

# Charakterisierung der Diffusion und der Reaktionskinetik von peripheren Membranproteinen in lebenden Zellen

## Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Graduiertenschule für Mathematik und  
Naturwissenschaften (BayNAT) der Universität Bayreuth

vorgelegt von

**Julia Hoffmann**

aus Mytischy (Russland)

**Bayreuth, 2015**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2011 bis Dezember 2015 am Lehrstuhl Experimentalphysik I (EPI) der Universität Bayreuth unter der Betreuung von Prof. Dr. Matthias Weiss angefertigt.

Amtierender Direktor der  
Graduiertenschule BayNAT: Prof. Dr. Stephan Kümmel

Einreichung der Dissertation: 16. Dezember 2015  
Wissenschaftliches Kolloquium: 18. April 2016

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Matthias Weiss (Erstgutachter)  
Prof. Dr. Benedikt Westermann (Zweitgutachter)  
Prof. Dr. Andreas Möglich (Vorsitz)  
Prof. Dr. Georg Papastavrou

## Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bestimmung der Bindungskinetik von peripheren Membranproteinen auf ihren Targetmembranen *in vivo* mit der Methode *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) untersucht. Assoziations-Dissoziations-Prozesse von Proteinen mit Membranen werden häufig anhand der charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  quantifiziert. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die charakteristische Zeit  $\tau$  nicht nur von der Bindungskinetik der Proteine abhängt, sondern auch durch die Größe und die Anzahl der Targetmembranen im System bestimmt wird. Diese zusätzlichen Parameter müssen deswegen bei Untersuchungen der Bindungskinetik von Proteinen auf Membranen mit FRAP berücksichtigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Regulation und die Organisation von *ER exit sites* (ERES), auf den Proteinexport spezialisierten Domänen der ER-Membran, untersucht. Hierzu wurde mit den Methoden Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und FRAP die Diffusion des Regulatorproteins Sec16 im Zytoplasma sowie seine Assoziation und Dissoziation mit den ERES vermessen. Es zeigte sich, dass eine Anbindung von Sec16 an ERES nur in Wechselwirkung mit dem COPII-Proteinkomplex möglich ist, welcher die Produktion von Transportvesikeln an den ERES reguliert. Folglich kann Sec16 an den ERES keine organisierende Rolle für die COPII-Proteine im Sinne eines *Scaffold*-Proteins übernehmen. Weiterhin wurde festgestellt, dass eine Phosphorylierung die Oligomerisierung von Sec16 auf der ER-Membran beeinflusst: während das Protein im phosphorylierten Zustand als Monomer oder in kleinen Komplexen auf der ER-Membran diffundiert, findet im unphosphorylierten Zustand Oligomerisierung zu größeren Komplexen statt. Die Oligomerisierung und die Bildung von COPII-Sec16-Komplexen sind dabei zwei konkurrierende Reaktionen auf der ER-Membran. Die Ergebnisse gingen in die Entwicklung eines Modells der Entstehung von ERES in lebenden Zellen ein, das auf der Selbstorganisation der Proteine Sec16 und des COPII-Komplexes basiert.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der löslichen Proteindomäne und des Aktivitätszustandes einer biochemisch modifizierten Variante des Proteins N-Ras auf sein Verhalten im Zytoplasma hin untersucht. Es zeigte sich, dass die Lokalisation des Proteins im Zytoplasma von der löslichen Domäne abhängt, während die Diffusion des Proteins auf der ER-Membran von seinem Aktivitätszustand beeinflusst wird.



## Abstract

In the first part of this thesis the determination of binding kinetics via fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of peripheral membrane proteins on their target membranes was investigated *in vivo*. These association-dissociation processes are commonly quantified by means of characteristic recovery time  $\tau$ . The result of this work show that  $\tau$  values are determined not only by the binding kinetics of proteins, but also by the size and number of target structures in the system. Hence, in investigations of binding kinetics of proteins on their target membranes via FRAP these additional parameters should be considered.

In the second part of this thesis the regulation and the formation of ER exit sites (ERES), specialized domains of the ER membrane for protein export, was investigated. For this purpose the methods fluorescence correlation spectroscopy (FCS) and FRAP were used to measure diffusion of the regulator protein Sec16 in cytoplasm as well as its association and dissociation with ERES. The studies have shown that binding of Sec16 to ERES is only possible in interaction with the COPII protein complex, which regulates the production of transport vesicles at ERES. Sec16 therefore can not have any organizing role for COPII proteins in the sense of a scaffold protein. Further it was found that phosphorylation influence the oligomerization of Sec16: in phosphorylated state Sec16 proteins diffuse as monomers or in small complexes on the ER membrane, whereas in unphosphorylated state oligomerization to large complexes takes place. The oligomerization is competed by the formation of Sec16-COPII complexes on the ER membrane. These results contributed to a model of the formation of ERES in cells which is based on self-organization of Sec16 and the COPII complex.

In the last part of this thesis the influence of the soluble structure domain and the activation state of the protein N-Ras on its behavior in the cytoplasm was investigated. Measurements have shown that the localization of this protein in the cytoplasm depends on the soluble structure domain, whereas its diffusion on the ER membrane is influenced by its activation state.



# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Grundlagen</b>	<b>9</b>
<b>1. Eukaryotische Zellen</b>	<b>11</b>
1.1. Hauptmerkmale eukaryotischer Zellen . . . . .	11
1.2. Zellmembranen . . . . .	12
1.3. Proteine . . . . .	13
1.4. Makromolekulares <i>Crowding</i> in lebenden Zellen . . . . .	14
<b>2. Diffusion</b>	<b>15</b>
2.1. Normale Diffusion . . . . .	15
2.2. Anomale Diffusion . . . . .	16
<b>3. Messmethoden</b>	<b>19</b>
3.1. GFP - Fluoreszenzfarbstoff für Messungen in lebenden Zellen . . . . .	19
3.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	21
3.3. Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) . . . . .	23
3.4. <i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP) . . . . .	32
<b>II. Einfluss der Geometrie der Organellen auf die Vermessung der Bindungskinetiken peripherer Membranproteine mittels FRAP</b>	<b>39</b>
<b>4. Einleitung</b>	<b>41</b>
<b>5. Methoden</b>	<b>43</b>
5.1. Zellkultur und Probenpräparation . . . . .	43
5.2. Experimentelle Methoden . . . . .	43
<b>6. Ergebnisse</b>	<b>47</b>
6.1. Entwicklung des mathematischen Modells . . . . .	47
6.2. Experimentelle Überprüfung des mathematischen Modells . . . . .	52
<b>7. Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>III. Regulation und Organisation der ER Exit Sites</b>	<b>61</b>
<b>8. Einleitung</b>	<b>63</b>
8.1. Vorwort . . . . .	63
8.2. Der frühe Sekretorische Pfad . . . . .	64
<b>9. Fragestellung</b>	<b>71</b>

<b>10. Methoden</b>	<b>73</b>
10.1. Zellkultur und Probenpräparation . . . . .	73
10.2. Experimentelle Methoden und Auswertung . . . . .	75
<b>11. Ergebnisse</b>	<b>81</b>
11.1. Phänotypen der Sec16-Proteinkonstrukte in Zellen . . . . .	81
11.2. Ergebnisse der FCS-Messungen im Nukleus und Zytoplasma . . . . .	83
11.3. Ergebnisse der FRAP-Messungen an den ERES . . . . .	94
<b>12. Diskussion</b>	<b>101</b>
12.1. Überblick . . . . .	101
12.2. Verteilung der Proteine im Zytoplasma . . . . .	101
12.3. Diffusion membrangebundener Proteine . . . . .	105
12.4. Austauschprozess der Sec16-Proteinkonstrukte an den ERES . . . . .	107
12.5. Modelle für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES . . . . .	108
12.6. Modell der Entstehung der ERES in Zellen . . . . .	110
<b>IV. Diffusion der Mutanten von N-Ras auf Membranen und im Zytoplasma</b>	<b>113</b>
<b>13. Einleitung</b>	<b>115</b>
13.1. Kleine GTPasen Ras . . . . .	115
13.2. Posttranslationale Modifikationen der vier Ras-Isoformen . . . . .	115
13.3. Die Bedeutung der Linker-Domänen von H-Ras, N-Ras und K-Ras4A . . . . .	117
13.4. Die Bedeutung des Aktivierungszustandes von H-Ras und N-Ras . . . . .	117
<b>14. Fragestellung</b>	<b>119</b>
<b>15. Methoden</b>	<b>121</b>
15.1. Zellkultur und Probenpräparation . . . . .	121
15.2. Messmethoden . . . . .	122
<b>16. Ergebnisse</b>	<b>123</b>
16.1. Phänotypen der untersuchten Proteinvarianten von N-Ras in Zellen . . . . .	123
16.2. Diffusion der Mutanten von N-Ras im Zytoplasma . . . . .	123
<b>17. Diskussion</b>	<b>133</b>

**Teil I.**

**Grundlagen**



# 1. Eukaryotische Zellen

## 1.1. Hauptmerkmale eukaryotischer Zellen

Zellen sind die kleinsten funktionalen und strukturellen Einheiten lebender Organismen.

Lebewesen werden nach der Art ihrer Zellstruktur unterschieden. Eukaryoten bestehen aus Zellen, die über einen membranumhüllten Zellkern (Nukleus) verfügen, in dem ihre Erbinformation in Form von DNA untergebracht ist. Prokaryoten haben dagegen keinen Zellkern. Ihre DNA befindet sich mit allen weiteren lebensnotwendigen Zellbestandteilen (u.a. RNA, Proteinen) in einem einzigen Zytoplasmakompartiment. In Abb. 1.1 ist eine schematische Skizze einer eukaryotischen Zelle dargestellt. Eukaryotische Zellen haben typischerweise einen Durchmesser von 10–30 µm. Ihre äußere Hülle ist die Plasma-Membran. Das Innere bilden der Nukleus und das Zytoplasma, die durch eine Kernmembran voneinander getrennt sind. Im Zytoplasma befindet sich eine Vielzahl membranumhüllter Organellen, die vom Zytosol, einem wasserhaltigen Fluid, umgeben sind. Ein weiterer Bestandteil des Zytoplasmas ist das Cytoskelett, das das innere Gerüst einer Zelle bildet und aus feinen Proteinfilamenten (Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente) besteht.

Der Nukleus ist der Träger der Erbinformation, die in Form von langen DNA-Molekülen gespeichert und bei der Zellteilung weitergegeben wird. Mit einem Durchmesser von 5–10 µm ist der Nukleus die größte Organelle einer eukaryotischen Zelle. Die Mitochondrien sind für die Produktion des Trägers der chemischen Energie der Zellen, dem Adenosintriphosphat (ATP), zuständig. Die Energie für die Produktion von ATP wird aus Nahrungsstoffen durch Oxidation gewonnen. Da dabei Sauerstoff verbraucht und Kohlendioxid freigesetzt wird, wird dieser Prozess als Zellatmung bezeichnet. Die Mitochondrien sind länglich geformte Strukturen mit einem Durchmesser von 1–2 µm. Einzigartig ist, dass ihre äußere Hülle aus zwei getrennten Lipiddoppelschichten besteht und sie über ihre eigene DNA verfügen. Die Vermehrung der Mitochondrien findet durch Zweiteilung statt.<sup>[84]</sup>

Die Organelle Endoplasmatisches Retikulum (ER) ist der Ort, an dem die meisten Lipide, Grundbausteine der Zellmembranen, und ein großer Teil der Proteine synthetisiert werden. Das ER besteht aus einem netzartig verzweigten Membransystem mit tubulären (*Tubules*) und planaren (*Sheets*) Strukturelementen. Das Membransystem des ER geht aus der Kernmembran des Nukleus hervor und erstreckt sich über das gesamte Zytoplasma.

Chemische Modifikation und Sortierung von Stoffen, die im ER neu synthetisiert wurden, findet am Golgi-Apparat statt. Diese Organelle besteht aus einem Stapel von mehreren parallel zueinander angeordneten flachen Zisternen und hat typischerweise einen Durchmesser von ca. 1 µm.

Das Zytosol ist das wasserhaltige Fluid, das die Organellen umgibt. Im Zytosol sind zahlreiche Proteine, die an verschiedenen im Zytosol ablaufenden Prozessen, beispielsweise der Proteinsynthese, beteiligt sind, enthalten.

Zusätzlich sind in Zellen mehrere kleinere Organellen mit unterschiedlichen weiteren Funktionen enthalten. Die Lysosomen sind für den Abbau von zelleigenen und zell-

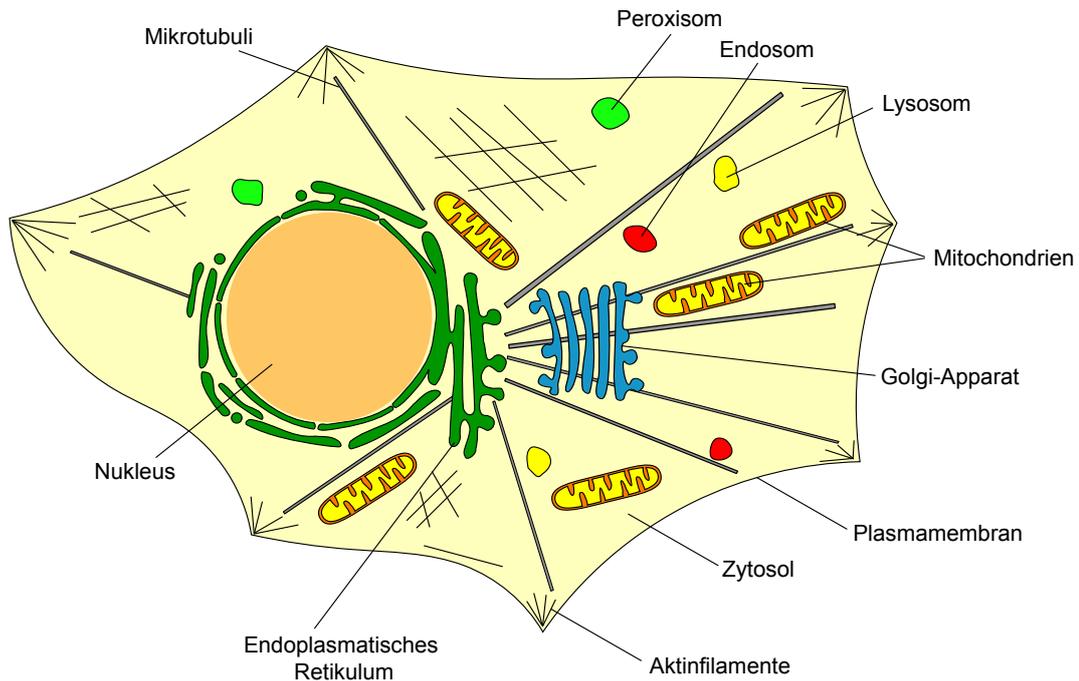


Abbildung 1.1. Schematische Darstellung einer eukaryotischen Zelle.

fremden Stoffen zuständig. Die Peroxisomen sind abgegrenzte Reaktionsräume, in denen die Oxidation von toxischen Molekülen stattfindet, und in den Endosomen findet die Sortierung vom aufgenommenen zellfremden Material statt.

Das Gesamtvolumen einer Zelle beträgt ca.  $500 - 5000 \mu\text{m}^3$ . Das Zytosol nimmt mit ca. 54 %<sup>[84]</sup> den größten Anteil des Gesamtvolumens ein. Das restliche Volumen verteilt sich auf die Mitochondrien mit ca. 22 %, das ER mit 12 %, den Nukleus mit 6 %, den Golgi mit 3 % sowie die Peroxisomen, die Lysosomen und die Endosomen mit jeweils 1 %.<sup>[84]</sup>

## 1.2. Zellmembranen

Die Membranen der Organellen bestehen aus Lipiddoppelschichten, die etwa 5 nm dick sind.<sup>[84]</sup> Lipide sind amphipatisch – sie besitzen sowohl hydrophile (Kopfgruppe) als auch hydrophobe (Schwanzgruppe) Strukturelemente. In wässrigen Umgebungen bilden diese Moleküle, aufgrund ihrer Amphiphilie, Lipiddoppelschichten, auch Lipidmembranen genannt, aus. In solchen Membranen sind die hydrophilen Kopfgruppen der Lipide zur wässrigen Phase ausgerichtet und die hydrophoben Schwanzgruppen zeigen nach Innen.

Die Grundstruktur biologischer Membranen wird durch die Phospholipide gebildet, die eine Phosphatgruppe als Kopfgruppe und zwei Kohlenwasserstoffreste mit einer Länge von ca. 14–24 Kohlenwasserstoffatomen<sup>[84]</sup> als Schwanzgruppen tragen. Der molekulare Aufbau der Phospholipide, die in einer Membran enthalten sind, ist sehr vielfältig. Je nach Kopfgruppe wird zwischen den Phosphoglycerolipiden und den Sphingophospholipiden unterschieden. Die Kohlenwasserstoffketten der Lipide

können dabei unterschiedlich lang sein und Doppelbindungen zwischen den Kohlenwasserstoffatomen enthalten.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil zellulärer Membranen ist das Cholesterin. Aufgrund der relativ starren molekularen Struktur des Cholesterins nimmt die Fluidität einer Membran mit höherem Cholesterinanteil ab. Sowohl das Cholesterin als auch die Kombination aus verschiedenen Phospholipiden tragen dazu bei die Fluidität der Membranen in Zellen bei Temperaturschwankungen zu stabilisieren und die Kristallisation der Phospholipide zu vermeiden.<sup>[84]</sup>

Zusätzliche Bestandteile zellulärer Membranen sind Proteine. Sie sind die funktionalen Elemente einer Membran und übernehmen auf dieser Aufgaben wie den Transport bestimmter Moleküle über die Membran oder membranassoziierte katalytische Reaktionen (z.B. ATP-Synthese).<sup>[84]</sup>

Die Membranen einzelner Organellen weisen individuelle Zusammensetzungen der Lipide, des Cholesterinanteils und der Proteine auf. Diese verleihen der jeweiligen Membran ihre einzigartige Funktion und Form.

### 1.3. Proteine

Proteine sind Polypeptide – sie bestehen aus langen Ketten von Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Der größte Teil der Proteine enthält 50–2000 Aminosäuren.<sup>[5]</sup> Biologisch funktional werden die Polypeptidketten erst, wenn sie unter kontrollierten Bedingungen in eine korrekte dreidimensionale Konformation gefaltet werden. Die biologische Aktivität der Proteine wird oft durch biochemische (posttranslationale) Modifikationen der Polypeptidketten gesteuert. Das Repertoire der Modifikationen ist sehr vielfältig, ebenso wie die Auswirkungen der Modifizierungen auf die Eigenschaften der Proteine. Indem, beispielsweise, an den Proteinen Lipidanker, in Form von langen Kohlenwasserstoffketten, angebracht und wieder entfernt werden, lassen sich die Interaktionen dieser Proteine mit Membranen der Organellen steuern. Durch posttranslationale Modifikationen können zusätzlich biologische Prozesse gesteuert werden. Hierbei gilt die Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren als ein wichtiges biochemisches Werkzeug.<sup>[84]</sup>

In Zellen können die Proteine in löslicher Form im Zytosol (lösliche Proteine) oder an die Membranen der Organellen und die Plasma-Membran gebunden sein (Membranproteine). Unter den Membranproteinen wird zwischen den integralen Proteinen und den Transmembranproteinen unterschieden. Integrale Proteine sind lediglich zum Teil in die Lipidmembranen integriert. Transmembranproteine durchspannen dagegen beide Schichten einer Lipidmembran. Eine weitere Sorte von Proteinen sind die peripheren Membranproteine. Diese sind durch nichtkovalente Bindungen an die Oberfläche einer Membran gebunden und können sowohl in gelöster als auch in membrangebundener Form in Zellen vorliegen. Die Interaktion peripherer Membranproteine mit Membranen kann u.a. durch Modifizierungen mit Lipidankern aus Fettsäureresten (z.B. Farnesyl- und Palmitoyl-Gruppen) oder Glycosylphosphatidylinositol (GPI-Anker) gesteuert werden.

## 1.4. Makromolekulares *Crowding* in lebenden Zellen

In allen Zellen lebender Organismen wird das Phänomen des makromolekularen *Crowding*, einer sehr hohen Gesamtkonzentration von Makromolekülen, die zwischen 50 und 400 mg/ml betragen kann, im Innenraum der Zellen beobachtet. [46, 59, 177]

Dieses Phänomen ist ein wichtiges Kriterium für den Ablauf molekularer Prozesse in Zellen. Ein entscheidender Effekt, der auf *Crowding* basiert, ist die Reduktion des frei zugänglichen Raums für gelöste Moleküle im Medium. [45] Dieser Effekt wird als *Excluded Volume Effekt* bezeichnet und kann seinerseits die Thermodynamik biochemischer Reaktionen beeinflussen, so dass beispielsweise die Assoziation von Makromolekülen mit größeren Komplexen in einem System begünstigt wird. [178] Zusätzlich werden durch *Crowding* die Reaktionsraten biochemischer Reaktionen beeinflusst. [149]

*Crowding* führt zur Subdiffusion der Makromoleküle in lebenden Zellen. [40] Die Diffusionskoeffizienten von Molekülen in Zellen können sich dabei um Faktor drei bis zehn niedriger sein als in wässrigen Lösungen. [47, 102] Die Subdiffusion in lebenden Zellen wird in Abs. 2.2.1 näher erläutert.

## 2. Diffusion

### 2.1. Normale Diffusion

In Flüssigkeiten suspendierte Partikel führen ständig unregelmäßige Eigenbewegung aus, die durch thermische Stöße mit Lösungsmittelmolekülen hervorgerufen wird. Dieses Phänomen wird als Brownsche Molekularbewegung bezeichnet und führt zur Diffusion der gelösten Partikel.

Mathematisch wurde die Diffusion eines Partikels von Einstein im Jahr 1905 im Modell des *Random Walk* beschrieben. Betrachtet man die Bewegung eines Partikels in einer Dimension, legt dieser in kleinen zeitlichen Abständen kurze und gradlinige Strecken in negative oder positive Richtung zurück. Die individuellen Diffusionsschritte erfolgen unabhängig voneinander und haben keine Vorzugsrichtung. Die Wahrscheinlichkeiten für Schritte in jede der beiden möglichen Bewegungsrichtungen (positiv und negativ) betragen jeweils  $p = 1/2$ . Die Wahrscheinlichkeit für diesen Partikel, in einer bestimmten Zeitperiode  $t$  ausgehend von einem Startpunkt  $x_0 = 0$  eine bestimmte Strecke  $x$  zurückzulegen, wird durch eine binomiale Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion  $P(x, t)$  beschrieben. Aufgrund des zentralen Grenzwertsatzes kann  $P(x, t)$  für eine unendlich große Anzahl von Schritten näherungsweise als eine Gauß-Verteilung beschrieben werden. Für einen *Random Walk* in einem multidimensionalen Raum ergibt sich:

$$P(x, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|x|^2}{4Dt}} \quad (2.1)$$

Der Parameter  $d$  entspricht der Anzahl der räumlichen Dimensionen und  $D$  ist der Diffusionskoeffizient des Partikels.

Die Verteilung  $P(x, t)$  ist durch das erste und zweite Moment der Funktion (2.1) vollständig charakterisiert. Das erste Moment beschreibt die mittlere zurückgelegte Strecke  $\langle x \rangle$  des Partikels:

$$\langle x \rangle = 0 \quad (2.2)$$

Das zweite Moment, die Varianz von  $P(x, t)$ , ist die mittlere quadratische Verschiebung (*Mean Square Displacement*, MSD)  $\langle x^2 \rangle$  des Partikels:

$$\langle x^2 \rangle = 2dDt \quad (2.3)$$

Der Diffusionskoeffizient des Partikels hängt sowohl von seinen Eigenschaften als auch von den Eigenschaften des Suspensionsmediums ab. Für kugelförmige Partikel mit dem Radius  $R_H$  in einem dreidimensionalen isotropen Medium mit der Viskosität  $\eta$  ergibt sich nach der Stokes-Einstein-Beziehung<sup>[43]</sup> ein Diffusionskoeffizient von:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (2.4)$$

Der Parameter  $T$  ist die absolute Temperatur des Systems und  $k_B$  die Boltzmann-Konstante.

Makroskopisch betrachtet führt die Brownsche Molekularbewegung in Flüssigkeiten zum Ausgleich von Konzentrationsgradienten. Dieser Vorgang wird durch das erste Ficksche Gesetz<sup>[56]</sup> beschrieben. Hierbei wird ein Partikelfluss  $\vec{j}$  mit der Einheit [mol/m<sup>2</sup>s] betrachtet, der in Gegenwart eines Konzentrationsgradienten  $\partial C(x, t)/\partial x$  entsteht:

$$\vec{j} = -D \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} \quad (2.5)$$

Die Partikel bewegen sich demnach entgegen der Richtung des Konzentrationsgradienten, von Positionen höherer Konzentration zu Positionen niedriger Konzentration. Die zeitliche Änderung der Partikelkonzentration wird durch das zweite Ficksche Gesetz (Diffusionsgleichung) beschrieben:

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} \quad (2.6)$$

Für ein symmetrisches System und die Anfangsbedingung  $C(0, 0) = \delta(x, t)$  ist die allgemeine Lösung dieser Differentialgleichung eine Gauß-Funktion:

$$C(x, t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad (2.7)$$

Die beiden Funktionen  $P(x, t)$  in Gl. (2.1) und  $C(x, t)$  in Gl. (2.7) sind identisch. Die Wahrscheinlichkeitsverteilung für den Aufenthalt eines diffundierenden Partikel und die Verteilung der Konzentration der Partikel in einem System werden demnach mathematisch durch die gleiche Funktion beschrieben.

## 2.2. Anomale Diffusion

Als anomale Diffusion werden alle diffusiven Prozesse bezeichnet, die von dem normalen diffusiven Verhalten abweichen und nicht durch die Funktionen (2.1) oder (2.7) zu beschreiben sind. Bei solchen Prozessen liegt eine nichtlineare Abhängigkeit der mittleren quadratischen Verschiebung  $\langle x^2 \rangle$  der diffundierenden Partikel von der Zeit  $t$  vor:

$$\langle x^2 \rangle = 2d\Gamma t^\alpha \quad (2.8)$$

Der Parameter  $\Gamma$  ist der sogenannte Transportkoeffizient der Partikel. Im Gegensatz zu dem normalen Diffusionskoeffizienten  $D$  mit der Einheit [m<sup>2</sup>/s], hat  $\Gamma$  die Einheit [m<sup>2</sup>/s <sup>$\alpha$</sup> ].

Der Parameter  $\alpha$  ist die Anomalität des betrachteten Prozesses. Für die normale Diffusion ist  $\alpha = 1$ . Andere diffusive Vorgänge werden nach dem Grad ihrer Anomalität unterschieden. Prozesse mit  $\alpha < 1$  werden als Subdiffusion bezeichnet. Diese Art der Diffusion wird experimentell in lebenden Zellen für die Bewegung von Proteinen im Zytoplasma<sup>[163]</sup> und auf intrazellulären Membranen beobachtet.<sup>[104]</sup> Zusätzlich kann Subdiffusion beispielsweise in Polymernetzwerken<sup>[170]</sup> und beim Ladungstransport in amorphen Halbleitern<sup>[107]</sup> auftreten. Bei Prozessen mit  $\alpha > 1$  spricht man von Superdiffusion. Experimentell wird Superdiffusion unter anderem bei der Nahrungssuche von Meeresraubtieren<sup>[81]</sup> und beim Reiseverhalten von Menschen<sup>[25]</sup> beobachtet.

### 2.2.1. Subdiffusion in lebenden Zellen

Die Aufklärung der Ursachen der anomalen Diffusion auf molekularer Ebene ist ein aktuelles Forschungsgebiet.

Zum heutigen Zeitpunkt haben sich im Wesentlichen drei Modelle etabliert, die die Entstehung der Subdiffusion aufgrund des makromolekularen *Crowding* in lebenden Zellen beschreiben. Diese sind (I) *Obstructed Diffusion* (OD), (II) *Fractional Brownian Motion* (FBM) und (III) *Continuous Time Random Walk* (CTRW).

Bei dem Modell OD entsteht die Subdiffusion aufgrund von zufällig verteilten immobilen Hindernissen im Raum, in dem die Diffusion stattfindet. Durch die immobilen Hindernisse bekommt der Raum eine fraktionale Geometrie, so dass die Diffusion der Partikel in einem Raum mit gebrochener Dimension stattfindet.<sup>[134]</sup>

Das Modell FBM hat das Hauptmerkmal der sogenannten Anti-Korrelation der Diffusionsschritte. Bei Ausführung eines Diffusionsschrittes besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass der nächste Schritt wieder in Richtung der Ausgangsposition des vorherigen Schrittes stattfinden wird. Aufgrund der Anti-Korrelation hat diese Art des *Random Walks* ein Erinnerungsvermögen. In einem Medium mit makromolekularem *Crowding* entsteht diese Art von Subdiffusion durch die Viskoelastizität des Fluids.<sup>[153]</sup>

Das Modell CTRW basiert auf der Annahme, dass die diffundierenden Partikel zwischen Perioden von freier Diffusion Ruhepausen nehmen, die eine nach einem Potenzgesetz verteilte Zeitdauer haben.<sup>[24, 107]</sup>

Welches dieser Modelle die Subdiffusion in lebenden Zellen tatsächlich beschreibt, ist bisher nicht abschließend geklärt. Neuere *in-vitro*-Untersuchungen zeigen jedoch, dass die anomale Diffusion in hochkonzentrierten Polymerlösungen, die einen ähnlichen Grad an makromolekularem *Crowding* aufweisen wie das Zellinnere, die Merkmale des Modells FBM aufweist und demnach aufgrund von viskoelastischen Eigenschaften der Fluide entsteht.<sup>[50, 162]</sup> Da das Zytoplasma und intrazelluläre Membranen ebenfalls über viskoelastische Eigenschaften verfügen<sup>[64]</sup> lassen diese Befunde vermuten, dass die anomale Diffusion der Proteine in lebenden Zellen durch Modell FBM beschrieben wird.



## 3. Messmethoden

### 3.1. GFP - Fluoreszenzfarbstoff für Messungen in lebenden Zellen

#### 3.1.1. Allgemeines zu GFP-Technologie

Für die Untersuchungen dynamischer Prozesse (molekularer Transport, Reaktionkinetik) von Proteinen in lebenden Zellen ist in der heutigen Zeit die Fluoreszenzmikroskopie oft die Methode der Wahl. Um die unterschiedlichen Proteine spezifisch untersuchen zu können müssen diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Fluoreszenzfarbstoffe sind Moleküle, die durch Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge zur Lichtemission angeregt werden.

Die gezielte Markierung der Proteine mit Fluorophoren in lebenden Zellen wurde mit der Entwicklung der Technologie fluoreszierender Proteine möglich. Diese entstand in den 1990-er Jahren, als die DNA-Sequenz des *Green Fluorescent Protein* (GFP) veröffentlicht wurde<sup>[28, 118]</sup> und dadurch der Zugang zur genspezifischen Fluoreszenzmarkierung der Proteine möglich wurde.

Seit dieser Zeit wurde die Palette der fluoreszierenden Proteine um ein Vielfaches erweitert<sup>[93]</sup> und auch das ursprüngliche GFP wurde weiterentwickelt. Für die Untersuchungen in Zellen wird heutzutage das sogenannte *enhanced GFP*<sup>[35, 74, 75]</sup> verwendet, das aufgrund von Mutationen bestimmter Aminosäuren sich gegenüber Wildtyp-GFP durch höhere Photostabilität und erhöhte Fluoreszenzausbeute auszeichnet.

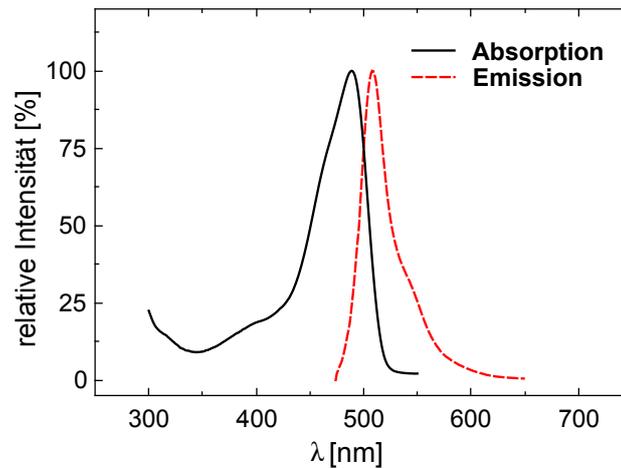
Die Markierung der Proteine mit GFP erfolgt mittels Transfektion. Hierfür werden Plasmide, ringförmige DNA-Moleküle, in denen die Gene des zu untersuchenden Proteins und des GFP kodiert sind, in die Zellen eingeschleust. Durch Ablesen der DNA-Sequenz des Plasmids werden in Zellen Proteine synthetisiert, die kovalent an GFP gebunden sind (Fusionsproteine).

Für die Einschleusung der Plasmide in die Zellen stehen zahlreiche chemische (z.B. Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion), physikalische (z.B. Mikroinjektion, Elektroporation) und biologische (z.B. Transferrinfektion) Transfektionsverfahren zur Verfügung. Eine relativ wenig aufwendige und effektive Möglichkeit der Transfektion bieten kommerziell verfügbare Transfektionsmittel (z.B. Fugene 6, Lipofektamin), die zu den chemischen Transfektionsverfahren zählen.

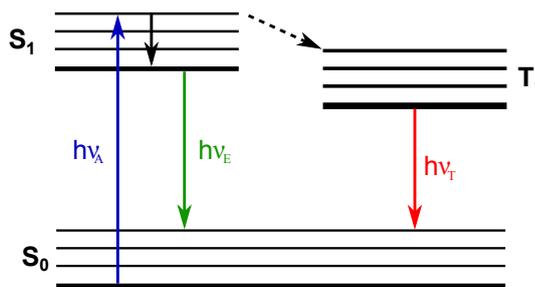
#### 3.1.2. Fluoreszenzfarbstoff GFP

Licht ist der Wellenlängenbereich elektromagnetischer Strahlung, der für das menschliche Auge sichtbar ist. Das sichtbare Lichtspektrum umfasst etwa den Bereich von  $\lambda = 380 - 780$  nm.

Als Fluoreszenz wird die spontane Lichtemission der Fluorophore nach ihrer Anregung mit Licht bestimmter Wellenlängen bezeichnet. Der Wellenlängenbereich, in dem die Absorption und die Emission der Fluorophore stattfindet, wird durch ihre chemische Zusammensetzung bestimmt. In Abb. 3.1 sind die Spektren der Absorption und der Emission von GFP dargestellt. Dieses Fluorophor hat ein Absorptionsmaximum



**Abbildung 3.1.** Spektren der Absorption und der Emission des Fluorophors *enhanced Green Fluorescent Protein* (GFP) mit einem Absorptionsmaximum bei  $\lambda_{\text{ex, max}} = 488 \text{ nm}$  und einem Emissionsmaximum bei  $\lambda_{\text{em, max}} = 509 \text{ nm}$ .<sup>[2]</sup>



**Abbildung 3.2.** Jablonski-Diagramm: Schematische Darstellung der elektronischen Übergänge in einem Fluorophor bei Anregung mit Licht. Durch Absorption eines Photons der Energie  $h\nu_A$  geht ein Elektron aus dem Grundzustand  $S_0$  in den ersten angeregten Zustand  $S_1$  über. Aus dem  $S_1$ -Zustand findet entweder die Relaxation in den Grundzustand  $S_0$  unter Emission einer Photons der Energie  $h\nu_E$  oder, in seltenen Fällen, der spinverbotene Übergang in den Triplettzustand  $T_1$  statt. Die Relaxation aus dem  $T_1$  in den Grundzustand  $S_0$  findet unter Emission eines Photons der Energie  $h\nu_T$  statt.

im Bereich des blauen Lichts bei  $\lambda_{\text{ex, max}} = 488 \text{ nm}$  und ein Emissionsmaximum im Bereich des grünen Lichts bei  $\lambda_{\text{em, max}} = 509 \text{ nm}$ . Die photophysikalischen Prozesse, die bei Anregung eines Fluorophors auf subatomarer Ebene stattfinden, sind in einem Jablonski-Diagramm in Abb. 3.2 zusammengefasst.

Bei einer Anregung wird die Energie eines Photons, des kleinsten Teilchens des Lichts, von dem Fluorophor absorbiert. Durch die Absorption wird ein Elektron des Fluorophors aus dem elektronischen Grundzustand  $S_0$  in den energetisch höheren ersten angeregten Zustand  $S_1$  versetzt. Nach einer Verweilzeit von wenigen Nanosekunden in diesem Zustand erfolgt die Relaxation des Elektrons aus dem  $S_1$  in den energetisch niedrigeren Grundzustand  $S_0$ . Die überschüssige Energie des Elektron wird dabei in Form eines Photons emittiert.

Für alle elektronischen Zustände ( $S_0$ ,  $S_1$ , usw.) existieren mehrere energetisch unter-

schiedliche Schwingungsniveaus. Bei Anregung wird das Elektron typischerweise in ein energetisch höheres Schwingungsniveaus des angeregten Zustands versetzt und relaxiert innerhalb von wenigen Pikosekunden in das niedrigste Schwingungsniveau des  $S_1$ -Zustands, aus dem die Photonenemission stattfindet. Dementsprechend haben die emittierten Photonen weniger Energie als die absorbierten. Die Wellenlänge des emittierten Lichts ist aus diesem Grund gegenüber der Wellenlänge des absorbierten Lichts rotverschoben. Dieser Effekt wird als *Stokes-Shift* bezeichnet.

Die Zustände  $S_0$  und  $S_1$  sind Singulettzustände. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass alle Elektronen eines Systems gepaart sind und einen Gesamtspin von  $S = 0$  aufweisen. Elektronen im angeregten Singulettzustand  $S_1$  können mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit durch Spinumkehr in den angeregten Triplettzustand  $T_1$  übergehen. Im Triplettzustand befinden sich im System zwei ungepaarte Elektronen mit parallel ausgerichteten Spin. Der Gesamtspin beträgt in diesem Zustand  $S = 1$ . Der Übergang von  $S_1 \rightarrow T_1$  wird *Intersystem Crossing* genannt. Nach einer Verweilzeit von etwa  $0,1 - 10 \mu\text{s}$  des Elektrons im  $T_1$ -Zustand findet unter Emission eines Photons die Relaxation in den Grundzustand  $S_0$  statt. Der Übergang von  $T_1 \rightarrow S_0$  ist spinverboten und hat aus diesem Grund verglichen zu Übergängen im Singulettzustand längere Relaxationszeiten.

Die Lebensdauer der Fluorophore ist begrenzt. Sie können typischerweise  $10^6 - 10^9$  Wiederholungen von Anregung und Emission durchleben, bevor sie irreversibel gebleicht werden. <sup>[110]</sup>

## 3.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

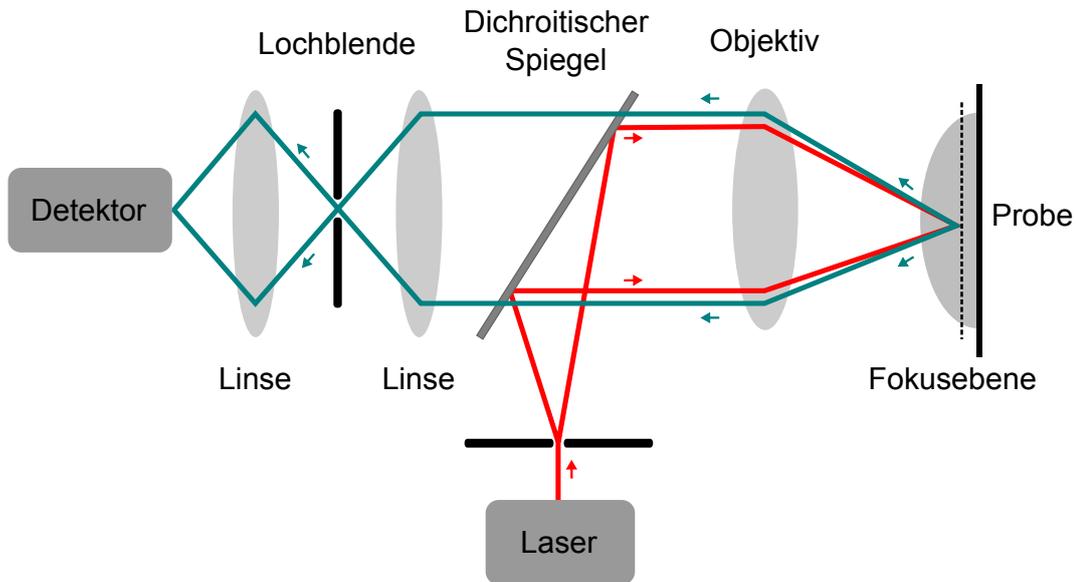
Für optische Untersuchungen auf der subzellulären Ebene werden oft konfokale Fluoreszenzmikroskope verwendet, die sich durch eine hohe räumliche Auflösung im Mikrometerbereich auszeichnen.

