spannung aufzutrennen. Jeweils 5 ml der Proben wurden zu 10 ml SDS-Probenpuffer gegeben, bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert und auf ein Trenngel mit 15 % Acrylamid (Massenanteil) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung wurde bei 25 mA für 50 min durchgeführt. Es wurde das Tris-HCl/ Tris-Glyzerin-Puffersystem nach [96] verwendet. Die Färbung mit 0,12 % (w/v) Coomassie Blue Silver G-250, gelöst in Wasser mit 20 % (v/v) Methanol, 10 % (w/v) Phosphorsäure, 10 % (w/v) Ammoniumsulfat erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die überschüssige Farbe durch Inkubation des Gels für ca. 1,5 Stunden in Entfärbelösung, bestehend aus 10 % (v/v) Essigsäure und 20 % (v/v) Ethanol in Wasser, entfernt.

## Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration aller Proteine wurde mittels Bradfordreagenz bestimmt. Dafür wurden 10  $\mu$ l der jeweiligen Elutionsfraktion mit 200  $\mu$ l Bradfordreagenz 30 min inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen. Über eine BSA-Kalibrierreihe im Bereich von 0 - 1 mg/ml Protein konnte aus den Absorptionswerten die Konzentration berechnet werden.

## Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p

Die Expression von Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p erfolgte in *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen, die freundlicher Weise von Randy Schekman zur Verfügung gestellt wurden. Sec23p-R722A/Sec24p wurde durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt. Alle Arbeiten zur Mutagenese, Expression und Reinigung von Sec23p/Sec24p, Sec23pR722A/Sec24p sowie Sec13p/Sec31p wurden von Sebastian Daum durchgeführt, der die Proteine anschließend freundlicherweise zur Verfügung stellte.

## Arf1p

Die Expression von Arf1p erfolgte in einem *Escherichia coli* Stamm, der ebenfalls freundlicher Weise von Randy Schekman zur Verfügung gestellt wurde. Die Anzucht und Reinigung des Proteins wurde von Sebastian Daum durchgeführt, der die Proteine für die vergleichenden Untersuchungen zur Verfügung stellte.

## Markierung von Sar1p-SCCS

Die Markierung des Sar1p-SCCS (siehe Tabelle 2.6 auf Seite 26) mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 Maleimid wurde von Jan Auerswald durchgeführt und freundlicherweise für die Experimente zur Verfügung gestellt.

### 4.2.3. Sar1p-Bindung an wenig gekrümmten Membranen

Für den Ansatz zur Bindung von Sar1p an GUV wurde dem HKM-Puffer 1 mM GTP oder ein anderes Guanosinnukleotid (GMP-PNP, GDP) zugesetzt. Um das GTP in „unbegrenzter“ Menge zur Verfügung zu stellen, wurde den Ansätzen zusätzlich zum GTP ein GTP-Regenerationssystem (gekennzeichnet als GTP<sub>r</sub>) zugefügt. Dieses bestand aus 0,2 mg/ml (f.c.) Kreatinphosphokinase und 40 mM (f.c.) Kreatinphosphat in B88-Puffer [87]. Zu 10  $\mu$ M Sar1p wurden des weiteren 1  $\mu$ M Sec12p- $\Delta$ C(1-354) zugegeben. Dabei handelt es sich um die N-terminale zytosolische Domäne des Sec12p ohne Transmembranhelix und lumenalen Teil [29]. Alternativ zum Sec12p wurden 2,5 mM EDTA eingesetzt, welches durch die Komplexbildung des Mg<sup>2+</sup> den Austausch von GDP zu GTP erleichtert.

Um die GUV nicht durch osmotische Einflüsse zu zerstören, wurden alle eingesetzten wässrigen Bestandteile hinsichtlich ihrer Osmolalität vermessen und im Gesamtansatz mit Glycerin entsprechend auf die Osmolalität der GUV-Suspension eingestellt. Die Reaktion wurde mit Zugabe von ca. 40  $\mu$ M Lipid in Form von GUV gestartet (siehe auch

Tabelle 4.2). Nach Zusammengeben aller Komponenten wurde der Ansatz in einer Kammer, bestehend aus zwei mit Gelatine beschichteten Deckgläsern und einem ca. 300  $\mu\text{m}$  hohen Abstandshalter aus doppelseitigem Klebeband, für zwei bis sechs Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Zunächst wurde untersucht, unter welchen Bedingungen Sar1p allgemein eine Krümmung der Membran induzieren kann. Um den Einfluss der Hydrolyse zu untersuchen, wurden GTP<sub>r</sub>, GDP oder GMP-PNP eingesetzt und die resultierenden Strukturen verglichen. Zusätzlich wurde eine Variante (Sar1p-H77L) mit GTP kombiniert, die eine normale intrinsische GTPase-Aktivität aufweist, aber unempfindlich gegenüber dem GTPase-aktivierenden Protein Sec23p ist [57]. Um den Einfluss der amphipathischen Helix auf Membranen zu untersuchen, wurde zudem eine  $\Delta\text{N23}$ -Sar1p-Variante verwendet, der die Aminosäuren 1-23, welche die amphipathische Helix bilden, fehlten [16]. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden erfolgte die mikroskopische Analyse des Einflusses von Sar1p auf GUV. Zum Vergleich wurde Arf1p mit GTP an GUV untersucht.

#### 4.2.4. *In vitro* Rekonstitution der minimalen COPII-Komponenten

Die Bindungsversuche mit dem gesamten inneren und äußeren COPII an GUV wurden ebenfalls in HKM-Puffer, der mit 1 mM GTP oder einem anderen Nukleotid (GMP-PNP, GDP) versetzt war, durchgeführt. Hierbei wurden 2  $\mu\text{M}$  Sar1p mit 1  $\mu\text{M}$  Sec12p- $\Delta\text{C}$  (oder 2,5 mM EDTA), 0,32  $\mu\text{M}$  Sec23p/Sec24p und 0,52  $\mu\text{M}$  Sec13p/Sec31p gemischt. Die Osmolalität wurde mittels Glyzerin angepasst und die Reaktion durch Zugabe von ca. 40  $\mu\text{M}$  Lipid in Form von GUV gestartet (siehe auch Tabelle 4.2). Die Kammer wurde, wie in Abschnitt 4.2.3 beschrieben, zusammengesetzt und die Probe für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Elektronenmikroskopie wurde ein Teil des Ansatzes in einem 200  $\mu\text{l}$  PCR-Röhrchen inkubiert, bevor es für die weitere Präparation verwendet wurde.

Neben der Möglichkeit ein nicht-hydrolysierbares GTP einzusetzen, wurde auch die Sar1p-H77L-Variante mit GTP untersucht. Als eine weitere Möglichkeit, die Hydrolyse des GTP zu unterdrücken, wurde (von Sebastian Daum) eine Variante des Sec23p eingeführt, die an der Stelle 722 anstelle eines Argininrestes, ein Alanin trägt (Sec23p(R722A)/Sec24p), und damit unfähig ist, das Sar1p hinsichtlich der Hydrolyse zu aktivieren [18, 20].

Tabelle 4.2.: Endkonzentrationen der Reaktionsansätze für die Sar1p- und COPII-Rekonstitutionsversuche. Nukleotid bezeichnet hier GTP, GTP<sub>r</sub>, GDP oder GMP-PNP

Komponente	Endkonzentration für Sar1p-Bindung in mM	Endkonzentration für COPII-Rekonstitution in mM
HEPES	20	20
Kaliumazetat	50	50
Magnesiumchlorid	1,2	1,2
Sar1p	0,01	0,002
Nukleotid	2	1
Regenerationssystem: Kreatinphosphokinase	0,0025	
Kreatinphosphat	40	
Sec12p- $\Delta$ C	0,001	0,001
Sec23p/Sec24p		0,00032
Sec13p/Sec31p		0,00052
10 %iges Glyzerin (w/v)	variabel zur Einstellung der Osmolalität	
Lipid in Form von GUV	0,04	0,04

#### 4.2.5. Konfokale Lichtmikroskopie

Nach der Inkubation der Proteinrekonstitutionsproben wurde die Deckglaskammer ohne weitere Manipulation in den Probenhalter des inversen Mikroskopsetups gelegt. Die Aufnahmen wurden mit dem in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen LSM-Aufbau unter Verwendung eines C-Appochromat 40 $\times$ /1,2 N.A. Wasserimmersionsobjektivs durchgeführt. Die Anregungswellenlänge für den Lipidfarbstoff Rhodamin B - DHPE betrug 561 nm mit einer Laserleistung von ca. 30 - 90  $\mu$ W, DiD C<sub>18</sub> wurde mit der Wellenlänge 633 nm und einer Leistung von 20 - 50  $\mu$ W angeregt. Das mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 markierte Protein wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm und einer Leistung von 15 - 50  $\mu$ W angeregt. Die Aufnahmen am LSM710 erfolgten mittels der ZEN 2009 - Software. Die Bildbearbeitung wurde ebenfalls in diesem Programm durchgeführt. Um die Membranveränderungen sichtbar zu machen, wurde für alle Abbildungen, wenn nicht anders erwähnt, eine nicht-lineare Darstellung ( $\gamma = 0,45$ ) gewählt, um die Helligkeiten anzupassen. Alle Proben wurden bei Raumtemperatur mikroskopiert.

#### 4.2.6. Negativ-Kontrastierungs- und Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Die negativ-kontrastierten Proben wurden nach der Inkubationszeit von zwei Stunden präpariert, indem 5  $\mu$ l der *in vitro* rekonstituierten Probe auf ein mit Formvarfilm be-

schichtetes Kupfergrid aufgebracht wurden. Nach einer Minute wurde überschüssige Flüssigkeit mit Filterpapier abgenommen und 5  $\mu$ l einer 1 %igen (w/v) wässrigen Uranylazetat-Lösung ebenfalls für eine Minute auf das Grid gegeben, bevor es wieder entfernt wurde. Die getrockneten Proben wurden von Annette Meister mit einem EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop untersucht und die Bilder mit einer SSCCD SM-1k-120 Kamera aufgenommen.

Für die Kryo-Elektronenmikroskopie wurden die *in vitro* rekonstituierten Proben auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Elektronenmikroskopiegrid pipettiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgenommen wodurch ein dünner Flüssigkeitsfilm auf dem Grid verblieb. Dieser wurde durch schnelles Eintauchen in flüssiges Ethan sofort vitrifiziert. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Bildaufnahme erfolgte an einem Tecnai F30 300kV FEI Elektronenmikroskop, welches mit einer 4K FEI Eagle Kamera ausgestattet war. Die Bilder wurden mit einer Vergrößerung von 20 000 $\times$ , entsprechend einer Pixelgröße von 0,59 nm, mit einem Defokus zwischen  $-3 \mu$ m und  $-4 \mu$ m mit einer Dosis von  $25 \text{ e}^-/\text{Å}^2$  am Tecnai FEI EM gemacht. Präparation und Bildaufnahme der Kryo-Proben wurden von Annette Meister und Simone Prinz am EMBL in Heidelberg durchgeführt.

## 4.3. Ergebnisse und Diskussion der COPII-Bindung an GUV

### 4.3.1. Sar1p-Bindung an GUV

#### Sar1p-induzierte Krümmung von Membranen

Aktiviertes Sar1p (Sar1p-GTP) kann in Abwesenheit der restlichen COPII-Komponenten durch Einlagern seiner amphipathischen Helix in die äußere Membranschicht Spannung erzeugen und die gesamte Membran krümmen [16, 54]. Hinzu kommt eine helikale Anordnung der Sar1p-Moleküle untereinander [54]. Es entstehen stark gekrümmte tubuläre Strukturen. Dadurch verändert sich das Verhältnis von Oberfläche (Lipide) zu Volumen, es wird mehr Lipid bei kleinem Volumen benötigt. Dadurch kommt es zu Spannungen in der Membran, die zum Zerreißen der GUV führt (siehe Bacia *et al.* 2011, Abbildung 1d [1]). In Folge dessen bleiben Nester aus weichen Tubuli in der Probe sichtbar.

Wie in Abbildung 4.1 A ersichtlich, waren zwei Stunden nach Zugabe von Sar1p-GTP<sub>r</sub> keine GUV mehr in der Probe zu erkennen. Sar1p-GTP<sub>r</sub> bewirkte, dass alle großen Vesikel platzten und sich kleine fädige Strukturen bildeten. Anhand der LSM-Aufnahmen ist es nicht möglich, den Durchmesser dieser dünnen Röhren abzuschätzen. Wurde statt des GTP<sub>r</sub>, das Nukleotid GDP in den Ansatz gegeben, konnte keine Veränderung der GUV beobachtet werden (Abbildung 4.1 B). In Abbildung 4.1 C wird deutlich, dass  $\Delta$ N23-Sar1p die Membran auch unter aktivierenden GTP-Bedingungen nicht verformte. Dieser Sar1p-Variante fehlen die 23 N-terminalen Aminosäuren, die der amphipathischen Helix des Sar1p entsprechen. In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass sich  $\Delta$ N23-Sar1p hinsichtlich der GTP-Bindung und -Hydrolyse wie das Sar1p verhält [16]. Dafür wurde Sar1p sowie das mit His-Tag versehene  $\Delta$ N23-Sar1p an mit Nickellipid versetzten Vesikeln untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Änderung der Tryp-

tophanfluoreszenz, die durch den Austausch von GDP zu GTP messbar ist, mit beiden Proteinvarianten vergleichbar war [16]. Dies zeigt, dass GTP-Bindung und -Hydrolyse unabhängig von der amphipathischen Helix sind [16]. Die in Abbildung 4.1 C gezeigten Beobachtung sprechen dafür, dass das Einlagern der amphipathischen Helix notwendig ist, um Krümmung an Membranen zu erzeugen. Ebenso wenig hatten die Proteine des GTP-Regenerationssystems und Sec12p- $\Delta$ C in Abwesenheit von Sar1p einen Einfluss auf die Membran (Abbildung 4.1 D).

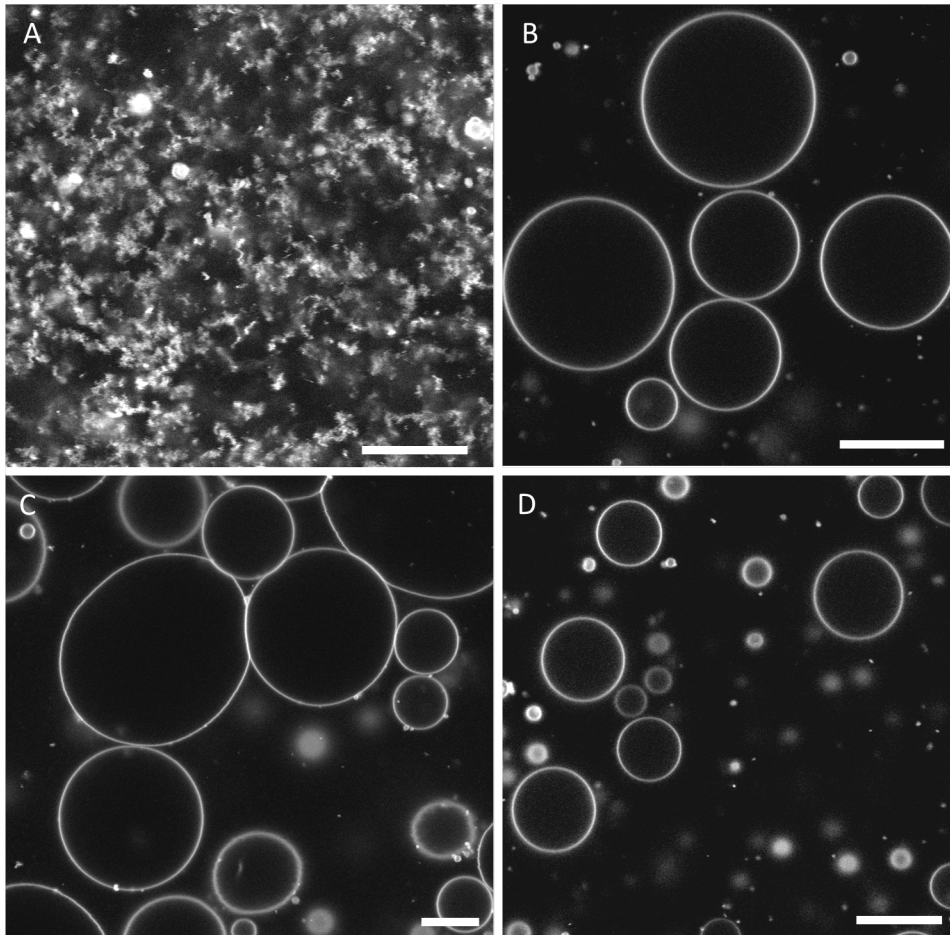


Abbildung 4.1.: **Sar1p-GTP erzeugt Krümmung** (A) Ansatz mit 10  $\mu$ M Sar1p, 1  $\mu$ M Sec12p- $\Delta$ C und 1 mM GTP<sub>r</sub> inkubiert mit fluoreszenzmarkierten GUV. Eine Aktivierung des Sar1p mit GTP zerstörte die GUV und verursachte eine Tubulierung mit sehr starker Krümmung. (B) 10  $\mu$ M Sar1p, 1  $\mu$ M Sec12p- $\Delta$ C und 2 mM GDP inkubiert mit GUV, zeigte keine Tubulierung, die GUV wurden nicht zerstört. (C) Bei Zugabe von Sar1p als  $\Delta$ N23-Variante [18] (10  $\mu$ M), ohne amphipathische Helix, mit 1 mM GTP und 1  $\mu$ M Sec12p- $\Delta$ C zu GUV blieben die GUV erhalten. (D) Die Kontrolle ohne Sar1p mit 1  $\mu$ M Sec12p- $\Delta$ C und 1 mM GTP<sub>r</sub> zeigte keine Zerstörung der GUV. Für alle Ansätze wurden GUV aus Major-Minor-Mix mit 0,5 mol% Rhodamin B - DHPE verwendet. Es wurde für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu$ m

Es wurde deutlich, dass die Krümmung von Membranen, die durch die amphipathische Helix des Sar1p verursacht wird [16], auch in der Fluoreszenzmikroskopie eindeutig nachweisbar war.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von Sar1p, an Membranen zu binden und diese zu krümmen, unabhängig von der GTP-Hydrolyse ist. Dies zeigten Versuche mit Sar1p mit nicht-hydrolysierbarem GMP-PNP (Abbildung 4.2 A). Die Sar1p-H77L-Variante, die aufgrund einer Strukturänderung GTP zwar binden kann, aber unempfindlich gegenüber der GAP-Aktivität des Sec23p ist [57], wurde ebenfalls in diesem Bindungsansatz untersucht. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die intrinsische GTP-Hydrolyseaktivität bei beiden Proteinvarianten (Sar1p und Sar1p-H77L) ähnlich ist [57]. In den gezeigten Untersuchungen konnte ebenfalls kein Unterschied in der Membranbindung festgestellt werden (Abbildung 4.2 B). Damit kann die Sar1p-H77L hier, hinsichtlich ihrer Fähigkeit an Membranen zu binden, wie die Wildtyp-Variante des Sar1p behandelt werden. In Untersuchungen mit humanem Sar1b wurden ähnliche Ergebnisse erhalten [54, 53].

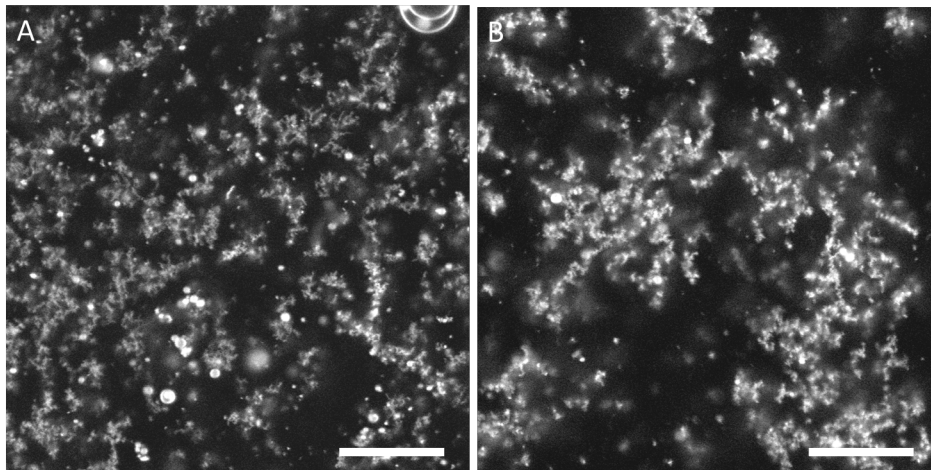


Abbildung 4.2.: **Die Tubulierung ist Hydrolyse-unabhängig.** Sar1p tubulierte fluoreszenzmarkierte Major-Minor-Mix GUV, nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln mit (A) 10  $\mu\text{M}$  Sar1p, 1  $\mu\text{M}$  Sec12p $\Delta\text{C}$  und 1 mM GMP-PNP und (B) mit 10  $\mu\text{M}$  Sar1pH77L, 1  $\mu\text{M}$  Sec12p $\Delta\text{C}$  und 5 mM GTP $_{\gamma}$ , ohne dass Hydrolyse notwendig war.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu\text{m}$

Die Hydrolyse von GTP ist in Abwesenheit des GTPase aktivierenden Proteins Sec23p/Sec24p sehr langsam, wie auch biochemische Daten zur Hydrolyseaktivität [57, Jan Auerswald, persönliche Mitteilung] belegen. Dies erklärt den fehlenden Unterschied zwischen den Versuchen mit GTP $_{\gamma}$  oder mit GMP-PNP im Ansatz nach zweistündiger Inkubation. Nach einer längeren Inkubationszeit von vier bis sechs Stunden werden Unterschiede zwischen den Proben mit verschiedenen Nukleotiden deutlich, diese werden in Abschnitt 4.3.1 näher beschrieben und diskutiert.

Bei höherer Auflösung in der Elektronenmikroskopie konnte ein Unterschied zwischen Membranen mit und ohne eingelagertem Protein festgestellt werden. Dies ist in Abbil-



Abbildung 4.3 A, in der Membranen mit Sar1p (rote Pfeile, Vergrößerung a) und ohne Sar1p (weiße Pfeile, Vergrößerung b) nebeneinander zu sehen sind, ersichtlich. Zwischen Membranen, die mit Sar1p-GTP<sub>r</sub>, Sar1p-GMP-PNP oder Sar1p-H77L-GTP<sub>r</sub> inkubiert wurden, konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden (vergleiche Abbildung 4.3 A-C). In allen drei untersuchten Proben war eine verdickte Membran zu erkennen. Diese Verdickung entsteht durch die Einlagerung des Sar1p. Außerdem wird deutlich, dass Sar1p-umhüllte Lipidstrukturen wahrscheinlich durch die oben bereits beschriebene Affinität des Sar1p zu Oberflächen, bevorzugt auf oder am Kohlenstoff haftete und nur selten frei in der vitrifizierten Eisschicht der Löcher zu finden war (besonders deutlich in Abbildung 4.3 B). Dies machte es unmöglich Unterschiede in der Beschaffenheit und im Muster der Sar1p-umhüllten Strukturen zu erkennen. Die durch die Bindung des Sar1p gebildeten Tubuli hatten an den schmalsten Stellen einen Durchmesser von etwa 45-90 nm und eine sehr variable Länge. Die in Abbildung 4.1 B-D dargestellten Kontrollen konnten nicht in der Elektronenmikroskopie untersucht werden, da GUV zu groß für die kleinen Maschen des EM-Grids sind und mechanisch zerstört werden würden.

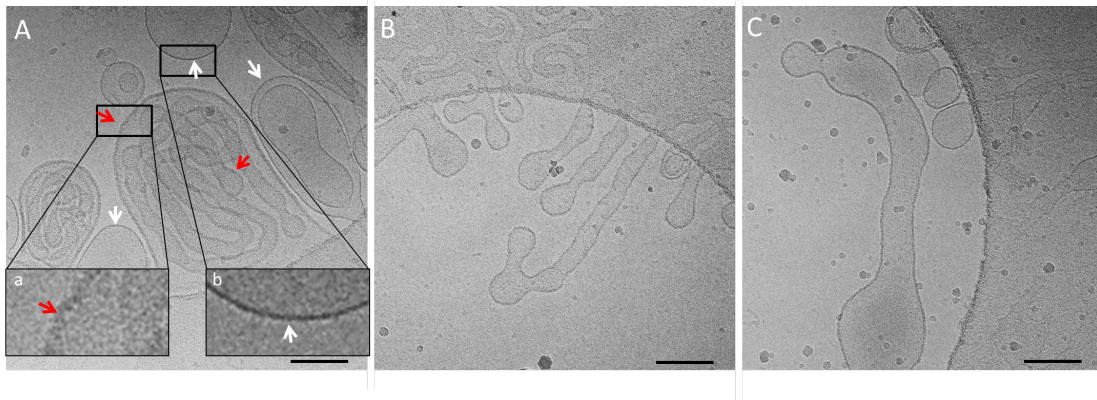


Abbildung 4.3.: **Kryo-EM-Aufnahmen** (A) Sar1p mit Sec12p- $\Delta$ C und GTP<sub>r</sub>. (B) Sar1p mit Sec12p- $\Delta$ C und GMP-PNP. (C) Sar1p-H77L mit Sec12p- $\Delta$ C und GTP<sub>r</sub>. Präparation von Annette Meister, Aufnahmen Tecnai FEI am EMBL in Heidelberg von Simone Prinz. Maßbalken 200 nm, Defokus: 4  $\mu$ m

### Sar1p erzeugt photolabile lange steife Tubuli

Neben den bereits in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen weichen, flexiblen Tubuli konnten nach einer längeren Inkubationszeit (ca. vier bis sechs Stunden ab Zugabe der GUV zu Sar1p-GTP<sub>r</sub> und Sec12p- $\Delta$ C) der GUV mit Sar1p (Abbildung 4.4 B) oder Sar1p-H77L (Abbildung 4.6 A) und Sec12p- $\Delta$ C mit GTP<sub>r</sub> auch lange, steife Tubuli beobachtet werden. Dies Tubuli entstehen möglicherweise erst durch eine exakte helikale Anordnung der Sar1p-Moleküle auf der Lipidoberfläche, die ein Versteifen der zu Beginn weichen Membranschläuche ermöglicht. Dies könnte durch wenige GTP-Hydrolysezyklen und ein dadurch erfolgendes Loslösen von und ein anschließendes wieder Einbauen in die Membran geschehen. Da nicht alle Sar1-Moleküle gleichzeitig GTP hydrolysieren und von der Membran dissoziieren, kann die zweite Bindung eines Sar1p an die Membran besser an be-

reits vorhandenen Sar1p-Molekülen ausgerichtet werden, wodurch eine höhere Ordnung ermöglicht wird. Dafür spricht zum einen die lange Inkubationszeit und zum anderen die Notwendigkeit eines GTP-Regenerationssystems, um diese steifen Tubuli zu erhalten. Ähnliche tubulären Strukturen wurden bereits mit dem Hamster Sar1A beobachtet [54]. Die steifen Tubuli, die eine Länge von  $\approx 100 \mu\text{m}$  erreichen können, waren zumeist deutlich heller als die anderen Strukturen in der Probe, was auf ein Bündel tubulärer Strukturen hinwies. Da diese mit Sar1p gebildeten Strukturen bei direkter Beleuchtung mit dem sichtbaren Laserlicht schnell destabilisiert wurden und sich zusammenzogen (Abbildung 4.5 und 4.6 A), war es bisher nicht möglich diese genauer zu untersuchen. Bemerkenswert in den mit Sar1p durchgeführten Untersuchungen war jedoch, dass Tubuli in Regionen außerhalb des Fokus sich nicht zusammenzogen. Ebenfalls konnte das Zusammenziehen auch ohne Verwendung des Lasers und ohne Fluoreszenzfarbstoffe in der Differentialinterferenzkontrastmikroskopie (DIC) nach längerer Belichtungszeit beobachtet werden. Damit kann das Vorhandensein des Farbstoffes als spezifische Ursache für das Zusammenziehen ausgeschlossen werden. Wurden GUV der gleichen Lipidmischung mit gleichem Fluoreszenzfarbstoff unter gleichen Bedingungen wie für Sar1p-GTP<sub>r</sub> stattdessen mit Arf1p und GTP $\gamma$ S inkubiert, konnten ausschließlich sehr lange steife Röhren (Abbildung 4.4 C) beobachtet werden. Diese waren auch nach längerer Beleuchtung stabil. Arf1 ist eine kleine GTPase, die Bestandteil des COPI ist. Sie hat eine dem Sar1 sehr ähnliche Struktur und auch Funktionsweise. Ein entscheidender Unterschied der beiden kleinen GTPasen ist ein Myristylanker am Ende der amphipathischen Helix des Arf1, der beim Sar1 nicht vorhanden ist. Dieser lagert sich in den hydrophoben Teil der Membran ein und stabilisiert die Protein-Membran-Interaktion [97]. Möglicherweise könnte dieser Anker ein Dissoziieren des Proteins von der Membran ohne Hydrolyse des GTP verhindern. Sar1 hingegen könnte ohne diesen Anker bei Energiezufuhr durch Licht von der Membran dissoziieren.

