

**Etablierung eines Messsystems
zur einzelmolekülsensitiven Analyse
von Protein-Monoschicht-Interaktionen
am Beispiel von Sar1p**

Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II
Chemie, Physik und Mathematik

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Diplom-Biochemiker Jan Auerswald
geboren am 04.12.1985 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Bacia

2. Prof. Dr. Ch. G. Hübner

Tag der Verteidigung: 11.11.2021

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jan Auerswald
Geboren: 04.12.1985 in Leipzig
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
Nationalität: Deutsch

Werdegang

08/1996 – 07/2004 Goethe-Gymnasium Reichenbach
Abschluss: Abitur, Note: 2,0

07/2004 – 09/2005 Grundwehrdienst

10/2005 – 12/2010 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Diplomarbeit: „ Herstellung einer fluoreszenzmarkierten Phospholipase D α 2-Variante für Untersuchungen mittels Einzelmolekülspektroskopie

Abschluss: Diplom, Note: 1,2

01/2012 – 06/2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ZIK HALOmem, Institut für Chemie
Doktorand

04/2011 - 03/2013 Leistungsstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Sachsen-Anhalt

seit 07/2016 wissenschaftlicher Mitarbeiter der mibe GmbH Arzneimittel in der Abteilung Qualitätssicherung

Publikationen und Preprint-Artikel

J. Auerswald, J. Ebenhan, C. Schwieger, A. Scrima, A. Meister and K. Bacia; Measuring Protein Insertion Areas in Lipid Monolayers by Fluorescence Correlation Spectroscopy; *bioRxiv preprint*; 2020

S. Daum, D. Krüger, A. Meister, **J. Auerswald**, S. Prinz, J. Briggs and K. Bacia; Insights from reconstitution reactions of COPII vesicle formation using pure components and low mechanical perturbation; *Biol. Chem.*, 395(7-8): 801-812; 2014

Posterpräsentationen

S. Daum, M. Grimmer, J. Ebenhan, A. Meister, **J. Auerswald**, D. Krüger, S. Werner and K. Bacia; Membrane binding and remodelling by the COPII coat. *Biophys. J.*, 112, 239a; 2017

J. Auerswald, A. Meister, S. Daum and K. Bacia; Fluorescence Correlation Spectroscopy reveals additional information on protein insertions into phospholipid monolayers; *Biophys. J.*, 106, 514a; 2014

D. Krüger, S. Werner, S. Daum, **J. Auerswald**, P. Simeonov, C. Haupt, M. Tanabe and K. Bacia; Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy of reconstituted protein-membrane systems; *Biophys. J.*, 106, 712a; 2014

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
A_0	Oberfläche der Filmwaage
AFP	<i>actual focus position</i>
Alexa488	Alexa Fluor® 488 C ₅ Maleinimid
ATR	<i>attenuated total reflection</i>
CLSD	<i>cranio-lentikulo-sutural dysplasia</i>
COPII	<i>coat protein complex II</i>
D	Diffusionskoeffizient
<i>E.coli</i> -BL21-DE3	<i>Escherichia coli</i> Expressionsstamm
<i>E.coli</i> -DH5 α	<i>Escherichia coli</i> Plasmid-Vermehrungsstamm
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fluoreszenzsignal
F_A	Auftrieb
F_G	Gewichtskraft
F_M	Gewichtskraft des Meniskus am Wilhelmyplättchen
F_W	Kraft, die auf das Wilhelmy-Plättchen wirkt
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
g	Gravitationskonstante (9,81 m s ⁻²)
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMP-PNP	Guanlyl-5'-imido diphosphat
GTP	Guanosinriphosphat
GUV	<i>giant unilamellar vesicle</i>
k_B	Boltzmannkonstante
k_{cat}	Wechselzahl (<i>turnover number</i>)
LB-Agar	<i>lysogeny broth</i> Agar
LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
LC	<i>liquid condensed</i>
LE	<i>liquid expanded</i>
Mg ²⁺	Magnesiumion
MIP	<i>maximum insertion pressure</i>
MPE	<i>multi-photon excitation</i>
MMM	Major-Minor-Mix
N	mittlere Anzahl Fluorophore im Fokus
NFP	<i>nominal focus position</i>
<i>off</i>	<i>Offset</i> der Korrelationsfunktion
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P_i	anorganisches Orthophosphat
R	universelle Gaskonstante
R_0	hydrodynamischer Radius
r_0	laterale Ausdehnung des Fokusvolumens

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
RICS	<i>raster image correlation spectroscopy</i>
Sar1	<i>secretion-associated Ras-related 1</i>
Sar1p	Sar1-Protein aus Hefe, Wildtyp-Protein
Sar1p _{AI488}	Sar1p Wildtyp-Protein, das mit Alexa ₄₈₈ modifiziert wurde
Sar1p _{SCCS}	Sar1p-Variante, bei der das Cystein 171 durch ein Serin und das Serin 147 durch ein Cystein ersetzt wurde
Sar1p _{SCCSAI488}	Sar1p-Variante, die mit Alexa ₄₈₈ modifiziert wurde
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec12 Δ C	lösliche C-terminale Domäne von Sec12
SUV	<i>small unilamellar vesicle</i>
T	Tempertur
T_T	Triplettanteil
tER	transitorisches endoplasmatisches Retikulum
v/v	volume per volume
VS-Charakteristik	Bestimmung der Umsatzrate von Enzymen in Gegenwart verschiedener Mengen an Substrat
z_0	axiale Ausdehnung des Fokusvolumens
Zen2009	Auswerte und Analysesoftware zum konfokalen FLuoreszenzmikroskop (LSM 710 and ConfoCor 3)
$\alpha^{32}\text{P-GDP}$	radioaktiv markiertes GDP
$\alpha^{32}\text{P-GTP}$	radioaktiv markiertes GTP
η	dynamische Viskosität
π	Oberflächendruck
σ	Oberflächenspannung
τ_D	Diffusionszeit
τ_T	Tripletrelaxationszeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Techniken zur Untersuchung von Membransystemen und Biomolekülen.....	1
1.2 Sar1 - ein Beispiel für Proteininteraktionen an Monoschichten	1
2. Zielstellung	3
3. Theoretischer Teil	4
3.1 GTPasen und deren Bedeutung im Stoffwechsel	4
3.1.1 Allgemeines	4
3.1.2 Die Ras-Superfamilie	4
3.1.3 Sar1 als Schalter des anterograden Vesikel-Transports	5
3.2 Fluoreszenz.....	9
3.2.1 Grundprinzip.....	9
3.2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie.....	11
3.2.3 <i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> (FCS).....	13
3.2.4 Z-Scan-FCS	15
3.2.5 Bestimmung von molekularen Insertionsflächen in Monoschichten	17
3.3 Tensiometrie.....	18
3.3.1 Grundsetup und Vergleich verschiedener Langmuir-Tröge	19
3.3.2 Kraftmessung nach der Plattenmethode von Wilhelmy	19
3.3.3 Adsorption von Molekülen aus der Subphase.....	21
3.3.4 Konfokale Mikroskopie in Kombination mit dem Langmuir-Filmwaagesystem.....	22
4. Materialien und Methoden	23
4.1 Materialien	23
4.1.1 Chemikalien/Proteine/Lipide	23
4.1.2 Kits und Standards	24
4.1.3 Nährmedien/Puffer und Stammlösungen.....	24
4.1.4 GTPase-Aktivitätstest auf Basis von Malachitgrün	25
4.1.5 Lipidlösungen.....	26
4.1.6 Stämme und Plasmide	26
4.2 Methoden	26
4.2.1 Generierung von Sar1p Varianten	26
4.2.2 Proteinpräparation und Modifikation	28
4.2.3 Lipidpräparationen.....	30
4.2.4 GTPase-Aktivität.....	31
4.2.5 Funktionsanalyse von COPII an GUVs.....	33
4.2.6 FCS-Setup Kalibrierung für Messungen in wässrigen Systemen und an Grenzflächen	33
4.2.7 Z-Scan-FCS Auswertung mittels MATLAB	35
5. Ergebnisse	39
5.1 Generierung und Modifikation von Sar1p und Sar1p _{SCCS} mit Alexa ₄₈₈	39
5.1.1 Entwicklung der Variante	39
5.1.2 Zellanzucht und Proteinreinigung von Sar1p und Sar1p _{SCCS}	39
5.1.3 Fluoreszenzmarkierung von Sar1p und Sar1p _{SCCS}	40
5.2 Etablierung eines Testverfahrens zum Nachweis der katalytischen Aktivität von Sar1p.....	44
5.2.1 Optimierung der Messparameter und der Nachweislösung.....	44
5.2.2 Entwicklung eines geeigneten Kalibrierstandards zum Nachweis der GTP-Hydrolyse	45

5.2.3	Einfluss von Phospholipiden und Alexa ₄₈₈	47
5.3	GTPase-Aktivität von Sar1p und dessen Regulation	47
5.3.1	Vergleich verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Basalaktivität von Sar1p	47
5.3.2	Einfluss von nicht proteinogenen Effektoren auf die GTPase-Aktivität von Sar1p.....	48
5.3.3	Einfluss von proteinogenen Effektoren auf die GTPase-Aktivität von Sar1p.....	48
5.3.4	GTPase-Aktivität von Sar1p _{SCCSAI488} im Vergleich zu Sar1p	50
5.4	Membraninteraktion von Sar1p und Sar1p _{SCCSAI488} im Vergleich	51
5.4.1	Tubulierungsnachweis mit konfokaler Mikroskopie	51
5.4.2	Tubulierungsnachweis mit Kryoelektronenmikroskopie	52
5.5	Auswertung der Z-Scan-FCS-Daten mittels MATLAB.....	53
5.5.1	Korrelation der Z-Scan-FCS-Daten	53
5.5.2	FCS-Modellanpassung durch MATLAB.....	54
5.5.3	Anpassung der einzelnen FCS-Fitparameter im Rahmen der Z-Scan-FCS	57
5.6	Etablierung eines Messsystems für FCS-Analysen an Phospholipid-Monoschichten	59
5.6.1	Technische Umsetzung des kombinierten Setups	59
5.6.2	Einfluss des Rührens auf die Gleichverteilung.....	60
5.6.3	Einflussfaktoren auf die Messung des Oberflächendrucks	61
5.6.4	Systemkalibrierung und Fokussierung der Grenzfläche	64
5.6.5	Stabilität der Monoschicht während der Messung.....	66
5.7	Interaktionsanalyse von Proteinen und Phospholipid-Monoschichten durch Z-Scan-FCS.....	68
5.7.1	Interaktion von Sar1p mit MMM-Monoschichten.....	68
5.7.2	Insertionsfläche von Sar1p _{SCCSAI488} in Gegenwart verschiedener Lipidsysteme.....	69
5.7.3	Interaktionsanalysen mit zwei Farben.....	69
6.	Diskussion	72
6.1	Modifikation von Sar1p und Sar1p _{SCCS} mit Alexa ₄₈₈	72
6.1.1	Modifizierungsstrategien und Markierungseffizienz	72
6.1.2	Proteinreinigungsverfahren	74
6.2	Etablierung eines GTPase-Aktivitätstest für Sar1p mit nichtra dioaktiven Substanzen.....	74
6.3	Funktionsanalysen von Sar1p und Sar1p _{SCCSAI488}	76
6.3.1	GTPase-Aktivität und Regulation	76
6.3.2	Tubulierungsfähigkeit	78
6.4	Z-Scan-FCS-Analyse mittels MATLAB.....	79
6.5	Etablierung eines Systems zur Analyse von Protein-Monoschicht-Interaktionen mittels FCS	80
6.5.1	Validierung der Systemparameter	80
6.5.2	Grundprinzipien des Systemaufbaus und der Justage/Kalibrierung	83
6.6	Interaktion von Sar1p mit Phospholipid-Monoschichten.....	85
6.6.1	Bindung und Insertion in Gegenwart verschiedener Lipidsysteme	85
6.6.2	Interaktionsanalyse mit zwei Farben	87
7.	Zusammenfassung	89
8.	Summary	91
9.	Ausblick	93
10.	Danksagung	94
11.	Erklärung	95
12.	Literaturverzeichnis	96
13.	Anhang.....	I
13.1	Charakteristik Sar1p _{SCCSAI488}	I

13.1.1	Diffusionskoeffizient Sar1p/Sar1p _{SCCSAI488}	I
13.2	Etablierung eines Testverfahrens zum Nachweis der katalytischen Aktivität von Sar1p	I
13.2.1	Reaktionsgleichungen zum Phosphatnachweis mit Malachitgrün	I
13.2.2	Sensitivität des Nachweisverfahrens	I
13.2.3	Autohydrolyse GTP und GDP	II
13.2.4	Einfluss von MMM Lipiden auf den Malachitgrün-Nachweistest	II
13.2.5	Einfluss von Alexa ₄₈₈ auf den Malachitgrün-Nachweistest	III
13.3	GTPase-Aktivität von Sar1p und dessen Regulation	IV
13.3.1	Kalibrierreihen	IV
13.3.2	Basalaktivität von Sar1p	IV
13.3.3	Einfluss von Mg ²⁺ auf die Basalaktivität	V
13.3.4	Einfluss von MMM-Liposomen auf die Basalaktivität von Sar1p	VI
13.3.5	Einfluss von COPII-Komponenten auf die Basalaktivität von Sar1p	VI
13.4	Etablierung eines Messsystems für FCS-Analysen an Phospholipid-Monoschichten	XII
13.4.1	Installation eines zweiten Kühlkreislaufes	XII
13.4.2	Bestimmung der idealen Z-Position des Objektivs	XII
13.4.3	Monoschichtstabilität/Fluoreszenzstabilität bei verschiedenen Laserleistungen	XVII
13.4.4	Monoschichtstabilität beim Bewegen über die Filmwaage	XXXV
13.4.5	Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test)	LI
13.5	Interaktionsanalyse von Sar1p und Phospholipid-Monoschichten durch Z-Scan-FCS	LIV
13.5.1	Setupkalibrierung zur Bestimmung der Fokusfläche	LIV
13.5.2	Interaktion von Sar1p _{SCCSAI488} (100 %) mit einer MMM-Monoschicht	LV
13.5.3	Interaktion von Sar1p-Mischungen mit MMM-Monoschichten	LVI
13.5.4	Interaktion von Sar1p-Mischungen mit DLPC/DPLS-Monoschichten	LVII
13.5.5	Interaktion von Sar1p-Mischungen mit fluoreszierenden MMM-Monoschichten	LVII
13.5.6	Filmwaagedaten zu den vorherigen Insertionen von Sar1p	LXXIII
13.5.7	Bestimmung des Fehlers der Flächenermittlung durch die Langmuir-Filmwaage	LXXV

1. Einleitung

1.1 Techniken zur Untersuchung von Membransystemen und Biomolekülen

Biomembranen sind für Zellen ein essentieller Bestandteil, da sie zum einen deren Inhalt von der Umgebung abgrenzen, zum anderen das Zellinnere in verschiedene Bereiche unterteilen. Je nach Art ihrer Beschaffenheit übernehmen diese Bereiche spezielle Aufgaben. So sorgen beispielsweise Lysosomen für den Abbau von Makromolekülen [1], das endoplasmatische Retikulum (ER) stellt u. a. den Produktionsort für sekretorische Vesikel dar [2] und im Golgi-Apparat erfolgt die Glycosylierung von Proteinen [2]. Neben der Funktion als Barriere ermöglichen Membranen auch Stoff-, Energie- sowie Informationsaustausch und bilden dadurch ein komplexes System, das durch verschiedene Techniken untersucht werden kann. Bezugnehmend auf deren Morphologie kann zwischen kugelförmigen und planaren Systemen unterschieden werden. Untersuchungen an kugelförmigen Strukturen werden dabei an Liposomen verschiedener Größen durchgeführt [3, 4, 5]. Planare Doppelschichtsysteme werden z.B. als aufgespannte Membranen (*black lipid membranes* [6]) oder als, auf Oberflächen, fixierte Membranen (als Modellmembran der *attenuated total reflection* (ATR) Spektroskopie [7]) analysiert. Im Falle der planaren Systeme gibt es noch eine weitere Möglichkeit, diese zu untersuchen, indem nur eine Lipidschicht der ansonsten doppelschichtigen Membran als Untersuchungsgegenstand verwendet wird. Diese Monoschichten werden klassischerweise mit der Langmuir-Filmwaage-Technik präpariert und analysiert. Durch Variation des Oberflächendrucks ist es dabei möglich, die sich an einer Luft-Puffer Grenzfläche befindlichen Lipide zu beeinflussen. So können beispielsweise deren Packungsdichte und Organisation (z.B. durch Übergang der gesättigten Phospholipidseitenketten von einer flüssigen (*liquid expanded*, LE) in eine kondensierte (*liquid condensed*, LC) Phase, [8, 9]) verändert werden. Dadurch werden z.B. Bedingungen geschaffen, bei denen Monoschichten in Abhängigkeit der verwendeten Moleküle (z.B. Dipalmitoylphosphatidylcholine, DPPC) kleine Aggregate oder Domänen ausbilden können [8]. Zusätzlich stellt die Monoschicht ein planares System dar, dessen Komponenten freibeweglich sind, im Gegensatz zu den teilweise fixierten Komponenten der *black lipid membranes*.

Für Moleküle, die nur mit einer Schicht einer Biomembran interagieren, ist dieses System ein geeignetes Modell, um Interaktionsprozesse ohne zusätzliche Einflüsse (z.B. Oberflächenkrümmung) zu analysieren. Der Nachteil dieser Technik besteht darin, dass die Interaktionseffekte nur global als gesamte Änderung des Oberflächendrucks (π) oder der gesamten Oberfläche (A_0) analysiert werden können. Aussagen zur Anzahl und Beschaffenheit der interagierenden Moleküle, ihrer Bewegungsdynamik oder der Bildung von Mikrodomänen sind mit der Langmuir-Filmwaage allein und in direkter Weise nicht möglich. Die Aufklärung derartiger Fragestellungen kann durch optische Methoden (z.B. *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS)) erfolgen. Aufgrund der Empfindlichkeit der FCS-Technik können durch Kombination einer Langmuir Filmwaage mit einem konfokalen Mikroskop neben der Variation von Oberflächenparametern somit auch Details auf molekularer Ebene an Monoschichten untersucht werden.

1.2 Sar1 - ein Beispiel für Proteininteraktionen an Monoschichten

Für die Untersuchung von Proteinen an Monoschichten ist es Voraussetzung, dass diese im natürlichen System nur mit einer Halbschicht der Membran interagieren. Die kleine GTPase der Ras-Superfamilie Sar1 erfüllt diese Vorgaben, indem sie durch eine amphipathische α -Helix am N-Terminus, mit einer Monoschicht interagiert. Diese wird dabei zwischen die Lipide eingebettet. Neben diesem eher technischen Aspekt, der das kleine Protein als gutes Testobjekt für

Untersuchungen an Monoschichten definiert, stellt es auch in Bezug auf seine Rolle im Zellstoffwechsel einen Untersuchungsgegenstand dar. So spielt Sar1 als molekularer Schalter bei der Biogenese von Transportvesikeln vom ER zum Golgi-Apparat eine initiale Rolle. Neben der GTPase sind dabei weitere Proteine involviert, die sich im Laufe der Vesikelbildung mit dem Enzym zu einem Hüllkomplex (*coat protein complex II*, COPII) zusammenlagern und so zu dessen Bildung beitragen. Die COPII-Proteine wurden sowohl in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*, allgemeine Erweiterung der Proteinbezeichnung mit p, z.B. Sar1p) als auch in tierischen Zellen, wenngleich auch hier in größerer Variation, nachgewiesen.

In humanen Zellen treten beispielsweise zwei Paraloge von Sar1 (Sar1A und Sar1B) auf. Einige Mutationen im Paralog Sar1B führen dabei zum Funktionsverlust des Enzyms, was bei neugeborenen Kindern zu Gedeihstörungen, Diarrhoe und Steatorrhoe führen kann [10]. Dabei handelt es sich um eine autosomal rezessive Chylomikronen-Retentions-Krankheit [11]. Ein weiteres Beispiel ist die *cranio-lentikulo-sutural dysplasia* (CLSD), die ebenfalls im Zusammenhang mit einer Mutation einer der COPII-Komponenten steht, dem humanen Sec23-Paralog SEC23A. Durch die unzureichende Bildung von COPII-Vesikeln am rauen ER von Fibroblasten wird der Transport von Proteinen und anderem Sekretionsmaterial inhibiert. Elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gewebeproben der betroffenen Patienten wiesen dabei stark aufgeblähte und überproportional ausgedehnte ER-Strukturen auf [12]. Diese ebenfalls autosomal rezessiv vererbte Krankheit äußert sich im Neugeborenen- und Kleinkindalter. Sie ist gekennzeichnet durch sich spät bis gar nicht schließende Fontanellen, grauen Star, Fehlbildungen des Gesichtes und Defekte des Skeletts.

Aufgrund der aufgeführten Beispiele könnte die Kombination aus Langmuir-Filmwaage und konfokalem Mikroskop einen weiteren Beitrag leisten, der es ermöglicht, die initialen Schritte während der COPII-Vesikel-Biogenese besser zu verstehen. Dadurch wäre es denkbar, auf Basis dieser Kenntnisse weitere Therapieansätze für die oben beschriebenen Krankheitsbilder zu entwickeln.

2. Zielstellung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung und Validierung eines Messsystems, das es ermöglicht, Interaktionen von Molekülen mit Monoschichten auf Basis einzelmolekülsensitiver Techniken (FCS) zu untersuchen. Dazu soll ein kommerzielles Fluoreszenzmikroskop mit einer Langmuir-Filmwaage kombiniert werden mit dem Ziel, die ermittelten Daten von Langmuir-Filmwaage Experimenten durch zusätzliche Parameter (z.B. Teilchenzahl, Diffusionskoeffizienten) zu erweitern. So kann zum einen die Anzahl der Moleküle bestimmt werden, die mit der Monoschicht interagieren. Auch können Aussagen über die molekulare Struktur (Monomer, Dimer, Oligomer) basierend auf Helligkeitsanalysen getroffen werden. Bezüglich der Moleküldynamik erweitert dieses Messsystem die Möglichkeiten der Filmwaage erheblich, indem z.B. Diffusionskoeffizienten der inserierten Moleküle bestimmt werden können, und auch die Bildung von Domänen ließe sich verfolgen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, aufgrund der hohen Sensitivität der FCS-Technik die Interaktionen von Molekülen unter Bedingungen zu untersuchen, bei denen die Filmwaage keine Informationen mehr liefert (z.B. im Bereich des *maximum insertion pressure*, MIP). Da die Etablierung am Beispiel der kleinen GTPase Sar1p erfolgen soll, muss diese im Vorfeld mit einem Fluoreszenzfarbstoff modifiziert werden. Dabei sollen möglichst hohe Markierungsausbeuten bei minimalem Verlust an biologischer Funktionalität erreicht werden. Für den Nachweis der Funktionalität müssen auf Basis der enzymatischen Aktivität weitere Testverfahren entwickelt bzw. auf die GTPase angepasst werden.

3. Theoretischer Teil

3.1 GTPasen und deren Bedeutung im Stoffwechsel

3.1.1 Allgemeines

Als GTPase wird eine Gruppe von Hydrolasen bezeichnet, die Guanosin triphosphat (GTP) binden und in Guanosindiphosphat (GDP) und Orthophosphat (P_i) spalten (hydrolysieren) [13]. Die Bindung und Hydrolyse erfolgt dabei in einer hochkonservierten Domäne des Enzyms (GTPase-Domäne). GTPasen fungieren als molekulare Schalter, die zahlreiche grundlegende Prozesse innerhalb der Zelle regulieren und steuern [14]. Dies betrifft u.a. Prozesse der Signaltransduktion, bei denen heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) im Zusammenspiel mit Transmembranrezeptoren (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) extrazelluläre Informationen ins Innere der Zelle weitergeben [14, 15, 16]. Auch an der Proteinbiosynthese (Vermittlung der Bindung des Ribosoms an die ER-Membran durch *translation factor family GTPases*, [17, 18, 19]) sind GTPasen ebenso beteiligt wie an Prozessen der Zelldifferenzierung und Zellbewegung [20]. Ein weiterer wichtiger Prozess innerhalb der Zelle ist die Biogenese von Transportvesikeln, die ebenfalls von kleinen GTPasen reguliert und umgesetzt wird [20].

Um diese Schalterfunktion wahrnehmen zu können, existiert eine GTPase in zwei Zuständen, einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand [14, 15]. Dabei bewirkt der Wechsel vom inaktiven Zustand in den aktiven und wieder zurück jeweils eine Konformationsänderung des Enzyms, welche wiederum Signalkaskaden (z. B. Bindung mit anderen Proteinen, [13]) auslösen kann oder aber zu Bindungen mit Membranen/Vesikeln [21] führt. Aus regulatorischer Sichtweise existieren für eine GTPase somit zwei Prozesse, die die „Schaltung“ ermöglichen und steuern. Zum einen die Beladung mit GTP (inaktiv zu aktiv) und zum anderen dessen Hydrolyse (aktiv zu inaktiv). Beide Prozesse werden durch Effektoren stimuliert und beschleunigt. Im Falle des Nukleotidaustauschs erfolgt dies durch GEF-Proteine (*guanine nucleotide exchange factor*). Die Hydrolyserate wird durch GAP-Proteine (*GTPase activating protein*) beeinflusst.

3.1.2 Die Ras-Superfamilie

Als molekulare Schalter übernehmen GTPasen zahlreiche grundlegende Funktionen des zellulären Stoffwechsels. Aufgrund dieser Vielfalt an Funktionen existieren GTPasen in unterschiedlichen Formen und Größen und lassen sich dementsprechend in unterschiedliche Gruppen einteilen.

Die Ras-Superfamilie stellt eine Gruppe von kleinen monomeren GTPasen dar, die ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa aufweisen. Sie wurde nach dem ersten identifizierten Vertreter kleiner monomere GTPasen benannt, die aus einer einzigen Untereinheit (GTPase-Domäne) besteht [22, 23]. Aufgrund der Aminosäuresequenz, Struktur und Funktion lassen sich die Mitglieder dieser Superfamilie in weitere Untergruppen/Familien einteilen (Ras, Rho, Rab, Arf, Ran) [22, 23, 24]. Dabei reguliert die Ras-Familie Prozesse der Zellproliferation, während GTPasen der Rho-Familie Einfluss auf das Zytoskelett und die Zellmorphologie nehmen. GTPasen der Ran-Gruppe steuern den Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern und die der Arf- und Rab-Familien den zellulären Vesikeltransport [20, 23].

Da viele der monomeren GTPasen mit Membranen assoziiert sind, weisen diese Untergruppen häufig posttranslationale Modifikationen auf, welche die Membranbindung beeinflussen. So erfahren die GTPasen der Ras-, Rho- und Rab-Subfamilien an der C-terminalen, zur GTPase-Domäne

befindlichen CaaX-Sequenz (C=Cystein, a=aliphatische Aminosäure, X=C-terminale Aminosäure) verschiedene Änderungen wie beispielsweise Isoprenylierungen oder Palmytilyierungen des Cysteins, Abspaltung der aaX-Sequenz, oder Carboxymethylierung des isoprenylierten Cysteinrestes. Im Gegensatz dazu weist die Arf-Untergruppe eine Modifizierung in Form einer Myristoylierung am N-Terminus auf und keine posttranslationalen Modifikationen an der CaaX-Sequenz. Die Ran Untergruppe besitzt im Gegensatz dazu weder am N-Terminus noch in der C-terminalen CaaX-Sequenz eine posttranslationalen Modifikation [23].

3.1.3 Sar1 als Schalter des anterograden Vesikel-Transports

3.1.3.1 Struktur von Sar1

Wie in 3.1.2 erwähnt fungiert die Arf-Familie kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie als Regulator für den vesikelgesteuerten Transport innerhalb der Zelle. Sar1 (*secretion-associated Ras-related 1*) wird aufgrund einer Sequenzidentität von 30-35 % ebenfalls zu dieser Untergruppe gezählt, da diese höher ist als im Vergleich zu anderen Familien der kleinen GTPasen (Ras und Rab, 20-25 %) [25]. Neben dieser Sequenzidentität rechtfertigt Sar1 auch funktionell die Zuordnung zur Arf-Untergruppe, da es den anterograden Vesikeltransport, der einen Teil des zellulären Vesikeltransports darstellt, (siehe 3.1.3.2) reguliert und initiiert [4, 26]. Ein weiteres Merkmal, das allen kleinen GTPasen gemeinsam haben, ist die GTP-Bindedomäne (Abbildung 1, Bild A).

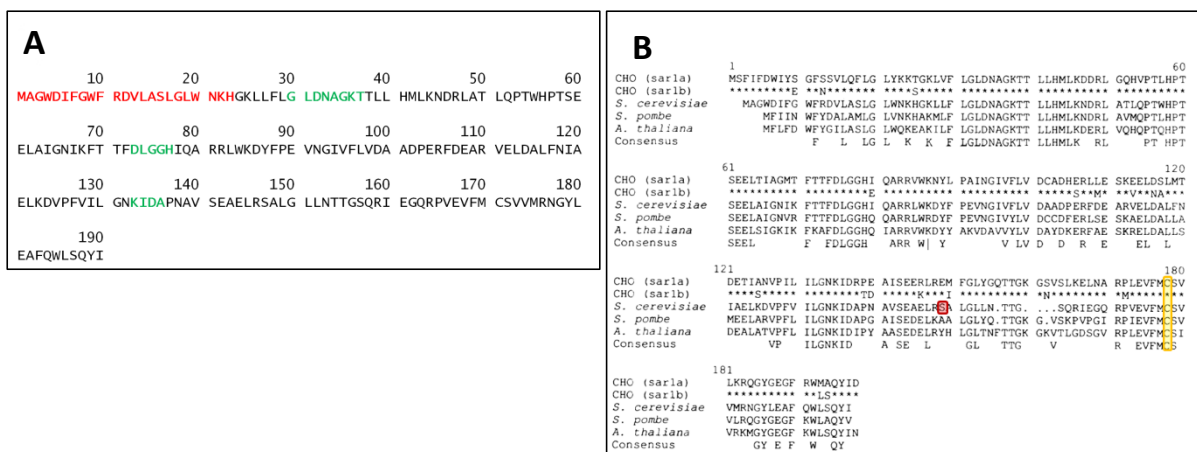


Abbildung 1: (Bild A) Aminosäuresequenz von Sar1p mit den Bereich der N-terminalen amphipathischen α-Helix (rot) sowie den Abschnitten, die die GTP-Bindedomäne bilden (grün)(in Anlehnung an 25, 28, 29). (Bild B) Aminosäuresequenzen verschiedener Sar1-Varianten unterschiedlicher Organismen im Vergleich. Gekennzeichnet sind das konservierte Cystein (gelb) im C-terminalen Bereich sowie das Serin im Hefeprotein an Position 147 (rot), welches zwischen den dargestellten Organismen und Proteinvarianten nicht konserviert ist (modifiziert nach 35).

Bezüglich der posttranslationalen Modifikation weist Sar1 gegenüber Arf1 sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. So besitzen beide Proteine keine Isoprenylierungen oder Palmytilyierungen des Cysteinsrests der CaaX-Sequenz. Allerdings existiert bei Arf1 eine Myristoylierung der N-terminalen amphipathischen α-Helix, die die Interaktion des Proteins mit der Membran unterstützt. Sar1 hingegen, dem dieser Myristoylanker fehlt, weist eine um neun Aminosäuren längere N-terminale amphipathische α-Helix auf [27].

Für die Untersuchungen von Proteinen mit bildgebenden Verfahren (z.B. Fluoreszenzmikroskopie) oder mit Einzelmolekülsensitiven Techniken (z.B. FCS) werden diese an einzelnen funktionellen Gruppen (z.B. Thiolgruppen von Cysteinen [30, 31] bzw. Aminogruppen von Lysin, Argininen oder der des N-Terminus [32]) modifiziert. Da alle Versuche mit Hefeproteinen durchgeführt wurden, beziehen sich alle weiteren Informationen/Überlegungen in diesem Abschnitt

bezüglich der Struktur auf das Sar1p. Da in diesem Protein nur ein Cystein existiert, dessen Thiolgruppe nicht bereits durch einen Isoprenyl- oder Palmitylrest blockiert ist, bietet dies bei einer möglichen Modifikation den Vorteil, dass diese spezifisch an einer Position an der Moleküloberfläche erfolgt.

Nach Abbildung 2 befindet sich dieses Cystein 171 allerdings eher in einer sterisch geblockten/gehinderten Umgebung, wodurch niedrige Markierungsausbeuten zu erwarten wären. Hinzu kommt die Nähe zur Membranbinderegion, die die Interaktion des Proteins mit ihr beeinflussen könnte. Eine Lösung bietet das Umsetzen des Cysteinrestes an eine andere, besser

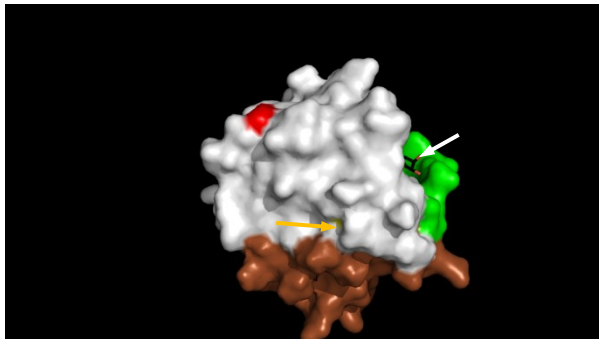


Abbildung 2: Oberflächenstruktur von Sar1p Δ N (Sar1-Variante aus Hefe ohne die N-terminale amphipathische α -Helix) mit dem Bindbereich zur Membran (■), dem Interaktionsbereich zu Sec23p (■), dem aktiven Zentrum (➔), dem nicht konservierten Serin an Position 147 (■) und dem konservierten Cystein an Position 171(➔) (erstellt mit Pymol 34, pdb-file: 1M2O).

exponierte Position im Protein. Dazu müsste das vorhandene Cystein entfernt und an Stelle einer anderen Aminosäure eingefügt werden. Grund dafür ist eine mögliche Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken welche Fehler bei der Proteinfaltung verursachen könnte. Nach [33] ist es allerdings möglich, das Cystein zu ersetzen, ohne dabei die katalytische Funktion von Sar1 zu verlieren. Auch die Stimulation durch das GAP (Sec23/24) bliebe bei diesem Aminosäureaustausch erhalten. Aufgrund des Raumbedarfs von Cystein sowie der Funktionalität stellt Serin einen guten Ersatz dar. In diesem Fall würde lediglich eine Thiolgruppe durch eine Alkoholgruppe ausgetauscht. Der Sequenzvergleich von Sar1p mit verschiedenen anderen Sar1 GTPasen aus verschiedenen Organismen (Abbildung 1, Bild B) zeigt, dass das Cystein 171 konserviert ist [35]. Von den vorhandenen Serinresten ist das an Position 147 (■) befindliche sowohl oberflächenexponiert als auch wenig konserviert. Weiterhin befindet es sich in einer Region des Proteins, die entfernt ist vom Bindbereich mit der Membran (■) bzw. dem mit dem GAP Sec23/24p (■).

3.1.3.2 Der COPII - Komplex

Sar1 ist wie die anderen GTPasen der Arf-Familie für die Regulation und Bildung von Transportvesikeln zuständig. Hierbei betrifft es Vesikel des sekretorischen Pfades, die vom ER abgeschnürt werden, um mit den Zisternen der *cis*-Seite des Golgi-Apparates zu fusionieren. Den Ausgangspunkt für die Bildung derartiger Transportvesikel stellen spezialisierte, ribosomenfreie Bereiche des ER (transitorisches ER, tER) dar [2, 36, 37]. Für einen effektiven Transport wird neben der Auswahl der richtigen Fracht und Aufkonzentrierung dieser auch sichergestellt, dass ER-ansässige Proteine dieses nicht mit den Transportvesikeln verlassen. Realisiert wird dieser Prozess letztlich durch die Lokalisation mehrerer Proteine, die einen Hüllkomplex um die sich bildenden Vesikel formen (COPII-Komplex) dessen Aufbau durch Sar1 eingeleitet wird [35, 38, 39, 40]. Dieser Komplex besteht aus minimal 5 verschiedenen Proteinkomponenten (Sar1, Sec23, Sec24, Sec13 und Sec31)[41].

Zu Beginn der Vesikel-Bildung liegt Sar1 als globuläres, lösliches Protein im Zytoplasma vor. Um die Vesikelbildung zu initiieren, muss es aus seiner inaktiven, GDP-gebundenen Form in eine aktive

Form gebracht werden. Wie bereits unter 3.1.1 erwähnt, ist für die Aktivierung der GTPasen ein Nucleotidaustausch notwendig, der seinerseits eine Konformationsänderung nach sich zieht. Im Fall von Sar1 wird der Austausch durch den transmembranen Guanidinaustaschfaktor (GEF) Sec12 beschleunigt. Dieser GEF stellt ein Glycoprotein dar, welches aus einer N-terminalen zyttoplasmatischen Domäne, einer Transmembrandomäne und einer glykosylierten Domäne im Lumen des ER besteht [42]. Bei *in vitro* Versuchen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die katalytische zyttoplasmatische Domäne von Sec12 (Sec12 Δ C), für die Rekrutierung von Sar1 an die ER-Membran und den damit verbundenen Nucleotidaustausch ausreichend ist [21]. Während dieses Nucleotidaustauschs erfährt Sar1 eine strukturelle Änderung, die dazu führt, dass die bis dahin in einer Tasche an der Proteinoberfläche befindliche amphipathische N-terminale α -Helix aus dieser heraus geklappt wird. Aufgrund der Tatsache, dass Sec12 ein Transmembranprotein des ER ist, erfolgt diese Konformationsänderung in unmittelbarer Nähe zur ER-Membran und ermöglicht so ein leichteres Einbetten des hydrophoben Teiles der Helix in die äußere Halbschicht der ER-Membran (Abbildung 3) [43, 44]. Durch diese Einlagerung werden die äußeren Lipide auseinandergedrückt, was nach dem nach dem Bilayer-Couple-Modell eine leichte Krümmung der Membran nach sich

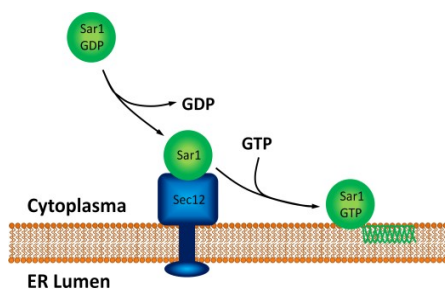


Abbildung 3: Aktivierung von Sar1 (●) durch den Austausch von GDP zu GTP. Diese Reaktion wird durch den GEF (Sec12 (■)) katalysiert. Da dieser Prozess in der Nähe der ER-Membran stattfindet, kann die amphipathische α -Helix in die äußere Monoschicht inserieren (in Anlehnung an 43).

zieht. Versuche mit Sar1-Varianten, denen die amphipathische Helix fehlt, haben ergeben, dass eine Vesikelbildung und anschließende Abschnürung nicht stattfinden kann [45].

Im weiteren Verlauf der Vesikelbiogenese wird das Heterodimer Sec23/24 zur Membran rekrutiert und bildet den inneren Hüllkomplex (*prebudding complex*). Beide Monomere unterscheiden sich dabei deutlich in ihren Sequenzen (Sequenzidentität 14 %) [46], obwohl sie bezüglich der Faltung und der vorhandenen Domänen Ähnlichkeiten aufweisen. Auch phylogenetisch sind beide Proteine miteinander verwandt [47]. Die Struktur von Sec23/24 ähnelt dabei einer Fliege (*bow tie*, Abbildung 4) mit einer konkaven inneren Oberfläche [37]. Diese kann sich wiederum sehr

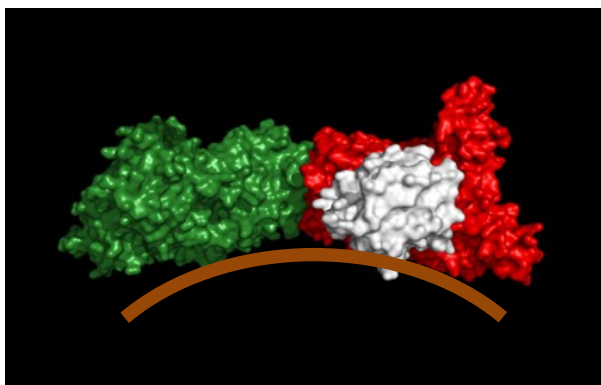


Abbildung 4: Proteinstruktur des inneren COPII-coat-Komplexes bestehend aus Sar1 (weiß), Sec23 (rot) und Sec24 (grün). Die konkave Form des Heterodimers Sec23/24 erzwingt bei Anlagerung an eine Membran (braun) eine Krümmung (erstellt mit Pymol 34, pdb-file: 1M20).

gut an Sar1 und die leicht gekrümmte Membran anlagern. Eine *trunk*-Domäne verknüpft dabei die einzelnen Monomere des Heterodimers. Eine Bindung von Sec23/24 an die Membran ohne Sar1 ist nur schwer möglich [45, 48], da der Sec23-Körper für die Bindung mit Sar1 um dessen ausgeklappte

Helix rotiert und zur *trunk*-Domäne gekrümmt vorliegt. Erst dadurch beschreibt die konkave Oberfläche des Heterodimers den gleichen Verlauf wie die gekrümmte Membran. [46]. Durch basische Aminosäurereste und positiv geladene Zinkfinger-Domänen (koordiniert durch Argininreste) wird die Bindung an negativ geladene Phospholipide zusätzlich verstärkt. Die bereits vorhandene Krümmung der Membran weiter dadurch weiter forciert und stabilisiert [37]. Darüber hinaus bindet Sec23 an Sar1 und GTP mit seinen β -*barrel*-, helikalen und gelsolinähnlichen Domänen und bewirkt als GTPase aktivierendes Protein (GAP) eine Steigerung der GTPase-Aktivität [49]. Dabei ragt der Argininrest 722 des Sec23 in das aktive Zentrum von Sar1 und bildet Wasserstoffbrücken mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen (Abbildung 5). Dies hat zur Folge, dass sich die negativen Ladungen um das Phosphoratom reduzieren, wodurch ein Angriff von

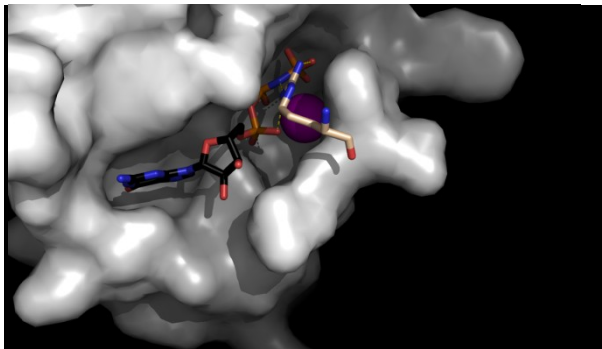


Abbildung 5: aktives Zentrum von Sar1 mit gebundenem Mg^{2+} (●) und einer nicht hydrolysierbaren Variante von GTP (GMP-PNP). Durch die Bindung an Sec23 wird ein Argininrest (Argininfinger ●) im aktiven Zentrum positioniert, der durch Wasserstoffbrückenbindungen die negativen Ladungen der Sauerstoffatome in den Phosphatresten abschwächt. (erstellt mit Pymol 34, pdb-file: 1M2O)

Wasser effizienter erfolgen kann [46, 50, 51]. Sec24 hingegen dient als Adapter für Transportgut, das spezifisch und selektiv mit den sich bildenden Vesikeln transportiert werden soll. Hier sind drei voneinander unabhängige Plattformen für die Bindung auf der Oberfläche lokalisiert, die durch die β -*barrel*-Domäne und einem Zinkfinger-Motiv erzeugt werden [45].

Als weiterer Schritt zur Bildung von Transportvesikeln erfolgt die Rekrutierung des Heterotetramers Sec13/31. Dadurch erfährt Sar1 eine weitere Stimulation seiner intrinsischen GTPase-Aktivität. Sec 13/31 fungiert dabei als äußere Hülle (*outer coat*) [48, 49, 52], die bezüglich ihrer Struktur flexibel aufgebaut ist. So haben *in vitro* Versuche zur Assemblierung von Sec13/31 gezeigt, dass sich das Heterotetramer bei Abwesenheit von Membranen und den anderen COPII-Proteinen zu käfigartigen Strukturen (Kuboktaeder) zusammenlagert [53]. In Gegenwart von tubulären Strukturen wiederum beschreibt Sec13/31 andere Geometrien, was zeigt, dass es sich hierbei um ein sehr flexibles und an die Erfordernisse (z. B. Vesikelgröße in Abhängigkeit von der zu transportierenden Fracht) angepasstes System handelt [54]. Beispielsweise verknüpfen sich Sec13/31 Heterotetramere zu rautenartigen Strukturen an der Oberfläche langer Röhren, wohingegen sie an deren Enden Dreiecke bilden [54]. Weiterhin vereint das Heterotetramer angrenzende Sec23/24-Komplexe, um damit Transportgut im reifenden Vesikel zu konzentrieren [48]. Die kontinuierliche Steigerung der Membrankrümmung durch die schrittweise Rekrutierung des inneren (Sec23/24) und äußeren *coat* (Sec13/31) sowie die Aktivierung der GTPase-Aktivität von Sar1 führt letztlich zur Abschnürung von Vesikeln mit einem Durchmesser von 50-90 nm [2, 48, 49]. Durch Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i gelangt Sar1 dabei wieder in seinen inaktiven Zustand zurück. Als Folge dessen wird die N-terminale amphipathische α -Helix in einer weiteren Konformationsänderung in die hydrophobe Tasche von Sar1 zurückbewegt. Die Verankerung mit der Membran wird gelöst und die GTPase liegt wieder als inaktives, zytosolisches Protein vor [55].

In Gegenwart von nichthydrolysierbaren Varianten des GTP (z.B. Guanylyl-5'-imidodiphosphat, GMP-PNP) wird der Prozess der Vesikelbildung während der Biogenese gestoppt [4, 52]. Anstelle der Vesikel entstehen tubuläre Strukturen, auf denen die COPII-Proteine angeordnet sind.

Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass diese Tubes teilweise in regelmäßigen Abständen eingeschnürt sind. Die Abstände dieser Einschnürungen (ca. 100 nm) entsprechen dabei in etwa der Größe der Transportvesikel, wie sie unter Hydrolysebedingungen entstehen (50 bis 90 nm) [2, 48, 49]. Außerdem ist neben der verdickten Membran (Indiz für den Einbau von Sar1 und Sec23/24) auch ein weiterer Bereich mit hoher Elektronendichte zu sehen. Dieser, unmittelbar neben der Membran befindliche, wird dem Sec13/31 zugeordnet[54].

3.2 Fluoreszenz

3.2.1 Grundprinzip

Als Fluoreszenz wird die Eigenschaft von Molekülen und Atomen bezeichnet, Photonen einer definierten Wellenlänge zu emittieren, unter der Voraussetzung, dass sie vorher angeregt worden sind. Neben der Phosphoreszenz stellt die Fluoreszenz ebenfalls eine Art der Lumineszenz dar, deren grundlegende Prozesse im nachfolgenden Jablonski-Diagramm (Abbildung 6) vereinfacht dargestellt sind.

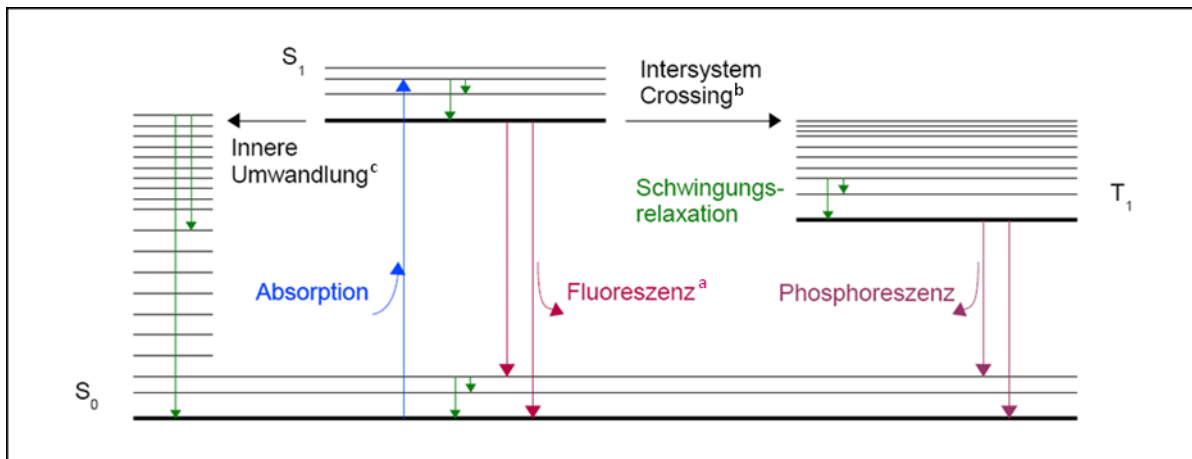


Abbildung 6: Jablonski-Diagramm, in dem die grundlegenden Vorgänge bei der Entstehung von Lumineszenz dargestellt sind. — symbolisieren dabei den elektronischen Grundzustand S_0 , sowie die beiden angeregten Zustände T_1 und S_1 . Zu jedem dieser einzelnen Energiezustände (S_0 , S_1 und T_1) existieren verschiedene Schwingungsenergieniveaus —. Strahlende Übergänge zwischen den Niveaus, sind als senkrechte Pfeile (Fluoreszenz, Phosphoreszenz) dargestellt. → zeigen strahlungslose Relaxation innerhalb eines Niveaus und → strahlungslose Übergänge zwischen den elektronischen Zuständen. Die Abgabe von Fluoreszenzlicht (a), das intersystem crossing auf höhere Schwingungsenergieniveaus des Triplettzustands (b) sowie die Innere Umwandlung auf höhere Schwingungsenergieniveaus des Singulettgrundzustands (c) stellen 3 Möglichkeiten dar, den ersten angeregten Singulettzustand zu verlassen (modifiziert nach [56]).

Werden Moleküle oder Atome mit Licht bestrahlt, dessen Energiegehalt größer oder gleich der Energiedifferenz zwischen dem ersten angeregten Singulettzustand (S_1) und dem Singulettgrundzustand (S_0) ist, so besteht die Möglichkeit, dass durch Absorption dieser Photonen und der damit verbundenen Energieaufnahme einzelne Elektronen vom Singulettgrundzustand (S_0) auf einen Singulettzustand höherer Energie wechseln können. Jedes dieser elektronischen Energieniveaus (—, Abbildung 6) besitzt wiederum verschiedene Schwingungsenergieniveaus (—, Abbildung 6), die von dem angeregten Elektron besetzt werden können. Dieser Wechsel zwischen den elektronischen Energieniveaus (S_0 zu S_1) läuft in einem Zeitintervall von 10^{-15} s ab, was zur Folge hat, dass nach dem Frank-Condon-Prinzip keine Änderung des Kernabstandes stattfindet. Befindet sich ein Elektron auf einem Schwingungsenergieniveau innerhalb von S_1 , so relaxiert es auf das niedrigste Schwingungsniveau des angeregten Zustandes (S_1) herab. Hierbei handelt es sich um einen strahlungslosen Prozess, bei dem die Anregungsenergie in Schwingungs- und Rotationsquanten umgewandelt und anschließend ins Medium abgegeben wird. Dadurch, dass dieser Prozess mit einer

Lebensdauer von 10^{-12} s ca. 10000-mal schneller abläuft, als die Fluoreszenzlebensdauer beträgt (10^{-8} s), erfolgt die Rückkehr in den Grundzustand (S_0) in der Regel von dem niedrigsten Schwingungsenergieniveau des angeregten Zustandes (Kashas Regel, [57]). Dabei existieren mehrere Möglichkeiten, wie diese Rückkehr erfolgen kann.

Zum einen ist eine Rückkehr in den Grundzustand durch Abgabe von Fluoreszenzphotonen möglich. Bei diesem Prozess besitzt das Elektron, welches angeregt wurde, einen dem Elektron aus dem Grundzustand entgegengesetzten Spin, womit eine Rückkehr nach dem Pauli-Prinzip möglich ist. Eine weitere Möglichkeit, das S_1 -Niveau zu verlassen, stellt das *intersystem crossing* in den ersten angeregten Triplet-Zustand (T_1) dar. Dabei erfolgt allerdings eine Spinumkehr des angeregten Elektrons, wodurch eine Rückkehr in den Grundzustand nach dem Pauli-Prinzip nicht erfolgen kann. Da der Triplet-Zustand (T_1) energetisch niedriger ist als der S_1 -Zustand, ist eine Rückkehr aus diesem ebenfalls nicht möglich. Um in den Grundzustand zurückkehren zu können, ist neben der Emission von Photonen auch eine erneute Spinumkehr notwendig. Diese Emission von Photonen aus dem T_1 -Zustand wird als Phosphoreszenz bezeichnet. Die Lebensdauer dieses angeregten Zustandes ist hierbei mit 10^{-3} bis 1 s deutlich größer als die des S_1 -Zustandes. Während ein Molekül im Triplet-Zustand verweilt, befindet es sich in einer Dunkelphase. Eine dritte im Jablonski-Diagramm (Abbildung 6) abgebildete Möglichkeit, das S_1 Niveau zu verlassen, besteht in der inneren Umwandlung. Dabei wechselt das Elektron vom S_1 -Niveau auf ein höheres Schwingungsniveau des Grundzustandes S_0 und relaxiert strahlungsfrei auf das niedrigste Schwingungsenergieniveau.

Weitere zusätzliche Möglichkeiten, in den Grundzustand zurückzukehren, sind strahlungslose Konkurrenzprozesse zur eigentlichen Emission von Fluoreszenzlicht (Quenchen). Dabei besteht die Möglichkeit, dass der Fluorophor durch Zusammenstöße mit dem Lösungsmittel relaxiert (dynamisches Quenchen) oder nichtfluoreszierende Komplexe (statisches Quenchen) bildet. Diese Prozesse sind jedoch meist reversibel und können bei geeigneter Wahl des Messsystems reduziert oder komplett unterdrückt werden. Einen irreversiblen Prozess stellt das sogenannte Photobleichen (*photo bleaching*) dar, wobei das Molekül dauerhaft im Dunkelzustand verbleibt. Grund dafür ist die teilweise Zerstörung der Molekülstruktur, z.B. in Form von Bindungsbrüchen durch zu hohe Lichtintensitäten.

In der Regel besitzt das Fluoreszenzlicht eine größere Wellenlänge und somit niedrigere Energie als das Anregungslicht. Das Fluoreszenzspektrum ist also im Vergleich zum Anregungsspektrum in

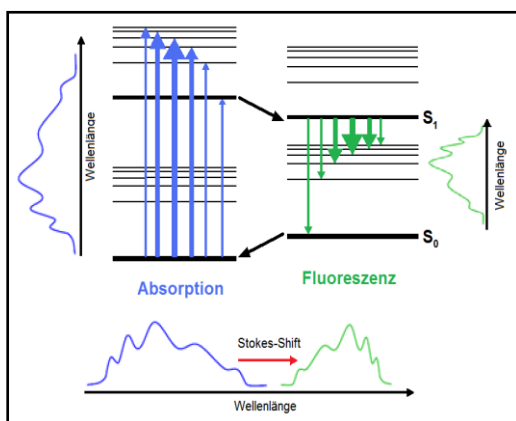


Abbildung 7: Schematische Darstellung des *Stokes-Shift*. Betrachtet werden dabei die Übergänge zwischen dem Grundzustand S_0 und dem ersten angeregten Zustand S_1 . Die Dicke der jeweiligen Pfeile (blau und grün) stellt dabei die Übergangswahrscheinlichkeit dar. Gleiche Übergangswahrscheinlichkeiten führen zu gleichen relativen *Peakhöhen*. (entnommen aus 58)

den längerwelligen Spektralbereich verschoben worden, was als *Stokes-Shift* bezeichnet wird (Abbildung 7) Ursache dafür ist die Reorientierung der den Fluorophor umgebenden Lösungsmittelmoleküle, wenn dieser angeregt wird. Diese Reorientierung benötigt ihrerseits Energie, die dem angeregten Fluorophor entzogen wird. Das hat eine energetische Absenkung des angeregten

Zustandes S_1 zur Folge und verursacht die Emission von Licht geringerer Energie bzw. größerer Wellenlänge. Da der Prozess der Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle im Bereich von 10^{-10} s geschieht, erfolgt die Absenkung des S_1 -Niveaus vor der Emission von Fluoreszenzlicht. Diese Verschiebung stellt eine wichtige Voraussetzung dar, Anregungs- und Emissionslicht durch wellenlängenabhängige Strahlteiler zu trennen, was z.B. bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie angewendet wird.

3.2.2 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

3.2.2.1 Allgemeiner Aufbau

Fluoreszenzmikroskopie ist ein in den Biowissenschaften häufig eingesetztes bildgebendes Verfahren. Dabei werden Proben, die mit Hilfe eines fluoreszierenden Moleküls (Fluoreszenzmarker, wie zum Beispiel synthetische Farbstoffe oder fluoreszierende Proteine wie des *green fluorescent protein*, GFP) markiert wurden, durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (Anregungswellenlänge) bestrahlt. Dieses Licht ist charakteristisch für den Fluoreszenzmarker und wird in der Regel von einem Laser abgegeben, über einen dichroitischen Spiegel auf die Probe geleitet und durch ein Objektiv fokussiert (Abbildung 8). Das Emissionslicht, welches von der Probe abgegeben wird, wird durch dasselbe Objektiv eingesammelt und über den dichroitischen Spiegel zum Detektor geleitet.

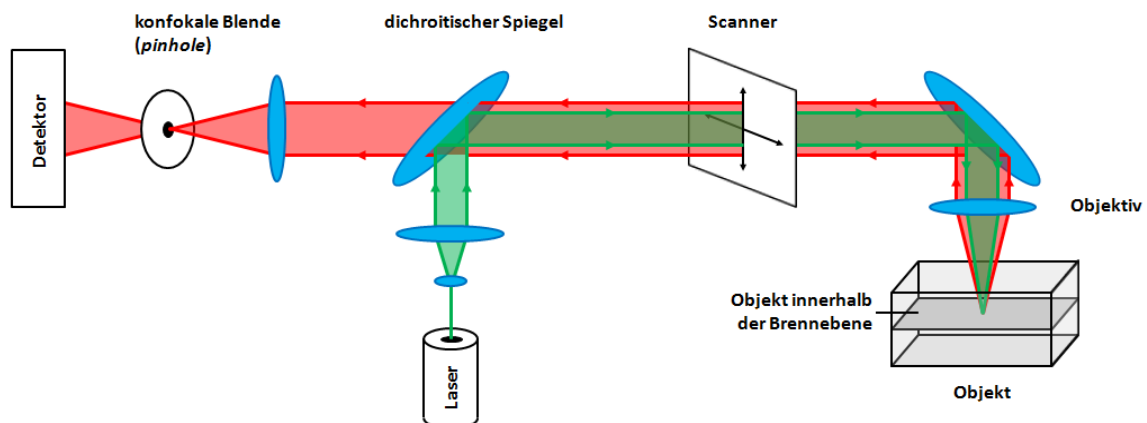


Abbildung 8: Grundprinzip eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (in Anlehnung an 59)

Dadurch liegen die beiden Foki der Punktlichtquelle und des Punktlichtdetektors aufeinander (konfokal). Aufgrund des *Stokes-Shift* (siehe 3.2.1) können das Anregungslicht und das Emissionslicht am dichroitischen Spiegel voneinander getrennt werden. Um die axiale Auflösung zu verbessern, wird vor dem Detektor eine Lochblende (*pinhole*) installiert, die dafür sorgt, dass nur Fluoreszenzlicht aus dem Fokusbereich detektiert wird. Licht der unteren und oberen Bildebenen wird dabei ausgeblendet. Da nur Licht innerhalb des Fokus analysiert werden kann, muss eine größere Probe Punkt für Punkt gescannt werden. Veränderungen in sehr kurzen zeitlichen Intervallen lassen sich dadurch nur bedingt abbilden. Ein Vorteil der konfokalen Technik besteht allerdings in der Möglichkeit, Informationen und Signale von einzelnen Fluorophoren zu untersuchen, die im gemittelten Signal einer klassischen Ensemble-Messung verborgen sind.

3.2.2.2 Fokusbeschreibung und Modelle

Die Ausdehnung des kombinierten Fokus aus Punktlichtquelle und Punktlichtdetektor kann durch ein dreidimensionales Gauß-Profil näherungsweise beschrieben werden (Gleichung [1]).

$$p(\vec{r}) = I_0 e^{\left[\frac{-2(x^2 + y^2)}{r_0^2} \right]} e^{\left(\frac{-2z^2}{z_0^2} \right)} \quad \text{Gleichung [1]}$$

$p(\vec{r})$ wird als Detektionsprofil bezeichnet, wobei \vec{r} die Position des Moleküls im Raum beschreibt. Das elliptische effektive Fokusvolumen wird durch die radiale (r_0^2) und axiale (z_0^2) Ausdehnung beschrieben, bei denen r_0 (bei $z=0$) bzw. z_0 (bei $r=0$) die Abstände vom Mittelpunkt darstellen, für die gilt:

$$p = I_0 \frac{1}{e^2} \quad \text{(Abbildung 9)}$$

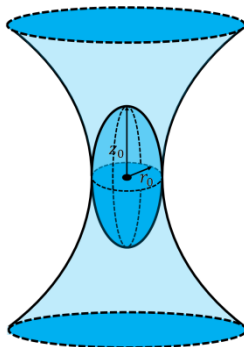


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Detektionsvolumens eines konfokalen Mikroskops.

Nach [56] ergibt sich ein effektives Fokusvolumen gemäß Gleichung [2].

$$V = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0 \quad \text{Gleichung [2]}$$

Da in einem konfokalen System die Auflösung beugungsbegrenzt ist, ergeben sich für die Ausdehnung r_0 in Abhängigkeit von der Wellenlänge des verwendeten Anregungslichts Größenordnungen von einigen 100 nm. Die Ausdehnung von z_0 hängt vom Durchmesser des *pinhole* ab und beträgt einige μm . Anhand dieser Dimensionen ergibt sich gemäß Gleichung [2] ein effektives Fokusvolumen im Bereich von < 1 fl.

Um ein einzelnes Fluorophor zu detektieren, ist ein möglichst hohes Signal zu Rausch-Verhältnis notwendig. Das Rauschen ist dabei abhängig von der Anzahl der in Lösung vorhandenen Moleküle und wird durch eine Reduktion des Detektionsvolumens ebenfalls reduziert. Dadurch wird es möglich, die Fluoreszenzsignale eines einzelnen Fluorophors in Lösung zu detektieren.

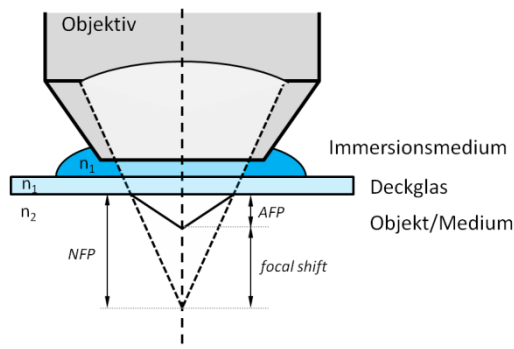


Abbildung 10: Prinzipieller Strahlenverlauf innerhalb des Immersionsmediums, des Deckglases und der Probe. Aufgrund der Unterschiede in den Brechungsindizes des Immersionsmediums (n_1) und der Analytenumgebung (n_2) entsteht ein Unterschied zwischen der theoretischen z -Position des Fokus (*nominal focus position*, NFP) und der tatsächlichen (*actual focus position*, AFP), die als *focal shift* bezeichnet wird (modifiziert nach 61)

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist das Immersionsmedium, da es einen Einfluss auf die Aberration (sphärisch als auch chromatisch) sowie die Lage und Gestalt des konfokalen Volumens haben kann

[61]. Grund dafür sind Unterschiede im Brechungsindex des Immersionsmediums im Vergleich zur Probe, die letztlich dazu führen, dass die erwartete Z-Position nicht der tatsächlichen entspricht (Abbildung 10).

3.2.3 Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)

3.2.3.1 Allgemeine Herleitung der Autokorrelationsfunktion

Gegenstand der FCS ist die Analyse von zeitabhängigen Schwankungen der Intensität eines Fluoreszenzsignals [62]. Diese Schwankungen stellen das Resultat dynamischer Prozesse, wie beispielsweise translatorische Diffusion eines Moleküls durch den Fokus, Rotationsdiffusion, photophysikalische Prozesse oder interne Dynamik, dar. Dabei liefert die Korrelation des detektierten Signals über ein definiertes Zeitintervall Informationen über die temporären Abläufe der oben beschriebenen Prozesse sowie die Anzahl der davon betroffenen Moleküle.

Die Fluktuation $\delta F(t)$ des Fluoreszenzsignals $F(t)$ wird dabei definiert als:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad . \quad \text{Gleichung [3]}$$

Aus den Fluktuationen kann die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ berechnet werden.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 = \frac{\langle F(t) F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad . \quad \text{Gleichung [4]}$$

Unter Berücksichtigung der Fokusbeschreibung durch ein dreidimensionales Gauß-Profil (Gleichung [1]) kann die Autokorrelationsfunktion gemäß [56] beschrieben werden als

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{r_0^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_0^2} \right)^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad . \quad \text{Gleichung [5]}$$

D entspricht dabei dem Diffusionskoeffizienten, N der mittleren Teilchzahl im Fokusvolumen, r_0 der radialen und z_0 axialen Ausdehnung des Fokusvolumens. Durch Ersetzen von r_0^2

$$r_0^2 = \tau_D 4D \quad \text{Gleichung [6]}$$

und z_0^2

$$z_0^2 = S^2 r_0^2 = S^2 \tau_D 4D \quad \text{Gleichung [7]}$$

in Gleichung [5] erhält man

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} + 1 \quad . \quad \text{Gleichung [8]}$$

Diese beschreibt die charakteristische Abklingkurve für eine Fluoreszenzautokorrelation bei dreidimensionaler translationaler Diffusion. Im Fall einer zweidimensionalen Diffusion reduziert sich Gleichung [5] zu

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{r_0^2}\right)^{-1} + 1 \quad . \quad \text{Gleichung [9]}$$

Auch hier lässt sich r_0^2 (Gleichung [6]) in Gleichung [9] ersetzen zu

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} + 1 \quad . \quad \text{Gleichung [10]}$$

Gleichung [10] beschreibt die charakteristische Abklingkurve für eine Fluoreszenzautokorrelation bei zweidimensionaler translationaler Diffusion.

Mit Hilfe der Stokes-Einstein Relation (Gleichung [11]) können die Diffusionskoeffizienten D kleiner globulärer Makromoleküle (z.B. Proteine) bei dreidimensionaler Diffusion mit dem hydrodynamischen Molekülradius R_0 in Verbindung gebracht werden

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_0} \quad . \quad \text{Gleichung [11]}$$

Dabei stellen T die Temperatur des Mediums, k_B die Boltzmannkonstante und η die dynamische Viskosität des Mediums bei gegebener Temperatur T dar.

3.2.3.2 Triplettdynamik und Afterpulsing

Wie in 3.2.1 erwähnt, existieren für ein Elektron im ersten angeregten Zustand (S_1) neben der Abgabe von Fluoreszenzlicht noch weitere Möglichkeiten, das S_1 -Niveau zu verlassen und in den Grundzustand zurückzukehren. Eine davon, bei dem das Elektron vom Singulettzustand (S_1) in den Triplettzustand wechselt, sorgt dafür, dass der Fluorophor in eine Art Dunkelzustand versetzt wird und kein Fluoreszenzlicht abgeben kann. Dies hat Auswirkungen auf die Autokorrelationsfunktion, bei der sich die Amplitude aufgrund der geringeren Anzahl an Fluorophoren, die Fluoreszenzlicht abgeben können, erhöht. Weiterhin führt es zu einer regelmäßigen Fluktuation des Signals, bei der ein Hell-Dunkel-Zyklus eine gewisse Zeit (Tripletzeit, τ_T) dauert. Für den Fall, dass translationale Diffusion und Triplettdynamik auf deutlich (um mehrere Größenordnungen) verschiedenen Zeitskalen stattfinden, gelten folgende Ausdrücke für die Korrelationsfunktion [63]

$$G(\tau) = \frac{1}{N(1 - T_T)} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \left(1 - T_T + T_T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}\right) + Off \quad \text{Gleichung [12]}$$

für dreidimensionale Diffusion und

$$G(\tau) = \frac{1}{N(1 - T_T)} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 - T_T + T_T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}\right) + Off \quad \text{Gleichung [13]}$$

für zweidimensionale Diffusion. Dabei entspricht T_T dem Anteil an Fluorophoren, die sich im Tripletzustand befinden, τ_T ist die Tripletzeit und Off einem Offset, der die Verschiebung der Korrelationskurve in Y-Richtung u.U. korrigiert. Wenn keine Verschiebung vorhanden ist, beträgt dieser Offset den Wert 1. Die Notwendigkeit für einen Offset besteht in der Änderung der mittleren Signalintensität während der Z-Scan-FCS-Messung (siehe 3.2.4).

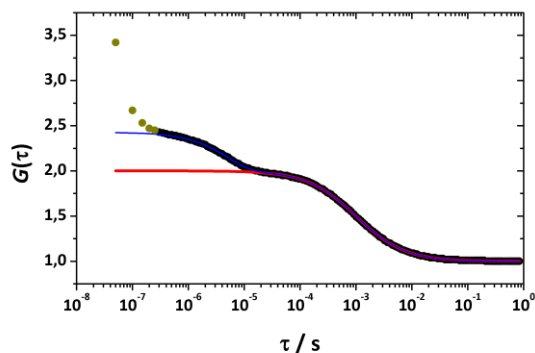


Abbildung 11: Autokorrelationskurve mit translationalem Diffusionsanteil (—), Tripletanteil (—) und Afterpulsing(●).

Aufgrund von Rückkopplung besteht für jedes detektierte Fluoreszenzphoton eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass der Detektor im Anschluss einen weiteren Impuls abgibt. Dieser Effekt wird als *Afterpulse* bezeichnet und ist abhängig von der Art des Detektors [64]. *Afterpulsing* hat ebenfalls einen Einfluss auf den Verlauf der Autokorrelationsfunktion, da er im Zeitbereich kleiner 10⁻⁶ Sekunden deren Amplitude deutlich erhöht (Abbildung 11).

3.2.4 Z-Scan-FCS

Wie in 3.2.3 ff. erläutert, findet die FCS Anwendung bei der Aufklärung von Dynamiken auf molekularer Ebene. Dabei werden in der Regel Prozesse betrachtet, die in räumlicher Umgebung stattfinden und durch dreidimensionale Diffusionsmodelle beschrieben werden (z.B. Proteinfaltung [65, 66, 67] oder Bewegung von Proteinkomplexen [68] sowie DNA-DNA-Interaktionen in Lösung [69]).

Einen Unterschied stellt die Untersuchung von molekularen Vorgängen an Grenzflächen dar, wie sie beispielsweise bei Protein-Membran-Interaktionen vorliegen. In diesem Fall werden zweidimensionale Diffusionen analysiert [70, 71]. Dies hat zur Folge, dass die Position des Fokus zum Analyten/der Grenzfläche einen Einfluss auf die Auswertung der FCS-Parameter (N und τ_D) zeigt (Abbildung 12). Grundsätzlich kann das Anregungsprofil (Abbildung 12, Bild A) durch den fokussierten Laserstrahl auch als fokussierter Gaußstrahl beschrieben werden [60]. Das bedeutet, dass bei Messungen oberhalb und unterhalb des Fokuszentrums eine größere Anregungsfläche zu Grunde liegt, als bei Messungen im Zentrum. So beschreiben N sowie τ_D einen parabolischen Verlauf in

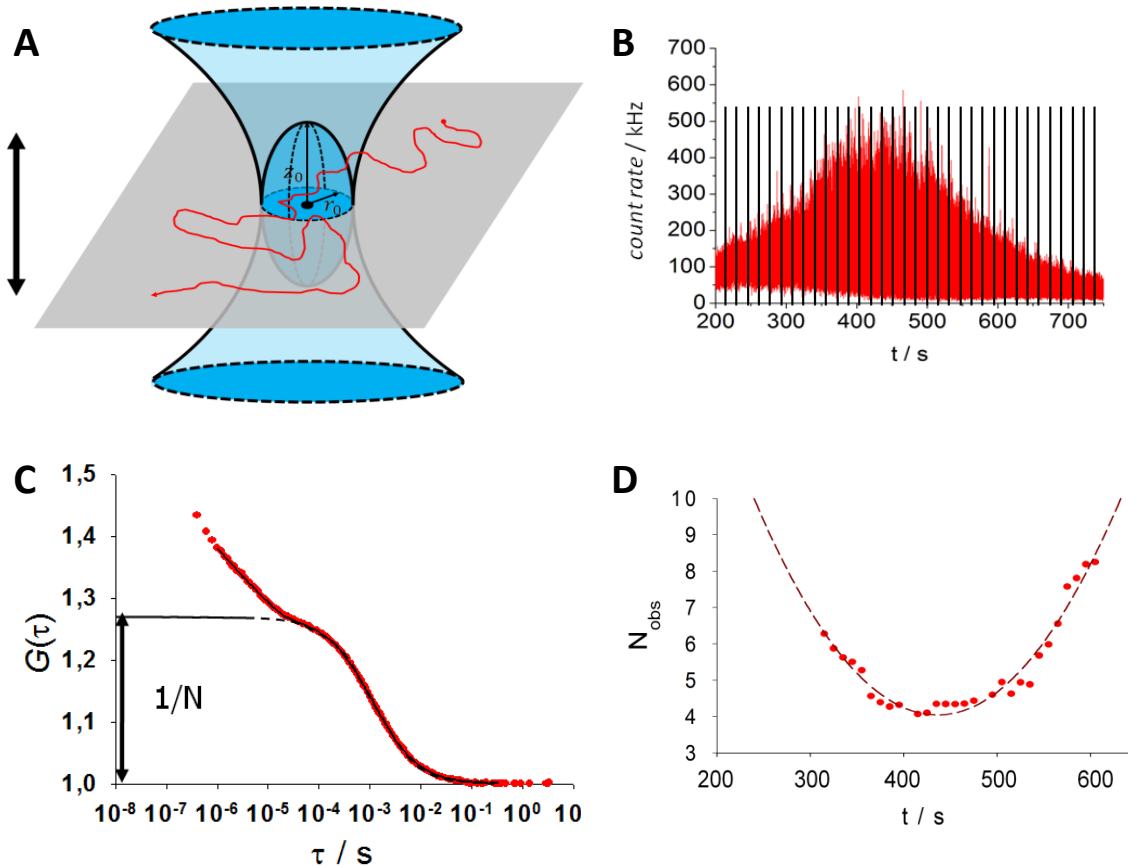


Abbildung 12: Auswertungsstrategie von zeitabhängigen Z-Scan-FCS-Daten (gemäß 70) am Beispiel der mittleren Teilchenzahl im Fokus. (Bild A) Bewegung einer Grenzfläche (■) (z.B. Aufgrund der Verdunstung der Subphase, auf der diese präpariert wurde) durch das konfokale Detektionsvolumen (■). Während dieser Migration diffundieren Fluorophore innerhalb dieser Grenzschicht durch den Fokus (—). (Bild B) Peak-förmige Kurve der Fluktuationssignale (—) von Fluorophoren innerhalb der planaren Schicht, die sich durch das konfokale Detektionsvolumen bewegt. Diese wird in mehrere gleichgroße Segmente zerlegt (—). (Bild C) Signale von jedem der Segmente werden autokorreliert (•) und gemäß Gleichung [13] angepasst (—). (Bild D) Die so aus jeder Korrelationskurve bestimmten mittleren Teilchenzahlen beschreiben bei der Auftragung gegen die Migrationszeit des zugehörigen Segmentes einen parabolischen Verlauf (•). Dieser wiederum kann durch ein Polynom zweiten Grades angenähert werden (—), dessen Minimum der mittleren Teilchenzahl in der Äquatorialebene des konfokalen Volumens entspricht. Im Falle von τ_D ist die Vorgehensweise analog.

Abhängigkeit von der axialen Position innerhalb des Detektionsfokus [72]. Die Signalintensität hingegen zeigt in Abhängigkeit von der Z-Position einen glockenkurvenartigen Verlauf. Aus diesen Betrachtungen folgt, dass die ermittelten FCS-Parameter eine Abhängigkeit von der jeweiligen Z-Position innerhalb des konfokalen Volumens zeigen. Um mehrere parallele Messungen vergleichen zu können, ist es notwendig, diese auf eine Z-Position (Äquatorialebene) innerhalb des konfokalen Volumens zu beziehen. Dies lässt sich beispielsweise realisieren, indem Grenzflächen, die in der axialen Position gezielt bewegt werden können (z.B. Phospholipid-Monoschichten an Luft-Puffer-Grenzflächen) durch Pumpen, Absaugen oder Verdunsten der Subphase letztlich durch den Fokus „wandern“ (zeitabhängige Z-Scan-FCS, [70]). Das Ergebnis dieses kontinuierlichen Durchwanderns zeigt eine Fluktuationsskurve mit einem glockenkurvenförmigen Charakter (Abbildung 12, Bild B). Durch Zerlegung dieser Fluktuationsskurve in kleine Segmente und deren jeweiligen Analyse nach Gleichung [12] (für ein zweidimensionales Diffusionsmodell, Abbildung 12, Bild C) lassen sich abhängig von der Z-Position die Parameter N und τ_D bestimmen. Werden die so ermittelten Parameter gegen die Messzeit t aufgetragen, ergibt sich der bereits erwähnte parabolische Verlauf, dessen Minimum die jeweiligen Parameter im Zentrum des konfokalen Volumens wiedergibt

(z.B. Auswertung der mittleren Teilchenzahl im Fokus N , Abbildung 12, Bild D). Eine andere Möglichkeit, die Grenzfläche durch den Fokus zu bewegen, besteht darin, dass diese konstant gehalten wird und der Fokus in definierten Schritten entlang der Z-Achse bewegt wird. Die bei jedem Schritt erhaltenen Fluktuationskurven ergeben ebenfalls ein in Abbildung 12, Bild B vergleichbares Profil. Aus jedem dieser Abschnitte können analog zur Variante mit kontinuierlichem „Durchwandern“ N und τ_D bestimmt werden. Auch hier zeigt die Auftragung der jeweiligen Fitparameter (N und τ_D) gegen die Z-Position einen parabolischen Verlauf [70].

In [70] wurde weiterhin gezeigt, dass die Z-Scan-FCS-Analyse von Vesikeln, die auf Borosilikatglas gespreitet wurden, bezüglich der Minima der Fitparameter (N und τ_D) in Abhängigkeit ihrer Z-Position nicht identisch sind mit der Z-Position, bei der die höchste Signalintensität gemessen wurde. Die Größe dieser Verschiebung zwischen dem Maximum der Intensität auf der einen Seite und dem Minimum der Fitparameter auf der anderen Seite ist abhängig von der Art und Dicke des Trägermaterials [70]. Derartige Effekte sind somit bei Systemen zu erwarten, bei denen die zu analysierende Grenzfläche zusätzlich auch eine Trennung zweier Medien verursacht, die unterschiedliche optische Brechungsindizes aufweisen (z.B. Phospholipidmonoschicht, Wasser/Luft; gespreitete Lipide auf Trägermaterial, Wasser/Glas).

3.2.5 Bestimmung von molekularen Insertionsflächen in Monoschichten

Die Kombination einer Langmuir-Filmwaage mit einem konfokalen Mikroskop ermöglicht es, durch Anwendung des Z-Scan-FCS-Verfahrens (3.2.4) die Anzahl der Moleküle zu bestimmen, die sich an einer Monoschicht befinden. Unter der Annahme, dass sich alle Moleküle gleichmäßig auf der gesamten Oberfläche der Monoschicht verteilen, kann mit Hilfe der bestimmten Teilchenzahl bei einer gegebenen Fokusfläche (siehe Abbildung 12) und der gemessenen Flächenänderung während der Interaktionsphase die molekulare Interaktionsfläche gemäß

$$A_{\text{mol}} = \frac{\Delta A}{\frac{A_{\text{ges}}}{A_{\text{Fokus}}} N_{\text{min}}} X \quad \text{Gleichung [14]}$$

bestimmt werden. Dabei stellen ΔA die Flächenänderung vom Beginn der Proteininteraktion bis hin zum Zeitpunkt der FCS-Messung, A_{ges} die absolut gemessene Oberfläche zwischen den Barrieren zum Zeitpunkt der FCS-Messung, A_{Fokus} die im Rahmen der Systemkalibrierung ermittelte Fläche der Äquatorialebene des konfokalen Volumens, N_{min} die minimale Teilchenzahl im Fokus (siehe 3.2.4 ff.) und X den Dotierungsgrad dar.

Alternativ ist es auch möglich, die molekulare Interaktionsfläche über die Verdrängung der vorhandenen Monoschichtkomponenten durch Z-Scan-FCS zu berechnen. Voraussetzung dafür ist, dass dabei sowohl die Monoschicht als auch die inserierenden Moleküle durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Unter der Annahme, dass sich alle Moleküle in der Grenzfläche gleichmäßig verteilen, lässt sich der Platzbedarf der inserierten Moleküle durch die Differenz der Teilchenzahl der markierten Monoschichtkomponenten vor und nach der Insertion gemäß

$$\Delta A_1 = \left(\frac{A_{\text{FokusMono}}}{N_{\text{MonoA}}} \right) (N_{\text{MonoA}} - N_{\text{MonoB}}) \quad \text{Gleichung [15]}$$

berechnen. Durch Bestimmung der Teilchenzahl der inserierten Moleküle (z.B. Proteine) nach der Insertionsphase gemäß

$$N_{\text{Insert}} = \left(\frac{A_{\text{FokusMono}}}{A_{\text{FokusInsert}}} \right) \left(\frac{N_{\text{minInsert}}}{X} \right) \quad \text{Gleichung [16]}$$

lässt sich mit Hilfe von Gleichung [15] und Gleichung [16] die molekulare Interaktionsfläche nach

$$A_{\text{mol}} = \frac{\Delta A_1}{N_{\text{Insert}}} = \left(\frac{N_{\text{MonoA}} - N_{\text{MonoB}}}{N_{\text{MonoA}}} \right) \left(\frac{A_{\text{FokusInsert}}}{N_{\text{minInsert}}} \right) X \quad \text{Gleichung [17]}$$

berechnen. Dabei werden die unterschiedlichen Fokusflächen der beiden Detektionskanäle in Gleichung [16] berücksichtigt. $A_{\text{FokusMono}}$ stellt die Fokusfläche des Detektionskanals dar, in dem die Fluoreszenz der markierten Monoschichtkomponenten gemessen wird, und N_{MonoA} die Anzahl markierter Monoschichtkomponenten im Fokus vor der Insertion. Der Quotient aus beiden entspricht der Fläche eines mittleren „Clusters“ der Monoschichtkomponenten, welches aus einem fluoreszenzmarkierten Molekül und, gemäß dem Mischungsverhältnis der eingesetzten Lösung, entsprechend vielen anderen Molekülen besteht. Es wird davon ausgegangen, dass sich diese einzeln und unabhängig voneinander bewegen, sodass sie kein echtes Cluster oder Aggregat gebildet wird. Diese Fläche wird während des Insertionsexperimentes als konstant angenommen. N_{MonoB} stellt die Anzahl von markierten Monoschichtkomponenten im Fokuszentrum nach der Insertion dar. $A_{\text{FokusInsert}}$ bezeichnet die Fokusfläche des Detektionskanals, in dem die Fluktuationen der inserierten Moleküle gemessen werden, $N_{\text{minInsert}}$ die Anzahl an markierten inserierten Molekülen im Zentrum des konfokalen Volumens und X den Dotierungsgrad der inserierten Moleküle. Es wird davon ausgegangen, dass markierte und nichtmarkierte Moleküle in gleicher Weise in die Monoschicht inserieren.

3.3 Tensiometrie

Die Tensiometrie bezeichnet eine Technik zur Messung der Oberflächenspannung σ an der Grenzfläche der flüssigen Subphase zur umgebenden Luft. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Messprinzip, nämlich die Kraftmessung nach der Plattenmethode (Wilhelmy), wird die Kraft F gemessen, die sich durch die Benetzung einer senkrecht aufgehängten Platte ergibt. Lagern sich Substanzen an der Luft/Subphasen-Grenzfläche an, so verändern sie die Oberflächenspannung der Subphase (σ_{Substanz}). Diese Differenz der Oberflächenspannung der reinen Subphase und der Oberflächenspannung der Subphase in Gegenwart grenzflächenaktiver Substanzen wird als lateraler Oberflächendruck π bezeichnet

$$\pi = \sigma - \sigma_{\text{Substanz}} \quad \text{Gleichung [18]}$$

Diese Änderung in Form des lateralen Oberflächendruckes π kann zum einen durch Aufsetzen (Spreiten) von amphiphilen Molekülen (z.B. Phospholipide) erreicht werden, die sich ausschließlich an dieser Luft/Subphasen-Grenzfläche anlagern (Langmuir-Monoschicht). Zum anderen ist es

möglich, dass wasserlösliche Moleküle eine Monoschicht aufbauen, indem sie sich sowohl in der wässrigen Subphase als auch an der Luft/Subphasen-Grenzfläche befinden und zwischen beiden in einem dynamischen Gleichgewicht stehen (Gibbs-Monoschicht).

3.3.1 Grundsetup und Vergleich verschiedener Langmuir-Tröge

Das Standardsetup zur Bestimmung des Oberflächendruckes π besteht aus einem flachen, temperierten Becken (Langmuir-Trog), welches verschiedene geometrische Grundformen aufweisen kann (rechteckig, rund; Abbildung 13). Als Material, welches den Trog auskleidet, wird in der Regel Teflon verwendet, da es chemisch inert ist und abweisende Eigenschaften gegenüber hydrophilen und hydrophoben Systemen besitzt. In diesen wird die Subphase hineingefüllt.

Zur Erzeugung einer Monoschicht mit einem definierten Oberflächendruck gibt es wiederum zwei Möglichkeiten. Zum einen können wenige amphiphile Moleküle auf die Subphasenoberfläche

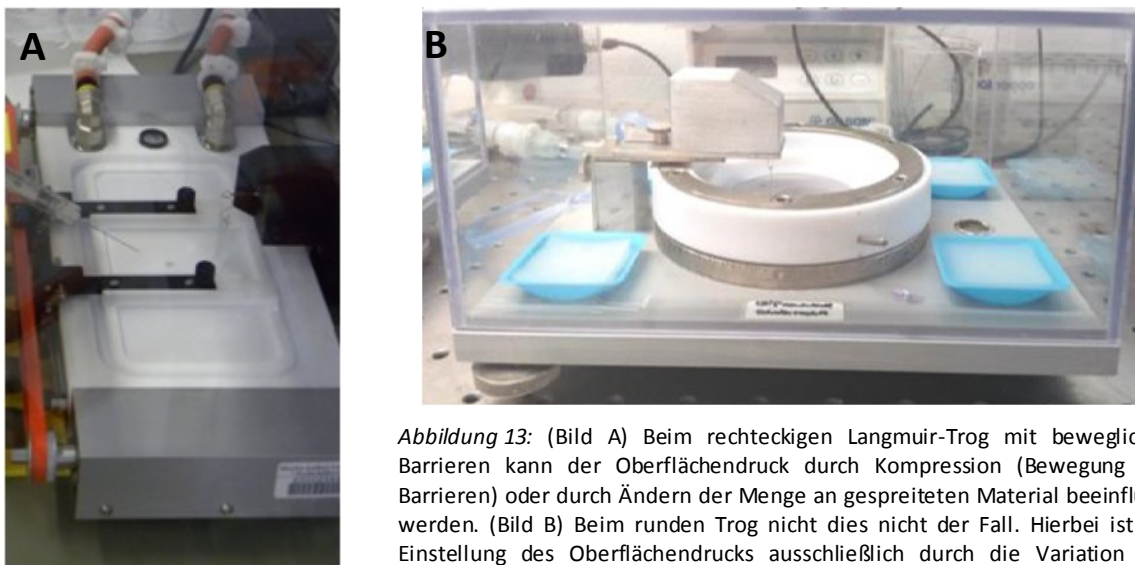


Abbildung 13: (Bild A) Beim rechteckigen Langmuir-Trog mit beweglichen Barrieren kann der Oberflächendruck durch Kompression (Bewegung der Barrieren) oder durch Ändern der Menge an gespreitetem Material beeinflusst werden. (Bild B) Beim runden Trog ist dies nicht der Fall. Hierbei ist die Einstellung des Oberflächendruckes ausschließlich durch die Variation der Menge an gespreitetem Material möglich.

gespreitet und diese dann mit Hilfe von beweglichen Barrieren (Abbildung 13, Bild A) soweit komprimiert werden, bis der gewünschte Oberflächendruck erreicht ist. Zum anderen ist es möglich, solange Moleküle auf die Subphasenoberfläche zu spreiten, bis diese eine Monoschicht ausbilden. Je mehr Moleküle auf die Oberfläche aufgetragen werden, desto mehr ändert sich die Oberflächenspannung der Subphase und somit auch der Oberflächendruck. Dieses Prinzip stellt bei Langmuir-Filmwaagen ohne bewegliche Barrieren (Abbildung 13, Bild B) eine Möglichkeit dar, den gewünschten Oberflächendruck zu erreichen.

3.3.2 Kraftmessung nach der Plattenmethode von Wilhelmy

Mit Hilfe der Plattenmethode nach Wilhelmy soll die Oberflächenspannung σ an der Grenzfläche Luft/Subphase über einen Zeitraum t gemessen werden. Die Oberflächenspannung σ ist aus thermodynamischer Betrachtung die partielle Ableitung der freien Enthalpie G nach der Oberfläche A_0 bei konstantem Druck p und konstanter Temperatur T (Gleichung [19])

$$\sigma = \left(\frac{\partial G}{\partial A_0} \right)_{T,p} \quad \text{Gleichung [19]}$$

Bei der Plattenmethode wird ein in seiner Form definierter geometrischer Körper (Wilhelmy-Plättchen) aus Platin oder, wie in dieser Arbeit verwendet, aus Filterpapier senkrecht zur Luft/Subphasen-Grenzfläche in die Subphase hineingetaucht (Abbildung 14). Dabei wird die am

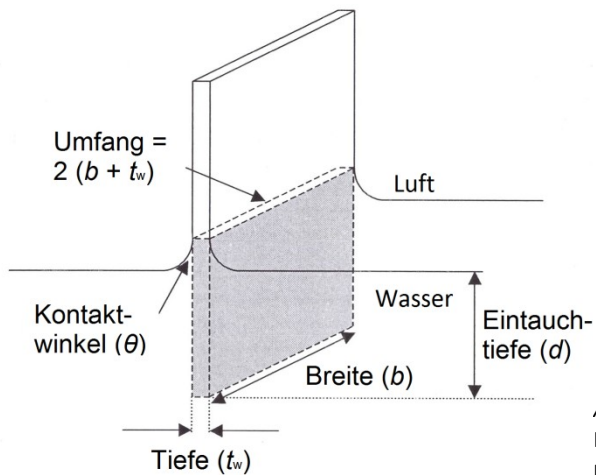


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Wilhelmy-Plättchens (Filterpapier) in der Subphase (modifiziert nach [74])

Plättchen wirkende Kraft F_W gemessen, welche sich aus drei Teilkomponenten (Gleichung [20]) θ

$$F_W = [F_G] - [F_a] + [2 F_M] = [\rho_P l b t_W g] - [\rho_S d b t_W g] + [2(b + t_W) \sigma \cos \theta] \quad \text{Gleichung [20]}$$

zusammensetzt. Hier sind F_G die Gewichtskraft des Wilhelmy-Plättchens, F_a der Auftrieb sowie F_M die Gewichtskraft des sich bildenden Meniskus an der Kontaktfläche von Subphase (Dichte ρ_S) und Wilhelmyplättchen. Das Wilhelmyplättchen wird durch seine Länge l , seine Breite b , seiner Tiefe t_W sowie seiner Dichte ρ_P beschrieben. Aufgrund seiner Rauigkeit und Saugfähigkeit führt das Filterplättchen dazu, dass der Wassermeniskus in einem sehr kleinen Kontaktwinkel θ am Plättchen anliegt ($\theta \sim 0^\circ$). Weiterhin kann die Gewichtskraft des Wilhelmyplättchens (nachdem es sich vollständig mit der Subphase vollgesogen hat) als konstant angenommen werden. Anders als bei Systemen mit stationären Kraftmessern, bei denen die Eintauchtiefe d des Wilhelmyplättchens

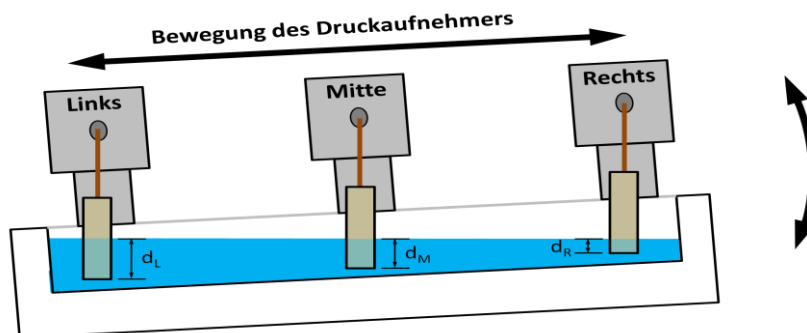


Abbildung 15: Schematisch Darstellung der Eintauchtiefen des Wilhelmy-Plättchens während der Bewegung des Druckaufnehmers bei einem schief ausgerichteten Langmuir-Trog.

ebenfalls als konstant angenommen werden kann, ist dies bei einem System mit Kraftmessern, die parallel zur Grenzfläche bewegt werden, nicht zwangsläufig der Fall (Abbildung 15). Wenn die Filmwaage nicht parallel ausgerichtet ist, verändert sich d , da es auf der einen Seite in die Subphase hineingedrückt und auf der anderen Seite herausgezogen wird. Ändert sich nun die Oberflächenspannung der Subphase σ , so verändert sich auch die Kraft des Meniskus F_M . Damit die gemessene Änderung der Kraft F auch wirklich nur der Änderung der Kraft des Meniskus F_M (und damit der Änderung von σ) entspricht, müssen demnach die Gewichtskraft des Wilhelmyplättchens und der Auftrieb des Systems konstant sein. Das heißt, dass die Filmwaage horizontal ausgerichtet werden muss.

3.3.3 Adsorption von Molekülen aus der Subphase

Neben der Analyse von amphiphilen Molekülen auf der Subphasen/Luft-Grenzfläche werden auch Substanzen untersucht, die aus der wässrigen Subphase heraus mit der Grenzfläche bzw. den darauf befindlichen Molekülen interagieren. Dazu wird die zu untersuchende Substanz unterhalb der Subphasengrenzfläche injiziert und durch langsames, aber gleichmäßiges Rühren in dieser verteilt (Abbildung 16). Ist die zu untersuchende Substanz grenzflächenaktiv, so interagiert sie letztlich (bedingt durch Diffusions- und Konvektionsprozesse) mit der Grenzfläche, indem sie sich an dieser anlagert und dadurch die Oberflächenspannung σ verändert. Dieser Vorgang erreicht ein

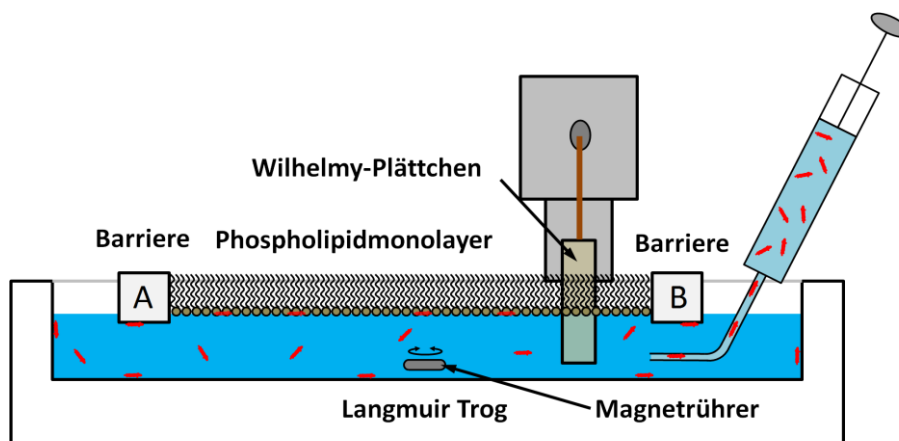


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Verhaltens von Molekülen, die in die Subphase injiziert werden und anschließend mit der Monoschicht interagieren (in Anlehnung an 75).

dynamisches Gleichgewicht, welches von der substanzspezifischen Sättigungskonzentration Γ abhängt

$$\Gamma = \frac{n_i}{A_0} \quad \cdot \quad \text{Gleichung [21]}$$

Dabei entsprechen n_i der Stoffmenge der adsorbierten Substanz und A_0 der Oberfläche. Durch die Beschreibung der substanzspezifischen Sättigungskonzentration Γ mit Hilfe der Gibbs'schen Adsorptionsisotherme zeigt sich, dass mit Erreichen von Γ eine Änderung der Oberflächenspannung σ erfolgt. Unter den bisher beschriebenen Bedingungen können alle anderen Parameter als konstant angenommen werden

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{d\sigma}{d \ln c} \right) \quad . \quad \text{Gleichung [22]}$$

Hier entsprechen R der universellen Gaskonstante, T der Temperatur, σ der Oberflächenspannung und c der Konzentration der grenzflächenaktiven Moleküle. Unter der Annahme, dass diese grenzflächenaktiven Moleküle sich nur an der Monoschicht oder in der Subphase aufhalten (also nicht an den Trogboden binden) und dass keine strukturellen Veränderungen hinsichtlich der Molekülgestalt/Größe/Geometrie stattfinden, lässt sich anhand der Gibbs'schen Adsorptionsisotherme berechnen, wie viele Moleküle in der Grenzfläche vorhanden sind.

3.3.4 Konfokale Mikroskopie in Kombination mit dem Langmuir-Filmwaagesystem

Neben der Untersuchung physikochemischer Eigenschaften von grenzflächenaktiven und amphiphilen Molekülen/Substanzen ist das Langmuir-Filmwaagesystem auch ein Modell zur Untersuchung von Protein-Membran-Wechselwirkungen, wenn diese sich nur auf eine Halbschicht einer Phospholipiddoppelschicht beziehen. Wie im oberen Abschnitt bereits erwähnt, kann mit Hilfe der Gibbs'schen Adsorptionsisotherme die Anzahl der Moleküle bestimmt werden, die sich an der Grenzfläche angelagert haben (vergl. Gleichung [21] und Gleichung [22]). Für ein System, bei dem sich die grenzflächenaktiven Moleküle, welche in die Subphase injiziert werden, in eine bereits vorhandene Langmuir-Monoschicht einlagern, ist es genauer, die inserierten Moleküle direkt zu bestimmen. Dies ist allerdings nur möglich, wenn das bisher beschriebene Filmwaagesetup mit

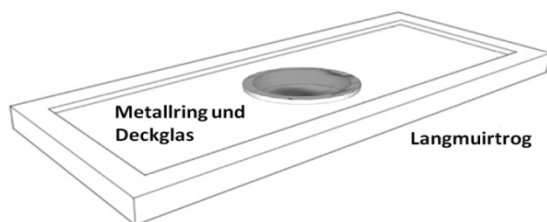


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Langmuir-Trogs, der es erlaubt, konfokale Mikroskopie durch dessen Boden hindurch anzuwenden (modifiziert nach 72).

anderen Messtechniken erweitert wird. Eine Variante besteht darin, die Langmuir-Filmwaage mit einem konfokalen Mikroskop zu kombinieren, sodass mit dem Objektiv durch den Boden der Filmwaage hinweg auf die Monoschicht fokussiert werden kann. Mit Hilfe eines Metallringes, der in den Boden des Langmuir-Trogs eingebracht ist, und einem darüber liegenden Deckglas, ist es möglich, das Objektiv nahe genug an die Monoschicht heranzubewegen, um auf diese zu fokussieren (Abbildung 17). Dies ermöglicht neben der einzelmolekülsensitiven Quantifizierung der Teilchenanzahl auch die Bestimmung von Teilchendynamiken (z.B. Diffusionskoeffizienten) und Molekülstrukturen (z.B. Interaktionsfläche).

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Chemikalien/Proteine/Lipide

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanineperchlorat	DiD-C18	Invitrogen
1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholin	DLPC	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin	DLPS	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-(cytidine diphosphat)	CDP-DAG	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphat	DOPA	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin	DOPC	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin	DOPE	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin markiert mit ATTO 633	ATTO 633 DOPE	ATTO-TEC GmbH
1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin	DOPS	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Roth
Agar Agar	Agar	Roth
Alexa Fluor® 488 C ₅ Maleinimid	Alexa ₄₈₈	Invitrogen
Alexa Fluor® 488 Hydrazid	Alexa ₄₈₈ Hydrazid	Invitrogen
Alexa Fluor® 633 Hydrazid	Alexa ₆₃₃ Hydrazid	Invitrogen
Ammoniumheptamolybdat(VII)-Hexahydrat	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	Roth
Ammoniumperoxodisulfat	APS	Roth
Ampicillin	Amp	Roth
Borsäure	-----	Roth
<i>bovine serum albumin</i>	BSA	Thermo Scientific
Bromphenolblau	-----	Roth
Coomassie Brilliant Blau R250	Coomassie	Sigma Aldrich
Ergosterol	-----	Sigma Aldrich
Essigsäure (glacial)	-----	Roth
Ethanol 96%(v/v) (vergällt)	-----	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	EDTA	Roth
Glutathion-Agarose	GSH-Agarose	Invitrogen
Glycin	-----	Roth
Glyzerin	-----	Roth
Guanosin-5'-diphosphat	GDP	Sigma Aldrich
Guanosin-5'-triphosphat	GTP	Sigma Aldrich
Guanlyl-5'-imido diphosphat	GMP-PNP	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	-----	Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG	Roth
Kaliumacetat	KCH ₃ COO	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Roth

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
Kalziumchlorid	CaCl ₂	Roth
L-α-Phosphatidylinositol	PI	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
L-α-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	PI(4,5)P ₂	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
L-α-Phosphatidylinositol-4-phosphat	PI4P	Avanti POLAR LIPIDS, Inc.
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	Roth
Malachitgrün	-----	Merck Millipore
Methanol	-----	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin	TEMED	Roth
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdocecylsulfat	SDS	Roth
Natriumhydroxid	NaOH	Roth
Salzsäure	HCl	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Roth
Trypton	-----	VWR International
β-Mercaptoethanol	-----	Roth

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde doppelt deionisiertes Wasser (dd H₂O) verwendet.

