

**Untersuchung molekularer Interaktionen
in der pflanzlichen Signaltransduktion
mittels FCS**

Diplomarbeit

vorgelegt von

Daniel Wesner

aus Herford

Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

Bielefeld, November 2004

Die folgende Arbeit entstand unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dario Anselmetti

In der Zeit von Februar bis November 2004 im Arbeitskreis
Experimentelle Biophysik und angewandte Nanowissenschaften
der Fakultät für Physik der Universität Bielefeld.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mit einer Auslegung in der Universitätsbibliothek bin ich einverstanden.

Bielefeld, 3.November 2004

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	2
1 Einleitung	4
2 Theoretischer Hintergrund	7
2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	7
2.1.1 Fluoreszenz.....	9
2.1.2 Konfokale Mikroskopie.....	11
2.1.3 Autokorrelation.....	12
2.1.4 Signal-Rausch-Verhältnis.....	19
2.2 Diffusion	21
2.3 Biologisches Untersuchungsmaterial.....	23
2.3.1 LPS – CD14.....	24
2.3.2 GTP – G-Proteine	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Konfokales Mikroskop	27
3.1.1 ConfoCor 2	27
3.1.2 Gerätejustierung	29
3.2 Datenauswertung.....	30
3.3 Chemikalien	31
3.4 LPS - Bindung.....	32
3.4.1 Auflösen der Aggregate durch Detergenzien	33
3.4.2 Bindung an Proteinextrakt	33
3.5 GTP-Bindung.....	34
3.5.1 Bindung an Rab3A	34
3.5.2 Bindung an Rac 1	35
4 Ergebnisse und Diskussion	36
4.1 Farbstoffeigenschaften.....	36
4.1.1 Tripleteigenschaften und Fotostabilität	36
4.1.2 Lipophile Eigenschaften der Farbstoffe	40
4.2 Bindung von LPS-RITC an Mt-CD14	45
4.2.1 Dissoziation der Aggregate	45
4.2.2 Kontamination des LPS (mit ungebundenem Farbstoff).....	46
4.2.3 Reaktion mit dem Proteinextrakt aus <i>Medicago truncatula</i> (Mt-CD14).....	48
4.3 Bindung von GTP-Atto an G-Proteine	54
4.3.1 Reaktion mit Rab 3A	54
4.3.1.1 Einfluss des Puffers: Magnesium / EDTA	55
4.3.1.2 Bindungskinetik.....	58
4.3.2 Reaktion mit Rac 1	63
4.3.2.1 Diffusionszeit des GTP- Protein-Komplexes: Größe und Schwankungen.....	64
4.3.2.2 Bindungskinetik.....	66
4.3.2.3 Konkurrenz und Verdrängung.....	69
5 Zusammenfassung und Ausblick	72
Literaturverzeichnis	76
Danksagungen.....	79

Abkürzungsverzeichnis

ACF	Autocorrelation Function
AOTF	Acusto-optical Tunable Filter
APD	Avalanche Photo Diode
BSA	Bovine Serum Albumine
BP	Bandpass (Filter)
CCD	Charge Coupled Device
CEF	Collection Efficiency Function
cpm	Counts per Molecule
DNA	Desoxyribo Nucleic Acid
DOC	Natrium Deoxycholat
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FIDA	Fluorescence Intensity Distribution Analysis
FILDA	Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GAP	GTPase-Activating Protein
GDI	Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GTP	Guanosintriphosphat
LP	Longpass (Filter)
LPS	Lipopolysaccharid

NA	numerische Apertur
PCH	Photon Counting Histogram
RH6G	Rhodamine 6 Green
RITC	Rhodamine B Isothiocyanate
RNA	Ribonucleic Acid
SCSI	Small Computer System Interface
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SPAD	Single Photon Avalance Photodiode
TCSPC	Time Correlated Single Photon Counting
TLR	Toll-Like Receptor

1 Einleitung

Die biologische Forschung auf zellulärer und molekularer Ebene kann hinsichtlich der analysierten Moleküle in verschiedene Bereiche gegliedert werden. Während die Genomik die Gesamtheit des Erbgutes eines Organismus (Genom) untersucht, beschäftigt sich die Transkriptomik mit den zu einem bestimmten Zeitpunkt bzw. Entwicklungsstadium aktiven Genen, welche in mRNA transkribiert werden (Transkriptom). Die daraus translatierten Proteine (Proteom) stellen die biologisch aktive Umsetzung der genetisch gespeicherten Information dar. Diese Information ist zeitlich konstant und als lineare Abfolge von 4 Basen darstellbar. Für die Sequenzierung stehen mittlerweile gut etablierte Verfahren zur Verfügung, so dass vor allem die Größe des Genoms als zeitbestimmender Faktor der Analyse zu beachten ist. Dagegen sind die aktiven Gene, das heißt das Transkriptom und in stärkerem Masse das Proteom von verschiedenen Faktoren wie äußeren Reizen und der zellulären Reaktion darauf sowie dem Differenzierungszustand der Zelle in mehrzelligen Organismen abhängig. Wegen möglicher Modifikationen auf Ebene der mRNA und selbst des translatierten Proteins sind Vorhersagen bezüglich der Anzahl und Aktivität der gebildeten Proteine auf Basis von Sequenzhomologien im Genom mit Ungenauigkeiten behaftet.¹ Während bei Bakterien die Anzahl an verschiedenen Genen und Proteinen mit ca. 3000 bzw. 4000 in der gleichen Größenordnung liegt, geht man für den Menschen von etwa 35000 Genen und bis zu einer Million Proteinen aus.²

Durch 2D-Gelelektrophorese kann ein Überblick über die unter gegebenen Bedingungen exprimierten Proteine gewonnen und diese darauf mittels Massenspektrometrie oder chemischer Verfahren sequenziert werden. Die Funktion von Proteinen wird oftmals durch ihre Integration in ein Netzwerk von regulativen und reaktiven Interaktionen mit anderen Molekülen deutlich. Für die Einordnung sind umfangreiche Screening-Verfahren notwendig, um mögliche Interaktionspartner zu detektieren, deren Wirkung daraufhin charakterisiert wird. Angesichts der großen Anzahl noch unbekannter Proteine und der hohen Komplexität bisher zumindest in Teilen beschriebener molekularer Netzwerke ist die vollständige Beschreibung der Interaktionen selbst in einem einfachen Bakterium eine

immense Herausforderung. Daher liegt das Interesse der Forschung besonders auf grundlegenden Reaktionen wie dem Energiestoffwechsel, welcher bereits relativ früh untersucht wurde, sowie gesundheitlich oder wirtschaftlich relevanten Prozessen wie der Signaltransduktion in der Immunabwehr und Tumorentwicklung³ bzw. der Wachstumsregulation und Optimierung von biotechnologisch und landwirtschaftlich eingesetzten Organismen. Eine detaillierte Kenntnis regulativer Vorgänge ermöglicht es, effizient und selektiv Vorgänge zu beeinflussen und damit nebenwirkungsärmere bzw. kostengünstigere Verfahren zu entwickeln.⁴

Die Interaktionen basieren auf einer zumindest zeitweisen Assoziation der beteiligten Moleküle, während der ein Informationstransfer stattfindet. Dieser kann z.B. in einer induzierten Konformationsänderung liegen, wodurch die Affinität für andere Interaktionspartner verändert oder eine enzymatische Aktivität beeinflusst wird. Zur Detektion einer Bindung sind verschiedene Verfahren entwickelt worden, wie z.B. das Yeast-Two-Hybrid-System, das zum Screening von Interaktionspartnern eingesetzt werden kann, dabei jedoch auf Proteine beschränkt ist und keine quantitativen Aussagen über die Bindungsaffinität erlaubt. Dieses ist dagegen z.B. mit radioaktiven Filterbindungstests, Analytischer Ultrazentrifugation oder Oberflächenplasmonresonanz möglich.⁵ Für diese Verfahren sind allerdings größere Probevolumen oder der Einsatz von Radioaktivität nötig, was die Arbeiten aufgrund der dafür benötigten Infrastruktur erschwert. Eine Alternative liegt in verschiedenen Formen der Fluoreszenzspektroskopie. Dabei kann einerseits die intrinsische Proteinfluoreszenz genutzt werden, wenn sich diese durch den Bindungszustand verändert.⁶ Allgemeiner einsetzbar ist die Markierung der Bindungspartner mit geeigneten Fluorophoren, wie es in der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie praktiziert wird. Hierbei wird der Unterschied der Diffusionszeit eines markierten Liganden in freiem und gebundenen Zustand genutzt, um kinetische und thermodynamische Daten (on- und off-Raten sowie Dissoziationskonstanten) zu berechnen. Die eingesetzten Konzentrationen liegen im nanomolaren Bereich und das Probevolumen ist mit 5 – 20 µl vergleichsweise klein, so dass nur geringe Materialmengen benötigt werden. Mit einer Messdauer von einigen Sekunden bis Minuten ist die Methode vergleichbar schnell und ermöglicht durch ihre Automatisierbarkeit den Einsatz in Screening-Verfahren. Während in diesem Fall in

Puffersystemen gearbeitet wird, ist in Einzelexperimenten sogar die Messung intrazellulär, also *in vivo* möglich.^{7,8}

Im tierischen und insbesondere menschlichen Organismus sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems vom Typ des Toll-Like-Receptor (TLR) seit einigen Jahren bekannt und deren Signaltransduktion zumindest in Teilen beschrieben. Aufgrund der gefundenen Homologie zwischen einzelnen tierischen Spezies und bisheriger Ergebnisse in Pflanzen wie *Medicago* Spezies besteht Grund zu der Annahme, dass grundlegende Funktionen auch auf Pflanzenzellen übertragbar sind. So können z.B. gram-negative Bakterien anhand von allgemeinen Oberflächenmolekülen wie Lipopolysacchariden (LPS) erkannt und gegebenenfalls bekämpft werden. In einigen wichtigen Fällen kommt es zwischen Bakterium und Pflanze jedoch statt dessen zu einer Symbiose. Für die Entscheidung darüber ist wahrscheinlich unter anderem eine spezifische Erkennung typischer LPS-Moleküle von Bedeutung. Es wird angenommen, dass an der LPS-Bindung ein dem menschlichen CD14 homologes Protein beteiligt ist. In der folgenden intrazellulären Signaltransduktion sind GTP-bindende Proteine (kurz: G-Proteine) involviert. Sie stellen molekulare Schalter dar, abhängig von dem gebundenen Guaninnukleotid (GTP/GDP) und werden durch eine intrinsische GTPase-Aktivität sowie andere Proteine reguliert. Kleinen G-Proteinen kommen vielseitige und teilweise essentielle Aufgaben zu, was nicht zuletzt zu der Entdeckung einer Mutante des Prototyps Ras in Tumorzellen geführt hat, an deren Transformation sie bedeutenden Anteil hat.

Diese Arbeit befasst sich mit der Interaktion von LPS des symbiotischen Bakteriums *Sinorhizobium meliloti* mit potentiellen Bindeproteinen der Wirtspflanze *Medicago truncatula*. Ein weiteres Thema ist die Untersuchung der GTP-Bindung des kleinen G-Proteins Rac1 aus *Medicago sativa*, welchem eine Funktion in der Signalverarbeitung infolge der LPS-Stimulation zugemessen wird.⁹

2 Theoretischer Hintergrund

Der folgende Abschnitt stellt die eingesetzte Untersuchungsmethode der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie vor. Dabei werden theoretische Grundlagen wie auch praktische Anwendungsmöglichkeiten dargestellt. Darauf folgt eine Beschreibung des aus Pflanzen stammenden Untersuchungsmaterials, wobei hinsichtlich der Funktion Analogien zum humanen System aufgezeigt werden.

2.1 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wurde Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts als ein physikalisches Verfahren entwickelt, dessen Anwendung auf biologische Untersuchungen ausgelegt ist.¹⁰ Technische Weiterentwicklungen in den letzten 10 Jahren ermöglichten eine verbesserte Anwendbarkeit und steigerten die Bedeutung der Methode in der Forschung. In der heutigen Form wird die hohe Selektivität der Fluoreszenz gepaart mit sensitiven Detektoren eingesetzt, um Signale bis hinab auf die Ebene einzelner Moleküle zu analysieren. Das wird durch das kleine Messvolumen konfokaler Mikroskopie ermöglicht. Somit lassen sich aus den Schwankungen der Fluoreszenzintensität wichtige Informationen gewinnen, welche in makroskopischen Systemen durch die wegen der großen Teilchenzahl notwendige Mittelwertbildung nicht zugänglich sind.

Ein entscheidendes Kriterium der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist die Anzahl der detektierten Fluorophore. Mit Entwicklung der konfokalen Mikroskopie konnte das Messvolumen auf unter 1 fl gesenkt werden, worin sich bei geeigneter Verdünnung der Messlösung von ca. 0.1 – 100 nM etwa 0.2 – 40 Fluorophore befinden.¹¹ Es wird zwar die Gesamtintensität der Fluoreszenz gemessen, aber wegen des hohen Anteils einzelner Fluorophore an diesem Signal erlaubt die statistische Analyse der zeitaufgelösten Intensitätsschwankungen, auf Eigenschaften einzelner Moleküle zu schließen. Aus diesem Grund kann man die Bezeichnung Einzelmolekülspektroskopie für die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie wählen.

Durch FCS lassen sich vielseitige Informationen erhalten, von denen die wohl wichtigste die charakteristische Diffusionszeit τ_D eines Moleküls durch das konfokale Volumen ist. Sie ist von dem Diffusionskoeffizienten abhängig und damit ein Maß für die Größe und Form des Moleküls. Vorgänge, die eine hinreichend große Veränderung der molekularen Gestalt bewirken sind damit messbar. Dazu gehören z.B. die Denaturierung eines Proteins oder wohl bedeutender die Bindung anderer Moleküle oder Partikel.

Die Detektionsgrenze wird mit einem Unterschied der Diffusionszeiten im Bereich eines Faktors von 1,6 – 2 angegeben.¹² Das entspricht einem 4 bis 8-fachen Massenunterschied bei sphärischer Geometrie der Interaktionspartner. In diesem Fall sollte der Anteil einer Spezies mindestens 10 % der detektierten Moleküle betragen, um eine Analyse zu erlauben. Mit steigender Differenz der Diffusionszeiten sinkt diese Schwelle.¹³

Diese Limitierung ist durch Markierung beider Interaktionspartner mit Fluorophoren unterschiedlicher Emissionswellenlänge und Kreuzkorrelationsanalyse des Fluoreszenzsignals überwindbar. Diese Methode erlaubt zudem eine Verkürzung der Messdauer was sie für Screenings z.B. in der Pharmaindustrie interessant macht. Weiterhin wird so eine Analyse intrazellulärer Untersuchungen vereinfacht. Dort kann eine abnormale Diffusion durch die hohe Konzentration weiterer Moleküle und Kompartimente auftreten, was mit dem üblicherweise eingesetzten Modell der freien Diffusion nicht beschrieben wird. Für diese Anwendung ist insbesondere der Einsatz der 2-Photonen-Anregung sinnvoll, deren langwellige Strahlung weiter in Gewebe eindringen kann. Wegen des oftmals breiten Absorptionsspektrums der Farbstoffe ist es in diesem Fall möglich, unterschiedliche Fluorophore mit einem einzigen Laser anzuregen und so den apparativen Aufwand zu verringern.

Neben der Autokorrelationsanalyse sind auf das Fluoreszenzsignal andere Verfahren zur Informationsgewinnung anwendbar. Die molekulare Helligkeit und Fluoreszenzlebensdauer können Aufschluss über die Umgebung des Farbstoffs geben und werden durch die Methoden des Photon Counting Histogram (PCH) und Fluorescence Intensity Distribution Analysis (FIDA) bzw. Fluorescence Intensity and Lifetime Distribution Analysis (FILDA) und Time Correlated Single Photon Counting (TCSPC) genutzt.¹⁴⁻¹⁶

2.1.1 Fluoreszenz

Absorbiert ein Molekül ein Photon entsprechender Energie, wird ein Elektron aus dem elektronischen Grundzustand S_0 in den S_1 -Zustand angeregt. Diese Energie kann unter anderem durch Fluoreszenzstrahlung wieder abgegeben werden. Das emittierte Licht ist dabei im Vergleich zum Anregungslicht rotverschoben (Stokes Shift), da ein Teil der Energie im angeregten Zustand strahlungslos z.B. durch Interaktion mit der Umgebung abgegeben wird. Die Zeit zwischen Absorption und Emission wird als Fluoreszenzlebensdauer bezeichnet und durch den Fluorophore und seine Umgebung bestimmt. Sie liegt für organische Farbstoffe im Bereich von einigen Nanosekunden, so dass theoretisch Emissionsraten von etwa 100 MHz möglich sind.

Neben der Fluoreszenz können weitere Effekte auftreten, welche in einem Jablonski-Diagramm dargestellt sind:

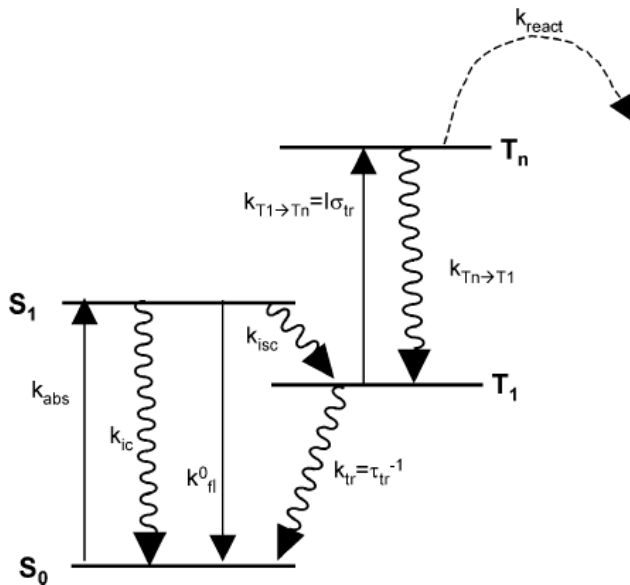


Abb. 2.1: Jablonski-Diagramm. Durch die Absorption eines Photons (k_{abs}) gelangt ein Molekül aus dem S_0 in den S_1 -Zustand, den es u.a. durch Fluoreszenz in den S_0 -Zustand (k_{fl}^0) oder durch Intersystem Crossing (k_{isc}) in den ersten Tripletzustand T_1 verlassen kann.

Ein Übergang aus dem S_1 in den niedrigsten Triplet-Zustand T_1 wird als Intersystem Crossing (ISC) bezeichnet. Da er quantenmechanisch verboten ist, tritt er nur selten auf (ca. 1 mal pro $10^5 - 10^6$ absorbierter Photonen).¹⁴ Die Tripletlebensdauer liegt allerdings im Bereich von Mikrosekunden, daher kann der Anteil der Fluorophore in diesem Zustand besonders bei hoher Anregungsintensität beträchtlich sein. Für Fluoreszenzmessungen ist ein niedriger Tripletanteil aus zwei Gründen wünschenswert: Einerseits tragen Moleküle in diesem Stadium nicht zur Fluoreszenz bei, andererseits nimmt man an, dass photodegradative chemische Reaktionen (Photobleaching) vor allem im Triplet-Zustand stattfinden.¹⁷ Neue Fluoreszenzfarbstoffe werden auf einen kleinen Tripletanteil und hohe Photostabilität optimiert, was besonders für die Einzelmolekülspektroskopie notwendig ist.

Ein anderer Prozess, der die Fluoreszenzquantenausbeute verringert wird als Fluoreszenzlöschung oder Quenching bezeichnet. Man unterscheidet zwischen statischem Quenching, bei dem der Fluorophor im Grundzustand einen nicht fluoreszierenden Komplex mit einem weiteren Molekül bildet, sowie dynamischem Quenching durch Stöße mit anderen Molekülen. In biologischen Systemen sind vor allem die Aminosäure Tryptophan und die Base Guanin sowie molekularer Sauerstoff als mögliche Quencher von Bedeutung.¹⁸

Weiterhin kann die Fluoreszenz durch den FRET-Effekt beeinflusst werden. Bei diesem durch Förster beschriebenen Vorgang wird die absorbierte Energie strahlungslos auf ein benachbartes Molekül übertragen, dessen Absorptionsspektrum mit der Fluoreszenzwellenlänge korrespondiert.¹⁹

Sowohl Quenching wie auch FRET werden analytisch eingesetzt, da sie sehr entfernungs sensitiv sind.

2.1.2 Konfokale Mikroskopie

Um Einzelmolekülspektroskopie in Lösungen betreiben zu können, ist ein kleines Detektionsvolumen notwendig, in dem sich nur wenige Analytmoleküle befinden. Für ein ausreichend hohes Messsignal müssen diese Moleküle mit einer großen Energiedichte angeregt werden. Beides wird durch die konfokale Mikroskopie ermöglicht: Ein anregender Laserstrahl wird durch ein Objektiv hoher Numerischer Apertur ($NA > 0.9$) auf ein durch Beugung limitiertes Volumen fokussiert und erzeugt hier eine hohe Energiedichte. Im Epifluoreszenzmodus wird das emittierte Licht von dem selben Objektiv gesammelt und über dichroitische Spiegel und Filter auf ein Pinhole abgebildet und die passierenden Photonen von einem Detektor registriert. Das Pinhole ist nur für Strahlen permeabel, deren Quelle in einem eng begrenzten Bereich entlang der optischen Achse liegt. Damit wird die relativ hohe Auflösung optischer Mikroskope in der xy -Ebene um eine vergleichbare Auflösung in der z -Achse ergänzt.

Die Anregungs- und Detektionsvolumina sind bei diesem Aufbau idealerweise deckungsgleich, in jedem Fall sollte das Detektionsvolumen das Anregungsvolumen umschließen, um ein vorzeitiges Bleichen des Farbstoffs zu vermeiden. Die Form des Anregungs- bzw. Detektionsvolumens, auch als effektives Volumen V_{eff} bezeichnet, ist ellipsoid und wird durch den Strukturparameter S als Quotient der halben langen Achse z_0 und der halben kurzen Achse r_0 beschrieben. Dabei geht man von einem dreidimensionalen gaußförmigen Emissionsprofil aus, dessen Intensität axial bei $z = z_0$ und lateral bei $r = r_0$ auf $1/e^2$ abfällt (anstelle von r und z wird in der Literatur häufig die Bezeichnung ω_1 bzw. ω_2 verwendet). Diese Parameter sind auch für die Autokorrelationsanalyse von Bedeutung.