Das Prinzip eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist in Abb. 3.3 skizziert. Ein Laser-Strahl trifft zunächst auf eine Lochblende (*Pinhole*) und wird mittels eines dichroitischen Spiegels und eines Objektivs auf die Probe fokussiert. Unter Bestrahlung werden die Fluorophore der Probe zur Fluoreszenz angeregt. Das emittierte Licht passiert das selbe Objektiv wie die Anregungsstrahlung und trifft auf eine weitere Lochblende bevor es an einem Detektor antrifft.

Da die Anregung und die Detektion der Fluoreszenz in einem gemeinsamen fokalen Volumen  $V_k$  stattfindet, das durch Lichtbeugung an der Fokusebene erzeugt wird, wird dieser Aufbau als konfokal bezeichnet. Der Durchmesser des konfokalen Volumens  $\omega_0$  wird durch das Abbesche Beugungslimit bestimmt:

$$\omega_0 = \frac{\lambda}{2 \cdot \text{NA}} \quad (3.1)$$

Der Parameter  $\lambda$  ist die Wellenlänge der Anregungsstrahlung und  $\text{NA} = n \cdot \sin\beta$  die numerische Apertur des Objektivs, die durch den Brechungsindex  $n$  der Probe und den halben Öffnungswinkel  $\beta$  des Objektivs bestimmt wird. Um ein möglichst kleines fokales Volumen zu erzeugen, werden Objektive mit möglichst hohen NA verwendet. Wasser hat einen ähnlichen Brechungsindex wie biologische Proben. Für Untersuchungen in lebenden Zellen eignen sich aus diesem Grund Wasserimmersionsobjektive



**Abbildung 3.3.** Aufbauprinzip und Strahlengang in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop: Der Laser-Strahl trifft auf eine Lochblende und wird mittels eines dichroitischen Spiegels und eines Objektivs auf die Probe fokussiert. Die von der Probe erzeugte Fluoreszenz passiert das Objektiv und den dichroitischen Spiegel und trifft auf eine weitere Lochblende. Diese lässt nur die Fluoreszenz durch, die ausschließlich an der Fokusebene erzeugt wurde. Danach trifft die Fluoreszenz am Detektor an.

mit numerischen Aperturen von  $NA > 1$ .

Die Lochblende im Strahlengang der Fluoreszenz dient zur Abschirmung von Störstrahlung wie dem Streulicht und der Fluoreszenz, die aus Positionen außerhalb der fokalen Ebene stammt.

Zum heutigen Zeitpunkt werden vor allem konfokale Spinning-Disk-Mikroskope und Laser-Scanning-Mikroskope (CLSM) für biophysikalische Untersuchungen genutzt.<sup>[112]</sup> Bei einem CLSM wird für die Erzeugung eines Bildes das konfokale Volumen Zeilenweise durch die Probe geführt. Spinning-Disk-Mikroskope enthalten zwei rotierende Nipkow-Scheiben mit jeweils spiralförmig angeordneten Linsen und Lochblenden. Während der Rotation werden mehrere Linsen und Lochblenden mit Licht bestrahlt wodurch mehrere fokale Volumina auf die Probe projiziert werden. Durch die Rotation der Nipkow-Scheiben wird die Probe in bogenförmigen Bewegungen abgescannt.

Beide Mikroskope bieten eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung und eignen sich für die Anwendung moderner Mikroskopiemethoden wie Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP).

In dieser Arbeit wurde ein kommerzielles CLSM für biophysikalische Untersuchungen in lebenden Zellen mittels FCS und FRAP verwendet.

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

### 3.3.1. Einführung

Die Methode Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine in den frühen 1970-er Jahren entwickelte Technik, die es erlaubt das dynamische Verhalten fluoreszierender Partikel in komplexen Systemen wie den lebenden Zellen mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung zu untersuchen. Die Methode basiert auf der statistischen Analyse der zeitlichen Fluktuationen des Fluoreszenzsignals mittels Autokorrelation. Prinzipiell können alle physikalischen Parameter, die zur Fluktuationen der Fluoreszenz führen, mit FCS untersucht werden. In lebenden Zellen wird FCS typischerweise zur Untersuchung der Mobilität fluoreszierender Biomoleküle verwendet. In diesem Fall geht man davon aus, dass die Fluktuationen der Fluoreszenz durch den ständigen Austausch der Fluorophore im fokalen Volumen verursacht werden.

Der Ausgangspunkt einer FCS-Messung ist die Aufnahme eines zeitlichen Signals der Fluoreszenzintensität im fokalen Volumen eines Mikroskops, das sich während der Messung an einer ausgewählten Position innerhalb einer Probe befindet. Die Fluoreszenzintensität wird dabei mit einer hohen zeitlichen Auflösung ( $<1 \mu\text{s}$ ) detektiert. Aus den aufgenommenen Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurven werden anschließend mittels Autokorrelation die FCS-Kurven berechnet. Durch die Autokorrelation werden die Fluktuationen des Fluoreszenzsignals untersucht, die vielfältige Informationen über die Eigenschaften der fluoreszierenden Partikel und ihrer Umgebung beinhalten. Diese Eigenschaften lassen sich durch Fitten der FCS-Kurven mit geeigneten Modellfunktionen charakterisieren. Die statistische Analyse der Fluktuationen mittels der Autokorrelation erlaubt es beispielsweise die Konzentration der Moleküle im Detektionsvolumen sowie die verschiedenen Arten molekularer Transportvorgänge (gerichteter Transport, normale Diffusion, Sub- und Superdiffusion) zu identifizieren und zu charakterisieren. Finden weiterhin im Detektionsvolumen Reaktionen statt, so können mittels FCS auch die Reaktionsraten bestimmt werden.

Experimentell wird diese Technik beispielsweise für die Untersuchungen der Konformationsänderungen von DNA-Einzel-<sup>[149]</sup> oder -Doppelsträngen<sup>[117]</sup> verwendet. Weiterhin können Konformationsänderungen von Proteinen untersucht werden<sup>[29]</sup> oder auch die Organisation und Funktion von zellulären Membranen.<sup>[17]</sup>

Bei der Durchführung einer FCS-Messung wird das fokale Volumen an einem ausgewählten Ort innerhalb der Probe positioniert und die erzeugte Fluoreszenzintensität  $F(t)$  über eine bestimmte Zeitperiode  $t$  aufgezeichnet. Die Voraussetzung für den nächsten Schritt, die Autokorrelation von  $F(t)$ , ist, dass die Fluoreszenzintensität um einen zeitlich konstanten Mittelwert fluktuiert. Durch die Autokorrelation wird die Charakteristik der Fluktuationen in  $F(t)$  untersucht. Zur Auswertung der Autokorrelationskurven werden theoretische Modelle benötigt, die die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität mathematisch beschreiben. Für die Herleitung der Modellfunktionen müssen zahlreiche Parameter des Messsystems berücksichtigt werden. Hierzu gehören die räumlichen Verteilungen der Lichtintensität bei der Anregung und der Detektion der Fluoreszenz sowie die (photo)physikalischen Eigenschaften der Fluorophore in der Probe.

Die häufigste Anwendung von FCS ist die Vermessung der Diffusion fluoreszierender

Partikel. Dementsprechend lassen sich in Publikationen hierzu zahlreiche Modellfunktionen finden. Im Folgenden wird die Herleitung der Fit-Funktionen zur Vermessung der Diffusion mit FCS erläutert. Die Herleitung lehnt sich an die Publikation von Rigler et al.<sup>[125]</sup> an.

### 3.3.2. Anregung der Fluoreszenz im konfokalen Volumen

Das Anregungsprofil in einem konfokalen Mikroskop hängt vom Profil des verwendeten Laserstrahls, des verwendeten Objektivs für die Fokussierung auf die Probe und dem Brechungsindex der Probe ab. Das Profil eines Laserstrahls hat die Form einer Gauß-Kurve mit einem Radius  $\omega_1$  bei  $1/e^2$ . Das Objektiv bestehend aus mehreren Zwischen- und Korrekturlinsen ist durch seine Brennweite  $f$  spezifiziert. Die Verteilung der Lichtintensität  $I_{\text{exc}}(x, y, z)$  wird auf der  $xy$ -Ebene durch eine Gauß-Verteilung und in  $z$ -Richtung durch eine Lorentz-Verteilung beschrieben:

$$I_{\text{exc}}(x, y, z) = \frac{\omega_0^2 \cdot I_0}{\omega(z)^2} \cdot e^{-\frac{2(x^2 + y^2)}{\omega(z)^2}} \quad (3.2)$$

Dabei ist  $I_0$  die maximale Intensität des Anregungsstrahls in der Mitte des Strahls. Die Breite des Anregungsstrahls in der fokalen Ebene ist  $\omega_0 = \frac{\lambda_{\text{exc}} \cdot f}{n\pi\omega_1}$  mit der Wellenlänge des Anregungsstrahls im Vakuum  $\lambda_{\text{exc}}$  und dem Brechungsindex  $n$  der Probe. In  $z$ -Richtung ändert sich die Breite des Anregungsstrahls nach  $\omega(z)^2 = \omega_0^2 + z^2\omega_1^2/f^2$  mit dem Abstand zu der fokalen Ebene  $z$ .

### 3.3.3. Detektion der Fluoreszenz im konfokalen Volumen

Die emittierte Fluoreszenz einer Probe wird von der Objektiv-Linse gesammelt und auf eine Lochblende fokussiert. Damit nur die Photonen die Lochblende erreichen, die ursprünglich aus der fokalen Ebene stammen, wird der Radius der Lochblende  $L$ , so gewählt, dass er der Breite des Anregungsstrahls  $\omega_0$  in der fokalen Ebene entspricht. Durch die Kombination aus einem Objektiv mit einer hohen numerischen Apertur und einer kleinen Lochblende wird in einem konfokalen Mikroskop, entsprechend des Abbeschen Beugungslimits (3.1), ein sehr kleines Detektionsvolumen von weniger als einem Femtoliter erzeugt.

Für die Detektion der Fluoreszenz wird typischerweise eine Avalanche Photodiode (APD) verwendet. Die Fluoreszenzintensität  $I_{\text{em}}$  wird dabei als Anzahl der Photonen pro Zeitintervall (*Counts per Second*, cps) gemessen.

Die Verteilung der Fluoreszenzintensität  $I_{\text{em}}(x, y, z)$  im Detektionsvolumen hängt ab von dem Profil der Lichtintensität bei Anregung  $I_{\text{exc}}(x, y, z)$ , von der Quantenausbeute eines einzelnen Fluorophors  $Q$ , der Effizienz der Filter und der Photonenzähler  $E$ , sowie von der sogenannten Sammeleffizienz-Funktion (*Collection Efficiency Function*)  $\text{CEF}(x, y, z)$ , die von den Eigenschaften der Optik für die Detektion abhängt:

$$I_{\text{em}}(x, y, z) = E \cdot Q \cdot \text{CEF}(x, y, z) \cdot I_{\text{exc}}(x, y, z) \quad (3.3)$$

Die Quantenausbeute  $Q$  eines Fluorophors ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der absorbierten Photonen und der Anzahl der emittierten Photonen.

Die CEF( $x, y, z$ ) wird durch die Eigenschaften des Objektivs und der Lochblende bestimmt und lässt sich durch die Punktspreizfunktion (*Point Spread Function*, PSF) des Objektivs und die Transmissionsfunktion der Lochblende  $T(x, y)$  beschreiben:

$$\text{CEF}(\vec{r}, z) = \frac{1}{N} \cdot \int T(\vec{r}') \cdot \text{PSF}(\vec{r}, \vec{r}', z) d\vec{r}' \quad (3.4)$$

Der Parameter  $N$  ist ein Normierungsfaktor. Die PSF( $\vec{r}, \vec{r}', z$ ) beschreibt die Verteilung der detektierten Lichtintensität (Bildraum) einer einzigen punktförmigen Lichtquelle, die durch ein Objektiv betrachtet wird (Objektraum) und ist gegeben durch:

$$\text{PSF}(\vec{r}, \vec{r}', z) = \frac{\text{circ} \left\{ \frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{R(z)} \right\}}{\pi \cdot R(z)^2} \quad (3.5)$$

Der Vektor  $|\vec{r}|$  ist ein zweidimensionaler Vektor in der  $xy$ -Ebene, der senkrecht zu der optischen Achse ausgerichtet ist. In der fokalen Ebene ( $z = 0$ ) wird eine punktförmige Lichtquelle an der Position ( $|\vec{r}|, z$ ) im Objektraum als eine Scheibe abgebildet dessen Radius durch die Auflösung  $R_0$  des Objektivs bestimmt wird. Dabei ist  $R_0$  der Radius des ersten Beugungsrigs (*Airy Disc*). Außerhalb der fokalen Ebene auf Positionen  $z \neq 0$  vergrößert sich der Radius der Scheibe entsprechend einer Lorentz-Funktion:

$$R(z)^2 = R_0^2 + z^2 \cdot \tan^2 \beta \quad (3.6)$$

$T(\vec{r})$  beschreibt den Anteil des emittierten Lichts, das durch die Lochblende transmittiert wurde und ist gegeben durch:

$$T(\vec{r}) = \text{circ} \left\{ \frac{|\vec{r}|}{s_0} \right\} \quad (3.7)$$

$$\text{circ} \left\{ \frac{|\vec{r}|}{s_0} \right\} = \begin{cases} 1 & \text{wenn } |\vec{r}| \leq s_0 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.8)$$

Dabei beschreibt  $s_0 = L/M$  die Abbildung der Lochblende mit dem Radius  $L$  durch ein Objektiv mit der Vergrößerung  $M$ . Unter Berücksichtigung der CEF in Gl. (3.4) wird die Funktion zur Beschreibung der Fluoreszenzintensität  $I_{\text{em}}$  in Gl. (3.3) zu einem komplexen Ausdruck, der nur noch numerisch gelöst werden kann. Wenn jedoch der Radius  $L$  der Lochblende nach dem Kriterium  $\omega_0 < L < \frac{\tan \beta}{2 \tan \delta \omega_0}$  ausgewählt wurde, kann  $I_{\text{em}}$  näherungsweise mit einer Gauß-Verteilung beschrieben werden:

$$I_{\text{em}}(x, y, z) = E \cdot Q \cdot I_0 \cdot e^{-\frac{2(x^2 + y^2 + (z/S)^2)}{\omega_0^2}} \quad (3.9)$$

Dabei ist  $S \approx 3-10$  ein konstanter dimensionsloser Faktor, das die Ausdehnung des konfokalen Volumens in axialer Richtung ( $z$ -Richtung) relativ zu der lateralen Richtung ( $xy$ -Ebene) berücksichtigt.

### 3.3.4. Analyse der Fluktuationen der Fluoreszenzintensität mittels Autokorrelation

#### Autokorrelationsfunktion einer diffundierenden Partikelspezies

Das zeitliche Signal der Fluoreszenzintensität  $F(t)$ , das im Beobachtungsvolumen  $V$  detektiert wurde, hängt von der Intensität  $I_{\text{em}}(x, y, z)$  des emittierten Lichts an der Position  $(x, y, z)$  und der Konzentration der Fluorophore  $C(x, y, z, t)$  in  $V$  ab:

$$F(t) = \int_V I_{\text{em}}(x, y, z) \cdot C(x, y, z, t) d^3r \quad (3.10)$$

Die Fluoreszenzintensität und die Konzentration können durch ihre Mittelwerte  $\langle F \rangle$ ,  $\langle C \rangle$  und Fluktuationen  $\delta F(t)$ ,  $\delta C(x, y, z, t)$  ausgedrückt werden:

$$F(t) = \langle F \rangle + \delta F(t) \quad (3.11)$$

$$C(x, y, z, t) = \langle C \rangle + \delta C(x, y, z, t) \quad (3.12)$$

Die Autokorrelation dient generell dazu, die Selbstähnlichkeit einer fluktuierenden Variablen in einer Messreihe zu detektieren. Die Autokorrelationsfunktion einer zeitabhängigen Funktion  $f(t)$  mit einem Mittelwert von  $\langle f(t) \rangle = 0$  ist definiert als:

$$\begin{aligned} G(\tau) &= \langle f(t) \cdot f(t + \tau) \rangle \\ &= \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{2}{T} \cdot \int_{-T}^T f(t) \cdot f(t + \tau) dt \end{aligned} \quad (3.13)$$

Durch diese mathematische Operation werden die Werte  $f(t)$  zum definierten Zeitpunkt  $t \in \{t_0, t_{\text{max}} - \tau\}$  mit Werten von  $f(t + \tau)$  bei späteren Zeitpunkten  $(t + \tau)$  verglichen. Die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  beschreibt demnach das zeitliche Abklingen von Informationen in  $f(t)$  über die Zeitperiode  $\tau$ . Für periodische Signale  $f(t)$  ist  $G(\tau)$  ebenfalls periodisch. Für zeitlich begrenzte Ereignisse in  $f(t)$  zeigt  $G(\tau)$  eine abfallende Kurve von einem Maximalwert bei  $G(0)$  auf Null bei  $G(\infty)$ .

Die normierte Autokorrelationsfunktion für das Signal der Fluoreszenzintensität  $F(t)$  lautet:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\sqrt{\langle F(t)^2 \rangle \langle F(t + \tau)^2 \rangle}} \quad (3.14)$$

Die Kombination der Gl. (3.10), (3.11) und (3.12) führt zu:

$$\langle F(t)F(t + \tau) \rangle = \left( \langle C \rangle \cdot \int_V I_{\text{em}} dt \right)^2 + \int_V \int_{V'} I_{\text{em}}(\vec{r}) I_{\text{em}}(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle dV dV' \quad (3.15)$$

Der erste Term der Gl. (3.15) ist eine Konstante und der zweite Term ist die Autokorrelationsfunktion der Fluktuation der Fluoreszenzintensität,  $\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle$ . Diese hängt von dem Profil der Emissionsintensität  $I_{\text{em}}$  und von der Autokorrelationsfunktion der Konzentrationsfluktuationen  $\langle \delta C(\vec{r}, t) \cdot \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle$  ab.

Werden die Fluktuationen der Konzentration durch Diffusion hervorgerufen, kann die Autokorrelationsfunktion von  $\delta C$  mit der Gauß-Lösung (2.7) der Diffusionsgleichung beschrieben werden. Für ein dreidimensionales System ergibt sich dann:

$$\langle \delta C(\vec{r}, t) \cdot \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle = \frac{\langle C \rangle}{(4\pi D\tau)^{\frac{3}{2}}} \cdot e^{-\frac{|\vec{r} - \vec{r}'|}{4D\tau}} \quad (3.16)$$

Für die Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen der Fluoreszenzintensität gilt:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle}{\langle F^2 \rangle} \quad (3.17)$$

$$= \frac{\int_V \int_{V'} I_{\text{em}}(\vec{r}) I_{\text{em}}(\vec{r}') \langle \delta C(\vec{r}, t) \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle dV dV'}{(\langle C \rangle \int_V I_{\text{exc}}(\vec{r}) dV)^2} \quad (3.18)$$

Aus der Kombination von Gl. (3.9) und Gl. (3.16) ergibt sich:

$$G(\tau) = \frac{1}{\pi^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0 \cdot \langle C \rangle} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_D}}} \quad (3.19)$$

Diese Autokorrelationsfunktion beschreibt den Verlauf einer Kurve an, die bei FCS-Messungen von beispielsweise in Wasser gelösten fluoreszierenden Molekülen zu erwarten ist.

Der erste Term der Gl. (3.19) ist die Amplitude einer FCS-Kurve  $G(0)$  und entspricht dem Kehrwert der mittleren Anzahl der Fluorophore ( $1/N$ ) im effektiven fokalen Volumen  $V = \pi^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0$  während der Messung, wobei  $N = \pi^{3/2} \cdot \omega_0^2 \cdot z_0 \cdot \langle C \rangle$  ist. Der Parameter  $z_0 = S \cdot \omega_0$  ist die Ausdehnung des Volumens  $V$  entlang der optischen Achse.

Der Parameter  $\tau_D$  ist die Diffusionszeit der Fluorophore und beschreibt die mittlere Verweilzeit der Fluorophore im fokalen Volumen. Sie hängt von dem Diffusionskoeffizienten  $D$  der Fluorophore ab:

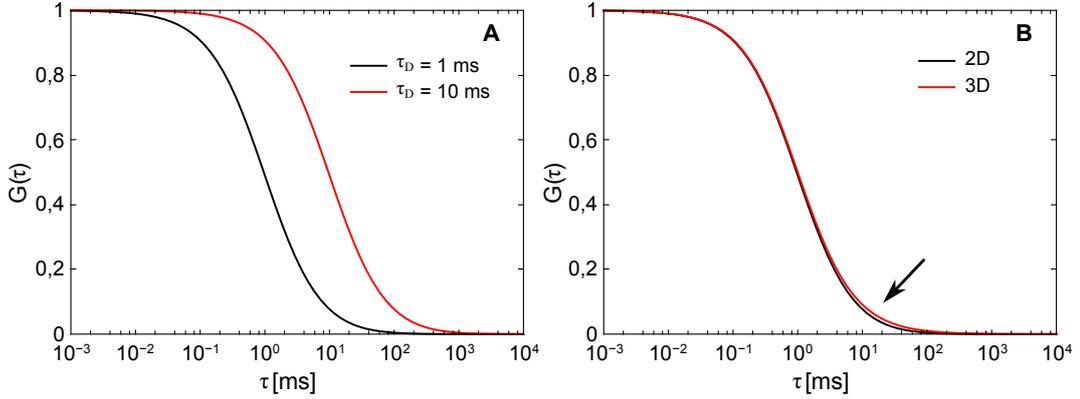
$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad (3.20)$$

Der zweite Term der Funktion (3.19) berücksichtigt den Beitrag der Diffusion in der  $xy$ -Ebene und der letzte Term beschreibt den Beitrag der Diffusion entlang der optischen Achse ( $z$ -Richtung). Für zweidimensionale Diffusion ergibt sich demnach die Autokorrelationsfunktion:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \quad (3.21)$$

Diese Autokorrelationsfunktion beschreibt FCS-Kurven wie sie beispielsweise bei Messungen von Fluorophoren auf Lipidmembranen zu erwarten sind.

Der Vergleich von FCS-Kurven für dreidimensionale Diffusion (Gl. (3.19)) und zweidimensionale Diffusion (Gl. (3.21)) in Abb. 3.4 zeigt, dass sich die beiden Kurven nur bei größeren Werten von  $\tau$  signifikant voneinander unterscheiden. Für schnell diffundierende Partikel in einem dreidimensionalen Systemen ist der Beitrag der



**Abbildung 3.4.** Beispiele von Autokorrelationskurven  $G(\tau)$  wie sie bei FCS-Messungen bei dreidimensionalen (Gl. (3.19)) und zweidimensionalen Diffusion (Gl. (3.21)) der Partikel zu erwarten sind. **A:** Autokorrelationskurven für dreidimensionale Diffusion bei Diffusionszeiten von  $\tau_D = 1$  ms und 10 ms. **B:** Autokorrelationskurven für dreidimensionale (3D) und zweidimensionale Diffusion (2D) bei einer Diffusionszeit von  $\tau_D = 1$  ms. Der Pfeil zeigt den Unterschied zwischen den beiden Kurven an. Aufgrund der Elongation des fokalen Volumens in  $z$ -Richtung ist der Beitrag der  $z$ -Komponente zur Autokorrelation bei dreidimensionalen Diffusion sehr gering und nur bei größeren Zeitskalen erkennbar.

Diffusion entlang der optischen Achse zur Autokorrelation demnach sehr klein.

### Autokorrelationsfunktionen mit mehreren diffundierenden Partikelspezies

Enthält eine Probe mehrere Spezies, die unabhängig voneinander diffundieren und unterschiedliche Diffusionskoeffizienten aufweisen, müssen die Beiträge beider Spezies in der Autokorrelationsfunktion berücksichtigt werden. In diesem Fall setzt sich die Gesamtautokorrelationsfunktion aus der Summe der Autokorrelationsfunktionen einzelner Spezies zusammen. In einem System, in dem eine Komponente dreidimensionale Diffusion (z.B. im Zytosol) und die zweite zweidimensionale Diffusion (z.B. auf einer Membran) aufweisen ergibt sich:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[ \frac{f_1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,1}}\right) \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau}{S^2 \tau_{D,1}}}} + \frac{1 - f_1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,2}}\right)} \right] \quad (3.22)$$

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \left[ \frac{f_1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,1}}} + \frac{1 - f_1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,2}}} \right] \quad (3.23)$$

Der Parameter  $f_1$  ist der relative Anteil der ersten Komponente im fokalen Volumen. Die Diffusionszeiten  $\tau_{D,1}$  und  $\tau_{D,2}$  hängen entsprechend Gl. (3.20) mit dem Diffusionskoeffizienten  $D$  der jeweiligen Komponente zusammen.

Beträgt der Unterschied zwischen den Diffusionszeiten der beiden Komponenten mehrere Größenordnungen, so sind die Beiträge der beiden Komponenten in einer Autokorrelationskurve bereits per Auge gut erkennbar. Ist der Unterschied zwischen den Diffusionszeiten der beiden Komponenten dagegen relativ klein, so unterscheiden sich die Autokorrelationskurven dieser beiden Modelle optisch nicht signifikant von

den Kurven der Modelle mit einer Komponente.

Werden die beiden Modelle (3.22) und (3.23) miteinander verglichen (siehe Abb. 3.5:B) so zeigt sich, dass bei gleichen Diffusionszeiten der beiden Komponenten sich die Kurven kaum voneinander unterscheiden. Der Grund hierfür ist, dass aufgrund der Ausdehnung des konfokalen Volumens in  $z$ -Richtung, der Beitrag der Diffusion aus dieser Richtung sehr klein ist und nur bei größeren Zeitskalen sichtbar ist (vgl. Abb 3.4: A). In Gl. (3.22) weist nur die schnellere Komponente ( $\tau_{D,1}$ ) für die Diffusion eine dritte Dimension auf. Bei größeren Zeitskalen wird jedoch die Kurve durch den Beitrag der langsameren Komponente ( $\tau_{D,2}$ ) dominiert.

Die Autokorrelationsfunktionen (3.22) und (3.23) eignen sich unter anderem zur Charakterisierung der Diffusion von Proteinen, die in Zellen in zwei unterschiedlichen Umgebungen diffundieren. Die Diffusion der Proteine hängt von der Viskosität ihrer Umgebung ab. Im Zytosol werden beispielsweise Viskositäten von  $\eta_c = 2 - 3 \text{ mPa s}$  [98, 105, 152] beobachtet. Im Vergleich dazu werden für zelluläre Membranen Viskositäten von  $\eta_m = 3 - 30 \text{ mPa s}$  [87, 101] beobachtet. Dementsprechend weist ein Protein, das sich in Zellen sowohl im Zytosol als auch in einem membrangebundenen Zustand befindet, in diesen beiden Umgebungen unterschiedliche Diffusionskoeffizienten auf, die bei FCS-Messungen zu unterschiedlichen Diffusionszeiten führen. [135] Im Zytosol gelöste Proteine zeigen typischerweise Diffusionszeiten von  $\tau_D < 1 \text{ ms}$ . Membrangebundene Proteine weisen dagegen Diffusionszeiten von  $\tau_D \approx 10 \text{ ms}$  auf. Zur Veranschaulichung sind in Abb. 3.4: B mehrere Autokorrelationskurven des Modells der zweidimensionalen Diffusion mit zwei Komponenten (Gl. (3.23)) mit den typischen Diffusionszeiten von Proteinen im Zytosol und auf Membranen ( $\tau_{D,1} = 1 \text{ ms}$ ,  $\tau_{D,2} = 10 \text{ ms}$ ) bei unterschiedlichen Anteilen der schnelleren Komponente ( $f_1$ ) dargestellt. In diesem Fall ist der Unterschied zwischen den beiden Komponenten zu gering, um im Verlauf der Kurven per Auge erkennbar zu sein. Bei FCS-Messungen in einem solchen Fall müssen zusätzliche Kriterien, wie beispielsweise bekannte Lokalisationen der Proteine im Zellen oder der Vergleich der Fit-Güte mit anderen Modell-Funktionen, herangezogen werden, um zu entscheiden, ob dieses Modell für die Auswertung der Messungen geeignet ist.

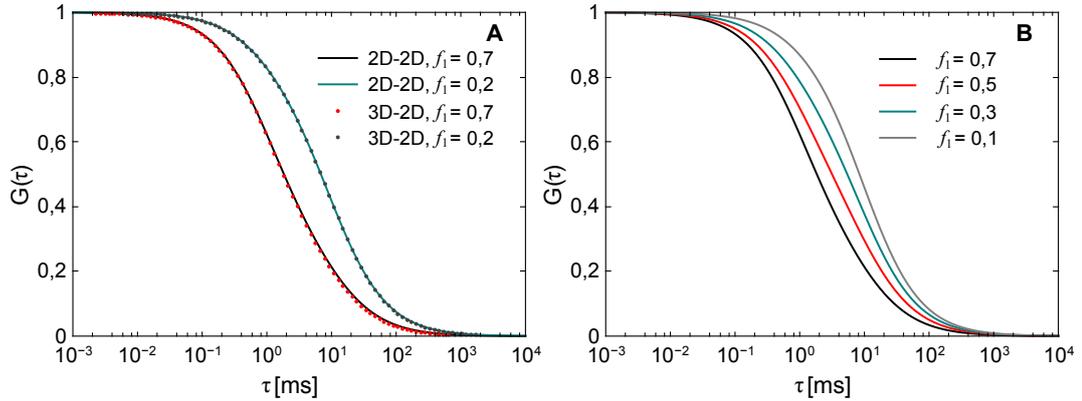
### Autokorrelationsfunktionen bei anomaler Diffusion

Bei anomaler Diffusion wächst die mittlere quadratische Verschiebung eines Teilchens entsprechend Gl. (2.8) asymptotisch mit der Zeit  $t$  und ist proportional zum Transportkoeffizienten  $\Gamma$  (siehe Abs. 2.2). In einem heuristischen Ansatz kann hieraus ein zeitabhängigen Diffusionskoeffizient definiert werden, der von der Anomalität  $\alpha$  abhängt:

$$D(t) = \Gamma t^{\alpha-1} \quad (3.24)$$

Unter Berücksichtigung dieser Zeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten ergibt sich für die anomale dreidimensionale Diffusion die Autokorrelationsfunktion (3.25) und für die anomale zweidimensionale Diffusion (3.26).

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_\alpha}\right)^\alpha} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{1}{S^2} \left(\frac{\tau}{\tau_\alpha}\right)^\alpha}} \quad (3.25)$$



**Abbildung 3.5.** Beispiele von Autokorrelationskurven  $G(\tau)$  wie sie bei FCS-Messungen für Diffusion mit zwei Komponenten zu erwarten sind. Bei allen dargestellten Kurven betragen die Diffusionszeiten  $\tau_{D,1} = 1$  ms und  $\tau_{D,2} = 10$  ms. **A:** Vergleich von zwei Autokorrelationsfunktionen mit zwei Komponenten. Als Linien sind Kurven der Modellfunktion (3.23) mit zweidimensionaler Diffusion für beide Komponenten dargestellt (2D-2D). Als Punkte sind Kurven der Modellfunktion (3.22) mit dreidimensionaler Diffusion der schnelleren Komponente ( $\tau_{D,1}$ ) und zweidimensionalen Diffusion der langsameren Komponente ( $\tau_{D,2}$ ) dargestellt (3D-2D). Bei einem hohen Anteil der schnellen Komponente sind zwischen den beiden Modellen keine Unterschiede erkennbar und bei einem niedrigen Anteil der schnellen Komponente ist zwischen den beiden Modellen ein sehr geringer Unterschied zu erkennen. **B:** Autokorrelationskurven für zweidimensionale Diffusion mit zwei Komponenten (Gl.(3.23)) mit relativen Anteilen der schnelleren Komponente ( $\tau_{D,1}$ ) von  $f_1 = 0,7, 0,5, 0,3$  und  $0,1$ .

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{\tau}{\tau_\alpha}\right)^\alpha} \quad (3.26)$$

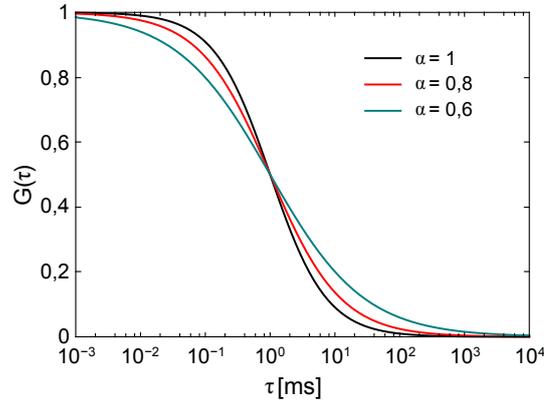
Der Parameter  $\tau_\alpha$  entspricht der mittleren Verweilzeit der Teilchen im fokalen Volumen. Anhand der Anomalität  $\alpha$  kann bei FCS-Messungen zwischen den Transportvorgängen der Subdiffusion ( $\alpha < 1$ ), Superdiffusion ( $\alpha > 1$ ) und der normalen Diffusion ( $\alpha = 1$ ) unterschieden werden.

In Abb. 3.6 sind zur Veranschaulichung Autokorrelationskurven dieser Modellfunktion dargestellt.

### 3.3.5. Störungsfaktoren der Methode FCS

#### Blinken und der Triplet-Zustand von Fluorophoren

Die Emission vieler Fluorophore ist zeitlich nicht konstant, sondern kann auf verschiedenen Zeitskalen fluktuieren und dadurch FCS-Messungen stören. Die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität der Fluorophore können beispielsweise bei ihrer Anregung durch den Übergang eines Elektrons aus dem ersten angeregten Zustand  $S_1$  in den Triplet-Zustand  $T_1$  hervorgerufen werden. Findet dieser Übergang statt, so verweilen die Fluorophore einige Mikrosekunden im sogenannten *Dark State* bis eine Relaxation in den Grundzustand  $S_0$  erfolgt und die Photonenemission wieder einsetzt (*Bright State*). Ein weiterer Grund für das Blinken der Fluorophore sind ihre unimolekularen chemische Reaktionen. Ein Beispiel hierfür ist das Blinken von GFP aufgrund von Protonierungsreaktionen. [73]



**Abbildung 3.6.** Beispiele von Autokorrelationskurven  $G(\tau)$  wie sie bei FCS-Messungen bei zweidimensionaler anomaler Diffusion (Gl. (3.26)) mit einer Diffusionszeit von  $\tau_\alpha = 1$  ms und Anomalitätsgraden von  $\alpha = 0,6$ ,  $0,8$  und  $1$  zu erwarten sind. Je niedriger der Anomalitätsgrad desto größer ist der Unterschied zwischen den Autokorrelationskurven der anomalen ( $\alpha = 0,6$  und  $0,8$ ) und der normalen Diffusion ( $\alpha = 1$ ).

In FCS-Kurven äußern sich diese beiden photophysikalischen Prozesse in Form eines zusätzlichen Beitrags zur Autokorrelation im Bereich von Mikrosekunden. Dieser Beitrag kann bei der Auswertung der FCS-Kurven berücksichtigt werden, indem die Fit-Funktion  $G(\tau)$  mit dem Term  $F_T$  multipliziert wird:<sup>[167]</sup>

$$F_T(\tau) = 1 - f_T + f_T e^{-\frac{\tau}{\tau_T}} \quad (3.27)$$

Hier ist  $\tau_T$  die Relaxationszeit aus dem *Dark State* und  $f_T$  die Fraktion der Fluorophore im *Dark State*. Diese Korrektur wird nicht benötigt, wenn die FCS-Kurven bei Korrelationszeiten im Bereich von  $\tau > 0,001$  ms untersucht werden.

### Photobleaching

Die Anzahl der Photonen, die einzelne Fluorophore emittieren können bevor sie irreversibel gebleicht werden, ist begrenzt.<sup>[110, 116]</sup> Das irreversible Bleichen der Fluorophore wird *Photobleaching* genannt. Im Experiment wird durch das *Photobleaching* die mittlere Fluoreszenzintensität im fokalen Volumen kontinuierlich erniedrigt. Da die Methode FCS auf der Annahme basiert, dass die Fluoreszenzintensität im fokalen Volumen um einen zeitlich konstanten Mittelwert fluktuiert, stellt das *Photobleaching* während einer Messung einen Störungsfaktor dar. Photobleichen der Fluorophore wird vermieden, wenn FCS-Messungen bei möglichst niedrigen Laserleistungen durchgeführt werden.

### Afterpulsing

Bei FCS-Messungen werden typischerweise Avalanche-Photodioden (APD) als Detektoren eingesetzt, die die Anzahl der emittierten Photonen pro Zeitintervall messen. In seltenen Fällen wird unmittelbar nach einem Detektionsereignis im APD durch übrig gebliebene Elektronen ein Nachpuls ausgelöst, der zu einem Detektionsereignis ohne reale Photonen führt. Dieses Phänomen wird *Afterpulsing* genannt.

In FCS-Kurven äußert sich *Afterpulsing* als ein zusätzlicher scharfer Abfall der Kurve im Bereich von Mikrosekunden.<sup>[49]</sup> Korrekturen von *Afterpulsing* sind nicht notwendig, wenn FCS-Kurven bei Korrelationszeiten von  $\tau > 0,001$  ms untersucht werden.

### Hintergrundrauschen

Hintergrundrauschen wird hauptsächlich durch Reflektionen des Laserstrahls an optischen Komponenten des Mikroskops und durch Lichtstreuung an Glasoberflächen erzeugt. Es ist ein Bestandteil des Fluoreszenzsignals bei FCS-Messungen. Da das Hintergrundrauschen unkorreliert ist, wird die Autokorrelation des Fluoreszenzsignals dadurch nicht gestört. Starkes Hintergrundrauschen erhöht jedoch die mittlere detektierte Fluoreszenzintensität  $F(t)$  und verfälscht dadurch die gemessene Konzentration der Fluorophore. Die Korrektur des Hintergrundrauschens erfolgt durch die Multiplikation der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  mit dem Faktor  $K$ :

$$K = \left(1 - \frac{\langle H \rangle}{\langle F(t) \rangle}\right)^2 \quad (3.28)$$

Hier ist  $\langle H \rangle$  die mittlere Intensität des Hintergrunds und  $\langle F(t) \rangle$  ist die mittlere detektierte Fluoreszenzintensität während der Messung. Wird bei Messungen ein auf das Emissionsspektrum des Fluorophors abgestimmtes Filtersystem und ein stabiler Laser verwendet, um ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu erreichen, ist diese Korrektur nicht notwendig.

## 3.4. Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)

### 3.4.1. Einführung

Die Methode *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP) ist neben FCS eine weitere fluoreszenzbasierende Methode, die es ermöglicht dynamische Prozesse mit einer hohen zeitlichen und räumlichen Auflösung zu untersuchen. Sie wurde annähernd gleichzeitig mit der Methode FCS in den 1970-er Jahren entwickelt.<sup>[13,91,100]</sup> FRAP zeichnet sich durch eine vergleichsweise unkomplizierte Durchführung der Messungen aus. Es werden zunächst die Fluorophore einer Probe innerhalb einer ausgewählten *Region Of Interest* (ROI) durch Bestrahlung mit hoher Lichtdosis irreversibel gebleicht. Typischerweise findet nach dem Bleichschritt die Erholung der Fluoreszenzintensität in der ROI statt, die im Experiment zeitlich verfolgt wird. Die Fluoreszenzerholung findet durch Prozesse statt, bei denen die gebleichten durch intakte Fluorophore ersetzt werden. Im Wesentlichen tragen zum Austausch der Fluorophore molekulare Transportvorgänge (z.B. Diffusion) und Reaktionen bei. Durch Fitten der FRAP-Kurven, die den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzintensität in der ROI darstellen, an geeignete Modellfunktionen lassen sich aus den Messungen die zugrundeliegenden Austauschprozesse der Fluorophore einer Probe physikalisch charakterisieren.

Die Anwendung der Methode FRAP in lebenden Zellen wurde mit der Entwicklung der konfokalen Mikroskopie und der Methode zur Markierung beliebiger Proteine in lebenden Zellen mit GFP möglich. Hier kann FRAP beispielsweise zur Quantifizie-

nung von Reaktionskinetiken der Proteine im Nukleus<sup>[146]</sup> oder auf intrazellulären Membranen<sup>[48,119]</sup> verwendet werden. Prinzipiell ist es auch möglich die Diffusion der Proteine im Zytoplasma<sup>[138]</sup> oder auf zellulären Membranen<sup>[33]</sup> mittels FRAP zu untersuchen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass in solchen Fällen die Resultate von FRAP-Messungen sehr stark von den gewählten Messparametern (z.B. Bleichintervall) abhängen<sup>[161]</sup> und sich aus diesem Grund nur bedingt für die Untersuchungen von diffusiven Prozessen eignen. Die Methode FCS bietet hierzu eine wesentlich genauere Messmethode.

Im Weiteren wird die experimentelle Durchführung sowie die Störungsfaktoren der Messmethode näher erläutert. Es werden zusätzlich die gängigen Modellfunktionen für die Auswertung von FRAP-Kurven vorgestellt. Dabei werden nur die grundlegenden Aspekte dieser Modelle besprochen, da in dieser Arbeit keines der Modelle verwendet wurde, sondern ein eigenes Modell für die Analyse von Reaktionskinetiken peripherer Membranproteine entwickelt wurde.