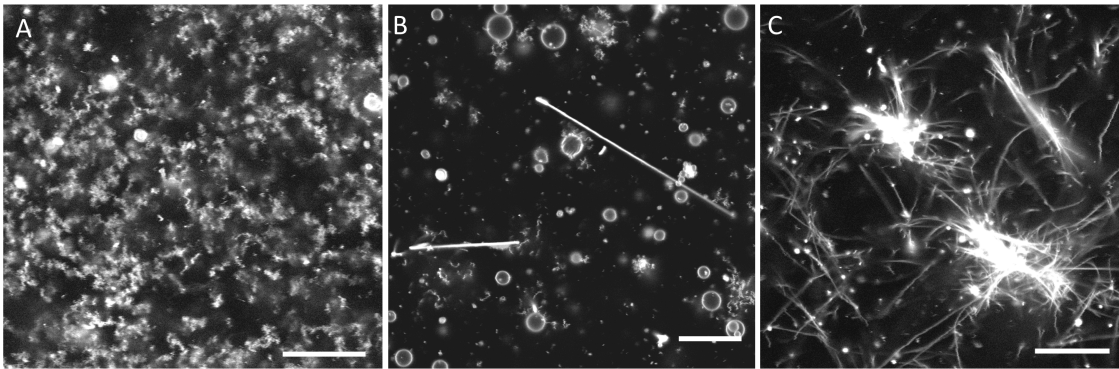


Abbildung 4.4.: **Vergleich der verschiedenen Tubuli von Sar1p an GUV mit Arf1p an GUV.** (A) 10  $\mu\text{M}$  Sar1p mit 1  $\mu\text{M}$  Sec12p- $\Delta\text{C}$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}_\gamma$  inkubiert mit fluoreszenzmarkierten GUV, bildete weiche Tubuli mit Sar1p nach 2 h Inkubation bei RT und (B) steife Tubuli nach 6 h Inkubation. (C) 10  $\mu\text{M}$  Arf1p inkubiert mit 1 mM  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  und GUV bildete nach ca. 4 h bei Raumtemperatur im Dunkeln ausschließlich lange steife Tubuli, die sich bei Einstrahlung des Laserlichtes nicht zusammensogen.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu\text{m}$

Für Protein-Protein-Interaktionen wurden bereits Beispiele von lichtinduziertem Auflösen der Bindungen erbracht [98, 99, 100]. Versuche mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 markiertem Sar1p ließen bisher keine Aussage darüber zu, ob das Zusammenziehen der Tubuli mit einem Dissoziieren des Sar1p von der Membran zusammenhängt (vergleiche Abbildung 4.6 B). Die räumliche Auflösung und die Empfindlichkeit eines konfokalen Mikroskops erreicht in diesem Fall seine Grenzen. Wenn davon ausgegangen wird, dass es zu einem lichtinduzierten Herauslösen der amphipathischen Helix aus der Membran kommt, entstehen Membrandefekte, die sehr schnell geschlossen werden müssen, um zu verhindern, dass hydrophobe Lipidketten der wässrigen Umgebung ausgesetzt werden. Dieses schnelle Umorganisieren der Lipiddoppelschicht könnte durch das Drehen und Zusammenziehen der Tubuli erfolgen. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass das dissoziierte Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 aufgrund der schnellen Verteilung durch die Diffusion und der niedrigen resultierenden Konzentration nicht im Mikroskopiebild als Erhöhung der

Hintergrundfluoreszenz detektierbar ist.

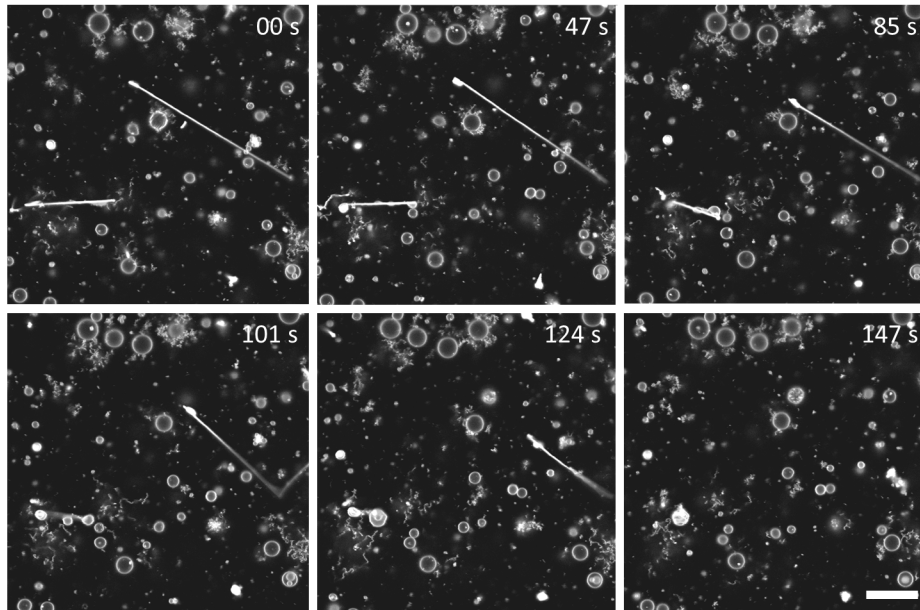


Abbildung 4.5.: **Steife Tubuli von Sar1p ziehen sich zusammen.** 10  $\mu\text{M}$  Sar1p mit 1  $\mu\text{M}$  Sec12p- $\Delta\text{C}$  und 1  $\mu\text{M}$   $\text{GTP}_{\gamma}$ , inkubiert mit fluoreszenzmarkierten GUV, bildete nach ca. vier bis sechs Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln neben weichen Tubuli wenige steife Tubuli, die sich bei Lasereinstrahlung zusammen zogen.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu\text{m}$

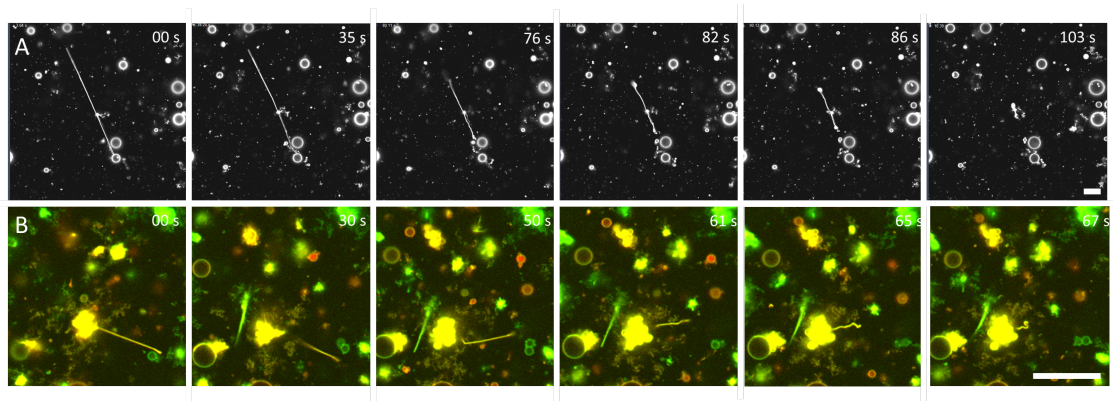


Abbildung 4.6.: **Zusammenziehen der Tubuli mit Sar1p-Varianten.** (A) Sar1p-H77L (B) Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 zieht sich ebenfalls zusammen, aber ein Abfallen des Proteins von der Membran ist nicht zu sehen. Maßbalken 20  $\mu\text{m}$ ,  $\gamma = 0,45$ .

Wie bereits erwähnt handelt es sich möglicherweise bei diesen starren Strukturen um eine höhere Ordnung von Sar1p auf den Tubuli. Leider ist es bisher nicht gelungen,

diese starren Strukturen in der Kryo-Elektronenmikroskopie wiederzufinden, wie dies bereits für Säuger-Sar1A [54] und -Sar1B [53] gelungen ist. Long *et al.* zeigten, dass Hamster-Sar1A in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbare steife Tubuli bildet [54]. Diese sind jedoch in größerer Anzahl vorhanden, wenn sie auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern inkubiert werden, auf denen es zu einem Anhaften der Strukturen kommt. Für die nicht hydrolysierende Variante des Sar1-H79G konnten die Autoren diese Art der Tubuli nicht finden. In negativ-gefärbten Elektronenmikroskopieaufnahmen konnten sie kurze starre Stücke auflösen, auf denen eine höhere Ordnung erkennbar zu sein scheint [54]. Hariri und Kollegen fanden in der Elektronenmikroskopie ebenfalls nur wenige starre Tubuli von unterschiedlicher Dicke [53]. Um Strukturanalysen an Kryo-Elektronenmikroskopieaufnahmen durchführen zu können, nutzten sie D-Galactosyl- $\beta$ -1,1'-N-nervonoyl-D-erythro-sphingosin (GalCer), ein Lipid, das, wenn zu 50 vol% zu den übrigen Lipiden zugesetzt, selbstständig tubuläre Strukturen mit einem einheitlichen Durchmesser von ca. 30 nm bildet [53]. Die Beschichtung mit Poly-L-Lysin wurde in den hier beschriebenen Untersuchungen nicht verwendet, da es das Ziel war, die Manipulation so gering wie möglich zu halten. Hinzu kommt, dass diese Art der Beschichtung bei kryo-elektronenmikroskopischen Untersuchungen nicht eingesetzt werden kann. Die Verwendung von GalCer-Tubuli, wie von Hariri *et al.* beschrieben, würde wahrscheinlich auch für Sar1p gleichmäßige und gut zu untersuchende Tubuli ergeben. Da hierbei allerdings der Durchmesser vorgegeben und die Lipidzusammensetzung nicht natürlich ist, kann keine sichere Aussage über natürliche Strukturen getroffen werden. In dieser Arbeit wurde deshalb auf diese Hilfsmittel verzichtet. Stattdessen wurden weitere COPII-Proteine eingesetzt, um Mechanismen und Strukturen aufzuklären. Dies soll im nächsten Abschnitt betrachtet werden.

#### 4.3.2. COPII-Rekonstitution an GUV

##### COPII-Rekonstitution unter hydrolysierenden und nicht-hydrolysierenden Bedingungen

Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, konnte durch Sar1p-GTP in Anwesenheit von Sec12p- $\Delta$ C eine Krümmung der Membran induziert, aber keine Abschnürung von Vesikeln beobachtet werden. Es ist bekannt, dass ein minimaler Satz von Proteinen, bestehend aus den COPII-Hüllproteinen Sar1p, Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p sowie dem GEF Sec12p- $\Delta$ C, nötig ist, um *in vitro* ein Abschnüren von kleinen Vesikeln aus ER-Membranen (Mikrosomen) herbei zu führen [58].

Nach Inkubation der mit Rhodamin B - DHPE fluoreszenzmarkierten Major-Minor-Mix-GUV mit den COPII-Hüllproteinen sowie dem GEF Sec12p- $\Delta$ C und GTP, zeigte sich im konfokalen Laser Scanning Mikroskop ein heterogenes Bild (Abbildung 4.7 A). Neben wenigen intakten GUV wurden die meisten Vesikel zerstört und vielfältige Strukturen von kleinen Vesikeln über Tubuli bis hin zu Membranaggregaten waren zu erkennen. Ein ähnliches Bild ergab sich in Abwesenheit des GEF Sec12p- $\Delta$ C, welches durch EDTA im Ansatz ersetzt wurde (Abbildung 4.7 B). EDTA unterstützte den Austausch von GDP zu GTP an Sar1p durch die Erniedrigung der Magnesiumkonzentration [29]. Die

Kontrolle, bestehend aus dem vollständigen COPII in Anwesenheit von Sec12p- $\Delta$ C und dem inaktiven, GDP-gebundenen Sar1p, zeigte unbeeinflusste GUV (Abbildung 4.7 C). Wie bereits in Abschnitt 4.3.1 gezeigt, ist der Austausch von GDP zu GTP notwendig, damit Sar1p an Membranen bindet. Erst durch die Bindung dieser kleinen GTPase ist es den übrigen Proteinen möglich, die Hülle um die Membran zu bilden [23, 16]. Die Hydrolyse von GTP dagegen scheint vielmehr bei der Dissoziation der Hülle und der möglicherweise damit verbundenen Abschnürung der Vesikel eine Rolle zu spielen [101]. Aus diesem Grund war für die in Abbildung 4.7 A und B dargestellten Versuche zu erwarten, dass sich aus den GUV kleine Vesikel von 50-100 nm Durchmesser abschnüren, die im LSM nicht auflösbar wären und nur als erhöhte Hintergrundhelligkeit auffallen könnten. Demzufolge sollten in den Aufnahmen entweder nur GUV (kleiner als zuvor) mit hellem Hintergrund oder ein einheitlich heller Hintergrund zu sehen sein. Die tatsächlichen Beobachtungen lassen die Vermutung zu, dass das verwendete Set an Proteinen doch nicht ausreicht, um die beschriebenen Vesikel abzuschneiden und ein weiterer Schritt zwischen großen Lipidreservoirs und kleinen Vesikeln stattfindet. Darauf deuten die vereinzelt auftretenden kurzen Tubuli in Abbildung 4.7 A und B (weiße Pfeile) hin, die ein Zwischenschritt sein könnten. Ähnliches wurde auch schon in früheren Arbeiten mit Elektronenmikroskopie an LUV beobachtet [29].

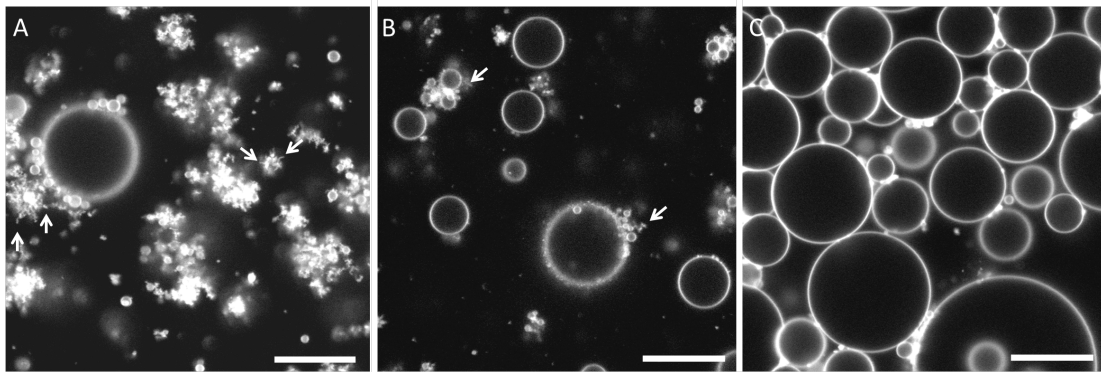


Abbildung 4.7.: **COPII verformt GUV bei Sar1p-Aktivierung durch GTP.** In allen drei Ansätzen wurden die mit 0,5 mol% Rhodamin B -DHPE versetzten Major-Minor-Mix-GUV für zwei Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 2  $\mu$ M Sar1p, 320 nM Sec23p/Sec24p, 520 nM Sec13p/Sec31p sowie 1 mM eines Nukleotids inkubiert. (A) In Anwesenheit des GEF Sec12p- $\Delta$ C mit aktiviertem Sar1p-GTP wurden die GUV fast vollständig zerstört. Es bildeten sich vielfältige Strukturen von kleineren Vesikeln über Tubuli bis hin zu nicht definierbaren Aggregaten. (B) Ähnliches ist zu beobachten, wenn ohne Zugabe von Sec12p- $\Delta$ C EDTA eingesetzt wird. (C) Mit GDP im Ansatz wurden die GUV nicht verformt.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu$ m

Nach diesen nicht eindeutigen Bildern von COPII-deformierten GUV-Membranen unter hydrolysierenden Bedingungen mit GTP (Abbildung 4.7 A und B) sollten im Folgenden Bedingungen gefunden werden, in denen die Hydrolyse von GTP auf verschiedene Art unterdrückt war, um diese mögliche Zwischenstufe besser zu untersuchen. Dies wurde neben dem Einsatz von GMP-PNP, welches ein nicht-hydrolysierbares GTP-Analogon

darstellt, auch mit den Proteinvarianten Sar1p-H77L und Sec23p-R722A realisiert. Sar1p-H77L besitzt eine dem Wildtyp Sar1p vergleichbare intrinsische GTPase-Aktivität, welche jedoch nicht durch das GTPase aktivierende Protein (GAP) Sec23p weiter erhöht werden kann [57]. Bei der Sec23p-R722A-Variante wurde das Arginin an Position 722, welches als „Argininfinger“ ins katalytische Zentrum von Sar1p hineinreicht, durch ein Alanin ersetzt. Das Arginin im Wildtyp Sec23p sorgt für eine Repositionierung von GTP und einen effizienten Umsatz zu GDP [102, 18, 20]. Auch hier steht Sar1p nur seine intrinsische Hydrolyseaktivität zur Verfügung. Somit wurde in beiden Fällen das GTP nur sehr langsam hydrolysiert und Sar1p (bzw. Sar1p-H77L) blieb lange in seinem aktivierten Zustand mit ausgeklappter amphipathischer Helix an der Membran gebunden.

Mit der Zugabe von GMP-PNP zu dem bereits erwähnten Satz von COPII-Proteinen, zeigten sich in der konfokalen Mikroskopie lange steife Tubuli (Abbildung 4.8 A). Da diese dünnen Röhren deutlich lichtschwächer waren als die als Donormembran dienenden GUV und einen Durchmesser unterhalb der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie aufwiesen, wurde in den Abbildungen 4.7 und 4.8 der  $\gamma$ -Wert auf 0,45 verändert, was eine höhere Gewichtung und damit bessere Sichtbarkeit schwach leuchtender Strukturen zulässt. Da alle LSM-Abbildungen in gleicher Weise korrigiert wurden, konnten diese objektiv verglichen werden. Die beschriebene Starrheit der Tubuli wurde besonders im Live-Bild deutlich. Hier war zu erkennen, dass die Tubuli sich nicht wie weiche Fäden, sondern wie feste Strahlen im Ganzen bewegen. Diese Strukturen wurden ebenfalls bei Inkubation der GUV mit der Sar1p-H77L-Variante in Anwesenheit von GTP gefunden (Abbildung 4.8 B).

Auch der Einsatz einer Sec23p-R722A-Variante in Kombination mit Sar1p, GTP und den übrigen COPII-Proteinen führte zur Ausbildung steifer Tubuli an GUV (Abbildung 4.8 C). Im Gegensatz zu bisherigen Studien [13, 29] verhinderte scheinbar in den vorliegenden Experimenten das Unterdrücken der Hydrolyse eine Abschnürung von Vesikeln. Vielmehr schienen die Hüllproteine der Membran eine starke Krümmung aufzuzwingen, ohne sich anschließend von der Donormembran zu lösen. Damit stehen die gewonnenen Ergebnisse im Kontrast zu Versuchen, bei denen mittels Dichtegradientenzentrifugation abgeschnürte Vesikel nur unter GMP-PNP-Bedingungen, nicht aber unter GTP-Bedingungen gefunden wurden [13, 29].

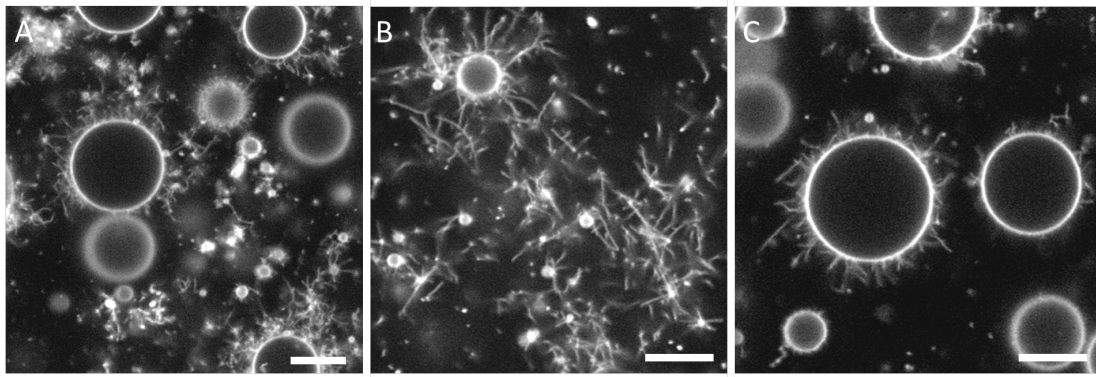


Abbildung 4.8.: **COPII-Hülle auf GUV unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen.** Für die dargestellten Mikroskopieaufnahmen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Major-Minar-Mix-GUV mit COPII-Proteinen in der gleichen Konzentration wie in Abbildung 4.7 inkubiert. (A) GTP wurde durch ein nicht-hydrolysierbares Analogon, hier GMP-PNP, ersetzt. (B) COPII in Anwesenheit der Variante Sar1p-H77L mit GTP sowie (C) die Variante Sec23p-R722A/Sec24p in Anwesenheit von Sar1p und GTP repräsentieren nicht-hydrolysierende Bedingungen auf Proteinebene. In allen drei Ansätzen ließen sich hauptsächlich steife tubuläre Strukturen rund um die GUV erkennen.  $\gamma = 0,45$ ; Maßbalken = 20  $\mu\text{m}$

Schnürten sich bei der hier verwendeten nicht-invasiven Methode von Inkubation und anschließender Mikroskopie unter Gleichgewichtsbedingungen mit GTP oder unter den verschiedenen nicht-hydrolysierenden Bedingungen kleine Vesikel ab, wären diese nicht in der Lichtmikroskopie sichtbar, da deren Größe mit 60-90 nm [51, 103] unterhalb der Auflösungsgrenze von etwa 300 nm liegt. Zumeist kann man das Abschnüren solch kleiner Vesikel nur undeutlich im konfokalen Mikroskop sehen oder indirekt durch eine Volumenabnahme der GUVs beobachten [104]. Um Strukturen dieser Größe sichtbar zu machen sowie um genauere Aussagen über die starren Strukturen in ihrer Größe und Form machen zu können, wurden die Proben zusätzlich in der Elektronenmikroskopie, welche praktisch ein Auflösungslimit von wenigen Nanometern erreicht, untersucht (Abbildung 4.9).

Hierbei wurde für die Inkubation mit GTP deutlich, dass neben größeren Vesikeln ohne Protein (Abbildung 4.9 A, weißer Pfeil) auch kleine Vesikel mit der für COPII typischen Größe gefunden wurden (Abbildung 4.9, rote Pfeile). Diese zeigten eine deutlich verdickte und unstrukturierte äußere Membranschicht. Ebenfalls zu erkennen waren leere Membrankäfige, die wahrscheinlich nur aus den Proteinen der Hülle, Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p, bestanden (schwarze Pfeile).



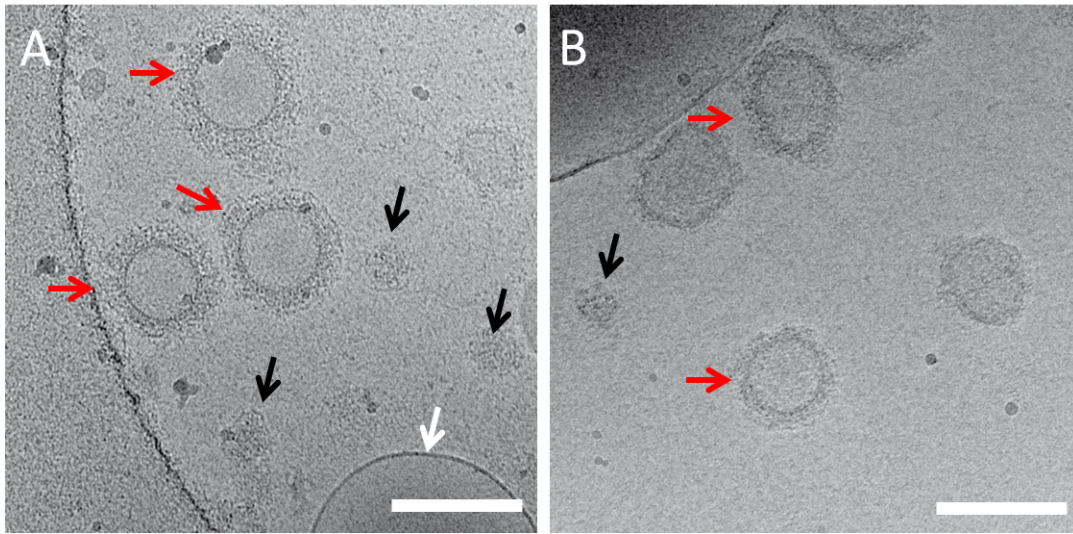


Abbildung 4.9.: **Kryo-Elektronenmikroskopie von Vesikeln mit COPII in Anwesenheit von GTP.** Die Probe aus Abbildung 4.7 A in der Kryo-Elektronenmikroskopie betrachtet, zeigte, dass sich kleine Vesikel mit einem Durchmesser von ca. 100 nm abgeschnürt haben. Diese Vesikel zeigten im Gegensatz zur Membran ohne Protein (weißer Pfeil) eine deutlich verdickte äußere Membranschicht (roter Pfeile). Daneben sind ebenfalls Proteinnaggregate ohne Membran (schwarze Pfeile) zu erkennen. Die beschriebenen Strukturen bildeten sich sowohl (A) ohne GEF bei Inkubation mit EDTA zur Erniedrigung der  $Mg^{2+}$ -Konzentration, als auch (B) mit GEF Sec12p- $\Delta C$  aus. Maßbalken entsprechen 200 nm. (vergleiche Abbildungen 2 D und 2 E aus Daum *et al.* [3]) (Bilder aufgenommen von Annette Meister und Simone Prinz am Tecnai FEI am EMBL, Heidelberg)

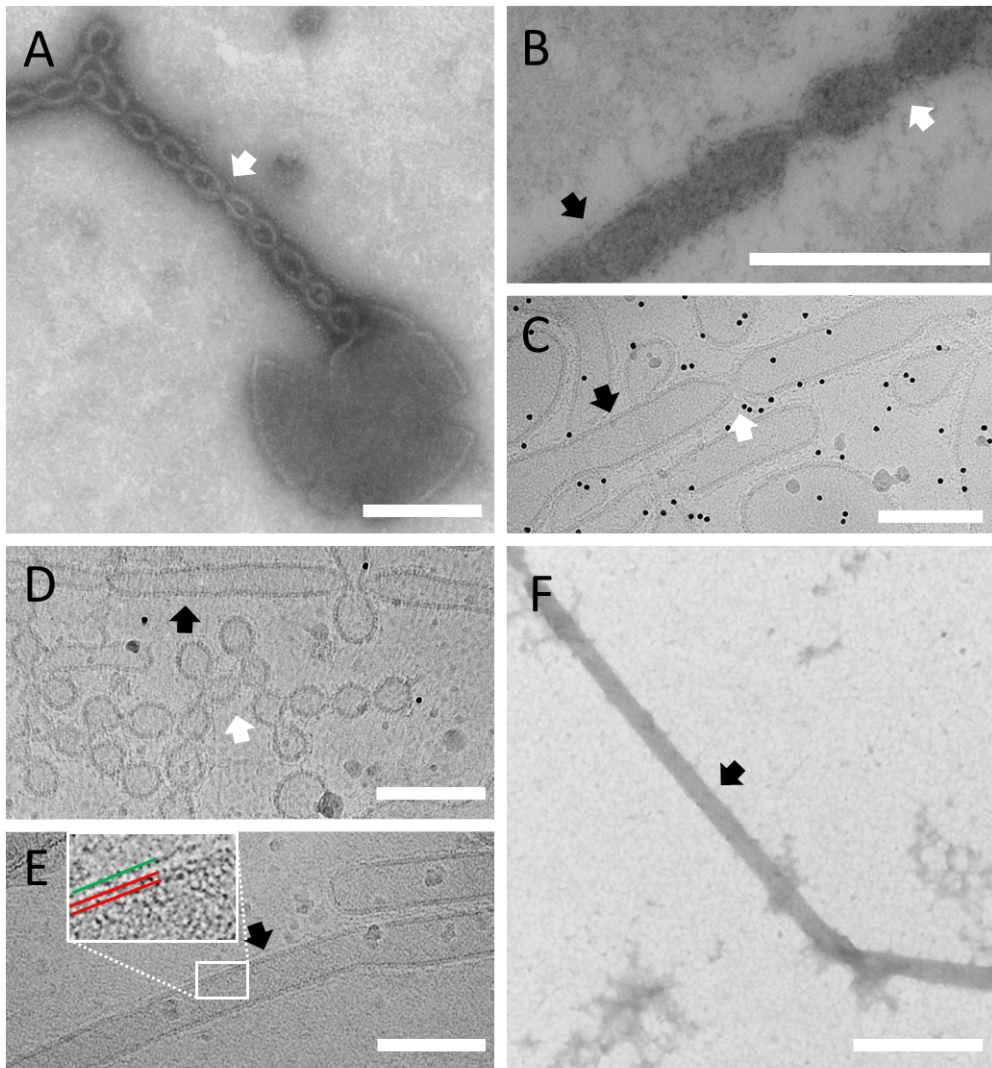


Abbildung 4.10.: **Elektronenmikroskopieaufnahmen unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen.** Wie auch in Abbildung 4.8 für die konfokale Mikroskopie gezeigt, sind in den Elektronenmikroskopiebildern tubuläre Strukturen zu erkennen. (A,B) Sar1p, Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p mit 2,5 mM EDTA und 1 mM GMP-PNP und (C) mit Sec12p statt EDTA zeigten eingeschnürte (weiße Pfeile) und gerade (schwarze Pfeile) tubulärer Strukturen, jedoch keine abgeschnürten Vesikel. (D) Sar1p-H77L mit Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p mit 2,5 mM EDTA und 1 mM GTP zeigte gerade (schwarzer Pfeil) und eingeschnürte Tubuli (weißer Pfeil). (E) Der gleiche Ansatz wie in (D) mit Sec12p- $\Delta$ C, ohne EDTA, ließ langgestreckte Membrantubuli erkennen. Das Bild im Bild zeigt die beiden Linien der Membrandoppelschicht (rot) mit zusätzlicher COPII-Schicht (grün) (F) Der Ansatz mit Sar1p, Sec12p- $\Delta$ C, Sec23p-R722A/Sec24p und Sec13p/Sec31p mit 1 mM GTP zeigte ebenso lange, starre Membrantubuli. (A, B, F) sind negativ kontrastierte Proben, aufgenommen von Annette Meister am Zeiss EM 900 MLU Halle-Wittenberg. (C, D, E) sind Aufnahmen vitrifizierter Proben von Annette Meister und Simone Prinz am Tecnai FEI am EMBL, Heidelberg). Maßbalken entspricht jeweils 200 nm. (Vergleiche Abbildung 2 in Daum *et al.* (2014) [3])

Die unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen im LSM nur als feine Ausstülpungen der Donor-Vesikel sichtbaren Strukturen konnten ebenfalls mit dieser hochauflösenden Methode deutlich dargestellt werden (Abbildung 4.10). Es wurden unterschiedliche Ausprägungen der tubulären Membranen sichtbar. Einerseits waren langgestreckte, gerade, starre Membrantubuli zu erkennen (schwarze Pfeile), andererseits fanden sich eingeschnürte tubuläre Verlängerungen (weiße Pfeile), die an Perlenschnüre erinnerten. Diese zwei unterschiedlichen Morphologien waren meist innerhalb einer Probe (Abbildung 4.10 B - D), teilweise innerhalb eines Tubulus (Abbildung 4.10 B, C) sichtbar.