4.1.2 Kits und Standards

- Bradford Assay, Sigma Aldrich (Lösungen zur quantitativen Proteinkonzentrationsbestimmung)
- QIAprep® Spin Miniprep Kits ,Qiagen (Präparationskit zur Plasmid-DNA-Isolierung)
- Pfu-Polymerase-Kit, Invitrogen (Präparationskit zur Mutagenese mit der Pfu-Polymerase)
- Amicon®Ultra-Einheiten, Merck Millipore (Kit zur Aufkonzentrierung durch Zentrifugation)
- DNA Größenstandard (1-10 kb), Fermentas
- Proteinstandard (*bovine serum albumin*), ThermoScientific, 2 mg ml⁻¹
- PageRuler™ Prestained Protein Ladder (170 kDa;130 kDa; 100 kDa; 70 kDa; 55 kDa; 40 kDa; 35 kDa; 25 kDa; 15 kDa; 10 kDa), Thermo Scientific

4.1.3 Nährmedien/Puffer und Stammlösungen

4.1.3.1 LB-Medium

- 5 g l⁻¹ Hefeextrakt
- 10 g l⁻¹ NaCl
- 10 g l⁻¹ Trypton

4.1.3.2 LB-Agar-Platten

- 15 g l⁻¹ Agar
- 5 g l⁻¹ Hefeextrakt
- 10 g l⁻¹ NaCl
- 10 g l⁻¹ Trypton

4.1.3.3 TBS-Mg-Puffer

- 50 mM Tris-Base
- 150 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂

Der TBS-Mg-Puffer wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

4.1.3.4 GDP-Stammlösung

- 5 mM GDP

4.1.3.5 TCB-Puffer

- 20 mM HEPES
- 150 mM K-Acetat
- 5 mM Mg-Acetat
- 250 mM Sorbitol

Der TCB-Puffer wurde mit KOH auf pH 8,0 eingestellt.

4.1.3.6 Tris HCl-Lösung zur pH-Wert Einstellung

- 0,15 M Tris-Base
- 0,175 M HCl

4.1.3.7 lowK-HKM-Puffer für Versuchsansätze mit Sar1p

- 20 mM HEPES
- 50 mM K-Acetat
- 1,2 mM MgCl₂

Der pH-Wert wurde mit KOH auf 6,8 eingestellt.

4.1.4 GTPase-Aktivitätstest auf Basis von Malachitgrün

4.1.4.1 Malachitgrün-Nachweislösung

- 1 M HCl
- 2,86 mM Ammoniumheptamolybdat
- 1 mM Malachitgrün

4.1.4.2 komplexe Kalibrierreihe

P_i / μM	GDP / μM	GTP / μM
0	0	1000
5	5	995
10	10	990
20	20	980
30	30	970
40	40	960
50	50	950
60	60	940
70	70	930
80	80	920
90	90	910
100	100	900

4.1.5 Lipidlösungen

4.1.5.1 Major-Minor-Mix (MMM)

Komponente	Anteil / mol%
DOPC	34,4
DOPE	14,8
DOPS	5,4
DOPA	3,4
PI	5,4
PI4P	1,5
PI(4,5)P ₂	0,5
CDP-DAG	1,3
Ergosterol	33,3

4.1.5.2 DLPC/DLPS

Komponente	Anteil / mol%
DLPC	80
DLPS	20

4.1.6 Stämme und Plasmide

4.1.6.1 Verwendete Bakterienstämme

- *E. coli*-DH5 α Stamm
- *E. coli*-BL21-DE3 Expressionsstamm
- chemokompetente *E. coli*-Zellen (von Dr. Sebastian Daum, AG Bacia, Institut für Chemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt)

4.1.6.2 Verwendete Plasmide/Vektoren

- pGEX-Vektor

4.2 Methoden

4.2.1 Generierung von Sar1p Varianten

4.2.1.1 Plasmidpräparation für Mutagenese/Sequenzierung

Zu Beginn der Plasmidpräparation wurde eine *Escherichia coli* Glycerinkultur (*E. coli*-DH5 α) (welche das gesuchte Plasmid trug) auf einer LB-Agarplatte (siehe 4.1.3.2) vereinzelt. Zur Selektion diente Ampicillin (Amp), welches dem LB-Agar (*lysogeny broth*) zugesetzt wurde (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Die Platte wurde anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden 5 ml LB-Medium mit einer der über Nacht gewachsenen *E. coli*-DH5 α -Kolonien inokuliert und bei 37°C und 200 rpm (Schüttelinkubator Multitron, INFORS) für 12-16 h inkubiert. Die so gewachsenen Zellen wurden bei 4500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Angaben des QIAprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen). Die erhaltene Plasmid-DNA konnte zum einen für die Sequenzierung, für anschließende Mutationsexperimente oder für Transformationen in andere Stämme verwendet werden.

4.2.1.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA wurde von der Firma GATC durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm *Cromas lite* (Technelysium, [76]) in eine Textdatei vom Typ „.txt“ übertragen und mit Hilfe von ExPASy (Schweizer Institut für Bioinformatik (SIB), [77]) in eine Proteinsequenz übersetzt. Der abschließende Sequenzvergleich erfolgte mit EMBOSS (Europäisches Bioinformatik Institut (EBI), [78]), indem die Zielsequenz mit einer Referenzsequenz durch das Programm verglichen wurde.

4.2.1.3 Mutagenese und *polymerase cain reaktion* (PCR)

Die Generierung von Punktmutationen in der Plasmid-DNA erfolgte im Rahmen einer QuickChange® Mutagenese unter Verwendung des Pfu-Polymerase-Kit (Invitrogen). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers und ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: PCR-Reaktionsansatz

Komponente	V / µl
Wasser	37
10 x Pfu-Puffer	5
<i>forward</i> Primer	2
<i>reversed</i> Primer	2
Plasmidlösung (5 µgml ⁻¹)	2
dNTP-Mix (10 mM)	1
Pfu-DNA-Polymerase*	1

vor Zugabe den bisherigen Ansatz gut mischen

Tabelle 2: PCR-Programmschritte

Schritt	Beschreibung
1	Denaturierung der Plasmid-DNA bei 95°C für 1 min
2*	Denaturierung der Plasmid-DNA bei 95°C für 30 sek
3*	<i>Annealing</i> -Phase bei verschiedenen Temperaturen (48 °C, 50 °C, 52°C) für 1 min
4*	PCR-Reaktion bei 68°C für 11 min (2 min / kB)

Die Schritte 2 bis 4 wurden 16 mal wiederholt.

Die PCR-Reaktion wurde gemäß den Bedingungen aus Tabelle 2 durchgeführt und die Proben anschließend auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden dabei mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Sybr® Safe, Invitrogen) detektiert, der dem Agarosegel vor dem Erstarren beigemischt wurde (1:10000 (v/v)). Die Fluoreszenzmessung erfolgte an einem Fluoreszenzscanner (ImageQuant™ LAS-4000, FUJIFILM) mit dem Anregungs- und Emissionssetup für GFP.

4.2.1.4 Transformation und Lagerung

Für die Transformation der mutagenen Plasmid-DNA in chemokompetente Zellen wurden 5 µl des PCR-Ansatzes (4.2.1.3) zu 100 µl chemokompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (4.1.6.1) gegeben und für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 1,5 min bei 42 °C (Digital Heizblock, VWR), gefolgt von einer dreiminütigen Abkühlphase auf Eis. Im weiteren Verlauf der Transformation wurden dem Ansatz 400 µl LB-Medium (4.1.3.1) ohne Antibiotika unter sterilen Umgebungsbedingungen hinzugefügt und die Zellen weitere 60 min bei 37°C und 1000 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert. Von diesen Ansätzen wurden je 200 µl auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg ml⁻¹) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die über Nacht gewachsene *E. coli* DH5α-Kultur wurde in Form von Glycerolkulturen bei -80°C gelagert. Dazu wurde zunächst eine 5 ml Schüttelkultur (LB-Medium, 4.1.3.1 mit Ampicillin 100 µg ml⁻¹) mit einer der gewachsenen Kolonien inokuliert und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Entnahme von 500 µl dieser Schüttelkultur welche in 4,5 ml frisches LB-Medium gegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,4 wachsen gelassen wurde. In einem

Lagergefäß wurden 150 µl steriles Glycerin (85 %) vorgelegt, 850 µl der Zellkultur hinzugefügt und kurz gemischt.

4.2.2 Proteinpräparation und Modifikation

4.2.2.1 Zellanzucht und Proteinexpression von Sar1p und dessen Variante

Die Anzucht der jeweiligen *E.coli*-BL21-DE3 Stämme erfolgte in LB-Medium (siehe 4.1.3.1). Dazu wurde im Vorfeld von einer Glycerin-Kultur eine LB-Agar-Platte (siehe 4.1.3.2) inokuliert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden vier Vorkulturen zu je 75 ml LB-Medium mit Ampicillin versetzt ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) und mit je einer Kolonie von der LB-Agar-Platte inokuliert. Die Vorkulturen wurden unter Schütteln bei 37 °C und 180 rpm (Schüttelinkubator Multitron, INFORS) über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde je eine gewachsene Vorkultur komplett in eine von vier Hauptkulturen (1,5 l LB-Medium mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin) überführt. Die dadurch inokulierten Hauptkulturen wurden ebenfalls bei 37 °C und 180 rpm (Schüttelinkubator Multitron, INFORS) inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Zugabe von IPTG (1 mM). Die Hauptkulturen wurden für weitere 2 h unter Schütteln bei 30 °C inkubiert. Abschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation bei 5000 x g. Die so gewonnenen Zellen wurden in ca. 5-6 g Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.2.2 Reinigung von Sar1p und dessen Variante

Zu Beginn der Proteinreinigung wurde eine Zellfraktion (5-6 g, siehe 4.2.2.1) in 8 ml TBS-Mg-Puffer (siehe 4.1.3.3) pro g Zellmasse vollständig resuspendiert. Zusätzlich wurde GDP aus einer 5 mM Stammlösung (siehe 4.1.3.4,) so zugesetzt, dass eine GDP-Konzentration von 5 µM erreicht wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von Lysozym (1 mg ml^{-1}). Nach vollständigem Resuspendieren wurde der gesamte Ansatz noch 25 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend mittels Hochdruckdispersion (Gaulin, AVP) in fünf Passagen aufgeschlossen. Zum Entfernen von grobem Zellmaterial wurde der gesamte Ansatz bei 20000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine mit GSH-Agarose gefüllte Polypropylentropfsäule (5 ml, Thermo Scientific) gegeben und diese anschließend mit einem GDP-haltigen TBS-Mg-Puffer (siehe 4.1.3.3) (5 µM GDP) gewaschen. Das Volumen dieses Waschpuffers betrug dabei das zehnfache des verwendeten Säulenvolumens. Anschließend wurde die Säule mit GDP-haltigen TCB-Puffer (siehe 4.1.3.5) (5 µM GDP) für die Thrombinspaltung vorbereitet. Die Menge an TCB-Puffer für diesen Schritt betrug das dreifache des Säulenvolumens. Alle diese Schritte (Auftragen des Überstandes auf die Säule, Waschen, Pufferwechsel für die Thrombinspaltung) wurden bei 4 °C durchgeführt. Durch Zugabe von Thrombin (4 U, entsprechen $4 \mu\text{mol/min}^{-1}$) und vollständigem Resuspendieren des Säulenmaterials erfolgte der Verdau bei Raumtemperatur für 1 h unter leichtem Schütteln und Schwenken der Säule (PTR-30 Rotator, Grant). Die abschließende Elution erfolgte über eine mit Benzamidin-Sepharose gefüllte Polypropylentropfsäule (5 ml, Thermo Scientific). Dazu wurde die GSH-Agarose-Säule über die Benzamidin-Sepharose-Säule gehängt und mit ca. vier Säulenvolumen (bezogen auf die GSH Agarose-Säule) an GDP enthaltendem TCB-Puffer (siehe 4.1.3.5) (5 µM GDP) nachgespült. Es wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Coomassiefärbung analysiert.

Für die Versuche zur Modifikation von Sar1p auf der GSH-Agarose-Säule wurde eine 2 mM Alexa Fluor® 488 C₅ Maleinimid-Lösung (Alexa₄₈₈-Lösung) in TCB-Puffer mit 5 µM GDP (siehe 4.1.3.5) im Anschluss an den Pufferwechsel hinzugefügt, sodass die Alexa₄₈₈-Konzentration 200 µM betrug. Dieser Reaktionsansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur (22°C) im Dunkeln geschüttelt und

geschwenkt. Im Anschluss daran erfolgte das Separieren des überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffes, indem der Ansatz mit 50 ml TCB-Puffer mit 5 μM GDP bei 4 °C gewaschen wurde.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Analysetest nach Bradford (Bradford Assay, Sigma Aldrich) verwendet. Alle Fraktionen, deren Sar1p-Konzentration 20 μM überstieg, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Fraktionen mit geringeren Proteinkonzentrationen wurden durch Zentrifugation über geeignete Membranen (Ausschlussgröße: 10 kDa) (4.1.2) gemäß den Angaben des Herstellers auf $\geq 20 \mu\text{M}$ aufkonzentriert und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.2.3 Markierung von Sar1p und dessen Variante nach der Proteinreinigung

Die Fluoreszenzmodifizierung von Sar1p und dessen Variante mit Alexa₄₈₈ erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in zehnfachem molarem Überschuss an Fluoreszenzmarker zum Protein. Die Ansatzgröße sollte dabei 1 % des Säulenvolumens der anschließend verwendeten Größenausschlusschromatographiesäule (120 ml, HiLoad 16/600 Sephadex 30pg, GE Healthcare) nicht überschreiten. Vor der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte eine tropfenweise Zugabe einer sauren Tris-HCl-Lösung (4.1.3.6), bis sich der pH-Wert der Proteinlösung zwischen 7,0 und 7,5 eingestellt hatte. Anschließend erfolgte die Zugabe des Fluoreszenzmarkers in Form einer wässrigen, hochkonzentrierten Stammlösung. Für eine möglichst vollständige Markierungsreaktion sollte die Proteinkonzentration im kompletten Markierungsansatz 20 μM nicht unterschreiten. Der gesamte Markierungsansatz wurde für 2 h unter Lichtschutz bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Trennung von markiertem Protein und ungebundenem Farbstoff erfolgte durch Größenausschlusschromatographie mit Hilfe eines ÄKTA FPLC Systems (GE Healthcare) bei einem Fluss von 0,3 ml min⁻¹. Als mobile Phase wurde GDP enthaltender TCB-Puffer (5 μM GDP) verwendet (siehe 4.1.3.5). Es wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt und die Proteinkonzentration (Bradford Assay, Sigma Aldrich) bestimmt. Alle proteinenthaltenden Fraktionen wurden beginnend mit der niedrigsten Konzentration in ein Zentrifugationsröhrchen (Amicon®Ultra-Einheiten, Merck Millipore) gegeben und gemäß den Angaben des Herstellers durch Zentrifugation aufkonzentriert. War das Volumen auf $\leq 500 \mu\text{l}$ gesunken, wurden die Fraktionen mit den nächsthöheren Proteinkonzentrationen hinzugefügt. Wurden alle Fraktionen vereinigt, erfolgte die Aufkonzentrierung auf ein Restvolumen von $\leq 200 \mu\text{l}$. Diese Präparation wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.2.4 Markierungsausbeute und Qualität

Zur Bestimmung der Markierungsausbeute wurde die Proteinkonzentration mittels eines Bradford-Assay (Bradford Assay, Sigma Aldrich) gemäß den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Quantifizierung des im Ansatz enthaltenden Fluoreszenzfarbstoffes erfolgte durch UV-Vis-Spektroskopie (Infinite M200 pro, TECAN) bei einer Wellenlänge von 488 nm unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 72000 M⁻¹ cm⁻¹ (Invitrogen). Die Korrektur der gesamten Farbstoffkonzentration um den Anteil, der nicht kovalent gebunden hatte, wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE und anschließendem Fluoreszenzscan (ImageQuant™ LAS-4000, FUJIFILM) durchgeführt. Dabei wurde dem Probenpuffer kein Bromphenolblau zugesetzt, um die Fluoreszenzsignale des freien Alexa₄₈₈ nicht zu überdecken. Die Quantifizierung der Banden erfolgte durch densitometrische Analyse der Fluoreszenzaufnahmen (ImageQuant™ LAS-4000, FUJIFILM).

Für die Untersuchung der Proteinprobe bezüglich des Auftretens von Aggregaten wurde eine FCS-Messung in Lösung auf Deckgläsern durchgeführt, die mit Casein beschichtet waren. Dazu wurden diese in eine gesättigte Caseinlösung (10 mg/ml⁻¹) getaucht, bei 50°C über 3 h inkubiert und

anschließend über Nacht getrocknet. Auf die getrockneten Deckgläser wurden 20 µl einer in *lowK* HKM-Puffer (4.1.3.7) verdünnten Proteinlösung gegeben und anschließend zweimal 60 s am Fluoreszenzmikroskop (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss) vermessen und mittels FCS analysiert. Die Proteinlösung wurde dabei so verdünnt, dass der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff ca. 5-10 nM beträgt.

4.2.3 Lipidpräparationen

4.2.3.1 Major-Minor-Mix-Lipidmischung

Für die Herstellung einer Major-Minor-Mix-Lipidmischung (MMM-Lipidmischung) wurden die benötigten Lipidkomponenten gemäß des Mengenanteiles (siehe 4.1.5.1) gemischt und mit Chloroform/Methanol (2:1, v/v) so aufgefüllt, dass die Lipidkonzentration 12 mM erreichte. Anschließend wurde diese Stammlösung auf mehrere Glasgefäße verteilt (zu 50 µl, 100 µl und 500 µl). Alle diese Proben wurden unter einem leichten Stickstoffstrom komplett eingetrocknet. Zum Schutz der Lipide vor Oxidation erfolgte eine abschließende Überschichtung mit Argon. Die so präparierten Lipidproben wurden bis zum Ablauf ihrer Haltbarkeit, basierend auf der kürzesten Haltbarkeit der beinhaltenden Komponente, bei -20 °C gelagert.

4.2.3.2 Herstellung von kleinen MMM-Liposomen

Zur Herstellung von kleinen MMM-Liposomen (*small unilamellar vesicles*, SUVs) als Komponente des GTPase-Assay wurden auf ein Major-Minor-Mix-Aliquot (500 µl) 2 ml *lowK*-HKM-Puffer (4.1.3.7) gegeben und diese vollständig durch Schütteln resuspendiert. Die somit entstandene 3 mM Lipidsuspension wurde nun 21-mal mit Hilfe eines Avanti™ Mini-Extruders durch eine Membran mit 400 nm großen Poren (Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman) gedrückt (extrudiert).

4.2.3.3 Herstellung von großen MMM-Liposomen

Die Herstellung von *giant unilamellar vesicles* (GUVs) erfolgte durch Elektroformation. Dazu wurde eine 15 mM MMM-Lipidmischung in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (2:1, v/v) aufgenommen. Zum Anfärben der Membran wurde zusätzlich 0,5 mol% DiD-C18 hinzugefügt. In der Regel waren hierfür 50 µl MMM-Aliquots (siehe 4.2.3.1) ausreichend. Wurden diese in 40 µl Chloroform/Methanol-Gemisch aufgenommen, so entstand eine 15 mM MMM-Lipidlösung. Diese wurde auf zwei Deckgläser ausgestrichen, die mit Indiumzinnoxid (ITO) beschichtet waren. Anschließend wurden die beiden Deckgläser zusammen mit einem geöffneten Gummiring (U-Form, Dicke 3 mm) zu einer kleinen Kammer zusammengebaut, wobei die ITO-beschichteten Seiten nach innen zeigten. Der so entstandene Hohlraum wurde mit einer ca. 500 mOsm Saccharoselösung (bestimmt mit Vapor Pressure Osmometer, VAPRO) befüllt und anschließend verschlossen. Zur Herstellung der GUVs wurde die Kammer an ein Wechselfeld von 10 Hz und 3 V (p-p) für 4 h angeschlossen (Voltcraft® 8202 2MHz Sweep/Function Generator). Für die Untersuchungen der mit Alexa₄₈₈ modifizierten Variante von Sar1p (Sar1p_{S_{CCSAI488}}) wurde auf die Liposomenmarkierung durch DiD-C18 verzichtet.

Nach erfolgter Elektroformation wurde die Lösung im Inneren der Kammer in ein Gefäß überführt, in dem eine äquiosmolare Glucoselösung vorgelegt wurde. Durch Sedimentation über Nacht bei 4 °C sanken die GUVs ab und konnten bei 4 °C für ca. 1 Woche gelagert werden.

4.2.3.4 Herstellung von Lösungen zur Monoschichtpräparation

Für die Herstellung einer MMM-Lipidlösung zur Präparation von Monoschichten wurde ein 50 μ l Aliquot in 2 ml eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1, v/v) aufgenommen. Zur Präparation der Monoschicht wurde die Lipidlösung in eine 100 μ l Glasspritze mit einer engen Kanüle überführt und tropfenweise auf die wässrige Subphase aufgesetzt. Bei Analysen von fluoreszenzmarkierten Monoschichten wurden der MMM-Lipidlösung $5 \cdot 10^{-3}$ mol% ATTO 633 DOPE (für Analysen bei 633 nm) hinzugefügt.

4.2.4 GTPase-Aktivität

4.2.4.1 Malachitgrün-Nachweislösung

Zur Herstellung der Malachitgrün-Nachweislösung wurde Ammoniumheptamolybdat (20 mM Orthomolybdat) in 1 M HCl gelöst und anschließend festes Malachitgrünnoxalat (1 mM Malachitgrün) langsam unter Rühren hinzugefügt. Nach weiteren 30 min unter Rühren wurde die bis dahin grün aussehende Lösung durch eine Membran (400 nm Porengröße, Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman) filtriert. Das Filtrat hatte nun eine gelbe Farbe und war frei von nicht gelösten Malachitgrün-Partikeln.

4.2.4.2 Standardansatz

Die Standardansätze zur Bestimmung der basalen GTPase-Aktivität von Sar1p und dessen Aktivierung durch die weiteren COPII-Komponenten wurden in Tabelle 3 schematisch zusammengefasst. Alle verwendeten Sec-Proteine wurden von Dr. Sebastian Daum, AG Bacia, Institut für Chemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg für die Analysen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Standardansatz zur Bestimmung der GTPase-Aktivität von Sar1p

	MMM-SUVs*	Sar1p	Sec12 Δ Cp	Sec23/24p	Sec13/31p
Basalaktivität	1,5 mM	0,5 μ M	-----	-----	-----
<i>prebudding complex</i>	1,5 mM	0,5 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	-----
<i>prebudding complex (Referenz)</i>	1,5 mM	-----**	0,1 μ M	0,5 μ M	-----
COPII-Komplex	1,5 mM	0,5 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M
COPII-Komplex (Referenz)	1,5 mM	-----**	0,1 μ M	0,5 μ M	0,5 μ M

Die Lipidsuspension wurde durch eine Membran mit 400 nm Porengröße (Nucleopore® Track-Etched Membranes, Whatman) extrudiert. Die Konzentrationsangabe bezog sich auf die eingesetzte Lipidkonzentration vor dem Extrudieren.

** Anstelle von Sar1p wurde TCB-Puffer, pH 8,0 eingesetzt.

Zur Erstellung des Reaktionsansatzes ($V_{\text{ges}} = 175 \mu$ l) wurden im ersten Schritt 87,5 μ l einer 3 mM MMM-SUV-Suspension (4.2.3.2) vorgelegt und 8,75 μ l eines 10 x *low*K HKM-Puffers (pH 6,8; Vergleich 4.1.3.7) sowie 1 mM GTP und H₂O hinzugegeben. Die Menge an eingesetztem H₂O war dabei abhängig von der Anzahl der eingesetzten Proteine bzw. deren Konzentration und wurde benötigt, um den Reaktionsansatz auf 175 μ l aufzufüllen. Dieser Ansatz wurde kurz gemischt und zentrifugiert. Die Proteinlösungen wurden nun an die Gefäßwand pipettiert (Sar1p wurde dabei als letzte Proteinlösung pipettiert), sodass sich diese als Tropfen (jede Proteinlösung für sich) über der Oberfläche des Reaktionsansatzes befanden. Durch kurze Zentrifugation, Mischen und erneutes

Zentrifugieren gelangten alle Proteine gleichzeitig in den Reaktionsansatz. Die Reaktion wurde durch die Anwesenheit von Sar1p gestartet. Der Reaktionsansatz wurde in eine Mikrotiterplatte (Nunclon 96-well Mikrotiterplatte, Thermo Scientific) mit flachem Boden verteilt, wobei in jede Kavität 20 μl pipettiert wurden. Die Reaktion erfolgte bei 22 °C. Dazu wurden die Mikrotiterplatten verschlossen und in einem Umwälzthermostat (αRA8 , Lauda) temperiert. Nach definierten Zeiten wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μl einer 0,5 mM EDTA-Lösung gestoppt. Für die Bestimmung der basalen Hydrolyserate von Sar1p sowie in Gegenwart des *prebudding complex* wurde der Umsatz über einen Zeitraum von 0-4 h vermessen, im Fall des gesamten COPII-Komplexes von 0-90 min.

Um den GTP-Verbrauch zu ermitteln, wurden in alle Kavitäten 250 μl der Malachitgrün-Nachweislösung (4.2.4.1) gegeben und die Ansätze in einem Zeitfenster von 15-30 min Inkubation (bei Raumtemperatur) bei 630 nm vermessen (Infinite M200 pro, TECAN). Um die so erhaltenen Absorptionswerte in produziertem P_i umrechnen zu können, wurde eine Kalibrierreihe (0-150 μM P_i , siehe 4.1.4.2) ebenfalls mit 250 μl Malachitgrün-Nachweislösung versetzt und parallel die Absorption bei 630 nm bestimmt. Der Kalibrieransatz pro Kavität setzte sich dabei aus 20 μl der jeweiligen Standardkonzentration und 5 μl einer 0,5 mM EDTA-Lösung zusammen. Da bei den Reaktionen von Sar1p in Gegenwart des *prebudding complex* sowie des gesamten COPII-Komplexes auch ohne Sar1p eine geringe zeitliche Steigerung des Absorptionssignals bei 630 nm zu beobachten war, wurde neben dem eigentlichen Reaktionsansatz auch ein Referenzansatz (Tabelle 3) erstellt, dessen Absorptionswerte von denen der Messungen mit Sar1p abgezogen wurden. An Stelle von Sar1p wurde dabei TCB-Puffer, pH 8,0 eingesetzt.

4.2.4.3 VS-Charakteristiken

Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der Umsatzrate von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Substrat (VS-Charakteristik) wurden in ähnlicher Art und Weise durchgeführt wie im Kapitel 4.2.4.2 beschrieben. Ein genereller Unterschied bestand allerdings darin, dass für die Analysen keine Lipide verwendet und als zusätzliche Proteinkomponente neben Sar1p nur Sec12 ΔCp eingesetzt wurde. Bei GTP-Konzentrationen bis zu 1 mM wurde bezüglich der Durchführung des Standardansatzes (Präparation in Mikrotiterplatte, Abstoppen der Reaktion, Durchführung der Nachweisreaktion) so verfahren, wie in 4.2.4.2 beschrieben. Lediglich bei GTP-Konzentrationen über 1 mM GTP erfolgte eine Verdünnung des durch EDTA abgestoppten Ansatzes (Zugabe von 5 μM einer 0,5 mM EDTA-Lösung) mit *lowK* HKM-Puffer, pH 6,8 (4.1.3.7), sodass die resultierende GTP-Konzentration 1 mM entsprach. Von dieser Verdünnung wurden 25 μl entnommen und mit 250 μl Malachitgrün-Nachweislösung versetzt. Die Auswertung erfolgte nach 15-30 min Inkubation wie in 4.2.4.2 beschrieben.

4.2.4.4 Radioaktiver GTPase - Nachweis

Der Nachweis der GTP-Hydrolyse von Sar1p erfolgte mit radioaktiv markiertem αP^{32} -GTP. Der hergestellte Reaktionsansatz entsprach dabei dem in 4.2.4.2 beschriebenen Ansatz zur Bestimmung der basalen GTPase-Aktivität von Sar1p mit dem Unterschied, dass keine Liposomen eingesetzt wurden. Das verwendete GTP wurde zudem mit αP^{32} GTP dotiert (1 μCi in 1 mM GTP). Die Trennung der Nukleotide und die Auswertung der Radioaktivität (Aufnahmen der jeweiligen Signalintensitäten sowie die densitometrische Auswertung) wurde von Herrn Dr. Uwe Kühn (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Prof. Wahle) durchgeführt.

4.2.5 Funktionsanalyse von COPII an GUVs

Für die Untersuchung der Funktionsfähigkeit der COPII-Proteine an MMM-GUVs (*Tubulation*, siehe 3.1.3.2 ff.) wurden die Reaktionsansätze wie folgt präpariert.

Tabelle 4: Reaktionsansatz zur Untersuchung der Funktionsfähigkeit von COPII-Proteinen an MMM-GUVs

Komponente	Konzentration
Sar1p/Sar1p-Variante	0,2 μ M / 1 μ M
GMP-PNP	1 mM
Sec12p	1 μ M
Sec23/24p	0,32 μ M
Sec13/31p	0,52 μ M

Hinzu kamen noch 1 μ l einer konzentrierten GUV-Präparation (4.2.3.3). Abhängig von der Summe der Osmolalitäten der eingesetzten Komponenten wurde durch Zugabe von Glycerin ein Ausgleich zum Osmolalitätswert der GUV-Lösung erreicht.

Um die Liposomen nicht durch osmotische Einflüsse zu zerstören, wurden alle eingesetzten wässrigen Komponenten bezüglich ihrer Osmolalität vermessen und im Gesamtansatz mit Glycerin entsprechend auf die Osmolalität (bestimmt mit Vapor Pressure Osmometer, VAPRO) der GUV-Suspension eingestellt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Liposomen gestartet und der Ansatz in einer Kammer, bestehend aus zwei mit Gelatine beschichteten Deckgläsern (von Frau Claudia Müller, AG Bacia, Institut für Chemie, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt) und einem ca. 300 μ m hohen Abstandshalter aus doppelseitigem Klebeband für 2-6 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung mittels konfokaler Mikroskopie (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss).

Für die Analyse mittels Kryoelektronenmikroskopie wurden die Reaktionsansätze in kleinen Reaktionsgefäßen für 2-6 h inkubiert. Die anschließende Präparation, Messung und Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Annette Meister (ZIK HALOmEm) in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

4.2.6 FCS-Setup Kalibrierung für Messungen in wässrigen Systemen und an Grenzflächen

4.2.6.1 Allgemeine Kalibrierung des optischen Systems

Für die FCS-Analyse wurde ein konfokales Laserscanningmikroskop (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss) verwendet. Die Anregung erfolgte durch Laserlicht der Wellenlänge 488 nm (externer Argon Laser, Lasos) und 633 nm (LSM710 integrierter HeNe-Laser, Zeiss). Das Fluoreszenzlicht wurde über einen wellenlängenabhängigen Strahlteiler (488/561/633) vom Anregungslicht getrennt und durch einen weiteren Strahlteiler (NFT 635 VIS) auf die beiden Detektionskanäle geleitet. Vor dem Erreichen des jeweiligen Detektors wurde es noch einmal mit einem Bandpassfilter von 505-540 nm (BP505-540 für Emissionslicht aus 488 nm Anregung) sowie einem Bandpassfilter von 655-710 nm (BP655-710 für Emissionslicht aus 633 nm Anregung) gefiltert.

Für die Kalibrierung des Analysesetups bezüglich Proben mit dreidimensionaler Diffusion wurde ein Tropfen Immersionswasser auf ein Wasserimmersionsobjektiv (C-Apochromat 40x, NA 1,2) gegeben und ein Deckglas (Nr. 1,5; Menzel-Gläser) aufgelegt. Auf dieses wiederum wurden ca. 20 μ l einer Fluoreszenzstandardlösung gegeben. Diese beinhaltete Alexa₄₈₈-Hydrazid (5 nM) und Alexa₆₃₃-Hydrazid (5 nM). Der Korrekturring am Objektiv wurde mit Hilfe der beiden Fluorophore so

eingestellt, dass die gemessene molekulare Helligkeit beider Farbkanäle der maximalen Helligkeit des einzelnen Farbkanals so gut wie möglich entsprach. Anschließend erfolgte die Positionskorrektur des *pinholes* (über Zen2009, Software zum LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss) mit dem Ziel, dass die maximale Zählrate beider Farbkanäle in X- und Y-Position möglichst deckungsgleich übereinanderlagen. Dafür wurden die X- und Y-Positionen der jeweiligen Farbkanäle einzeln vermessen. Im Falle einer Differenz zwischen den X- bzw. Y-Positionen der einzelnen Farbkanäle wurde der Mittelwert der jeweiligen Position verwendet. Für die Messung von Proteinen oder anderen Analyten, die stark an Glasoberflächen haften, wurden anstelle der herkömmlichen Deckgläser caseinbeschichtete Deckgläser (4.2.2.4 ff.) verwendet.

Zur Vorbereitung von Analysen an Monoschichten wurde ein *long distance* Objektiv (LD C-Apochromat 40x, NA 1,1) verwendet und der Korrekturring auf 1,7 eingestellt. Die *pinhole*-Justage erfolgte in der gleichen Art und Weise, wie sie zuvor für die Analyse von dreidimensionalen Diffusionen beschrieben wurde. Lediglich beim Immersionsmedium wurde hier eine öltartige Substanz (Immersol W) verwendet, die einen vergleichbaren Brechungsindex aufwies wie Immersionswasser.

4.2.6.2 Präparation und Reinigung des Langmuir-Troges mit Metallring

Zu Beginn von Experimenten an Langmuir-Monoschichten erfolgte eine Reinigung des Troges wie im weiteren Verlauf beschrieben. Sowohl der Teflonbereich des Troges als auch der Metallring und das Deckglas wurden einmal mit 2 % iger Hellmanex II-Lösung (HellmaTM) gewaschen. Anschließend erfolgten drei Spülschritte mit H₂O, indem der Trog komplett gefüllt wurde. Das Deckglas und der Metallring wurden zusätzlich noch einmal mit Chloroform, zweimal mit Methanol und abschließend mit Ethanol gereinigt. Nach jedem dieser Waschschrte wurde der gesamte Trog zweimal komplett mit H₂O gefüllt und dadurch gespült. Im Anschluss daran erfolgte das Befüllen des Troges mit der Subphase. Durch mehrfaches Komprimieren der Barrieren und Absaugen der Oberfläche wurde eventuell vorhandener Staub schrittweise entfernt.

4.2.6.3 Präparation der Monoschicht für FCS-Analysen

Auf die bereits gereinigte Oberfläche der Subphase (4.2.6.2) wurde eine in Chloroform/Methanol (2:1, v/v) hergestellte Lösung mit amphiphilen Molekülen (z.B. MMM-Lipidlösungen, 4.2.3.4) tropfenweise aufgebracht. Wichtig dabei war, dass die Tropfen nicht über dem Metallring oder dem Deckglas aufgebracht wurden, da die Subphase mit ca. 0,5 mm Höhe zerreißen würde. Ebenfalls war ein „Fallen lassen“ der Tropfen zu vermeiden, da diese ggf. durch die Oberfläche hätten durchschlagen können. Nachdem die vorgesehene Menge an Lipiden auf der Oberfläche gespreitet worden war, wurde die Subphase durch langsames Hineinpumpen oder Absaugen (Microlab 600 Verdünner/Dispensiersystem, Hamilton) von Subphasenlösung in den Bereich des konfokalen Detektionsvolumens so positioniert, dass das gemessene Fluoreszenzsignal maximal wurde. Um der Verdunstung der Subphase entgegenzuwirken, wurde die Pumprate so eingestellt, dass die Monoschicht im Zentrum des Fokus verweilte oder leicht nach oben aus dem konfokalen Volumen herauswanderte. Anschließend wurden die Lipide unter Rühren der Subphase (neben dem Metallring) durch kontinuierliches Bewegen der Barriere A (Abbildung 16) auf eine gewünschte Zielfläche (A_0) oder einen gewünschten Zieldruck (π) komprimiert. Um die Monoschicht mittels FCS analysieren zu können, wurde diese durch paralleles Bewegen beider Barrieren über dem Objektiv positioniert.

4.2.6.4 Insertionsexperimente an Phospholipidmonoschichten

Die Präparation von Insertionsexperimenten z.B. mit Sar1p erfolgte stets neben dem Metallring. Dazu wurde die Monoschicht so präpariert, dass sich diese nach dem Komprimieren neben dem Objektiv befand (4.2.6.3). Im Falle einer Analyse der Monoschicht vor der Insertion wurde diese unter Beibehaltung der vorgegeben Flächen- und Druckbedingungen parallel über das Objektiv bewegt. Im Anschluss an diese Verschiebung erfolgte eine Relaxationsphase der Monoschicht von 15 min. Um die Insertionsexperimente durchführen zu können, wurde die Monoschicht nach erfolgter FCS-Messung wieder in die Ausgangsposition gebracht und erneut 15 min relaxieren gelassen. Anschließend erfolgte unter Rühren der Subphase die Zugabe von Sar1p unter der Barriere B (Abbildung 16) hindurch, sodass die Monoschicht nicht durchstoßen werden musste.

4.2.7 Z-Scan-FCS Auswertung mittels MATLAB

4.2.7.1 Allgemeines

Die Auswertung der Z-Scan-FCS-Daten erfolgte mit Hilfe eines selbsterstellten Programmes in MATLAB (MathWorks, [79]) in Zusammenarbeit mit Herrn Jan Ebenhan. Das Programm wurde dieser Dissertation beigelegt. Grund für diese Eigenentwicklung war, dass die zum Laserscanningmikroskop gelieferte Auswertesoftware (Zen2009) nur sehr eingeschränkte Möglichkeiten besaß, eine komplette Fluktuationskurve automatisch in Segmente zu zerlegen, zu korrelieren und anzupassen. Das selbsterstellte Programm war in der Lage, Rohdaten des Laserscanningmikroskops zu importieren, zu korrelieren und gemäß dem Z-Scan-FCS-Verfahren auszuwerten.

4.2.7.2 Korrelation der Z-Scan-FCS-Segmente

Wie unter 3.2.4 erläutert, wurde die gemessene Fluktuationskurve in kleine Segmente zerlegt und jedes einzeln korreliert. Da eine komplette Fluktuationskurve importiert wurde, war es möglich diese automatisch in Segmente zu zerlegen und anschließend zu analysieren. Die Korrelation erfolgte dabei gemäß Gleichung [4]. Die Glättung der Korrelationsdaten wurde durch einen *multiple- τ* -Algorithmus realisiert, bei dem die Verschiebung der Fluktuationskurve (τ) immer nach 8 Schritten um den Faktor 2 vergrößert wurde. Die Kontrolle der Eignung erfolgte durch einen Vergleich der in MATLAB erzeugten Daten mit denen, die durch den dem Mikroskop beigelegten Korrelator erzeugt wurden. Dabei wurde eine 5 nM Alexa₄₈₈-Hydrazid Lösung verwendet, deren Fluktuationssignale durch einen 50/50 Strahlteiler auf die beiden Detektoren geleitet wurden. Somit ließen sich die Korrelationskurven der beiden Detektionskanäle (Autokorrelation Detektionskanal 1 und Autokorrelation Detektionskanal 2) sowie die Kreuzkorrelationen der beiden Detektionskanäle gegeneinander (Detektionskanal 1 gegen Detektionskanal 2 bzw. Detektionskanal 2 gegen Detektionskanal 1) erzeugen und mit den Korrelationskurven vergleichen, die durch den Korrelator des LSM 710 and ConfoCor 3 (Zeiss) erzeugt wurden.

4.2.7.3 Modellanpassung der FCS-Segmente

Mit Hilfe eines Diffusionsmodells, welches eine zweidimensionale translationale Diffusion einer Komponente mit zusätzlichem Triplettanteil beschreibt (Gleichung [13]), wurden die in MATLAB erzeugten Korrelationsdaten angepasst. Dies erfolgte im Bereich von 1 μ s bis zum Ende der Korrelationskurve. Die Umsetzung dieser wurde durch eine MATLAB interne Funktion für nichtlineare Regressionen (lsqnonlin) realisiert. Eine zusätzliche Wichtung einzelner Bereiche oder Punkte der Korrelationskurve während der Anpassung wurde nicht durchgeführt.

Da bei der Datenanpassung die vorherige Angabe von Startwerten für die einzelnen Parameter notwendig war und sich diese von Korrelationskurve zu Korrelationskurve änderten, wurden diese aus den jeweiligen Korrelationskurven näherungsweise ermittelt, indem die Kurve geglättet und numerisch differenziert wurde (Abbildung 18). Für die Glättung der Korrelationskurve wurde für

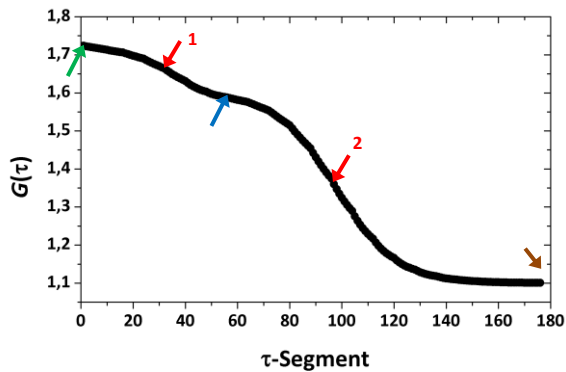


Abbildung 18: Charakteristischen Bereiche einer FCS-Kurve für die Startparameterableitung. Die automatisierte Ermittlung der Startparameter einer FCS-Kurve erfolgt durch ihre numerische Differenzierung um die Startwerte der Tripletzeit (Wendepunkt \rightarrow_1), die translationale Diffusionszeit (Wendepunkt \rightarrow_2), reziproke Teilchenzahl (Wendepunkt \rightarrow), den Offset (\rightarrow) und den Tripletanteil (\rightarrow) zu ermitteln und für jede FCS-Kurve individuell festzulegen.

jeden Punkt ein Mittelwert von diesem und seinen 4 nachfolgenden Punkten gebildet und in einer Matrix abgelegt. Dadurch wurde jeder Punkt der Korrelationskurve fünfmal bei der Berechnung eines Mittelwertes benötigt, sodass jedem Punkt der Korrelationskurve fünf Mittelwertpunkte zugeordnet wurden. Der resultierende Punkt der Glättung war dabei der Zentralwert der fünf Mittelwertpunkte (siehe Abbildung 19). Um die ersten bzw. letzten fünf Punkte der Kurve ebenfalls nach diesem Prinzip glätten zu können, wurden in diesem Bereich die Mittelwerte nach oben bzw. unten aufgefüllt, sodass jeder Punkt der geglätteten Kurve durch einen Zentralwert aus 5 Werten gebildet wurde. Diese Glättungskurve diente wiederum als neue Korrelationskurve für die darauffolgende Glättung. Der Algorithmus wurde solange durchgeführt, bis alle Punkte der Kurve einen definierten Abstand zur Vorgängerkurve unterschritten. Dieser wurde Anhand des Mittelwertes der Korrelationskurve im Bereich von $0,45 \mu\text{s}$ bis $1 \mu\text{s}$ (Bereich nach dem Afterpulsing mit der größten zu erwartenden Fluktuation) festgelegt. Waren die Differenzen aller Punkte der

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	2.3149		1.4734	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	0	0	0	0	0
2	1.4788		1.4734	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	0	0	0	0	0
3	1.2775		1.4734	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	0	0	0	0	0
4	1.2310		1.4734	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	0	0	0	0	0
5	1.0646		1.4734	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	0	0	0	0	0
6	1.0104		0	1.2124	1.1296	1.0948	1.0584	1.0568	0	0	0	0
7	1.0646		0	0	1.1296	1.0948	1.0584	1.0568	0	0	0	0
8	1.1033		0	0	0	1.0948	1.0584	1.0568	1.0638	0	0	0
9	1.0491		0	0	0	0	1.0584	1.0568	1.0638	1.0591	1.0529	0
10	1.0568		0	0	0	0	0	1.0568	1.0638	1.0591	1.0529	1.0452
11	1.0452		0	0	0	0	0	0	1.0638	1.0591	1.0529	1.0452
12	1.0413		0	0	0	0	0	0	0	1.0591	1.0529	1.0452

Abbildung 19: Prinzip der Datenglättung für die Funktionswerte einer Korrelationskurve (□). Die Funktionswerte der Glättungskurve (■) entsprachen dabei dem Zentralwert aus fünf Mittelwerten (□), von denen sich jeder einzelne aus fünf Funktionswerten der FCS-Kurve ergab (X bzw. X). In den Bereichen der ersten und letzten fünf Funktionswerte einer Korrelationskurve wurden die fehlenden Mittelwerte aufgefüllt, sodass auch hier ein Zentralwert aus fünf Werten bestimmt wurde (→).

Glättungskurve zur Vorgängerkurve unter $1/1000$ gesunken, wurde die Glättung beendet, spätestens aber nach 100 Runden. Punkte, deren Differenz zum Vorgänger bereits kleiner waren als der zuvor

definierte Grenzwert, wurden im weiteren Verlauf der Glättung nicht mehr verändert.

Diese geglättete Kurve wurde numerisch abgeleitet. Da die Abstände auf der X-Achse nicht konstant waren, wurden die geglätteten Datenpunkte gegen ihre jeweiligen τ -Segmente und nicht gegen ihren eigentlichen τ -Wert aufgetragen und numerisch nach Gleichung [23] abgeleitet. Als τ -Segment wird eine natürliche Zahl bezeichnet, die die Anzahl der jeweiligen Verschiebungen der Fluktuationskurve nach dem multiple- τ -Algorithmus darstellt. Der erste Punkt der Korrelationskurve erhält den Wert 1, der zweite den Wert 2 und so weiter.

$$G_{\text{Ableitung}} = \frac{G_{\text{Ende}} - G_{\text{Anfang}}}{x_{\text{Ende}} - x_{\text{Anfang}}} \quad \text{Gleichung [23]}$$

Die so erhaltene erste Ableitung wurde nach dem oben beschriebenen Verfahren über 10 Runden geglättet und daraus gemäß Gleichung [23] die zweite Ableitung berechnet. Aus dieser wurde nach einmaliger Glättung gemäß Gleichung [23] die dritte Ableitung berechnet, die wiederum nur einmal geglättet wurde.

Die Positionen, an denen die zweite Ableitung Nullstellen aufwies und die dritte Ableitung positiv war, wurden als Kandidaten für Startwerte von Zeitkomponenten (τ_T und τ_D) festgelegt. Dabei wurde die Nullstelle, deren Position ≤ 53 Punkte war (entspricht einem τ -Wert von 20 μs) und den maximalen Wert der dritten Ableitung aufwies, als Startwert für τ_T betrachtet. Die Nullstelle, deren Position > 53 Punkte war und den maximalen Wert der dritten Ableitung besaß, wird als Startwert für τ_D definiert. Der Startwert des Offsets der Korrelationskurve wurde durch den Endpunkt der geglätteten Korrelationskurve bestimmt. Der Startwert für N wurde aus der Kombination des Offset und der Diffusionszeit τ_D ermittelt. Dazu wurde die Vorgänger-Nullstelle der zweiten Ableitung gewählt, die für die Ermittlung von τ_D verwendet wurde und in der dritten Ableitung negativ ist. Der Wert der geglätteten Korrelationskurve an der Stelle dieser neuen Nullstelle ergab nach Gleichung [24] den Startwert für N .

$$N = \frac{1}{G_{\text{Nullstelle}} - \text{Startwert}_{\text{Offset}}} \quad \text{Gleichung [24]}$$

Aus den ersten Werten der geglätteten Korrelationsfunktion, dem Startwert für N und dem Startwert für den Offset wurde nach Gleichung [13] (für $\tau = 0$) der Startwert für den Tripletanteil T_T bestimmt.

4.2.7.4 Z-Scan-FCS-Modellanpassung

Für die globale Analyse der FCS-Parameter (N , τ_D) wurden diese gemäß den Ausführungen in 3.2.4 ff. segmentweise gegen die Aufnahmezeit aufgetragen und nach Gleichung [25] angepasst.

$$f(x) = a(x - b)^2 + c \quad \text{Gleichung [25]}$$

Dabei spiegelte c je nachdem, welcher FCS-Parameter aufgetragen wurde, N_{min} oder $\tau_{D_{\text{min}}}$ wider. b entsprach der Migrationszeit, bei der die jeweils minimale Teilchenzahl N_{min} oder die minimale Diffusionszeit $\tau_{D_{\text{min}}}$ erreicht war. Deren Startwerte wurden aus den jeweiligen Segmenten

bestimmt, indem τ_D bzw. N des Segments verwendet wurde, welches die größte Helligkeit aufwies. a beschrieb die Streckung bzw. Stauchung der Parabel und wurde basierend auf den Abständen der Segmente mit halbmaximaler Helligkeit zum Segment mit der maximalen Helligkeit gemäß Gleichung [26] definiert.

$$a = \frac{P_{\text{Hell}'} - P_{\text{Hell}}}{|x_{\text{Hell}'} - x_{\text{Hell}}|^2} \quad \text{Gleichung [26]}$$

$P_{\text{Hell}'}$ bezeichnete dabei den Parameterwert eines Segmentes (N oder τ_D) bei halbmaximaler Helligkeit und P_{Hell} den Parameterwert eines Segmentes bei maximaler Helligkeit. x_{Hell} bezeichnete die Segmentzahl des Segmentes mit maximaler Helligkeit und $x_{\text{Hell}'}$ die Segmentzahl des Segmentes mit halbmaximaler Helligkeit. Der Parameter b wurde dabei so angepasst, dass er sowohl bei der Auftragung der Wanderzeit durch den Fokus (t) gegen N als auch bei der Auftragung der Wanderzeit durch den Fokus (t) gegen τ_D den gleichen Wert annahm.

Aufgrund der Streuung der Daten wurde eine gewichtete Anpassung der Z-Scan-FCS-Daten durchgeführt. Der Wichtungsfaktor berücksichtigte dabei sowohl die Lage zum Zentrum als auch die Güte der einzelnen FCS-Datenanpassungen. Ersteres wurde durch die reziproke Helligkeit des jeweiligen Segmentes realisiert. Die Beurteilung der Güte der Datenanpassung erfolgte über die Summe der jeweiligen quadrierten gewichteten Residuen zwischen der Korrelationskurve mit der angepassten Modellkurve im Bereich von $1 \mu\text{s}$ bis zum Ende der Korrelationskurve. Als Wichtung wurde hier die Multiplikation des Residuenwertes mit der Anzahl des jeweiligen Vergrößerungsschrittes (1, 2, 3, usw.) (entspricht der Glättung der Korrelationskurve gemäß des *multiple- τ* -Algorithmus) definiert. Der Wichtungsfaktor für die parabolischen Kurven ergab sich aus dem Produkt der reziproken Helligkeit und der Summe der modifizierten Residuenwerte, welches anschließend noch einmal quadriert wurde. Zusätzlich wurden alle Segmente, deren Helligkeiten kleiner als die halbmaximale Helligkeit des hellsten Segmentes war, von der Z-Scan-Anpassung ausgeschlossen.

Die Anpassung der Helligkeiten der einzelnen Segmente erfolgte durch Anpassung der Daten mit einer lorentzförmigen *Peak*-Funktion ohne zusätzliche Wichtung. Um die molekulare Helligkeit in der Äquatorialebene des konfokalen Volumens zu bestimmen, wurde der Helligkeitswert der angepassten lorentzförmigen *Peak*-Funktion gewählt, dessen Migrationszeit derjenigen bei der minimalen Teilchenzahl N_{min} entsprach. Diese Helligkeit wurde dann mit N_{min} dividiert.

5. Ergebnisse

5.1 Generierung und Modifikation von Sar1p und Sar1p_{SCCS} mit Alexa₄₈₈

5.1.1 Entwicklung der Variante

Aufgrund der Proteinstruktur von Sar1p wies das natürlich vorkommende Cystein an Position 171 neben seiner Nähe zur Sec23p-Binderegion eine zusätzliche, sterische Hinderung auf. Wie in 3.1.3.1 erläutert, ließen diese strukturellen Gegebenheiten eine reduzierte Markierungsausbeute bzw. eine wenig effiziente Markierung vermuten. Durch den Austausch des Cysteins an Position 171 durch das strukturell ähnliche Serin und einen weiteren Austausch des Serins an Position 147 durch ein Cystein, sollten bessere Modifizierungsbedingungen geschaffen werden. Dieser Aminosäureaustausch in Form einer doppelten Punktmutation wurde durch eine zweifache Quickchange-Mutagenese realisiert. Abbildung 20 zeigt dabei den Vergleich der Aminosäuresequenz von Sar1p und dessen Variante Sar1p_{SCCS}. Die Variante wies dabei die Mutationen an

Sar1p	1	MAGWDIFGWFRDVLASLGLWNKHGKLLFLGLDNAGKTTLLHMLKNDRLAT	50
Sar1pC171SS147C	1	MAGWDIFGWFRDVLASLGLWNKHGKLLFLGLDNAGKTTLLHMLKNDRLAT	50
Sar1p	51	LQPTWHPTSEELAIGNIKFTTDFDLGGHIQARRLWKDYFPEVNGIVFLVDA	100
Sar1pC171SS147C	51	LQPTWHPTSEELAIGNIKFTTDFDLGGHIQARRLWKDYFPEVNGIVFLVDA	100
Sar1p	101	ADPERFDEARVELDALFNIAELKDVPFVILGNKIDAPNAVSEAE LR SALG	150
Sar1pC171SS147C	101	ADPERFDEARVELDALFNIAELKDVPFVILGNKIDAPNAVSEAE LR CALG	150
Sar1p	151	LLNTTGSQRIEGQRPVEVFM C SVVMRNGYLEAFQWLSQYI	190
Sar1pC171SS147C	151	LLNTTGSQRIEGQRPVEVFM S SVVMRNGYLEAFQWLSQYI	190

Abbildung 20: Sequenzvergleich von Sar1p (Sar1p) mit Sar1p_{SCCS} (Sar1pC171SS147C). Beide Proteine unterschieden sich nur an den Positionen 147 (○) und 171 (○).

Position 147 (Serin zu Cystein ○) und Position 171 (Cystein zu Serin ○) auf. Alle anderen Aminosäurepositionen von Sar1p_{SCCS} entsprachen denen von Sar1p. Auch die Anzahl der Aminosäuren beider Proteine war identisch. Mit dem erzeugten Plasmid wurde jeweils ein *E. coli* dH5α-Stamm und ein *E. coli* BL21DE3-Expressionsstamm transformiert.

5.1.2 Zellanzucht und Proteinreinigung von Sar1p und Sar1p_{SCCS}

Die Proteinexpressionen von Sar1p bzw. Sar1p_{SCCS} erfolgte in *E. coli* BL21DE3-Expressionsstämmen. Die Anzucht dieser wurde in LB-Medium (siehe 4.1.3.1) durchgeführt. Aus 6 l Nährmedium konnten dabei durchschnittlich 8-10 g Feuchtmasse erhalten werden.

Die Proteinreinigung erfolgte gemäß den Angaben in (4.2.2.2). In Abbildung 21 sind die SDS-PAGE-Gele der Proteinpräparation am Beispiel von Sar1p_{SCCS} mit den Belade- und Waschfraktionen (Bild A) sowie den Elutionsfraktionen (Bild B) dargestellt. Der Vergleich der einzelnen Bahnen in der ersten Phase der Proteinreinigung (Bild A) zeigte, dass die anfänglich vorhanden Proteinbanden im Überstand nach dem Zellaufschluss (Ü) und den anschließenden Waschfraktionen (W₁ bis W₃) an Intensität und Häufigkeit abnahmen. Die Elutionsfraktionen (Bild B) wiesen nur noch eine sichtbare Bande zwischen 15 kDa und 25 kDa auf, die dem Molekulargewicht von Sar1p (ca. 22 kDa) entsprach.

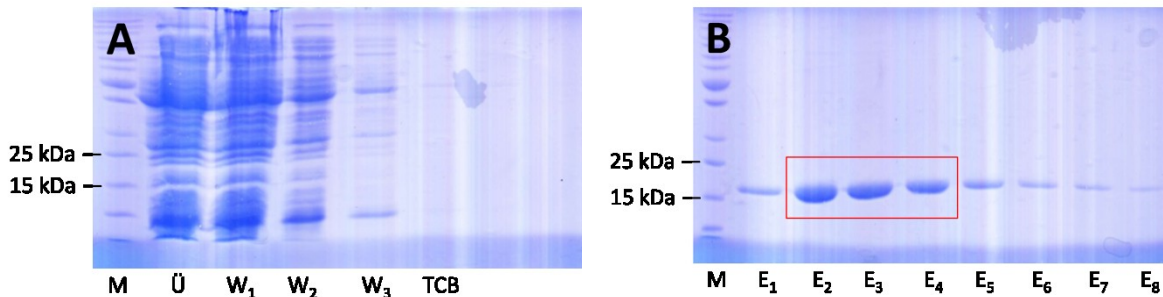


Abbildung 21: Die SDS-PAGE-Gele der Reinigung von Sar1p_{SCCS} zeigen im ersten Teil der Reinigung (Bild A), dass sich die zahlreichen Proteinbanden des Überstandes (Ü) während der einzelnen Waschschritte (W₁-W₃) an Intensität und Häufigkeit reduzierten. Bei der abschließenden Elution (Bild B) wurde ausschließlich Protein der Größe zwischen 15 kDa und 25 kDa in Form einer einzelnen Bande erhalten, welches Sar1p_{SCCS} entsprach (ca. 22 kDa). Die mit markierten Fraktionen stellten die mit der größten Proteinkonzentration dar.

Parallel dazu wurde eine Proteinbestimmung aller Elutionsfraktionen nach Bradford durchgeführt (4.2.2.2 ff). Mit allen Fraktionen, die eine Proteinkonzentration $\geq 20 \mu\text{M}$ aufwiesen, (E₂ = $55 \pm 9 \mu\text{M}$, E₃ = $42 \pm 6 \mu\text{M}$, E₄ = $26 \pm 2 \mu\text{M}$) wurde entsprechend (4.2.2.2 ff.) verfahren.

5.1.3 Fluoreszenzmarkierung von Sar1p und Sar1p_{SCCS}

5.1.3.1 Modifikation während der Proteinreinigung

Die Modifizierung von Sar1p erfolgte mit zehnfach molarem Überschuss an Alexa₄₈₈ im Anschluss an die Waschschritte 1-3 (siehe 4.2.2.2 ff). Dazu wurden die Präparations- und Modifikationsschritte auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und mittels Fluoreszenzscan analysiert (Abbildung 22, Bild B). Dabei zeigte sich, dass bei dem Waschschritt nach der Markierung (Durchlauf nach der Markierung, D_M) neben überschüssigem Alexa₄₈₈ () auch zuvor gebundenes Protein (\rightarrow) von der GSH-Agarosematrix

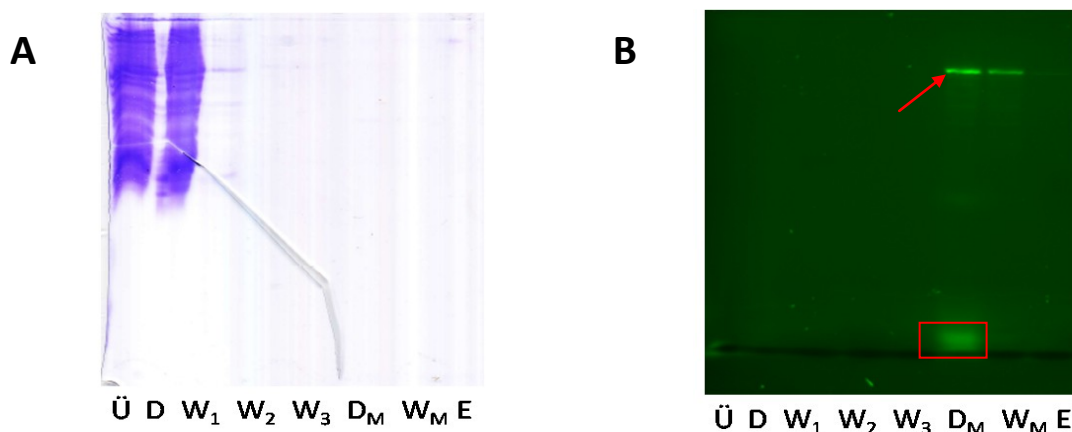


Abbildung 22: SDS-PAGE-Gel der Präparationsschritte bei der Herstellung und gleichzeitigen Modifikation von Sar1p nach Coomassie-Färbung (Bild A) und Fluoreszenzscan (Bild B). Dabei stellen Ü den Überstand nach Zellaufschluss, D den Durchlauf nach Auftragung des Überstandes auf eine GSH-Agarose-Säule und W₁-W₃ die einzelnen Waschfraktionen der GSH-Agarose-Säule dar. D_M steht für den Durchlauf nach der Markierungsreaktion, W_M für einen weiteren Waschschritt nach der Markierung und E für die Elution nach erfolgter Spaltung durch Thrombin.

eluiert wurde. Durch einen weiteren Waschschritt (W_M) war es zwar möglich, den restlichen freien Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen, bei der anschließenden Spaltreaktion mit Thrombin zeigte die Durchlauf fraktion (E) allerdings keine fluoreszierende Proteinbande. Auch bei der im Anschluss durchgeführten Coomassie-Färbung (Abbildung 22, Bild A) wurde kein Protein nach der Spaltung durch Thrombin erhalten.

5.1.3.2 Modifikation nach der Proteinreinigung

Die Modifikation von Sar1p erfolgte in Gegenwart von 20 x molarem Überschuss an Alexa₄₈₈. Die Variante Sar1p_{SCCS} wurde in Gegenwart von 10 x molarem Überschuss markiert. Bei allen Ansätzen wurde eine Proteinkonzentration von $\geq 50 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Probenpräparation, Aufreinigung und Konzentrierung erfolgten dabei gemäß den Angaben in 4.2.2.2. Für nachfolgende Charakteristiken wurde dabei eine möglichst vollständige Markierung des Proteins angestrebt. Die Ausbeute wurde dabei wie in 4.2.2.4 beschrieben, bestimmt und für verschiedene Inkubationszeiten und Proteinvarianten in Tabelle 5 zusammengefasst.

Sar1p wies dabei eine Markierungsausbeute von 12,6 % nach 2 h Inkubationszeit bei 22 °C auf. Eine Verlängerung der Inkubationszeit von 2 h auf 24 h führte zu einer Erhöhung der Markierungsausbeute auf 66,3 %. Im Vergleich dazu wies die Variante Sar1p_{SCCS} nach 2 h Inkubationszeit bei 22 °C mit 99,9 % die höchste Markierungsausbeute auf, die zudem einer vollständigen Modifikation sehr nahe kam. Wie in 4.2.2.2 dargelegt, wurde der überschüssige Alexa₄₈₈ Farbstoff mittels Größenausschlusschromatographie vom Protein entfernt. Bei allen diesen

Tabelle 5: Vergleich der Markierungsausbeute verschiedener Sar1p-Präparationen

Markierungsansatz	[Sar1] / μM	[Alexa ₄₈₈] / μM	Ausbeute* / %
Sar1p 2 h bei 22°C	11,2	1,4	12,6
Sar1p 24 h bei 22°C	10,4	6,9	66,3
Sar1p _{SCCS} 2h bei 22°C**	9,2	9,2	99,9

* Anteil des mit Alexa₄₈₈ modifizierten Sar1p

** Die Analyse der Sar1p_{SCCS}-Variante wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Tobias Irmischer (unter der praktischen Leitung von Herrn Jan Auerswald) durchgeführt.

Reinigungen zeigte sich eine größenbedingte Zerlegung der jeweiligen Proteinprobe auf zwei verschiedene Fraktionen (Fraktion 1 und Fraktion 2; Abbildung 23). Diese beiden Fraktionen und die Alexa₄₈₈-Fraktion konnten dabei vollständig voneinander getrennt werden. Die Analyse der

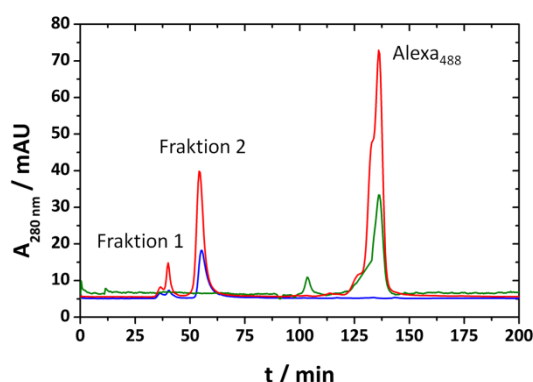


Abbildung 23: Vergleich der Elutionsprofile von Sar1p (—), Alexa₄₈₈ (—) und dem Modifizierungsansatz von Sar1p mit Alexa₄₈₈ nach 24 h bei 22°C (—).

Modifikation von Sar1p (nach 24 h Modifikationszeit bei 22 °C) mittels SDS-PAGE und anschließendem Fluoreszenzscan (4.2.2.4) ließ erkennen, dass sowohl Fraktion 1 als auch Fraktion 2 eine sehr intensive Proteinbande enthielten (Abbildung 24, Bild A). Da für die Markierung ausschließlich Proteinpräparationen eingesetzt wurden, die nur eine sichtbare Proteinbande aufwiesen (Vergleich Abbildung 21, Bild B), wurde diese dem modifiziertem Sar1p (Sar1p_{Al488}) zugeordnet. Anders als Fraktion 2, dessen SDS-PAGE-Gel-Analyse eine einzige Proteinbande zeigte, weist das SDS-PAGE-Gel von Fraktion 1 zusätzliche, fluoreszierende Banden auf, die sich oberhalb

und unterhalb der intensiven Bande von Sar1p_{AI488} befanden. Diese entsprachen zum einen Molekülen mit größerem Molekulargewicht (Banden oberhalb der intensiven Sar1p_{AI488}-Bande), zum anderen Molekülen mit kleinerem Molekulargewicht (Banden unterhalb der intensiven Sar1p_{AI488}-Bande). Dieser Vergleich verdeutlichte, dass es sich bei Fraktion 2 um eine Fraktion handelte, die Sar1p_{AI488} ohne nachweisbare Rückstände an weiteren Proteinen oder freiem Farbstoff

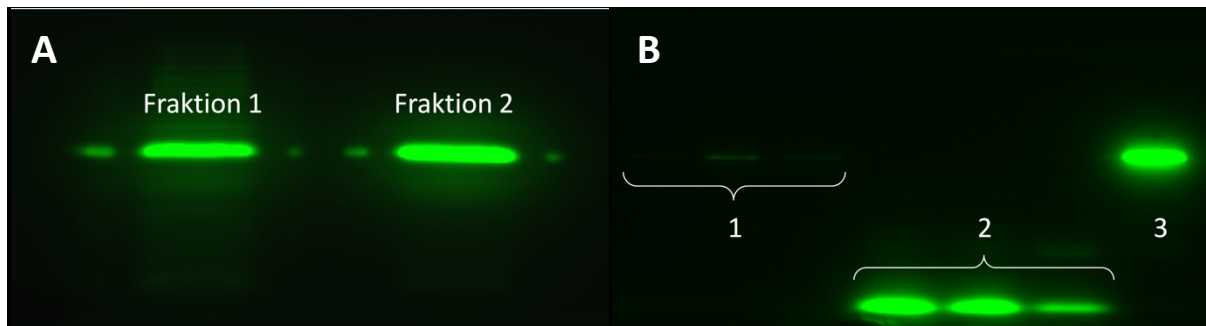


Abbildung 24: Fluoreszenzscan der SDS-PAGE-Gele von Sar1p_{AI488} und Sar1p_{SCCSAI488}. (Bild A) aufkonzentrierte Elutionsfraktionen (Fraktion 1 und Fraktion 2) von Sar1p_{AI488} bei 22 °C nach 24 h. (Bild B) Elutionsfraktionen von Sar1p_{SCCSAI488} bei 22 °C und 2 h (Bereich 1), die Elutionsfraktionen von freiem Alexa₄₈₈ (Bereich 2) sowie einen Teil der Elutionsfraktion von Sar1p_{AI488} (vergl. Fraktion 2, Bild A) (Bereich 3).

beinhaltete. Die Elutionsfraktionen der Reinigung von markiertem Sar1p_{SCCS} (Sar1p_{SCCSAI488}) nach dessen Modifikation mit Alexa₄₈₈ bei 22 °C über 2 h (Abbildung 24, Bild B, Bereich 1) wiesen ebenfalls nur eine Proteinbande im SDS-PAGE-Gel auf. Diese befand sich auf der gleichen Höhe wie die Bande der Fraktion 2 aus der Reinigung von Sar1p_{AI488} (Abbildung 24, Bild A), welche im Bild B als Referenz zusätzlich mit aufgetragen wurde (Bereich 3). Die Unterschiede in den Helligkeiten ließen sich dadurch erklären, dass die Präparation von Sar1p_{AI488} bereits aufkonzentriert worden war, die Fraktionen im Bereich 1 hingegen ohne Aufkonzentrierung analysiert wurden. Neben der gleichen Lage der Proteinbanden war im Bereich 1 ebenfalls kein zusätzlicher freier Alexa₄₈₈-Fluoreszenzfarbstoff zu identifizieren. Dieser wäre auf der Höhe der Banden im Bereich 2 zu erwarten gewesen, da dort die Fraktionen des freien Alexa₄₈₈ (vergl. Abbildung 23) aufgetragen wurden.

Da das Protein durch die Zugabe von SDS denaturierte, war eine Aussage zur Veränderung der Konformation durch die Modifikation mit Alexa₄₈₈ und anschließender Aufreinigung nicht möglich. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Elutionsfraktionen von Sar1p_{AI488} (Fraktion 1 und Fraktion 2) sowie Sar1p_{SCCSAI488} (Fraktion 2) (vergl. Abbildung 24) mittels FCS analysiert. Die Fluktuationskurven der jeweiligen Fraktion 2 von Sar1p_{AI488} (Abbildung 25, Bild B) als auch von Sar1p_{SCCSAI488} (Abbildung 25, Bild C) wiesen dabei eine homogene Fluktuation über den gesamten Messzeitraum auf. Bereiche mit starken Intensitätsschwankungen, welche sehr hellen Teilchen zugeordnet werden konnten, waren im Gegensatz dazu charakteristisch für die Fluktuationskurve der Elutionsfraktion 1 von Sar1p_{AI488} (Abbildung 25, Bild A). Der Vergleich der Autokorrelationsfunktionen dieser drei Fluktuationskurven (Abbildung 25, Bild D) und deren Datenanpassung mit einem dreidimensionalen Diffusionsmodell einer Komponente mit Triplettanteil (Gleichung [12], Tabelle 6) zeigte, dass die beiden Elutionsfraktionen 2 (Sar1p_{AI488} (●), und Sar1p_{SCCSAI488} (●)) Partikel beinhalteten, die im Mittel eine ähnliche Diffusionszeit von ca. 140 μs aufweisen. Durch die Anpassung dieser Korrelationskurven mit einem Diffusionsmodell einer Komponente und der

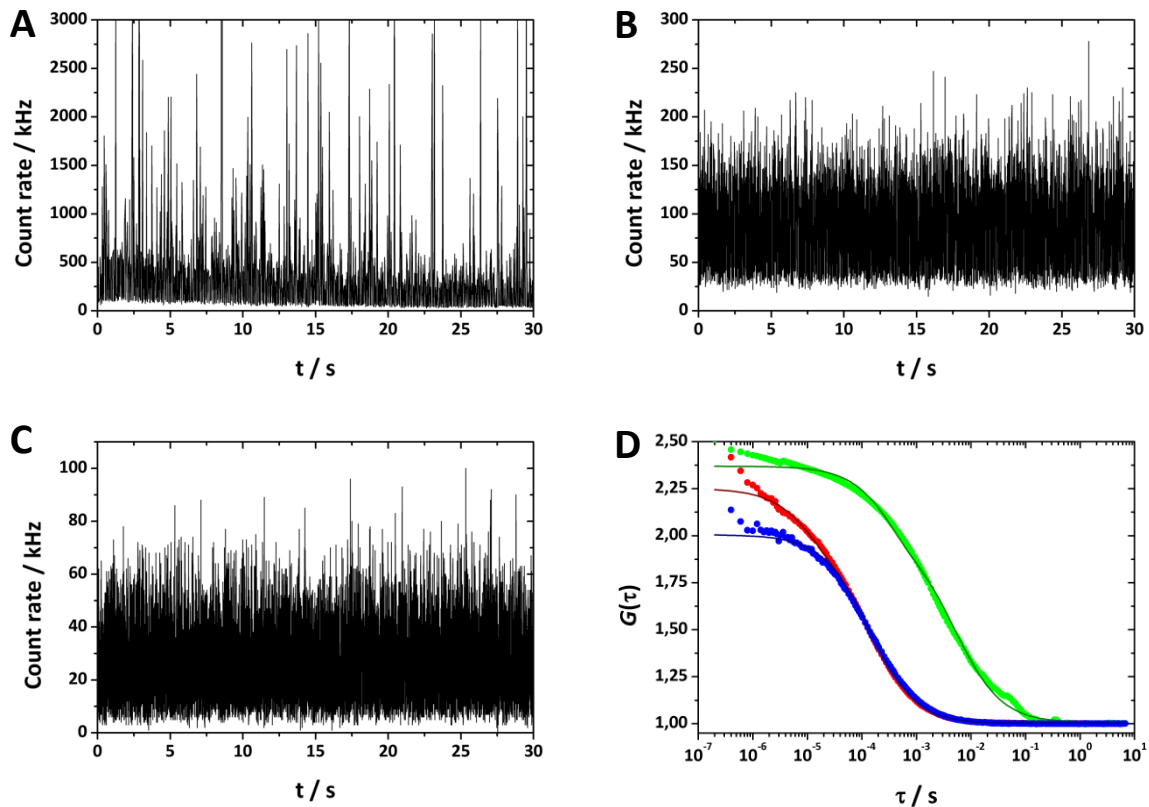


Abbildung 25: Zusammenfassende Darstellung der gemessenen Fluktuationenkurven der Elutionsfraktionen von Sar1p_{AI488} (22°C für 24 h) (Fraktion 1, Bild A und Fraktion 2, Bild B) sowie der Elutionsfraktionen von Sar1p_{SCCSAI488} (22°C für 2 h) (Fraktion 2 Bild C). Alle diese Fluktuationenkurven wurden autokorreliert und gemäß (Gleichung [12]) angepasst (Bild D; Sar1p_{AI488} Fraktion 1: (●)); Sar1p_{AI488} Fraktion 2: (●); Sar1p_{SCCSAI488} Fraktion 2: (●)). Die Bezeichnung der Fraktionen entspricht der aus Abbildung 23.

Tatsache, dass die SDS-PAGE-Gele (Abbildung 24, Bild A, Fraktion 2 bzw. Bild B, Bereich 1) nur eine Bande aufwies, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Partikelart handelt. Diese wies basierend auf dem jeweiligen Diffusionskoeffizienten D (Gleichung [6], Tabelle 6) (Sar1p_{AI488}: $10,0 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$; Sar1p_{SCCSAI488}: $10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) einen Wert auf, der dem von Sar1p ($10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, siehe Anhang 13.1.1) entspricht. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Korrelationskurve der Fraktion 1 (●), dass es sich um Partikel handelte, die mit ca. 5 ms langsamer

Tabelle 6: Zusammenfassung der FCS-Analyse der verschiedenen Sar1p-Varianten

Fraktion	N	$\tau_D / \mu\text{s}$	$D^* / \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	$T_T / \%$	$\tau_T / \mu\text{s}$
Sar1p _{AI488} -Fraktion 1	0,8	4937,2	$0,3 \cdot 10^{-7}$	26	296,7
Sar1p _{AI488} -Fraktion 2	2,7	140,5	$10,0 \cdot 10^{-7}$	20	10,0
Sar1p _{SCCSAI488} -Fraktion 2	2,1	137,3	$10,2 \cdot 10^{-7}$	0	-----**

Der Diffusionskoeffizient wurde nach Gleichung [6] berechnet. Das r_0 wurde im Rahmen einer Kalibrationsmessung mit Alexa₄₈₈-Hydrazid bestimmt und beträgt 237 nm ($D_{\text{Alexa488}} = 4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, [81]; $\tau_{D_{\text{Alexa488}}} = 33,8 \mu\text{s}$). $D_{\text{Sar1p}} = 10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (bestimmt nach Gleichung [11], siehe 13.1.1)

** Die Modellanpassung ergab einen Tripletanteil von 0 %, wodurch nach Gleichung [12] der Tripletterm entfällt.

als Sar1p_{AI488} bzw. Sar1p_{SCCSAI488} diffundierten. Der ermittelte mittlere Diffusionskoeffizient war mit $0,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 35 kleiner als der von Sar1p_{AI488}. Gemäß Gleichung [11] ergaben sich daraus Partikel mit einem mittleren hydrodynamischen Kugelradius von ca. 86 nm (vergl. Sar1p: ca. 2 nm).

5.2 Etablierung eines Testverfahrens zum Nachweis der katalytischen Aktivität von Sar1p

5.2.1 Optimierung der Messparameter und der Nachweislösung

Um die Hydrolyse von GTP zu GDP und P_i zu quantifizieren, wurde eine chemische Nachweisvariante, basierend auf Molybdat und Malachitgrün, verwendet. Die Etablierung erfolgte dabei in Anlehnung an die in [73] beschriebene Methode. Im Rahmen der Anpassung dieses Nachweisverfahrens an das COPII-System wurde zu Beginn ein Test auf Sensitivität und Signalentwicklungszeit durchgeführt (Abbildung 26). Das Kriterium für die Signalsensitivität ist dabei der Anstieg der P_i -Kalibriergeraden (in $\text{mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$), bei der das Messsignal gegen die jeweiligen P_i -Konzentration aufgetragen wurde. In [73] wurde eine Steigung von $4,0 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$ nach 5 min Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung erreicht (entspricht -- in Abbildung 26, Bild A). Im Gegensatz dazu betrug die

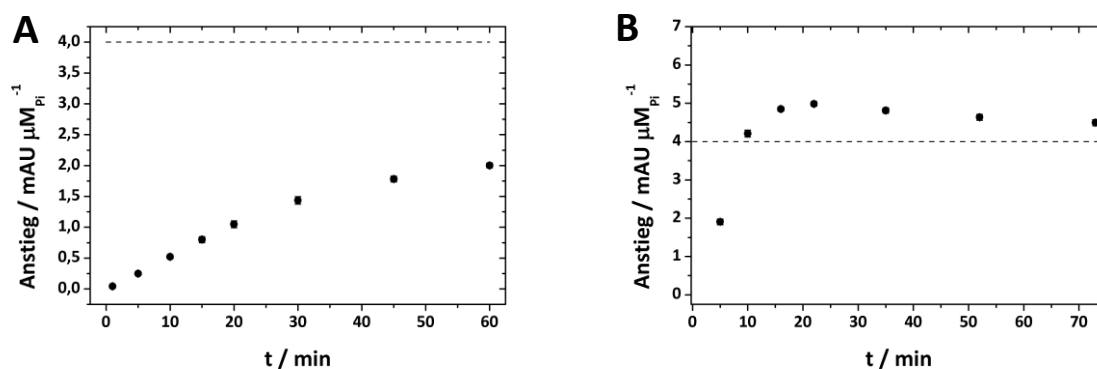


Abbildung 26: Anstiege einer P_i -Kalibrierreihe (0-100 μM) nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (4.2.4.1)(Bild A, ●) im Vergleich zum beschriebenen Geradenanstieg von $4,0 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$ [73] (Bild A, --). Die Zugabe von Wasser bewirkte dabei eine Erhöhung des Anstieges der P_i -Kalibrierreihe (Bild B, ●) nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung über das Niveau von $4,0 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$ [73](Bild B, --).

Steigung der P_i -Kalibriergeraden auch nach 60 min Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung nur ca. 50 % des Niveaus, welches in [73] beschrieben wurde (maximal $2 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$; Abbildung 26 Bild A). Eine Erhöhung des Probenvolumens durch Zugabe von $100 \mu\text{l H}_2\text{O}$ von $175 \mu\text{l}$ auf $275 \mu\text{l}$, was gleichzeitig eine Erhöhung des pH-Wertes der Nachweislösung nach sich zog, zeigte eine Erhöhung des Geradenanstieges auf $4,6 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$ (Abbildung 26, Bild B). Dies entsprach 115 % des Niveaus, welches in [73] publiziert wurde ($4,0 \text{ mAU } \mu\text{M}_{P_i}^{-1}$; --). Weiterhin bewirkte die Zugabe von H_2O eine Beschleunigung der Signalentwicklung. Diese war bereits nach ca. 20 min maximal und fiel im Laufe der weiteren Minuten wieder leicht ab. Dennoch konnte sie im Zeitfenster von 15 min bis 35 min nach Zugabe von Malachitgrün-Nachweislösung als konstant angesehen werden, was vergleichbare Messwerte ermöglichte.

Da das Gleichgewicht zwischen Ortho- und Heptamolybdat im sauren Milieu auf der Seite des Heptamolybdates lag (siehe Anhang 13.2.1), die Phosphatnachweisreaktion jedoch nur unter sauren Bedingungen erfolgte, wurde im Folgenden der Einfluss der Orthomolybdat-Menge (als Heptamolybdat eingesetzt) auf die Signalintensität und Geschwindigkeit der Signalausbildung untersucht (Abbildung 27, Bild A). Die maximale Signalintensität (ca. $0,4 \text{ AU}$) wurde dabei ab etwa

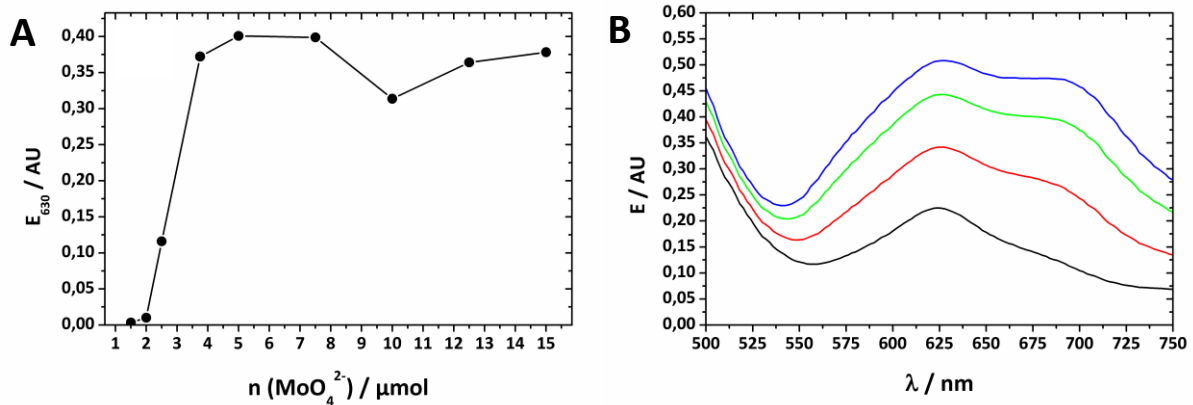


Abbildung 27: Optimierung des Orthomolybdat-Gehaltes. (Bild A) Sättigungsverhalten des Messsignals bei ca. 0,4 AU. Dies wurde ab einer Orthomolybdatmenge von ca. 5 μmol erreicht. (Bild B) Vergleich der Detektionsspektren von 20 μM P_i —, 50 μM P_i —, 80 μM P_i — und 100 μM P_i — in Gegenwart von 150 μl Nachweislösung und 100 μl H_2O nach 60 min Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung.

5 μmol Orthomolybdat im Ansatz erreicht. Bei 2,5 nmol P_i (100 μM in 25 μl Standardlösung), was der höchsten Konzentration innerhalb der P_i -Kalibrierreihe entsprach (0-100 μM P_i), wie sie für die Anstiegsauswertung in Abbildung 26 Bild A und Bild B verwendet wurde, ergab sich ein Anstieg von 4 $\text{mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$. Dieser war identisch mit dem aus [73] (4 $\text{mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$). Eine Erhöhung der Orthomolybdatmenge über 5 μmol hinaus führte zu keiner weiteren Steigerung der Signalintensität. Weiterhin ließ sich die Signalintensität durch Änderung der Detektionswellenlänge zusätzlich steigern. Die UV-Vis-Spektren der Malachitgrün-Nachweislösung wiesen in Gegenwart verschiedener Mengen P_i (Abbildung 27, Bild B) ein lokales Maximum bei ca. 630 nm auf.

5.2.2 Entwicklung eines geeigneten Kalibrierstandards zum Nachweis der GTP-Hydrolyse

Nach [73] wurde als Kalibrierstandard eine Konzentrationsreihe von 0-100 μM P_i verwendet. Die eigentlichen Experimente beinhalteten allerdings GTP und GDP, welche in wässrig saurer Umgebung autohydrolysieren und somit P_i freisetzen. Aus diesem Grund wurde die Autohydrolyse von GDP und GTP unter den vorherrschenden Bedingungen der Nachweisreaktion (4.2.4.1) bei unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten beobachtet (Abbildung 28). In Gegenwart der eingesetzten Menge an GDP (maximal 100 μM) konnte nur minimal eine zusätzliche Steigerung des

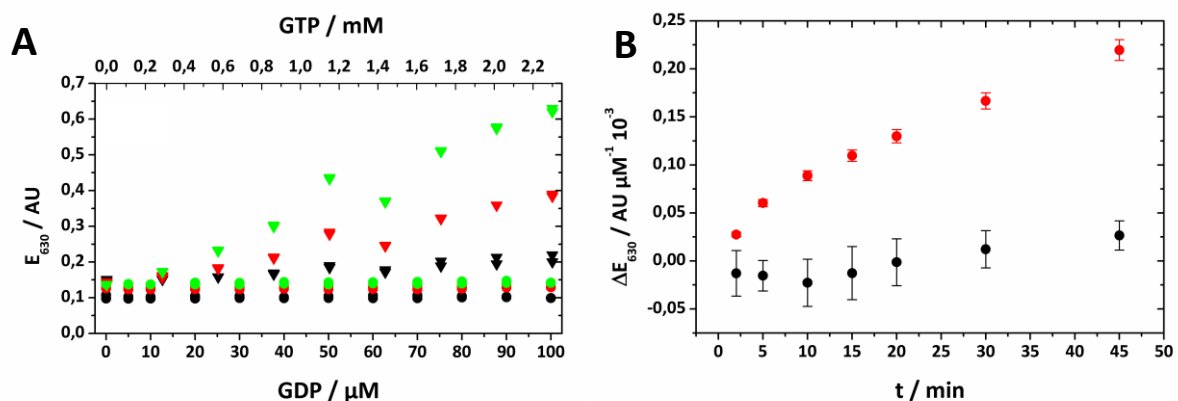


Abbildung 28: Vergleich der Autohydrolyseraten von GDP und GTP bei verschiedenen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (Bild A; GDP: 0 min (●), 20 min (●), 45 min (●); GTP: 0 min (▲), 20 min (▲), 45 min). Die aus den Absorptionssignalen erhaltenen Geradenanstiege (Bild B) für GDP (●) und GTP (●) zeigten, dass GTP durch Autohydrolyse einen Beitrag zum Messsignal leistete. Als Fehler wurden die im Rahmen der Datenanpassung erhaltenen Fehler für die Geradenparameter verwendet.

Absorptionssignale bei 630 nm gemessen werden. Die absoluten Absorptionen (Abbildung 28, Bild A nach 0 min (●), 20 min (●) und 45 min (●) Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung) lagen alle zwischen 0,10 AU und 0,15 AU. Der Vergleich der jeweiligen Geradenanstiege, die aus der GDP-Reihe zu unterschiedlichen Zeitpunkten berechnet und gegen die Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung aufgetragen wurden (Abbildung 28, Bild B, (●)), zeigten, dass sich dieser leicht erhöhte. GTP wies eine Zunahme des Absorptionssignals bei steigender Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung auf. Abbildung 28, Bild B (●) zeigte, dass 1 mM GTP nach 20 min Inkubationszeit zu einem Geradenanstieg von $> 0,1 \text{ mAU } \mu\text{M}^{-1}$ führte, was einem absoluten Signal von $> 0,1 \text{ AU}$ entsprach. Verglichen mit der Kalibrierreihe aus reinem P_i , die einen Anstieg von $4 \text{ mAU } \mu\text{M}_i^{-1}$ aufwies, würden diese $0,1 \text{ AU}$ einer P_i -Konzentration von $25 \mu\text{M}$ (25 % der maximalen P_i -Konzentration der Kalibrierreihe) entsprechen, die jedoch nicht dem Enzymumsatz, sondern der Autohydrolyse von GTP zuzuordnen wäre.

Um die Hydrolyserate von GTPasen in Gegenwart der Autohydrolyse von GTP zu quantifizieren, wurde eine Kalibrierreihe entwickelt, die die Spaltung von GTP in GDP und P_i simuliert. Abbildung 29, Bild A zeige beispielhaft die gemessenen Absorptionssignale dieser Kalibrierreihe, die im zeitlichen Verlauf nach Zugabe von Malachitgrün-Nachweislösung zwei Phasen aufwies. Zum einen wurde die Nachweisreaktion des in der Lösung vorhandenen P_i , die mit der Erhöhung des Geradenanstieges verbunden war und zum anderen eine kontinuierliche Verschiebung der Gerade in Y-Richtung, was auf die kontinuierliche Autohydrolyse des GTP zurückzuführen war, beobachtet. Da die gesamte Kalibriergerade ab ca. 10 min (●) Inkubationszeit diese Verschiebung erfuhr, blieb der Geradenanstieg ab diesem Zeitpunkt nahezu konstant (Abbildung 28, Bild B ●). Neben diesem

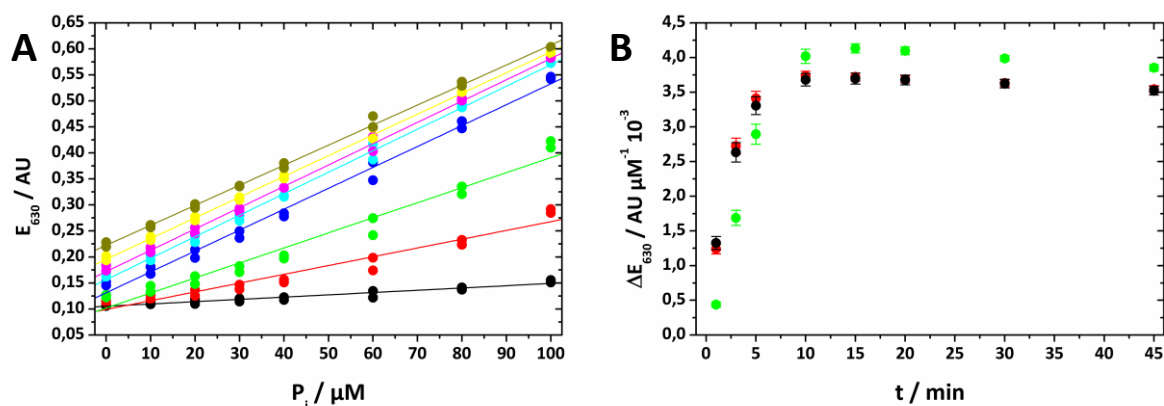


Abbildung 29: (Bild A) Die Signalentwicklung des Kalibrierstandards aus GTP, GDP und P_i nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (1 min ●, 3 min ●, 5 min ●, 10 min ●, 15 min ●, 20 min ●, 30 min ● und 45 min ●). (Bild B) Die Entwicklung der Geradenanstiege in Gegenwart von H_2O ●, HKM-Puffer (4.1.3.7) ● und HKM-Puffer mit anschließender Zugabe von EDTA ●.

konstanten Messsignal zur Quantifizierung der Umsatzrate war es zudem hilfreich, die Enzymreaktion vor dem Beginn der Nachweisreaktion abzurechnen. Dadurch bestand die Möglichkeit, die Nachweisreaktion in allen Reaktionsansätzen gleichzeitig zu starten und nach dem Erreichen der konstanten Geradenanstiege auch gleichzeitig zu vermessen. Im Falle von Sar1p, welches in seinem aktiven Zentrum neben GTP auch Mg^{2+} gebunden hatte (3.1.3.2), wurde der Abbruch der Enzymreaktion durch Zugabe von EDTA realisiert. Abbildung 29, Bild B zeigte dabei den Vergleich der Geradenanstiege der komplexen Kalibriergerade (GTP, GDP und P_i , siehe 4.1.4.2) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung in Gegenwart verschiedener Lösungsmittel (H_2O ●, HKM-Puffer (4.1.3.7) ●, HKM-Puffer mit anschließender Zugabe von EDTA ●). In allen drei Fällen stellte sich eine Konstanz des Geradenanstieges im Bereich von ca. 10-30 min

Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung ein. Beim Vergleich der Geradenanstiege zeigte sich kein Unterschied zwischen H_2O ● und HKM-Puffer ●. Die Zugabe von EDTA zum HKM-Puffer führte zusätzlich zu einer geringen Steigerung des Anstieges von $3,7 \text{ mM } \mu\text{M}^{-1}$ (H_2O ●, HKM-Puffer ●) auf $4,0 \text{ mM } \mu\text{M}^{-1}$ (HKM-Puffer mit EDTA ●).

5.2.3 Einfluss von Phospholipiden und Alexa₄₈₈

Da Phospholipide im sauren Milieu ebenfalls hydrolysieren konnten, und somit die Möglichkeit der Freisetzung von P_i bestand und viele Reaktionen von Sar1p bzw. den COPII-Komponenten in Gegenwart von Phospholipiden (z.B. in Form von MMM-Liposomen, 4.2.3.2), durchgeführt werden sollten, wurde deren Einfluss auf das Malachitgrün-Signal in Gegenwart der komplexen Kalibrierreihe (5.2.2) untersucht (Abbildung 30, Bild A). Unabhängig von der Lipidkonzentration existierte ein zeitlicher Bereich der Inkubation mit Malachitgrün-Nachweislösung, in dem ein konstanter Geradenanstieg beobachtet wurde (15-30 min). Bezüglich der Höhe des Geradenanstieges schwankten die Werte von $3,6\text{-}4,2 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$ (ohne Liposomen ergab der Geradenanstieg $3,8 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$).

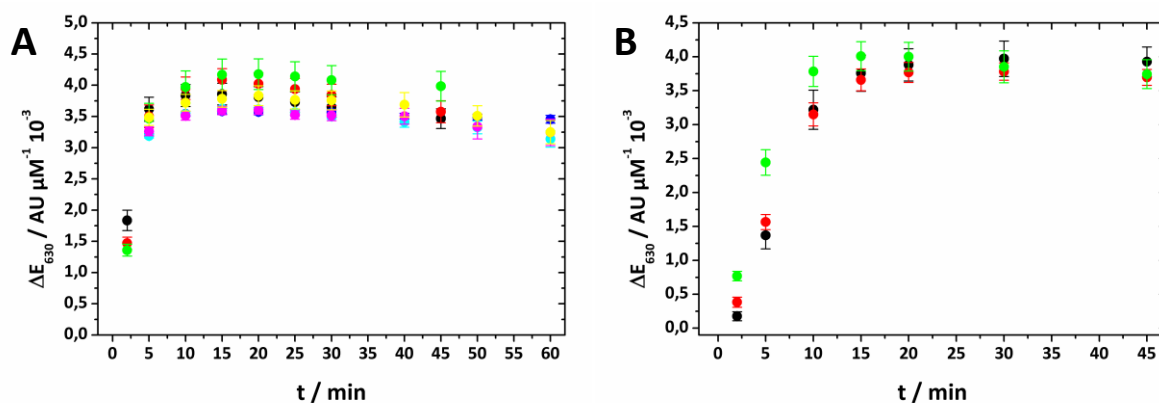


Abbildung 30: (Bild A) Einfluss der Lipidkonzentration auf die Signalentwicklung (Anstiege der Kalibrierreihe, 5.2.2) nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (0,0 mM ●; 0,2 mM ●; 0,5 mM ●; 0,75 mM ●; 1 mM ●; 1,25 mM ●; 1,5 mM ● Lipid). (Bild B) Einfluss von Alexa488 (0 μM ●; 5 μM ● und 7,5 μM ●). Alle Messungen wurden in Gegenwart von HKM-Puffer und EDTA durchgeführt.

Da neben Sar1p auch fluoreszenzmarkierte Varianten der GTPase enzymatisch untersucht werden sollten, war es notwendig, den Einfluss des zu verwendenden Fluorophors (Alexa₄₈₈) auf die Nachweisreaktion zu analysieren (Abbildung 30, Bild B). Dabei zeigten alle eingesetzten Mengen an Alexa₄₈₈ keinen Einfluss auf die Lage des Maximums der Anstiege der komplexen Kalibrierreihe (5.2.2). Diese lagen zwischen $3,6 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$ (0 μM Alexa₄₈₈ ●) und $3,8 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$ (7,5 μM Alexa₄₈₈ ●) bei 20 min Inkubationszeit mit Malachitgrün-Nachweislösung. Lediglich der Beginn des Zeitfensters, in dem sich ein konstanter Geradenanstieg eingestellt hatte, verschob sich von ca. 15 min auf 20 min.

5.3 GTPase-Aktivität von Sar1p und dessen Regulation

5.3.1 Vergleich verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Basalaktivität von Sar1p

Sar1p war als GTPase in der Lage GTP zu GDP und P_i zu hydrolysieren. Für den Nachweis bzw. die Quantifizierung dieser Reaktion wurden sowohl das gebildete P_i mittels Molybdat und Malachitgrün (siehe Anhang 13.2.1) als auch das Verhältnis von radioaktiv markiertem GTP zu radioaktiv markiertem GDP bestimmt. Die Präparation der jeweiligen Reaktionsansätze erfolgte dabei gemäß

Tabelle 7: Vergleich der Sar1p Basalaktivität im Rahmen verschiedener Nachweismethoden.

Nachweismethode	Sar1p / pmol	[GTP] / mM	Aktivität / pmol min ⁻¹	k _{cat} / min ⁻¹
Malachitgrün-Test	75,0	1,0	38,6 ± 1,7	0,51 ± 0,03
radioaktiver Test	1554,8	1,0	865,5 ± 48,3	0,56 ± 0,03

Als Fehler wurden die im Rahmen der Datenanpassung erhaltenen Fehler für die Geradenanstiege verwendet.

den Angaben unter 4.2.4.2 bzw. 4.2.4.4. Dabei wies Sar1p bei Anwendung des Malachitgrün-Tests mit einer Umsatzrate (k_{cat}) von $(0,51 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ einen ähnlichen Wert auf wie im Fall des Tests mit radioaktiv markiertem GTP $((0,56 \pm 0,03) \text{ min}^{-1})$.

5.3.2 Einfluss von nicht proteinogenen Effektoren auf die GTPase-Aktivität von Sar1p

Im Rahmen der COPII-Vesikel-Bildung interagiert Sar1p neben Phospholipiden auch mit Mg^{2+} als nicht proteinogene Effektoren. Dabei wies die katalytische Aktivität in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration (Abbildung 31, Bild A) ein Maximum bei 1 mM Mg^{2+} auf. Diese maximale Basalaktivität von $(0,52 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ reduzierte sich im Falle von geringeren Mg^{2+} -Konzentrationen und führte bei Abwesenheit von Mg^{2+} zu einer kompletten Inaktivierung des Enzyms. In Gegenwart höherer Mg^{2+} -Konzentrationen reduzierte sich die Basalaktivität ebenfalls. Bei Anwesenheit von 15 mM Mg^{2+} betrug die Basalaktivität nur noch $(0,33 \pm 0,02) \text{ min}^{-1}$, was $(63,6 \pm 5,0) \%$ der ursprünglichen GTPase-Aktivität entsprach.

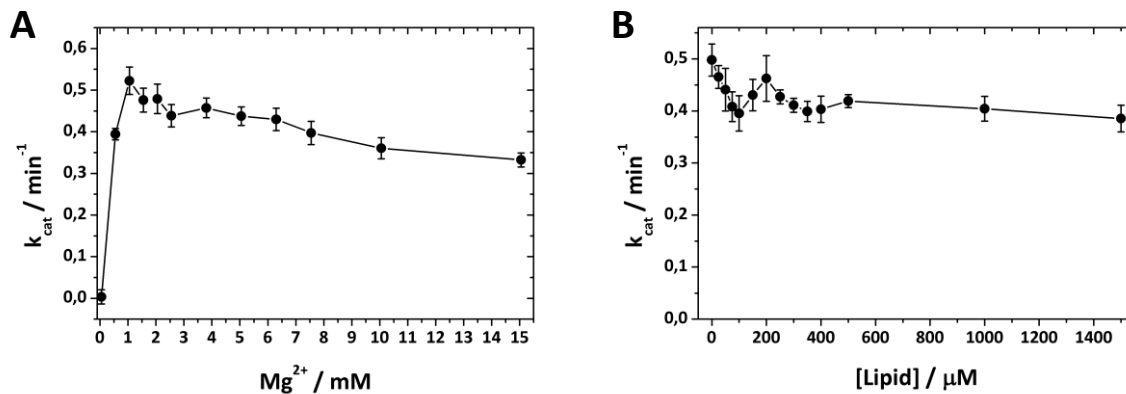


Abbildung 31: Einfluss der Mg^{2+} -Konzentration (Bild A) und der Lipidkonzentration (Bild B) auf die basale GTPase-Aktivität von Sar1p. Die Inkubationszeit mit Malachitgrünlösung betrug 20 min. Die angegebenen Fehler setzen sich aus den Regressionsfehlern der Kalibrierreihe (siehe 13.3.3 und 13.3.4) und den jeweiligen Zeit-Umsatzkurven der einzelnen Enzymreaktionen zusammen.