### 3.4.2. Ablauf der FRAP-Messungen

Für FRAP-Experimente werden typischerweise konfokale Fluoreszenzmikroskope (CLSM oder Spinning-Disk-Mikroskope) mit Photomultipliern (PMT) als Detektoren verwendet.

Bei der Durchführung eines FRAP-Experiments wird eine zeitliche Serie von Fluoreszenzbildern vor und nach dem Bleichen der Fluoreszenz in der ausgewählten ROI aufgenommen. Der Ablauf einer FRAP-Messung kann dabei in drei Phasen eingeteilt werden. In der *Prebleach*-Phase werden Fluoreszenzbilder der ROI vor dem Bleichen aufgenommen. Diese Bilderserie dient zur Bestimmung der Ausgangsfluoreszenzintensität in der ROI ( $F_0$ ). Darauf folgt die *Bleach*-Phase, in der das irreversible Bleichen der Fluorophore erfolgt. Die Fluoreszenzintensität in der ROI fällt dabei auf den Wert  $F_{\text{ROI}}^\infty \cdot f$  ab. Typischerweise werden dabei ca. 40–60 % der Ausgangsfluoreszenz gebleicht. In der Schlussphase, *Postbleach*, werden Bilder der ROI über eine ausreichend lange Zeitperiode aufgenommen, die zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzerholung nach dem Bleichen dienen. Eine FRAP-Messung ist abgeschlossen, wenn die Fluoreszenzintensität in der ROI einen zeitlich konstanten Wert ( $F_{\text{ROI}}^\infty$ ) erreicht.

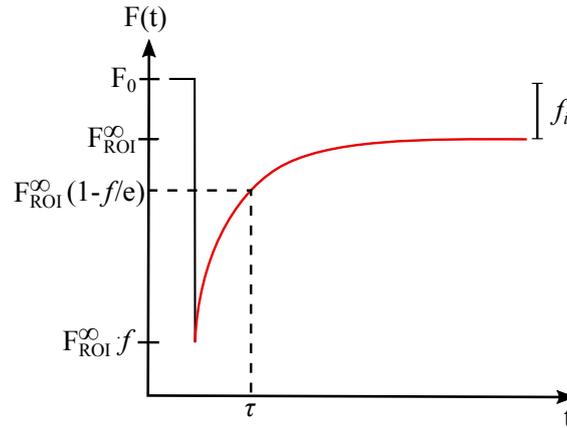
Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in der ROI  $F_{\text{ROI}}(t)$  lässt sich aus den aufgenommen Bildserien mit gängigen Bildverarbeitungsprogrammen, wie z.B. ImageJ, bestimmen. In Abb. 3.7 ist eine solche FRAP-Kurve schematisch dargestellt.

### 3.4.3. Auswertung der FRAP-Messungen

#### Allgemeine Charakterisierung der FRAP-Kurven

Die Kurven einer FRAP-Messung werden anhand von den Parametern der Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und der immobilen Fraktion  $f_i$  charakterisiert, die sich direkt aus den Kurven abgelesen lassen. Alternativ dazu können FRAP-Kurven durch Fitten mit geeigneten Modellfunktionen ausgewertet werden.

Bei der direkten Auswertungsmethode ist die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Zeitpunkt, bei dem sich die Fluoreszenzintensität in der ROI zur Hälfte erholt hat. Alternativ zu  $t_{1/2}$



**Abbildung 3.7.** Skizze einer FRAP-Kurve: Die Ausgangsfluoreszenzintensität  $F_0$  in der ROI wird mit hoher Lichtdosis gebleicht und fällt auf einen Wert von  $F_{ROI}^\infty \cdot f$  ab. Anschließend findet die Erholung der Fluoreszenz in der ROI (rot markiert) mit einer charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  statt. Nach abgeschlossener Fluoreszenzerholung weist die Fluoreszenz der ROI einen zeitlich konstanten Wert von  $F_{ROI}^\infty$  auf. Die immobile Fraktion  $f_i$  ist der Anteil der Ausgangsfluoreszenzintensität  $F_0$ , der sich während des Experiments nicht erholt hat.

kann aus FRAP-Kurven die charakteristische Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  bestimmt werden. Hierzu werden die FRAP-Kurven mit der einfach-exponentiellen Funktion (3.29) gefittet.

$$F_{ROI}(t) = F_{ROI}^\infty \left(1 - f e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \quad (3.29)$$

Der Parameter  $\tau$  ist der Zeitpunkt, bei dem die Fluoreszenzintensität der ROI einen charakteristischen Wert von  $F_{ROI}^\infty \left(1 - \frac{f}{e}\right)$  erreicht hat. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  und die charakteristische Erholungszeit  $\tau$  hängen wie folgt zusammen:

$$t_{1/2} = \tau \cdot \ln(2) \quad (3.30)$$

Die immobile Fraktion  $f_i$  ist der Anteil der Ausgangsfluoreszenzintensität  $F_0$  der ROI, der sich während der Messung nicht erholt hat und wird bestimmt nach:

$$f_i = \frac{F_0 - F_{ROI}^\infty}{F_0 - F_{ROI}^\infty \cdot f} \quad (3.31)$$

Eine immobile Fraktion kann grundsätzlich aufgrund von längeren Verweilzeiten der Fluorophore in der ROI entstehen. Hierbei wird ein Teil der gebleichten Fluorophore während der Messung nicht ausgetauscht, so dass diese Fluorophore auf der Zeitskala der Messung immobil sind. Ein weiterer Faktor, der zum Auftreten einer immobilen Fraktion beiträgt, ist das irreversible Bleichen eines Teils der Fluorophore bei einer FRAP-Messung. Dieser Vorgang stellt eine Störung dar, die zur einer Erniedrigung der Gesamtfluoreszenz des Systems führt. Während der Fluoreszenzerholung findet der Ausgleich der Fluoreszenz im System statt. Aufgrund der erniedrigten Gesamtfluoreszenz des Systems kann jedoch der Ausgangswert der Fluoreszenzintensität der ROI nicht mehr erreicht werden.

### 3.4.4. Modelle von physiko-chemischen Prozessen während der Fluoreszenzerholung

#### Reine Diffusion

Die Herleitung aller bekannter FRAP-Modelle für die normale Diffusion basieren auf der Diffusionsgleichung (siehe Abs. 2.1). Für zweidimensionale Diffusion lautet diese:

$$\frac{\partial C(x, y, t)}{\partial t} = D \left( \frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C(x, y, t)}{\partial y^2} \right) \quad (3.32)$$

Hier ist  $D$  der Diffusionskoeffizient und  $C(x, y, t)$  die Konzentration der Teilchen an der Position  $x, y$  zum Zeitpunkt  $t$ . Mit bestimmten Anfangs- und Randbedingungen lassen sich für Gl. (3.32) Lösungen  $C(x, y, t)$  finden, die die Konzentration der Fluorophore als Funktion von Raum und Zeit beschreiben. Modellfunktionen, die zur Analyse von FRAP-Messungen verwendet werden, sind typischerweise Integrale einer bestimmten Lösung von Gl. (3.32) über die ROI. In den Modellfunktionen müssen dementsprechend die Geometrien der ROI berücksichtigt werden.

In FRAP-Experimenten werden oft kreisförmige Geometrien der ROI verwendet. Die dazugehörigen Modelle stammen von Axelrod et al.<sup>[13]</sup> für einen Spot mit einem Gauß-Profil als ROI und von Soumpasis et al.<sup>[145]</sup> für eine kreisförmige ROI mit einem Durchmesser von  $r > 3 \mu\text{m}$ . Die Modellfunktion für eine kreisförmige ROI nach Soumpasis et al.<sup>[145]</sup> lautet:

$$F(t) = \exp\left(\frac{-2\tau_F}{t}\right) \left[ I_0\left(\frac{2\tau_F}{t}\right) + I_1\left(\frac{2\tau_F}{t}\right) \right] \quad (3.33)$$

Hier sind  $I_0$  und  $I_1$  die modifizierten Bessel-Funktionen und  $\tau_F$  ist die charakteristische Diffusionszeiten. Der Diffusionskoeffizient  $D$  der diffundierenden Teilchen in der ROI wird bestimmt nach:

$$D = \frac{r^2}{4\tau_F} \quad (3.34)$$

Der Parameter  $r$  entspricht dem Durchmesser der verwendeten kreisförmigen ROI.

#### Diffusionslimitierte Reaktionen

Neben der Diffusion können bei FRAP-Messungen Reaktionen der Fluorophore mit immobilen Strukturen in der ROI zur Fluoreszenzerholung beitragen. Im diffusionslimitierten Fall findet die Reaktion sehr viel schneller statt, als der Transport der Moleküle durch Diffusion, so dass die Fluoreszenzerholung nur von der Diffusionszeit der Fluorophore abhängt. Die Analyse der FRAP-Experimente kann in diesem Fall mit der Modellfunktion (3.33) nach Soumpasis et al.<sup>[145]</sup> erfolgen. Aufgrund der Reaktion lässt sich hierbei aus der Diffusionszeit  $\tau_F$  ein effektiver Diffusionskoeffizient  $D_{\text{eff}}$  bestimmen:

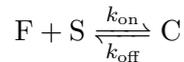
$$\tau_F = \frac{r^2}{4D_{\text{eff}}} \quad \text{mit} \quad D_{\text{eff}} = \frac{D}{1 + k_{\text{on}}^*/k_{\text{off}}} \quad (3.35)$$

Die Parameter  $k_{\text{on}}^*$  und  $k_{\text{off}}$  sind die Assoziations- und Dissoziationsraten für die Reaktion.

## Reine Reaktion

Im reaktionslimitierten Fall findet der Transport der Fluorophore auf der Zeitskala einer FRAP-Messung nahezu instantan statt, während der Prozess der Assoziation und der Dissoziation der Moleküle mit einer immobilen Struktur (z.B. Membranen von Organellen) innerhalb der ROI deutlich langsamer ist.

Mathematische Modelle für diese Art der Fluoreszenzerholung basieren auf der Betrachtung einer Gleichgewichtsreaktion zwischen den Fluorophoren F und der Struktur S zu einem Komplex C mit den Reaktionsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ :



Autoren mehrerer Publikationen (Bulinski et al.,<sup>[27]</sup> Kaufman et al.,<sup>[89]</sup> Sprague et al.<sup>[146]</sup>) kommen zu dem Ergebnis, dass die Fluoreszenzerholung im reaktionslimitierten Fall durch die einfach-exponentielle Funktion (3.36) beschrieben wird und die charakteristische Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  (vgl. Gl. (3.29)) dabei ausschließlich von der Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  abhängt.

$$F(t) = 1 - C_{\text{eq}} e^{-k_{\text{off}} t} \quad \text{mit} \quad k_{\text{off}} = \frac{1}{\tau} \quad (3.36)$$

In der vorliegenden Arbeit wurde der reaktionslimitierte Fall näher untersucht. Die Untersuchungen ergaben, dass Gl. (3.36) nur einen Grenzfall der reaktionslimitierten Fluoreszenzerholung beschreibt. Tatsächlich wird die Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  nicht nur von der Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  bestimmt, sondern kann von weiteren Parametern wie der Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$  und der Größe der gebleichten ROI abhängen. Detaillierte Besprechung dieser Untersuchungen befinden sich in Kap.II dieser Arbeit und in der Publikation,<sup>[78]</sup> die kürzlich zu diesem Projekt erschienen ist.

### 3.4.5. Störungsfaktoren der Methode FRAP

#### Photobleichen während der *Postbleach*-Phase

Durch die Anregung der Fluorophore wird ihre Reaktivität erhöht. Reaktionen der Fluorophore im angeregten Zustand mit weiteren Substanzen des Systems führen oft zu ihrem Photobleichen. Findet dieses Photobleichen während der Fluoreszenzerholung (*Postbleach*-Phase) statt, so sinkt die Fluoreszenzintensität in der ROI stetig ab, so dass die zeitabhängigen Parameter einer FRAP-Kurve (z.B. Halbwertszeit  $t_{1/2}$ ) beeinflusst werden. Starkes Photobleichen ist in FRAP-Kurven deutlich sichtbar und äußert sich in Form einer sinkenden Fluoreszenzintensität der ROI in der Schlussphase der Fluoreszenzerholung.

Das Photobleichen der Fluorophore während der *Postbleach*-Phase kann vermindert werden, indem für die Aufnahmen der Bilder möglichst niedrige Laserintensitäten und kurze Belichtungszeiten gewählt werden. Insbesondere eignet sich hierfür die Vorgehensweise, bei der die Zeitintervalle  $\gamma$  zwischen den Bildaufnahmen während einer Messung variiert werden. Direkt nach der *Bleach*-Phase steigt die Fluoreszenzintensität typischerweise schnell an und zeigt im weiteren Verlauf der Fluoreszenzerholung eine geringe zeitliche Änderung. Dementsprechend kann bei einer Messung der an-

fängliche Anstieg der Fluoreszenzintensität mit einer hohen zeitlichen Auflösung ( $\gamma < 1$  s) detektiert werden und in der Schlussphase der Fluoreszenzerholung kann die Häufigkeit der Bildaufnahmen erniedrigt ( $\gamma > 1$  s) werden.

Zusätzlich kann das Photobleichen nachträglich gemäß Gl. (3.37) korrigiert werden:

$$F_{\text{ROI}}(t) = \frac{F(t) - F_b}{F_{\text{corr}}(t) - F_b} \quad (3.37)$$

Für die Korrektur werden neben der eigentlichen FRAP-Kurve  $F(t)$ , die Fluoreszenzintensität des Hintergrunds (z.B. außerhalb einer Zelle)  $F_b$  und das Fluoreszenzsignal  $F_{\text{corr}}(t)$  einer weiteren ROI aus einem Bereich der FRAP-Bilder, der während der Messung nicht gebleicht wurde, benötigt.

### Reversibles Photobleichen von GFP

Für FRAP und andere Experimente in lebenden Zellen wird heutzutage die photostabilere GFP-Variante EGFP<sup>[35,74,75]</sup> verwendet. Werden diese Fluorophore mittels hoher Lichtdosis gebleicht, so kann es vorkommen, dass diese nach kurzer Zeit wieder Licht emittieren. Diese Eigenschaft wird als reversibles Photobleichen bezeichnet. Die Halbwertszeit  $t_{1/2,\text{rp}}$  für reversibles Photobleichen von EGFP beträgt *in vitro*  $t_{1/2,\text{rp}} = 1,5 - 5,5$  ms,<sup>[152]</sup> kann jedoch in lebenden Zellen im Bereich von Sekunden liegen.<sup>[144]</sup>

Das reversible Photobleichen der Fluorophore stellt bei FRAP-Messungen eine Störung dar, da hierbei die Fluoreszenzerholung nicht aufgrund von molekularen Prozessen (z.B. Diffusion, Reaktionen) stattfindet, sondern aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften der Fluorophore.

Reversibles Photobleichen wird bei FRAP-Experimenten vermieden, wenn die Fluorophore während der *Bleach*-Phase durch die Wahl geeigneter Belichtungsparameter effektiv und irreversibel gebleicht werden. Die Effektivität des Bleichvorgangs wird beispielsweise erhöht, indem zum Bleichen mehrere Laserlinien (für GFP/EGFP 476 nm, 488 nm und 496 nm) mit hohen Laserintensitäten verwendet werden.

### Phototoxizität

Laserstrahlung kann Störungen in biologischen Proben verursachen oder zu ihrer Zerstörung beitragen (siehe Übersichtsartikel von Magidson et al.<sup>[103]</sup>). Diese negativen Effekte der Laserstrahlung werden unter dem Begriff *Photodamage* zusammengefasst. Zum *Photodamage* während der FRAP-Experimente tragen insbesondere zwei Prozesse bei: (I) lokales Erhitzen der Zellen<sup>[12]</sup> und (II) photochemisches Erzeugen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikale.<sup>[22,131,174,175]</sup> ROS und freie Radikale entstehen, als Nebenprodukte des Photobleichens der Fluorophore. Reaktionen der Zellbestandteile (Proteine, Lipide, DNA) mit diesen Substanzen können sowohl die Physiologie der Zellen beeinflussen<sup>[55,67]</sup> als auch zur Apoptose führen.<sup>[143]</sup>

*Photodamage* kann zum Teil durch die Verwendung natürlicher Antioxidantien (Glutathion, Ascorbinsäure und Tocopherol (Vitamin E)) verringert werden.<sup>[37]</sup> Der Nachteil dieser Substanzen ist jedoch, dass sie ihrerseits die Physiologie der Zellen beein-

flussen können. Eine weitere Maßnahme zum Vermeiden von *Photodamage* ist es milde Bildaufnahmeparameter und ein auf das Emissionsspektrum der Fluorophore abgestimmtes Filtersystem zu verwenden, um unnötiges Belichten von Zellen zu vermeiden. Da Photobleichen ein wesentlicher Bestandteil jeder FRAP-Messung ist, sollte hierbei darauf geachtet werden die Anzahl von FRAP-Experimenten pro Zelle gering zu halten.

#### **„Corona“-Effekt und weitere Störungen bei Diffusionsmessungen mittels FRAP**

In einem FRAP-Experiment findet im Idealfall das Bleichen der Fluorophore in der ROI instantan statt, so dass diese direkt nach der *Bleach*-Phase eine klar definierte Grenze zur ungebleichten Region der Probe aufweist. In modernen konfokalen Mikroskopen nimmt der Bleich-Vorgang eine bestimmte Zeit in Anspruch, da hierzu die ROI gescannt werden muss. Dies stellt bei FRAP-Messungen, bei denen die Diffusion der Fluorophore zur Fluoreszenzerholung beiträgt, einen kritischen Punkt dar, da während dieser Zeit am Rand der gebleichten ROI bereits Austausch von Fluorophoren durch Diffusion stattfindet. Die Grenze zwischen der gebleichten ROI und der ungebleichten Region ist dadurch nicht mehr genau definiert. Durch diesen Effekt kommt es zur Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Diffusionszeiten und der dazugehörigen Diffusionskoeffizienten. Bereits bei fünf Bleichwiederholungen (Anzahl der Scans zum Bleichen der ROI) kann der gemessene Diffusionskoeffizient 50 % niedriger sein als der tatsächliche Diffusionskoeffizient der diffundierenden Partikel.<sup>[161]</sup> In lebenden Zellen werden Diffusionsmessungen auf intrazellulären Membranen mittels FRAP durch die Struktur der Membranen beeinträchtigt, da diese nicht planar sind, sondern beispielsweise tubuläre oder wellenartige Strukturelemente aufweisen.<sup>[4]</sup> Aufgrund dieser Störungen ist die Methode FRAP insbesondere für Diffusionsmessungen in lebenden Zellen weniger gut geeignet.

**Teil II.**

**Einfluss der Geometrie der  
Organellen auf die Vermessung der  
Bindungskinetiken peripherer  
Membranproteine mittels FRAP**



## 4. Einleitung

Periphere Membranproteine zeichnen sich durch die Eigenschaft aus transiente Interaktionen mit intrazellulären Membranen eingehen zu können. Diese Eigenschaft macht sie bei zahlreichen intrazellulären Prozessen wie Signaltransduktion und Sekretion zu wichtigen Akteuren. Viele Beispiele solcher Proteine lassen sich in der Proteinfamilie kleiner GTPasen finden, die durch ihre reversible Assoziation und Dissoziation mit Lipidmembranen, regulierende Funktionen bei solchen Prozessen übernehmen.

Die Proteine der Familie Ras, beispielsweise, setzen durch ihre Assoziation mit der Plasma-Membran zahlreiche Signaltransduktionswege in Gang.<sup>[121]</sup> Im frühen sekretorischen Pfad ist die reversible Anbindung der kleinen GTPasen Sar1 an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und von Arf1 an die Membran des Golgi-Apparats ein wichtiger Schritt für die Entstehung der COPII- und COPI-Vesikel,<sup>[10,57,97]</sup> die für den intrazellulären Transport von Proteinen und anderen Zellbestandteilen benötigt werden.

Für den regulären Ablauf dieser Prozesse ist die Verweilzeit der peripheren Proteine auf ihren Targetmembran ein wichtiger Faktor. So ist beispielsweise für eine ordnungsmäßige Abschnürung gefüllter COPII- und COPI-Vesikel aus den Membranen des ER und des Golgis die Verweilzeit von Sar1 auf der ER-Membran und von Arf1 auf der Golgi-Membran entscheidend.<sup>[57,95,164]</sup>

Experimentell gemessene Verweilzeiten von Proteinen auf Membranen von Organellen dienen häufig als Vorlage für die Untersuchung intrazellulärer Prozesse mittels computergestützten Modellierung und Simulationen.<sup>[6,53,76,115]</sup> Für die Vermessung der Verweilzeiten von Proteinen auf Membranen von Organellen in lebenden Zellen hat sich die Methode FRAP etabliert (siehe Abs. 3.4).

Bei FRAP-Experimenten von peripheren Membranproteinen tragen im Allgemeinen zwei Prozesse zur Fluoreszenzerholung bei: (I) das Rein- und Rausdiffundieren fluoreszierender Proteine in und aus der ROI und (II) Reaktionen, d.h. die Assoziation und die Dissoziation, der Proteine mit immobilisierbaren intrazellulären Strukturen.

Der Beitrag der Diffusion zur Fluoreszenzerholung kann vernachlässigt werden, wenn die Diffusion eines Proteins deutlich schneller stattfindet als seine Reaktion mit einer Membran und ebenfalls schneller ist als die Messdauer des FRAP-Experiments.<sup>[146]</sup>

In diesem Fall findet der Austausch der frei diffundierenden gebleichten Partikel unmittelbar nach dem Bleichen, also instantan, statt. Die Fluoreszenzerholung bei längeren Messzeiten hängt demnach nur von dem zeitlichen Ablauf der Reaktion der Proteine mit der Membran ab.

Ein kleines peripheres Membranprotein Arf1, beispielsweise, weist im Zytosol einen von Diffusionskoeffizienten von  $15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ <sup>[48]</sup> und eine typische Verweilzeit auf der Golgi-Membran von 10 s. Mit einem solchen Diffusionskoeffizienten kann das Protein innerhalb von  $\sim 2$  s eine Fläche von  $\sim 100 \mu\text{m}^2$  durchqueren, die etwa der Querschnittsfläche eines Golgi-Apparats entspricht. Die Reaktion, d.h. der Assoziations-Dissoziationszyklus, von Arf1 mit der Golgi-Membran dauert allerdings etwa fünfmal länger. Bleichen einer ROI, die nur die Membran des Golgi-Apparats umschließt, führt demnach zu einer Fluoreszenzerholungskurve, die ab ca. 2 s nach dem Bleichen nur durch die Reaktion von Arf1 mit der Golgi-Membran dominiert wird.

Die Annahme eines instantanen Transports der frei diffundierenden Proteine und einer im Vergleich dazu langsamen Reaktion der Proteine mit einer intrazellulären Struktur führt zu der Entkopplung des räumlichen Aufenthalts der Proteine und ihres zeitabhängigen Austausches an der betrachteten Struktur. Aus diesem Grund wird in einem solchen Fall bei FRAP-Experimenten häufig angenommen, dass die Größe der intrazellulären Struktur, an der die Reaktion der Proteine stattfindet, keinen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzerholung hat. Die Fluoreszenzerholungszeit eines peripheren Membranproteins gemessen auf seiner intrazellulären Targetstruktur gilt aus diesem Grund im Allgemeinen als ein verlässliches Maß für die Reaktionskinetik des betrachteten Proteins mit der Targetstruktur.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Größe der Targetstruktur auf die Fluoreszenzerholungszeiten peripherer Membranproteine bei FRAP-Experimenten untersucht. Ausgehend von einem einfachen Assoziations-Dissoziationszyklus eines Proteins auf einer intrazellulären Membran wurde ein mathematisches Modell entwickelt, das die Fluoreszenzerholung in FRAP-Experimenten beschreibt. Insbesondere wurden dabei zwei Fälle untersucht. Im ersten Fall sind in der Zelle für das betrachtete Protein mehrere kleine Targetmembranen enthalten, von denen im FRAP-Experiment eine gebleicht wird. Im zweiten Fall beinhaltet die Zelle eine große Targetmembran für das Protein, die im FRAP-Experiment als Ganzes gebleicht wird. Nach dem Modell wird die Fluoreszenzerholungszeit eines peripheren Membranproteins durch die Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$ , die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  und die Größe der Targetmembran beeinflusst.

Das entwickelte Modell wurde experimentell überprüft, indem für das Protein Arf1 auf (I) einem von mehreren Golgi-Membran Fragmenten und (II) einem ganzen Golgi-Apparat die Reaktionsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  aus FRAP-Messungen bestimmt wurden. Die gewonnenen Erkenntnisse der hier vorgestellten Untersuchungen trugen zu der Publikation von Hoffmann et al. [78] bei.

## 5. Methoden

### 5.1. Zellkultur und Probenpräparation

#### 5.1.1. Zellkultur

Für die Untersuchungen wurden CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Wildtyp-Zellen im RPMI 1640 Nährmedium (Hrst. Gibco) mit 10 % fötalen Kälberserum, 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin in Zellkulturflaschen (Corning, 25  $\mu\text{m}^2$ ) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Mikroskopie wurden die Zellen in den Mikroskopie-Behältern  $\mu$ -Slide (ibiTreat, 2 Kammern, No. 1,5, Hrst. Ibi) gezüchtet. Pro Kammer eines  $\mu$ -Slide wurde 1,5 ml Nährmedium verwendet.

#### 5.1.2. Transfektion der Zellen

Die Zellen wurden mit dem Plasmid Arf1-GFP<sup>[48,119]</sup> transfiziert. Es wurde das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Hrst. Promega) verwendet. Entsprechend der Herstelleranleitung wurden 2  $\mu\text{l}$  FuGENE 6 und 1  $\mu\text{g}$  DNA in 100  $\mu\text{l}$  Opti-MEM GlutaMax Medium (zusatzfrei, Hrst. Gibco) gelöst und 15 min bei RT inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Nährmedium der Zellen durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden danach mit je 100  $\mu\text{l}$  Transfektionslösung pro Kammer eines  $\mu$ -Slide versetzt und 18–24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 5.1.3. Fragmentierung des Golgi-Apparats in Zellen

Die Fragmentierung des Golgi-Apparats wurde an transfizierten Zellen mit dem Reagenz Nocodazol durchgeführt.<sup>[32,150]</sup> Vor der Behandlung wurde das Nährmedium der Zellen durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden danach mit je 3  $\mu\text{l}$  einer Nocodazol-Stammlösung (3 mg Nocodazol in 1 ml DMSO, 10 mmol/l) pro Kammer eines  $\mu$ -Slide versetzt und 3–6 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 5.1.4. Probenpräparation für die Mikroskopie

Für die Untersuchungen der Zellen am konfokalen Mikroskop wurde ein farbstofffreies *Imaging*-Medium bestehend aus MEM (ohne Phenolrot, Hrst. Gibco), 5 % fötalen Kälberserum und 50 mmol/l HEPES verwendet. Bei Zellen mit einem fragmentierten Golgi-Apparat wurde das *Imaging*-Medium mit 3  $\mu\text{l}$  der Nocodazol-Stammlösung (s.o.) pro Kammer eines  $\mu$ -Slide ergänzt.

## 5.2. Experimentelle Methoden

### 5.2.1. Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein Leica TCS SP5 konfokales Laser-Scanning-Mikroskop mit einem 63 $\times$ /1,2 NA Wasserimmersionsobjektiv verwendet. Alle Mikroskopie-Experimente wurden bei 37 °C in einer am Lehrstuhl angefertigten Inkubationskammer durchge-

führt.

Die Anregung der Fluorophore erfolgte gemäß des Absorptionsmaximums von GFP (siehe Abb. 3.1) bei 488 nm mit einem 65 mW Argon-CW-Laser. Die Fluoreszenz wurde im Bereich von 500–600 nm mit einem Photomultiplier detektiert. Für die Bildaufnahme wurde der bidirektionale Scan-Modus mit einer Scannerfrequenz von 700 Hz verwendet. Um eine möglichst dicke Probenschicht optisch zu untersuchen wurde die Lochblende des Mikroskops auf 4 *Airy Units* (AU) geöffnet.

### 5.2.2. Durchführung der FRAP-Experimente

Vor jedem FRAP-Experiment wurden von jeder gemessenen Zellen ein Bild aufgenommen, auf dem die Fluoreszenz der gesamten Zellen abgebildet wurde. Dazu wurde ein Bildformat von  $512 \times 512$  Pixel und ein elektronischer Zoomfaktor von  $5\times$  verwendet. Pro Bild wurde eine Gesamtfläche von  $49,2 \mu\text{m} \times 49,2 \mu\text{m}$  gescant. Die Aufnahmen einzelner vollständiger Zellen wurden zur Kontrolle bei einigen Messungen nach einem FRAP-Experiment wiederholt.

Für anschließende FRAP-Messungen wurde ein Bildformat von  $256 \times 256$  Pixel und ein elektronischer Zoomfaktor von  $10\times$  benutzt. Insgesamt wurde pro Frame eine Fläche von  $24,6 \mu\text{m} \times 24,6 \mu\text{m}$  gescant. Das Zeitintervall zwischen den Bildaufnahmen betrug 190 ms. In unbehandelten Zellen mit intakten Golgi-Apparaten ( $\text{ROI} \sim 60 \mu\text{m}^2$ ) bestand ein FRAP-Experiment aus fünf Frames vor dem Bleichen (*Prebleach*), zwei Frames während des Bleichens (*Bleach*) und 700 Frames nach dem Bleichen (*Postbleach*). Bei FRAP-Experimenten an kleinen Golgi-Fragmenten ( $\text{ROI} \sim 2 \mu\text{m}^2$ ) in mit Nocodazol behandelten Zellen wurden zwei *Prebleach*-Frames, ein *Bleach*-Frame und 700 *Postbleach*-Frames verwendet. Für möglichst effektives Bleichen der ROI wurde der Zoom-In-Modus verwendet. Zusätzlich wurde das Bleichen der Fluorophore mit mehreren Argon-Laserlinien (476 nm, 488 nm und 496 nm) durchgeführt. Die relativen Intensitäten der Laserlinien wurden dabei so angepasst, dass die Fluoreszenzintensität in der ROI beim Bleichvorgang um etwa 50 % gesenkt wurde.

### 5.2.3. Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten, Volumina und der Fluoreszenzerholungszeiten

Die Auswertung der Bilder einzelner Zellen und der FRAP-Experimente wurde mit dem Programm ImageJ/FIJI<sup>[1]</sup> durchgeführt.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten des Zytosols ( $F_c^\infty$ ) und der gebleichten Golgi-Membran ( $F_{\text{ROI}}^\infty$ ) im stationären Zustand wurden Fluoreszenzbilder einzelner vollständiger Zellen, die vor jedem FRAP-Experiment aufgenommen wurden, verwendet. Die Parameter  $F_c^\infty$  und  $F_{\text{ROI}}^\infty$  wurden als die Summen der Pixelwerte im Zytosol und in der ROI bestimmt.

Zur Abschätzung des Volumenverhältnisses  $V_c/V_{\text{ROI}}$  zwischen dem Zytosol ( $V_c$ ) und der ROI ( $V_{\text{ROI}}$ ) wurden die Summen der Pixelflächen des Zytosols und der gebleichten Golgi-Membran (ROI) bestimmt.

Bei unbehandelten Zellen wurden die Parameter  $F_c^\infty$ ,  $F_{\text{ROI}}^\infty$  und  $V_c/V_{\text{ROI}}$  anhand der Originalaufnahmen, ohne zusätzliche Bearbeitung der Bilder, bestimmt. Bei Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, wurde für die Bestimmung dieser Parameter ein Matlab-Skript (von R. Fickentscher, Lehrstuhl Prof. Dr. M. Weiss, Universi-

tät Bayreuth) verwendet, mit dem das Fluoreszenzsignal der Golgi-Fragmente von dem Fluoreszenzsignal des Zytoplasmas separiert wurde. Dazu wurden die Pixel der Golgi-Fragmente lokalisiert, ausgeschnitten und um den Wert der mittleren Zytoplasma-Fluoreszenz korrigiert.

Bei FRAP-Messungen in Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, wiesen die gebleichten Golgi-Fragmente oft Eigenbewegungen auf, die über die Grenzen der fest positionierten ROI hinaus gingen. Bei der Auswertung der Experimente wurde aus diesem Grund die Bewegung der gebleichten Golgi-Membran nachverfolgt, indem mit dem Programm ImageJ für jedes Frame einer FRAP-Bildserie die Position der ROI individuell definiert wurde. Die Fluoreszenzintensitäten zu jedem Zeitpunkt des FRAP-Experiments wurden dabei als Summen der Pixelwerte in der ROI bestimmt. Die charakteristischen Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  wurden durch Fitten der FRAP-Kurven an die einfach-exponentielle Funktion (3.29) bestimmt.



## 6. Ergebnisse

### 6.1. Entwicklung des mathematischen Modells

Das vorgestellte Modell für die Fluoreszenzerholung in FRAP-Experimenten an peripheren Membranproteinen auf Targetmembranen in einer Zelle wurde in Diskussion mit Prof. Dr. Weiss (Lehrstuhl Experimentalphysik I, Universität Bayreuth) entwickelt. Mathematisch wurde das Modell erstmals von Prof. Dr. Weiss ausformuliert.

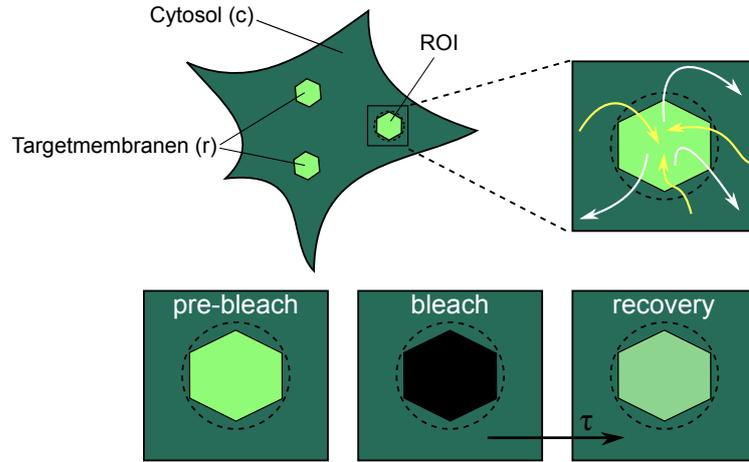
In Abb. 6.1 ist ein FRAP-Experiment an einer von mehreren Targetmembranen in einer Zelle schematisch dargestellt. Die Fluoreszenzerholung wird im Experiment durch den Austausch der Proteine an der gebleichten Targetmembran angetrieben. Dieser Austausch findet durch die Reaktion der Proteine mit der Targetmembran statt und wird im Modell als ein einfacher Assoziations-Dissoziationsprozess betrachtet. Die Proteine binden an die Targetmembran aus dem Zytosol und kehren zurück ins Zytosol nachdem sie von der Membran dissoziiert sind. In den drei Zellbereichen, Zytosol (c), gebleichte Targetmembran (ROI) und die restlichen ungebleichten Membranen (r), lassen sich die Parameter der Teilchenzahlen  $N_c$ ,  $N_{ROI}$ ,  $N_r$  und der Volumina  $V_c$ ,  $V_{ROI}$ ,  $V_r$  definieren. Die Gesamtzahl der Proteine in der Zelle  $N_{tot}$  und das Gesamtvolumen der Zelle  $V_{tot}$  setzen sich aus der Summe der Teilchenzahlen und der Volumina der drei Teilbereiche c, ROI und r zusammen.

Im Gleichgewichtszustand lässt sich der Assoziations-Dissoziationsprozess eines peripheren Membranproteins mit seiner Targetmembran als ein Adsorption-Desorption-Zyklus durch eine Langmuir-Isotherme<sup>[38]</sup> (Gl.(6.1)) beschreiben. Die individuellen Eigenschaften verschiedener Proteinspezies sowie die potenzielle Inhomogenität von Targetmembranen werden hierbei vernachlässigt.

$$\theta = \frac{cK}{1 + cK} \quad (6.1)$$

Der Parameter  $K$  ist die Adsorptionskonstante im Gleichgewicht,  $c = N_c/V_c$  ist die Konzentration der Proteine im Zytosol und  $\theta = (N_r + N_{ROI})v/(V_r + V_{ROI})$  ist der Belegungsgrad aller Targetmembranen mit  $v$  dem Volumen eines einzelnen Proteins. Typische periphere Membranproteine wie Arf1 mit einer Masse von  $\sim 20$  kDa haben einen Radius von 1–2 nm und eine Kopienzahl von  $10^7$  pro Zelle. Der Volumenanteil, den die Proteine im Zytosol einnehmen ist aus diesem Grund vernachlässigbar klein und die Beladung der Oberfläche liegt bei  $\theta \leq 10\%$ . Aufgrund dessen lässt sich Gl. (6.1) linearisieren zu:

$$\frac{N_r + N_{ROI}}{V_r + V_{ROI}} = K' \frac{N_c}{V_c} \quad \text{mit} \quad K' = \frac{K}{v} \quad (6.2)$$



**Abbildung 6.1.** Skizze eines FRAP-Experiments in einer Zelle den mehreren Targetmembranen, von denen im Experiment eine gebleicht wird. Der Bereich des Zytosols (c) ist in dunkelgrün dargestellt. Die Targetmembranen (r und ROI) sind in hellgrün dargestellt. Die gestichelte Linie markiert die Umrisse der im Experiment gewählten ROI, die eng um eine der Targetmembranen gelegt wurde. Es wird der reaktionslimitierte Fall betrachtet, d.h. es wird angenommen, dass die Diffusion der Proteine zu, aus und in den Targetmembranen viel schneller stattfindet, als die Reaktion der Proteine mit ihnen. Fluoreszierende Proteine können aus diesem Grund aus jedem beliebigen Punkt innerhalb des Zytosols mit den Targetmembranen assoziieren (gelbe Pfeile, zeigen nach Innen) und werden mit der gleichen Wahrscheinlichkeit zu jedem beliebigen Punkt des Zytosols dissoziieren (weiße Pfeile, zeigen nach Außen). Untere Reihe des Bildes stellt die drei Phasen der Fluoreszenzintensität in der ROI während des FRAP-Experiments an einer der Targetmembranen (ROI) dar: Gleichgewicht, Störung des Gleichgewichts direkt nach dem Bleichen, erreichtes Gleichgewicht nach einer Fluoreszenzerholung infolge der Assoziation und der Dissoziation der Proteine mit der Targetmembran. Die Fluoreszenzerholung findet mit einer typischen Zeit  $\tau$  statt, die Auskunft über die Bindungskinetik der Proteine mit den Targetmembranen gibt.

Die Prozesse der Adsorption ( $\Gamma_{\text{on}}$ ) und der Desorption ( $\Gamma_{\text{off}}$ ) können als Elementarreaktionen ausgedrückt werden:

$$\Gamma_{\text{on}} = k_{\text{on}} \frac{N_c}{V_c} \quad (6.3)$$

$$\Gamma_{\text{off}} = k_{\text{off}} \frac{N_r + N_{\text{ROI}}}{V_r + V_{\text{ROI}}} \quad (6.4)$$

Durch die Anwendung des Massenwirkungsgesetzes ergibt sich für die Kinetik der Adsorption von Teilchen auf der Oberfläche die Gleichung:

$$\frac{d}{dt} \frac{N_r + N_{\text{ROI}}}{V_r + V_{\text{ROI}}} = k_{\text{on}} \frac{N_c}{V_c} - k_{\text{off}} \frac{N_r + N_{\text{ROI}}}{V_r + V_{\text{ROI}}} \quad (6.5)$$

Im stationären Zustand ergibt sich hieraus Gl. (6.2) mit  $K' = k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$ . In den Gl. (6.2) und (6.5) lassen sich die Teilchenzahlen  $N_x$  (mit  $x = \{c, \text{ROI}, r\}$ ) mit  $F_x = \sigma N_x$  in die Fluoreszenzintensitäten umwandeln. Dabei ist  $\sigma$  die auftretende Fluoreszenzintensität eines einzelnen Fluoreszenzfarbstoffs (z.B. GFP). Die Targetmembranen, bezeichnet mit den Indizes  $r$  und ROI, stellen voneinander getrennte Strukturen dar. Aus diesem

Grund lassen sich die Reaktionen der Proteine in den beiden Teilbereichen in zwei separaten Gleichungen aus Gl. (6.5) formulieren:

$$\frac{dF_{\text{ROI}}}{dt} = \mu F_c - k_{\text{off}} F_{\text{ROI}} \quad \text{mit} \quad \mu = k_{\text{on}} \frac{V_{\text{ROI}}}{V_c} \quad (6.6)$$

$$\frac{dF_r}{dt} = \xi F_c - k_{\text{off}} F_r \quad \text{mit} \quad \xi = k_{\text{on}} \frac{V_r}{V_c} \quad (6.7)$$

Unter Berücksichtigung der Teilchenzahlerhaltung

$$F_{\text{tot}} = F_c + F_r + F_{\text{ROI}} = \sigma N_{\text{tot}} \quad (6.8)$$

ergibt sich für alle Teilbereiche in der Zelle (c, ROI und r) der vollständige Satz der kinetischen Gleichungen:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} F_{\text{ROI}} \\ F_r \\ F_c \end{pmatrix} = \underbrace{\begin{pmatrix} -k_{\text{off}} & 0 & \mu \\ 0 & -k_{\text{off}} & \xi \\ k_{\text{off}} & k_{\text{off}} & -k_{\text{on}}^* \end{pmatrix}}_{\mathbf{M}} \begin{pmatrix} F_{\text{ROI}} \\ F_r \\ F_c \end{pmatrix} \quad (6.9)$$

Dabei ist  $k_{\text{on}}^* = \mu + \xi$ .