Besonders in den Kryo-EM-Aufnahmen (Abbildung 4.10 C - E) wird zusätzlich zu einer verdickt erscheinenden Membran (zwei Linien - rot) eine dritte Linie (grün) sichtbar. Dabei handelt es sich um die äußere COPII-Hülle, bestehend aus einem polymerisierten Geflecht von Sec13p/Sec31p [21]. Alle beschriebenen Strukturen sind unabhängig von der Art der Hydrolyseinhibierung und wurden sowohl mit Sar1p-GMP-PNP als auch mit Sar1-H77L-GTP beobachtet. Lediglich die Experimente mit Sec23p-R722A, lassen weder die „Überstruktur“ noch Einschnürungen erkennen (Abbildung 4.10 F)

Bisherige Lichtstreuexperimente an künstlichen Liposomen konnten zeigen, dass GTP nur eine transiente Membranbindung des COPII vermittelt, welche aber durch die katalytisch aktive, zytoplasmatische Domäne des GEF Sec12p durch wiederholtes Beladen von Sar1p mit GTP nach der Hydrolyse stabilisiert werden kann [29]. Mit GMP-PNP bleibt die Bindung der COPII-Proteine hingegen, unabhängig von der Verwendung von Sec12p- $\Delta$ C, über einen längeren Zeitraum bestehen [23, 29]. Über eine Abschnürung kleinerer Vesikel konnten die Autoren allerdings keine Aussage treffen, vielmehr verursachte die Bindung der Proteinhülle eine Änderung der Signalintensität in den Lichtstreuexperimenten [23]. In anderen Experimenten war GMP-PNP notwendig um kleinere Vesikel aus den Liposomen abzuschneiden, nach Inkubation mit GTP konnte keine Fraktion abgeschnürter Vesikel gefunden werden [13, 29]. In biochemischen Abschnürungsversuchen aus natürlichen Membranen wie Hefe-ER-Membranen erwiesen sich GTP und GMP-PNP fast gleich effizient für die Abschnürung kleiner Vesikel [51], ähnlich verhielt es sich bei *in vitro*-Versuchen mit semiintakten HELA-Zellen, aus denen sowohl mit GTP, als auch mit GTP $\gamma$ S Vesikel isoliert werden konnten [49]. Neuere Untersuchungen an künstlichen flachen Membranschichten mittels Rasterkraftmikroskop (*Atomic Force Microscope*, AFM) zeigten, dass Sar1 ohne Hydrolyse nicht in der Lage ist die Membran zu verändern [105].

Im natürlichen System bindet Sar1p und die gesamte COPII-Hülle ebenfalls mit Hilfe von hydrolysierbarem GTP in Anwesenheit von Sec12p und anderer regulatorischer Proteine wie Sec16p [39, 42, 44] und Sed4p [106] sowie verschiedener Cargo- und SNARE-Proteine an die ER-Membran und setzt damit die Abschnürung von kleinen Vesikeln in Gang [13, 107]. Möglicherweise war die „minimale COPII-Hülle“ nicht ausreichend, um den Vorgang der Vesikelabschnürung vollends zu erklären, bzw. waren evtl. die Präparationsbedingungen zu harsch um die fein abgestimmten Proteininteraktionen wiederzugeben. *In vivo* Untersuchungen mit der Hydrolyse-blockierten Sar1-H79G-Variante zeigten bereits neben einzelnen Vesikeln auch Schnüre, bestehend aus mehreren nicht abgetrennten Vesikeln [84].

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.7 und 4.8), die nach dem zusammengeben ohne mechanische Manipulation inkubiert und aufgenommen wurden,

verdeutlichen die Notwendigkeit der Sar1p-Aktivierung durch den Austausch von GDP durch GTP um morphologische Veränderungen an der Membran hervorzurufen zu können. Jedoch können aus diesen Aufnahmen kaum Aussagen über die Art der Membranverformung durch die COPII-Hülle getroffen werden. Dafür sind hochauflösende elektronenmikroskopische Abbildungen nötig (Abbildung 4.9). Aus diesen wird deutlich, dass es, anders als bisher gezeigt [23, 29] in Anwesenheit von Sec12p- $\Delta$ C und GTP vermutlich zur Abschnürung von Vesikeln kommt. Im Unterschied zu der Arbeit von Futai und Mitarbeitern [29] wurde die Inkubationszeit von 15 min auf 2 h verlängert und die Präparation für die Elektronenmikroskopie konnte ohne Zentrifugation durchgeführt werden. Damit konnte sichergestellt werden, dass die entstandenen Vesikel keine Präparationsartefakte sind. Diese Präparation, die nahezu frei von mechanischer Manipulation ist, wurde bei der Untersuchung der nicht-hydrolysierenden Bedingungen noch wichtiger. Hier konnte gezeigt werden, dass es ohne die Hydrolyseaktivität von Sar1p nicht zur Ausbildung von kleinen Vesikeln kommt. Vielmehr schien es sich bei den in früheren Versuchen gefundenen Vesikel unter GMP-PNP-Bedingungen um Präparationsartefakte zu handeln. So fanden Lee *et al.* nach der Inkubation von LUV mit COPII und GMP-PNP, nach Fixierung und 30 minütiger Sedimentation durch Ultrazentrifugation bei  $100.000\times g$ , in der Elektronenmikroskopie neben kleinen Vesikeln auch kurze Vesikelketten [16]. Nach 16-stündiger Ultrazentrifugation von LUV mit COPII und GMP-PNP auf einem Zuckergradienten hingegen konnte eine Fraktion homogener kleiner umhüllter Vesikel gefunden werden [13]. Es scheint plausibel, dass es sich bei den eingeschnürten Vesikelketten, die bei Unterdrückung der Hydrolyse entstehen, um eine Art Vorstufe zur Vesikelbildung handelt.

Neben der guten Auflösung der Vesikel und Tubuli in der Elektronenmikroskopie konnten speziell in den Abbildungen der Kryo-Elektronenmikroskopie auch die Strukturen der Proteinhülle selbst verglichen werden. Während die Vesikel unter GTP-Bedingungen eine eher unstrukturierte Hülle aufwiesen (Abbildung 4.9), zeigten die Tubuli, wenn unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen inkubiert wurde, vergleichsweise geordnete Strukturen (Abbildung 4.10). Für eine Strukturauflösung mittels Elektronenmikroskopie sind statische Strukturen und eine hohe Ordnung von großem Vorteil, wenn nicht gar unerlässlich [18, 108]. Da es sich bei lebenden Organismen aber um dynamische Strukturen und Prozesse handelt, kann eine durch die Unterdrückung der Hydrolyse starre Struktur den Prozess der Abschnürung als Ganzes nicht erklären. Die Beobachtung, dass es auch unter hydrolysierenden Bedingungen eine Proteinhülle auf den abgeschnürten Vesikeln gibt (Abbildung 4.9), bestätigt Daten, die zeigten, dass Sec23p trotz GTP-Hydrolyse und der Dissoziation von Sar1p von der Membran auf den Transportvesikeln gebunden bleibt [51]. Dies scheint für die spätere Interaktion mit den Golgi-Bindungsfaktoren (*Tethering factors*) wichtig zu sein [24]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der GTP-Hydrolyse durch Sar1p den ER-zu-Golgi-Transport hemmt, wobei die Abschnürung von Vesikeln aus ER-Membranen unverändert blieb und lediglich die Fusion mit der Golgi-Membran gehemmt wurde [51]. Oka und Nakano zeigten, dass die Hydrolyse von Sar1 notwendig ist, um die Bindung der COPII-Vesikel an den Golgi-Apparat zu initiieren, aber eine nachträgliche Inhibierung durch Zugabe von Sar1-GTP $\gamma$ S nicht möglich war, was eine Änderung der COPII-Hülle nach Verlassen des Sar1 vermuten lässt

[109].

Die Unterschiede zwischen nativen ER-Membranen und künstlichen Membranzusammensetzungen legen die Vermutung nahe, dass ein weiterer wichtiger Faktor zu den „minimalen COPII Komponenten“ dazugehört, der bisher keine Berücksichtigung fand. Es kann lediglich vermutet werden, dass die gezeigten steifen Strukturen (Abbildungen 4.7 - 4.10) durch Zentrifugation zu den Vesikeln und kurzen Fragmenten werden, die in der Vergangenheit nach *in vitro* Rekonstitution beobachtet wurden [23, 16]. Um zu differenzieren, ob die GTP-Hydrolyse bereits während der Abschnürung vonstatten geht und damit evtl. auch einen Einfluss auf die Abschnürung als solche hat, oder sie nur dem Herauslösen von Sar1 aus den COPII-Vesikeln dient, um diese auf die Bindung mit der Golgi-Membran vorzubereiten, macht weitere Untersuchungen nötig.

### Lipidabhängigkeit der COPII-Rekonstitution

Matsuoka und Kollegen untersuchten die Proteinbindung mittels Flotationsexperimenten um Lipid-gebundene und -ungebundene Proteine voneinander zu trennen [13]. Dabei stellten sie fest, dass eine neutrale Mischung aus DOPC/DOPE die GMP-PNP vermittelte Bindung von Sar1p unterstützt, nicht aber die Bindung von Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p. Die Zugabe von negativ geladenen Lipiden (PI, DOPS und DOPA zu DOPC und DOPE, wird als Major-Mix bezeichnet) bewirkt eine schwache Bindung von Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p, die erst durch Zugabe von PI4P, PI(4,5)P<sub>2</sub> und CDP-DAG deutlich verbessert wird. Anknüpfend an diese Untersuchungen sollen im Folgenden die Ergebnisse einer COPII-Rekonstitution unter GMP-PNP-Bedingungen an neutrale GUV aus DOPC und DOPE, sowie an teilweise geladenen Liposomen, zum einen aus DOPC und DOPA, zum anderen aus dem Major-Mix bestehend, mit Strukturen aus Abschnitt 4.3.2 an Major-Minor-Mix-GUV verglichen werden (Zusammensetzung der Lipidmischungen siehe Tabelle 4.1).

Je nach Lipidmischung wurden durch Zugabe der COPII Komponenten Sar1p, Sec12p- $\Delta$ C, Sec23p/Sec24p, Sec13p/Sec31p sowie GMP-PNP verschiedene Membranzusammensetzungen ausgebildet (Abbildung 4.11). Nach der bisher eingehaltenen Inkubationszeit von zwei Stunden (obere Reihe) waren die GUV aus DOPC/DOPE (80/20 mol%) kaum verändert. Vesikel aus einer Lipidmischung, die auch negativ geladene Lipide, in Form von DOPA oder einer Mischung aus DOPA, DOPS und PI (Major-Mix) enthielt, wurden durch die COPII-Proteine sichtbar verändert. Die ausgebildeten Strukturen waren allerdings deutlich verschieden zu denen mit COPII an Major-Minor-Mix erhaltenen starren Tubuli. Nach einer mehr als 3fach verlängerten Inkubationszeit von insgesamt sieben Stunden (Abbildung 4.11 A2-C2) waren mit der neutralen Lipidmischung (DOPC/DOPE) neben den Vesikelkränzen um die GUV auch sehr feine fädige Strukturen sichtbar. Die einfache negativ geladene Mischung aus DOPC/DOPA (80/20 mol%) zeigte eher ein Aggregieren als eine Weiterentwicklung der röhrenförmigen Strukturen. An Major-Mix-GUV hingegen fanden sich Strukturen, die denen von COPII mit GMP-PNP an Major-Minor-Mix-GUV glichen.

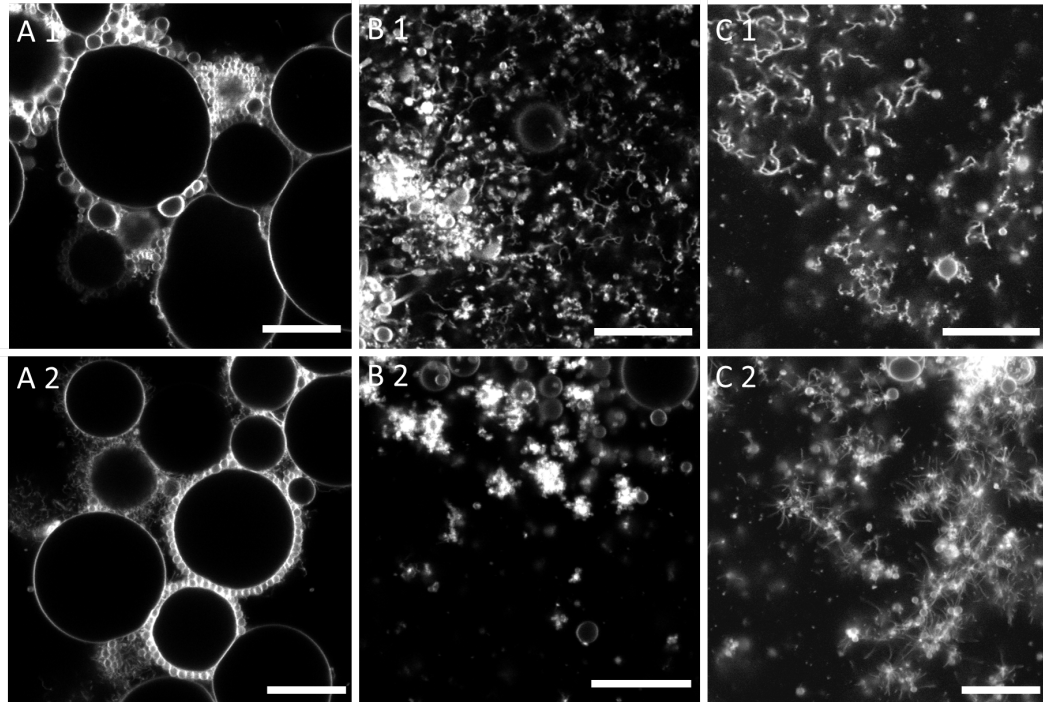


Abbildung 4.11.: **Lipidabhängigkeit der Tubulierung von Membranen durch GMP-PNP vermittelte COPII-Rekonstitution.** Konfokale Laser Scanning-Bilder nach der Inkubation von mit Rhodamin B - DHPE fluoreszenzmarkierten GUV verschiedener Lipidkonzentration mit 2  $\mu\text{M}$  Sar1p, 2  $\mu\text{M}$  Sec12p- $\Delta\text{C}$ , 0,32  $\mu\text{M}$  Sec23p/Sec24p, 0,52  $\mu\text{M}$  Sec13p/Sec31p und 1 mM GMP-PNP. Obere Reihe (A 1 - C 1) nach zwei Stunden Inkubation, untere Reihe (A 2 - C 2) nach sieben Stunden Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. (A) GUV aus DOPC/DOPE (80/20 mol%) (B) GUV aus DOPC/DOPA (80/20 mol%) (C) GUV aus Major-Mix (siehe Tabelle 4.1) Maßbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ ;  $\gamma=0,45$

Damit konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der COPII-Proteine, die Form von Membranen zu verändern, auch von der Lipidzusammensetzung abhängt. Obwohl an ungeladenen Lipidmischungen nur Sar1p-GMP-PNP binden sollte [13], waren die entstandenen Strukturen nicht wie erwartet mit denen ohne Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec31p im Ansatz vergleichbar. Dies spricht für einen Einfluss der Hüllproteine auf das Sar1p, auch wenn diese nicht an die Membran binden können. Es wurde deutlich, dass der üblicherweise in Rekonstitutionsexperimenten mit Hefe-COPII-Proteinen eingesetzte Major-Minor-Mix [13, 39, 29, 16, 110, 21] eine optimale und schnelle Bindung der COPII-Komponenten und eine Ausformung der starren Tubuli unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen sichert. Bei längerer Inkubationszeit schien auch der Major-Mix auszureichen, um eine vollständige Rekonstitution der COPII-Proteine an der Membran zu erreichen. In ihrer Bachelorarbeit konnte Lea Dietrich zeigen, dass das Weglassen von Ergosterol aus der Lipidmischung keinen Einfluss auf die Ausbildung starrer Tubuli hatte [111]. Dies kann mit den Ergebnissen von Matsuoka *et al.* in Einklang gebracht werden, der ebenfalls keinen Einfluss dieses Sterols messen konnte und es deshalb nicht in der ursprünglichen

Zusammensetzung des Major-Minor-Mix vorgesehen hatte [13]. Da Ergosterol jedoch ein wichtiger Bestandteil des ER in Hefezellen ist [90], wurde es zugefügt um möglichst nahe am natürlichen System zu arbeiten. Des weiteren konnte in dieser Bachelorarbeit gezeigt werden, dass der Major-Mix auch ohne DOPE oder PI die Ausbildung starrer Tubuli durch COPII ermöglichte, lediglich der Entzug beider Lipide hatte einen negativen Einfluss und störte die Rekonstitution der Proteinhülle auf der Membran. Damit kann festgehalten werden, dass der komplexe Lipidmix durch Weglassen einer Komponente vereinfacht werden könnte [111]. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, wäre es nötig, elektronenmikroskopische Untersuchungen anzuschließen, in denen eine bessere Beurteilung der entstandenen Membranstrukturen möglich ist. Es kann jedoch angenommen werden, dass in der Zelle eine Lipidzusammensetzung existiert, die eine fein abgestimmte, nicht zwangsläufig maximal affine Membranbindung ermöglicht. Schließlich kommt es in der Zelle nur zur vorübergehenden Ausbildung einzelner Vesikelknospen oder kurzer Tubuli, die sich als Vesikel abschnüren. Für weitere Experimente wird es deshalb nötig sein, eine Lipidmischung zu wählen, die dem komplexen natürlichen System möglichst nahe kommt, um die Rolle regulatorischer Faktoren genauer bestimmen zu können.

#### **4.4. Zusammenfassung zu den COPII-Bindungsuntersuchungen mittels Fluoreszenzmikroskopie**

Im ersten Teil dieses Kapitels konnte gezeigt werden, dass Sar1p auch in Abwesenheit der restlichen COPII-Komponenten in der Lage ist eine starke Krümmung von Membranen in Form von dünnen Röhren aus (fast) ungekrümmten Membranen zu erzeugen. Für diesen ersten Schritt der Rekrutierung verschiedener Proteine an die ER-Membran, der durch Sec12p stabilisiert wird, ist zwar der Austausch von GDP zu GTP an Sar1p notwendig, nicht aber die Hydrolyse von GTP (Abbildung 4.1 und 4.2). Vielmehr scheint nur mit hydrolysierbarem GTP eine höhere Ordnung auf den Membrantubuli möglich, wodurch sich lange steife Röhren, im Unterschied zu den weichen Tubuli bilden (Abbildung 4.5 und 4.4 B). Bisher ist es nicht gelungen diese steifen Strukturen genauer zu untersuchen, da sie sich bei Lichteinfall zusammenziehen. Dies geschieht vermutlich aufgrund einer photoinduzierten Dissoziation von Sar1p von der Membran.

Untersuchungen mit der gesamten COPII-Hülle an wenig gekrümmten GUVs in der konfokalen Mikroskopie legen nahe, dass die Aktivierung von Sar1p durch den Austausch von GDP mit GTP notwendig ist, um die Bindung der übrigen COPII-Proteine zu ermöglichen. Außerdem scheint die Hydrolyse von GTP durch Sar1p notwendig zu sein, um eine Abschnürung von kleinen Vesikeln von vorgeformten perlschnurartigen Tubuli zu erreichen, da nur in Anwesenheit von GTP kleine Vesikel in der Elektronenmikroskopie gefunden wurden, nicht aber mit GMP-PNP oder mit hydrolyseblockierten Proteinen des COPII. Durch den Verzicht auf mechanische Manipulation während oder nach der Inkubation der Vesikel mit den Proteinen kann davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Strukturen nur durch die Aktivität der Proteine entstehen. Nicht auszuschließen ist hingegen, dass die Hydrolyse nicht die einzige Möglichkeit zur Abschnürung der Ve-

sikel ist, sondern weitere Proteine wie z.B. Sec16p ebenfalls zur Abschnürung beitragen können [44].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die von Matsuoka und Mitarbeitern [13] eingeführte Lipidmischung die beste Mischung für die Ausbildung steifer Tubuli aus GUV und damit für die Bindung des COPII an die Membran ist. Auch bei dem um die Lipide PI4P, PI(4,5)P<sub>2</sub>, CDP-DAG und Ergosterol reduzierten Lipidmix konnten steife tubuläre Strukturen beobachtet werden, allerdings benötigten die COPII-Proteine in den gezeigten Untersuchungen mehr als die 3fache Inkubationszeit um sich zusammenzulagern. Eine weitere Reduzierung der Lipidkomponenten hatte den Verlust der Tubulierungsfähigkeit der Proteine zur Folge.

Insgesamt konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass es möglich ist, Proteinbindung an Liposomen (GUV) *in vitro* mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie zu verfolgen, sofern diese Bindung mit einer Änderung der Struktur der Lipidvesikel einhergeht. Dafür ist es nicht nötig, die Proteine mit eventuell störenden fluoreszierenden Farbstoffen zu markieren, wenn im Gegenzug dazu die Lipidstrukturen mit fluoreszierenden Lipidanaloga sichtbar gemacht werden. Vorteile dieser Methode sind neben dem geringen materiellen Aufwand in Form von Proteinen besonders die nach Zusammengeben aller Bestandteile störungsfreie Inkubation und Untersuchung der Proben. Damit kann ausgeschlossen werden, dass es sich beim Abschnüren von Vesikeln lediglich um ein Artefakt der Präparation handelt.

So ist die Methode als Funktionstest für neue Proteinvarianten und -chargen vor allem beim Probenscreening deutlich weniger aufwendig als die Elektronenmikroskopie oder Bindungsversuche mittels Dichtegradientenzentrifugation [13]. Sie bietet eine schnelle Möglichkeit, mit nur geringem Proteineinsatz eine Aussage über die Bindungsfähigkeit des Sar1p zu Membranen und zu den übrigen COPII-Komponenten sowie über die Qualität der einzelnen Proteine zu treffen. (Die Aussage kann basierend auf der Beobachtung, dass die steifen Verlängerungen unter Einsatz der minimalen COPII-Hülle, Sec12p- $\Delta$ C und GMP-PNP nur bei guter Qualität aller Proteine entstehen, getroffen werden.)

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen ist es von großem Interesse, in Zukunft weitere Komponenten auf ihren Einfluss auf die Hydrolyse und die Fähigkeit zur Vesikelabschnürung zu untersuchen. Neben den bereits erwähnten Lipiden oder den bekannten Proteinen Sec16p oder Sed4p, wäre auch der Einfluss des Sec23p-homologen Proteins Nel1p [112] interessant. Der Einfluss verschiedener transmembraner Proteine, wie z.B. des Cargoproteins Bet1p oder des Wildtyps von Sec12p, wird bereits untersucht.

Durch die Möglichkeit, die Proteine ebenfalls mit einem fluoreszierenden Farbstoff zu markieren, eröffnen sich weitere Möglichkeiten der Untersuchung, da dadurch Interaktionen oder Lokalisationen einzelner Proteine beobachtet werden können, wie in Bacia *et al.* (2011), Abbildung 2c, am Beispiel des markierten Sec13p/Sec31p deutlich wird [1]. Weitere Fortschritte im Gebiet der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie, wie sie seit einigen Jahren mit Methoden wie der *Stimulated Emission Depletion* (STED) - Mikroskopie [65, 66] oder *Photoactivated Localization Microscopy* (PALM) [113] entwickelt werden, verbessern die räumliche Auflösung weiter und machen die Fluoreszenzmikroskopie zu einem unverzichtbaren Werkzeug zur Untersuchung von Lipid-Protein-Interaktionen.

Trotz der Vorteile der fluoreszenzmikroskopischen Methoden und der Nachteile der



Elektronenmikroskopie, besonders im Hinblick auf Fixierung der Proben und den Zeitaufwand für die Aufnahme der Bilder, ist die hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie und Elektronentomographie für die Untersuchung und besonders auch die Strukturaufklärung der COPII-Hülle nicht zu ersetzen.

Da es sich bei den hier gezeigten Mikroskopieuntersuchungen um qualitative Beobachtungen handelt, können nur ja/nein-Aussagen getroffen werden und über Konzentrationsreihen Bindungsaffinitäten lediglich abgeschätzt werden. Soll der Einfluss verschiedener Komponenten auf die Affinität beispielsweise des Sar1p zur Membran quantitativ untersucht werden, ist eine Methode nötig, mit der quantitative Aussagen möglich sind. Dies kann mit dafür geeigneten Proben mittels dcFCCS durchgeführt werden (siehe Kapitel 5).

## 5. dcFCCS zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Dieses Kapitel beinhaltet Daten, die bereits in Krüger *et al.* (2017) veröffentlicht wurden [4].

### 5.1. Einleitung zur Bestimmung von Bindungsparametern mittels dcFCCS

Für die Quantifizierung der Bindung von Proteinen an Membranen stehen bisher wenige Methoden zur Verfügung, die, anders als Zentrifugations- oder Filtrationsuntersuchungen, im Gleichgewichtszustand der Proben messen. Bei der Isothermalen Titrationskalorimetrie (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) wird die Energiezufuhr während eines Bindungsprozesses aufgezeichnet, die nötig ist, um die Temperatur in der Probe konstant zu halten. Daraus können anschließend die Bindungskonstante und Bindungsenthalpie berechnet werden. Dafür sind Probenmengen im mikromolaren Bereich nötig und hohe Affinitäten im nanomolaren Bereich können nur schwer aufgelöst werden [114]. Die Oberflächenplasmonenresonanz (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) hingegen benötigt nur wenig Probenmaterial im nanomolaren Bereich und kann besonders subnanomolare Affinitäten messen [115, 116]. Für diese Methode werden die Lipide auf der Oberfläche eines Sensorchips als planare Fläche oder Vesikel immobilisiert [117]. Um die Bindung von Protein an freie Vesikel zu messen werden neben der ITC auch verschiedenen Fluoreszenzmethoden eingesetzt. Die intrinsische Tryptophanfluoreszenz wurde beispielsweise genutzt, um die Interaktionen der Phospholipase [118, 119] oder des Synaptotagmin [120] mit Liposomen zu untersuchen. Die Messung der Tryptophanfluoreszenz kann nur bei einer kleinen Auswahl an Proteinen mit Tryptophan im Bereich der Membranbindefläche angewendet werden. Änderungen der Fluoreszenz spiegeln bei dieser Methode nicht immer quantitativ den Grad der Bindung wieder [115]. Mit FRET konnte gezeigt werden, in welchem Oligomerisierungszustand Proteine wie Lysozym oder die N-BAR-Helix H0 an Membranen binden [121]. Wird Tryptophan als FRET-Donor verwendet treten ähnliche Probleme wie bei der Verwendung der Tryptophanfluoreszenz selbst auf. Wird eine Fluoreszenzsonde eingeführt, muss diese nahe genug an der Membranbindestelle sein um sich in Reichweite des in der Membran befindlichen FRET-Partners zu befinden, ohne die Interaktion des Proteins mit der Membran zu beeinflussen. Mit den genannten Methoden zur Bindungsmessung ist es zudem nicht möglich Aussagen über die Größe bzw. die Anzahl der Lipide des jeweiligen Proteinbindungsplatzes zu machen. Dafür ist es notwendig, auf andere Methoden, wie die Elektronenmikroskopie bzw. -tomographie, die Kernspinre-

sonanz (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) oder die Elektronenspinresonanz (*Electron Spin Resonance*, ESR) zurückzugreifen [122].

Die FCS ist eine nicht invasive Methode zur Messung von Moleküldynamiken *in vivo* und *in vitro*. Die Theorie dieser Methode wurde 1972 erstmals von Magde *et al.* [123] vorgestellt. 1974 veröffentlichte die gleiche Arbeitsgruppe die experimentelle Umsetzung der FCS [124]. Später wurde dies in verschiedenen Arbeiten aufgegriffen [125, 126, 127] und durch technische Neuerungen wie Konfokale Mikroskopie [128], verbesserte Detektion [129] und Zwei-Photonen-Anregung [130, 131, 132] erweitert. Die Idee und Theorie zwei Farben gleichzeitig anzuregen und Interaktionen zwischen Molekülen über eine Kodiffusion nachzuweisen, wurde 1997 erstmals von Schwille und Mitarbeitern [72] umgesetzt. Heute ist die FCS *in vivo* [133, 134, 135] und *in vitro* [136, 137] eine aussagekräftige Standardmethode [138]. Auch die dcFCCS findet immer mehr Anwendungen [139].

Die Verwendung für Bindungsanalysen von Protein zu Lipid ist allerdings bisher nur wenig verbreitet. Rusu *et al.* und Melo *et al.* zeigten, dass die Bindung einfacher fluoreszenzmarkierter Peptide mit hoher Affinität zu Membranen oder bestimmten Membranbestandteilen mit Hilfe der FCS quantifiziert werden kann [55, 56]. Dabei wurden unmarkierte Vesikel eingesetzt, so dass bei Bindung des markierten Peptids oder Proteins eine Änderung in der Diffusionszeit des fluoreszierenden Moleküls sichtbar wurde. Die Auswertung geschah, basierend auf der Autokorrelationsanalyse, unter notwendigen Annahmen, wie einer sehr langsamen Dissoziation des Proteins von der Membran während der Messung, einer monodispersen Liposomenverteilung und einer durch das Protein nicht beeinflussten Liposomenmorphologie. Diese und weitere Annahmen bezüglich einer sich nicht ändernden Helligkeit des Proteins bei Bindung an die Liposomen sowie einer nicht kooperativen Bindung, waren nötig, um Fraktionen von gebundenen und ungebundenen Peptiden oder Proteinen zu ermitteln [55, 56]. Rhoades und Mitarbeiter konnten mittels FCS für die neuronalen Proteine  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein Bindungsaffinitäten in Abhängigkeit der Vesikelzusammensetzung und -größe quantifizieren [140, 122, 141].

In diesem Teil der Arbeit soll dargestellt werden, wie die Erweiterung der FCS um die Kreuzkorrelationsanalyse mit einer weiteren Farbe dazu beitragen kann, sichere Werte, sowohl für die Affinität eines Proteins zu Lipiden, als auch für die Anzahl der Lipide je Bindungsplatz zu erhalten.

## 5.2. Theorie zur Bestimmung von Bindungskonstanten mittels dcFCCS

Die in diesem Abschnitt hergeleiteten Gleichungen entstanden in Zusammenarbeit mit Jan Ebenhan und wurden teilweise in Krüger *et al.* veröffentlicht [4].