Bei Anwesenheit von Phospholipiden (in Form von extrudierten MMM-Liposomen, 4.2.3.2) zeigten Titrationsexperimente von Sar1p in Gegenwart steigender Mengen an MMM-Liposomen eine Reduktion der Basalaktivität von $(0,50 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ auf $(0,39 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$, was $(77,4 \pm 5,4) \%$ des Originalniveaus (Abbildung 31, Bild B) entsprach.

5.3.3 Einfluss von proteinogenen Effektoren auf die GTPase-Aktivität von Sar1p

Während der Bildung von COPII-Vesikeln waren neben Sar1p weitere proteinogene Faktoren beteiligt, die die GTPase-Aktivität beeinflussten (3.1.3.2). In Gegenwart der wasserlöslichen C-terminalen Domäne des transmembranen Guanidin-Austauschfaktors Sec12p (Sec12 Δ Cp) und MMM-Liposomen zeigte sich in Bezug auf die Basalaktivität von Sar1p keinerlei aktivierende Wirkung (Abbildung 32, Bild A; Tabelle 8). Die Basalaktivität des Enzyms (in Gegenwart von

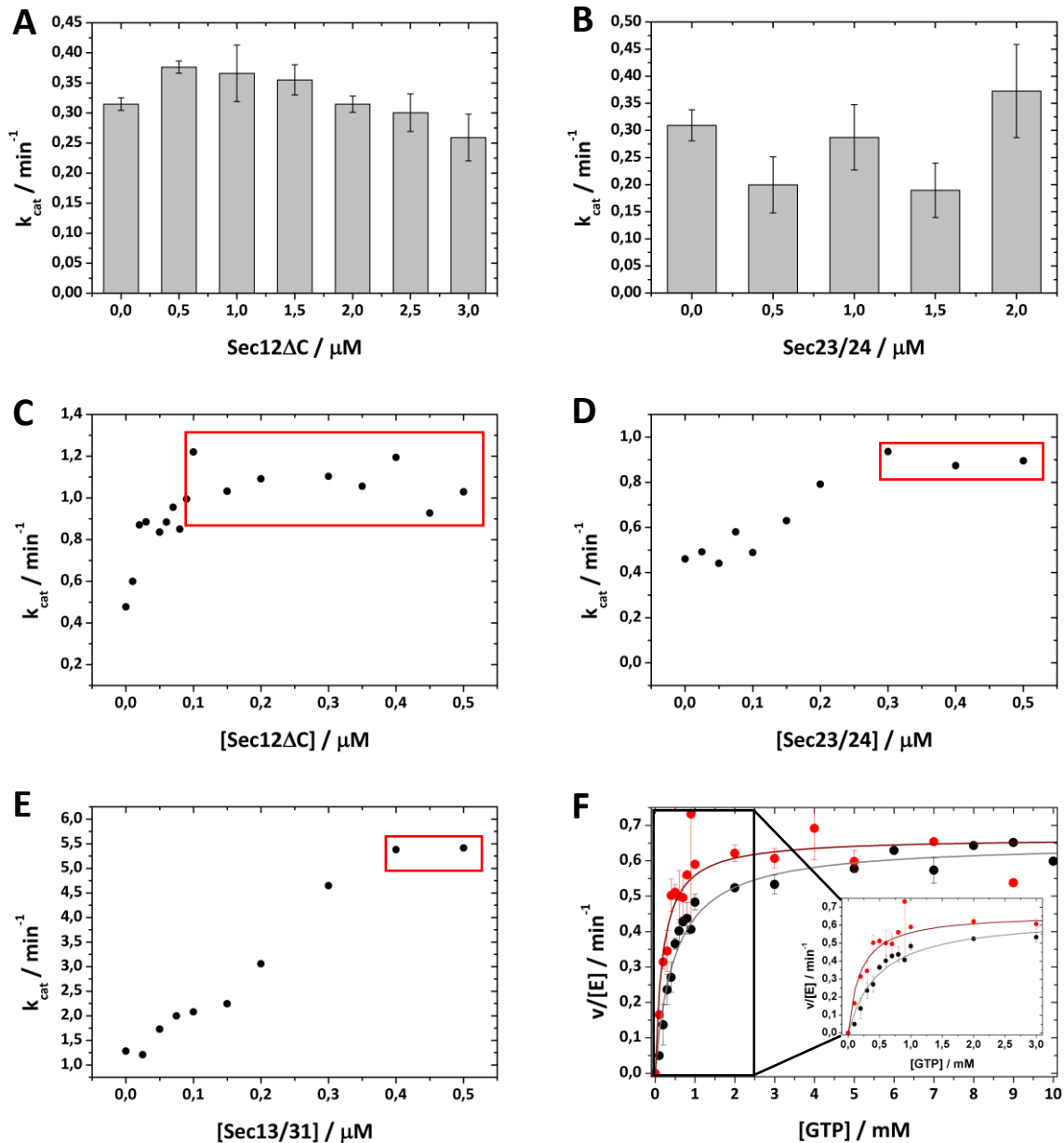


Abbildung 32: Einfluss proteinogener Faktoren (COPII-Proteine) auf die Basalaktivität von Sar1p. (Bild A) Sar1p Umsatzraten bei verschiedenen Mengen an Sec12ΔCp. (Bild B) Sar1p Umsatzraten in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec23/24p. Die in (Bild A) und (Bild B) angegebenen Fehler setzen sich aus den Regressionsfehlern der Kalibrierreihe und den jeweiligen Zeit-Umsatzkurven der einzelnen Enzymreaktionen zusammen. (Bild C) Variation der Konzentration von Sec12ΔCp bei 0,5 μM Sec23/24p und 0,5 μM Sar1p. (Bild D) Variation der Konzentration von Sec23/24p bei 0,1 μM Sec12ΔCp und 0,5 μM Sar1p. (Bild E) Variation der Konzentration von Sec13/31p zu den inneren Hüllproteinen (0,5 μM Sec23/24p, 0,1 μM Sec12ΔCp und 0,5 μM Sar1p). Alle Darstellungen zeigten einen Sättigungsbereich (□). (Bild F) Vergleich der Umsatzraten von Sar1p bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (●) von Sec12ΔCp. Die Fehler entsprachen dabei der Standardabweichung aus einer Doppelbestimmung.

MMM-Liposomen, siehe 5.3.2) von $(0,39 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ erreichte auch bei einem sechsfachen molaren Überschuss an Sec12ΔCp nur einen maximalen Wert von $(0,38 \pm 0,01) \text{ min}^{-1}$. Ein vergleichbarer Trend zeigte sich bei Anwesenheit des Heterodimers Sec23/24p in Gegenwart von MMM-Liposomen (Abbildung 32, Bild B; Tabelle 8). Auch hier wurde eine vergleichbare Basalaktivität mit $(0,37 \pm 0,09) \text{ min}^{-1}$ bestimmt. Somit ergab sich in beiden Fällen unabhängig von der eingesetzten Menge an Effektorprotein keine Steigerung der Basalaktivität von Sar1p.

Bei zunehmender Konzentration an Sec12ΔCp (0-0,5 μM) in Gegenwart von 0,5 μM Sec23/24p und 0,5 μM Sar1p hingegen wurde eine Erhöhung der GTPase-Aktivität beobachtet, die im Bereich

Tabelle 8: Zusammenfassung des Einflusses proteinogener Effektoren auf die Basalaktivität von Sar1p

Kombination *	[Sar1p] / μM	[Sec12 Δ Cp] / μM	[Sec23/24p] / μM	[Sec13/31p] / μM	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1}$
Sar1p	0,5	----	----	----	$0,39 \pm 0,03$
Sar1p + Sec12 Δ Cp	0,5	0 bis 3	----	----	$0,38 \pm 0,01$
Sar1p + Sec23/24p	0,5	----	0 bis 2	----	$0,37 \pm 0,09$
Sar1p + Sec12 Δ Cp + Sec23/24p	0,5	0 bis 0,5	0,5	----	$1,08 \pm 0,09$
	0,5	0,1	0 bis 0,5	----	$0,90 \pm 0,03$
Sar1p + Sec12 Δ Cp + Sec23/24p + Sec13/31p	0,5	0,1	0,5	0 bis 0,5	$5,40 \pm 0,02$

Alle Messungen wurden in Gegenwart von 1,5 mM MMM-Lipiden (siehe 4.2.4.2) durchgeführt.

von 0,1 μM bis 0,5 μM Sec12 Δ Cp eine Sättigung erfuhr (Abbildung 32, Bild C, □). Innerhalb dieses Plateaus betrug die durchschnittliche Umsatzrate von Sar1p ($1,08 \pm 0,09$) min^{-1} . Dies bedeutete eine Steigerung um den Faktor $2,8 \pm 0,5$, verglichen mit der Basalaktivität ($(0,39 \pm 0,03) \text{min}^{-1}$). Auch die Titration von Sec23/24p in Gegenwart von 0,1 μM Sec12 Δ Cp und 0,5 μM Sar1p führte zu einer Steigerung der Basalaktivität. Bei höheren Konzentrationen von Sec23/24p (0,3-0,5 μM) erfuhr diese ebenfalls eine Sättigung (Abbildung 32, Bild D, □). Die mittlere Umsatzrate in diesem Bereich ($0,90 \pm 0,03$) min^{-1} entsprach dabei einer Umsatzsteigerung auf das $2,3 \pm 0,3$ fache der Basalaktivität ($(0,39 \pm 0,03) \text{min}^{-1}$). Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass die wasserlösliche Domäne des Guanidinaustauschfaktors (Sec12 Δ Cp) notwendig war, damit die GTPase aktivierende Wirkung des GAP (Sec23/24p, siehe 3.1.3.2) zur Anwendung kommen konnte. Eine mögliche Ursache dafür zeigten Titrationskurven von Sar1p mit verschiedenen Mengen an GTP in Gegenwart und Abwesenheit von Sec12 Δ Cp (Abbildung 32, Bild F). Die daraus resultierenden Anstiege (Substratumsatz pro Zeit), aufgetragen gegen die eingesetzte GTP-Konzentration, zeigten einen hyperbolen Verlauf, der nach den Ausführungen von [80] ausgewertet wurde. Die maximale Umsatzrate von Sar1p ohne Sec12 Δ Cp ($(0,65 \pm 0,02) \text{min}^{-1}$) hatte dabei einen ähnlichen Wert wie bei Anwesenheit von Sec12 Δ Cp ($(0,66 \pm 0,03) \text{min}^{-1}$). Anders verhielt es sich mit der Michaelis-Konstante (K_M), die der Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzrate entsprach. Bei Abwesenheit von Sec12 Δ Cp betrug diese ($0,48 \pm 0,05$) mM das 2,5 fache von dem, welche in Gegenwart von Sec12 Δ Cp ($0,19 \pm 0,04$) mM erreicht wurde.

Neben den beiden inneren Hüllproteinen Sec12 Δ CP und Sec23/24p hatte auch das äußere Hüllprotein Sec13/31p einen Einfluss auf die GTPase-Aktivität von Sar1p (3.1.3.2). Dazu wurden verschiedenen Mengen von Sec13/31p der Kombination der inneren Hüllproteine hinzugefügt. Dabei zeigte sich eine weitere Erhöhung der GTP-Hydrolyserate, die bei höheren Sec13/31p-Konzentrationen (0,4-0,5 μM) ebenfalls eine Sättigung erfuhr (Abbildung 32, Bild E, □). Die dabei erreichte mittlere Umsatzrate von ($5,40 \pm 0,02$) min^{-1} entsprach zugleich einem Aktivierungsfaktor, bezogen auf die Basalaktivität von $13,8 \pm 1,1$.

5.3.4 GTPase-Aktivität von Sar1p_{SCCSA1488} im Vergleich zu Sar1p

Wie in 5.1.3.2 gezeigt, war es möglich, Sar1p_{SCCS} in 2 h vollständig mit einem Fluoreszenzmarker zu modifizieren. Um die Ergebnisse von zukünftigen Untersuchungen dieser fluoreszenzmarkierten Variante mit dem Wildtyp-Enzym vergleichen zu können, wurden deren enzymatische Aktivitäten bestimmt. Als Kriterium für die enzymatische Funktionalität galten dabei die in 5.3.3 gezeigten Aktivierungsschritte der Basalaktivitäten in Gegenwart des inneren Hüllkomplexes (bestehend aus

Tabelle 9: Zusammenfassung des Einflusses proteinogener Effektoren auf die Umsatzrate von Sar1p_{SCCSAI488}

Kombination *	[Sar1p _{SCCSAI488}] / μM	[Sec12 Δ Cp] / μM	[Sec23/24p] / μM	[Sec13/31p] / μM	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1}$
Sar1p _{SCCSAI488}	0,5	----	----	----	0,01 \pm 0,01
Sar1p _{SCCSAI488} + Sec12 Δ Cp + Sec23/24p	0,5	0,1	0,5	----	1,07 \pm 0,28
Sar1p _{SCCSAI488} + Sec12 Δ Cp + Sec23/24p + Sec13/31p	0,5	0,1	0,5	0,5	4,28 \pm 0,37

Alle Messungen wurden in Gegenwart von 1,5 mM MMM-Lipiden (in Form von extrudierten Vesikeln, siehe 4.2.4.2) durchgeführt. Die angegebenen Fehler wurden aus den Fitparametern der jeweiligen Umsatzkurven ermittelt. Alle Daten waren im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Tobias Irmischer (unter der praktischen Leitung von Herrn Jan Auerswald) entstanden und wurden aus dieser entnommen [82].

Liposomen, der jeweiligen Variante von Sar1p, Sec12 Δ Cp und Sec23/24p) sowie des gesamten COPII-Komplexes (bestehend aus Liposomen, der jeweiligen Variante von Sar1p, Sec12 Δ Cp, Sec23/24p und Sec13/31p). Die in Tabelle 9 zusammengefassten Umsatzraten zeigten, dass die Basalaktivität von Sar1p_{SCCSAI488} in Gegenwart der inneren Hüllproteine (Sec12 Δ Cp und Sec23/24p) auf einen Wert von (1,07 \pm 0,28) min^{-1} gesteigert werden konnte. Die basale Hydrolyserate von Sar1p_{SCCSAI488} fiel mit (0,01 \pm 0,01) min^{-1} deutlich geringer aus, als die des Sar1p ((0,39 \pm 0,03) min^{-1}). Dennoch entsprach die Aktivierung durch den *inner coat* in ihren Werten denen aus den Titrationsexperimenten von Sar1p mit Sec12 Δ Cp ((1,08 \pm 0,09) min^{-1}) bzw. von Sar1p mit Sec23/24p ((0,90 \pm 0,03) min^{-1}) (siehe Tabelle 8).

Auch in Gegenwart des gesamten Hüllkomplexes wurde eine weitere Aktivierung der Basalaktivität von Sar1p_{SCCSAI488} auf (4,28 \pm 0,37) min^{-1} ermittelt. Dies entsprach einer Steigerung der durch den *inner coat* aktivierten Hydrolyserate von Sar1p_{SCCSAI488} um den Faktor 4. Vergleichend dazu konnte Sec13/31p die Hydrolyserate des bereits aktivierten Sar1p um den Faktor 5 bis 6 steigern (Tabelle 8).

5.4 Membraninteraktion von Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} im Vergleich

Neben der GTP-Hydrolyse war die Fähigkeit von Sar1p, in Gegenwart von nicht hydrolysierbarem GTP (GMP-PNP) und Komponenten des COPII-Komplexes (Sec12 Δ Cp, Sec23/24p und Sec13/31p) starre tubuläre Strukturen an der Oberfläche von großen MMM-Liposomen (MMM-GUVs) zu erzeugen, ein weiteres Kriterium, um die Funktionalität von Sar1p_{SCCSAI488} mit der von Sar1p zu vergleichen.

5.4.1 Tubulierungsnachweis mit konfokaler Mikroskopie

Um die Bildung von starren tubulären Strukturen durch das Zusammenwirken der jeweiligen Sar1p-Variante (Sar1p oder Sar1p_{SCCSAI488}) mit den restlichen COPII-Proteinen unter nicht hydrolysierbaren Bedingungen (siehe 3.1.3.2) zu beobachten, wurden GUVs (Herstellung siehe 4.2.3.3) mit den COPII-Proteinen und GMP-PNP inkubiert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe 4.2.5). Abbildung 33 zeigt dabei die Tubulierung in Gegenwart von Sar1p (Bild A) und Sar1p_{SCCSAI488} (Bild B). In beiden Fällen wiesen die GUVs tubuläre Strukturen (\rightarrow) auf, die sich allerdings in ihrer Länge unterschieden. So wurden in Gegenwart von

Sar1p (Bild A) *Tubes* von bis zu 5 μm Länge beobachtet, wohingegen bei Anwesenheit von Sar1p_{SCCSAI488} *Tubes* mit ca. 2,5 μm Länge gemessen wurden.

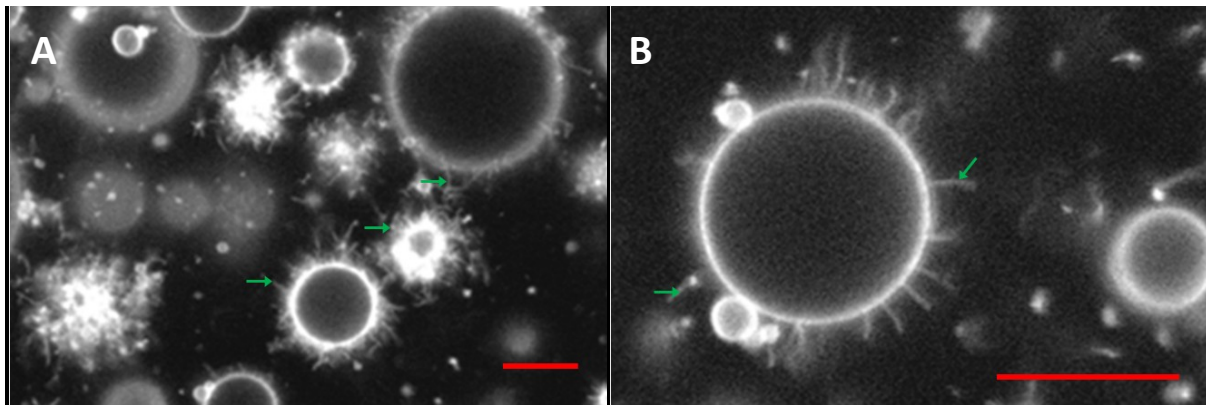


Abbildung 33: Fluoreszenzaufnahmen (Maßstab: — 10 μm ; $\gamma=0,45$) von MMM-GUVs in Gegenwart von COPII-Proteinen, GMP-PNP und Sar1p (Bild A) sowie Sar1p_{SCCSAI488} (Bild B). Dabei wiesen die GUVs in beiden Fällen tubuläre Strukturen auf (\rightarrow), die bei Anwesenheit von Sar1p (Bild A) mit ca. 5 μm länger sind als die in Gegenwart von Sar1p_{SCCSAI488} gebildeten Strukturen (Bild B, ca. 2,5 μm). Alle Daten waren im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Tobias Irmscher (unter der praktischen Leitung von Herrn Jan Auerswald) entstanden und wurden von dieser entnommen [82].

5.4.2 Tubulierungsnachweis mit Kryoelektronenmikroskopie

Die Bildung starrer tubulärer Strukturen an der Oberfläche von GUVs war ein Hinweis darauf, dass die eingesetzten COPII-Komponenten so miteinander interagierten, wie es der natürlichen Gegebenheit entsprach (siehe 3.1.3.2). Da sich bereits im Rahmen von lichtmikroskopischen Untersuchungen (siehe 5.4.1) Unterschiede zwischen den tubulären Strukturen in Gegenwart von Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} bezüglich deren Längen zeigten, sollte im Rahmen von kryoelektronenmikroskopischen Untersuchungen geklärt werden, ob und in welcher Art und Weise die COPII-Komponenten mit den jeweiligen Sar1p-Varianten interagierten (Abbildung 34). Charakteristisch für die Bildung der COPII-Hüllstruktur war das Auftreten einer zweiten Linie (\rightarrow) neben der eigentlichen Membran (\blacktriangleright), welche den äußeren Hüllkomplex Sec13/31p darstellte. Derartige Strukturen sind sowohl bei den Tubulierungsversuchen in Gegenwart von Sar1p (Bild A) als auch bei denen, wo Sar1p_{SCCSAI488} eingesetzt wurde (Bild B) zu beobachten. Allerdings unterschieden sich die Bereiche, die die äußere COPII-Hülle darstellten, in Abhängigkeit von der eingesetzten Sar1p-Variante voneinander. Bei Anwesenheit des Sar1p war diese zweite dünne Linie (\rightarrow) regelmäßig und über den gesamten *Tube* verteilt zu beobachten, wohingegen diese Strukturen bei Anwesenheit von Sar1p_{SCCSAI488} eher lokal und teilweise punktförmig auf den *Tubes* zu finden waren.

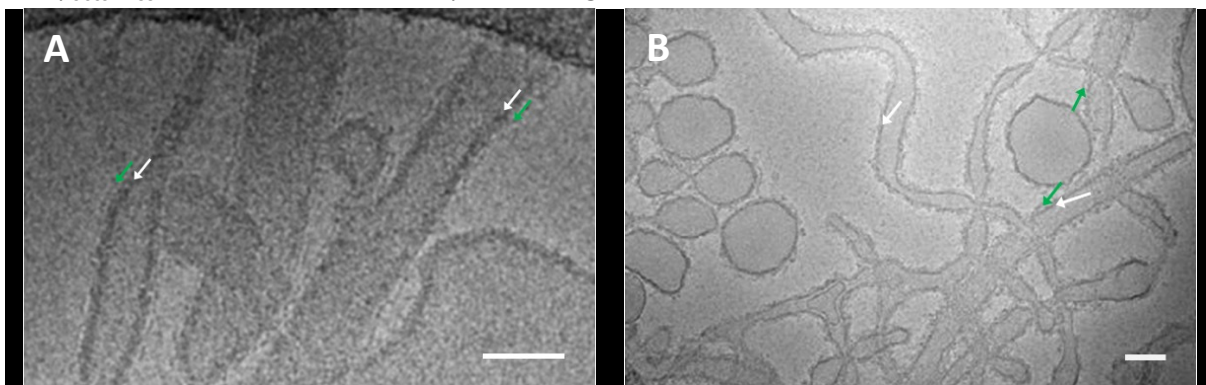


Abbildung 34: Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen (Maßstab: — 100 nm) von MMM-GUVs in Gegenwart von COPII-Proteinen, GMP-PNP und Sar1p (Bild A) sowie Sar1p_{SCCSAI488} (Bild B). Dabei wiesen die tubulären Strukturen in beiden Fällen eine zweite dünne schwarze Linie (\rightarrow) über der eigentlichen Membran (\blacktriangleright) auf, die auf die Anwesenheit des äußeren Hüllproteins (Sec13/31p) zurückzuführen war. Alle Daten waren im Rahmen der Bachelorarbeit von Herrn Tobias Irmscher (unter der praktischen Leitung von Herrn Jan Auerswald) entstanden und wurden von dieser entnommen [82].

5.5 Auswertung der Z-Scan-FCS-Daten mittels MATLAB

5.5.1 Korrelation der Z-Scan-FCS-Daten

Die Fluktuationsdaten, die im Rahmen der FCS-Analyse an Monoschichten gemessen werden konnten, wurden nicht durch Zen2009 analysiert. Stattdessen erfolgte die Korrelation und Auswertung durch ein selbst entwickeltes Programm (in Zusammenarbeit mit Jan Ebenhan in der Anwendungsumgebung von MATLAB), welches dieser Dissertation beigelegt ist. Um die Korrektheit

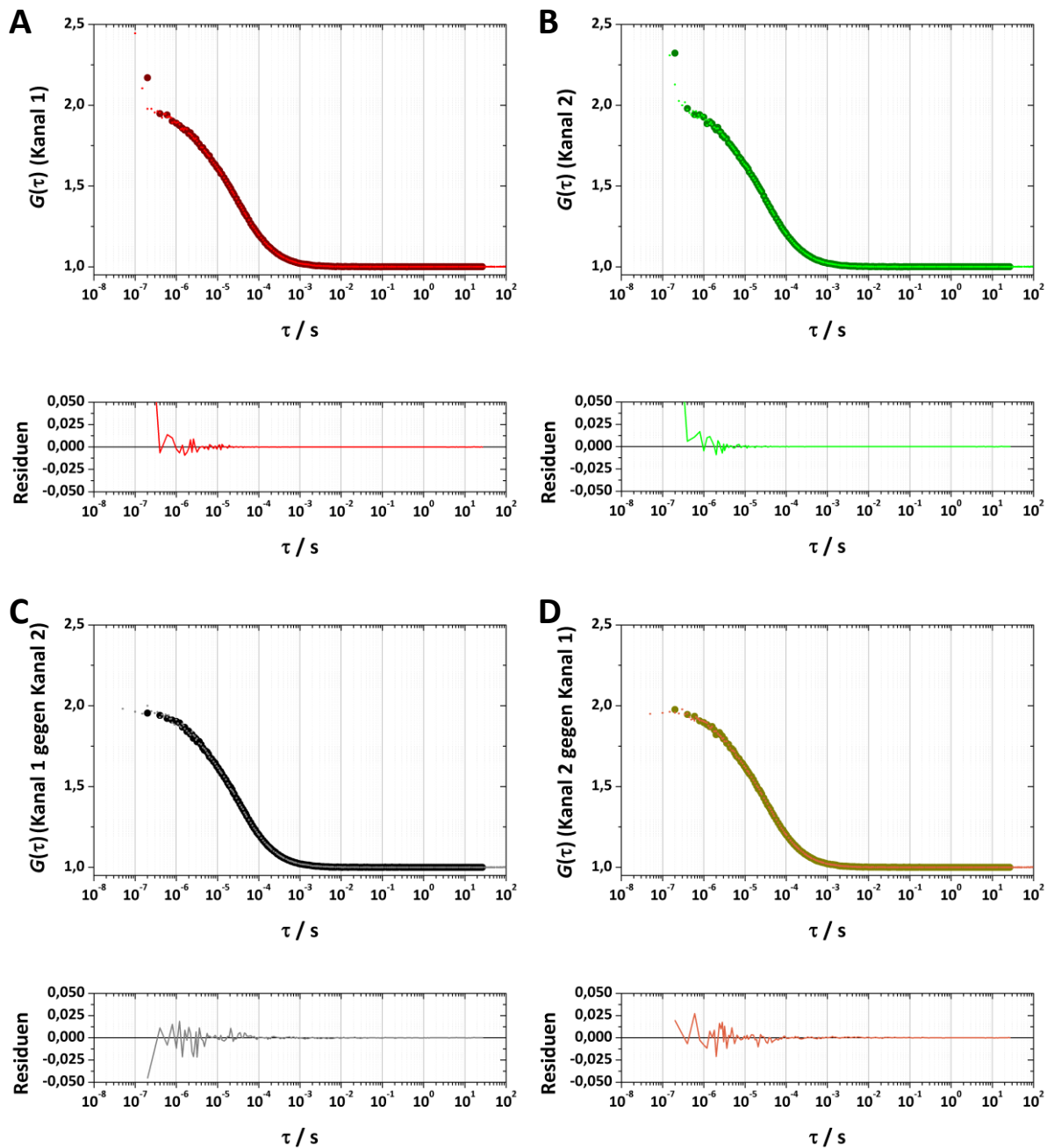


Abbildung 35: Vergleich der korrelierten Kurven einer Alexa₄₈₈-Hydrizid Messung, die durch einen 50/50 Strahlteiler an beiden Detektionskanälen aufgezeichnet wurde. Somit konnten sowohl die Autokorrelation des Detektionskanals 1 (Bild A; MATLAB ●; Zen2009 ●), die Autokorrelation des Detektionskanals 2 (Bild B; MATLAB ●; Zen2009 ●), die Kreuzkorrelation des Detektionskanals 1 gegen den Detektionskanal 2 (Bild C; MATLAB ●; Zen2009 ●) als auch die Kreuzkorrelation des Detektionskanals 2 gegen den Detektionskanal 1 (Bild D; MATLAB ●; Zen2009 ●) erzeugt und gegen die jeweilige Software verglichen werden.

und Eignung des verwendeten Korrelationsalgorithmus zu überprüfen, wurden alle Korrelationsarten, die durch die Datenaufnahme des Laserscanningmikroskops (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss) möglich waren (Autokorrelation des Detektionskanals 1, Autokorrelation des Detektionskanals 2 sowie die Kreuzkorrelationen beider Kanäle zueinander (Detektionskanal 1 gegen Detektionskanal 2 und Detektionskanal 2 gegen Detektionskanal 1)) mit den Korrelationsdaten des dem LSM 710 and ConfoCor 3-System beinhaltenden Korrelators verglichen (Abbildung 35). Dabei zeigte der Vergleich der jeweiligen Korrelationskurven beider Korrelatoren zueinander, dass in allen möglichen Varianten, die Daten zu korrelieren, nur geringe Unterschiede zwischen den jeweiligen Kurven vorhanden waren. Nur im Zeitbereich von 50 ns bis 1,0 μ s wiesen alle Kurven, die mit dem in MATLAB programmierten Korrelator generiert wurden, einen Unterschied zu den Korrelationsdaten auf, die mit Zen2009 erzeugt wurden. Da für die Modellanpassung (Gleichung [13]) der Daten ein Zeitintervall von 1 μ s bis zum Ende der jeweiligen Korrelationskurve zugrunde gelegt wurde, waren die etwas größeren Abweichungen im Bereich von 50 ns bis 1,0 μ s für deren Interpretation nicht von Bedeutung.

5.5.2 FCS-Modellanpassung durch MATLAB

Die in MATLAB erzeugten Korrelationsdaten wurden gemäß den Angaben unter 4.2.7.3 angepasst. Inwieweit der verwendete Algorithmus die vorgegeben Modelle korrekt an die Daten angleicht, wurde mit Simulationskurven überprüft (Abbildung 36). Dabei ergab die Anpassung dieser simulierten Kurven mit MATLAB (●, Bild A und Bild B), dass bei Verwendung der gleichen Startparameter für beide Simulationen (—, Bild A und Bild B) im Falle des ersten Modells (Bild A) die Parameter erhalten wurden (Tabelle 10), die für die Simulation der Kurven zur Anwendung kamen. Im Falle des zweiten Modells ergab die Datenanpassung unterschiedliche Parameter im Vergleich zu den Simulationen. Durch eine Korrektur der Startwertvorgaben war es im Rahmen einer zweiten Anpassung möglich, auch die Parameter zu erhalten, die für die Modellsimulation (Bild B) verwendet wurden.

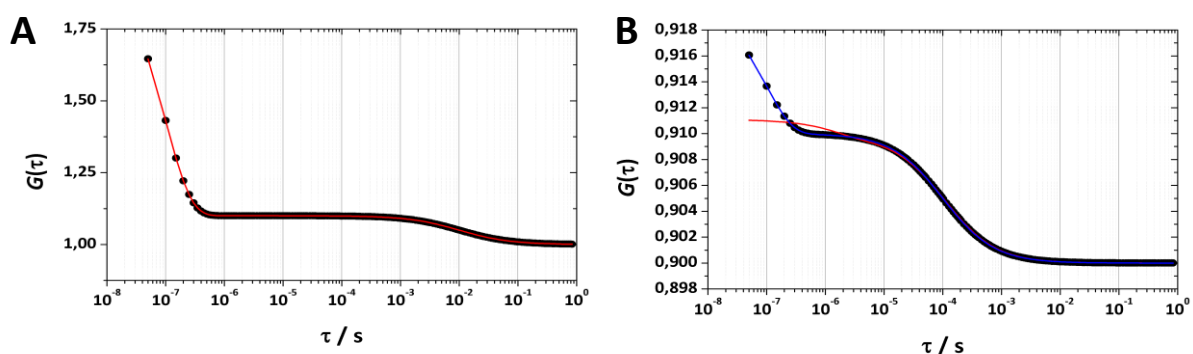


Abbildung 36: Datenanpassung verschiedener simulierter Korrelationskurven (Bild A ● und Bild B ●) die unter Verwendung verschiedener Startparameter (Tabelle 10) erzeugt und mit MATLAB angepasst wurden. Diese Anpassung beider Modelle (Bild A — und Bild B —) erfolgte mit den gleichen Startparametern (Tabelle 10) und ergab für das erste Modell (Bild A) die gleichen Parameter (Tabelle 10), wie sie für die Simulation verwendet wurden. Im Falle des zweiten Modells (Bild B) wichen die nach der Anpassung erhaltenen Parameter (Tabelle 10) ab. Eine Änderung der Startparameter für die Modellanpassung (Bild B —, Tabelle 10) führte anschließend dazu, dass die in der Simulation eingesetzten Startwerte erhalten werden konnten.

Die richtige Wahl der Startparameter für eine möglichst optimale Modellanpassung war demnach entscheidend. Um die manuelle Auswahl der Startparameter für jede einzelne Korrelationskurve zu umgehen, wurde versucht, die Informationen der Startwerte aus deren Eigenschaften zu ermitteln. Dazu wurde die Korrelationskurve wie unter 4.2.7.3 beschrieben

Tabelle 10: Zusammenfassung der Datenanpassung verschiedener Modelle mittels MATLAB

Bezeichnung	Modell 1 (Abbildung 36, Bild A)			Modell 2 (Abbildung 36, Bild B)				
	Simulationswerte	Startwerte für Fit	Fitparameter	Simulationswerte	Startwerte für Fit ₁	Fitparameter ₁	Startwerte für Fit ₂	Fitparameter ₂
N	10	1	10	100	1	102	100	100
τ_D	10 ms	1 ms	10 ms	0,1 ms	1 ms	0,11 ms	10 ms	0,1 ms
T_T	0,9	0,1	0,9	0,5	0,1	0,11	0,9	0,5
τ_T	0,1 μ s	1 μ s	0,1 μ s	0,1 μ s	1 μ s	1,5 μ s	0,1 μ s	0,1 μ s
Offset	1	1	1	0,9	1	0,9	0,9	0,9

Fit₁ entspricht dabei der Datenanpassung (—) in Abbildung 36 und Fit₂ der Datenanpassung (—) in Abbildung 36

geglättet und anschließend numerisch abgeleitet, um die charakteristischen Wendepunkte (z.B. Abbildung 37, Bild A, →) für die Bestimmung der Startparameter (z.B. τ_D) zu ermitteln. Die Notwendigkeit einer Glättung vor der Erzeugung der ersten Ableitung zeigte der Vergleich der abgeleiteten, ungeglätteten Korrelationsdaten (Abbildung 37, Bild B, —) mit den abgeleiteten Korrelationsdaten nach der Glättung (Abbildung 37, Bild B, —). Im ersten Fall (ungeglättet) ließ die erste Ableitung aufgrund der zahlreichen Extrema keine weitere Differenzierung (zweite Ableitung) zur Startwertermittlung zu. Ursache waren die starken Fluktuationen innerhalb der Korrelationskurve (Abbildung 37, Bild A, ●), die in Form der Ableitung zahlreiche Extrema aufzeigten (Abbildung 37, Bild B, —) und somit den globalen Kurvenverlauf überlagerten. Zu erwarten war aufgrund der Gestalt der Korrelationskurve, dass der Bereich um das 80te τ -Segment ein Extremum in der ersten Ableitung zeigte, aus dem in der zweiten Ableitung eine Nullstelle und daraus der Wendepunkt abgeleitet werden konnte. Wurde die Korrelationskurve hingegen gemäß den Ausführungen in 4.2.7.3 geglättet (Abbildung 37, Bild A, —) und anschließend abgeleitet (Abbildung 37, Bild B, —), so wurden die charakteristischen Eigenschaften der Korrelationskurve (z.B. Extremum bei τ -Segment 80) sichtbar. Weiterhin verhinderte die im Algorithmus definierte Abbruchroutine (durch Erreichen eines Mindestabstandes der aktuellen Glättungskurve von der Vorgängerkurve, 4.2.7.3 ff.), dass die in der Korrelationskurve vorhandenen Charakteristika wie Wendepunkte oder Extrema nicht heraus gemittelt wurden, wie es ohne Abbruch nach 50 Runden der Fall gewesen wäre (Abbildung 37; Bild A, —). Die Ableitung dieser sehr stark geglätteten Kurve (Abbildung 37, Bild B, —) zeigte, dass die Extrema der τ -Segmente 50, 65 und 80 immer mehr zu einem einzigen breiten Extremum geglättet wurden und somit als Startwerte für die Fitparameter verloren gegangen wären, da sie in der zweiten Ableitung keine Nullstelle (Wendepunkt der Korrelationskurve) darstellten (vergl. Abbildung 18 in 4.2.7.3). Die erste Ableitung der Korrelationskurve wiederum wies einige Fluktuationen auf, die eine Zuordnung von Nullstellen in der zweiten Ableitung erschwerte (Abbildung 37, Bild C, —). So existierten mehrere Nullstellen im Bereich des 80ten τ -Segments, die als möglicher Startwert für τ_D in Betracht kommen konnten. Eine Zuordnung für die τ_T im Bereich vom 19-53ten τ -Segment (entspricht dem Bereich von 1 μ s bis 20 μ s) war ebenfalls nicht möglich, da auch dort zu viele Extrema vorhanden waren. Eine vorherige Glättung der ersten Ableitung gemäß 4.2.7.3 (Abbildung 37, Bild B, —) und anschließende Ableitung dieser (Abbildung 37, Bild C, ●) verfügte über weniger Nullstellen, die einen Wendepunkt darstellen und als Startparameter hätten verwendet werden können. Mit Hilfe der dritten Ableitung (Abbildung 37, Bild D, ●) und anschließender Glättung (4.2.7.3) (Abbildung 37, Bild D, —) wurde, im

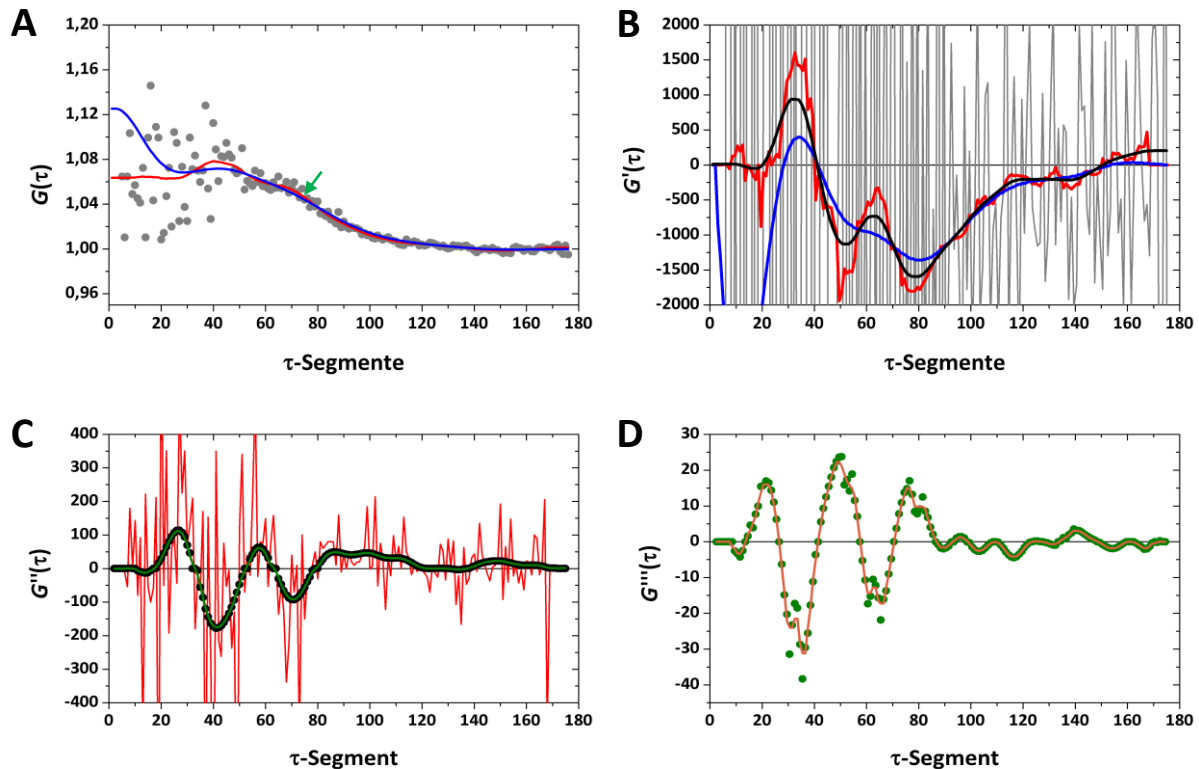


Abbildung 37: Einfluss der Glättung auf die einzelnen numerischen Ableitungen einer Korrelationskurve. Die Ermittlung der charakteristischen Wendepunkte der x -modifizierten Korrelationskurve (anstelle der τ -Werte wurden äquidistante Segmentzahlen aufgetragen) (\bullet , Bild A) zur Bestimmung der Startwerte für z.B. τ_D und τ_T erfolgte durch Berechnung der zweiten Ableitung. Aufgrund der starken Fluktuation der Korrelationsdaten zeigte die daraus resultierende numerische Ableitung ($-$, Bild B) zahlreiche Extremwerte, die alle als Nullstellen der zweiten Ableitung und damit als Wendepunkte und somit auch als Startwerte für τ_D und τ_T herangezogen wurden. Eine Glättung der Korrelationsdaten ($-$, Bild A) nach den Ausführungen in 4.2.7.3 und anschließende numerische Ableitung ($-$, Bild B) führte zur Reduktion der Anzahl an Extrempunkten, die für die weitere Ableitung verwendet und ausgewertet werden konnten. Dieses Prinzip setzte sich über die folgenden Ableitungen fort. So ermöglichte die Glättung der ersten Ableitung ($-$, Bild B) eine bessere Zuordnung möglicher Wendepunkte in der zweiten Ableitung ($-$, Bild C). Ohne Glättung hatte diese ebenfalls sehr viele Wendepunkte und dadurch viele Kandidaten für Startparameter ($-$, Bild C). Durch die dritte Ableitung ($-$, Bild D) wurde über den Extremwert des zur Nullstelle der zweiten Ableitung passenden Extremums ausgewählt, welche Nullstelle der zweiten Ableitung zur Startwertermittlung verwendet wurde.

Falle mehrerer Nullstellen der zweiten Ableitung die Nullstelle gewählt, die das größte Maximum (bis zum τ -Segment 53, für τ_T ; ab dem τ -Segment 53 für τ_D) hatte. Für τ_T war dies beim τ -Segment 49 und für τ_D beim τ -Segment 80 der Fall. Übertragen auf die eigentlichen τ -Werte der Korrelationsfunktion entsprach dies einem Wert von $14,4 \mu\text{s}$ als Startparameter für τ_T und $0,205 \text{ ms}$ als Startparameter für τ_D . Der Offset der Korrelationskurve entsprach dem Korrelationswert G des letzten τ -Segments der geglätteten Kurve der Korrelationsdaten (Abbildung 37, Bild A, $-$) und betrug $0,995$. Gemäß den Beschreibungen aus 4.2.7.3 erfolgte die Ermittlung des Startwertes für N , basierend auf der Vorgänger-Nullstelle der zweiten Ableitung, die zur Bestimmung des Startwertes für τ_D herangezogen wurde. Da das 80te τ -Segment für die Ermittlung des Startwertes für τ_D bestimmt wurde, ergab sich das τ -Segment 63 als vorherige Nullstelle (Abbildung 37, Bild C, $-$). Der Korrelationswert der geglätteten Korrelationskurve in diesem τ -Segment betrug $1,057$. Gemäß Gleichung [24] (in 4.2.7.3) ergab sich für N ein Startwert von $16,13$. Der Startwert für den Triplettanteil wurde errechnet durch den Startwert von N , den Startwert des Offset und dem Korrelationswert der geglätteten Korrelationskurve im τ -Segment 1 (4.2.7.3). Er betrug $0,096$. Unter Verwendung dieser Startwerte wurde diese Korrelationskurve in MATLAB angepasst (Abbildung 38, Bild A).

Um die Eignung des Verfahrens zu bestätigen, wurde versucht, die Startparameter einer simulierten Korrelationskurve zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die aus diesem Verfahren heraus ermittelten Startparameter für die Kurvenanpassung mit $N=2,06$; $\tau_D=0,92$ ms, $T_T=0,21$; $\tau_T=4,8$ μ s; Offset=1,1 in etwa die Parameter darstellten, die für die Simulation verwendet wurden ($N=2$; $\tau_D=1$ ms, $T_T=0,2$; $\tau_T=5$ μ s; Offset=1,1).

5.5.3 Anpassung der einzelnen FCS-Fitparameter im Rahmen der Z-Scan-FCS

Für die globale Analyse der FCS-Parameter (N , τ_D) wurden diese gemäß den Ausführungen in Theorie 3.2.4 ff. segmentweise gegen die Aufnahmezeit aufgetragen und parabol nach Gleichung [25] in 4.2.7.4 angepasst. Die Helligkeit wurde durch eine Lorentzkurve beschrieben.

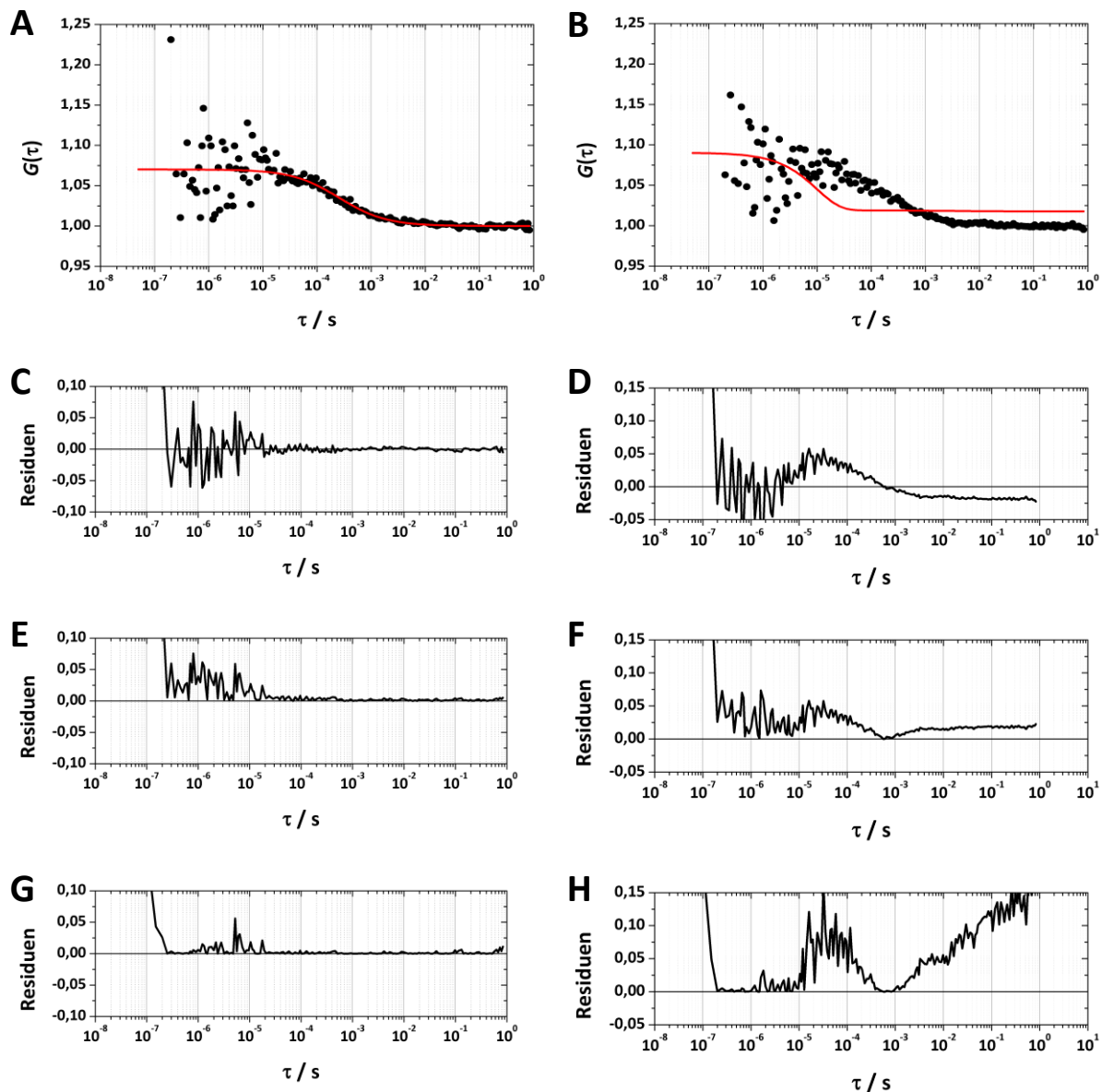


Abbildung 38: Vergleich verschiedener Varianten zur Bestimmung eines Parameters für die Beurteilung der Güte der FCS-Datenanpassung an einer guten Datenanpassung (Bild A, Daten: ●, Fit: —) und einer schlechten (Bild B, Daten: ●, Fit: —). Basierend auf den Residuen zwischen Modellkurve und Korrelationsdaten (guter Datensatz, Bild C; schlechter Datensatz Bild D) wurden zum einen die absoluten Residuen beider Korrelationsdaten (guter Datensatz, Bild E; schlechter Datensatz, Bild F) als auch die nach dem Glättungsgrad (bedingt durch den multiple τ -Algorithmus) gewichteten Residuen (4.2.7.4) (guter Datensatz, Bild G; schlechter Datensatz, Bild H) miteinander verglichen. Dabei unterschieden sich die Residuen, die nach dem Glättungsgrad gewichtet wurden am stärksten voneinander (guter Datensatz, Bild G; schlechter Datensatz, Bild H).

Aufgrund dessen, dass u. a. einzelne FCS-Anpassungen trotz der automatischen Startwertvorgabe zu keiner guten Datenanpassung führten (Abbildung 38, Bild B), war es nicht möglich, die aufgetragenen Daten ohne weitere Einschränkungen (Wichtungsfaktor der einzelnen FCS-Parameter N und τ_D , die die Güte der einzelnen Korrelationsanpassungen berücksichtigen) parabol anzupassen (Abbildung 39, —). Hinzu kam, dass Segmente außerhalb des konfokalen Zentrums mit einer geringeren Helligkeit (und damit verbunden einer geringeren Anzahl an Signalen) dazu führten, dass die Korrelationskurven ein stärkeres Rauschen/stärkere Fluktuationen aufwiesen. Weiterhin stiegen N bzw. τ_D mit zunehmendem Abstand vom konfokalen Zentrum (3.2.4 ff.), was bei einer konstanten Segmentlänge (und damit verbunden einem konstanten maximalen Wert für τ über alle Segmente) ebenfalls erwarten ließ, dass die Datenanpassung in diesen Segmenten schlechter erfolgte als in der Nähe des konfokalen Zentrums. Aus diesen beiden Gründen wurde ein Wichtungsfaktor für jedes Segment generiert, der sowohl die Lage zum konfokalen Zentrum als auch die Güte der Anpassung der einzelnen Korrelationsdaten berücksichtigte (Abbildung 39).

Grundlage für die Bestimmung der Anpassungsgüte der einzelnen Modellkurven an die Korrelationsdaten war eine stärkere Wichtung der Differenzen bei größeren τ -Werten (größerem Glättungsgrad, bedingt durch den *multiple- τ* -Algorithmus [83, 84]). Das Vorgehen wurde exemplarisch am Beispiel aus Abbildung 38 beschrieben und die resultierenden Daten wurden in Tabelle 11 zusammengefasst. Wurden die absoluten Residuen aufsummiert, so ergab sich ein

Tabelle 11: Zusammenfassung der Auswertung der Residuen einzelner FCS-Datenanpassungen zur Ermittlung eines Güteparameters

Bezeichnung		Residuen _{gesamt} 1 μs bis Ende	Residuen _{Abschnitt 1} 1 μs bis 10 μs	Residuen _{Abschnitt 2} 10 μs bis Ende
Anpassung gut	normal	$-4,14 \cdot 10^{-4}$	-----	-----
	absolut	1,11	0,72 (64,75 %)	0,39 (35,25 %)
	gewichtet	0,48	0,26 (54,89 %)	0,22 (45,11 %)
Anpassung schlecht	normal	$7,54 \cdot 10^{-5}$	-----	-----
	absolut	3,26	0,64 (19,66 %)	2,62 (80,34 %)
	gewichtet	9,25	0,21 (2,27 %)	9,04 (97,73 %)

Unterschied in der Wichtung von 2,15 zwischen der guten (1,11) und der schlechten (3,26) Datenanpassung. Zudem hatte der Fluktuationsanteil im Abschnitt 1 der summierten Residuen (1 μs bis 10 μs) mit 19,66 % bei der schlechten und 64,75 % bei der guten Datenanpassung noch einen sehr starken Einfluss, obwohl dieser Bereich keine Aussagekraft über die Güte der Datenanpassung im Gesamten lieferte. Bei den gewichteten und summierten Residuenwerten (4.2.7.4 ff.) dagegen lag ein fast 20-facher Unterschied zwischen dem der guten Datenanpassung (0,48) und der schlechten Datenanpassung (9,25) vor. Im Vergleich zur absoluten Summe der Residuen hatte der Bereich von 1 μs bis 10 μs bei der schlechten Datenanpassung mit 2,27 % Anteil am Gesamtwert einen deutlich geringeren Einfluss. Der Bereich, der Auskunft über die Anpassung der Parameter τ_D und letztlich auch N gab, (10 μs bis zum Ende) trug jetzt 97,73 % zum gesamten gewichteten Summenwert der Residuen bei. Da im Rahmen der Z-Scan-Analyse auch Bereiche außerhalb der konfokalen Äquatorialebene analysiert wurden, war die Güte der Auswertung aufgrund der steigenden Diffusionszeiten bei konstanter Segmentlänge sowie der sich verringernden

Helligkeiten geringer als bei Messungen innerhalb der Äquatorialebene. Aus diesem Grund wurden

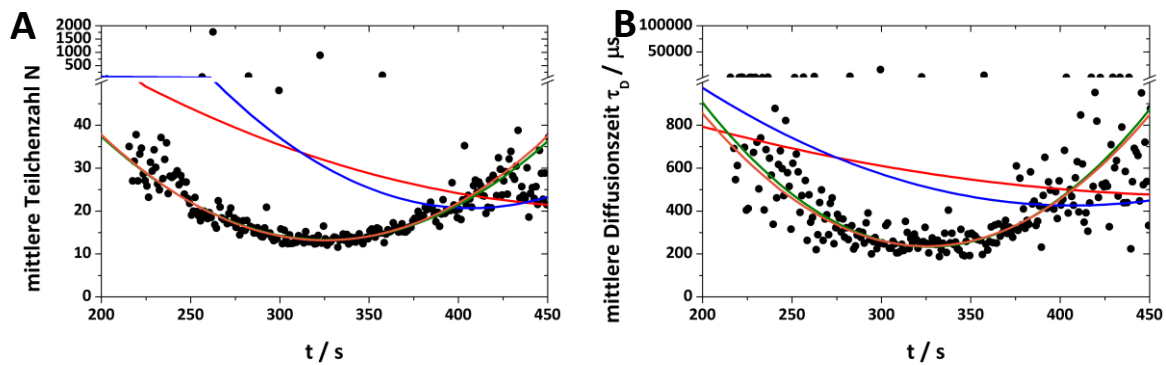


Abbildung 39: Einfluss verschiedener Wichtungsfaktoren auf die parabolische Datenanpassung gemäß (Theorie 3.2.4). Dabei zeigte die ungewichtete Datenanpassung (—) sowohl bei N (Bild A) als auch bei τ_D (Bild B), dass diese nicht in der Lage war, die vorhandenen Daten (\bullet) korrekt zu beschreiben. Auch die Wichtung bezüglich der Lage zum konfokalen Zentrum (—) wies immer noch große Differenzen zwischen der Modellfunktion und den Datenpunkten auf. Unter Verwendung der gewichteten summierten Residuen (als Wert für die Güte der Modellanpassung an die Korrelationsdaten) in quadratischer Form (—) als auch der Kombination beider Wichtungsfaktoren in quadratischer Form (Position zum konfokalen Zentrum und die Güte der einzelnen Anpassungen der FCS-Korrelationskurven) (—) wurden die Datenpunkte im Sinne eines parabolischen Verlaufs beschrieben.

alle Daten, die eine geringere Helligkeit als die halbmaximale Helligkeit besaßen, von der Z-Scan-Anpassung ausgeschlossen und alle übrigen Daten gemäß ihrer Helligkeit und der Güte der Anpassung der Korrelationsdaten (gewichtete Summe der Residuen) gewichtet. Dabei zeigten die Kurvenanpassungen sowohl für die Auftragung von N (Abbildung 39, Bild A) als auch für die Auftragung von τ_D gegen die Migrationszeit (Abbildung 39, Bild B), dass sowohl ein ungewichtetes Modell (—) als auch der Wichtungsfaktor der Position des jeweiligen Segments in Relation zum konfokalen Zentrum (—) nicht in der Lage waren, die Daten anzupassen. Die Wichtung bezüglich der Güte der einzelnen Anpassungen der FCS-Korrelationskurven (—) und auch die Kombination beider Wichtungsfaktoren in quadratischer Form (Position zum konfokalen Zentrum und die Güte der einzelnen Anpassungen der FCS-Korrelationskurven) (—) beschrieben dagegen den parabolischen Verlauf der Daten.

5.6 Etablierung eines Messsystems für FCS-Analysen an Phospholipid-Monoschichten

Das in diesem Abschnitt beschriebene Messsystem war eine Kombination aus einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop und einer Langmuir-Filmwaage mit Barrieren, die unabhängig voneinander, aber auch simultan bewegt werden konnten. Dieses sollte neben der Beobachtung von Monoschichtbestandteilen (z.B. Phospholipiden), auch dazu dienen, die Interaktion von anderen Komponenten, wie z.B. Proteinen, an der Grenzfläche mit einzelmolekülsensitiven Verfahren zu untersuchen. Von Interesse waren stöchiometrische Parameter (N) sowie dynamische Informationen (D), die mit einer Langmuir-Filmwaage allein nicht bestimmt werden konnten. Ausgehend von dem in [72] beschriebenen Setup wurden im Anschluss die einzelnen Systemparameter, Kalibrationsdaten und erste Anwendungsversuche dargestellt.

5.6.1 Technische Umsetzung des kombinierten Aufbaus

Das nach [72] beschriebene Messsystem wurde im Rahmen dieser Arbeit in seinen wesentlichen Bestandteilen nachgebildet und wurde in Abbildung 40 dargestellt. Gezeigt wird ein kommerziell nutzbares konfokales Mikroskop (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss), welches von einer Inkubatorbox

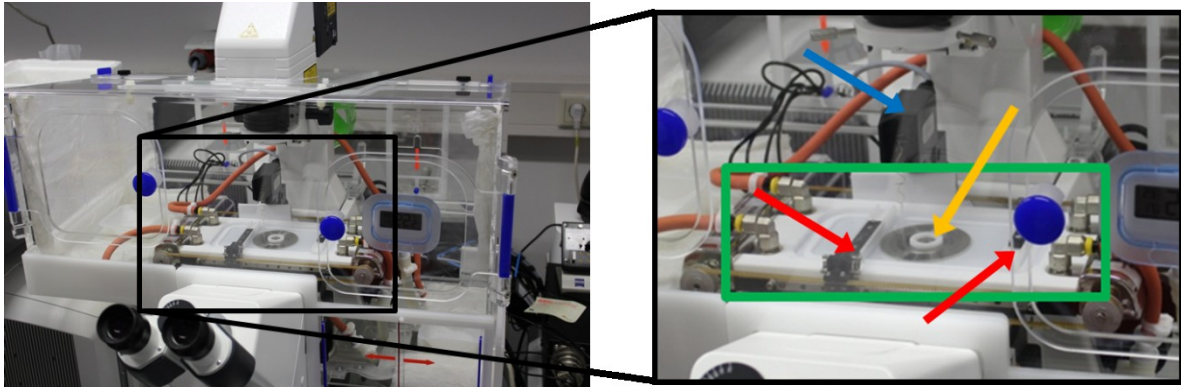


Abbildung 40: Foto des kombinierten Aufbaus eines konfokalen Mikroskops und einer Langmuir-Filmwaage in Anlehnung an die Beschreibungen aus [72]. Voraussetzung dafür war die Modifikation des Teflontrogs der Filmwaage in Form einer Öffnung, die durch einen Metallring mit aufgeklebtem Deckglas geschlossen gewesen war (□). Auf diesem Deckglas wurde ein geöffneter Teflonring positioniert (→), um eventuelle Stöße und Oberflächenwellen zu reduzieren. Die beiden Barrieren (→), welche unabhängig voneinander bewegt werden konnten, erlaubten sowohl Expansions- und Kompressionsexperimente als auch ein paralleles Verschieben der gesamten Monoschicht. Der Druckaufnehmer (→) mit dem Wilhelmy-Plättchen war dabei mit der Barrieren B (Abbildung 16) fest verbunden.

umgeben ist, die normalerweise für Zellkulturbeobachtungen verwendet wird. Durch diese sollten äußere Effekte, wie z.B. Luftströme, reduziert und ein konstantes Mikroklima (Luftfeuchte) geschaffen werden. Gleichzeitig bot sie die Möglichkeit eines gut temperierbaren Umfeldes um die Filmwaage (□). Weiterhin erforderte das Arbeiten an Laser-Systemen der Klasse 3 und höher den Schutz vor direktem Kontakt des Laserstrahls mit dem Auge des Anwenders. Beim klassischen Mikroskopiesetup mit Probentisch wurde dies durch Deckel oder Umhänge sichergestellt. Durch die Inkubatorbox war das Anbringen eines Umhangs möglich, ohne die Monoschicht zu beschädigen und ebenfalls den Laserstrahl abzuschirmen. Bei der hier verwendeten Langmuir-Filmwaage wurde in den Trog aus Teflon ein Metallring eingesetzt, welcher mit einem Deckglas (Durchmesser 50 mm, Menzel-Gläser) abgedeckt wurde. Das Deckglas wurde mit Epoxidharz am Metallring fixiert. Durch die beiden unabhängig voneinander beweglichen Barrieren (→), war es möglich, sowohl Kompressions- und Expansionsexperimente als auch ein Verschieben der gesamten Monoschicht durchzuführen, was Analysen an beliebigen Stellen zuließ. Der bewegliche Druckaufnehmer (→) wurde an Barriere B (Abbildung 16) fest verankert, sodass dieser ebenfalls mit der gleichmäßigen Bewegung dieser Barriere in konstantem Abstand mitgeführt werden konnte. Ein Anstoßen des Wilhelmy-Plättchens an eine der Barrieren wurde dadurch verhindert. Zu berücksichtigen war, dass eine manuelle, ruckartige Bewegung des Wilhelmy-Plättchens dazu führen konnte, dass die Monoschicht beschädigt wurde oder das Plättchen aus der Subphase herausgerissen werden könnte. Durch den Metallring, war es möglich, mit einem Wasserimmersionsobjektiv mit langem Arbeitsabstand (LD C-Apochromat 40x, NA 1,1) die darüber befindliche Monoschicht zu analysieren. Um diese Monoschicht im optischen Messbereich zu stabilisieren (z.B. vor Oberflächenschwingungen), wurde ein geöffneter Teflonring um die Beobachtungsstelle positioniert (→).

5.6.2 Einfluss des Rührens auf die Gleichverteilung

In [72] waren allerdings nur Daten beschrieben, bei denen Phospholipide in Form von Monoschichten analysiert wurden. Eine Analyse von Molekülen in der Subphase, die mit den Lipiden der Monoschicht interagierten, setzte voraus, dass diese auch in den Ring hineindiffundieren konnten und sich auf der gesamten Oberfläche gleichmäßig verteilten. Andernfalls wäre eine Kombination der Effekte, die am Wilhelmy-Plättchen registriert wurden (z.B. Änderungen von π) mit denen, die im Rahmen der FCS ermittelt wurden (N , τ_D), nicht möglich. Ein Spreiten und Rühren

über dem Deckglas war zudem nicht möglich, da sonst die dünne Subphase (0,5 mm) zerrissen worden wäre. Eine gleichmäßige Verteilung von Interaktionspartnern (z.B. Sar1p_{SCCSAI488}) innerhalb und außerhalb des Teflonrings musste daher durch Rühren der Subphase neben dem Metallring (aufgrund der größeren Tiefe der Subphase) realisiert werden. Beim Vergleich der Verteilung des

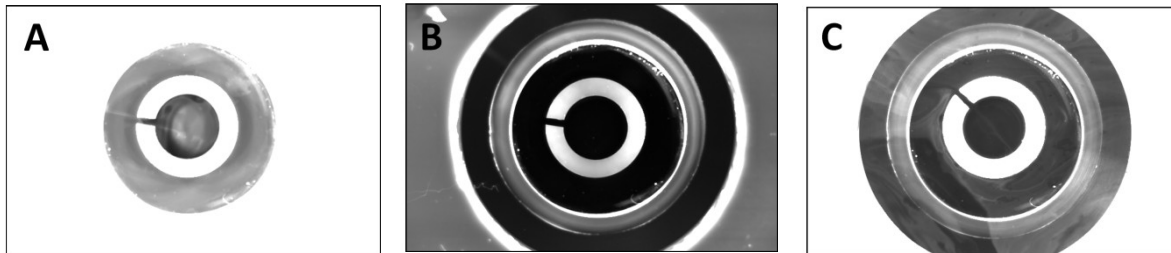


Abbildung 41: Effekt des Teflonrings auf die Verteilung von Analyten in der Subphase (Sar1p_{SCCSAI488}). Die Verteilung von Sar1p_{SCCSAI488} nach 6 h Rühren (Bild A) zeigte, dass mehr Protein im Inneren des Teflonringes nachzuweisen war als nach 6 h ohne Rühren (Bild C). Je höher die Weißfärbung der einzelnen Bilder, desto mehr Fluoreszenzsignal war vorhanden. Dass es sich hierbei um die Fluoreszenz von Sar1p_{SCCSAI488} handelte zeigte der Vergleich mit (Bild B), welches der Präparation von (Bild A) entsprach. Dieses wurde vor der Injektion von Sar1p_{SCCSAI488} erstellt.

Fluoreszenzsignals innerhalb des Teflonringes (Abbildung 41) zeigte sich, dass sowohl mit (Bild A) als auch ohne Rühren (Bild C) keine gleichmäßige Verteilung des Fluoreszenzsignals zu beobachten war. Eine Extrapolation von FCS-Daten (N , τ_D), die an einer lokal begrenzten Position innerhalb des Teflonringes gemessen wurden, auf den gesamten Trog war damit nicht möglich. Aus diesem Grund wurde der Teflonring bei allen weiteren Untersuchungen entfernt und die Präparation erfolgte neben dem Metallring unter Rühren.

5.6.3 Einflussfaktoren auf die Messung des Oberflächendrucks

5.6.3.1 Temperatur in der Subphase innerhalb der Langmuir-Filmwaage

Das im Rahmen der Setupentwicklung eingesetzte Mikroskop (Zeiss (LSM710 mit ConfoCor 3 Einheit) stellte ein vollautomatisches System dar, welches im Vergleich zu nichtautomatischen Systemen einer zusätzlichen Wärmequelle gleichkam. Um die Auswirkungen dieser zusätzlichen Wärmeproduktion auf das Messsystem zu kompensieren, wurde um das Objektiv ein weiterer Kühlkreislauf installiert (siehe Anhang 13.4.1). Beim Vergleich der ermittelten Temperaturen (mit und ohne zusätzliche Kühlung) zeigte sich, dass ohne Objektivkühlung eine maximale Temperaturdifferenz von 3,0 K (25 °C direkt über dem Objektiv) zur Solltemperatur der Subphase (22 °C) zu messen war (Abbildung 42, Bild A). Nur in größerer Entfernung, an den Rändern des Teflontrogs, wurden Temperaturen gemessen, die mit 22,1 °C bis 22,4 °C in einem Bereich von $\pm 0,5$ K zur Solltemperatur von 22 °C lagen. Durch die zusätzliche Kühlung des Objektivs mit 4,5 °C kaltem Wasser (Abbildung 42, Bild B), befanden sich alle gemessenen Temperaturen im Bereich von $\pm 0,5$ K zur Solltemperatur. Die maximale Temperaturdifferenz reduzierte sich auf 0,6 K (21,8 °C direkt neben dem Objektiv und 22,4 °C im äußeren Trogbereich).

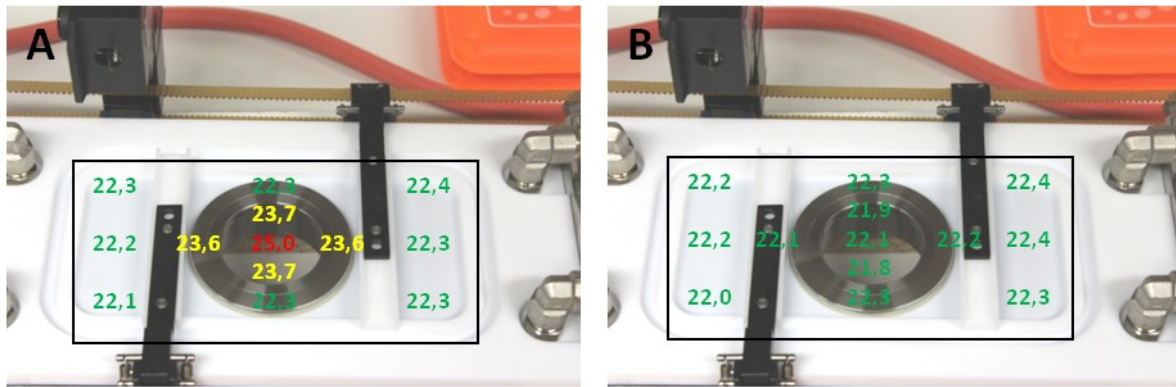


Abbildung 42: Einfluss einer aktiven Objektivkühlung auf die Temperaturverteilung innerhalb der Subphase. Bezogen auf die Solltemperatur von 22 °C war diese bei Abwesenheit einer externen Objektivkühlung mit 25 °C über dem Deckglas höher als die Vorgabe (Bild A). Im Vergleich dazu führte eine aktive Objektivkühlung mit Wasser (4,5 °C) zu einer gleichmäßigeren Temperaturverteilung innerhalb der Subphase (Bild B). Werte in grün zeigten dabei eine Abweichung zur Solltemperatur (22 °C) von < 1 K an. Ab einer Abweichung von ≥ 1 K bis < 3 K sind die Werte gelb, ab ≥ 3 K rot markiert. Bei allen Messungen betrug die Temperatur des Wassers zur Temperierung der Filmwaage 22 °C.

5.6.3.2 Bewegung des Wilhelmy-Plättchens und waagerechte Positionierung der Filmwaage

Wie unter 5.6.2 dargelegt, war es nicht möglich, eine komplett gleichmäßige Verteilung eines Analyten in der Subphase über dem Metallring und dem Deckglas zu erreichen. Aus diesem Grund wurden die Interaktionsexperimente neben dem Metallring durchgeführt und der Bereich zwischen den Barrieren für die FCS-Analyse über das Objektiv bewegt. Dabei musste sichergestellt werden, dass an jeder Position der Filmwaage (π) konstant war (siehe 3.3.2).

Prinzipiell wurden zwei Effekte betrachtet, die einen Einfluss von π in Abhängigkeit von der Position des Wilhelmy-Plättchens aufwiesen. Bei der Bewegung von Barriere B (Abbildung 43, Bild B) wurde ein Druckanstieg von $\Delta\pi \approx 1,5 \text{ mN m}^{-1}$ über die gesamte Breite der Filmwaage gemessen. Diese Differenz wurde sowohl beim Schließen (—) als auch beim Öffnen (—) der Barriere B ohne Neigungskorrektur beobachtet. Erst nachdem die Filmwaage schrittweise waagerecht ausgerichtet wurde, reduzierte sich diese Druckdifferenz bis hin zu einem, um $\pi = 0,0 \text{ mN m}^{-1}$ schwankenden Signal (— für Schließen und — für Öffnen). Basierend auf der Schwankungsbreite des Drucksignals ohne Bewegung des Drucksensors oder der Barrieren (Abbildung 43, Bild F) wurde das 95 % *Prediction*-Intervall als Schwankungsbreite definiert, um eine Orientierung zu erhalten, welche Abweichung des gemessenen Drucksignals im Falle der Bewegung des Druckaufnehmers als Abweichung/Druckänderung zu bewerten war. Für dieses Intervall (-- Abbildung 43) betrug diese Schwankung $0,16 \text{ mN m}^{-1}$. Die Breite dieser Schwankung von μ bei neigungskorrigierter Filmwaage lag dabei größtenteils innerhalb des definierten 95 % *Prediction*-Intervalls. Die einzigen Ausnahmen stellten die beiden Maxima bei ca. 45 cm^2 und 55 cm^2 dar. An diesen Stellen befand sich das Wilhelmy-Plättchen direkt über dem Metallring. Der Abstand zwischen Deckglasoberkante und Luft-Wasser-Grenzfläche betrug ca. 0,5 mm.

Wie in 3.2.5 ff. erläutert, konnten Zunahmen von π beim Zusammenfahren der Barrieren ebenfalls durch Verunreinigungen hervorgerufen werden, die sich als oberflächenaktive Substanzen an der Luft/Subphasengrenze anlagerten. Um sicher zu gehen, dass die bisher beobachteten Änderungen von μ auf die Schiefelage der Filmwaage zurückzuführen waren, wurde im Anschluss der Bewegung von Barriere B das gesamte Prozedere (komprimieren und expandieren) mit Barriere A bei jeder Neigung wiederholt (Abbildung 43, Bild A). Der Druckaufnehmer blieb dabei unbewegt. Alle diese Messungen zusammengefasst wiesen allerdings nur eine maximale Druckdifferenz von $\Delta\pi \approx 0,25 \text{ mN m}^{-1}$ auf.

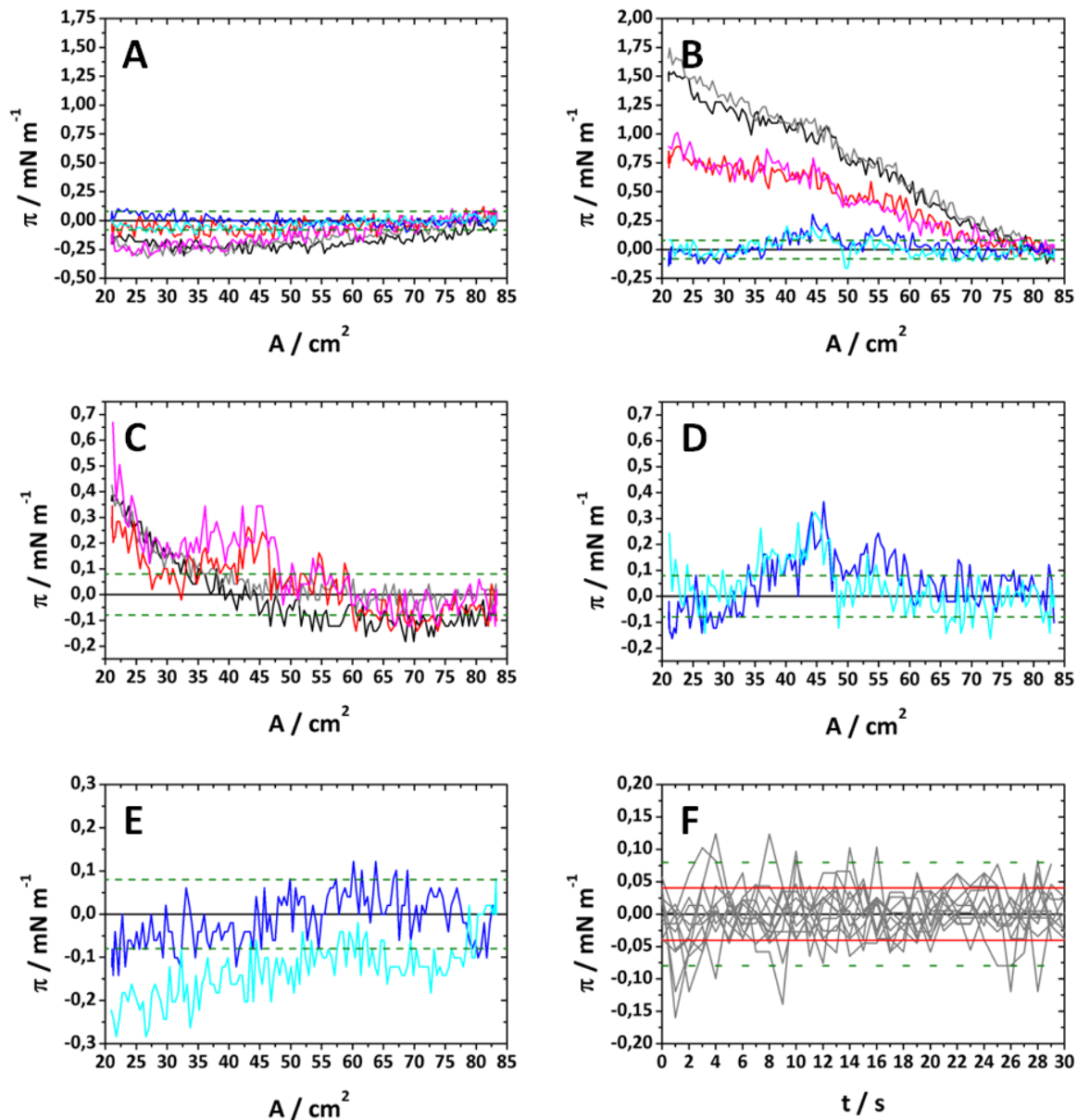


Abbildung 43: Verlauf des Oberflächendrucks bei verschiedenen Bewegungen der Barrieren und des Druckensensors an der Wasser/Luft-Grenzfläche. Dabei führte die Bewegung der Barriere A (bei konstanter Position des Druckaufnehmers) auf einer nicht neigungskorrigierten Filmwaage (— Schließen, — Öffnen bei $-340 \mu\text{m}$ auf der linken Seite; — Schließen, — Öffnen bei $-170 \mu\text{m}$ auf der linken Seite; — Schließen, — Öffnen bei $0 \mu\text{m}$ auf der linken Seite) zu keiner Veränderung von μ (Bild A). Im Falle der Bewegung von Barriere B (bei beweglicher Position des Druckaufnehmers) war eine neigungsabhängige Änderung von π (— Schließen, — Öffnen bei $-340 \mu\text{m}$ auf der linken Seite; — Schließen, — Öffnen bei $170 \mu\text{m}$ auf der linken Seite; — Schließen, — Öffnen bei $0 \mu\text{m}$ auf der linken Seite) zu beobachten (Bild B). Verunreinigungen auf der Luft/Subphasen-Grenzfläche äußerten sich bei einer neigungskorrigierten Filmwaage darin, dass sowohl die Bewegung der Barriere A (mit konstanter Position des Druckaufnehmers; Schließen — und Öffnen —) als auch die Bewegung der Barriere B (mit beweglicher Position des Druckaufnehmers; Schließen — und Öffnen —) einen vergleichbaren Anstieg von μ während des Komprimierens zeigten (Bild C). Die Differenz beider Druckprofile führte zu einer Fluktuation im Bereich um 0 mN m^{-1} (Bild D; Schließen — und Öffnen —). Dies war sowohl bei $0,5 \text{ mm}$ Subphasenhöhe über dem Deckglas (entspricht Bild D) als auch bei 5 mm (Bild E; Schließen — und Öffnen —) der Fall. (Bild F) Verlauf des Messsignals am Druckaufnehmer über 30 s aus 10 Messungen (—) und wurde bezüglich der Standardabweichung (—) und des 95% Prediction-Intervall (—) ausgewertet. Das 95% Prediction-Intervall war in allen anderen Bildern als Vergleich der Streubreite des Druckaufnehmers mit dargestellt.

Welchen Einfluss eine nicht gesäuberte Oberfläche bei einer waagrecht ausgerichteten Filmwaage hatte, gaben die Ergebnisse in Abbildung 43, Bild C wieder. Die Bewegung des Wilhelmy-Plättchens (durch Schließen der Barriere B) führte zu einem Anstieg von μ von ca. $0,4 \text{ mN m}^{-1}$ (Abbildung 43, Bild C, —). Dass dieser Effekt auf Oberflächenverunreinigungen und

nicht auf die Schiefelage der Filmwaage zurückzuführen war, zeigte der Verlauf von μ während des Schließens von Barriere A (Abbildung 43 Bild C, —). Dieser war mit ca. $0,4 \text{ mN m}^{-1}$ vergleichbar mit dem aus der Bewegung von Barriere B. Durch Subtraktion des Druckprofils der Bewegung von Barriere B mit dem der Bewegung von Barriere A, erhielt man einen Druckverlauf, der eine vergleichbare Abweichung zur 0 mN m^{-1} -Linie aufweist, wie jener aus Abbildung 43 Bild F. Wie in 3.3.2 ff. erläutert, war μ auch abhängig von der Eintauchtiefe des Wilhelmy-Plättchens und somit von der Höhe der Subphase. Diese wiederum kann aufgrund des optischen Setups nicht beliebig angepasst werden. Bestimmend dafür war der Arbeitsabstand des Objektivs. Um zu zeigen, dass die Art und Weise der Ausrichtung der Filmwaage unabhängig von der Höhe der Subphasengrenzfläche war, wurde das oben beschriebene Experiment bei einem höheren Füllstand über dem Deckglas (5 mm) durchgeführt (Abbildung 43 Bild E). Ein Vergleich mit Abbildung 43 Bild D (niedriger Füllstand, 0,5 mm) zeigte dabei, dass sowohl die Druckverläufe bei hohem Füllstand als auch bei niedrigem Füllstand in einem ähnlichen Maß um die 0 mN m^{-1} -Linie schwankten.

5.6.4 Systemkalibrierung und Fokussierung der Grenzfläche

Für die Untersuchung von Molekülen an der Luft/Subphasen-Grenzfläche mittels FCS war es notwendig, das Setup zu kalibrieren. Wie in 3.2.2.2 beschrieben, hatte das Immersionsmedium einen Einfluss auf die Fokusform und die tatsächliche Position des Fokuszentrums in axialer Richtung. Bei Zwei-Farben-Experimenten war eine möglichst vollständige Überlappung beider Foki wichtig für die Messung und spätere Auswertung der Daten. Da aufgrund der langen Experimentierzeit Immersionswasser verdunstete und ein Nachfüllen einen Abbau der Filmwaage nach sich gezogen hätte, wurde ein ölartiges Immersionsmedium gewählt, welches einen ähnlichen Brechungsindex wie Wasser besaß (Immersol W). Um nun die ideale axiale Position zu ermitteln, bei der die Foki der beiden Farbkanäle (488 nm und 633 nm) ideal überlappten, wurde die Fluoreszenz der Monoschicht an verschiedenen Z-Positionen des Objektivs gemessen (Abbildung 44). Dabei zeigte sich, dass die Fluktuationskurven der beiden Foki (— Detektionskanal 1 und — Detektionskanal 2) bezüglich der Lage ihrer Maxima gegeneinander verschoben waren. Die Art und Weise der Verschiebung hing mit der Z-Position des Objektivs zusammen. So wurde bei allen Z-Positionen des Objektivs unterhalb der idealen Z-Position beobachtet, dass das Maximum der Fluktuationskurve des Detektionskanals 1 (—) vor dem Maximum der Fluktuationskurve des Detektionskanals 2 (—) detektiert wurde (Abbildung 44, Bild A, Z-Position: 3,510 mm). Befand sich die Z-Position des Objektivs oberhalb der idealen Z-Position, war die Reihenfolge vertauscht. Dann wurde zuerst das Maximum der Fluktuationskurve des Detektionskanals 2 (—) vor dem des Detektionskanals 1 (—) gemessen (Abbildung 44, Bild B, Z-Position: 3,590 mm). Wurde das Objektiv so positioniert, dass es der idealen Z-Position entsprach, so wurden die Maxima der beiden Detektionskanäle gleichzeitig erfasst (Abbildung 44, Bild C, Z-Position: 3,570 mm). Durch Anpassung der Fluktuationskurven mit einer *peak*-förmigen Modellfunktion nach Lorentz wurde die Migrationszeit der einzelnen Maxima bestimmt und so der Versatz als zeitliche Differenz zwischen den beiden Maxima gegen die Z-Position des Objektivs aufgetragen (Abbildung 44, Bild D; ●). Der Verlauf dieser zeitlichen Unterschiede der jeweiligen Maxima in Abhängigkeit von der Z-Position des Objektivs wurde mit einer linearen Funktion angepasst, deren Schnittpunkt mit der X-Achse bei 3,568 mm der idealen Z-Position entsprach. Um den zeitlichen Versatz der jeweiligen Maxima der Fluktuationskurven in eine apparente Distanz anzugeben, wurde die Wandergeschwindigkeit der Monoschicht in axialer Richtung (bedingt durch die Verdunstung der Subphase) bestimmt (Abbildung 44, Bild E). Der lineare Verlauf im Bereich von 3,51 mm und 3,59 mm zeigte, dass sich die Monoschicht mit einer konstanten Geschwindigkeit (21 nm s^{-1}) bewegte, was gemäß den Ausführungen nach 3.2.4 ff. eine

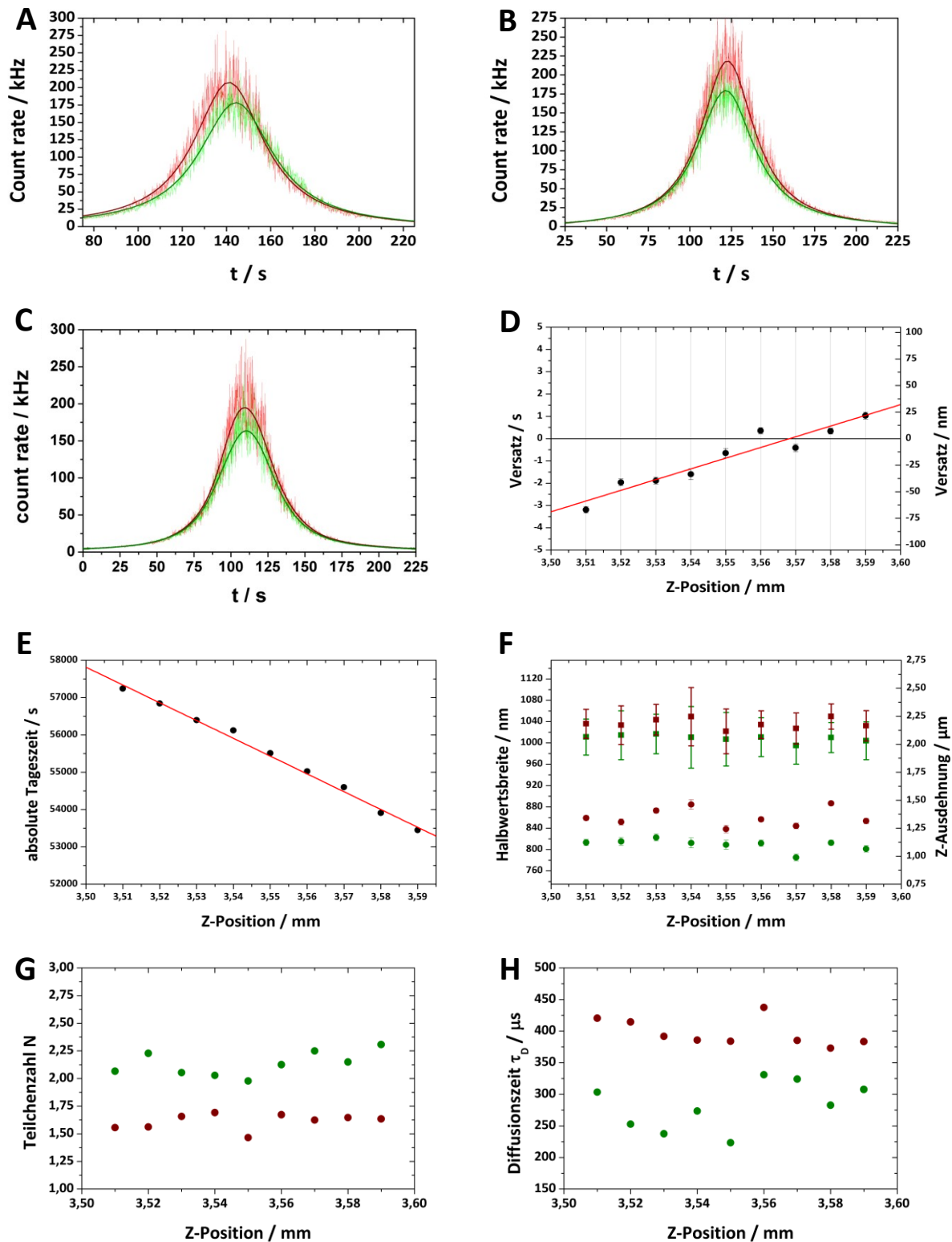


Abbildung 44: Zusammenfassung der Kalibrierung der Optik. (Bild A) Fokuspositionen unterhalb der idealen Z-Position. (Bild B) Fokuspositionen oberhalb der idealen Z-Position. (Bild C) Fluktuationenkurven bei idealer Überlappung. (Bild D) Der zeitliche Versatz der Maxima der beiden Detektionskanäle variierte in Abhängigkeit von der Z-Position des Objektivs und weist eine Position auf, bei der der Versatz 0 (ideale Z-Position) war. Durch lineare Regression (—) und Berechnung der Nullstelle ließ sich diese ideale Z-Position ermitteln. (Bild E) Wandergeschwindigkeit der Monoschicht, die es ermöglichte, den gemessenen zeitlichen Versatz in einen Abstand der beiden Foki zueinander umzurechnen. (Bild F) Halbwertsbreiten der Lorentzanspassungen der einzelnen Fluktuationenkurven (● Detektionskanal 1 und ● Detektionskanal 2) sowie die Ausdehnungen der jeweiligen konfokalen Volumina in Z-Richtung (Abstand zwischen den Funktionswerten, bei denen die Lorentzfunktion $1/e^2$ des maximalen Wertes aufwies) (■ Detektionskanal 1 und ■ Detektionskanal 2). (Bild G) Im Rahmen der Z-Scan-FCS-Auswertung ermittelten Teilchenzahlen N (● Detektionskanal 1 und ● Detektionskanal 2). (Bild H) Im Rahmen der Z-Scan-FCS-Auswertung ermittelten Diffusionszeiten τ_D (● Detektionskanal 1 und ● Detektionskanal 2).

Voraussetzung für die parabolische Auswertung der Z-Scan-FCS-Daten war.

Neben dem idealen Z-Überlapp der beiden Foki stellte sich ebenfalls die Frage, inwieweit die Fokusform bzw. die aus der Z-Scan-FCS erhaltenen Fitparameter (N und τ_D) in Abhängigkeit von dieser idealen Z-Position Änderungen aufwiesen. Bezüglich der Fokuseometrie konnten aus der Form der Fluktuationskurven Aussagen über die Z-Ausdehnung des konfokalen Volumens getroffen werden. Mit Hilfe der apparenten Wandergeschwindigkeit war es möglich, die erhaltenen Fitparameter der jeweiligen Lorentz Anpassungen der Fluktuationskurven von einer zeitbasierten Angabe in eine längenbasierte Angabe umzurechnen. Abbildung 44, Bild F zeigt dabei vergleichend die Halbwertsbreiten der Lorentzkurven der jeweiligen Detektionskanäle (● Kanal 1, ● Kanal 2) sowie die Z-Ausdehnung des konfokalen Volumens (entspricht der Breite der Lorentzkurve, bei der die Werte auf den $1/e^2$ ten Teil abgefallen sind) beider Kanäle (■ Kanal 1, ■ Kanal 2) in Abhängigkeit von der absoluten Z-Position des Objektivs. Zusätzlich zur Ausdehnung in Z-Richtung wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Positionen des Objektivs einen Einfluss auf die durch Z-Scan-FCS ermittelten Parameter wie N (Abbildung 44, Bild G; ● Detektionskanal 1, ● Detektionskanal 2) und τ_D (Abbildung 44, Bild H; ● Detektionskanal 1, ● Detektionskanal 2) hatten. Unter der Voraussetzung einer Normalverteilung der ermittelten Daten (13.4.5) wurde gemäß dem David-Hartley-Person-Test [85] geprüft, ob diese Werte in Abhängigkeit von der Z-Position des Objektivs einer normalverteilten Grundgesamtheit angehören oder sich als Ausreißer von dieser unterscheiden. Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ und 9 vorhandenen Datenpunkten ($n=9$) ergab sich nach [85] ein kritischer Wert von 3,552. Würde dieser Wert überschritten, so wäre anzunehmen, dass je nach Betrachtung der kleinste bzw. größte Wert der Datenreihe als Ausreißer zu werten wäre. Eine normalverteilte Grundgesamtheit der Daten würde so in Frage gestellt. Die kritischen Werte der einzelnen Datenreihen aus Abbildung 44, Bild C, Bild G und Bild H wurden in Tabelle 12 zusammengefasst. In allen Fällen wurde beim David-Hartley-Pearson-Test keine Überschreitung des

Tabelle 12: Zusammenfassung David-Hartley-Pearson-Test

Messreihe	Minimum	Maximum	Standard- abweichung	krit. Wert
Halbwertsbreite Kanal 1	837,6	885,7	17,0	2,832
Halbwertsbreite Kanal 2	784,4	821,9	10,6	3,548
Z-Ausdehnung Kanal 1	2,1	2,2	0,05	2,927
Z-Ausdehnung Kanal 2	2,0	2,1	0,03	3,421
N Detektionskanal 1	1,5	1,7	0,07	3,157
N Detektionskanal 2	2,0	2,3	0,1	2,962
τ_D Detektionskanal 1	373,0	437,5	21,5	2,996
τ_D Detektionskanal 2	223,4	330,8	38,1	2,820

vorgegebenen kritischen Wertes von 3,552 festgestellt. Demnach konnte davon ausgegangen werden, dass bei allen analysierten Datensätzen (Halbwertsbreite, Z-Ausdehnung, Teilchenzahl und Diffusionszeit) eine normalverteilte Grundgesamtheit vorlag.

5.6.5 Stabilität der Monoschicht während der Messung

5.6.5.1 Bleichanalyse der Lipide

Nach 3.2.1 ff. bestand die Möglichkeit, dass Fluorophore durch die Interaktion mit Photonen des Anregungslichtes strukturell beschädigt werden und dadurch „erlöschen“ (Bleichen) würden. Da das

Bleichen ebenfalls zu einer Reduktion der Helligkeit sowie einer Reduktion von N und τ_D führt, war es notwendig, diese Effekte im Rahmen der Z-Scan-Analyse auszuschließen, da andernfalls die parabolische Anpassung der Daten gemäß (3.2.4) nicht möglich gewesen wäre. Der Vergleich von τ_D (Abbildung 45, Bild A, ●) als auch der von N (Abbildung 45, Bild A, ●) über einen Leistungsbereich

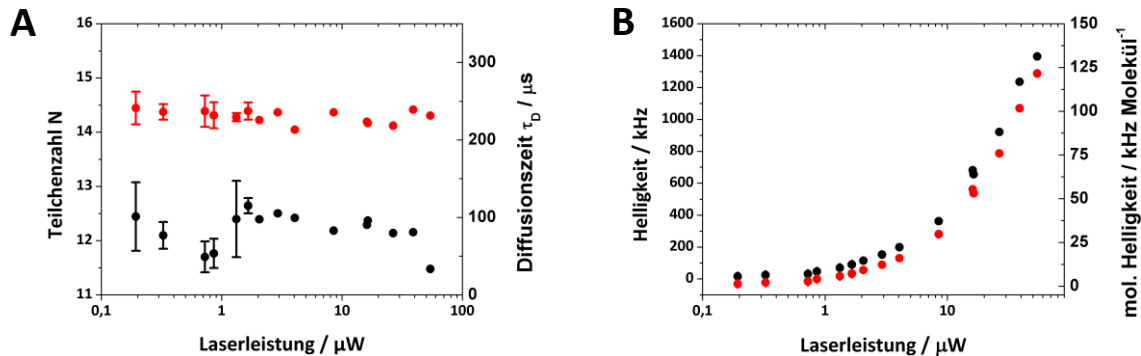


Abbildung 45: Einfluss der Laserleistung ($\lambda = 488 \text{ nm}$) auf die im Rahmen der Z-Scan-FCS-Analyse ermittelten Teilchenzahlen (Bild A; ●) und Diffusionszeiten (Bild A; ●). Zu jedem Datensatz waren zudem die Helligkeiten (Bild B; ●) sowie die molekulare Helligkeit (Bild B; ●) (siehe 4.2.7.4 ff.) dargestellt. Die Fehlerbalken stellen dabei die Standardabweichung der ermittelten Parameter aus mehreren Messungen dar.

von 0,2-55,2 μW zeigte, dass diese keine signifikanten Unterschiede zu einer normalverteilten Grundgesamtheit aufwiesen (siehe auch 13.4.5). Belegt wurde dies durch den David-Hartley-Pearson-Test bei dem der kritische Wert einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ und 15 Messpunkten (4,17) weder bei N (3,58) noch bei τ_D (3,38) überschritten wurde. Aufgrund dessen war die Annahme zulässig, dass es sich bei N als auch bei τ_D um Daten mit einer normalverteilten Grundgesamtheit handelte.

In Abbildung 45 (Bild B) wiesen sowohl der Verlauf der absoluten Helligkeit (●) als auch der Verlauf der molekularen Helligkeit (●) (siehe 4.2.7.4 ff.) nur eine Zunahme der jeweiligen Werte in Abhängigkeit von der Laserleistung auf. Ein Bereich der Sättigung oder eine Abnahme der Helligkeiten, welche auf ein Bleichen zurückzuführen wären, waren bei den eingesetzten Laserleistungen nicht zu beobachten.

5.6.5.2 Monoschichtstabilität bei Bewegung über die Filmwaage

Aufgrund der Problematik, dass über dem Deckglas kein Rühren der Subphase möglich war, mussten Insertionsexperimente neben diesem stattfinden und die Monoschicht zu gegebenen Zeitpunkten über das Deckglas bewegt werden. Als Vorversuch zu Insertionsexperimenten mit Sar1p_{SCCSAI488} wurde eine MMM-Monoschicht bei $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ verwendet. Um sicherzustellen, dass diese während der Bewegung nicht zerstört oder beschädigt würde, wurde die Teilchenzahl N (Abbildung 46, Bild A) und Diffusionszeit τ_D (Abbildung 46, Bild B) der gemessenen Fluktuationskurven bestimmt und verglichen. Die Messungen erfolgten dabei an 10 verschiedenen Positionen der MMM-Monoschicht, bevor diese wieder neben dem Deckglas positioniert wurde, um erneut über dieses bewegt zu werden. Dabei zeigten sowohl N als auch τ_D , dass die MMM-Monoschicht stabil genug war, mehrfach über das Objektiv bewegt zu werden und wieder zurück. Beim Vergleich von N zwischen der ersten und der zweiten Bewegung der MMM-Monoschicht wiesen die Boxen ähnliche Werte auf (Runde 1: 29,7-31,7; Runde 2: 29,6-31,4). Einzig nach der dritten Bewegung erhöhte sich die Streuung der Teilchenzahl auf einen Bereich von 29,1-31,4. Bei der Analyse von τ_D hingegen ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Bewegungszyklen erkennen.

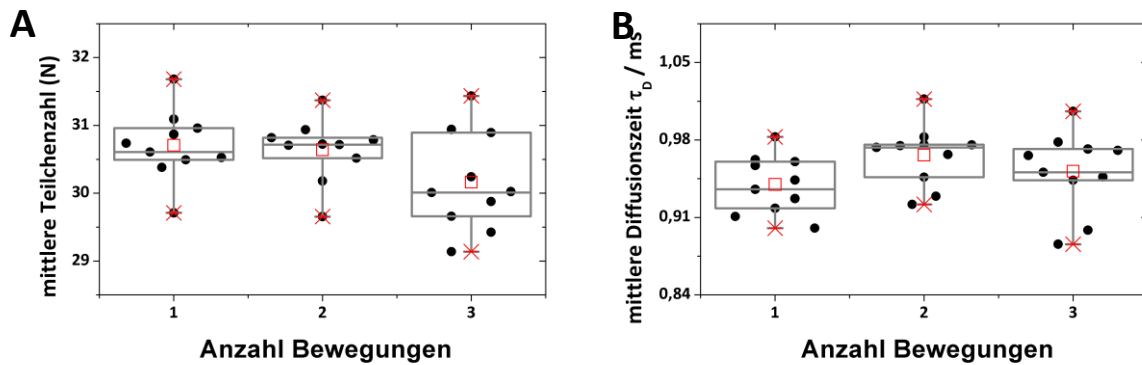


Abbildung 46: Ermittelten Teilchenzahlen (Bild A) sowie die Diffusionszeiten (Bild B) einer MMM-Monoschicht bei $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$. Die jeweils dargestellten Boxen umfassten dabei Z-Scan-FCS-Messungen an 10 unterschiedlichen Positionen der Monoschicht, welche dreimalmal über das Objektiv bewegt wurde.