Aus der Autokorrelationsfunktion ist die apparente Teilchenzahl im effektiven Volumen bestimmbar und damit eine Möglichkeit zur Konzentrationsmessung gegeben. Zudem erlaubt sie, V_{eff} zu berechnen, wozu der Diffusionskoeffizient D des Fluorophors bekannt sein muss. Unter Verwendung von Gl. 2.1 wird r_0 berechnet:

$$r_0 = \sqrt{4 \cdot D \cdot \tau_D} \quad [2.1]$$

Damit beträgt das effektive Volumen

$$V_{eff} = \frac{4}{3}\pi(4D\tau_D)^{\frac{3}{2}} \cdot S \quad [2.2]$$

2.1.3 Autokorrelation

Mit Hilfe des mathematischen Verfahrens der Autokorrelation wird ein Signal – in diesem Fall die Fluoreszenzintensität F – hinsichtlich seiner Selbstähnlichkeit nach einer bestimmten Zeit τ analysiert. Schwankungen der Fluoreszenzintensität δF können von Änderungen der Konzentration δC (z.B. durch Diffusion) sowie Unterschieden der molekularen Helligkeit $\delta\eta$ der Fluorophore (bedingt durch Triplet-Übergänge, Quenching, FRET oder Photobleaching) herrühren.

Aus dem Fluoreszenzsignal wird die Autokorrelationsfunktion (ACF) berechnet und anschließend ein mathematisches Modell angepasst, aus dem sich charakteristische Zeitkonstanten τ_i sowie die apparente Teilchenzahl N abgelesen lassen (Abb. 2.2).

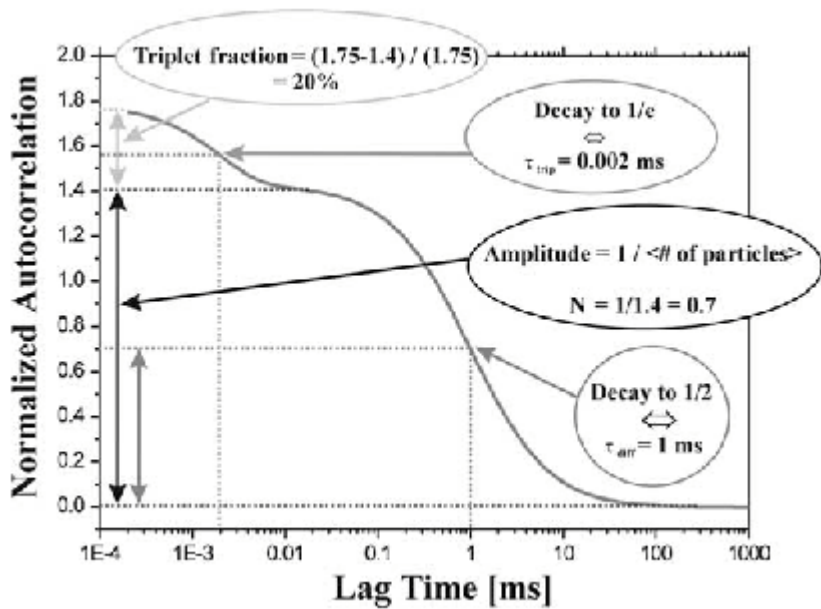


Abbildung 2.2: Autokorrelationsfunktion in Abhängigkeit der Zeit τ . Die Amplitude des diffusionsbasierten Bereichs ($\tau > 0.01 \text{ ms}$) entspricht der reziproken apparenten Molekülanzahl N , am Halbpunkt (1 ms) ist die Diffusionszeit τ_D ablesbar. Die relative Veränderung der Amplitude im tripletbasierten Bereich gibt den Anteil der Moleküle in diesem Zustand an, dessen Lebensdauer nach einem Abfall auf 1/e gegeben ist. (Abb. aus ²⁰)

Da die photophysikalischen Effekte in einem kürzeren Zeitbereich stattfinden als die Diffusion, können sie getrennt behandelt werden. Die folgenden Betrachtungen gelten daher für eine konstante molekulare Helligkeit.

Fluktuationen der Fluoreszenzintensität resultieren aus Veränderungen der Konzentration $C(\underline{r}, t)$ im effektiven Volumen und sind gegeben durch:

$$\delta F(t) = \int_V W(\underline{r}) \cdot \delta(\eta C(\underline{r}, t)) dV \quad [2.3]$$

Hierbei ist η die molekulare Helligkeit (auch counts per molecule – cpm – bezeichnet) eines Fluorophors, die das Produkt aus der gerätebedingten Anregungsintensität I und

gesamten Detektionseffizienz κ , sowie der vom Fluorophor abhängigen Größen Absorptionsquerschnitt q und Fluoreszenzquantenausbeute σ darstellt.

Die räumliche Verteilungsfunktion $W(\underline{r})$ kombiniert die optische Transferfunktion des anregenden Lichts $I(\underline{r})/I_0$, für das ein gaußförmiges Strahlprofil angenommen wird mit der Collection Efficiency Function (CEF), die von den Eigenschaften des Objektivs und des Pinholes bestimmt wird. $W(\underline{r})$ wird häufig durch eine dreidimensionale Gaußverteilung beschrieben, die lateral bei $r = r_0$ und entlang der optischen Achse bei $z = z_0$ auf $1/e^2$ absinkt.

$$W(\underline{r}) = e^{-\frac{2(x^2+y^2)}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} \quad [2.4]$$

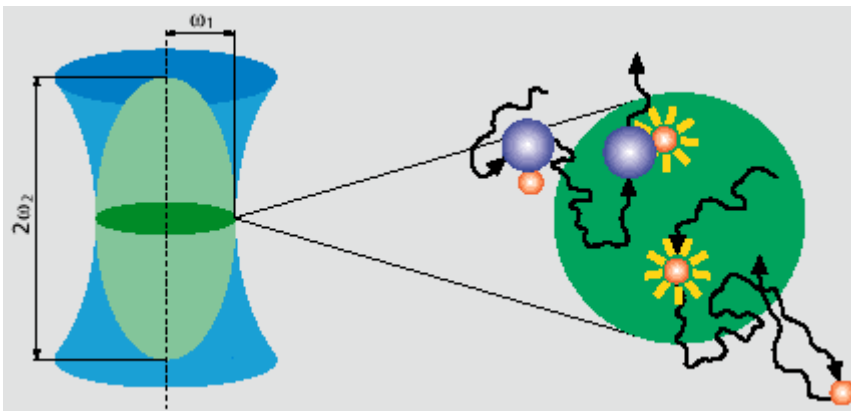


Abbildung 2.3: Linke Bildhälfte: außförmiges Strahlprofil im Fokusbereich (blau), effektives Volumen gekennzeichnet durch Halbachsen ω_1 und ω_2 (grün). Rechte Bildhälfte: Fokusebene mit $z = 0$, $r = \omega_1$, Moleküle diffundieren durch den Laserfokus, fluoreszierende Moleküle (orange Kugeln) liegen frei und gebunden an Rezeptor (blaue Kugeln) vor.

Die normierte Autokorrelationsfunktion wird geschrieben als

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad [2.5]$$

Dabei bedeuten eckige Klammern eine zeitliche Mittelung. $G(\tau)$ gibt die Selbstähnlichkeit des Fluoreszenzsignals nach der Zeit τ an, was Graphik 2.4 zum Ausdruck bringt:

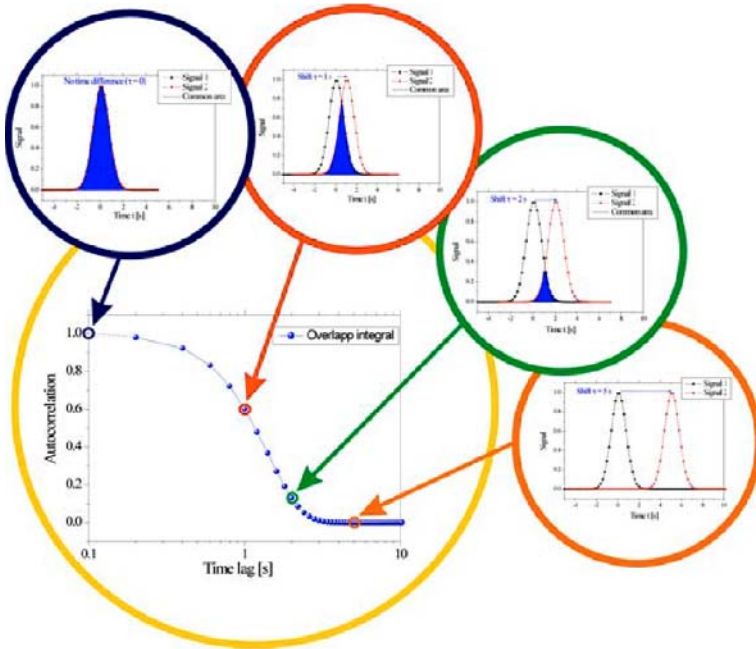


Abbildung 2.4: Selbstähnlichkeit des korrelierten Signals. Großer Kreis: ACF als Funktion der Zeit τ . Kleine Kreise: Überlappungsintegral zweier Fluoreszenzsignale mit einer zeitlichen Differenz τ ; mit zunehmendem τ sinkt die Selbstähnlichkeit. (Abb. aus ²¹)

Die Kombination von Gl. 2.3 und Gl. 2.5 ergibt bei konstanter molekularer Helligkeit ($\delta\eta = 0$):

$$G(\tau) = \frac{\iint W(\mathbf{r})W(\mathbf{r}')\langle\delta C(\mathbf{r},0)\delta C(\mathbf{r}',\tau)\rangle dVdV'}{\left(\langle C\rangle\int W(\mathbf{r})dV\right)^2} \quad [2.6]$$

Die Position des Fluorophors verändert sich dabei von \underline{r} am Zeitpunkt $t = 0$ zu \underline{r}' zum Zeitpunkt $t = \tau$. Lässt man nur freie Diffusion beschrieben durch dem Diffusionskoeffizienten D als Ursache von Konzentrationsänderungen zu, ergibt sich der Autokorrelationsterm der Teilchenzahldichte:

$$\langle \delta C(\underline{r}, 0) \delta C(\underline{r}', \tau) \rangle = \langle C \rangle \frac{1}{(4\pi D \tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} \quad [2.7]$$

Die Kombination von Gl. 2.6 und Gl. 2.7 führt zu

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle C \rangle (4D\tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot \frac{\int \int W(\underline{r}) W(\underline{r}') \cdot e^{-\frac{(\underline{r}-\underline{r}')^2}{4D\tau}} dV dV'}{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2} \quad [2.8]$$

Die bereits genannte Diffusionszeit τ_D , die ein Molekül im Mittel für die laterale Diffusion durch das effektive Volumen benötigt, hängt nach Gl. 2.9 von dem konstanten Diffusionskoeffizienten und der gerätebedingten Länge r_l ab.

$$\tau_D = \frac{r_l^2}{4D} \quad [2.9]$$

Das effektive Volumen ist durch die räumliche Verteilungsfunktion $W(\underline{r})$ gegeben.

$$V_{eff} = \frac{\left(\int W(\underline{r}) dV \right)^2}{\int (W(\underline{r}))^2 dV} = \frac{\left(\int e^{-\frac{2x^2+y}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{2z^2}{z_0^2}} dV \right)^2}{\int e^{-\frac{4x^2+y}{r_0^2}} \cdot e^{-\frac{4z^2}{z_0^2}} dV} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^2 \cdot z_0 = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot r_0^3 \cdot S \quad [2.10]$$

In einem System aus n verschiedenen Komponenten k (z.B. freier und gebundener fluoreszierender Ligand, $n = 2$) tragen diese entsprechend ihrem Molenbruch m_k zum Autokorrelationssignal bei. Unter Einbeziehung von Gl. 2.9 und 2.10 ist die Autokorrelationsfunktion dann gegeben durch:

$$G(\tau) = \frac{1}{\sum_1^n V_{eff} \langle C \rangle m_k} \cdot \sum_1^n \left(m_k \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,k}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0} \right)^2 \cdot \frac{\tau}{\tau_{D,k}}}} \right) \quad [2.11]$$

Der erste Term der Funktion entspricht der reziproken Anzahl detektierter Moleküle N im effektiven Volumen und kann aus der Amplitude $G(\tau=0)$ abgelesen werden. Bei bekanntem V_{eff} sind damit Konzentrationsmessungen in lokal begrenzten Bereichen – gegebenenfalls auch innerhalb von Zellen – möglich.

$$G(0) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} = \frac{1}{N} \quad [2.12]$$

In Mehrkomponentensystemen kann mit Hilfe der ebenfalls aus der Analyse erhältlichen m_k -Werte die jeweilige Konzentration und im Falle einer Ligand-Rezeptor-Interaktion der Bindungsgrad bestimmt werden.

Von den photophysikalischen Effekten ist der Triplet-Übergang von allgemeiner Bedeutung, die übrigen Effekte sind weitgehend abhängig vom jeweiligen Untersuchungsmaterial. Die Autokorrelationsfunktion wird nun als Kombination der auf Diffusion (Gl. 2.11) und Triplet-Übergang basierenden Funktionen beschrieben.

$$G(\tau)_{total} = G(\tau)_{Diff} \cdot X(\tau)_{Triplet} \quad [2.13]$$

Der Effekt des Tripletzustandes wird durch einen exponentiellen Abfall mit der Zeitkonstante τ_T und einem Anteil T modelliert. In gleicher Form können auch andere Phänomene, die ein zeitweises Verlöschen der Fluoreszenz (Blinking) bewirken, integriert werden.

$$X_{Triplet} = 1 - T + T \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} \quad [2.14]$$

Die normierte Autokorrelationsfunktion hat damit die Form:

$$G(\tau) = \frac{1 + \frac{T}{1-T} e^{-\frac{\tau}{\tau_T}}}{N} \left(\sum_1^n \frac{m_k}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,k}}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{D,k}}}} \right) + 1 \quad [2.15]$$

Besitzen die Komponenten k eine verschiedene molekulare Helligkeit, was z.B. durch Bindungsereignisse hervorgerufen werden kann, ist dieses durch Einbeziehung eines Korrekturfaktors zu berücksichtigen. Unterschiedlichen Diffusionszeiten wird durch Einstellung der Komponentenanzahl der Fitroutine Rechnung getragen. Das entsprechende Programm des ConfoCor 2 erlaubt die Anpassung des Tripletanteils sowie dreier Komponenten von gleicher molekularer Helligkeit unter Verwendung von Gl. 2.15.

2.1.4 Signal-Rausch-Verhältnis

Die Korrelationsfunktion ist wie jedes experimentelle Ergebnis mit einem Rauschen behaftet. Die Ursachen dafür liegen in dem Detektionsprozess (shot noise), sowie in den statistischen Veränderungen des detektierten Signals, die die Basis der Analyse darstellen. Eine allgemein gültige Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses (S/N) ist bisher nicht vorgelegt worden. Unter Einbeziehung einiger Näherungen wurde von Koppel eine Abschätzung vorgenommen.²² Dabei wird angenommen, dass die Anzahl an Fluorophoren im effektiven Volumen groß ist ($N \gg 1$). Weiterhin soll ein Messintervall ΔT kurz gegenüber der charakteristischen Diffusionszeit τ_D sein. Dieses Messintervall stellt die Breite eines Kanals des Korrelators dar. Zudem wird die Korrelationsfunktion durch einen exponentiellen Abfall und nicht durch die in Gl. 2.15 beschriebene Form dargestellt. Damit erhält man folgenden Zusammenhang:

$$\frac{S}{N} \propto \frac{\sqrt{M} \cdot \eta \Delta T}{\sqrt{1 + 4\eta \Delta T + 2(\eta \Delta T)^2 \cdot \left(\tau_D / \Delta T\right)}} \quad [2.16]$$

Hier ist M die gesamte Messdauer und $\eta \Delta T$ stellt die pro Messintervall detektierte Photonenzahl dar. Zur Beurteilung des Signal-Rausch-Verhältnisses können zwei Fälle unterschieden werden.

$$\eta \Delta T \ll 1 \quad \frac{S}{N} \propto \sqrt{M} \cdot \eta \Delta T \quad [2.17]$$

$$\eta \Delta T \gg 1 \quad \frac{S}{N} \propto \sqrt{M \cdot \frac{\Delta T}{\tau_D}} \quad [2.18]$$

Demnach steigt das Signal-Rausch-Verhältnis linear mit der molekularen Helligkeit η , solange gilt $\eta\Delta T \ll 1$. Darüber hinaus ist das Signal-Rausch-Verhältnis unabhängig von der molekularen Helligkeit und kann nur durch Verlängerung der Messdauer M erhöht werden. Die Abhängigkeit von der Wurzel der Messdauer ist ein üblicher Zusammenhang, der auch in anderen Methoden auftritt.

Die molekulare Helligkeit kann durch die Wahl eines geeigneten Farbstoffs sowie eine hohe Anregungsintensität gesteigert werden. Letzteres ist jedoch nur begrenzt möglich, da auch der Anteil der Fluorophore im Tripletzustand ansteigt. Weiterhin ist die Streuung durch das Lösungsmittel linear von der Anregungsintensität abhängig, so dass das Hintergrundsignal zunimmt.

Während bei einer Teilchenanzahl $N \geq 1$ das Signal-Rausch-Verhältnis nicht, wie in makroskopischen Systemen, durch eine Steigerung der Konzentration zu erreichen ist, gilt für $N \ll 1$ folgender Zusammenhang.

$$\frac{S}{N} \propto \sqrt{N} \quad [2.19]$$

Neben hohen Transmissionswerten der optischen Komponenten ist die Wahl der Filter von großer Bedeutung für die molekulare Helligkeit eines Farbstoffs. Bandpassfilter reduzieren den detektierten Hintergrund aufgrund von Ramanstreuung, grenzen aber auch den Anteil der Fluoreszenzemission ein. Dagegen erlauben Longpassfilter die Detektion eines großen Teils der emittierten Fluoreszenzstrahlung sowie des inelastisch gestreuten Anregungsstrahlung.

2.2 Diffusion

Die Moleküle einer Flüssigkeit sind aufgrund ihrer thermischen Energie in ständiger ungerichteter Bewegung (Brownsche Molekularbewegung). Ihr Impuls kann durch Stöße auf größere Moleküle wie z.B. Proteine übertragen werden, deren Gesamtimpuls statistisch verteilt ist. Ein System im Ungleichgewicht, wie es beispielsweise durch einen Konzentrationsgradienten hervorgerufen wird, strebt zeitabhängig dem Gleichgewicht zu. Im Fall eines Stofftransports wird dieser Vorgang als Diffusion bezeichnet. Dem zugrundeliegende thermodynamische Größen wie der Diffusionskoeffizient und die Viskosität sind in makroskopischen Systemen nur im Ungleichgewichtszustand messbar, was allgemein zur Entwicklung von Relaxationsverfahren geführt hat. Auf mikroskopischer Ebene sind Informationen auch in einem dynamischen Gleichgewicht zu erhalten, da hier das Messsignal nicht eine Mittelung der statistisch verteilten Größen darstellt. Daraus resultiert die Bezeichnung Diffusionszeit für die durch FCS gewonnenen Daten, auch wenn diese in Abwesenheit eines Konzentrationsgradienten ermittelt werden. Die Geschwindigkeit eines Moleküls in einer flüssigen Phase ist seinem Diffusionskoeffizienten D proportional, welcher nach der Stokes-Einstein-Gleichung durch den hydrodynamischen Radius a und die Viskosität des Mediums η gegeben ist:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad [2.20]$$

Der hydrodynamische Radius a eines globulären Moleküls kann durch Gl. 2.21 angenähert werden, wobei die Masse eines Moleküls, gegeben durch den Quotienten der Molaren Masse m und der Avogadrokonstante N_A , ins Verhältnis zur Dichte des Moleküls ρ gesetzt wird. Abweichungen von der globulären Form führen zu einem größeren hydrodynamischen Radius. Viele lösliche Proteine lassen sich so beschreiben, wobei deren Dichte im Mittel mit 1,2 g/ml angenommen werden kann.²³

$$a = \sqrt[3]{\frac{3m/N_A}{4\pi\rho}} \quad [2.21]$$

Die zeitliche Änderung der Konzentration durch Diffusion wird durch das zweite Ficksche Gesetz beschrieben. Demzufolge ist die Geschwindigkeit der Konzentrationsänderung der Steilheit des Konzentrationsgradienten proportional.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} \quad [2.22]$$

Die Lösung der Differenzialgleichung für eine freie Diffusion in allen Raumrichtungen entspricht einer radialsymmetrischen Gaußverteilung $c(r)$. Betrachtet man eine eindimensionale Diffusion von n_0 Teilchen entlang der x-Achse ausgehend von einer Fläche A in der y,z-Ebene, erhält man:

$$c(x) = \frac{n_0}{A(\pi Dt)^{\frac{1}{2}}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad [2.23]$$

Während Gl. 2.23 für ein makroskopisches System entwickelt wurde, kann die eindimensionale Bewegung eines einzelnen Moleküls durch eine große Anzahl von Sprüngen simuliert werden. Legt es während der Zeit τ die Schrittweite λ zurück, ist die Wahrscheinlichkeit, es nach der Zeit t an dem Punkt x zu finden:

$$P(x) = \sqrt{\frac{2\tau}{\pi t}} \cdot e^{-\frac{x^2}{2t\lambda^2}} \quad [2.24]$$

Aus einem Vergleich mit Gl. 2.23 folgt die Einstein-Smoluchowski-Gleichung, die den Diffusionskoeffizienten durch die Schrittweite und die Frequenz der Sprünge darstellt.