Bei FRAP-Experimenten ist die Messzeit typischerweise viel kürzer, als die Synthese neuer Proteine oder ihr biologischer Abbau. Die Gesamtzahl der Proteine in der Zelle während eines FRAP-Experiments ist aus diesem Grund näherungsweise konstant. Für die Gesamtfluoreszenz der Zelle vor dem Bleichen der ROI ( $\phi_{\text{tot}}$ ) gilt demnach:

$$\phi_{\text{tot}} = \phi_c + \phi_r + \phi_{\text{ROI}} \quad (6.10)$$

Durch das Bleichen wird die Fluoreszenz der ROI um einen Bruchteil  $0 \leq f < 1$  der Ausgangsfluoreszenz erniedrigt. Der Bleichvorgang der ROI ist im Vergleich zu der Fluoreszenzerholung ein instanter Prozess. Für die Gesamtfluoreszenz der Zelle direkt nach Bleichen ( $F_{\text{tot}}, t = 0$ ) gilt aus diesem Grund:

$$F_{\text{tot}} = \phi_c + \phi_r + f \phi_{\text{ROI}} \quad (6.11)$$

Werden außerdem im Experiment bei der Aufnahme der Bilderserie während der Fluoreszenzerholung relativ milde Belichtungsbedingungen gewählt, wodurch ungewolltes Photobleichen der Fluorophore verhindert wird, so bleibt  $F_{\text{tot}}$  auch während der Fluoreszenzerholungsphase konstant. Für die Gesamtfluoreszenz der Zelle nach vollständigem Fluoreszenzausgleich, also im Gleichgewichtszustand ( $t \rightarrow \infty$ ), ergibt sich dann:

$$F_{\text{tot}} = F_c^\infty + F_r^\infty + F_{\text{ROI}}^\infty \quad (6.12)$$

Darüber hinaus ergibt sich aus Gl. (6.9) im Gleichgewichtszustand:

$$\begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{off}} & 0 & \mu \\ 0 & -k_{\text{off}} & \xi \\ k_{\text{off}} & k_{\text{off}} & -k_{\text{on}}^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{\text{ROI}}^\infty \\ F_r^\infty \\ F_c^\infty \end{pmatrix} \quad (6.13)$$

Für die Fluoreszenzintensitäten im Zytosol, der ROI und den restlichen Targetmembranen folgt hieraus:

$$F_{\text{ROI}}^{\infty} = \frac{\mu F_{\text{tot}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*}, \quad F_{\text{r}}^{\infty} = \frac{\xi F_{\text{tot}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*}, \quad F_{\text{c}}^{\infty} = \frac{k_{\text{off}} F_{\text{tot}}}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*} \quad (6.14)$$

Um den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten in den drei Zellbereichen (c, ROI und r) im Nichtgleichgewichtszustand, d.h. während der Fluoreszenzerholung, zu bestimmen, muss das Differentialgleichungssystem (6.9) gelöst werden. Die allgemeine Lösung eines solchen Systems lautet:

$$F(t) = A + B e^{-\lambda_1 t} + C e^{-\lambda_2 t} \quad (6.15)$$

Dabei sind  $\lambda_0 = 0$ ,  $\lambda_1 = -k_{\text{off}}$  und  $\lambda_2 = -(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$  die Eigenwerte der Matrix  $\mathbf{M}$ . Die Faktoren  $A$ ,  $B$  und  $C$  lassen aus den Anfangsbedingungen für die Fluoreszenz direkt nach dem Bleichen ( $t = 0$ ) und im Gleichgewichtszustand ( $t \rightarrow \infty$ ) bestimmen. Für den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz im Zytosol während der Fluoreszenzerholungsphase ergibt sich dann:

$$F_{\text{c}}(t) = F_{\text{c}}^{\infty} + (\phi_{\text{c}} - F_{\text{c}}^{\infty}) e^{-(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)t} \quad (6.16)$$

Und für die Fluoreszenzerholung in der ROI ergibt sich:

$$F_{\text{ROI}}(t) = F_{\text{ROI}}^{\infty} - \omega \phi_{\text{ROI}} e^{-(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)t} - [F_{\text{ROI}}^{\infty} - (f + \omega) \phi_{\text{ROI}}] e^{-k_{\text{off}} t} \quad (6.17)$$

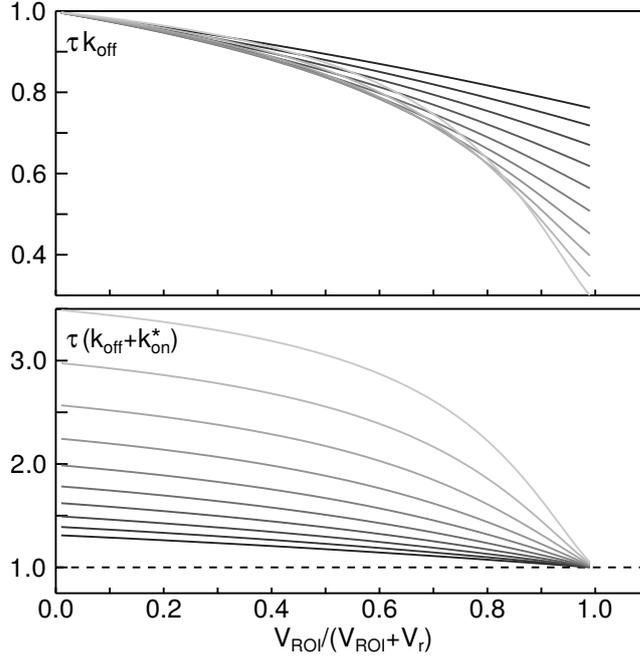
mit

$$\frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_{\text{tot}}^{\infty}} = \frac{\phi_{\text{ROI}}}{\phi_{\text{tot}}} = \frac{\mu}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*} \quad \text{und} \quad \omega = \frac{k_{\text{off}} \mu (1 - f)}{k_{\text{on}}^* (k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)} \quad (6.18)$$

Die Funktion  $F_{\text{ROI}}(t)$  für die Fluoreszenzerholung der gebleichten Targetmembranen in einem System bestehend aus drei Komponenten (c, ROI und r) sieht auf den ersten Blick etwas komplex aus. Die wichtigste Beobachtung hierbei ist, dass die Fluoreszenzerholung der ROI keine einfach-exponentielle, sondern eine doppelt-exponentielle Funktion ist und wird demnach durch zwei charakteristische Fluoreszenzerholungszeiten,  $\tau_1 = 1/k_{\text{off}}$  und  $\tau_2 = 1/(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$ , bestimmt.

Fitten einer solchen FRAP-Kurve an eine einfach-exponentielle Funktion liefert demzufolge keine relevanten Informationen über die Kinetik der zugrundeliegenden Assoziations- und Dissoziationsprozesse der Proteine mit ihren Targetmembran. Um diese Aussage zu verdeutlichen wurde im Rahmen dieses Projekt von Prof. Dr. Weiss eine Computersimulation durchgeführt. Es wurden zunächst FRAP-Kurven mit einer doppelt-exponentiellen Fluoreszenzerholung nach Gl. (6.17) bei unterschiedlichen Kombinationen der Parameter  $\tau_1 = 1/k_{\text{off}}$ ,  $\tau_2 = 1/(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$  und mit verschiedenen Größen der gebleichten Targetmembranen ( $V_{\text{ROI}}$ ) berechnet. Diese wurden anschließend mit der einfach-exponentiellen Funktion (Gl. (3.29)) mit  $\tau = 1/k_{\text{off}}$  oder  $\tau = 1/(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$  gefittet. Die Ergebnisse dieser Simulation sind in Abb. 6.2 illustriert. Für kleine Größen der ROI ( $V_{\text{ROI}} \rightarrow 0$ ) wird die Fluoreszenzerholungszeit annähernd durch die Dissoziationsrate bestimmt  $\tau \approx 1/k_{\text{off}}$  und bei größer werdenden ROI ist  $\tau \approx 1/1/(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$  zu beobachten.

Gemäß der Definition von  $k_{\text{on}}^*$  geht aus Gl. (6.17) zusätzlich hervor, dass eines der



**Abbildung 6.2.** Auftretende Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  simulierter FRAP-Kurven mit einem Verlauf nach Gl.(6.17) beim Fitten mit einer einfach-exponentiellen Funktion. Oben/Unten: Skalierung von  $\tau$  erfolgte mit der minimalen/maximalen charakteristischen Rate in Gl.(6.17). Für kleine Größen der gebleichten ROI ( $V_{ROI} \rightarrow 0$ ) wird  $\tau \approx 1/k_{off}$  beobachtet. Bei steigender Größe der ROI auf Kosten der Größe ungebleichter Targetmembranen,  $V_r$ , und einem gleichbleibenden Anteil aller Targetmembranen ( $V_{ROI} + V_r = 0,2V_{tot}$ ) wird eine asymptotische Näherung an  $\tau \approx 1/(k_{off} + k_{on}^*)$  beobachtet. Für einen breiten Bereich, in dem im System ungebleichte Targetmembran neben einer gebleichten ROI präsent sind, liegt die auftretende Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  zwischen den beiden Zeiten, die bei den beiden Grenzfällen zu erwarten sind. Abweichungen von den charakteristischen Raten in Gl. (6.17) werden mit steigendem Verhältnis von  $k_{on}/k_{off} = 1, \dots, 10$  (in Kurven gezeigt als schwarz zu hell-grau), d.h. wenn immer mehr Proteine an die Targetmembranen gebunden werden.

Parameter der charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit,  $1/(k_{off} + k_{on}^*)$ , von dem Größenverhältnis der Targetmembranen zum Zytosol  $(V_{ROI} + V_r)/V_c$  abhängt.

In zwei Fällen lässt sich die komplexe Gleichung (6.17) vereinfachen. Im ersten Fall ist die ROI viel kleiner als die zwei übrigen Zellregionen (c, r), so dass  $V_{ROI} \ll V_c, V_r$  ist. Hieraus folgt für die Parameter  $\mu \rightarrow 0$  und  $\omega \rightarrow 0$ . Dadurch ergibt sich aus Gl. (6.17) näherungsweise eine einfach-exponentielle Funktion:

$$F_{ROI}(t) \approx F_{ROI}^\infty - (F_{ROI}^\infty - f\phi_{ROI})e^{-k_{off}t} \quad (6.19)$$

Die Ausgangsfluoreszenz der ROI ist in diesem Fall deutlich niedriger als die Fluoreszenz in den beiden anderen Zellbereichen ( $\phi_{ROI} \ll \phi_c, \phi_r$ ). Bleichen eines Bruchteils der Fluoreszenzintensität der ROI wird die Gesamtfluoreszenz der Zelle aus diesem Grund nur minimal erniedrigt und die Fluoreszenzintensität im Zytosol bleibt während der Fluoreszenzerholungsphase näherungsweise konstant ( $F_c \approx F_c^\infty$ ). Die Fluoreszenzerholung wird demnach nur durch eine charakteristische Fluoreszenzerholungszeit bestimmt, die nur von der Dissoziationsrate  $k_{off}$  der Proteine an der Targetmembran abhängt.

Im zweiten Fall ist im System nur eine Targetmembran vorhanden, die im FRAP-Experiment die ROI darstellt. Demnach gilt  $F_r = V_r = \xi = 0$ . Dadurch reduziert sich das Gleichungssystem (6.9) zu:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} F_{\text{ROI}} \\ F_c \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{\text{off}} & k_{\text{on}}^* \\ k_{\text{off}} & -k_{\text{on}}^* \end{pmatrix} \begin{pmatrix} F_{\text{ROI}} \\ F_c \end{pmatrix} \quad (6.20)$$

Auch in diesem Fall wird die Fluoreszenzerholung in der ROI durch die einfach-exponentielle Funktion beschrieben:

$$F_{\text{ROI}}(t) = F_{\text{ROI}}^{\infty} (1 - f e^{-(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)t}) \quad (6.21)$$

Die charakteristische Fluoreszenzerholungszeit  $\tau = 1/(k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*)$  wird dabei nicht nur von den Raten  $k_{\text{off}}$  und  $k_{\text{on}}$  bestimmt, sondern hängt, entsprechend der Definition von  $k_{\text{on}}^*$ , zusätzlich von der relativen Größe der Targetmembran ( $V_{\text{ROI}}/V_c$ ) ab. Die analytischen Erkenntnisse des vorgestellten Modells wurden als Nächstes durch FRAP-Experimente in lebenden Zellen überprüft.

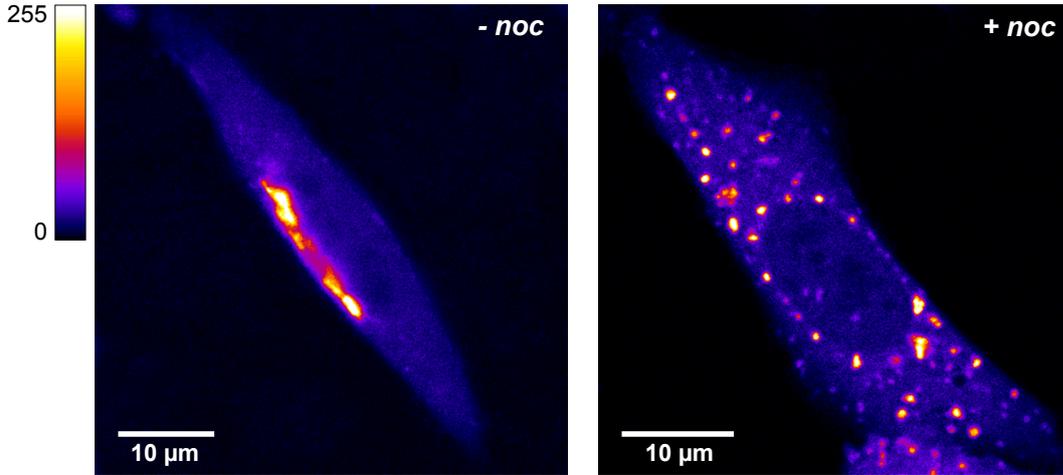
## 6.2. Experimentelle Überprüfung des mathematischen Modells

Als prototypisches Modellsystem für einen Assoziations-Dissoziationszyklus eines peripheren Membranproteins mit seiner Targetmembran wurde die kleine GTPase Arf1, markiert mit GFP als Fluoreszenzfarbstoff, gewählt. Die Targetmembran stellt in diesem Fall die Membran des Golgi-Apparats dar. Durch FRAP-Experimente in lebenden CHO-Zellen wurden bei zwei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen die charakteristischen Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  bestimmt. Die Messungen wurden zum einen in unbehandelten Zellen durchgeführt und zum anderen in mit Nocodazol behandelten Zellen.

Durch Fitten der Kurven an die einfach-exponentielle Funktion (3.29) wurden zunächst die charakteristischen Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 6.1 zusammengefasst.

In unbehandelten Zellen ist die Membran des Golgi-Apparats eine große zusammenhängende Struktur (siehe *-noc* in Abb. 6.3). Die Assoziation und die Dissoziation von Arf1 mit der Golgi-Membran ist ein reaktionslimitierter Prozess,<sup>[48]</sup> da die Diffusion von Arf1 im Zytosol viel schneller ist als seine Verweilzeit auf der Targetmembran. In FRAP-Experimenten mit einer ROI, die die vollständige Golgi-Membran umschließt, wird aus diesem Grund die Fluoreszenzerholung nur durch die Reaktion von Arf1 mit der Golgi-Membran bestimmt. Es ergaben sich einfach-exponentielle FRAP-Kurven mit der mittleren charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit von  $\tau = 12,6$  s. Unter diesen experimentellen Bedingungen wurden für  $\tau$  von Arf1 bereits zuvor ähnliche Werte beobachtet.<sup>[48, 119]</sup>

In Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, werden die Mikrotubuli depolymerisiert und der Golgi-Apparat zerfällt in mehrere kleiner Fragmente, die annähernd gleichmäßig über die Zelle verteilt sind<sup>[32, 150]</sup> (siehe *+noc* in Abb.6.3). FRAP-Messungen an einem dieser kleinen Golgi-Fragmente als ROI führten zu deutlich höheren Fluoreszenzerholungszeiten mit  $\tau = 18,5$  s. Im Vergleich zu den Ergebnissen



**Abbildung 6.3.** Fluoreszenzbilder von unbehandelten ( $-noc$ ) und mit Nocodazol behandelten CHO-Zellen ( $+noc$ ), die transient mit Arf1-GFP transfiziert wurden.

	$\tau$ [s]	$n$
$-noc$	$12,6 \pm 2,7$	28
$+noc$	$18,5 \pm 4,2$	27

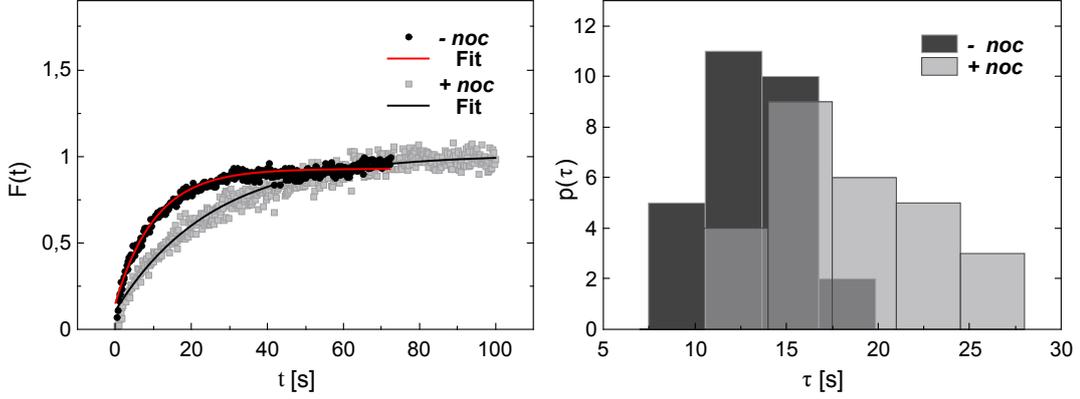
**Tabelle 6.1.** Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  aus  $n$  FRAP-Messungen von Arf1 in unbehandelten Zellen ( $-noc$ ) und mit Nocodazol behandelten Zellen ( $+noc$ ). Die Parameter  $\tau$  wurden durch Fitten der Kurven an die einfach-exponentielle Funktion (3.29) bestimmt.

in unbehandelten Zellen zeigte der Student-t-Test eine Signifikanz von  $10^{-8}$ . Die Fluoreszenzerholungszeit von Arf1 in Zellen mit fragmentiertem Golgi ist demnach signifikant größer als in unbehandelten Zellen. In Abb.6.4 sind repräsentative FRAP-Kurven  $F(t)$  und die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau)$  der Fluoreszenzerholungszeiten dargestellt, die den Unterschied zwischen den beiden Messungen verdeutlichen.

Ohne weitere Analyse der Ergebnisse würde man an dieser Stelle schlussfolgern, dass intakte Mikrotubuli einen Einfluss auf die Reaktionskinetik von Arf1 mit der Golgi-Membran haben, da die Depolymerisierung der Mikrotubuli eine signifikante Änderung der Fluoreszenzerholungszeit von Arf1 in FRAP-Experimenten zur Folge hat. Unter der einfachen Annahme, dass die Fluoreszenzerholungszeit der Kehrwert der Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  von Arf1 ist, wäre die Vermutung naheliegend, dass intakte Mikrotubuli direkt oder indirekt zur Destabilisierung des membrangebundenen Zustands von Arf1 auf der Golgi-Membran beitragen.

Andererseits muss bedacht werden, dass entsprechend des bereits vorgestellten mathematischen Modells (siehe Abs. 6.1) bei Messungen (i) an einer Targetmembran und (ii) an einer von mehreren Targetmembranen die Fluoreszenzerholung durch zwei unterschiedliche Funktionen (Gl. (6.21) und (6.19)) beschrieben wird. Die Assoziations- und Dissoziationsraten ( $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ ) sich hierbei jedoch nicht ändern.

Um zu überprüfen, wodurch die Fluoreszenzerholungszeit von Arf1 bei den beiden



**Abbildung 6.4.** Repräsentative FRAP-Kurven  $F(t)$  (gefittet mit Gl. (3.29)) und die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau)$  der Fluoreszenzerholungszeiten von Arf1 in unbehandelten ( $-noc$ ) und mit Nocodazol behandelten ( $+noc$ ) Zellen. In Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden ist eine deutlich langsamere Fluoreszenzerholung und höhere Erholungszeiten zu beobachten.

experimentellen Bedingungen beeinflusst wurde, wurden aus experimentellen Daten die Assoziations- und Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  von Arf1 bestimmt.

In unbehandelten Zellen, also mit einer größeren Targetmembran, wird die Fluoreszenzerholung durch Gl. (6.21) beschrieben. Dementsprechend gilt im Gleichgewichtszustand:

$$\frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_{\text{tot}}^{\infty}} = \frac{k_{\text{on}}^*}{k_{\text{off}} + k_{\text{on}}^*} \quad (6.22)$$

Für die Assoziations- und die Dissoziationsraten ergibt sich hieraus:

$$k_{\text{on}} = \frac{1}{\tau} \frac{V_c}{V_{\text{ROI}}} \frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_{\text{tot}}^{\infty}} \quad \text{und} \quad k_{\text{off}} = \frac{1}{\tau} \left( 1 - \frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_{\text{tot}}^{\infty}} \right) \quad (6.23)$$

In Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, stellt eine von mehreren Targetmembranen die ROI dar. Im Gleichgewichtszustand gilt hierbei:

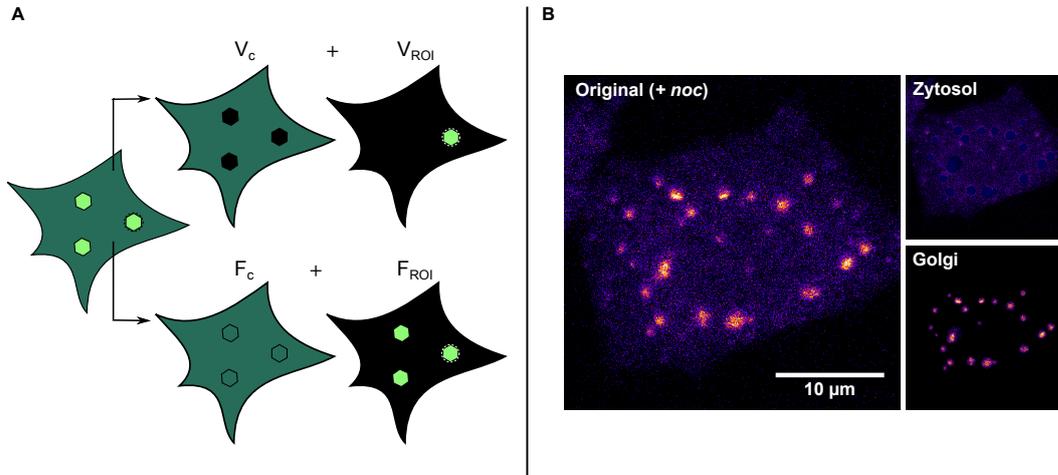
$$\frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_c^{\infty}} = \frac{k_{\text{on}} V_{\text{ROI}}}{k_{\text{off}} V_c} \quad (6.24)$$

Für die Assoziations- und die Dissoziationsraten in Zellen mit fragmentiertem Golgi ergibt sich demnach:

$$k_{\text{on}} = \frac{1}{\tau} \frac{V_c}{V_{\text{ROI}}} \frac{F_{\text{ROI}}^{\infty}}{F_c^{\infty}} \quad \text{mit} \quad k_{\text{off}} = \frac{1}{\tau} \quad (6.25)$$

Für die Bestimmung der Raten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  werden außer der bereits bekannten Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  die Volumina der Zellbereiche  $V_x$  und die Fluoreszenzintensitäten  $F_x$  benötigt. Diese lassen sich aus Bildern von ganzen Zellen bestimmen, die vor oder nach einem FRAP-Experiment aufgenommen wurden, so dass die Fluoreszenzintensitäten in einer Zelle ausgeglichen sind.

Für die Messungen in unbehandelten Zellen wurden die Fluoreszenzintensitäten  $F_{\text{ROI}}^{\infty}$  und  $F_{\text{tot}}^{\infty}$  aus Bildern von ganzen Zellen bestimmt, die vor einer FRAP-Messung aufgenommen wurden (siehe  $-noc$  in Abb. 6.3). Das Volumenverhältnis zwischen

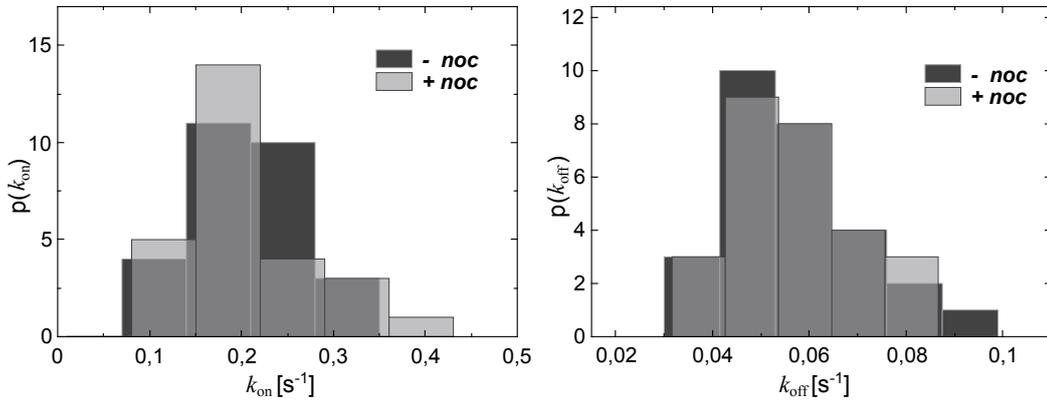


**Abbildung 6.5.** **A:** Skizze der Bestimmung der Volumina des Zytosols ( $V_c$ ) und der ROI ( $V_{ROI}$ ) sowie der Fluoreszenzintensitäten des Zytosols ( $F_c$ ) und der ROI ( $F_{ROI}$ ) aus Fluoreszenzbildern ganzer Zellen, die mit Nocodazol vor einer FRAP-Messung. **B:** Beispiel für die Separierung der Fluoreszenzsignale des Zytosols und der Golgi-Fragmente in Bildern von Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, mit einem Matlab-Skript (von R.Fickentscher) zur Bestimmung der Parameter  $V_c$ ,  $V_{ROI}$ ,  $F_c$  und  $F_{ROI}$ .

der ROI und dem Zytosol,  $V_{ROI}/V_c$ , wurde näherungsweise als das Verhältnis der Flächen, die diese Bereiche in den Bildern ganzer Zellen einnehmen, bestimmt. Dieser Vorgehensweise liegt die Annahme zugrunde, dass Zellen im Mittel überall die gleiche Dicke aufweisen. Bei der Aufnahme der Bilder wurde zusätzlich nicht die minimale Öffnung der Lochblende von 1 AU verwendet, sondern eine Öffnung von 4 AU. Auf diese Weise wurde beim Aufnehmen der Bilder die Fluoreszenz aus der gesamten Dicke einer Zelle gesammelt.

Für die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten und der Volumina  $V_{ROI}$  und  $V_c$  bei Messungen in Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, wurden die Fluoreszenzbilder ganzer Zellen (siehe +noc in Abb.6.3) zunächst bearbeitet. Mit einem Matlab-Skript (von R. Fickentscher, Lehrstuhl Prof. Dr. Weiss, Universität Bayreuth) wurden die Fluoreszenzsignale der Golgi-Fragmente von dem Signal des Zytosols getrennt (detailliert beschrieben in Abs. 5.2.3). In Abb. 6.5 ist diese Bearbeitung an einem Fluoreszenzbild veranschaulicht. In Bildern, die nur die Fluoreszenzsignale des Zytosols enthalten, wurde die Fluoreszenz der entfernten Golgi-Fragmente auf den Wert der mittleren Fluoreszenzintensität des Zytosols gesetzt. Dieser Schritt wurde notwendig, da die detektierte Fluoreszenz aus der gesamten Dicke einer Zelle ( $\sim 5-7\mu\text{m}$ ) stammt, die Golgi-Fragmente jedoch eine deutlich kleinere Dicke ( $\sim 1-2\mu\text{m}$ ) aufweisen. Es ist demnach anzunehmen, dass sich die Fluoreszenzintensität der Golgi-Fragmente sich aus den Fluoreszenzsignalen der Fragmente und des Zytosols zusammensetzt. Der resultierende Wert  $F_c^\infty$  stellt demnach die obere Grenze der Fluoreszenzintensität des Zytosols der Zellen dar.

Aus den beiden separaten Fluoreszenzbildern der ROI und des Zytosols wurden die Fluoreszenzintensitäten  $F_{ROI}^\infty$  und  $F_c^\infty$  als Summen der Pixelwerte der beiden Bereiche bestimmt und die Volumina  $V_{ROI}$  und  $V_c$  wurden als Flächen der Pixel der



**Abbildung 6.6.** Die Häufigkeitsverteilungen der Reaktionsraten für die Assoziation  $p(k_{\text{on}})$  und die Dissoziation  $p(k_{\text{off}})$  von Arf1 mit den Membranen des Golgi-Apparats in unbehandelten ( $-noc$ ) und mit Nocodazol behandelten ( $+noc$ ) Zellen. Obwohl die Parameter  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  auf der Basis unterschiedlicher Fluoreszenzerholungszeiten (vgl.  $p(\tau)$  in Abb. 6.4) gewonnen wurden, sind bei den beiden Messbedingungen ( $-/+noc$ ) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Reaktionsraten festzustellen.

	$k_{\text{on}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$k_{\text{off}}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]
$-noc$	$0,21 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,01$
$+noc$	$0,19 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,01$

**Tabelle 6.2.** Mittelwerte und Standardabweichungen der Reaktionsraten für die Assoziation  $k_{\text{on}}$  und die Dissoziation  $k_{\text{off}}$  von Arf1 mit den Membranen des Golgi-Apparats in unbehandelten ( $-noc$ ) und mit Nocodazol behandelten ( $+noc$ ) Zellen.

beiden Zellbereiche abgeschätzt.

In Tab. 6.2 sind die mittleren Reaktionsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  und ihre Standardabweichungen, die nach den Gl. (6.23) und (6.25) bestimmt wurden, zusammengefasst. In unbehandelten Zellen wurde für Arf1 eine mittlere Assoziationsrate von  $k_{\text{on}} = 0,21 \text{ s}^{-1}$  und eine mittlere Dissoziationsrate von  $k_{\text{off}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$  bestimmt. In Zellen, die mit Nocodazol behandelten wurden, ergaben sich  $k_{\text{on}} = 0,19 \text{ s}^{-1}$  und  $k_{\text{off}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ . Mit dem Student-t-Test wurde zwischen den Reaktionsraten bei den beiden experimentellen Bedingungen kein signifikanter Unterschied festgestellt (Signifikanz 0,42 und 0,99 für  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$ ). Auch die Häufigkeitsverteilungen der Messwerte  $p(k_{\text{on}})$  und  $p(k_{\text{off}})$  in Abb. 6.6 zeigen gute Überlappungen miteinander. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Assoziations- und die Dissoziationsraten von Arf1 mit der Golgi-Membran in unbehandelten und mit Nocodazol behandelten Zellen sich nicht voneinander unterscheiden.

## 7. Diskussion

In diesem Projekt wurde ein mathematisches Modell für die Fluoreszenzerholung entwickelt, die bei FRAP-Messungen von peripheren Membranproteinen auf ihren Targetmembranen in lebenden Zellen zu beobachten ist. Auf der Grundlage eines einfachen Assoziations-Dissoziationsprozesses der Proteine mit der Targetmembran, wurde gezeigt, dass die charakteristische Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  nicht nur durch die Assoziations- und die Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bestimmt wird, sondern zusätzlich von der relativen Größe der gebleichten Targetmembran ( $V_{\text{ROI}}/V_c$ ) sowie der Gesamtzahl der Targetmembranen im System abhängt.

Bei Anwesenheit einer einzigen Targetmembran für die Proteine verläuft die Fluoreszenzerholung nach einer einfach-exponentiellen Funktion. Für die charakteristische Erholungszeit ergibt sich hierbei  $\tau = 1/(k_{\text{on}}^* + k_{\text{off}})$  mit  $k_{\text{on}}^* = k_{\text{on}}V_{\text{ROI}}/V_c$ . Ist in diesem Fall das Volumen der gebleichte Targetmembran annähernd genauso groß wie des Zytosols ( $V_{\text{ROI}} \approx V_c$ ), so ist die resultierende Fluoreszenzerholungszeit größenunabhängig und wird nur durch die beiden Raten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bestimmt. Ist die Größe der gebleichten Targetmembran dagegen deutlich kleiner als die des Zytosols ( $V_{\text{ROI}} \ll V_c$ ), so ist die Fluoreszenzerholungszeit ebenfalls größenunabhängig und wird hauptsächlich durch die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  bestimmt.

Sind im System mehrere Targetmembran anwesend, von denen im Experiment eine gebleicht wird, so verläuft die Fluoreszenzerholung nach einer doppelt-exponentiellen Funktion mit zwei charakteristischen Erholungszeiten,  $\tau_1$  und  $\tau_2$ . Dabei sind  $\tau_1 = 1/(k_{\text{on}}^* + k_{\text{off}})$  mit  $k_{\text{on}}^* = k_{\text{on}}(V_{\text{ROI}} + V_r)/V_c$  und  $\tau_2 = 1/k_{\text{off}}$ . Ist in diesem Fall die gebleichte Targetmembran ( $\phi_{\text{ROI}}, V_{\text{ROI}}$ ) sehr viel kleiner im Vergleich zu den übrigen Komponenten des Systems ( $\phi_r, \phi_c$  und  $V_r, V_c$ ), so bewirkt das Bleichen eines Bruchteils der Fluoreszenz der Targetmembran eine vernachlässigbar kleine Änderung der Fluoreszenzintensität im Zytosol. Die Fluoreszenzerholung verläuft dabei nach einer einfach-exponentiellen Funktion mit einer charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit  $\tau_2 = 1/k_{\text{off}}$ , die nur durch die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  bestimmt wird.

Dieses Modell wurde experimentell mit FRAP-Messungen von dem Protein Arf1 auf den Membranen des Golgi-Apparats bei zwei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen überprüft. Die Experimente wurden zum einen in unbehandelten Zellen und zum anderen in Zellen, die mit Nocodazol behandelt wurden, durchgeführt. In unbehandelten Zellen stellt die Membran des Golgi-Apparats eine größere zusammenhängende Struktur dar und wurde im FRAP-Experiment als Ganzes gebleicht (ROI). In Zellen, die mit Nocodazol, behandelt wurden, zerfällt der Golgi-Apparat aufgrund der Depolymerisierung der Mikrotubuli in mehrere kleine Membranfragmente. In diesem Fall sind für das Protein Arf1 in einer Zelle mehrere Targetmembranen vorhanden, von denen in FRAP-Experimenten eine gebleicht wurde.

Es wurde festgestellt, dass Arf1 bei den beiden Bedingungen signifikant unterschiedliche Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  auf den Membranen des Golgi-Apparats aufweist. In Zellen mit fragmentiertem Golgi ist  $\tau$  deutlich größer als in unbehandelten Zellen. Die Fluoreszenzerholung ist also deutlich langsamer.

Mithilfe des entwickelten Modells wurden aus den gemessenen Zeiten  $\tau$ , den Verhältnissen der Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewichtszustand ( $F_{\text{ROI}}^\infty/F_{\text{tot}}$  und  $F_{\text{ROI}}^\infty/F_c^\infty$ )

und des Volumenverhältnisses zwischen der ROI und des Zytosols ( $V_{\text{ROI}}/V_c$ ) in den beiden Fällen die Assoziations- und die Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bestimmt. Es zeigte sich, dass die beiden unterschiedlichen Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  von Arf1 bei den beiden experimentellen Bedingungen auf gleichen Assoziations- und Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  des Proteins auf den Golgi-Membranen basieren. Die Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  von Arf1 wurde demnach durch das geänderte Größenverhältnis  $V_{\text{ROI}}/V_c$  beeinflusst.

Ohne diese zusätzliche Analyse der Erholungszeiten  $\tau$  würde man zu der falschen Schlussfolgerung kommen, dass die Depolymerisierung der Mikrotubuli direkt oder indirekt die Bindung von Arf1 an die Golgi-Membran beeinflusst. Die Analyse der FRAP-Messungen, die nur auf der Basis der Fluoreszenzerholungszeiten beruht, würde demnach auf einer Fehlinterpretation der Messungen führen.

Zuverlässige Erkenntnisse über die physikochemischen Vorgänge lassen sich demnach nur gewinnen, wenn aus den Messdaten die Parameter bestimmt werden, die der Fluoreszenzerholung zugrunde liegen, wie beispielsweise die Assoziations- und die Dissoziationsraten.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass selbst das vorgestellte, vergleichsweise aufwendige, Vorgehen zur Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten nicht ohne Annahmen und systematische Ungenauigkeit auskommt. Der größte systematische Fehler tritt bei der Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten im Gleichgewicht und der Volumina aus einzelnen Fluoreszenzbildern ganzer Zellen auf. Eine genauere Bestimmung dieser Parameter ließe sich durch eine dreidimensionale Rekonstruktion der Zellen erreichen, basierend auf einer Serie von konfokalen Abbildungen, die über die ganze Dicke einer Zelle (Lochblende-Öffnung: 1 AU, Abstand zwischen den Frames gemäß des Nyquist-Theorems) aufgenommen wurden. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass während der Aufnahme einer solchen Bildserie die Zelle mehrfach beleuchtet wird, so dass es zum unvermeidbaren Bleichen der Fluorophore kommen wird. Dieses Vorgehen würde demnach nicht nur den Aufwand eines FRAP-Experiments erheblich steigern, sondern auch zu zusätzlichen Fehlern der Messungen führen, die durch das Bleichen der Fluorophore während der Bildaufnahmen entstehen. Aufnahme eines einzelnen Bildes mit einer weit geöffneten Lochblende bietet zwar eine weniger genaue, jedoch eine gute Alternative. Durch das Öffnen der Lochblende wird die Fluoreszenzintensität mit einer hohen räumlichen Auflösung detektiert, da hierbei die Fluoreszenz über eine größere Zellschicht aufsummiert wird. Die Annahme, dass Zellen über die ganze Zellfläche die gleiche Dicke aufweisen, ist sicherlich ziemlich inkorrekt. Diese Annahme wirkt sich jedoch nur auf die absoluten Werte und nicht auf die relativen kinetischen Raten aus, da alle Experimente im gleichen Ausmaß von dieser Ungenauigkeit betroffen sind. Solange die Zellen eine ähnliche Form aufweisen kann demnach angenommen werden, dass die relativen Fehler in einzelnen Experimenten, selbst bei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen, eher klein sein werden.

Eine zusätzliche Ungenauigkeit bei der Bestimmung der Volumina und der Fluoreszenzintensitäten tritt durch den Umstand auf, dass die ROI nicht ausschließlich die gebleichte Targetmembran umschließt, sondern unweigerlich auch Proteine aus dem Zytosol enthält, die sich oberhalb und unterhalb der Targetmembran befinden. Durch die Annahme, dass die ROI sich aus den beiden Beträgen der Targetmembran

---

(Index  $g$ ) und des Zytosols (Index  $z$ ) zusammensetzt lässt sich der systematische Fehler für  $F_{\text{ROI}}$  und  $V_{\text{ROI}}$  wie folgt formulieren:

$$\frac{F_{\text{ROI}}}{V_{\text{ROI}}} = \frac{F_g + F_z}{V_g + V_z} = \frac{F_g(1 + x \cdot k_{\text{off}}/k_{\text{on}})}{V_g(1 + x)} \quad \text{mit} \quad x = \frac{V_z}{V_g} \quad (7.1)$$

In Fall von Arf1 mit  $k_{\text{off}}/k_{\text{on}} \approx 1/3$ , wird  $k_{\text{on}}$  in jeder Zelle um den Faktor  $(1 + x/3)/(1 + x)$  unterschätzt. Allerdings, unter der Annahme, dass das Verhältnis  $x$  in unbehandelten Zellen ähnlich ist, wie in mit Nocodazol behandelten Zellen, müssten die Werte für die Assoziationsraten in den beiden Messungen um den gleichen Faktor korrigiert werden. Demnach wirkt sich die Ungenauigkeit, die durch den Beitrag des Zytosols in der ROI entstanden ist, nur auf die absoluten und nicht auf die relativen Werte von  $k_{\text{on}}$  aus.

Hieraus lässt sich schließen, dass trotz leicht unterschiedlicher Messbedingungen in unbehandelten und mit Nocodazol behandelten Zellen, keine wesentlichen Korrekturen für die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsraten notwendig sind.