5.7 Interaktionsanalyse von Proteinen und Phospholipid-Monoschichten durch Z-Scan-FCS

5.7.1 Interaktion von Sar1p mit MMM-Monoschichten

Die Untersuchungen von Sar1p_{SCCSA1488} an MMM-Monoschichten wurden bei einem Oberflächendruck von $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ durchgeführt. Der Druck wurde über die gesamte Phase der Proteininteraktion mit der Monoschicht konstant gehalten, sodass sich während des Einbaus die von Protein und Lipid besetzte Oberfläche vergrößerte. Mithilfe dieser Flächenänderung (durch die Filmwaage bestimmt) und der im Rahmen des Z-Scan-FCS-Verfahrens ermittelten Teilchenzahl wurde die molekulare Interaktionsfläche der GTPase mit der MMM-Monoschicht gemäß Gleichung [14] berechnet. Durch diese molekulare Interaktionsfläche (A_{mol}) sollte geklärt werden, ob sich Sar1p_{SCCSA1488} in Rahmen derartiger Insertionsexperimente an MMM-Monoschichten

Tabelle 13: Zusammenfassung der A_{mol} von Sar1p_{SCCSA1488} und Sar1p

Bezeichnung	$X^*/\%$	$A_{\text{Fokus}}^{**}/\text{nm}^2$	$\Delta A / \text{cm}^2$	$A_{\text{ges}} / \text{cm}^2$	N_{min}	$A_{\text{mol}} / \text{nm}^2$ Molekül ^{-1***}	$A_{\text{mol}} / \text{nm}^2$ Molekül ⁻¹
100 % Sar1p _{A1488}	100,00	175719	0,24	63,83	101,96	6,5	6,5
			1,57	61,85	13,99		
1,16 % Sar1p _{A1488}	1,16	175719	1,57	61,85	15,25	4,1	
			1,57	61,85	13,94		
			1,41	61,69	8,30		6,6 ± 3,2
0,80 % Sar1p _{A1488}	0,80	175719	2,17	61,66	5,39	9,2	
2,70 % Sar1p _{A1488}	2,70	175719	1,68	61,39	13,73	9,5	
1,85 % Sar1p _{A1488}	1,85	175719	0,98	57,90	15,61	3,6	
			1,02	57,94	15,84		

* Bezeichnet den Anteil von Sar1p_{SCCSA1488} (Dotierungsgrad) an der eingesetzten Proteinmenge

** Die Fokusfläche wurde bestimmt aus einer FCS-Kalibrierung mit Alexa₄₈₈-Hydrazid ($\tau_D=33,78 \mu\text{s}$), $D = 4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [81]. Daraus ergab sich ein r_0 von 237 nm. Unter der Annahme einer kreisrunden Fokusfläche mit dem Radius r_0 von 237 nm wurde eine Fokusfläche von 175719 nm^2 bestimmt.

*** Die Bestimmung der molekularen Interaktionsfläche der unterschiedlichen Mischungen aus Sar1p_{SCCSA1488} und Sar1p erfolgte an mehreren MMM-Monoschichten. Bei den MMM-Monoschichtpräparationen, an denen mehrere Z-Scan FCS-Messungen zur Bestimmung der molekularen Interaktionsfläche möglich waren, wurde der Mittelwert aus allen Parallelmessungen angegeben.

genauso verhält, wie Sar1p (Tabelle 13). Dabei zeigten A_{mol} in Gegenwart von 100 % Sar1p_{SCCSAI488} mit 6,5 nm²/Molekül einen vergleichbaren Wert wie im Fall der Mischungen ((6,6 ± 3,2) nm²/Molekül), welche zwischen 0,8 % und 2,7 % Sar1p_{SCCSAI488} aufwiesen. Durch das Mischen von Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} war es zudem möglich, die gemessene Flächenänderung ΔA auf den Faktor 10 und höher zu vergrößern. Bei einer Ungenauigkeit der Flächenbestimmung durch die Filmwaage von 0,02 cm² (13.5.7), hatte dies zur Folge, dass diese weniger stark auf A_{mol} Einfluss nahm. So betrug der Fehler im Falle der geringen Flächenänderung und 100 % Sar1p_{SCCSAI488} 16,7 %, wohingegen sich der Fehler im Falle der Mischungen (und den größeren Flächenänderungen) zwischen 1,8 % und 4,1 % bewegte.

5.7.2 Insertionsfläche von Sar1p_{SCCSAI488} in Gegenwart verschiedener Lipidsysteme

Um zu untersuchen, wie sich Sar1p in Gegenwart verschiedener Lipidsysteme verhielt wurde die molekulare Interaktionsfläche der Mischung mit 1,16 % Sar1p_{SCCSAI488} an einer Monoschicht mit zwei Komponenten (DLPC/DLPS, siehe 4.1.5.2) mit der in Gegenwart von MMM-Monoschichten verglichen (Tabelle 14). Die Bestimmung der molekularen Interaktionsfläche erfolgte dabei ebenfalls nach Gleichung [14]. In Gegenwart dieses Lipidmixes, bestehend aus 80 mol% DLPC und 20 mol% DLPS,

Tabelle 14: Zusammenfassung der Insertion von Sar1p_{SCCSAI488}/Sar1p in DLPC/DLPS Monoschichten

Bezeichnung	X*/%	$A_{\text{Fokus}}^{**}/\text{nm}^2$	$\Delta A/\text{cm}^2$	$A_{\text{ges}}/\text{cm}^2$	N_{min}	$A_{\text{mol}}/\text{nm}^2$ Molekül ⁻¹
DLPC/DLPS ₁	1,16	175719	0,64	63,26	1,94	
DLPC/DLPS ₂	1,16	175719	2,43	70,31	3,19	17,8 ± 6,3
DLPC/DLPS ₃	1,16	175719	1,02	63,19	1,59	

* Bezeichnet den Anteil von Sar1p_{SCCSAI488} (Dotierungsgrad) an der eingesetzten Proteinmenge

** Die Fokusfläche wurde bestimmt aus einer FCS-Kalibrierungsmessung mit Alexa₄₈₈-Hydrazid ($\tau_D=33,78 \mu\text{s}$), $D = 4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [81]. Daraus ergab sich ein r_0 von 237 nm. Unter der Annahme einer kreisrunden Fokusfläche mit dem Radius r_0 von 237 nm wurde eine Fokusfläche von 175719 nm² bestimmt.

betrug die molekulare Interaktionsfläche (17,8 ± 6,3) nm²/Molekül. Verglichen mit den molekularen Interaktionsflächen in Gegenwart von MMM entsprach dies einer Erhöhung um den Faktor 2,7. Die absoluten Flächenänderungen, die mittels Filmwaage bestimmt wurden, wiesen dagegen nur leichte Unterschiede auf. So betrug diese im Fall der Insertion in MMM-Monoschichten Werte von 0,98 cm² bis 2,17 cm². In Gegenwart von DLPC/DLPS-Monoschichten wurden Werte von 0,64 cm² bis 2,43 cm² gemessen, welche eine vergleichbare Größenordnung darstellten. Zusätzlich dazu zeigte die Analyse der Z-Scan-FCS-Daten, dass neben der 2,7 fach unterschiedlichen molekularen Interaktionsfläche auch die minimale Teilchenzahl im Fokus verschieden war. So wurden in den Insertionsexperimenten mit 1,16 % markiertem Sar1p_{SCCSAI488} im Falle der MMM-Monoschicht durchschnittlich 12,87 markierte Sar1p-Moleküle ermittelt, wohingegen bei Insertion in DLPC/DLPS-Monoschichten nur durchschnittlich 2,24 Teilchen bestimmt wurden, was einen Unterschied um den Faktor 5,74 bedeutete.

5.7.3 Interaktionsanalysen mit zwei Farben

Aufgrund des Designs der Insertionsexperimente, bei dem nach erfolgreicher Präparation der Monoschicht das Interaktionsmolekül in die Subphase injiziert wurde, zeigte die Monoschicht in der Regel ein kontinuierliches Abtauchen in die Subphase (siehe Anhang 13.5.6, *Abbildung 154*). Dabei war aus den Filmwaageparametern nicht ersichtlich, wie sich das Abtauchen in die Subphase nach

der Insertion weiter verhält, oder ob die Monoschicht ggf. durch das inserierte Molekül stabilisiert wurde. Für die Bestimmung der Flächenänderung (z.B. bei der Berechnung der molekularen Interaktionsfläche) wurde traditionell die Fläche zum Zeitpunkt der Injektion als Untergrenze und die maximale Fläche während der Interaktion als Obergrenze gewählt. Mit Hilfe von Zwei-Farben-Experimenten, bei denen die Monoschicht ebenfalls fluoreszenzmarkiert war, war es möglich, das

Tabelle 15: Flächenänderung bestimmt durch die Filmwaage nach Insertion von Sar1p_{SCCSA1488}/Sar1p in einer markierten MMM-Monoschicht

Bezeichnung	X*/%	$A_{\text{Fokus}}^{**} / \text{nm}^2$	$\Delta A / \text{cm}^2$	$A_{\text{ges}} / \text{cm}^2$	N_{min}	$A_{\text{mol}} / \text{nm}^2$ Molekül ⁻¹
MMM ₁	1,02	175719	3,21	30,38	32,24	
MMM ₂	0,06	175719	2,98	31,52	3,19	4,2 ± 1,5
MMM ₃	0,06	175719	3,14	30,23	3,04	

* Bezeichnet den Anteil von Sar1p_{SCCSA1488} (Dotierungsgrad) an der eingesetzten Proteinmenge

** Die Fokusfläche wurde bestimmt aus einer FCS-Kalibrierung mit Alexa₄₈₈-Hydrazid ($\tau_D=33,78 \mu\text{s}$), $D = 4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [81]. Daraus ergab sich ein r_0 von 237 nm. Unter der Annahme einer kreisrunden Fokusfläche mit dem Radius r_0 von 237 nm wurde eine Fokusfläche von 175719 nm² bestimmt.

Verhalten dieser zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Interaktion parallel zu erfassen und die molekulare Interaktionsfläche aus der Differenz der Teilchenzahlen der markierten Lipide im Fokus vor und während der Insertion zu bestimmen (Tabelle 15). In diesem Fall ergaben sich mit (4,2 ± 1,5) nm² Molekül⁻¹ vergleichbare molekulare Interaktionsflächen, wie sie bereits für die Interaktion von Sar1p_{SCCSA1488}/Sar1p in Gegenwart von MMM-Monoschichten (5.7.1) beschrieben wurden.

Alternativ dazu konnte die molekulare Insertionsfläche auch über die Änderung der minimalen Teilchenzahl der markierten Monoschicht vor und während der Insertion bestimmt werden. Dabei galt die Annahme, dass sich die Monoschicht nicht entmischt und im Falle eines Abtauchens in die Subphase (z.B. an den Ecken zwischen Barriere und Trogkannte) markiertes Lipid im gleichen Anteil verloren ging wie andere Lipidkomponenten. In diesem Fall ließ sich die molekulare Interaktionsfläche basierend auf den Definitionen zur Flächenänderung Gleichung [15] und Anzahl an Proteinmolekülen Gleichung [16] gemäß Gleichung [17] berechnen. Die somit erhaltenen molekularen Interaktionsflächen wurden in Tabelle 16 zusammengefasst. Auch hierbei ergab sich in

Tabelle 16: Flächenänderung, bestimmt durch Änderung der Lipidanzahl vor und nach Insertion von Sar1p_{SCCSA1488}/Sar1p in markierten MMM-Monoschichten

Bezeichnung	X*/%	N_{Lipid_A}	N_{Lipid_B}	ΔN	$N_{\text{Protein}_{\text{min}}}$	$A_{\text{mol}} / \text{nm}^2$ Molekül ⁻¹
MMM ₁	1,02	27,88	24,92	2,96	32,24	
MMM ₂	0,06	27,89	25,25	2,64	3,19	5,0 ± 1,7
MMM ₃	0,06	30,52	25,17	5,35	3,04	

* Bezeichnet den Anteil von Sar1p_{SCCSA1488} (Dotierungsgrad) an der eingesetzten Proteinmenge

** Die Fokusfläche wurde bestimmt aus einer FCS-Kalibrierung mit Alexa₄₈₈-Hydrazid ($\tau_D=33,78 \mu\text{s}$), $D = 4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [81]. Daraus ergab sich ein r_0 von 237 nm. Unter der Annahme einer kreisrunden Fokusfläche mit dem Radius r_0 von 237 nm wurde eine Fokusfläche von 175719 nm² bestimmt.

Gegenwart einer MMM-Monoschicht mit 5,0 ± 1,7 nm²/Molekül eine vergleichbare molekulare Interaktionsfläche, wie sie bereits in 5.7.1 und auch im Rahmen der Auswertung der Flächendifferenz mittels Filmwaage (Tabelle 15) bestimmt wurde. Zudem reduzierte sich der Fehler

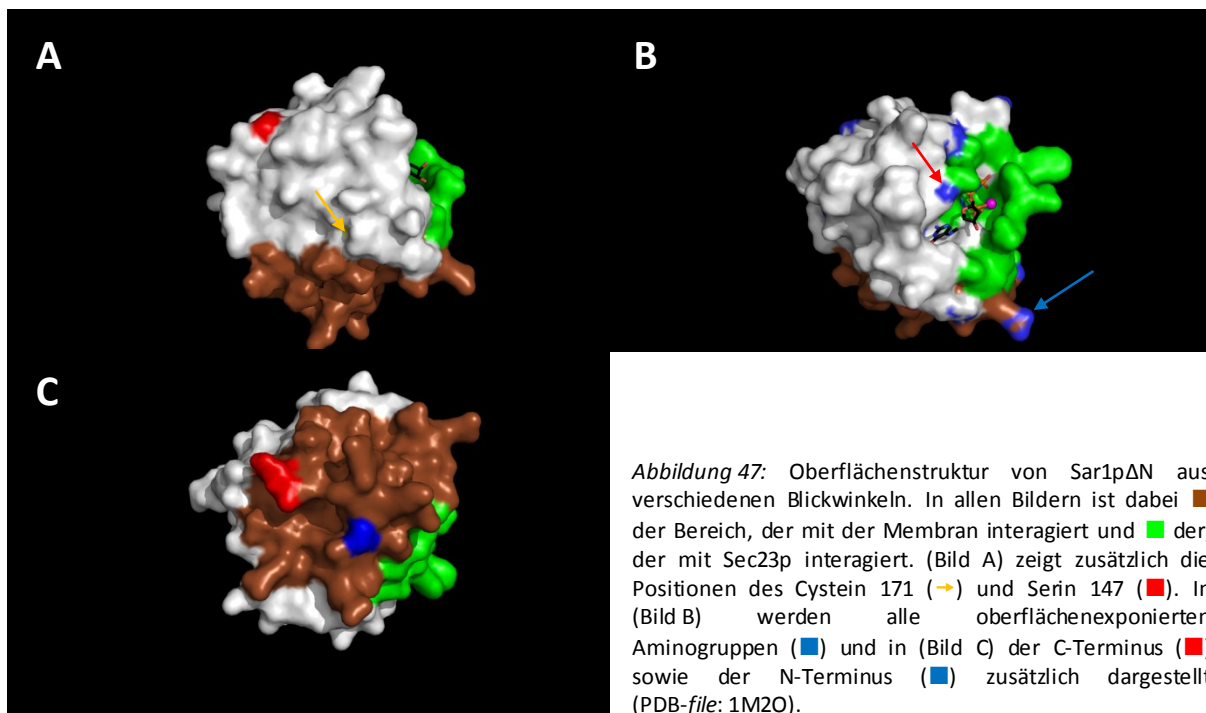
der molekularen Interaktionsfläche auf 32,83 %. Im Rahmen der Bestimmung der molekularen Interaktionsfläche durch Messung von ΔA durch die Filmwaage ergaben sich Fehler von 35,03 % (Tabelle 15) bis 48,26 % (Tabelle 13).

6. Diskussion

6.1 Modifikation von Sar1p und Sar1p_{SCCs} mit Alexa₄₈₈

6.1.1 Modifizierungsstrategien und Markierungseffizienz

Um die Funktion und Wirkungsweise von Proteinen mit Hilfe von optischen Methoden auf der Basis von Fluoreszenz (z.B. konfokale Fluoreszenzmikroskopie, FCS) analysieren zu können, werden geeignete Fluorophore benötigt. Bei den natürlich vorkommenden Fluorophoren werden die Fluoreszenzsignale der aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin von der des Tryptophans aufgrund des höheren molaren Extinktionskoeffizienten überlagert [86]. Um die Fluoreszenz von Tryptophan messen zu können, wird zur Anregung Licht in einem Wellenlängenbereich um 280 nm benötigt. Alternativ dazu ist eine Anregung durch Licht größerer Wellenlängen (z.B. 840 nm) möglich (*multi-photon-excitation*, MPE [87]). Aus technischen Gründen konnte keine der beiden Varianten angewendet werden, da die geeigneten Laserquellen (Laser, die Licht im Bereich von 280 nm emittieren für die Ein-Photonen-Anregung bzw. gepulste Laser für die *multi-photon-excitation*) nicht vorhanden waren. Alternativ zur Anregung von Tryptophan können Proteine durch zusätzliche Fluorophore modifiziert werden, die in Form von Fusionsproteinen (z. B. durch Kopplung des Zielproteins mit einem GFP, [88, 89]) oder durch posttranslationale Modifikation geeigneter, oberflächenexponierter Aminosäureseitenketten mit diesem kovalent verbunden sind. Geeignete Aminosäureseitenketten enthalten entweder Thiolgruppen, [90, 91] oder Aminogruppen [92, 93, 94].



Bezogen auf seine Struktur besitzt Sar1p eine N-terminale amphipathische α -Helix, die für die Funktion des Enzyms essentiell ist (3.1.3.1, [45]). Auch der C-Terminus von Sar1p befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Membranbinderegion des Proteins (Abbildung 47, Bild C). Aus diesem Grund besteht das Risiko, dass ein Fusionsprotein aus Sar1p und GFP die Funktionalität von Sar1p bezüglich der Interaktion mit der Membran beeinträchtigen kann. Die Variante der posttranslationalen

Modifikation von Aminen führt wiederum zur Entstehung von Proteinmischungen mit unterschiedlichen Markierungsgraden, da das Sar1p-Protein mehrere oberflächenexponierte Lysin- und Argininreste aufweist (Abbildung 47, Bild B). Da die Amplitude von FCS-Daten (und somit beispielsweise auch die Angabe zur mittleren Teilchenzahl im Fokus) von der jeweiligen molekularen Helligkeit [95, 96] abhängt, ist für eine spätere Quantifizierung mittels FCS eine eindeutige Aussage über die Menge der jeweiligen Population innerhalb der Proteinpräparation hilfreich. Wie Abbildung 47, Bild B ebenfalls zeigt, besitzt Sar1p auch Lysin- und Argininreste im Bereich der Membranbinderegion (\rightarrow) sowie des aktiven Zentrums (\rightarrow). Eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften sowie der GTPase-Aktivität ist daher zu vermuten. Die Modifikation des einzigen Cysteinrestes in Sar1p (Abbildung 47, Bild A, \rightarrow) hingegen führt (bei vollständiger) Markierung zu einer einzigen Population, was eindeutige Aussagen im Rahmen von FCS-Analysen unterstützt. Dieser befindet sich allerdings in einem sterisch gehinderten Bereich an der Oberfläche von Sar1p. Markierungsversuche mit 20 x molarem Überschuss an Alexa₄₈₈ über einen Zeitraum von 24 h (5.1.3.2) haben gezeigt, dass Sar1p nur mit 66,3 % modifiziert wurde. Hinzu kommt, dass sich die Proteinfraction nach Abtrennung des restlichen freien Fluoreszenzfarbstoffes in zwei Fraktionen aufteilt (Abbildung 23, 5.1.3.2). FCS-Analysen beider Fraktionen (Tabelle 6) ergaben, dass das in Fraktion 2 enthaltene Protein mit einem Diffusionskoeffizient von $10,0 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ dem auf Basis der Proteingröße ermittelten theoretischen Diffusionskoeffizient (Stokes Einstein-Relation, Gleichung [29]) mit $10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ gleicht. Die Proteinfraction 1 hingegen weist zahlreiche, sehr hell leuchtende Aggregate auf, die mit einem mittleren Diffusionskoeffizienten von $0,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ kein monomeres Sar1p_{AI488} darstellen. Zusätzlich zur unvollständigen Modifikation von Sar1p befindet sich das Cystein an Position 171 direkt neben der Sec23p-Interaktionsfläche (Abbildung 47, Bild A), wodurch Einflüsse auf die Proteininteraktion nicht auszuschließen sind.

Somit wurde eine alternative Stelle an der Enzymoberfläche für die Fluoreszenzmarkierung gewählt. Sequenzvergleiche verschiedener Sar1-Proteine in unterschiedlichen Organismen [35] und die Betrachtung der Oberfläche von Sar1p (Abbildung 2) zeigten, dass das Serin an Position 147 gut exponiert und nicht konserviert ist. Weiterhin besteht auch ein größerer Abstand zur Membranbinderegion, der Sec23p-Binderegion und dem aktiven Zentrum. Um zu verhindern, dass sich während der Markierung verschiedene Populationen des Enzyms mit unterschiedlichen Helligkeiten und Markierungsgraden bilden, wurde das Cystein an Position 171 durch ein Serin (aufgrund der ähnlichen Aminosäurearchitektur und Raumverhältnisse) ersetzt. Die Entfernung des konservierten Cysteins an Position 171 hat nach [33] allerdings keinen Einfluss auf die Funktionalität (katalytische Aktivität und Stimulation durch Sec23/24) des Proteins.

Nach erfolgreicher Mutagenese und Transformation in *E.coli*-BL21DE3 Expressionsstämme konnte die Variante (Sar1p_{sccs}) erfolgreich exprimiert und als bandenreines Protein gemäß dem Präparationsverfahren des Wildtyp-Proteins (5.1.2 ff.) hergestellt werden. Im Vergleich zu diesem zeigte die Variante bereits nach 2 h (bei 22 °C) eine deutlich höhere Markierungsausbeute von 99,9 %. Allerdings ergab sich auch hier während der Abtrennung des restlichen Alexa₄₈₈ eine Aufspaltung des markierten Proteins in zwei Fraktionen. Diese enthielten vergleichbar zum Wildtyp Aggregate (Fraktion 1) und monomeres Protein (Fraktion 2), was durch FCS-Messungen bestätigt werden konnte. Auch ergab der Diffusionskoeffizient mit $10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Fraktion 2) im Vergleich zum theoretischen Diffusionskoeffizient ($10,2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, Gleichung [29]) einen nahezu identischen Wert.

6.1.2 Proteinreinigungsverfahren

Grundsätzlich wurde Sar1p und dessen Varianten als GST-Fusionsprotein mit einer Thrombinschnittstelle zwischen dem GST-Tag und der GTPase nach den Ausführungen in 4.2.2 ff. exprimiert und präpariert. In allen Fällen konnte im Anschluss daran bandenreines Protein erhalten werden (z.B. Abbildung 21). Dabei war es möglich, Fraktionen mit Konzentration von $> 50 \mu\text{M}$ zu erhalten. Diese zeigten im Falle der Variante Sar1_{SCCS} bei der nachfolgenden Modifikation mit Alexa₄₈₈ eine nahezu vollständige Markierungsausbeute nach 2 h Markierungsreaktion bei 22 °C. Die Abtrennung des restlichen ungebundenen Farbstoffes über eine Größenausschlusschromatographie führte allerdings dazu, dass das markierte Protein zwar vom freien Alexa₄₈₈ getrennt werden konnte, aber aufgrund der sehr starken Verdünnung (500 μl Markierungsansatz wurden auf ca. 20 ml Elutionsvolumen verdünnt) eine Aufkonzentrierung des Proteins notwendig war. So konnten im Anschluss daran Konzentration von ca. $10 \mu\text{M}$ Sar1_{SCCSAI488} in ca. 250 μl erreicht werden. Absolut betrachtet bedeutete dies allerdings einen Verlust von ca. 90 % des Gesamtproteins. Um diesen Proteinverlust zu umgehen und das Markierungsverfahren mit anschließender Aufreinigung zu verkürzen, wurde versucht, die GTPase während der Proteinpräparation zu modifizieren, indem das an der GSH-Agarose gebundene Fusionsprotein Sar1p-GST (für alle Varianten wurde ebenfalls der GST-Tag als Präparations-Tag verwendet) nach dem Entfernen aller nichtgebundenen Proteine mit Alexa₄₈₈ modifiziert werden sollte (4.2.2.2). Die Resultate (5.1.3.1) zeigen, dass es zwar möglich ist, das Fusionsprotein auf der Säule zu modifizieren und den restlichen freien Farbstoff zu entfernen, aber durch die Modifikation wurde auch die Interaktion der GSH-Agarose und des GST-Tags beeinflusst, sodass neben dem freien Alexa₄₈₈-Farbstoff auch das Fusionsprotein von der Säule eluiert wurde. Eine Modifikation des GST-Sar1-Fusionsproteins während der Proteinaufreinigung ist somit nicht möglich.

6.2 Etablierung eines GTPase-Aktivitätstest für Sar1p mit nichtradioaktiven Substanzen

Für den Nachweis der katalytischen Aktivität von GTPasen der Ras-Superfamilie existieren verschiedene Verfahren. So werden beispielsweise Änderungen in der Tryptophanfluoreszenz gemessen, die sich auf das Ereignis der Konformationsänderung im Protein während der hydrolytischen Spaltung von GTP zu GDP beziehen [97, 98, 99, 100]. Dieser Ansatz ist allerdings nur ein indirekter Nachweis der GTP-Hydrolyse und auch dahingehend anfällig für Fehler, da Änderungen in der Tryptophanfluoreszenz immer auch dann auftreten können, wenn die Umgebung dieses Aminosäurerestes von hydrophober Umgebung zu hydrophiler Umgebung wechselt. Dies kann ebenso bei Entfaltungsreaktionen von Proteinen [101] der Fall sein.

Bei direkten Nachweisverfahren wird dagegen entweder die Menge des Reaktionsproduktes P_i (z.B. Malachitgrün basierter Nachweis, [73]) oder das Verhältnis von GTP zu GDP (z.B. durch radioaktiv markierte Nukleotide, [33]) bestimmt. Im Falle des Umsatznachweises mittels radioaktiver Nukleotide ergibt sich zum einen die Schwierigkeit der Umsetzung, da die Experimente in einer kontrollierten (radioaktiv gesicherten) Umgebung stattfinden müssen und zum anderen eine chromatographische Aufarbeitung (Dünnschichtchromatographie) des Reaktionsansatzes zur Detektion der Nukleotide notwendig ist. Im Falle des auf Malachitgrün basierenden Nachweisverfahrens ist eine strenge Kontrolle der Sicherheitsvorkehrungen nicht erforderlich. Auch der Nachweis des gebildeten P_i erfolgt direkt aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe einer Farbreaktion, die photospektrometrisch quantifiziert werden kann. Ein vergleichbares Verfahren wurde bereits von [73] für Dynamin beschrieben und sollte für die Untersuchung von Sar1p und den COPII-

Komponenten entsprechend adaptiert werden. In der ersten Phase dieser Etablierung sollten zunächst die Signalsensitivität sowie die Geschwindigkeit der Entwicklung des Detektionssignals so optimiert werden, dass diese den Angaben aus [73] gleichen oder diese übertreffen. Bezüglich der Signalsensitivität, die durch einen möglichst steilen Anstieg der Kalibriergeraden ausgedrückt wird, konnten unter den angegebenen Bedingungen mit $2 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$ nur ca. 50 % des Wertes erreicht werden, der in [73] beschrieben wurde. Auch die Zeit, in der sich dieser maximale Anstieg einstellte, war mit 60 min deutlich länger als in [73] (5 min). Durch Zugabe von H_2O zum Ansatz aus Malachitgrün-Nachweislösung und P_i -Lösung wurden Anstiege von $4,6 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$ erreicht (113 % im Vergleich zur Angabe in [73]) und das bereits ab 10 min Inkubationszeit. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Verwendung von Ammoniumheptamolybdat im Vergleich zum Orthomolybdat (wurde in [73] verwendet) bei 10 mM Orthomolybdatäquivalent in der Nachweislösung zu deutlich niedrigeren Signalintensitäten bei gleicher Phosphatmenge führt (Abbildung 27, Bild A). Bei einem Probenvolumen von $250 \mu\text{l}$ entspricht dies maximal $2,5 \mu\text{mol}$ Orthomolybdat im Reaktionsansatz, welches zur Komplexierung von $5 \text{ nmol } \text{P}_i$ zur Verfügung steht. Eine Verdopplung der eingesetzten Ammoniumheptamolybdatkonzentration auf ein Orthomolybdatäquivalent von 20 mM (entspricht $5 \mu\text{mol}$ Orthomolybdat in einem $250 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz) führt zu einer Erhöhung des Absorptionssignals auf $0,4 \text{ AU}$. Basierend auf einer Konzentration von $100 \mu\text{M } \text{P}_i$ ist dies gleichzusetzen mit einem Anstieg von $4 \text{ mAU } \mu\text{M}_{\text{P}_i}^{-1}$, welcher identisch zu dem in [73] ist. Begründet werden kann dieser Effekt durch das Vorhandensein eines zweiten Gleichgewichtes aus Orthomolybdat und Heptamolybdat, welches der Nachweisreaktion Orthomolybdat entzieht (siehe Anhang 13.2.1). In dieser wird unter stark sauren Bedingungen ein Komplex aus P_i und Orthomolybdat gebildet. Gleichzeitig existiert Molybdat in saurem Milieu hauptsächlich als Heptamolybdat, welches sich aus Orthomolybdat und H^+ unter Freisetzung von Wasser bildet und für die Phosphatnachweisreaktion nicht zur Verfügung steht. Dies könnte auch den Effekt der Signalsteigerung nach Wasserzugabe erklären. In diesem Fall würde das Gleichgewicht auf die Seite von Orthomolybdat und H^+ verschoben, die wiederum für die Phosphatnachweisreaktion zur Verfügung stehen. Da Proteine bei sauren pH-Werten denaturieren und nach Zugabe der Malachitgrün-Nachweislösung ein Abstoppen der Enzymreaktion erfolgen muss (um das bisher produzierte P_i nachzuweisen), erfolgt die oben beschriebene Optimierung dahingehend, dass ein möglichst saurer pH-Wert erhalten bleibt.

Weiterhin zeigte sich, dass die Einstellung eines stabilen Signales nach 5-10 min abgeschlossen war. Bei der Untersuchung der jeweiligen Spektren des Nachweisansatzes wurde zusätzlich beobachtet, dass das Spektrum bei ca. 630 nm ein phosphatabhängiges Maximum zeigt und nicht, wie in [73] beschrieben, bei 650 nm . Somit wurden im Rahmen der Optimierung der Mess- und Nachweisparameter eine Erhöhung der eingesetzten Heptamolybdatkonzentration auf 20 mM Orthomolybdatäquivalent sowie eine Veränderung der Detektionswellenlänge auf 630 nm vorgenommen.

Neben der katalytischen Spaltung von GTP durch das Enzym sind die Nukleotide ebenfalls in der Lage, aufgrund der Säureanhydridbindung zwischen den einzelnen Phosphatgruppen unter diesen sauren Bedingungen zu hydrolysieren und Phosphat freizusetzen (Abbildung 28). Um das Nachweisverfahren auch bei großen Probenzahlen parallel anwenden zu können, die nicht alle exakt zum gleichen Zeitpunkt vermessen werden können (aufgrund zeitlichen Versatzes durch manuelle Präparation), wurde das Kalibriersystem so angepasst, dass es die Situation der GTP-Hydrolyse nachstellt. Durch Kombination von GTP, GDP und P_i in den Verhältnissen, wie sie auch während der Hydrolyse entstehen, konnte eine Kalibrierreihe entwickelt werden, deren Einzelsignale zwar kontinuierlich stiegen (kontinuierliche Steigerung des Achsenabschnittes), aber deren

Geradenanstieg über einen längeren Zeitraum (bis 20 min) konstant blieb (Abbildung 29).

Neben Proteinen werden für die Analyse verschiedener Effekte zur Hydrolyse von Sar1p auch Liposomen eingesetzt. Da Phospholipide aufgrund der vorhandenen Esterbindungen in saurer Umgebung gespalten werden und ebenfalls Phosphat freisetzen können, wurde untersucht, inwieweit auch Phospholipide in Form von MMM-Liposomen (durch eine Membran mit 400 nm Porendurchmesser extrudiert) einen Einfluss auf die Signalentwicklung der Nachweisreaktion zeigen. Bei Analysen zur Signalentwicklung der Kalibrierreihe aus GTP, GDP und P_i konnte allerdings keine liposomenabhängige Veränderung der Signale bei den eingesetzten Konzentrationen zwischen 0-1,5 mM Lipid bestätigt werden. Der messbare Einfluss von Liposomen ist, wenn er denn vorhanden ist, so gering, dass eine zusätzliche Betrachtung dieser in Form einer Zugabe zur Kalibrierreihe nicht erforderlich ist. Um abschließend die Eignung des etablierten Nachweisverfahrens auch gegenüber anderen Testverfahren zu bestätigen, wurde die basale Hydrolyserate von Sar1p sowohl mit dem Malachitgrün basierten Testverfahren als auch mit der eingangs erwähnten radioaktiven Methode bestimmt. Dabei konnte erfolgreich gezeigt werden, dass beide Verfahren zu einer vergleichbaren Basalaktivität für Sar1p führten (Tabelle 7). Dies ermöglicht zudem eine bessere Vergleichbarkeit von zukünftigen Daten (z.B. Hydrolyseraten von Sar1p-Varianten in Gegenwart verschiedener COPII-Proteine) mit denen, die bereits mit radioaktiven Verfahren publiziert wurden.

6.3 Funktionsanalysen von Sar1p und Sar1p_{SCCSA1488}

6.3.1 GTPase-Aktivität und Regulation

Da Sar1p ein Enzym der Klasse kleiner monomerer GTPasen ist, kann dessen Aktivität sowie die Regulation der GTP-Hydrolyse Aufschluss über Einflüsse von Mutationen und posttranslationalen Modifikationen auf die Funktionalität geben. Die bisher ermittelte Basalaktivität von Sar1p ohne weitere Effektoren ($(0,56 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ in Gegenwart von radioaktiv markiertem GTP ($\alpha^{32}\text{P-GTP}$)) lag hierbei um den Faktor 500 höher als die Basalaktivitäten, die bisher für die GTPase mit radioaktiven Nachweisverfahren publiziert wurde ($1,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, [102]). Auch bei Anwendung des Malachitgrün-basierenden Nachweisverfahrens konnte diese deutlich höhere Basalaktivität bestätigt werden ($0,51 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$; Faktor 464). Als Ursache ist dabei die eingesetzte Menge an GTP zu sehen, die in dieser Arbeit standardmäßig bei 1 mM lag, wohingegen in [102] 1 μM verwendet wurde. Die Auswertung der GTP-Hydrolyserate nach Michaelis-Menten (VS-Charakteristik, [80]) mit einem K_M -Wert von $(0,48 \pm 0,05) \text{ mM}$ und einem k_2 von $(0,65 \pm 0,02) \text{ min}^{-1}$ ergaben bei den in [102] verwendeten 1 μM GTP eine Basalaktivität im Bereich von $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ bis $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Diese lag in einer vergleichbaren Größenordnung zu der in [102] beschriebenen Basalaktivität.

In Gegenwart von Liposomen zeigte die Basalaktivität von Sar1p eine leichte Verringerung auf $(77,4 \pm 5,4) \%$ im Vergleich zu Messungen ohne Lipid. Dass Liposomen Einfluss auf die Basalaktivität von Sar1 haben, wurde bereits in [3] gezeigt. Dabei veränderte sich diese in Abhängigkeit von der eingesetzten Vesikelgröße dahingehend, dass kleine Vesikeldurchmesser einen aktivierenden Charakter auf die Basalaktivität zeigen und größere nicht. Es ist möglich, dass die GTPase nach erfolgreichem Nukleotidaustausch mit ihrer dann exponierten N-terminalen amphipathischen α -Helix in die Membran inseriert [27, 46] und dort auch in ihrer GTP-gebundenen Form stabilisiert wird. Einen weiteren nicht proteinogenen Effektor stellen Mg^{2+} dar, in deren Gegenwart Sar1p ein Maximum seiner Basalaktivität bei $(0,52 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ zeigt. Bei Abwesenheit von Mg^{2+} ist hingegen keine GTPase-Aktivität messbar. Dies veranschaulicht, dass für Sar1p Mg^{2+} als Cofaktor für die GTP-Hydrolyse notwendig sind, was nach [103, 104] für einige der kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie bestätigt wurde.

Bei der Untersuchung der Modulation der Basalaktivität von Sar1p wurde der Effekt des GAP-Proteins Sec23/24p untersucht, was eine Beschleunigung der Hydrolyserate nach sich ziehen sollte. Anders als in [33] wurde dabei keine Stimulation der Basalaktivität von Sar1p in Gegenwart von 0,0-2,0 μM Sec23/24p (0-4facher molarer Überschuss im Vergleich zu Sar1p) beobachtet. Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei Zugabe von 0,0-3,0 μM Sec12 ΔCp (zytosolische und katalytisch wirksame Domäne des Guanidin-Austauschfaktors für Sar1p), bei der ebenfalls keine Steigerung der Basalaktivität zu beobachten war. Die Kombination aller drei Proteine führte dagegen zu einer Steigerung der Basalaktivität von Sar1p. So erhöhte sich diese von $(0,39 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Sec23/24p (bei 0,5 μM Sar1p und 0,1 μM Sec12 ΔCp) bis auf $(0,90 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$, was einen Aktivierungsfaktor von 2,3 bedeutet. In Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Sec12 ΔCp (bei 0,5 μM Sar1p und 0,5 μM Sec23/24p) wurde die Umsatzrate von $(0,39 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$ auf $1,08 \pm 0,09) \text{ min}^{-1}$ gesteigert. Dies entspricht einem Aktivierungsfaktor von 2,8. Zusammenfassend betrachtet führt demnach die Kombination aus Sar1p, Sec12 ΔCp und Sec23/24p zu einer Erhöhung der Basalaktivität auf das ca. 2,5fache, was bei den jeweiligen Effektoren allein nicht beobachtet wurde.

Da sich die aktivierende Wirkung des GAP (Sec23/24p) erst in Gegenwart des Austauschfaktors (Sec12 ΔCp) beobachten lässt, kann vermutet werden, dass der Nukleotidaustausch zu langsam abläuft, um die Beschleunigung der GTP-Spaltreaktion zu beobachten. In Gegenwart des Austauschfaktors scheint dieser Austausch schnell genug abzulaufen, sodass eine höhere Hydrolyserate unter Anwesenheit von Sec23/24p gemessen werden konnte. Durch Untersuchungen der GTPase-Aktivität von Sar1p bei unterschiedlichen GTP-Konzentrationen in Gegenwart und Abwesenheit von Sec12 ΔCp wurde gezeigt, dass sich die Konzentration an GTP, bei der die Hälfte der maximalen Umsatzrate erreicht wird (K_M -Wert, [80]), verändert. So reduziert sich dieser K_M -Wert in Gegenwart von Sec12 ΔCp von $(0,48 \pm 0,05) \text{ mM}$ auf $(0,19 \pm 0,04) \text{ mM}$, was ebenfalls einem Faktor von 2,5 entspricht. Der K_M -Wert beinhaltet dabei die Assoziations- und Dissoziationskonstanten des Enzyms mit dem Substrat k_1 und k_{-1} sowie die Produktbildungsrate k_2 (Gleichung [27]) ($k_2 = k_{cat}$), wobei letztere unter Substratsättigungsbedingungen direkt von der maximalen Umsatzrate (v_{max}) abhängt (Gleichung [28]).

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad \text{Gleichung [27]}$$

$$v_{max} = k_2[E] \quad \text{Gleichung [28]}$$

Dabei stellt [E] die Gesamtkonzentration des Enzyms dar. Da k_2 sowohl in Gegenwart ($(0,65 \pm 0,02) \text{ min}^{-1}$) als auch bei Abwesenheit ($(0,66 \pm 0,03) \text{ min}^{-1}$) von Sec12 ΔCp nahezu konstant bleibt und die eingesetzte Enzymkonzentration mit 0,5 μM ebenfalls konstant ist, ergibt sich, dass auch die maximale Geschwindigkeit, mit der das Produkt gebildet wird (v_{max}), gleich bleibt. Da sich K_M in Gegenwart des Austauschfaktors verringert hat und k_2 als konstant angenommen werden kann, folgt daraus, dass sich möglicherweise die Geschwindigkeitskonstante der Substratassoziation (k_1) erhöht hat, die Geschwindigkeitskonstante der Substratdissoziation (k_{-1}) verringert hat oder beide Effekte eingetreten sind. In allen drei Fällen würde dies bedeuten, dass sich das Gleichgewicht aus freiem Enzym und ungebundenen Substrat hin zum Enzym-Substrat-Komplex verschoben hat. Weiterhin ist es auch möglich, dass sich die Geschwindigkeitskonstanten der Substratassoziation (k_1) und der Substratdissoziation (k_{-1}) um den gleichen Faktor erhöht haben. In diesem Fall würde sich

die Lage des Gleichgewichtes zwischen Enzym und Substrat und dem Enzym-Substrat-Komplex nicht verändern. Die Geschwindigkeit, mit der sich Enzym-Substrat-Komplex bildet und wäre dadurch aber erhöht, sodass eine Steigerung von k_2 durch Sec23p ebenfalls nachweisbar wäre.

Um Abschließend auch den Effekt des äußeren Hüllproteins zu untersuchen, wurde eine Titrationsreihe mit Sec13/31p zu dem bereits zuvor beschriebenen Ansatz durchgeführt. In diesem Fall konnte eine 13fache Aktivierung (bezogen auf die Basalaktivität von Sar1p) bestätigt werden. Dieser Wert erfährt eine Sättigung bei ca. 0,5 μM Sec13/31p, was ebenfalls einer äquimolaren Menge zum Sar1p entspricht. Bezugnehmend auf diese Sättigungskonzentrationen der einzelnen COPII-Komponenten und nichtproteinogenen Effektoren, konnte nun der Vergleich der Sar1-Variante mit dem Wildtyp-Protein erfolgen. Dabei stellte sich heraus, dass das Sar1_{p_{SCCSA}488} auf der einen Seite so gut wie keine Basalaktivität ($0,01 \pm 0,01$) min^{-1} aufwies, auf der anderen Seite durch den inneren *coat* auf ein vergleichbares Niveau zum Wildtyp aktiviert wurde ($1,07 \pm 0,28$) min^{-1} . Es ist somit nicht auszuschließen, dass der Fluoreszenzfarbstoff aufgrund seines langen *linker*-Bereiches, obwohl er weiter entfernt vom aktiven Zentrum der GTPase angebracht wurde, dieses dennoch beeinflusst. Das geschieht allerdings in einer Weise, die eine Interaktion und Aktivierung durch den *inner coat* zulässt. Beim der Aktivierung in Gegenwart von Sec13/31p zeigte die Variante einen geringeren Aktivierungsgrad im Vergleich zur Anwesenheit des Wildtyps. So stimulierte die Anwesenheit des *outer coat* das durch den *inner coat* voraktivierte Sar1_{p_{SCCSA}488} um den Faktor 4, wohingegen bei Anwesenheit von Sar1p Aktivierungsfaktoren von 5-6 ermittelt werden konnten. Es zeigt sich, dass durch Anwesenheit des Fluoreszenzmarkers die Interaktionen im COPII-Hüllkomplex derart beeinträchtigt werden, dass die Aktivierung durch den *outer coat* leicht

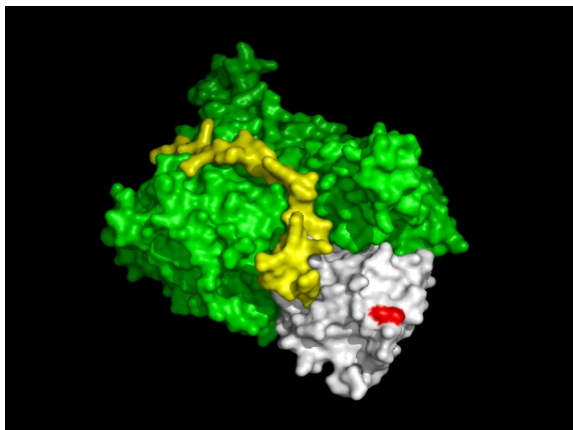


Abbildung 48: Proteinstruktur von Sar1p (weiß) mit Sec23p (Grün) und einem Teil von Sec31p (gelb). Das Serin an Position 147 (rot) befindet sich dabei nicht in einem der Bindebereiche von Sar1p mit Sec23p oder Sec31p (PDB-file: 2QTV).

gesunken ist und dadurch diese Variante für Untersuchungen in Gegenwart des *outer coat* nur bedingt geeignet scheint. Bei Betrachtung der Proteinstrukturen von Sar1p in Gegenwart von Sec23p und einem Teil von Sec31p kann eine Beeinflussung der Interaktion von Sar1 und Sec31 durch den Fluoreszenzmarker und seinen Linker durchaus vermutet werden, wobei die Markierungsposition des Alexa₄₈₈ (Abbildung 48, ●) nicht in einem der Bindebereiche von Sar1p mit Sec23p oder Sec31p liegt.

6.3.2 Tubulierungsfähigkeit

Wie in (3.1.3.2) dargelegt, ist Sar1p in der Lage, in Gegenwart von nicht hydrolysierbarem GTP (GMP-PNP) die COPII-Komponenten der inneren und äußeren Hülle (Sec23/24p, *inner coat*; Sec13/31p *outer coat*) an der Membran so zu assoziieren, dass lange tubuläre Strukturen entstehen können. Aufgrund der Dimension von einigen μm können diese auch im Lichtmikroskop beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass sowohl Sar1p als auch Sar1p_{p_{SCCSA}488} in der Lage sind, die Form der

MMM-GUV-Membran in Gegenwart von GMP-PNP sowie Sec23/24p und Sec13/31p so zu verändern, dass tubuläre Strukturen entstehen. Allerdings weisen die gebildeten *Tubes* in Art und Anzahl Unterschiede auf. So ist die Häufigkeit der tubulären Strukturen bei Verwendung von Sar1p höher als bei Sar1p_{SCCSAI488}. Auch deren Länge erscheint in Gegenwart des Wildtypenzym mit bis zu 5 µm größer als in Gegenwart der Variante (bis zu 2,5 µm). Bei näherer Betrachtung mittels Kryoelektronenmikroskopie zeigten sich ebenfalls Unterschiede zwischen den tubulären Strukturen, die in Gegenwart der beiden Varianten erzeugt wurden. Im Falle des Wildtyps werden durchgängige Linien parallel zur Membran beobachtet, die den äußeren Hüllkomplex (Sec13/31p) darstellen [54]. Die *Tubes* hingegen, die in Gegenwart von Sar1p_{SCCSAI488} entstanden sind, zeigen kürzere Bereiche von Elektronendichte neben der Membran, welche aber eher punktförmig und immer wieder unterbrochen erscheint. Ähnlich wie bei der Untersuchung der Stimulation der GTPase-Aktivität zeigt sich auch bei der Tubulierungsfähigkeit, dass die Variante im Vergleich zum Wildtyp weniger deutliche Effekte erzielt. Sowohl die geringere Anzahl an tubulären Strukturen und deren Länge, als auch die Art und Weise, wie sich der äußere Hüllkomplex um die *Tubes* formiert, deuten darauf hin, dass die Interaktion von Sar1p_{SCCSAI488} und Sec13/31p nicht so verläuft, wie bei Sar1p und Sec13/31p. Dennoch ist diese in einem Maß vorhanden, das es erlaubt, dass tubuläre Strukturen gebildet werden und dass der äußere Hüllkomplex an der Membran rekrutiert wird.

6.4 Z-Scan-FCS-Analyse mittels MATLAB

Grundsätzlich werden alle FCS-Daten, die mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM 710 and ConfoCor 3, Zeiss) erzeugt wurden, mit der dazugehörigen Analysesoftware Zen2009 ausgewertet. Im Falle der Datenauswertung gemäß den Beschreibungen der Z-Scan-FCS-Methode (3.2.4) war dies mit der Zen2009 Software nur eingeschränkt möglich, da die gemessene Fluktuationskurve nur auf zweierlei Weise in Segmente zerlegt und analysiert werden konnte. Dies gelang zum einen durch das manuelle Definieren von Fluktuationsbereichen einer kompletten Fluktuationskurve, die nicht für die Korrelation verwendet werden sollten (*cut-region*), zum anderen durch die Definition von Aufnahmeintervallen, deren Zeit und Anzahl im Vorfeld festgelegt werden musste. Wenn davon ausgegangen werden kann, dass für ein Interaktionsexperiment 5-10 Messungen durchgeführt werden und jede Fluktuationskurve je nach Segmentlänge (welche wiederum abhängig ist von der Diffusionszeit, um die Korrelationskurven so optimal wie möglich mit einem Diffusionsmodell anpassen zu können) zwischen 10 und 100 einzelne Segmente beinhaltet, wird deutlich, dass das manuelle Definieren der Bereiche für die Korrelation zwar möglich, aber sehr zeitaufwendig ist (auch im Hinblick darauf, dass die Segmentlänge nachträglich eventuell noch einmal angepasst werden müsste). Bei der zweiten Variante, bei der die Segmentlängen und Segmentanzahlen im Vorfeld definiert werden müssen, ist ein nachträgliches Anpassen der Segmentlänge nicht mehr uneingeschränkt möglich, da zwischen den einzelnen Segmenten eine Totzeit entsteht, in der keine Daten aufgenommen werden. Somit können die Segmente nicht mehr zu einer kompletten Kurve zusammengesetzt werden. Die auf der Basis von MATLAB entwickelte Auswerterroutine ermöglichte dabei zum einen die Flexibilität bei der Wahl und Variation der Segmentlänge und zum anderen das Auswerten einer großen Anzahl von Messungen in automatisierter Form.

Der verwendete Korrelator, der auf einem *multiple-τ*-Algorithmus basiert [83, 84], erzeugt dabei vergleichbare Korrelationskurven aus den Fluktuationsdaten wie der, dem LSM 710 beigestellte Korrelator, was die Funktionalität des MATLAB-basierten Korrelators bestätigt. Für die anschließende Anpassung der Korrelationskurven mit den entsprechenden Diffusionsmodellen müssen geeignete Startwerte für die Kurvenanpassung (so auch in Zen2009) manuell eingegeben

werden, da nicht in jedem Segment das gleiche N und τ_D wie in seinem benachbarten Segment erhalten wird (3.2.4). Durch ein Verfahren, bei dem die erzeugten Korrelationskurven geglättet und numerisch differenziert wurden, konnte für jede dieser Kurven anhand ihrer charakteristischen Form eine Bestimmung der Startwerte für die Datenanpassung automatisch erfolgen.

Bei der abschließenden parabolischen Auswertung von N und τ_D in der Äquatorialebene des konfokalen Volumens war eine einfache Modellanpassung der erhaltenen Daten mit einer Parabel nicht möglich, da zum einen die Daten in den Randbereichen und zum anderen schlecht angepasste Korrelationskurven ohne Wichtungsfaktor einen zu starken Einfluss nahmen (5.5.3, Abbildung 39, —). Im ersten Fall wurde die reziproke Helligkeit des Segmentes als Wichtungsfaktor herangezogen, da gemäß (3.2.4) die Randbereiche weniger hell sind als die Bereiche im Zentrum des konfokalen Volumens. Hinzu kommt, dass die Diffusionszeiten in den Randbereichen steigen und somit die vorgegebene konstante Segmentlänge zu klein wird, je größer die Entfernung zum Zentrum des konfokalen Volumens wird. Das heißt, dass die Diffusionszeit immer näher an die maximale Korrelationszeit τ heranrückt oder diese unter Umständen überschreitet. Die Anpassung des zweidimensionalen Diffusionsmodells an die Korrelationskurve, wie sie im Zentrum des konfokalen Volumens angewendet wird, ist so nicht mehr in gleicher Qualität umsetzbar. Für die Beurteilung der Güte der Modellanpassung an die Korrelationsdaten wurde ein Summenparameter der einzelnen Residuenwerte (in modifizierter Form, siehe Abbildung 38) von Modellfunktion und Korrelationsdaten ermittelt, der vor allem Anpassungsfehler in den Bereichen stärker bewertet, die durch den *multiple- τ* -Algorithmus auch stärker geglättet sind. Dies hat zur Folge, dass die starken Fluktuationen im Bereich der kleineren τ -Werte weniger stark in Betracht gezogen werden und Daten mit groben Anpassungsfehlern im Bereich größerer Glättung selektiv weniger stark bei der parabolischen Datenanpassung berücksichtigt werden. Mit Hilfe eines kombinierten Wichtungsfaktors, der sowohl die Anpassungsgüte der FCS-Modellfunktionen an die Korrelationsdaten als auch den Abstand zum Zentrum des konfokalen Volumens berücksichtigt, ist die korrekte parabolische Datenanpassung auch mit einzelnen schlecht angepassten Korrelationsdaten möglich.

6.5 Etablierung eines Systems zur Analyse von Protein-Monoschicht-Interaktionen mittels FCS

6.5.1 Validierung der Systemparameter

Den Ausgangspunkt dieses Messsystems stellten ein konfokales Laser-Scanning Mikroskop und eine Langmuir-Filmwaage mit modifiziertem Trog sowie zwei voneinander unabhängig beweglichen Barrieren dar [72]. Da die FCS-Analyse durch das wässrige Medium hindurch erfolgt, war es notwendig, den geschlossenen Teflontrog mit Hilfe eines Loches (welches mit einem Deckglas abgedeckt ist) zu modifizieren, sodass das Objektiv nahe an die Monoschicht heran positioniert werden konnte.

Bei einer Langmuir-Filmwaage mit geschossenem Trog lassen sich die Monoschichten gleichmäßig präparieren, d.h. die Moleküle, die die Monoschicht bilden sollen, können an jeder Stelle gespreitet werden. Im Falle der modifizierten Filmwaage ist dies nicht möglich. Da bei der angewendeten konfokalen Mikroskopie durch das Medium hindurch beobachtet wird, definiert sich die Subphasenhöhe über dem Objektiv durch dessen Arbeitsabstand, der in der Regel nur einige 100 μm groß ist. Bei einer so dünnen Subphase würde diese zerreißen sobald ein Tropfen über dem Deckglas gespreitet wird. Somit ist das Präparieren der Monoschicht nur neben dem Deckglas bei größerer Subphasenhöhe möglich. Auch die Insertion von Molekülen in die Subphase und deren

Gleichverteilung ist bei Filmwaagen mit tieferen Subphasen einfacher zu realisieren. In diesem Fall ist die Subphase so hoch, dass mit kleinen Magnetkugeln oder Rührstäbchen (Durchmesser 1-2 mm) die injizierten Moleküle gut verteilt werden können. Im Falle der modifizierten Filmwaage ist dies aufgrund der schmalen Subphase und der Tatsache, dass an der Stelle des Objektivs kein Rührmotor angebracht werden kann, nur neben diesem möglich. Verteilungsversuche (5.6.2, Abbildung 41) haben dabei bestätigt, dass eine gleichmäßige Verteilung von injizierten Molekülen auch in Zeiträumen von 6 h ohne Rühren nicht möglich ist. Experimente, bei denen eine Korrelation von FCS-Daten mit Parametern der Filmwaage von Interesse sind (z.B. Diffusionskoeffizienten in Abhängigkeit vom Oberflächendruck, Teilchenzahlen und damit verbundene Bindungsraten in Abhängigkeit vom Oberflächendruck) setzen allerdings eine Gleichverteilung voraus. Aus diesem Grund ist es notwendig, die Insertionsexperimente neben dem Objektiv durchzuführen und anschließend die Monoschicht über das Objektiv zu bewegen, ohne dass sich dieser verändert. Der in [72] beschriebene Teflonring zur Reduktion von Oberflächenschwingungen wirkt dabei als ein zusätzliches Hindernis. Hinzugefügt, um Oberflächenvibrationen zu reduzieren, stellt er für die Verteilung der Moleküle in der Subphase und in der Monoschicht eine zusätzliche Barriere dar und bildet mit der wässrigen Subphase einen Meniskus zum Deckglas hin. Dies kann möglicherweise dazu führen, dass oberflächenaktive Substanzen bei hohen Drücken an diesen Stellen aus der Grenzschicht entweichen. Aus diesen Gründen wird auf den Teflonring verzichtet, auch wenn dies eine mögliche stärkere Schwingung der Oberfläche (z.B. durch Pumpen in Kühlkreisläufen) zur Folge haben kann. Je nachdem ob diese die Auswertung der FCS-Daten beeinflusst, ist es beispielsweise möglich sie durch Fourier Transformation und Frequenzfilter zu eliminieren [105, 106, 107]. Dazu bieten kommerzielle Analyseprogramme (z.B. MATLAB) eigene *fft*-Algorithmen an (*fast fourier transformation*), durch die die zeitbasierte Korrelationskurve in eine frequenzbasierte Korrelationskurve umgewandelt werden kann. Gleiches ist mit der FCS-Modellfunktion (Gleichung [13]) möglich, sodass eine Anpassung der *Fourier*-transformierten Korrelationsdaten mit einer *Fourier*-transformierten FCS-Modellfunktion möglich ist.

Für die Analyse von Protein-Monoschicht-Interaktionen in Abhängigkeit verschiedener Oberflächendrücke muss zudem sichergestellt sein, dass isotherme Bedingungen gegeben sind. Dies ist auch im Hinblick auf eine mögliche Verschiebung der Monoschicht im Rahmen von Insertionsexperimenten notwendig. Bei Filmwaagen mit geschlossenem Teflontrog wird dies durch einen Kühlkreislauf realisiert. Im Falle des kombinierten Setups ergibt sich die Komplikation, dass das Laser-Scanning-Mikroskop selbst eine starke Wärmequelle darstellt und sich die dünne Subphase über dem Objektiv stärker erwärmt als an anderen Stellen. Vergleichende Temperaturmessungen innerhalb der Subphase bei einer Trogtemperatur von 22 °C an verschiedenen Punkten zeigten eine Temperaturspanne von 22 °C (Randbereiche) bis 25 °C (direkt über dem Objektiv). Da gemäß Gleichung [19] die Oberflächenspannung und damit auch der Oberflächendruck bei konstanter Temperatur definiert ist, folgt, dass eine Monoschicht, welche in den Randbereichen präpariert wird, einen anderen Oberflächendruck aufweist, als über dem Objektiv selbst. Dies wiederum kann zu anderen dynamischen Parametern (z.B. Diffusionskoeffizienten) und Molekülflächen führen. Durch Hinzufügen eines zweiten Kühlkreislaufes um das Objektiv selbst (4,5 °C) war es jedoch möglich, die Temperatur im gesamten Trog auf eine maximale Differenz von 0,3 K zu reduzieren (Anhang 13.4.1, Abbildung 66). Einen Grund für diese extrem niedrige Temperatur, mit der das Objektiv gegengekühlt wurde, stellt letztlich die schlechte Wärmeleitung vom Kühlschlauch zum Objektiv dar. Dieses wurde aufgrund einer möglichen Beschädigung des Deckglases beim Fokussieren durch das Objektiv (und dem damit verbundenen Auslaufen des Langmuirtroges) mit einem Wasserschutz in Form einer Gummimanschette versehen. Um den Wasserschutz herum war die Kühlung angebracht

worden, da ein direktes Umwickeln des Objektivs u. U. dazu geführt hätte, dass Kondensationswasser in das Mikroskop gelangt wäre.

Neben der konstanten Temperatur ist die waagerechte Positionierung der Filmwaage für Experimente, bei denen die Monoschicht an verschiedenen Stellen vermessen werden soll, essentiell. Wie unter 3.3.2 ff. erläutert führt eine nicht waagrecht ausgerichtete Filmwaage zu einer Veränderung des gemessenen Oberflächendrucks. Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wird die Filmwaage, die über eine eigene Stativvorrichtung fest mit dem Mikroskop verschraubt ist wie eine Art Wasserwaage verwendet. Da der Druckaufnehmer zwar beweglich ist, aber in einem konstanten Abstand an die Barriere B fixiert wurde, war es möglich, die Änderung des Oberflächendruckes während der Bewegung des Druckaufnehmers zu messen. Ist dieser über den Bereich der gesamten Bewegung konstant, ist die Filmwaage bezüglich dieser Bewegungsrichtung waagrecht.

Für die FCS-Messungen in wässrigen Systemen wird ein Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Da die Filmwaage während einer Experimentierserie zwischen den Versuchen nicht abgebaut wird, weil sie im Anschluss erneut kalibriert werden müsste, ist Wasser als Immersionsmedium ungeeignet, da es nach ca. 2 h verdunstet. Um dieses Problem zu umgehen, existieren Immersionsmedien, mit einem vergleichbaren Brechungsindex wie der von Wasser. Allerdings haben sie einen ölartigen Charakter, sodass das Immersionsmedium auch nach zwei Wochen noch vorhanden ist. Im Vergleich zum Immersionswasser führte Immersol W allerdings dazu, dass sich die Z-Positionen der Maxima der *Peak*-förmigen Fluktuationskurven verschiedener Anregungswellenlängen in Abhängigkeit der Z-Position des Objektivs zueinander veränderten. Interessanterweise war zu beobachten, dass sich die Verschiebung der Maxima der jeweiligen Fluktuationskurven zueinander in Abhängigkeit der Z-Position des Objektivs zum Deckglas der Filmwaage so veränderte, dass eine Objektiv-Position erreicht wurde, bei der beide Fluktuationskurven deckungsgleich aufeinanderliegen. Bezogen auf die *Peak*-Form des einzelnen Fokus hat sich in Abhängigkeit der Z-Position des Objektivs (und damit auch des konfokalen Volumens) gezeigt, dass die Halbwertsbreite der *Peak*-förmigen Fluktuationskurve im gesamten Messbereich konstant blieb (unabhängig von der verwendeten Anregungswellenlänge von 488 nm oder 633 nm). Auch N und τ_D blieben in Abhängigkeit von der Z-Position des Objektivs konstant. Zusammengefasst bedeutet dies, dass der ideale Z-Überlapp nur im Falle von Zweifarben Kreuzkorrelationsexperimenten (z.B. Protein-Lipid-Interaktion oder Protein-Protein-Interaktion, bei denen die Komponenten unterschiedlich gefärbt sind), von Bedeutung ist [108]. Bei Messungen, in denen die Farbkanäle separat analysiert werden (Autokorrelation), ist aufgrund der hohen Robustheit der FCS-Parameter N und τ_D sowie der Z-Ausdehnung des konfokalen Volumens über einen weiten Bereich der Objektivposition eine exakte Positionierung mit idealem Z-Überlapp nicht zwingend erforderlich.

Wie in [70] erläutert, beschreiben N und τ_D im Rahmen der Z-Scan-Analyse einen parabolischen Verlauf, wenn sie gegen die Migrationszeit aufgetragen werden. Dies ist allerdings nur der Fall, wenn die Wandergeschwindigkeit als konstant angenommen werden kann. Andernfalls ist von einer Verzerrung in X-Richtung (Zeitachse) auszugehen. Da im Rahmen der Experimentierzeit (die u. U. auch 24 h betragen kann) stetig Subphase verdunstet, muss diese kontinuierlich, in Abhängigkeit der Wandergeschwindigkeit, hinzugefügt werden. Voraussetzung dafür ist allerdings eine konstante Verdunstungsrate. Die Ergebnisse zur Bestimmung der Wandergeschwindigkeit der Monoschicht durch den Fokus zeigen 1 h nach dessen Präparation (als Startzeitpunkt gilt das Beenden des Spreitens) einen linearen Verlauf in Abhängigkeit von der Objektivposition. Die dabei gemessenen *Peak*-artigen Fluktuationskurven wiesen einen symmetrischen Charakter auf, ohne nachweisbare Verzerrung auf der Zeitachse. Somit ist eine parabolische Anpassung der Teilchenzahlen bzw.

Diffusionszeiten möglich.

Da wie eingangs erwähnt die Subphase über dem Objektiv nicht gerührt werden kann, ist es notwendig, die Monoschicht über das Objektiv zu bewegen. Das setzt wiederum voraus, dass dieser hinreichend stabil ist und während der Bewegung nicht kollabiert. Diesbezüglich wurde N und τ_D nach mehreren Bewegungen bestimmt und miteinander verglichen. Dabei zeigt die MMM-Monoschicht bei einem Oberflächendruck von 30 mN m^{-1} auch nach dreimaligem Verschieben ein annähernd konstantes N sowie τ_D . Allerdings verringerte sich die Gesamtfläche bei jedem Bewegungsvorgang, was zeigt, dass die Monoschicht bei der Verschiebung in gewisser Weise auch kollabiert bzw. in die Subphase abtaucht. Da die FCS-Parameter N und τ_D keiner großen Änderung unterliegen ist dies ein Hinweis darauf, dass sich das Mischungsverhältnis der Lipide nicht oder nur sehr gering verändert hat. Dennoch ist eine MMM-Monoschicht bei $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ hinreichend stabil, um mehrfach über das Objektiv und zurück bewegt zu werden, was die Voraussetzung für die Analyse von Protein-Monoschicht-Interaktionen mit diesem System darstellt.

Bei FCS-Messungen an Monoschichten ist es ebenfalls notwendig, diese unter Bedingungen durchzuführen, bei denen die zu untersuchenden Fluorophore nicht durch das Anregungslicht gebleicht werden. Derartige Effekte haben wie in 3.2.1 ff. dargelegt einen Einfluss auf die Fluoreszenz des Fluorophors. Ist dieser Effekt schneller als τ_D , so führt er zu einem stärkeren Abschwächen der Fluktuationssignale, was zu einer Asymmetrie in der *Peak*-förmigen Fluktuationsskurve führen kann, sowie zu einer Abnahme von N und τ_D , da die Fluorophore bereits vor dem Verlassen des konfokalen Volumens erlöschen. Wie hoch die Wahrscheinlichkeit des Bleichens durch das Anregungslicht auf den Fluorophor ist, hängt unter anderem auch von dessen Verweildauer im Anregungsvolumen ab. Bei dreidimensionalen Messungen ist diese letztlich nur vom Diffusionskoeffizienten des jeweiligen Fluorophors abhängig, wohingegen bei Z-Scan-FCS-Analysen neben der Diffusion innerhalb der planaren Schicht auch deren Wandergeschwindigkeit durch den Fokus einen Einfluss hat. Es ist demnach für jedes System im Vorfeld der Analysen zu prüfen, inwieweit die durch die Pumprate bedingte Wandergeschwindigkeit der Monoschicht durch den Fokus, der Diffusionskoeffizient des Fluorophors (bedingt durch den Oberflächendruck der Monoschicht) sowie die eigentliche Laserleistung und Anregungswellenlänge ein Bleichen bewirken. Wichtig dabei ist, dass die Wandergeschwindigkeit der Monoschicht letztlich an den Diffusionskoeffizienten des fluoreszierenden Moleküls angepasst werden muss, um im Rahmen der Z-Scan-FCS-Auswertung ausreichend viele geeignet lange Segmente zu generieren. Für das verwendete System zur Analyse der Insertion von Sar1p mit MMM Monoschichten wurde das Bleichverhalten bei 488 nm Anregungswellenlänge untersucht (Licht mit der größeren Energie im Vergleich zu Licht der Wellenlänge von 633 nm). Dabei zeigte sich auch bei dem 10fachen der in den späteren Experimenten verwendeten Laserleistung kein Bleichen. Da sich weder N noch τ_D änderten, und auch die molekulare Helligkeit des Fluorophors bei den verwendeten Laserleistungen keine Sättigung oder Reduktion aufwies, ist bei der verwendeten Laserleistung (ca. $5 \mu\text{W}$) für die Insertionsexperimente von Sar1p_{SCCSAI488} ein Bleicheffekt eher unwahrscheinlich.

6.5.2 Grundprinzipien des Systemaufbaus und der Justage/Kalibrierung

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte System bedarf beim Aufbau folgender notwendiger Justageschritte und Kalibrierungen, die sich aus den untersuchten Systemparametern ableiten. Aufgrund technischer, baulicher und systemischer gegenseitiger Einflussnahme haben sich die nachfolgend beschriebenen Schritte in ihrer Reihenfolge als valide herausgestellt.

Vor dem Aufbau des kombinierten Setups ist es notwendig, wenn das System auf einem Druckluft gefederten Tisch positioniert ist, diesen komplett zu entlasten. Anschließend wird der

Probentisch vom Mikroskop entfernt und das optische System kalibriert, indem der Korrekturring des Objektivs (LD C-Apochromat 40x, NA 1,1) auf 1,7 (Standardeinstellung für 150 µm dicke Deckgläser) eingestellt wird und das *pinhole* durch das System gemäß den Angaben aus 4.2.6.1 kalibriert wird. Anschließend erfolgt die Installation des *Aquastop* inklusive des Objektivkühlkreislaufes. Darauffolgend wird die Filmwaage mit ihrem Stativ am Mikroskop montiert und das Objektiv zuvor in seine niedrigste Z-Position bewegt. Die Filmwaage wird ebenfalls an einen Kühlkreislauf angeschlossen und gemäß 4.2.6.2 gereinigt. Anschließend erfolgt die Kalibrierung des Druckaufnehmers gemäß den Angaben des Herstellers. Da bei der Messung Plättchen mit geringerem Umfang verwendet wurden, war dieser bei der Kalibrierung des Wilhelmyplättchens entsprechend zu bestimmen und im System (gemäß des Herstellers) zu hinterlegen.

Um nun die Filmwaage waagrecht auszurichten wird sie mit Wasser gefüllt und der Druckaufnehmer mit einem Wilhelmy-Plättchen präpariert. Ist das zu messende Drucksignal konstant, so wird die Oberfläche noch einmal gesäubert (4.2.6.3) und die Fläche mit der Barriere A (Abbildung 16) komprimiert. Ergeben sich Druckänderungen, muss die Oberfläche erneut gesäubert werden. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis kein messbarer Druckanstieg beobachtet werden kann. Nun wird die Fläche durch die Barriere B (Abbildung 16) komprimiert. Auch in diesem Fall sollte keine Änderung des Drucksignals erfolgen. Ist dies der Fall, wird die Barriere wieder zurückbewegt und die Filmwaage ist bezüglich der Bewegungsrichtung für die spätere Filmbewegung waagrecht positioniert. Andernfalls muss mit Hilfe der Stellschrauben am Stativ nachjustiert und die oben beschriebene Messung so oft wiederholt werden, bis auch hier keine Änderung des Drucks zu beobachten ist (nach 2-3 Untersuchungsrounden sollte erneut getestet werden, inwieweit die Oberfläche noch frei von Verunreinigungen ist). Ist die Ausrichtung vollzogen, so wird die Montage abgeschlossen, indem die Inkubatorbox auf das Mikroskop gesetzt und das Pumpsystem zur Verdunstungskorrektur installiert wird. Abschließend wird die Inkubatorbox lasersicher abgedeckt.

Nachdem das Messsetup installiert wurde, erfolgt die Bestimmung der Z-Position, bei der der Z-Überlapp von zwei Foki unterschiedlicher Anregungswellenlängen identisch ist. Dazu wird das Objektiv langsam nach oben bewegt, bis das Immersionsmedium das Deckglas berührt. Bei eingeschaltetem Laser wird nun das Streusignal (mit den Filtern des Fluoreszenzsetups, um die Detektoren nicht zu schädigen) gemessen. In dem Moment, wo das konfokale Volumen von unten in das Deckglas eintaucht und dieses wieder verlässt, wird dies durch eine Zunahme des Messsignals registriert. Das Objektiv wird nun 450 µm über diese obere Deckglaskante positioniert. Um nun die ideale Z-Position zu ermitteln, wird eine gefärbte Monoschicht präpariert (ca. $5 \cdot 10^{-3}$ mol % Fluorophor, π : 20-30 mN m⁻¹) und unterhalb des Fokus positioniert. Das Objektiv wird dabei nicht bewegt. Befindet sich die Monoschicht unterhalb des Objektivs, wird diese kontinuierlich durch langsames Hineinpumpen nach oben bewegt. Dabei werden die Fluktuationssignale gemessen und der jeweilige zeitliche Versatz ermittelt, indem diese durch eine Lorentzkurve angenähert und die jeweiligen Maxima bestimmt werden. Befindet sich die Monoschicht oberhalb des Fokus, so wird dieser in konstanten Anständen (10 µm) nach oben bewegt, und bei jeder Position erneut die Fluktuation gemessen, wenn sich die Monoschicht durch Pumpen durch den Fokus bewegt. Es ist darauf zu achten, dass bei einer Position ab 630-650 µm über der Deckglasoberkante die Gefahr besteht, dass das Deckglas zerbrechen kann. Anhand der somit gewonnenen Daten lässt sich wie in 5.6.4 dargestellt die Position ermitteln, in der beide Foki ideal überlappen. Abschließend wird noch die Pumprate ermittelt, mit der gegen die Verdunstung der Subphase korrigiert werden soll. Dazu wird das Objektiv ca. 600 µm über die Position bewegt, bei der die Streusignale der Deckglasoberkante gemessen wurden. Die Positionierung der Monoschicht erfolgt darüber, sodass sich das konfokale Volumen innerhalb der Subphase befindet. Anschließend wird die Pumpe

abgestellt, und die Monoschicht bewegt sich einzig durch Verdunstung durch den Fokus. Anschließend wird das Objektiv um 10 μm nach unten bewegt und erneut die Fluktuationskurve aufgenommen. Dieser Vorgang wird einige Male wiederholt. Durch Auftragen der Z-Position des Objektivs gegen die zeitliche Position des Maximums der jeweiligen Signalkurve (Tageszeit des Maximums / s, durch Anpassung der Fluktuationsdaten mit einer Lorentzfunktion) lässt sich aus dem Anstieg dieser linearen Funktion die Wandergeschwindigkeit ermitteln. Mit Hilfe der Subphasenoberfläche kann diese in eine Verdunstungsrate (z.B. $\mu\text{l/h}$) umgerechnet werden. Die Pumpe wird nun so eingestellt, dass die Förderrate etwas größer ist, als die Verdunstungsrate, um zu verhindern, dass die Monoschicht bei sehr langen Experimenten zu nahe an die Deckglasoberfläche gelangt und die Oberfläche dadurch zerreißt.

6.6 Interaktion von Sar1p mit Phospholipid-Monoschichten

6.6.1 Bindung und Insertion in Gegenwart verschiedener Lipidsysteme

Für die Untersuchung von Proteinen, die nur in einer Schicht einer Membran inserieren oder auch nur an diese binden, ohne in sie einzudringen, sind Untersuchungen mit Langmuir-Filmwaagen eine verbreitete Technik, um Informationen über die Interaktionsprozesse und deren Rahmenbedingungen zu erhalten [109, 110, 111]. Sie bietet dabei den Vorteil, Eigenschaften der Grenzschicht (z.B. Packungsdichte von Lipiden in einer Phospholipidmonoschicht) gezielt zu beeinflussen und somit Effekte auf das Verhalten der Interaktion von Molekülen (z.B. Proteinen) und der Grenzschicht zu untersuchen. Nachteilig ist diese Technik allerdings dahingehend, dass nur globale Parameter wie die Änderungen in der gesamten Oberfläche oder Änderungen des Oberflächendrucks, untersucht werden können. Weiterhin ist die Messgenauigkeit und die Auflösung bei Oberflächendrücken im Bereich des maximalen Einbaudruckes (MIP) gering, sodass diese, für das inserierende Molekül charakteristische Größe durch lineare Extrapolation ermittelt wird [44; 112]. Auch ist nicht bekannt, wie viele Moleküle in welcher Form (Monomer, Dimer) mit der Grenzschicht interagieren.

Nach [44] wurde ein MIP von Sar1p in Gegenwart von MMM-Monoschichten im Bereich von ca. 30 mN m^{-1} extrapoliert. Untersuchungen der Insertion von Sar1p_{SCCSAI488} (5.7.1) ergaben, dass ca. 100 Sar1p Moleküle in die Monoschicht inseriert sind, was belegt, dass bei diesen 30 mN m^{-1} tatsächlich ein Einbau von Sar1p erfolgt. Da bei der vergleichenden Analyse von Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} sowohl bei der enzymatischen Aktivität als auch bei der Fähigkeit, tubuläre Strukturen zu erzeugen, einige Unterschiede deutlich wurden, ist zu prüfen, ob auch in diesem Fall ein Unterschied bei der jeweiligen Insertion der beiden Enzyme vorhanden ist.

Als Vergleichsparameter wurde die molekulare Interaktionsfläche beider Proteine herangezogen, indem diese für Sar1p_{SCCSAI488} und Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} ermittelt wurde. Dabei wiesen sowohl Sar1p_{SCCSAI488} ($6,5 \text{ nm}^2/\text{Molekül}$) als auch die Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} ($(6,6 \pm 3,2) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$) vergleichbar große Insertionsflächen auf. Die Ergebnisse, die mit Sar1p_{SCCSAI488} ermittelt wurden, können somit auch auf Sar1p übertragen werden. Auf Basis der Dimension von ΔNSar1p (Variante von Sar1p ohne die N-terminale amphipathische α -Helix, vermessen aus der Röntgenkristallstruktur, *pdb-file*: 1M2O) ergibt sich eine theoretische Interaktionsfläche von $14,5 \text{ nm}^2$ wenn das Protein in vollem Umfang in die Monoschicht inseriert. Wird hingegen nur die N-terminale amphipathische α -Helix in die Monoschicht inseriert, ergibt sich im Rahmen einer einfachen Modellannahme (Abbildung 49) eine molekulare Interaktionsfläche in der Größenordnung von $3,3 \text{ nm}^2$. Somit belegen die bisherigen Daten, dass sich Sar1p_{SCCSAI488} mit seiner Helix und einem kleinen Teil des Proteinrumpfes in die Monoschicht einbettet, aber nicht als

gesamtes Protein. Gleiches gilt auch für die Mischung aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488}. Die Möglichkeit

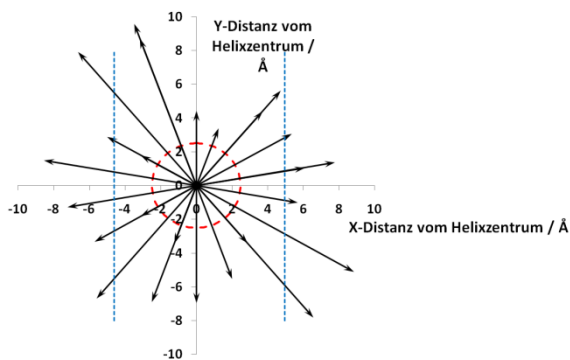


Abbildung 49 Schematische Darstellung der N-terminalen α -Helix von Sar1p. Dabei stellt --- den Kern der Helix und \rightarrow die Distanz der jeweiligen Aminosäurereste in ihrer maximalen Länge vom Mittelpunkt der Helix dar (bestimmt durch Vermessung mittels Pymol). Ausgehend von der Geometrie einer α -Helix (3,6 Aminosäuren/360°, 5,4 Å Ganghöhe und 2,5 Å Radius) besitzt die α -Helix bei 23 Aminosäuren eine Länge von 34,5 Å. Bezogen auf den jeweiligen Mittelwert der Abstände der Aminosäurereste (auf die x-Achse projiziert) nach links (4,6 Å) bzw. rechts (5,0 Å) (---) ergibt sich ein Abstand von 9,6 Å. Aus dieser Spannweite und der Helixlänge lässt sich eine Helixfläche von 3,31 nm² berechnen. (die Helix wurde dabei so positioniert, dass die meisten hydrophoben Aminosäurereste nach unten zeigen)

der Verwendung von Sar1p bietet zudem die Möglichkeit, größere Mengen an Protein einzusetzen um Änderungen in den weniger sensitiven Messparametern der Filmwaage (A_0 und π) zu verstärken und gleichzeitig die Auswertbarkeit der hochsensitiven FCS-Technik bei einer nicht zu großen Teilchenzahl im Fokus zu gewährleisten.

Auch beim Vergleich verschiedener Lipidsysteme führten die zusätzlichen Mess- und Analyseparameter der FCS-Methode (N und τ_D) zu weiteren Informationen, die die Filmwaage allein nicht aufschlüsseln konnte. So ergab die Mischung von Sar1p_{SCCSAI488} und Sar1p nach Insertion in eine DLPC/DLPS-Monoschicht bei $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ eine globale Flächenänderung von 0,64 cm² bis 2,43 cm². Dieser Bereich unterschied sich dabei wenig von der Flächenänderung, die in Gegenwart der MMM-Monoschicht (0,98 cm² bis 2,17 cm²) gemessen wurde. Diese Parameter ohne weitere Daten ließen den Schluss zu, dass die eingesetzte Sar1p-Präparation (Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488}) in beiden Monoschichten aufgrund der vergleichbaren gesamten Flächenänderung auch mit der gleichen molekularen Fläche inserieren bzw. eine vergleichbare Affinität zur jeweiligen Monoschicht zeigen würden. Untersuchungen mit einer Mischung aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} (1,16 % Anteil von Sar1p_{SCCSAI488}) zeigten dabei, dass die Anzahl der Proteine, die zur Flächenänderung in Gegenwart einer MMM-Monoschicht beitragen, das 5,8fache dessen ausmachten, was in Gegenwart einer DLPC/DLPS-Monoschicht bestimmt wurde. Dies belegt die höhere Affinität von Sar1p zur MMM-Monoschicht, welche eine Nachbildung der ER-Membran darstellt [48]. Weiterhin ergab sich aus diesen Messdaten eine molekulare Interaktionsfläche von Sar1p von $(17,8 \pm 6,3) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$, was, anders als bei der MMM-Monoschicht, darauf hinweist, dass sich das Protein komplett in diese einbettet und möglicherweise an der Luft/Puffer-Grenzfläche auch etwas entfaltet. Die Verwendung einer Langmuir-Filmwaage und eines konfokalen Mikroskops haben somit gezeigt, dass durch die Messparameter der Filmwaage (A_0) eine mögliche Vergleichbarkeit in der Interaktion von Sar1p mit einer MMM-Monoschicht und einer DLPC/DLPS-Monoschicht durch die zusätzlichen FCS-Parameter widerlegt wird.

Die Kalibrierung der Fokusfläche wurde hierbei durch Messungen von Fluorophoren in Wasser (Alexa₄₈₈-Hydrazid) bestimmt, indem die Autokorrelationskurve der Fluktuationsdaten mit einem dreidimensionalen Diffusionsmodell (Gleichung [12]) angepasst wurden. Gemäß Gleichung [6] ließ sich bei bekanntem Diffusionskoeffizienten die laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens (r_0) berechnen (237 nm). Diese Methode stellt eine gängige Art der Kalibrierung des optischen Setups dar, wie es z.B. auch in [72] verwendet wurde. Allerdings wurde in diesem Fall ein zweidimensionales Analysesystem mit einem dreidimensionalen kalibriert. Nach [113] ergab eine Fokuskalibrierung

durch *raster image correlation spectroscopy* (RICS) an einer gefärbten Monoschicht eine laterale Ausdehnung von $r_0 = 187$ nm. Bezogen auf diese Fokusdimension ergaben sich molekulare Interaktionsflächen im Falle des Einbaus von Sar1p (100 % Dotierungsgrad) von $4,05$ nm²/Molekül sowie $(4,1 \pm 2,0)$ nm²/Molekül (Mischung aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAl488}). Bezogen auf die theoretische Helixfläche zeigten diese Werte auch, dass Sar1p in MMM-Monoschichten bei $\pi = 30$ mN m⁻¹ nur mit dieser und nicht mit seinem gesamten Rumpf in die Monoschicht inseriert. Bezüglich der Insertionsexperimente mit DLPC/DLPS-Monoschichten ergab sich unter Voraussetzung eines r_0 von 187 nm eine molekulare Interaktionsfläche von $(11,1 \pm 3,9)$ nm²/ Molekül. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass das Sar1p-Molekül mit seinem Rumpf inseriert. In beiden Varianten der Fokuskalibrierung zeigte sich, dass Sar1p in Gegenwart der MMM-Monoschicht mit einer Fläche inseriert, die der Helixfläche zuzuordnen ist und im Falle des Lipidmixes aus DLPC/DLPS mit dem gesamten Proteinkörper. Im Falle der Auswertung unter Berücksichtigung der Fokuskalibrierung mit RICS (zweidimensionale Kalibrierung) liegen die ermittelten Werte in vergleichbaren Bereichen der molekularen Interaktionsfläche, wie sie in [113] angegeben sind (Insertion von Sar1p in MMM-Monoschicht: $(4,1 \pm 2,2)$ nm²/Molekül; und Insertion von Sar1p in DLPC/DPLS Monoschicht: $(11,4 \pm 3,6)$ nm² / Molekül).

6.6.2 Interaktionsanalyse mit zwei Farben

Die Auswertung der bislang experimentell ermittelten Daten zur Flächenänderung nach Insertion von Sar1p wurde in der Art und Weise durchgeführt, dass die Anfangsfläche mit dem Zeitpunkt der Zugabe des Proteins in die Subphase definiert wurde. Von da aus erfolgte die Bestimmung der Differenz zu der Fläche, bei der die FCS-Messungen durchgeführt wurden. Problematisch dabei war allerdings, dass die Filmwaageparameter A_0 und π , nicht mit Sicherheit konstant blieben, nachdem die Monoschicht auf die gewünschten Ausgangsbedingungen komprimiert wurde (siehe Anhang 13.5.6). Mit Hilfe von FCS-Analysen, in denen neben dem Protein auch die Monoschicht fluoreszenzmarkiert wurde, war der Trend, mit welchem sich diese während der Insertion verändert, ebenfalls mit zu verfolgen. So bleibt die gemessene Teilchenzahl der Lipidmoleküle bei der bisher angewendeten Art der Monoschichtuntersuchung (konstanter Druck durch Variation der Oberfläche) zu jedem Zeitpunkt gleich, da die Filmwaage die Veränderung des Oberflächendrucks (bedingt durch die Veränderung der an der Luft-Puffer-Grenzfläche vorhandenen Phospholipide) ausgleicht. Das heißt, dass eine MMM-Monoschicht bei $\pi = 30$ mN m⁻¹, die über einen längeren Zeitraum kontinuierlich Material verliert, durch die Filmwaage zu jedem Zeitpunkt auf die gleiche Lipiddichte gebracht wird, bis diese gänzlich verschwunden war. Im Falle der Insertion von zusätzlichen Molekülen (z.B. Proteinen) vergrößerte sich die Oberfläche der Monoschicht, was wiederum zu einer Verdünnung der fluoreszierenden Lipide führte. Basierend auf dieser Differenz war es ebenfalls möglich, die molekulare Interaktionsfläche zu berechnen (Gleichung [17]), die mit $(5,0 \pm 1,7)$ nm²/Molekül mit den Werten übereinstimmt, die bisher für Sar1p in MMM-Monoschichten ermittelt wurden. Dass diese Art der Auswertung mit der bisherigen Auswertungsstrategie vergleichbar ist, belegt die ermittelte molekulare Interaktionsfläche, die basierend auf der gemessenen Oberflächenänderung der Monoschicht bestimmt wurde ($(4,2 \pm 1,5)$ nm²/Molekül). Bezogen auf die Fehlerbreite der molekularen Interaktionsflächen konnten diese durch die Analyse mit zwei verschiedenen Farben auf ca. 30 % reduziert werden. Im Vergleich zu anderen Analysetechniken bietet diese Variante den Vorteil, dass die Monoschicht während der Analyse nicht zerstört wird, wie es in [114] der Fall ist. Außerdem sind Annahmen von konstanten Insertionsflächen über einen weiten Bereich verschiedener Oberflächendrücke [115, 116] nicht notwendig, da keine Extrapolation der Daten erfolgt. Diese werden bei jeder Bedingung

direkt erhoben und ausgewertet. Somit lassen sich sowohl zeitliche als auch lokale Unterschiede (z. B. Clusterbildung in bestimmten Regionen zu bestimmten Interaktionsphasen) analysieren, die für das Verständnis des Insertionsprozesses von Bedeutung sein können. Auch ist es für die Untersuchung nicht notwendig zu warten, bis der Prozess des Einbaus vollständig abgeschlossen ist, wie es bei der Auswertung von klassischen Filmwaageexperimenten der Fall ist. Die Dauer derartiger Experimente kann dadurch um einige Stunden verkürzt werden.

Wie in 6.6.1 bereits erläutert, wurde die laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens auf der Basis einer dreidimensionalen Diffusion eines Fluorophors (Alexa₄₈₈-Hydrazid) mit 237 nm bestimmt. Gemäß [113] ist es auch möglich, die Fokusdimension durch RICS-Analysen an zweidimensionalen Monoschichten zu berechnen (187 nm). Dabei ergaben sich molekulare Interaktionsflächen von $(3,1 \pm 1,0) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$, die, verglichen mit den Angaben aus [113] $(3,4 \pm 0,8) \text{ nm}^2/\text{Molekül}$, ähnliche Werte liefern.

7. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand, darin ein Messsystem zu etablieren und zu validieren, das es erlaubt, Interaktionen von Proteinen mit Phospholipid-Monoschichten auf Basis einzelmolekülsensitiver Techniken (FCS) zu untersuchen. Voraussetzung dafür war die Erweiterung der Kühlstrategie (Filmwaagetemperierung und Objektivkühlung), die innerhalb der Subphase an jeder Position zu annähernd konstanten Temperaturen führte. Auch das Problem der homogenen Verteilung von Molekülen in der Subphase wurde erfolgreich gelöst, indem neben dem Objektiv Magnetprüher installiert werden konnten, die es ermöglichten, dass sich sowohl die in der Subphase befindlichen Moleküle als auch die an der Monoschicht gebundenen gleichmäßig verteilen. Durch die Möglichkeit der Verschiebung der MMM-Monoschicht über das Objektiv, ohne dass diese kollabierte, war eine FCS Analyse an verschiedenen Punkten möglich. Dieses Prinzip ließ sich dabei ebenso gut bei Monoschichten mit Lipidkomponenten anwenden, deren Fettsäureketten aus ungesättigten Alkylketten bestehen als auch an einfachen Lipidsystemen aus DLPC/DPLS, deren Fettsäureketten aus gesättigten Alkylketten bestehen. Das Messsystem steht somit für eine Anwendung an Monoschichten verschiedener Zusammensetzungen zur Verfügung. Durch abschließende Installation eines Pumpsystems zur Variation des Füllstandes der Filmwaage ist es möglich, die Migrationsgeschwindigkeit der Monoschicht gezielt anzupassen, sodass auch bei langsamer diffundierenden Teilchen diese lang genug im Bereich der Äquatorialebene des konfokalen Volumens verweilen kann. Das somit entwickelte Messsystem ist dadurch geeignet auch Moleküle mit sehr kleinen Diffusionskoeffizienten, wie sie beispielsweise bei höheren Oberflächendrücken der Monoschicht entstehen, ohne Umbau zu analysieren. Auch Mehrfarbenexperimente (z.B. dcFCCS) und auf RICS basierende Techniken sind in einem breiten Rahmen möglich.

Als Untersuchungsobjekt im Rahmen der Systemetablierung sollte Sar1p dienen, weil es nur mit einer Membranschicht interagiert (3.1.3.1). Da die FCS-Techniken auf der Basis von Fluoreszenz beruhen, stellte die Modifizierung der kleinen GTPase ein erstes Problem dar, da es nicht möglich war, das natürlich vorkommende Cystein im Wildtyp-Protein möglichst vollständig unter Erhalt der biologischen Funktionalität mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren. Gelöst werden konnte dieses Problem durch erfolgreiche Generierung einer Variante, bei der das natürlich vorkommende Cystein an Position 171 durch ein Serin und das natürlich vorkommende Serin an Position 147 durch ein Cystein ausgetauscht wurde. Diese Variante konnte nach relativ kurzer Zeit (2 h) nahezu vollständig modifiziert werden.

Bezüglich der biologischen Funktionalität zeigte diese modifizierte Variante, dass sie vergleichbar mit dem Wildtyp in der Lage gewesen ist, in Gegenwart von GMP-PNP und den Hüllproteinen des COPII-Komplexes starre tubuläre Strukturen aus MMM-GUVs zu erzeugen. Zusätzlich wurde die GTP-Hydrolyse und deren Regulation vergleichend zum Wildtyp-Protein untersucht. Voraussetzung dafür war allerdings die Etablierung eines geeigneten Testverfahrens, welches im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls erfolgreich umgesetzt wurde. Dabei konnte bestätigt werden, dass sich die modifizierte Variante von Sar1p und der Wildtyp in Gegenwart der inneren Hüllproteine und MMM-Liposomen auf vergleichbare Umsatzraten stimulieren ließen. Bezüglich der Interaktion mit dem äußeren Hüllkomplex (Sec13/31p) wurden jedoch leichte Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp sichtbar. So wies die Variante neben einer niedrigeren Stimulation der GTPase-Aktivität auch eine ungleichmäßigere Morphologie der äußeren COPII-Hülle um die tubulären Strukturen an MMM-GUVs auf. Im Hinblick auf die Monoschichtinteraktion konnte

allerdings gezeigt werden, dass die molekularen Interaktionsflächen von Sar1p_{SCCSAI488} (100 %) und einer Mischung aus Wildtyp-Protein und einem kleinen Anteil von Sar1p_{SCCSAI488} (0,8 % bis 2,7 %) nahezu identisch waren, was belegt, dass das Sar1p_{SCCSAI488} in vergleichbarer Geometrie mit der Monoschicht interagiert, wie es auch beim Wildtyp der Fall ist. Die generierte Sar1p_{SCCSAI488} stellt somit ein funktionierendes Testobjekt dar, um die Interaktion mit Monoschichten und der inneren Hüllproteine des COPII-Komplexes auf Basis von Fluoreszenztechniken zu untersuchen.

In ersten Insertionsexperimenten von Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} an MMM- und DLPC/DPLS-Monoschichten bei $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ wurde gezeigt, dass sich die globalen Flächenänderungen in beiden Fällen ähnelten. Durch die zusätzliche Bestimmung der inserierten Moleküle konnte gezeigt werden, dass sich allerdings die Art und Weise, wie Sar1p mit MMM-Monoschichten einerseits und DLPC/DLPS-Monoschichten andererseits interagiert, unterschied. So ergaben die ermittelten Daten, dass die GTPase vorrangig mit der N-terminalen amphipathischen α -Helix in die MMM-Monoschicht inseriert, wohingegen sich bei einer DLPC/DLPS-Monoschicht das gesamte Protein einbettet.

8. Summary

Aim of this thesis was to establish and validate a measurement system that allows to investigate interactions of proteins with phospholipid monolayers on the basis of single molecule sensitive techniques (FCS). Prerequisite for this was the extension of the cooling strategy (film balance temperature control and lens cooling) which led to almost constant temperatures at every position within the subphase. The problem of the homogeneous distribution of molecules in the subphase was also successfully solved by installing several magnetic stirrers next to the objective which made it possible for both the molecules in the subphase and those bound to the monolayer to be equally distributed. The possibility of moving the MMM monolayer over the lens without its collapsing made it possible to carry out an FCS analysis at various points. This principle could be applied well to monolayers with lipid components whose fatty acid chains consist of unsaturated alkyl chains as well as to simple lipid systems made of DLPC/DPLS whose fatty acid chains consist of saturated alkyl chains. Thus the measuring system is available for the use on monolayers of different compositions. By final installing of a pump system to vary the level of the film balance it is possible to adjust the migration speed of the monolayer in a precisely targeted manner so that even with slower diffusing particles it can linger long enough in the area of the equatorial plane of the confocal volume. The measuring system developed in this way is therefore also suitable for analyzing molecules with very low diffusion coefficients as those that arise at higher surface pressures of the monolayer without any modification. Multicolor experiments (e.g. dcFCCS) and techniques based on RICS are also possible within a wide range.

Sar1p should serve as the object of investigation in the context of system establishment because it only interacts with one membrane layer (3.1.3.1). Since the FCS techniques are based on fluorescence the modification of the small GTPase proved to be a first problem. It was not possible to mark the naturally occurring cysteine in the wild-type protein as completely as possible during the maintenance of the biological functionality with a fluorescent dye. This problem could be solved by successfully generating a variant in which the naturally occurring cysteine at position 171 was exchanged for a serine and the naturally occurring serine at position 147 was exchanged for a cysteine. This variant could be modified almost completely after a relative short time (2 h).

With regard to the biological functionality this modified variant showed that comparable to the wild type it was able to generate rigid tubular structures from MMM GUVs in the presence of GMP-PNP and the coat proteins of the COPII complex. In addition, GTP hydrolysis and its regulation were compared to the wild type protein. The prerequisite for this was the establishment of a suitable test procedure which was also successfully implemented in this thesis. It could be confirmed that the modified variant of Sar1p and the wild type can be stimulated to comparable turnover rates in the presence of the inner envelope proteins and MMM liposomes. With regard to the interaction with the outer envelope complex (Sec13/31p) slight differences compared to the wild type were visible. In addition to a lower level of stimulation of GTPase activity the variant also had a more irregular morphology of the outer COPII envelope around the tubular structures on MMM GUVs. With regard to the monolayer interaction it could be shown that the molecular interaction surfaces of the Sar1p_{SCCSAI488} (100 %) and a mixture of wild type protein and a small proportion of the Sar1p_{SCCSAI488} (0.8 % to 2.7 %) were almost identical which proves that the Sar1p_{SCCSAI488} interacts with the monolayer and with the wild type in a similar geometry. The generated Sar1p_{SCCSAI488} thus represents a functioning test object to investigate the interaction with monolayers and the inner coat proteins of the COPII complex on the basis of fluorescence techniques.

In first insertion experiments of mixtures of Sar1p and Sar1p_{SCCSA1488} on MMM and DLPC/DPLS monolayers at $\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$ it was shown that the global changes in area were similar in both cases. However, by additional determining of the inserted molecules it could be shown that the way in which Sar1p interacts with MMM-monolayers and DLPC/DLPS monolayers was different. The determined data showed that the GTPase primarily inserts into the monolayer with the N-terminal amphipathic α -helix whereas in a DLPC/DLPS monolayer the entire protein is embedded in this.

9. Ausblick

Durch die Etablierung des Messsystems aus einer Langmuir-Filmwaage und einem konfokalen Mikroskop ist die Voraussetzung geschaffen worden, einzelmolekülsensitive Analysen an Monoschichten durchzuführen. Aufgrund des verwendeten Designs der Langmuir-Filmwaage sind Untersuchungen von Domänenbildungen in Abhängigkeit des Oberflächendrucks ebenso denkbar, wie die Aufklärung von dynamischen Aspekten (z.B. Diffusionszeiten). Auch bietet die Variante der Analyse mittels zweier Farben die Möglichkeit, die Interaktion von markierten Proteinen und Lipiden oder Protein-Protein-Interaktionen durch *dual color fluorescence cross correlation spectroscopy* (dcFCCS) zu untersuchen und ggf. gezielt Bindungsereignisse und deren Lebensdauer zu analysieren, ohne das Oberflächenkrümmungen (z.B. in Gegenwart von SUVs) oder Membrandeformationen (z.B. durch Tubulierung von GUVs) die Bindung beeinflussen.

10.Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Kirsten Bacia für die Möglichkeit diese herausfordernde und spannende Arbeit in ihrer Gruppe anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, die freundliche Unterstützung, sowie die hilfreichen Diskussionen, Ratschläge und für die Bereitschaft bedanken, dieses Promotionsvorhaben auch nach meiner aktiven Zeit an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg weiterhin zu betreuen.

Bei Herrn Prof. Dr. Ch. G. Hübner möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, das Zweitgutachten zu erstellen.

Herrn Prof. A. Blume danke ich für die vielen Diskussionen und nützlichen Hinweise bezüglich der Filmwaageexperimente.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Sebastian Daum für das Bereitstellen der gereinigten Sec-Proteine, die Hilfestellung im Bereich der molekularbiologischen, proteinchemischen und enzymatischen Experimente sowie für die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse.

Frau Dr. Annette Meister danke ich für die Unterstützung und Hilfestellung beim Aufbau der Filmwaage. Weiterhin gilt mein Dank für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Gerd Hause.

Herrn Dr. Uwe Kühn möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der GTPase-Versuche mit radioaktivmarkierten Nukleotiden danken.

Jan Ebenhan danke ich für die zahlreichen Diskussionen und Hilfestellungen bezüglich der mathematischen, physikalischen und statistischen Fragestellungen, die sich im Laufe der Arbeit ergaben. Auch für die Unterstützung im Rahmen der Programmierung bin ich Ihm sehr dankbar.

Stefan Werner, Mona Grimmer und Daniela Krüger danke ich für die vielen und aufschlussreichen Diskussionen und Unterstützungen im Laboralltag.

Claudia Müller möchte ich für die Bereitstellung der gelantinebeschichteten Deckgläser, der Unterstützung beim Malachitgrün-basierten GTPase-Test sowie für ihre Organisation des gesamten Laboralltages danken.

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.