Im Folgenden werden die Berechnungen für den Fall der Bindung grün markierten Proteins an rot markierte Vesikel beschrieben. Dabei sind die „grünen“ Konzentrationen und Fraktionen die des Proteins ( $c_{g,0} = c_{P,ges}$ ,  $c_{g,free} = c_{P,free}$  und  $f_{g,free} = f_{P,free}$ ) und die „rote“ Konzentration ist gleich der Vesikelkonzentration ( $c_r = c_V$ ). Für die Berechnung von Bindungsgrad und Dissoziationskonstante werden die aus den dcFCCS-Messungen gewonnenen Informationen zu den molaren Konzentrationen oder zu den Fraktionen der

beteiligten Stoffe (Protein und Vesikel) benötigt.

Aus den Verhältnissen der Kreuzkorrelationsamplitude zu den Autokorrelationsamplituden lassen sich Aussagen über die gemeinsame Diffusion von rot- und grün-markierten Teilchen treffen. Im Fall einer 1:1 Bindung und eines idealisierten dcFCCS-Aufbaus gilt, dass aus dem Verhältnis der Amplitude der Kreuzkorrelation zur jeweiligen Autokorrelation direkt eine Aussage zur Bindung getroffen werden kann. Hierbei werden für die Kreuzkorrelation und die grüne Autokorrelation die volumennormierten Werte, nach Gleichung 3.30 auf Seite 45, verwendet. Für die rote Autokorrelation wird zusätzlich die Farbstoffverteilung nach Gleichung 3.43 auf Seite 48 berücksichtigt:

$$X_r = \frac{G_x^*(0)}{G_r^i(0)} \quad (5.1)$$

$$X_g = \frac{G_x^*(0)}{G_g^*(0)} \quad (5.2)$$

Im Unterschied zu den in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen Gleichungen wird in dieser praktischen Anwendung zwar der Bindung des grünen Proteins an die Vesikel ausgegangen, aber dies geschieht unvollständig und es gibt zusätzlich ungebundenes Protein in der Lösung, welches in der Berechnung der Kreuzkorrelationsamplitude berücksichtigt werden muss. Gleich bleibt die statistische Verteilung des roten Farbstoffes sowie die Unabhängigkeit von rotem und grünem Farbstoff. Damit ergibt sich für die Kreuzkorrelationsamplitude aus Gleichung 3.35 auf Seite 46:

$$G_x^*(0) = \frac{\sum_{j=0}^{j=\max} \sum_{i=0}^{i=\max} i \cdot j \cdot c_{ij}}{\left[ \sum_{i=0}^{i=\max} i \cdot c_i \right] \left[ \left[ \sum_{j=1}^{j=\max} j \cdot c_j \right] + c_{g,\text{free}} \right]} = \frac{\lambda_r \cdot \sum_{j=0}^{j=\max} j \cdot c_j}{\lambda_r \cdot c_r \cdot \left( \left[ \sum_{j=0}^{j=\max} j \cdot c_j \right] + c_{g,\text{free}} \right)}, \quad (5.3)$$

mit  $c_i = \sum_j c_{ij}$  und  $c_j = \sum_i c_{ij}$ . Dabei steht Index  $i$  für rot und  $j$  für grün.

Durch Einsetzen von Gleichung 5.3 im Zähler und Gleichung 3.43 auf Seite 48 im Nenner in Gleichung 5.1 folgt eine Modellgleichung zur direkten Ermittlung der Fraktion des gebundenen grünen Proteins an die roten Vesikel aus dem Verhältnis von Kreuz- zu roter Autokorrelationsamplitude ( $X_r$ ) (Gleichung 5.5). Wobei  $c_r$  die Gesamtvesikelkonzentration  $c_{\text{ges}}$  darstellt:

$$X_r = \frac{G_x^*(0)}{G_r^i(0)} = \frac{G_x^*(0)}{c_r} = \frac{\left[ \sum_{j=0}^{j=\max} j \cdot c_j \right]}{\left[ \left[ \sum_{j=0}^{j=\max} j \cdot c_j \right] + c_{g,\text{free}} \right]} \quad (5.4)$$

$$X_r = \frac{c_{P,\text{ges}} - c_{P,\text{free}}}{c_{P,\text{ges}}} = 1 - f_{P,\text{free}} = f_{P,\text{b}} \quad (5.5)$$

Bei bekannter Gesamtkonzentration des Proteins  $c_{P,ges}$  kann die Konzentration an freiem Protein  $c_{P,free}$  berechnet werden:

$$c_{P,free} = c_{P,ges} \cdot (1 - X_r) \quad (5.6)$$

Die Berechnung des Bindungsgrades  $\nu$  erfolgt aus der Definition der volumennormierten Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x^*(0)$  (Gleichung 5.3).

Dabei ist  $\sum_{j=1}^{j=max} j \cdot c_j = \sum_{i=1}^n i \cdot V_{P,i}$  und  $\sum_{i=0}^{r_{max}} c_i = c_r = \sum_{i=0}^n V_{P,i}$  aus Gleichung 3.58 auf Seite 51. Wird dies in Gleichung 5.3 eingesetzt, ergibt sich:

$$G_x^*(0) = \frac{\sum_{j=0}^n j \cdot V_{P,j}}{\left[ \sum_{j=0}^n V_{P,i} \right] \left[ \left[ \sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j \right] + c_{g,free} \right]} = \frac{\nu}{\left[ \sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j \right] + c_{g,free}} \quad (5.7)$$

Mit  $\left[ \sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j \right] + c_{g,free} = c_{P,ges}$  vereinfacht sich Gleichung 5.7 weiter zu :

$$\nu = G_x^*(0) \cdot c_{P,ges} \quad (5.8)$$

### 5.2.1. Berücksichtigung probenspezifischer Einflussgrößen

#### Quenchen des grünen Farbstoffes

Als Fluoreszenzlöschung (Quenchen) wird ein chemischer oder photophysikalischer Vorgang bezeichnet, bei dem die Fluoreszenzintensität eines Fluorophores herabgesetzt wird. Dies kann durch verschiedene Mechanismen wie Deaktivierung durch Zusammenstoßen mit einem anderen Molekül, Energietransfer auf einen anderen Fluorophor oder auch Komplexbildung mit dem Quencher geschehen.

Bei den im Folgenden dargestellten Messungen kommt es durch die Bindung des Proteins an die Vesikel zum Quenchen des am Protein befindlichen grünen Farbstoffes. Dies kann durch die Konformationsänderung des Proteins und eine dadurch veränderte Polarität der direkten Umgebung des Fluorophores oder auch durch die Nähe zur Membran selbst bzw. zu einzelnen Lipiden oder zum Lipidfarbstoff geschehen.

Um diesen Prozess quantitativ zu erfassen und zu berücksichtigen, können Messungen in der FCS oder an einem Fluoreszenzspektrometer durchgeführt werden.

Der so ermittelte Anteil, um den der Farbstoff dunkler wird, geht als Quenchfaktor  $\Phi$  in die Gleichung 5.3 für die Kreuzkorrelationsamplitude ( $G_x^*(0)$ ) ein. (Wie in Abschnitt 3.3.3 bereits eingeführt bezeichnet  $i$  den Helligkeitsfaktor der roten Teilchen,  $c_i$  sind damit die Konzentrationen dieser Spezies,  $j$  bezeichnet den Helligkeitsfaktor der grünen Teilchen und  $c_j$  deren Konzentrationen.  $c_{ij}$  wiederum bezeichnet die Konzentration der Teilchen die i rote und j grüne Farbstoffe tragen.)

$$G_x^*(0) = \frac{\sum_{i=0}^{i=max} \sum_{j=0}^{j=max} i \cdot \Phi \cdot j \cdot c_{ij}}{\left[ \sum_{i=0}^{i=max} i \cdot c_i \right] \left[ c_{g,free} + \sum_{j=0}^{j=max} \Phi \cdot j \cdot c_j \right]} \quad (5.9)$$

Dies kann zu Gleichung 5.10 vereinfacht und  $\sum_i^{i=max} c_i = c_r$  gesetzt werden:

$$G_x^*(0) = \frac{\Phi \cdot \sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j}{c_r \cdot \left[ c_{g,free} + \Phi \cdot \sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j \right]} \quad (5.10)$$

Es wird hierbei eine Unterscheidung der grünen Konzentrationen gemacht, da der Quenchfaktor nur auf die Fraktion der gebundenen ( $c_j$ ), nicht aber auf die der freien Teilchen ( $c_{g,free}$ ) angewendet werden muss.

Die Anwendung des Quenchfaktors aus Gleichung 5.10, unter Berücksichtigung, dass  $c_{g,free} = c_{P,free}$  und  $\sum_{j=0}^{j=max} j \cdot c_j = c_{P,bound} = c_{P,ges} - c_{P,free}$ , ergibt bei der Herleitung wie Gleichungen 5.4 und 5.6 nach Auflösen nach  $c_{P,free}$ :

$$c_{P,free} = c_{P,ges} \cdot \frac{\Phi \cdot (X_r - 1)}{X_r \cdot (\Phi - 1) - \Phi} \quad (5.11)$$

Der Quenchfaktor geht ebenso in Gleichung 5.8 ein:

$$\nu = G_x^*(0) \cdot (c_{P,ges} + c_{P,free} \left[ \frac{1}{\Phi} - 1 \right]) \quad (5.12)$$

## Dotierung des Proteins

Da die FCS auf eine möglichst geringe Anzahl fluoreszierender Teilchen im Detektionsvolumen angewiesen ist, musste das markierte Protein für die Titration von Protein zu konstanter Lipidmenge teilweise mit unmarkiertem Protein gemischt (dotiert) werden.

Der Dotierungsgrad ( $x_{Dye}$ ) ist gegeben durch:

$$x_{Dye} = \frac{c_{Dye}}{c_{P,ges}} \quad (5.13)$$

Dabei ist  $c_{Dye}$  die Konzentration der markierten Proteine.

Die durch die Dotierung beeinflusste Konzentration grüner Teilchen findet in der Amplitude der grünen Autokorrelation  $G_g(0)$ , die für die nachfolgenden Berechnungen nicht benötigt wird, und in der Kreuzkorrelationsamplitude  $G_x(0)$  Beachtung. Wird dieser

Quotient in Gleichung 5.3 für das korrigierte Kreuzkorrelationsvolumen eingesetzt ergibt dies:

$$G_x^*(0) = \frac{\sum_{i=0}^{i=\max} \sum_{b_j=0}^{b_{\max}} i \cdot x_{\text{Dye}} \cdot b_j \cdot c_{ib}}{\left[ \sum_{i=0}^{i=\max} i \cdot c_i \right] \left[ \left[ \sum_{j=0}^{b_{\max}} x_{\text{Dye}} \cdot b_j \cdot c_j \right] + x_{\text{Dye}} \cdot c_{\text{P,free}} \right]} \quad (5.14)$$

$b_j$  bezeichnet alle Proteine, unabhängig davon, ob fluoreszierend oder nicht. Wie aus Gleichung 5.14 hervor geht, kürzt sich  $x_{\text{Dye}}$  im Falle der Kreuzkorrelationsamplitude heraus und muss nicht weiter berücksichtigt werden.

## 5.3. Durchführung der dcFCCS-Messungen

### 5.3.1. Präparation

#### Kleine Vesikel

Kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von  $\leq 100$  nm wurden durch Extrusion hergestellt. Hierfür wurde in einem Glasrundkolben ein Lipidfilm aus Major-Minor-Mix oder DOPC jeweils mit 0,004 mol% fluoreszierenden Lipidanaloga erzeugt, indem das Lösungsmittel, Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1, in einem Rotationsverdampfer abgezogen wurde. Im Anschluss erfolgte die Rehydratisierung in HKM-Puffer mit einer finalen Lipidkonzentration von 4 mM durch Rotation des Kolbens. Daraufhin schlossen sich zwei Gefrier-Tau-Zyklen ( $-80^\circ\text{C}$  und Raumtemperatur, RT) sowie wiederholtes Vortexen an. Abschließend wurde die Lipiddispersion durch eine Polykarbonatmembran mit einer Porengröße von 50 nm extrudiert. Mittels DLS wurde kontrolliert, ob die Größenverteilung unimodal war. Für die weitere Verwendung wurde die helligkeitsgewichtete Größe aus der Diffusionszeit aus den FCS-Messungen berechnet. Für die Messreihe mit steigender Lipidkonzentration wurden die Vesikel nach der Extrusion in einer Amicon-Zentrifugationsfiltereinheit (mit einem Molekulargewichtlimit von 3000) bei  $10000 \times g$  aufkonzentriert. Die Lipidkonzentration nach der Extrusion und nach dem Aufkonzentrieren wurde mit Hilfe eines quantitativen Phosphattests mit Nachweis durch Malachitgrün kontrolliert (durchgeführt von Claudia Müller). Die Vesikkonzentration  $c_V$  wurde für alle Messreihen den FCS-Messungen (siehe Gleichung 3.33 auf Seite 46,  $c_V = c_r$ ) entnommen.

Die Vesikel wurden bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

#### Nanodiscs

Nanodiscs wurden aus DOPC und dem Hüllprotein MSP1D1 (*Membrane Scaffold Protein*), welches freundlicherweise von Heike Böcker zur Verfügung gestellt wurde, durch Entzug von Detergens hergestellt [61]. Dafür wurde sowohl das Lipid DOPC, als auch die

beiden für die Kreuzkorrelationsproben verwendeten fluoreszierenden Lipidfarbstoffe, die mit 5 mol% relativ zum Lipid eingesetzt wurden, in cholathaltigem Phosphatpuffer gelöst und im Verhältnis 67 : 1 (Lipid : Protein) gemischt. Der Ausgangspuffer für Lipid und Lipidanalogue enthielt immer die doppelte Menge Cholat wie Lipid. Diese Mischung wurde langsam über eine Entsalzungssäule (PD10) gegeben. Anhand des Lipidfarbstoffes war der Bereich mit den gebildeten Nanodiscs gut sichtbar und konnte als Fraktion gesammelt werden. Diese wurde anschließend auf eine Superdex S200 (10/300)-Säule aufgetragen, um das restliche Detergens über eine Größenausschlusschromatografie abzutrennen.

### **Mizellen**

Mizellen wurden in zwei unterschiedlichen Mischungen hergestellt. Zum einen wurden die Farbstoffe DiD C<sub>18</sub> und Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> mit einer Endkonzentration von jeweils 0,125 µM in 2,5 mM Triton X-100 in HKM gelöst. Ein zweiter Ansatz beinhaltete neben 2,5 mM Triton auch 7,2 mM des Phospholipids DOPC in HKM. Die fluoreszierenden Lipidanaloga OregonGreen-DHPE und Atto633-DMPE wurden mit jeweils 0,6 mM, das entspricht 5 mol% im Verhältnis zum Lipid eingesetzt. Das Detergens sollte hierbei die Entstehung von Lipidvesikeln verhindern und die Bildung von Mizellen aus DOPC und Farbstoffen favorisieren. Für die Ausbildung der Mizellen war keine Weiterbehandlung der Probe nötig. Die Detergensmoleküle bildeten selbstständig Mizellen, da die Konzentration oberhalb der kritischen Mizellbildungskonzentration (*Critical Micelle Concentration*, CMC) lag.

### **Proteingewinnung**

Herstellung der verwendeten Proteine Sar1p und Sar1p-SCCS für die Markierung geschah wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Die Markierung des Sar1p-SCCS mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 wurde von Jan Auerswald durchgeführt und freundlicherweise für die FCS-Messungen zur Verfügung gestellt. Die Markierungsausbeute betrug ca. 97%.

### **Tests für Standard-Kreuzkorrelationsproben**

Für die Standard-Kreuzkorrelationsproben mussten keine weiteren Präparationsschritte durchgeführt werden. Die doppelt gefärbten Proben (Mizellen, Nanodiscs und Vesikel) wurden auf eine für die FCS optimale Konzentration von ca. 5 - 20 nM Teilchen (Mizellen, Nanodiscs oder Vesikel) verdünnt und auf einem unbeschichteten Deckglas, welches direkt auf dem Objektiv platziert wurde, vermessen. Fünf einminütige Messungen wurden gemittelt und im ZEN 2009 mit den in Gleichung 3.15 auf Seite 42 beschriebenen Termen für Triplett und Diffusion angepasst. Die weitere Auswertung der Korrelationsamplituden erfolgte in OriginPro 8G.

### **Bindungsansätze**

Um die Bindung von Proteinen an Liposomen mit Hilfe der FCS zu quantifizieren, wurden zwei Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurde die Konzentration der Liposomen



variiert, zum anderen die Konzentration von Sar1p. In beiden Fällen wurden alle anderen Komponenten des Ansatzes in ihrer Konzentration konstant gehalten. Der HKM-Puffer wurde für alle Ansätze mit 1 mM GMP-PNP versetzt, um die Dissoziation des Sar1p von den Vesikeln während der Messung zu verhindern. Die Variation der Protein- oder Lipidkonzentration geschah nicht, wie bei einer klassischen Titration durch schrittweise Zugabe zum selben Ansatz. Es wurden verschiedene Ansätze mit verschiedenen Protein- bzw. Lipidkonzentrationen einzeln zusammengegeben und jeweils ca. 4  $\mu$ l in einer fest verklebten Glaskammer, bestehend aus zwei mit Casein beschichteten Deckgläschen sowie einem 0,5 mm dicken Gummiring als Abstandhalter, für zwei Stunden bei ca. 22 °C inkubiert. Anschließend wurde jede Probe für fünf mal eine Minuten gemessen. Die daraus gemittelten Korrelationskurven wurden mit der ZEN 2009 Software entsprechend der in Abschnitt 3.3.3 dargestellten Gleichungen ausgewertet und mit Hilfe des Programms OriginPro 8G auf Detektionsvolumina und rote Farbstoffverteilung korrigiert. Die Bindungsparameter wurden nach Abschnitt 5.2 ebenfalls in Origin bestimmt und graphisch dargestellt.

### Bestimmung des Quenchfaktors

Um festzustellen, um wieviel die Fluoreszenz des an Sar1p gebundenen Alexa Fluor<sup>®</sup>488 bei Bindung des Proteins gequenchet wurde, wurden Messungen an einem Fluoreszenzspektrometer (Tecan Reader) durchgeführt. 100  $\mu$ l einer Lösung mit 21 nM Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 und GDP in HKM-Puffer sowie 21 nM Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 mit 30 nM Vesikeln und GMP-PNP wurden in einer Mikrotiterplatte mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Fluoreszenzemission von 500 nm bis 600 nm aufgezeichnet. Die gemessenen Spektren wurden in OriginPro 8G verglichen und  $\Phi$  berechnet.

### 5.3.2. Kalibrierung des FCS-Setups

Vor Beginn jeder Messung wurde das Gerät mit Hilfe von freien Farbstoffen (Alexa Fluor<sup>®</sup>488-Hydrazid und Alexa Fluor<sup>®</sup>633-Hydrazid) kalibriert. Da es im verwendeten Setup nur eine Lochblende für alle Laser gab, wurde für beide eingesetzten Wellenlängen eine gemeinsame optimale Position ermittelt. Die Größe der Lochblende wurde auf den von der ZEN-Software vorgegebenen wellenlängenoptimierten Wert von 1 AU eingestellt. Dies entspricht im Kreuzkorrelationssetup 488/633 einem Durchmesser von 40  $\mu$ m. Nach Einstellen des Korrekturrings wurden für beide Kanäle Kalibriermessungen durchgeführt [70]. Aus diesen Kalibriermessungen mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ( $D = 414 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) [142] und Alexa Fluor<sup>®</sup>633 ( $D = 380 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ) [75, Manuskript in Vorbereitung] wurde durch das Anpassen der experimentell ermittelten Autokorrelationskurven mit Gleichung 3.5/ 3.6 auf Seite 40, die nach Gleichung 3.15 mit dem Term 3.16 auf Seite 42 für das Triplettblincken ergänzt wurde, der Strukturparameter ermittelt. Aus 39 unabhängigen Messungen im grünen Kanal mit Alexa Fluor<sup>®</sup>488 wurde  $S_g = 6,7$  und aus 32 Messungen im roten Kanal mit Alexa Fluor<sup>®</sup>633 wurde  $S_r = 6,3$  bestimmt. Aufgrund des zu vernachlässigenden Unterschiedes wurde im Folgenden ein mittlerer Wert für beide Kanäle von  $S = 6,5$  verwendet.

Mit Hilfe der in den Kalibriermessungen ermittelten Werte für  $\tau_{\text{diff}}$  und  $S$  und den Gleichungen 3.11 und 3.12 auf Seite 41 sowie der Gleichung 3.22 auf Seite 43 können alle setupspezifischen Größen ermittelt werden.

Die ermittelten Werte betragen  $V_{\text{eff,r}} = 0,674 \mu\text{m}^3$  bei  $\omega_{0,\text{r}} = 0,265 \mu\text{m}$  für das rote Detektionsvolumen,  $V_{\text{eff,g}} = 0,357 \mu\text{m}^3$  bei  $\omega_{0,\text{g}} = 0,214 \mu\text{m}$  für das grüne Detektionsvolumen und  $V_{\text{eff,x}} = 0,506 \mu\text{m}^3$  bei  $\omega_{0,\text{x}} = 0,240 \mu\text{m}$  für das Kreuzkorrelationsvolumen.

## 5.4. Ergebnisse und Diskussion der dcFCCS-Messungen

### 5.4.1. Standard-Kreuzkorrelationsproben

#### Vesikel

Das verwendete Setup zeichnet sich durch hohe Stabilität und Reproduzierbarkeit der Messungen aus. Allerdings konnten nur begrenzt Einstellungen vorgenommen werden. Z.B. ist im Confocor 3 nur eine Lochblende, die alle Detektionsstrahlengänge nutzen, verbaut. Das hatte zur Folge, dass sowohl die Position, als auch die Größe der Lochblende einen bestmöglichen Kompromiss zwischen den verwendeten Kanälen darstellen musste. Um Aussagen darüber treffen zu können, wie gut mit diesen Einstellungen die Überlappung der Detektionsvolumina der verwendeten Wellenlängenbereiche erreicht wurde, ist es nötig, mit einer möglichst perfekten Kreuzkorrelationsprobe das Setup zu testen. Da kommerziell erhältliche doppelt gefärbte DNA-Oligonukleotide oftmals nur eine doppelt markierte Fraktion von 50-60 % aufwiesen [70], wurden von Stefan Werner (Masterarbeit [64]) doppelt gefärbte Liposomen aus DOPC mit einer Größe von ca. 60 nm als Standard-Kreuzkorrelationsprobe etabliert [75, Artikel in Bearbeitung].

Bei Kontrolle des verwendeten dcFCCS-Setups mit diesen doppelt gefärbten SUV lag die Kreuzkorrelationskurve (dunkelgrau) zwischen der roten und der grünen Autokorrelationskurve (Abbildung 5.1 A). Der Unterschied zwischen den einzelnen Kurven spiegelte die Auswirkung der wellenlängenabhängigen Größen der Detektionsvolumina auf die dcFCCS-Messungen wider. Nach Korrektur der Kurven um den jeweiligen, aus der Kalibrierung mit freiem Farbstoff ermittelten effektiven Größe des Detektionsvolumens, wurde deutlich, dass es sich in beiden Kanälen um Partikel gleicher Größe ( $D = 0,28 \text{ s}/\mu\text{m}^2$ ) und Konzentration  $c = 1,1 \text{ nM}$  Vesikel) handelt (Abbildung 5.1 B). Dafür wurde die Korrelationsfunktion  $G(\tau)$ , aufgetragen auf der y-Achse, um das jeweilige Detektionsvolumen und die Korrelationszeit  $\tau$ , auf der x-Achse, um die jeweilige laterale Ausdehnung  $\omega_0^2$  ( $\omega_{0,\text{r}}, \omega_{0,\text{g}}, \omega_{0,\text{x}}$ ) korrigiert, was zur Folge hatte, dass rote und grüne Autokorrelation (fast) perfekt übereinander lagen. Des Weiteren wurden die grüne und rote Autokorrelation für die Helligkeiten (Farbstoffverteilung) korrigiert. Die relative Höhe der Kreuzkorrelationsamplitude bestätigte zudem, dass es sich in beiden Kanälen um die selben Vesikel handelte, da beide Farbstoffe gemeinsam diffundieren.

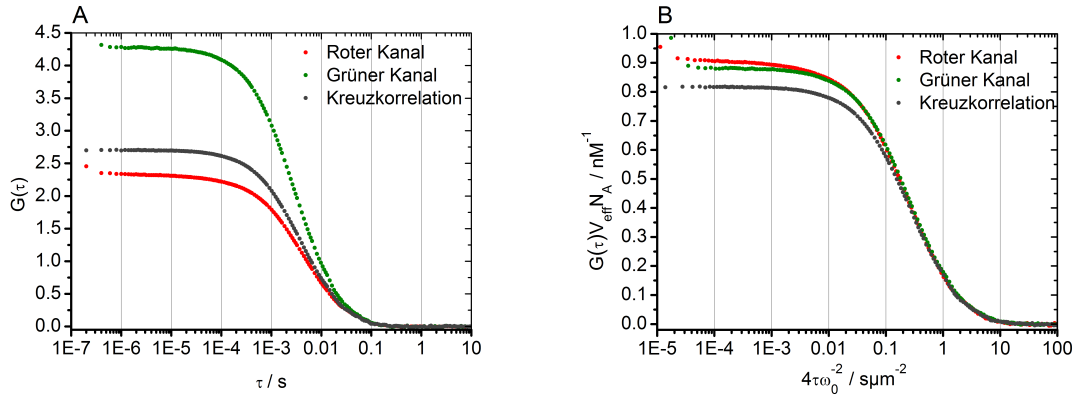


Abbildung 5.1.: **Perfekte Kreuzkorrelationsprobe aus mit DiD C<sub>18</sub> und Bodipy®FL C<sub>12</sub> doppelt markierten DOPC-Liposomen (ca. 100 nm) zur Demonstration der Volumenkorrektur.** (A) zeigt die unkorrigierten Korrelationsamplituden aller gemessenen Kanäle inklusive der Kreuzkorrelation in der Auftragung gegen die Korrelationszeit  $\tau$ . (B) zeigt die gleichen Korrelationskurven, mit  $G(\tau)$  korrigiert um das jeweilige effektive Detektionsvolumen und die Farbstoffverteilung unter den Vesikeln und  $\tau$  korrigiert um die jeweilige Fokusfläche  $\omega_0^2$ . Es wird deutlich, dass die Teilchen in beiden Kanälen den gleichen Diffusionskoeffizienten aufweisen. Die sehr hohe Kreuzkorrelationsamplitude im Vergleich zu den Autokorrelationsamplituden bestätigt zudem, dass die Teilchen beide Farbstoffe tragen.

Die Kreuzkorrelationsamplitude verlief nach allen Korrekturen etwas unterhalb dieser beiden Kurven und nicht wie für eine zu 100 % doppelt markierte Probe erwartet auf gleicher Höhe mit den beiden Autokorrelationsproben. Die Ursache hierfür ist in der unvollständigen Überlappung der beiden Detektionsvolumina zu suchen. Aus der Abweichung der Kreuzkorrelationsamplitude von den beiden Autokorrelationsamplituden können Rückschlüsse auf die Qualität des Überlapps beider Detektionsvolumina gezogen werden [75, Artikel in Bearbeitung]. Die Vesikel hingegen können als perfekt doppelt markierte Probe behandelt werden.

Aus der Messung dieser perfekten Probe konnten die mit diesem Setup maximal erreichbaren Verhältnisse  $X_r$  und  $X_g$  ermittelt und als mittlerer Korrekturfaktor  $Q$  des Setups für alle folgenden Messungen berücksichtigt werden. Im Fall des verwendeten Setups betrug  $X_r = 0,93$  und  $X_g = 0,91$ , aufgrund der Ähnlichkeit dieser beiden Werte konnte  $Q = 0,92$  verwendet werden. Zum Vergleich wurden einfach grün gefärbte Vesikel mit einfach rot gefärbten Vesikeln der gleichen Größe im Verhältnis 1:1 gemischt. Die korrigierten Autokorrelationskurven dieser Probe lagen ebenfalls genau übereinander, jedoch beschrieb die Kreuzkorrelationskurve eine Gerade parallel zur x-Achse, die Kreuzkorrelationsamplitude ( $G_x$ ) war nahezu null (siehe Abbildung A.2 im Anhang).

## Mizellen

Da Vesikel bei der Extrusion nicht perfekt einheitlich werden, sondern immer eine Größenverteilung aufweisen, wurden weitere, einfach herzustellende, doppelt markierte Proben

auf ihre Eignung als Standardkreuzkorrelationsprobe getestet.

Eine einfache Variante schienen Mizellen zu sein, die ebenfalls beide Farbstoffe enthalten. Bei Mizellen handelt es sich um Aggregate mit einem Radius von 2,5 - 6 nm aus ca. 130 - 1000 amphiphilen Molekülen, die sich in wässrigen Lösungen oberhalb der CMC von selbst assemblieren. Es wurden gemischte Mizellen aus verschiedenen Detergens-Farbstoffzusammensetzungen, z.T. in Kombination mit Lipiden getestet. Beispielhaft sollen Messungen von zum einen von Mizellen bestehend aus Triton X-100 und den Fluoreszenzfarbstoffen DiD C<sub>18</sub> und Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> (Abbildung 5.2 A) und zum anderen von Mizellen aus Triton X-100, DOPC und den Fluoreszenzfarbstoffen Atto633-DMPE und Oregon Green-DHPE (Abbildung 5.2 B) die Problematik verdeutlichen.