Damit wird eine Verbindung der mikroskopischen Moleküleigenschaften und makroskopischen Größen geschaffen.

$$D = \frac{\lambda^2}{2\tau} \quad [2.25]$$

2.3 Biologisches Untersuchungsmaterial

Höhere Organismen wie der Mensch oder auch Pflanzen sind kontinuierlich mit einer großen Anzahl verschiedener Mikroorganismen konfrontiert und stellen teilweise deren natürlichen Lebensraum dar. Das Immunsystem steht vor der Aufgabe, Pathogene zu erkennen und zu bekämpfen, während andere Organismen toleriert bzw. sogar zu gegenseitigem Nutzen im Wachstum gefördert werden (Symbiose). Wirbeltieren steht dabei das adaptive wie auch das angeborene Immunsystem zur Verfügung, wobei Bestandteile des letzteren auch in Insekten und Pflanzen gefunden wurden.³ Der Forschungsstand bezüglich pflanzlicher Systeme hat noch nicht das Niveau, das auf humaner Ebene gegeben ist, erreicht, mögliche Homologien erleichtern jedoch die Suche potentiellen Interaktionspartnern.

Die Symbiose der stickstofffixierenden Rhizobien mit Pflanzen der Familie der Leguminosen ist von enormer agrarwirtschaftlicher Bedeutung. Hier gilt *Medicago truncatula* als Modell der wegen ihres großen Genoms für Forschungszwecke wenig geeigneten landwirtschaftlich genutzten Pflanzen.² Für die Ausbildung der Wurzelknöllchen, in denen die Stickstofffixierung stattfindet, ist eine molekulare Erkennung typischer Oberflächenmarker der Bakterien erforderlich, zu denen auch Lipopolysaccharide (LPS) zählen. Geringe Unterschiede dieser chemisch sehr homogenen Molekülgruppe führen allerdings zu einer Abwehrreaktion, die im humanen wie pflanzlichen System Parallelen aufweist und unter anderem durch sogenannte kleine GTP-bindende Proteine vermittelt wird.^{24,25}

2.3.1 LPS – CD14

Lipopolysaccharide sind Polymere von etwa 4 – 10 kDa, die in der äußeren Zellmembran von Bakterien eingelagert sind. Dieses geschieht über ein Lipid A genannten Bereich, welcher mehrere teilweise modifizierte Fettsäuren enthält. Der Kohlenhydratanteil ist in die Core-Region und den O-Antigen-Bereich gegliedert, wobei sich letzterer durch eine hohe Variabilität auszeichnet (Abb. 2.5). Er ist zusammen mit dem Lipid A verantwortlich für die LPS-Erkennung in Blut von Säugetieren, wo eine Abwehrreaktion induziert wird. Diese ist im Fall einer überschießenden Reaktion als Septischer Schock bekannt, der bis zum Tod führen kann.

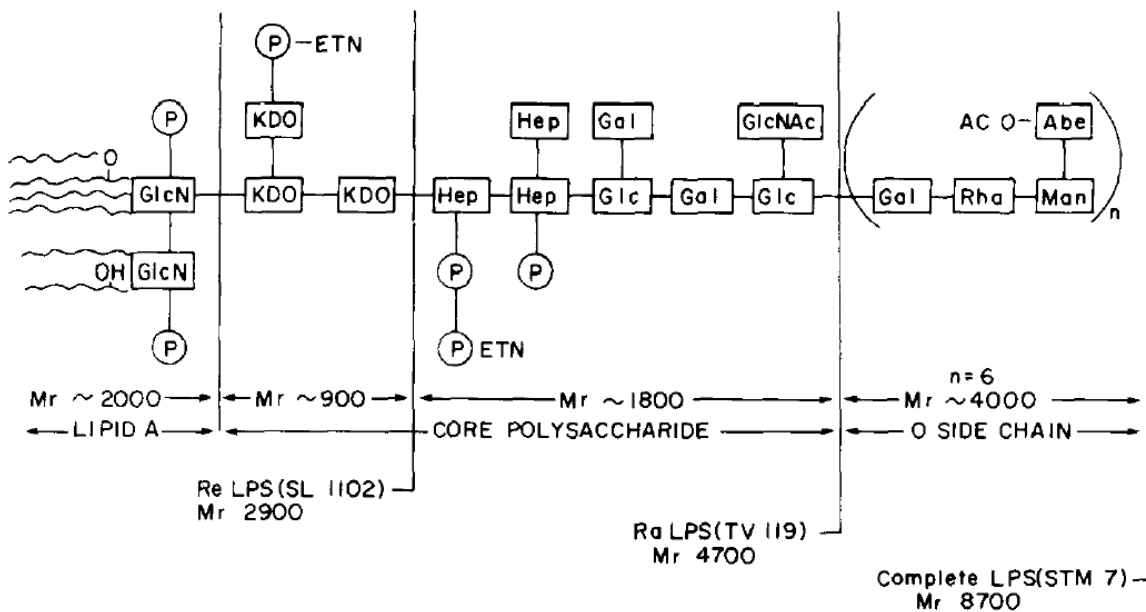


Abb. 2.5. Molekülstruktur von LPS aus *Salmonella typhimurium*. Von links: Lipid A, KDO-Bereich, Core-Region, O-Antigenbereich. Gewellte Linien = Fettsäuren, Rechtecke = Kohlenhydrate, P = Phosphat.²⁶

Im tierischen Organismus erfordert die Erkennung die Bindung von LPS an das Protein CD14, welches frei im Blut sowie in einigen Zellen über einen GPI-Anker membrangebunden vorkommt. Die folgende Interaktion mit dem membranständigen Rezeptor TLR-4, eventuell im Komplex mit weiteren Proteinen, leitet die intrazelluläre Signaltransduktion ein.³

Da im Pflanzengenom Hinweise auf die Präsenz eines TLR-Signalweges gefunden wurden und Reaktionen auf LPS bewiesen sind, steht nun die Identifizierung der beteiligten Komponenten an. In der Arbeitsgruppe Prof. Pühler wurde aus *M. truncatula* Protein der Masse 45 kDa isoliert, welches dem tierischen CD14 homologe Charakteristika aufweist. Die Bindung von LPS, extrahiert aus dem symbiotischen Bakterium *Sinorhizobium meliloti*, an dieses Protein wird mittels FCS untersucht.

2.3.2 GTP – G-Proteine

Kleine GTP-bindende Proteine sind an vielen Signaltransduktionsprozessen wie auch dem durch LPS induzierten beteiligt. Ihre Aktivität wird durch das gebundene Guaninnukleotid bestimmt, wobei GTP aktivierend und GDP inaktivierend wirkt. Der Austausch von GDP durch GTP wird von Guanine nucleotide exchange factor-Proteinen (GEF) katalysiert, während die Hydrolyse zu GDP von der intrinsischen GTPase Funktion vermittelt wird. Dieser langsame Prozess kann durch GTPase activating proteins (GAPs) beschleunigt werden. Eine Interaktion mit einem Guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) arretiert diesen Zyklus im inaktiven Stadium mit gebundenem GDP. Damit wirken G-Proteine als molekulare Schalter mit einer von einem Timer begrenzten aktiven Periode.²⁷

Das Protein Rac1 (Abb. 2.6) aus *M. sativa* ist an der Initiation der als oxidative burst bezeichneten extrazellulären Freisetzung von Wasserstoffperoxid beteiligt. Sie erfolgt unter anderem als Reaktion auf die Erkennung von LPS phytopathogener Bakterien und dient deren Bekämpfung. Die GTP-Bindung einer in *E. coli* exprimierten Variante dieses

Proteins wurde bereits im Ensemble mittels Surface Plasmon Resonance (SPR) gezeigt und soll nun durch FCS auf Einzelmolekülebene bestätigt und weiter untersucht werden.



Abb. 2.6: Wahrscheinliche Molekülstruktur von MsRac 1, berechnet durch SWISS-MODEL⁹

3 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt die Gerätekonfiguration des verwendeten Mikroskops sowie die Präparation der zu untersuchenden Proben.

3.1 Konfokales Mikroskop

3.1.1 ConfoCor 2

Für diese Messungen wurde das kommerziell erhältliche Gerät ConfoCor 2 der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) eingesetzt. Es basiert auf dem inversen konfokalen Mikroskop Axiovert 200M, kombiniert mit einem Lasermodul der Firma LASOS (Jena, Deutschland), einer Detektionseinheit mit 2 APDs sowie einem Softwarekorrelator und einer Steuerungs- und Analysesoftware.

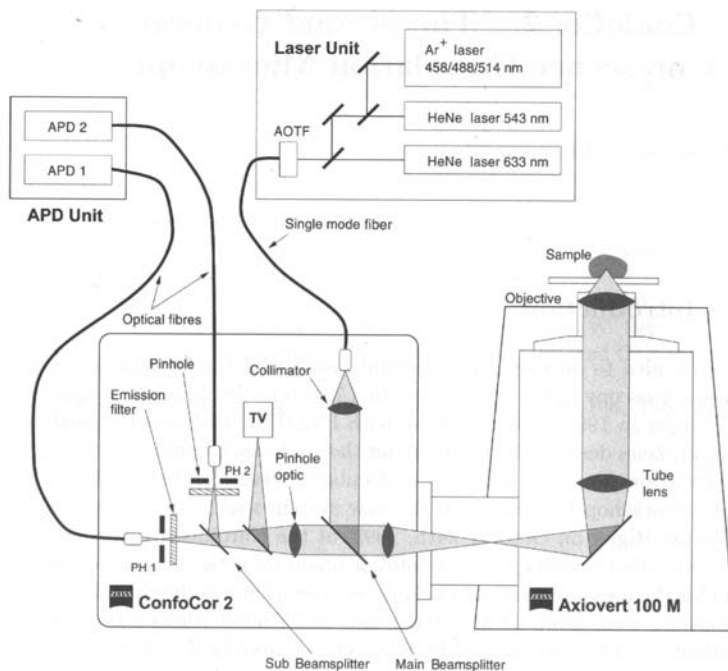


Abb. 3.1 Aufbau des ConfoCor 2 und Weg der Anregungs- und Fluoreszenzstrahlung

Das Lasermodul stellt mit drei Lasern insgesamt 5 Wellenlängen zur Verfügung, welche die Anregung praktisch aller für den sichtbaren Spektralbereich ausgelegten Fluoreszenzfarbstoffe erlauben. Ein Argonionenlaser liefert die Wellenlängen 458 nm, 488 nm und 514 nm, zwei Helium-Neon-Laser steuern die Wellenlängen 543 nm und 633 nm bei. Die Frequenzwahl wie auch die Regulierung der Intensität erfolgt durch ein AOTF. Die Transmissionseigenschaften dieses anisotropen Kristalls sind durch applizierte Schallwellen modulierbar und einem Bandpassfilter vergleichbar. Im Kreuzkorrelationsmodus ist er für zwei Wellenlängen (488 nm und 633 nm) permeabel.

Die Leistung der Laser beträgt für die HeNe-Laser 3 mW (543 nm) bzw. 5 mW (633 nm), die des Argonionenlasers ist von der gewählten Röhrenspannung abhängig. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 50 % der maximal 25 mW eingestellt.

Das Anregungslicht wird mittels eines Multimode-Glasfaserleiters zum Mikroskop geführt und dort durch einen Kollimator in ein paralleles Strahlenbündel aufgeweitet, das über einen Strahlteiler zum Objektiv gelenkt wird (Abb. 3.1). Das von dem selben Objektiv gesammelte längerwellige Fluoreszenzlicht passiert diesen Spiegel auf dem Rückweg und wird durch eine Optik auf ein Pinhole fokussiert, wobei Streulicht zuvor durch Filter abgefangen wird. Hinter dem Pinhole wird das Licht wieder in eine Glasfaser eingekoppelt und zu einem Detektor geleitet. Hierbei werden für lang- und kurzwelliges Fluoreszenzlicht jeweils verschiedene Kanäle verwendet, die über einen Spiegel anzusteuern sind. Zudem besteht die Möglichkeit einer Abbildung durch eine CCD-Kamera. Sämtliche Spiegel und Filter sind motorgetrieben und durch die Software einstellbar.

Es wird ein 40x C-Apochromat Wasserimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 eingesetzt. Das effektive Volumen liegt damit unter 1 fl. Der Arbeitsabstand beträgt 220 µm und erlaubt Messungen in hinreichendem Abstand von der Probenoberfläche wie auch innerhalb adhärenter Zellen. Die Optik kann auf Glasdurchmesser von 140 – 180 µm korrigiert werden, was die Anwendung von Deckgläsern wie auch Mikrotiterplatten ermöglicht.

Die Detektoren sind in einem getrennten Gehäuse untergebracht, um eine Erwärmung der optischen Bauteile zu vermeiden. Es werden zwei APDs (SPCM-AQR-13-FC, Firma EG&G, Canada) mit einem niedrigen Hintergrundrauschen von < 250 Hz und einer Totzeit zwischen zwei Pulsen von 50 ns verwendet. Sie weisen eine wellenlängenabhängige Detektionseffizienz von $45 - 65$ % auf. Die detektierten Photonenergebnisse werden über eine schnelle SCSI-Verbindung zu einem Computer übermittelt und dort in Echtzeit bezüglich der Auto- bzw. Kreuzkorrelation analysiert.

3.1.2 Gerätejustierung

Eine Bestimmung der Dicke D des Probenträgers erfolgt, indem die von der CCD-Kamera aufgenommenen Reflexionspunkte des Laserstrahls an den Glasoberflächen während der Annäherung des Objektivs vermessen werden. Aufgrund der piezoelektronischen Bewegung des Objektivs in axialer Richtung ist eine sehr präzise Positionsbestimmung möglich. Die so ermittelte scheinbare Dicke d wird wegen der Unterschiede der Brechungsindices n_i von Glas und Immersionsmittel (hier: Wasser) korrigiert:

$$D = \frac{n_{Glas}}{n_{Wasser}} \cdot d \quad [3.1]$$

Mit $n_{Glas} = 1,52$ und $n_{Wasser} = 1,33$ ergibt sich für die eingesetzten 18×18 mm Deckgläser der Firma Menzel (Braunschweig, Deutschland) $d = (124,5 \pm 3,1) \mu\text{m}$ und damit $D = 142,3 \mu\text{m}$. Der berechnete Wert wird am Korrekturring des Objektivs eingestellt und durch Messung der molekularen Helligkeit eines geeigneten Farbstoffs kontrolliert. Eine weitere Anpassung aufgrund von Abweichungen des Brechungsindex der Probe von dem reinen Wassers ist anhand dieses Parameters möglich.

Die Positionierung des Pinholes erfolgt automatisiert und ist auf eine maximale Zählrate des Detektors ausgerichtet. Dazu werden $20 \mu\text{l}$ einer 100 nM Rh6G-Lösung in H_2O für die Wellenlängen 488 nm, 514 nm und 543 nm auf ein Deckglas gegeben und das

Objektiv 200 μm über die Glasoberfläche in den Tropfen fokussiert. Der Durchmesser des Pinhole wird für die Anregungswellenlängen 488 nm und 514 nm auf 70 μm und für die Wellenlänge 543 nm auf 80 μm eingestellt, so dass nur das Hauptmaximum der Beugungsscheibe abgebildet wird.

Die Messungen von GTP-Atto bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm wurden unter Verwendung des Strahlteilers HFT 488 und des Emissionsfilters LP 505 durchgeführt. Für die Messungen des LPS-RITC bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm wurden der Strahlteiler HFT 543 und der Emissionsfilter LP 560 verwandt.

Zur Berechnung des effektiven Volumens nach Gl. 2.1 sowie Gl. 2.11 wird die Diffusionszeit eines Farbstoffs mit bekanntem Diffusionskoeffizienten bestimmt. Für die kurzwelligen Laser bis einschließlich 543 nm kommt eine 30 nM Rh6G-Lösung in 150 mM wässrigem NaCl zum Einsatz. Der parallel für jede Wellenlänge ermittelte Strukturparameter S wird in der Analyse der folgenden Messungen als Konstante behandelt.

Eine Neueinstellung der Spiegel des Lasermoduls wurde durch den Hersteller vorgenommen.

3.2 Datenauswertung

Die mitgelieferte Software Version 3.0 SP3 wird unter Windows NT betrieben und gestattet sowohl die Steuerung der einzelnen Komponenten wie auch die Analyse der aufgezeichneten Daten. Diese enthalten die zeitabhängige Fluoreszenzintensität sowie die resultierende Autokorrelationsfunktion nach Gl. 2.5. Die Analyse erfolgt durch Anpassung des mathematischen Modells Gl. 2.15 unter Verwendung des nichtlinearen Levenberg-Marquard-Algorithmus. Der Benutzer hat die Möglichkeit, die Anzahl der Komponenten festzulegen (max. 3) sowie den Parametern konstante Werte zuzuweisen.

In Bindungsstudien sind in der Regel 2 Komponenten anwesend. Die Diffusionszeit des freien Liganden τ_{D1} wird in vorausgehenden Experimenten bestimmt und anschließend fixiert. In Anwesenheit des Bindungspartners ergibt ein 2-Komponenten-Fit die Diffusionszeit des Komplexes τ_{D2} . Durch Fixierung beider Diffusionszeiten wird eine Vergleichbarkeit verschiedener Messungen hinsichtlich des Bindungsgrades Y ermöglicht. Weiterhin wird die Güte des Fits durch Fixierung bekannter Größen verbessert, da lokale Minima während der iterativen Anpassung des Modells vermieden werden.

Während die gesamte Fluoreszenzintensität messbar ist, wird die molekulare Helligkeit η (auch cpm genannt) eines Fluorophors unter Einbeziehung der korrelierten Daten berechnet. Dazu wird der Mittelwert der Autokorrelationsfunktion (ACF) im Zeitbereich $\tau = 2 - 10 \mu\text{s}$ ($\approx 1/N$) mit der Gesamtzählrate multipliziert. Mögliche Unterschiede der cpm eines Fluorophors in verschiedener chemischer Umgebung bleiben so unberücksichtigt.

3.3 Chemikalien

Das an der 2' oder 3'OH-Position markierte GTP wurde von der Firma Jena Bioscience (Jena, Deutschland) unter Verwendung des Farbstoffs Atto-488 (Atto-Tec GmbH, Siegen, Deutschland) synthetisiert. Die Farbstoffe Rh6G und RITC wurden von Fluka GmbH (Buchs, Schweiz) bzw. Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), Igepal Ca630®, Natriumchlorid (NaCl) und GTP stammen von Fluka (Buchs, Schweiz). Natriumdodecylsulfat (SDS) und Magnesiumchlorid-Hexahydrat wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland) erhalten. Rinderserumalbumin (BSA), Dithiothreitol (DTT), Tetra-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) sowie die Detergenzien Triton X100 und Natriumdeoxycholol (DOC) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Das deionisierte und

filtriertes Wasser war von MilliQ Qualität, die Entsalzungsanlage wie auch die Membranfilter stammen von der Firma Millipore (Bedford, MA, USA).

Die eingesetzten Pufferlösungen waren HBSMD (Hepes 25 mM, 25 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,5), HBS-D (Hepes 25 mM, 25 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5), PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,5), Tris-Borat (100 mM Tris, 100 mM Borsäure, pH 8,0).

3.4 LPS - Bindung

Das Lipopolysaccharid aus *Sinorhizobium meliloti 2011* und das dem CD14 homologe LPS-bindende Protein aus *M. truncatula* (im folgenden mit Mt-CD14 bezeichnet) wurden von Dipl. Biol. Andrea Groß aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pühler in der Fakultät für Biologie bereit gestellt. Die Präparation und Fluoreszenzmarkierung sollen hier kurz dargestellt werden.

Das LPS wird durch die sogenannte hot phenole-water Methode aus den Bakterien extrahiert. Enthaltene Proteine, DNA und RNA werden enzymatisch abgebaut und das LPS durch Dialyse und Ultrazentrifugation gereinigt. Die Bindung des Farbstoffs RITC wird in einem Boratpuffer (100 mM, pH 10,5) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen reagieren Isothiocyanate mit primären Aminogruppen unter Bildung von Thioharnstoffen. Der ungebundene Farbstoff wird durch Dialyse gegen Wasser entfernt. Aggregate des Farbstoffs werden durch Zentrifugation beseitigt. Die Konzentration an LPS beträgt 20 µg/ml in Borat-Puffer (100 mM, pH 10,5).

Das LPS-bindende Protein aus *M. truncatula* ist durch einen GPI-Anker auf der Außenseite der Zellmembran gebunden. Es wird durch eine Phospholipase geschleudert und mittels Zentrifugation von den Zellen getrennt. Dieser Extrakt wird ohne weitere Aufreinigung verwendet und enthält daher auch andere im Zellüberstand enthaltene Proteine. Der Gesamtproteingehalt beträgt 0,5 mg/ml, die Konzentration des zu

untersuchenden Proteins Mt-CD14 ist unbekannt, so dass ausschließlich qualitative Aussagen bezüglich der LPS-Bindung möglich sind.

3.4.1 Auflösen der Aggregate durch Detergenzien

In wässriger Lösung bildet LPS aufgrund seiner amphiphilen Eigenschaften hochmolekulare Aggregate, die durch divalente Kationen stabilisiert werden, indem sie die negativen Ladungen der Phosphatgruppen neutralisieren. Eine Behandlung mit Detergenzien und EDTA reduziert die Größe der Aggregate sukzessiv bis hin zu Monomeren, wobei in einigen Studien lediglich Di- bzw. Trimere als kleinster Einheit erreicht wurden.²⁶

FCS-Messungen werden durch diese Aggregate praktisch unmöglich, da sie deutliche Spitzen der Fluoreszenzintensität verursachen. Die Zugabe des Detergenz Natrium-Deoxycholat (DOC) reduziert die Größe der Aggregate in einer konzentrationsabhängigen Weise. Um Beeinträchtigungen des potentiellen Bindeproteins sowie des Farbstoffs zu vermeiden, wurde eine Endkonzentration von 0,03% w/v eingesetzt.

3.4.2 Bindung an Proteinextrakt

Die Anregungswellenlänge dieser Messungen beträgt 543 nm bei einer Ausgangsleistung von 0,5 mW. Eine Messreihe umfasst 30 Messung, welche jeweils aus 20 Wiederholungen á 10 s bestehen. Die hohe Anzahl kurzer Einzelmessungen gestattet es, ungeeignete Einzelmessungen (z.B. durch verbliebene LPS-Aggregate) nicht einzubeziehen, ohne den auswertbaren Datenumfang zu sehr einzuschränken.