Für die Bestimmung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten der ROI und des Zytosols in mit Nocodazol behandelten Zellen wurden alle Pixel, die von Golgi-Fragmenten besetzt wurden (einschließlich der ROI), mit Pixelwerten der mittleren Fluoreszenzintensität des Zytosols aufgefüllt. Durch diese Korrektur wurde der Wert für  $F_{\text{ROI}}^{\infty}/F_c^{\infty}$  etwas unterschätzt, so dass die Werte von  $k_{\text{on}}$  etwas niedriger sind. Wird  $F_{\text{ROI}}^{\infty}/F_c^{\infty}$  hingegen ohne die Korrektur bestimmt, d. h. es wird angenommen, dass die Fluoreszenz aller sichtbaren Golgi-Strukturen keine Beiträge der löslichen Proteine aufweist, so wird der Wert von  $F_{\text{ROI}}^{\infty}/F_c^{\infty}$  überschätzt und führt demnach zu einem höheren Wert für  $k_{\text{on}}$ . Mit dieser Methode wird ein Wert von  $k_{\text{on}} = 0,22/\text{s}$  gefunden, der die obere Grenze für die Assoziationsrate darstellt. Auch für diese Methode wird mit dem Student-t-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten  $k_{\text{on}}$  von Arf1 in unbehandelten und mit Nocodazol behandelten Zellen gefunden.



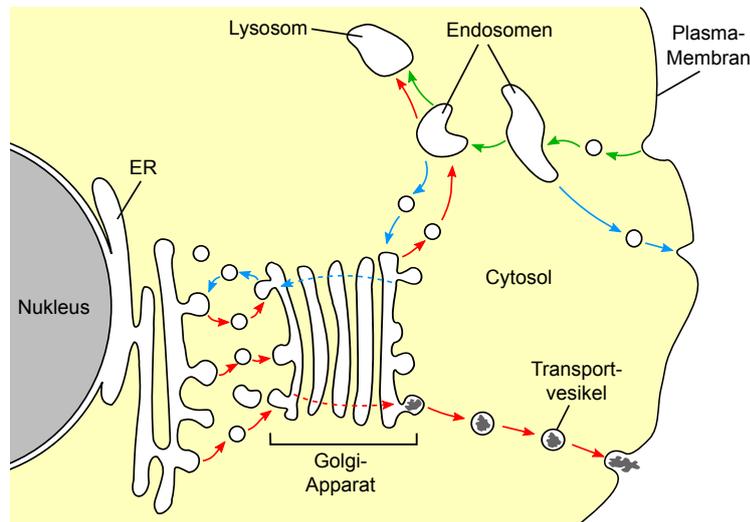
**Teil III.**

**Regulation und Organisation der  
ER Exit Sites**



# 8. Einleitung

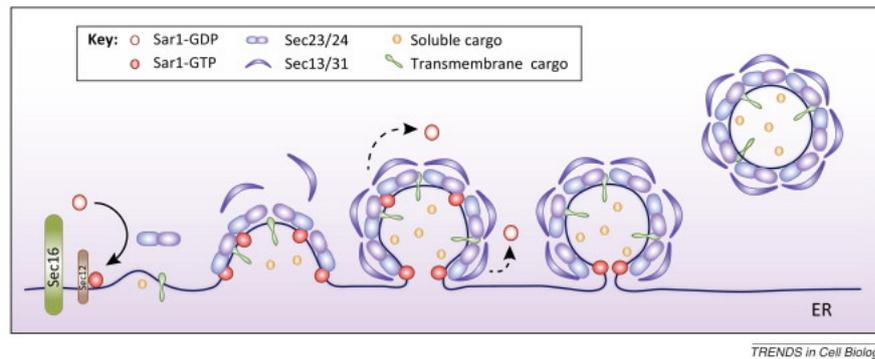
## 8.1. Vorwort



**Abbildung 8.1.** Sekretion und Endozytose in eukaryotischen Zellen. Die Beförderung der Proteine und weiterer Moleküle zwischen den Organellen findet in Vesikeln statt, die an Membranen von Organellen oder an der Plasma-Membran produziert werden. Bei der Sekretion (rote Pfeile) werden neusynthetisierte Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasma-Membran oder über (späte) Endosomen zu den Lysosomen transportiert. Bei der Endozytose (grüne Pfeile) wird Material von der Plasma-Membran über die Endosomen zu den Lysosomen transportiert. Manche Moleküle werden von den Endosomen zurück zur Plasma-Membran transportiert oder über das Golgi-Apparat zurück zum ER befördert. Alle diese rückwärts gerichteten Wege sind mit blauen Pfeilen markiert.

Sekretion von Proteinen und anderen Zellbausteinen (Lipiden, Kohlenhydraten) ist ein fundamentaler biologischer Prozess (siehe Abb. 8.1), der für den Wachstum und das Fortleben eukaryotischer Zellen notwendig ist. Etwa ein Drittel der in Zellen produzierten Proteine sind für die Sekretion bestimmt.<sup>[36]</sup> Proteine und Stoffe, die für die Sekretion bestimmt sind, werden nach ihrer Synthese entlang des sogenannten sekretorischen Pfades zur Plasma-Membran (PM) transportiert und aus der Zelle ausgeschieden. Der sekretorische Pfad stellt eine intrazelluläre Route bestehend aus mehreren Organellen dar. Während des Transports entlang dieser Route werden die Proteine modifiziert, sortiert und kontrolliert. Die Beförderung der Proteine zwischen den einzelnen Organellen findet dabei in kleinen unilaminaren Transportvesikeln statt.

Das Endoplasmatische Retikulum (ER) ist die erste Station des sekretorischen Pfades. Hier werden die Proteine synthetisiert, gefaltet und in Transportvesikel verpackt, um zur nächsten Station, dem Golgi-Apparat befördert zu werden. Die Produktion der Transportvesikel findet an spezifischen Domänen der ER-Membran statt, den sogenannten *ER exit sites* (ERES) und ist ein kontrolliert ablaufender Prozess, der durch den *Coat Protein Complex II* (COPII-Komplex) gesteuert wird. Der COPII-Komplex setzt sich aus drei Komponenten zusammen, dem Protein Sar1 sowie den Proteinkomplexen Sec23/Sec24 und Sec13/31, die jeweils die innere und die äußere



**Abbildung 8.2.** Schematische Darstellung der Entstehung eines COPII-Vesikels,<sup>[156]</sup> mit Genehmigung des Verlags *Elsevier* (Lz.-Nr: 3617121108248, von *Copyright Clearance Center*). Siehe Abs. 8.2.1 für Details.

Hülle eines Vesikels bilden. Die COPII-Komponenten werden nacheinander an die ER-Membran gebunden, wodurch diese immer stärker gekrümmt wird und es zur Vesikelformung kommt.

Auf molekularer Ebene ist die Vesikelentstehung im Wesentlichen gut charakterisiert und verstanden. Entstehung und Regulation der Domänen, an den die COPII-Vesikelproduktion stattfindet, den ERES, sind dagegen nicht vollständig aufgeklärt. So ist beispielsweise unbekannt welche Prozesse der Entstehung der ERES zugrunde liegen und welche Proteine dabei beteiligt sind. In diesem Zusammenhang gilt das Protein Sec16, als ein möglicher Initiator für die ERES-Bildung.<sup>[158]</sup>

Darüber hinaus ist bekannt, dass beispielsweise die Anzahl der ERES in Abhängigkeit von dem MAPK-Signaltransduktionsweg, der insbesondere beim Zellwachstum beteiligt ist, reguliert wird.<sup>[54]</sup> Hier wird für das Protein Sec16 eine regulierende Rolle vermutet.<sup>[54]</sup> Vollständig aufgeklärt ist dieser Regulationsprozess jedoch nicht. In dieser Arbeit wurde das dynamische Verhalten des Proteins Sec16 in lebenden Zellen charakterisiert, um seine Rolle für die Organisation und die Regulation der ERES näher zu untersuchen. Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Fragestellung näher erörtert.

## 8.2. Der frühe Sekretorische Pfad

### 8.2.1. Produktion einzelner COPII-Vesikel

Der erste Schritt bei der Entstehung eines Vesikels ist die Aktivierung der GTPase Sar1 durch einen GDP/GTP-Austausch (siehe Abb. 8.2). Die Aktivierung wird durch das Protein Sec12, einem Guanin-Nucleotid-Austausch-Faktor (GEF) von Sar1, an der ER-Membran katalysiert.<sup>[16]</sup> Infolge der Aktivierung wird Sar1 an die ER-Membran gebunden und ruft an dieser eine lokale Krümmung hervor. Als nächstes werden aus dem Zytosol nacheinander die Dimere Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 an Sar1 gebunden, wodurch auf der ER-Membran ein vollständiger COPII-Komplex entsteht. Der Zerfall des COPII-Komplexes findet infolge der GTP-Hydrolyse an Sar1 statt.<sup>[57]</sup> Die GTP-Hydrolyse von Sar1 wird durch die Anlagerung der beiden Dimere Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 stimuliert,<sup>[7,21,173]</sup> so dass ein vollständiger COPII-

Komplex ohne zusätzliche Stabilisierung intrinsisch instabil ist.<sup>[8]</sup> Die benötigte stabilisierende Funktion des COPII-Komplexes übernimmt mindestens teilweise das Protein Sec16.<sup>[94,166,172]</sup> Es bindet an den Komplex bestehend aus Sar1-Sec23/Sec24 und verhindert auf diese Weise das Anbinden von Sec13/Sec31 an Sec23/Sec24. Für die Fertigstellung eines COPII-Vesikels ist die Verknüpfung der beiden Dimere Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 miteinander notwendig,<sup>[58]</sup> wodurch Sec16 aus dem Komplex verdrängt werden muss. Der Mechanismus nach dem dies stattfindet ist zum heutigen Zeitpunkt unbekannt. Kürzlich wurde jedoch ein Protein identifiziert, das dazu fähig ist Sec16 aus dem COPII-Komplex zu verdrängen.<sup>[90]</sup>

*In vitro* sind die drei Kernkomponenten des COPII-Komplexes, Sar1, Sec23/Sec24, Sec13/Sec31, ausreichend, um auf Lipidmembranen eine Membrankrümmung hervorzurufen und Vesikel zu bilden.<sup>[106]</sup> *In vivo* wurde jedoch das Protein Sec16 als eine zusätzliche und essenzielle Komponente für die Produktion der COPII-Vesikel an den ERES identifiziert.<sup>[20,34,51,82,83,85,158]</sup>

Sec16 ist ein peripheres Membranprotein, das in lebenden Zellen großteils an den ERES lokalisiert ist.<sup>[34,141,158]</sup> Mit ca. 2200 Aminosäuren und einer Größe von 231 kDa<sup>[3]</sup> gehört es zu den größten Proteinen der Säugetierzellen. Es verfügt über mehrere Bindungsstellen zu den Proteinen des COPII-Komplexes. In Säugetierzellen sind als Bindungspartner Sec23<sup>[20,82]</sup> und Sec13<sup>[80,82]</sup> bekannt. In Hefezellen wurden Wechselwirkungen mit allen COPII-Komponenten inklusive der Proteine Sar1<sup>[151,172]</sup> und Sec12<sup>[51,111,141]</sup> nachgewiesen. Sowohl *in vitro*<sup>[20,83]</sup> als auch *in vivo*<sup>[83]</sup> wurde zusätzlich beobachtet, dass Sec16 Oligomere bildet. Die Oligomerisierung von Sec16 findet dabei auf Lipid-Membranen statt.<sup>[172]</sup> Gleichzeitig mit der Entstehung eines Transportvesikels wird in seinem Inneren das Transportgut konzentriert. Auf welche Weise die Selektion und die Konzentration des Transportguts stattfindet, ist nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass dabei das Heterodimer Sec23/Sec24 involviert ist.<sup>[11,108,109,165]</sup> Die Komponenten Sar1 und Sec13/Sec31 hingegen sorgen für die notwendige Membrankrümmung während der Vesikelentstehung und die Abschnürung des fertigen Vesikels.<sup>[147]</sup>

### 8.2.2. Die ERES und Sec16

#### Merkmale der ERES in lebenden Zellen

Die ERES wurden erstmals identifiziert als spezifische Domänen der ER-Membran mit einer hohen Konzentration des COPII-Komplexes.<sup>[15]</sup> Die ERES sind näherungsweise gitterartig über die Membran verteilt<sup>[26,68]</sup> und stellen relativ immobile, punktförmige Strukturen mit einem Durchmesser von  $\sim 400$  nm<sup>[15]</sup> dar. Der Austausch der COPII-Komponenten an den ERES findet innerhalb von Sekunden statt.<sup>[57,130]</sup> Die ERES können dagegen über mehrere Minuten bestehen bleiben.<sup>[68]</sup> Im Laufe ihrer Lebensdauer finden Fusionen und Schrumpfprozesse der ERES statt.<sup>[18,148]</sup> Darüber hinaus werden auch Neuf ormation der ERES in lebenden Zellen beobachtet. Kultivierte Säugetierzellen verfügen im Durchschnitt über 200–400 ERES pro Zelle.<sup>[68,155]</sup>

## Organisation der ERES

Anhand aktueller Forschungsergebnisse lassen sich für die Entstehung der ERES auf der ER-Membran zwei grundlegende Mechanismen identifizieren. Einerseits ist es die Selbstorganisation der COPII-Komponenten und andererseits können zusätzliche COPII-organisierende oder -regulierende Faktoren wie Proteine oder strukturelle Eigenschaften der ER-Membran (z.B. Lipiddomänen) dabei beteiligt sein.

Ein mögliches Modell für die Entstehung der ERES, das beide Aspekte berücksichtigt, wurde anhand von Computersimulationen untersucht.<sup>[76]</sup> Mit Berücksichtigung des bekannten Mechanismus zur Abschnürung der COPII-Vesikel (siehe Abs. 8.2.1) wurde hierbei ein Mechanismus angenommen, bei dem die Selbstorganisation der COPII-Proteine in Form von Fusionen zu größeren COPII-Clustern stattfindet. Das COPII-organisierende Element wurde als sogenanntes kooperatives Binden berücksichtigt, bei dem die COPII-Proteine im Zytosol eine höhere Wahrscheinlichkeit haben an größere COPII-Cluster auf der ER-Membran zu binden als an eine freie Membran. Die Simulationen zeigten, dass dieses Modell die gitterartige Anordnung der COPII-Cluster (ERES), die in lebenden Zellen beobachtet wird, gut reproduzieren kann. Die Größe der ERES hing dabei von dem Austausch der COPII-Proteine ab. Schneller COPII-Austausch, d.h. kurze Verweilzeit auf der Membran, führte zu kleineren und mobileren ERES. Ein solcher Effekt wurde in lebenden Zellen infolge des Mangels an Transportgut beobachtet.<sup>[57]</sup> Das kooperative Binden der COPII-Proteine führte in Simulationen zur Entstehung stabilerer ERES. Bei Abwesenheit eines solchen COPII-organisierenden Elements entstanden dagegen kleinere und weniger stabile ERES. Zusammenfassend zeigten diese Untersuchungen, dass die COPII-Proteine durch ihre Selbstorganisation zur Bildung kleinerer Cluster fähig sind. Zur Entstehung größerer COPII-Cluster (ERES) sind jedoch weitere COPII-organisierende (-regulierende) Faktoren notwendig.<sup>[76]</sup>

Bei einer anderen weitverbreiteten Hypothese zur Entstehung der ERES steht der COPII-organisierende Aspekt im Vordergrund. Dabei wird angenommen, dass die ERES auf der Basis eines bereits bestehenden Grundgerüsts (*Scaffold*), welches durch ein *Scaffold*-Protein gebildet wird, auf der ER-Membran entstehen. Das *Scaffold*-Protein hat dabei die Funktion die Position der ERES zu definieren, die COPII-Komponenten an diesen Stellen zu konzentrieren und den Materialexport aus dem ER zu regulieren.

Das Protein Sec16 gilt als ein vielversprechender Kandidat eines solchen *Scaffold*-Proteins.<sup>[80,83,141,142]</sup> Die wichtigste Beobachtung, die diese Idee unterstützt ist, dass bei biochemisch erzeugtem Mangel (*Depletion*) von Sec16 die Akkumulation der COPII-Komponenten an den ERES gestört wird und es zur Beeinträchtigung des Materialexports aus dem ER kommt.<sup>[20,34,83,158]</sup> Für eine *Scaffold*-Funktion spricht auch die Beobachtung, dass in mehreren Organismen die Anbindung von Sec16 an die ERES durch *Depletion* der COPII-Komponenten Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 nicht beeinträchtigt wird.<sup>[20,80,83]</sup> Allerdings wurde in Säugetierzellen beobachtet, dass die Anbindung von Sec16 an die ERES in Abhängigkeit von Sar1 stattfindet.<sup>[82,158]</sup> In *Drosophila* ist es dagegen Sec16, das die Anbindung von Sar1-GTP an die ER-Membran unterstützt.<sup>[83]</sup> Untersuchungen in *P. pastoris* und Säugetierzellen lassen darüber hinaus die Vermutung zu, dass Sec16 die Lokalisation des Proteins Sec12 auf der ER-Membran beeinflusst.<sup>[111]</sup>

Neuere Untersuchungen von Bharucha et al deuten jedoch auf anderes Verhalten von Sec16 im Bezug auf die COPII-Proteine Sec23/Sec24 und Sec13/Sec31 hin.<sup>[19]</sup> Hier ergaben die Experimente, dass eine Sec16-Mutante, bei der die COPII-bindende Domäne aus der Proteinsequenz entfernt wurde, nicht mehr an den ERES lokalisiert ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei biochemisch erzeugter Lokalisierung der COPII-Komponenten an Stellen außerhalb der ERES, auch Sec16 nicht mehr an den ERES lokalisiert ist.<sup>[19]</sup> Diese Untersuchungen zeigten demnach, dass Sec16 in Abhängigkeit von COPII-Proteinen an den ERES lokalisiert ist.

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen experimentellen Beobachtungen ist, dass in den verschiedenen Studien unterschiedliche biochemische Experimente durchgeführt wurden.<sup>[61]</sup> Während in den Arbeiten von Bhattacharyya et al.,<sup>[20]</sup> Ivan et al.<sup>[83]</sup> und Hughes et al.<sup>[80]</sup> *Depletion* nur einige COPII-Komponenten betraf, wurden in den Experimenten von Bharucha et al.<sup>[19]</sup> alle COPII-Komponenten aus den ERES und der ER-Membran entfernt.<sup>[61]</sup>

### Regulation der ERES während des Zellwachstums

Der Transport der Proteine entlang des sekretorischen Pfades findet in Abhängigkeit von anderen intrazellulären Prozessen statt. Die Kommunikation zwischen den Prozessen findet unter anderem durch Signaltransduktion statt. An den ERES wurde eine Vielzahl von Signalkaskaden identifiziert, die die COPII-Maschinerie und damit den Proteinexport entsprechend der momentanen Anforderungen der Zelle regulieren (siehe Referenz<sup>[52]</sup>). Bekannt sind beispielsweise Regulierungen aufgrund von ER-Stress durch den Signaltransduktionsweg *Unfolded Protein Response* (UPR),<sup>[53]</sup> durch Lipidsignale<sup>[23]</sup> sowie in Abhängigkeit vom Zellwachstum<sup>[54]</sup> und Zellzyklus.<sup>[86]</sup> Wird in Zellen durch einen intra- oder extrazellulären Reiz (z. B. Hormone, Wachstumsfaktoren) eine Signalkaskade aktiviert, so erfolgt zunächst über mehrere Zwischenschritte die Aktivierung einer für die Signalkaskade charakteristischen Proteinkinase. Die aktivierte Kinase phosphoryliert danach ein Protein, das bei dem zu regulierenden Prozess beteiligt ist, wodurch die Eigenschaften und Funktionsweise des Proteins beeinflusst werden (z. B. durch Konformationsänderungen). Phosphorylierbare Proteine in einem solchen Prozess werden Phosphoproteine genannt.

Der *Mitogen-activated Protein Kinase*-Weg (MAPK-Weg), der unter anderem bei der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung eine wichtige Rolle spielt,<sup>[136]</sup> ist eines der wichtigsten Signaltransduktionswege in eukaryotischen Zellen. Die Aktivierung des MAPK-Weges erfolgt hauptsächlich durch epidermale Wachstumsfaktoren (EGF).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die ERES in Abhängigkeit von dem MAPK-Weg reguliert werden.<sup>[54]</sup> In HeLa-Zellen wurde beobachtet, dass die Behandlung der Zellen mit EGF zu einer Erhöhung der Anzahl der ERES pro Zelle führte. Die Regulierung der Anzahl der ERES erfolgte dabei in Abhängigkeit von dem Protein Sec16. In Zellen, die mit EGF behandelt wurden, zeigte Sec16 in FRAP-Experimenten an den ERES eine niedrigere immobile Fraktion als in Zellen, die über mehrere Stunden ohne EGF inkubiert wurden. Bei Aktivierung des MAPK-Weges erhöhte sich demnach die Mobilität von Sec16 an den ERES. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Sec16 infolge einer MAPK-Aktivierung an der Aminosäure Threonin auf Position 415 (T415) phosphoryliert wird. Eine unphosphorylierbare Mutante von

Sec16, Sec16-T415I, zeigte sowohl bei Behandlung der Zellen mit EGF als auch ohne EGF eine konstant höhere immobile Fraktion an den ERES. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die niedrige Mobilität von Sec16 in Abwesenheit von EGF durch die fehlende Phosphorylierung verursacht wurde. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Sec16 mit COPII interagieren und phosphoryliert sein muss damit neue ERES infolge von MAPK-Pfad-Aktivierung entstehen können.<sup>[155]</sup> Es ist jedoch nicht klar, nach welchem Mechanismus neue ERES bei Aktivierung des MAPK-Weges entstehen.

Das Protein Sec16 ist nicht das einzige Phosphoprotein, das bei der Regulierung des Proteinexports beteiligt ist. In den letzten Jahren wurden die COPII-Komponenten Sec31<sup>[92,132]</sup> und Sec24,<sup>[42,140]</sup> als Phosphoproteine identifiziert. Insbesondere Sec24, das als Adapter für Transportgut fungiert, wird von der Kinase Akt phosphoryliert.<sup>[140]</sup> Diese Kinase wird bei Behandlung der Zellen mit EGF aktiviert.<sup>[176]</sup> Durch die Phosphorylierung von Sec24 wird die Interaktion zwischen Sec24 und Sec23 beeinflusst.<sup>[140]</sup> Fehlende Phosphorylierung führt dabei zur Schwächung der Interaktion zwischen Sec24 und Sec23.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass während des Zellwachstums nicht nur Sec16 bei der Regulierung des Proteinexports an den ERES beteiligt ist, sondern auch die Komponenten des COPII-Komplexes und insbesondere Sec24 involviert sein können.

### **Regulation der ERES in Abhängigkeit von der Menge des Transportguts**

Der Proteintransport hat Einfluss sowohl auf die Merkmale der ERES in Zellen als auch auf die Proteine, die bei dem Proteinexport an den ERES beteiligt sind.

Die Untersuchungen von Farhan et al. zeigten, dass die Anzahl und Größe der ERES in Abhängigkeit von der Menge des Transportgut (*Cargo*) reguliert wird.<sup>[53]</sup> Untersucht wurden die kurzfristige (akute) und die langfristige (chronische) Adaption der ERES an eine Erhöhung der *Cargo*-Menge an den ERES. Im Falle einer akuten Erhöhung von *Cargo* wurden vermehrt Fusionen der ERES beobachtet, wodurch weniger, jedoch größere ERES entstanden sind. Diese Vergrößerung diente dazu kurzfristig die Kapazität des Proteinexports an einzelnen ERES zu erhöhen. Bei einer chronischen Erhöhung der *Cargo*-Menge erhöhte sich dagegen die Anzahl der ERES in Zellen. Diese Änderung der ERES wurde in Abhängigkeit von dem Signaltransduktionsweg UPR reguliert. Infolge der Aktivierung des UPR wurde die Expression der COPII-Komponenten und Sec16 induziert, so dass in Zellen zusätzliche ERES entstehen konnten. Sowohl bei einer akuten als auch bei einer chronischen Erhöhung der *Cargo*-Menge wurde eine Beteiligung des Proteins Sec16 an der Adaption der ERES beobachtet. Auf welche Weise Sec16 zur Entstehung größerer oder zusätzlicher ERES beiträgt, wurde jedoch noch nicht aufgeklärt.

Andere Untersuchungen zeigten, dass der Austausch der COPII-Komponenten an den ERES in Abhängigkeit von der *Cargo*-Menge reguliert wird.<sup>[57]</sup> In FRAP-Experimenten an den ERES wurde beobachtet, dass bei einer Erniedrigung der *Cargo*-Menge durch die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (CHX) der Austausch des Dimers Sec23/Sec24 an den ERES beschleunigt wurde und der Austausch von Sar1 verzögert wurde. Eine ähnliche Untersuchung zeigte, dass infolge einer niedrigen *Cargo*-Menge, die ebenfalls durch Behandlung mit CHX eingeleitet wurde,

Sec16 an den ERES eine höhere immobile Fraktion, d.h. eine niedrigere Mobilität aufweist.<sup>[155]</sup>



## 9. Fragestellung

Das Protein Sec16 ist eines der wenigen bekannten Regulator-Proteinen an den ERES. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist seine Funktionsweise bei der Organisation und der Regulation der ERES nicht vollständig aufgeklärt.

In dieser Arbeit wurde das dynamische Verhalten von Sec16 in Abhängigkeit von zwei Einflussfaktoren in lebenden *Chinese Hamster Ovary* (CHO) Zellen untersucht. Die Untersuchungen richteten sich auf die Charakterisierung der Diffusion von Sec16 im Zytoplasma und des Austauschprozesses von Sec16 an den ERES. Das Verhalten von Sec16 wurde dabei zum einen die Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand und zum anderen in Abhängigkeit von seiner Bindung zum COPII-Komplex charakterisiert.

Die Diffusion von Sec16 im Zytoplasma wurde mit der Methode FCS und der Austauschprozess an den ERES wurde mit der Methode FRAP untersucht.

Für die Untersuchungen wurden vier verschiedene Sec16-Proteinkonstrukte verwendet (siehe Tab. 10.2), die unterschiedliche Eigenschaften bezüglich des Phosphorylierungszustandes und der Bindung zum COPII-Komplex aufwiesen. Es wurden die Proteinkonstrukte Sec16L-Wildtyp (Konstrukt: Sec16) sowie eine Sec16L-Mutante ohne Bindungsstellen zu den COPII-Komponenten Sec23 (Sec23A) und Sec12 (Konstrukt: Maddin),<sup>[155]</sup> eine unphosphorylierbare Mutante (Konstrukt: T415I) und eine permanent phosphorylierte Mutante (Konstrukt: T415E) untersucht. Die Plasmide dieser Proteinkonstrukte wurden im Labor von Dr. H. Farhan (BITg, Universität Konstanz) hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Verhalten der Proteinkonstrukte wurde bei den beiden Zellwachstumsbedingungen mit EGF (*Serum Stimulation*) und ohne EGF (*Starvation*) charakterisiert, bei denen die Proteinkonstrukte unterschiedliche Phosphorylierungszustände aufweisen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen trugen zu der Publikation von Tillmann et al.<sup>[155]</sup> bei.



# 10. Methoden

## 10.1. Zellkultur und Probenpräparation

### 10.1.1. Zellen

Alle Messungen wurden mit CHO (*Chinese Hamster Ovary*) Wildtyp-Zellen durchgeführt. Diese wurden im R10-Medium (siehe Tabelle 10.1) in Zellkulturflaschen (25  $\mu\text{m}^2$ , Hrst. Corning) bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Für Mikroskopie-Experimente wurden die Behälter *Nunc Lab-Tek Chambered Coverglass* (2 Kammern, No. 1, Borosilikatglas, Hrst. Thermo Scientific) zum Züchten der Zellen verwendet. Pro Kammer eines *Lab-Tek* wurde 1 ml Nährmedium verwendet.

### 10.1.2. Zellkulturmedien

Für die Zellkultur und die Durchführung der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente wurden mehrere Nährmedien für die Zellen verwendet. Die Zusammensetzung und experimentelle Anwendung aller verwendeten Medien sind in Tabelle 10.1 aufgeführt.

### 10.1.3. Plasmide

Es wurde das Protein Sec16L als Wildtyp und in drei biochemisch modifizierten Varianten (Maddin, T415I und T415E<sup>[54,155]</sup>) in lebenden Zellen untersucht. Die Zellen wurden dazu mit den jeweiligen Plasmiden der Proteine transfiziert. Die Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. H. Farhan (Universität Konstanz) hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle untersuchten Konstrukte sind Fusionsproteine bestehend aus der Proteinsequenz von Sec16 und GFP als Fluoreszenzmarkierung. Die Proteinkonstrukte und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 10.2 aufgelistet.

### 10.1.4. Transfektion der Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Hrst. Promega) verwendet. Für die Herstellung einer Transfektionslösung wurden entsprechend der Herstelleranleitung 4,5  $\mu\text{l}$  FuGENE 6 und 1,5  $\mu\text{g}$  eines Plasmids in 100  $\mu\text{l}$  Opti-MEM-Medium gelöst und 15 min bei RT inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Nährmedium der Zellen durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden danach mit je 100  $\mu\text{l}$  Transfektionslösung pro Kammer eines *Lab-Tek* versetzt und 18–24 h bei 37 °C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

### 10.1.5. Probenpräparation bei den Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation*

Transfizierte Zellen wurden bei den beiden experimentellen Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* untersucht.

Die Kondition *Serum Stimulation* entspricht den normalen Bedingungen zur Kultivierung der CHO-Zellen in einem Nährmedium, das 10 % Serum enthält. Experimentelle

Bezeichnung	Zusammensetzung	Anwendung
<b>R10</b>	RPMI 1640 Medium (Hrst. Gibco), 10 % fötales Kälberserum ( <i>Abk. Serum</i> ), 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin	Zellkultur Standardmedium, Nährmedium bei der Kondition <i>Serum Stimulation</i>
<b>R0</b>	RPMI 1640 Medium (Hrst. Gibco), 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % L-Glutamin	Nährmedium bei der Kondition <i>Starvation</i>
<b><i>Imaging-Medium (Serum Stimulation)</i></b>	MEM Medium ohne Phenolrot (Hrst. Gibco), 10 % Serum, 50 mmol/l HEPES (1 mol/l Stammlösung, Hrst. Gibco)	Medium für die Mikroskopie bei der Kondition <i>Serum Stimulation</i>
<b><i>Imaging-Medium (Starvation)</i></b>	MEM Medium ohne Phenolrot (Hrst. Gibco), 50 mmol/l HEPES (1 mol/l Stammlösung, Hrst. Gibco)	Medium für die Mikroskopie bei der Kondition <i>Starvation</i>
<b>Opti-MEM</b>	Opti-MEM GlutaMax Medium (Hrst. Gibco)	Medium zur Herstellung der Transfektionslösungen

**Tabelle 10.1.:** Verwendete Zellkulturmedien für die Zellkultur und die Durchführung der in diesem Kapitel vorgestellten Experimente.

Untersuchungen bei dieser Kondition wurden an Zellen durchgeführt, die nach der Transfektion bis zur Vermessungen am Mikroskop im R10-Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

Untersuchungen bei der Kondition *Starvation* wurden an transfizierten Zellen durchgeführt, die für 4–6 h vor einer Untersuchung am Mikroskop in einem Nährmedium ohne Serum (R0-Medium) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

### 10.1.6. Probenpräparation für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Untersuchungen der Zellen am Mikroskop wurde ein farbstofffreies *Imaging-Medium* verwendet. Der pH-Wert des Mediums während der Messungen wurde durch

Name	Plasmid	Besonderheit	Sequenzmodifizierung
<b>Sec16</b>	<b>GFP-Sec16</b>	Sec16L-Wildtyp	keine
<b>Maddin</b>	<b>GFP-Sec16-Maddin</b>	keine Bindung zu Sec23A und Sec12 <sup>[54]</sup>	Verkürzung um die letzten 431 Aminosäuren am C-Terminus
<b>T415I</b>	<b>GFP-Sec16-T415I</b>	Fähigkeit zur Phosphorylierung erniedrigt um min. 65 % <sup>[54]</sup>	Substitution von Thr415 zu Ile
<b>T415E</b>	<b>GFP-Sec16-T415E</b>	permanent phosphoryliert	Substitution von Thr415 zu Glu

**Tabelle 10.2.:** Verwendete Plasmide des Proteins Sec16L,<sup>[54,155]</sup> zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Dr. H. Farhan (Universität Konstanz).

Zugabe von 50 mmol/l HEPES stabilisiert Für Experimente bei der Kondition *Serum Stimulation* wurde das *Imaging*-Medium mit 10 % Serum ergänzt.

## 10.2. Experimentelle Methoden und Auswertung

### 10.2.1. Experimentelle Ausstattung

Alle Messungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop des Modells Leica TCS SP5 durchgeführt. Dieser verfügte über einen 63×/1,2 NA Wasserimmersionsobjektiv, einen FCS-Unit (PicoQuant) und einen 65 mW Argon-CW-Laser. Für FRAP-Experimente wurde ein Photomultiplier als Detektor verwendet. Bei FCS-Messungen erfolgte die Detektion mit einem 500–550 nm Bandpassfilter und einer Avalanche-Photodiode (APD) als Detektor.

Die Parameter für die Fluoreszenzanregung und die Detektion wurden entsprechend des Absorptions- und des Emissionsspektrums von GFP gewählt (siehe Abb. 3.1). Alle Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C durchgeführt. Dazu wurde eine am Lehrstuhl angefertigte Inkubationskammer verwendet.

### 10.2.2. FRAP-Messungen an den ERES

#### Durchführung der FRAP-Messungen

FRAP wurde an einzelnen ERES gemessen.

Für die Fluoreszenzanregung wurde die 488 nm Laserlinie des Ar-Lasers verwendet. Die Fluoreszenz wurde im Bereich von 500–600 nm detektiert. Für die Bildaufnahme wurde der bidirektionale Scan-Modus mit einer Scanfrequenz von 700 Hz verwendet. Die Öffnung der Lochblende des Mikroskops betrug 2 AU. Es wurde ein Bildformat von 256 × 256 Pixel und ein elektronischer Zoom von 20× verwendet. Insgesamt wurde pro Frame eine Fläche von 12,3 μm × 12,3 μm abgerastert.

Es wurde eine kreisförmige ROI-Geometrie mit einem Durchmesser von 0,8 μm verwendet. Effektives Photobleichen der Fluorophore in der ROI wurde erzielt, indem

während des Bleichvorgangs der Zoom-In-Modus (Leica-Spezifikation) und drei Ar-Laserlinien (476 nm, 488 nm und 496 nm) verwendet wurden. Die relativen Intensitäten der Laserlinien wurden dabei so angepasst, dass die Fluoreszenzintensität in der ROI beim Bleichvorgang um etwa 50 % gesenkt wurde.

Ein FRAP-Experiment enthielt zwei Frames vor dem Bleichen (*Prebleach*), einem Frame während des Bleichens (*Bleach*) und 105 Frames nach dem Bleichen (*Postbleach*). Bei den Abschnitten *Prebleach* und *Bleach* wurde ein Zeitintervall von 190 ms zwischen den Frames verwendet. Der Abschnitt *Postbleach* setzte sich zusammen aus 10 Frames alle 190 ms, 15 Frames alle 500 ms und 80 Frames alle 1,5 s. Die Gesamtdauer eines FRAP-Experiments betrug insgesamt ca. 130 s.

Aufgrund der toxischen Wirkung des Photobleichens (siehe Abs. 3.4.5) wurden pro Zelle nicht mehr 3 FRAP-Experimente durchgeführt.

### Auswertung der FRAP-Messungen

Die ERES zeigten im Verlauf einer FRAP-Messung Eigenbewegungen auf, die oftmals über die Grenzen der fest positionierten ROI-Markierung hinaus gingen. In einem solchen Fall kann die Fluoreszenzerholung der untersuchten Objekte nicht mehr in ausreichendem Maße erfasst werden. Aus diesem Grund wurde für jedes Frame einer FRAP-Bilderserie eine eigene ROI-Markierung definiert und damit die Bewegung der ERES nachverfolgt wurde. Diese Prozedur wurde manuell mit dem Programm ImageJ/FIJI durchgeführt. Die Fluoreszenzintensitäten der ROI ( $F_{ROI}$ ) wurde als Summe der Bit-Graustufenwerte der Pixel in der ROI bestimmt.

Anhand der resultierten Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurven ( $F_{ROI}(t)$ ) wurden mit dem Programm QtiPlot 0.9.8.9 die charakteristische Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  und die immobile Fraktion  $f_i$  bestimmt.

Für die Bestimmung des Parameters  $\tau$  wurde der FRAP-Kurvenbereich direkt nach dem Bleichen an die einfach-exponentielle Funktion (3.29) gefittet.

Die immobile Fraktion  $f_i$  wurde nach Formel (3.31) bestimmt. Der Parameter der Ausgangsfluoreszenz der ROI vor dem Bleichen ( $F_0$ ) wurde als Mittelwert der ersten beiden Werte der *Prebleach*-Phase bestimmt. Der Parameter  $F_{ROI}^{\infty}$  wurde als der Mittelwert der letzten 10 Werte in der *Postbleach*-Phase bestimmt und ( $F_{ROI}^{\infty} \cdot f$ ) entspricht dem ersten Wert der Kurve direkt nach dem Bleichen.

## 10.2.3. FCS-Messungen im Nukleus und Zytoplasma

### Durchführung der FCS-Messungen

FCS-Messungen wurden im Inneren einer Zelle im Nukleus oder an Stellen außerhalb der ERES durchgeführt. An den ausgewählten Stellen wurde zunächst das Fluoreszenzsignal zeitlich erfasst und anschließend mit sich selbst korreliert (Autokorrelation).

Für FCS-Messungen wurden Zellen mit möglichst schwacher Fluoreszenz ausgewählt. Die Messdauer des Fluoreszenzsignals betrug 60–90 s. Die Öffnung der Lochblende betrug 1 AU. Für die Fluoreszenzanregung wurde die 488 nm Laserlinie des Ar-Lasers verwendet. Die Intensität des Lasers wurde so angepasst, dass am APD eine Photonencounttrate von ca. 5000–10000 cps detektiert wurde.

Aus den resultierten Fluoreszenzintensität-Zeit-Kurven ( $F(t)$ ) wurden mit der Soft-

ware SymPhoTime (PicoQuant) Autokorrelationskurven  $G(\tau)$  nach Gleichung (10.1) berechnet.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (10.1)$$

Dabei ist  $\langle F(t) \rangle$  der zeitliche Mittelwert der Fluoreszenzintensität während der Messung,  $\delta F(t)$  sind die Fluktuationen der Fluoreszenz um den Mittelwert  $\langle F(t) \rangle$  und  $\tau$  ist die Korrelationszeit.

### Auswertung der FCS-Messungen

Die aufgenommenen FCS-Kurven wurden im Bereich von 0,01 – 1000 ms mit den Autokorrelationsfunktionen für dreidimensionale anomale Diffusion einer Komponente (Gl.(3.25)) und für zweidimensionale Diffusion mit zwei diffusiven Spezies (Gl.(3.23)) gefittet. Der Fit-Bereich wurde so gewählt, dass sowohl die photophysikalischen Effekte von GFP als auch das *Afterpulsing* des APD in den Kurven bereits abgeklungen sind (siehe Abs. 3.3.5).

#### 10.2.4. Bestimmung der theoretischen Werte der Diffusionskoeffizienten und der Diffusionszeiten von Proteinen

Zur Bestimmung der theoretischen Werte der Diffusionskoeffizienten  $D_{x,\text{theo}}$  der Sec16-Proteine im Zytosol ( $x = c$ ) und Nukleus ( $x = n$ ) wurde die Stokes-Einstein-Gleichung 10.2 verwendet. Die Proteine werden hierbei als kugelförmige Objekte im dreidimensionalen isotropen Medium mit der Viskosität  $\eta_x$  mit  $x = \{c, n\}$  betrachtet.

$$D_{x,\text{theo}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_x R_H} \quad (10.2)$$

Dabei ist  $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K die Boltzmannkonstante,<sup>[160]</sup>  $T = 310$  K (37 °C) die absolute Temperatur und  $R_H$  der hydrodynamische Radius des Proteins. Für die Sec16-Proteine wurde nach der empirischen Formel (10.3)<sup>[39]</sup> ein Radius von  $R_H = 6,6$  nm bestimmt.

$$R_H = 0,325 \cdot N^{0,392}[\text{nm}] \quad (10.3)$$

Diese Formel wurde aus statistischen und experimentellen Untersuchungen der Proteinradien abgeleitet.<sup>[39]</sup> Dabei ist  $N = 2179$ <sup>[3]</sup> die Anzahl der Aminosäure der Sec16-Proteine.

Für die Viskosität des Zytosols wurde entsprechend einer Studie von Swaminathan et al. um den Faktor 3,2 größer geschätzt als die Viskosität des Wassers  $\eta_w$ .<sup>[152]</sup> Bei  $T = 37$  °C beträgt  $\eta_w = 6,9 \cdot 10^{-4}$  Pa s.<sup>[160]</sup> Es ergab sich  $\eta_c = 2,24 \cdot 10^{-3}$  Pa s. Die Viskosität im Nukleus beträgt  $\eta_n = 2,3 \cdot 10^{-3}$  Pa s.<sup>[99]</sup> Die korrespondierenden Diffusionszeiten  $\tau_{x,\text{theo}}$  wurden entsprechend Gl. (3.20) und (3.1) mit  $\lambda = 488$  nm und NA = 1,2 bestimmt.