Um einen Farbstoffgehalt von 5 - 7 Molekülen pro Farbstoff und Mizelle zu erreichen, war es nötig 5 mol% je Farbstoff im Vergleich zum Detergens bzw. im Verhältnis zum Lipid einzusetzen. Zwar wurden die Proben wie beschrieben mit der entsprechenden Farbstoffmenge präpariert, jedoch war es nicht möglich diese konzentrierten Mizellensuspensionen zu vermessen. Das notwendige Verdünnen der Proben, um sie in der FCS messen zu können, machte es unmöglich den Farbstoffgehalt in den einzelnen Mizellen so hoch zu halten. Ein Verdünnen in detergensfreier Lösung hätte dazu geführt, dass die Detergenskonzentration unter die CMC fällt und damit keine Mizellen mehr in der Lösung vorhanden wären, bzw. sich in Anwesenheit von Lipid Vesikel bilden. Das Verdünnen der Probe in detergenschaltiger Lösung führte dazu, dass mehr Mizellen entstanden, wodurch es nur zum Verdünnen der Farbstoffe, nicht aber der Mizellen kam und ein Auftreten beider unterschiedlicher Farbstoffe in einer Mizelle unwahrscheinlicher wurde. Die Endkonzentration jedes Farbstoffs in der Lösung betrug 0,0005 mol% für die Probe, die in Abbildung 5.2 A dargestellt wird und 0,0012 mol% für die Probe in Abbildung 5.2 B. In beiden Fällen befanden sich Mizellen in der Lösung. Dies war durch den Diffusionskoeffizienten von  $D = 49 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  für Messung 5.2 A aus grüner Autokorrelation berechnet (entspricht  $r_0 = 5,8 \text{ nm}$ ) und  $D = 80 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  für Messung 5.2 B aus roter Autokorrelation berechnet (entspricht  $r_0 = 3,2 \text{ nm}$ ) belegbar. Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wurde jeweils aus der Autokorrelationskurve mit den wenigsten Tripletteffekten bestimmt. Für Abbildung 5.2 A lässt sich die grüne Kurve des Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub>, für Abbildung 5.2 B hingegen lässt sich die rote Kurve des Atto633-DMPE besser anpassen.

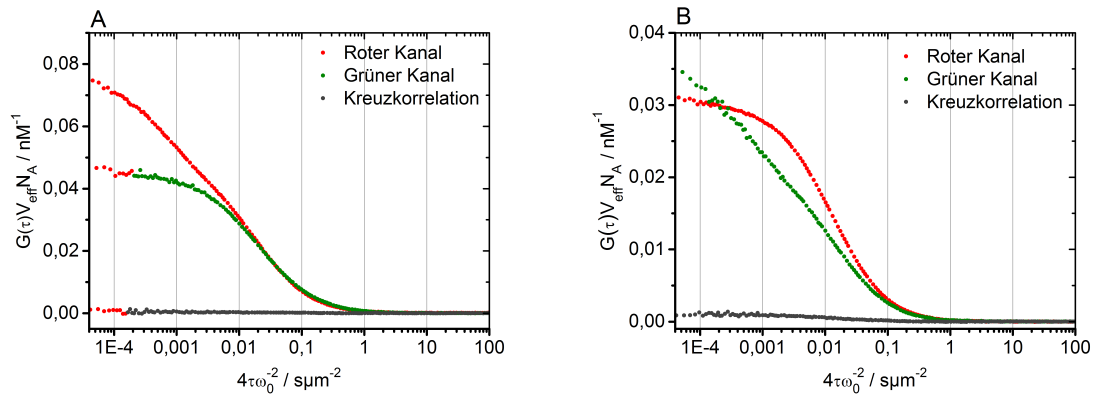


Abbildung 5.2.: **Volumen- und farbstoffverteilungskorrigierte Darstellung der Kreuzkorrelationsmessungen doppel gefärbter Mizellen.** Gemessen bei RT mit Anregung bei 488 nm und 633 nm Wellenlänge. (A) Mizellen aus 2,5 mM Triton X-100, 12,5 nM DiD C<sub>18</sub> und 12,5 nM Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> ohne Lipid. (B) Mizellen aus 2,5 mM Triton X-100, 360 nM DOPC und jeweils 30 nM Att633-DMPE und 30 nM Oregon Green-DHPE.

Die im Messansatz sehr niedrige Farbstoffkonzentration von 0,0005 mol% (0,0012 mol%) im Verhältnis zum Detergens machte es sehr unwahrscheinlich, dass sich mehrere Farbstoffmoleküle gleichzeitig in einer Mizelle befanden. Dies zeigte sich deutlich in der sehr niedrigen Kreuzkorrelationsamplitude. Auch in diesen Messungen könnten die Autokorrelationsamplituden um den Wert der Farbstoffverteilung ( $\lambda$ ) nach Gleichung 3.43 auf Seite 48 korrigiert werden. Die Korrekturwerte betragen für Abbildung 5.2 A:  $\lambda = 0,0011$  und für Abbildung 5.2 B:  $\lambda = 0,0084$ . Wenn aber  $\lambda$  sehr viel kleiner als 1 ist, würde dies die relativen Kreuzkorrelationsamplituden  $X_r$  und  $X_g$  sehr unsicher machen. Deshalb wurden die Werte in Tabelle 5.1 für die Mizellen ohne Farbstoffkorrektur berechnet. Damit sind Mizellen als Standardkreuzkorrelationsprobe ungeeignet.

Um das Verdünnen der eigentlichen Untersuchungsobjekte zu verhindern, war es nötig, Proben herzustellen, die ähnlich wie Lipidvesikel nach dem Vorgang der Präparation stabile Strukturen bilden, die sich nicht durch Verdünnen ändern.

## Nanodiscs

Nanodiscs sind Strukturen in einem ähnlichen Größenbereich wie Mizellen. Es handelt sich um eine Lipiddoppelschicht, die durch ein Hüllprotein (*Membrane Scaffold Protein*, MSP) zusammen gehalten wird. Die genaue Größe der Nanodisc ist dabei von der Art des Hüllproteins abhängig. Mit dem hier verwendeten Hüllprotein MSP1D1 beinhaltete eine Nanodisc ca. 134 Lipidmoleküle (DOPC). Um im Mittel mindestens ein Farbstoffmolekül pro Nanodisc zu erhalten, wurden 5 mol% je Fluoreszenzfarbstoff im Ansatz benötigt. Ein Vorteil der Nanodiscs im Vergleich zu den Mizellen ist die Möglichkeit der Verdünnung der Probe, da die Partikel selbst unabhängig von ihrer Konzentration stabil sind.

Es wurden zwei verschiedene Farbstoffkombinationen getestet. In beiden Proben waren doppelt markierte Teilchen vorhanden, die mit  $D = 63 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  ( $r_0 = 3,9 \text{ nm}$ ) (Abbildung 5.3 A) und  $D = 73 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$  ( $r_0 = 3,4 \text{ nm}$ ) (Abbildung 5.3 B) etwa der erwarteten Größe

entsprachen.

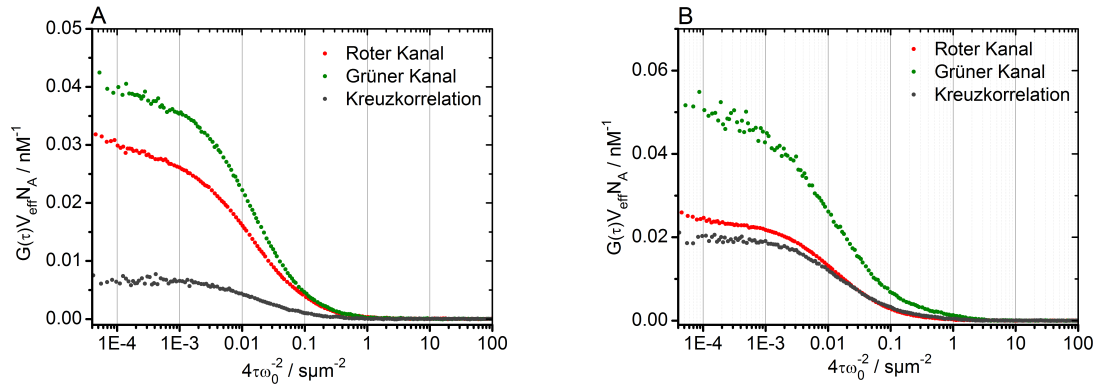


Abbildung 5.3.: **Kreuzkorrelationsmessungen von Nanodiscs aus DOPC und roten und grünen Fluoreszenzfarbstoffen** (A) Nanodiscs aus DOPC mit 5 mol% DiD C<sub>18</sub> und 5 mol% Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> gemessen mit Laserleistungen von 0,6  $\mu$ W des roten Lasers und 3,5  $\mu$ W des grünen Lasers. (B) Nanodiscs bestehen aus DOPC, 5 mol% Atto633-DMPE und 5 mol% OregonGreen-DHPE, die Messung wurde bei Laserleistungen von 0,6  $\mu$ W roter Laser und 15  $\mu$ W grüner Laser durchgeführt.

Unabhängig von der Farbstoffkombination waren scheinbar deutlich weniger grüne als rote Teilchen in der Lösung vorhanden, was der Vergleich der grünen und roten Autokorrelationsamplitude zeigt (Abbildung 5.3). Zudem war die Kreuzkorrelationsamplitude deutlich niedriger als im verwendeten dcFCCS-Setup für eine zu 100 % doppelt markierte Probe erwartet werden kann (siehe Abschnitt 5.4.1).

Für die Messung in Abbildung 5.3 A wurde, wie bei den Vesikeln, die Farbstoffkombination aus dem rot fluoreszierenden Farbstoff DiD C<sub>18</sub> und dem grün fluoreszierenden Farbstoff Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> eingesetzt. Diese Kombination hatte sich bei früheren Untersuchungen als günstig herausgestellt. Da sich beim Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> der Fluorophor an einer Fettsäurekette befindet, beim DiD C<sub>18</sub> dagegen der Fluorophor der Lösung zugewandt und das Dipolmoment parallel zur Membran liegt, wurde erwartet, dass diese beiden Farbstoffe verschieden orientierte Übergangsdipolmomente haben und es nur eine sehr geringe FRET-Effizienz gibt [64]. In Nanodiscs, wo ähnlich viele Farbstoffmoleküle wie in einem Vesikel, allerdings auf einer deutlich kleineren Fläche zusammengedrängt werden, könnte es trotzdem zur Fluoreszenzlöschung, besonders des grünen Bodipy<sup>®</sup>FL C<sub>12</sub> kommen. Dies würde die grüne Autokorrelationsamplitude sowie die Kreuzkorrelationsamplitude verfälschen. Auch der Einfluss des umgebenden Proteins kann hierbei als Quencher eine Rolle spielen.

Bei der zweiten Nanodisc-Probe, mit OregonGreen-DHPE als grün- und Atto633-DMPE als rot fluoreszierender Farbstoff (Abbildung 5.3 B), war die Teilchenkonzentration im grünen Kanal im Vergleich zum roten Kanal noch niedriger als bei der Messung in Abbildung 5.3 A. Hinzu kommt, dass der grüne Farbstoff nur sehr schwach fluoreszierte, obwohl mit vierfacher Laserleistung im Vergleich zum roten Kanal angeregt wurde. Da es sich bei beiden Farbstoffen um kopfgruppenmarkierte Lipidanaloga handelte, kann

vermutet werden, dass sich die beiden Fluorophore sehr nahe kommen konnten und aufgrund von FRET ein Teil der grünen Farbstoffmoleküle nicht fluoresziert. Der Vergleich der Amplitudenverhältnisse  $X_r$  und  $X_g$  von Nanodiscs und Vesikeln (Tabelle 5.1) macht deutlich, dass Vesikel die größten Werte für dieses Kreuzkorrelationsmaß erreichen.

Tabelle 5.1.: **Direkter Vergleich der Amplitudenverhältnisse  $X_r$  und  $X_g$**  nach Korrektur für die unterschiedlichen Detektionsvolumina und den Farbstoffgehalt der Vesikel und Nanodiscs. Für Mizellen sind nur die volumennormierten Werte genannt, da eine Korrektur für den Farbstoffgehalt nicht sinnvoll wäre.

Probe	Farbstoffe grün - rot	$X_r$	$X_g$	$\frac{G_x^*}{G_r^*}$	$\frac{G_x^*}{G_g^*}$
Vesikel	Bodipy <sup>®</sup> FL C <sub>12</sub> - DiD C <sub>18</sub>	0,93	0,91		
Mizellen A	Bodipy <sup>®</sup> FL C <sub>12</sub> - DiD C <sub>18</sub>			0,006	0,007
Mizellen B	OregonGreen - Atto633			0,03	0,04
Nanodiscs A	Bodipy <sup>®</sup> FL C <sub>12</sub> - DiD C <sub>18</sub>	0,22	0,15		
Nanodiscs B	OregonGreen - Atto633	0,63	0,37		

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Vesikel als einzige der getesteten Möglichkeiten als Standardkreuzkorrelationsprobe in Frage kommen. Die einfache Präparation, der geringe Farbstoffgehalt, besonders im Verhältnis zur Lipidkonzentration, und die stabilen Strukturen, bedingt durch die niedrige CMC der Phospholipide, machen aus ihnen einfach zu handhabende Kalibrierproben für dcFCCS-Setups [75, Artikel in Bearbeitung]. Vesikel lassen sich im Vergleich zu Mizellen problemlos Verdünnen ohne ihre Zusammensetzung zu verändern. Diese Eigenschaft weisen zwar auch die Nanodiscs auf, jedoch scheint die benötigte Anzahl der Farbstoffmoleküle auf so kleinem Raum zu unerwünschten Effekten wie Fluoreszenzlöschung zu führen. Dieser Nachteil der Nanodiscs kann auch durch die angestrebte Homogenität der Partikelgröße nicht aufgehoben werden. Die Heterogenität der Vesikelgröße kann zudem rechnerisch berücksichtigt werden.

## 5.4.2. Vorbereitende Messungen für Bindungsexperimente

### Bleichen des Farbstoffes

Vor Beginn der Bindungsexperimente wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Um sicherzustellen, dass in den Experimenten die verwendeten Farbstoffe nicht durch Bleichen zerstört werden, wurden Bleichkurven sowohl für den freien, als auch für den an Sar1p gebundenen Farbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup>488 aufgenommen. Im hier beschriebenen Fall ist mit Bleichen eine meist irreversible Zerstörung des Farbstoffes gemeint, die dazu führt, dass die Fluoreszenz während der Anregung plötzlich erlischt.

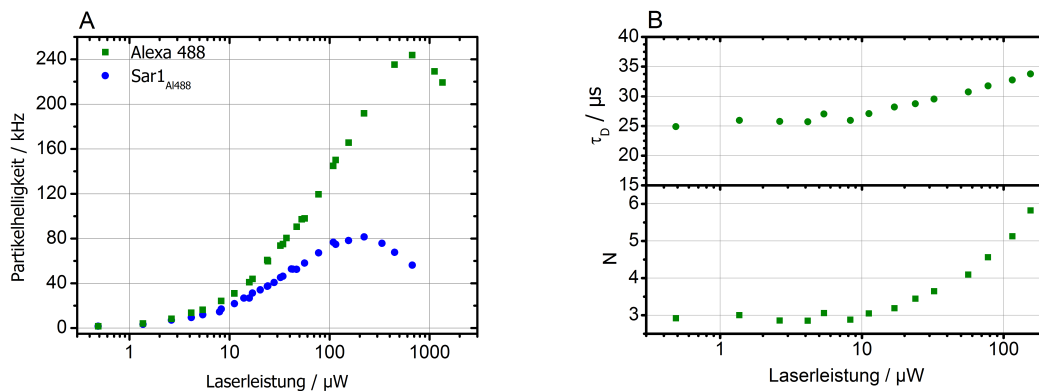


Abbildung 5.4.: **Bleichkurven für Alexa Fluor<sup>®</sup>488.** (A) Darstellung der Partikelhelligkeit von freiem Alexa Fluor<sup>®</sup>488-hydrazid (grüne Quadrate) und an Sar1p gebundenem Alexa Fluor<sup>®</sup>488-maleimid (blaue Punkte) in HKM-Puffer in Abhängigkeit von der Laserleistung. (B) Abhängigkeit der Diffusionszeit  $\tau_D$  und der Teilchenzahl  $N$  des Alexa Fluor<sup>®</sup>488-hydrazid von der Anregungsleistung.

Beim Auftragen der Partikelhelligkeit gegen die Laserleistung (Abbildung 5.4 A) wird deutlich, dass sowohl das freie Alexa Fluor<sup>®</sup>488, als auch das an das Sar1p gebundene Alexa Fluor<sup>®</sup>488 bei einer Laserleistung von unter 80  $\mu\text{W}$  nicht gebleicht werden. Das Bleichen trat bei dem an das Sar1p gebundenen Alexa Fluor<sup>®</sup>488 bereits bei niedrigeren Laserleistungen als beim freien Farbstoff ein. Es konnte festgestellt werden, dass der am Sar1p gebundene Farbstoff im Vergleich zum freien Farbstoff eine verminderte Helligkeit aufwies. Dies war aber für die folgenden Messungen nicht von Bedeutung, da kein freier Farbstoff in den Proben des markierten Sar1p mehr vorhanden war (persönliche Mitteilung Jan Auerswald).

Sowohl die Diffusionszeit als auch die Teilchenzahl des freien Alexa Fluor<sup>®</sup>488 waren bis zu einer Laserleistung von ca. 10  $\mu\text{W}$  konstant (Abbildung 5.4 B). Alle folgenden Experimente wurden, soweit nicht anders erwähnt, mit einer Anregungsleistung des Argon-Ionen-Lasers bei 488 nm von 5,4  $\mu\text{W}$  gemessen. Die Laserleistung wurde mit einem Handmessgerät mit Photodiode ohne Objektiv im Strahlengang bestimmt.

### Alexa Fluor<sup>®</sup>488 an Liposomen

Um sicher zu stellen, dass die beobachtete Bindung des Sar1p an die Vesikel nur durch das Protein und nicht durch den Farbstoff vermittelt wurde, wurden Major-Minor-Mix-Vesikel vier Stunden mit freiem Alexa Fluor<sup>®</sup>488 inkubiert und anschließend vermessen (Abbildung 5.5). Anhand der Messungen konnte ausgeschlossen werden, dass Alexa Fluor<sup>®</sup>488-hydrazid an Liposomen bindet. Zum einen ließ sich aus der Autokorrelationskurve des grünen Kanals (freier Farbstoff) nicht die Diffusionszeit für Liposomen entnehmen, zum anderen war die für das Übersprechen korrigierte Kreuzkorrelationsamplitude mit  $G_x(0) = 0,01$  sehr niedrig, ebenso wie das Verhältnis von Kreuz- zu roter Autokorrelationsamplitude  $X_r = 0,0038$ . Aus Gleichung 5.5 geht hervor, dass diesem Wert entnommen werden kann, dass ca. 0,4 % der grünen Farbstoffmoleküle gemeinsam



mit einem roten Teilchen diffundierten.

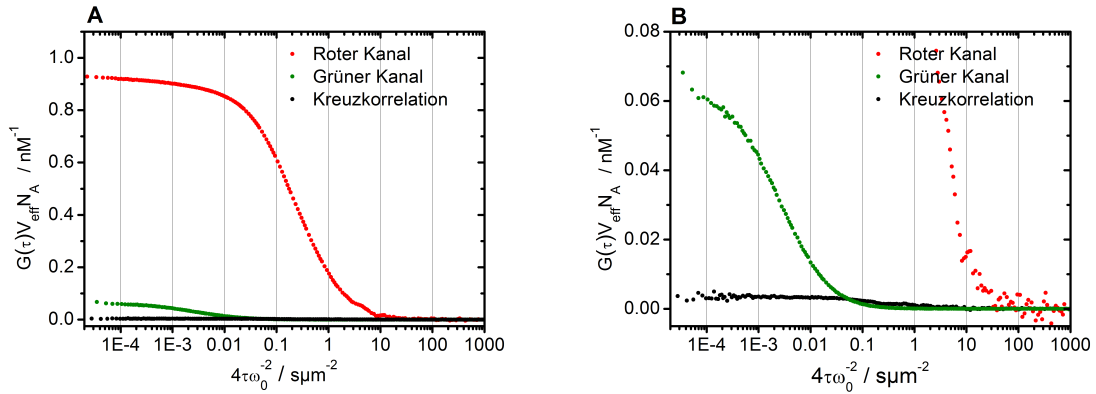


Abbildung 5.5.: **Keine unspezifische Bindung von freiem Farbstoff an Vesikel.** Freies Alexa Fluor<sup>®</sup>488-hydrazid (grüner Kanal) bindet nicht an SUV aus Major-Minor-Mix, welche mit 0,02mol% DiD C<sub>18</sub> markiert wurden (roter Kanal). Eine Übersprechkorrektur wurde berücksichtigt. (A) Darstellung aller drei gemessenen Korrelationskurven in volumennormierter Form. Die rote Kurve für die Vesikeldiffusion wurde ebenfalls für die Farbstoffverteilung korrigiert. (B) Veränderte Skala der y-Achse um grüne Autokorrelations- und Kreuzkorrelationskurve besser sichtbar zu machen.

Wie bereits in Abschnitt 3.3.3 erwähnt wurde, konnte aufgrund des Setups ein Übersprechen des grünen Farbstoffes in den roten Kanal nicht ausgeschlossen werden. Mit Hilfe von Referenzmessungen mit freiem Protein ohne Vesikel im Kreuzkorrelationssetup wurde ein Korrekturwert  $\kappa_{Gr} = 0,0087$  nach Gleichungen 3.27- 3.29 auf Seite 45 berechnet [63] und in allen gezeigten Messungen berücksichtigt.

### 5.4.3. Bindungsexperimente mit Sar1p an Vesikeln

Für alle nachfolgenden Messungen wurde Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 eingesetzt. Um sich nicht wie in bisher gezeigten Untersuchungen dieser Art alleinig auf das Signal des Proteins und seiner Veränderung hinsichtlich der Diffusionszeit zu verlassen [55, 56], wurden in den vorliegenden Experimenten die Vesikel mit dem fluoreszierenden Lipidanalogen DiD C<sub>18</sub> angefärbt, um diese mit einer Wellenlänge von 633 nm anzuregen und ihre Diffusion im roten Kanal zu messen. Dadurch konnte neben den Autokorrelationen beider Kanäle auch die Kreuzkorrelation bestimmt und für die Auswertung herangezogen werden. Die Berechnungsgrundlagen für diese Experimente sind in 3.3.3 detailliert dargestellt.

### Kinetik der Bindung von Sar1p an Major-Minor-Mix Vesikel

Um die späteren Messungen im Gleichgewichtszustand durchführen zu können und einen ersten Eindruck über die Kinetik der Bindung des Sar1p an Vesikel zu bekommen, wurden zu Beginn Messungen über mehrere Stunden durchgeführt. Wie bereits im vorigen Kapitel 4 erläutert, bindet Sar1p in Anwesenheit von GTP oder einem nicht-hydrolysierbaren

GTP-Analogen an die Membran. Um die Dissoziation des Sar1p von den Vesikeln während des Passierens des Fokus zu verhindern, wurde GMP-PNP als nicht-hydrolysierbares Nukleotid eingesetzt. Direkt nach der Herstellung der Probe wurde diese über vier Stunden alle 15 Minuten für eine Minute gemessen. Die Abstände sollten verhindern, dass die Kinetik durch einen anhaltenden Energieeintrag in Form von Licht beeinflusst wird.

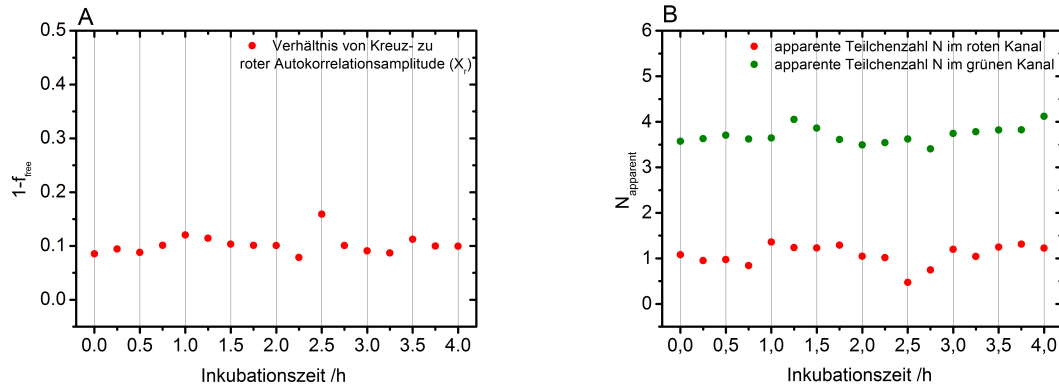


Abbildung 5.6.: **Messungen während der Inkubationszeit von vier Stunden.** 0,2 mM Lipid (entspricht ca. 3 nM Vesikel) wurden mit 21 nM Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 in HKM-Puffer mit 1 mM GMP-PNP bei Raumtemperatur inkubiert. Gemessen wurde alle 15 Minuten für eine Minute. (A) Darstellung des Anteils gebundenen Proteins aus dem vollständig korrigierten Verhältnis von Kreuzkorrelationsamplitude zu roter Autokorrelationsamplitude  $X_r$  (siehe Gleichung 5.1). (B) Darstellung der apparenten Teilchenzahlen  $N$  im roten (Vesikel mit DiD-C<sub>18</sub>) und grünen (Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488) Kanal in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Wie in Abbildung 5.6 dargestellt, konnte mittels der durchgeführten Messungen keine Kinetik aufgelöst werden. Aufgrund des nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogons konnte außerdem davon ausgegangen werden, dass Sar1p während der Messung kaum von den Vesikeln dissoziiert. Die dargestellten Parameter sind im Rahmen messbedingter Schwankungen über die gesamte Zeit konstant. Aufgrund dieser Ergebnisse und um es gegenüber den Tubulationsexperimenten vergleichbar zu halten, wurde für alle weiteren Messungen eine Inkubationszeit von zwei Stunden gewählt.

### Titration von Sar1p zu Vesikeln

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse wurden 2017 im Biophysical Journal veröffentlicht [4].

Für den ersten Teil der Bindungsmessungen in der FCS wurde die Lipidkonzentration konstant gehalten ( $c_{L,\text{tot}} = 0,09 \text{ mM} \triangleq c_{L,\text{acc}} = 0,045 \text{ mM}$ ) und die Proteinkonzentration variiert. Die Größe der Major-Minor-Mix Vesikel betrug  $d = (83,6 \pm 3,8) \text{ nm}$  (bestimmt in der FCS). Die genaue Vesikelkonzentration  $c_V$  konnte direkt aus der roten Autokorrelationsamplitude  $G_r^{\ddagger}(0)$  bestimmt werden und betrug  $c_V = (1,6 \pm 0,4) \text{ nM}$ . Die Proteinkonzentration der Ausgangslösung des gelabelten Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 wurde in einer

Kontrollmessung des Proteins ohne Vesikel per FCS aus der grünen Autokorrelationsamplitude  $G_g^*(0)$  bestimmt. Für Konzentrationen  $c_{P,ges} > 100$  nM wurde mit Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 dotiertes unmarkiertes Sar1p eingesetzt. Die Gesamtkonzentration von Sar1p wurde mit Hilfe eines Absorptionsspektrums im Bereich von 220 bis 350 nm bestimmt (ein exemplarisches Spektrum befindet sich im Anhang A.3).

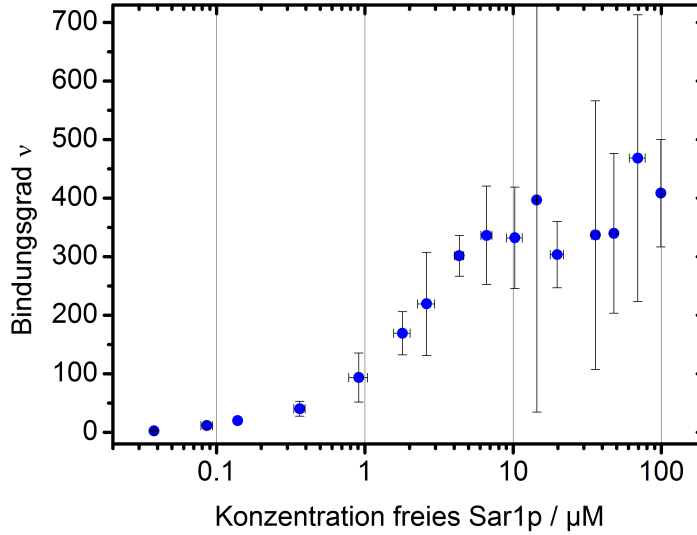


Abbildung 5.7.: **Auftragung des errechneten Bindungsgrades  $\nu_n$  gegen die Konzentration freies Sar1p.** Mittlung von sechs Einzelmessungen mit einer konstanten Lipidkonzentration von  $c_{L,acc} = 0,045$  mM ( $c_V = (1,6 \pm 0,4)$  nM). Die Vesikel aus Major-Minor-Mix hatten einen Durchmesser von  $d = (83,6 \pm 3,8)$  nm. Alle Messungen wurden nach zweistündiger Inkubation der Vesikel mit Sar1p in HKM-Puffer mit 1 mM GMP-PNP in der Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die hier dargestellten Berechnungen wurden nach Abschnitt 3.3.3 und 5.2 ohne Berücksichtigung möglichen Quenchens durchgeführt. Die Balken geben die Standardabweichung der Werte an.

Für die Abbildung 5.7 wurden sechs unabhängige Titrationsreihen ausgewertet. Die jeweiligen Auto- und Kreuzkorrelationsamplituden wurden wie in 5.2 beschrieben herangezogen, um einen Bindungsgrad ( $\nu$ ) und die Konzentration an freiem Sar1p ( $c_{P,free}$ ) zu berechnen. Der Bindungsgrad  $\nu$  gibt an, wie viele Proteinmoleküle pro Vesikel gebunden sind. Das Maximum  $n$  gibt wiederum an, wie viele Proteine maximal auf einem Vesikel gebunden sein können (vergleiche Gleichung 3.60). Es wurde deutlich, dass eine Titration von  $100$  nM  $< c_{P,ges} < 20$   $\mu\text{M}$  ausreichen würde, um  $n$  und  $k_D$  für Sar1p zu einem Bindungsplatz auf einem kleinen Liposom (mit GMP-PNP) zu ermitteln. Die aus der Kurve in Abbildung 5.7 durch Anpassung mit Gleichung 3.59 auf Seite 51 (Anpassungskurve siehe Abbildung A.4 B) ermittelten Werte für  $k_D$  und  $n$  sind in Tabelle 5.2 zusammengefasst. Aus diesen beiden Werten konnte nach Gleichung 3.60 auf Seite 52 der Wert für  $K_{D,V}$  als Dissoziationskonstante des Sar1p zu einem Vesikel ( $d \approx 83$  nm) berechnet werden. Die Anzahl Lipide je Sar1p ( $\Lambda_{acc}$ ) (also je Bindungsplatz, nur eine

Lipidschicht betrachtet) wurde über die Gleichung 3.61 auf Seite 52 bestimmt. Um die Dissoziationskonstante zu Lipid zu berechnen wurde Gleichung 3.63 auf Seite 52 verwendet.