Es werden in einem Eppendorfgefäß 100 µl der 20 µg/ml LPS-Lösung zu 50 µl einer wässrigen DOC-Lösung von 1 mg/ml gegeben und intensiv gemischt. Davon werden 10 µl auf ein Deckglas pipettiert und 5 – 10 Messungen durchgeführt, bevor der

Proteinextrakt dazugegeben wird. Dieser wird wie erhalten oder 1:10 in PBS verdünnt in verschiedenen Volumina (0,2 – 2 µl) eingesetzt. Der Proteinextrakt wurde bei –20 °C gelagert, für Messungen entnommene Proben wurden maximal 3 Tage bei 0 °C aufbewahrt.

Um eine Verdunstung des Lösungsmittels während der Messung zu vermeiden, wird um den Probetropfen ein Gummiring gelegt, auf dem ein zweites Deckglas zu liegen kommt. Diese Kammer weist ein Volumen von ca. 80 µl auf.

3.5 GTP-Bindung

Die Modifikation von Guaninnukleotiden an der 2'- und 3'-Position der Ribose wird vielfach für Bindungsstudien eingesetzt und daher für die Markierung des GTP mit dem Farbstoff Atto-488 gewählt. Das GTP-Atto wurde in Wasser auf 1 µM verdünnt und bei –20 °C gelagert. Für die Messungen wurde es in dem jeweiligen Puffer auf 10 nM verdünnt und bei 0 °C aufbewahrt, wobei es für maximal 5 Tage eingesetzt wurde.

Es wurden zwei G-Proteine untersucht, wobei Rab 3A ein kommerziell erhältliches Protein ist, mit dem die Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Methode stattfand, bevor die Messungen mit dem pflanzlichen Rac 1 durchgeführt wurden.

3.5.1 Bindung an Rab3A

Das Protein Rab 3A (R-6022) wurde von der Firma Sigma in einer Konzentration von 0,31 mg/ml entsprechend 12,4 µM bezogen und bei –70 °C gelagert. Ein Teil davon wurde mit HBSMD auf 1 µM verdünnt und bei –20 °C für Messungen bereitgehalten. Die Konzentration vor der Reaktion mit GTP wurde auf 100 nM eingestellt und die Lösung für maximal 3 Tage bei 0 °C gelagert.

3.5.2 Bindung an Rac 1

Das Protein Rac 1 aus *M. sativa* wurde von Dipl. Biol. Martina Brecht aus der Arbeitsgruppe von Prof. Pühler in der Fakultät für Biologie zur Verfügung gestellt. Das entsprechende Gen wurde in das Plasmid pFLAG-MAG integriert und in transfizierten *E. coli* BL21 Zellen als Fusionsprotein mit einem Flag-Tag® exprimiert. Die Aufreinigung aus dem Zelllysat erfolgte affinitätschromatographisch unter Verwendung einer anti-FLAG Antikörper-Agarosesäule. Zwei Fraktionen des Eluats (im Folgenden E2 und E3 genannt) wurden für Messungen der GTP-Bindung ausgewählt und der Proteingehalt durch eine Bradford-Reaktion bestimmt. Fraktion E2 enthält 0,512 mg/ml, Fraktion E3 0,768 mg/ml Protein. Beide Proben beinhalten eine größere, nicht bekannte Menge Flag-Peptid, das zur Elution des Proteins eingesetzt wurde und bei der Konzentrationsbestimmung ebenfalls erfasst wird. Das Protein wurde in HBSMD bei -20 °C gelagert, für Messungen aufgetaute Aliquots wurden bei 0 °C für maximal 3 Tage verwahrt. Die Proben wurden für Messungen direkt oder 1:10 verdünnt in HBSMD eingesetzt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Farbstoffeigenschaften

Bevor die eigentlichen Messungen durchgeführt werden können, sind einige Charakteristika der Fluorophore zu bestimmen. Sie sind für die Einstellungen des Gerätes hinsichtlich der Intensität und Wellenlänge des anregenden Lichts, sowie der Auswahl entsprechender Filter wie auch für die Autokorrelationsanalyse notwendig, da die Fixierung bekannter Größen die Genauigkeit des Fits erhöht.

4.1.1 Tripleteigenschaften und Fotostabilität

Eine gutes S/N-Verhältnis erfordert eine hohe molekulare Helligkeit und damit eine große Anregungsleistung. Da mit steigender Energiedichte auch der Tripletanteil und die Photobleachingrate zunehmen, wird eine optimale Laserleistung durch Messen des Tripletanteils und eines möglichen Bleichens des Farbstoffs bei steigender Laserleistung bestimmt. Der Anteil der Fluorophore im Tripletzustand ist durch die Autokorrelationsanalyse direkt messbar, während sich ein Bleichen des Farbstoffs durch eine verringerte Diffusionszeit bemerkbar macht. Der Grund dafür ist, dass die gebleichten Moleküle bereits vor dem Verlassen des Detektionsvolumens keine Photonen mehr emittieren.

Die Berechnung der Laserleistung bezieht sich auf die nominelle maximale Ausgangsleistung und ist in der Probe wegen Verlusten an den optischen Komponenten geringer. Für die Farbstoffe Rh6G und GTP-Atto wurde die Wellenlänge 488 nm des Argonionenlasers verwandt, so dass eine direkte Vergleichbarkeit gegeben ist, während für RITC ein HeNe-Laser mit 543 nm eingesetzt wurde und so Differenzen der Leistung möglich sind.

Für die alle untersuchten Fluorophore ergibt die Analyse einen Anstieg des Tripletanteils mit zunehmender Laserintensität (Abb. 4.1). Da man von einer konstanten Rate des ICS von S_1 -Zuständen ausgehen kann und deren Besetzung bei niedriger Energiedichte linear von der Laserintensität abhängt, ist eine annähernd konstante Steigung zu erwarten. Dieses kann durch die Messungen bestätigt werden, lediglich bei höheren Intensitäten ist ein Abflachen der Kurven erkennbar.

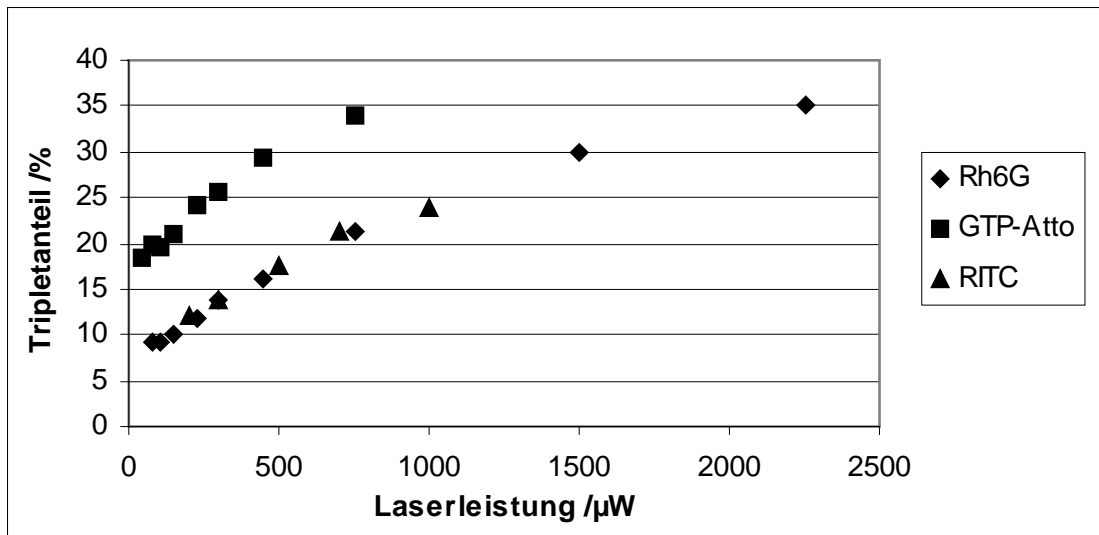


Abb. 4.1: Tripleteigenschaften von Rh6G (30 nM in 150 mM NaCl), GTP-Atto (10 nM in HBSMD) und RITC (100 nM in 150 mM NaCl). Mit steigender Laserintensität nimmt der Tripletanteil des Farbstoffes zu. Wellenlänge Rh6G und GTP-Atto 488 nm, RITC 543 nm.

Ein Vergleich der Farbstoffe zeigt, dass GTP-Atto im Unterschied zu Rh6G und RITC einen höheren Tripletanteil bei gleicher Anregungsintensität aufweist. Ob dieses eine Eigenschaft des Farbstoffs ist, oder in einer möglichen Interaktion mit dem gebundenen Guaninnukleotid begründet liegt, kann nicht geklärt werden, da dieser Farbstoff nur als GTP-Konjugat vorlag. Als Folge muss die Laserintensität bei Messungen mit GTP-Atto mit 105 μW niedriger gewählt werden, um die empfohlene Schwelle eines Tripletanteils von 20 % nicht zu überschreiten, während für Rh6G 450 μW und RITC 500 μW eingesetzt werden können.

Die Diffusionszeit von Rh6G bleibt bei einer Laserleistung unter 500 μW weitgehend konstant und fällt mit weiter steigender Leistung langsam ab. Dagegen weisen sowohl GTP-Atto wie auch RITC eine Zunahme der Diffusionszeit mit ansteigender Laserleistung auf (Abb. 4.2). Man kann daher annehmen, dass die Farbstoffe bei einer Leistung unterhalb von ca. 500 μW unter den gegebenen Umständen stabil gegen ein Ausbleichen sind. Das bedeutet, dass ihre Aufenthaltsdauer im Laserfokus τ_D weitaus kleiner ist, als im Mittel für ein Bleichen erforderlich ist. Eine Steigerung der Anregungsleistung über ca. 500 μW kann im Fall von Rh6G zu einer Zerstörung des Farbstoffs führen. Dieser Effekt sollte bei Molekülen mit langsamerer Diffusionszeit wie z.B. Proteinen stärker ausgeprägt sein, da sie sich längere Zeit im Laserfokus aufhalten.²⁸ Ein Anstieg der Diffusionszeit, wie es bei GTP-Atto und RITC zu beobachten ist, lässt sich mit einer Sättigung des S_1 -Zustandes durch die hohe Energiedichte im Zentrum des Laserfokus und damit einhergehender Ausweitung des Intensitätsprofils erklären.²⁹ Ein Ausbleichen kann hier nicht festgestellt werden, jedoch ist die maximale Laserleistung in beiden Messreihen niedriger als bei Rh6G.

Weiterhin ist mit zunehmender Laserleistung ein Anstieg der apparenten Teilchenzahl N zu verzeichnen, was nach Gl. 2.15 zu einem Abfallen der Amplitude der Autokorrelationsfunktion führt. Abbildung 4.3 zeigt dieses exemplarisch für Rh6G, die übrigen Farbstoffe weisen ein analoges Verhalten auf. Das zeigt, dass nicht alle im Laserfokus befindlichen Moleküle angeregt werden, die Wahrscheinlichkeit dafür aber mit zunehmender Energiedichte steigt. Sollen mittels FCS Konzentrationsmessungen durchgeführt werden, ist daher eine Umrechnung der apparenten in eine tatsächliche Teilchenanzahl notwendig, wozu Vergleichsmessungen mit bekannten Konzentrationen bei der selben Laserleistung durchzuführen sind.

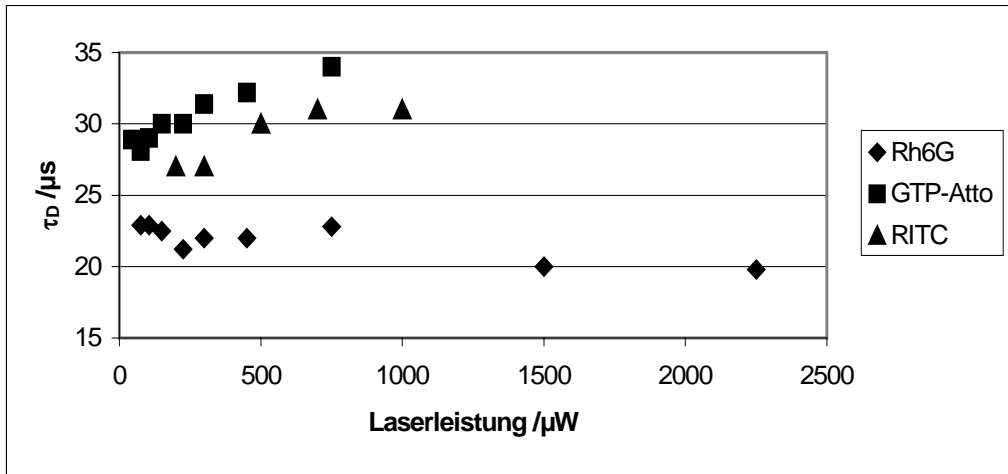


Abb. 4.2: Diffusionszeit in Abhängigkeit der Laserleistung. Rh6G zeigt eine Abnahme der Diffusionszeit bei hoher Laserleistung, GTP-Atto und RITC dagegen eine Zunahme schon bei relativ geringer Leistung.

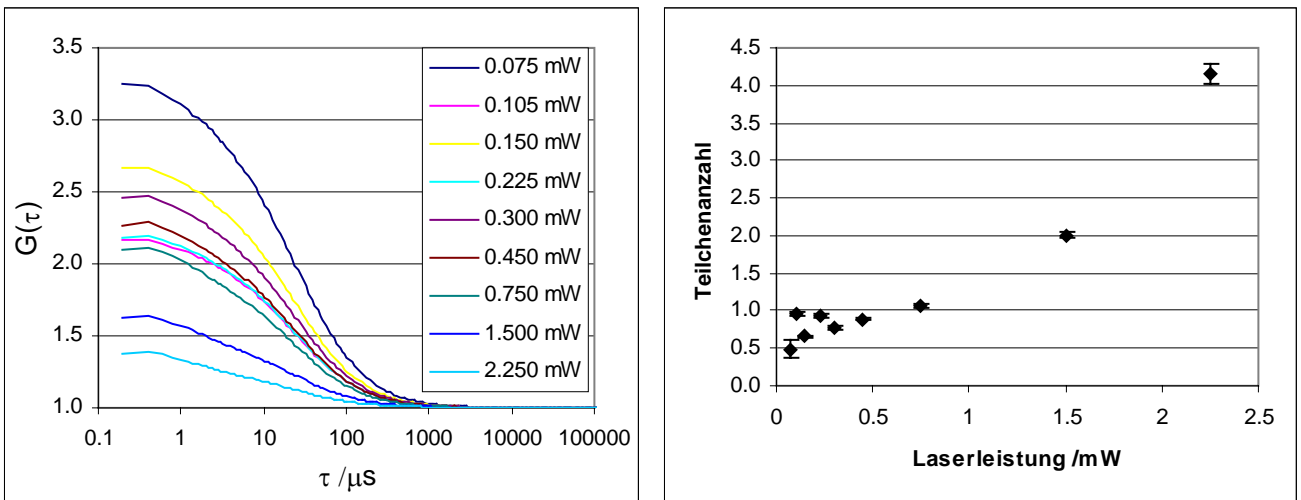


Abb. 4.3: **links** Korrelationsfunktion in Abhängigkeit der Laserleistung, **rechts** apparente Teilchenanzahl N in Abhängigkeit der Laserleistung (30 nM Rh6G in 150 mM wässriger NaCl).

4.1.2 Lipophile Eigenschaften der Farbstoffe

Von Rh6G und RITC ist bekannt, dass sie stark lipophile Eigenschaften besitzen und deshalb unspezifisch an lipophile Moleküle und Oberflächen binden.³⁰ Dieser Vorgang ist ein Grund für die Abnahme der Teilchenanzahl während längerer Messungen der Farbstoffe. Ein Ausbleichen der Fluorophore ist wie beschrieben unwahrscheinlich und würde wegen des mit dem Volumen des Laserfokus verglichen großen Probevolumens kaum detektierbare Auswirkungen haben. Man kann diesen Vorgang durch einen exponentiellen Abfall erster Ordnung modellieren, wie Abb. 4.4 zeigt.

$$N = y_0 + A \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad [4.1]$$

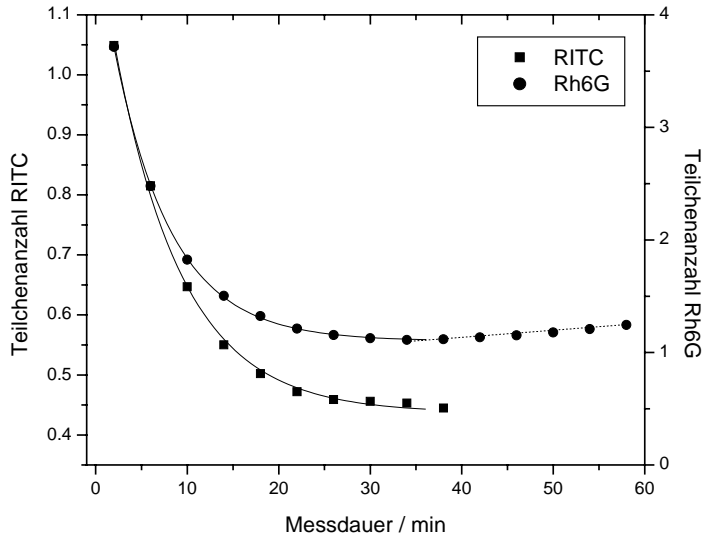


Abb. 4.4: Abnahme der Teilchenanzahl N durch Adsorption an der Glasoberfläche, angenähert durch exponentiellen Abfall (durchgezogene Linie), Konzentrationsanstieg durch Verdunstung (gepunktete Linie, nur Rh6G). Rh6G (30 nM in 150 mM wässriger NaCl) rechte Ordinate, RITC (100 nM in 150 mM wässriger NaCl) linke Ordinate. Laser $\lambda = 543$ nm, $P = 500 \mu\text{W}$.

Nach etwa 40 Minuten ist in beiden Messungen ein Minimum erreicht, was darauf schließen lässt, dass sich ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption an der Glasoberfläche ausgebildet hat.

In der Messung von Rh6G schließt sich darauf ein annähernd linearer Anstieg an (die Messung von RITC wurde nach 40 min beendet). Der Anstieg der Teilchenanzahl kann durch eine Konzentrationszunahme infolge von Verdunstung des Lösungsmittels erklärt werden und weist in anderen Messungen ebenfalls einem linearen Verlauf auf. Diese Erklärung wird durch die Abscheidung von kleinen Tropfen Kondenswassers an dem die Messkammer oben abschließenden Deckglases gestützt, welche nach ca. 20 min erkennbar werden und darauf an Größe zunehmen. Das Gesamtvolumen der Kammer beträgt etwa 80 μl , so dass für eine Sättigung der Luftatmosphäre relativ wenig Wasser notwendig ist.

Im Gegensatz zu Rh6G und RITC tritt bei GTP-Atto keine Abnahme der Teilchenanzahl während einer Messdauer von 40 min auf. Hier steigt die Anzahl der Fluorophore im Fokus bereits nach ca. 5 min an. Da keine Strukturformel dieses Fluorophors veröffentlicht ist, sind Aussagen über seine Hydrophobizität nicht möglich. Eine Adsorption an der Glasoberfläche ist jedoch nicht feststellbar.

Die Adsorption von Rh6G und RITC an Oberflächen ist nicht auf Glas beschränkt, sondern tritt auch an Kunststoffen wie Pipettenspitzen und Eppendorfgefäßen auf. So sinkt die Teilchenanzahl deutlich, nachdem ein Tropfen der Farbstofflösung mehrfach in eine Pipettenspitze aufgesaugt und darauf erneut gemessen wird. Das bedeutet, dass jeder Pipettierschritt einer Farbstofflösung deren Konzentration senkt und die berechneten Angaben in dieser Arbeit damit zu hoch sowie nicht vergleichbar sind. Dieses wird in Abb. 4.4 deutlich, wo die Teilchenanzahl einer nominell 30 nM Rh6G-Lösung die einer 100 nM RITC-Lösung um den Faktor 4 übersteigt.

Eine Möglichkeit, Adsorption an Oberflächen, wie sie auch von Proteinen bekannt ist, zu unterbinden, ist die Zugabe von Detergenzien. Sie können zum Absättigen der Bindungsstellen einer Oberfläche eingesetzt werden (z.B. durch Tween 80) oder sich an gelöste Moleküle anlagern. Zur Solubilisierung und Dissoziation der untersuchten LPS-Aggregate ist der Einsatz von Detergenzien notwendig (s. 4.2.1). Da RITC gebunden an

LPS sowie wahrscheinlich in beträchtlichem Umfang frei in der LPS-Präparation vorliegt, ist sein Verhalten in Gegenwart des Detergenz Natriumdeoxychololat (DOC) sowie zum Vergleich in Gegenwart des Detergenz Igepal CA630® untersucht worden.

Die Adsorption von RITC an Oberflächen wird durch ein Detergenz unterbunden bzw. rückgängig gemacht. Dieses geht aus der Zunahme der Teilchenanzahl nach Zugabe von DOC hervor. Da auch die Diffusionszeit ansteigt, ist anzunehmen, dass eine Anlagerung mehrerer DOC-Moleküle an ein Fluorophor erfolgt und er in dieser Form in Lösung gebracht wird (Abb. 4.5 links). Ein 2-Komponentenfit mit Fixierung der Diffusionszeit des freien Farbstoffs ($\tau_{D1} = 27 \mu\text{s}$) liefert für niedrige Konzentrationen des Detergenz keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich der Größe der Komplexe, da deren Anteil zu gering ist. Im Bereich der CMC und bei höheren Konzentrationen des Detergenz korreliert die Diffusionszeit des Komplexes ($\tau_{D2} = 88 \pm 2.9 \mu\text{s}$) gut mit der Größe der Micellen von ca. 4200 Da, was etwa 10 DOC-Monomeren entspricht.³¹ Demzufolge wird der Farbstoff oberhalb der CMC in Detergenzmicellen integriert, ohne deren Größe signifikant zu beeinflussen.