Der Graduiertenförderung des Landes Sachsen Anhalt, dem GRK1026 sowie der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg danke ich für die finanzielle Unterstützung

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern und ganz besonders meiner Frau Andrea aussprechen. Ohne ihren Rückhalt, ihr Verständnis und die aufopferungsvolle Unterstützung hinsichtlich der Kinderbetreuung und des Berufsaltages wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Des Weiteren versichere ich, dass ich zu keinem anderen Zeitpunkt versucht habe, diese Dissertation einzureichen, der Prüfungsbehörde einer anderen Hochschule vorzulegen bzw. mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Jan Auerswald

Halle (Saale), den 09.10.2020

12. Literaturverzeichnis

- 1 W. K. Purves, D. Sadava, G. H. Orians and H. C. Heller; *Biologie*; 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag; 2006
- 2 B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter; *Molecular Biology of the cell*; 5th edition, Garland Science; 2008
- 3 M. G. Hanna, I. Mela, L. Wang, R. M. Henderson, E. R. Chapman, J. M. Edwardson and A. Audhya; Sar1 GTPase Activity Is Regulated by Membrane Curvature; *J. Biol. Chem.* 291(3):1014-1027; 2015
- 4 K. Bacia, E. Futai, S. Prinz, A. Meister, S. Daum, D. Glatte, J. A. G. Briggs and R. Schekman; Multibudded tubules formed by COPII on artificial liposomes; *Sci. Rep.*, 1:17; 2011
- 5 D. Krüger, J. Ebenhan and Kirsten Bacia; Measuring Protein Binding to Lipid Vesicles by Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy; *Biophys. J.*, 113(6):1311-1320; 2017
- 6 M. S. Khan, N. S. Dosoky, B. K. Berdiev and J. D. Williams; Electrochemical impedance spectroscopy for black lipid membranes fused with channel protein supported on solid-state nanopore; *Eur. Biophys. J.*, 45(8):843-852; 2016
- 7 G. A.-R. Ahmed, S. K. H. Khalil, W. El hotaby, L. Abbas, H. H.A. Sherif , E. A. Abdel-Rahman, S. H. Saber, M. Hassan, M. H. Hassan and S. S. Ali; ATR-IR and EPR spectroscopy for detecting the alterations in cortical synaptosomes induced by aluminium stress; *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 228:117535 ; 2020
- 8 P. Scholtyssek, Z. Li, J. Kressler and A. Blume; Interactions of DPPC with Semitelechelic Poly(glycerol methacrylate)s with Perfluoroalkyl End Groups; *Langmuir*, 28(44); 2012
- 9 A. Kerth; Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie an Lipid-, Peptid- und Flüssigkristall-Filmen an der Luft/Wasser-Grenzfläche; Dissertation, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg; 2003
- 10 B. Jones, E. L. Jones, S. A. Bonney, N. H. Patel, A. R. Mensenkamp, S. Eichenbaum-Voline, M. Rudling, U. Myrdal, G. Annesi, S. Naik, N. Meadows, A. Quattrone, S. A. Islam, R. P. Naoumova, B. Angelin, R. Infante, E. Levy, C. C. Roy, P. S. Freemont, J. Scott and C. C. Schoulders; Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders; *Nat. Genet.*, 34(1):29-31; 2003
- 11 T. Okada, M. Miyashita, J. Fukuhara, M. Sugitani, T. Ueno, M. Samson-Bouma and L. P. Aggerbeck; Anderson's disease/chylomicron retention disease in a Japanese patient with uniparental disomy 7 and a normal SAR1B gene product coding sequence; *Orphanet J. Rare Dis.*, 21(6):78; 2011
- 12 S. A. Boyadjiev, J. C. Fromme, J. Ben, S. S. Chong, C. Nauta, D. J. Hur, G. Zhang, S. Hamamoto, R. Schekman, M. Ravazzola, L. Orci and W. 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; 2006
- 13 P. F. Stouten, C. Sander, A. Wittinghofer and A. Valencia; How does the switch II region of G-domains work?; *FEBS Lett.*, 320(1):1-6; 1993
- 14 A. G. Gilman; G proteins: transducers of receptor-generated signals; *Ann. Rev. Biochem.*, 56:615-649; 1987
- 15 M. Rodbell; Nobel Lecture: Signal transduction: Evolution of an idea; *Biosci. Rep.*, 15(3): 117-133; 1995
- 16 K. Pierce, R. Premont, and R. Lefkowitz; Seven-transmembrane receptors; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3(9): 639-650; 2002
- 17 R. T. Batey, R. P. Rambo, L. Lucast, B. Rha and J. A. Doudna; Crystal Structure of the Ribonucleoprotein Core of the Signal Recognition Particle; *Science*, 287(5456):1232-1239; 2000
- 18 A. Parmeggiani and G. Sander; Properties and regulation of the GTPase activities of elongation factors Tu and G, and of initiation factor 2; *Mol. Cell. Biochem.*, 35(3):129-158; 1981
- 19 M. R. Gibbs and K. Fredrick; Roles of elusive translational GTPases come to light and inform on the process of ribosome biogenesis in bacteria; *Mol. Microbiol.*, 107(4): 445-454; 2018

- 20 S. Munemitsu, M. Innis, R. Clark, F. McCormick, A. Ullrich and P. Polakis; Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42; *Mol. Cell. Biol.*, 10(11):5977–82; 1990
- 21 E. Futai, S. Hamamoto, L. Ocric and R. Schekman; GTP/GDP exchange by Sec12p enables COPII vesicle bud formation on synthetic liposomes; *EMBO J.*, 23(21):4146-4155; 2004
- 22 Y. Takai, T. Sasaki and T. Matozaki; Small GTP-binding proteins; *Physiol. Rev.*, 81(1):153–208; 2001
- 23 E. J. Chenette and C. J. Der; Lipid Modification of Ras-Superfamily GTPases: Not Just Membrane Glue; *The Enzymes*, 29th Auflage, Kapitel 5; Elsevier Inc.; 2011
- 24 L. Goitre, E. Trapani, L. Trabalzini and S. F. Retta; The Ras-Superfamily of small GTPases: the unlocked secrets; *Methods Mol. Biol.*, 1120:1-18; 2014
- 25 A. Nakano, H. Otsuka, M. Yamagishi, E. Yamamoto, K. Kimura, S. Nishikawa and T. Oka; Mutational Analysis of the Sar1p Protein, a Small GTPase Which Is Essential for Vesicular Transport from the Endoplasmic Reticulum; *J. Biochem.*, 116(2):243-247; 1994
- 26 J. C. Fromme, L. Orci and R. Schekman; Coordination of COPII vesicle trafficking by Sec23; *Trends Cell Biol.*, 18(7):330-336; 2008
- 27 M. Huang, J. T. Weissman, S. Béraud-Dufour, P. Luan, C. Wang, W. Chen, M. Aridor, I. A. Wilson and W. E. Balch; Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export; *J. Cell Biol.*, 155(6):937–948; 2001
- 28 H. R. Bourne, D. A. Sanders and F. McCormick; The GTPase super-family: conserved structure and molecular mechanism; *Nature*, 349(6305):117-127; 1991
- 29 A. Wittinghofer and E. F. Pai; The structure of ras protein: a model for a universal molecular switch; *Trends Biochem. Sci.*, 16(10):382-387; 1991
- 30 S. Waichman, C. You, O. Beutel, M. Bhagawati and J. Piehler; Maleimide Photolithography for Single-Molecule Protein–Protein Interaction Analysis in Micropatterns; *Anal. Chem.*, 83(2):501–508; 2011
- 31 J. W. Grate, K.-F. Mo, Y. Shin, A. Vasdekis, M. G. Warner, R. T. Kelly, G. Orr, D. Hu, K. J. Dehoff, F. J. Brockman and M. J. Wilkins; Alexa Fluor-Labeled Fluorescent Cellulose Nanocrystals for Bioimaging Solid Cellulose in Spatially Structured Microenvironments; *Bioconjugate Chem.*, 26(3):593–601; 2015
- 32 X. Qiao, L. Wang, J. Ma, Q. Deng, Z. Liang, L. Zhang, X. Peng and Y. Zhang; High sensitivity analysis of water-soluble, cyanine dye labeled proteins by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection; *Anal. Chim. Acta*, 640(1-2):114-120; 2009
- 33 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; 1998
- 34 W. L. DeLano; The pymol molecular graphics system; DeLano Scientific LLC; 2002
- 35 O. Kuge, C. Dascher, L. Orci, T. Rowe, M. Amherdt, H. Plutner, M. Ravazzola, G. Tanigawa, J. E. Rothman and W. E. Balch; Sar1p Promotes Vesicle Budding from the Endoplasmic reticulum but Not Golgi Compartments; *J. Cell Biol.*, 125(1):51-65; 1994
- 36 G. Palade; Intracellular aspects of the process of protein synthesis; *Science*, 189(4206):867; 1975
- 37 M. C. S. Lee, E. A. Miller, J. Goldberg, L. Orci and R. Schekman; Bi-directional protein transport between the ER and Golgi; *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20:87-123; 2004
- 38 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; 1991
- 39 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; 1995

- 40 B. L. Tang, F. Peter, J. Krijnse-Locker, S. H. Low, G. Gri_ths 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; 1997
- 41 B. Antonny and R. Schekman ER export: public transportation by the COPII coach; *Curr. Opin. Cell Biol.*, 13(4):438-443; 2001
- 42 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; 1993
- 43 C. Mc Mahon, S. M. Studer, C. Clendinen, G. P. Dann, P. D. Jeffrey and F. M. Hughson; The Structure of Sec12 Implicates Potassium Ion Coordination in Sar1 Activation; *J. Biol. Chem.*, 287(52):43599-43606; 2012
- 44 C. Schwieger, A. Meister, S. Daum, A. Blume and K. Bacia; Binding of the GTPase Sar1 to a Lipid Membrane Monoschicht: Insertion and Orientation Studied by Infrared Reflection–Absorption Spectroscopy; *Polymers*, 9:612; 2017
- 45 M. C. S. Lee, L. Orci, S. Hamamoto, E. Futai, M. Ravazolla and R. Schekman; Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle; *Cell*, 122(4):605-617; 2005
- 46 X. Bi, R. A. Corpina and J. Goldberg; Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat; *Nature*, 419(6904):271-277; 2002
- 47 A. Schlacht and J. B. Dacks; Unexpected ancient paralogs and an evolutionary model for the COPII coat complex Affiliations; *Genome Biol. Evol.*, 7(4):1098-1109; 2015
- 48 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; 1998
- 49 M. C. S. Lee and E. A. Miller; Molecular mechanisms of COPII vesicle formation; *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18(4):424-434; 2007
- 50 K. Wennerberg, K. L. Rossman and C. J. Der; The Ras-Superfamily at a glance; *J. Cell Sci.*, 118(5):843–846; 2005
- 51 C. Russell and S. M. Stagg; New Insights into the Structural Mechanisms of the COPII Coat; *Traffic*; 11(3):303–310; 2009
- 52 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): 351-357; 2001
- 53 S. M. Stagg, C. Gürkan, D. M. Fowler, P. LaPointe, T. R. Foss, C. S. Potter, B. Carragher and W. E. Balch; Structure of the Sec13/31 COPII coat cage; *Nature*, 439(7073):234-238; 2006
- 54 G. Zanetti, S. Prinz, S. Daum, A. Meister, R. Schekman, K. Bacia and J. A. G Briggs; The structure of the COPII transport-vesicle coat assembled on membranes; *ELife*, 2:e00951; 2013
- 55 K. Satoa and A. Nakano; Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting; *FEBS Lett.*, 581(11):2076–2082; 2007
- 56 J. R. Lakowicz; *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd edition; Springer; 2008
- 57 M. Kasha; Characterization of electronic transitions in complex molecules; *Discuss. Faraday Soc.*, 9:14-19; 1950
- 58 J. Auerswald; Herstellung einer fluoreszenzmarkierten Phospholipase D α 2-Variante für Untersuchungen mittels Einzelmolekülspektroskopie;. Diplomarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg; 2010.
- 59 F. Lottspeich and J. W. Engels; *Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie*; Bioanalytik, 2. Auflage, Kapitel 8.6; Spektrum; 2006
- 60 R. H. Webb; Confocal optical microscopy; *Rep. Prog. Phys.*, 59:427-471; 1996
- 61 S. Hell, G. Reiner, C. Cremer und E. H. K. Stelzer; Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index; *J. Microsc.*, 169(3):391-405; 1993
- 62 E. Elson, D. Madge and W. W. Webb; Fluorescence correlation spectroscopy: 1. conceptual basis and theory; *Biopolymers*, 13:1-27; 1974
- 63 J. Widengren, Ü. Mets and R. Rigler; Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study; *J. Phys. Chem.*, 99(36):13368–13379; 1995

- 64 M. Zhao, L. Jin, B. Chen, Y. Ding, H. Ma and D. Chen; Afterpulsing and its correction in fluorescence correlation spectroscopy experiments; *Appl. Opt.*, 42(19):4031-4036; 2003
- 65 B. Schuler, E. A. Lipman and W. A. Eaton; Probing the free-energy surface for protein folding with single-molecule fluorescence spectroscopy; *Nature*, 419(6908):743-747; 2002
- 66 G. Haran; Single-molecule fluorescence spectroscopy of biomolecular folding; *J. Phys. Condens. Mat.*, 15:R1291-R1317; 2003
- 67 X. Michalet, S. Weiss and M. Jäger; Single-molecule fluorescence studies of protein folding and conformational dynamics; *Chem. Rev.*, 106(5):1785-1813; 2006
- 68 R. Yasuda, H. Noji, K. Kinosita and M. Yoshida; F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120° steps; *Cell*, 93(7):1117-1124; 1998
- 69 T. Ha, T. Enderle, D. F. Ogletree, D. S. Chemla, P. R. Selvin and S. Weiss; Probing the interaction between two single molecules: fluorescence resonance energy transfer between a single donor and a single acceptor; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(13):6264-6268; 1996
- 70 A. Benda, M. Benes, V. Marecek, A. Lhotsky, W. T. Hermens and M. Hof; How to determine diffusion coefficients in planar phospholipid systems by confocal fluorescence correlation spectroscopy; *Langmuir*, 19(10):4120-4126; 2003
- 71 J. Humpolickova, E. Gielen, A. Benda, V. Fagulova, J. Vercaemmen, M. van de Ven, M. Hof, M. Amelott and Y. Engelborghs; Probing diffusion laws within cellular membranes by Z-scan fluorescence correlation spectroscopy; *Biophys. J.*, 91(3):L23-L25; 2006
- 72 M. Gudmand, M. Fidorra, T. Bjørnholm and T. Heimburg; Diffusion and Partitioning of Fluorescent Lipid Probes in Phospholipid Monolayers; *Biophys. J.*, 96(11):4598-4609; 2009
- 73 M. Leonard, B. D. Song, R. Ramachandran and S. L. Schmid; Robust Colorimetric Assays for Dynamin's Basal and Stimulated GTPase Activities; *Methods Enzymol.*, 404:490-503; 2005
- 74 *Langmuir-Blodgett Troughs; Operating Manual; 6th edition ; NIMA; 2004*
- 75 H.-D. Dörfler; *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme; Physik und Chemie; Springer; 2002.*
- 76 *Chromas Lite; Technelysium Pty Ltd*
- 77 R. Appel and A. Bairoch; *Expasy Schweizer Institut für Bioinformatik (SIB); 1993*
- 78 P. Rice, I. Longden and B. Bleasby; EMBL-EBSS: The European Molecular Biology Open Software Suite; *Trends Genet.* 16(6):276–277; 2000
- 79 *MATLAB; The MathWorks, Inc.; R2010a*
- 80 L. Michaelis and M. L. Menten; Kinetik der Invertinwirkung; *Biochem. Z.*, 49:333–369; 1913
- 81 E. P. Petrov, T. Ohrt, R. G. Winkler and P. Schuille; Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA; *Phys. Rev. Lett.*, 97(25):258101; 2006
- 82 T. Irmscher; *Generierung und Charakterisierung einer fluoreszenzmarkierten Sar1p-Variante; Bachelorarbeit, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg; 2012*
- 83 K. Schatzel; Noise on photon correlation data: I. Autocorrelation functions; *Quantum Opt.*, 2(4):287-305; 1990
- 84 K. Schatzel; *New Concepts in Correlator Design; Inst. Phys. Conf. Ser. 77, 175-184; 1985*
- 85 H. A. David, H. O. Hartley and E. S. Pearson; The distribution of the ratio, in a single, normal sample, of range to standard deviation; *Biometrika.*, 41:482-493; 1954
- 86 F. W. J. Teale and G. Weber; Ultraviolet Fluorescence of the Aromatic Amino Acids; *Biochem. J.*, 65(3):476-482; 1957
- 87 S. Ranjit, A. Dvornikov, D. A. Holland, G. D. Reinhart, D. M. Jameson and E. Gratton; Application of Three-Photon Excitation FCS to the Study of Protein Oligomerization; *J. Phys. Chem. B.*, 118(50):14627–14631; 2014
- 88 T. Ochiishi, M. Kaku, K. Kiyosue, M. Doi, T. Urabe, N. Hattori, H. Shimura and T. Ebihara; New Alzheimer's disease model mouse specialized for analyzing the function and toxicity of intraneuronal Amyloid β oligomers; *Sci. Rep.*, 9:17368; 2019
- 89 G. Corso, W. Heusermann, D. Trojer, A. Görgens, E. Steib, J. Voshol, A. Graff, C. Genoud, Y. Lee, J. Hean, J. Z. Nordin, O. P.B. Wiklander, S. El Andaloussi and N. Meisner-Kober; Systematic characterization of extracellular vesicle sorting domains and quantification at the single molecule – single vesicle level by fluorescence correlation spectroscopy and single particle imaging; *J. Extracell. Vesicles.* 8(1):1663043; 2019

- 90 S. Wiesner, E. Helfer, D. Didry, G. Ducouret, F. Lafuma, M. F. Carlier and D. J. Pantaloni; A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility; *J. Cell Biol.*, 160(3):387-398; 2003
- 91 M. Shiraishi, R. D. Loutzenhiser and M. P. Walsh; A highly sensitive method for quantification of myosin light chain phosphorylation by capillary isoelectric focusing with laser-induced fluorescence detection; *Electrophoresis*, 26(3):571-580; 2005
- 92 P. K. Selbo, O. Kaalhus, G. Sivam and K. Berg; 5-Aminolevulinic acid-based photochemical internalization of the immunotoxin MOC31-gelonin generates synergistic cytotoxic effects in vitro; *Photochem. Photobiol.*, 74(2):303-310; 2001
- 93 A. Salic and T. J. Mitchison; A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(7):2415-2420; 2008
- 94 S. Martinez-Caballero, P. M. Peixoto, K. W. Kinnally and M. L. Campo; A fluorescence assay for peptide translocation into mitochondria; *Anal. Biochem.*, 362(1):76-82; 2007
- 95 A. M. Melo, M. Prieto and A. Coutinho; The effect of variable liposome brightness on quantifying lipid-protein interactions using fluorescence correlation spectroscopy; *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.*, 1808(10):2559-2568; 2011
- 96 N.L. Thompson; Fluorescence correlation spectroscopy; *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Techniques*, 1st edition, Plenum Press, New York, 337-378; 1991
- 97 I. Bravo-Plaza, M. Hernández-González, M. Pinar, J. F. Díaz and M. A. Peñalva; Identification of the guanine nucleotide exchange factor for SAR1 in the filamentous fungal model *Aspergillus nidulans*; *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.*, 1866(12):118551; 2019
- 98 S. Beraud-Dufour, S. Robineau, P. Chardin, S. Paris, M. Chabre, J. Cherfils and B. Antonny; A glutamic finger in the guanine nucleotide exchange factor ARNO displaces Mg²⁺ and the beta-phosphate to destabilize GDP on ARF1; *EMBO J.*, 17(13):3651-3659; 1998
- 99 F. Peurois, S. Veyron, Y. Ferrandez, I. Ladid, S. Benabdi, M. Zeghouf, G. Peyroche and J. Cherfils; Characterization of the activation of small GTPases by their GEFs on membranes using artificial membrane tethering; *Biochem. J.*, 474(7):1259-1272; 2017
- 100 B. C. Richardson and J. C. Fromme; biochemical methods for studying kinetic regulation of Arf1 activation by Sec7; *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 130:101-126; 2015
- 101 M. D. Watson, I. Peran, J. Zou, O. Bilsel and D. P. Raleigh; Selenomethionine Quenching of Tryptophan Fluorescence Provides a Simple Probe of Protein Structure; *Biochemistry*, 56(8):1085-1094; 2017
- 102 C. Barlowe, C. d'Enferfn and R. Schekman; Purification and Characterization of SARlp, a Small GTP-binding Protein Required for Transport Vesicle Formation from the Endoplasmic Reticulum; *J. Biol. Chem.*, 268(2): 873-879; 1993
- 103 T. Higashijima, K. M. Ferguson, M. D. Smigel and A. G. Gilman; The effect of GTP and Mg²⁺ on the GTPase activity and the fluorescent properties of Go; *J. Biol. Chem.*, 262(2):757-761; 1987
- 104 R. C. Killoran and M. J. Smith; Conformational resolution of nucleotide cycling and effector interactions for multiple small GTPases determined in parallel Affiliations; *J. Biol. Chem.*, 294(25):9937-9948; 2019
- 105 A. V. Oppenheim and R. W. Schafer; *Zeitdiskrete Signalverarbeitung*; 3. Auflage, R. Oldenbourg Verlag; 1999
- 106 E. O. Brigham; *FFT. Schnelle Fourier-Transformation*; R. Oldenbourg Verlag; 1995
- 107 S. W. Smith; *The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing*; 1st edition, chapter 18, Elsevier Ltd; 2002
- 108 S. Werner, J. Ebenhan, C. Haupt and K. Bacia; A Quantitative and Reliable Calibration Standard for Dual-Color Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy; *ChemPhysChem.*, 19(24):1-10; 2018
- 109 J. J. Schüer, C. Wölk, U. Bakowsky and S. R. Pinnapireddy; Comparison of Tanaka lipid mixture with natural surfactant Alveofact to study nanoparticle interactions on Langmuir film balance; *Colloids Surf. B*, 188:110750; 2020

- 110 J. J. Schüer, A. Arndt, C. Wölk, S. R. Pinnapireddy, and U. Bakowsky; Establishment of a Synthetic In Vitro Lung Surfactant Model for Particle Interaction Studies on a Langmuir Film Balance; *Langmuir*, 36(17):4808–4819; 2020
- 111 M. Krajewska, K. Dopierała and K. Prochaska; Lipid–Protein Interactions in Langmuir Monolayers under Dynamically Varied Conditions; *J. Phys. Chem. B*, 124(1):302–311; 2020
- 112 P. Calvez, S. Bussièeres, E. Demers and C. Salesse; Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers; *Biochimie*, 91(6):718-733; 2009
- 113 J. Auerswald, J. Ebenhan, C. Schwieger, A. Scrima, A. Meister and K. Bacia; Measuring Protein Insertion Areas in Lipid Monolayers by Fluorescence Correlation Spectroscopy; *bioRxiv preprint*; 2020
- 114 W. N. Huang, Y. H. Chen, C. L. Chen and W. G. Wu; Surface Pressure-Dependent Interactions of Secretory Phospholipase A(2) with Zwitterionic Phospholipid Membranes; *Langmuir* 27(11):7034-7041; 2011
- 115 A. Seelig, T. Alt, S. Lotz and G. Holzemann; Binding of substance P agonists to lipid membranes and to the neurokinin-1 receptor; *Biochemistry*, 35(14):4365-4374; 1996
- 116 V. Boguslavsky, M. Rebecchi, A. J. Morris, D. Y. Jhon, S. G. Rhee and S. Mclaughlin; Effect of Monoschicht Surface Pressure on the Activities of Phosphoinositide-Specific Phospholipase-C-Beta-1, Phospholipase-C-Gamma-1, and Phospholipase-C-Delta-1; *Biochemistry*, 33(10):3032-3037; 1994
- 117 L. Sachs; *Angewandte Statistik*; 11. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2004

13. Anhang

13.1 Charakteristik Sar1p_{SCCSAI488}

13.1.1 Diffusionskoeffizient Sar1p/Sar1p_{SCCSAI488}

$$D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_0} = \frac{1,380658 \cdot 10^{-23} \frac{J}{K} 298,15 K}{6 \pi 0,891 \text{ mPa s } 2,4 \text{ nm}} = 10,21 \cdot 10^{-7} \frac{\text{cm}^2}{\text{s}} \quad \text{Gleichung [29]}$$

k_B : Boltzmannkonstante ($1,380658 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$)

T : Temperatur (298,15 K; entspricht 25°C)

η : dynamische Viskosität des Lösungsmittels bei 25°C (Wasser = 0,891 mPa s)

R_0 : Hydrodynamische Radius von Sar1p (2,4 nm; bestimmt durch Vermessen der dreidimensionalen Struktur an fünf verschiedenen Stellen und zusätzlicher Addition von 2,5 Å (angenommene Hydrathülle, bestehend aus einer Schicht Wassermoleküle))

13.2 Etablierung eines Testverfahrens zum Nachweis der katalytischen Aktivität von Sar1p

13.2.1 Reaktionsgleichungen zum Phosphatnachweis mit Malachitgrün

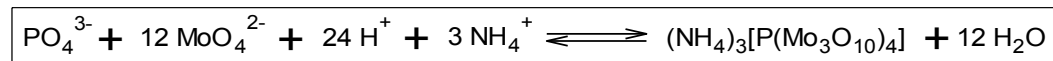


Abbildung 50: Nachweisreaktion von Phosphat durch Orthomolybdat in saurer Umgebung.

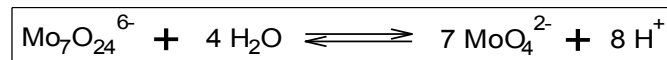


Abbildung 51: Gleichgewichtsreaktion von Orthomolybdat und Heptamolybdat.

13.2.2 Sensitivität des Nachweisverfahrens

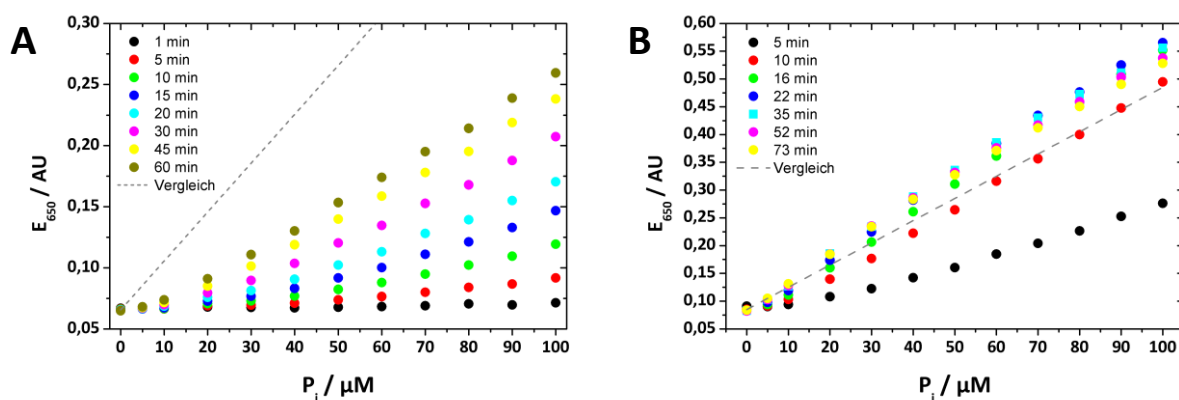


Abbildung 52: Rohdaten der Messungen einer P_i -Kalibriergerade aus denen die Anstiege in Abbildung 26 bestimmt wurden (Bild A für Abbildung 26, Bild A und Bild B für Abbildung 26, Bild B)

13.2.3 Autohydrolyse GTP und GDP

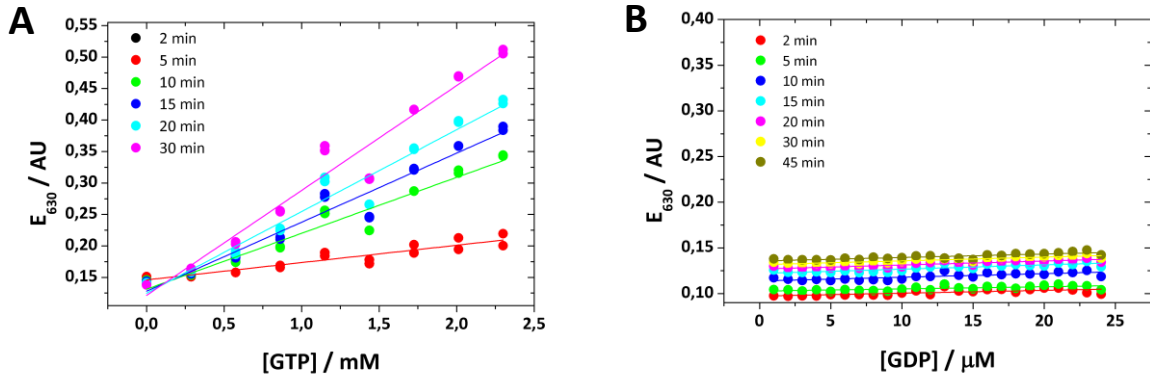
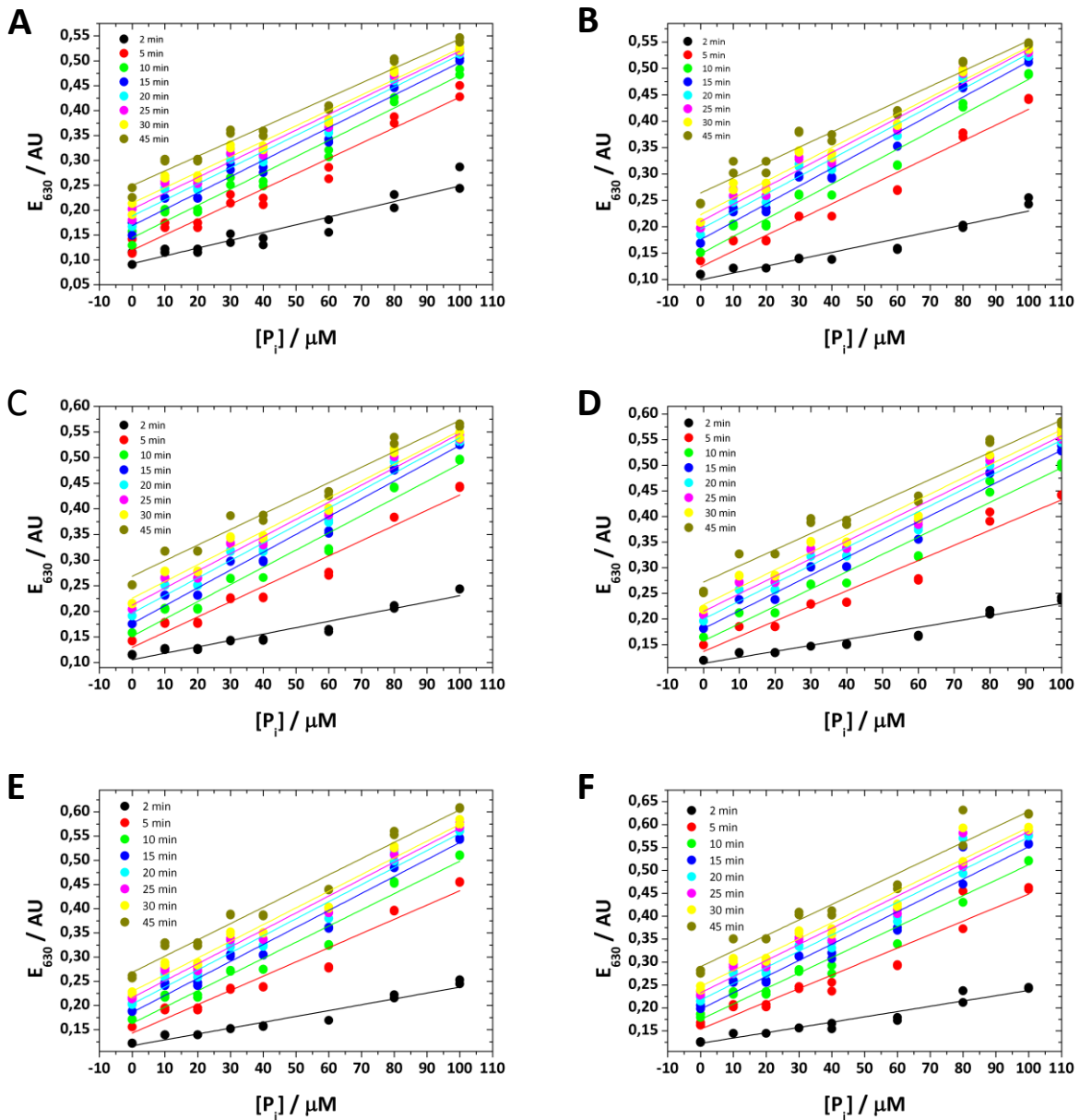


Abbildung 53: Rohdaten der Autohydrolyse von GTP (Bild A) und GDP (Bild B).

13.2.4 Einfluss von MMM Lipiden auf den Malachitgrün-Nachweistest



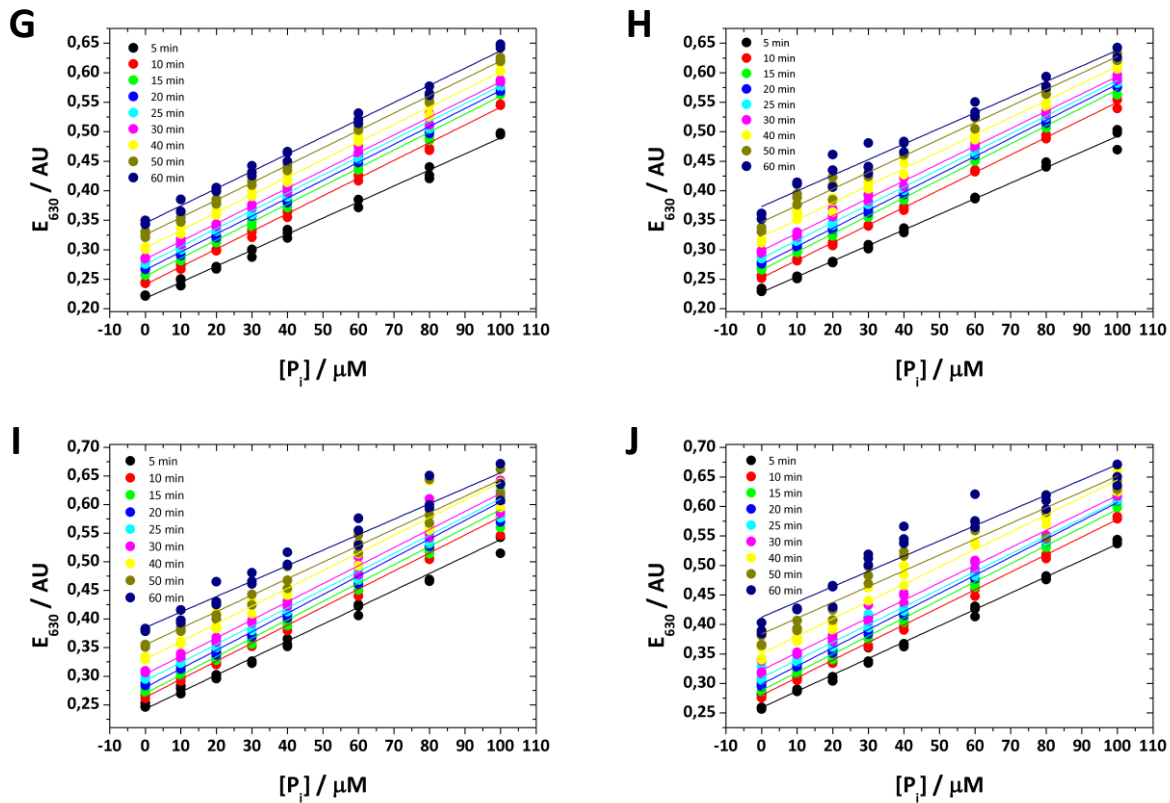


Abbildung 54: Rohdaten der Messungen einer P_i -Kalibriergerade in Gegenwart verschiedener Mengen MMM-Lipid (0 mM Bild A; 0,1 mM Bild B; 0,2 mM Bild C; 0,3 mM Bild D; 0,4 mM Bild E; 0,5 mM Bild F; 0,75 mM Bild G; 1,0 mM Bild H; 1,25 mM Bild I; 1,5 mM Bild J) nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (siehe Legende in jeweiligen Graphen).

13.2.5 Einfluss von Alexa₄₈₈ auf den Malachitgrün-Nachweistest

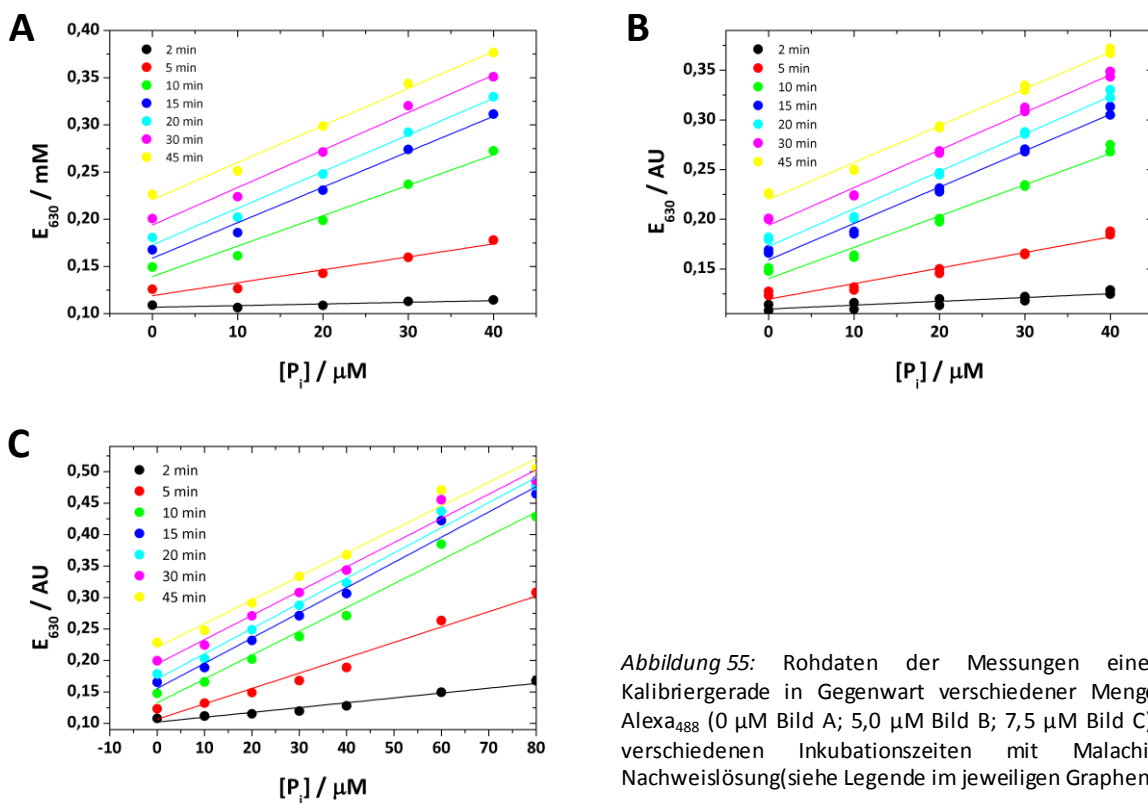


Abbildung 55: Rohdaten der Messungen einer P_i -Kalibriergerade in Gegenwart verschiedener Mengen Alexa₄₈₈ (0 μ M Bild A; 5,0 μ M Bild B; 7,5 μ M Bild C) nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Malachitgrün-Nachweislösung (siehe Legende im jeweiligen Graphen).

13.3 GTPase-Aktivität von Sar1p und dessen Regulation

13.3.1 Kalibrierreihen

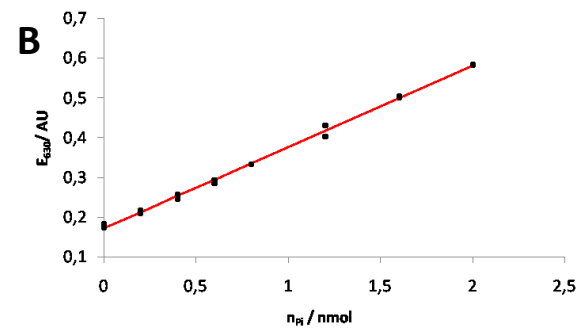
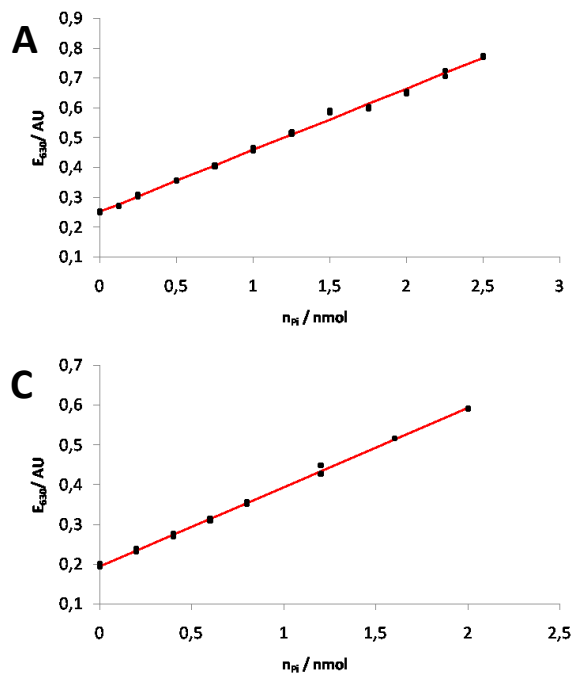


Abbildung 56: Rohdaten der Messungen von P_i -Kalibriergeraden zur Quantifizierung des Absorptionssignals bei 630 nm (Bild A: Anstieg = $(0,2067 \pm 0,003) AU/nmol_{P_i}$; Bild B: Anstieg = $(0,2049 \pm 0,003) AU/nmol_{P_i}$; Bild C: Anstieg = $(0,199 \pm 0,002) AU/nmol_{P_i}$)

13.3.2 Basalaktivität von Sar1p

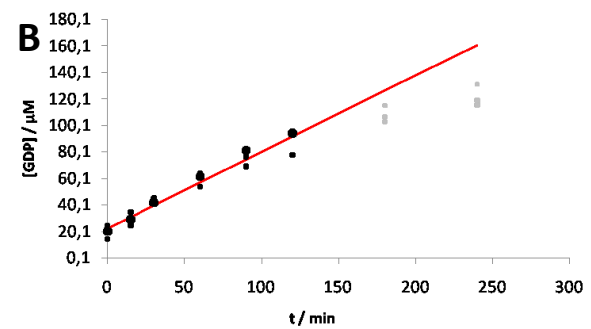
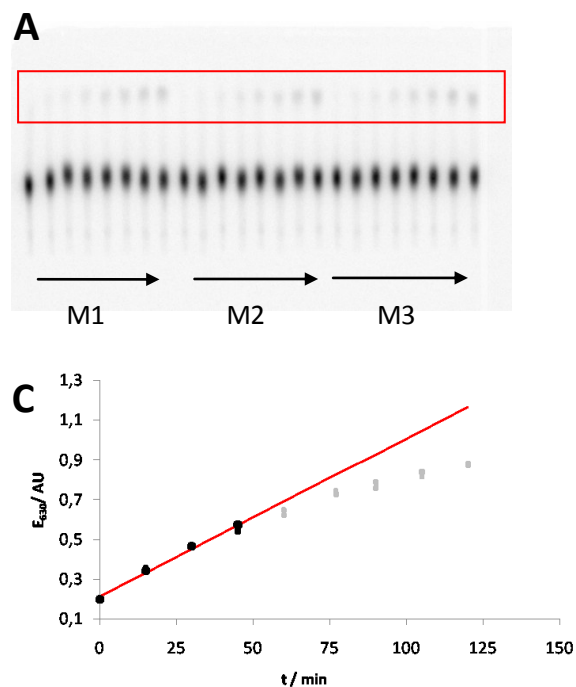


Abbildung 57: Auswertung der gemessenen Umsätze von Sar1p in Gegenwart von radioaktiv markiertem $\alpha^{32}P$ -GTP (Bild A). Die Bestimmung des gebildeten GDP (\square) erfolgte dabei desitometrisch in dem die Intensität des einzelnen GDP-Spots im Verhältnis zur Intensität einer gesamten Bahn betrachtet wurde (Bild B, \bullet). Insgesamt wurden 3 parallel Messungen durchgeführt (M1, M2, M3; Bild A). (Bild B) GDP-Produktion in Abhängigkeit von der Zeit, wobei die Messpunkte ab 150 min nicht für die Bestimmung des Anstieges verwendet wurden, da diese bereits in einer Sättigungsphase lagen. (Bild C) gemessene Absorption bei 630 nm (Malachitgrün-Nachweistest) nach verschiedenen Reaktionszeiten mit Sar1p. Auch hier wurden die gemessenen Werte nach längeren Inkubationszeiten nicht für die Bestimmung des Initialen Anstieges verwendet, da diese eine Sättigung zeigten.

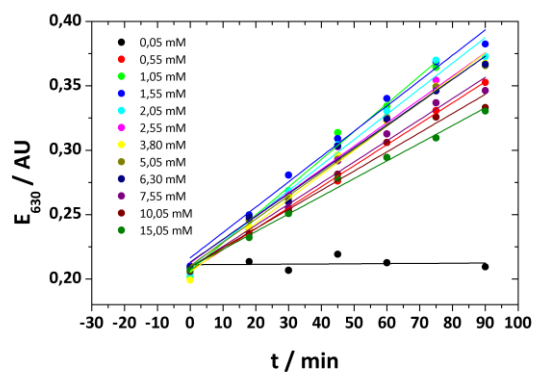
Tabelle 17: Zusammenfassung Sar1p Umsatz mit radioaktivem GTP

	Anstieg Umsatz / $\mu\text{M}_{\text{GDP}} \text{ min}^{-1}$	$V_{\text{Ansatz}} / \text{ml}$	Aktivität / $\text{pmol}_{\text{GDP}} \text{ min}^{-1}$
radioaktiver Test	$0,577 \pm 0,032$	1,5	$865,5 \pm 48,3$

Tabelle 18: Zusammenfassung Sar1p Umsatz mit Malachitgrün-Nachweis

	Anstieg Umsatz / AU min^{-1}	Anstieg Kalibrierreihe / $\text{AU nmol}_{\text{Pi}}^{-1*}$	Aktivität / $\text{pmol}_{\text{Pi}} \text{ min}^{-1}$
Malachitgrün Test	$7,94 \cdot 10^{-3} \pm 0,29 \cdot 10^{-3}$	$0,2067 \pm 0,003$	$38,4 \pm 1,9$
entspricht Kalibrierreihe in Abbildung 56, Bild A			

13.3.3 Einfluss von Mg^{2+} auf die Basalaktivität

Abbildung 58: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Mg^{2+} (siehe Legende im Graphen).Tabelle 19: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen Mg^{2+}

$\text{Mg}^{2+} / \text{mM}$	Umsatz / $10^{-5} \text{ AU min}^{-1}$	Umsatz / $\text{pmol}_{\text{Pi}} \text{ min}^{-1*}$	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1**}$
0,05	$1,41 \pm 6,98$	$0,07 \pm 0,34$	$0,00 \pm 0,02$
0,55	$162,96 \pm 3,49$	$7,88 \pm 0,27$	$0,39 \pm 0,01$
1,05	$215,96 \pm 10,67$	$10,45 \pm 0,66$	$0,52 \pm 0,03$
1,55	$196,73 \pm 9,28$	$9,52 \pm 0,58$	$0,48 \pm 0,03$
2,05	$198,00 \pm 11,93$	$9,58 \pm 0,71$	$0,48 \pm 0,04$
2,55	$181,21 \pm 8,65$	$8,77 \pm 0,54$	$0,44 \pm 0,03$
3,8	$188,99 \pm 7,21$	$9,14 \pm 0,47$	$0,46 \pm 0,02$
5,05	$180,81 \pm 6,75$	$8,75 \pm 0,44$	$0,44 \pm 0,02$
6,3	$177,70 \pm 8,76$	$8,60 \pm 0,54$	$0,43 \pm 0,03$
7,55	$164,19 \pm 9,32$	$7,94 \pm 0,56$	$0,40 \pm 0,03$
10,05	$148,98 \pm 8,53$	$7,21 \pm 0,51$	$0,36 \pm 0,03$
15,05	$137,39 \pm 5,08$	$6,65 \pm 0,33$	$0,33 \pm 0,02$

* verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild A

** eingesetzt wurden $1,0 \mu\text{M}$ Sar1p bei einem Volumen von $20 \mu\text{l}$

13.3.4 Einfluss von MMM-Liposomen auf die Basalaktivität von Sar1p

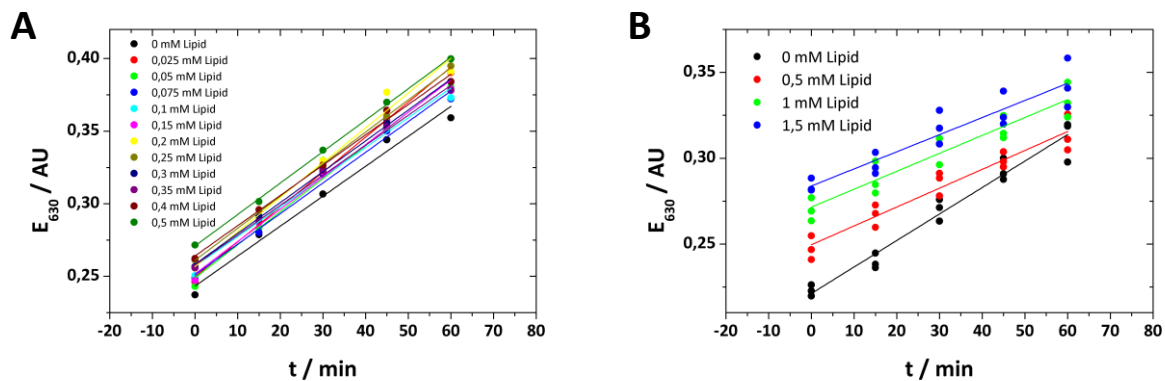


Abbildung 59: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an MMM Lipiden (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 20: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen MMM Lipiden

Lipid / μM	Umsatz / $10^{-5} \text{ AU min}^{-1}$	Umsatz / $\text{pmol}_{\text{Pi}} \text{ min}^{-1*}$	$k_{\text{cat}} / \text{min}^{-1**}$
0	257,22 \pm 12,52	12,45 \pm 0,77	0,50 \pm 0,03
25	240,47 \pm 8,15	11,63 \pm 0,55	0,47 \pm 0,02
50	227,80 \pm 18,09	11,02 \pm 1,02	0,44 \pm 0,04
75	210,93 \pm 11,83	10,21 \pm 0,71	0,41 \pm 0,03
100	204,33 \pm 14,83	9,89 \pm 0,85	0,40 \pm 0,03
150	222,53 \pm 12,65	10,77 \pm 0,76	0,43 \pm 0,03
200	238,93 \pm 19,46	11,56 \pm 1,10	0,46 \pm 0,04
250	220,67 \pm 4,08	10,68 \pm 0,34	0,43 \pm 0,01
300	212,33 \pm 4,04	10,27 \pm 0,33	0,41 \pm 0,01
350	206,27 \pm 7,29	9,98 \pm 0,49	0,40 \pm 0,02
400	208,33 \pm 10,14	10,08 \pm 0,63	0,40 \pm 0,03
500	216,53 \pm 3,56	10,48 \pm 0,31	0,42 \pm 0,01
1000	208,84 \pm 9,46	10,10 \pm 0,59	0,40 \pm 0,02
1500	199,16 \pm 10,66	9,64 \pm 0,64	0,39 \pm 0,03

* verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild A

** eingesetzt wurden 1,0 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5 Einfluss von COPII-Komponenten auf die Basalaktivität von Sar1p

13.3.5.1 Einfluss von Sec12 ΔCp

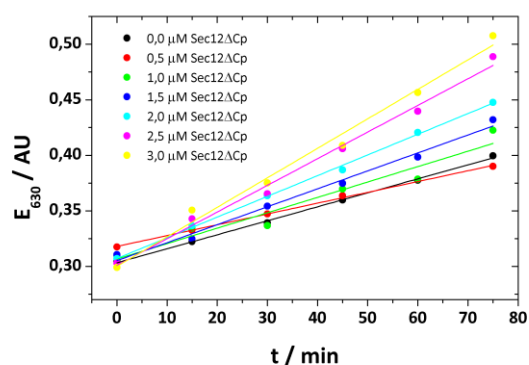


Abbildung 60: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec12 ΔCp (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 21: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec12ΔCp

Sec12ΔCp / μM	Umsatz / 10 ⁻⁵ AU min ⁻¹	Signal _{Referenz} / AU	Signal _{t=0min} / AU	Umsatz _{korrr} / 10 ⁻⁵ AU min ^{-1*}	Umsatz / pmol _{pi} min ^{-1**}	k _{cat} / min ^{-1***}
0,0	125,90 ± 2,51	0,30	0,30	128,97 ± 2,51	6,30 ± 0,21	0,31 ± 0,01
0,5	97,29 ± 2,05	0,27	0,32	154,22 ± 2,05	7,53 ± 0,20	0,38 ± 0,01
1,0	138,63 ± 17,14	0,30	0,31	149,96 ± 17,14	7,32 ± 0,94	0,37 ± 0,05
1,5	161,58 ± 8,24	0,32	0,31	145,45 ± 8,24	7,10 ± 0,50	0,36 ± 0,03
2,0	186,44 ± 3,79	0,35	0,31	128,97 ± 3,79	6,30 ± 0,27	0,31 ± 0,01
2,5	240,06 ± 11,08	0,39	0,30	123,12 ± 11,08	6,01 ± 0,62	0,30 ± 0,03
3,0	265,70 ± 14,48	0,42	0,30	106,23 ± 14,48	5,19 ± 0,78	0,26 ± 0,04

* Vom Umsatz wird jeweils die Differenz aus dem Referenzsignal und dem Signal bei t= 0 min dividiert durch die Messzeit des Referenzsignales (75 min)abgezogen.

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild B

*** eingesetzt wurden 1,0 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5.2 Einfluss von Sec23/24p

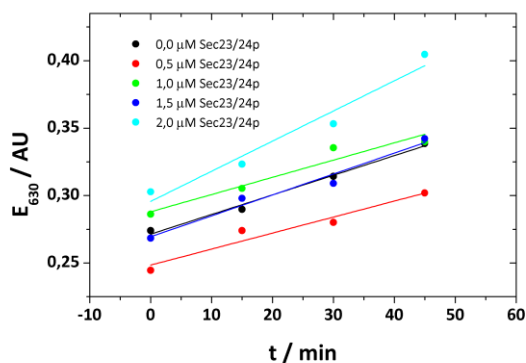


Abbildung 61: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec23/24p (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 22: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec23/24p

Sec23/24p / μM	Umsatz / 10 ⁻⁵ AU min ⁻¹	Signal _{Referenz} / AU	Signal _{t=0min} / AU	Umsatz _{korrr} / 10 ⁻⁵ AU min ^{-1*}	Umsatz / pmol _{pi} min ^{-1**}	k _{cat} / min ^{-1***}
0,0	145,47 ± 9,93	0,29	0,27	126,80 ± 9,93	6,19 ± 0,57	0,31 ± 0,03
0,5	118,67 ± 20,05	0,27	0,24	81,83 ± 20,05	3,99 ± 1,03	0,20 ± 0,05
1,0	127,67 ± 23,01	0,29	0,29	117,67 ± 23,01	5,74 ± 1,20	0,29 ± 0,06
1,5	155,00 ± 19,49	0,31	0,27	77,67 ± 19,49	3,79 ± 1,00	0,19 ± 0,05
2,0	223,53 ± 33,07	0,35	0,30	152,70 ± 33,07	7,45 ± 1,72	0,37 ± 0,09

* Vom Umsatz wird jeweils die Differenz aus dem Referenzsignal und dem Signal bei t= 0 min dividiert durch die Messzeit des Referenzsignales (60 min)abgezogen.

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild B

*** eingesetzt wurden 1,0 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5.3 Einfluss verschiedener Mengen von Sec12ΔCp in Gegenwart von Sec23/24p

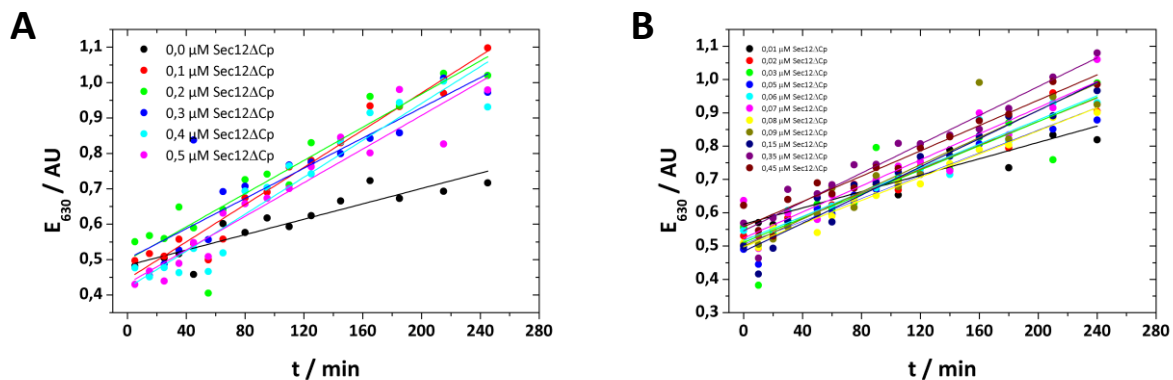


Abbildung 62: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec12ΔCp und 0,5 μM Sec23/24p (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 23: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec12ΔCp und 0,5 μM Sec23/24p

Sec12ΔCp / μM	Umsatz / 10 ⁻⁵ AU min ⁻¹	Signal _{Referenz} / AU	Signal _{t=0min} / AU	Umsatz _{korr} / 10 ⁻⁵ AU min ^{-1*}	Umsatz / pmol _p min ^{-1**}	k _{cat} / min ^{-1***}
0	97,68	0,48	0,48	97,68	4,77	0,48
0,01	122,73	0,56	0,56	122,73	5,99	0,60
0,02	178,26	0,53	0,53	178,26	8,70	0,87
0,03	181,22	0,56	0,56	181,22	8,85	0,88
0,05	171,12	0,49	0,49	171,12	8,35	0,84
0,06	181,02	0,55	0,55	181,02	8,84	0,88
0,07	195,53	0,64	0,64	195,53	9,54	0,95
0,08	174,10	0,51	0,51	174,10	8,50	0,85
0,09	203,69	0,50	0,50	203,69	9,94	0,99
0,1	250,01	0,50	0,50	250,01	12,20	1,22
0,15	211,33	0,50	0,50	211,33	10,32	1,03
0,2	223,50	0,55	0,55	223,50	10,91	1,09
0,3	226,01	0,57	0,57	226,01	11,03	1,10
0,35	216,35	0,48	0,48	216,35	10,56	1,06
0,4	244,71	0,62	0,62	244,71	11,95	1,19
0,45	189,96	0,43	0,43	189,96	9,27	0,93
0,5	210,70	0,48	0,48	210,70	10,29	1,03

Vom Umsatz wird jeweils die Differenz aus dem Referenzsignal und dem Signal bei t = 0 min dividiert durch die Messzeit des Referenzsignales (240 min) abgezogen.

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild B

*** eingesetzt wurden 0,5 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5.4 Einfluss verschiedener Mengen von Sec23/24p in Gegenwart von Sec12ΔCp

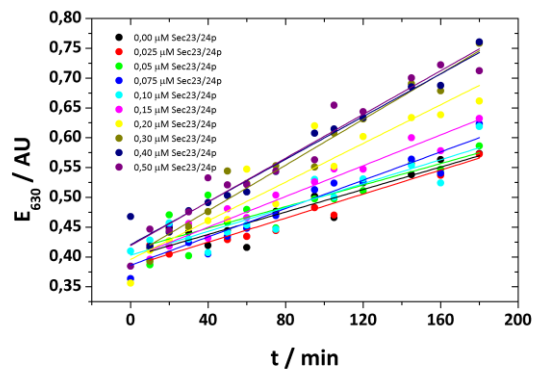


Abbildung 63: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec23/24p und 0,1 μM Sec12 ΔCp (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 24: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec23/24p und 0,1 μM Sec12 ΔCp .

Sec23/24p / μM	Umsatz / 10^{-5} AU min^{-1}	Signal _{Referenz} / AU	Signal _{t=0min} / AU	Umsatz _{korr} / 10^{-5} AU min^{-1} *	Umsatz / pmol_{pI} min^{-1} **	k_{cat} / min^{-1} ***
0	94,32	0,40	0,54	94,32	4,60	0,46
0,025	100,77	0,54	0,54	100,77	4,92	0,49
0,05	90,37	0,56	0,56	90,37	4,41	0,44
0,075	118,81	0,36	0,36	118,81	5,80	0,58
0,1	100,17	0,41	0,41	100,17	4,89	0,49
0,15	128,97	0,56	0,56	128,97	6,30	0,63
0,2	162,10	0,36	0,36	162,10	7,91	0,79
0,3	191,67	0,65	0,65	191,67	9,36	0,94
0,4	178,95	0,47	0,47	178,95	8,74	0,87
0,5	183,28	0,38	0,38	183,28	8,95	0,89

* Vom Umsatz wird jeweils die Differenz aus dem Referenzsignal und dem Signal bei $t = 0$ min dividiert durch die Messzeit des Referenzsignals (240 min) abgezogen.

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild B

*** eingesetzt wurden 0,5 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5.5 Einfluss verschiedener Mengen an Sec13/31p in Gegenwart von Sec23/24p und Sec12ΔCp

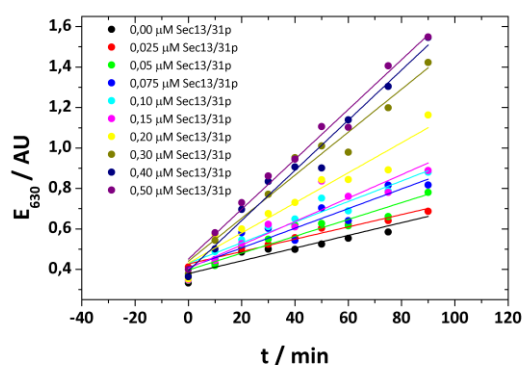


Abbildung 64: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec13/31p sowie 0,5 μM Sec23/24p und 0,1 μM Sec12 ΔCp (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 25: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Sec13/31p sowie 0,1 μM Sec12 ΔCp und 0,5 μM Sec23/24p

Sec13/31p / μM	Umsatz / 10^{-5} AU min^{-1}	Signal _{Referenz} / AU	Signal _{t=0min} / AU	Umsatz _{korr} / 10^{-5} AU min^{-1} *	Umsatz / pmol_{pI} min^{-1} **	k_{cat} / min^{-1} ***
0	314	0,47	0,33	257,50	11,30	1,28
0,025	305	0,56	0,41	242,50	13,09	1,21
0,05	416	0,51	0,34	346,96	16,14	1,73
0,075	486	0,55	0,35	401,00	18,82	2,00
0,1	509	0,59	0,37	417,75	24,23	2,08
0,15	579	0,66	0,35	450,63	30,47	2,24
0,2	743	0,66	0,35	613,83	38,62	3,06
0,3	1063	0,69	0,38	933,12	52,07	4,65
0,4	1240	0,75	0,36	1080,29	58,51	5,38
0,5	1232	0,75	0,40	1087,00	56,98	5,41

* Vom Umsatz wird jeweils die Differenz aus dem Referenzsignal und dem Signal bei t= 0 min dividiert durch die Messzeit des Referenzsignales (240 min)abgezogen.

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild B

*** eingesetzt wurden 0,5 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

13.3.5.6 VS-Charakteristik von Sar1p

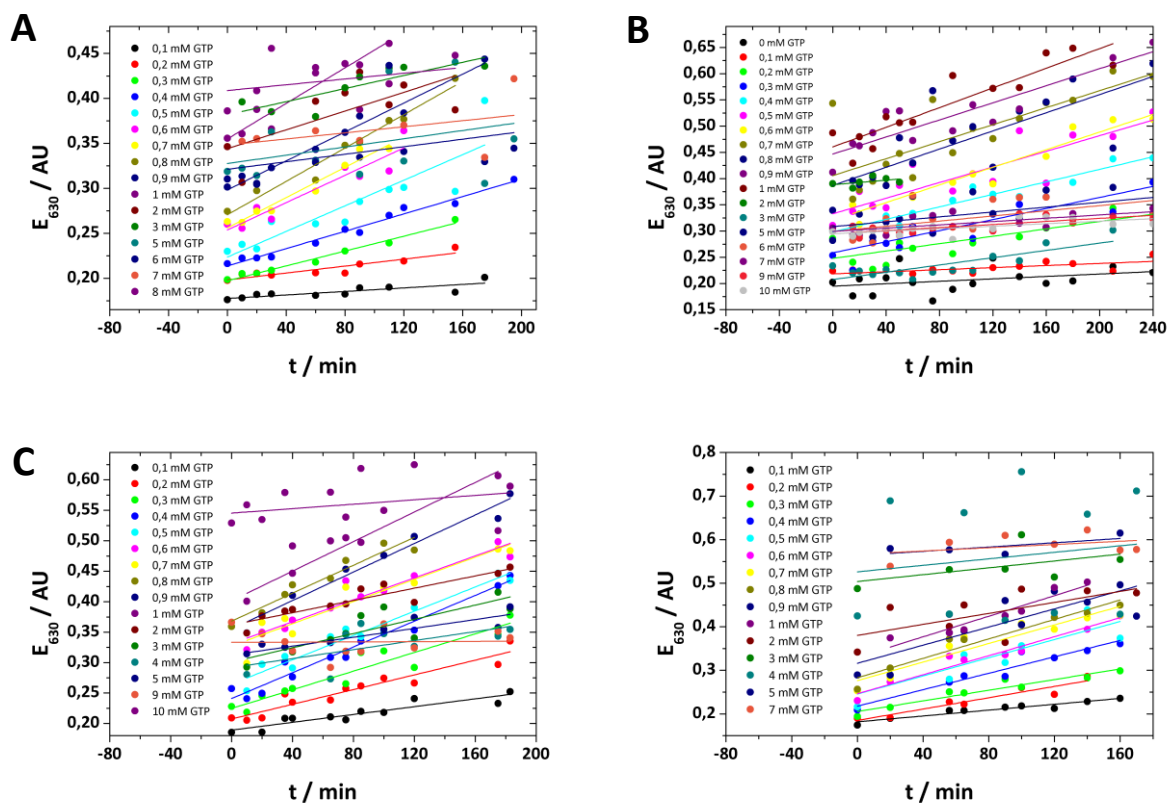


Abbildung 65: Rohdaten der Messungen von Sar1p in Gegenwart verschiedener Mengen an GTP in Abwesenheit (Bild A und Bild B) und Anwesenheit von 0,1 μM Sec12 ΔCp (Bild C und Bild D) (siehe Legende im Graphen).

Tabelle 26: Zusammenfassung Sar1p Umsatz in Gegenwart verschiedener Mengen an Mengen an GTP in Abwesenheit und Anwesenheit von 0,1 μM Sec12 ΔCp

GTP / mM	Verdünnungsfaktor	Umsatz _{Sar1p M1} / 10^{-5} AU min ^{-1*}	Umsatz _{Sar1p M2} / 10^{-5} AU min ^{-1*}	Umsatz _{Sar1p} / pmol _{p_i} min ^{-1**}	k_{catSAr1p} / min ^{-1***}	Umsatz _{Sar1p/Sec12p M1} / 10^{-5} AU min ^{-1*}	Umsatz _{Sar1p/Sec12p M2} / 10^{-5} AU min ^{-1*}	Umsatz _{Sar1p/Sec12p} / pmol _{p_i} min ^{-1**}	$k_{\text{catSAr1p/Sec12p}}$ / min ^{-1***}
0,1	1	9,78	9,91	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,00	32,12	33,60	0,33 ± 0,01	0,16 ± 0,01
0,2	1	19,27	35,21	0,27 ± 0,11	0,14 ± 0,06	60,31	64,93	0,63 ± 0,03	0,31 ± 0,02
0,3	1	41,26	52,78	0,47 ± 0,08	0,24 ± 0,04	76,47	61,06	0,69 ± 0,11	0,34 ± 0,06
0,4	1	48,29	59,56	0,54 ± 0,08	0,27 ± 0,04	105,79	94,25	1,00 ± 0,08	0,50 ± 0,05
0,5	1	71,15	74,51	0,73 ± 0,02	0,37 ± 0,02	99,58	104,20	1,02 ± 0,03	0,51 ± 0,02
0,6	1	76,11	84,04	0,80 ± 0,06	0,40 ± 0,03	90,02	109,15	1,00 ± 0,14	0,50 ± 0,07
0,7	1	84,14	86,52	0,85 ± 0,02	0,43 ± 0,01	91,02	106,52	0,99 ± 0,11	0,50 ± 0,06
0,8	1	92,76	81,44	0,87 ± 0,08	0,44 ± 0,04	---	111,63	1,12 ± 0,00	0,56 ± 0,01
0,9	1	80,42	81,44	0,81 ± 0,01	0,41 ± 0,01	187,50	104,09	1,46 ± 0,59	0,73 ± 0,30
1	1	98,73	93,81	0,96 ± 0,03	0,48 ± 0,02	117,08	118,02	1,18 ± 0,01	0,59 ± 0,01
2	2	104,36	---	1,04 ± 0,00	0,52 ± 0,01	121,33	126,17	1,24 ± 0,03	0,62 ± 0,02
3	3	109,28	103,26	1,06 ± 0,04	0,53 ± 0,03	123,82	117,80	1,21 ± 0,04	0,61 ± 0,03
4	4	---	---	---	---	126,33	149,41	1,38 ± 0,16	0,69 ± 0,09
5	5	114,57	115,66	1,15 ± 0,01	0,58 ± 0,01	115,66	122,61	1,19 ± 0,05	0,60 ± 0,03
6	6	125,33	-----	1,25 ± 0,00	0,63 ± 0,01	---	---	---	---
7	7	118,62	109,92	1,14 ± 0,06	0,57 ± 0,04	---	130,31	1,30 ± 0,00	0,65 ± 0,01
8	8	128,18	-----	1,28 ± 0,00	0,64 ± 0,01	---	---	---	---
9	9	---	129,87	1,30 ± 0,00	0,65 ± 0,01	107,19	---	1,07 ± 0,00	0,54 ± 0,01
10	10	---	119,35	1,19 ± 0,00	0,60 ± 0,01	---	---	---	---

* Die Anstiege wurden bereits um den Verdünnungsfaktor korrigiert

** verwendet wurde die Kalibrierreihe aus Abbildung 56, Bild C

*** eingesetzt wurden 0,5 μM Sar1p bei einem Volumen von 20 μl

Daten die mit --- bezeichnet sind, konnten aufgrund von Präparationsfehlern nicht ausgewertet werden

13.4 Etablierung eines Messsystems für FCS-Analysen an Phospholipid-Monoschichten

13.4.1 Installation eines zweiten Kühlkreislaufes

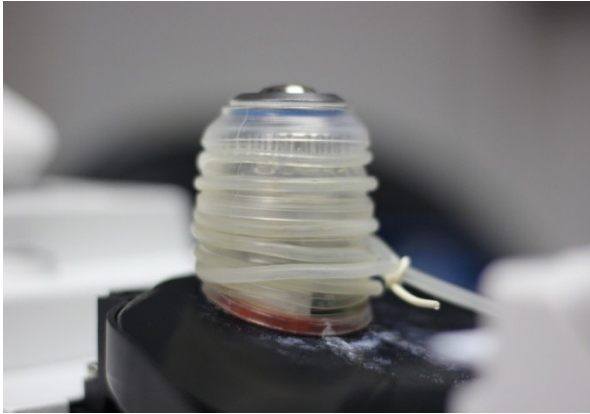


Abbildung 66: Installation der Kühlkreislaufes für das Objektiv. Dieses wurde mit einer Gummimanschette umhüllt um die wiederum ein dünner Schlauch gewickelt wurde, durch den das Kühlwasser geleitet wird. Feuchtigkeit (z.B. Kondenswasser oder durch reißen des Schlauches) läuft außen an der Manschette ab und wird separat aufgefangen, ohne in das Mikroskop zu gelangen.

13.4.2 Bestimmung der idealen Z-Position des Objektivs

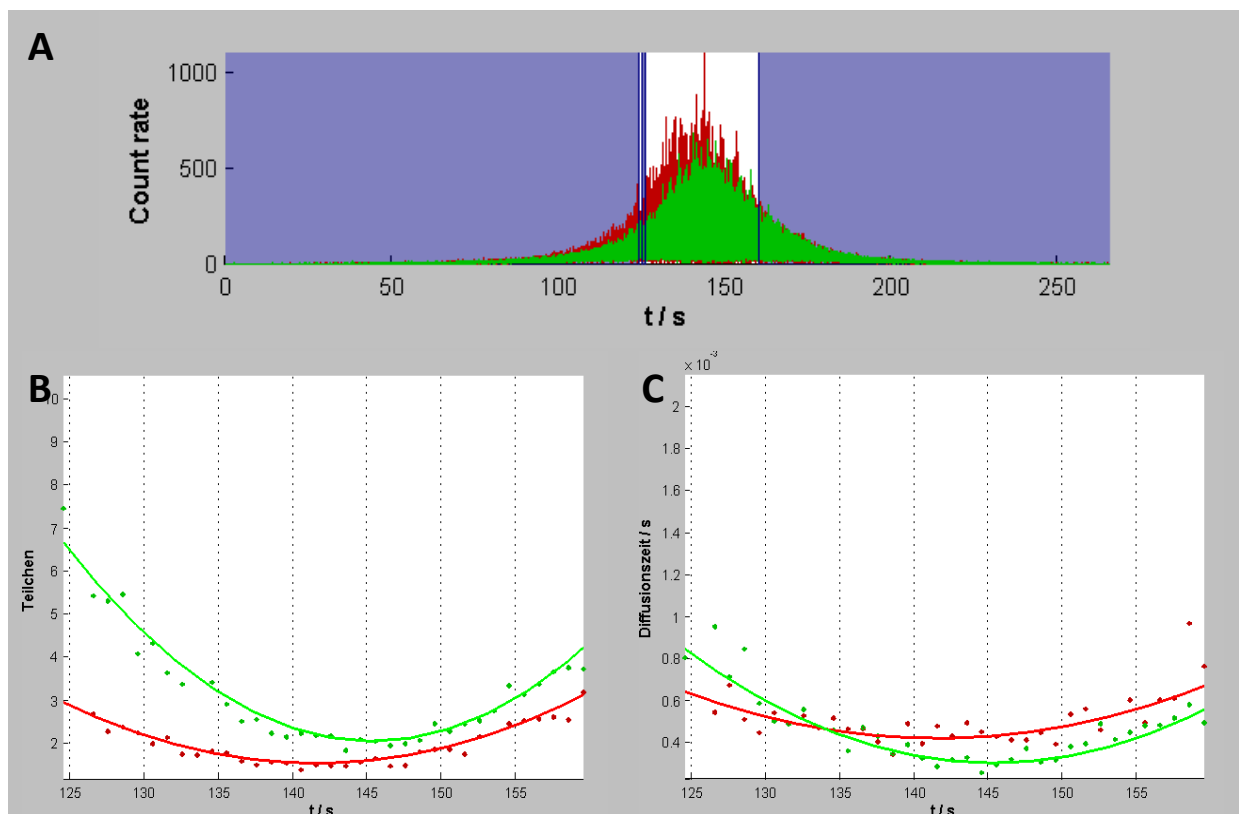


Abbildung 67: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,51 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

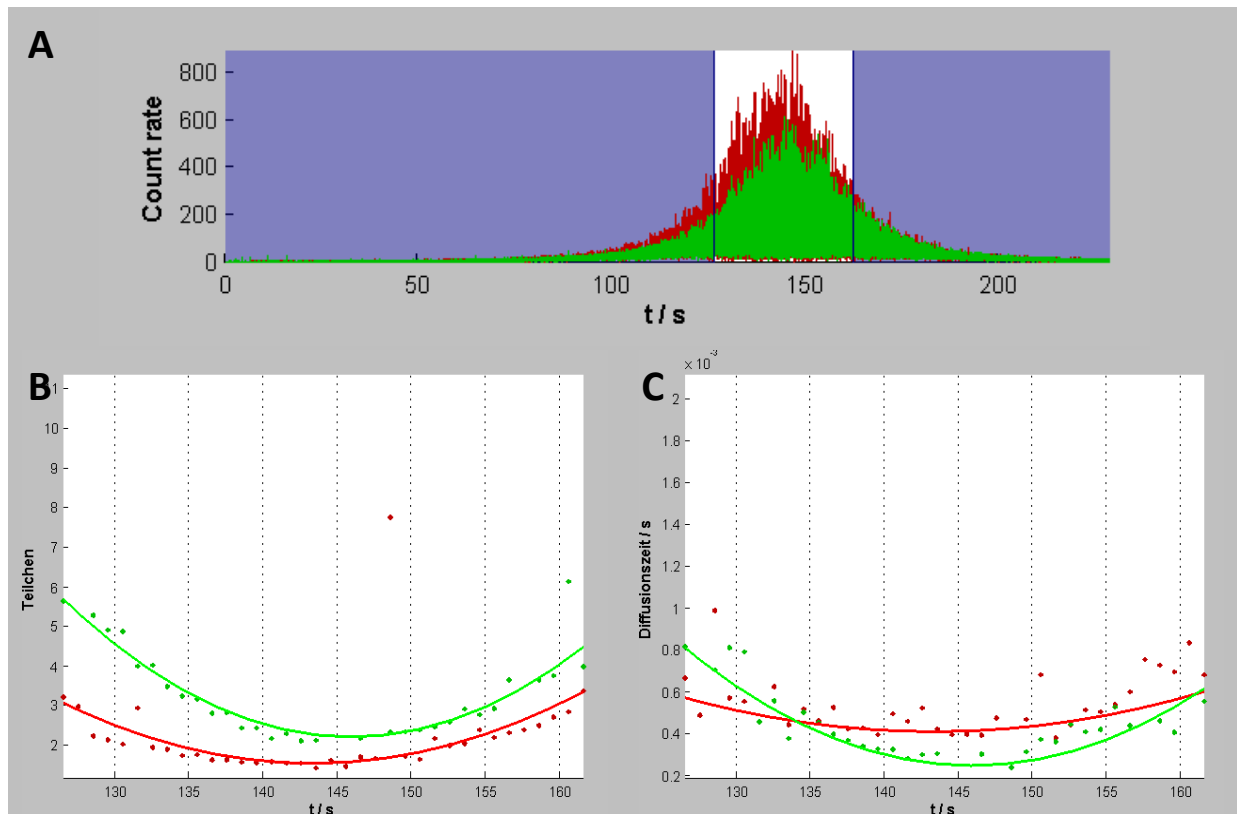


Abbildung 68: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,52 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

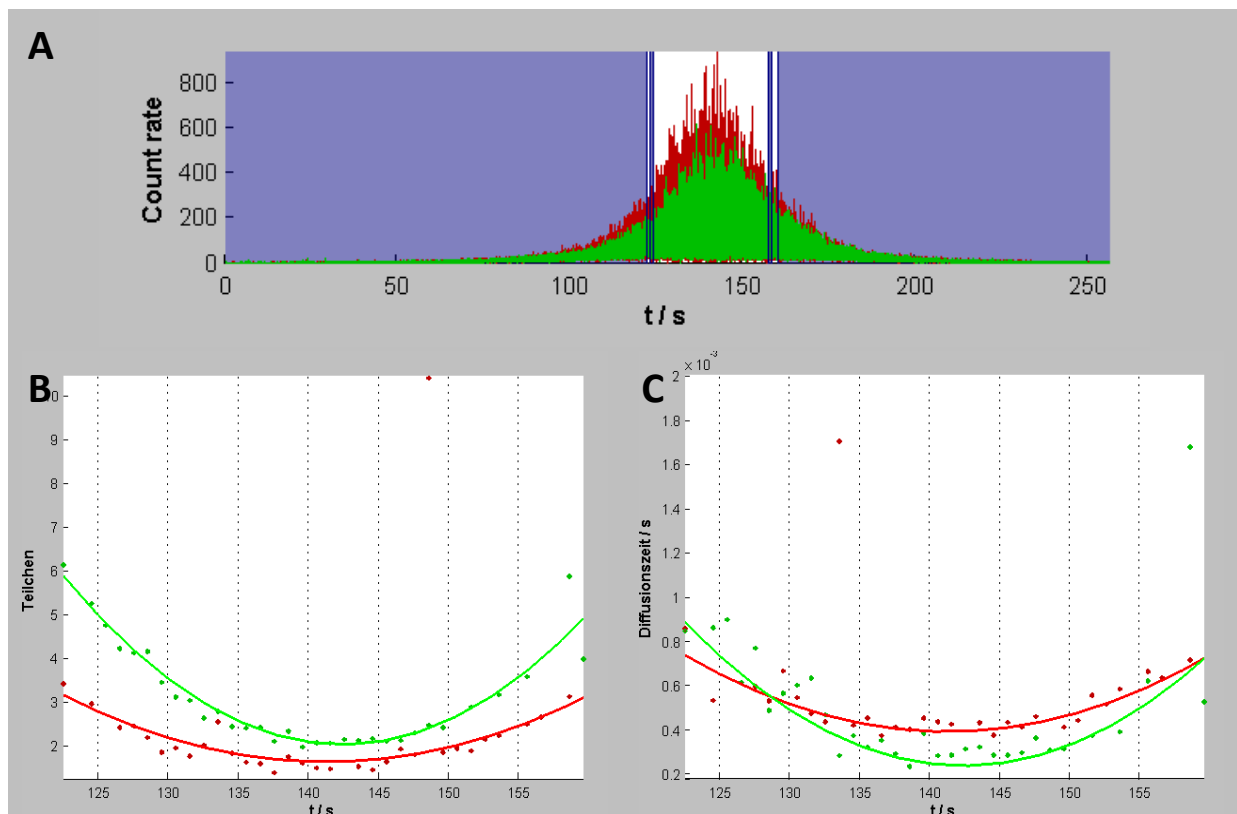


Abbildung 69: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,53 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

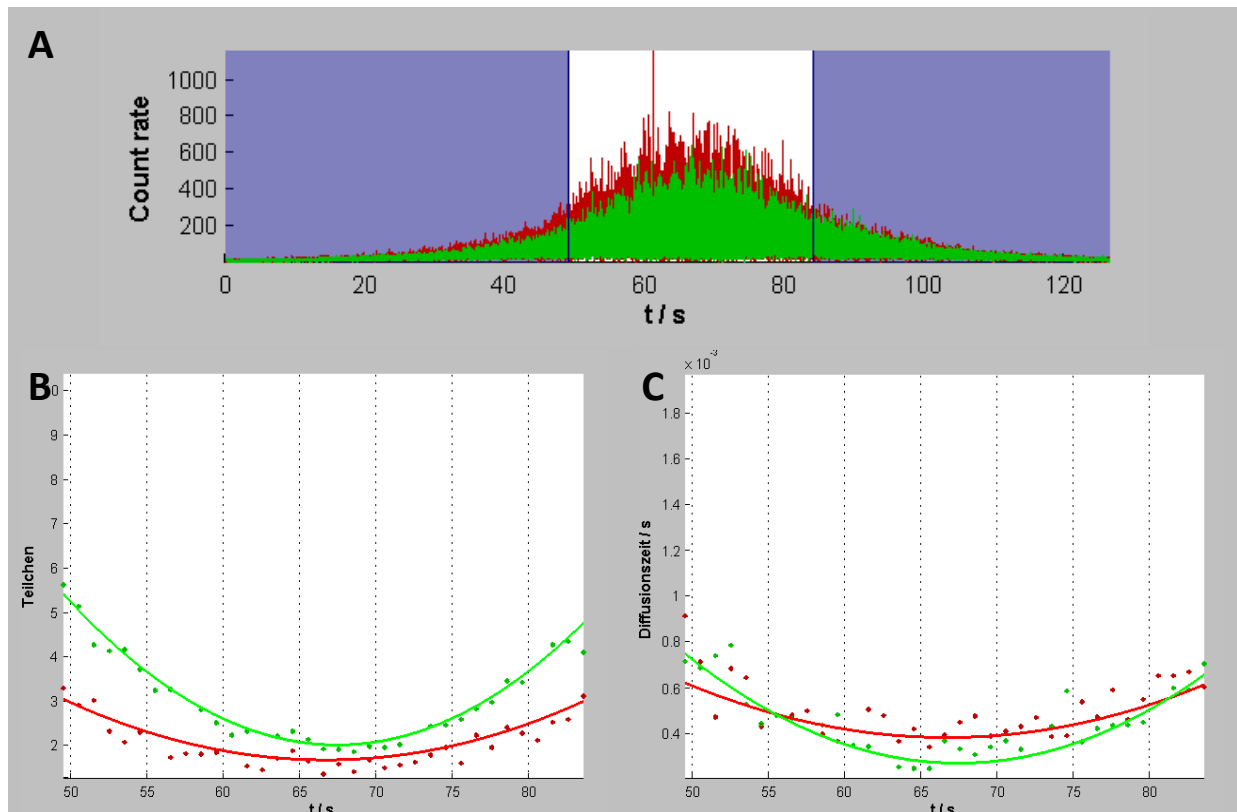


Abbildung 70: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,54 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

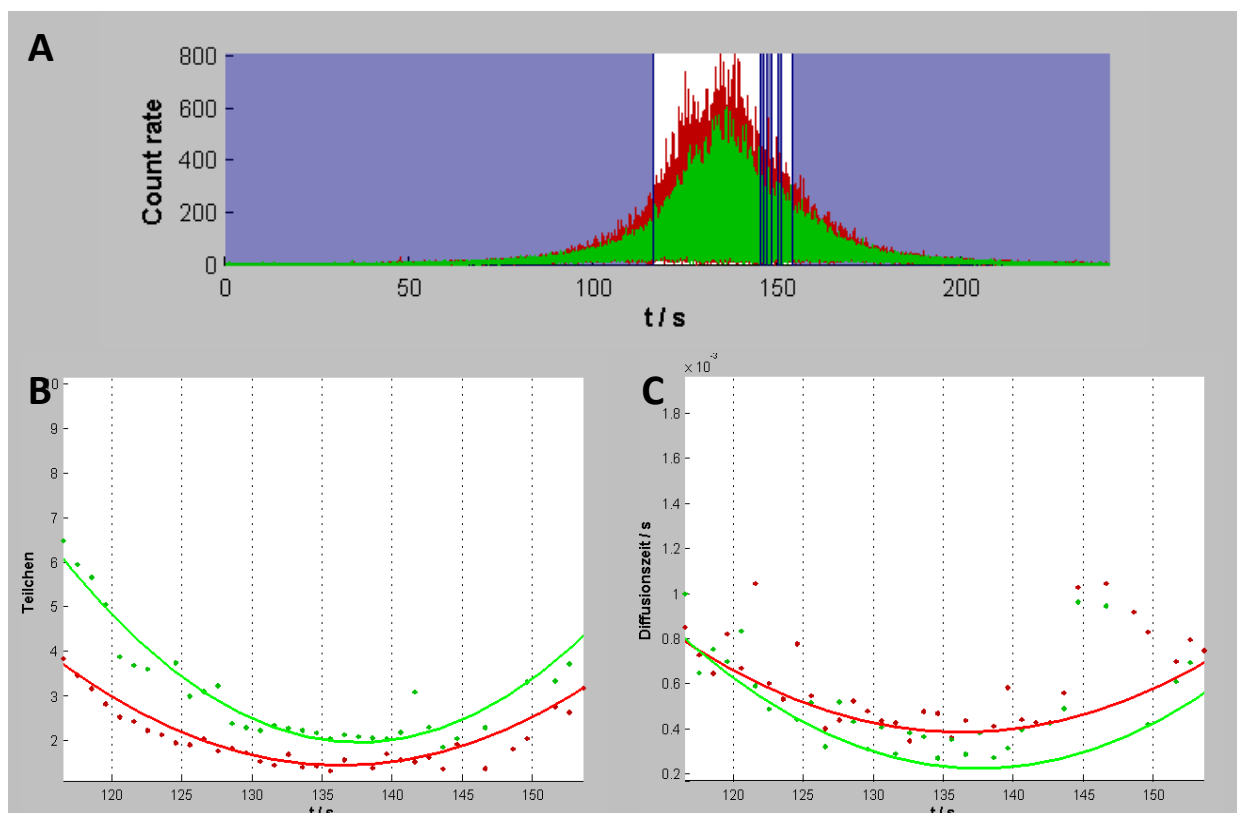


Abbildung 71: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,55 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

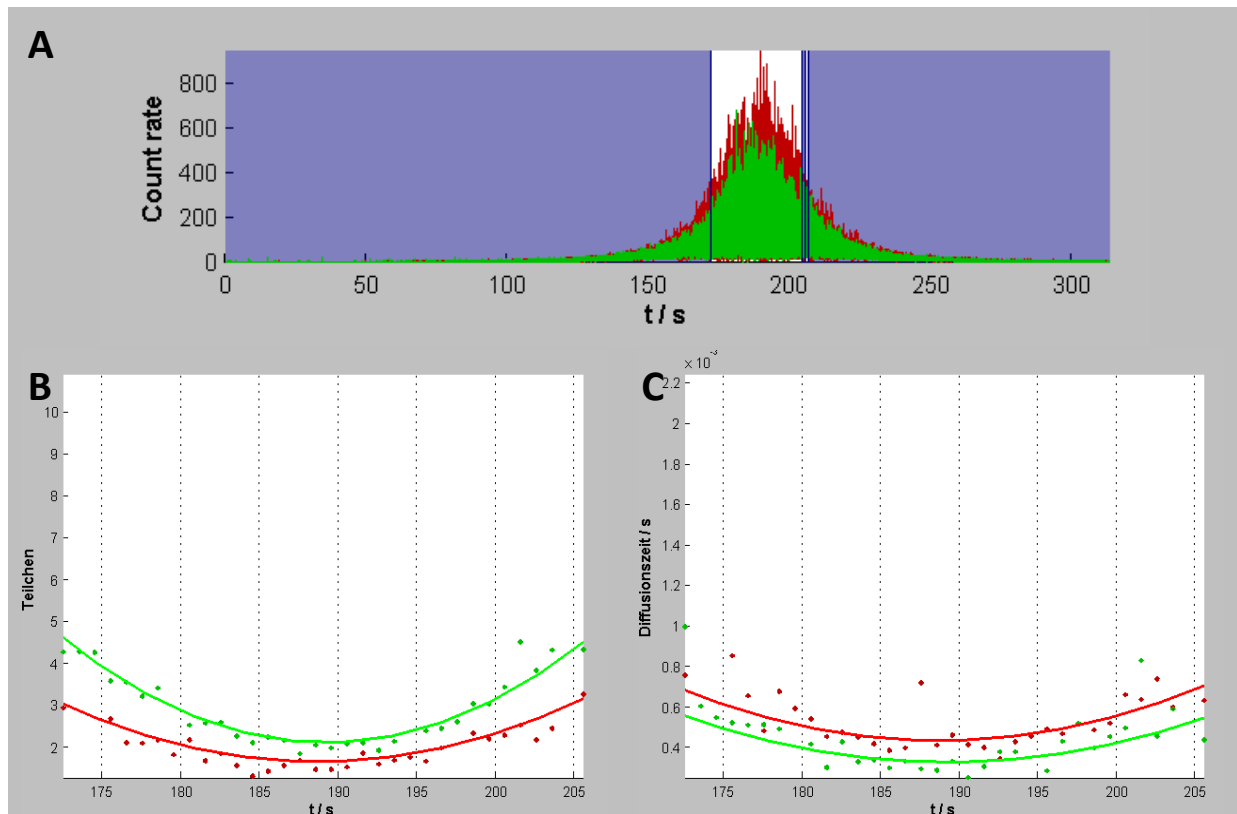


Abbildung 72: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,56 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

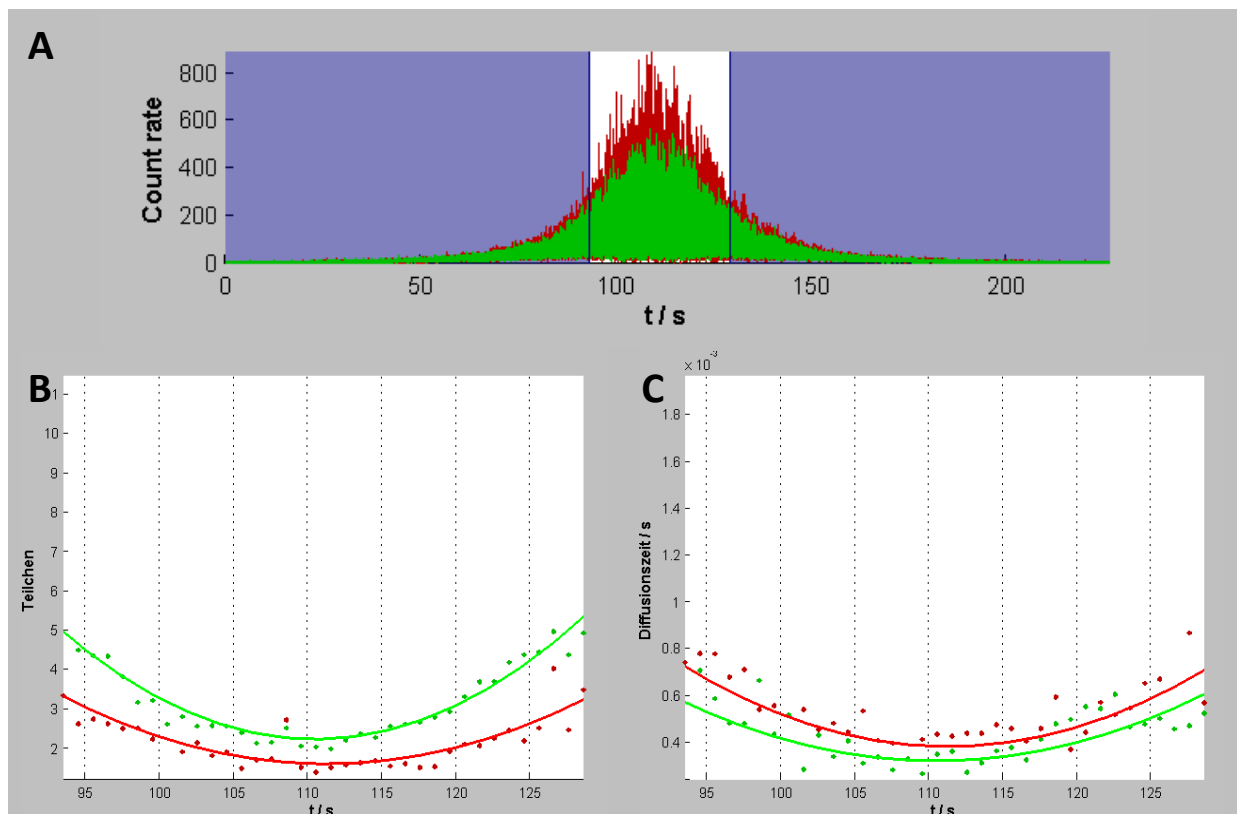


Abbildung 73: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,57 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

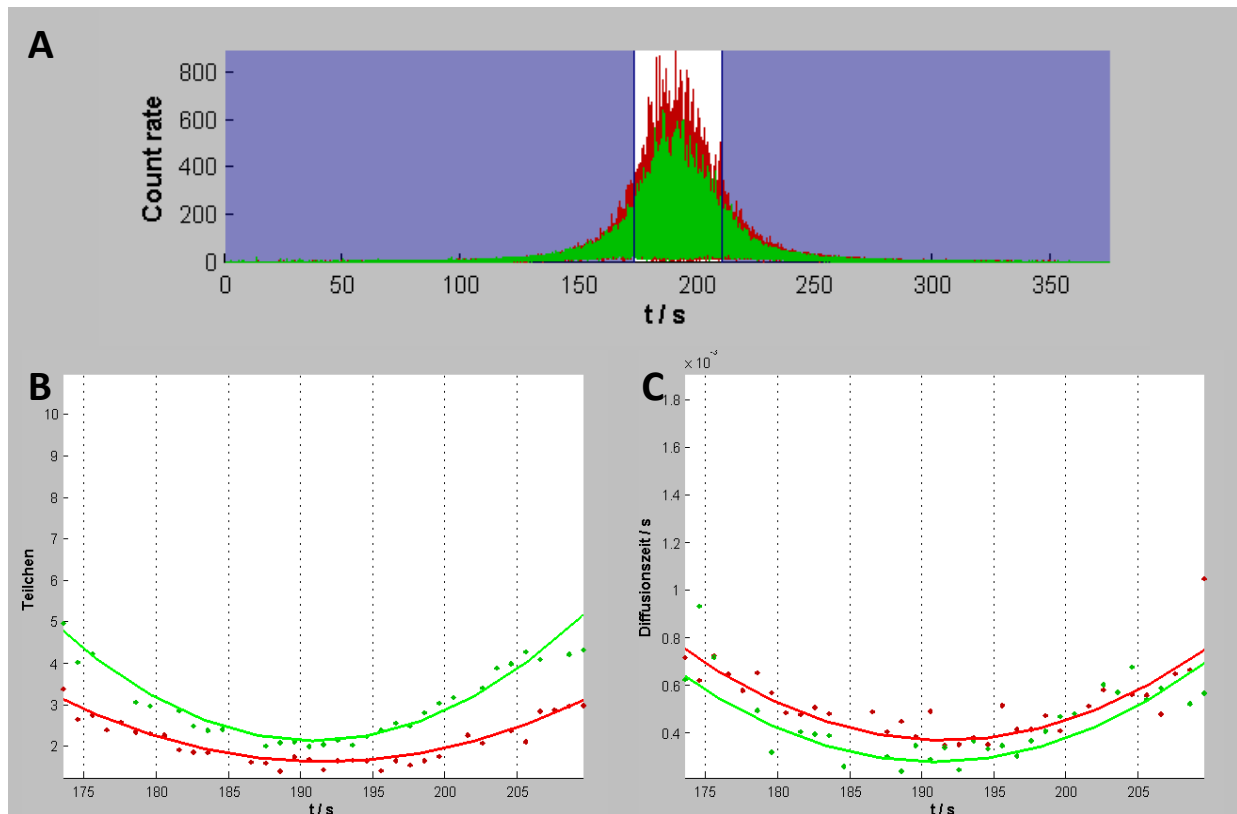


Abbildung 74: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,58 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

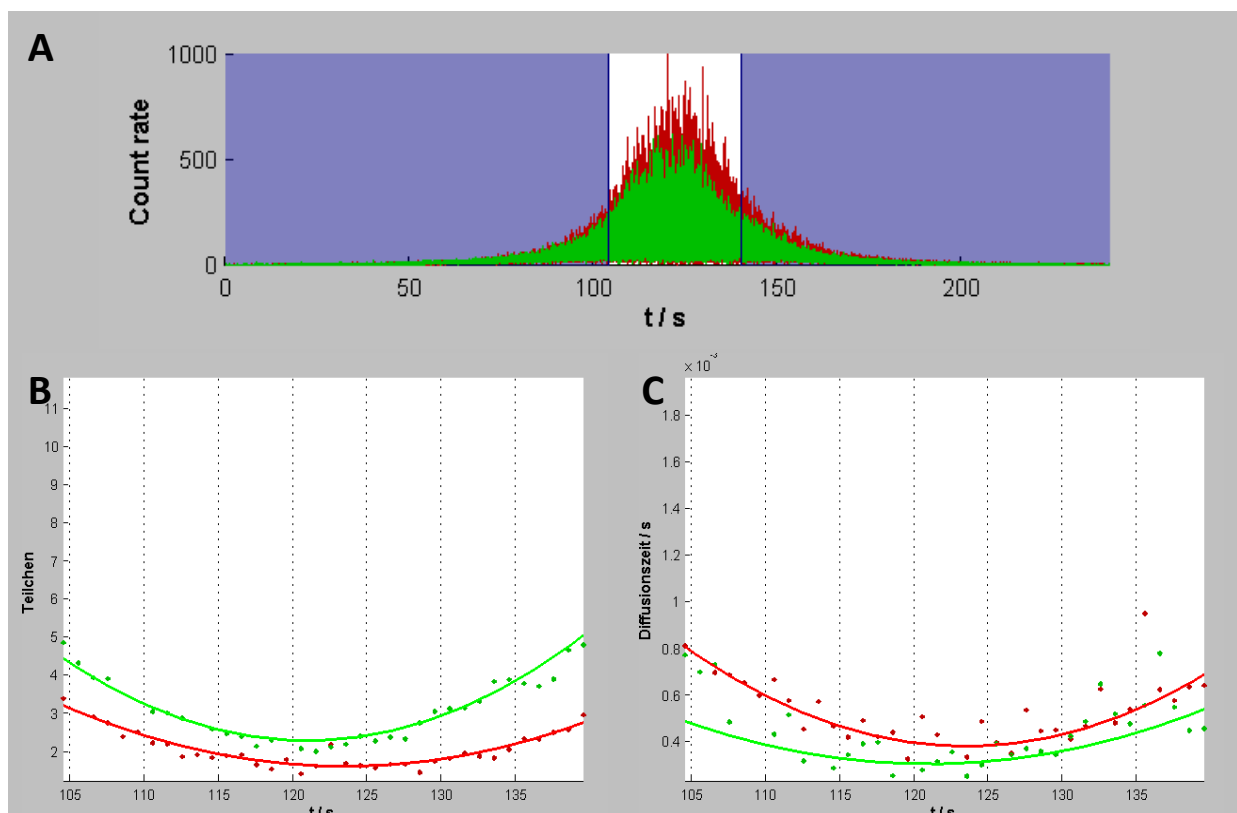


Abbildung 75: Fluktuationssignale (Bild A) bei einer Z-Position des Objektivs bei 3,59 mm. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl, (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Bei allen Graphiken werden die Detektionskanäle 1 (—) und 2 (—) gezeigt (Segmentlänge: 1 s).