Tabelle 5.2.: Werte für  $k_D$  und  $n$  ermittelt aus den Messreihen in Abbildung 5.7 mit verschiedenen Werten für  $\Phi$  sowie die daraus ermittelten Werte für  $K_{D,V}$  und  $K_{D,L}$  und die zugehörigen Werte für Lipide pro Sar1p (pro Bindungsplatz).

Anpassung aus Abbildung	Quenchfaktor $\Phi$	$k_D$ $\pm$ Standardabweichung $\mu\text{M}$	$n$ $\pm$ Standardabweichung	$K_{D,V}$ in nM	Lipide pro Bindungsplatz $\Lambda_{\text{acc}}$	$K_{D,L}$ in $\mu\text{M}$
5.7	1,0	$2,24 \pm 0,50$	$408 \pm 19$	5,49	71	159
A.4 B	0,8	$2,30 \pm 0,52$	$506 \pm 24$	4,55	57	131
A.4 B	0,66	$2,36 \pm 0,52$	$610 \pm 28$	3,87	47	111

Die in der obigen Tabelle (5.2) dargestellten Werte wurden durch Anpassung der gemittelten Kurve in Abbildung 5.7 errechnet. Zur Überprüfung speziell des Wertes für  $k_D$  wurden zusätzlich alle sechs Einzelkurven (siehe Abbildung 5.8 A-F) angepasst und anschließend die daraus berechneten Werte gemittelt. Dabei ergibt sich ein mittlerer  $\bar{k}_D = (2,1 \pm 1,1) \mu\text{M}$ . Der Wert für die Anzahl Bindungsplätze je Vesikel variiert stark zwischen 200 und 600.

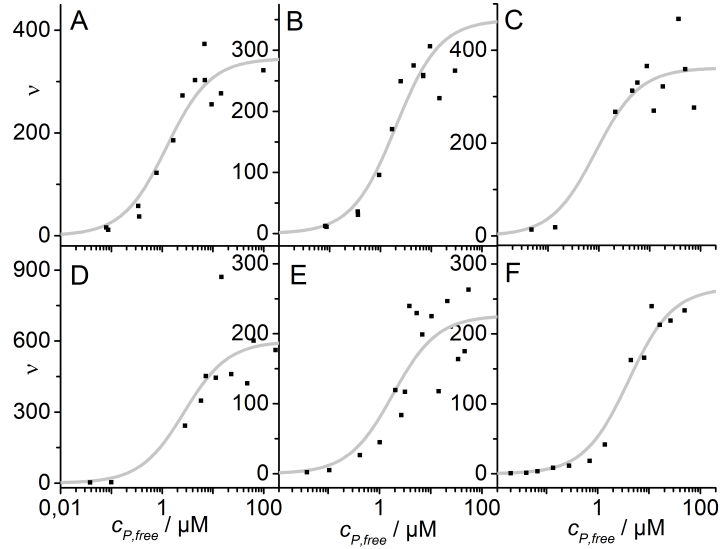


Abbildung 5.8.: **Auftragung des errechneten Bindungsgrades  $\nu$  gegen die Konzentration freies Sar1p ( $c_{P,free}$ ).** Sechs Einzelmessungen mit einer konstanten Lipidkonzentration von  $c_{L,acc} = 0,045 \text{ mM}$  ( $c_V = (1,6 \pm 0,4) \text{ nM}$ ). Die Vesikel aus Major-Minor-Mix hatten einen Durchmesser von  $d = (83,6 \pm 3,8) \text{ nm}$ . Alle Messungen wurden nach zweistündiger Inkubation der Vesikel mit Sar1p in HKM-Puffer mit  $1 \text{ mM}$  GMP-PNP in der Lösung bei Raumtemperatur durchgeführt. Die hier dargestellten Berechnungen wurden nach Abschnitt 3.3.3 und 5.2 ohne Berücksichtigung möglichen Quenchens durchgeführt.

Alle in den Abbildungen 5.7 und 5.8, sowie in Tabelle 5.2 dargestellten FCS-Messwerte und daraus berechnete Größen wurden hinsichtlich der Einflussfaktoren des Übersprechens, der Größe des Detektionsvolumens, des Farbstoffgehaltes und des Setup abhängigen Qualitätsfaktors korrigiert. Dass der Dotierungsgrad des Sar1p keinen Einfluss auf die Kreuzkorrelationsamplitude hat, konnte in Abschnitt 5.2.1 gezeigt werden. Nicht vernachlässigbar ist der Einfluss des Quenchens. Der Quenchfaktor  $\Phi$  wurde in unabhängigen Messung durch den Vergleich der Fluoreszenzspektren von freiem Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 und vollständig an Vesikel gebundenem Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ermittelt. Die Vesikelmenge wurde so gewählt, dass mehr als 80 % des Proteins an den Vesikeln gebunden sein sollte (ca. 30 nM Vesikel mit 21 nM Sar1p). Der gemessene Quenchfaktor betrug  $\Phi = 0,8$ . Dieser konnte bei der Berechnung von  $c_{P,free}$  und  $\nu$  (Gleichungen 5.11 und 5.12) berücksichtigt werden. Die Anpassung der mit  $\Phi$  korrigierten Messwerte machte deutlich, dass durch den Fluoreszenzverlust die Anzahl der Proteine pro Vesikel als zu gering eingeschätzt wurde. Die Dissoziationskonstante  $k_D$  wurde nur wenig beeinflusst (siehe Abbildung A.4 und Tabelle 5.2). In der Literatur wird meist eine Dissoziationskonstante zu verfügbarem Lipid berechnet. Diese konnte aus den Werten für  $k_D$  und  $n$  mit den Gleichungen 3.61 und 3.63 auf Seite 52 berechnet werden. Die Werte für die Anzahl zugänglicher Lipide je Bindungsplatz ( $\Lambda_{acc}$ ) und der  $K_{D,L}$  hängen, anders als der  $k_D$ , stärker vom berücksichtigten  $\Phi$  ab. Dies ist der unterschätzten Anzahl gebundenen Proteins und der damit überschätzten Anzahl Lipide je Bindungsplatz geschuldet, wenn

das Quenchen nicht berücksichtigt wird. Um eine sicherere Aussage über den  $K_{D,L}$  zu treffen, wurde eine weitere Titrationsreihe angeschlossen.

### Titration von Vesikeln zu Sar1p

In Anlehnung an die Arbeiten von [55] und [56] wurde eine zweite Bindungsmessreihe angeschlossen. Hierbei wurde die Konzentration des markierten Proteins Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 konstant gehalten ( $c_{P,ges} = 21 \text{ nM}$ ) und die Lipidkonzentration verändert. Die Proteinkonzentration in der Ausgangslösung wurde vor jeder Messreihe mittels FCS bestimmt. Die Vesikelsuspension wurde mit der benötigten Lipidkonzentration hergestellt und stichprobenartig mittels Phosphattest (durchgeführt von Claudia Müller) kontrolliert.

Aus den einzelnen Messwerten wurde anschließend, wie in Abschnitt 5.2 erläutert, die jeweilige Fraktion gebundenes Protein nach Gleichung 5.5 berechnet. Diese Werte wurden gegen die für das Protein zur Verfügung stehende Lipidkonzentration ( $c_{L,acc} = c_{L,tot}/2$ ) aufgetragen (Abbildung 5.9).

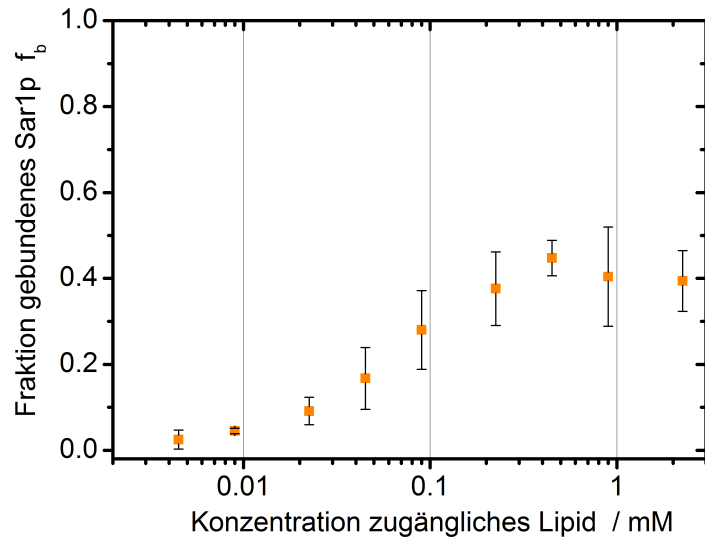


Abbildung 5.9.: **Titration von Lipid in Form von Vesikeln zu einer konstanten Konzentration Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488.** Darstellung der apparenten Fraktion gebundenen Proteins, die sich direkt aus  $X_r$  ableiten lässt, in Abhängigkeit von der gesamten für das Protein zugänglichen Lipidkonzentration ( $c_{L,acc}$ ). Gemessen wurden Proben aus Major-Minor-Mix-Vesikeln mit  $c_{P,ges} = 21 \text{ nM}$  Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 mit GMP-PNP in HKM-Puffer nach zweistündiger Inkubation. Die für die Darstellung verwendeten Korrelationsamplituden wurden für das Übersprechen, die Größe der Detektionsvolumina und die Farbstoffverteilung zwischen den Vesikeln korrigiert. Es wurden Werte von drei unabhängigen Messreihen gemittelt, die schwarzen Balken repräsentieren die Standardabweichung.

Bei steigender Lipidkonzentration nahm die Fraktion des gebundenen Sar1p-Alexa

Fluor<sup>®</sup>488 wie erwartet zu. Diese Fraktion ging nicht über ein Maximum von  $f_{P,b} \approx 0,5$  hinaus und nahm danach wieder leicht ab. Bei dieser Art der Konzentrationsreihe wurde erwartet, dass eine Lipidkonzentration erreicht würde, bei der das gesamte Protein gebunden ist. Dies würde sich in der Fraktion gebundenes Protein widerspiegeln, die gegen  $\lim_{c_{L,acc} \rightarrow \infty} f_b = 1$  laufen sollte. Selbst ohne Einbeziehen des bereits im vorigen Abschnitt beschriebenen Quenchen ( $\Phi = 0,8$ ) sollte dieser Grenzwert erreicht werden, da Helligkeitsunterschiede zwischen gebundenem und ungebundenem Protein bei einer Fraktion freien Proteins  $f_{P,free} = 0$  keine Rolle mehr spielen. Der wahrscheinlichste Grund für einen Grenzwert für  $f_{P,b} < 1$  ist ein Anteil bindungsunfähigen Proteins in der Lösung. Dies wird deutlich, wenn Gleichung 3.50 auf Seite 50 um die Faktoren für den Anteil bindungsfähigen Proteins ( $\alpha$ ) und den realen Quenchfaktor ( $\zeta$ ) erweitert wird. Die Herleitung dieser Gleichung geschah in Zusammenarbeit mit Jan Ebenhan und wird im Anhang in den Gleichungen A.1 bis A.8 aufgezeigt.

Gleichung A.8 kann mit  $c_{L,acc} = n \cdot c_V \cdot A$  und  $K_{D,L} = k_D \cdot A$  (Gleichung 3.63 auf Seite 52) geschrieben werden als:

$$X_r = \frac{\alpha \cdot \zeta \cdot c_{L,acc}}{K_{D,L} + c_{L,acc} \cdot (\alpha \zeta + 1 - \alpha)} \quad (5.15)$$

Der Grenzwert dieser Gleichung lässt sich berechnen als:

$$\lim_{c_{L,acc} \rightarrow \infty} X_r = \frac{\alpha \cdot \zeta}{\alpha \cdot \zeta + 1 - \alpha} \quad (5.16)$$

Aus dieser Gleichung 5.16 ist ersichtlich, dass für den Fall, dass das gesamte Protein bindungsfähig ist ( $\alpha = 1$ ), der Grenzwert für  $X_r = 1$  und unabhängig vom realen Quenchfaktor  $\zeta$  ist. In den unabhängigen Messungen zum Quenchen war ebenfalls nicht bindungsfähiges Sar1p ( $1 - \alpha$ ) vorhanden, welches uneingeschränkt fluoresziert. Die Fraktion bindungsfähiges Protein war vollständig gebunden und fluoreszierte mit dem Faktor  $\zeta$ . Damit handelt es sich bei dem gemessenen Wert  $\Phi$  nur um einen apparenten Quenchfaktor der sich mit  $\alpha$  und  $\zeta$  ausdrücken lässt:

$$\Phi = \alpha \cdot \zeta + (1 - \alpha) \quad (5.17)$$

Somit kann die Gleichung 5.15 durch den bekannten apparenten Quenchfaktor aus Gleichung 5.17 vereinfacht werden zu:

$$X_r = \alpha \cdot \zeta \cdot \frac{c_{L,acc}}{K_{D,L} + \Phi \cdot c_{L,acc}} \quad (5.18)$$

Die Messreihe in Abbildung 5.9 konnte mit Gleichung 5.18 angepasst werden, um so mit  $\Phi = 0,8$  Werte für das Produkt aus  $\alpha \cdot \zeta = Z$  und die Dissoziationskonstante  $K_{D,L}$

zu erhalten (Anpassung siehe Abbildung A.5). Durch Hinzuziehen von Gleichung 5.18 können  $\alpha$  und  $\zeta$  einzeln bestimmt werden (siehe Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3.: Angepasste und berechnete Werte aus Abbildung 5.9 mit Gleichung 5.18. Der apparente Quenchfaktor wurde vorher mit  $\Phi = 0,8$  bestimmt.

Parameter	angepasster Wert		weitere Parameter	berechnete Werte
$K_{D,L}$	66,4 $\mu\text{M}$		$\alpha$	0,58
$Z$	0,38		$\zeta$	0,66

Aus diesen Werten geht hervor, dass wahrscheinlich nur knapp 60% des eingesetzten Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 für eine Bindung an die Vesikel zur Verfügung standen, das übrige Protein blieb frei in der Lösung. Der Grund für diese partielle Bindungsunfähigkeit könnte eine Behinderung der amphipathischen Helix durch den Farbstoff sein. Obwohl bei der Markierung darauf geachtet wurde, dass der Farbstoff nicht in der Membranbinderegion an das Protein gebunden wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass er diese Region oder die Helix selbst beeinflusst. Ebenso könnte der Farbstoff die zum Binden an Membranen notwendige Konformationsänderung membranferner Proteinteile oder den Austausch des GDP mit GMP-PNP im aktiven Zentrum behindern. Auch wenn in der Ausgangslösung des Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 mittels FCS keine Aggregate, in Form von langsamen Diffusionszeiten, beobachtet werden konnten, kann ein Aggregieren eines Teils der Proteinmoleküle während der Inkubationszeit nicht ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung der Korrektur für nicht bindungsfähiges Protein ist der reale Quenchwert kleiner als der per Fluoreszenzspektrum bestimmte Wert. Es konnten nur etwa 66% der Helligkeit von freiem Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 nach der Bindung an die Vesikel noch detektiert werden. Zum Vergleich beider Titrationskurven wurde die Reihe mit steigender Proteinkonzentration ebenfalls mit diesem Wert korrigiert und angepasst. Die aus dieser Kurve ermittelten Werte sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

Im direkten Vergleich von Lipid- und Proteintitration kann festgestellt werden, dass die Parameter, die direkt aus der aufgetragenen und angepassten Kurve ermittelt werden können, nicht die gleichen Parameter sind. Aus der Titration von Sar1p zu einer konstanten Lipidkonzentration kann eine Dissoziationskonstante zu einem Bindungsplatz ( $k_D$ ) sowie eine maximale Anzahl Proteinmoleküle je Vesikel ( $\nu_{\max}$ ) ermittelt werden. Diese Anzahl spiegelt demnach auch die Anzahl Bindungsplätze pro Vesikel wider und sollte von der Vesikelgröße abhängen. Alle weiteren in Tabelle 5.2 dargestellten Werte können ausgehend von diesen angepassten Werten berechnet werden. Aus diesen Messungen kann keine Aussagen über den Anteil bindungsfähigen Proteins und über den realen Quenchfaktor getroffen werden.

Aus der Titration von Lipid zu einer geringen Konzentration Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 kann eine Dissoziationskonstante zu Lipid ( $K_{D,L}$ ), wie sie oft in der Literatur verwendet wird [140, 122, 141], ermittelt werden. Hierbei handelt es sich rechnerisch um das Produkt aus  $k_D$  und der Anzahl Lipide je Bindungsplatz ( $\Lambda$ ).

Des Weiteren konnten aus den Titrationsreihen von Vesikeln zu konstantem Protein bei Kenntnis eines apparenten Quenchfaktor ( $\Phi$ ) der reale Quenchfaktor ( $\zeta$ ) und die



Fraktion bindungsfähiges Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 ( $\alpha$ ) berechnet werden. Je nach Fragestellung kann es sinnvoll sein, die eine oder andere Titrationsvariante zu wählen. Sollten Affinitäten von Proteinen oder Peptiden in Abhängigkeit der Lipidzusammensetzung untersucht werden, ist die Titration von Vesikeln zu einer konstanten Menge Proteine die bessere Wahl, da neben dem geringeren Proteinverbrauch auch eine gesicherte Aussage über den Wert  $K_{D,L}$  getroffen werden kann. Dies lässt sich damit erklären, dass die Messwerte direkt gegen die eingesetzte Lipidkonzentration aufgetragen werden können. Bei der Titration von Protein zu konstantem Lipid hingegen geht die genaue Gesamtproteinkonzentration ( $c_{P,ges}$ ) in die Berechnung beider Achsen ein. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration ist je nach verwendeter Methode und Protein fehlerbehaftet. Bei der angewandten Methode, die Proteinkonzentration über das Absorptionsspektrum zu bestimmen, wurde der Fehler aufgrund des in der Proteinlösung vorhandenen GDP und der nicht perfekten Anpassungsfunktionen auf bis zu 10 % geschätzt.

Im Gegensatz zu früheren Proteinbindungsstudien mittels FCS [56] wurde in der vorliegenden Arbeit initial kein Bindungsmodell vorgegeben, die Auswertung der Messwerte geschah unabhängig. Das Langmuir-Modell von unabhängigen, Bindungsplätzen mit gleicher Affinität wurde erst beim Anpassen der Titrationskurven zur Bestimmung des  $K_D$  herangezogen.

In den vergangenen Jahren wurden von zwei Arbeitsgruppen Bindungsaffinitäten des Sar1 an Membranen mit verschiedenen Methoden bestimmt. Loftus *et al.* verwendeten die Titration von Sar1 zu auf Deckgläschen aufgebrachten Membranen um Bindungsaffinitäten Sar1 verschiedener Spezies (Hefe-Sar1p, humanes Sar1A und Sar1B) zu vergleichen. Dabei fanden sie durch Auswertung der Fluoreszenzintensitäten des an Sar1 gebundenen, nicht hydrolysierbaren fluoreszierenden GTP-Analogons Bodipy FL-GTP- $\gamma$ -S einen für alle untersuchten Sar1 gleichen  $k_D = 10,5 \mu\text{M}$  [143]. Dieser ist etwa vier Mal größer, die Affinitäten also geringer, als der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Wert von  $k_D \approx 2,3 \mu\text{M}$ . Dies kann darin begründet sein, dass Loftus und Mitarbeiter durch das Wegwaschen freien Proteins und Nukleotids eine Verschiebung des Gleichgewichts zu einer scheinbar verringerten Affinität verursachten [143], die sich in der Dissoziation des Proteins niederschlugen, wohingegen die Werte dieser Arbeit im Gleichgewicht gemessen wurden. Hinzu kommt, dass bei Loftus *et al.* die Bindung an einer auf einem Deckglas aufgebrachten Membran untersucht wurde [143], diese Membran weist keine Krümmung auf. In der vorliegenden Arbeit wird im Gegensatz dazu die Bindung an Liposomen mit hoher Krümmung untersucht. Hanna und Mitarbeiter konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Bindung von Sar1 von der Krümmung abhängt [105]. Bereits die Vergrößerung des Liposomendurchmessers von 105 nm auf 225 nm, und damit eine Verringerung der Krümmung, hat eine Verringerung der Affinität um das 2 - 4,6-fache zur Folge [105]. Diese Daten wurden mit Hilfe einer Lipidtitration ermittelt. Die verschiedenen  $K_{D,L}$  wurde nur als relative Größe im Vergleich zum  $K_{D,L}$  zu Vesikeln des kleinsten Durchmessers angegeben, nicht als absoluten Werte [105].

Die Größe  $K_{D,L}$  ist die in der Literatur am häufigsten verwendete Größe für die Quantifizierung der Protein-Lipid Interaktion und lässt sich deshalb gut einordnen.

Der Vergleich zu anderen amphipathischen membranbindenden Proteinen zeigt, dass der ermittelte Wert für die Bindung an SUV sich in einem für diese Art Protein bekannten

Rahmen bewegt. So wurde für die amphipathische Helix des N-BAR für die Bindung an anionische Lipide (POPS oder POPG) ein Wert von  $K_{D,L} \approx 24 \mu\text{M}$  bestimmt, der mit zunehmender Vesikelgröße geringfügig kleiner wird [144]. BAR-Domänen kommen als Teil verschiedener membranbindender Proteine vor, wie z.B. Amphiphysin, welches an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt ist. Die H0-Helix des N-BAR lagert sich, ähnlich der amphipathischen Helix des Sar1p, in die Membran ein. Ebenfalls eine  $\alpha$ -helikale Struktur bei Bindung an Lipiddoppelschichten bilden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein aus. Diese Proteine kommen in Neuronen, aber auch in Zellen der Skelettmuskulatur und der Leber vor [145, 146].

Für den  $K_{D,L}$  des  $\alpha$ -Synuclein wurde eine Abhängigkeit sowohl von der Art der Lipide als auch von der Größe der Vesikel gefunden. Zu Vesikeln mit einem Durchmesser von 93 nm bestehend aus POPS/POPC (1:1) betrug der  $K_{D,L} = 100 \mu\text{M}$ , zu kleineren Vesikeln konnte eine höhere Affinität (also ein kleinerer  $K_{D,L}$ ) nachgewiesen werden. Für die Lipidmischung POPA/POPC war die Dissoziationskonstante bei einer Vesikelgröße von 93 nm bereits deutlich kleiner ( $K_{D,L} = 1,6 \mu\text{M}$ ), damit die Affinität höher [140, 122]. Für  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein wurde die Bindungsaffinität in Abhängigkeit des Anteils POPS in POPC-Vesikeln untersucht. Bei 75 % POPS wurden dabei Werte in einem ähnlichen Bereich wie in dieser Arbeit für das Sar1p an Major-Minor-Mix Vesikel (ca. 20 % geladene Lipide) ermittelt (ca. 60  $\mu\text{M}$ ) [147]. Erste Untersuchungen mit reinen DOPC-Vesikeln weisen darauf hin, dass die Bindung von Sar1p an Membranen nicht von der Ladung der Vesikel abhängig ist (siehe Abbildung A.6). Es wurde in Proteintitrationsreihen ein  $k_D = 2,27 \mu\text{M}$  gefunden, der damit dem  $k_D$  für Major-Minor-Mix-Vesikel gleicht. Da die diskutierten Proteine an unterschiedliche Membranen binden, sind Unterschiede in der Affinität zu verschiedenen Lipiden oder verschieden stark geladenen Membranen biologisch sinnvoll. Bei Proteinen, die nur durch elektrostatische Interaktion mit Membranen interagieren wurde eine große Abhängigkeit von der Ladungsdichte auf der Membran deutlich. Rusu *et al.* fanden für das MARCKS-Peptid beispielsweise einen  $K_{D,L} = 0,1 \mu\text{M}$  bei 25 mol% POPS in einem POPC-Vesikel bei nur 10 mol% POPS betrug der  $K_D \approx 100 \mu\text{M}$ , die Affinität war also deutlich herabgesetzt. [55].

Soll eine Aussage über die Bindungsplatzdichte, bzw. den Platzbedarf je Protein getroffen werden, ist es unerlässlich, eine Titrationsreihe zu wählen, bei der ein Maximum an gebundenem Proteinen je Vesikel erreicht wird. Die so ermittelte Anzahl Lipide einer Membranschicht je Sar1p  $\Lambda_{\text{acc}} = 47$  ( $\Lambda_{\text{Bi}} = 94$  Lipide bezogen auf die Doppelschicht), unter Einbeziehen des realen Quenchfaktors ( $\zeta$ ), lässt sich mit Literaturwerten vergleichen. So gibt es für das bereits erwähnte  $\alpha$ -Synuclein, ein Protein aus 140 Aminosäuren [148], Angaben von 40 bis 85 Lipiden in der Doppelschicht unter Gleichgewichtsbedingungen, gemessen in der FCS [140, 122]. Für Sar1 oder dem sehr in Form, Größe und Funktion ähnlichen Arf1 gibt es bisher keine derartigen Untersuchungen. Aus der Kristallstruktur des Sar1p (pdb:1M2O) [18] kann eine maximale Fläche der vom Protein bedeckten Membran von  $A_{P,\text{theorie}} \approx 20 \text{ nm}^2$  abgeschätzt werden. Bei einer Kopfgruppenfläche der Lipide von  $A_L \approx 0,5 - 0,6 \text{ nm}^2$  [73, 149, 150] ergab sich ein Wert für die aus den Messungen ermittelte Fläche eines Bindungsplatzes ( $A_{P,\text{mess}} = \Lambda_{\text{acc}} \cdot A_L$ ) von  $A_{P,\text{mess}} = 23,5 - 28,2 \text{ nm}^2$ . Der Vergleich der theoretischen Fläche mit der aus den Messdaten ermittelten Fläche eines Proteins auf der Vesikeloberfläche ließ die Annah-

me zu, dass etwa 70 – 85 % der Membranoberfläche mit Sar1p bedeckt war, was für eine dichte Packung spricht. Aus der Kristallstruktur von Sec23p/Sec24p-Sar1p berechneten Bi und Kollegen eine Fläche von  $\approx 82 \text{ nm}^2$ , die dieser innere Proteinkomplex auf der Membran benötigt [18]. Dies würde bedeuten, dass bei den Messungen ohne weitere COPII-Proteine eine deutlich dichtere Packung der Sar1p-Moleküle vorlag, als es der Struktur des Sar1p mit Sec23p/Sec24p zufolge möglicherweise im gesamten COPII der Fall ist. Aus Kryo-Elektronenmikroskopie und -tomographieaufnahmen an tubulären Strukturen geht hervor, dass das humane Sar1B ein geordnetes Netz auf der Membranoberfläche bildet, in dem jedes Sar1-Molekül Kontakt zu vier weiteren Molekülen hat und der Eindruck einer Dimerbildung entsteht [53]. FRAP-Experimente von Loftus *et al.* zeigten, dass humanes Sar1A und Sar1B mit steigender Konzentration zu Dimerbildung neigen, was bei Hefe-Sar1p nicht der Fall zu sein scheint [143]. Aus weiteren hoch auflösenden TEM-Untersuchungen mit Sar1p-Sec23p/Sec24p ging hervor, dass der deutlich größere Sec23p/Sec24p-Komplex sich regelmäßig auf der Membranoberfläche anordnet und keinen Kontakt der Sar1p-Moleküle untereinander zulässt [21]. Zur Anordnung, besonders der inneren Proteinhülle auf Vesikeln, wurden bisher keine hochauflösenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen veröffentlicht. Lediglich die Struktur des leeren Sec13/Sec31-Käfigs ist aus Aufnahmen ohne Membran und Sar1 sowie ohne Sec23/Sec24 bekannt [151].

Die Stärke der hier gezeigten Methode besteht vor allem in dem Potenzial, dass zukünftig der Einfluss verschiedener Lipide oder anderer Membranbestandteile auf die Bindung des Sar1p an Membranen quantifiziert werden kann. Bei den gezeigten Titrationen wurde mit der von Matsuoka *et al.* etablierten Lipidmischung gearbeitet, die neben DOPC, DOPS, DOPA, DOPE aus verschiedenen Phosphoinositiden und zu einem Drittel (in mol%) aus Ergosterol besteht [13]. Ergosterol ist aufgrund seiner kleinen Kopfgruppe das einzige Lipid der Mischung, welches im Sekundenbereich zwischen den beiden Lipidschichten einer Membran wechseln kann (Flip-Flop) [152]. Dieser Umstand führte zu den Überlegungen, dass Ergosterol einen Einfluss auf die maximale Anzahl gebundener Proteine pro Vesikel haben könnte, da es im vorliegenden Fall der einzige Membranbestandteil ist, der die Einlagerung von Helices und eine damit verbundene Vergrößerung der äußeren Lipidschicht in der inneren Lipidschicht ausgleichen kann. Weiterhin werden Bindungen von Proteinen oft alleinig oder unterstützend durch elektrostatische Interaktionen zwischen anionischen Lipiden und kationischen Aminosäuren vermittelt [153, 154]. Aus Untersuchungen von Matsuoka und Mitarbeitern geht hervor, dass keines der im „Major-Minor-Mix“ eingesetzten Lipide einen besonderen Einfluss auf die Bindung von Sar1p hat [13]. Die komplexe Lipidmischung wurde für die Bindung der übrigen COPII-Proteine optimiert [13]. Erste Untersuchungen mit reinen DOPC-Vesikeln, zu denen Sar1p hinzu titriert wurde, legen nahe, dass es nur geringe Unterschiede sowohl in der Anzahl maximal gebundener Proteine je Vesikel, als auch in der Affinität des Proteins zu einem Bindungsplatz auf diesem Vesikel gibt (siehe Abbildung A.6). Das bestätigt die von Matsuoka und Kollegen gemachten Beobachtungen hinsichtlich des nicht vorhandenen Einflusses von Ergosterol und geladenen Lipiden auf das Sar1p [13]. Dies wiederum lässt die Vermutung zu, dass Sar1p nicht aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen an die Membran bindet, sondern ausschließlich hydrophobe Interaktionen der amphipathischen

Helix mit der Membran ausschlaggebend sind. An dieser Stelle wären weitere Untersuchungen hinsichtlich des Einflusses der Vesikelgröße auf die Bindungsaffinität interessant, wobei die FCS und dcFCCS hierbei an ihre Grenzen stößt, da die Vesikelgröße deutlich kleiner als das Detektionsvolumen sein muss (Radius des Teilchens  $R \leq 0,25 \cdot \omega_0$ ), um als punktförmiges Teilchen angenommen werden zu können [155]. Dies wäre im verwendeten Setup eine Vesikelgröße von 100 nm Durchmesser. Messdaten für größere Vesikel müssten zusätzlich korrigiert werden. Von Interesse wären weiterhin Untersuchungen, inwiefern integrale Membranproteine wie der GEF Sec12p oder Cargoproteine die Affinität des Sar1p zur Membran beeinflussen. Auch der Einfluss der löslichen Sec12p-Domäne (Sec12p- $\Delta$ C) sowie der äußeren COPII-Proteine auf  $K_{D,L}$  und  $\Lambda$  wären interessant.