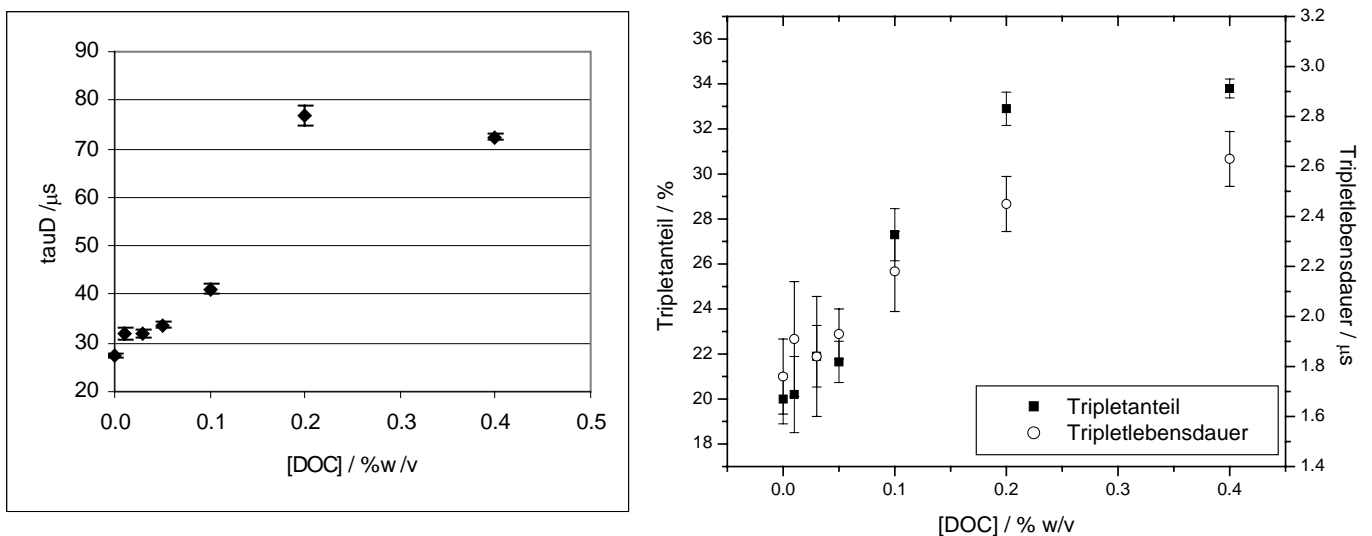


Abb. 4.5: Einfluss der Detergenzkonzentration. **links:** Diffusionszeit von RITC steigt mit zunehmender DOC-Konzentration (1-Komponenten-Fit). **rechts:** Tripletanteil und Tripletlebensdauer steigen mit zunehmender DOC-Konzentration (2-Komponenten-Fit). Standardabweichung als Fehler. RITC 10 nM in 100 mM Tris-Borat-Puffer, pH 8,0

Die molekulare Helligkeit des Farbstoffs bleibt nach Zugabe von DOC mit etwa 40 kHz ($P = 500 \text{ mW}$) im Bereich einer detergenzfreien Lösung, was darauf schließen lässt, dass jeweils ein einzelnes RITC-Molekül in den Komplexen vorliegt. Die Integration des Farbstoffs in die Detergenzmicellen verändert allerdings seine chemische Umgebung und damit seine photophysikalischen Eigenschaften hinsichtlich des Tripletübergangs. Wie aus dem rechten Teil der Abbildung 4.5 zu erkennen ist, steigt der Tripletanteil mit zunehmender Detergenzkonzentration von $(20,0 \pm 1,1)$ auf $(33,8 \pm 0,4) \%$ und die Tripletlebensdauer von $(1,76 \pm 0,15)$ auf $(2,63 \pm 0,11) \mu\text{s}$ an. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten ist eine Abschirmung des Farbstoffs von gelöstem Sauerstoff durch die angelagerten Detergenzmoleküle. Für das chemisch verwandte Rh6G ist ein Quenching im Tripletzustand durch molekularen Sauerstoff bekannt, was zu einer Abnahme des Tripletanteils mit steigender Sauerstoffkonzentration führt. Gleichzeitig wird die Tripletlebensdauer wahrscheinlich durch eine gesteigerte Rate chemischer Reaktionen mit Sauerstoff gesenkt.²⁹ Vergleichende Messungen von RITC und dem Detergenz Igepal CA 630® sowie von Rh6G und dem Detergenz SDS zeigen ein ähnliches Verhalten hinsichtlich des Tripletanteils, was diese Interpretation unterstützt.

Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von RITC ist eine Interaktion auch mit Proteinen denkbar. Für Rinderserumalbumin (BSA) konnte eine Bindung von RITC nachgewiesen werden. Die Interaktion nach einer sukzessiven Zugabe von BSA zu einer RITC-Lösung wurde anhand eines 2-Komponentenfits analysiert (Fixierung der Diffusionszeiten: freies RITC $\tau_{D1} = 27 \mu\text{s}$, Komplex mit BSA $\tau_{D2} = 170 \mu\text{s}$). Abb. 4.6 zeigt die Zunahme des Bindungsgrades Y während der Messungen. Die Endkonzentration an BSA ist mit $2,3 \text{ mg/ml}$ sehr hoch, der Bindungsgrad mit maximal $(16,9 \pm 2,8) \%$ allerdings relativ niedrig, so dass die Bindung demnach nur geringe Affinität aufweist.

Von Serumalbuminen ist bekannt, dass sie lipophile Bereiche an der Oberfläche aufweisen, über die sie im Blut Lipide binden und transportieren.¹ Es ist anzunehmen, dass auch RITC dort binden kann.

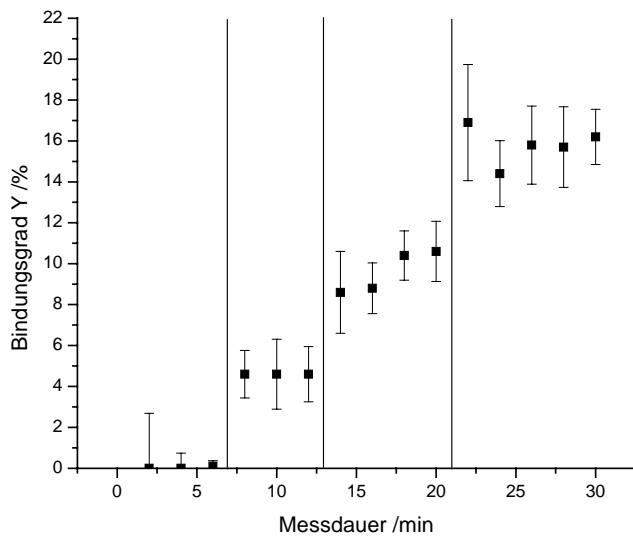


Abb. 4.6: Bindung von RITC an BSA. Die sukzessive Zugabe von BSA erhöht den Bindungsgrad Y in einem 2-Komponentenfit ($\tau_{D1}=27$, $\tau_{D2}=170$ μ s). Messung 1 – 3: RITC (100 nM, 10 μ l); dazu BSA (10 mg/ml) Messung 4: 0,3 μ l, Messung 7: 0,7 μ l, Messung 11 2,0 μ l, Zugabe durch senkrechte Linie gekennzeichnet.

Gleichfalls wurde eine Bindung an das pflanzliche Proteinextrakt untersucht. Eine Zugabe von 5 μ l des Proteinextraktes zu 15 μ l RITC (10nM) führte zu keiner Erhöhung der Diffusionszeit. Die Messung wurde sowohl ohne DOC als auch mit DOC in einer Konzentration, wie sie für Messungen mit LPS verwandt wurde, durchgeführt. Man kann daher annehmen, dass eine Bindung von RITC an Bestandteile des Proteinextraktes nicht erfolgt. Damit ist ein durch den Farbstoff hervorgerufenen falsch-positives Ergebnis der Messungen von LPS mit dem Proteinextrakt nicht wahrscheinlich.

4.2 Bindung von LPS-RITC an Mt-CD14

Wie von Lipopolysacchariden erwartet (2.3.1), bildet auch das RITC-markierte LPS in Wasser Aggregate, welche durch Detergenzien aufgelöst werden können. Zudem sind in der Präparation niedermolekulare fluoreszierende Partikel enthalten, bei denen es sich wahrscheinlich um ungebundenen Farbstoff handelt. Obwohl diese beiden Umstände die Interpretation der Messungen erschweren, kann eine Aussage über eine Interaktion mit dem Proteinextrakt gemacht werden.

4.2.1 Dissoziation der Aggregate

Analog zu anderen Amphiphilen kann auch für LPS eine CMC angegeben werden, unterhalb der jedoch keine Monomere, sondern lediglich prämicelläre Aggregate von reduzierter Größe ($5,5 * 10^6$ Da)³² vorliegen. Die Konzentration des hier eingesetzten LPS liegt mit 20 µg/ml im Bereich der für ein anderes LPS bestimmten CMC von 14 µg/ml.³² Zudem ist anzunehmen, dass die LPS-Konzentration niedriger als der angegebene Werte ist, da wie schon für RITC beschrieben, auch eine Adsorption von LPS an Oberflächen stattfindet, welche besonders bei den hier eingesetzten niedrigen Konzentrationen deutliche Verluste bedingt.³³

Um LPS-Aggregate aufzulösen, wird häufig DOC eingesetzt,²⁶ das sich gegenüber anderen Detergenzien durch eine vergleichsweise hohe CMC (in Wasser 5 mM, 0,21%)³⁴ auszeichnet und damit in hoher Konzentration löslich ist, ohne mit sich selbst zu interagieren. Um eine Denaturierung oder Funktionsstörung der Proteine zu vermeiden, wurde eine niedrige Konzentration von 0,03 % w/v eingesetzt.

Diffundiert ein Aggregat aus RITC-markiertem LPS durch das Detektionsvolumen, resultiert daraus ein starker Anstieg des Fluoreszenzsignals durch die große Anzahl gebundener Fluorophore. Die Anzahl von Intensitätsspitzen des Fluoreszenzsignals lässt sich durch Zugabe von DOC im Vergleich zu Messungen einer reinen LPS-Lösung

deutlich vermindern. Die Größe der Aggregate wird demnach durch DOC reduziert. Eine Auswertung der Messungen ergibt eine Diffusionszeit der Komplexe von 90 – 170 μs nach der Detergenzzugabe. Diese Werte sind höher, als für LPS-Monomere eines Molekulargewichts von ca. 6000 Da anzunehmen ist ($\tau_D \approx 50 \mu\text{s}$ bei sphärischer Geometrie). Geht man von 5 – 10 angelagerten DOC-Molekülen an einem LPS-Monomer aus,²⁶ steigt der theoretisch Wert der Diffusionszeit auf 62 μs . Wegen der geringen Detergenzkonzentration ist jedoch nicht von einer vollständigen Dissoziation der LPS-Multimere auszugehen. Steigert man die Konzentration des Detergenz bis in den Bereich der CMC, nimmt die Zählrate und damit die Teilchenanzahl stark zu. Mögliche Erklärungen dafür sind eine weitergehende Dissoziation der Aggregate und damit größere Anzahl an LPS-Einheiten reduzierter Größe sowie eine Ablösung von an Oberflächen adsorbierter Moleküle.

Die Schwankungen der Diffusionszeit zeigen die Heterogenität des Systems und erschweren eine quantitative Analyse. Wie in Abschnitt 4.2.3 dargestellt wird, führt die Zugabe des zu untersuchenden Proteinextraktes jedoch zu qualitativ gut reproduzierbaren Veränderungen, die hinsichtlich einer Bindung interpretierbar sind.

4.2.2 Kontamination des LPS (mit ungebundenem Farbstoff)

Die Analyse der Messungen des mit Detergenz behandelten LPS erfordert einen 2-Komponentenfit, um die Differenzen zwischen Modell und gemessener Funktion zu minimieren. Die Diffusionszeit der ersten Komponente liegt im Mittel im Bereich von 30 bis 35 μs , was der Diffusionszeit von RITC unter gleichen Bedingungen entspricht. Für LPS-Monomere der Masse 6000 Da ist eine Diffusionszeit von mindestens 50 μs zu erwarten, die durch eine Anlagerung von DOC-Molekülen noch erhöht würde.

Es wird daher davon ausgegangen, dass die erste Komponente freies RITC darstellt, das gegebenenfalls in Aggregaten mit wenigen DOC-Molekülen vorliegt. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass während der Präparation des RITC-markierten LPS rötliche Partikel erkennbar waren, welche bei einer vergleichbaren Präparation mit

FITC nicht auftreten und ausgefallenes ungebundenes RITC darstellen können. Weiterhin wurde eine Membranfiltration der LPS-Lösung durchgeführt, wobei die Porengröße des Filters 10 kDa betrug und damit ein Passieren von LPS-Aggregaten nicht erfolgen konnte. Das erhaltene Filtrat zeigte im Gegensatz zu mit DOC behandeltem LPS keine Reaktion mit dem zugegebenen Proteinextrakt. Das spricht ebenfalls dafür, dass es sich nicht um LPS, sondern um Farbstoff handelt. Die durch FCS gemessene Teilchenanzahl in diesem Filtrat betrug mit 0,26 etwa $\frac{1}{4}$ der Gesamtteilchenanzahl vor der Filtration. Das zeigt den hohen Anteil an Fluorophoren dieser Spezies, der wegen adsorptionsbedingter Verluste während der Filtration wahrscheinlich noch höher liegt.

In weiteren Analysen des DOC-behandelten LPS wurde die Diffusionszeit der ersten Komponente auf 30 μs fixiert. Dieser Wert wurde für RITC unter gleichen Bedingungen erhalten. Diese Fixierung ermöglicht eine einfachere Anpassung des Fits an die gemessene Kurve und eine Berechnung der zweiten Diffusionszeit unter vergleichbaren Voraussetzungen. Die in Abschnitt 4.2.1 genannten Werte von $\tau_{D2} = 90 - 170 \mu\text{s}$ wurden mit diesen Vorgaben erhalten. Der Anteil der zweiten Komponente (LPS-Multimere) an der Teilchenanzahl N betrug zwischen 12 und 20 %. Die apparente Teilchenanzahl N lag bei den Messungen zwischen 0,6 und 1,0, was einer mittleren Anzahl von etwa 0,1 LPS-Multimeren im effektiven Volumen entspricht.

Das unter diesen Bedingungen durch den freien Farbstoff hervorgerufene Hintergrundsignal ist beträchtlich. Eine Untersuchung der Bindung eines monomeren Liganden an einen Rezeptor aufgrund der unterschiedlichen Diffusionszeit wäre unter diesen Bedingungen praktisch kaum realisierbar.

4.2.3 Reaktion mit dem Proteinextrakt aus *Medicago truncatula* (Mt-CD14)

Trotz der geschilderten Erschwernisse hinsichtlich einer quantitativen Analyse von Bindungsereignissen des untersuchten LPS ist aufgrund der durchgeführten Messungen eine Interaktion zwischen LPS und Bestandteilen des Proteinextraktes festzustellen. Die Zugabe des Proteinextraktes zu einer mit DOC behandelten LPS-Lösung führt zu deutlichen Veränderungen der Messergebnisse. Im Folgenden sind typische Resultate einer Messreihe dargestellt, deren Verlauf repräsentativ für über 10 Messreihen ist. Die absoluten Werte unterliegen jedoch Schwankungen, die durch die Heterogenität des untersuchten Materials bedingt sind. Es wurden jeweils 5 – 10 Messungen der mit Detergenz behandelten LPS-Lösung durchgeführt, bevor der Proteinextrakt zugesetzt wurde. Auf diese Weise ist eine Vergleichbarkeit der Eigenschaften der jeweiligen Probe vor und nach Zusatz des Mt-CD14 möglich.

Nach der Zugabe der Proteinlösung steigen die Fluoreszenzintensität sowie die Teilchenanzahl im Laserfokus stark an, nachdem sie durch die Verdünnung der Lösung direkt nach der Zugabe absinken (Abb. 4.7). Vor der Zugabe ist ein geringer linearer Anstieg beider Größen erkennbar, der wahrscheinlich auf eine Konzentrationszunahme durch Verdunstung des Lösungsmittels zurückgeht. Die deutliche Zunahme direkt nach Zusatz des Proteinextraktes deutet auf eine Interaktion mit LPS hin, durch die sich die Anzahl an gelösten LPS-Partikeln erhöht. Das kann durch eine Ablösung von an der Glasoberfläche adsorbierten LPS oder durch Extraktion von LPS aus dispergierten Aggregaten erfolgen. Der Kurvenverlauf weist auf einen sättigbaren Prozess hin, da beide Kurven 90 min nach der Zugabe abflachen.

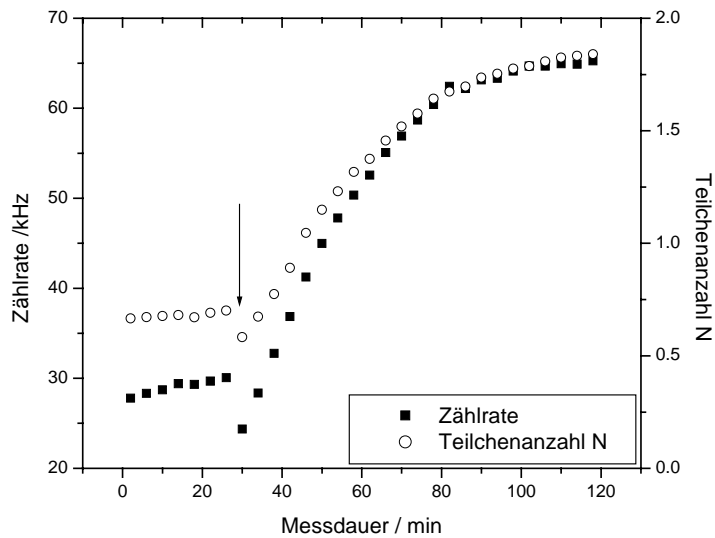


Abb. 4.7: Anstieg der Photonenzählrate und Teilchenanzahl nach Zugabe von Mt-CD14 zu einer LPS-Lösung (10 µl LPS + 0,03% w/v DOC, nach 30 min Zugabe von 2 µl Proteinextrakt, Zeitpunkt durch Pfeil gekennzeichnet).

Da ein solches Verhalten bei Vergleichsmessungen mit RITC unter den selben Bedingungen nicht auftrat, ist anzunehmen, dass LPS an diesem Prozess beteiligt ist.

Der Anstieg der Teilchenanzahl wird ebenfalls im Vergleich der Korrelationsfunktionen deutlich (Abb. 4.8 A). Nach Gl. 2.15 sinkt die Amplitude der ACF $G(\tau = 0)$ mit steigender Anzahl der Fluorophore im effektiven Volumen.

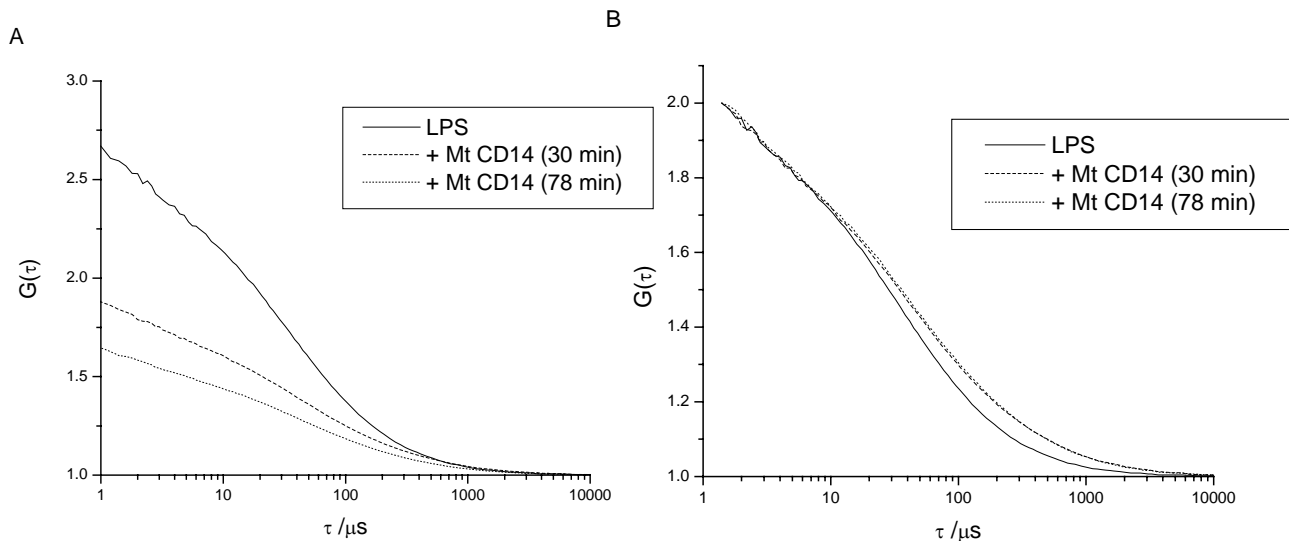


Abb. 4.9: Autokorrelationsfunktion von LPS-RITC zu verschiedenen Zeiten vor und nach Zugabe von Mt-CD14. A: Amplitude der ACF fällt mit zunehmender Teilchenanzahl, B: Normierung der Amplitude zum Vergleich der Korrelationszeit τ .

Um Aufschluss über die Diffusionszeit zu gewinnen, wurden die dargestellten Funktionen auf die selbe Amplitude zum Zeitpunkt $\tau = 0$ normiert ($G(0) = 2$, $G(\infty) = 1$). Es wird dadurch ersichtlich, dass nach Zugabe des Proteinextraktes die ACF zu größeren Korrelationszeiten verschoben sind (Abb. 4.9 B). Das bedeutet, dass die Diffusionszeit einer Komponente und oder deren Anteil an der Anzahl der Fluorophore erhöht ist.

Ein 2-Komponentenfit zeigt, dass sowohl die Diffusionszeit der langsamen Komponente steigt, als auch deren Anteil. Die Diffusionszeit der ersten Komponente bleibt etwa konstant, so dass sie auch in diesem Bereich auf 30 μs fixiert wird. Man erkennt einen steilen Anstieg der Diffusionszeit während 20 min nach Zugabe des Proteinextraktes von etwa 90 μs auf 250 – 300 μs . Darauf erfolgte ein langsamer linearer Abfall auf ca. 210 μs (Abb. 4.10). In anderen Messreihen wurde ebenfalls ein Wert der Diffusionszeit 2 von 200 – 250 μs gefunden.