### 10.2.5. Auswertung der kumulativen Verteilungen der Messwerte

Die Verteilungsfunktionen  $P(x)$  für unimodale und bimodale Normalverteilungen des Messparameters  $x$  lauten:

$$P(x) = \frac{1}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{x - \mu}{\sqrt{2\sigma^2}} \right) \right] \quad (10.4)$$

$$P(x) = \frac{f_1}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{x - \mu_1}{\sqrt{2\sigma_1^2}} \right) \right] + \frac{1 - f_1}{2} \left[ 1 + \operatorname{erf} \left( \frac{x - \mu_2}{\sqrt{2\sigma_2^2}} \right) \right] \quad (10.5)$$

Hier sind  $\mu, \mu_1, \mu_2$  die Erwartungswerte und  $\sigma^2, \sigma_1^2, \sigma_2^2$  die Varianz des Messparameters  $x$ . Bei bimodalen Verteilungen entspricht  $f_1$  dem relativen Anteil der Messwerte in der ersten Population. Der Schnittpunkt der beiden Populationen in einer bimodalen Verteilung lässt sich anhand ihrer Wahrscheinlichkeitsdichte  $w(x) = \frac{dP(x)}{dx}$ , die der ersten Ableitung von  $P(x)$  entspricht, bestimmen.

$$w(x) = \frac{\exp \left( -\frac{(x - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right)}{\sqrt{\pi 2\sigma_1^2}} \quad (10.6)$$

$$w(x) = f_1 \cdot \frac{\exp \left( -\frac{(x - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right)}{\sqrt{\pi 2\sigma_1^2}} + (1 - f_1) \cdot \frac{\exp \left( -\frac{(x - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2} \right)}{\sqrt{\pi 2\sigma_2^2}} \quad (10.7)$$

Der erste Term in Gl. (10.5) ist die Wahrscheinlichkeitsdichte der ersten Population und der zweite Term die der zweiten Population des Messparameters  $x$ . Der Schnittpunkt der beiden Populationen ergibt sich demnach aus:

$$f_1 \cdot \frac{\exp \left( -\frac{(x - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right)}{\sqrt{\pi 2\sigma_1^2}} = (1 - f_1) \cdot \frac{\exp \left( -\frac{(x - \mu_2)^2}{2\sigma_2^2} \right)}{\sqrt{\pi 2\sigma_2^2}} \quad (10.8)$$

Hieraus folgt:

$$0 = x^2 \left( \frac{1}{2\sigma_1^2} - \frac{1}{2\sigma_2^2} \right) + x \left( \frac{\mu_2}{\sigma_2^2} - \frac{\mu_1}{\sigma_1^2} \right) + \left( \frac{\mu_1^2}{2\sigma_1^2} - \frac{\mu_2^2}{2\sigma_2^2} - \ln \left[ \frac{f_1 \sigma_2}{\sigma_1 (1 - f_1)} \right] \right) \quad (10.9)$$

Die Lösung für diese Gleichung lautet:

$$x = \frac{-b + \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad \text{mit} \quad a = \frac{1}{2\sigma_1^2} - \frac{1}{2\sigma_2^2}$$
$$b = \frac{\mu_2}{\sigma_2^2} - \frac{\mu_1}{\sigma_1^2}$$
$$c = \frac{\mu_1^2}{2\sigma_1^2} - \frac{\mu_2^2}{2\sigma_2^2} - \ln\left(\frac{f_1\sigma_2}{\sigma_1(1-f_1)}\right)$$



# 11. Ergebnisse

## 11.1. Phänotypen der Sec16-Proteinkonstrukte in Zellen

In Abb. 11.1 sind repräsentative Fluoreszenzbilder der vier Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden experimentellen Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* in lebenden Zellen zu sehen.

Das Konstrukt Sec16 zeigt bei der Kondition *Serum Stimulation* einen relativ stark ausgeprägten ERES-Phänotypen: auf einem homogen fluoreszierenden Hintergrund sind stark fluoreszierende punktförmige Strukturen zu erkennen. Im Vergleich dazu sind bei der Kondition *Starvation* per Auge keine starken Unterschiede an den Mustern der ERES (Größe, Fluoreszenzintensität) festzustellen.

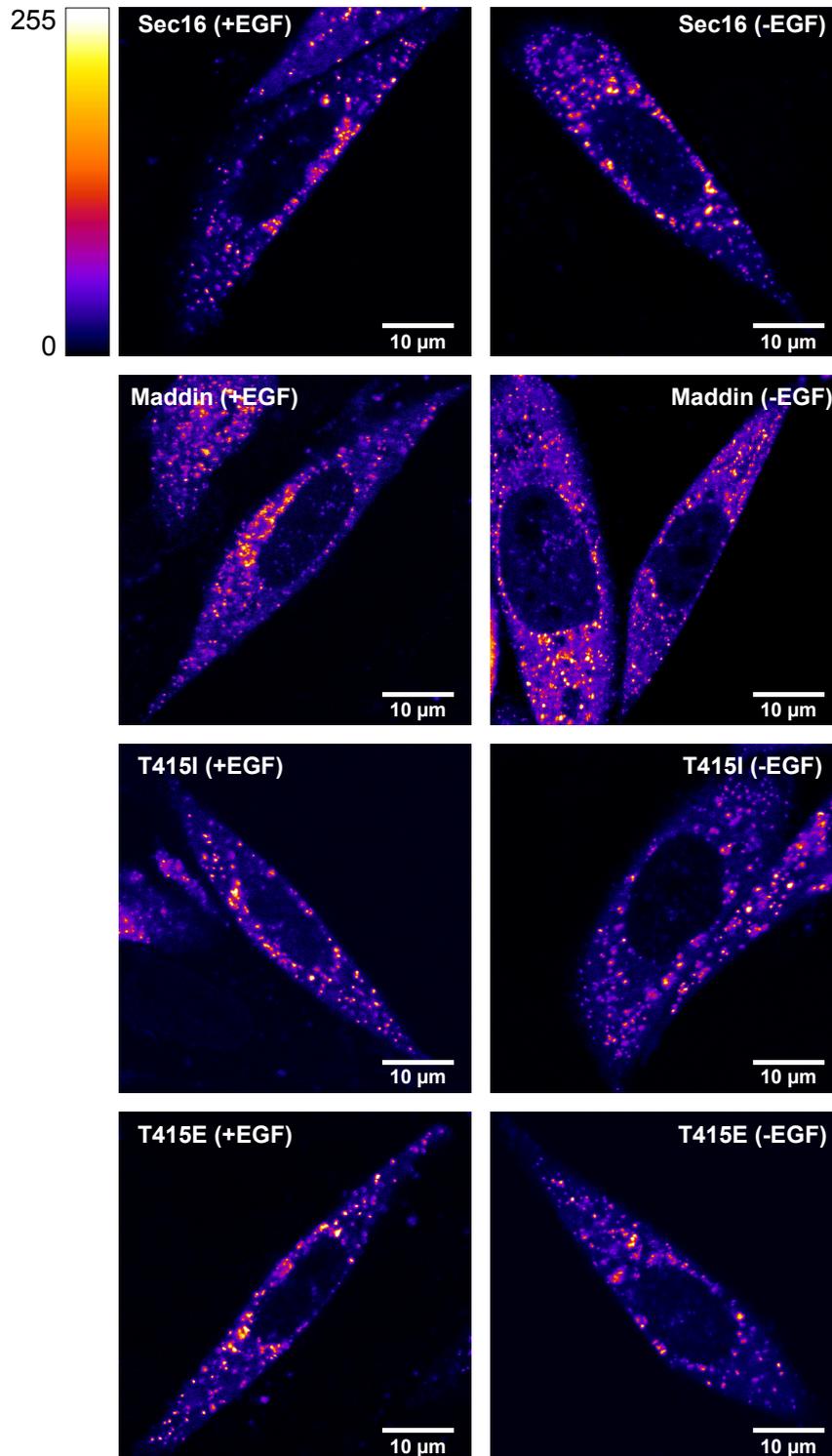
Die Mutanten T415I und T415E zeigen einen ähnlich stark ausgeprägten ERES-Phänotypen wie Sec16. Zwischen den Phänotypen bei den Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* sind bei den beiden Konstrukten keine starken Unterschiede zu erkennen.

Bei dem ERES-Phänotypen des Proteins Maddin lassen sich stärkere Unterscheide zum Sec16-Phänotyp feststellen. Es sind zwar punktförmige stark fluoreszierende Strukturen zu erkennen, jedoch ist der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten zwischen den ERES und dem restlichen Zytoplasma niedriger als bei Sec16. Demnach ist der relative Anteil an Maddin-Proteinen, die an die ERES gebunden sind, niedriger als bei Sec16.

Die Fluoreszenz des Zytoplasmas außerhalb der ERES ist bei allen Konstrukten homogen und zeigt keine Merkmale intrazellulärer Strukturen, die man bei Proteinen, die an Membranen anderer Organellen gebunden sind, erwarten würde. Diese Art der Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas kann durch den Aufenthalt der Proteine im Zytosol zustandekommen. Lösliche Proteine, die keine Kernlokalisierungssignale aufweisen, haben die Eigenschaft durch passive Diffusion oder nach Zellteilung in den Nukleus eindringen zu können. Dies wurde unter anderem bei Homooligomeren bestehend aus sechs GFP-Proteinen, die eine ähnliche Größe haben wie Sec16, beobachtet.<sup>[137]</sup> Für Sec16 sind keine Kernlokalisationssignale bekannt. Die leichte Fluoreszenzfärbung des Nukleus deutet demnach darauf hin, dass die untersuchten Sec16-Konstrukte über eine im Zytosol gelöste Fraktion von Proteinen verfügen, die durch passive Diffusion oder nach Zellteilung in den Nukleus eingedrungen sind.

Die zweite mögliche Erklärung für die Entstehung der homogenen Fluoreszenz der vier Sec16-Konstrukte im Zytoplasma ist, dass diese Fluoreszenz aus einer Mischung von im Zytosol gelösten und membrangebundenen Proteinen entstanden ist. Diese Überlegung entspricht der Eigenschaft von Sec16, als ein peripheres Membranprotein, sich sowohl im Zytosol als auch auf Lipidmembranen aufhalten zu können.

Anhand von Fluoreszenzbildern lassen sich die beiden Möglichkeiten für die Fluoreszenz des Zytoplasmas nicht unterscheiden. Die Diffusion der Proteine auf Membranen ist deutlich langsamer, als im Zytosol. Bei FCS-Messungen äußert sich dieser Unterschied in Form von größeren Diffusionszeiten (siehe Abs. 3.3.4). Die zutreffende Erklärung für die beobachtete Fluoreszenz des Zytoplasmas außerhalb der ERES lässt sich demnach durch die Vermessung der Diffusionszeiten von Sec16 im Zytoplasma



**Abbildung 11.1.** Phänotypen der Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF) in lebenden CHO-Zellen. Bei allen Proteinkonstrukten sind ERES (stark fluoreszierende punktförmige Strukturen) auf einem homogen fluoreszierenden Zytoplasma zu erkennen. Siehe Abs. 11.1 für Details.

mit dieser Methode identifizieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen befinden sich in Abs. 11.2.2.

## 11.2. Ergebnisse der FCS-Messungen im Nukleus und Zytoplasma

### 11.2.1. Diffusion im Nukleus

Für Kontrollzwecke wurde die Diffusion des Konstruktes Sec16 im Nukleus mittels FCS vermessen. Für Proteine ist in lebenden Zellen anomale Diffusion zu erwarten (siehe Abs. 2.2.1 und 1.4). Dementsprechend wurden die gemessenen FCS-Kurven mit der Modellfunktion für dreidimensionale anomale Diffusion (Abk. *3D-anomal*, Gl. (3.25)) gefittet.

Mit einer guten mittleren Fit-Güte von  $R^2 = 0,991$  ergab sich für die Diffusionszeit ein Mittelwert von  $\tau_n = 0,94 \pm 0,38$  ms und für die Anomalität ein Mittelwert von  $\alpha_n = 0,63 \pm 0,06$ .

Ähnliche Anomalitätsgrade wurden bereits bei der Diffusion von Partikeln mit ähnlicher Größe wie Sec16 im Nukleus beobachtet.<sup>[64]</sup>

Als Vergleichswert für die Diffusionszeit  $\tau_n$  lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung für Sec16 im Nukleus eine theoretische Diffusionszeit von  $\tau_{n,theo} = 0,68$  ms abschätzen (siehe Abs. 10.2.4). Diese stimmt gut mit der experimentell bestimmten Diffusionszeit  $\tau_n$  gut überein.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass es bei den diffundierenden Spezies im Nukleus um Sec16 handelt und deuten darauf hin, dass Sec16 über eine im Zytosol gelöste Fraktion von Proteinen verfügt.

### 11.2.2. Auswahl und Anpassung der Fit-Funktion für FCS-Messungen im Zytoplasma

Anhand der Aufnahmen einzelner transfizierter Zellen konnten zwei mögliche Erklärungen für die homogene Färbung des Zytoplasmas außerhalb der ERES abgeleitet werden. Die zytoplasmische Fluoreszenz kann entweder rein zytosolischer Natur sein oder durch eine Mischung aus im Zytosol gelösten und membrangebundenen Proteine zustandekommen (vgl. Abs. 11.1). Die beiden Möglichkeiten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der FCS-Messungen von Sec16 im Nukleus, die belegen, dass Sec16 über eine im Zytosol gelöste Fraktion von Proteinen verfügt.

Um die zutreffende Möglichkeit für die Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas außerhalb der ERES zu identifizieren, wurden FCS-Messungen von Sec16 in dieser Zellregion bei der Zellwachstumsbedingung *Serum Stimulation* durchgeführt. Die resultierenden Kurven wurden mit Autokorrelationsfunktionen von zwei unterschiedlichen Diffusionsmodellen gefittet, die die Diffusion der Proteine entsprechend der beiden Möglichkeiten der zytoplasmischen Färbung beschreiben.

Das *3D-anomal*-Modell (Gl. (3.25)) repräsentiert den Fall, dass die zytoplasmische Fluoreszenz ausschließlich durch im Zytosol gelöste Proteine verursacht wurde.

Im Fall, dass die Sec16-Proteine sich sowohl im Zytosol, als auch auf einer Membran bewegen, bietet sich für das Fitten der FCS-Kurven prinzipiell eine Funktion an, die sich aus der Summe von zwei einkomponentigen Modellen für anomale Diffusion zu-

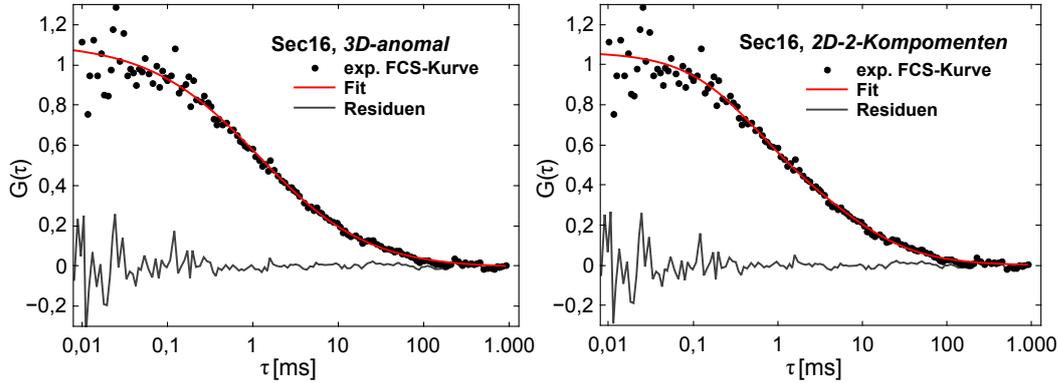
	<i>3D-anomal-Modell</i>	<i>2D-2-Komponenten-Modell</i>
$\tau_z$	$4,68 \pm 2,23$ ms ( $\pm 48$ %)	$\tau_c$ $0,83 \pm 0,28$ ms ( $\pm 34$ %)
$\alpha$	$0,63 \pm 0,07$ ( $\pm 11$ %)	$\tau_m$ $19,62 \pm 8,56$ ms ( $\pm 44$ %)
		$f_c$ $0,48 \pm 0,12$ ( $\pm 25$ %)
$R^2$	0,97	$R^2$ 0,97

**Tabelle 11.1.:** Fit-Ergebnisse eines Datensatzes bestehend aus  $n = 22$  FCS-Kurven des Proteins Sec16 gemessen im Zytoplasma bei der Kondition *Serum Stimulation* gefittet mit den Modellfunktionen für dreidimensionale anomale Diffusion mit einer Komponente (*3D-anomal-Modell*, Gl. (3.25)) und für zweidimensionale normale Diffusion mit zwei Komponenten (*2D-2-Komponenten-Modell*, Gl. (3.23)). Mit beiden Modellen lassen sich die Messdaten gleichermaßen gut reproduzieren.

sammensetzt. Für die löslichen Proteine eignet sich auch hier das *3D-anomal-Modell*. Für die membrangebundene Komponente kommt eine Modellfunktion für zweidimensionale anomale Diffusion in Betracht. Aus der Summe dieser beiden Modelle geht eine Funktion mit den fünf Fit-Parametern für die Diffusionszeiten der beiden Komponenten ( $\tau_1$  und  $\tau_2$ ), den Anomalien der beiden Komponenten ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) und dem Teilchenanteil der ersten Komponente ( $f_1$ ) hervor. Eine Funktion mit dieser Anzahl von freien Parametern liefert jedoch nur bei perfekt glatten FCS-Kurven eindeutige Ergebnisse. Für verrauschte Kurven, die üblicherweise aus Messungen in lebenden Zellen hervorgehen, ergeben sich jedoch verschiedene Werte-Kombinationen der Fit-Parameter, die zur gleicher Fit-Güte der Kurven führen. Die Auswertung der FCS-Kurven mit einer solchen Funktion kann demnach keine verwendbaren Informationen über die Bewegung der Proteine im Zytoplasma liefern. Aus diesem Grund wurde als Fit-Funktion für die zweite Möglichkeit der zytoplasmischen Färbung eine weniger komplexe Modellfunktion für zweidimensionale Diffusion mit zwei Komponenten ohne Anomalität (Abk. *2D-2-Komponenten*, Gl. (3.23)) mit den Fit-Parametern  $\tau_c$  und  $\tau_m$ , der Diffusionszeiten der beiden Komponenten, und  $f_c$ , dem relativen Anteil der schnellen Komponente, gewählt. Um die Fit-Funktion weiterhin zu vereinfachen wurde der Beitrag der löslichen Komponente in Gl. (3.23) als zweidimensional und nicht dreidimensional berücksichtigt. Ein Grund hierfür ist, dass die Diffusion der Proteine in  $z$ -Richtung aufgrund der Elongation des konfokalen Volumens nur einen minimalen Einfluss auf den Verlauf der Autokorrelationsfunktion (siehe Abb. 3.4) hat. In einer Autokorrelationsfunktion, in der zwei Komponenten berücksichtigt werden, ist dieser Einfluss sogar kaum erkennbar (siehe Abb. 3.5). Ein weiterer Grund für die Vereinfachung ist, dass in dieser Arbeit die relativen und nicht die absoluten Charakteristika (Diffusionszeit, relative Anteile) für die Diffusion der Proteine bestimmt werden sollen.

In Abb. 11.2 ist eine repräsentative FCS-Kurve dargestellt, die mit den beiden Diffusionsmodellen gefittet wurde und in Tabelle 11.1 befindet sich eine Übersicht über die Fit-Ergebnisse des gesamten Datensatzes dieser Messung.

Der Vergleich der beiden Fits per Auge und auch anhand des Fit-Güte Parameters  $R^2$  (0,97 für beide Modelle) zeigt, dass die experimentellen Ergebnisse gleichermaßen gut mit den beiden Diffusionsmodellen reproduziert werden können. Auch bei den



**Abbildung 11.2.** Repräsentativer Vergleich der Fits mit den Modellfunktionen für dreidimensionale anomale Diffusion mit einer Komponenten (*3D-anomal*, Gl. (3.25)) und für zweidimensionale normale Diffusion mit zwei Komponenten (*2D-2-Komponenten*, Gl. (3.23)). Gezeigt an einer experimentellen FCS-Kurve des Proteins Sec16 bei der Kondition *Serum Stimulation (+EGF)* im Zytoplasma. Die Fit-Güte für die gezeigte Kurve beträgt für beide Modelle  $R^2 = 0,98$ . Aus den gleichen  $R^2$ -Werten und der ähnlichen Streuung der Residuen lässt sich schließen, dass beide Modelle die experimentellen Daten gleichermaßen gut reproduzieren können. Dies trifft auf alle FCS-Kurven im Datensatz zu. Die Fit-Ergebnisse zu den beiden Modellen des gesamten Datensatzes sind in Tab. 11.1 zusammengefasst.

Streuungen der Werte um ihre Mittelwerte sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Modellen zu erkennen. Die Diffusionszeiten weisen bei beiden Modellen die größten Streuungen der Messwerte auf (*3D-anomal*:  $\tau_z$  mit  $\pm 48\%$ , *2D-2-Komponenten*:  $\tau_c$  mit  $\pm 34\%$ ,  $\tau_m$  mit  $\pm 44\%$ ). Daneben gibt es bei beiden Modellen relativ stabile Parameter mit kleineren Streuungen der Messwerte (*3D-anomal*:  $\alpha$  mit  $\pm 11\%$ , *2D-2-Komponenten*:  $f_{\tau_1}$  mit  $\pm 25\%$ ). Demnach lässt sich weder an der Fit-Güte der Kurven, noch an den Streuungen der Fit-Parameter erkennen, welches Diffusionsmodell sich am besten eignet.

Um weitere Anhaltspunkte für die Auswahl eines geeigneten Diffusionsmodells zu finden, wurden die gemessenen Diffusionszeiten mit theoretischen und experimentellen Werten sowie mit Literaturwerten verglichen.

Theoretisch lässt sich die Diffusionszeit von Sec16 im Zytosol mit Hilfe der Einstein-Stokes-Gleichung abschätzen (siehe Abs. 10.2.4). Hierbei ergibt sich eine Diffusionszeit von  $\tau_{c,theo} = 0,77$  ms. Ein weiterer Vergleichswert ist die Diffusionszeit  $\tau_n$  von Sec16 im Nukleus (siehe Abs. 11.2.1). Zusätzlich wurde von Guigas et al.<sup>[64]</sup> für anomal diffundierende Partikel mit ähnlicher Größe wie Sec16 ( $\approx 5$  nm) mittels FCS im Zytosol eine Diffusionszeit von  $\tau_{z,lit} = 0,65$  ms bestimmt.

Das gemessene  $\tau_z = 4,68$  ms stimmt nicht mit den Vergleichswerten ( $\tau_n, \tau_{c,theo}$  und  $\tau_{z,lit}$ ) überein. Diffusionszeiten in der Größenordnung von  $\tau_z$  sind entweder im Zytosol für sehr große Komplexe (Multimer aus ca. 50 Sec16-Proteinen) oder bei der Diffusion von Proteinen auf zellulären Membranen zu erwarten.<sup>[135]</sup> Zum heutigen Zeitpunkt gibt es keine Anhaltspunkte dafür, dass Sec16 im Zytosol, also in wässriger Umgebung, in größeren Komplexen vorliegt. *In vitro* wurde lediglich beobachtet, dass Sec16 auf Lipidmembranen Oligomere bildet.<sup>[172]</sup>

Für das Modell der zweidimensionalen Diffusion mit zwei Komponenten (*2D-2-Komponenten-Modell*) ergaben sich Fit-Ergebnisse, die gut mit erwarteten Diffusionszeiten von Sec16 im Zytosol und auf Membranen übereinstimmen. Die schnelle

Komponente mit der mittleren Diffusionszeit von  $\tau_c = 0,83$  ms stimmt gut mit den Erwartungswerten ( $\tau_{c,theo} = 0,77$  ms,  $\tau_{z,lit} = 0,65$  ms,  $\tau_n = 0,94$  ms) für Sec16 im Zytosol überein und die langsamere Komponente mit der mittleren Diffusionszeit von  $\tau_m = 19,62$  ms kann zur Diffusion von membrangebundenen Sec16-Proteinen zugeordnet werden.<sup>[135]</sup>

Nach diesen Erkenntnissen lässt sich feststellen, dass die zytoplasmische Fluoreszenz von Sec16, Maddin, T415I und T415E mit sehr großer Wahrscheinlichkeit eine Mischung aus im Zytosol gelösten und membrangebundenen Proteinen darstellt. Als Targetmembran ist hierbei die ER-Membran zu vermuten, da die ERES auf dieser lokalisiert sind.

In Abb. 11.3 sind repräsentative FCS-Kurven des Proteins Sec16 bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* zu sehen.

Bei FCS-Kurven von Sec16, die bei der Kondition *Starvation* aufgenommen wurden und ohne Einschränkung der Fit-Parameter mit dem *2D-2-Komponenten-Modell* gefittet wurden, ergaben sich Änderungen der Diffusionszeiten im Zytosol und auf der ER-Membran zu  $\tau_c = 1,50 \pm 0,73$  ms und  $\tau_m = 39,00 \pm 15,53$  ms.

Die Diffusionszeit  $\tau_c$  bei der Kondition *Starvation* liegt innerhalb des Fehlers der Diffusionszeit bei der Kondition *Serum Stimulation* ( $\tau_c = 0,83 \pm 0,28$  ms). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Diffusionszeit von Sec16 im Zytosol bei der Kondition *Starvation* sich nicht signifikant verändert hat. Da bei verrauschten Kurven mehrere Kombinationen von Fit-Parametern gleichermaßen gute Fit-Ergebnisse liefern können, ist es vorstellbar, dass die Änderung der Diffusionszeit bei der Kondition *Starvation* durch eine Verschiebung der Diffusionszeit  $\tau_m$  zu größeren Zeiten entstanden ist.

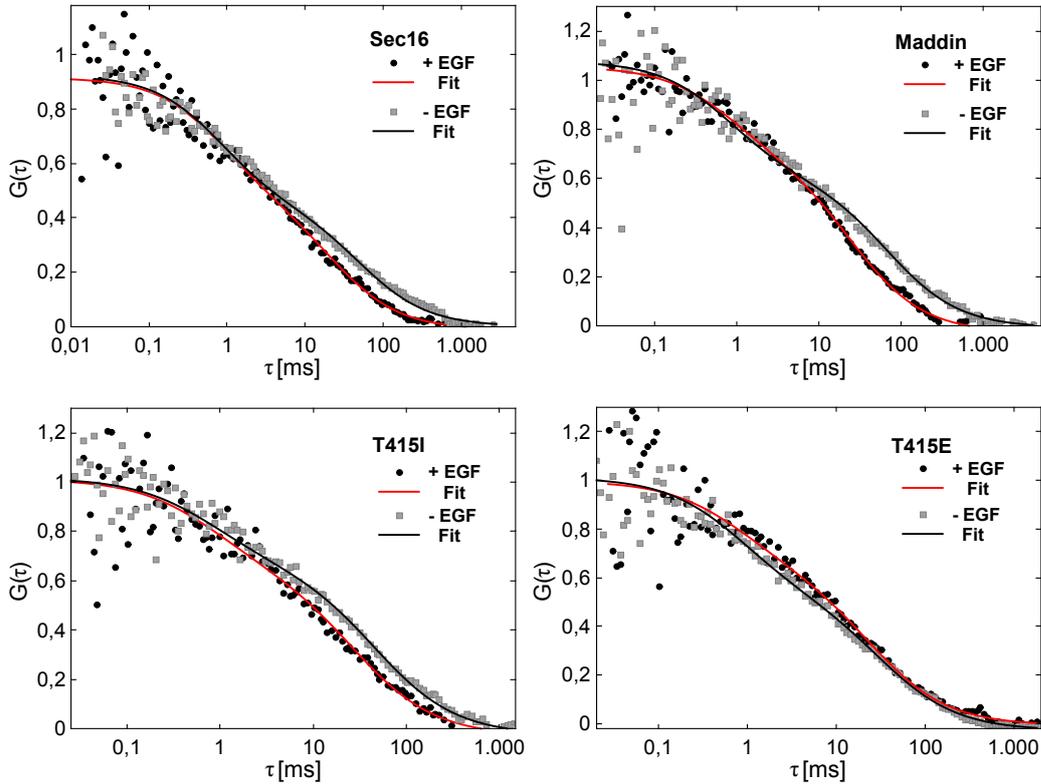
Um diese Störung zu vermeiden und die Fit-Ergebnisse gut miteinander vergleichen zu können, wurden alle FCS-Kurven mit dem *2D-2-Komponenten-Modell* bei einem konstanten Parameter für die Diffusionszeit im Zytosol ( $\tau_c = 0,8$  ms) gefittet. Diese Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

### 11.2.3. Charakterisierung der Diffusion membrangebundener Proteine und der Verteilung der Proteine im Zytoplasma

#### Überblick der Messergebnisse

Es wurde die Diffusion der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E im Zytoplasma außerhalb der ERES bei den beiden experimentellen Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* mit der Methode FCS untersucht. Die aufgenommenen FCS-Kurven wurden mit dem *2D-2-Komponenten-Modell* (Gl. (3.23)) bei  $\tau_c = \text{konst.} = 0,8$  ms gefittet. In Abb. 11.3 sind repräsentative gefittete FCS-Kurven der vier Proteinkonstrukte bei den beiden Zellwachstumsbedingungen dargestellt.

Anhand der Fits wurden die Parameter  $\tau_m$ , die Diffusionszeiten membrangebundener Proteine, und  $f_c$ , die relativen Anteile der im Zytosol gelösten Proteine, bestimmt. Für die Analyse der Datensätze der Parameter  $\tau_m$  und  $f_c$  wurden zunächst die kumulativen Verteilungen  $P(\tau_m)$  und  $P(f_c)$  der Messwerte hinsichtlich der Verteilungsart und der Anzahl der Populationen untersucht. Um festzustellen welchen Einfluss die Eigenschaften der einzelnen Proteinkonstrukte und die beiden Zellwachstumsbedingungen auf die Diffusion der Proteine haben, wurden anschließend die Mittelwerte



**Abbildung 11.3.** Repräsentative FCS-Kurven der Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (–EGF) gefittet mit dem *2D-2-Komponenten-Modell* (Gl. (3.23)) bei  $\tau_c = 0,8$  ms (konst.). Es ergaben sich für beide Konditionen gute Fits mit hohen  $R^2$ -Werten. Diese betragen bei der Kondition *Serum Stimulation* für Sec16:  $R^2 = 0,995$ , für Maddin:  $R^2 = 0,993$ , für T415I:  $R^2 = 0,988$ , für T415E:  $R^2 = 0,996$  und bei der Kondition *Starvation* für Sec16:  $R^2 = 0,997$ , für Maddin:  $R^2 = 0,997$ , für T415I:  $R^2 = 0,996$ , für T415E:  $R^2 = 0,998$ . Die Messergebnisse des gesamten Datensatzes sind in den Abb. 11.4 und 11.6 als kumulative Verteilungen dargestellt.

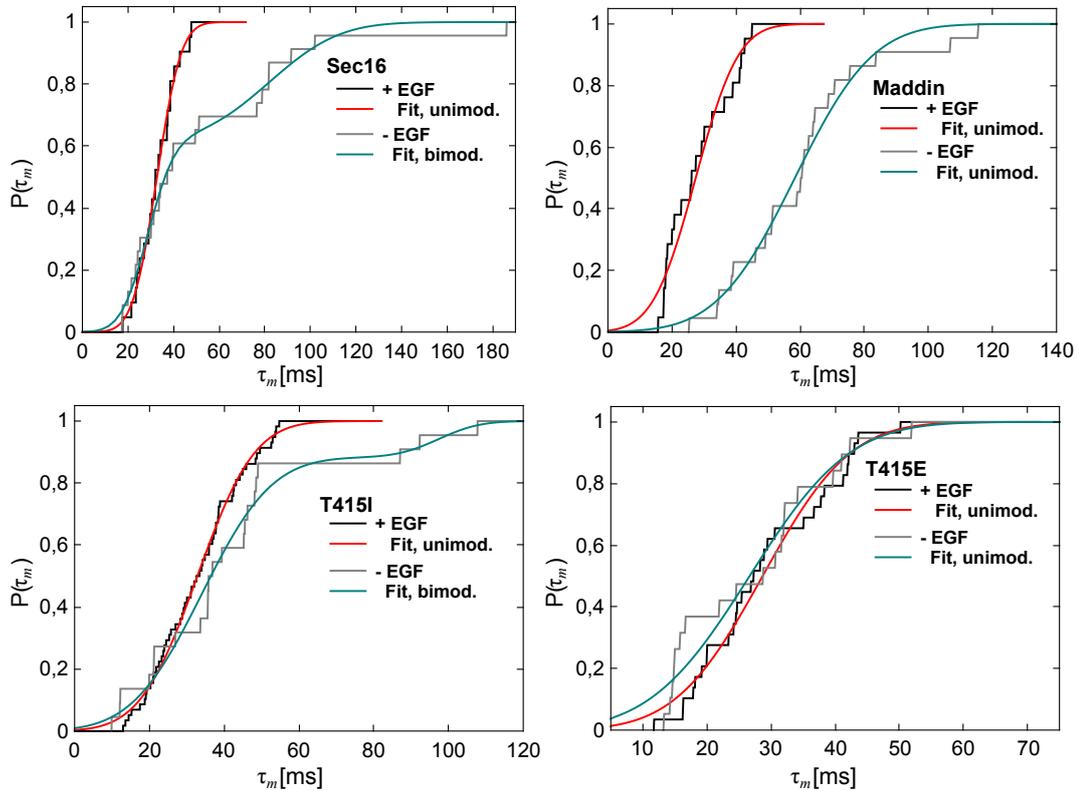
und die Standardabweichungen von  $\tau_m$  und  $f_c$  miteinander verglichen. Die Datensätze wurden zusätzlich mit Student-t-Tests auf Signifikanz untersucht.

### Diffusion membrangebundener Proteine bei den Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation*

Die kumulativen Verteilungen stellen Integrale der Häufigkeitsverteilungen der Messwerte dar und haben den Vorteil die Verteilungen der Messwerte unabhängig von der Bin-Größe miteinander vergleichen zu können.

Um die Art und die Anzahl der Populationen in den Häufigkeitsverteilungen von  $\tau_m$  der vier Proteinkonstrukte (Sec16, Maddin, T415I und T415E) zu bestimmen, wurden die zugehörigen kumulativen Verteilungen der Messwerte  $P(\tau_m)$  mit den Verteilungsfunktionen einer unimodalen (Gl. (10.4)) und einer bimodalen Verteilung (Gl. (10.5)) gefittet.

In Abb. 11.4 sind die gefitteten Verteilungen  $P(\tau_m)$  der Proteine bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* dargestellt.



**Abbildung 11.4.** Ergebnisse der Auswertung kumulativer Verteilungen  $P(\tau_m)$  der Diffusionszeiten  $\tau_m$  membrangebundener Proteinen der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF). Bei der Kondition *Serum Stimulation* ergaben sich für die Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E gute Fits ( $R^2 > 0,98$ ) mit der unimodalen (unimod.) Verteilungsfunktion (Gl. (10.4)), bei der Kondition *Starvation* ergaben sich für die Konstrukte Sec16 und T415I gute Fits ( $R^2 > 0,98$ ) mit der bimodalen (bimod.) Verteilungsfunktion (Gl.(10.5)) und für die Konstrukte Maddin und T415E mit der unimodalen Verteilungsfunktion. Siehe Abs. 11.2.3 für Details.

Es wurde festgestellt, dass die Diffusionszeiten membrangebundener Proteine  $\tau_m$  der Konstrukte Sec16 und T415I bei der Bedingung *Serum Stimulation* unimodal und bei der Bedingung *Starvation* bimodal verteilt sind. Die Messwerte  $\tau_m$  der Proteine Maddin und T415E sind sowohl bei der Kondition *Serum Stimulation* als auch bei der Kondition *Starvation* unimodal verteilt.

Durch einsetzen der gewonnenen Fit-Parametern (Erwartungswerte  $\mu$ ,  $\mu_1$ ,  $\mu_2$  und Varianzen  $\sigma^2$ ,  $\sigma_1^2$ ,  $\sigma_2^2$ ) zu  $P(\tau_m)$  in die Ableitungen der Fit-Funktionen (10.4) und (10.5) lassen sich nach Gl. (10.6) und (10.7) für  $\tau_m$  die Wahrscheinlichkeitsdichten  $w(\tau_m)$  berechnen.

In Abb. 11.5 sind die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_m)$  mit den dazugehörigen berechneten Wahrscheinlichkeitsdichten  $w(\tau_m)$  der Proteine dargestellt. Zwischen den experimentellen und berechneten Kurven ist eine gute Übereinstimmung festzustellen. Bimodal verteilte Messreihen des Parameters  $\tau_m$  wurden für weitere Analysen in ihre einzelnen Populationen aufgeteilt. Die Teilungen der Messwerte wurde anhand der Schnittpunkte der Wahrscheinlichkeitsdichten der beiden Populationen vorgenommen. Die genaue Vorgehensweise zur Ermittlung der Schnittpunkte ist in Abs. 10.2.5

11.2. Ergebnisse der FCS-Messungen im Nukleus und Zytoplasma

	+EGF			-EGF			
	$\tau_{m,1}$ [ms]	$n$	$R^2$	$\tau_{m,1}$ [ms]	$\tau_{m,2}$ [ms]	$n$	$R^2$
<b>Sec16</b>	$32,81 \pm 8,17$	21	0,99	$28,23 \pm 7,89$	$88,82 \pm 40,25$	23	0,99
<b>Maddin</b>	$27,86 \pm 9,73$	21	0,99	$60,09 \pm 22,04$	n/a	22	0,99
<b>T415I</b>	$33,04 \pm 11,40$	58	0,99	$32,80 \pm 13,28$	$95,73 \pm 10,78$	22	0,99
<b>T415E</b>	$29,06 \pm 10,08$	29	0,99	$27,10 \pm 11,59$	n/a	19	0,99

**Tabelle 11.2.:** Mittelwerte und die Standardabweichungen der Diffusionszeiten  $\tau_m$  membrangebundener Proteine aus  $n$  Messungen von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF). Mit dem Student-t-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den  $\tau_{m,1}$ -Messreihen von Sec16 (-EGF)/Maddin(-EGF),  $p < 0,001$  und Maddin (+EGF)/Maddin (-EGF),  $p < 0,001$ .

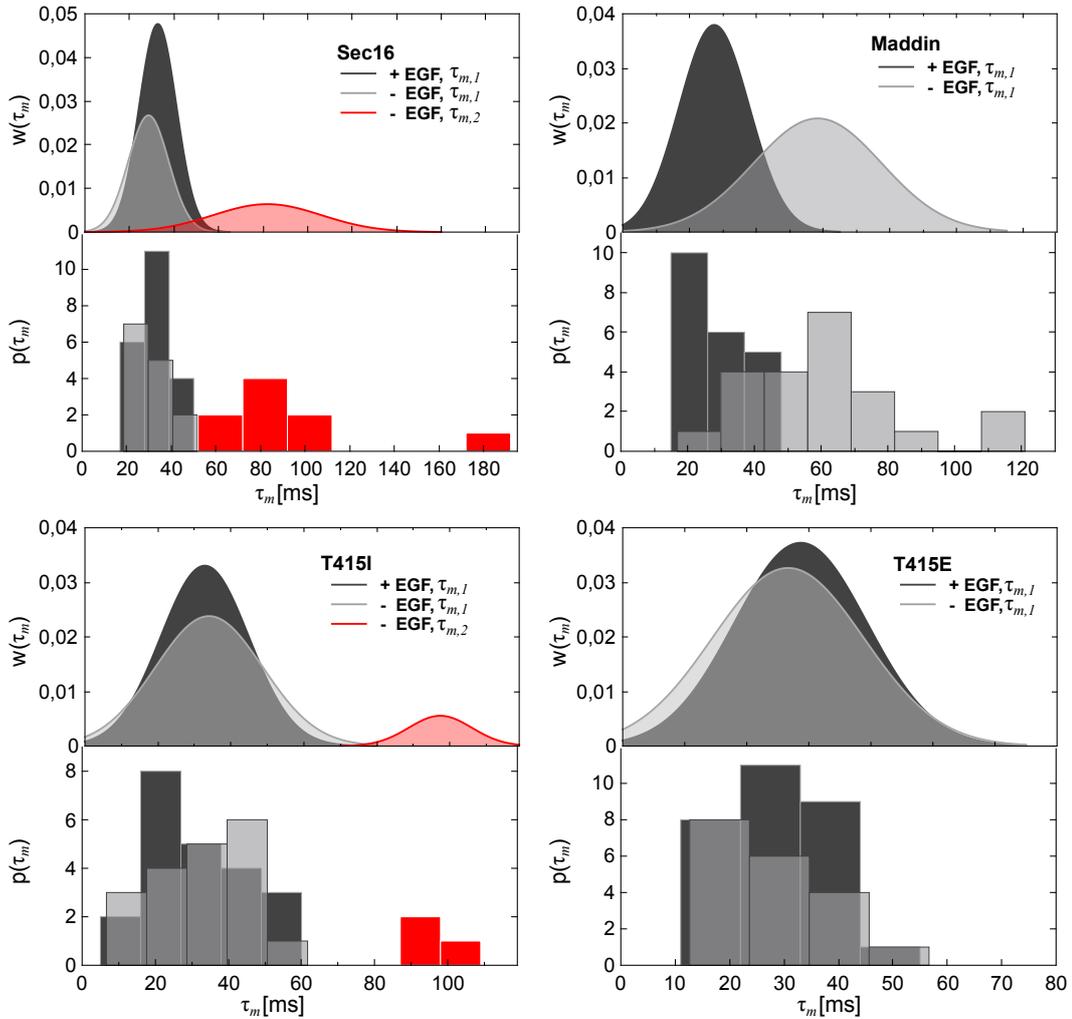
aufgeführt.