Tabelle 27: Zusammenfassung Fokusüberlappung in Abhängigkeit der Z-Position des Objektivs

Z-Position	N_{\min} (Kanal 1)	N_{\min} (Kanal 2)	$\tau_{D_{\min}}$ Kanal 1 / ms	$\tau_{D_{\min}}$ Kanal 1 / ms
3,51	1,56	2,07	0,42	0,30
3,52	1,56	2,23	0,41	0,25
3,53	1,66	2,05	0,39	0,24
3,54	1,69	2,03	0,39	0,27
3,55	1,46	1,98	0,38	0,22
3,56	1,67	2,12	0,44	0,33
3,57	1,62	2,25	0,39	0,32
3,58	1,65	2,15	0,37	0,28
3,59	1,63	2,31	0,38	0,31

13.4.3 Monoschichtstabilität/Fluoreszenzstabilität bei verschiedenen Laserleistungen

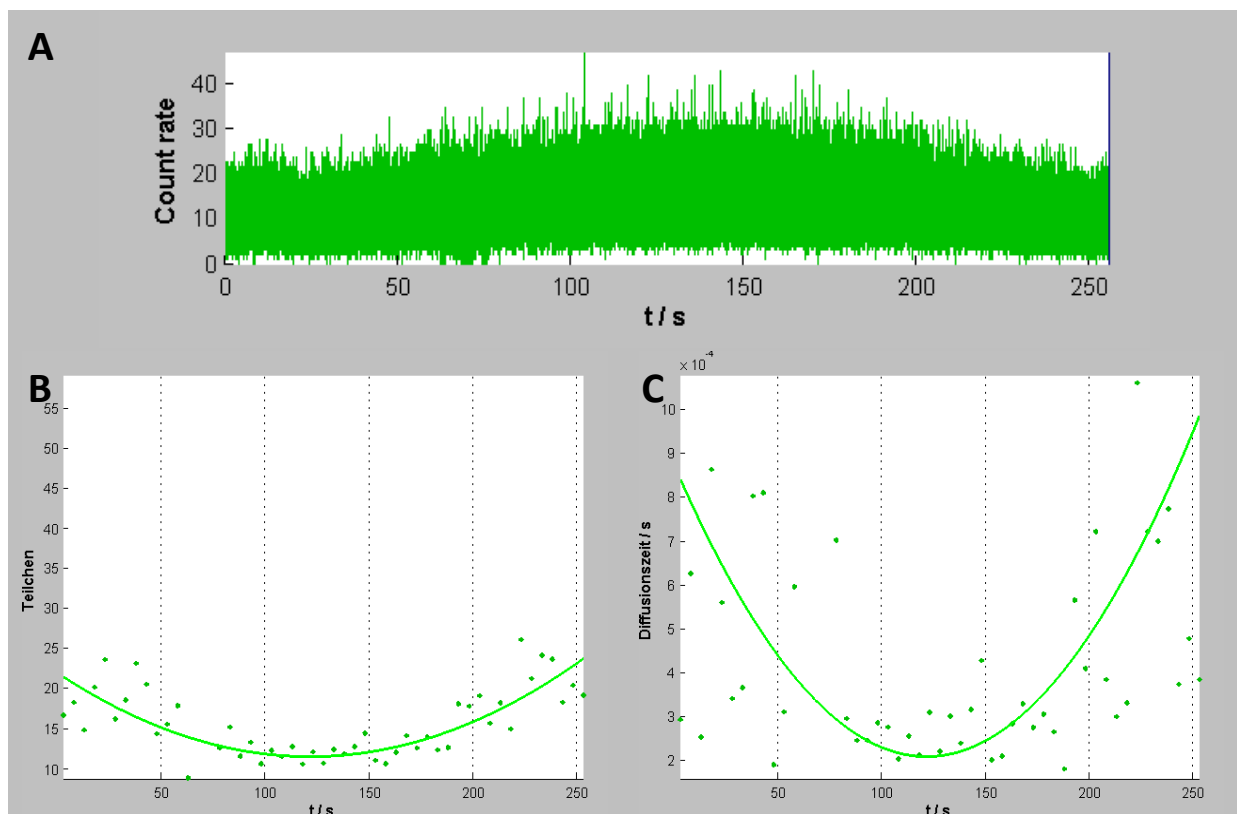


Abbildung 76: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

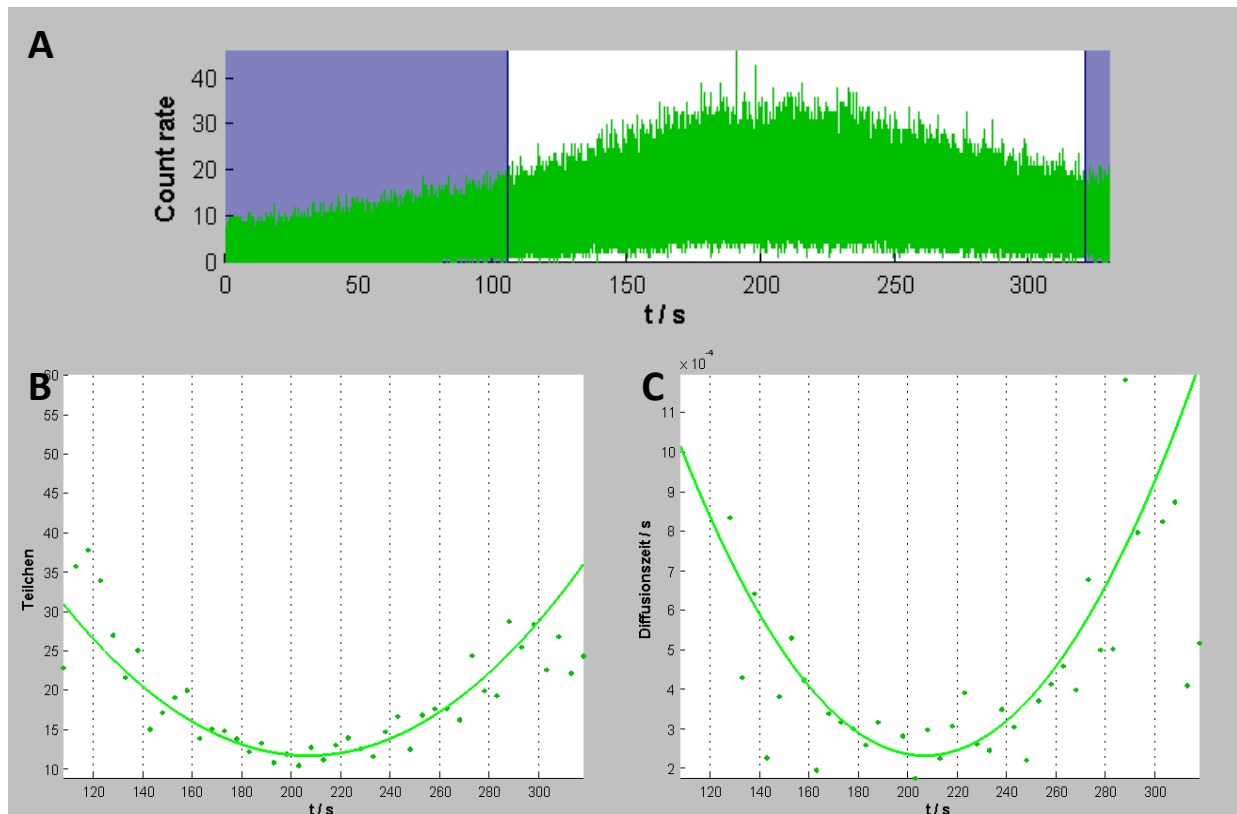


Abbildung 77: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

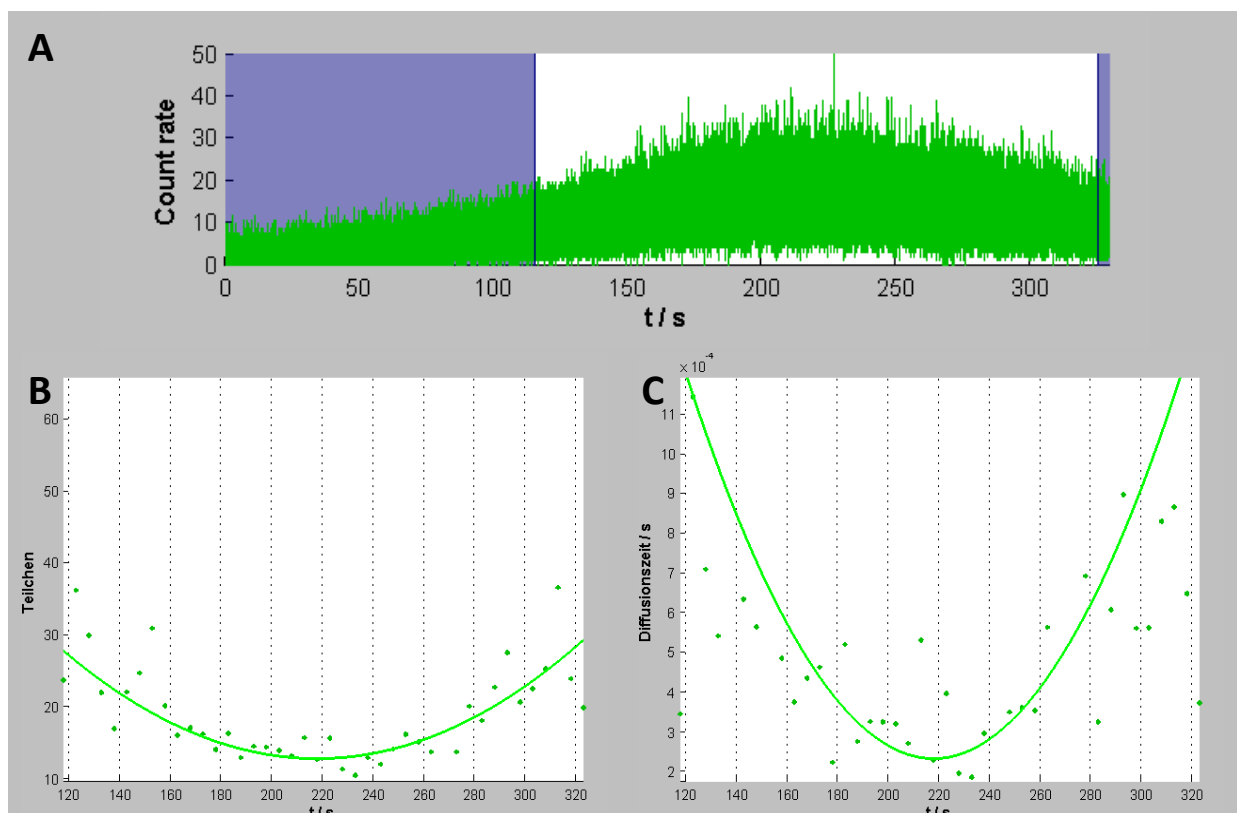


Abbildung 78: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

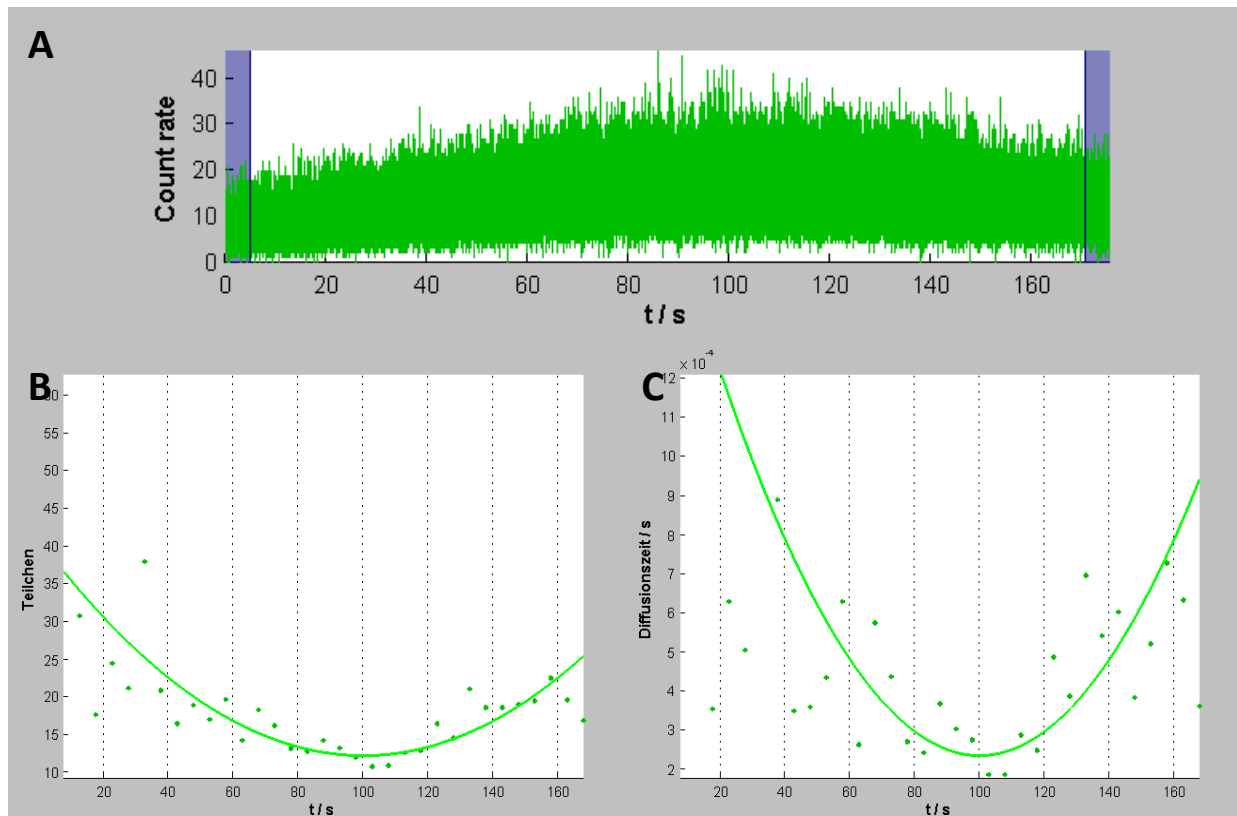


Abbildung 79: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 4). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

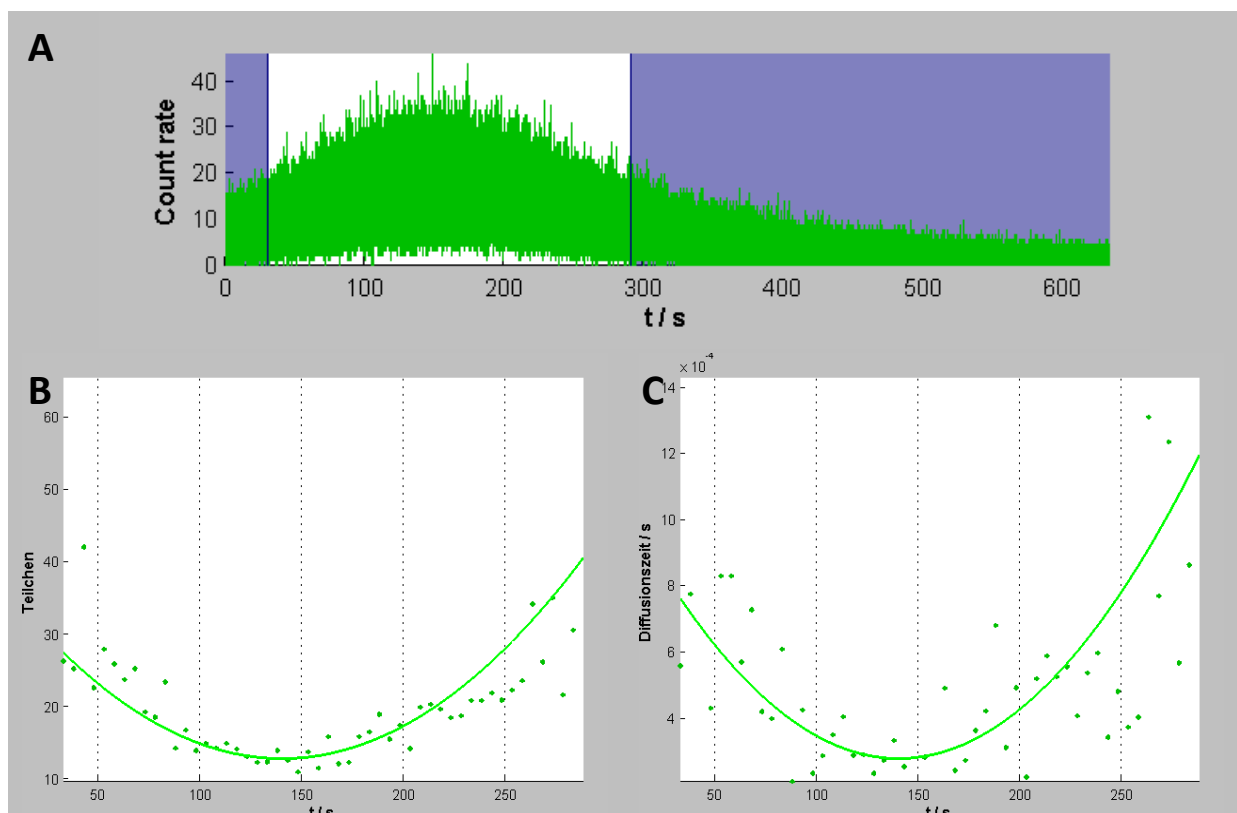


Abbildung 80: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 5). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

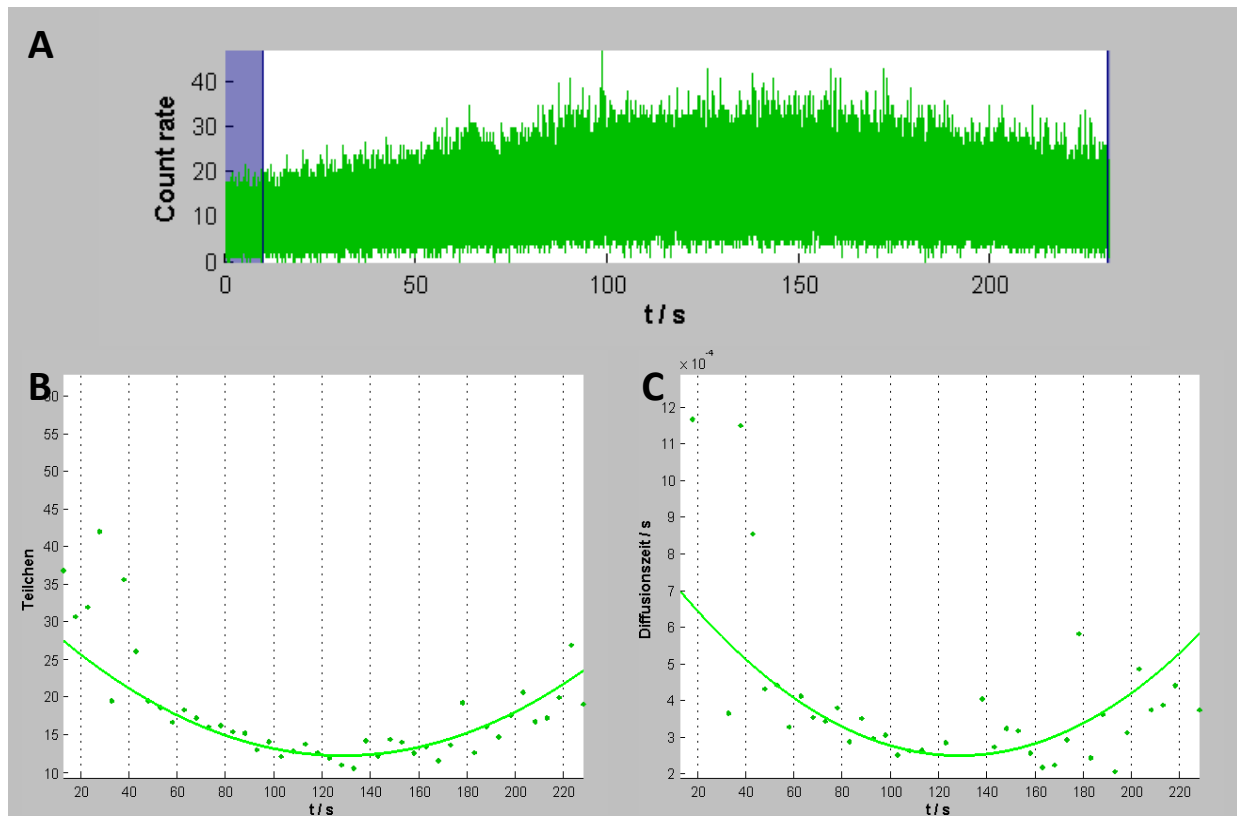


Abbildung 81: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 6). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

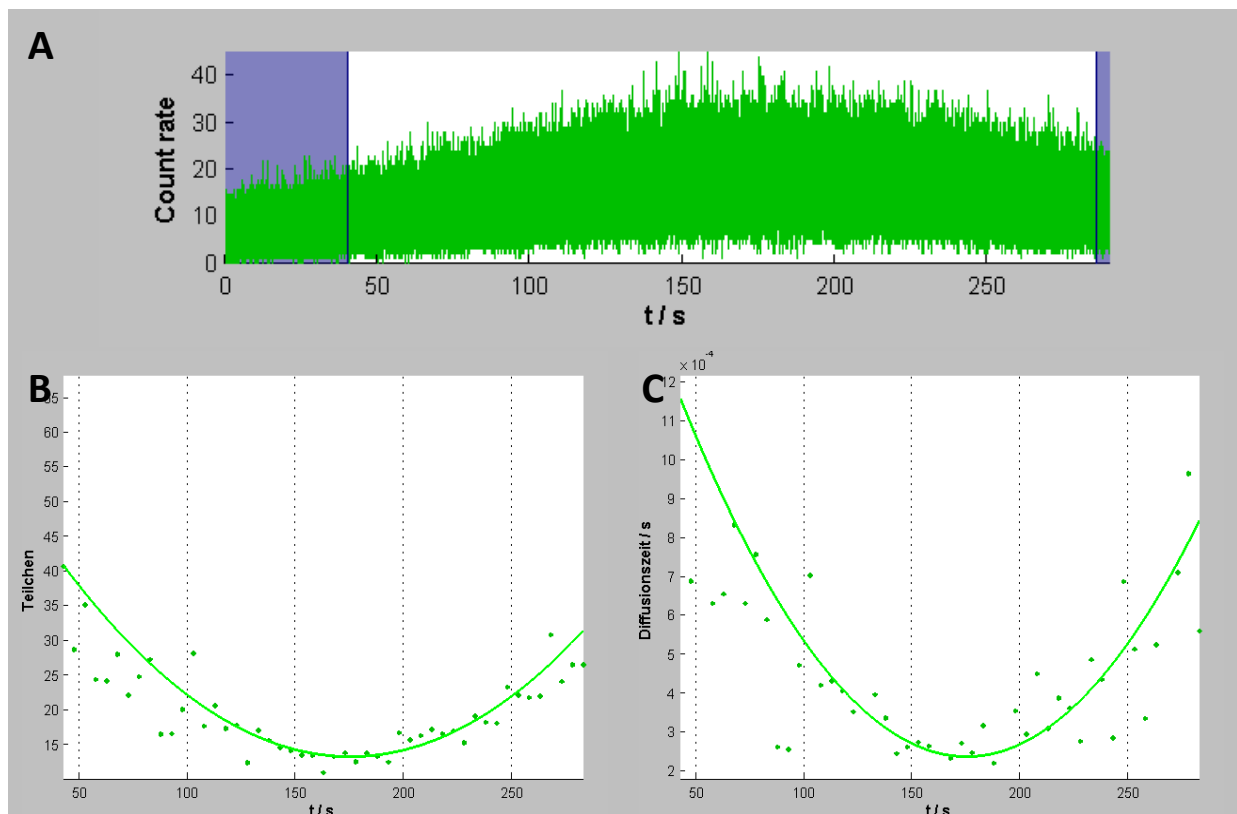


Abbildung 82: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,19 \mu\text{W}$ (Messung 7). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

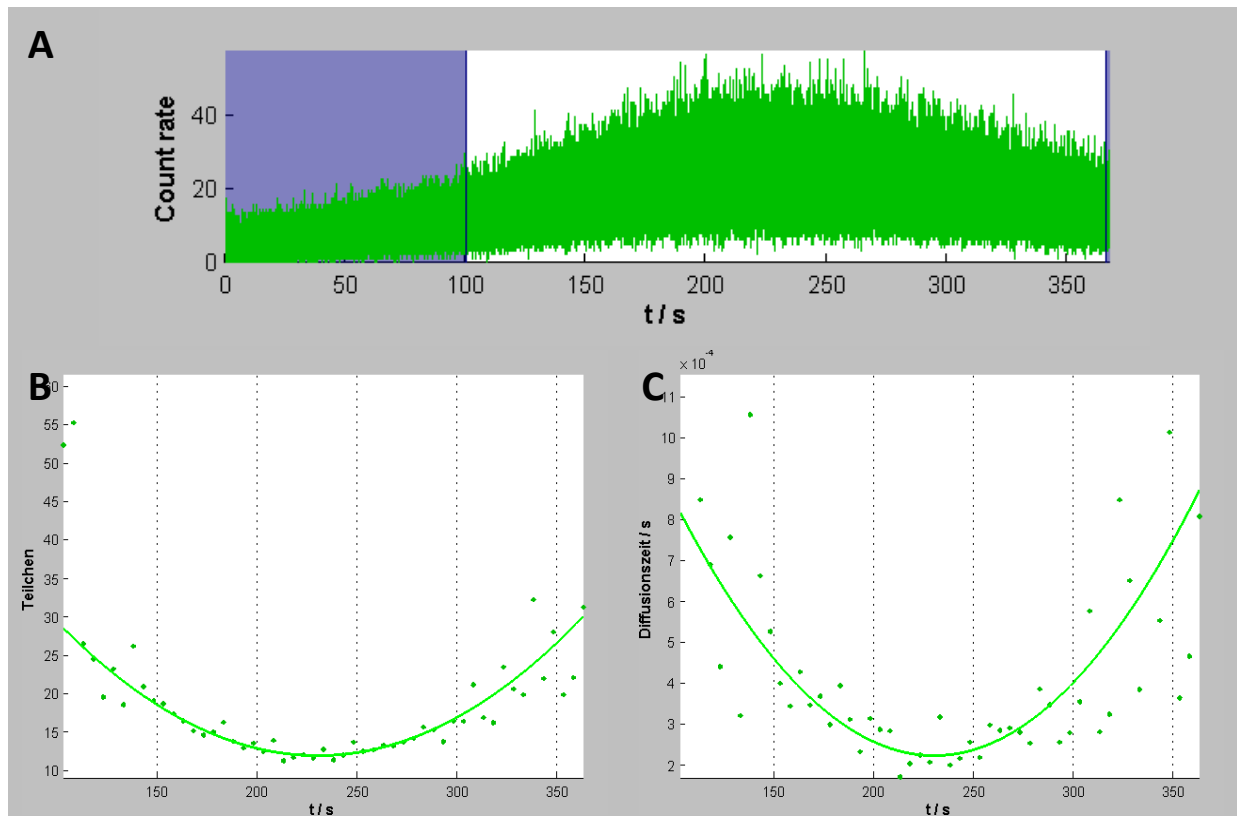


Abbildung 83: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,33 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

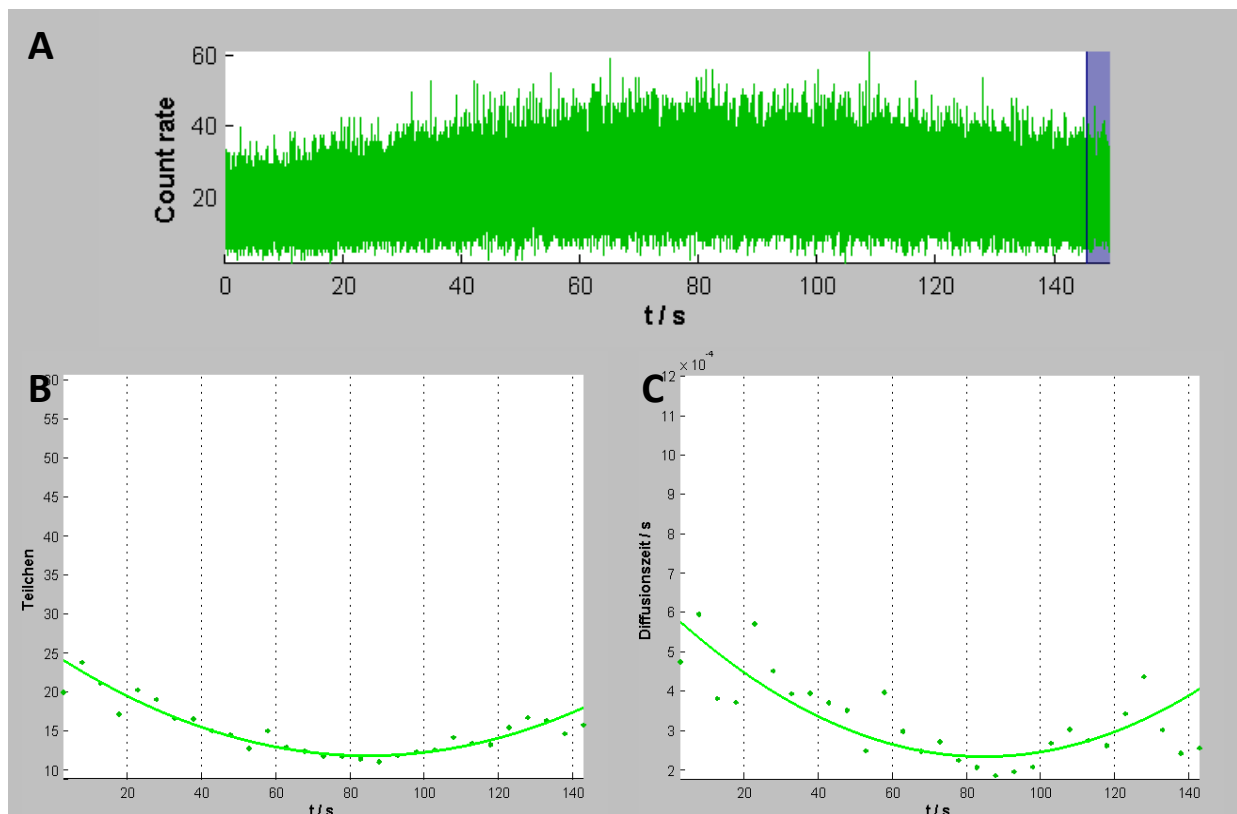


Abbildung 84: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,33 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

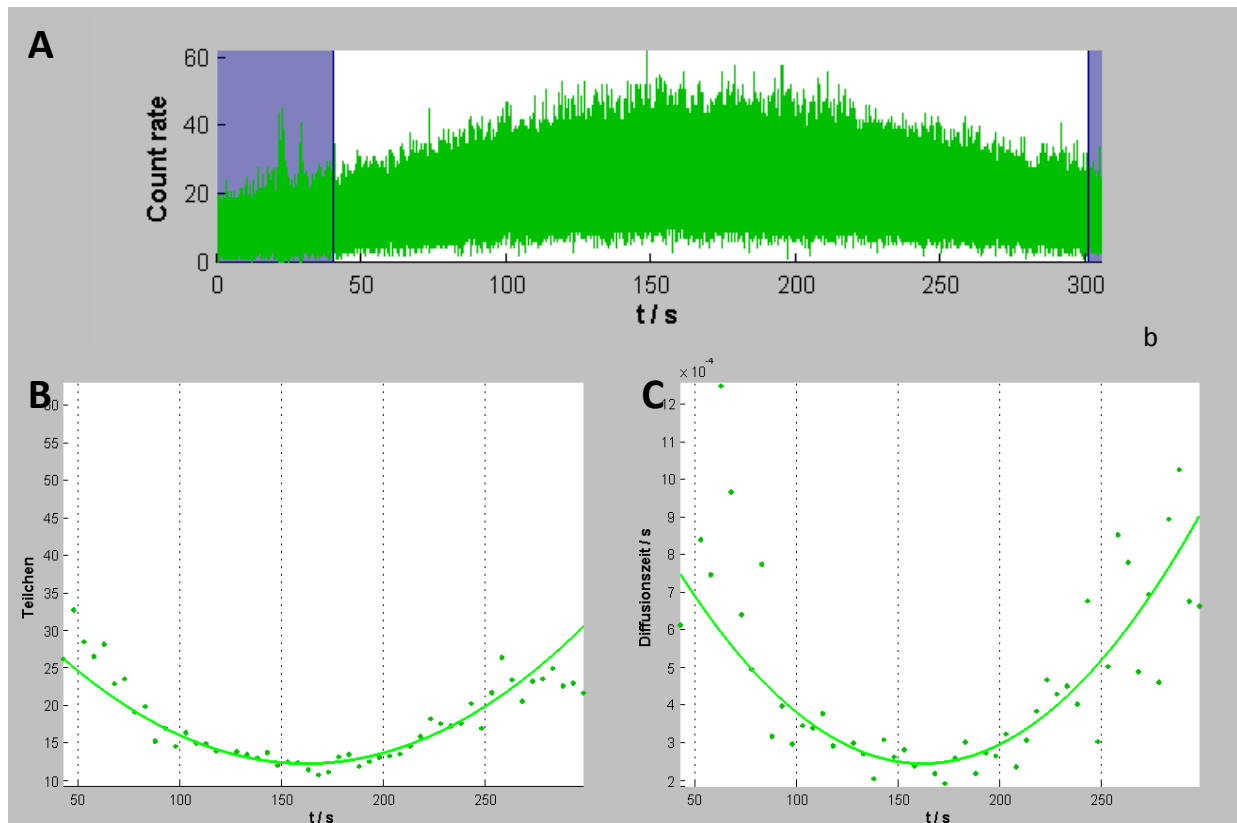


Abbildung 85: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,33 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

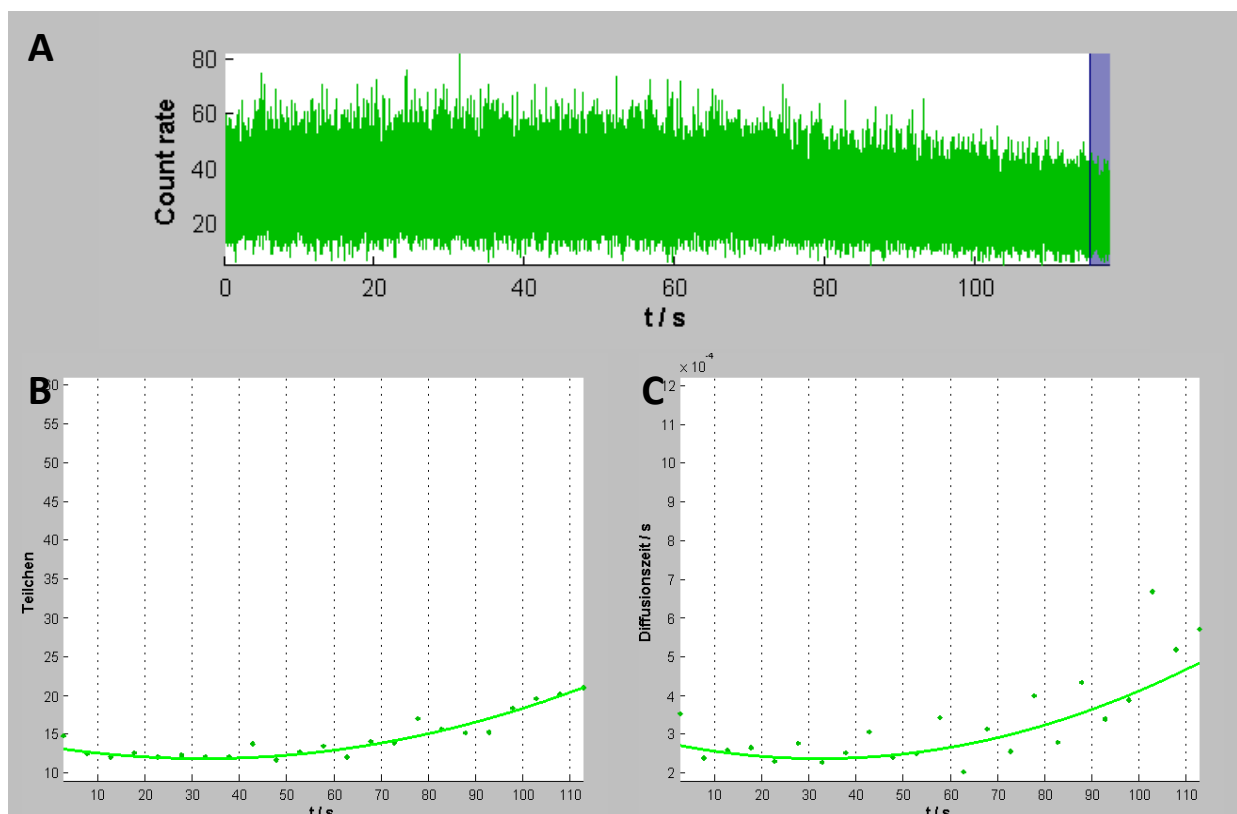


Abbildung 86: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,73 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

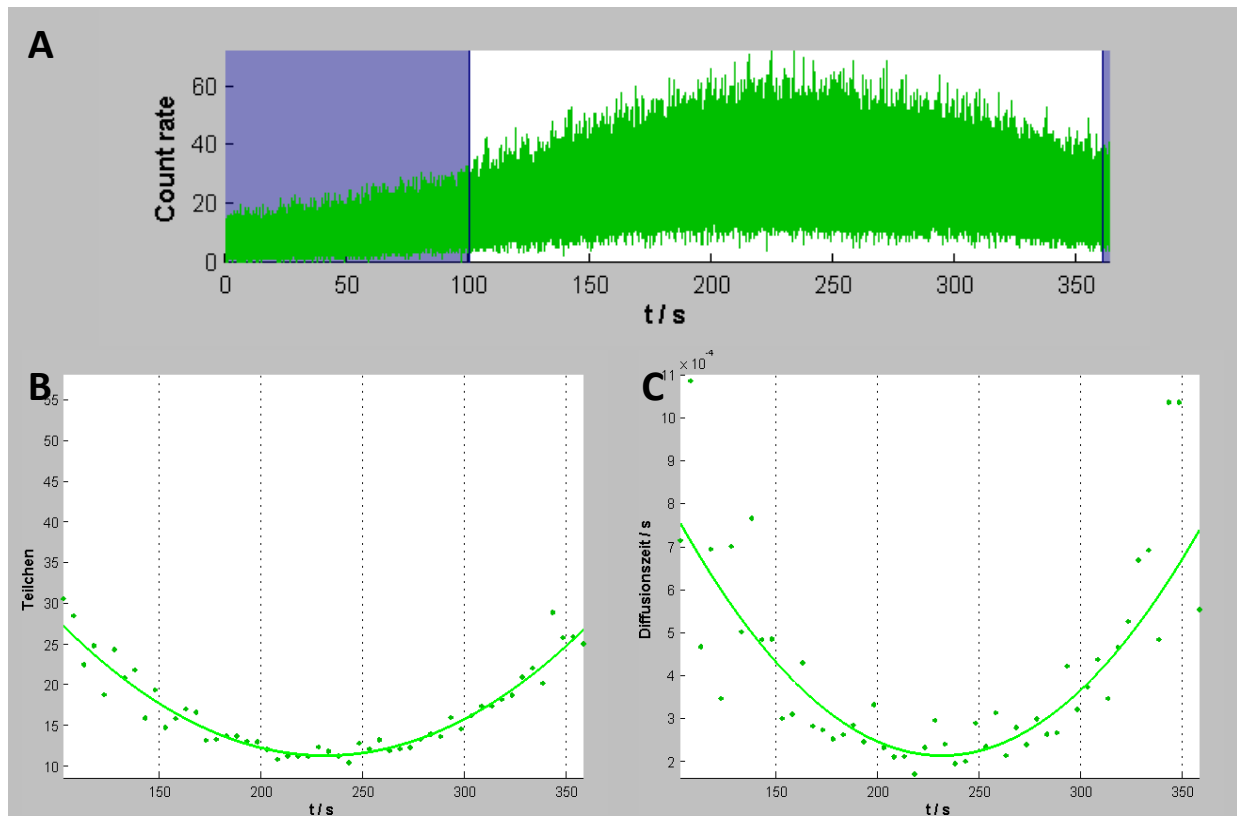


Abbildung 87: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,73 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

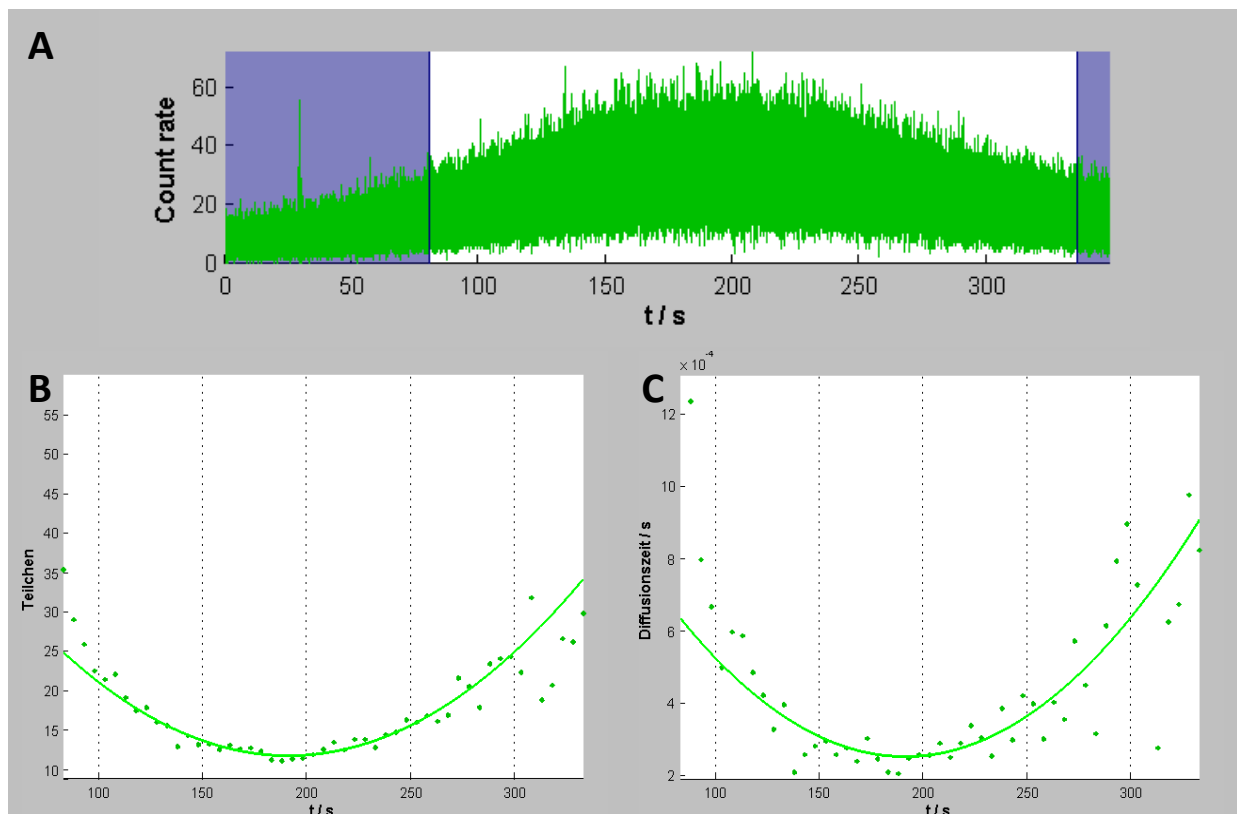


Abbildung 88: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,73 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

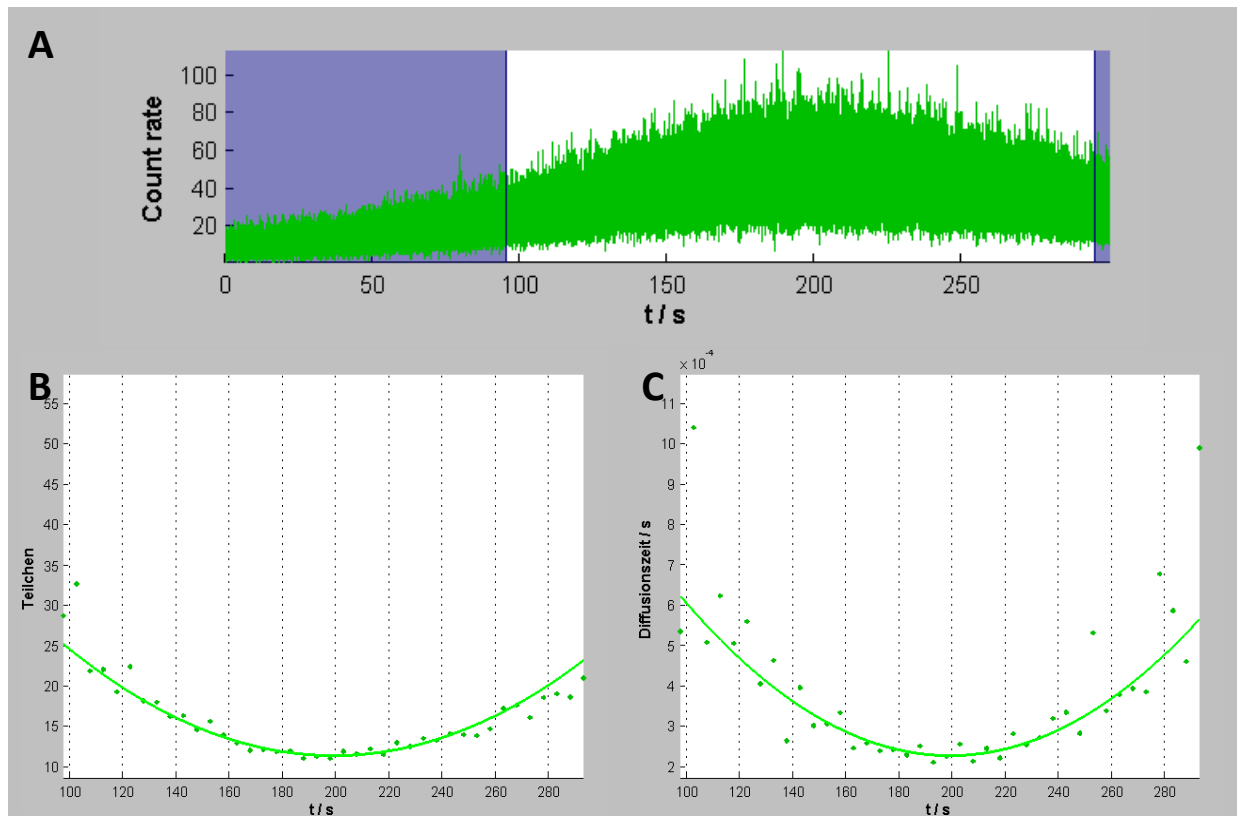


Abbildung 89: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,86 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

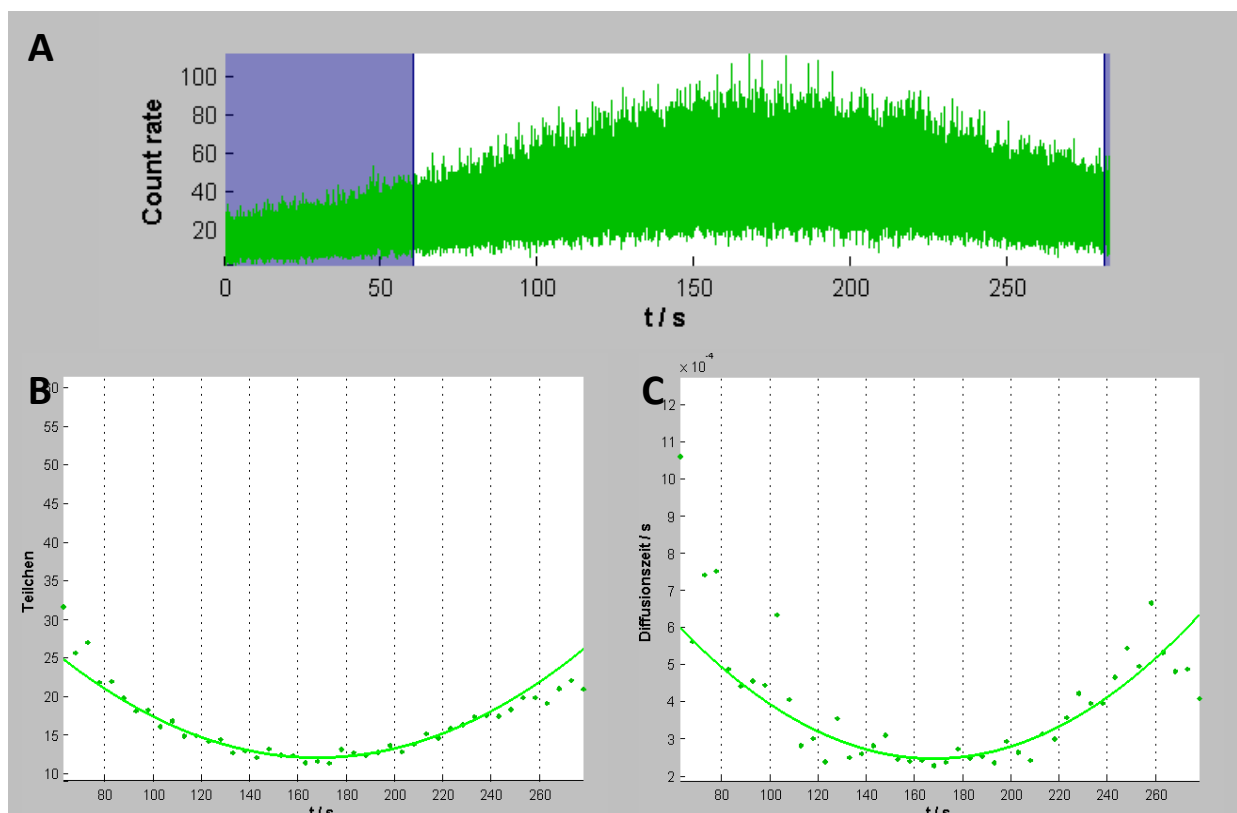


Abbildung 90: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,86 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

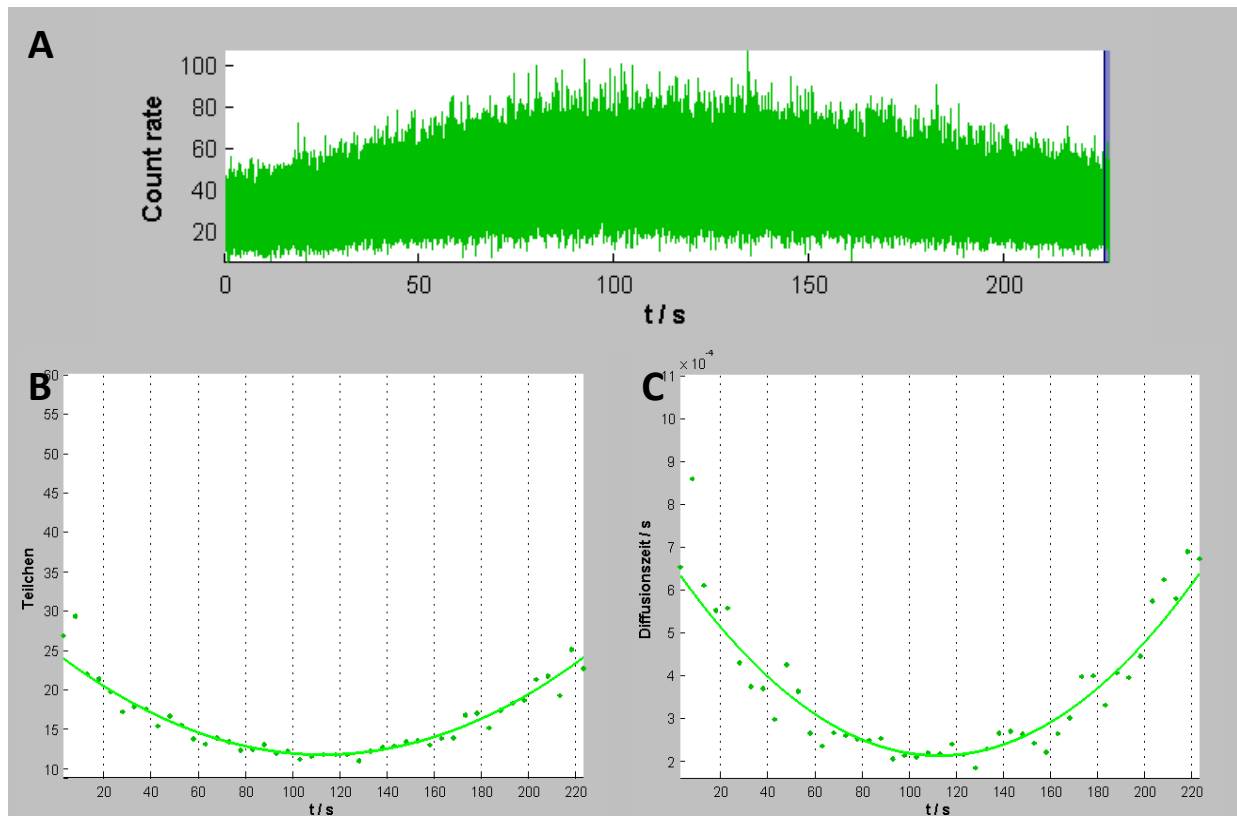


Abbildung 91: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $0,86 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

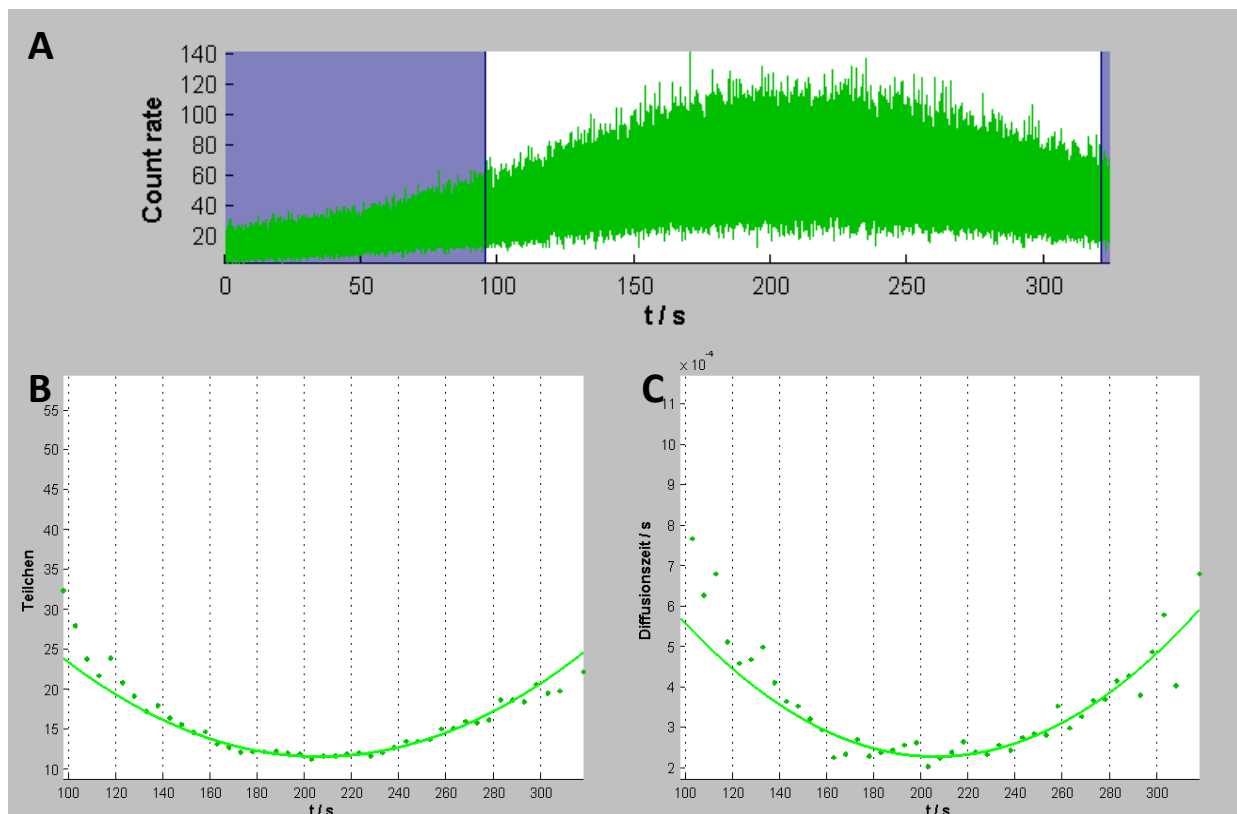


Abbildung 92: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,32 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

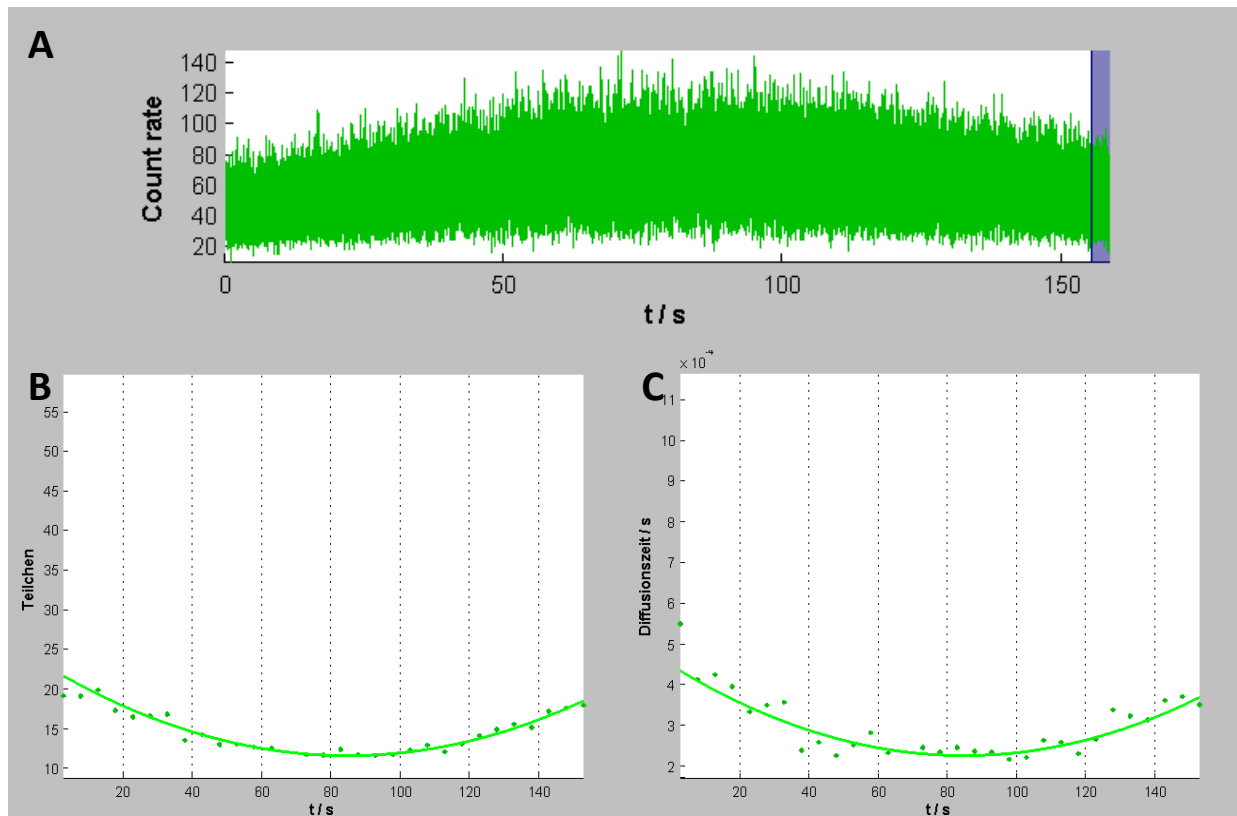


Abbildung 93: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,32 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

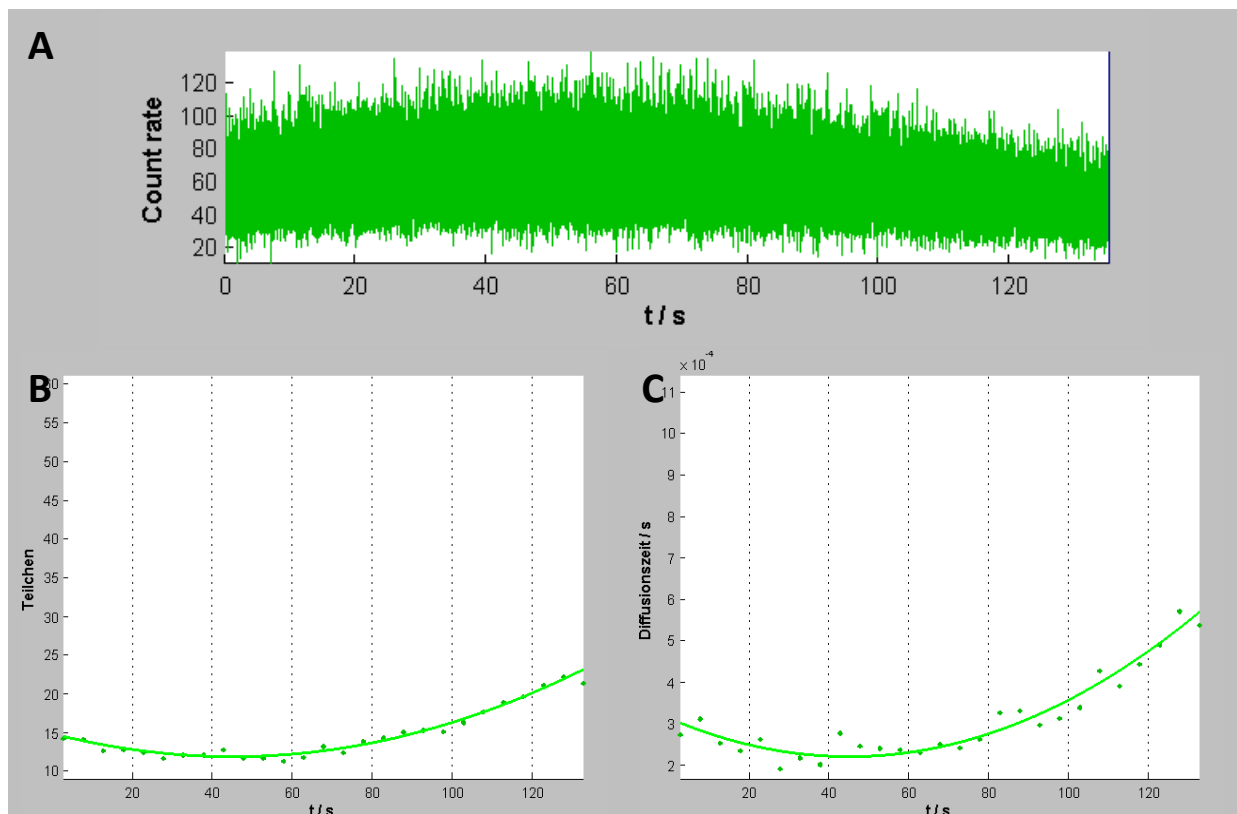


Abbildung 94: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,32 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

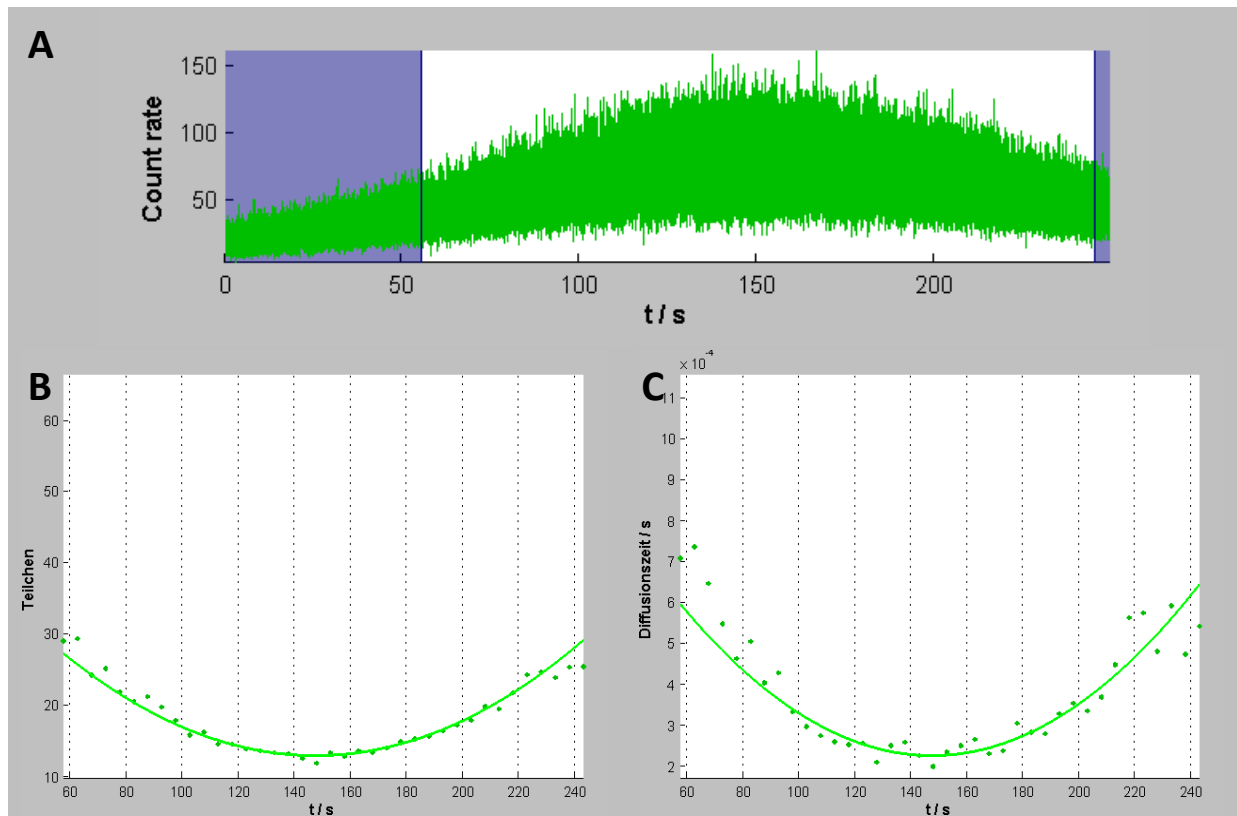


Abbildung 95: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,32 \mu\text{W}$ (Messung 4). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

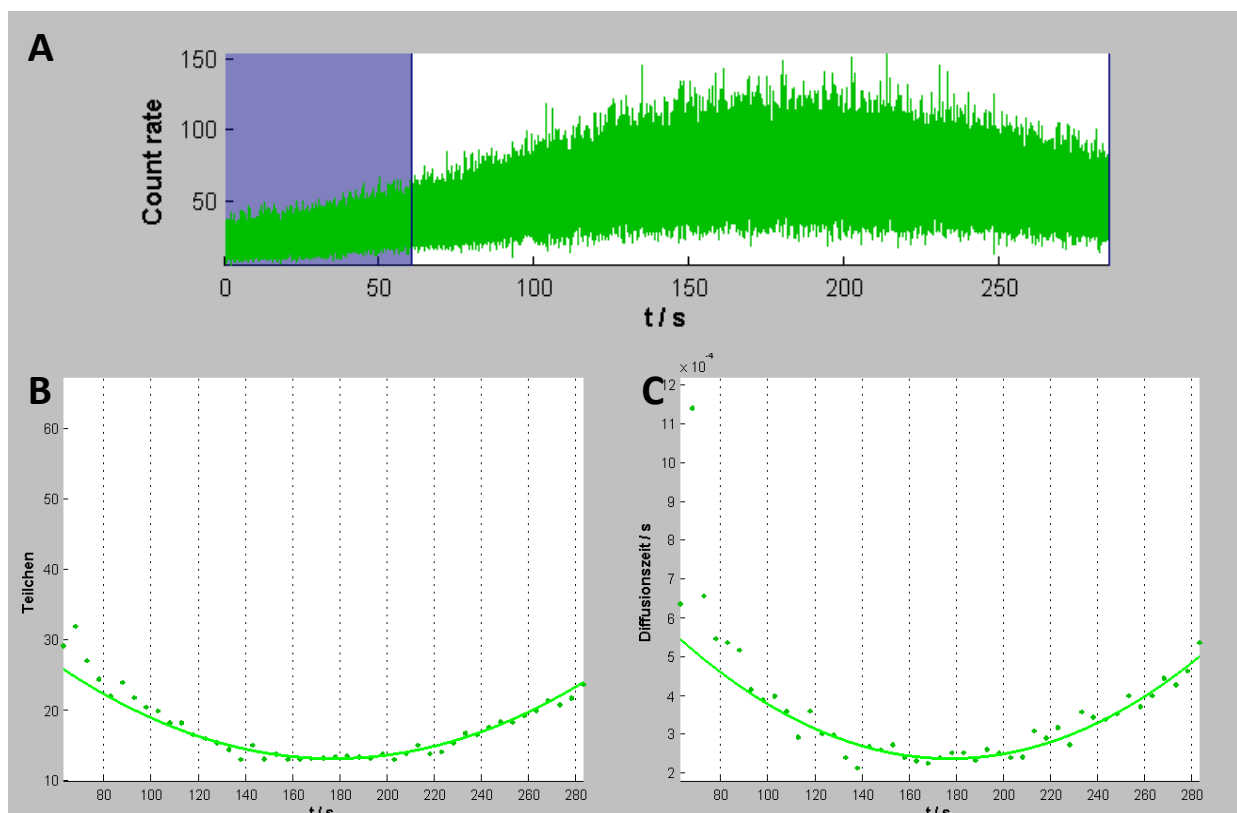


Abbildung 96: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,32 \mu\text{W}$ (Messung 5). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

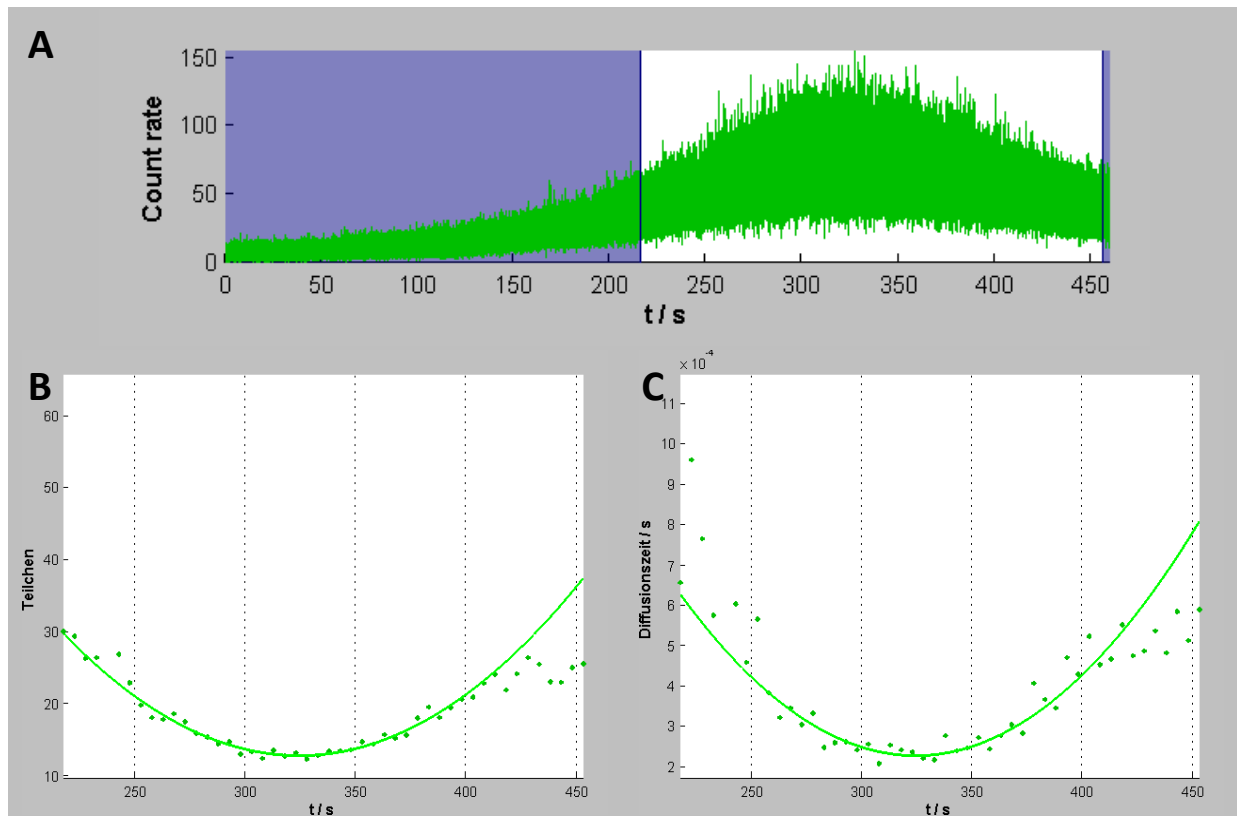


Abbildung 97: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 1,32 μW (Messung 6). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

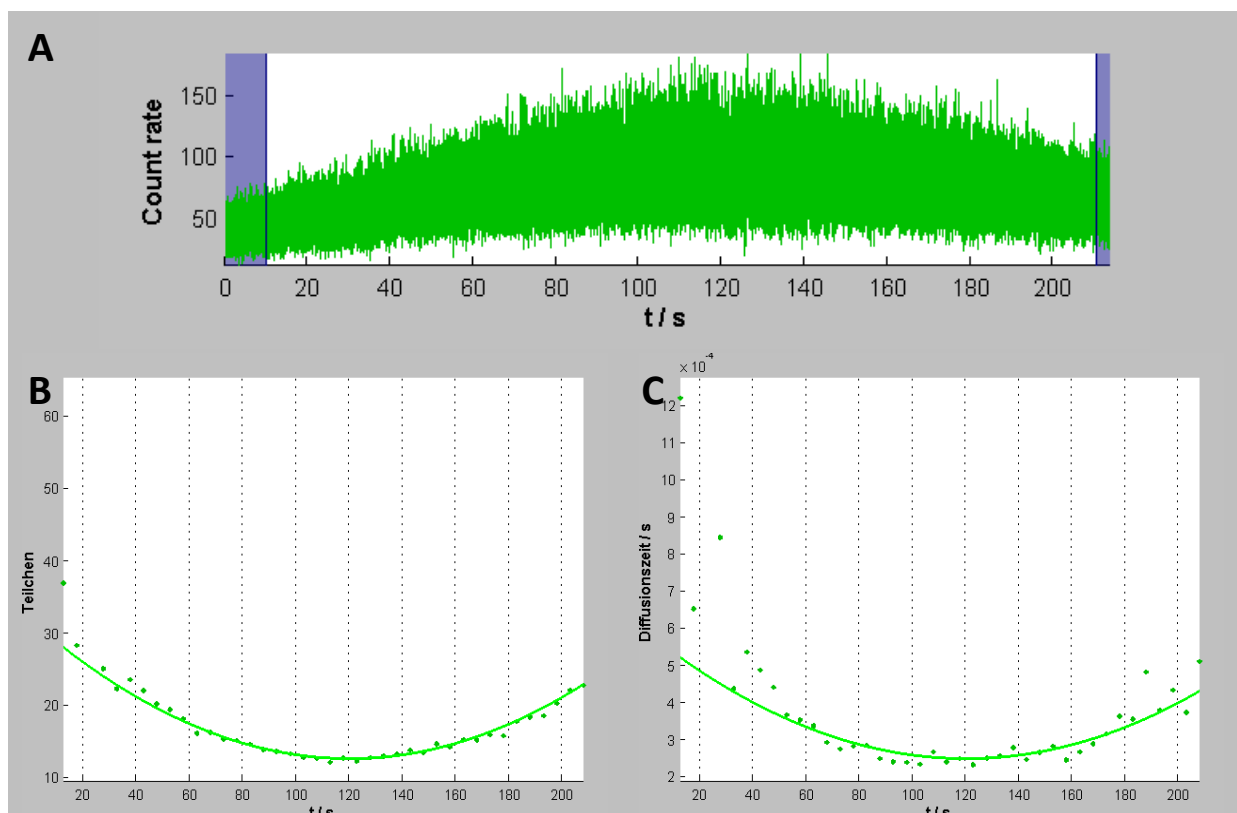


Abbildung 98: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 1,66 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

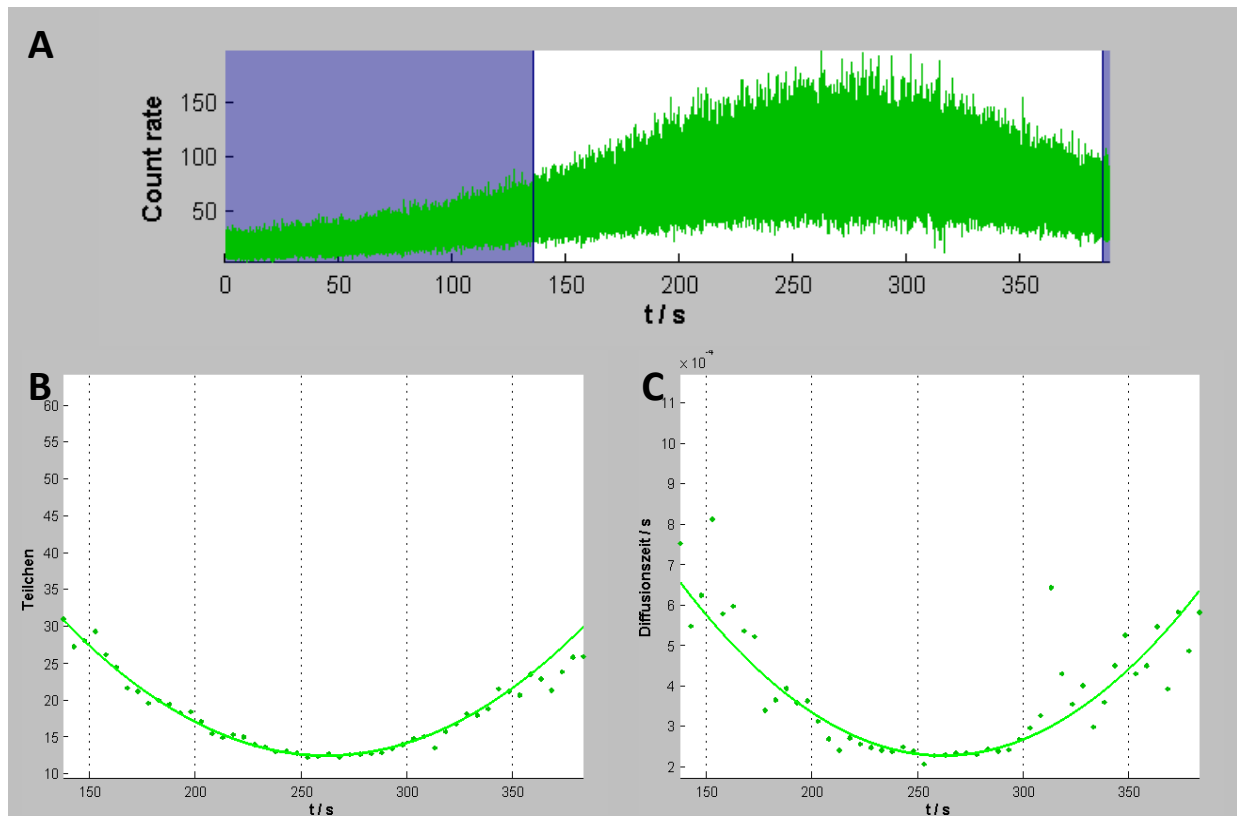


Abbildung 99: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,66 \mu\text{W}$ (Messung 2). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

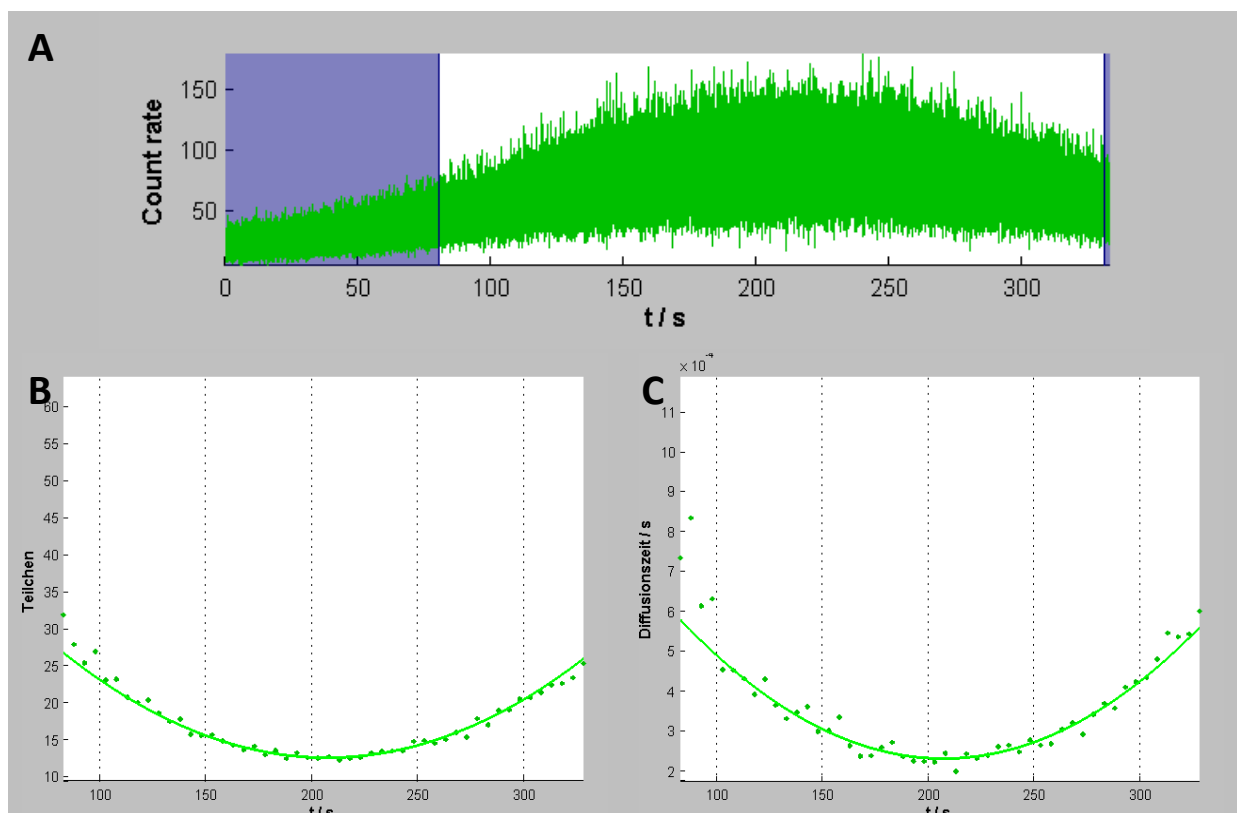


Abbildung 100: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $1,66 \mu\text{W}$ (Messung 3). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

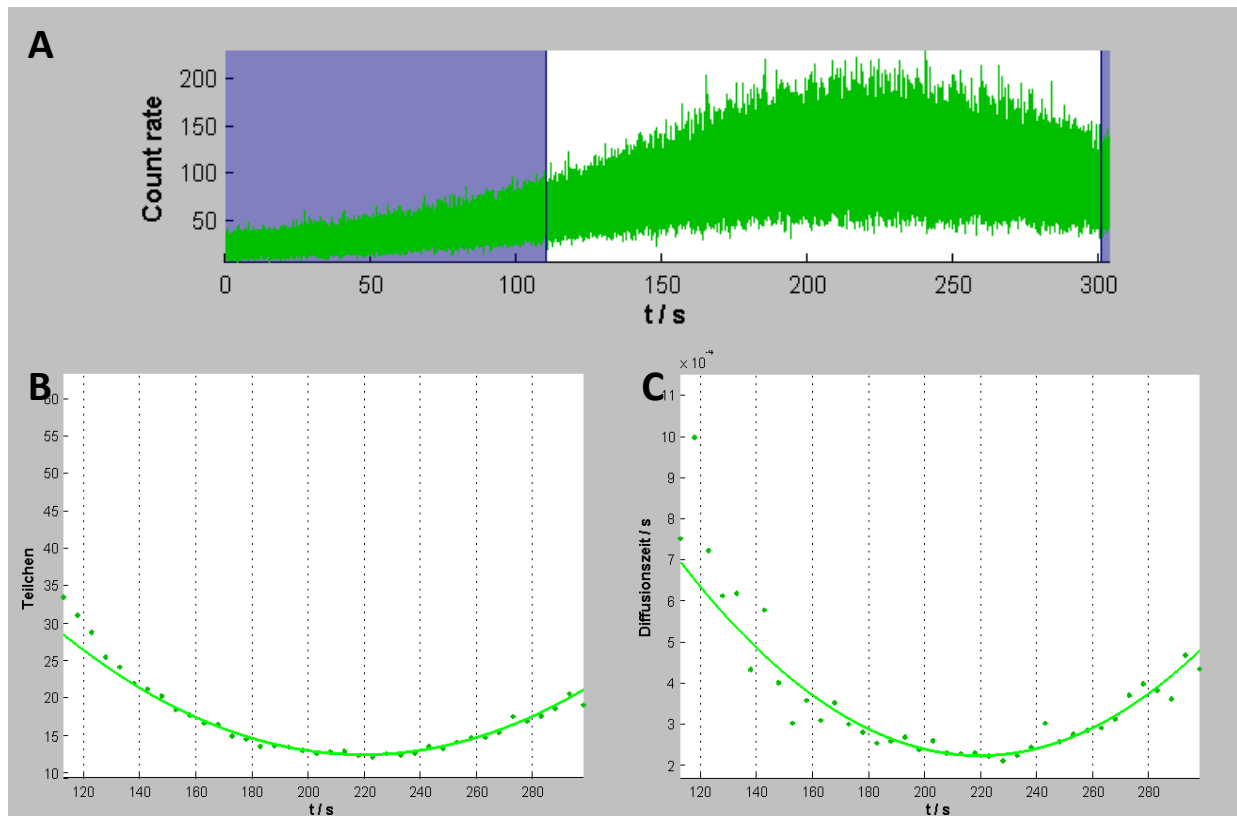


Abbildung 101: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $2,06 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

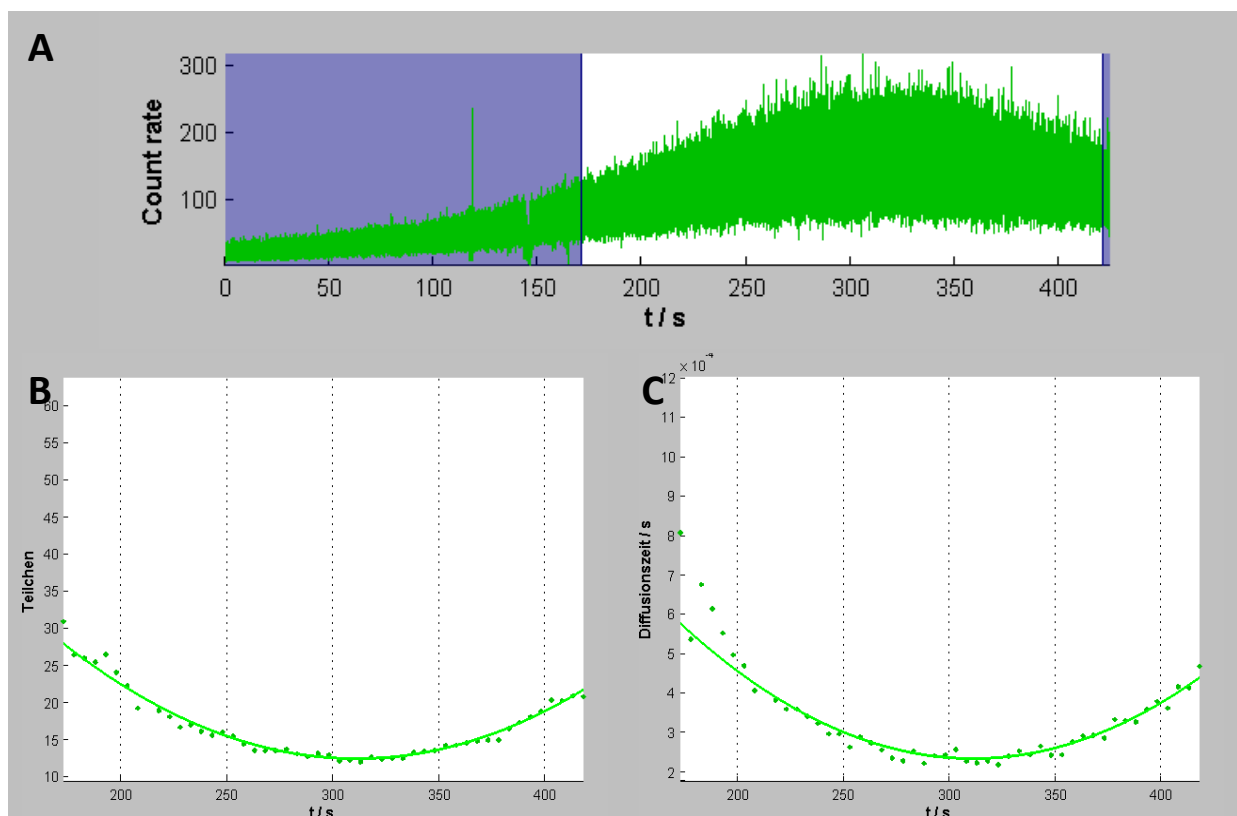


Abbildung 102: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $2,92 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

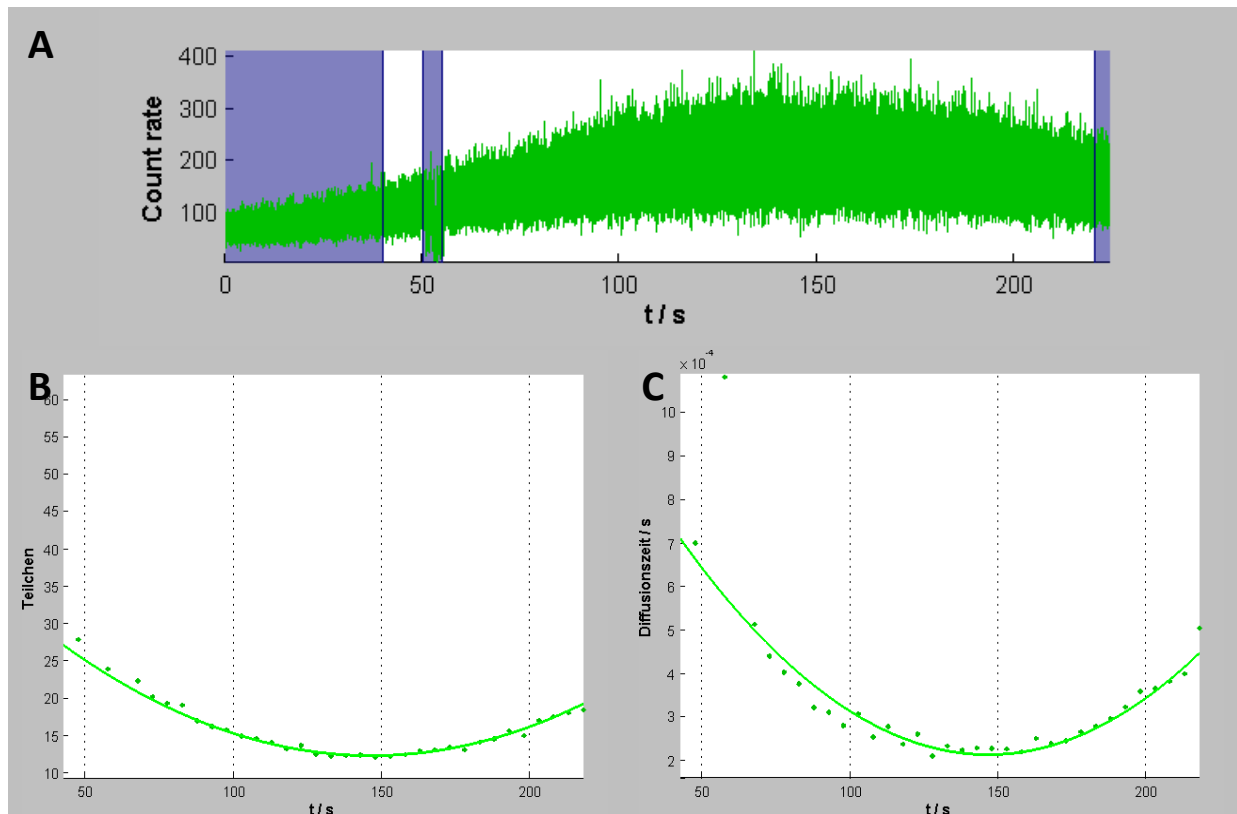


Abbildung 103: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 4,05 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

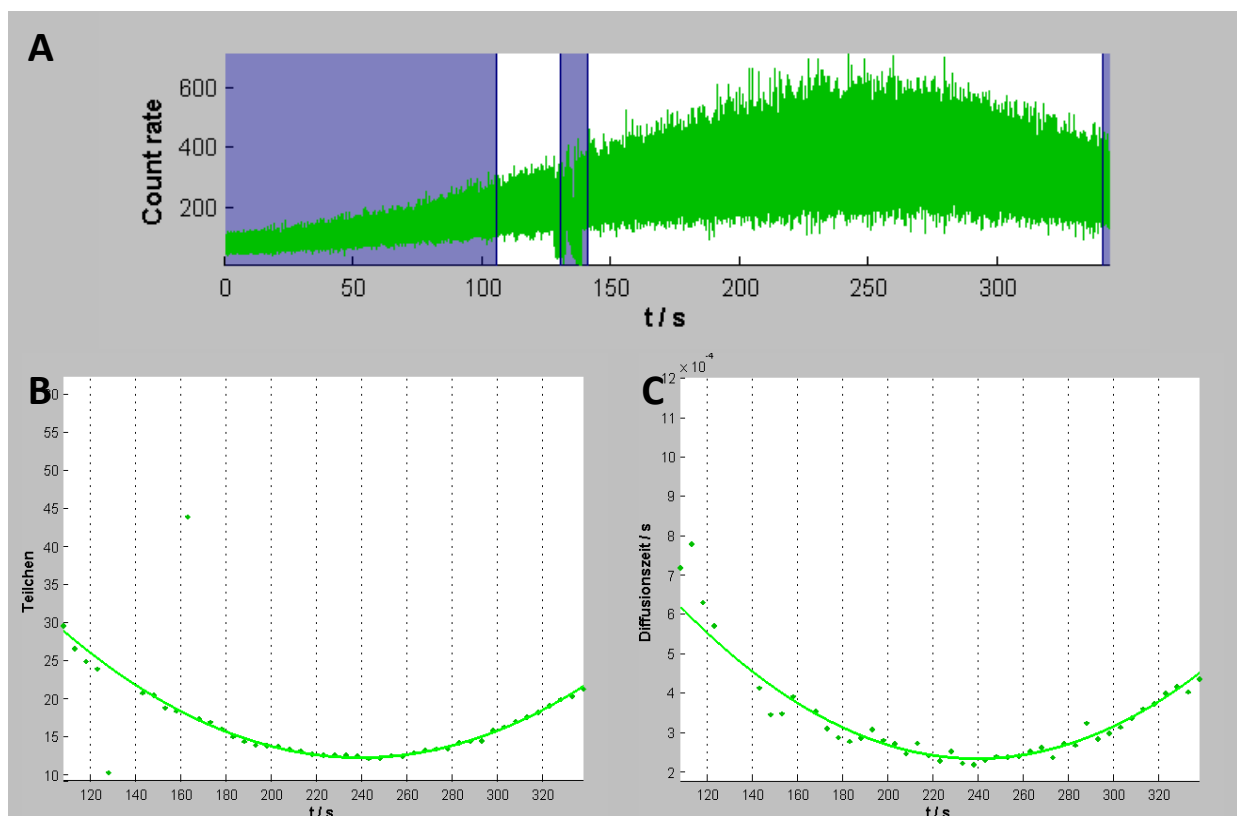


Abbildung 104: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 8,51 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

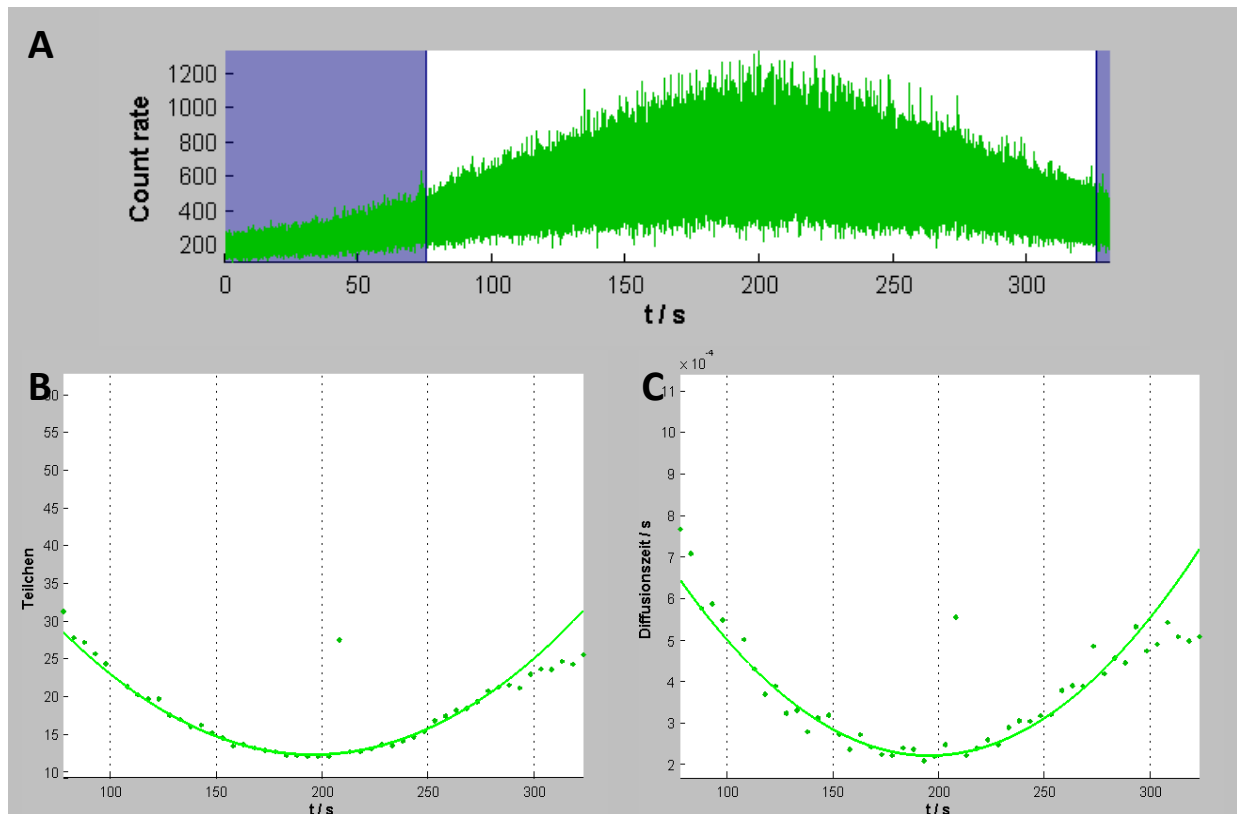


Abbildung 105: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 16,10 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

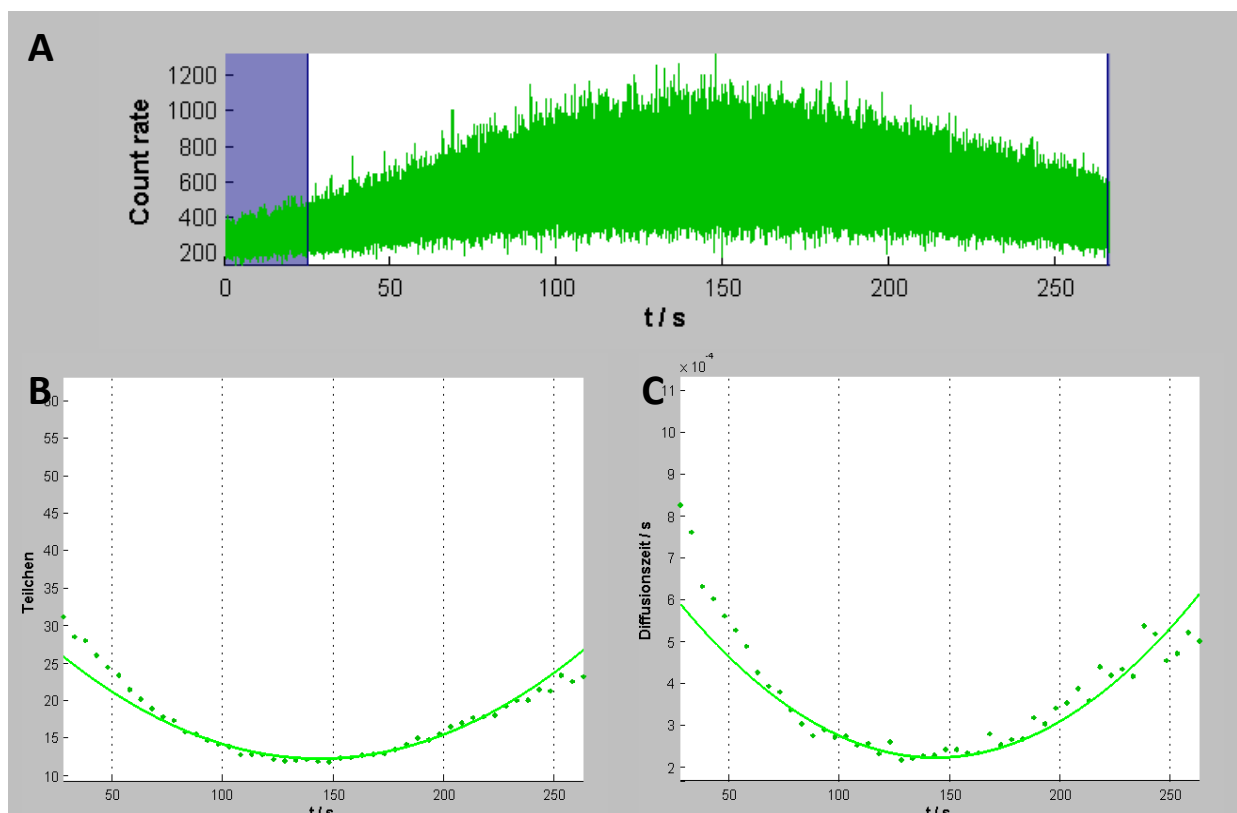


Abbildung 106: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 16,37 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

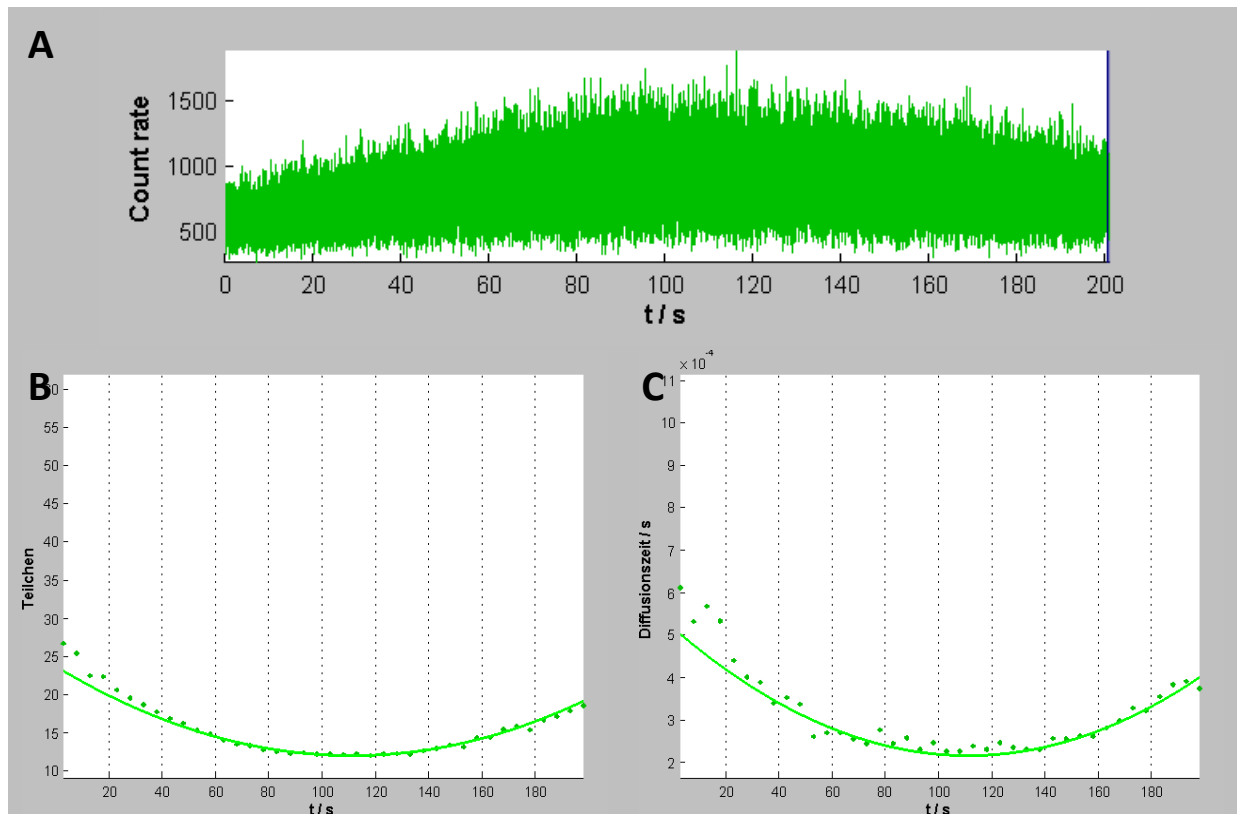


Abbildung 107: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $26,55 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

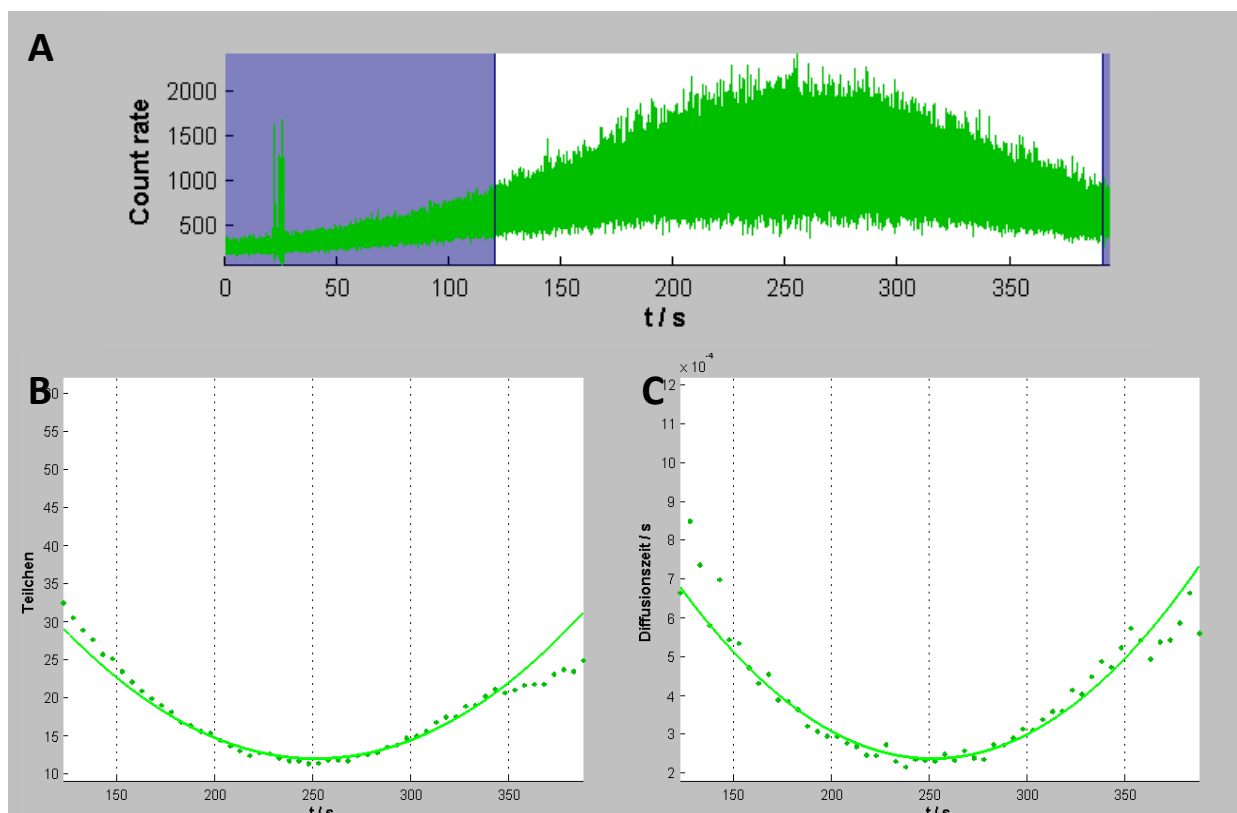


Abbildung 108: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von $38,93 \mu\text{W}$ (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

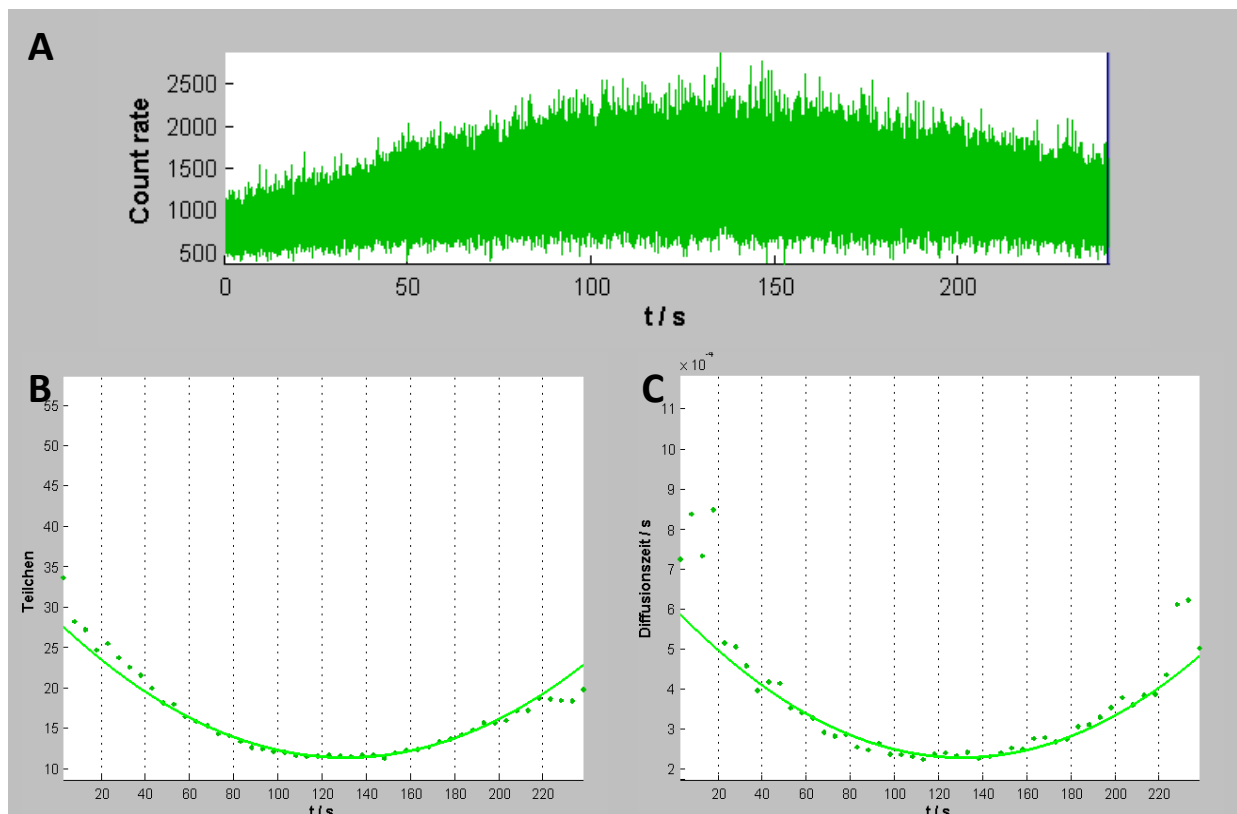


Abbildung 109: Fluktuationssignale (Bild A) in Gegenwart einer Laserleistung von 54,24 μW (Messung 1). Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchenzahl. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung der Laserleistung wurde mit dem energiereicheren Argon-Laser (488 nm) durchgeführt und mit dem Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 5 s).