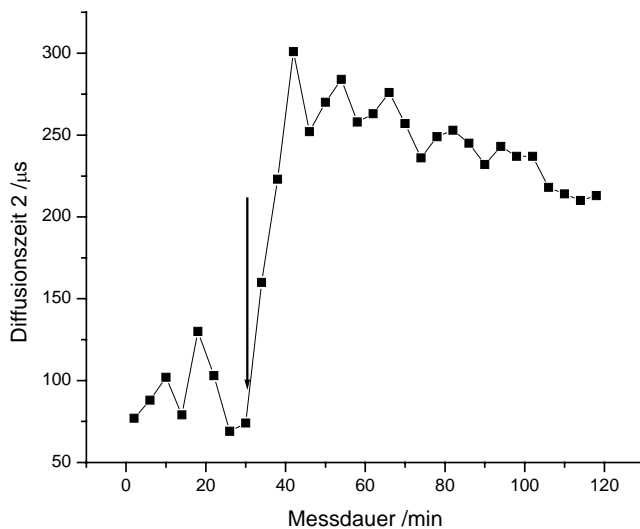


Abb. 4.10: Diffusionszeit der langsamen Komponente bei Fixierung der ersten Diffusionszeit $\tau_{D1} = 30 \mu\text{s}$. (10 μl LPS + 0,03% w/v DOC, nach 30 min Zugabe von 2 μl Proteinextrakt, Zeitpunkt durch Pfeil gekennzeichnet).

Nicht nur die Diffusionszeit, sondern auch der Anteil Y der zweiten Komponente nimmt nach Zugabe des Proteinextraktes zu. Nach einem steilen Anstieg von etwa 14 % wird nach ca. 40 min nach der Zugabe ein konstanter Wert von 25 – 26 % erreicht. Dieses gilt für einen 2-Komponentenfit mit variabler Diffusionszeit 2 (vergl. Abb. 4.10).

Eine Fixierung der Diffusionszeit 2 (hier 90 μs , Mittelwert der ersten 8 Messungen) reduziert die Schwankungen von Y in den ersten 8 Messungen deutlich und ergibt den genannten Wert von 14 %. Der glattere Kurvenverlauf in den folgenden Messungen verdeutlicht die in Abschnitt 2.1 gemachten Aussagen hinsichtlich der Detektionsgrenzen: Mit zunehmendem Unterschied der Diffusionszeiten und ausgeglichenerem Verhältnis der Komponenten steigt die Präzision der Analyse.

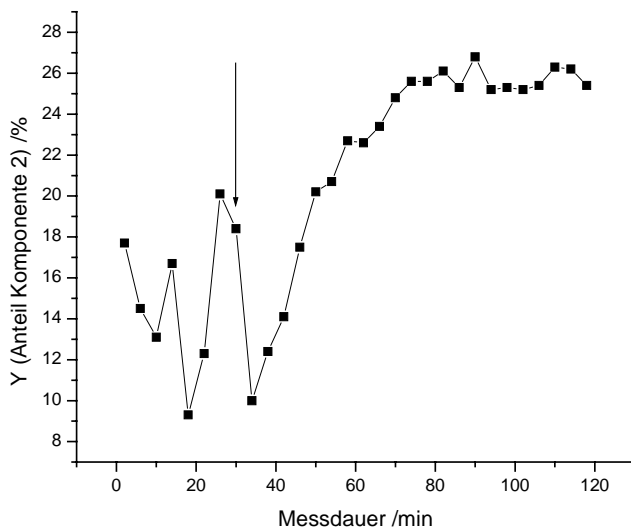


Abb. 4.11: Anteil der Komponente 2: Y steigt nach Zugabe des Proteinextraktes auf ca. 26% an (10 μ l LPS + 0,03% w/v DOC, nach 30 min Zugabe von 2 μ l Proteinextrakt, Zeitpunkt durch Pfeil gekennzeichnet).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutliche Veränderungen verschiedener Parameter der LPS-Lösung infolge einer Zugabe des Proteinextraktes aus *Medicago truncatula*. Der Anstieg der Teilchenanzahl N kann durch eine Solubilisierung adsorbierter Moleküle oder Aggregate von der Glasoberfläche erklärt werden. Damit einhergehend ist sowohl optisch durch Vergleich der ACF wie auch durch einen 2-Komponentenfit ein Anstieg der Diffusionszeit erkennbar. Dieser wird durch die langsamere Komponente bedingt, deren Anteil ebenfalls steigt. Der zeitliche Verlauf ähnelt der Bindungskinetik eines Liganden und seines Rezeptors. Nach Zugabe geringerer Mengen des Proteinextraktes ist ein qualitativ ähnlicher Verlauf der Parameter erkennbar, wogegen der Zusatz von reiner Pufferlösung (PBS) diese Effekte nicht hervorruft. Diese Beobachtungen legen eine Bindung von LPS an Bestandteile des Proteinextraktes nahe.

Die Abnahme der Diffusionszeit 2 nach Erreichen eines Maximums von ca. 250 μ s sowie Schwankungen dieses Wertes von etwa 50 μ s für unterschiedliche Messreihen geben Grund zu der Annahme, dass es sich bei dem zugrundeliegenden Partikel um ein dynamischen Komplex handelt. So ist denkbar, dass mehrere LPS-Moleküle an seinem Aufbau beteiligt sind und deren Anzahl gegebenenfalls durch Interaktion mit weiteren

freien Bindeproteinen abnimmt. Weiterhin ist eine Veränderung der Größe oder auch Gestalt durch Wechselwirkungen mit dem anwesenden Detergenz möglich. Angelagertes DOC würde den hydrodynamischen Radius vergrößern.

Unter diesen Bedingungen ist es kaum möglich, die Größe des zugrundeliegenden Komplexes oder gar des potentiellen Bindeproteines zu bestimmen. Als Richtwert kann für eine Diffusionszeit von 200 μ s ein hydrodynamischer Radius von 4,8 nm berechnet werden, was nach Gl. 2.21 einem sphärisch symmetrischen Molekül von 270 kDa entspricht. Bei einer Molekülmasse von ca. 50 kDa des Mt-CD14 ist die Differenz auch unter den gegebenen Bedingungen groß. Da kein gereinigtes Mt-CD14, sondern ein Proteinextrakt untersucht wurde, der eine unbekannte aber erhebliche Anzahl weiterer Proteine enthielt, besteht die Möglichkeit, dass eines oder mehrere dieser Proteine für die beschriebenen Reaktionen ursächlich sind. So wäre zum Beispiel eine Interaktion durch Lektine denkbar, welche eine Bindung der Kohlenhydratbestandteile des LPS eingehen könnten.

In Anbetracht des hohen Hintergrundsignals der Fluoreszenzintensität sind die hier genannten Werte allerdings mit erheblicher Unsicherheit behaftet. Die bisherigen Berechnungen der Fehler von FCS-Daten gehen von einem zu vernachlässigenden Hintergrundsignal aus und sind daher hier nicht anwendbar. Es ist daher wünschenswert, dieses Signal durch geeignete Reinigungsschritte des LPS zu reduzieren und die qualitativen Aussagen durch weitere Messungen zu präzisieren.

4.3 Bindung von GTP-Atto an G-Proteine

Die Bindung von GTP-Atto wurde an zwei Proteinen untersucht, welche zu der Gruppe der kleinen G-Proteine gehören. Die Messungen mit dem kommerziell erhältlichen Protein Rab 3A sollen die prinzipielle Anwendbarkeit der Methode belegen und einen Vergleich der gewonnenen Daten mit Literaturwerten ermöglichen. Dieses schafft die Basis für Untersuchungen des pflanzlichen Proteins Rac 1, dessen Charakterisierung die Motivation dieses Versuchsteiles darstellt.

4.3.1 Reaktion mit Rab 3A

Wie die Untersuchungen des LPS in Abschnitt 4.2 zeigen, wird eine Interpretation der Ergebnisse in einem sehr heterogenen System deutlich erschwert. Für die Charakterisierung der GTP-Bindung wurde daher in Vorversuchen mit dem kommerziell erhältlichen rekombinanten Protein Rab 3A gearbeitet, welches in aufgereinigter Form vorliegt. Es ermöglicht eine Beurteilung geeigneter Versuchsbedingungen anhand der gewonnenen Ergebnisse und erlaubt deren Einschätzung durch Vergleiche mit veröffentlichten Daten. So kann die Bewertung der für Rac 1 erhaltenen Resultate auf eine sicherere Basis gestellt werden.

Es wurden Messreihen einer Dauer von 70 – 190 Minuten aufgenommen, um den Anstieg des Bindungsgrades von GTP-Atto an das Protein Rab 3A zu verfolgen. Dabei repräsentiert ein Messpunkt den Mittelwert aus 10 Einzelmessungen einer Dauer von jeweils 20 Sekunden. Nach jeder Messung folgte eine Unterbrechung des Anregungsstrahls von 40 Sekunden, um der Probe eine Regeneration von eventuell durch die Laserstrahlung entstandenen Schädigungen zu erlauben.

Für die Analyse wurde ein 2-Komponentenfit eingesetzt, bei dem die Diffusionszeit des freien GTP-Atto auf 25 μs und die des Komplexes mit Rab 3A auf 130 μs fixiert wurden. Der Wert des freien GTP-Atto ist durch den Mittelwert aus 10 Messungen ohne Zusatz des Proteins gegeben. Die Diffusionszeit des Komplexes wurde durch ein 2-Komponentenfit unter Fixierung der ersten Diffusionszeit gewonnen. Dazu wurden zwei Messreihen mit der höchsten Proteinkonzentration und dem damit höchsten Bindungsgrad Y herangezogen und der Mittelwert der Diffusionszeiten der zweiten Komponente gebildet.

Für die Vorversuche mit Rab 3A stand nur eine begrenzte Menge an Protein zur Verfügung, so dass die Anzahl an Messungen limitiert war. Daher sind keine Mehrfachmessungen unter identischen Bedingungen durchgeführt worden, was für statistisch sichere Ergebnisse notwendig ist. Die Messungen unterscheiden sich hinsichtlich der Konzentrationen an GTP-Atto und Rab 3A, wobei die erzielten Ergebnisse konsistent hinsichtlich dieser Veränderungen sind.

4.3.1.1 Einfluss des Puffers: Magnesium / EDTA

Aufgrund der drei Phosphatgruppen des GTP weist es unter physiologischen Bedingungen eine hohe negative Ladung von -4 auf. Im Cytoplasma der Zelle gelöst kommt es daher komplexiert durch Magnesium vor. Bei der Bindung an Proteine ist ebenfalls eine Kompensation der Ladung notwendig, um repulsive Wechselwirkungen zu minimieren. Im Falle der kleinen G-Proteine wird dieses wiederum durch Magnesium vermittelt, welches auch für die GTPase Aktivität von Bedeutung ist.³⁵

Um die Auswirkungen von Magnesium im Reaktionspuffer zu untersuchen, wurden Messungen mit verschiedenen Konzentrationen an Magnesium durchgeführt. Der üblicherweise eingesetzte Puffer HBSMD⁹ enthält eine Konzentration von 5 mM MgCl_2 , während HBS-D kein zugesetztes Magnesium und HBS-D/EDTA anstelle des

Magnesiums 10 mM EDTA enthalten. Das GTP-Atto wurde in diesen Puffersystemen gelöst, Rab 3A wurde in HBSMD gelöst zugesetzt, da in den anderen Systeme bei längerer Lagerungszeit eine Destabilisierung des Proteins möglich ist. Damit ist in der mit HBS-D bezeichneten Probemischung eine geringe Magnesiumkonzentration (0,6 – 1,0 mM) enthalten, in HBS-D/EDTA wird dieses jedoch durch den Überschuss des Komplexbildners EDTA gebunden.

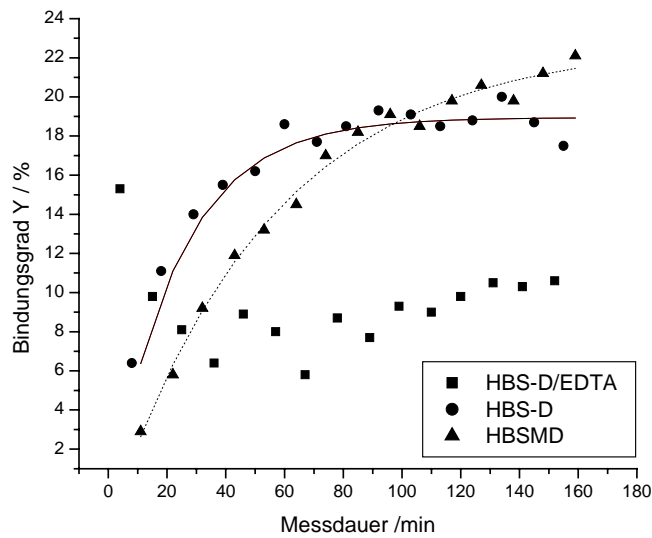


Abb. 4.12. Auswirkung des Puffers auf den Bindungsgrad von GTP-Atto an Rab 3A. In magnesiumhaltigen Puffern (HBS-D, HBSMD) steigt Y auf 18,9 bzw. 22,8 % an, im magnesiumfreien Puffer (HBS-D/EDTA) erreicht Y ca. 10%. Exponentieller Fit: durchgezogene Linie = HBS-D, unterbrochene Linie = HBSMD. (Messungen parallel auf Kulturplatte durchgeführt, GTP-Atto 9 nM, Rab 3A 12 nM).

Die Ergebnisse zeigen für magnesiumhaltige Puffer eine zeitabhängige Zunahme des Bindungsgrades, die durch eine Exponentialfunktion angenähert werden kann (Gl.4.2).

$$Y = 1 - \left(y_0 + A \cdot e^{-\frac{t}{\tau_{chem}}} \right) \quad [4.2]$$

Hier ist y_0 der Anteil an freiem GTP-Atto und A der Anteil angebindenem GTP-Atto im Gleichgewicht ($t = \infty$). Die Relaxationszeit τ_{chem} ist die charakteristische Zeit der Bindungsreaktion (4.3.1.2). Ein solcher Verlauf ist bei einer 1:1-Bindung zu erwarten.

Damit berechnet sich ein Maximum von $Y = 22,8 \%$ für HBSMD und $Y = 18,9 \%$ für HBS-D. Während der maximale Bindungsgrad zwischen einzelnen Messreihen schwankt, kann in allen vier durchgeführten Messreihen eine kürzere Relaxationszeit τ_{chem} (Gl. 4.4) bei Reaktionen in HBS-D verglichen mit HBSMD verzeichnet werden. Sie liegt für HBS-D im Bereich 18,4 – 30,1 min und für HBSMD zwischen 40,1 und 58,2 min.

In Pufferlösungen, in dem Magnesium durch EDTA komplexiert vorliegt (HBS-D/EDTA), tritt ein anderer Bindungsverlauf auf. Der Bindungsgrad weist nach der Proteinzugabe bereits vergleichsweise hohe Werte auf, die während der Messdauer von 160 Minuten geringfügig ansteigen. Die Werte parallel gemessener Reaktionen mit magnesiumhaltigem Puffer und gleicher Konzentration der Reaktionspartner werden in keinem Fall erreicht. Der für eine 1:1-Bindung erwartete Anstieg des Bindungsgrades Y ist in EDTA-haltigen Systemen nicht erkennbar.

Die Konzentration an Magnesium ist für die Bindungsgeschwindigkeit von großer Bedeutung. Bei einem niedrigen Magnesiumgehalt (HBS-D) findet die Bindung von GTP-Atto schneller statt, als in 5 mM (HBSMD), was durch die kürzeren Relaxationszeiten angezeigt wird. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Rab 3A wie auch andere kleine G-Proteine in nativem Zustand ein Guaninnukleotid (in der Regel GDP) gebunden haben. Da dieses die Stabilität der nativen Proteinkonformation erhöht, wird es während der Präparation zumeist nicht entfernt. Durch Magnesium wird wie erwähnt die Bindung sowohl von GTP wie auch von GDP an Rab 3A unterstützt. Eine Reduzierung der Magnesiumkonzentration erleichtert damit die Dissoziation des gebundenen GDP. Da dieser Reaktionsschritt vor der GTP-Bindung stattfindet, steigt die Konzentration an freiem Protein, das für die Bindung von GTP-Atto zur Verfügung steht. Es ist anzunehmen, dass die Affinität des GTP für Rab 3A bei niedriger Magnesiumkonzentration ebenfalls sinkt und die Bindung langsamer verläuft. Da dieses

nicht erkennbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die größere Konzentration an GDP-freiem Rab 3A bei niedriger Magnesiumkonzentration diesen Einfluss überwiegt.

Weiterhin sollte der Bindungsgrad von GTP-Atto im Gleichgewicht bei niedriger Magnesiumkonzentration sinken.³⁵ Dieses kann bei Vergleich der Ergebnisse mehrerer Messreihen für HBS-D und HBSMD nicht mit festgestellt werden, ist jedoch bei Zusatz von EDTA klar erkennbar.

Da die gemachten Aussagen auf einer relativ geringen Datenbasis beruhen, sind weitere Messungen notwendig, um den Einfluss des Reaktionspuffers genauer zu charakterisieren. Die im Folgenden dargestellten Messungen wurden, um reproduzierbare Bedingungen zu schaffen, in HBSMD-Puffer durchgeführt.

4.3.1.2 Bindungskinetik

Der zeitliche Verlauf des Bindungsgrades von GTP-Atto und Rab 3A wurde für verschiedene Konzentrationen beider Bindungspartner bestimmt. Zur Analyse wurde der für Relaxationsverfahren entwickelte Ansatz gewählt (Gl. 4.2). Bei dessen Herleitung geht man von einer Störung eines im Gleichgewicht befindlichen Systems durch äußere Einflüsse aus. Das System strebt daraufhin dem neuen Gleichgewichtszustand, der in diesem Fall durch einen anderen Bindungsgrad gekennzeichnet ist zu. Der zeitliche Verlauf der Konzentrationsveränderungen und demzufolge des Bindungsgrades Y folgt dabei einer Exponentialfunktion, die durch die Relaxationszeit τ_{chem} charakterisiert ist.

Für eine reversible Bindungsreaktion nach Gl. 4.3 (bimolekulare Hinreaktion, monomolekulare Rückreaktion) wird die Relaxationszeit τ_{chem} durch die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion k_{ass} multipliziert mit der Summe der Konzentrationen der freien Bindungspartner L (Ligand) und R (Rezeptor), sowie der Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion k_{diss} gegeben (Gl. 4.4).



$$\frac{1}{\tau_{chem}} = k_{ass} \cdot ([L] + [R]) + k_{diss} \quad [4.4]$$

Ist die Konzentration eines Partners (für FCS-Messungen die des unmarkierten Rezeptors) deutlich größer als die des anderen Partners (mehr als 10fach), sinkt sie während der Reaktion infolge der Bindung relativ wenig und kann daher als Konstante in die Geschwindigkeitskonstante k_{ass} einbezogen werden. Unter diesen Bedingungen wird die Reaktion als pseudo-erster Ordnung bezeichnet. Wegen der vereinfachten Datenanalyse werden in der Regel diese Bedingungen eingestellt. Für die hier durchgeführten Messungen wurde aufgrund der begrenzten verfügbaren Proteinmenge eine niedrigere Konzentration bezüglich des Rab 3A gewählt, so dass diese Näherung nur bedingt gültig ist.

Im Folgenden sind die Bindungskurven dreier Messreihen dargestellt. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Konzentrationen der Reaktanden und deren Verhältnis. Bei einer größeren Gesamtkonzentration von GTP-Atto und Rab 3A ist ein steilerer Anstieg des Bindungsgrades erkennbar, was nach Gl. 4.4 einer kürzeren Relaxationszeit entspricht (Tab. 4.1).

[GTP] / nM	[Rab3A] / nM	[GTP] + [Rab 3A] / nM	[Rab A] / [GTP]	Y_{max} / %	τ_{chem} / min
10	50	60	5,0	46,5 ± 1,2	30,1 ± 2,6
9	28	37	3,1	39,1 ± 1,1	46,9 ± 4,2
9	12	21	1,3	22,8 ± 0,6	54,6 ± 4,7

Tab. 4.1. Maximaler Bindungsgrad und Relaxationszeit für verschiedene Konzentrationen von Rab 3A und GTP-Atto.

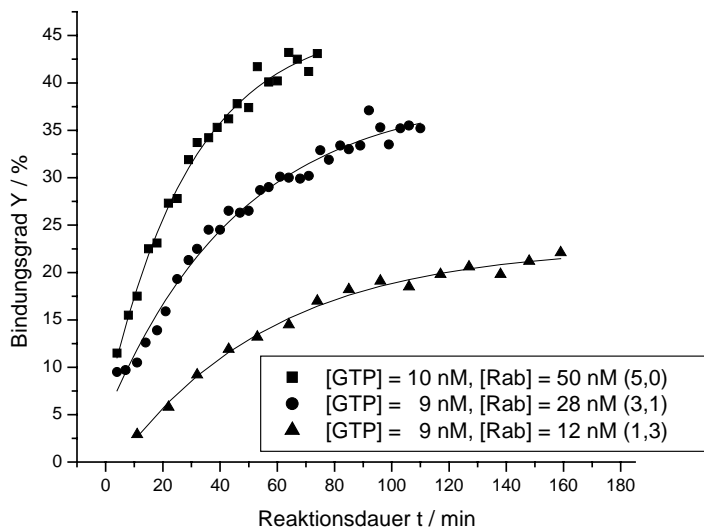


Abb. 4.13. Bindungskinetik von GTP-Atto und Rab 3A. Mit Anstieg der Gesamtkonzentration der Reaktionspartner nimmt die Geschwindigkeit der Reaktion zu. Für ein größeres Verhältnis der Konzentrationen [Rab 3A] / [GTP-Atto] (in Klammern angegeben) steigt der maximale Bindungsgrad.