In Tab. 11.2 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Diffusionszeiten  $\tau_m$  membrangebundener Proteine von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* zusammengefasst.

Auf Signifikanz wurden zum einen die Diffusionszeiten  $\tau_m$  des Proteinkonstrukts Sec16 gegen die Diffusionszeiten der übrigen Proteinkonstrukte (Maddin, T415I, T415E) getestet. Diese Tests wurden für beide experimentelle Bedingungen durchgeführt. Zum anderen wurde die Signifikanz der Diffusionszeiten einzelner Proteinkonstrukte bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* geprüft. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Diffusionszeiten  $\tau_{m,1}$  des Konstrukts Maddin bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation*. Zusätzlich weist Maddin bei der Kondition *Starvation* signifikant unterschiedliche  $\tau_{m,1}$ -Werte zu den Messwerten von Sec16 bei dieser Kondition.

Aus dem Vergleich der Mittelwerte von  $\tau_m$  (Tab. 11.2) und unter Berücksichtigung der Ergebnisse der t-Tests lassen sich folgende Schlussfolgerungen über die Diffusion membrangebundener Proteine von Sec16, Maddin, T415I und T415E ziehen:

1. Bei der Kondition *Serum Stimulation* sind für alle Proteinkonstrukte ähnliche Diffusionszeiten bei  $\tau_m \approx 30$  ms zu beobachten.
2. Das Protein T415E zeigt bei der Kondition *Starvation* im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* als einziges Konstrukt keine Änderung der Diffusionszeit membrangebundener Proteine.
3. Die Proteine Sec16 und T415I weisen bei der Kondition *Starvation* ähnliche Charakteristika der Diffusionszeiten membrangebundener Proteine. Es sind zwei Populationen der Diffusionszeiten  $\tau_m$  mit Mittelwerten im ähnlichen Bereichen ( $\tau_{m,1} \approx 30$  ms und  $\tau_{m,2} \approx 90$  ms) zu beobachten. Im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* ergibt sich für die erste Population ( $\tau_{m,1}$ ) keine signifikante Änderung der Diffusionszeit. Die Diffusionszeit der zweiten Population ( $\tau_{m,2}$ ) ist zu größeren Zeiten verschoben. Das Auftreten einer zusätzlichen Population mit größeren Diffusionszeiten bei der Kondition *Starvation* deutet auf *Clustering*



**Abbildung 11.5.** Aus  $P(\tau_m)$  (siehe Abb. 11.4) bestimmte Wahrscheinlichkeitsdichten  $w(\tau_m)$  (Gl. (10.6)) und Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_m)$  der gemessenen Diffusionszeiten mit den Populationen  $\tau_{m,1}$  und  $\tau_{m,2}$  membrangebundener Proteine von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (−EGF). Zu erkennen ist eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten Wahrscheinlichkeitsdichten und den gemessenen Messreihen. Siehe Abs. 11.2.3 für weitere Details.

der Proteine Sec16 und T415I hin, d.h. die beiden Proteine diffundieren bei dieser Kondition in größeren Komplexen auf der ER-Membran.

4. Bei dem Protein Maddin ist bei der Kondition *Starvation* eine Population von Diffusionszeiten membrangebundener Proteine mit  $\tau_m \approx 60$  ms zu beobachten. Im Vergleich zu Sec16/T415I weist Maddin bei dieser Kondition andere Charakteristika (Mittelwerte und Anzahl der Populationen) der Diffusionszeiten auf. Im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* ist bei Maddin für die Kondition *Starvation* eine signifikante Verschiebung der Diffusionszeiten zu größeren Werten festzustellen. Diese Ergebnis deutet auf langsamere Diffusion und damit auf *Clustering* membrangebundener Proteine von Maddin. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika der Diffusionszeiten ist zu vermuten, dass es sich bei den Proteinen Maddin und Sec16/T415I um unterschiedliche Arten von *Clustering* handelt. Das einzige Merkmal, das Maddin bei der Kondition *Starvation* von Sec16 und T415I unterscheidet, ist, dass Maddin über weniger Bindungstellen zum COPII-Komplex verfügt (siehe Tab. 10.2). Es ist demnach zu vermuten, dass die unterschiedlichen Charakteristika der Diffusion membrangebundener Proteine von Maddin und Sec16/T415I durch unterschiedliche Interaktionen mit dem COPII-Komplex entstanden sind.

Diese Ergebnisse werden in Abs. 12.3 ausführlich diskutiert.

### Die Verteilung der Proteine im Zytoplasma bei den Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation*

Der Fit-Parameter  $f_c$  ist der zweite charakteristische Parameter der Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E, der aus FCS-Messungen ermittelt wurde. Dieser Parameter gibt den relativen Anteil löslicher Proteine im fokalen Volumen während der FCS-Messungen an. Die Gesamtzahl der Proteine in fokalen Volumen teilt sich dabei in die Anteile löslicher ( $f_c$ ) und an die ER-Membran gebundener Proteine ( $f_m$ ) auf. Es gilt:

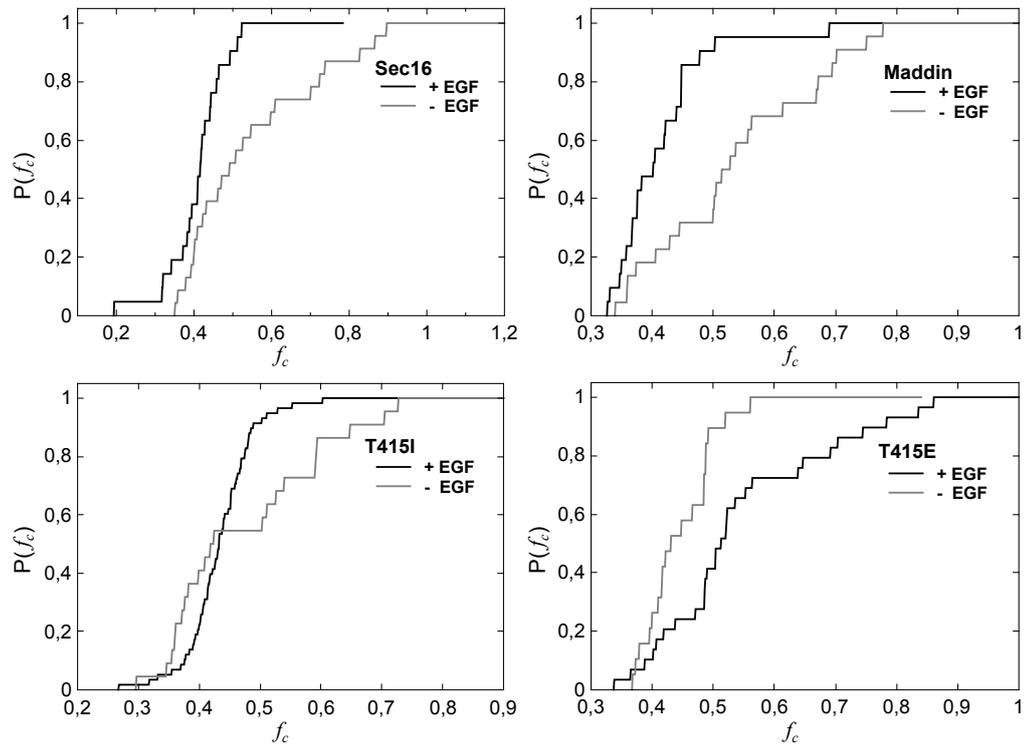
$$f_c + f_m = 1 \quad (11.1)$$

Für die Analyse der Ergebnisse des Parameters  $f_c$  wurden zunächst die kumulativen Verteilungen  $P(f_c)$  der Messwerte bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* untersucht. Diese sind in Abb. 11.6 dargestellt.

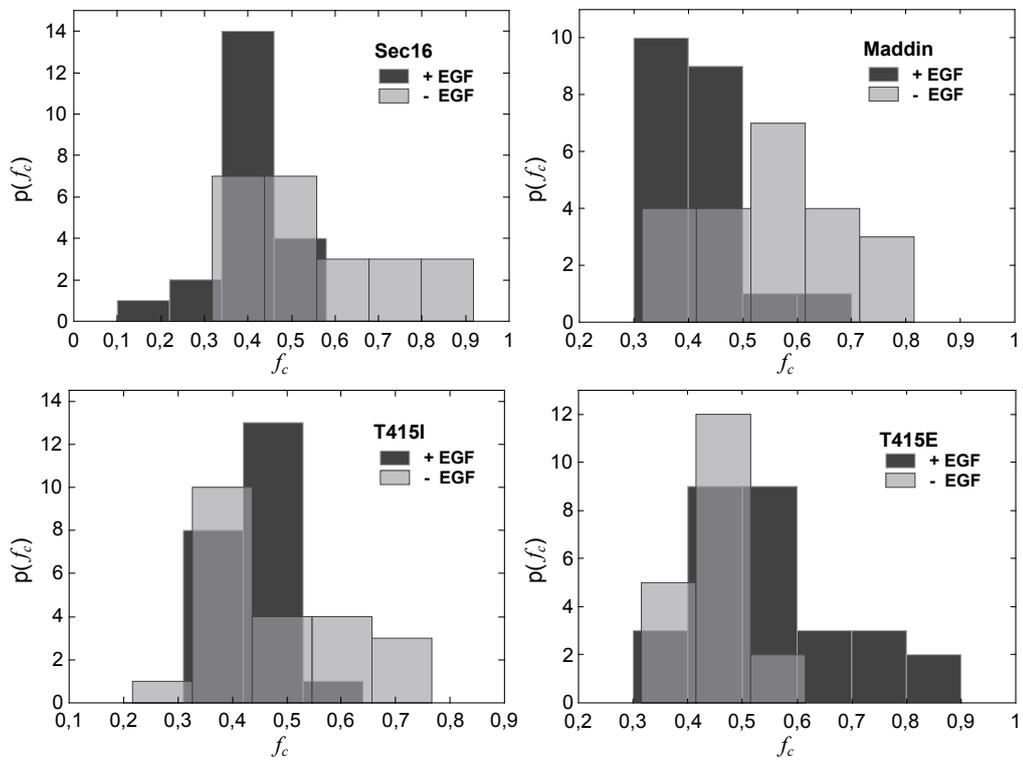
Es ist zu beobachten, dass sich bei allen Konstrukten die Verteilungen  $P(f_c)$  bei der Kondition *Serum Stimulation* von den Verteilungen bei der Kondition *Starvation* unterscheiden. Darüber hinaus ist es nicht möglich festzustellen, ob die Verteilungen  $P(f_c)$  unimodal oder bimodal verteilt sind. Dementsprechend trifft dies auch auf die Häufigkeitsverteilungen der Messwerte  $p(f_c)$  in Abb. 11.7 zu. Im Weiteren wurde aus diesem Grund angenommen, dass die  $f_c$ -Messwerte unimodal verteilt sind.

Weitere Analysen der Ergebnisse zu  $f_c$  erfolgte anhand der Mittelwerte und der Standardabweichungen (siehe Tab. 11.3) sowie der t-Tests.

Alle Proteinkonstrukte zeigen signifikante Unterschiede des Parameters  $f_c$  zwischen den Messungen bei der Kondition *Serum Stimulation* und der Kondition *Starvation*. Bei beiden Konditionen weisen die Proteine Sec16, Maddin und T415I ähnliche Mittelwerte für  $f_c$  auf. Das Proteinkonstrukt T415E zeigt dabei signifikant unterschiedliche Anteile  $f_c$  der löslichen Proteine als die drei übrigen Konstrukte.



**Abbildung 11.6.** Kumulative Verteilungen  $P(f_c)$  der Anteile löslicher Proteine im Zytoplasma der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF). Siehe Abs. 11.2.3 für Details.



**Abbildung 11.7.** Häufigkeitsverteilungen  $p(f_c)$  der Anteile löslicher Proteine im Zytoplasma der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF). Siehe Abs. 11.2.3 für Details.

	+EGF		-EGF	
	$f_c$	$n$	$f_c$	$n$
<b>Sec16</b>	$0,41 \pm 0,07$	21	$0,54 \pm 0,17$	23
<b>Maddin</b>	$0,41 \pm 0,08$	21	$0,54 \pm 0,13$	22
<b>T415I</b>	$0,43 \pm 0,05$	58	$0,47 \pm 0,13$	22
<b>T415E</b>	$0,55 \pm 0,14$	29	$0,44 \pm 0,05$	19

**Tabelle 11.3.:** Mittelwerte und die Standardabweichungen der Anteile  $f_c$  löslicher Proteine aus  $n$  Messungen im Zytoplasma von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF). Mit dem t-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den  $f_c$ -Messreihen von Sec16(+EGF)/Sec16(-EGF):  $p = 0,02$ , Maddin(+EGF)/Maddin(-EGF):  $p = 0,001$ , T415I(+EGF)/T415I(-EGF):  $p = 0,05$ , T415E(+EGF)/T415E(-EGF):  $p = 0,004$ , Sec16 (+EGF)/T415E(+EGF):  $p < 0,001$  und Sec16(-EGF)/T415E(-EGF):  $p = 0,02$ .

Bei der Kondition *Serum Stimulation* ergab sich für die Proteinkonstrukte Sec16, Maddin und T415I ein Wert von  $f_c \approx 0,4$  und für T415E ein Wert von  $f_c = 0,55$ . Dabei ist die Streuung der Messwerte von T415E größer als bei den drei übrigen Proteinkonstrukten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Protein T415E bei dieser Kondition einen höheren löslichen Anteil der Proteine aufweist und zusätzlich eine inhomogenere Verteilung der Proteine im Zytoplasma hat als die Proteine Sec16, Maddin und T415I.

Bei der Kondition *Starvation* weisen die Proteine Sec16, Maddin und T415I einen löslichen Anteil von  $f_c \approx 0,5$ . Es lässt sich zusätzlich feststellen, dass die Streuung der Messwerte bei dieser Kondition größer ist als bei der Kondition *Serum Stimulation*. Im Vergleich zu *Serum Stimulation* ergibt sich demnach bei *Starvation* für Sec16, Maddin, T415I ein höherer löslicher Anteil der Proteine und eine inhomogenere Verteilung der Proteine im Zytoplasma.

Im Gegensatz dazu weist das Protein T415E bei der Kondition *Starvation* im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* einen niedrigeren Anteil löslicher Proteine bei  $f_c = 0,44$  mit einer kleineren Streuung der Messwerte.

Auf der Basis dieser Ergebnisse lassen sich die relativen Änderungen der Dichten der Proteine auf der ER-Membran und im Zytosol bestimmen.

Für die Dichten der Proteine im Zytosol  $q_c$  und auf der ER-Membran  $q_m$  gilt:

$$q_c = \frac{N \cdot f_c}{V} \quad (11.2)$$

$$q_m = \frac{N \cdot f_m}{A} \quad \text{mit} \quad f_m = 1 - f_c \quad (11.3)$$

Hier entspricht  $N$  der Teilchenzahl der Proteine im fokalen Volumen,  $V$  den Volumen des Zytosols und  $A$  der Fläche der ER-Membran. Für die prozentualen Änderungen der Dichten  $\Delta q_c$  und  $\Delta q_m$  der Proteine im Zytosol und auf der ER-Membran gilt:

$$\Delta q_c = \frac{f_{c,[-EGF]} - f_{c,[+EGF]}}{f_{c,[+EGF]}} \cdot 100 \quad (11.4)$$

$$\Delta q_m = \frac{f_{c,[+EGF]} - f_{c,[-EGF]}}{1 - f_{c,[+EGF]}} \cdot 100 \quad (11.5)$$

Aus dieser Analyse geht hervor, dass sich die Teilchendichten löslicher Proteine von Sec16, Maddin und T415I bei der Kondition *Starvation* im Mittel um 24% erhöht haben. Bei dem Protein T415E zeigte sich dagegen eine Erniedrigung der Konzentration löslicher Proteine um 20%.

Für die Konzentrationen membrangebundener Proteine ergab sich bei der Kondition *Starvation* im Mittel eine Erniedrigung um 17% für die Proteine Sec16, Maddin und T415I. Das Protein T415E zeigte dagegen eine Erhöhung der Konzentration membrangebundener Proteine um 24%.

Die Diskussion dieser Ergebnisse befindet sich in Abs. 12.2.

### 11.3. Ergebnisse der FRAP-Messungen an den ERES

#### 11.3.1. Überblick der Messergebnisse

Es wurde der Austauschprozess der Proteine Sec16, Maddin, T415I und T415E an den ERES bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* mit der Methode FRAP untersucht.

Die FRAP-Experimente wurden an einzelnen ERES als ROI in lebender Zellen vorgenommen.

Entsprechend Abs. 10.2.2 wurden aus den aufgenommenen FRAP-Kurven die Parameter der charakteristischen Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  und der immobilen Fraktion  $f_i$  bestimmt. Der Parameter  $\tau$  gibt Auskunft über den Austauschprozess der Fluorophore an den ERES. Der Parameter  $f_i$  gibt den relativen Anteil der Fluorophore an den ERES an, der während eines FRAP-Experiments nicht zur Fluoreszenzerholung beigetragen hat.

In Abb. 11.8 sind repräsentative FRAP-Kurven der Proteinkonstrukte bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* dargestellt. Einige Kurven konnten aufgrund einer zu niedrigen Fluoreszenzerholung nicht gefittet werden. Dementsprechend konnte bei diesen Kurven der Parameter  $\tau$  nicht bestimmt werden. Der Parameter der immobilen Fraktion  $f_i$  wurde bei solchen Messungen jedoch bestimmt.

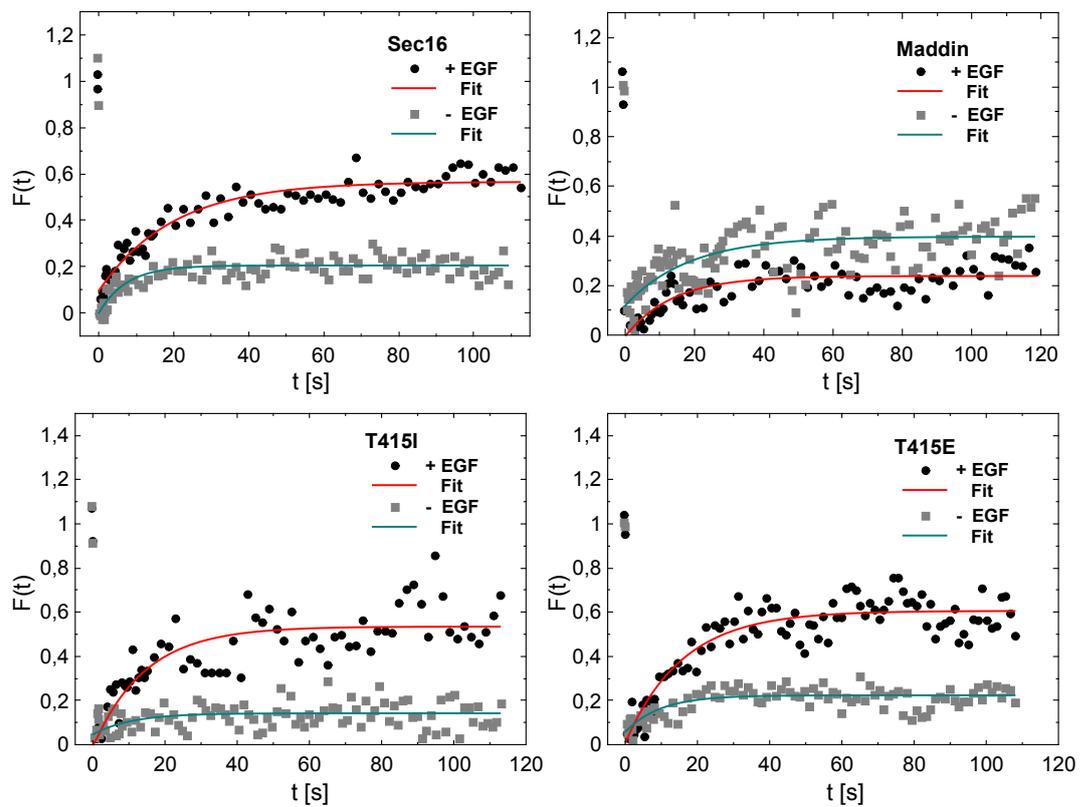
Die Analyse der Messergebnisse von FRAP erfolgte anhand der Häufigkeitsverteilungen, der Mittelwerte und der Standardabweichung der gemessenen Parameter  $\tau$  und  $f_i$ . Die Messreihen wurden zusätzlich mit t-Tests auf statistische Signifikanz untersucht.

In Abb. 11.9 und 11.11 sind die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau)$  und  $p(f_i)$  der Parameter  $\tau$  und  $f_i$  dargestellt. In Tab. 11.4 und 11.5 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Parameter  $\tau$  und  $f_i$  zusammengefasst.

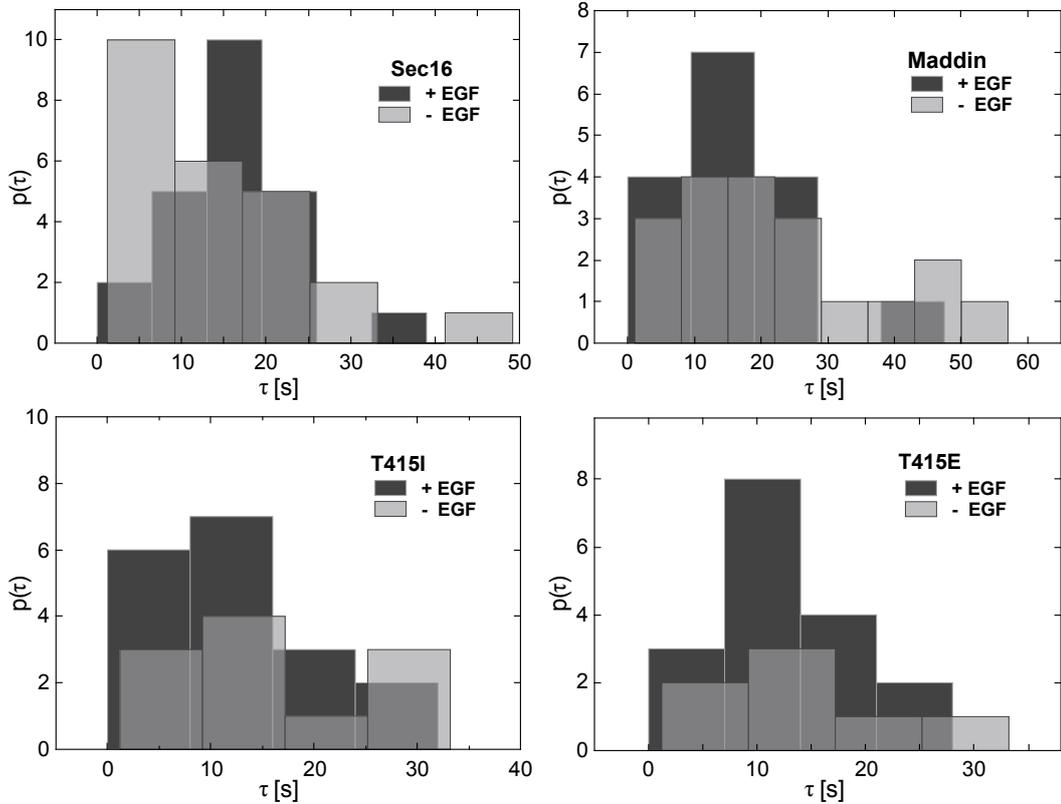
Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analyse vorgestellt.

#### 11.3.2. Charakteristika des Austauschprozesses der Proteine an den ERES bei der Bedingung *Serum Stimulation*

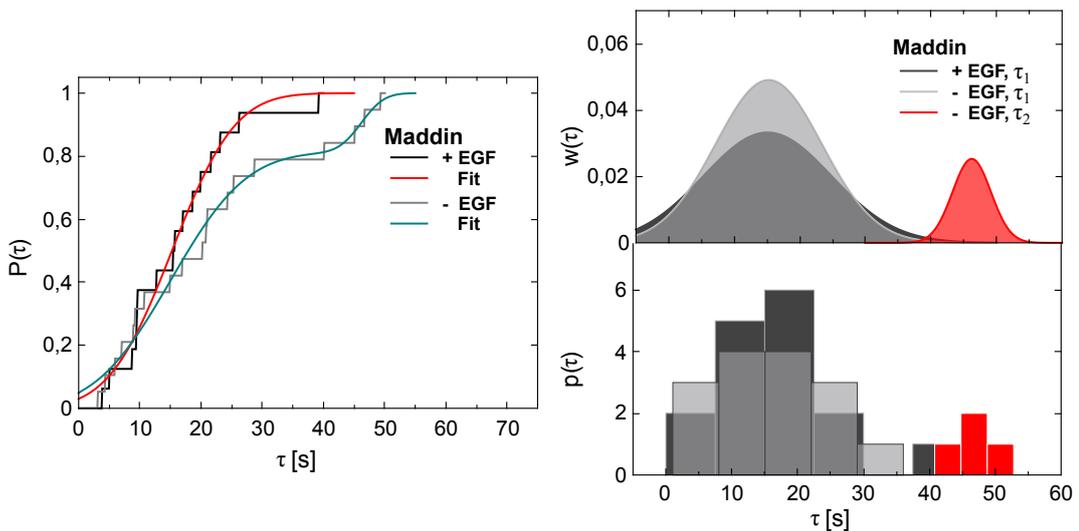
Bei der Kondition *Serum Stimulation* zeigen die vier Proteinkonstrukte ähnliche Fluoreszenzerholungszeiten mit Mittelwerten bei  $\tau \approx 15$  s, die sich voneinander nicht signifikant unterscheiden.



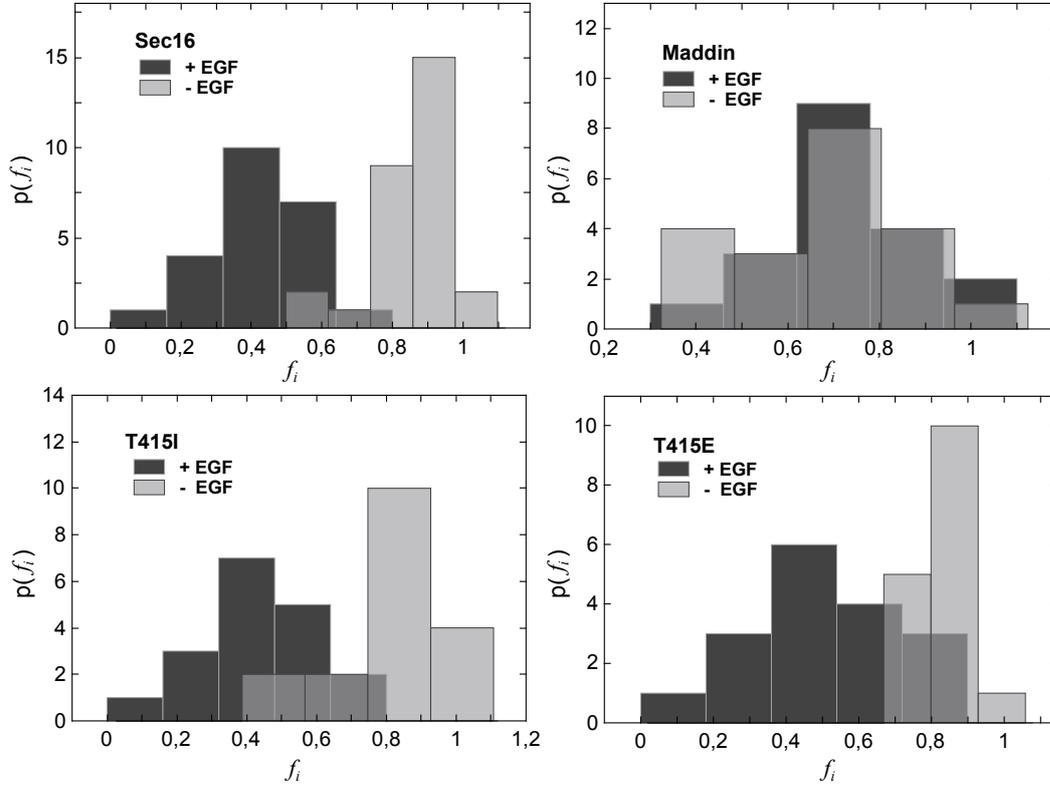
**Abbildung 11.8.** Repräsentative FRAP-Kurven der Proteine Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF) gefittet mit der einfach-exponentiellen Funktion (3.29). Die Ergebnisse des gesamten Datensatzes sind in den Abb. 11.9 und 11.11 zusammengefasst.



**Abbildung 11.9.** Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau)$  der Fluoreszenzerholungszeiten der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E an der ERES bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF).



**Abbildung 11.10.** Kumulative Verteilungen  $P(\tau)$  der Messwerte der Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  des Konstrukts Maddin bei den Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF) gefittet mit unimodalen (Gl. (10.4)) und bimodalen (Gl.(10.5)) Verteilungsfunktionen. Die bimodale Verteilung bei -EGF wurde entsprechend Abs. 10.2.5 in die beiden Populationen der Messwerte  $\tau_1$  und  $\tau_2$  aufgeteilt. Die rechte Abbildung zeigt die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau)$  und die berechneten Wahrscheinlichkeitsdichten  $w(\tau)$  der Messwerte. Siehe Abs. 11.3 für Details.



**Abbildung 11.11.** Häufigkeitsverteilungen  $p(f_i)$  der immobilen Fraktionen der Konstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E an der ERES bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (–EGF). Siehe Abs. 11.3 für Details.

	+EGF		–EGF	
	$f_i$	$n$	$f_i$	$n$
<b>Sec16</b>	$0,42 \pm 0,15$	23	$0,83 \pm 0,10$	29
<b>Maddin</b>	$0,73 \pm 0,15$	19	$0,67 \pm 0,20$	20
<b>T415I</b>	$0,44 \pm 0,17$	18	$0,77 \pm 0,17$	18
<b>T415E</b>	$0,51 \pm 0,20$	17	$0,82 \pm 0,08$	16

**Tabelle 11.5.** Mittelwerte und die Standardabweichungen der immobilen Fraktionen  $f_i$  aus  $n$  Messwerten der Proteine an den ERES von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (–EGF)). Mit dem t-Test ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den  $f_i$ -Messreihen von Sec16(+EGF)/Sec16(–EGF):  $p < 0,001$ , T415I(+EGF)/T415I(–EGF):  $p < 0,001$ , T415E(+EGF)/T415E(–EGF):  $p < 0,001$ , Sec16 (+EGF)/Maddin(+EGF):  $p < 0,001$  und Sec16(–EGF)/Maddin(–EGF):  $p < 0,001$ .

	+EGF			-EGF			
	$\tau$ [s]	$n$	$R^2$	$\tau_1$ [s]	$\tau_2$ [s]	$n$	$R^2$
<b>Sec16</b>	$15,80 \pm 5,97$	23	0,90	$13,18 \pm 10,54$	n/a	24	0,48
<b>Maddin</b>	$16,00 \pm 8,99$	16	0,66	$14,79 \pm 8,23$	$45,36 \pm 3,86$	19	0,50
<b>T415I</b>	$14,02 \pm 8,08$	18	0,80	$14,76 \pm 10,22$	n/a	11	0,54
<b>T415E</b>	$12,44 \pm 5,69$	17	0,78	$14,16 \pm 9,23$	n/a	7	0,42

**Tabelle 11.4.:** Mittelwerte und Standardabweichungen der Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  aus  $n$  FRAP-Messungen der Proteine von Sec16, Maddin, T415I und T415E an den ERES bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF), bestimmt durch Fitten an Gl. (3.29). Der Parameter  $R^2$  gibt die mittlere Fit-Güte der Messungen an. Mit dem t-Test wurden zwischen den angegebenen  $\tau$ -Messreihen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Lediglich das Protein Maddin zeigte bei der Kondition *Starvation* eine zusätzliche Population der  $\tau$ -Werte bei größeren Zeitskalen.

Die mittleren immobilen Fraktionen  $f_i$  der Proteine Sec16, T415I und T415E bei dieser Kondition liegen bei  $f_i \approx 0,45$  und sind nicht signifikant unterschiedlich. Das Protein Maddin weist dagegen eine signifikant höhere immobile Fraktion ( $f_i = 0,73$ ) als die übrigen Proteinkonstrukte.

### 11.3.3. Charakteristika des Austauschprozesses der Sec16-Proteinkonstrukte an den ERES bei der Kondition Starvation

Im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* ist für die Proteine Sec16, T415I und T415E bei der Kondition *Starvation* keine signifikante Änderung der Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  festzustellen.

Das Protein Maddin weist bei der Kondition *Starvation* eine mittlere Fluoreszenzerholungszeit von  $\tau = 21,23$ s. Mit den t-Tests wird keine eindeutige Antwort auf die Signifikanz gegenüber der Kondition *Starvation*. Werden die  $\tau$ -Werte von Maddin bei den beiden Konditionen ein signifikanter Unterschied von  $p_\tau = 0,04$ . Wird jedoch der  $\tau$ -Wert von Maddin mit den Wert von Sec16 bei der Kondition *Starvation* verglichen ergibt sich kein signifikanter Unterschied. Wie bereits oben festgestellt wurde, wird für das Protein Sec16 bei den beiden Konditionen *Serums Stimulation* und *Starvation* keine signifikante Änderung der Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  beobachtet. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass bei Maddin bei der Kondition *Starvation* entweder eine signifikante Änderung des  $\tau$ -Wertes eintritt, die jedoch auch gegenüber dem  $\tau$ -Wert von Sec16 bei dieser Kondition *Starvation* signifikant ist. Alternativ, wenn sich  $\tau$  von Maddin nicht geändert hat, wäre auch im t-Test beim Vergleich der beiden  $\tau$ -Werte von Maddin bei den beiden Konditionen keine Signifikanz festzustellen.

Durch Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der  $\tau$ -Messwerte von Maddin bei den beiden Konditionen (siehe Abb. 11.9) zeigte sich zwar im Bereich von  $< 30$ s eine gute Überlappung der Messwerte miteinander, allerdings wurde bei der Kondition *Starvation* eine zusätzliche Population mit größeren  $\tau$ -Werte beobachtet.

Aus diesem Grund wurden die kumulativen Verteilungen  $P(\tau)$  der Messwerte  $\tau$

von Maddin bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* mit Verteilungsfunktionen einer unimodalen und eine bimodalen Verteilung gefittet (siehe Abb.11.10). Es wurde festgestellt, dass die Messwerte von  $\tau$  des Proteins Maddin bei der Kondition *Serum Stimulation* unimodal und bei der Kondition *Starvation* bimodal verteilt sind.

Die bimodal verteilten Messwerte wurden entsprechend Abs. 10.2.5 in die beiden Populationen aufgeteilt. Die erste Population mit dem Mittelwert  $\tau_1 = 14,79$  s weist keinen signifikanten Unterschied zu den Messwerten von Maddin bei der Kondition *Serum Stimulation* oder zu den Messwerten von Sec16 bei der Kondition *Starvation*. Die zweite Population mit einem Mittelwert von  $\tau_2 = 45,36$  s ist dementsprechend zu größeren Zeiten verschoben.

Für den Parameter  $f_i$ , die immobile Fraktion der Proteine an den ERES, zeigen die Proteinkonstrukte Sec16, T415I und T415E bei *Starvation* im Vergleich zu *Serum Stimulation* einen signifikant größeren Mittelwert bei  $f_i \approx 0,8$ . Das Protein Maddin zeigt bei dieser Kondition im Vergleich zu den übrigen Proteinen eine signifikant niedrigere immobile Fraktion bei  $f_i = 0,67$ . Im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* ist bei Maddin keine signifikante Änderung des Parameters  $f_i$  festzustellen. Die Diskussion dieser Ergebnisse ist in Abs. 12.4 aufgeführt.



## 12. Diskussion

### 12.1. Überblick

In dem vorgestellten Projekt wurden vier verschiedene Konstrukte des Proteins Sec16 mit den Methoden FCS und FRAP bei den beiden experimentellen Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* in lebenden Zellen untersucht.

Die vier Proteinkonstrukte weisen bei den beiden Konditionen unterschiedliche Phosphorylierungszustände auf. Bei der Kondition *Serum Stimulation* werden die beiden Proteine Sec16 und Maddin, infolge der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges, phosphoryliert<sup>[54]</sup> und sind bei der Kondition *Starvation* nicht phosphoryliert. Das Protein T415I ist die unphosphorylierbare Mutante des Proteins Sec16, bei der die Möglichkeit für eine Phosphorylierung um mindestens 65 % gesenkt ist.<sup>[54]</sup> Das Protein T415E ist die permanent phosphorylierte Mutante von Sec16 und ist dementsprechend bei beiden Zellwachstumsbedingungen phosphoryliert.

Das Konstrukt Maddin verfügt zusätzlich über eine niedrigere Anzahl an Bindungsstellen zum COPII-Komplex als die übrigen Proteinkonstrukte.<sup>[155]</sup>

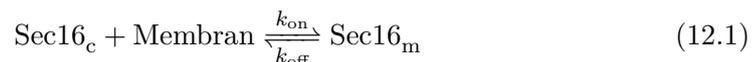
Mit der Methode FCS wurde die Diffusion und die Verteilung der Proteine im Zytoplasma außerhalb der ERES untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die vier Proteinkonstrukte über eine im Zytosol gelöste und eine an die ER-Membran gebundene Fraktion der Proteine verfügen. Für die Diffusion der Proteine im Zytosol wurde eine Diffusionszeit von  $\tau_c = 0,8$  ms bestimmt, die gut mit Literaturwerten und dem Theoriewerten entsprechend der Stokes-Einstein-Beziehung übereinstimmt.

Die FCS-Messungen lieferten weiterhin die Parameter der Diffusionszeiten membran-gebundener Proteine  $\tau_m$  sowie die Anteile löslicher Proteine im Zytoplasma  $f_c$ . Die Ergebnisse zu diesen Parametern sind in Tab. 12.1 zusammengefasst und werden in den Abs. 12.2 und 12.3 diskutiert.

Mit der Methode FRAP wurde der Austauschprozess der Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E an den ERES untersucht. Aus diesen Messungen wurden die Parameter der Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  und der immobilen Fraktion  $f_i$  bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in Tab. 12.2 aufgeführt und werden in Abs. 12.4 diskutiert.

### 12.2. Verteilung der Proteine im Zytoplasma

Die Aufteilung des Proteins Sec16 zwischen dem Zytosol (Sec16<sub>c</sub>) und der ER-Membran (Sec16<sub>m</sub>) kann anhand einer Gleichgewichtsreaktion beschrieben werden:



Dabei sind die Parameter  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  die Reaktionsraten für die Assoziation und die Dissoziation der Proteine mit der Membran. Im Gleichgewicht ergibt sich für diese Reaktion die Dissoziationskonstante  $K_D$ :

$$K_D = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[\text{Sec16}_c] \cdot [\text{M}]}{[\text{Sec16}_m]} \quad (12.2)$$

		+EGF		-EGF		
		$\tau_m$	$f_c$	$\tau_{m,1}$	$\tau_{m,2}$	$f_c$
Sec16	} 30 ms	}	0,4	30 ms	90 ms	} 0,5
Maddin				60 ms		
T415I				30 ms	90 ms	
T415E				30 ms		

**Tabelle 12.1.:** Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Parametern der Diffusionszeiten membran-gebundener Proteine  $\tau_m$  und der relativen Anteile löslicher Proteine im Zytoplasma  $f_c$  von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF).

		+EGF		-EGF			
		$\tau$	$f_i$	$\tau$	$f_i$		
Sec16	} 15 s	}	0,4	}		} 0,8	
T415I							15 s
T415E							15 s
Maddin						0,7	

**Tabelle 12.2.:** Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Parametern der Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  und der immobilen Fraktion  $f_i$  der Proteine an den ERES von Sec16, Maddin, T415I und T415E bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* (+EGF) und *Starvation* (-EGF).

Hier entsprechen  $[M]$  der Konzentration der Bindungsstellen auf der ER-Membran,  $[\text{Sec16}_c]$  der Konzentration der Proteine im Zytosol und  $[\text{Sec16}_m]$  der Konzentration der membrangebundenen Proteine.

Entsprechend Gl. (12.2) würde eine Änderung der Reaktionsraten  $k_{\text{off}}$  und (oder)  $k_{\text{on}}$  eine Änderung der Konzentrationen der Proteine auf der Membran und im Zytosol zur Folge haben. Bei FCS-Messungen lässt sich diese Änderung anhand des Parameters  $f_c$  identifizieren.