## 5.5. Zusammenfassung zu den Messungen von Bindungsparametern mit Hilfe der dcFCCS

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die dcFCCS eine geeignete Methode ist um Dissoziationskonstanten für die Bindung von Proteinen an Vesikel zu bestimmen. Die Möglichkeit mit sehr geringem Proteineinsatz in kurzer Zeit Bindungsaffinitäten zu ermitteln macht die Methode sehr praktikabel. Ein Vorteil der dcFCCS im Vergleich zur FCS, wie bisher für Bindungsstudien beschrieben [55, 140, 56, 141], liegt in der Verwendung einer zweiten Anregungswellenlänge um den Interaktionspartner des Proteins, die Vesikel, sichtbar zu machen und weitere Informationen zu erhalten. Wie gezeigt werden konnte, kann eine bei Bindung veränderte Helligkeit des Farbstoffes am Protein (Quenchen) in die Berechnung einbezogen werden, so dass dies keine Einschränkung mehr darstellt. Die bisher gezeigten Berechnungen basieren ausschließlich auf der roten Autokorrelations- und der Kreuzkorrelationsamplitude, unter Hinzunahme der Informationen der grünen Autokorrelation können möglicherweise noch weitere Informationen erhalten werden. Einschränkungen wie bereits zu Beginn genannt, bezüglich der monodispersen Verteilung der Liposomengröße und der langsamen Dissoziation des Proteins vom Vesikel müssen weiterhin getroffen werden. Die Untersuchung von Proteinen-Lipid-Interaktionen mit  $K_{D,L} > 1$  mM ist nach jetzigem Stand auch mit der dcFCCS nicht zu bestimmen. Hinzu kommt, dass bei einer Lipidkonzentration  $c_L > 2$  mM möglicherweise zu viele Vesikel im Fokus sind, so dass diese sich gegenseitig und auch die freien Proteinmoleküle in ihrer Diffusion stören. Es konnte beobachtet werden, dass mit steigender Lipidkonzentration die Fraktion gebundenes Protein wieder abnimmt. Um diesem Effekt zu begegnen könnte die von Wennmalm und Kollegen entwickelte Theorie der inversen FCS hilfreich sein, wobei die Teilchen im Fokus nicht mehr als punktförmig angenommen werden, sondern deren Volumen in einem Korrekturfaktor berücksichtigt wird [156].

Mit der hier vorgestellten Methode der Quantifizierung ist es nun möglich den Einfluss verschiedener Parameter auf die Bindungsaffinität des Sar1 zu kleinen Vesikeln zu untersuchen. Von großem Interesse wäre dabei, neben der Auswirkung verschiedener Lipide auf die Bindung, besonders auch der Einfluss von direkt mit dem Sar1 interagierenden Proteinen wie Sec12 oder Sec23/Sec24, sowie indirekt interagierende Proteine wie Cargoproteine oder auch Sec13/Sec31. Auch die Untersuchung verschiedener aktivierender

Nukleotide könnte interessant sein. Unabhängig vom Sar1 ist die dcFCCS als Methode zur Bestimmung von Bindungskonstanten überall da interessant, wo eine Bindung an stark gekrümmte Membranen untersucht werden soll. Da auch bei diesen Messungen auf mechanische Manipulationen verzichtet werden kann und die Messung im Gleichgewicht stattfindet, können dadurch entstehende Effekte ausgeschlossen werden.

## 6. Zusammenfassende Diskussion

In Kapitel 4 konnte festgestellt werden, dass nach Inkubation der GUV mit verschiedenen Sar1p-Varianten Sar1p nach Aktivierung durch die Bindung von GTP in der Lage ist, Membranen zu deformieren und eine hohe Krümmung zu erzeugen. Diese Fähigkeit ist unabhängig von anderen COPII-Proteinen oder transmembranen Frachtproteinen und sie ist ebenfalls unabhängig von der Hydrolyse des GTP. Hinsichtlich der bekannten niedrigen basalen GTPase-Aktivität des Sar1p bestätigt dieses Ergebnis frühere Untersuchungen [22, 102]. Die Beobachtung zweier unterschiedlicher tubulärer Strukturen nach Inkubation von Major-Minor-Mix-Vesikeln mit Sar1p in Anwesenheit von GTP lässt unterschiedliche Anordnungen der Proteine untereinander auf den Tubuli vermuten. Eine Disassemblierung von Sar1p von sich unter Lichteinstrahlung zusammenziehenden Tubuli konnte nicht nachgewiesen werden, ist aber eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen. In FCS-Messungen über mehrere Stunden konnte keine Verminderung des Bindungsgrades über die Zeit festgestellt werden (Abbildung 5.6). Allerdings wurden diese Untersuchungen zum Ermitteln der Bindungsparameter mit GMP-PNP durchgeführt. Mit diesem nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen und Sar1p ohne COPII konnten bisher in der Fluoreszenzmikroskopie weder steife Membranschläuche noch deren Zusammenziehen beobachtet werden (Abschnitt 4.3.1). Möglicherweise verhindert das GMP-PNP durch einen leicht anderen Einbau in das aktive Zentrum des Sar1p eine engere Packung der Proteinmoleküle, welches vermutlich für die Ausbildung steifer Strukturen notwendig wäre.

Die Rekrutierung der weiteren COPII-Proteine (Sec23p/Sec24p und Sec13p/Sec3p1) geschieht sowohl mit GTP als auch mit GMP-PNP. Hier wird deutlich, dass es ohne Hydrolyse zur Ausbildung von tubulären Strukturen, nicht aber von abgeschnürten Vesikeln kommt (Abbildung 4.8 und 4.10). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Hydrolyse von GTP durch das Sar1p und das damit verbundene Herausziehen der Helix aus der Membran notwendig ist, um ein Abschnüren zu erreichen. Auch Trahey und Hey stellten in ihrem Review fest, dass sich die Hinweise mehren, dass die GTPase-Aktivität des Sar1 weniger für die Disassemblierung der COPII-Hülle verantwortlich ist. Vielmehr scheint sie die Frachtsortierung [157, 36] und Vesikelabschnürung [101] zur Aufgabe zu haben [158]. So konnten in der vorliegenden Arbeit, ebenso wie auch von Hanna *et al.* in AFM-Messungen gezeigt [105], frühere *in vivo* Studien, auch *in vitro* bestätigt werden. Diese zeigten, dass durch nicht-hydrolysierbares GTP-Analoga bzw. eine nicht-hydrolysierende Sar1p-Variante (Sar1p-H77L) der letzte Schritt der Vesikelabschnürung von der ER-Membran unterdrückt wurde [101]. Die in bisherigen *in vitro* Untersuchungen gefundene Abschnürung kleiner COPII umhüllter Vesikel nach Inkubation unter nicht-hydrolysierenden Bedingungen [51] kann damit wahrscheinlich der Präparationsmethode, allen voran der Zentrifugation, zugeschrieben werden. Dies zeigt, wie entscheidend die

Behandlung der Proben Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben kann und dass es besonders bei Abschnürungsversuchen wichtig ist, auf mechanische Manipulation zu verzichten.

## 7. Zusammenfassung

Die intrazelluläre Kompartimentierung eukaryotischer Zellen ermöglicht die Aufteilung jeder einzelnen Zelle in verschiedene Reaktionsräume. Der Protein- und Stoffaustausch zwischen diesen Kompartimenten wird durch Transportvesikel gesteuert. Diese Vesikel werden mit Hilfe von Hüllproteinkomplexen von der Donormembran abgeschnürt und durch die Zelle transportiert. Für den ersten Schritt des sekretorischen Pfades vom ER zum Golgi-Apparat wird dieser Transport durch die Proteine des COPII vermittelt. Die Hauptkomponenten dieses Komplexes sind neben der kleinen GTPase Sar1, Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31. Der Austausch von GDP zu GTP am Sar1 bewirkt ein Rekrutieren des gesamten Komplexes an die Membran. Bisher ist die Rolle der Hydrolyse des GTP durch Sar1 bei der Abschnürung der Transportvesikel noch unklar. Auch über die quantitativen Bindungsparameter des Sar1 wurden kaum Untersuchungen durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ohne die Hydrolyse des GTP durch das Sar1p keine Abschnürung kleiner Vesikel aus GUV stattfinden konnte. Stattdessen zeigten sich lange tubuläre Strukturen. Dabei war es nicht entscheidend, ob die Hydrolyse durch das Fehlen des GAP in Ansätzen ohne die innere und äußere Hülle von Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 unterbunden wurde, oder ob bei vollständigem COPII die Hydrolyse durch GMP-PNP oder durch nicht hydrolysierende Proteinvarianten unterdrückt wurde. Es wird ebenfalls deutlich, dass trotz der beugungsbegrenzten Auflösung des konfokalen Mikroskops qualitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Proteinansätzen festgestellt werden konnten, die sich auch in der besseren Auflösung der Elektronenmikroskopie zeigten. Damit ist der GUV-Tubulierungsansatz geeignet um qualitativ Aussagen über die Wirkung des COPII auf Membranen zu treffen. Diese Methode ist nützlich, um Proben für die deutlich aufwendigere Elektronenmikroskopie zu screenen. Ebenso kann die Elektronenmikroskopie dazu dienen, Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie zu stützen.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit konnte mit Hilfe des dcFCCS gestützten Bindungstests eine Dissoziationskonstante für Sar1p an kleinen Vesikeln in Anwesenheit von GMP-PNP ermittelt werden, welche mit den Dissoziationskonstanten ähnlicher, über eine AH an Membranen bindende Proteine vergleichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass die dcFCCS gut für derartige Untersuchungen geeignet ist und mögliche probenbedingte Störgrößen berücksichtigt werden können. Die hier dargestellten Ergebnisse ermöglichen es in weiteren Untersuchungen den Einfluss von Lipidzusammensetzung, löslichen oder membranverankerten Proteinen und auch Nukleotiden auf die Dissoziationskonstante zu ermitteln. Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass die Fluoreszenzmikroskopie und Fluoreszenzspektroskopie als wenig invasive Methoden gut geeignet sind, um periphere Membranproteine zu untersuchen.



## 8. Summary

The intracellular compartmentalization of eucaryotic cells enables the cell to divide their internal space into different reaction chambers. The exchange of proteins and other substances between these compartments is regulated by transport vesicles. The fission from the donor membrane and the transport through the cell is mediated by coat protein complexes. For the first step of the secretory pathway from the ER to the Golgi apparatus, the transport is realized by the proteins of the COPII. The main components of this complex are the small GTPase Sar1, the Sec23/Sec24 hetero dimer and the Sec13/Sec31 tetramer. The exchange of GDP to GTP at the Sar1 effects the recruitment of the whole complex to the membrane. Up to now, only little is known about the role of the hydrolysis of GTP by Sar1 in the context of the fission of transport vesicles. Only very limited data is available on quantitative binding parameter of Sar1.

In this work it was shown that without the hydrolysis of GTP by Sar1 no fission of small vesicles occurs from GUVs. Long tubular structures appear instead. For this outcome it was not crucial if hydrolysis was prevented by the absence of the GAP (Sec23) in experiments without the inner and outer coat of Sec23/Sec24 and Sec13/Sec31 or if hydrolysis was inhibited by the use of GMP-PNP or non-hydrolyzing variants of the proteins when using the whole COPII. Another result of this work shows that the qualitative differences between the different preparations were analyzed with confocal microscopy, and were also found in the electron microscopy. With this, the GUV-Tubulation-Assay is an appropriate tool to investigate the effect of the COPII on membranes in a qualitative manner. This method is useful to screen samples for investigation by the costly method of electron microscopy. On the other hand it is possible to use the electron microscopy to support results obtained from confocal microscopy.

In a second part of the work, with a dcFCCS based binding assay it was possible to determine a dissociation constant for Sar1 to small vesicles in the presence of GMP-PNP. The calculated dissociation constant is comparable with constants of other membrane binding proteins, which insert an AH into the membrane. It was shown that dcFCCS is a suitable method for such investigations, because potential sample dependent disturbances can be considered.

The results shown in this work offer the possibility for further research to investigate the influence of lipid mixture, additional and membrane anchored proteins and different nucleotides on the dissociation constant. As a conclusion, this work shows that the fluorescence microscopy and fluorescence spectroscopy as minimally invasive methods are suitable to analyze peripheral membrane proteins.

# A. Anhang

## A.1. Fluoreszenzmikroskopie

zu 4.3.1

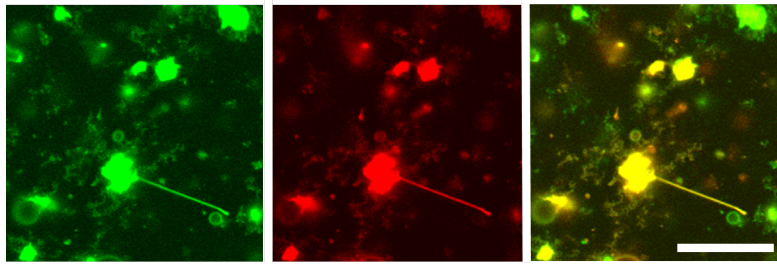


Abbildung A.1.: Sar1p-Alexa Fluor<sup>®</sup>488 bildet weiche und steife Tubuli. In grün (links) ist das Protein zu sehen, es lagert sich an alle Membranen an und ist sowohl an den weichen als auch den starren Tubuli zu sehen. In rot (Mitte) ist die Lipidmembran dargestellt. Das zusammengefasste Bild (rechts) zeigt die perfekte Überlagerungen beider Kanäle. Maßbalken 20  $\mu\text{m}$ ,  $\gamma = 0,45$ .

## A.2. dcFCCS

### A.2.1. Abbildungen zu 5.4.1

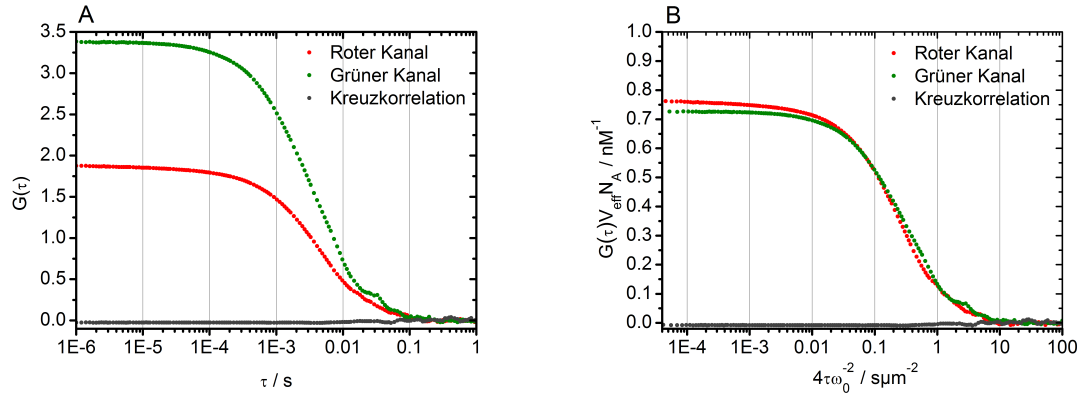


Abbildung A.2.: **Negativkontrolle für perfekte Kreuzkorrelation.** Messung einer Mischung einfach gefärbter Lipidvesikel, die entweder DiD C<sub>18</sub> als roten oder Bodipy®FL C<sub>12</sub> als grünen Farbstoff enthalten, im Verhältnis 1:1. (A) Darstellung der Korrelationskurven gegen die Zeit ( $\tau$ ). (B) Darstellung der volumennormierten Korrelationskurven.

### A.2.2. Abbildungen zu 5.4.3

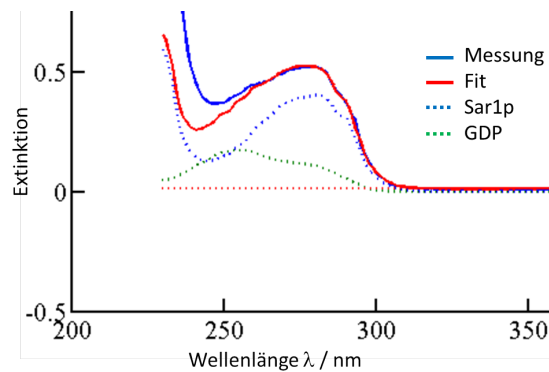


Abbildung A.3.: **Absorptionsspektrum von Sar1p-GDP in TCB-Puffer.** Das gemessene Spektrum von Sar1p, an dem GDP gebunden ist (blau, durchgezogen) wurde mit einer Kombination aus einem GDP-Spektrum und einem Spektrum aller im Sar1p absorbierenden Aminosäuren angefitet (rot, durchgezogen). Aus diesem Fit konnte die Konzentration für Sar1p ( $c_{\text{Sar1}} = 10,8 \mu\text{M}$ ) und für GDP ( $c_{\text{GDP}} = 15,6 \mu\text{M}$ ) entnommen werden (diese Bestimmung der Sar1p-Konzentration wurde von Jan Ebenhan und Kathleen Helmstedt eingeführt).

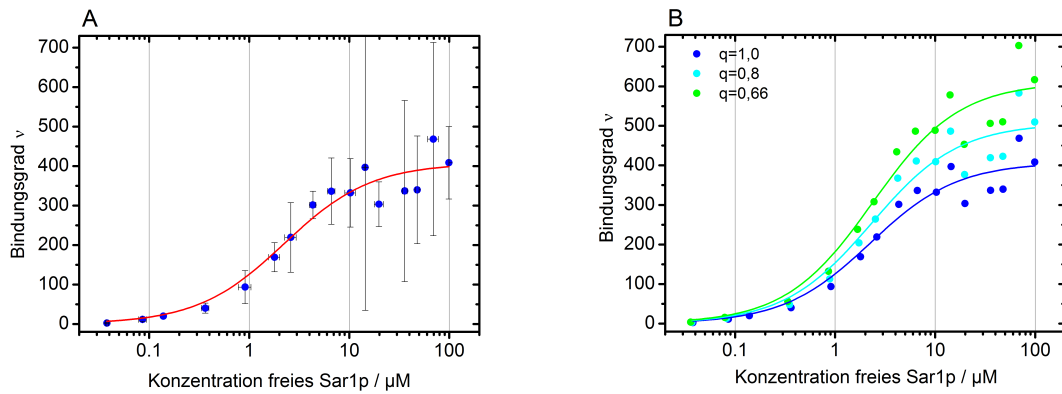


Abbildung A.4.: **Proteintitration zur Bestimmung des maximalen Bindungsgrades  $n$  und der Dissoziationskonstanten  $K_D$  für die kleine GTPase Sar1p im nicht-hydrolysierbaren GTP-Zustand an Vesikel aus Major-Minor-Mix.** Gemessen nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in HKM-Puffer. (A) Auftragung der gemittelten Werte über alle Messungen mit Standardabweichung für beide Achsen sowie Anpassungskurve (rot) (B) Vergleich der Titrationsreihen ohne Berücksichtigung des Quenchens und mit Berücksichtigung verschiedener Werte für den Quenchfaktor. Die Punkte spiegeln den Mittelwert aus 5 unabhängigen Messreihen für die verschiedenen Werte für  $q$  wider, auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde aus Gründen der besseren Übersicht verzichtet. Die durchgezogenen Linien sind Anpassungskurven für jede Messreihe, aus denen sich die Werte für  $K_D$  und  $n$  ergeben. Diese Werte sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

### A.2.3. Abbildungen zu 5.4.3

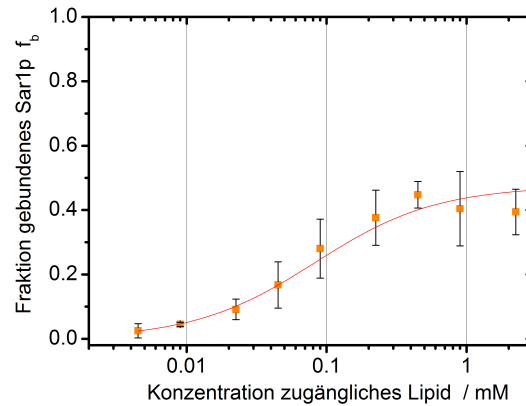


Abbildung A.5.: **Titration von Lipid in Form von Vesikeln zu einer konstanten Konzentration Sar1p-Alexa Fluor® 488 mit Anpassungskurve.** Vergleiche Abbildung 5.9 Darstellung der apparenten Fraktion ( $X_r$ ) in Abhängigkeit von der für das Protein zugänglichen Lipidkonzentration ( $c_{L,acc}$ ). Gemessen wurden Proben aus Major-Minor-Mix-Vesikeln mit 21 nM Sar1p-Alexa Fluor® 488 mit GMP-PNP in HKM-Puffer nach zweistündiger Inkubation. Die für die Darstellung verwendeten Korrelationsamplituden wurden für das Übersprechen, die Größe der Detektionsvolumina und die Farbstoffverteilung auf den Vesikeln korrigiert. Es wurden Werte von drei unabhängigen Messreihen gemittelt, die schwarzen Balken repräsentieren die Standardabweichung.

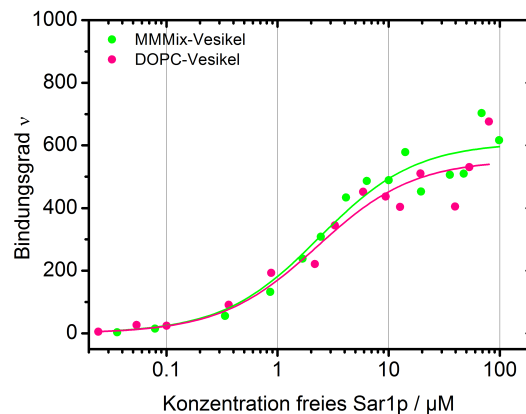


Abbildung A.6.: **Vergleich der Titration von Sar1p zu Major-Minor-Mix-Vesikeln mit der Titration zu DOPC-Vesikeln.** Darstellung der Daten aus Abbildung A.4 B (grün) im Vergleich zur Titration zu DOPC-Vesikeln (pink). Beide Messreihen wurden um den realen QuenCHFaktor von 0,66 korrigiert. Bei den durchgezogenen Linien handelt es sich um die Anpassungskurven. Für die Messreihe mit DOPC ergeben sich die Werte  $n = 555$  Sar1p je Vesikel und  $k_D = 2,27 \mu\text{M}$ , im Vergleich dazu für Major-Minor-Mix:  $n = 610$  und  $k_D = 2,36 \mu\text{M}$

#### A.2.4. Herleitung der Gleichung auf Seite 103

$$G_x^* = \frac{c_V \cdot \nu \cdot \zeta \cdot \lambda}{(c_V \cdot \lambda) \cdot (c_V \cdot \nu \cdot \zeta + c_{P,\text{free}} + (1 - \alpha) \cdot c_{P,\text{ges}})} \quad (\text{A.1})$$

wobei  $c_V$  die Vesikelkonzentration,  $\nu$  die mittlere Anzahl grüner Fluorophore je Vesikel bzw. der in Abschnitt 3.4 eingeführten Bindungsgrad  $\nu$  beschreibt.  $\lambda$  bezeichnet die mittlere Anzahl roter Fluorophore je Vesikel,  $\zeta$  den realen Quenchfaktor und  $\alpha$  die Fraktion bindungsfähiges Protein. Dabei ist  $(c_V \cdot \nu \cdot \zeta) = c_{P,b}$  und  $((1 - \alpha) \cdot c_{P,\text{ges}}) =$  nicht bindungsfähiges Protein.

Mit  $G_r^\ddagger = c_V^{-1}$  aus Gleichung 3.43 wobei  $c_{\text{ges}} = c_V$  ergibt sich mit Gleichung A.1 für  $X_r$ :

$$X_r = \frac{G_x^*}{G_r^\ddagger} = \frac{\nu \cdot \zeta \cdot c_V}{(c_V \cdot \nu \cdot \zeta + c_{P,\text{free}} + (1 - \alpha) \cdot c_{P,\text{ges}})} \quad (\text{A.2})$$

Die Gleichung 3.59 für den Bindungsgrad kann auch geschrieben werden als:

$$\nu = n \cdot \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D} \cdot \frac{1}{1 + \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D}} \quad (\text{A.3})$$

Für den Fall, dass nur wenig Protein vorhanden ist, das freie Protein weit unter dem  $k_D$  ist ( $\frac{c_{P,\text{free}}}{k_D} \ll 1$ ) ist die Näherung möglich:

$$\nu = n \cdot \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D} \quad (\text{A.4})$$

Aus der Massenerhaltung ergibt sich das Gesamtprotein als Summe aus gebundenem, freiem und nicht bindungsfähigem Protein:

$$\nu \cdot c_V + c_{P,\text{free}} + (1 - \alpha) \cdot c_{P,\text{ges}} = c_{P,\text{ges}} \quad (\text{A.5})$$

Für  $\nu$  kann die Näherung aus Gleichung A.4 in Gleichung A.5 eingesetzt werden. Das Auflösen nach  $c_{P,\text{free}}$  ergibt:

$$c_{P,\text{free}} = \frac{\alpha \cdot c_{P,\text{ges}} \cdot k_D}{k_D + n \cdot c_V} \quad (\text{A.6})$$

Wird Gleichung A.4 in Gleichung A.2 eingesetzt, dies geschrieben werden als:

$$X_r = \frac{n \cdot \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D} \cdot \zeta \cdot c_V}{n \cdot \frac{c_{P,\text{free}}}{k_D} \cdot \zeta \cdot c_V + c_{P,\text{free}} + (1 - \alpha) \cdot c_{P,\text{ges}}} \quad (\text{A.7})$$

$c_{P,\text{free}}$  kann durch Gleichung A.6 ersetzt werden. Nach Umformung ergibt sich:

$$X_r = \frac{n \cdot \zeta \cdot \alpha \cdot c_V}{k_D + n \cdot c_V \cdot (1 - \alpha + \alpha \cdot \zeta)} \quad (\text{A.8})$$

# Literaturverzeichnis

- [1] Kirsten Bacia, Eugene Futai, Simone Prinz, Annette Meister, Sebastian Daum, Daniela Glatte, John A G. Briggs, and Randy Schekman. *Multibudded tubules formed by copii on artificial liposomes*. *Sci Rep*, 1:17, 2011.
- [2] Matthias Schulz, Daniela Glatte, Annette Meister, Peggy Scholtyssek, Andreas Kerth, Alfred Blume, Kirsten Bacia, and Wolfgang H. Binder. *Hybrid lipid/polymer giant unilamellar vesicles: effects of incorporated biocompatible pib-peo block copolymers on vesicle properties*. *Soft Matter*, 7:8100–8110, 2011.
- [3] Sebastian Daum, Daniela Krüger, Annette Meister, Jan Auerswald, Simone Prinz, John A G. Briggs, and Kirsten Bacia. *Insights from reconstitution reactions of copii vesicle formation using pure components and low mechanical perturbation*. *Biol Chem*, 395(7-8):801–812, Jul 2014.
- [4] Daniela Kruger, Jan Ebenhan, and Kirsten Bacia. *Measuring protein binding to lipid vesicles by fluorescence cross-correlation spectroscopy*. *bioRxiv*, page 146464, 2017.
- [5] Marcus C S Lee, Elizabeth A Miller, Jonathan Goldberg, Lelio Orci, and Randy Schekman. *Bi-directional protein transport between the er and golgi*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20:87–123, 2004.
- [6] Bruce Alberts, Alexander Johnson, John Wilson, and Tim Hunt. *Molecular Biology of the cell, volume 5*. Garland Science, 2008. Kapitel 12 und 13.
- [7] G. Palade. *Intracellular aspects of the process of protein synthesis*. *Science*, 189(4206):867, Sep 1975.
- [8] L. Orci, M. Ravazzola, P. Meda, C. Holcomb, H. P. Moore, L. Hicke, and R. Schekman. *Mammalian sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(19):8611–8615, Oct 1991.
- [9] O. Kuge, C. Dascher, L. Orci, T. Rowe, M. Amherdt, H. Plutner, M. Ravazzola, G. Tanigawa, J. E. Rothman, and W. E. Balch. *Sar1 promotes vesicle budding from the endoplasmic reticulum but not golgi compartments*. *J Cell Biol*, 125(1):51–65, Apr 1994.
- [10] D. A. Shaywitz, L. Orci, M. Ravazzola, A. Swaroop, and C. A. Kaiser. *Human sec13rp functions in yeast and is located on transport vesicles budding from the endoplasmic reticulum*. *J Cell Biol*, 128(5):769–777, Mar 1995.