Tabelle 28: Zusammenfassung Laserleistungsuntersuchung

$\rho_{\text{Laser}} / \mu\text{M}$	N_{min}	$\tau_{\text{D,min}} / \text{ms}$	Helligkeit / kHz	Helligkeit _{mol} / kHz mol ⁻¹
0,19	11,59	0,21	15,09	1,30
0,19	11,79	0,23	15,74	1,34
0,19	12,90	0,23	15,76	1,22
0,19	12,30	0,24	16,40	1,33
0,19	12,84	0,28	15,77	1,23
0,19	12,33	0,25	16,52	1,34
0,19	13,36	0,24	17,25	1,29
0,33	12,06	0,23	23,58	1,95
0,33	11,87	0,24	24,47	2,06
0,33	12,36	0,25	24,52	1,98
0,73	11,95	0,24	33,31	2,79
0,73	11,39	0,22	30,73	2,70
0,73	11,76	0,26	30,48	2,59
0,86	11,49	0,23	46,72	4,07
0,86	12,03	0,25	48,84	4,06
0,86	11,77	0,22	46,06	3,91
1,32	11,62	0,23	64,79	5,57
1,32	11,70	0,23	68,93	5,89
1,32	11,98	0,22	66,51	5,55
1,32	13,02	0,23	77,03	5,91
1,32	13,17	0,24	70,02	5,31

Tabelle 28: Zusammenfassung Laserleistungsuntersuchung

$p_{\text{Laser}} / \mu\text{M}$	N_{min}	$\tau_{\text{D,min}} / \text{ms}$	Helligkeit / kHz	Helligkeit _{mol} / kHz mol ⁻¹
1,32	12,88	0,23	72,97	5,67
1,66	12,81	0,25	90,18	7,04
1,66	12,58	0,23	94,78	7,53
1,66	12,55	0,23	86,87	6,92
2,06	12,39	0,23	114,33	9,22
2,92	12,50	0,24	152,48	12,20
4,05	12,42	0,21	198,56	15,99
8,51	12,18	0,24	362,41	29,74
16,10	12,29	0,22	681,36	55,43
16,37	12,37	0,22	655,84	53,01
26,55	12,14	0,22	921,32	75,90
38,93	12,15	0,24	1235,49	101,64
54,24	11,48	0,23	1394,80	121,51

13.4.4 Monoschichtstabilität beim Bewegen über die Filmwaage

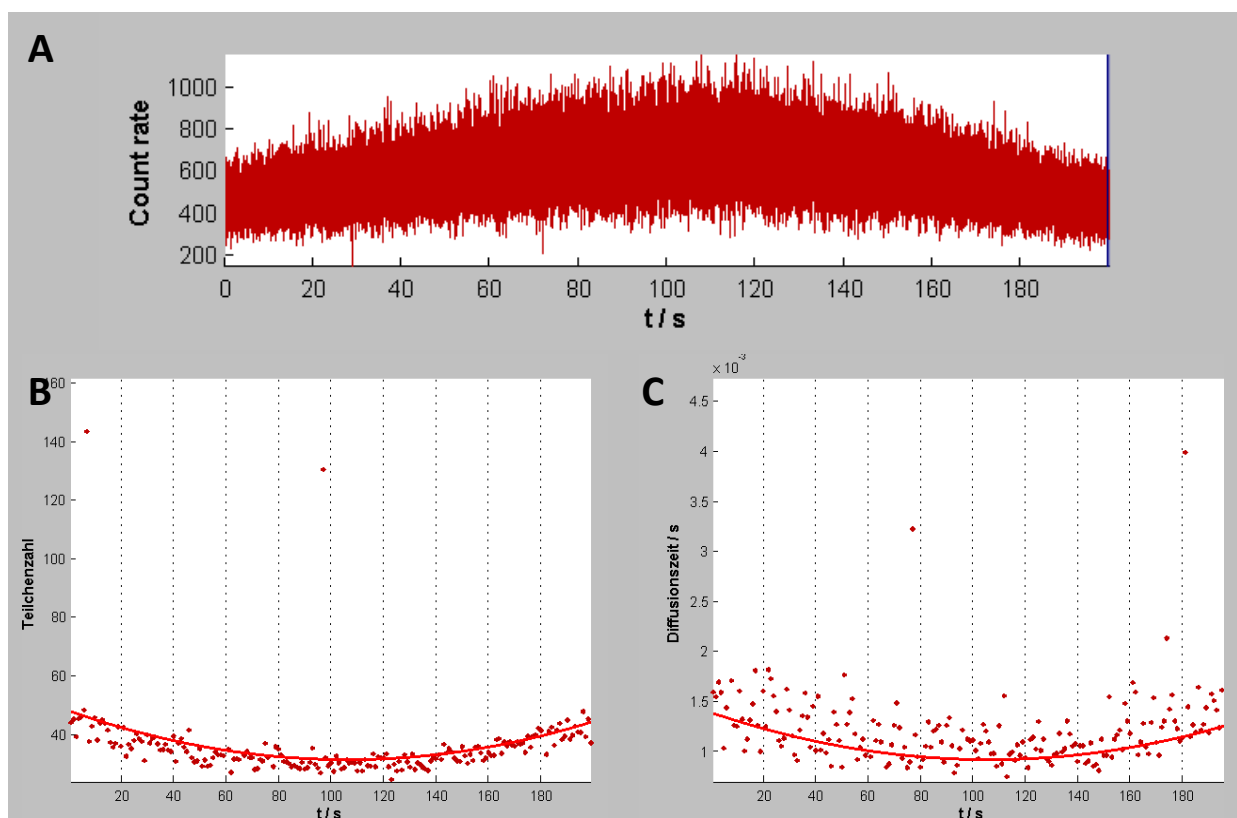


Abbildung 110: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 1) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

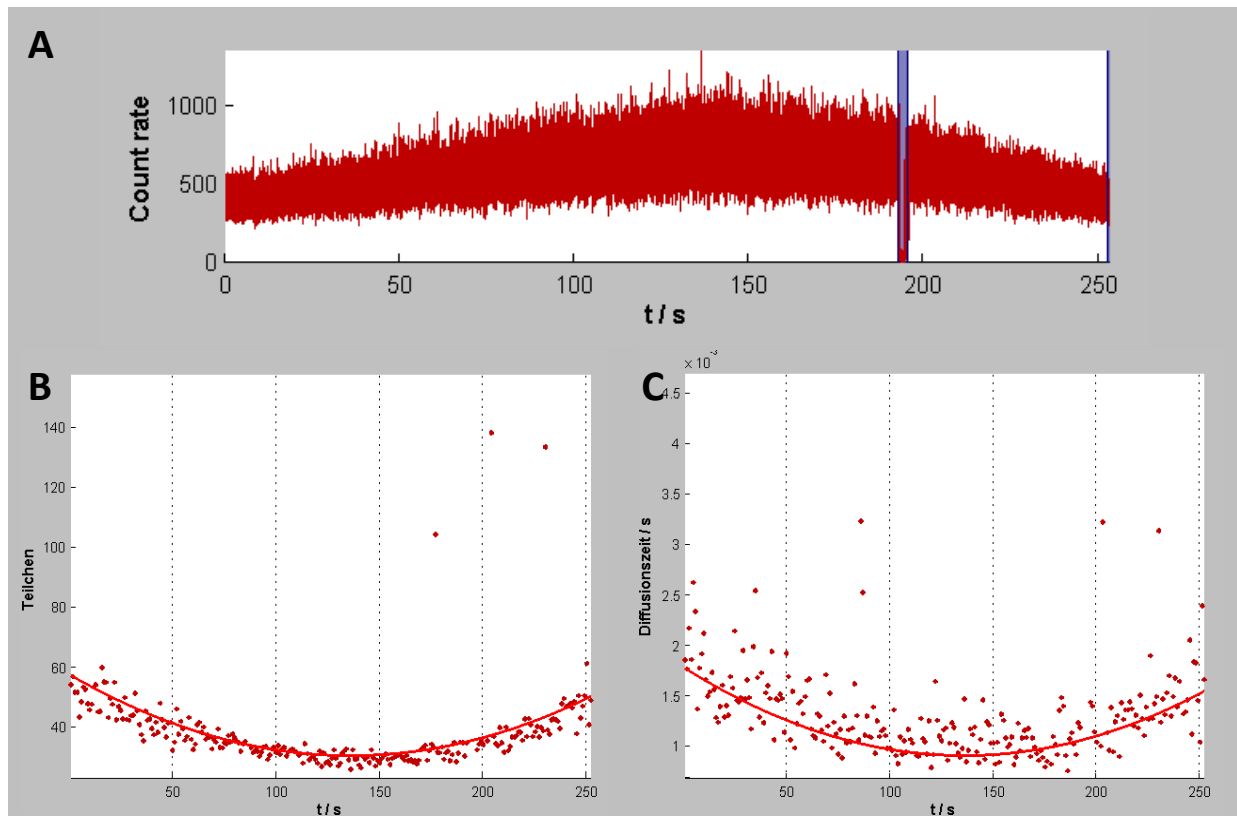


Abbildung 111: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 2) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

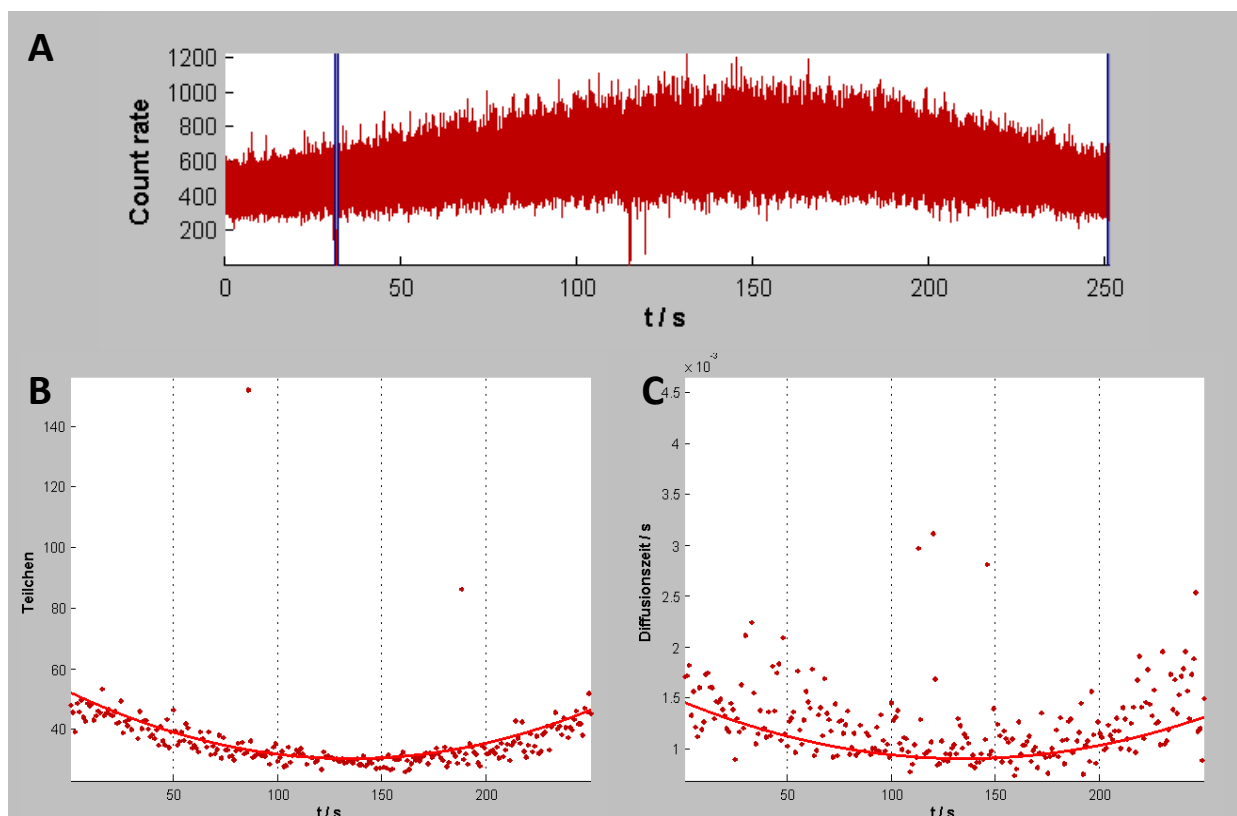


Abbildung 112: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 3) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

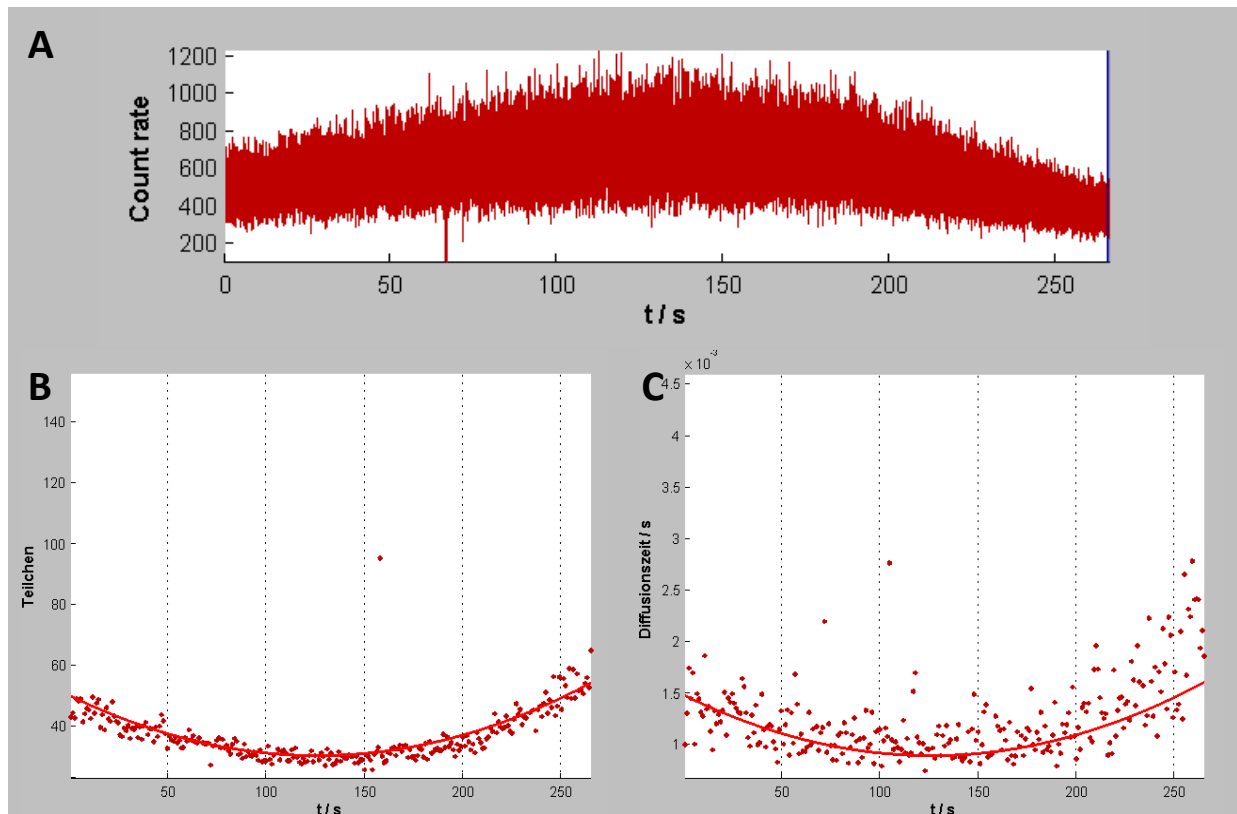


Abbildung 113: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 4) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

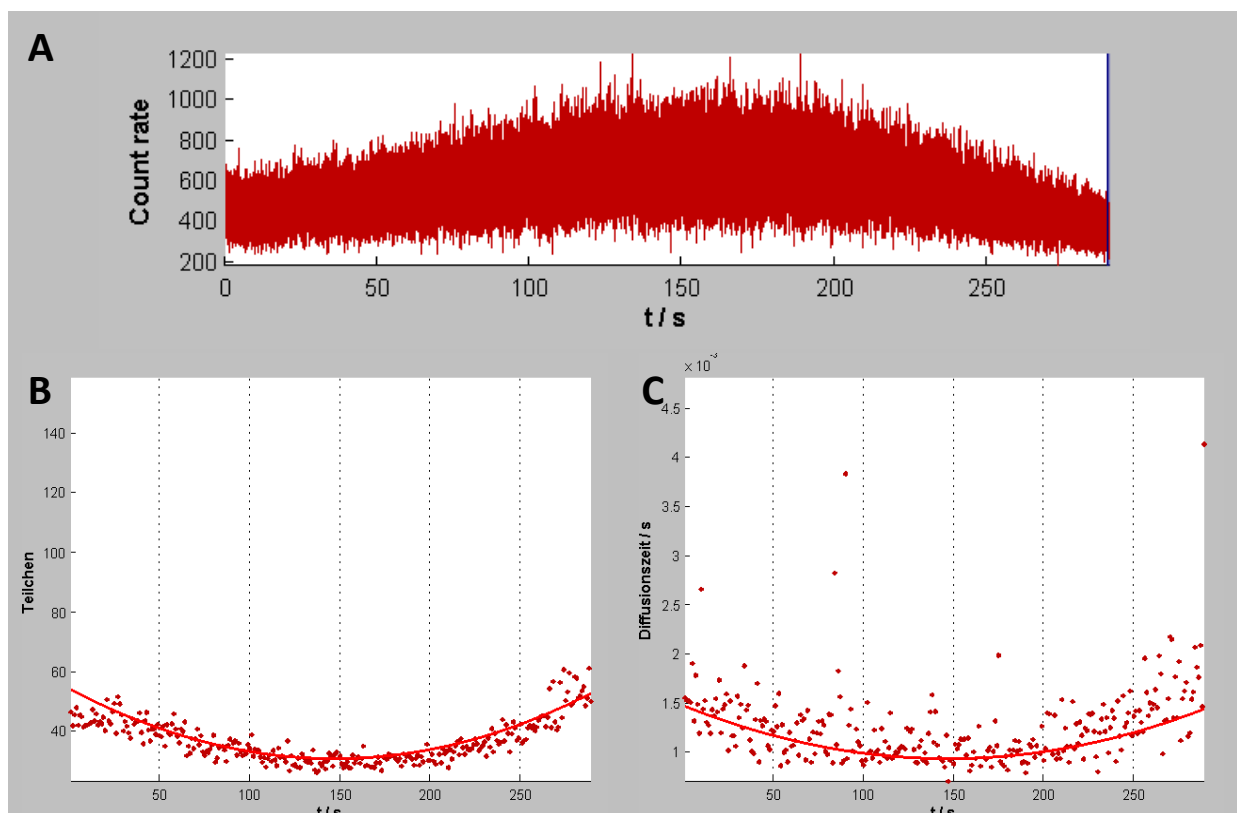


Abbildung 114: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 5) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

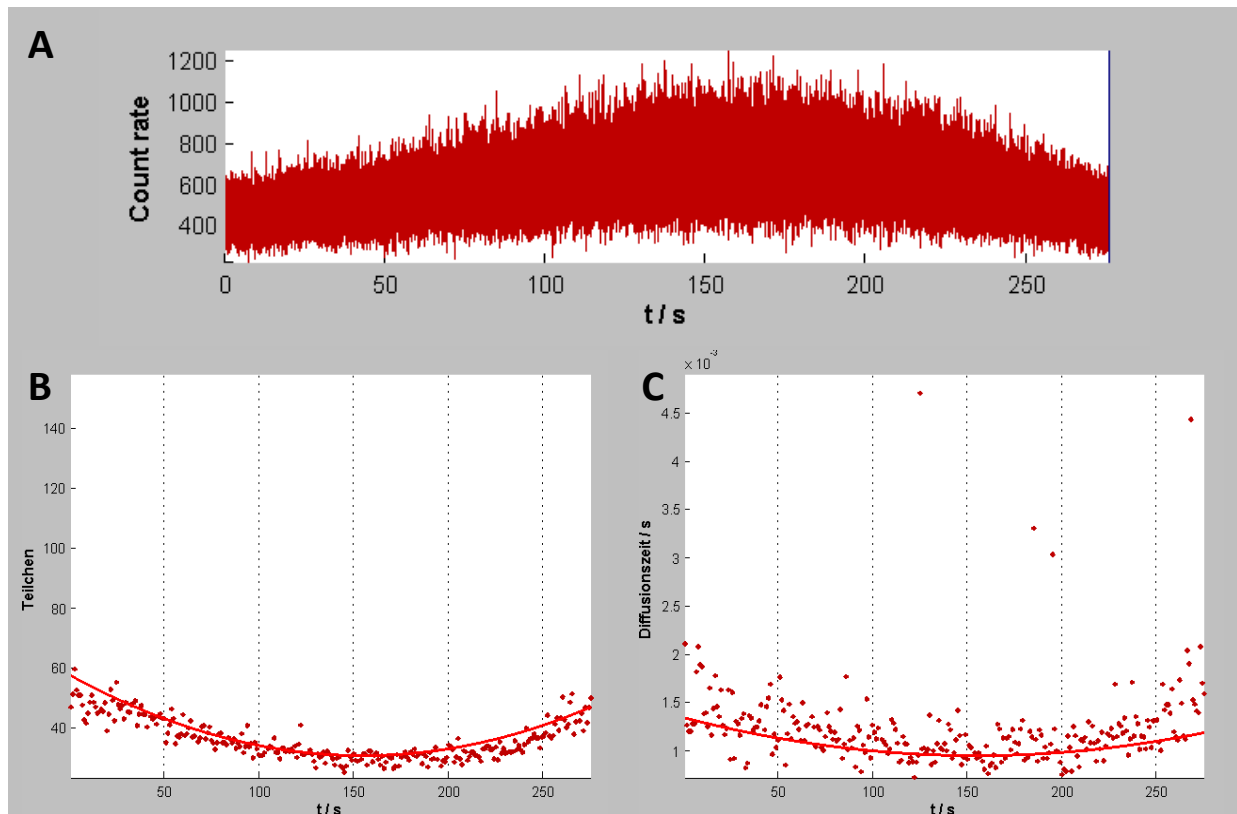


Abbildung 115: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 6) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

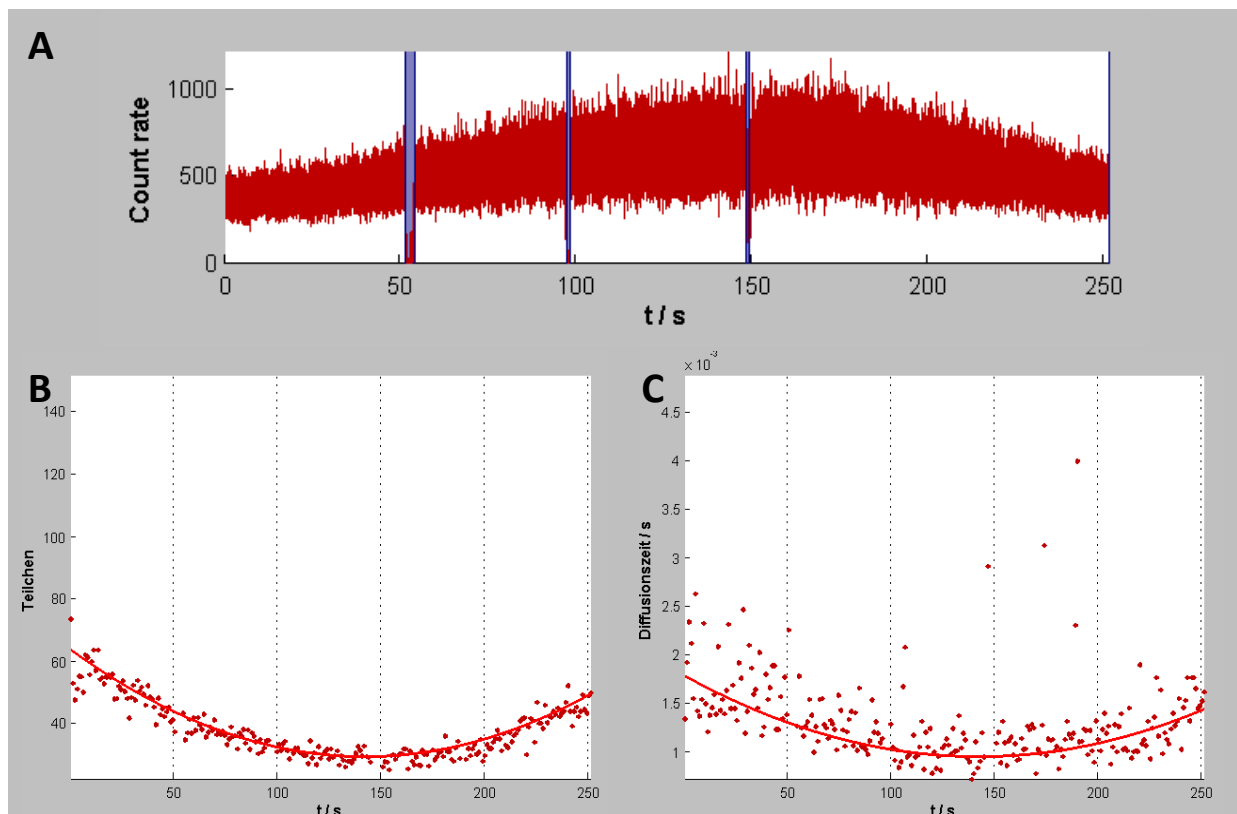


Abbildung 116: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 7) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

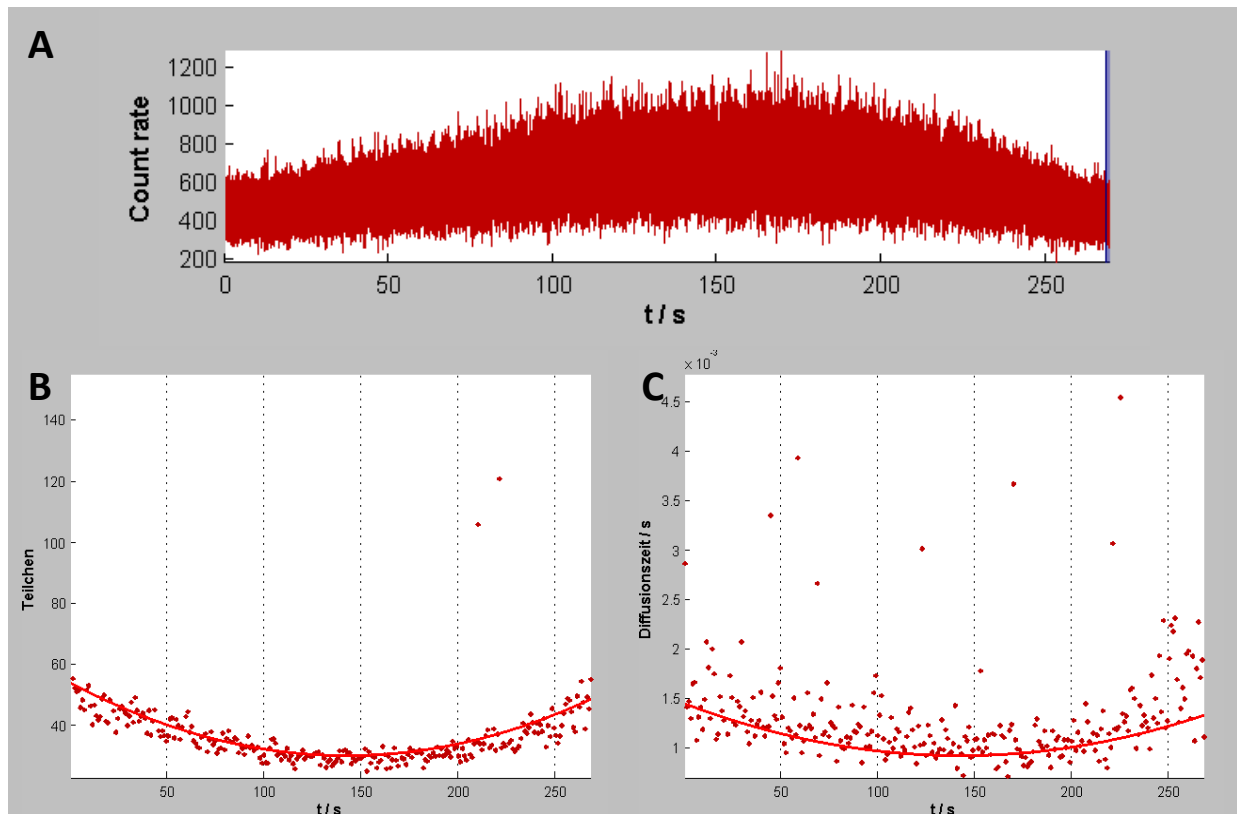


Abbildung 117: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 8) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

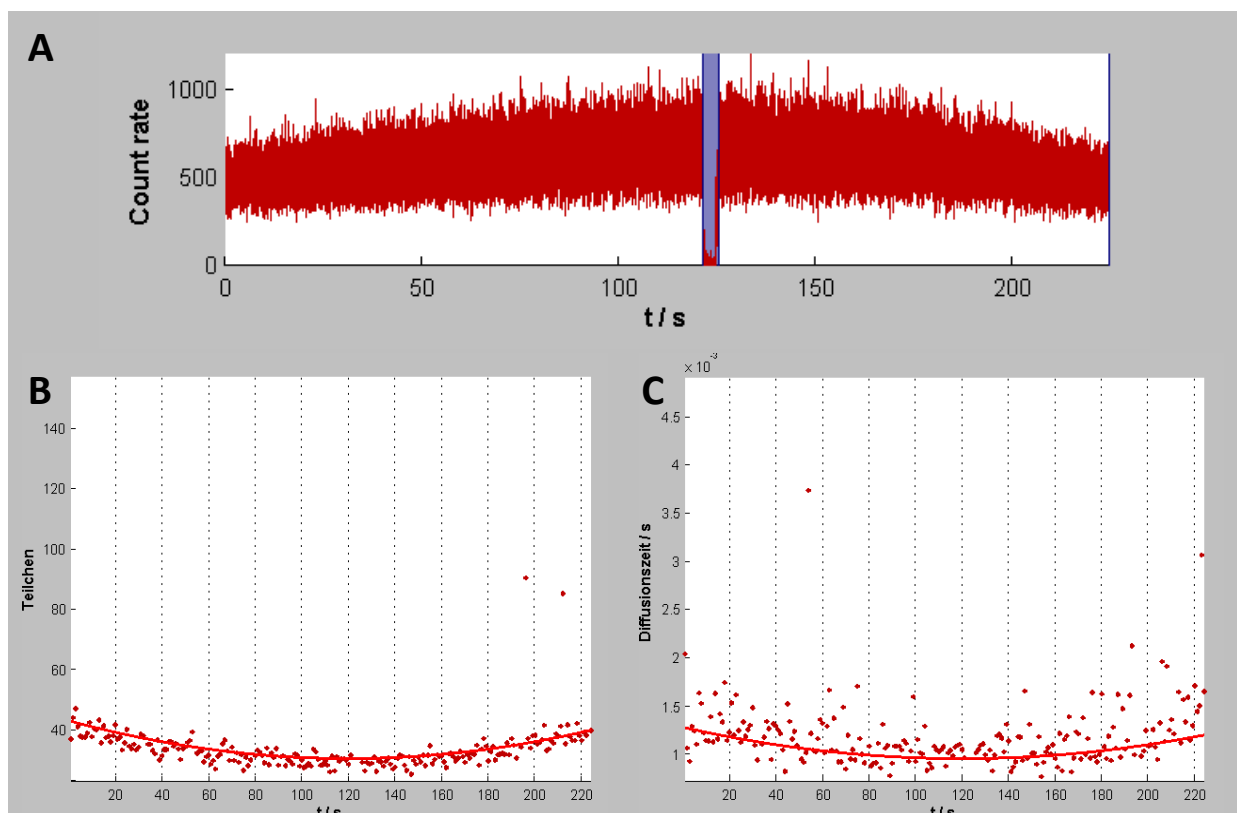


Abbildung 118: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 9) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

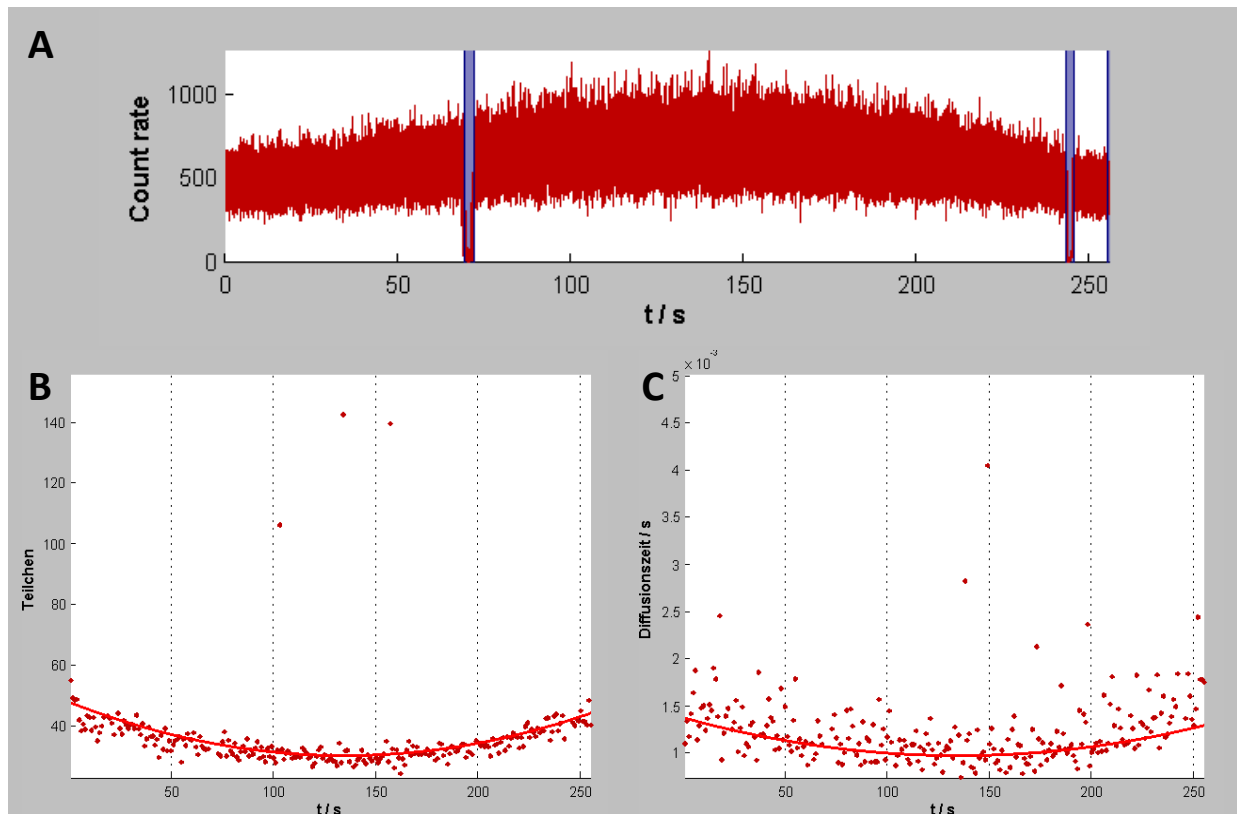


Abbildung 119: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert wurde und an verschiedenen Stellen (Position 10) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

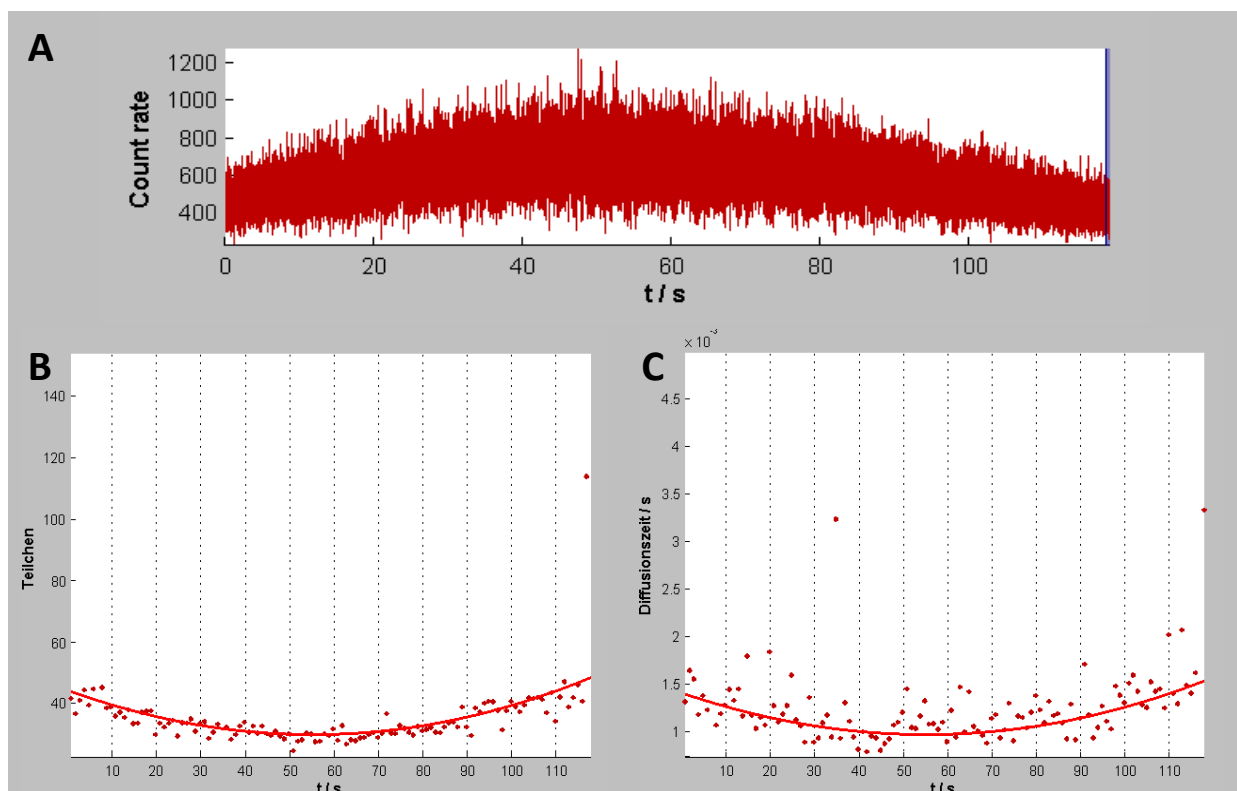


Abbildung 120: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 1) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

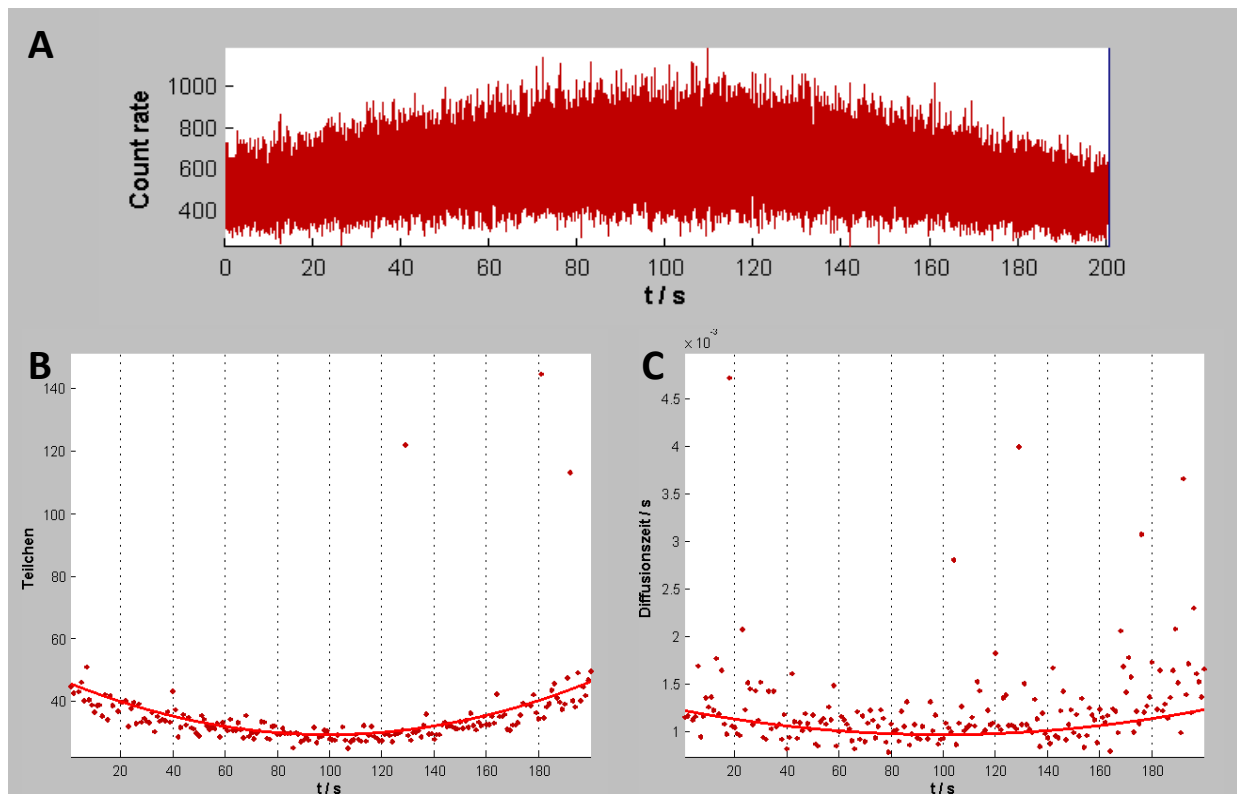


Abbildung 121: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 2) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

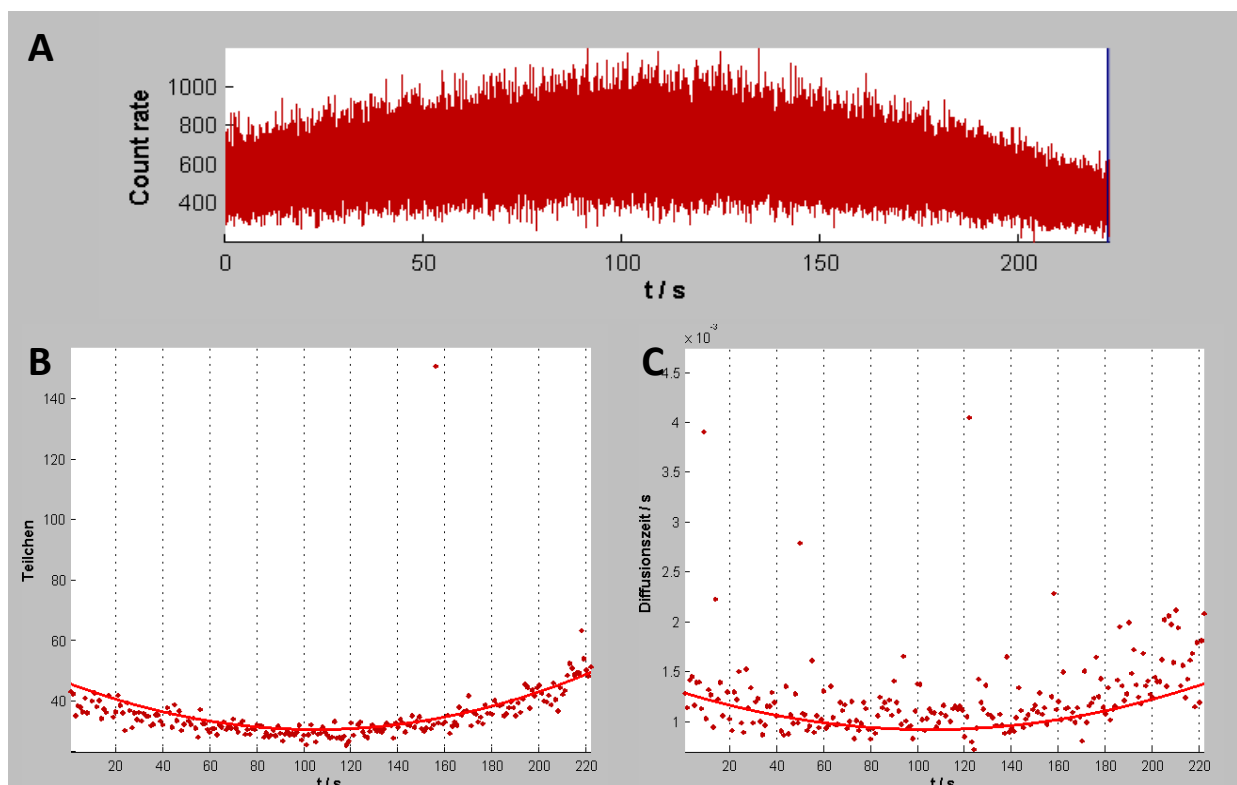


Abbildung 122: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 3) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

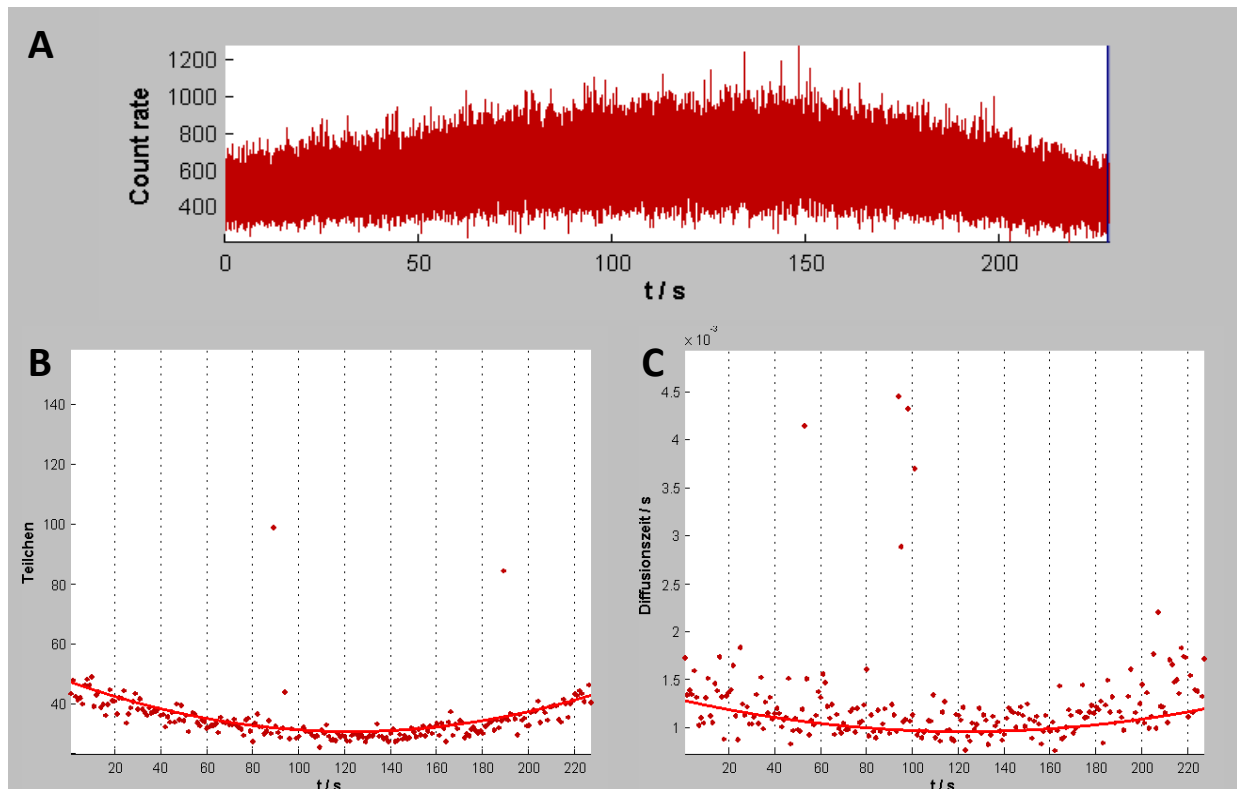


Abbildung 123: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 4) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

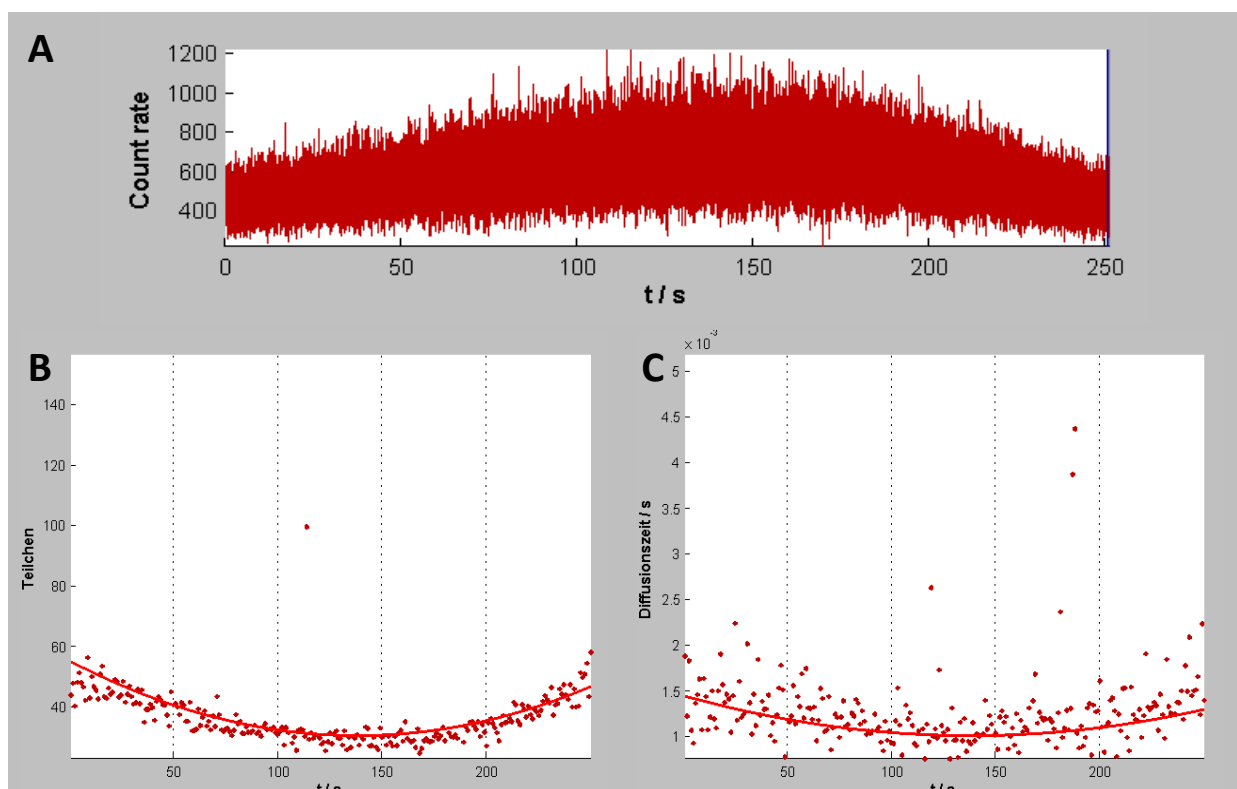


Abbildung 124: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 5) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

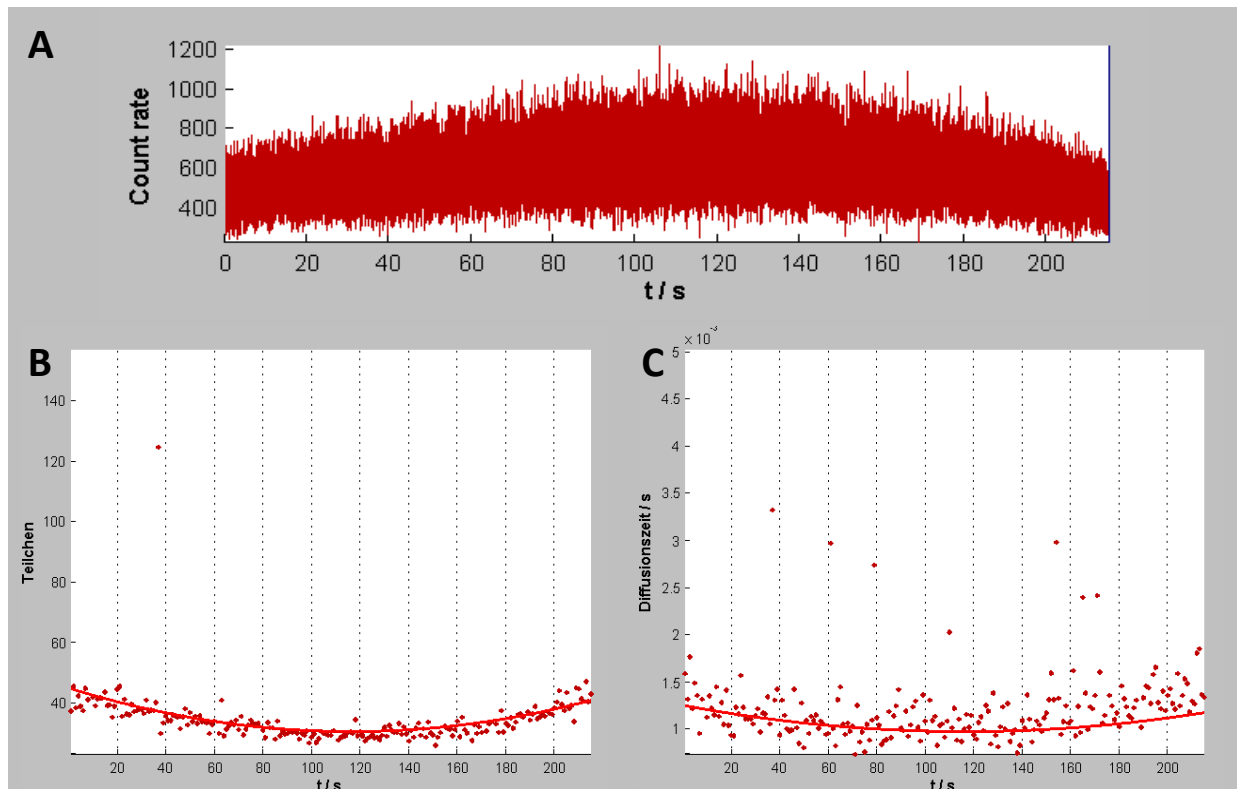


Abbildung 125: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 6) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

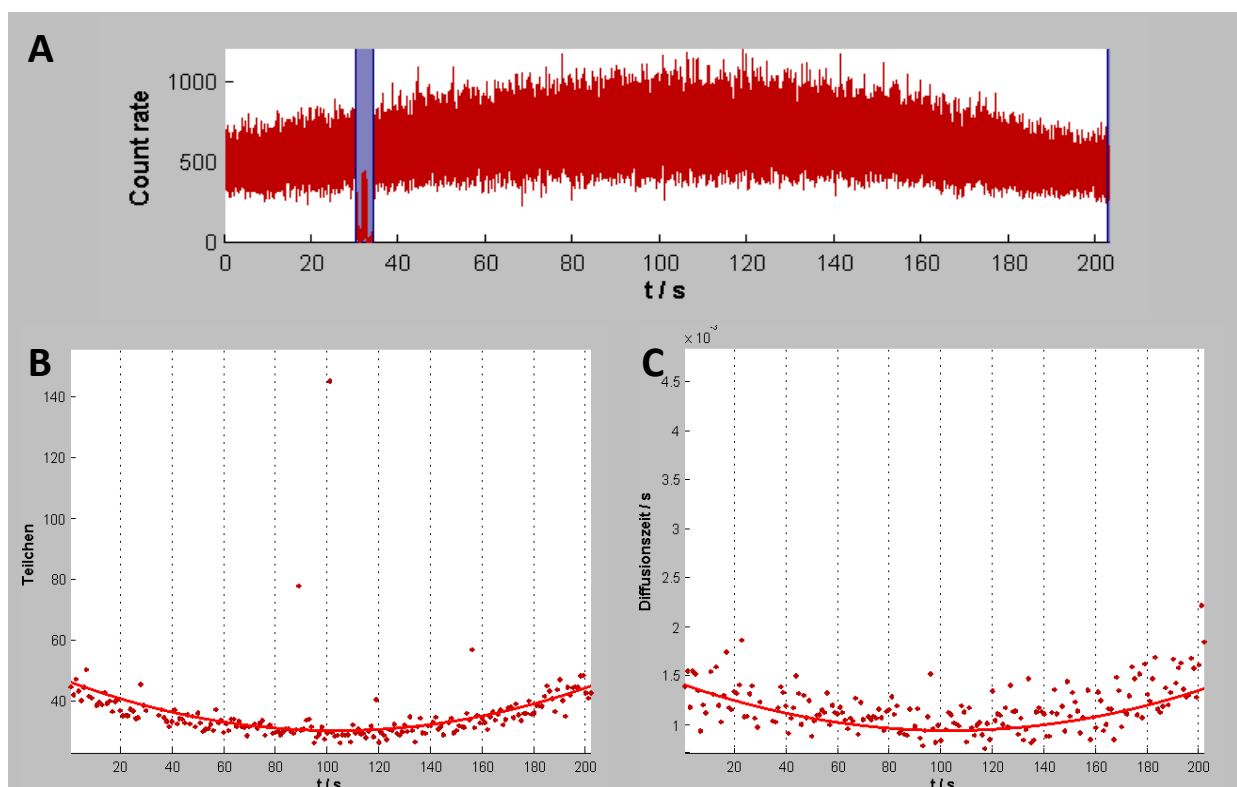


Abbildung 126: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 7) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

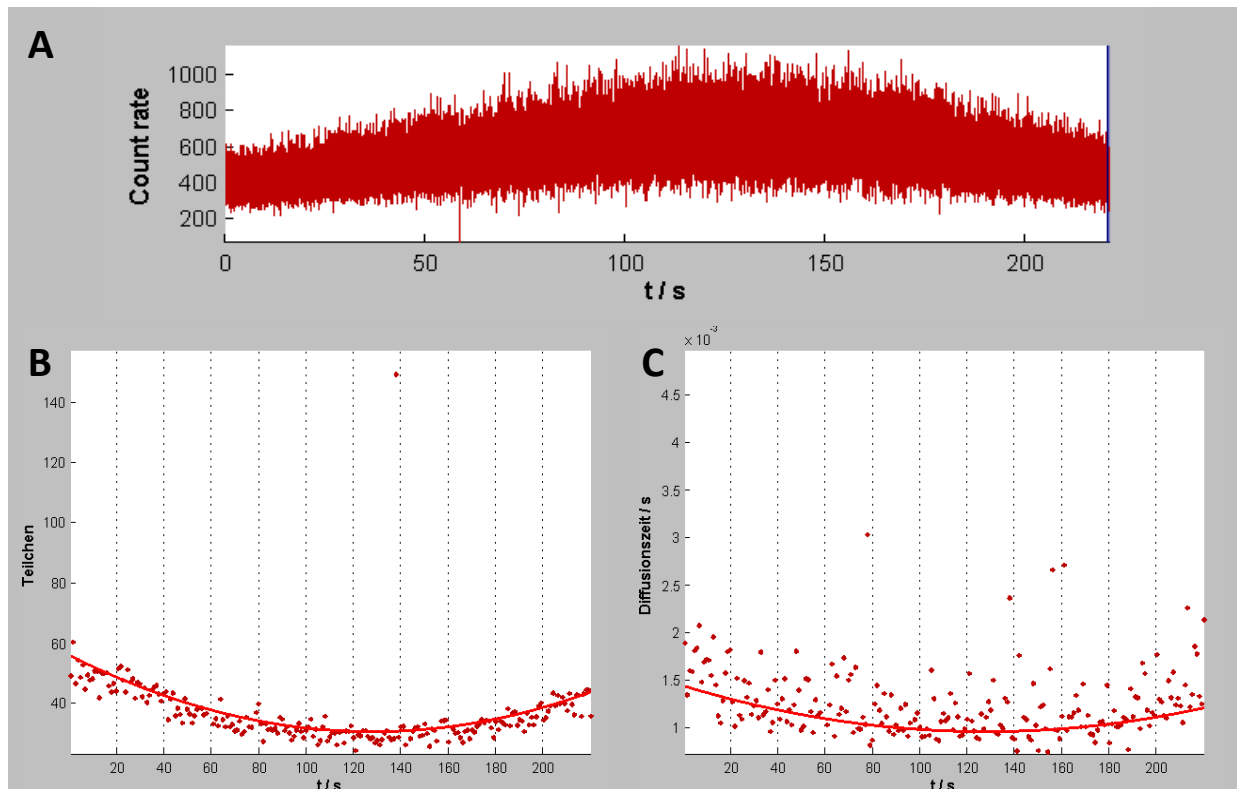


Abbildung 127: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 8) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

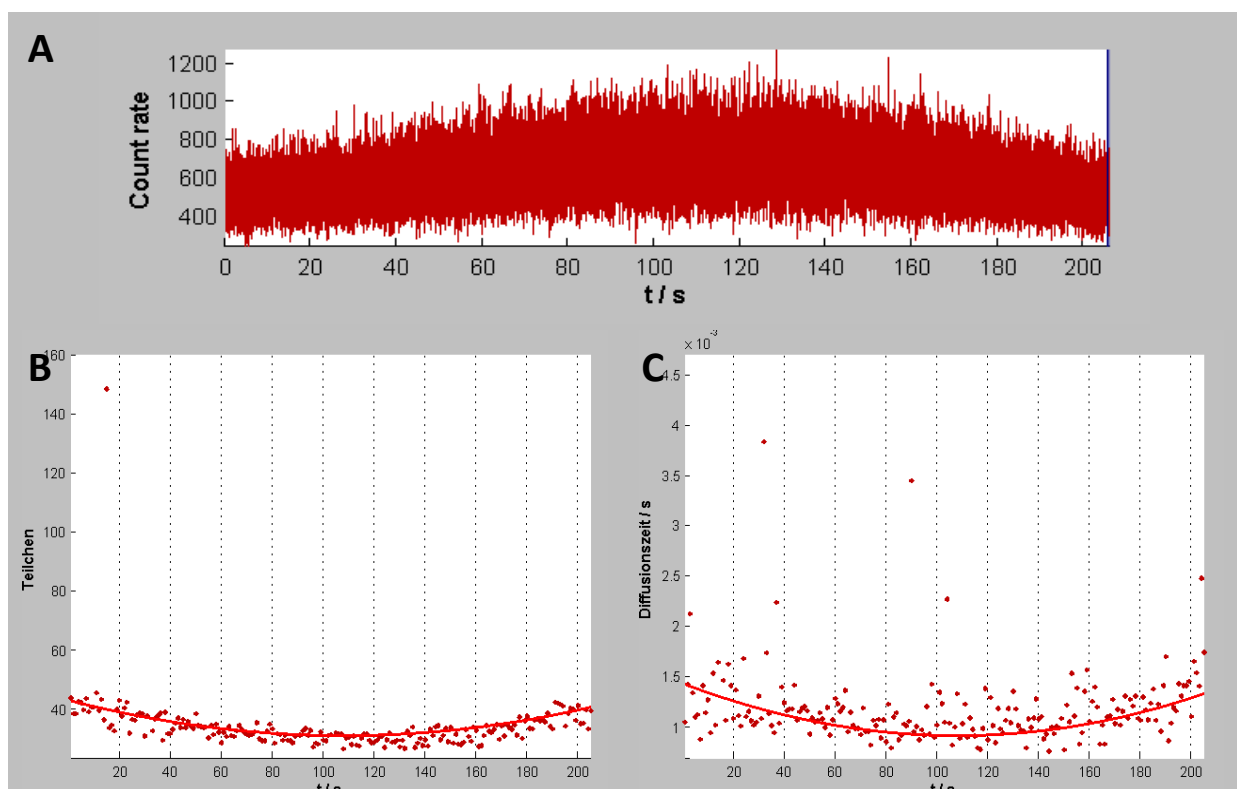


Abbildung 128: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 9) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

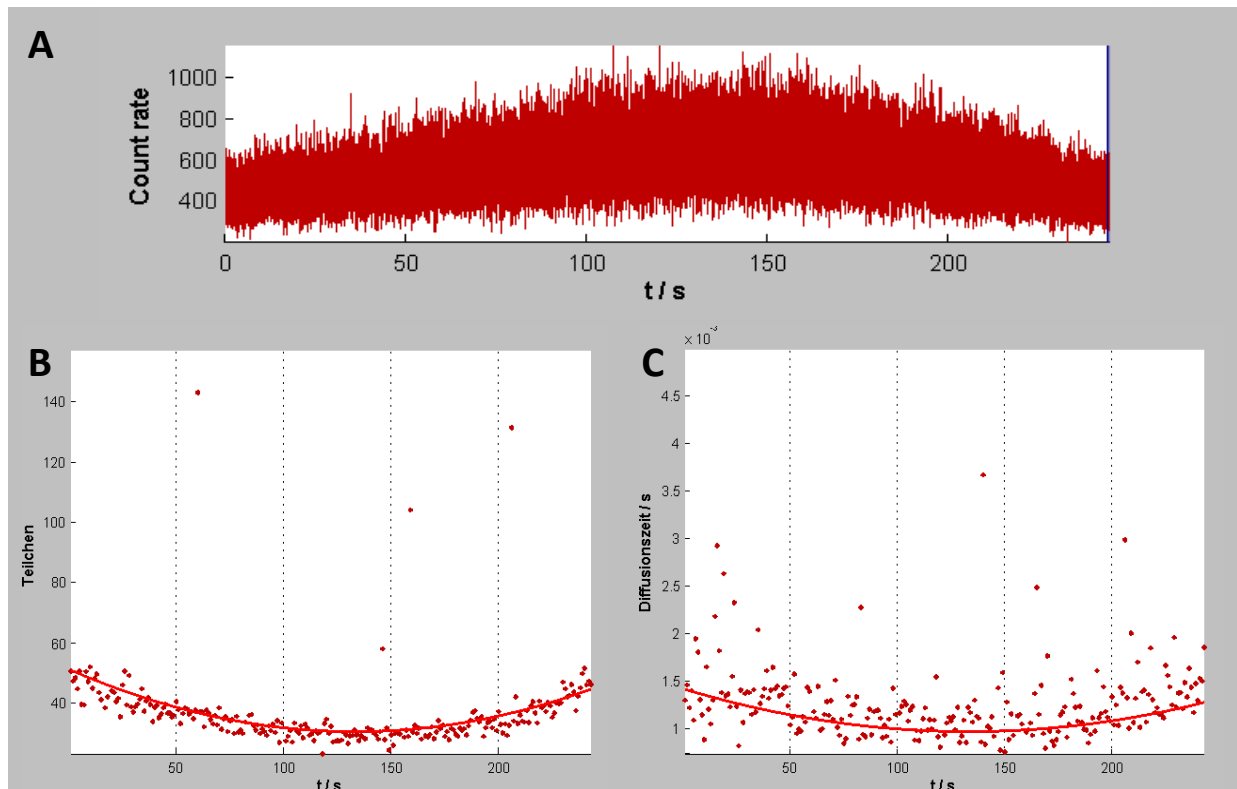


Abbildung 129: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend einmal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 10) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

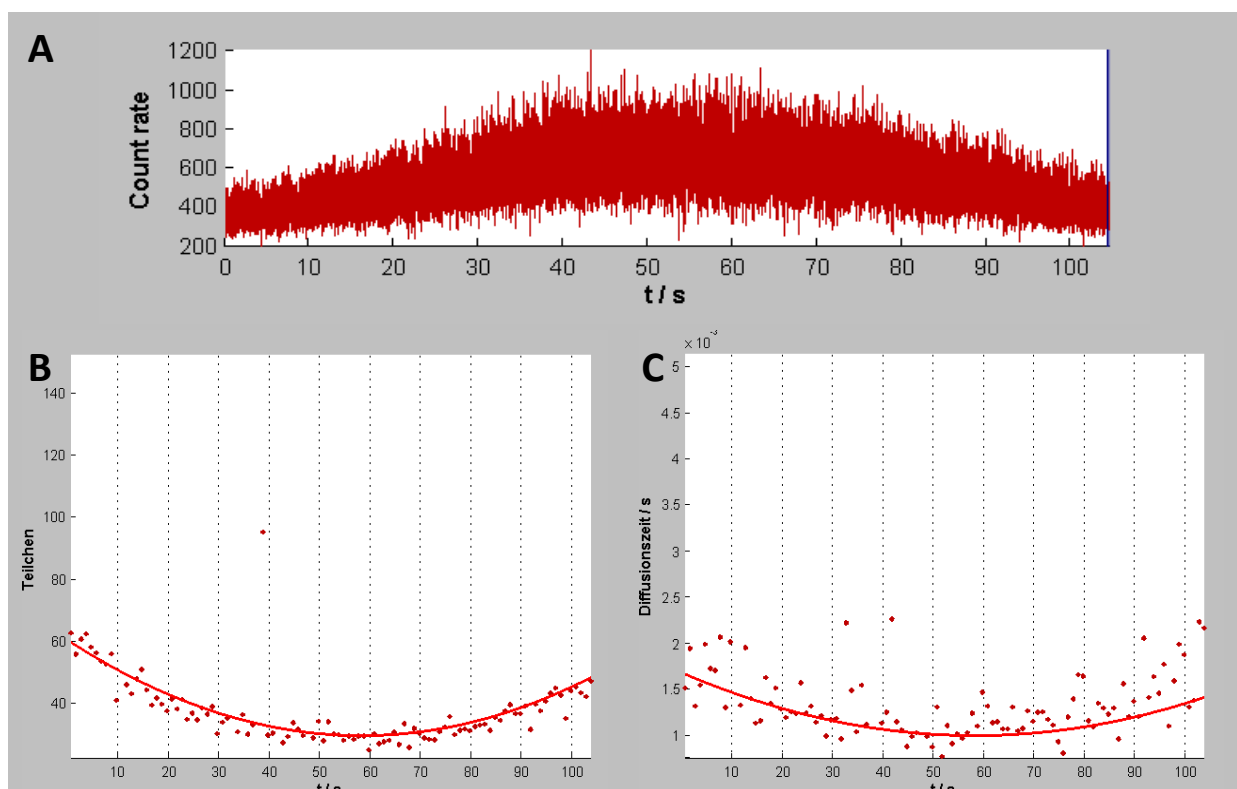


Abbildung 130: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 1) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

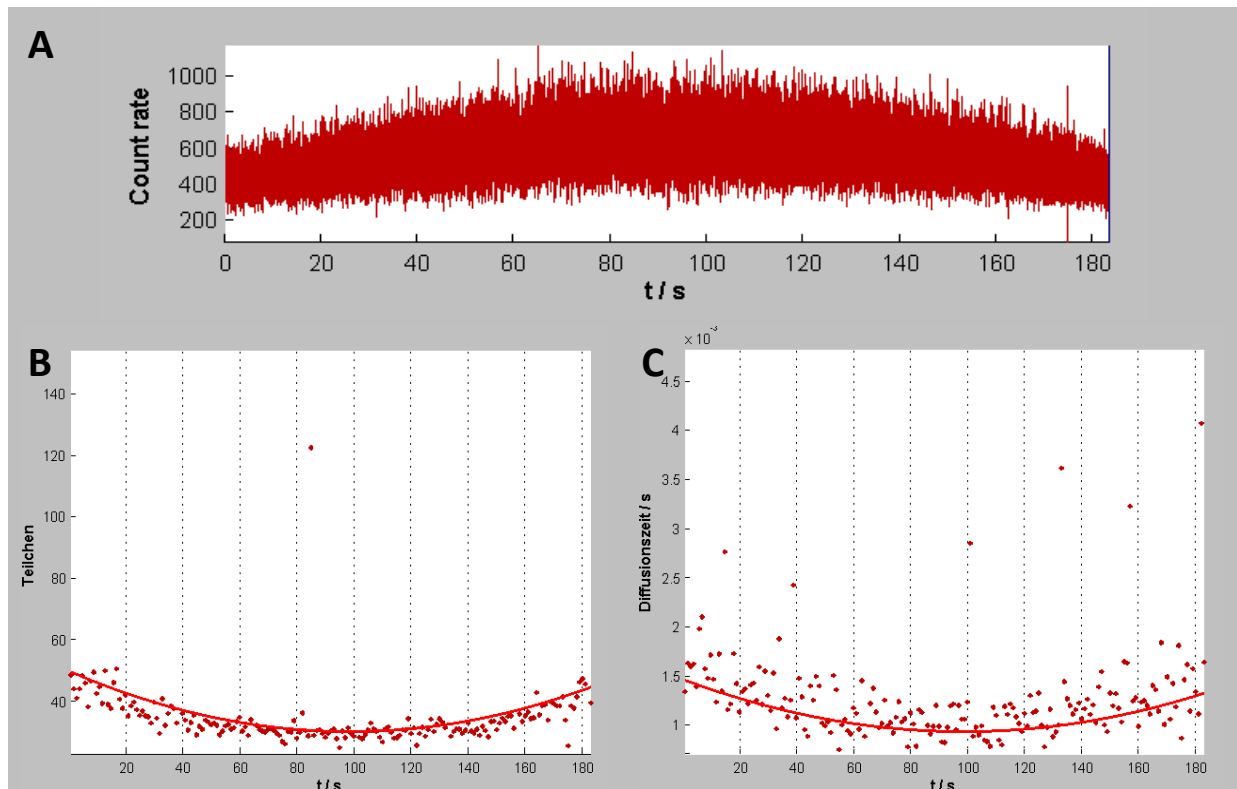


Abbildung 131: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 2) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

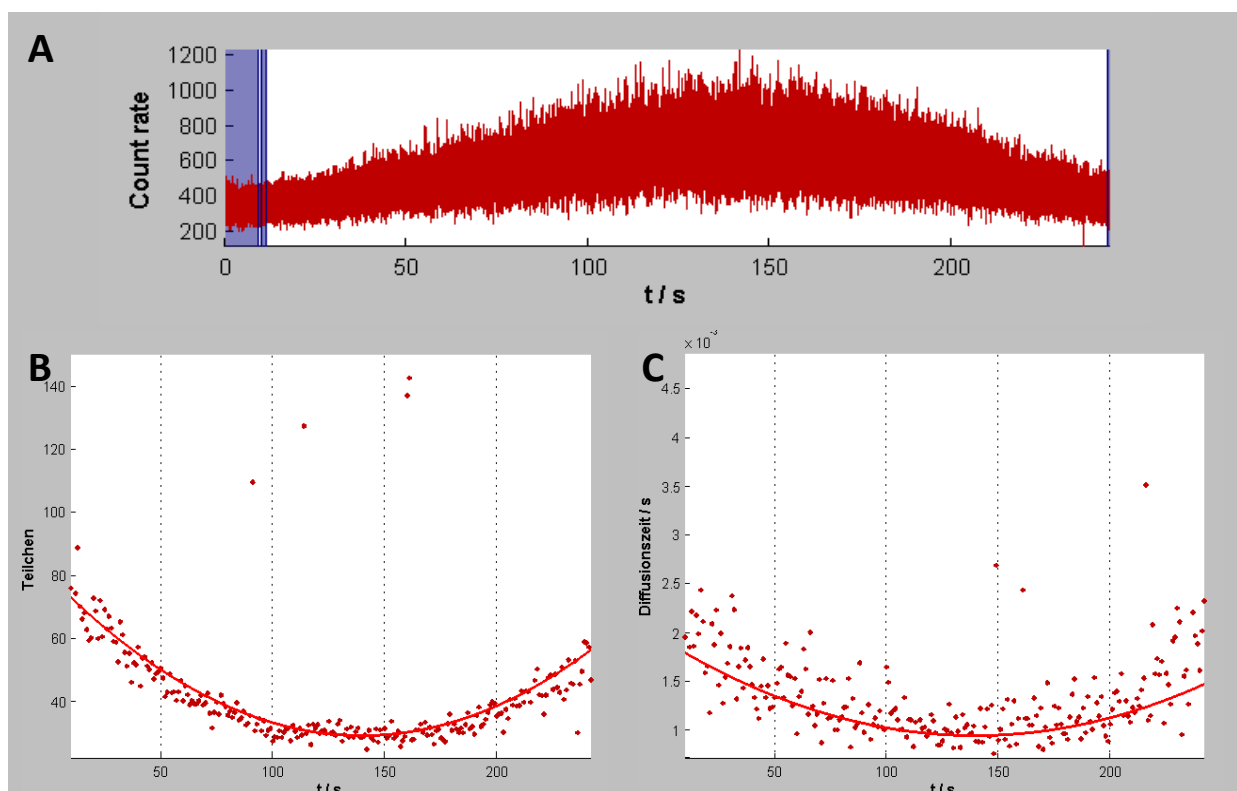


Abbildung 132: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 3) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

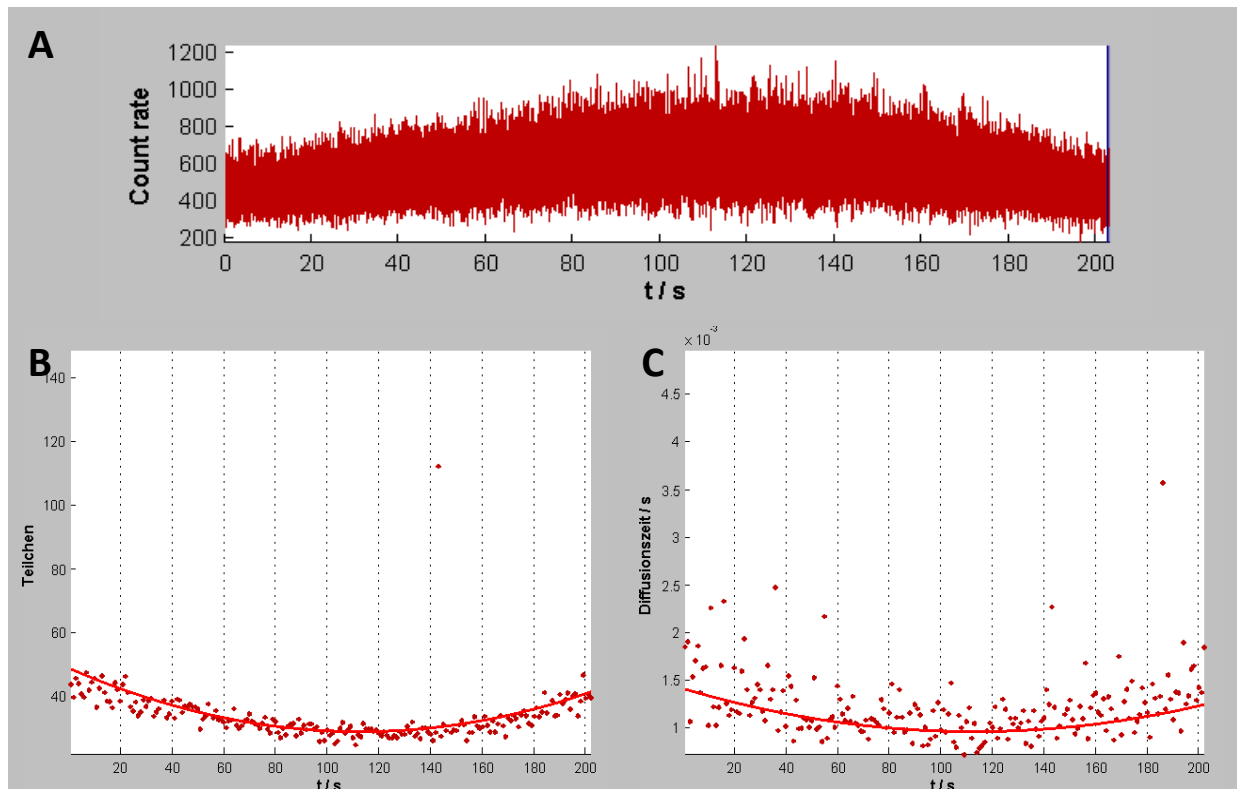


Abbildung 133: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 4) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

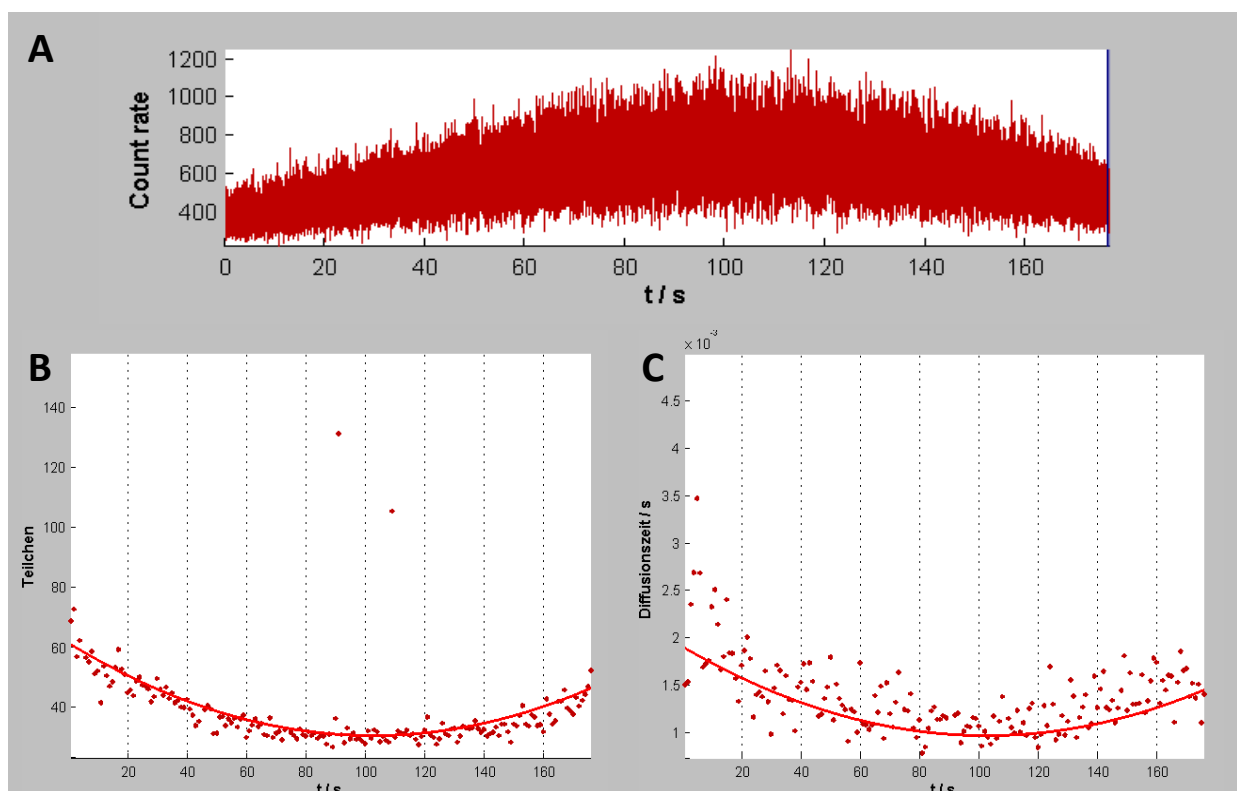


Abbildung 134: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 5) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

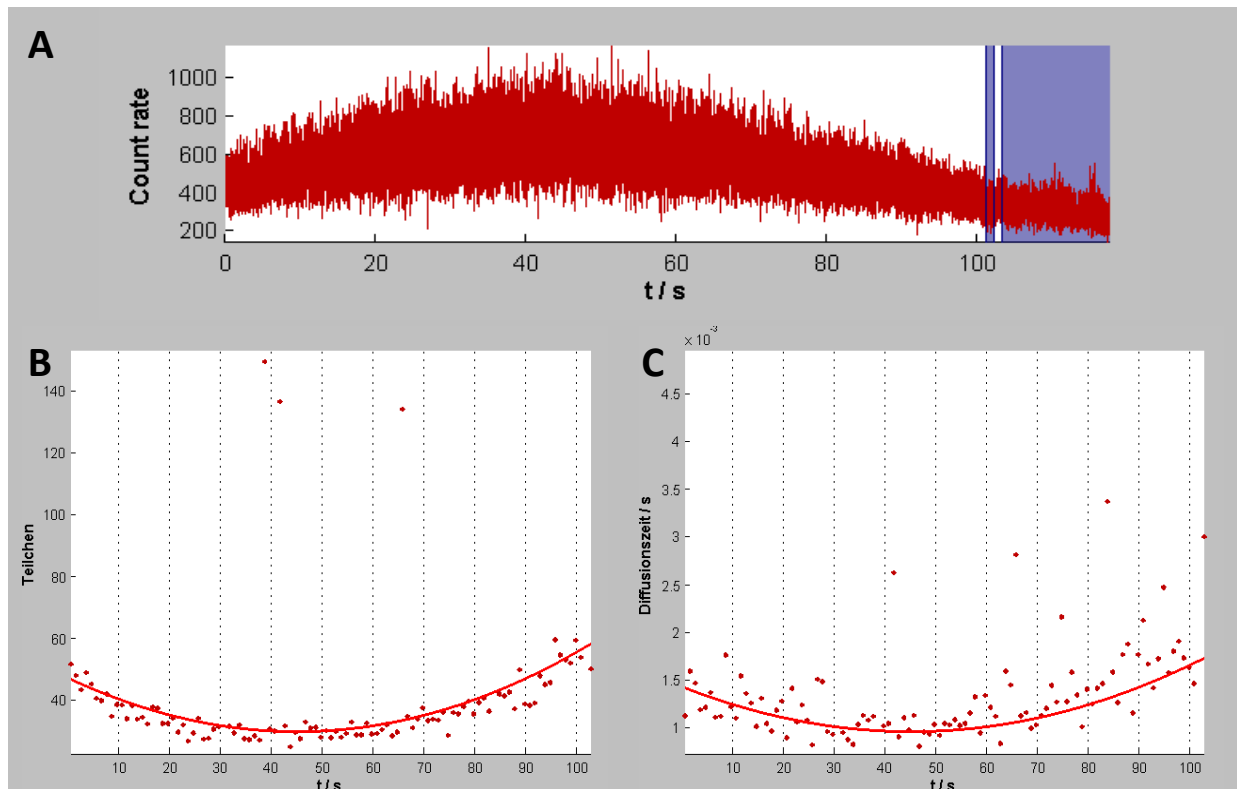


Abbildung 135: luktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 6) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

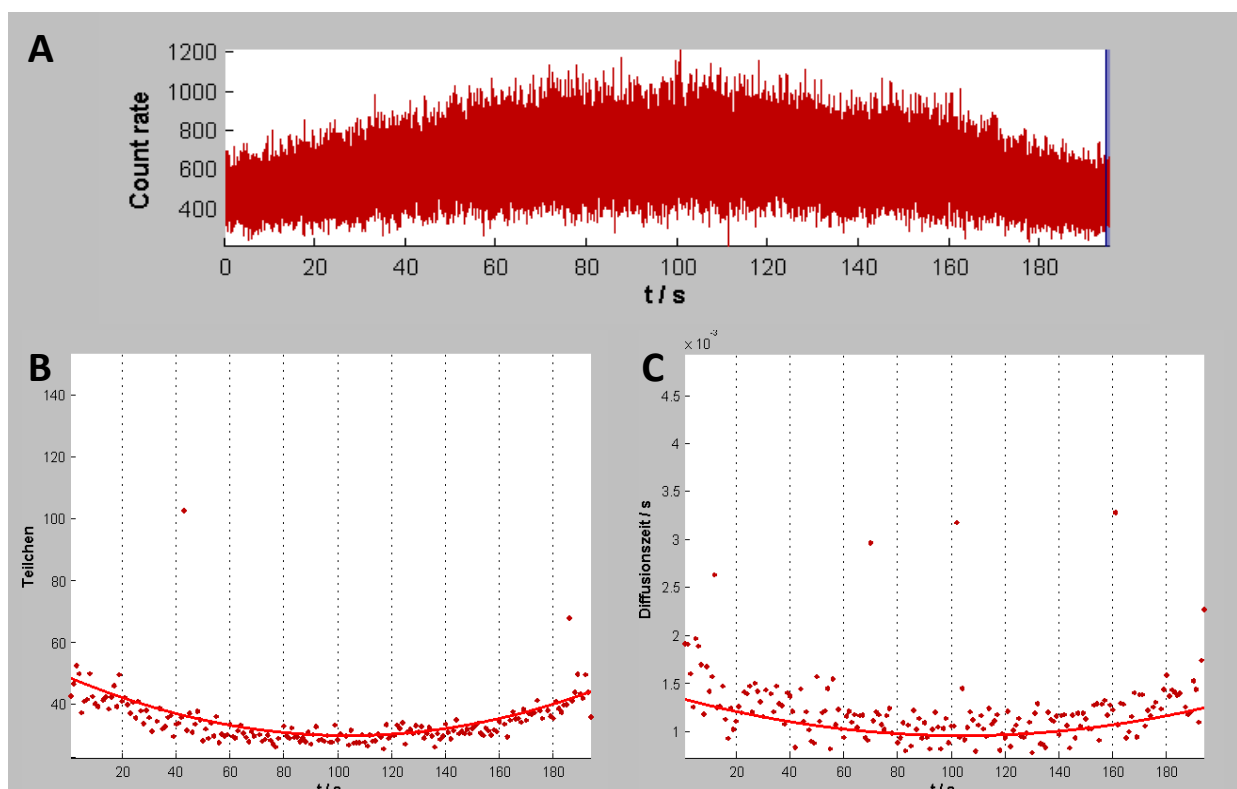


Abbildung 136: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 7) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

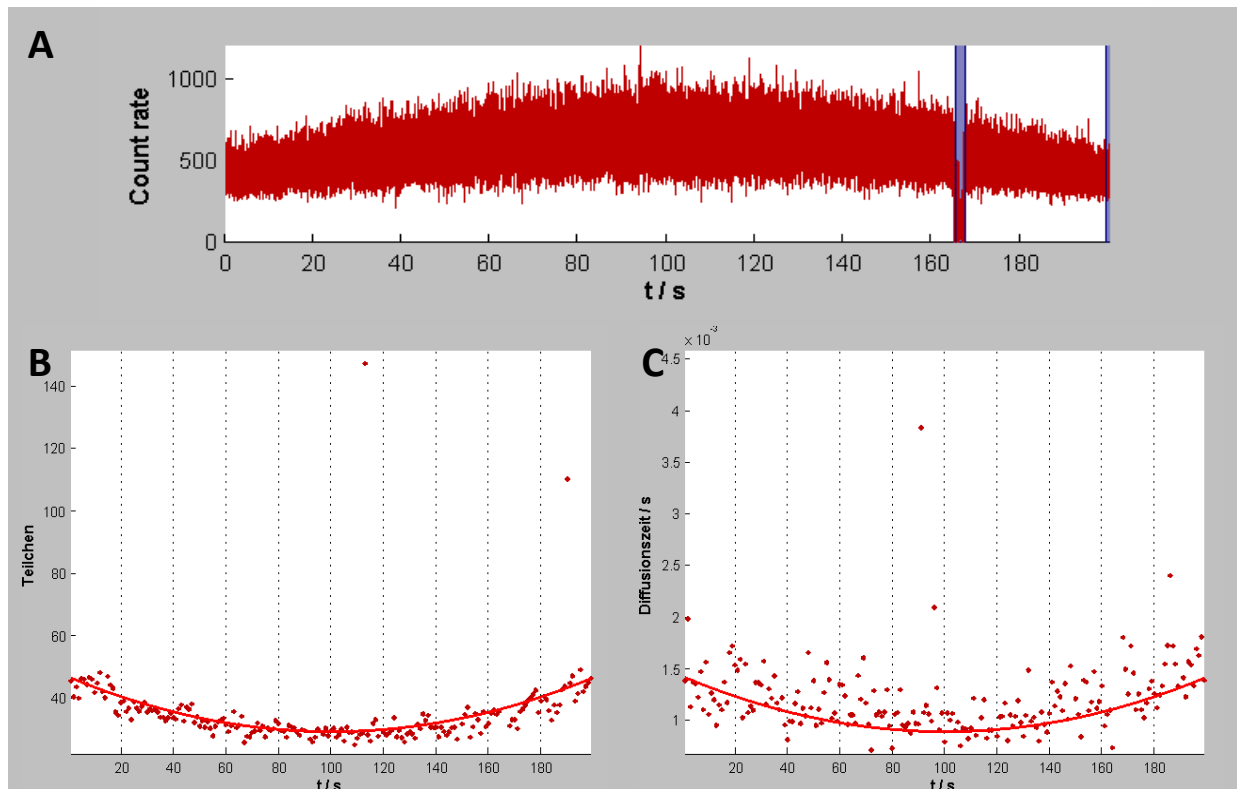


Abbildung 137: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 8) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

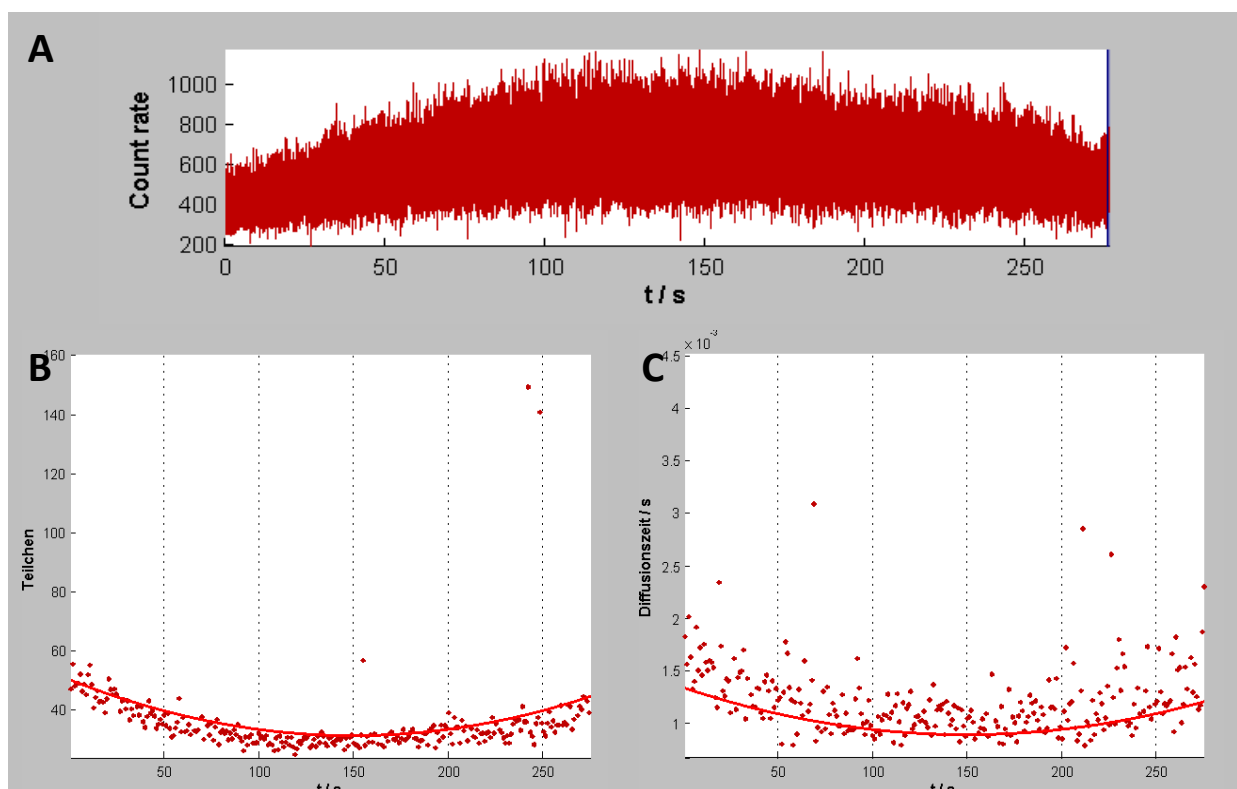


Abbildung 138: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 9) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

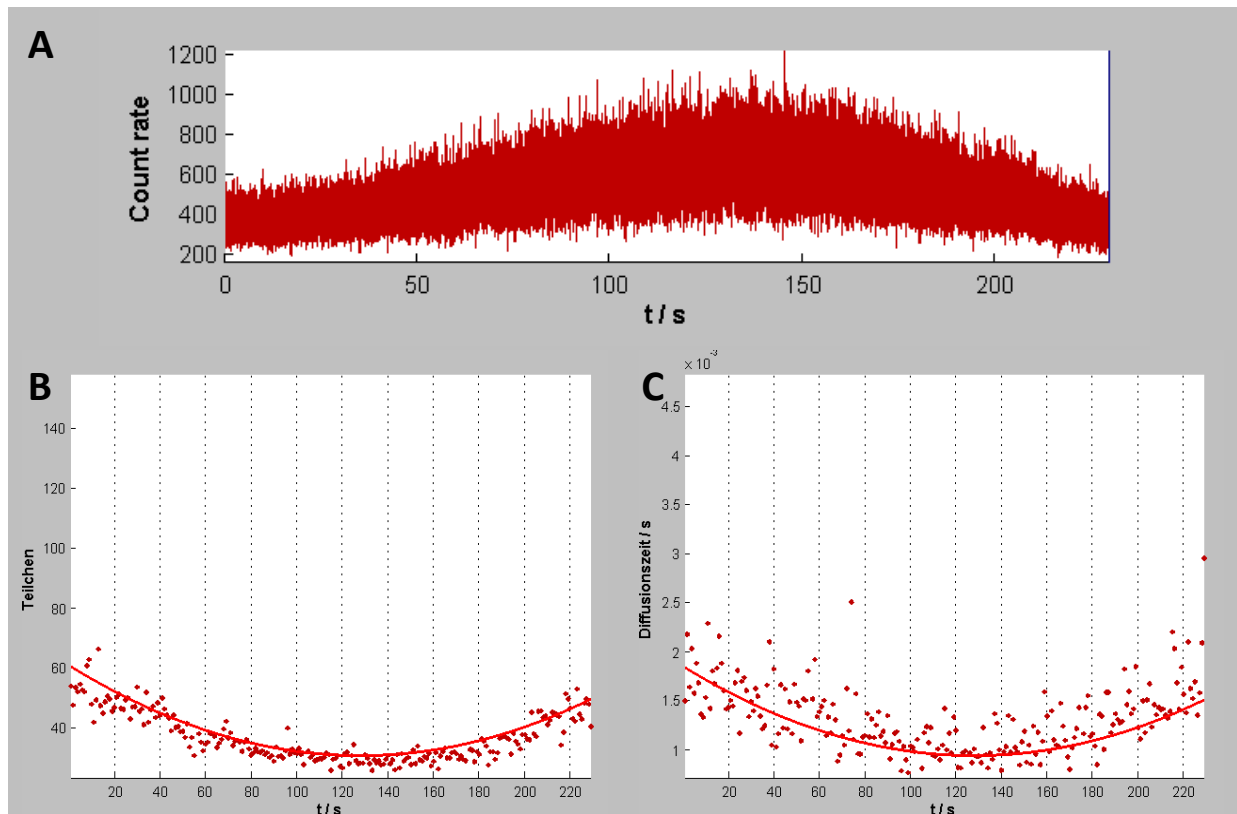


Abbildung 139: Fluktuationssignale (Bild A) einer fluoreszenzmarkierten MMM-Monoschicht, welche über dem Objektiv präpariert und anschließend zweimal neben dieses und zurückbewegt und an verschiedenen Stellen (Position 10) analysiert wurde. Die blauen Bereiche entsprechen denen, die für die Z-Scan-FCS Analyse nicht berücksichtigt werden. (Bild B) parabolischer Verlauf der Teilchen. (Bild C) parabolischer Verlauf der Diffusionszeiten. Die Untersuchung wurde mit dem Detektionskanal 1 (—) analysiert (Segmentlänge: 1 s).