Weiterhin steigt der maximale Bindungsgrad von GTP-Atto mit zunehmender Konzentration des Proteins Rab 3A. Die Differenzen der Konzentration an GTP-Atto sind vergleichsweise gering (9 bzw. 10 nM), während sich die Konzentrationen von Rab 3A um einen Faktor von 4,1 unterscheiden. Gemäß Gl. 4.5 ist der Bindungsgrad Y bei konstanter Konzentration des Liganden L (GTP-Atto) abhängig von der Konzentration des Rezeptors R (Rab 3A) und der Dissoziationskonstante K_D , die das Konzentrationsverhältnis der freien Bindungspartner L und R zu dem des Komplexes LR darstellt.

$$Y = \frac{[R]}{K_D + [R]} \quad [4.5]$$

Der Wert von K_D kann mittels eines Scatchard-Plots (Gl. 4.6) berechnet werden. Dieser besitzt gegenüber Gl. 4.5 den Vorteil, eine lineare Form aufzuweisen, was die Analyse erleichtert.

$$\frac{Y}{[R]} = \frac{1}{K_D}(1 - Y) \quad [4.6]$$

Eine Auftragung von $Y/[R]$ gegen Y ergibt damit eine Gerade mit der Steigung $-1/K_D$. In Anbetracht der geringen Anzahl an Messungen der gleichen oder ähnlichen Konzentration an GTP-Atto ist die Aussagekraft dieser Analyse sehr begrenzt. Zum einen sind drei Punkte kaum ausreichend, die Qualität der Regressionsgerade zu beurteilen. Weiterhin basieren sie auf einzelnen Messreihen, deren Ergebnisse nicht durch Wiederholungen bestätigt sind.

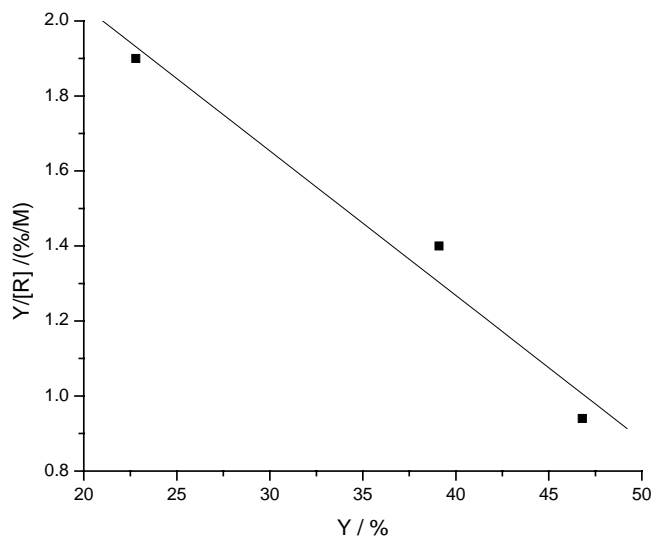


Abb. 4.14. Scatchard-Plot zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D . Daten aus Tab. 4.1.

Man erhält damit für K_D den Wert $(25,9 \pm 4,8)$ nM, was im Bereich der publizierten Werte von 46 nM^{35} und $(15 \pm 3) \text{ nM}^{36}$ liegt. Das deutet darauf hin, dass trotz der geringen Datenbasis die erreichten Resultate in Übereinstimmung mit zu erwartenden Ergebnissen liegen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass wahrscheinlich durch das zugesetzte Rab 3A eine nicht bekannte Menge an GDP in der Reaktionslösung anwesend ist, das als kompetitiver Inhibitor I der Bindungsreaktion von GTP-Atto fungiert. Die

Dissoziationskonstante für GDP ist mit $K_I = 63$ nM höher, jedoch im Bereich derjenigen des GTP,³⁵ so dass eine merkliche Bindung von GDP an Rab 3A erfolgen kann. Dieses würde zu einer Reduzierung der Konzentration an freiem Rab 3A führen, was sich sowohl in einer verlangsamten Bindungsgeschwindigkeit als auch in einem reduzierten Bindungsgrad äußern sollte. Unter der Annahme einer äquimolaren Ausgangskonzentration bezogen auf Rab 3A ($[I]_0 = [R]_0$) würde dieses nach Gl. 4.7 zu einer Abnahme der Konzentration an freiem Protein um etwa $X = 14$ % ($[Rab\ 3A] = 12$ nM) bis maximal $X = 34$ % ($[Rab\ 3A] = 50$ nM) führen.

$$X = \frac{K_I + [R]_0 + [I]_0 - \sqrt{(K_I + [R]_0 + [I]_0)^2 - 4[B]_0 \cdot [I]_0}}{2[I]_0} \quad [4.7]$$

Daraus folgt ein Anstieg der Dissoziationskonstante um 2,7 Punkte auf 28,6 nM, was höher ist, als ohne Inhibition berechnet. Dieses Ergebnis ist nicht zu erwarten, da ein gleicher gemessener Bindungsgrad bei geringerer effektiver Konzentration von Rab 3A für eine höhere Affinität und damit niedrigere Dissoziationskonstante sprechen sollte. Eine Erklärung ist daher in der geringen Anzahl an Messpunkten zu suchen, deren Analyse demnach nur einen Richtwert ergeben kann.

Weiterhin ist zu klären, ob durch den Fluoreszenzfarbstoff Atto die Bindungseigenschaften des GTP beeinflusst werden. So ist eine Verringerung der Affinität durch eine sterische Hinderung denkbar. Zudem ist eine unspezifische Bindung außerhalb der Bindetasche durch weitere Messungen auszuschließen. Beide Ziele sind durch Messungen in Gegenwart bekannter Konzentrationen an unmodifiziertem GTP als Kompetitor erreichbar. Diese Untersuchungen wurden wegen der geringen Menge an Rab 3A nicht durchgeführt. Aufgrund von Untersuchungen mit an der gleichen Position markierten GTP-Molekülen ist jedoch nicht von einer verringerten Affinität auszugehen.³⁷

Die molekulare Helligkeit des Farbstoffs Atto488 betrug zwischen 8 und 12 kHz bei 50% der maximalen Ausgangsleistung des Argonionenlasers. Dieser niedrige Wert ist durch eine unpräzise Einstellung einiger Spiegel des Lasermoduls zu erklären, aufgrund derer ein großer Anteil der emittierten Strahlung die Probe nicht erreichte. Nach einer Neueinstellung durch den Hersteller wurde eine molekulare Helligkeit von ca. 80 kHz bei 0,4 % der maximalen Ausgangsleistung erreicht. Die geschilderten Eigenschaften der Farbstoffe Rh6G und GTP-Atto wurden unter den korrigierten Bedingungen ermittelt. Da während der Bindungsmessungen die Strahlungsintensität in der Probe deutlich niedriger lag, ist eine Schädigung der Farbstoffe durch ein Ausbleichen weiter reduziert. Aufgrund der geringen verbleibenden Zeit für die Fertigstellung dieser Arbeit konnten jedoch keine Bindungsmessungen nach der Korrektur vorgenommen werden. Da das Signal-Rausch-Verhältnis von der molekularen Helligkeit anhängig ist, besteht damit ein deutliches Verbesserungspotential hinsichtlich der Qualität der erzielten Ergebnisse.

4.3.2 Reaktion mit Rac 1

Die Messungen der Bindung von GTP-Atto an Rac 1 wurden wie für Rab 3A beschrieben durchgeführt. Wegen der niedrigen molekularen Helligkeit des Farbstoffs unter den geschilderten Bedingungen wurde die Laserleistung von 50 % auf 80 % der maximalen Ausgangsleistung erhöht. Es wurde so eine molekulare Helligkeit von ca. 15 kHz erreicht. Dieses hat keine Veränderung der Diffusionszeit des freien GTP-Atto zur Folge, da die absoluten Änderungen der Strahlungsintensität niedrig sind. Der Wert der Diffusionszeit für GTP-Atto wurde daher bei 2-Komponentenfits wie für die Messungen mit Rab 3A auf 25 μ s fixiert.

Das rekombinant erzeugte Protein Rac 1 liegt fusioniert mit einem Flag-Tag® vor, welches gentechnisch angefügt wurde. Daher kann es affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Der Proteingehalt der so erhaltenen und ohne weitere Behandlung für diese Messungen eingesetzten Eluate E2 und E3 betrug 0,514 mg/ml bzw. 0,768

mg/ml, was bei einem Molekulargewicht von 22 kDa einer Konzentration von 22,4 bzw. 34,9 μM entspricht. Da für die Elution des Proteins von der Trennsäule ein Überschuss des Flag-Peptids eingesetzt wurde, und dieses die Bestimmung des Proteingehaltes mit erfasst wird, ist die Konzentration des Proteins Rac 1 deutlich geringer, als die genannten Werte. Im Folgenden werden Konzentrationsangaben dennoch auf diese Werte bezogen, um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Eine Auswertung hinsichtlich thermodynamischer Größen wie der Dissoziationskonstante K_D ist damit nicht möglich.

4.3.2.1 Diffusionszeit des GTP- Protein-Komplexes: Größe und Schwankungen

Die Analyse der Bindung von GTP-Atto und Rac 1 erfordert wie für Rab 3A einen 2-Komponentenfit unter Fixierung der Diffusionszeiten des freien und von Rac 1 gebundenen GTP-Atto. Die Diffusionszeit des Komplexes zeigt deutliche Schwankungen bei verschiedenen Messungen, wie auch Veränderungen innerhalb der Dauer einer Messreihe (Abb. 4.15). Die für verschiedene Messungen erhaltenen Werte liegen zwischen 130 und 400 μs . Innerhalb einer Messreihe sind die Diffusionszeiten entweder konstant (im Bereich von 150 μs) oder abnehmend, wobei ein annähernd linearer Abfall von bis zu 50 μs über eine Messdauer von ca. 80 Minuten zu verzeichnen ist. Wurde die Lösung des Rac 1 vor der Zugabe im Verhältnis 1: 10 in HBSMD verdünnt, betrug die Diffusionszeit 2 maximal 150 μs .

Das deutet darauf hin, dass das Protein Rac 1 Aggregate bilden kann, deren Größe in verdünnter Lösung abnimmt. Dieses kann auch das Absinken der Diffusionszeit nach Zugabe des Proteins in die Messlösung erklären, wodurch ebenfalls eine Verdünnung bewirkt wird. Da das Protein in der Zelle mit Membranen assoziiert vorliegen kann, ist eine Interaktion mit weiteren Rac 1-Molekülen über lipophile Bereiche denkbar. Da die molekulare Helligkeit der Fluorophore während der Zunahme des Bindungsgrades keinen Anstieg zeigt, ist davon auszugehen, dass pro Molekül des Komplexes nur ein Molekül GTP-Atto gebunden ist. Dieses ist bei der zu erwartenden hohen Anzahl an Proteinmolekülen in den Aggregaten relativ unwahrscheinlich. Es kann jedoch darauf

hindeuten, dass ein großer Anteil der in den Aggregaten vorhandenen Moleküle seine Fähigkeit zur GTP-Bindung verloren hat. Eine weitere mögliche Erklärung ist eine bestehende Bindung von GDP, das wie bereits für Rab 3A geschildert, durch die Aufreinigung nicht oder unvollständig dissoziiert ist. Zudem ist denkbar, dass eventuell vorhandene Verunreinigungen in der Lösung an die Proteine binden und deren Diffusionseigenschaften verändern.

Die zeitabhängige Zunahme des Bindungsgrades bis auf ein Plateau deutet auf eine Sättigung der GTP-Bindung hin und tritt unabhängig der Größe der Diffusionszeit 2 auf (Abb. 4.15). Eine Vergleichbarkeit der einzelnen Messreihen ist jedoch unter diesen Umständen kaum gegeben. Das schränkt die Anzahl der für eine Auswertung zur Verfügung stehenden Untersuchungen deutlich ein. Im Folgenden werden daher nur Messungen beschrieben, die eine Diffusionszeit des Komplexes im Bereich von 150 μs aufweisen, so dass für alle dieser Wert fixiert werden kann.

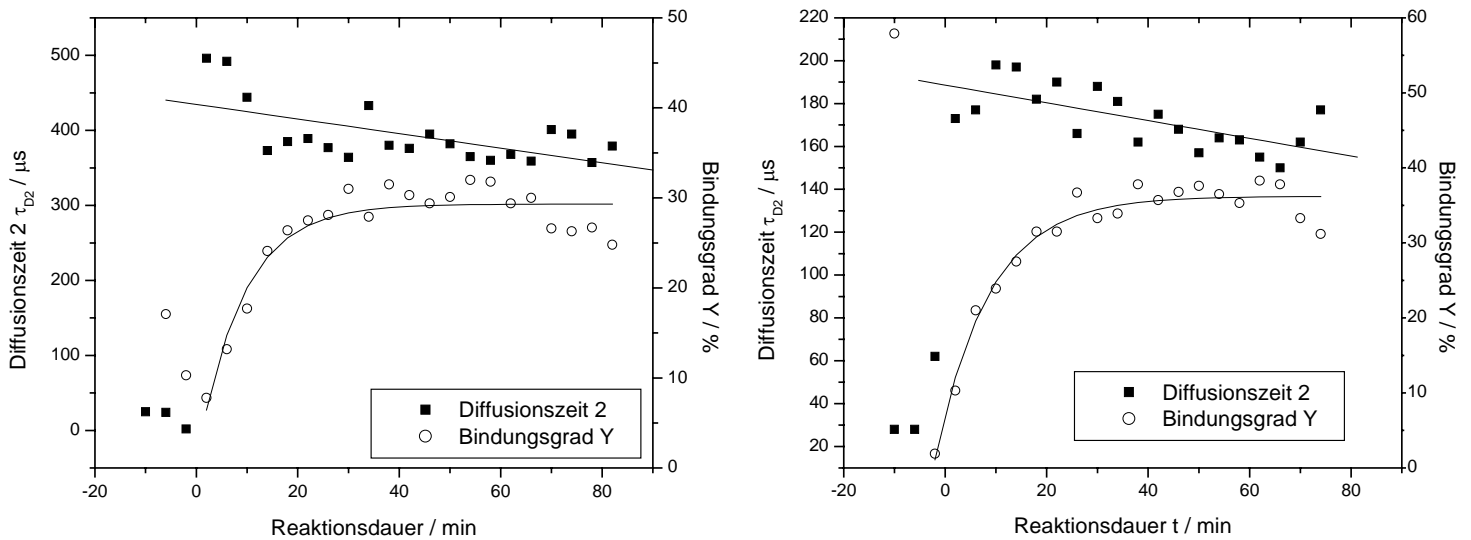


Abb. 4.15. Unterschiede der Diffusionszeit des Komplexes GTP-Atto + Rac 1 zwischen einzelnen Messreihen und innerhalb einer Messreihe. Die Diffusionszeit nimmt während einer Reaktionsdauer von 80 min etwa linear ab. Links [GTP] = 9,1 nM, [Rac 1] = 2,8 μM ; rechts [GTP] = 6,7 nM, [Rac 1] = 11,6 μM .

4.3.2.2 Bindungskinetik

Analog zum für Rab 3A beschriebenen Vorgehen wurden für Messreihen mit Rac 1 der erhaltene zeitliche Verlauf des Bindungsgrades durch eine Exponentialfunktion (Gl. 4.2) angepasst und die resultierenden Ergebnisse verglichen. Für drei exemplarische Messungen, die nach Zugabe von jeweils 5 μl einer in HBSMD verdünnten Lösung des Rac 1 zu 10 μl einer 10 nM Lösung von GTP-Atto erhalten wurden, sind die Ergebnisse eines 2-Komponentenfits ($\tau_{D1} = 25 \mu\text{s}$, $\tau_{D2} = 150 \mu\text{s}$) dargestellt (Tab. 4.2, Abb. 4.16).

[GTP] / nM	[Rac 1] / μM	[Rab A] / [GTP]	Y_{\max} / %	τ_{chem} / min
6,7	11,6	1731	$39,8 \pm 0,67$	$7,9 \pm 0,9$
6,7	9,3	1388	$31,2 \pm 0,84$	$12,6 \pm 1,4$
6,7	7,0	1045	$22,5 \pm 0,63$	$11,6 \pm 1,5$

Tab. 4.2. Maximaler Bindungsgrad Y_{\max} und Relaxationszeit τ_{chem} für verschiedene Konzentrationen von Rac 1 und GTP-Atto.

Es ist klar erkennbar, dass der maximale Bindungsgrad Y_{\max} mit steigender Konzentration an Rac 1 von 22,5 auf 39,8 % zunimmt. Die angegebenen Konzentrationen beruhen auf der Proteingehaltsbestimmung und sind aus den genannten Gründen wahrscheinlich zu hoch berechnet. Die Messergebnisse unterstützen diese Annahme, da gemäß Gl. 4.5 ein Bindungsgrad von 50 % bei einer Proteinkonzentration $[R]$ gleich der Dissoziationskonstante K_D auftreten sollte. Diese müsste demnach deutlich über der höchsten gemessenen Konzentration von 11,6 μM liegen. Für das humane Rac 1 wurde die Dissoziationskonstante des GTP mit 240 nM bestimmt,³⁸ was um einen Faktor von mindestens 10 unter dem für das pflanzliche Rac 1 anzunehmenden liegt. Unter Verwendung dieses Wertes berechnet sich ein maximaler Bindungsgrad von mindestens 90 % (Gl. 4.7) für alle gemessenen Konzentrationen an Rac 1, selbst unter der Annahme einer äquimolaren Konzentration an inhibierenden GDP ($K_D(\text{GDP}) = 620 \text{ nM}$).³⁸

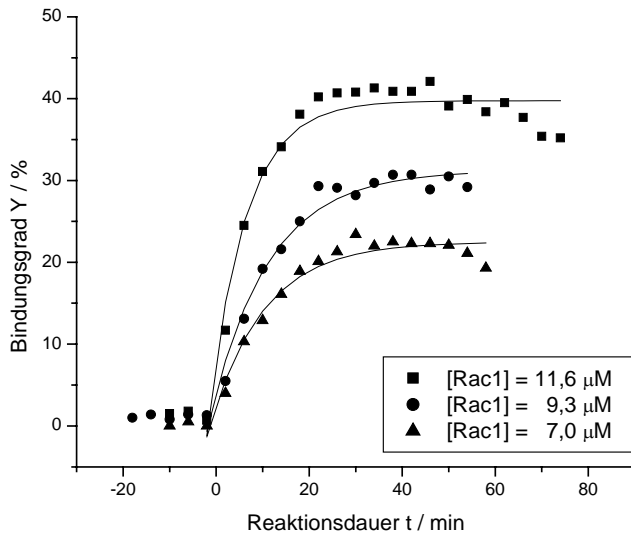


Abb. 4.16. Bindungsgrad Y als Funktion der Reaktionsdauer für verschiedene Konzentrationen an Rac 1. $[GTP\text{-}Atto] = 6,7 \text{ nM}$. Reaktionsmedium HBSMD. Zugabe des Proteins zum Zeitpunkt $t = 0$.

Nimmt man an, dass die Dissoziationskonstanten des humanen und pflanzlichen Rac 1 in einer vergleichbaren Größenordnung liegen, ist die Konzentration an aktivem Rac 1 um ca. 1 – 2 Zehnerpotenzen niedriger als angegeben. Es ist daher vorstellbar, dass die teilweise erhöhte Diffusionszeit des gebundenen GTP-Atto durch Anlagerung inaktiver Proteine hervorgerufen wird. Hier wird die generelle Problematik der FCS-Messungen deutlich, Bindungsaussagen hinsichtlich des markierten kleineren Liganden zu machen und kaum Hinweise auf die Aktivität des größeren Interaktionspartners zu geben. Dessen Konzentration in biologisch aktiver Form muss bekannt sein, um thermodynamische Größen aus den Messergebnissen zu berechnen.

Eine umgekehrte Herangehensweise wird beispielsweise in Filterbindungstest mit radioaktiv markierten Liganden genutzt. Ein Überschuss des kleineren Bindungspartners ermöglicht dort, die Konzentration des Rezeptors in aktiver Form bei einem Bindungsgrad von 100 % zu ermitteln. Für FCS-Messungen wäre denkbar, durch unterschiedliche Markierung beider Interaktionspartner und Kreuzkorrelationsanalyse diesen Nachteil zu kompensieren. Unter diesen Bedingungen könnte der kleinere Ligand (hier GTP-Atto) in höherer Konzentration eingesetzt werden, als der Bindungspartner

(hier Rac 1) und so gegebenenfalls eine vollständige Bindung bezogen auf den aktiven Anteil des größeren Partners ermöglichen. Dessen Konzentration kann durch die Kreuzkorrelationsanalyse ermittelt werden.

Die Relaxationszeiten der Bindung von Rac 1 (Tab. 4.2) liegen zwischen 7,9 und 12,6 min und damit um einen Faktor von 3 – 4 unter den für Rab 3A bestimmten Werten. Das kann nach Gl. 4.4 durch höhere Geschwindigkeitskonstanten und oder oder durch eine höhere Konzentration der Reaktionspartner erklärt werden. Ein Vergleich publizierter Daten von Rab 3A und des humanen Rac 1 ist in Tabelle 4.3 dargestellt.

	Rab 3A ³⁵	Rac 1 human ³⁸
K_D /nM	46	240
k_{diss} / min ⁻¹	0,024	0,031
k_{ass} / (μM*min) ⁻¹	0,52	0,129

Tab. 4.3. Publierte thermodynamische und kinetische Daten von Rab 3A und humanem Rac 1.

Unter Verwendung dieser Daten ist nach Gl. 4.5 anzunehmen, dass die Konzentration an Rac 1 größer als die des Rab 3A sein muss, um die kürzeren Relaxationszeiten zu erreichen. Damit kann eine untere Grenze der Konzentration an aktivem Rac 1 von 50 nM (maximale Konzentration an Rab 3A) genannt werden, wahrscheinlicher ist ein Wert im Bereich von 10^{-7} M in der Messlösung, was in Übereinstimmung mit dem gemessenen maximalen Bindungsgrad unter der Berücksichtigung der Dissoziationskonstante des humanen Rac 1 ist.

4.3.2.3 Konkurrenz und Verdrängung

Um die Spezifität der Bindung von GTP-Atto und Rac 1 zu untersuchen, wurden Konkurrenzstudien mit unmarkiertem GTP durchgeführt. Dieses sollte in einem Überschuss eingesetzt ein spezifisch gebundenes GTP-Atto verdrängen beziehungsweise dessen Bindung verhindern.