- [11] B. L. Tang, F. Peter, J. Krijnse-Locker, S. H. Low, G. Griffiths, and W. Hong. *The mammalian homolog of yeast sec13p is enriched in the intermediate compartment and is essential for protein transport from the endoplasmic reticulum to the golgi apparatus.* Mol Cell Biol, 17(1):256–266, Jan 1997.
- [12] B. Antonny and R. Schekman. *Er export: public transportation by the copii coach.* Curr Opin Cell Biol, 13(4):438–443, Aug 2001.
- [13] K. Matsuoka, L. Orci, M. Amherdt, S. Y. Bednarek, S. Hamamoto, R. Schekman, and T. Yeung. *Copii-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes.* Cell, 93(2):263–275, Apr 1998.
- [14] M. Aridor, J. Weissman, S. Bannykh, C. Nuoffer, and W. E. Balch. *Cargo selection by the copii budding machinery during export from the er.* J Cell Biol, 141(1):61–70, Apr 1998.
- [15] Charles Barlowe. *Signals for copii-dependent export from the er: what’s the ticket out?* Trends Cell Biol, 13(6):295–300, Jun 2003.
- [16] Marcus C S Lee, Lelio Orci, Susan Hamamoto, Eugene Futai, Mariella Ravazzola, and Randy Schekman. *Sar1p n-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a copii vesicle.* Cell, 122(4):605–617, Aug 2005.
- [17] W. L. DeLano. *The pymol molecular graphics system.*, 2002.
- [18] Xiping Bi, Richard A Corpina, and Jonathan Goldberg. *Structure of the sec23/24-sar1 pre-budding complex of the copii vesicle coat.* Nature, 419(6904):271–277, Sep 2002.
- [19] K. Matsuoka, R. Schekman, L. Orci, and J. E. Heuser. *Surface structure of the copii-coated vesicle.* Proc Natl Acad Sci U S A, 98(24):13705–13709, Nov 2001.
- [20] Xiping Bi, Joseph D Mancias, and Jonathan Goldberg. *Insights into copii coat nucleation from the structure of sec23.sar1 complexed with the active fragment of sec31.* Dev Cell, 13(5):635–645, Nov 2007.
- [21] Giulia Zanetti, Simone Prinz, Sebastian Daum, Annette Meister, Randy Schekman, Kirsten Bacia, and John A G. Briggs. *The structure of the copii transport-vesicle coat assembled on membranes.* Elife, 2:e00951, 2013.
- [22] C. Barlowe, C. d’Enfert, and R. Schekman. *Purification and characterization of sar1p, a small gtp-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum.* J Biol Chem, 268(2):873–879, Jan 1993.
- [23] B. Antonny, D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman. *Dynamics of the copii coat with gtp and stable analogues.* Nat Cell Biol, 3(6):531–537, Jun 2001.



- [24] Christopher Lord, Deepali Bhandari, Shekar Menon, Majid Ghassemian, Deborah Nycz, Jesse Hay, Pradipta Ghosh, and Susan Ferro-Novick. *Sequential interactions with sec23 control the direction of vesicle traffic*. *Nature*, 473(7346):181–186, May 2011.
- [25] C. Barlowe and R. Schekman. *Sec12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the er*. *Nature*, 365(6444):347–349, Sep 1993.
- [26] C. Barlowe and R. Schekman. *Expression, purification, and assay of sec12p: a sar1p-specific gdp dissociation stimulator*. *Methods Enzymol*, 257:98–106, 1995.
- [27] T. Yoshihisa, C. Barlowe, and R. Schekman. *Requirement for a gtpase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum*. *Science*, 259(5100):1466–1468, Mar 1993.
- [28] M. Sato, K. Sato, and A. Nakano. *Endoplasmic reticulum localization of sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain*. *J Cell Biol*, 134(2):279–293, Jul 1996.
- [29] Eugene Futai, Susan Hamamoto, Lelio Orci, and Randy Schekman. *Gtp/gdp exchange by sec12p enables copii vesicle bud formation on synthetic liposomes*. *EMBO J*, 23(21):4146–4155, Oct 2004.
- [30] S. I. Bannykh and W. E. Balch. *Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and golgi compartments*. *Histochem Cell Biol*, 109(5-6):463–475, 1998.
- [31] Charles Barlowe. *Molecular recognition of cargo by the copii complex: a most accommodating coat*. *Cell*, 114(4):395–397, Aug 2003.
- [32] Elizabeth Miller, Bruno Antonny, Susan Hamamoto, and Randy Schekman. *Cargo selection into copii vesicles is driven by the sec24p subunit*. *EMBO J*, 21(22):6105–6113, Nov 2002.
- [33] Elizabeth A. Miller, Traude H. Beilharz, Per N. Malkus, Marcus C S. Lee, Susan Hamamoto, Lelio Orci, and Randy Schekman. *Multiple cargo binding sites on the copii subunit sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles*. *Cell*, 114(4):497–509, Aug 2003.
- [34] Elena Mossessova, Lincoln C Bickford, and Jonathan Goldberg. *Snare selectivity of the copii coat*. *Cell*, 114(4):483–495, Aug 2003.
- [35] Ken Sato and Akihiko Nakano. *Dissection of copii subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during sar1p-gtp hydrolysis*. *Nat Struct Mol Biol*, 12(2):167–174, Feb 2005.

- [36] Rebecca Forster, Matthias Weiss, Timo Zimmermann, Emmanuel G Reynaud, Fatima Verissimo, David J Stephens, and Rainer Pepperkok. *Secretory cargo regulates the turnover of copii subunits at single er exit sites.* *Curr Biol*, 16(2):173–179, Jan 2006.
- [37] Peter Watson, Anna K. Townley, Pratyusha Koka, Krysten J. Palmer, and David J. Stephens. *Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells.* *Traffic*, 7(12):1678–1687, Dec 2006.
- [38] R. E. Gimeno, P. Espenshade, and C. A. Kaiser. *Copii coat subunit interactions: Sec24p and sec23p bind to adjacent regions of sec16p.* *Mol Biol Cell*, 7(11):1815–1823, Nov 1996.
- [39] Frantisek Supek, David T. Madden, Susan Hamamoto, Lelio Orci, and Randy Schekman. *Sec16p potentiates the action of copii proteins to bud transport vesicles.* *J Cell Biol*, 158(6):1029–1038, Sep 2002.
- [40] Elizabeth A. Miller and Charles Barlowe. *Regulation of coat assembly–sorting things out at the er.* *Curr Opin Cell Biol*, 22(4):447–453, Aug 2010.
- [41] James R R. Whittle and Thomas U. Schwartz. *Structure of the sec13–sec16 edge element, a template for assembly of the copii vesicle coat.* *J Cell Biol*, 190(3):347–361, Aug 2010.
- [42] Tomohiro Yorimitsu and Ken Sato. *Insights into structural and regulatory roles of sec16 in copii vesicle formation at er exit sites.* *Mol Biol Cell*, 23(15):2930–2942, Aug 2012.
- [43] Elisabeth A. Montegna, Madhura Bhave, Yang Liu, Dibyendu Bhattacharyya, and Benjamin S. Glick. *Sec12 binds to sec16 at transitional er sites.* *PLoS One*, 7(2):e31156, 2012.
- [44] Leslie F. Kung, Silvere Pagant, Eugene Futai, Jennifer G. D’Arcangelo, Roy Buchanan, John C. Dittmar, Robert J D. Reid, Rodney Rothstein, Susan Hamamoto, Erik L. Snapp, Randy Schekman, and Elizabeth A. Miller. *Sec24p and sec16p cooperate to regulate the gtp cycle of the copii coat.* *EMBO J*, 31(4):1014–1027, Feb 2012.
- [45] Simeon A. Boyadjiev, J Christopher Fromme, Jin Ben, Samuel S. Chong, Christopher Nauta, David J. Hur, George Zhang, Susan Hamamoto, Randy Schekman, Mariella Ravazzola, Lelio Orci, and Wafaa Eyaid. *Cranio-lenticulo-sutural dysplasia is caused by a sec23a mutation leading to abnormal endoplasmic-reticulum-to-golgi trafficking.* *Nat Genet*, 38(10):1192–1197, Oct 2006.
- [46] Jiayi Tao, Min Zhu, He Wang, Solomon Afelik, Matthew P. Vasievich, Xiao-Wei Chen, Guojing Zhu, Jan Jensen, David Ginsburg, and Bin Zhang. *Sec23b is required for the maintenance of murine professional secretory tissues.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(29):E2001–E2009, Jul 2012.

- [47] Min Zhu, Jiayi Tao, Matthew P. Vasievich, Wei Wei, Guojing Zhu, Rami N. Khoriaty, and Bin Zhang. *Neural tube opening and abnormal extraembryonic membrane development in sec23a deficient mice*. *Sci Rep*, 5:15471, 2015.
- [48] Kazuo Kurokawa, Michiyo Okamoto, and Akihiko Nakano. *Contact of cis-golgi with er exit sites executes cargo capture and delivery from the er*. *Nat Commun*, 5:3653, 2014.
- [49] Frank Adolf, Alexia Herrmann, Andrea Hellwig, Rainer Beck, Britta Brügger, and Felix T. Wieland. *Scission of copi and copii vesicles is independent of gtp hydrolysis*. *Traffic*, 14(8):922–932, Aug 2013.
- [50] Allen P. Liu and Daniel A. Fletcher. *Biology under construction: in vitro reconstitution of cellular function*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(9):644–650, Sep 2009.
- [51] C. Barlowe, L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman. *Copii: a membrane coat formed by sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum*. *Cell*, 77(6):895–907, Jun 1994.
- [52] Bruno Antonny, Pierre Gounon, Randy Schekman, and Lelio Orci. *Self-assembly of minimal copii cages*. *EMBO Rep*, 4(4):419–424, Apr 2003.
- [53] Hanaa Hariri, Nilakshee Bhattacharya, Kerri Johnson, Alex J. Noble, and Scott M. Stagg. *Insights into the mechanisms of membrane curvature and vesicle scission by the small gtpase sar1 in the early secretory pathway*. *J Mol Biol*, 426(22):3811–3826, Nov 2014.
- [54] Kimberly R Long, Yasunori Yamamoto, Adam L Baker, Simon C Watkins, Carolyn B Coyne, James F Conway, and Meir Aridor. *Sar1 assembly regulates membrane constriction and er export*. *J Cell Biol*, 190(1):115–128, Jul 2010.
- [55] Laura Rusu, Alok Gambhir, Stuart McLaughlin, and Joachim Rädler. *Fluorescence correlation spectroscopy studies of peptide and protein binding to phospholipid vesicles*. *Biophys J*, 87(2):1044–1053, Aug 2004.
- [56] Ana M Melo, Manuel Prieto, and Ana Coutinho. *The effect of variable liposome brightness on quantifying lipid-protein interactions using fluorescence correlation spectroscopy*. *Biochim Biophys Acta*, 1808(10):2559–2568, Oct 2011.
- [57] Y. Saito, K. Kimura, T. Oka, and A. Nakano. *Activities of mutant sar1 proteins in guanine nucleotide binding, gtp hydrolysis, and cell-free transport from the endoplasmic reticulum to the golgi apparatus*. *J Biochem*, 124(4):816–823, Oct 1998.
- [58] N. R. Salama, T. Yeung, and R. W. Schekman. *The sec13p complex and reconstitution of vesicle budding from the er with purified cytosolic proteins*. *EMBO J*, 12(11):4073–4082, Nov 1993.

- [59] T. Serafini, L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, and J. E. Rothman. *Adp-ribosylation factor is a subunit of the coat of golgi-derived cop-coated vesicles: a novel role for a gtp-binding protein.* *Cell*, 67(2):239–253, Oct 1991.
- [60] I. G. Denisov, Y. V. Grinkova, A. A. Lazarides, and S. G. Sligar. *Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size.* *J Am Chem Soc*, 126(11):3477–3487, Mar 2004.
- [61] Bradley J. Baas, Ilia G. Denisov, and Stephen G. Sligar. *Homotropic cooperativity of monomeric cytochrome p450 3a4 in a nanoscale native bilayer environment.* *Arch Biochem Biophys*, 430(2):218–228, Oct 2004.
- [62] Joseph R Lakowicz, editor. *Principles of fluorescence spectroscopy.* Springer Science & Business Media, 3 edition, 2006.
- [63] Kirsten Bacia, Zdenek Petrasek, and Petra Schwille. *Correcting for spectral cross-talk in dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy.* *Chemphyschem*, 13(5):1221–1231, Apr 2012.
- [64] Stefan Werner. *Etablierung eines standards für die zweifarben-fluoreszenzkreuzkorrelationspektroskopie.* Master’s thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011.
- [65] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy.* *Opt. Lett.*, 19(11):780–782, Jun 1994.
- [66] Stefan W. Hell. *Far-field optical nanoscopy.* *Science*, 316(5828):1153–1158, 2007.
- [67] Franco Quercioli. *Optical Fluorescence Microscopy.* Springer-Verlag, Berlin, 2011.
- [68] Robert L Price and W Gray Jay Jerome, editors. *Basic confocal microscopy.* Springer Science & Business Media, 2011.
- [69] Petra Schwille and Elke Haustein. *Fluorescence Correlation Spectroscopy. A tutorial for the Biophysics Textbook Online (BTOL).* *Biophysical Society, Rockville, MD*, 2002.
- [70] Kirsten Bacia and Petra Schwille. *Practical guidelines for dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy.* *Nat Protoc*, 2(11):2842–2856, 2007.
- [71] EP Petrov and Petra Schwille. *State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy.* In *Standardization and quality assurance in fluorescence measurements II*, pages 145–197. Springer, 2008.
- [72] P. Schwille, F. J. Meyer-Almes, and R. Rigler. *Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution.* *Biophys J*, 72(4):1878–1886, Apr 1997.

- [73] H. I. Petrache, S. W. Dodd, and M. F. Brown. *Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by  $^2\text{H}$  nmr spectroscopy*. *Biophys J*, 79(6):3172–3192, Dec 2000.
- [74] J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle. *Structure of lipid bilayers*. *Biochim Biophys Acta*, 1469(3):159–195, Nov 2000.
- [75] Stefan Werner and Kirsten Bacia. *A reliable calibration standard for quantitative co-localisation and binding analysis by fluorescence cross correlation spectroscopy*. 06.08.15: in preparation.
- [76] Ana M Melo, Manuel Prieto, and Ana Coutinho. *Quantifying lipid-protein interaction by fluorescence correlation spectroscopy (fcs)*. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1076:575–595, 2014.
- [77] L. K. Tamm. *Membrane insertion and lateral mobility of synthetic amphiphilic signal peptides in lipid model membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 1071(2):123–148, Jul 1991.
- [78] R. M. Peitzsch and S. McLaughlin. *Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins*. *Biochemistry*, 32(39):10436–10443, Oct 1993.
- [79] N. Ben-Tal, B. Honig, C. Miller, and S. McLaughlin. *Electrostatic binding of proteins to membranes. theoretical predictions and experimental results with charydotoxin and phospholipid vesicles*. *Biophys J*, 73(4):1717–1727, Oct 1997.
- [80] Jeffries Wyman and Stanley J. Gill. *Binding and Linkage - Functional Chemistry of Biological Macromolecules*. *University Science Books, Mill Valley, California*, 1990.
- [81] J. Robin Harris. *Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pages –, 2014.
- [82] Jürgen Thomas and Thomas Gemming. *Analytische Transmissionselektronenmikroskopie*. *Springer-Verlag Wien*, 2013.
- [83] Anna-Clare Milazzo, Anchi Cheng, Arne Moeller, Dmitry Lyumkis, Erica Jacovetty, James Polukas, Mark H. Ellisman, Nguyen-Huu Xuong, Bridget Carragher, and Clinton S. Potter. *Initial evaluation of a direct detection device detector for single particle cryo-electron microscopy*. *J Struct Biol*, 176(3):404–408, Dec 2011.
- [84] S. I. Bannykh, T. Rowe, and W. E. Balch. *The organization of endoplasmic reticulum export complexes*. *J Cell Biol*, 135(1):19–35, Oct 1996.
- [85] Jennifer G. D’Arcangelo, Kyle R. Stahmer, and Elizabeth A. Miller. *Vesicle-mediated export from the er: Copii coat function and regulation*. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11):2464–2472, Nov 2013.

- [86] K. Matsuoka and R. Schekman. *The use of liposomes to study copii- and copii-coated vesicle formation and membrane protein sorting.* *Methods*, 20(4):417–428, Apr 2000.
- [87] Jinoh Kim, Susan Hamamoto, Mariella Ravazzola, Lelio Orci, and Randy Schekman. *Uncoupled packaging of amyloid precursor protein and presenilin 1 into coat protein complex ii vesicles.* *J Biol Chem*, 280(9):7758–7768, Mar 2005.
- [88] J. Christopher Fromme, Mariella Ravazzola, Susan Hamamoto, Mohammed Al-Balwi, Wafaa Eyaid, Simeon A Boyadjiev, Pierre Cosson, Randy Schekman, and Lelio Orci. *The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into copii coat assembly.* *Dev Cell*, 13(5):623–634, Nov 2007.
- [89] Anna Blumental-Perry, Charles J. Haney, Kelly M. Weixel, Simon C. Watkins, Ora A. Weisz, and Meir Aridor. *Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at exit sites regulates export.* *Dev Cell*, 11(5):671–682, Nov 2006.
- [90] Gerrit van Meer, Dennis R. Voelker, and Gerald W. Feigenson. *Membrane lipids: where they are and how they behave.* *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(2):112–124, Feb 2008.
- [91] Frank Adolf and Felix T. Wieland. *Analysis of golgi complex functions: in vitro reconstitution systems.* *Methods Cell Biol*, 118:3–14, 2013.
- [92] Miglena I. Angelova and Dimiter S. Dimitrov. *Liposome electroformation.* *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81:303–311, 1986.
- [93] Pier Luigi Luisi and Peter Walde, editors. *Giant Vesicles: Perspectives in Supramolecular Chemistry, volume 22.* *John Wiley & Sons*, 2008.
- [94] Peter Walde, Katia Cosentino, Helen Engel, and Pasquale Stano. *Giant vesicles: Preparations and applications.* *ChemBioChem*, 11(7):848–865, 2010.
- [95] M.I. Angelova, S. Soleau, Ph. Meleard, F. Faucon, and P. Bothorel. *Preparation of giant vesicles by external ac electric fields. kinetics and applications.* In C. Helm, M. Lösche, and H. Möhwald, editors, *Trends in Colloid and Interface Science VI, volume 89 of Progress in Colloid & Polymer Science, pages 127–131.* *Steinkopff*, 1992.
- [96] U. K. Laemmli. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4.* *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [97] Yizhou Liu, Richard A. Kahn, and James H. Prestegard. *Structure and membrane interaction of myristoylated arf1.* *Structure*, 17(1):79–87, Jan 2009.
- [98] Mohammed Akaaboune, R Mark Grady, Steve Turney, Joshua R. Sanes, and Jeff W. Lichtman. *Neurotransmitter receptor dynamics studied in vivo by reversible photo-unbinding of fluorescent ligands.* *Neuron*, 34(6):865–876, Jun 2002.

- [99] Katrin G. Heinze, Santiago Costantino, Paul De Koninck, and Paul W. Wiseman. *Beyond photobleaching, laser illumination unbinds fluorescent proteins*. J Phys Chem B, 113(15):5225–5233, Apr 2009.
- [100] Klaus G. Neumüller, Kareem Elsayad, Johannes M. Reisecker, M Neal Waxham, and Katrin G. Heinze. *Photounbinding of calmodulin from a family of cam binding peptides*. PLoS One, 5(11):e14050, 2010.
- [101] Anna Bielli, Charles J. Haney, Gavin Gabreski, Simon C. Watkins, Sergei I. Bannykh, and Meir Aridor. *Regulation of sar1 nh2 terminus by gtp binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control copii vesicle fission*. J Cell Biol, 171(6):919–924, Dec 2005.
- [102] I. R. Vetter and A. Wittinghofer. *The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions*. Science, 294(5545):1299–1304, Nov 2001.
- [103] Y. Shimoni, T. Kurihara, M. Ravazzola, M. Amherdt, L. Orci, and R. Schekman. *Lst1p and sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane atpase into copii vesicles in saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 151(5):973–984, Nov 2000.
- [104] Michael Meinecke, Emmanuel Boucrot, Gamze Camdere, Wai-Ching Hon, Rohit Mittal, and Harvey T McMahon. *Cooperative recruitment of dynamin and bin/amphiphysin/rvs (bar) domain-containing proteins leads to gtp-dependent membrane scission*. The Journal of biological chemistry, 288:6651–6661, March 2013.
- [105] Michael G Hanna, 4th, Ioanna Mela, Lei Wang, Robert M. Henderson, Edwin R. Chapman, J Michael Edwardson, and Anjon Audhya. *Sar1 gtpase activity is regulated by membrane curvature*. J Biol Chem, 291(3):1014–1027, Jan 2016.
- [106] Chie Kodera, Tomohiro Yorimitsu, Akihiko Nakano, and Ken Sato. *Sed4p stimulates sar1p gtp hydrolysis and promotes limited coat disassembly*. Traffic, 12(5):591–599, May 2011.
- [107] A. Spang. *The life cycle of a transport vesicle*. Cell Mol Life Sci, 65(18):2781–2789, Sep 2008.
- [108] Giulia Zanetti, Kanika Bajaj Pahuja, Sean Studer, Soomin Shim, and Randy Schekman. *Copii and the regulation of protein sorting in mammals*. Nat Cell Biol, 14(1):20–28, Jan 2012.
- [109] T. Oka and A. Nakano. *Inhibition of gtp hydrolysis by sar1p causes accumulation of vesicles that are a functional intermediate of the er-to-golgi transport in yeast*. J Cell Biol, 124(4):425–434, Feb 1994.
- [110] Edward I Settles, Andrew F Loftus, Alesia N McKeown, and Raghuvveer Parthasarathy. *The vesicle trafficking protein sar1 lowers lipid membrane rigidity*. Biophys J, 99(5):1539–1545, Sep 2010.

- [111] Lea Dietrich. *Master's thesis, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, 2014.*
- [112] Chie Kodera, Tomohiro Yorimitsu, and Ken Sato. *Sec23 homolog nel1 is a novel gtpase-activating protein for sar1 but does not function as a subunit of the coat protein complex ii (copii) coat.* J Biol Chem, 289(31):21423–21432, Aug 2014.
- [113] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution.* Science, 313(5793):1642–1645, Sep 2006.
- [114] J. Seelig. *Titration calorimetry of lipid-peptide interactions.* Biochim Biophys Acta, 1331(1):103–116, Mar 1997.
- [115] W. Cho, L. Bittova, and R. V. Stahelin. *Membrane binding assays for peripheral proteins.* Anal Biochem, 296(2):153–161, Sep 2001.
- [116] Hyunju Cho, Ming Wu, Betul Bilgin, S Patrick Walton, and Christina Chan. *Latest developments in experimental and computational approaches to characterize protein-lipid interactions.* Proteomics, 12(22):3273–3285, Nov 2012.
- [117] L.S. Jung, J.S. Shumaker-Parry, C.T. Campbell, S.S. Yee, and M.H. Gelb. *Quantification of tight binding to surface-immobilized phospholipid vesicles using surface plasmon resonance: Binding constant of phospholipase a2.* Journal of the American Chemical Society, 122(17):4177–4184, 2000.
- [118] M. K. Jain, M. R. Egmond, H. M. Verheij, R. Apitz-Castro, R. Dijkman, and G. H. De Haas. *Interaction of phospholipase a2 and phospholipid bilayers.* Biochim Biophys Acta, 688(2):341–348, Jun 1982.
- [119] X. Qian, C. Zhou, and M. F. Roberts. *Phosphatidylcholine activation of bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase c toward pi vesicles.* Biochemistry, 37(18):6513–6522, May 1998.
- [120] E. R. Chapman and A. F. Davis. *Direct interaction of a ca<sup>2+</sup>-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers.* J Biol Chem, 273(22):13995–14001, May 1998.
- [121] Fábio Fernandes, Ana Coutinho, Manuel Prieto, and Luís M S. Loura. *Electrostatically driven lipid-protein interaction: Answers from fret.* Biochim Biophys Acta, 1848(9):1837–1848, Sep 2015.
- [122] Elizabeth R. Middleton and Elizabeth Rhoades. *Effects of curvature and composition on  $\gamma$ -synuclein binding to lipid vesicles.* Biophys J, 99(7):2279–2288, Oct 2010.
- [123] Douglas Magde, Elliot Elson, and W. W. Webb. *Thermodynamic fluctuations in a reacting system—measurement by fluorescence correlation spectroscopy.* Phys. Rev. Lett., 29:705–708, Sep 1972.



- [124] D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb. *Fluorescence correlation spectroscopy. ii. an experimental realization*. *Biopolymers*, 13(1):29–61, Jan 1974.
- [125] M. Ehrenberg and R. Rigler. *Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules*. *Q Rev Biophys*, 9(1):69–81, Feb 1976.
- [126] N. L. Thompson. *Topics in Fluorescence Spectroscopy, volume 1*. Plenum Press, New York, 1991.
- [127] M. Eigen and R. Rigler. *Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13):5740–5747, Jun 1994.
- [128] D. E. Koppel, D. Axelrod, J. Schlessinger, E. L. Elson, and W. W. Webb. *Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility*. *Biophys J*, 16(11):1315–1329, Nov 1976.
- [129] R. Rigler. *Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. applications in biotechnology*. *J Biotechnol*, 41(2-3):177–186, Jul 1995.
- [130] W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb. *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*. *Science*, 248(4951):73–76, Apr 1990.
- [131] K. M. Berland, P. T. So, and E. Gratton. *Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment*. *Biophys J*, 68(2):694–701, Feb 1995.
- [132] P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb. *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. *Biophys J*, 77(4):2251–2265, Oct 1999.
- [133] P. Schwille. *Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications*. *Cell Biochem Biophys*, 34(3):383–408, 2001.
- [134] J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, and A. Kenworthy. *Studying protein dynamics in living cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(6):444–456, Jun 2001.
- [135] J. Mütze, T. Ohrt, and P. Schwille. *Fluorescence correlation spectroscopy in vivo*. *Laser & Photonics Reviews*, 5(1):52–67, 2011.
- [136] Kirsten Bacia, Dag Scherfeld, Nicoletta Kahya, and Petra Schwille. *Fluorescence correlation spectroscopy relates rafts in model and native membranes*. *Biophys J*, 87(2):1034–1043, Aug 2004.
- [137] Kirsten Bacia and Petra Schwille. *Fluorescence correlation spectroscopy*. *Methods Mol Biol*, 398:73–84, 2007.
- [138] R. Rigler and E. L. Elson, editors. *Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Application*. Springer-Verlag, Berlin, 2001.

- [139] Kirsten Bacia, Sally A Kim, and Petra Schwille. *Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells*. *Nat Methods*, 3(2):83–89, Feb 2006.
- [140] Elizabeth Rhoades, Trudy F. Ramlall, Watt W. Webb, and David Eliezer. *Quantification of alpha-synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy*. *Biophys J*, 90(12):4692–4700, Jun 2006.
- [141] Vanessa C. Ducas and Elizabeth Rhoades. *Quantifying interactions of beta-synuclein and gamma-synuclein with model membranes*. *J Mol Biol*, 423(4):528–539, Nov 2012.
- [142] E. P. Petrov, T. Ohrt, R. G. Winkler, and P. Schwille. *Diffusion and segmental dynamics of double-stranded dna*. *Phys Rev Lett*, 97(25):258101, Dec 2006.
- [143] Andrew F. Loftus, Vivian L. Hsieh, and Raghuvveer Parthasarathy. *Modulation of membrane rigidity by the human vesicle trafficking proteins sar1a and sar1b*. *Biochem Biophys Res Commun*, 426(4):585–589, Oct 2012.
- [144] Fábio Fernandes, Luís M S. Loura, Francisco J. Chichón, Jose L. Carrascosa, Alexander Fedorov, and Manuel Prieto. *Role of helix 0 of the n-bar domain in membrane curvature generation*. *Biophys J*, 94(8):3065–3073, Apr 2008.
- [145] D. Eliezer, E. Kutluay, R Bussell, Jr, and G. Browne. *Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states*. *J Mol Biol*, 307(4):1061–1073, Apr 2001.
- [146] Yoon-Hui Sung and David Eliezer. *Secondary structure and dynamics of micelle bound beta- and gamma-synuclein*. *Protein Sci*, 15(5):1162–1174, May 2006.
- [147] Vanessa C. Ducas and Elizabeth Rhoades. *Investigation of intramolecular dynamics and conformations of  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -synuclein*. *PLoS One*, 9(1):e86983, 2014.
- [148] Tobias S. Ulmer, Ad Bax, Nelson B. Cole, and Robert L. Nussbaum. *Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein*. *J Biol Chem*, 280(10):9595–9603, Mar 2005.
- [149] Norbert Kučerka, Mu-Ping Nieh, and John Katsaras. *Fluid phase lipid areas and bilayer thicknesses of commonly used phosphatidylcholines as a function of temperature*. *Biochim Biophys Acta*, 1808(11):2761–2771, Nov 2011.
- [150] J. H. Ipsen, O. G. Mouritsen, and M. Bloom. *Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. the effects of cholesterol*. *Biophys J*, 57(3):405–412, Mar 1990.
- [151] Scott M Stagg, Cemal Gürkan, Douglas M Fowler, Paul LaPointe, Ted R Foss, Clinton S Potter, Bridget Carragher, and William E Balch. *Structure of the sec13/31 copii coat cage*. *Nature*, 439(7073):234–238, Jan 2006.

- [152] Karin John, Janek Kubelt, Peter Müller, Daniel Wüstner, and Andreas Herrmann. *Rapid transbilayer movement of the fluorescent sterol dehydroergosterol in lipid membranes*. *Biophys J*, 83(3):1525–1534, Sep 2002.
- [153] Joachim Seelig. *Thermodynamics of lipid-peptide interactions*. *Biochim Biophys Acta*, 1666(1-2):40–50, Nov 2004.
- [154] James H. Hurley. *Membrane binding domains*. *Biochim Biophys Acta*, 1761(8):805–811, Aug 2006.
- [155] Konstantin Starchev, Jingwu Zhang, and Jacques Buffle. *Applications of fluorescence correlation spectroscopy—particle size effect*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 203(1):189 – 196, 1998.
- [156] Stefan Wennmalm, Per Thyberg, Lei Xu, and Jerker Widengren. *Inverse-fluorescence correlation spectroscopy*. *Anal Chem*, 81(22):9209–9215, Nov 2009.
- [157] Ken Sato and Akihiko Nakano. *Reconstitution of cargo-dependent copii coat assembly on proteoliposomes*. *Methods Enzymol*, 404:83–94, 2005.
- [158] Meg Trahey and Jesse C. Hay. *Transport vesicle uncoating: it's later than you think*. *F1000 Biol Rep*, 2:47, 2010.

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Daniela Krüger (geboren Glatte)

geboren am 30.09.1981 in Eilenburg

### **Ausbildung**

1988-1992 Polytechnische Oberschule Lilo Hermann Eilenburg

1992-2000 Karl-August-Möbius-Gymnasium Eilenburg

Abschluss: Abitur

2002-2007 Universität Leipzig

Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

Studium Biologie

Abschluss: Diplom Biologie

2010-2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Institut für Chemie

Promotion in der AG Prof. Kirsten Bacia

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich nicht anderweitig versucht habe, diese Dissertation einzureichen oder einer Prüfungsbehörde einer anderen Hochschule vorzulegen. Ich selbst habe mich noch keiner Doktorprüfung unterzogen.

Leipzig 23.08.2017

Daniela Krüger