Tabelle 29: Zusammenfassung Stabilität der Monoschicht beim Bewegen über die Filmwaage (Neupräparation)

Position	N_{\min} (Kanal 1)	$\tau_{D_{\min}}$ Kanal 1 / ms
1	31,68	0,93
2	30,87	0,92
3	30,61	0,91
4	30,49	0,90
5	31,09	0,94
6	30,96	0,96
7	29,71	0,96
8	30,38	0,94
9	30,74	0,96
10	30,53	0,98

Tabelle 30: Zusammenfassung Stabilität der Monoschicht beim Bewegen über die Filmwaage (einmal Bewegen)

Position	N_{\min} (Kanal 1)	$\tau_{D_{\min}}$ Kanal 1 / ms
1	30,18	0,98
2	29,66	0,97
3	30,72	0,93
4	30,94	0,97
5	30,72	1,02
6	30,71	0,98
7	30,52	0,95
8	30,82	0,97
9	31,37	0,92
10	30,79	0,98

Tabelle 31: Zusammenfassung Stabilität der Monoschicht beim Bewegen über die Filmwaage (zweimal Bewegen)

Position	N_{\min} (Kanal 1)	$\tau_{D_{\min}}$ Kanal 1 / ms
1	29,88	1,01
2	30,24	0,94
3	29,43	0,95
4	29,14	0,97
5	30,89	0,98
6	30,01	0,97
7	30,02	0,97
8	29,66	0,90
9	31,44	0,89
10	30,94	0,95

13.4.5 Test auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test)

Tabelle 32: Zusammenfassung Halbwertsbreite Z-Ausdehnung (Detektionskanal 1) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	37,39	0,00	0,013	0,013
2	38,15	0,11	0,234	0,123
3	38,50	0,22	0,488	0,266
4	38,52	0,33	0,507	0,173
5	38,66	0,44	0,612	0,168
6	38,70	0,56	0,645	0,090
7	38,72	0,67	0,657	0,009
8	38,82	0,78	0,727	0,051
9	39,17	0,89	0,905	0,016

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,266 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 33: Zusammenfassung Halbwertsbreite Z-Ausdehnung (Detektionskanal 2) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	39,92	0,00	0,094	0,094
2	40,19	0,11	0,163	0,051
3	40,56	0,22	0,297	0,074
4	40,64	0,33	0,331	0,002
5	40,79	0,44	0,401	0,043
6	40,91	0,56	0,460	0,095
7	41,57	0,67	0,763	0,096
8	42,12	0,78	0,918	0,140
9	42,22	0,89	0,935	0,046

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,140 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 34: Zusammenfassung mittlere Teilchenzahl (Detektionskanal 1) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	1,46	0,00	0,020	0,020
2	1,56	0,11	0,215	0,104
3	1,56	0,22	0,241	0,019
4	1,62	0,33	0,565	0,232
5	1,63	0,44	0,625	0,180
6	1,65	0,56	0,683	0,128
7	1,66	0,67	0,735	0,068
8	1,67	0,78	0,800	0,023
9	1,69	0,89	0,866	0,023

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,232 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 35: Zusammenfassung mittlere Teilchenzahl (Detektionskanal 2) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	1,98	0,00	0,083	0,084
2	2,03	0,11	0,176	0,065
3	2,05	0,22	0,241	0,019
4	2,07	0,33	0,279	0,055
5	2,12	0,44	0,477	0,033
6	2,15	0,56	0,563	0,007
7	2,23	0,67	0,807	0,140
8	2,25	0,78	0,854	0,077
9	2,31	0,89	0,943	0,054

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,140 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 36: Zusammenfassung Diffusionszeit (Detektionskanal 1) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	0,000373	0,00	0,130	0,130
2	0,000383	0,11	0,260	0,148
3	0,000384	0,22	0,269	0,046
4	0,000385	0,33	0,289	0,044
5	0,000386	0,44	0,298	0,147
6	0,000392	0,56	0,398	0,158
7	0,000414	0,67	0,787	0,120
8	0,000420	0,78	0,859	0,081
9	0,000437	0,89	0,969	0,080

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,158 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 37: Zusammenfassung Diffusionszeit (Detektionskanal 2) im Rahmen der Bestimmung der idealen Z-Position

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	0,000223	0,00	0,063	0,063
2	0,000238	0,11	0,123	0,012
3	0,000253	0,22	0,223	0,001
4	0,000274	0,33	0,415	0,082
5	0,000283	0,44	0,511	0,066
6	0,000303	0,56	0,714	0,159
7	0,000308	0,67	0,752	0,086
8	0,000324	0,78	0,867	0,089
9	0,000331	0,89	0,901	0,012

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,159 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,430 [117].

Tabelle 38: Zusammenfassung mittlere Teilchenzahl im Rahmen der Untersuchung zum Bleichen

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	11,48	0,00	0,014	0,014
2	11,70	0,07	0,063	0,003
3	11,76	0,13	0,091	0,042
4	12,10	0,20	0,378	0,178
5	12,14	0,27	0,427	0,161
6	12,15	0,33	0,446	0,113
7	12,18	0,40	0,482	0,082
8	12,29	0,47	0,612	0,145
9	12,37	0,53	0,702	0,169
10	12,39	0,60	0,725	0,125
11	12,40	0,67	0,729	0,062
12	12,42	0,73	0,751	0,018
13	12,44	0,80	0,774	0,026
14	12,50	0,87	0,824	0,043
15	12,64	0,93	0,914	0,019

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,178 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,338 [117].

Tabelle 39: Zusammenfassung Diffusionszeit im Rahmen der Untersuchung zum Bleichen

Rang	Messwert	Rang-1/n	vergl. Normalvert.	Differenz
1	213,15	0,00	0,018	0,018
2	218,32	0,07	0,072	0,005
3	221,76	0,13	0,147	0,014
4	223,46	0,20	0,200	0,001
5	225,56	0,27	0,278	0,011
6	229,36	0,33	0,448	0,115
7	231,48	0,40	0,550	0,115
8	231,78	0,47	0,564	0,097
9	235,54	0,53	0,730	0,197
10	235,65	0,60	0,735	0,135
11	236,16	0,67	0,755	0,088
12	237,07	0,73	0,788	0,055
13	237,29	0,80	0,795	0,005
14	239,00	0,87	0,849	0,018
15	241,13	0,93	0,901	0,032

Alle Messwerte sind normalverteilt, da die maximale Abweichung von 0,197 kleiner ist als der kritische Wert ($\alpha = 0,05$) von 0,338 [117].

13.5 Interaktionsanalyse von Sar1p und Phospholipid-Monoschichten durch Z-Scan-FCS

13.5.1 Setupkalibrierung zur Bestimmung der Fokusfläche

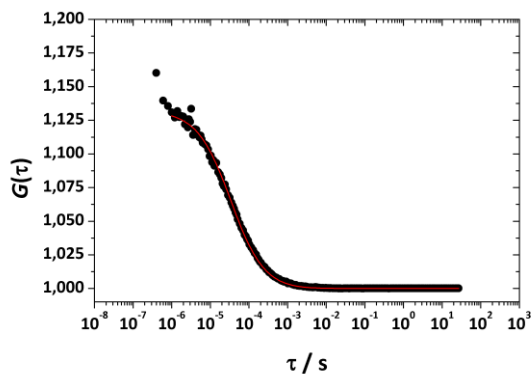


Abbildung 140: Korrelationskurve einer Alexa488-Hydrazid-Lösung. Die Daten wurden nach einem Modell mit 3 dimensionaler Diffusion ohne Triplettanteil (Gleichung [8]) angepasst. Die dabei erhaltene τ_D beträgt 33,776 μs was bei einem D von $4,14 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [81] nach Gleichung [6] ein r_0 von 237 nm ergibt ($S = 7,3$).

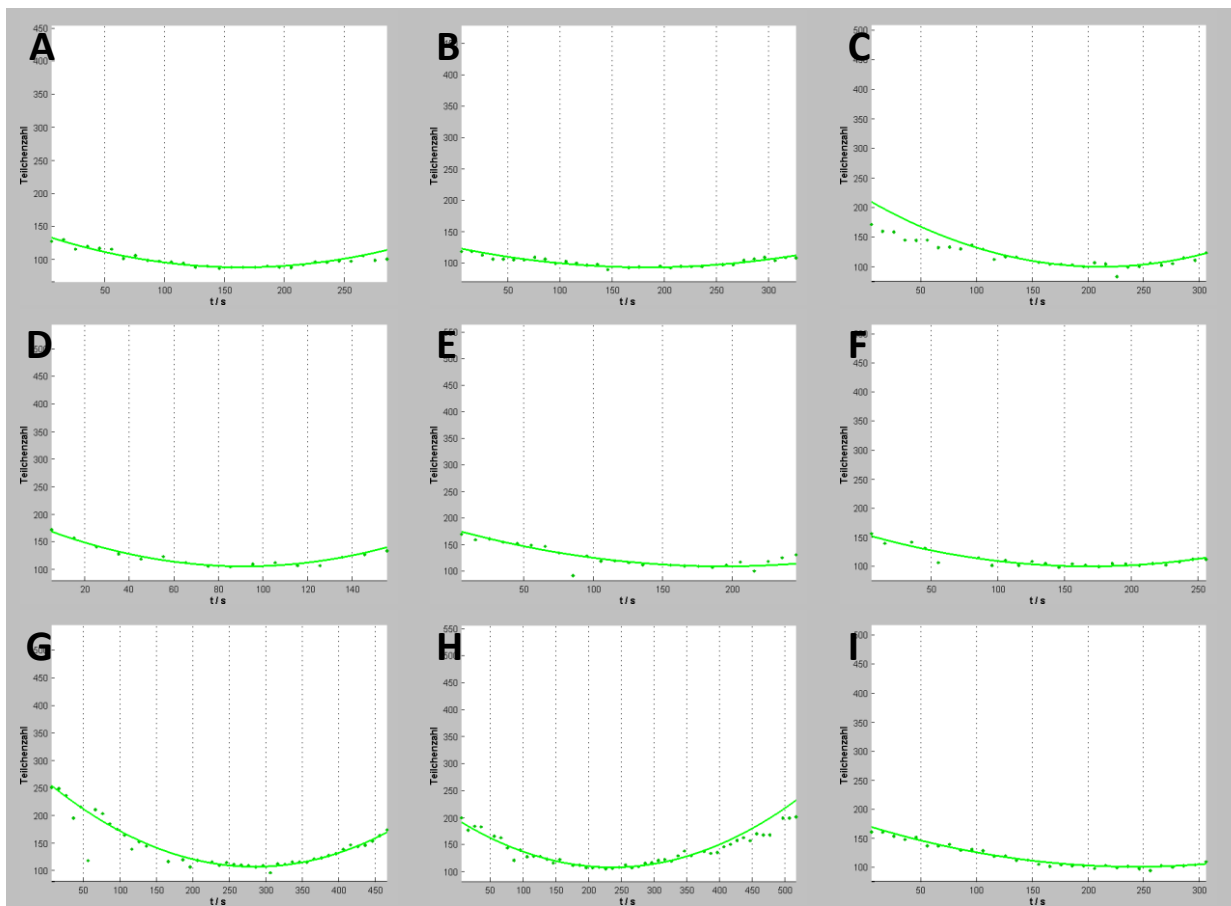
13.5.2 Interaktion von Sar1p_{SCCSAI488} (100 %) mit einer MMM-Monoschicht

Abbildung 141: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p_{SCCSAI488} nach Injektion in Gegenwart einer 30 mM m⁻¹ MMM-Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an mehreren Stellen (jede Graphik entspricht einer Position) und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert. (Segmentlänge: 10 s);

Tabelle 40: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p_{SCCSAI488} nach Injektion in Gegenwart einer 30 mM m⁻¹ MMM-Monoschicht

Position	Abbildung	N_{\min}
1	Abbildung 141, Bild A	88,98
2	Abbildung 141, Bild B	93,81
3	Abbildung 141, Bild C	99,52
4	Abbildung 141, Bild D	106,62
5	Abbildung 141, Bild E	110,57
6	Abbildung 141, Bild F	101,16
7	Abbildung 141, Bild G	106,81
8	Abbildung 141, Bild H	108,95
9	Abbildung 141, Bild I	101,27

13.5.3 Interaktion von Sar1p-Mischungen mit MMM-Monoschichten

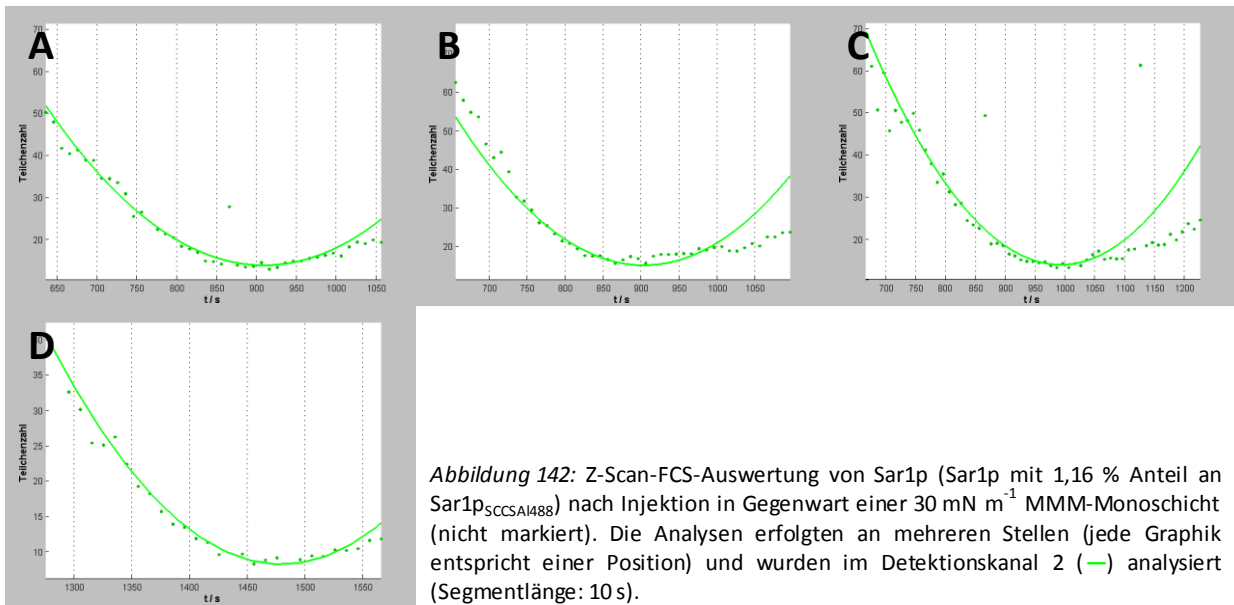


Abbildung 142: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Anteil an Sar1p_{SCCSAI488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an mehreren Stellen (jede Graphik entspricht einer Position) und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 10 s).

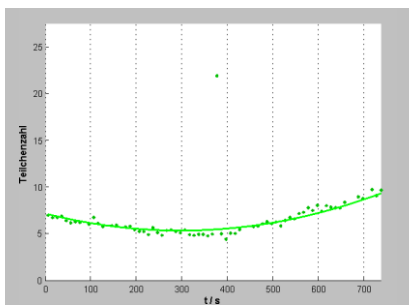


Abbildung 143: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 0,8 % Anteil an Sar1p_{SCCSAI488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an einer Stelle und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 10 s).

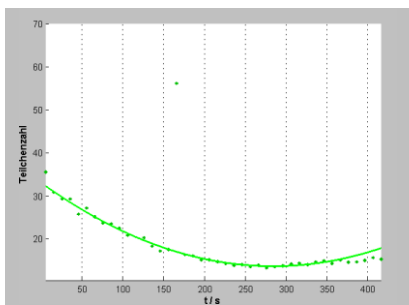


Abbildung 144: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 2,7 % Anteil an Sar1p_{SCCSAI488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an einer Stelle und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 10 s).

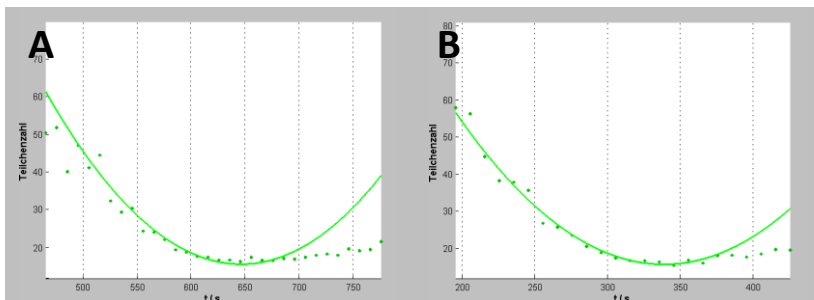


Abbildung 145: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 1,85 % Anteil an Sar1p_{SCCSAI488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an mehreren Stellen (jede Graphik entspricht einer Position) und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 10 s).

Tabelle 41: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht

Position	Abbildung	N_{\min}
1	Abbildung 142, Bild A	13,99
2	Abbildung 142, Bild B	15,25
3	Abbildung 142, Bild C	13,94
4	Abbildung 142, Bild D	8,30
1	Abbildung 143	5,39
1	Abbildung 144	13,73
1	Abbildung 145, Bild A	15,61
2	Abbildung 145, Bild B	15,84

13.5.4 Interaktion von Sar1p-Mischungen mit DLPC/DLPS-Monoschichten

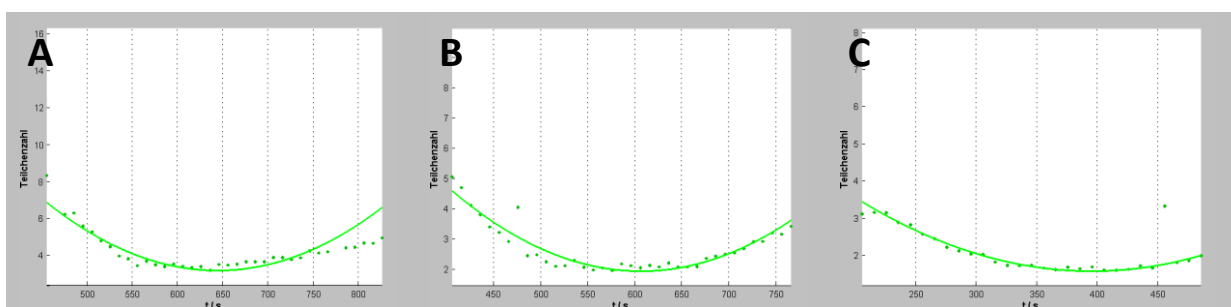


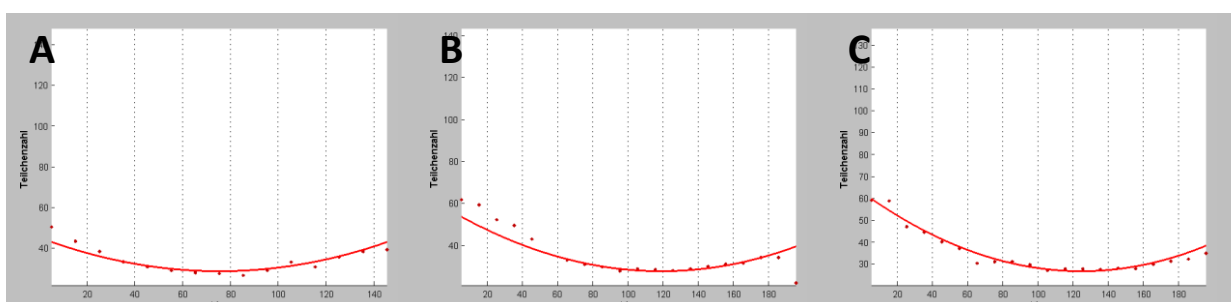
Abbildung 146: zeigt die Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ DLPC/DLPS Monoschicht (nicht markiert). Die Analysen erfolgten an mehreren Monoschichten (jede Graphik entspricht einer Monoschicht) und wurden im Detektionskanal 2 (—) analysiert (Segmentlänge: 10 s).

Tabelle 42: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart eines 30 mN m⁻¹ DLPC/DLPS Monoschicht

Monoschicht	N_{\min}
1 (Abbildung 146, Bild A)	3,19
2 (Abbildung 146, Bild B)	1,94
3 (Abbildung 146, Bild C)	1,59

13.5.5 Interaktion von Sar1p-Mischungen mit fluoreszierenden MMM-Monoschichten

13.5.5.1 MMM-Monolayer 1



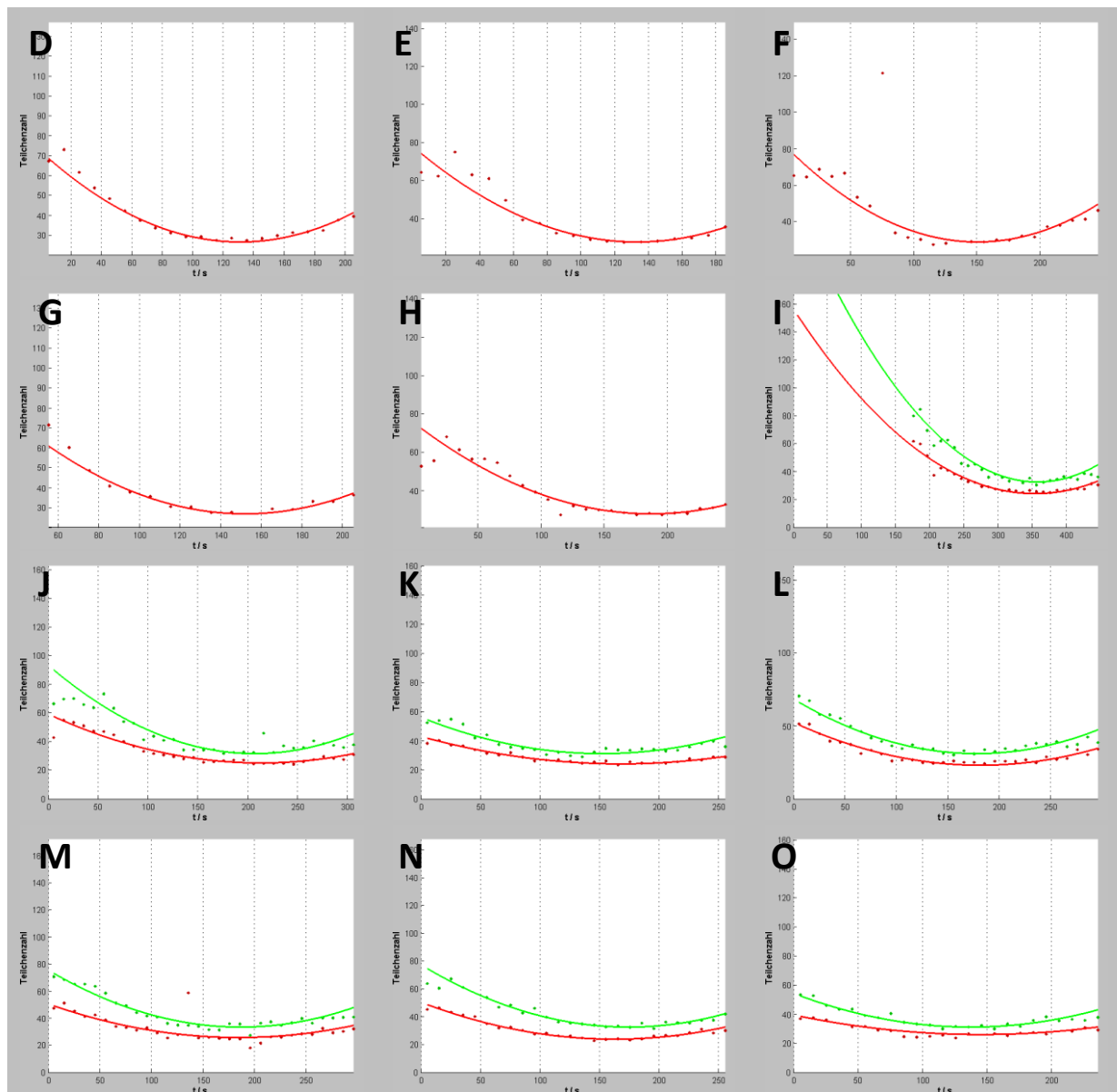


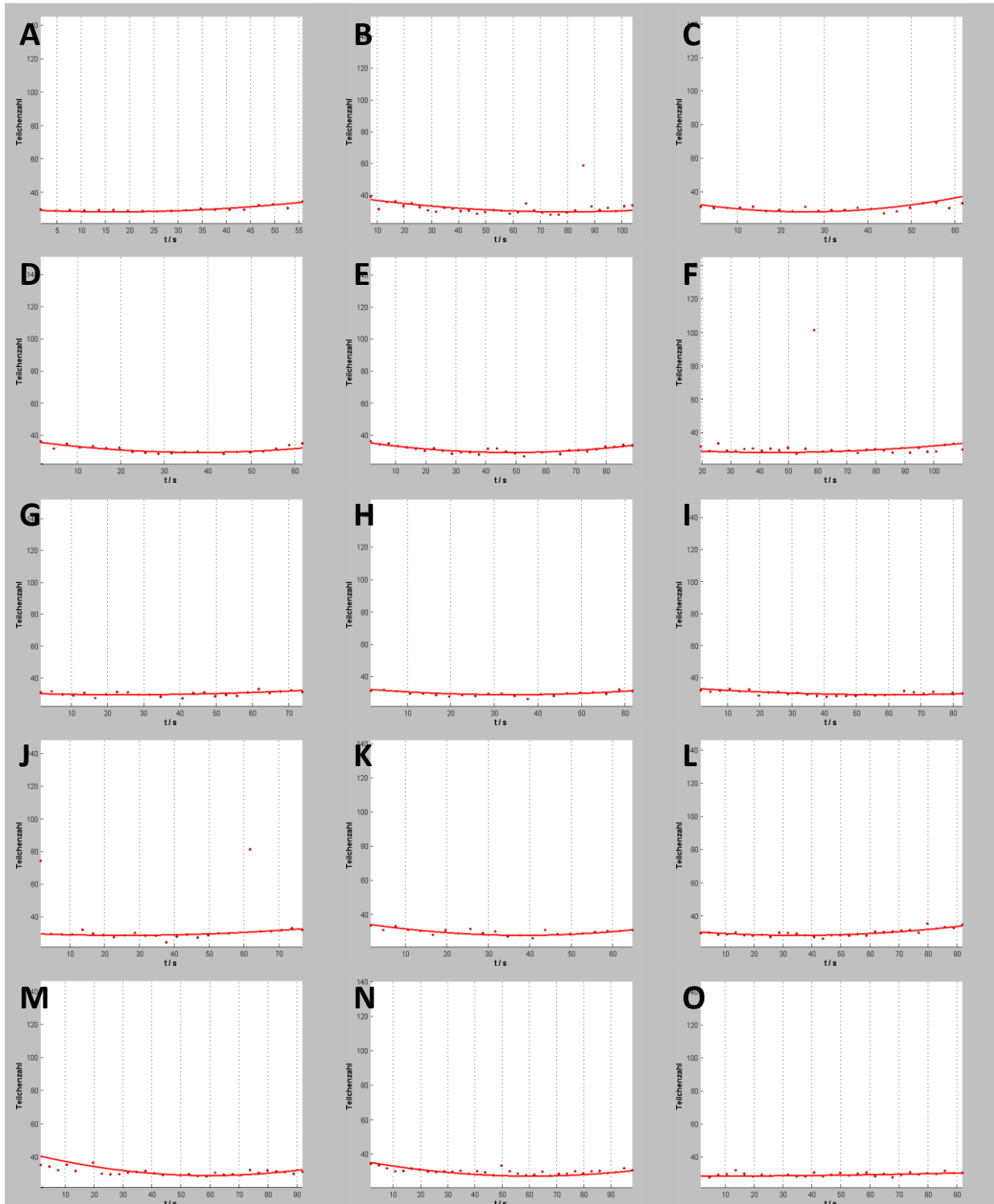
Abbildung 147: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 1 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (ebenfalls fluoreszenzmarkiert). Die Analysen erfolgten an mehreren Positionen vor und nach der Injektion. Jede Graphik zeigt dabei eine Position, wobei die Messungen vor der Injektion ausschließlich im Detektionskanal 1 (—) und die Messungen nach der Injektion in beiden Detektionskanälen (— und —) gemessen und analysiert wurden (Segmentlänge: 10 s).

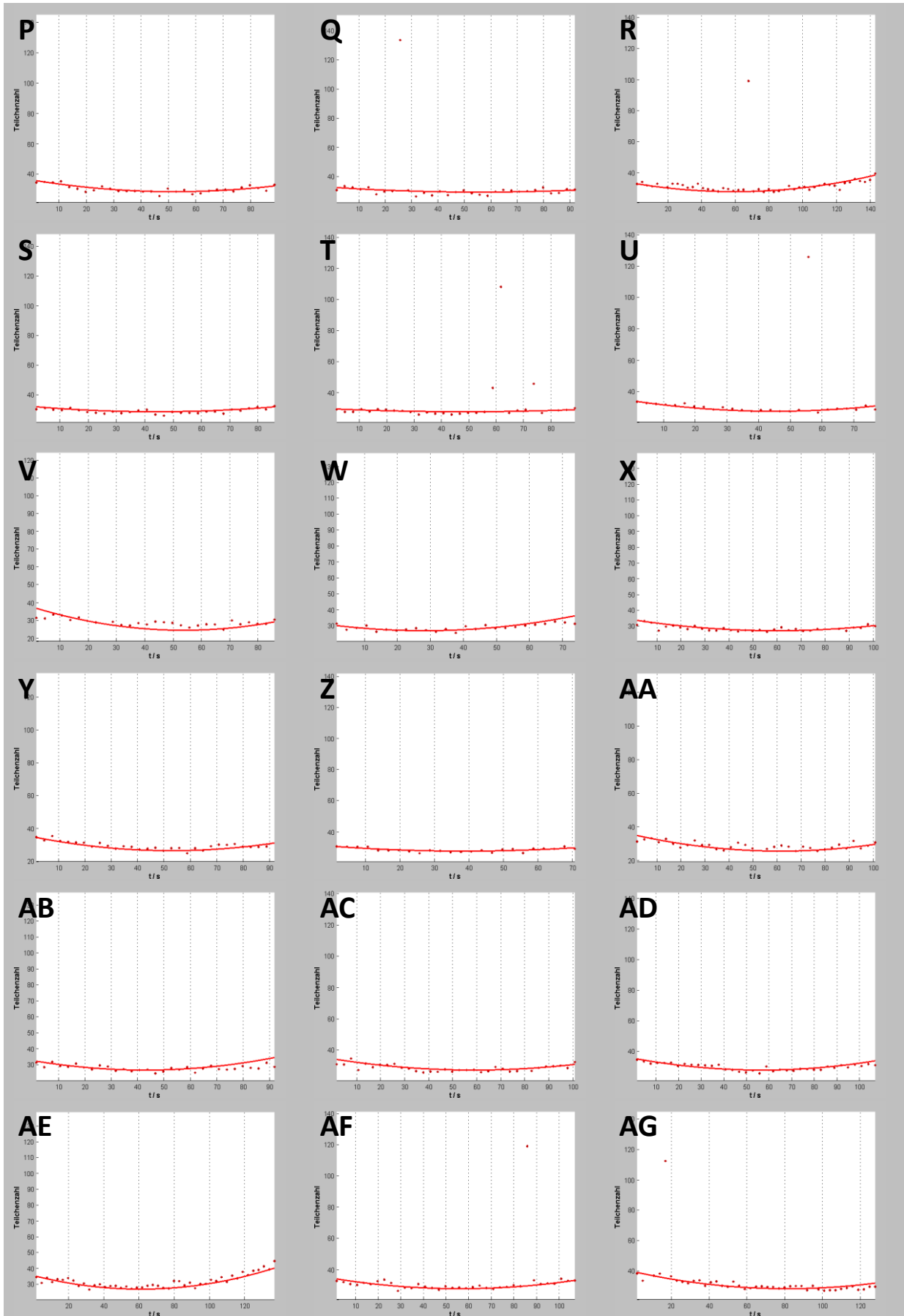
Tabelle 43: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 1 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
1	(Abbildung 147, Bild A)	28,98	-----	-----
2	(Abbildung 147, Bild B)	28,09	-----	-----
3	(Abbildung 147, Bild C)	26,97	-----	-----
4	(Abbildung 147, Bild D)	26,88	-----	-----
5	(Abbildung 147, Bild E)	28,08	-----	-----
6	(Abbildung 147, Bild F)	29,25	-----	-----
7	(Abbildung 147, Bild G)	26,88	-----	-----
8	(Abbildung 147, Bild H)	27,94	-----	-----

1	(Abbildung 147, Bild I)	-----	24,44	32,77
2	(Abbildung 147, Bild J)	-----	25,46	31,97
3	(Abbildung 147, Bild K)	-----	24,40	31,41
4	(Abbildung 147, Bild L)	-----	23,43	31,37
5	(Abbildung 147, Bild M)	-----	26,09	33,76
6	(Abbildung 147, Bild N)	-----	24,22	32,89
7	(Abbildung 147, Bild O)	-----	26,37	31,47

13.5.5.2 MMM-Monolayer 2





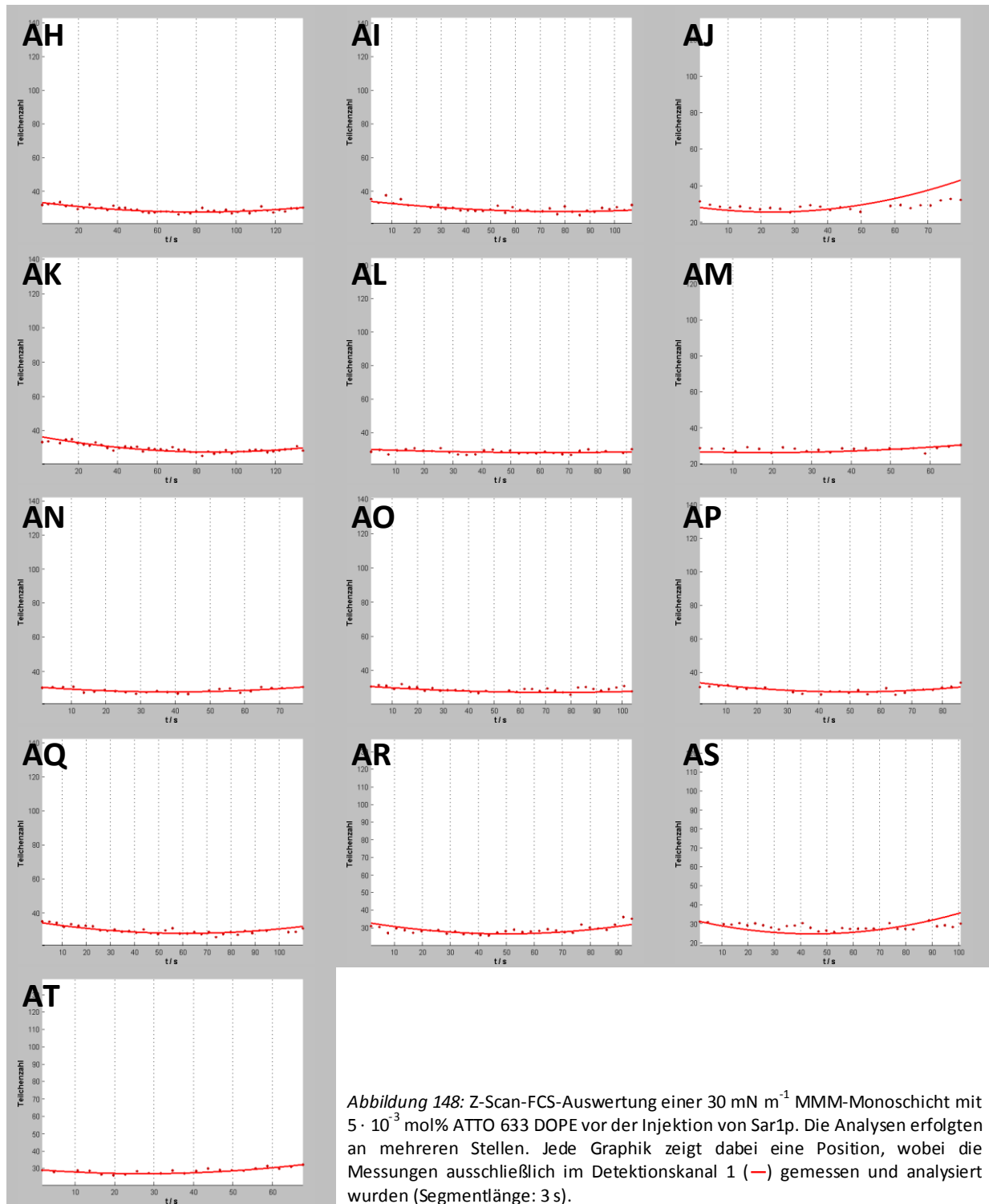
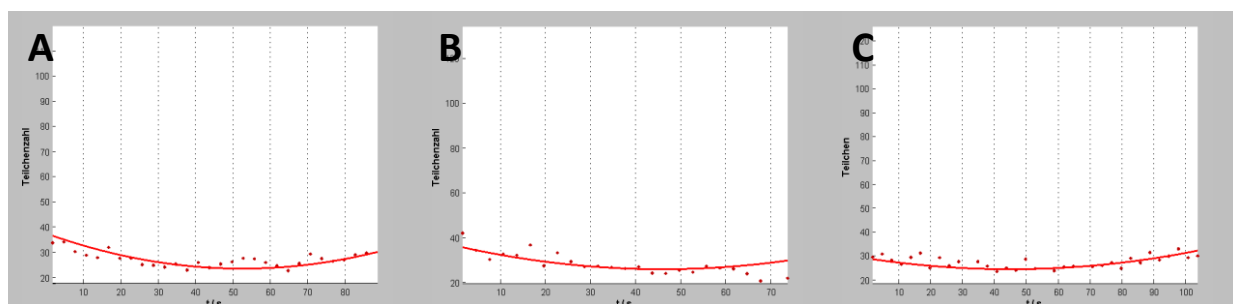
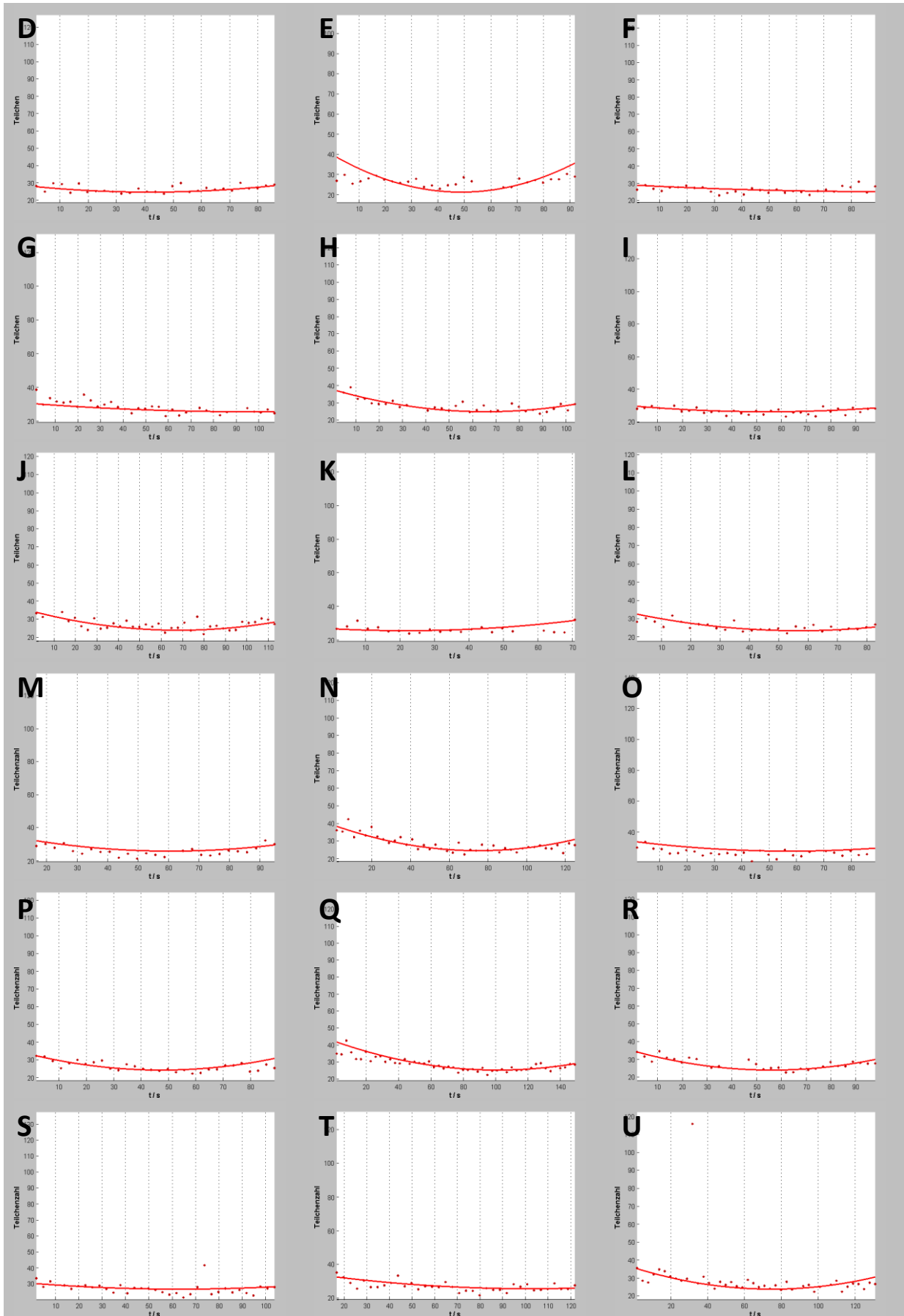
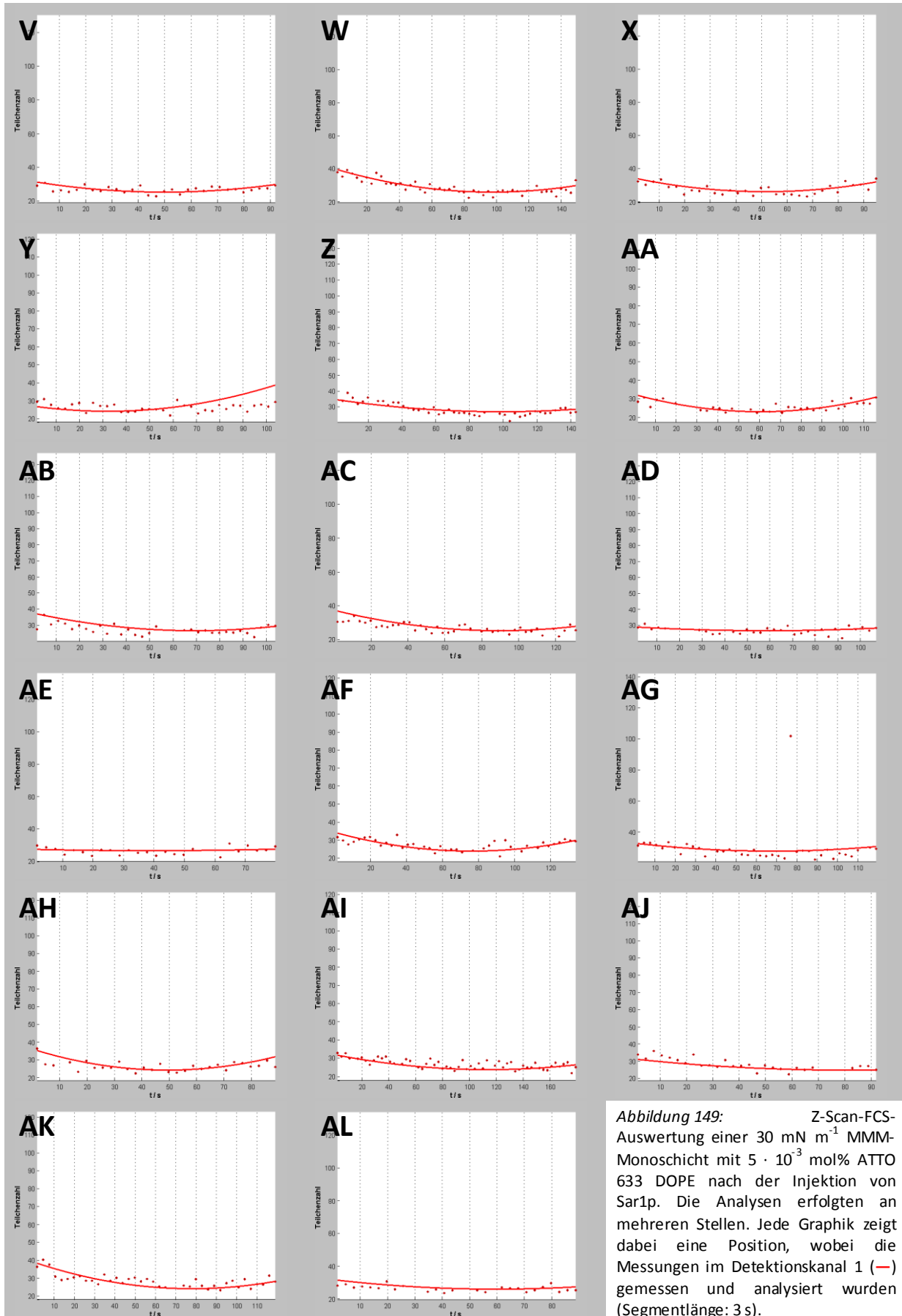
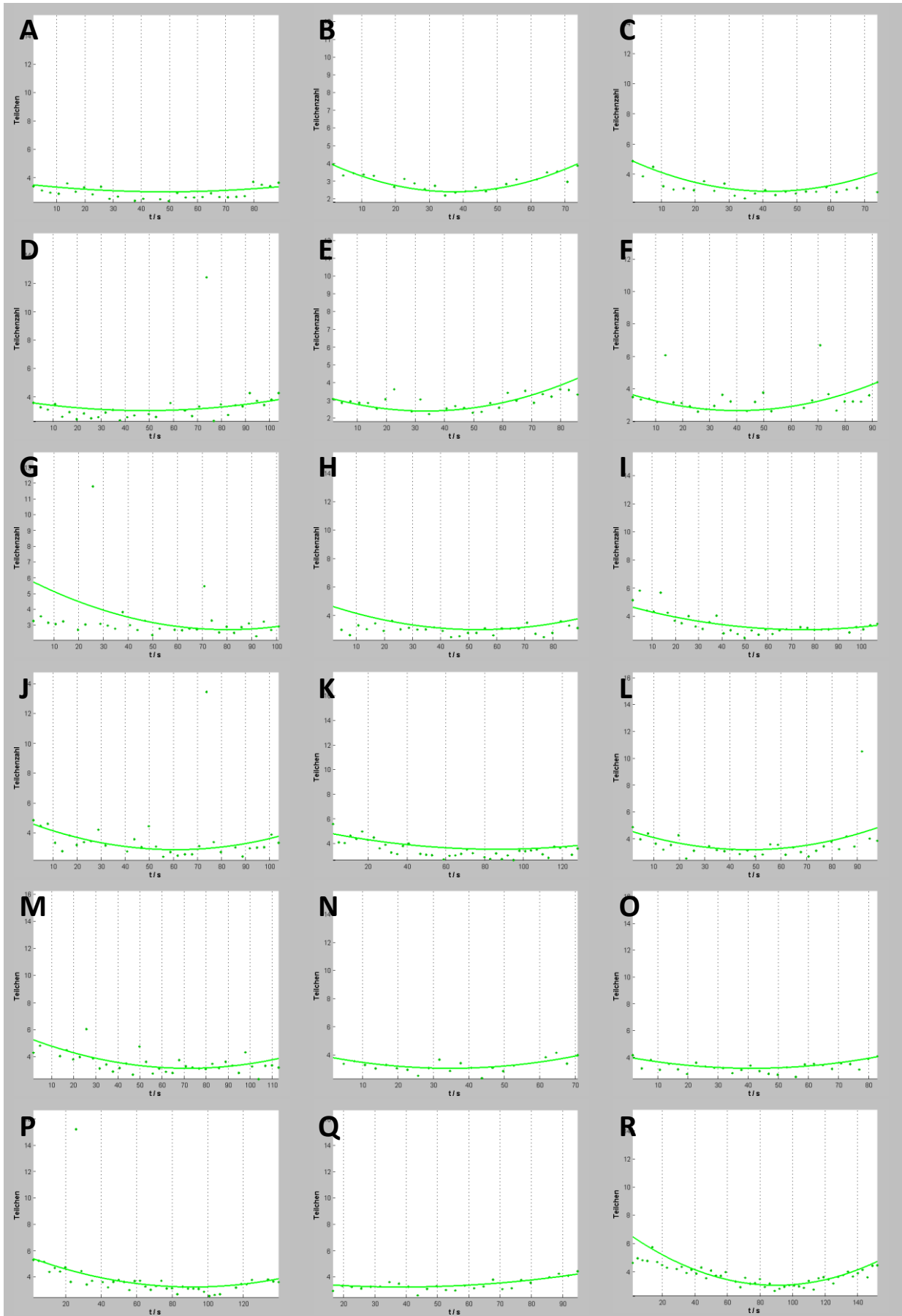


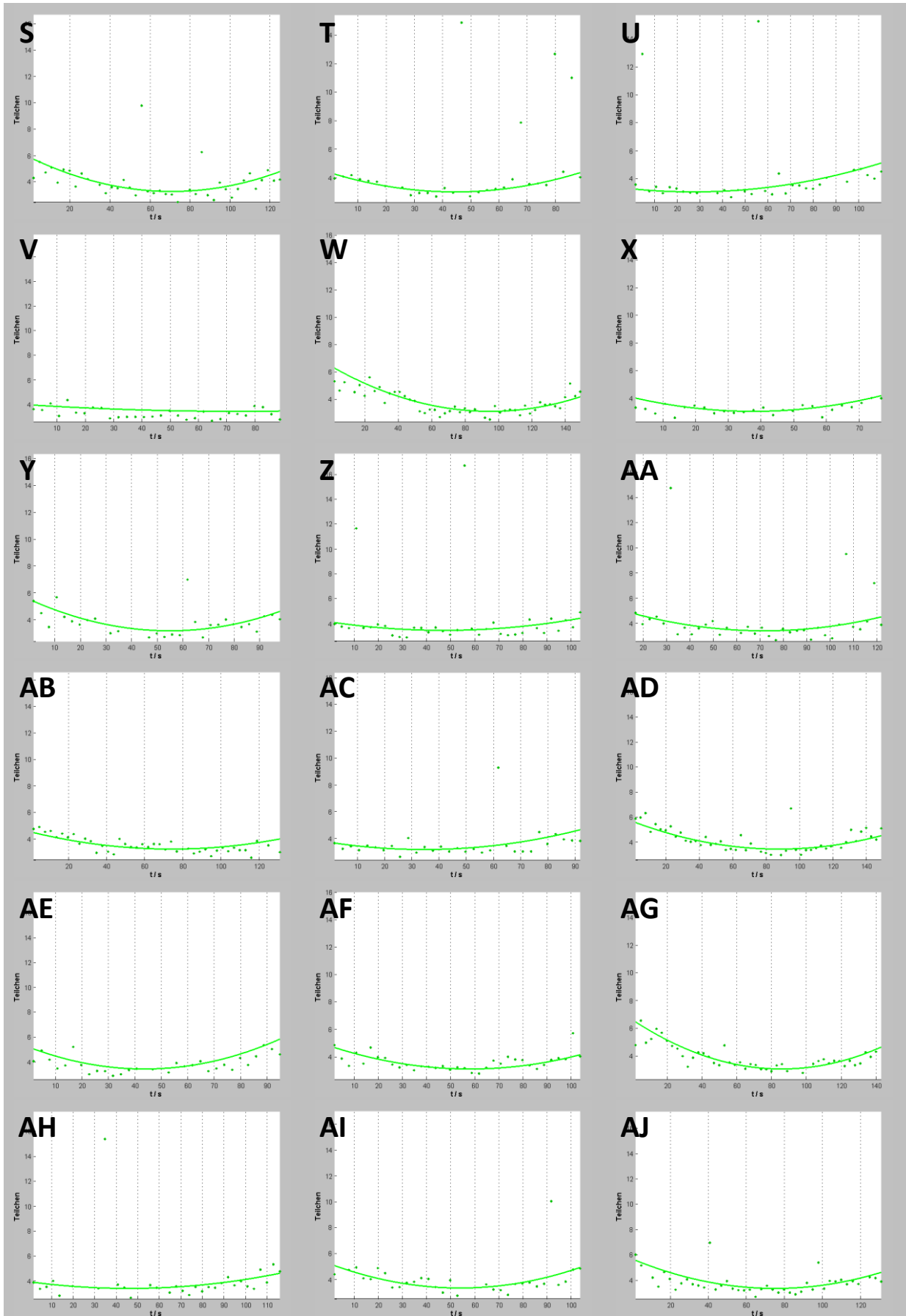
Abbildung 148: Z-Scan-FCS-Auswertung einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE vor der Injektion von Sar1p. Die Analysen erfolgten an mehreren Stellen. Jede Graphik zeigt dabei eine Position, wobei die Messungen ausschließlich im Detektionskanal 1 (—) gemessen und analysiert wurden (Segmentlänge: 3 s).











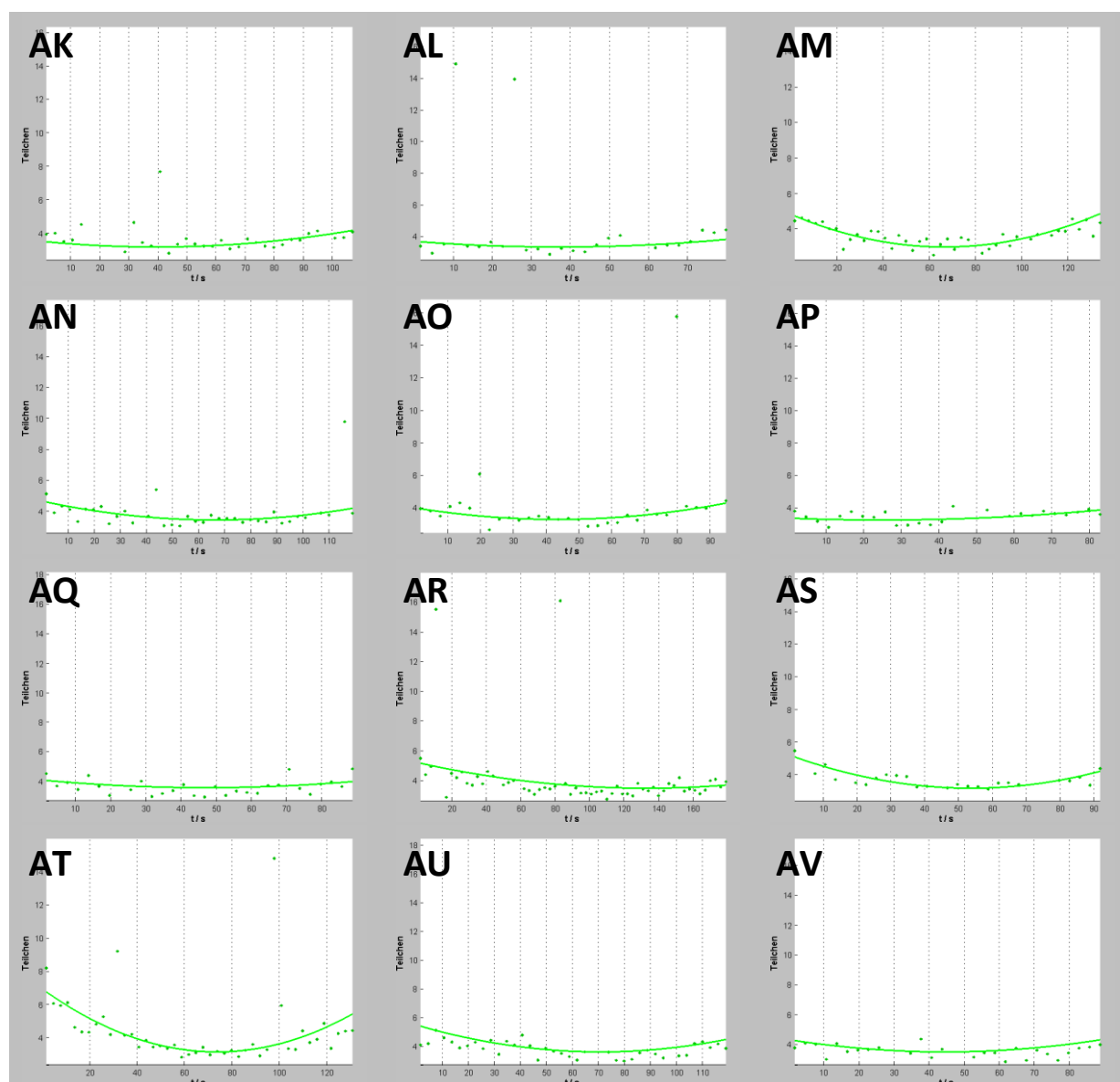


Abbildung 150: Z-Scan-FCS-Auswertung von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE). Die Analysen erfolgten an mehreren Positionen nach der Injektion. Jede Graphik zeigt dabei eine Position, wobei die Messungen nach der Injektion im Detektionskanal 2 (—) gemessen und analysiert wurden (Segmentlänge: 3 s).

Tabelle 44: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
1	(Abbildung 148, Bild A)	28,46	-----	-----
2	(Abbildung 148, Bild B)	29,89	-----	-----
3	(Abbildung 148, Bild C)	28,33	-----	-----
4	(Abbildung 148, Bild D)	29,59	-----	-----
5	(Abbildung 148, Bild E)	29,62	-----	-----
6	(Abbildung 148, Bild F)	28,42	-----	-----
7	(Abbildung 148, Bild G)	29,82	-----	-----
8	(Abbildung 148, Bild H)	29,27	-----	-----
9	(Abbildung 148, Bild I)	29,64	-----	-----
10	(Abbildung 148, Bild J)	29,03	-----	-----
11	(Abbildung 148, Bild K)	27,88	-----	-----

Tabelle 44: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
12	(Abbildung 148, Bild L)	28,63	-----	-----
13	(Abbildung 148, Bild M)	28,65	-----	-----
14	(Abbildung 148, Bild N)	27,48	-----	-----
15	(Abbildung 148, Bild O)	28,66	-----	-----
16	(Abbildung 148, Bild P)	28,40	-----	-----
17	(Abbildung 148, Bild Q)	29,56	-----	-----
18	(Abbildung 148, Bild R)	27,77	-----	-----
19	(Abbildung 148, Bild S)	29,07	-----	-----
20	(Abbildung 148, Bild T)	27,85	-----	-----
21	(Abbildung 148, Bild U)	27,52	-----	-----
22	(Abbildung 148, Bild V)	24,35	-----	-----
23	(Abbildung 148, Bild W)	27,14	-----	-----
24	(Abbildung 148, Bild X)	27,40	-----	-----
25	(Abbildung 148, Bild Y)	26,37	-----	-----
26	(Abbildung 148, Bild Z)	27,83	-----	-----
27	(Abbildung 148, Bild AA)	25,76	-----	-----
28	(Abbildung 148, Bild AB)	27,02	-----	-----
29	(Abbildung 148, Bild AC)	27,58	-----	-----
30	(Abbildung 148, Bild AD)	28,20	-----	-----
31	(Abbildung 148, Bild AE)	27,20	-----	-----
32	(Abbildung 148, Bild AF)	27,63	-----	-----
33	(Abbildung 148, Bild AG)	28,34	-----	-----
34	(Abbildung 148, Bild AH)	28,01	-----	-----
35	(Abbildung 148, Bild AI)	28,03	-----	-----
36	(Abbildung 148, Bild AJ)	25,86	-----	-----
37	(Abbildung 148, Bild AK)	27,58	-----	-----
38	(Abbildung 148, Bild AL)	28,31	-----	-----
39	(Abbildung 148, Bild AM)	26,37	-----	-----
40	(Abbildung 148, Bild AN)	27,83	-----	-----
41	(Abbildung 148, Bild AO)	27,61	-----	-----
42	(Abbildung 148, Bild AP)	28,27	-----	-----
43	(Abbildung 148, Bild AQ)	27,85	-----	-----
44	(Abbildung 148, Bild AR)	26,87	-----	-----
45	(Abbildung 148, Bild AS)	24,96	-----	-----
46	(Abbildung 148, Bild AT)	27,25	-----	-----
1	(Abbildung 149, Bild A)	-----	23,46	-----
2	(Abbildung 149, Bild B)	-----	26,30	-----
3	(Abbildung 149, Bild C)	-----	24,72	-----
4	(Abbildung 149, Bild D)	-----	24,89	-----
5	(Abbildung 149, Bild E)	-----	21,41	-----
6	(Abbildung 149, Bild F)	-----	25,02	-----
7	(Abbildung 149, Bild G)	-----	25,67	-----
8	(Abbildung 149, Bild H)	-----	25,07	-----
9	(Abbildung 149, Bild I)	-----	26,50	-----
10	(Abbildung 149, Bild J)	-----	23,90	-----

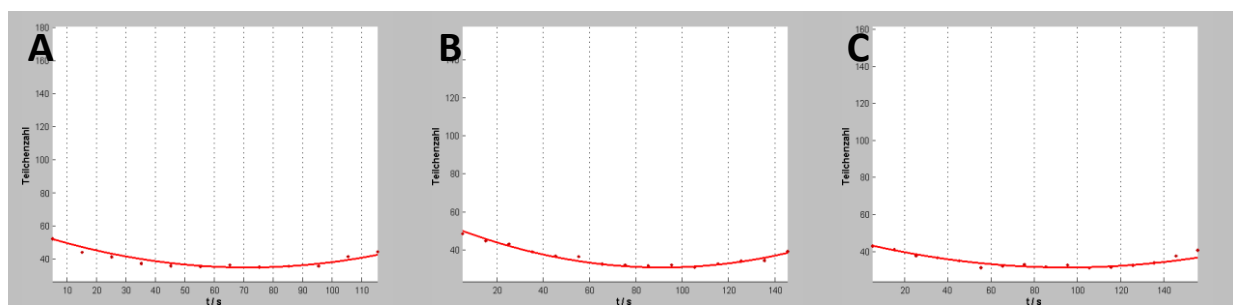
Table 44: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

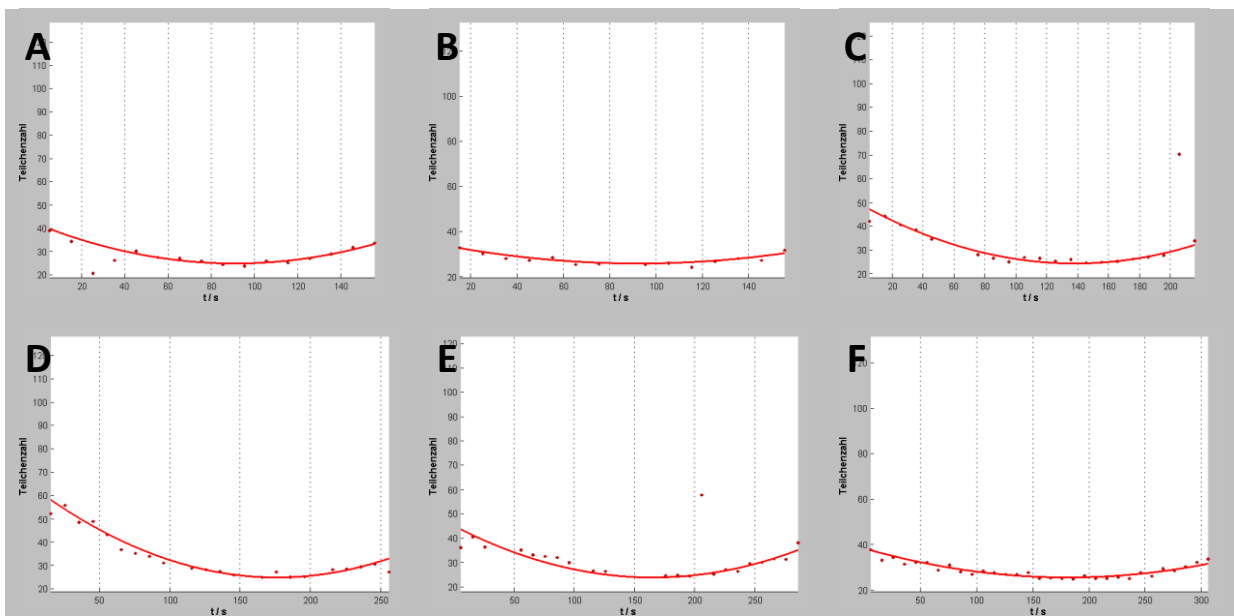
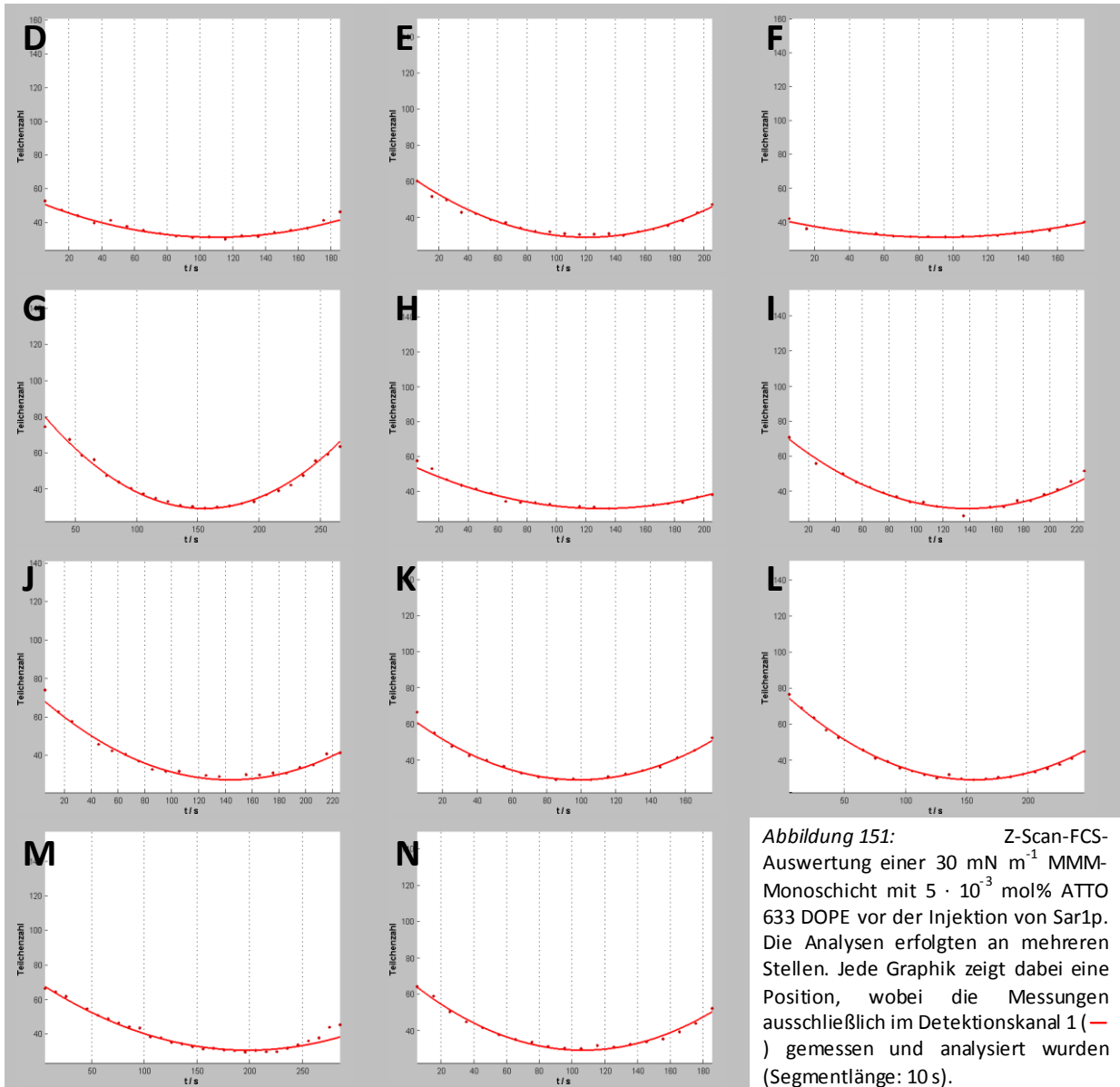
Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
11	(Abbildung 149, Bild K)	-----	25,73	-----
12	(Abbildung 149, Bild L)	-----	23,68	-----
13	(Abbildung 149, Bild M)	-----	26,13	-----
14	(Abbildung 149, Bild N)	-----	24,55	-----
15	(Abbildung 149, Bild O)	-----	27,97	-----
16	(Abbildung 149, Bild P)	-----	24,41	-----
17	(Abbildung 149, Bild Q)	-----	25,47	-----
18	(Abbildung 149, Bild R)	-----	24,28	-----
19	(Abbildung 149, Bild S)	-----	26,96	-----
20	(Abbildung 149, Bild T)	-----	25,28	-----
21	(Abbildung 149, Bild U)	-----	24,02	-----
22	(Abbildung 149, Bild V)	-----	25,54	-----
23	(Abbildung 149, Bild W)	-----	26,10	-----
24	(Abbildung 149, Bild X)	-----	26,04	-----
25	(Abbildung 149, Bild Y)	-----	24,08	-----
26	(Abbildung 149, Bild Z)	-----	27,25	-----
27	(Abbildung 149, Bild AA)	-----	23,26	-----
28	(Abbildung 149, Bild AB)	-----	26,85	-----
29	(Abbildung 149, Bild AC)	-----	25,53	-----
30	(Abbildung 149, Bild AD)	-----	27,02	-----
31	(Abbildung 149, Bild AE)	-----	26,66	-----
32	(Abbildung 149, Bild AF)	-----	24,05	-----
33	(Abbildung 149, Bild AG)	-----	27,85	-----
34	(Abbildung 149, Bild AH)	-----	24,41	-----
35	(Abbildung 149, Bild AI)	-----	23,75	-----
36	(Abbildung 149, Bild AJ)	-----	25,13	-----
37	(Abbildung 149, Bild AK)	-----	24,08	-----
38	(Abbildung 149, Bild AL)	-----	26,28	-----
1	(Abbildung 150, Bild A)	-----	-----	3,03
2	(Abbildung 150, Bild B)	-----	-----	2,43
3	(Abbildung 150, Bild C)	-----	-----	2,85
4	(Abbildung 150, Bild D)	-----	-----	3,04
5	(Abbildung 150, Bild E)	-----	-----	2,43
6	(Abbildung 150, Bild F)	-----	-----	2,66
7	(Abbildung 150, Bild G)	-----	-----	2,74
8	(Abbildung 150, Bild H)	-----	-----	3,03
9	(Abbildung 150, Bild I)	-----	-----	3,07
10	(Abbildung 150, Bild J)	-----	-----	2,89
11	(Abbildung 150, Bild K)	-----	-----	3,51
12	(Abbildung 150, Bild L)	-----	-----	3,22
13	(Abbildung 150, Bild M)	-----	-----	3,18
14	(Abbildung 150, Bild N)	-----	-----	3,07
15	(Abbildung 150, Bild O)	-----	-----	3,22
16	(Abbildung 150, Bild P)	-----	-----	3,27
17	(Abbildung 150, Bild Q)	-----	-----	3,27

Tabelle 44: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
18	(Abbildung 150, Bild R)	-----	-----	3,03
19	(Abbildung 150, Bild S)	-----	-----	3,27
20	(Abbildung 150, Bild T)	-----	-----	3,02
21	(Abbildung 150, Bild U)	-----	-----	3,08
22	(Abbildung 150, Bild V)	-----	-----	3,49
23	(Abbildung 150, Bild W)	-----	-----	3,15
24	(Abbildung 150, Bild X)	-----	-----	3,10
25	(Abbildung 150, Bild Y)	-----	-----	3,21
26	(Abbildung 150, Bild Z)	-----	-----	3,46
27	(Abbildung 150, Bild AA)	-----	-----	3,45
28	(Abbildung 150, Bild AB)	-----	-----	3,25
29	(Abbildung 150, Bild AC)	-----	-----	3,21
30	(Abbildung 150, Bild AD)	-----	-----	3,44
31	(Abbildung 150, Bild AE)	-----	-----	3,46
32	(Abbildung 150, Bild AF)	-----	-----	3,14
33	(Abbildung 150, Bild AG)	-----	-----	3,10
34	(Abbildung 150, Bild AH)	-----	-----	3,45
35	(Abbildung 150, Bild AI)	-----	-----	3,33
36	(Abbildung 150, Bild AJ)	-----	-----	3,39
37	(Abbildung 150, Bild AK)	-----	-----	3,20
38	(Abbildung 150, Bild AL)	-----	-----	3,38
39	(Abbildung 150, Bild AM)	-----	-----	3,02
40	(Abbildung 150, Bild AN)	-----	-----	3,47
41	(Abbildung 150, Bild AO)	-----	-----	3,29
42	(Abbildung 150, Bild AP)	-----	-----	3,30
43	(Abbildung 150, Bild AQ)	-----	-----	3,56
44	(Abbildung 150, Bild AR)	-----	-----	3,53
45	(Abbildung 150, Bild AS)	-----	-----	3,21
46	(Abbildung 150, Bild AT)	-----	-----	3,13
47	(Abbildung 150, Bild AU)	-----	-----	3,62
48	(Abbildung 150, Bild AV)	-----	-----	3,48

13.5.5.3 MMM-Monolayer 3





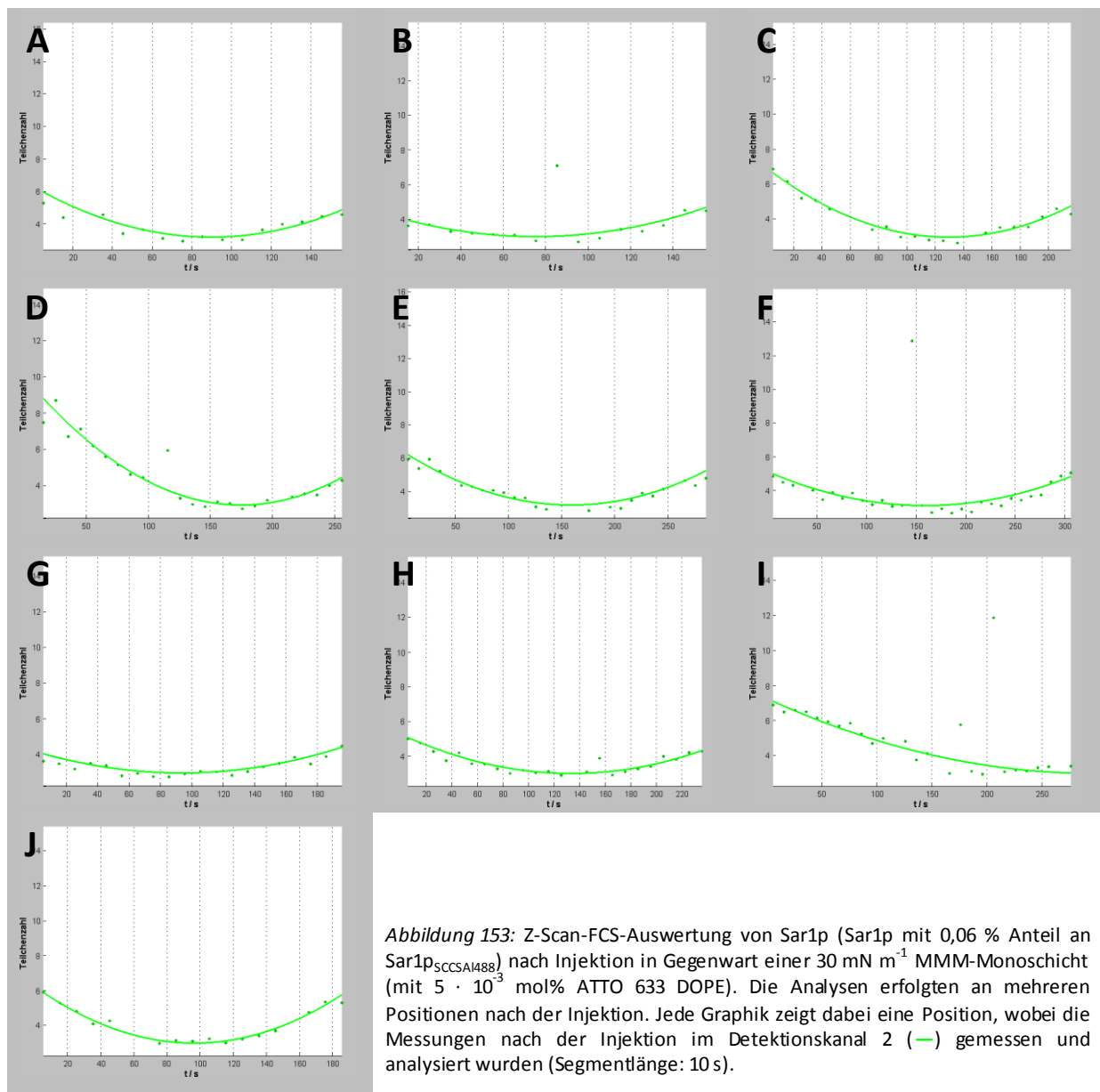
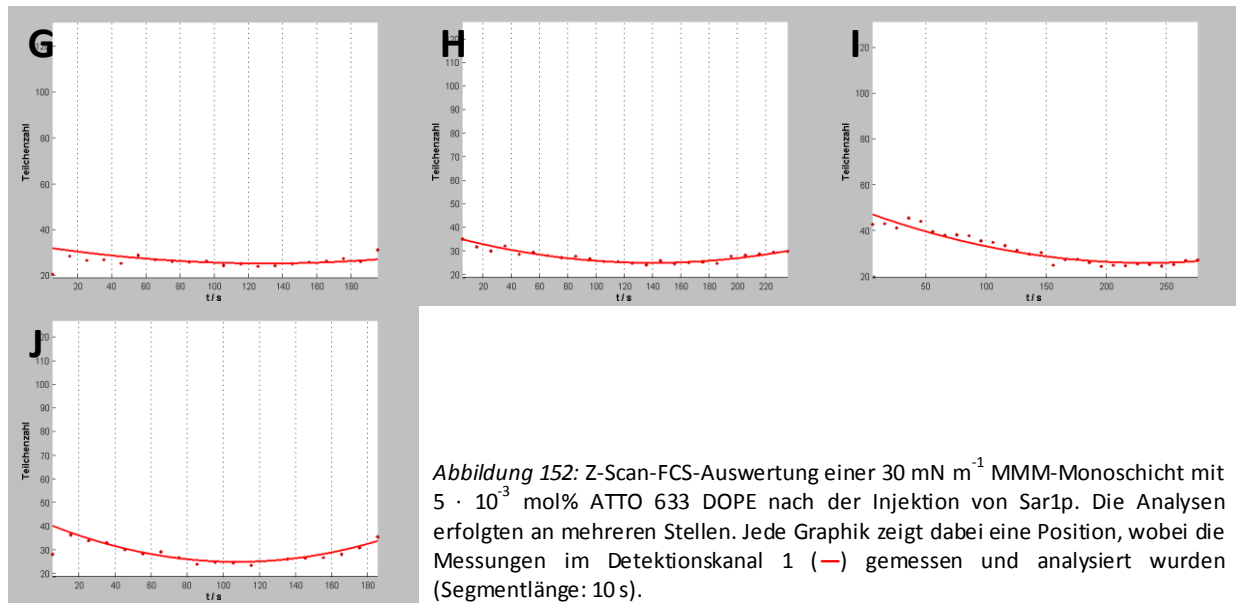


Tabelle 45: Zusammenfassung der Teilchenzahlen von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Anteil an Sar1p_{SCCSA1488}) nach Injektion in Gegenwart einer 30 mN m⁻¹ MMM-Monoschicht (fluoreszenzmarkiert mit 5 · 10⁻³ mol% ATTO 633 DOPE), die vor und nach der Injektion vermessen wurde.

Position	Abbildung	$N_{\min\text{Lipidvor}}$	$N_{\min\text{Lipidnach}}$	$N_{\min\text{Protein}}$
1	(Abbildung 151, Bild A)	35,38	-----	-----
2	(Abbildung 151, Bild B)	30,93	-----	-----
3	(Abbildung 151, Bild C)	31,68	-----	-----
4	(Abbildung 151, Bild D)	31,55	-----	-----
5	(Abbildung 151, Bild E)	29,44	-----	-----
6	(Abbildung 151, Bild F)	31,39	-----	-----
7	(Abbildung 151, Bild G)	29,44	-----	-----
8	(Abbildung 151, Bild H)	30,51	-----	-----
9	(Abbildung 151, Bild I)	30,36	-----	-----
10	(Abbildung 151, Bild J)	27,63	-----	-----
11	(Abbildung 151, Bild K)	29,40	-----	-----
12	(Abbildung 151, Bild L)	29,50	-----	-----
13	(Abbildung 151, Bild M)	30,81	-----	-----
14	(Abbildung 151, Bild N)	29,34	-----	-----
1	(Abbildung 152, Bild A)	-----	25,17	-----
2	(Abbildung 152, Bild B)	-----	26,00	-----
3	(Abbildung 152, Bild C)	-----	24,63	-----
4	(Abbildung 152, Bild D)	-----	25,12	-----
5	(Abbildung 152, Bild E)	-----	24,10	-----
6	(Abbildung 152, Bild F)	-----	25,78	-----
7	(Abbildung 152, Bild G)	-----	25,56	-----
8	(Abbildung 152, Bild H)	-----	24,88	-----
9	(Abbildung 152, Bild I)	-----	25,66	-----
10	(Abbildung 152, Bild J)	-----	24,82	-----
1	(Abbildung 153, Bild A)	-----	-----	3,21
2	(Abbildung 153, Bild B)	-----	-----	3,01
3	(Abbildung 153, Bild C)	-----	-----	2,99
4	(Abbildung 153, Bild D)	-----	-----	2,92
5	(Abbildung 153, Bild E)	-----	-----	3,17
6	(Abbildung 153, Bild F)	-----	-----	3,13
7	(Abbildung 153, Bild G)	-----	-----	2,96
8	(Abbildung 153, Bild H)	-----	-----	3,04
9	(Abbildung 153, Bild I)	-----	-----	3,01
10	(Abbildung 153, Bild J)	-----	-----	3,02

13.5.6 Filmwaagedaten zu den vorherigen Insertionen von Sar1p

13.5.6.1 100 % Sar1p_{SCCSAI488} in MMM-Monoschichten

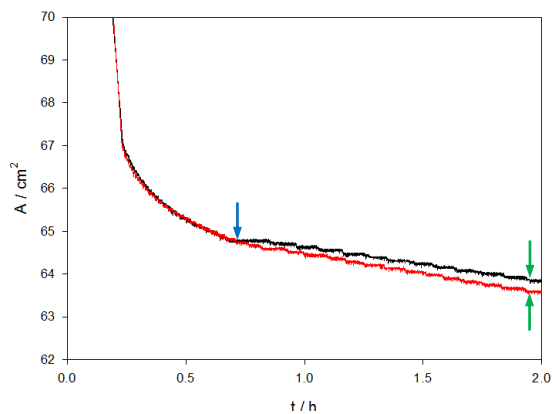


Abbildung 154: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) ohne Injektion (—) und mit Injektion von Sar1p_{SCCSAI488} (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $0,24 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $63,83 \text{ cm}^2$.

13.5.6.2 Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} in MMM-Monoschichten

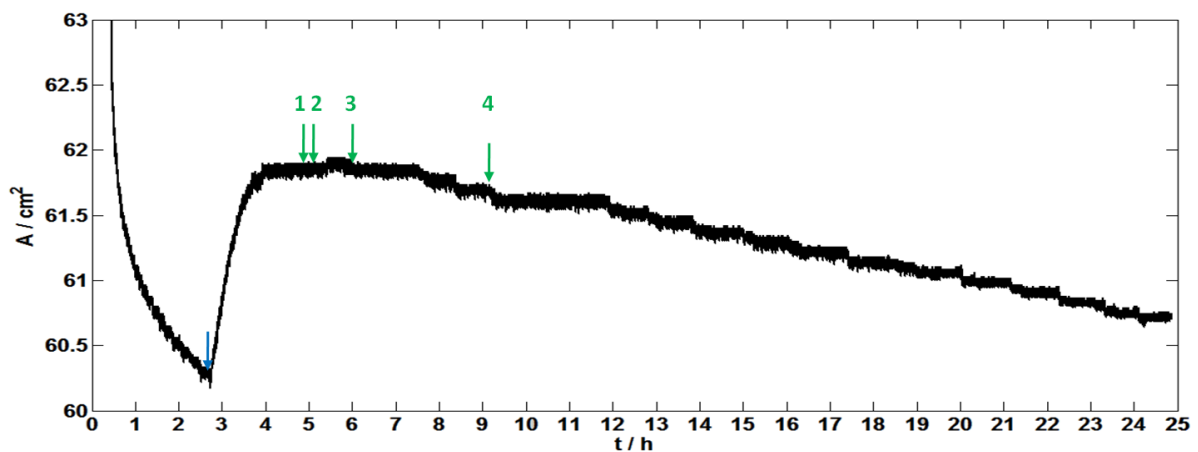


Abbildung 155: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Sar1p_{SCCSAI488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $1,57 \text{ cm}^2$ (für die Messungen 1-3) bzw. $1,41 \text{ cm}^2$ (für die Messung 4) bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $61,85 \text{ cm}^2$ (für die Messungen 1-3) bzw. $61,69 \text{ cm}^2$ (für die Messung 4).

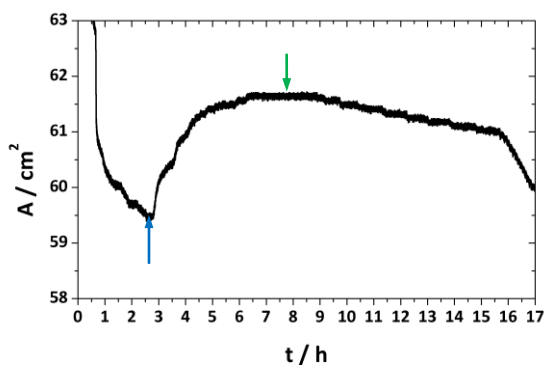


Abbildung 156: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 0,8 % Sar1p_{SCCSAI488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $2,17 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $61,66 \text{ cm}^2$.

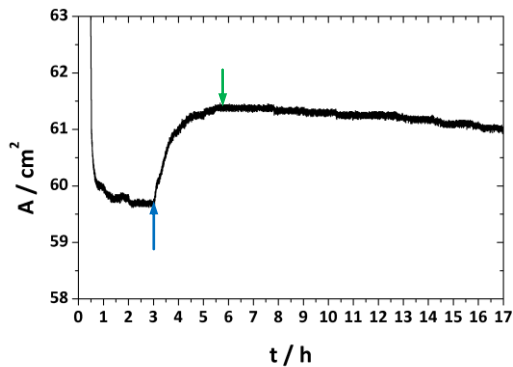


Abbildung 157: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 2,7 % Sar1p_{SCCSAI488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $1,68 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $61,39 \text{ cm}^2$.

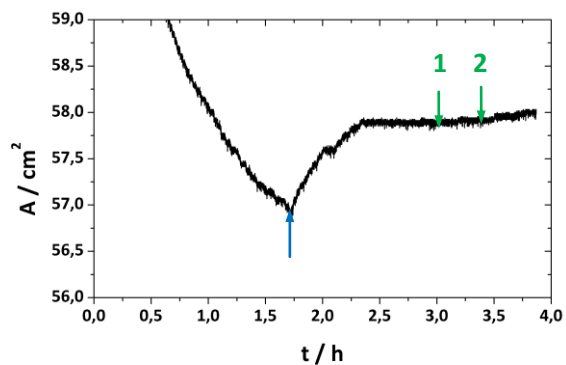


Abbildung 158: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 1,85 % Sar1p_{SCCSAI488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $0,98 \text{ cm}^2$ (für die Messung 1) bzw. $1,02 \text{ cm}^2$ (für die Messung 2) bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $57,9 \text{ cm}^2$ (für die Messung 1) bzw. $57,94 \text{ cm}^2$ (für die Messung 2).

13.5.6.3 Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSAI488} in DLPC/DLPS-Monoschichten

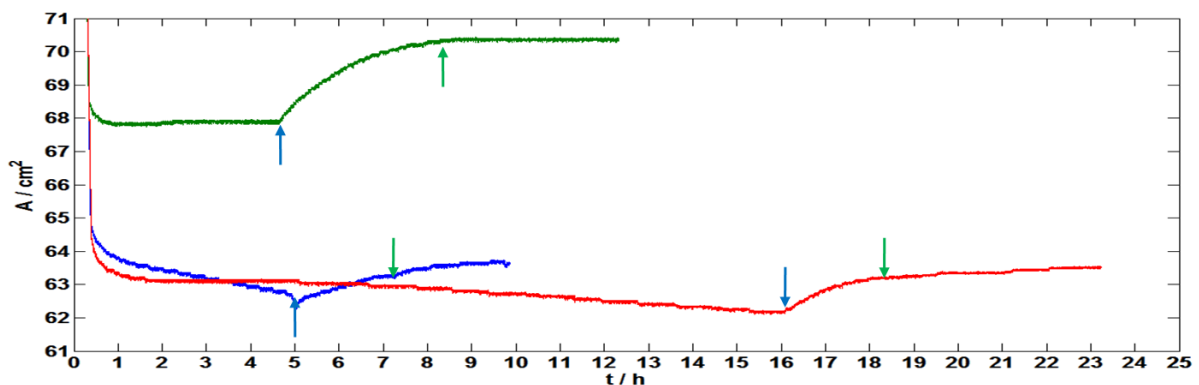


Abbildung 159: Flächenverlauf von DOPC/DOPS Monoschichten bei 30 mN m^{-1} (— Monoschicht 1; — Monoschicht 2; — Monoschicht 3) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 1,16 % Sar1p_{SCCSAI488}). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergeben sich die jeweiligen Flächendifferenzen ($0,64 \text{ cm}^2$ Monoschicht 1 (—); $2,43 \text{ cm}^2$ Monoschicht 2 (—); $1,02 \text{ cm}^2$ Monoschicht 3 (—)) bei den jeweiligen Endflächen (zum Zeitpunkt der Messung) von $63,26 \text{ cm}^2$ Monoschicht 1 (—); $70,31 \text{ cm}^2$ Monoschicht 2 (—); $63,19 \text{ cm}^2$ Monoschicht 3 (—).

13.5.6.4 Mischungen aus Sar1p und Sar1p_{SCCSA1488} in markierte MMM-Monoschichten

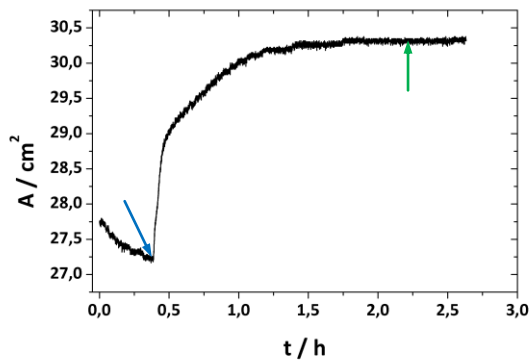


Abbildung 160: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 1,02 % Sar1p_{SCCSA1488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $3,21 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $30,38 \text{ cm}^2$.

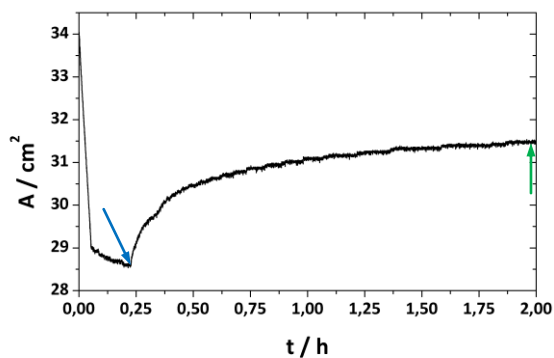


Abbildung 161: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Sar1p_{SCCSA1488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $2,98 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $31,52 \text{ cm}^2$.

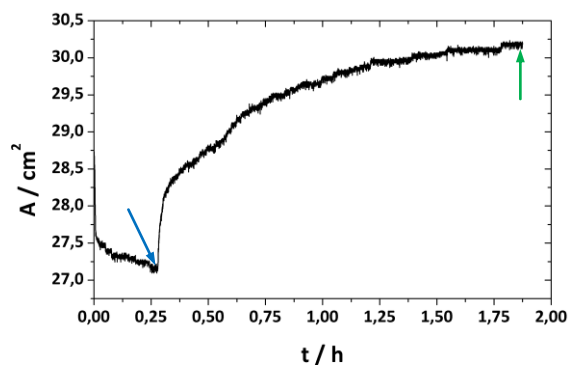


Abbildung 162: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht (30 mN m^{-1}) mit Injektion von Sar1p (Sar1p mit 0,06 % Sar1p_{SCCSA1488}) (—). Vom Zeitpunkt der Injektion (\rightarrow) bis zum Messzeitpunkt (\rightarrow) ergibt sich eine Flächendifferenz von $3,14 \text{ cm}^2$ bei einer Endfläche (zum Zeitpunkt der Messung) von $30,23 \text{ cm}^2$.

13.5.7 Bestimmung des Fehlers der Flächenermittlung durch die Langmuir-Filmwaage

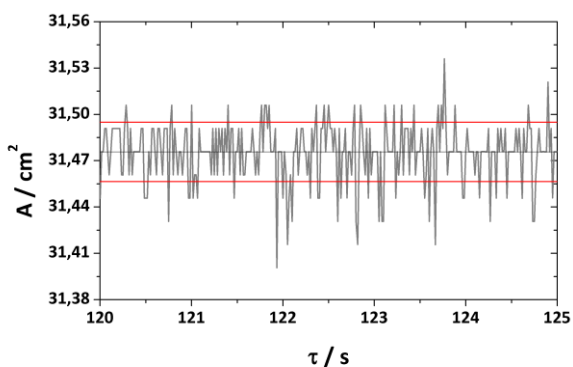


Abbildung 163: Flächenverlauf einer MMM-Monoschicht ($\pi = 30 \text{ mN m}^{-1}$). Bestimmt wurde die Standardabweichung ($0,02 \text{ cm}^2$; —) der Schwankung des Messsignals, welche als Fehler für Messung der Oberfläche durch die Filmwaage herangezogen wurde. Im Falle der Berechnung der Flächendifferenz (ΔA) wird von der doppelten Standardabweichung ausgegangen ($0,04 \text{ cm}^2$).