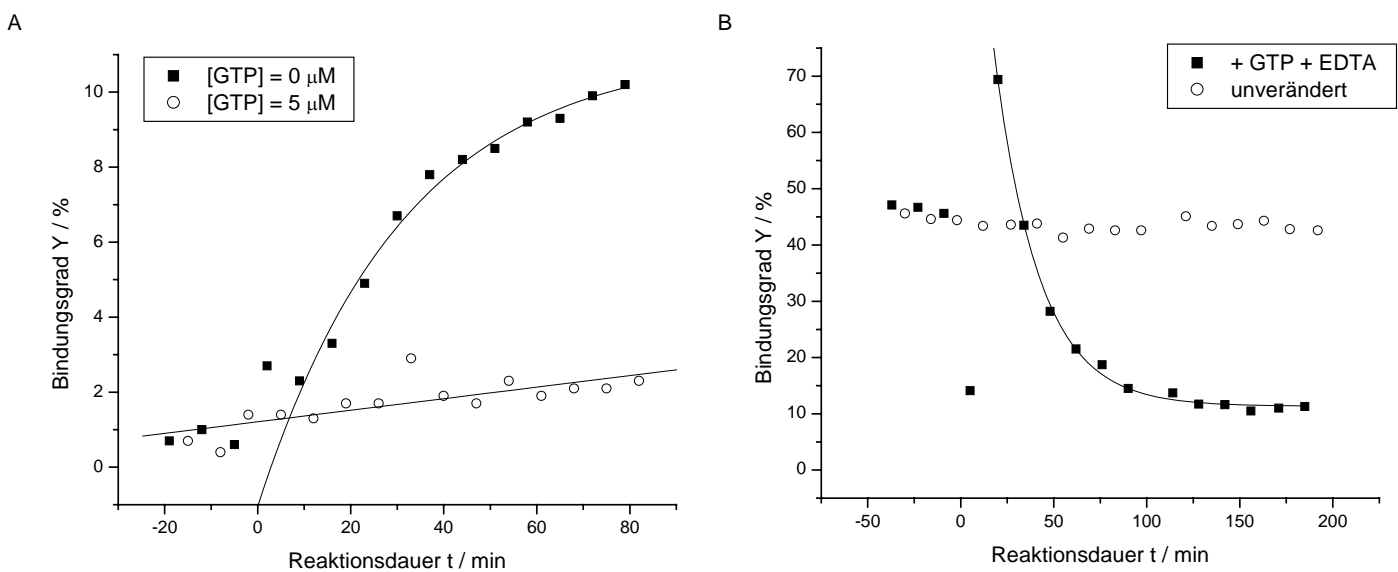


Abb. 4.17. Konkurrenz durch unmarkiertes GTP. A: [GTP-Atto] = 5 nM, [Rac 1] = 1,7 μM, zusätzlich in Messreihe o [GTP] = 5 μM. B: [GTP-Atto] = 10 nM, [Rac 1] = 34 μM, Messvolumen 10 μl, bei t = 0 in Messreihe ■ dazugegeben: 1 μl (Mischung [GTP] = 450 μM + [EDTA] = 45 mM).

In Gegenwart eines 1000fachen Überschusses unmarkierten GTPs bezogen auf GTP-Atto ist ein deutlich geringerer Anstieg des Bindungsgrades Y zu verzeichnen, als ohne Zugabe dieses Kompetitors (Abb. 4.17 A). Der zeitabhängige Verlauf ist in diesem Fall linear, was darauf schließen lässt, dass der Vorgang nicht zu einer Sättigung führt. Das deutet darauf hin, dass es sich um eine unspezifische Bindung von GTP-Atto handelt. Für eine Auswertung der Messungen ist der auf eine unspezifische Bindung zurückgehende Anteil des Bindungsgrades unter den jeweiligen Bedingungen zu bestimmen und von

dem Gesamtbindungsgrad abzuziehen. Das wurde bei dieser Auswertung nicht getan, da die geringe Anzahl an Messungen keine präzise Angabe des entsprechenden Wertes erlaubte. Qualitativ ist davon auszugehen, dass ein reduzierter Bindungsgrad zu einer größeren Dissoziationskonstante führt.

Weiterhin wurde der Einfluss von unmarkiertem GTP in Kombination mit EDTA auf die Bindung von GTP-Atto untersucht. Dazu wurde beide Stoffe einer bei Raumtemperatur 90 min vorinkubierten Mischung von GTP-Atto und Rac 1 zugesetzt und der Verlauf des Bindungsgrades verfolgt (Abb. 4.17 B). Man erkennt, dass vor Zugabe von GTP und EDTA ein Bindungsgrad von ca. 45 % vorlag, der in der parallel durchgeführten Vergleichsmessung ohne Zugabe von GTP und EDTA konstant bleibt. Direkt nach der Zugabe von GTP und EDTA ist ein starkes Absinken und darauf ein Anstieg des Bindungsgrades auf über 65 % zu verzeichnen. Dieses tritt in einer weiteren Messung ebenfalls auf, wobei der genaue Verlauf nur schlecht zu beschreiben ist, da durch die parallele Durchführung mehrerer Messreihen der zeitliche Abstand der einzelnen Messpunkte ansteigt. Von dem ca. 20 Minuten nach der Zugabe erreichten Maximum des Bindungsgrades erfolgt eine Abnahme bis auf 11 %, welche durch die Exponentialfunktion erster Ordnung beschrieben werden kann. Ein solcher Verlauf ist für einer Dissoziationsreaktion erster Ordnung zu erwarten, jedoch ist der Beginn mit 20 Minuten nach Zugabe von GTP und EDTA sehr spät. Es ist daher denkbar, dass der schnelle Abfall des Bindungsgrades direkt nach der Zugabe auf eine Verdrängung des gebundenen GTP-Atto durch unmarkiertes GTP zurückgeht. Durch das anwesende EDTA sollte eine rasche Entfernung des Magnesiums aus Komplexen von Rac 1 und GTP-Atto möglich sein und die Dissoziation damit schneller ablaufen. Weitere Messungen in kürzeren Zeitintervallen sollten den zweifachen Abfall des Bindungsgrades genauer beschreiben und damit eine bessere Grundlage einer Analyse liefern.

In beiden Fällen tritt jedoch ein minimaler Bindungsgrad von etwa 11 % auf, der bei längerer Reaktionsdauer konstant bleibt. Das spricht wiederum für eine unspezifische Bindung, da unter diesen Bedingungen ein mehr als 1000facher Überschuss an unmarkiertem GTP vorliegt. Der verbleibende Bindungsgrad beträgt 23 % des

Ausgangswertes und ist damit relativ hoch. Da unter den Versuchsbedingungen die Diffusionszeit des Komplexes bei 180 – 200 μ s lag, ist es möglich, dass die unspezifische Bindung von GTP-Atto aufgrund einer Interaktion mit Aggregaten stattfand und bei nativem Rac 1 nicht oder in verminderter Weise auftritt.

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen, dass GTP-Atto spezifisch an Rac 1 bindet, da es durch unmarkiertes GTP kompetitiv zu verdrängen ist. Eine gleichzeitig auftretende unspezifische Bindung ist wahrscheinlich. Aufgrund der teilweise auftretenden Aggregation des Bindeproteins bleibt offen, ob diese unspezifische Interaktion mit dem nativen Protein ebenfalls auftritt, oder durch gegebenenfalls angelagerte Bestandteile der Lösung hervorgerufen wird. Dieses zu klären und gegebenenfalls das Ausmaß der Interaktion zu ermitteln, erfordert weitere Untersuchungen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen die Anwendbarkeit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zur Untersuchung verschiedener physikalisch-chemischer sowie biologischer Fragestellungen. Beginnend mit der Charakterisierung photophysikalischer Merkmale von Fluoreszenzfarbstoffen werden deren Photostabilität und Tripleteigenschaften sowohl in Abhängigkeit der Intensität der Anregungsstrahlung beschrieben, als auch Reaktionen auf Veränderungen der chemischen Umgebung aufgezeigt. Damit erschließt sich eine weitere Informationsquelle neben der durch FCS-Messungen erhältlichen Diffusionszeit des Fluorophors. So konnte die Interaktion lipophiler Fluorophore mit Detergenzmicellen und Lipidvesikeln anhand eines Anstiegs der Diffusionszeit sowie des Tripletanteils gezeigt und die Größe der Partikel durch den hydrodynamischen Radius dieser Komplexe bestimmt werden. Es sollte daher möglich sein, eine Veränderung der Größe von Lipidaggregaten infolge einer unterschiedlichen Zusammensetzung auf Einzelmolekülebene zu beschreiben. Bei geeigneter Markierung der Bestandteile könnte eine Kreuzkorrelationsanalyse deren Anteile in einem solchen Aggregat bestimmen. Dieses kann in Hinblick auf die Anwendung von Lipidvesikeln als Shuttle von pharmazeutischen Wirkstoffen von Bedeutung sein.

Nach einer Charakterisierung der Fluorophore als Voraussetzung für deren Einsatz in weiteren Messungen wurden drei biologische Systeme untersucht. Die analysierten Bindungsreaktionen sind in der zellulären Signaltransduktion von Bedeutung, wobei die Interaktionen von LPS und Mt-CD14 sowie GTP und Rac 1 zeitlich gestaffelt im Zusammenhang der Immunabwehr auftreten.

Das in wässriger Lösung hochmolekulare Aggregate bildende LPS wurde durch das Detergenz Natriumdeoxycholat zu einer weitgehenden Reduktion deren Größe gebracht, was durch das Fluoreszenzsignal der markierten LPS-Moleküle erkennbar war. Unter diesen Bedingungen konnte anhand der Veränderung verschiedener Parameter wie der

Diffusionszeit, des Bindungsgrades und der Gesamtteilchenanzahl der Fluorophore eine Interaktion mit dem Mt-CD14 enthaltenden Proteinextrakt gezeigt werden. Da dieses Extrakt neben Mt-CD14 weitere Proteine beinhaltet, kann die Bindung von LPS an Mt-CD14 als alleinige Ursache nicht mit Sicherheit genannt werden.

Aus dem Grund sind weitere Messungen mit dem aufgereinigten Protein sinnvoll. In diesem Zusammenhang ist es angeraten, die Fluoreszenzmarkierung des LPS mit einem anderen Farbstoff durchzuführen, da der ungebundene Anteil des hier verwandten Farbstoffs RITC wahrscheinlich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften nicht vollständig entfernt werden konnte. Ebenfalls ist es sinnvoll, die Dispersion der LPS-Aggregate zu verbessern, um die Bindung von LPS-Monomeren an Mt-CD14 zu verfolgen. Messungen zeigen, dass dieses durch eine gesteigerte Konzentration des Detergenz möglich sein sollte, wobei gleichzeitig eine Solubilisierung von an Oberflächen adsorbierter LPS-Moleküle erfolgt. Die Reaktionsbedingungen haben jedoch auch der Stabilität des Proteins Rechnung zutragen, so dass eine Optimierung hinsichtlich verschiedener Parameter erfolgen muss. Eine Alternative stellt auch hier die Kreuzkorrelationsanalyse dar, durch die bei gleichzeitiger Markierung von LPS und Mt-CD14 auch eine Bindung von Mt-CD14 an LPS-Aggregate zu detektieren wäre.

Die Bindung von GTP-Atto an Enzyme aus der Gruppe der kleinen G-Proteine wurde an zwei Proteinen untersucht. Messungen mit dem in reiner Form vorliegenden Rab 3A zeigen einen konzentrationsabhängigen Anstieg des maximalen Bindungsgrades, dem zufolge eine Dissoziationskonstante von $(25,9 \pm 4,8)$ nM berechnet werden kann. Diese ist in guter Übereinstimmung mit publizierten Werten, die bei (15 ± 3) nM beziehungsweise 46 nM liegen. Ein möglicherweise von Rab 3A gebundenes GDP-Molekül wurde hier nicht berücksichtigt, würde jedoch einen geringeren Wert der Dissoziationskonstante bewirken. Für eine Anwesenheit von GDP spricht der schnellere Reaktionsverlauf bei reduzierter Magnesiumkonzentration. Diese sollte eine Dissoziation des GDP erleichtern und damit den Anteil an freiem Rab 3A erhöhen. In Gegenwart eines Überschusses EDTA wird ein geringerer maximaler Bindungsgrad erreicht, was mit der höheren Dissoziationskonstante unter diesen Bedingungen erklärt werden kann. Die

Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Erwartungen aufgrund von Publikationen betreffend des untersuchten Proteins Rab 3A und zeigen damit die Anwendbarkeit des Verfahrens auf die Bindung von GTP an G-Proteine. Darauf aufbauend wurde das pflanzliche Protein Rac 1 in gleicher Weise untersucht.

Die Untersuchung der GTP-Bindung bei Rac 1 ergab wie bei Rab 3A einen Anstieg des maximalen Bindungsgrades mit steigender Konzentration des Proteins. Aufgrund des vergleichsweise niedrigen Bindungsgrades und der teilweise hohen Diffusionszeiten der Komplexe ist anzunehmen, dass ein großer Anteil des Proteins in inaktiver Form und wahrscheinlich mit GTP-bindenden Rac 1 aggregiert vorliegt. Die Größe dieser Aggregate ist schwankend, nach einer Verdünnung der Proteinlösung liegt die Diffusionszeit jedoch in einem für monomeres Rac 1 zu erwartenden Bereich. Thermodynamische Größen waren unter diesen Bedingungen nicht zu erhalten. Untersuchungen durch Konkurrenz mit einem unmarkierten GTP zeigten eindeutig eine Spezifität der Bindung zwischen GTP-Atto und Rac 1, es ist jedoch von einer Kombination aus spezifischer und unspezifischer Bindung auszugehen. Inwieweit die unspezifische Bindung auf eine Interaktion mit den Proteinaggregaten zurückgeht, bleibt zu klären.

Die Untersuchungen von Rab 3A und Rac 1 zeigen, dass die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie geeignet ist, die Bindung von GTP an Proteine dieser Klasse zu beschreiben. Nach einer weitergehenden Analyse der Bindungsspezifität und gegebenenfalls einer rechnerischen Kompensation sollten präzisere Daten hinsichtlich kinetischer und thermodynamischer Größen zu erhalten sein. Dafür ist entscheidend, das Protein in der apo-Form (ohne gebundenes GDP) zu untersuchen. Von Interesse ist weiterhin die Interaktion von Rac 1 mit GDIs. Diese verhindert die Dissoziation eines gebundenen GDP, wodurch die Bindung von GTP-Atto unterbleibt oder einen niedrigeren Bindungsgrad erreicht. Gegenüber anderen Messmethoden ist der für FCS-Messungen geringe Bedarf an Untersuchungsmaterial sicherlich von Vorteil.

Wurde ein System *in vitro* hinreichend charakterisiert, ist eine Messung *in vivo* denkbar. Die Anwendung der Fluoreszenzkorrelationspektroskopie auf dieses Gebiet ist nach einer Anpassung des mathematischen Modells der Diffusion möglich. Hier spielen neben chemisch synthetisierten Fluorophoren Farbstoffe biologischen Ursprungs wie GFP und seine modifizierten Varianten eine Rolle.

Weitere und komplementäre Informationen sind durch die Analyse des Fluoreszenzsignals mittels der PCH-Technik zu erhalten. Da die entsprechenden Rohdaten durch das ConfoCor 2 zur Verfügung gestellt werden, ist hierzu lediglich eine Analysesoftware erforderlich. In einer Kombination mit Laser-Scanning Techniken ist eine bildliche Darstellung sowie physikalische Interpretation dynamischer Prozesse innerhalb lebender Zellen möglich. Eine interdisziplinäre Vorgehensweise wie in dieser Form sollte das Verständnis biologischer Vorgänge in Zukunft deutlich voranbringen.

Literaturverzeichnis

1. Voet,D. & Voet,J.G. Biochemistry. John Wiley & Sons, (1995).
2. Puehler,A. & Niehaus,K. Zukunftswissenschaft Genomforschung. *Forschung an der Universitaet Bielefeld* **26**, (2003).
3. Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M. & Shomchik,M.J. Immunobiology. Garland Publishing, New York (2001).
4. Lottspeich,F. & Zorbas,H. Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin (1998).
5. Rehm,H. Proteinbiochemie / Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag, (2002).
6. Brockhinke,A., Plessow,R., Dittrich,P. & Kohse-Höinghaus,K. Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques. *Appl. Phys. B* **71**, 755-763 (2000).
7. Fluorescence Correlation Spectroscopy - Theory and Applications. Springer-Verlag, (2001).
8. Schwille,P., Haupts,U., Maiti,S. & Webb,W.W. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.* **77**, 2251-2265 (1999).
9. Brecht,M. *et al.* The use of surface plasmon resonance (SPR) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) to monitor the interaction of the plant G-proteins Ms-Rac1 and Ms-Rac4 with GTP. *J. Biotechnol.* **112**, 151-164 (2004).
10. Magde,D., Elson,E.L. & Webb,W.W. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System - Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.* **29**, 705-708 (1972).
11. Application Manual: LSM 510 ConfoCor 2. Carl Zeiss, Advanced Imaging Microscopy, Jena (2001).
12. Single Molecule Spectroscopy - Nobel Conference Lectures. Springer-Verlag, (2001).
13. Meseth,U., Wohland,T., Rigler,R. & Vogel,H. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys. J.* **76**, 1619-1631 (1999).
14. Boehmer,M. & Enderlein,J. Fluorescence Spectroscopy of Single Molecules under Ambient Conditions: Methodology and Technology. *ChemPhysChem* **4**, 792-808 (2003).

15. Chen, Y., Muller, J.D., Berland, K.M. & Gratton, E. Fluorescence fluctuation spectroscopy. *Methods* **19**, 234-252 (1999).
16. Palo, K. *et al.* Fluorescence intensity and lifetime distribution analysis: toward higher accuracy in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys. J.* **83**, 605-618 (2002).
17. Dittrich, P. & Schwille, P. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Appl. Phys. B* **73**, 829-837 (2001).
18. Marme, N., Knemeyer, J.P., Sauer, M. & Wolfrum, J. Inter- and intramolecular fluorescence quenching of organic dyes by tryptophan. *Bioconjug. Chem.* **14**, 1133-1139 (2003).
19. Dietrich, A., Buschmann, V., Muller, C. & Sauer, M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor-acceptor substituted DNA strands: a comparative study of ensemble and single-molecule data. *J. Biotechnol.* **82**, 211-231 (2002).
20. Haustein, E. & Schwille, P. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 153-166 (2003).
21. Schwille, P. & Haustein, E. Biophysics Textbook Online (BTOL). 2000).
22. Koppel, D.E. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A* **10**, 1938-1945 (1974).
23. Zeiss. Application Manual: LSM 510 ConfoCor 2. Carl Zeiss, Advanced Imaging Microscopy, Jena (2001).
24. Fraysse, N., Couderc, F. & Poinso, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1365-1380 (2003).
25. Albus, U., Baier, R., Holst, O., Puehler, A. & Niehaus, K. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytologist* **151**, 597-606 (2001).
26. Shands, J.W., Jr. & Chun, P.W. The dispersion of gram-negative lipopolysaccharide by deoxycholate. Subunit molecular weight. *J. Biol. Chem.* **255**, 1221-1226 (1980).
27. Paduch, M., Jelen, F. & Otlewski, J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 829-850 (2001).
28. Eggeling, C., Widengren, J., Rigler, R. & Seidel, C.A.M. Photobleaching of Fluorescent Dyes under Conditions Used for Single-Molecule Detection: Evidence of Two-Step Photolysis. *Anal. Chem.* **70**, 2651-2659 (1998).

29. Widengren,J., Mets,U. & Rigler,R. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study. *J. Phys. Chem.* **99**, 13368-13379 (1995).
30. Application Manual: LSM 510 ConfoCor 2. Carl Zeiss, Advanced Imaging Microscopy, Jena (2001).
31. Sigma-Aldrich. Detergents Properties and Applications. (2004).
32. Santos,N.C., Silva,A.C., Castanho,M.A., Martins-Silva,J. & Saldanha,C. Evaluation of lipopolysaccharide aggregation by light scattering spectroscopy. *Chembiochem.* **4**, 96-100 (2003).
33. Sigma-Aldrich. Product Information Lipopolysaccharide FITC from *Escherichia coli* 055:B5; Product Number **F 8666**. (2003).
34. Sigma-Aldrich. Product Information Sodiumdeoxycholate. (2002).
35. Burstein,E.S. & Macara,I.G. Interactions of the ras-like protein p25rab3A with Mg²⁺ and guanine nucleotides. *Biochem. J.* **282** (Pt 2), 387-392 (1992).
36. Lin,C.G., Lin,Y.C., Liu,H.W. & Kao,L.S. Characterization of Rab3A, Rab3B and Rab3C: different biochemical properties and intracellular localization in bovine chromaffin cells. *Biochem. J.* **324** (Pt 1), 85-90 (1997).
37. Simon,I., Zerial,M. & Goody,R.S. Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J. Biol. Chem.* **271**, 20470-20478 (1996).
38. Zhang,B., Zhang,Y., Wang,Z. & Zheng,Y. The role of Mg²⁺ cofactor in the guanine nucleotide exchange and GTP hydrolysis reactions of Rho family GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **275**, 25299-25307 (2000).

Danksagungen

An diese Stelle möchte ich den Personen Dank aussprechen, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit in besonderer Weise unterstützt haben.

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können.

In besonderer Weise möchte ich Dr. Robert Ros für die Betreuung dieser Arbeit danken. Aufgrund seiner Unterstützung konnte ich mich schnell in die für einen Biochemiker ungewohnte Materie einarbeiten. Seine optimistische Einstellung war mir mehrfach eine gute Motivation.

Weiterhin danke ich den übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Den beteiligten Personen vom Lehrstuhl für Genetik, Andrea Groß und Martina Brecht sowie Herrn Dr. Karsten Niehaus möchte ich für die freundliche Zurverfügungstellung der untersuchten Proteine und die hilfreichen Diskussionen der Ergebnisse danken.

Bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die durch ihre Unterstützung dieses Studium ermöglicht haben, bedanke ich mich.

Weiterhin möchte ich meine Freunde und Kommilitonen nennen, denen ich eine angenehme Studienzeit verdanke.

Insbesondere gebührt mein Dank meinem Schöpfer für die Ausstattung mit einer hinreichenden Portion an Ausdauer und Frustrationstoleranz, durch die ich das Studium bis zu diesem Punkt habe bringen können.