Bei den vorgestellten Untersuchungen wurden für die Proteine Sec16, Maddin und T415I bei beiden Zellwachstumsbedingungen übereinstimmende Charakteristika für die Verteilung der Proteine im Zytoplasma (Mittelwerte und Streuung des Parameters  $f_c$ ) festgestellt. Unter Einbezug der Eigenschaften der Proteinkonstrukte Sec16 und Maddin lässt sich hieraus schließen, dass die Interaktion zwischen Sec16 und dem COPII-Komplex keinen Einfluss auf den Assoziations-Dissoziations-Prozess von Sec16 mit der ER-Membran hat, wie er in der Reaktionsgleichung (12.1) beschrieben ist. Bei der Kondition *Starvation* wurde im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* für die drei Proteinkonstrukte (Sec16, Maddin, T415I) eine Erhöhung der Fraktion löslicher Proteine und dementsprechend eine Erniedrigung der Fraktion membrangebundener Proteine im Zytoplasma beobachtet. Als zweite Beobachtung wurde bei dieser Kondition eine inhomogenere Verteilung der drei Proteinkonstrukte im Zytoplasma festgestellt. Demgegenüber zeigte das Protein T415E eine Erniedrigung der Fraktion löslicher Proteine und eine homogenere Verteilung der Proteine im Zytoplasma bei der Kondition *Starvation*.

Wie bereits festgestellt wurde, kann für das Proteinkonstrukt Maddin der Einfluss der veränderten Interaktion mit dem COPII-Komplex auf die Verteilung der Proteine im Zytoplasma vernachlässigt werden. Die beobachteten Unterschiede für den Parameter  $f_c$  können demnach aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungszustände der Proteine zustandekommen. Eine Interpretationsmöglichkeit der vorgestellten Ergebnisse basiert auf der Annahme, dass Sec16 bei der Kondition *Serum Stimulation*, trotz der Aktivierung der Kinasen des MAP-Kinase-Weges für die Phosphorylierung, sich zum Teil im phosphorylierten und zum Teil im unphosphorylierten Zustand befindet. Dabei muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass in Zellen bei allen Messungen neben der transfizierten Konstrukte (Sec16, Maddin, T415I und T415E) stets endogenes Sec16 vorhanden war. Dieses Protein hat die gleichen Eigenschaften wie das Konstrukt Sec16 und kann dementsprechend bei der Kondition *Serum Stimulation* phosphoryliert werden.

Bei den beiden Zellwachstumsbedingungen ergeben sich nach dieser Interpretationsmöglichkeit für die Proteinkonstrukte Sec16, Maddin und T415I ähnliche Kombinationen von phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinpopulationen im Zytoplasma. Das Verhältnis der Phosphorylierungszustände für das Protein T415E unterscheidet sich jedoch bei den beiden Konditionen von denen der übrigen Konstrukte.

Aufgrund der Aktivität der MAP-Kinasen ist bei der Kondition *Serum Stimulation* zu erwarten, dass die Proteine der Konstrukte Sec16 und Maddin zum größten Teil phosphoryliert sind. Ein kleinerer Teil der Proteine wird dabei jedoch unphosphoryliert sein. Die Anwesenheit des endogenen Sec16 hat keinen Einfluss auf dieses Verhältnis, da es eine ähnliche Mischung aus phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen

aufweisen wird wie Sec16. Das Protein T415I ist zwar eine unphosphorylierbare Mutante von Sec16, jedoch besteht trotz Mutation die Wahrscheinlichkeit für die Phosphorylierung der Proteine.<sup>[54]</sup> Darüber hinaus wird bei diesem Proteinkonstrukt die Population der phosphorylierten Proteine im Zytoplasma durch die Anwesenheit des endogenen Sec16 erhöht. Für das Proteinkonstrukt T415I ist demnach zu erwarten, dass im Zytoplasma, ähnlich wie bei Sec16 und Maddin, ebenfalls eine Mischung aus phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen vorliegt. Die ähnlichen Verteilungen der Proteine von Sec16, Maddin und T415I im Zytoplasma können demnach aufgrund der ähnlichen Mischungen von phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinpopulationen zustandekommen.

Bei dem Konstrukt T415E befindet sich bei der Kondition *Serum Stimulation*, aufgrund der Mutation der Proteine und der Anwesenheit des endogenen Sec16, der überwiegende Teil der Proteine im phosphorylierten Zustand. Die Verteilung der Proteine von T415E im Zytoplasma kann sich demnach von den übrigen unterscheiden, da bei diesem Konstrukt der phosphorylierte Zustand der Proteine wesentlich größer ist als bei den Proteinen Sec16, Maddin und T415I.

Bei der Kondition *Starvation* sind die MAP-Kinasen inaktiv. Dementsprechend ist bei dieser Kondition anzunehmen, dass die Population der unphosphorylierten Proteine von Sec16, Maddin, T415I ebenso wie vom endogenen Sec16 im Zytoplasma überwiegt. Für das Protein T415E ergibt sich dagegen, aufgrund der Anwesenheit des endogenen Sec16, eine Mischung aus phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen.

Nach dem vorgestellten Schema ergibt sich bei den beiden Zellwachstumsbedingungen eine homogenere Verteilung der Proteine im Zytoplasma und ein höherer Anteil membrangebundener Proteine, wenn in Zellen eine Mischung aus phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen vorliegt. Ist jedoch in Zellen vorwiegend nur eine Proteinpopulation (phosphoryliert oder unphosphoryliert) vorhanden, so ist eine inhomogenere Verteilung der Proteine mit einem höheren Anteil löslicher Proteine zu beobachten. Wodurch es zu diesem Unterschied kommt ist unklar.

Nach Gl. (12.2) beruht jede Änderung des Verhältnisses zwischen den löslichen und membrangebundenen Proteinen auf der Änderung der Assoziations- und der Dissoziationsraten  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  von Sec16 mit der ER-Membran. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen zwar solche Änderungen, diese stehen jedoch nicht im direkten Zusammenhang mit den Phosphorylierungszuständen der Sec16-Proteine. Unphosphorylierte Proteine zeigen ähnliche lösliche Fraktionen wie Proteine im phosphorylierten Zustand. Aufgrund dieser Beobachtung lässt sich vermuten, dass die Phosphorylierung von Sec16 keinen direkten Einfluss auf den Assoziations- und den Dissoziationsprozess von Sec16 mit der ER-Membran hat, wie er gemäß Reaktionsgleichung (12.1) beschrieben wird.

Außer der Phosphorylierungszustände der Proteine sind für die beobachteten Verteilungen der Proteine im Zytoplasma weitere Einflussfaktoren vorstellbar. Der MAPK-Weg ist eines der wichtigsten Signaltransduktionswege in Zellen, das bei der Regulierung biologischer Prozesse wie Zelldifferenzierung und Zellwachstum beteiligt ist.<sup>[136]</sup> Die Aktivierung und Deaktivierung dieser Signalkaskade beeinflusst demnach nicht nur den Phosphorylierungszustand von Sec16, sondern auch zahlreiche weitere intrazelluläre Prozesse. Beispielsweise ist bekannt, dass das Cytoskelett der

Mikrotubuli, welches eng mit der Struktur des ER verbunden ist,<sup>[79]</sup> durch MAP-Kinasen reguliert werden kann.<sup>[124]</sup> Dementsprechend ist es möglich, dass bei der Kondition *Starvation* aufgrund der Inaktivität der MAP-Kinasen eine Änderung der Morphologie des ER stattfindet, die sich auf die Verteilung der Proteinkonstrukte von Sec16 auswirkt.

### 12.3. Diffusion membrangebundener Proteine

Bei der Kondition *Serum Stimulation* wurden für die vier Proteinkonstrukte Sec16, Maddin, T415I und T415E ähnliche Diffusionszeiten  $\tau_m$  von membrangebundenen Proteinen beobachtet.

Bei der Kondition *Starvation* wurden im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* für das Protein T415E ähnliche Diffusionszeiten membrangebundener Proteine beobachtet. Bei den Proteinen Sec16, Maddin und T415I wurden dagegen Änderungen der Diffusionszeiten membrangebundener Proteine festgestellt.

Für Sec16 und T415I wurden bei der Kondition *Starvation* zwei Populationen membrangebundener Proteine festgestellt. Eine Population wies die gleiche Diffusionszeit wie bei der Kondition *Serum Stimulation* auf. Die andere Population wies deutlich größere Diffusionszeiten und damit langsamere Diffusion auf der ER-Membran auf. Aufgrund dieser zusätzlichen Population membrangebundener Proteine lässt sich für die Proteine Sec16 und T415I bei der Kondition *Starvation Clustering*, d.h. Bildung von größeren Proteinkomplexen, auf der ER-Membran vermuten.

Das Protein Maddin zeigte im Vergleich zu Sec16 und T415I bei der Kondition *Starvation* andere Charakteristika (Mittelwert von  $\tau_m$ , Anzahl der Populationen) der Diffusionszeiten auf der ER-Membran. Es wurde eine vollständige Verschiebung der Diffusionszeiten zu größeren Werten beobachtet. Auch dieses Ergebnis deutet auf *Clustering* der Proteine der ER-Membran hin. Das *Clustering* von Maddin unterscheidet sich jedoch vom *Clustering* von Sec16 und T415I.

Unter Beachtung der möglichen phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinpopulationen der vier Sec16-Konstrukte bei der Kondition *Starvation*, lassen sich aus diesen Resultaten zwei Schlussfolgerungen ziehen. Zum einen lässt sich vermuten, dass *Clustering* von Sec16 im unphosphorylierten Zustand stattfindet. Dies zeigt sich daran, dass alle Proteinkonstrukte, die bei der Kondition *Starvation* in unphosphoryliertem Zustand vorliegen (Sec16, Maddin, T415I), Merkmale langsamerer Diffusion, also *Clustering*, aufweisen. Bei dem Proteinkonstrukt T415E, das bei der Kondition *Starvation* als einziges eine Proteinpopulation im phosphorylierten Zustand aufweist, wurde dagegen kein *Clustering* membrangebundener Proteine festgestellt. Dabei ist zu vermuten, dass das *Clustering* der unphosphorylierten Sec16-Mutante T415I bei der Kondition *Serum Stimulation* durch die Anwesenheit des endogenen Sec16 gestört wird.

Die zweite Schlussfolgerung lässt sich aus den Resultaten zu den Diffusionszeiten membrangebundener Proteine von Maddin ableiten. Maddin verfügt über weniger Bindungsstellen zum COPII-Komplex und weist im Vergleich zu Sec16/T415I bei der Kondition *Starvation* andere Charakteristika für die Diffusion membrangebundener Proteine auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Diffusion membrangebundener Sec16-Proteine von der Interaktion mit dem COPII-Komplex beeinflusst wird.

Ein mögliche Erklärung für dieses Verhalten der vier untersuchten Sec16-Konstrukte auf der ER-Membran beruht auf zwei Annahmen: (I) im unphosphorylierten Zustand liegt Sec16 in Oligomeren vor und (II) die Oligomerisierung und die Reaktion mit dem COPII-Komplex sind zwei konkurrierende Prozesse auf der ER-Membran. Unter Beachtung der Phosphorylierungszustände, die aus den Ergebnissen zu der Verteilung der Proteine im Zytoplasma abgeleitet wurden, lässt sich für die Diffusion membrangebundener Proteine folgendes Szenario vermuten. Bei der Kondition *Serum Stimulation* ist das Protein Sec16 zum großen Teil phosphoryliert und zum kleineren Teil unphosphoryliert. Es diffundiert entweder als Monomer (bzw. in kleineren Oligomeren) oder in COPII-Komplexen auf der ER-Membran. Dabei weisen beide Sec16-Spezies (Sec16-Monomere und Sec16-COPII-Komplexe) auf der ER-Membran ähnliche Diffusionszeiten auf. Bei der Kondition *Starvation* tendiert Sec16 dazu, aufgrund der vorwiegenden unphosphorylierten Proteinpopulation, zur Bildung größerer Oligomere. Gleichzeitig kann Sec16 auch bei der Kondition *Starvation* mit den COPII-Komponenten Komplexe bilden. Die Oligomere diffundieren langsamerer auf der ER-Membran und weisen bei FCS-Messungen größere Diffusionszeiten auf. Die Sec16-COPII-Komplexe haben dagegen schnellere Diffusion und zeigen gleiche Diffusionszeiten wie bei der Kondition *Serum Stimulation*. Dementsprechend entstehen die zwei Populationen der Diffusionszeiten von Sec16 und T415I bei der Kondition *Starvation* durch die Anwesenheit der Oligomere und der Sec16-COPII-Komplexe auf der ER-Membran. Für das Konstrukt T415E ist keine Bildung der Oligomere zu erwarten, da diese nur auftreten, wenn der überwiegende Teil der Proteine unphosphoryliert ist. Dies ist bei diesem Protein bei keiner der beiden Zellwachstumsbedingungen der Fall. Für das Konstrukt Maddin ist nach diesem Szenario eine höhere Tendenz zur Oligomerbildung im unphosphorylierten Zustand zu erwarten, da es über eine geringere Anzahl an Bindungsstellen zum COPII-Komplex verfügt, wodurch die Bildung von Maddin-COPII-Komplexen benachteiligt und die Bildung der Oligomere bevorzugt wird. Dementsprechend wird bei der Kondition *Starvation* für Maddin eine Verschiebung der Diffusionszeiten zu größeren Werten beobachtet.

Außer der Eigenschaften der vier Sec16-Proteinkonstrukte sind für die Diffusion membrangebundener Proteine weitere Einflussfaktoren vorstellbar, die aufgrund der Beeinflussung des MAP-Kinase-Weges zustandekommen. Wie es bereits bei der Besprechung der Ergebnisse zu dem Parameter  $f_c$  erläutert wurde (siehe Abs. 12.2), ist es denkbar, dass die Morphologie der ER-Membran bei der Kondition *Serum Stimulation* anders ist als bei der Kondition *Starvation*. Es ist zusätzlich bekannt, dass einige Komponenten des COPII-Komplexes phosphoryliert werden können (siehe Übersichtsartikel von Farhan et al. <sup>[52]</sup>). Inwieweit diese Proteine von den Kinasen des MAP-Kinase-Weges phosphoryliert werden, wurde bis jetzt nicht untersucht. Es ist jedoch vorstellbar, dass dies der Fall sein könnte, da beispielsweise beobachtet wurde, dass das COPII-Protein Sec24 von der Kinase Akt, welches durch EGF aktiviert wird, <sup>[113]</sup> phosphoryliert wird. <sup>[140]</sup> Wie die Resultate zu Maddin gezeigt haben, wird die Diffusion membrangebundener Sec16-Proteine von den Komponenten des COPII-Komplexes beeinflusst. Aus diesem Grund ist es möglich, dass unterschiedliche Phosphorylierungszustände der COPII-Komponenten bei den beiden Bedingungen *Serum Stimulation* und *Starvation* zu der unterschiedlichen Diffusion der Sec16-Proteine bei den beiden Zellwachstumsbedingungen führen können.

## 12.4. Austauschprozess der Sec16-Proteinkonstrukte an den ERES

FRAP-Messungen ergaben, dass die Proteinkonstrukte Sec16, T415I und T415E bei der Kondition *Serum Stimulation* an den ERES ähnliche Fluoreszenzerholungszeiten  $\tau$  und immobile Fraktion  $f_i$  aufweisen. Im Vergleich dazu wurde bei der Kondition *Starvation* für diese Proteine keine Änderung der Fluoreszenzerholungszeiten jedoch ein höhere immobile Fraktion beobachtet.

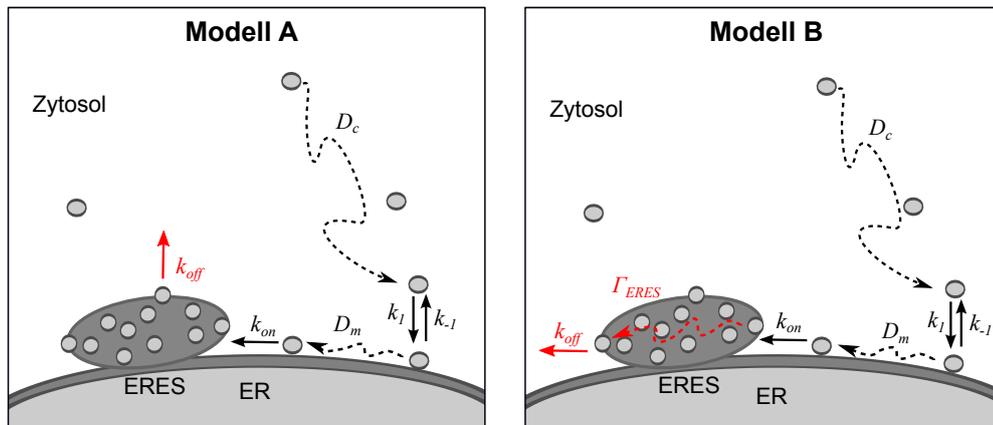
Für das Protein Maddin wurde im Vergleich zu den drei übrigen Proteinkonstrukten bei der Kondition *Serum Stimulation* ähnliche Fluoreszenzerholungszeiten und eine höhere immobile Fraktion beobachtet. Bei der Kondition *Starvation* wurde eine Änderung der Fluoreszenzerholungszeiten in Form einer zusätzlichen Population mit einem größeren Mittelwert festgestellt. Die immobile Fraktion der Maddin-Proteine an den ERES änderte sich dagegen nicht.

Das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen Maddin und Sec16 ist, dass Maddin über eine niedrigere Anzahl an Bindungsstellen zum COPII-Komplex verfügt. Dementsprechend lässt sich aus dem Unterschied der Parameter der immobilen Fraktion von Maddin und Sec16 bei beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* schließen, dass die Bindung zwischen dem COPII-Komplex und Sec16 einen starken Einfluss auf den Austauschprozess von Sec16 an den ERES hat.

Unter Beachtung der möglichen Phosphorylierungszustände der Proteine bei den beiden Zellwachstumsbedingungen, lassen sich die Ergebnisse der FRAP-Messungen wie folgt interpretieren. Die beiden Proteine Sec16 und T415I weisen bei der Kondition *Serum Stimulation* im Zytoplasma eine Mischung aus phosphorylierten und unphosphorylierten Proteinen auf und haben vorwiegend unphosphorylierte Proteine bei der Kondition *Starvation*. Die Kombination der Phosphorylierungszustände für das Protein T415E unterscheidet sich bei beiden Zellwachstumsbedingungen von Sec16/T415I (vorwiegend phosphoryliert bei der Kondition *Serum Stimulation* und Mischung aus unphosphoryliert und phosphoryliert bei der Kondition *Starvation*). Das Ergebnis, dass die drei Proteine bei beiden Zellwachstumsbedingungen für den Austauschprozess der Proteine an den ERES gleiche Charakteristika ( $\tau$ ,  $f_i$ ) aufweisen, deutet darauf hin, dass die Phosphorylierung keinen dominanter Einflussfaktor für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES ist.

Diesem Ergebnis stehen die Untersuchungen von Farhan et al. [54] gegenüber. Hier wurde beobachtet, dass in HeLa-Zellen die Mutante T415I bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* eine gleichermaßen hohe immobile Fraktion von  $f_i \approx 0,8$  an den ERES aufweist. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Sec16 aufgrund des unphosphorylierten Zustands an den ERES eine hohe immobile Fraktion aufweist. Um diese Ergebnisse mit den in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnissen vergleichen zu können, wäre es notwendig zur Kontrolle FRAP-Messungen mit der gleichen Genauigkeit (Verfolgung der Eigenbewegung des ERES in der ROI, größerer Zoom) von Sec16 in HeLa-Zellen durchzuführen, wie sie in dieser Arbeit vorgenommen wurden.

Neben der Phosphorylierung und der Interaktion mit dem COPII-Komplex ist die Menge des zu transportierenden *Cargo* an den ERES als wichtiger Einflussfaktor für den Austausch der Sec16-Proteine an den ERES vorstellbar. Es ist anzunehmen,



**Abbildung 12.1.** Modell für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES. Im Modell A gelangt Sec16 durch Diffusion im Zytosol ( $D_c$ ) an die ER-Membran, an der seine Assoziation mit der Reaktionsrate  $k_1$  und die Dissoziation mit der Rate  $k_{-1}$  stattfinden. Das Protein gelangt durch Diffusion auf der ER-Membran ( $D_m$ ) an ein ERES, an das es mit der Rate  $k_{on}$  bindet. Die Dissoziation des Proteins kann aus jeder beliebigen Position eines ERES mit der Dissoziationsrate  $k_{off}$  stattfinden. Im Modell B kann die Dissoziation von Sec16 nur aus bestimmten Positionen des ERES stattfinden, zu denen die Proteine mit einem Transportkoeffizienten von  $\Gamma_{ERES}$  transportiert werden müssen.

dass bei der Kondition *Starvation* infolge des deaktivierten MAP-Kinase-Weges weniger Stoffe für die Sekretion synthetisiert werden. Dementsprechend steht bei dieser Kondition im Vergleich zu der Kondition *Serum Stimulation* für den Transport im sekretorischen Pfad weniger *Cargo* zur Verfügung. Es ist bekannt, dass der Austausch der COPII-Komponenten an den ERES in Abhängigkeit von der *Cargo*-Menge reguliert wird.<sup>[53]</sup> Aus diesem Grund ist es vorstellbar, dass die höhere immobile Fraktion der Konstrukte Sec16, T415I und T415E bei der Kondition *Starvation* durch *Cargo*-Mangel verursacht wurde.

Es ist weiterhin möglich, dass der Austauschprozess von Sec16 an den ERES von den möglichen unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen der COPII-Komponenten bei den beiden Zellwachstumsbedingungen beeinflusst wird.

Die Anwesenheit einer mobilen Fraktion der Proteine mit einer Verweilzeit an den ERES, die durch die Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  charakterisiert wurde, und einer immobile Fraktion, charakterisiert durch die immobile Fraktion  $f_i$ , deuten darauf hin, dass an den ERES zwei Populationen von Sec16-Proteinen vorhanden sind.

## 12.5. Modelle für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES

Auf der Basis der in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse sind für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES zwei Modelle vorstellbar. Diese sind in Abb. 12.1 skizziert.

Ein Modell basiert auf der Annahme, dass Sec16 innerhalb der ERES zwei unterschiedliche Bindungspartner hat. Die Komplexe zwischen den beiden Bindungspartnern

und Sec16 weisen unterschiedliche Verweilzeiten an den ERES auf, die bei FRAP-Experimenten in Form einer mobilen und einer immobilen Fraktion von Proteinen auftreten. Bei diesem Modell findet die Assoziation von Sec16 mit den ERES von der ER-Membran aus statt und die Dissoziation kann aus jeder beliebigen Position innerhalb eines ERES stattfinden, so dass Sec16 sowohl ins Zytosol als auch zurück auf die ER-Membran freigesetzt werden kann.

Das zweite Modell basiert auf der Annahme, dass Sec16 innerhalb der ERES nur eine Sorte von Bindungspartner hat. Sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation von Sec16 findet über die ER-Membran statt. Die Sec16-Proteine können demnach nicht von überall dissoziieren, sondern müssen erst zur einer dafür günstigen Position innerhalb eines ERES gelangen. Man kann diese Art der Dissoziation als transportlimitiert bezeichnen. Die immobile Fraktion von Sec16 an den ERES entsteht in diesem Fall aufgrund dieser Limitierung.

In FRAP-Experimenten, die an einzelnen ERES durchgeführt werden, kann zwischen den beiden Modellen nicht unterschieden werden. Entsprechend der Ergebnisse des Projekt in Kap.II entspricht die Fluoreszenzerholungszeit  $\tau$  der Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  Sec16 Protein gemessen. Im zweiten Fall wird die Fluoreszenzerholung durch die Assoziationsrate  $k_{\text{on}}$  und die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$ , sowie durch die Zeit für den Transport von Sec16 innerhalb der ERES bestimmt.

Für Identifizierung des zutreffenden Modells ist es notwendig zu untersuchen, ob die Verweilzeiten der Sec16-Proteine innerhalb der ERES transportlimitiert sind, d.h. von der Größe der gebleichten ROI abhängen. Die gebleichte ROI sollte dabei kleiner als ein ERES sind. Die ERES sind jedoch sehr klein ( $<1 \mu\text{m}$ ). Für Experimente dieser Art werden dementsprechend Mikroskope mit größerer Auflösung, als man es mit herkömmlichen konfokalen Mikroskopen erreichen kann, benötigt. Eine Methode, bei der eine solche Auflösung mit einer schnellen Detektion der Fluoreszenzintensität verbunden ist, ist zum heutigen Zeitpunkt nicht zugänglich.

Insgesamt lassen sich für den Austauschprozess von Sec16 an den ERES drei Einflussfaktoren vermuten: (I) Phosphorylierungszustände von Sec16 und den COPII-Komponenten, (II) Interaktion zwischen Sec16 und COPII, sowie (III) die Cargo-Menge an den ERES. Ein Teil dieser Einflussfaktoren wurde in dieser Arbeit näher untersucht (Einfluss der Phosphorylierung von Sec16 und zum Teil der Einfluss der COPII-Komponenten). Um den Austauschprozess der Proteine an den ERES und damit die Regulation der ERES bei den beiden Zellwachstumsbedingungen besser verstehen zu können, werden weitere Messungen benötigt. Hierbei wäre es vor allem wichtig das Verhalten (Diffusion im Zytoplasma, Austausch an den ERES) der COPII-Proteine bei den beiden Konditionen *Serum Stimulation* und *Starvation* auf ähnliche Weise wie es in dieser Arbeit mit Sec16 getan wurde (mittels FCS und FRAP) zu charakterisieren. Zusätzlich wäre es interessant die Interaktion zwischen Sec16 und den COPII-Proteinen näher zu bestimmen. Diese könnte beispielsweise durch Untersuchungen von Zellen, in denen gleichzeitig das Protein Sec16 und ein Protein des COPII-Komplexes mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, möglich sein. Als Untersuchungsmethode für die Diffusion der beiden Proteine könnte sich beispielsweise die Methode Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie (FCCS) eignen.

## 12.6. Modell der Entstehung der ERES in Zellen

Die in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse haben dazu beigetragen ein Modell für die Entstehung der ERES in Zellen zu entwickeln und neue Erkenntnisse über die Regulation der ERES zu gewinnen.

Computersimulationen haben bereits gezeigt, dass die typische quasi-kristalline Anordnung von ERES mit einer definierten Größe in lebenden Zellen nach einem Mechanismus entstehen kann, das auf der Selbstorganisation der COPII-Komponenten und/oder Sec16 basiert.<sup>[76]</sup> Im Gleichgewicht kann die Bildung der ERES aus diesem Grund durch die Flory-Huggins-Theorie beschrieben werden.<sup>[60]</sup> Analog zu kleinen amphipatischen Polymeren in Wasser, führt die dynamische Entmischung von Sec16 und/oder der COPII-Komponenten auf der ER-Membran zur Entstehung von größeren Proteindomänen. Im Gegensatz zum Standard-Szenario von Flory-Huggins haben Sec16 und/oder die COPII-Komponenten jedoch eine definierte Verweilzeit auf der ER-Membran, d.h. sie dissoziieren von der ER-Membran mit einer Rate von  $\Gamma_m$ . Durch die Erweiterung der Flory-Huggins-Theorie um diesem Aspekt lassen sich analytische Vorhersagen über die Anzahl ( $N_{\text{ERES}}$ ) und den Radius ( $R_{\text{ERES}}$ ) der ERES als Funktion der Dichte  $\phi$ , der Dissoziationsrate  $\Gamma_m$  und der Diffusionskoeffizienten  $D_m$  der Proteine treffen:

$$N_{\text{ERES}} = \frac{\Gamma_m L^2}{D_m} \quad \text{und} \quad R_{\text{ERES}} = \sqrt{\frac{4\phi D}{\pi \Gamma}} \quad (12.3)$$

Hier entspricht der Parameter  $L^2$  der Fläche der ER-Membran.

Nach diesem Modell würde die Erhöhung der Dissoziationsrate  $\Gamma_m$  von Sec16 zu der Erhöhung der Anzahl der ERES unabhängig von der Dichte der Proteine  $\phi$  auf der ER-Membran führen. Die Erhöhung der Anzahl der ERES würde dabei mit einer Erniedrigung des Radiuses der ERES einhergehen, da dieser proportional zum Kehrwert von  $\Gamma_m$  ist. Anders ausgedrückt, damit neue, jedoch kleinere, ERES entstehen können muss Sec16 die ERES schneller verlassen. Diese Vorhersage wird durch die experimentellen Beobachtungen unterstützt, dass bei der Kondition *Starvation* eine kurzfristige (15 min) Stimulation der Zellen mit Serum zu einer Erhöhung der Anzahl und der Reduktion der Größe der ERES führt.<sup>[155]</sup> In dieser Arbeit wurden für Sec16 an den ERES zwei Populationen von Proteinen in Form einer mobilen Fraktion mit einer kurzen Verweilzeit und einer immobilen Fraktion mit einer langen Verweilzeit der Proteine an den ERES beobachtet. Für Sec16 lässt sich näherungsweise eine mittlere Dissoziationsrate  $\Gamma_m$  formulieren, die von dem relativen Anteil der mobilen Population  $q$  abhängt:

$$\Gamma_m = q\Gamma_{\text{mob}} + (1 - q)\Gamma_{\text{immob}} \quad (12.4)$$

Für die hier untersuchten Konstrukte von Sec16 wurden sowohl Änderungen der Diffusionskoeffizienten  $D_m$  als auch der Dissoziationsraten  $\Gamma_m$  beobachtet. Nach Gl. (12.3) ist die Anzahl der ERES in Zellen proportional zu  $\frac{\Gamma_m}{D_m}$ . In dieser Arbeit wurde für Sec16 und T415 bei der Kondition *Serum Stimulation* eine höhere mobile Fraktion und somit eine Erhöhung für  $\Gamma_m$  um etwa Faktor 3 beobachtet. Für die Diffusion ergab sich dabei eine Erhöhung um Faktor 1,5. Nach dem Flory-Huggins-Modell wäre dementsprechend für Sec16 und T415I bei der Kondition *Serum Stimulation* eine

größere Anzahl an ERES in Zellen zu erwarten als bei der Kondition *Starvation*. Für das Konstrukt Maddin wurde in dieser Arbeit bei der Kondition *Serums Stimulation* um etwa Faktor 1,5 schnellere Dissoziation der Proteine und eine um Faktor 2 schnellere Diffusion der Proteine beobachtet. Entsprechend Gl.(12.3) wäre für Maddin eine Erniedrigung der Anzahl der ERES in Zellen zu erwarten. Diese Vorhersagen für die drei Proteinkonstrukte Sec16, T415I und Maddin entsprechen den experimentellen Beobachtungen in fixierten HeLa-Zellen<sup>[155]</sup> und unterstützen somit das Modell nach Flory-Huggins.



## **Teil IV.**

# **Diffusion der Mutanten von N-Ras auf Membranen und im Zytosol**



# 13. Einleitung

## 13.1. Kleine GTPasen Ras

Die Ras-Proteine gehören zu der Proteinfamilie kleiner GTPasen. Diese zählen zu den wichtigen Regulatoren zahlreicher intrazellulärer Prozesse, wie Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung. [41,88,114] Säugetierzellen verfügen über vier Ras-Isoformen, H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B. Trotz ihrer großen strukturellen Homologie werden von den vier Isoformen in Zellen unterschiedliche Signale erzeugt. [157,169,171] Aus diesem Grund besteht großes Interesse an einer Aufklärung der Ursachen für das isoform-spezifische Verhalten der Ras-Proteine.

Der strukturelle Aufbau der Ras-Proteine ist schematisch in Abb. 13.1 dargestellt. Alle Isoformen verfügen über die sogenannte G-Domäne, die das lösliche Strukturelement der Ras-Proteine darstellt und die Bindungsstellen für die Effektoren von Ras in sich trägt. Sie besteht aus 165 Aminosäuren und ist nahezu identisch (90–100%) in allen Ras-Isoformen. Die C-terminale *Hypervariable Region* (HVR) besteht aus 23/24 Aminosäuren und ist die einzige Proteinregion, die sich bei den verschiedenen Ras-Isoformen signifikant unterscheidet. Die HVR der Ras-Proteine wird bei einzelnen Isoformen nach ihrer Translation auf unterschiedliche Weise modifiziert. Diese posttranslationalen Modifikationen bestimmen die endgültige Lokalisationen der Proteine innerhalb der Zellen sowie innerhalb der Plasma-Membran. Es wird vermutet, dass die unterschiedlichen biologischen Funktionen der Ras-Proteine durch ihre isoform-spezifischen Lokalisation in Zellen hervorgerufen werden.

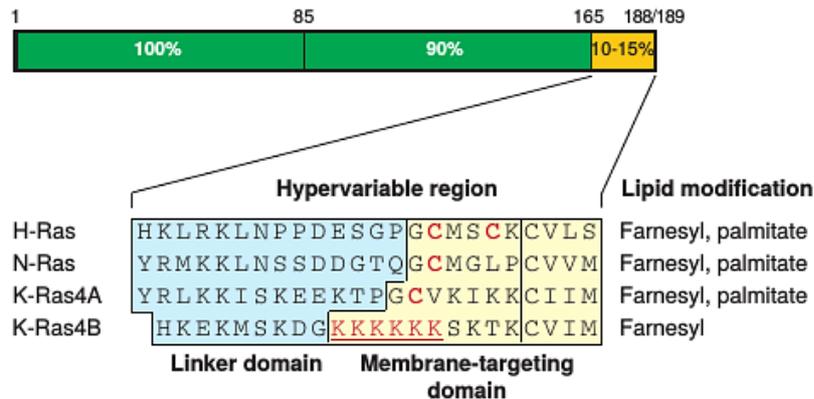
## 13.2. Posttranslationale Modifikationen der vier Ras-Isoformen

Im ersten Schritt der posttranslationalen Modifikation erhalten die vier Ras-Isoformen H-Ras, N-Ras, K-Ras4A und K-Ras4B einen Lipidanker in Form einer Farnesyl-Gruppe. [70,168] Die Farnesylierung ist eine irreversible Modifizierung und führt zu einer schwachen Bindung der Ras-Protein an die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER). [72,139]

Die Isoform K-Ras4B erhält keine weitere Modifizierung. Sie trägt eine polybasische Domäne, die durch Interaktionen mit anionischen Phospholipiden für eine stabile Anbindung des Proteins an die Plasma-Membran sorgt. [69,72]

Die Anbindung der Proteine H-Ras, N-Ras und K-Ras4A an Lipidmembranen wird durch eine Palmitoylierung stabilisiert. Das Protein H-Ras wird mit zwei Palmitoyl-Lipidankern versehen, während N-Ras und K-Ras4A nur eine Palmitoyl-Gruppe erhalten. Im Gegensatz zu Farnesylierung ist die Palmitoylierung eine reversible Modifizierung der Ras-Proteine.

Die Palmitoylierung wird durch die Proteine der Familie der Palmitoylacyltransferasen DHHC gesteuert, die in Säugetierzellen vorwiegend an der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert sind (siehe Übersichtsartikel von Salaun et al. [133]). Der Golgi-Apparat gilt aus diesem Grund als ein mögliches Zentrum für die Palmitoylierung der Ras-Proteine. [126]



**Abbildung 13.1.** Aufbau der Ras-Proteine: <sup>[120]</sup> Die N-terminale G-Domäne (grün) beinhaltet alle Bindungsstellen für die Effektoren von Ras und die Nucleotide (GDP, GTP), die *Hypervariable Region* (HVR) (gelb) beinhaltet < 10-15% der Proteinsequenzidentität und ist die einzige Strukturregion, die sich bei den einzelnen Ras-Isoformen signifikant unterscheidet. Innerhalb der HVR wird zwischen der Linker- und der *Membran-targeting*-Domäne unterschieden. Bei allen Ras-Isoformen beinhaltet die *Membran-targeting*-Domäne die Stellen für die Farnesylierung (C-terminaler CAAX-Motif), sowie Stellen für Palmitoylierung bei H-Ras, N-Ras, K-Ras, K-Ras4A (rot) und eine polybasische Domäne bei K-Ras4B (rot unterstrichen). Mit Genehmigung des Verlags *The Company of Biologists* (Lz.-Nr: 3652540575819, von *Copyright Clearance Center*).

Nach abgeschlossener Modifikation ist das Protein K-Ras4A an der Plasma-Membran lokalisiert. Der Mechanismus für den Transport von K-Ras4A an die Plasma-Membran ist unbekannt, findet jedoch unabhängig von dem sekretorischen Pfad statt. <sup>[9, 30, 31, 128, 154]</sup>

Die Proteine H-Ras und N-Ras sind nach ihrer posttranslationalen Modifikation sowohl auf der Plasma-Membran als auch auf den Membranen des Golgi-Apparats und des ER lokalisiert. Die intrazelluläre Verteilung der Proteine H-Ras und N-Ras wird durch einen Palmitoylierung-Depalmitoylierungszyklus reguliert. Dabei werden die beiden Proteine zunächst auf dem sekretorischen Pfad an die Plasma-Membran transportiert, wo ihre Aktivierung und Depalmitoylierung stattfinden. Die Abspaltung der Palmitoyl-Anker führt zu einer schwachen Bindung an die Plasma-Membran, wodurch die Proteine ins Zytosol freigesetzt werden und wahrscheinlich durch Diffusion an die Membranen des Golgi-Apparats gelangen, um erneut palmitoyliert zu werden. <sup>[14, 63, 127]</sup> Im palmitoylierten Zustand tendieren die Ras-Proteine dazu an alle intrazelluläre Membranen unspezifisch zu binden, <sup>[63, 127]</sup> so dass durch den beschriebenen Palmitoylierung-Depalmitoylierungszyklus ihre Akkumulation auf allen intrazellulären Membranen verhindert wird.

Die unterschiedlichen Modifikationen der Ras-Proteine an ihren HVR-Domänen sorgen nicht nur für ihre isoform-spezifische Verteilung im Zellinneren, sondern auch innerhalb der Plasma-Membran. Bei der Isoform H-Ras wurde beobachtet, dass die beiden Palmitoyl-Gruppen die Lokalisation des Proteins innerhalb der Plasma-Membran auf zwei unterschiedliche Arten beeinflussen. <sup>[129]</sup> Palmitoylierung an der Aminosäure Cystein auf Position 181 (Cys181) sorgt für eine stabile Verankerung des Proteins an der Plasma-Membran, während die Palmitoylierung an Cys184 für eine

bevorzugte Lokalisierung des Proteins in cholesterinreichen Mikrodomänen (*Rafts*) der Plasma-Membran unterstützt. Dabei zeigte die Cys181-monopalmitoylierte H-Ras-Mutante ähnliche intrazelluläre Lokalisation wie ein Wildtyp N-Ras-Protein, das in seiner nativen Form ausschließlich an der Cys181-Aminosäure palmitoyliert ist.

### 13.3. Die Bedeutung der Linker-Domänen von H-Ras, N-Ras und K-Ras4A

Der Linker-Domäne der Ras-Proteine, d.h. dem Strukturelement der HVR zwischen der G-Domäne und membranbindenden Region der Proteine, wurde lange Zeit wenig Beachtung geschenkt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass für die isoform-spezifische Lokalisation von H-Ras innerhalb der Plasma-Membran und seine biologische Aktivität eine intakte Linker-Domäne notwendig ist.<sup>[122]</sup> Für die Proteine N-Ras und K-Ras4A wird vermutet, dass die Linker-Domäne die stabile Anbindung der Proteine an die Plasma-Membran unterstützt.<sup>[96]</sup> Während die Farnesylierung und die zweifache Palmitoylierung von H-Ras ausreichend sind, um eine stabile Lokalisation des Proteins an der Plasma-Membran zu erreichen,<sup>[9]</sup> benötigen die monopalmitoylierten Isoformen der Ras-Proteine, N-Ras und K-Ras4A, zusätzliche basische oder hydrophobe Strukturelemente innerhalb der Linker-Domäne,<sup>[96]</sup> für ihren korrekten Einbau in die Plasma-Membran. Für das Protein N-Ras wurde gezeigt, dass bei Abwesenheit dieser Strukturelemente die minimale monopalmitoylierte N-Ras-Sequenz, tN (membranbindende Domäne der HVR), ausschließlich an der Membran des Golgi-Apparats lokalisiert ist.<sup>[96]</sup> Dabei wird vermutet, dass basische/hydrophobe Strukturelemente der HVR für eine stabilere Anbindung der Palmitoyl-Gruppe an eine Lipidmembran sorgen und auf diese Weise den Transport des Proteins an die Plasma-Membran unterstützen.<sup>[96]</sup>

Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die molekulare Struktur der Linker-Domäne Einfluss auf den Prozess der Palmitoylierung von N-Ras hat.<sup>[96]</sup> Während eine N-Ras-Mutante, die ausschließlich aus der HVR-Domäne von N-Ras besteht, im gleichen Ausmaß palmitoyliert wird wie ein Wildtyp N-Ras-Protein, wird die Mutante, die aus der HVR-Domäne von N-Ras mit einem Linker aus Alanin besteht, nicht palmitoyliert.<sup>[96]</sup> Auf welche Weise die Linker-Domäne die Palmitoylierung von N-Ras begünstigt ist noch nicht bekannt.

### 13.4. Die Bedeutung des Aktivierungszustandes von H-Ras und N-Ras

Die Verteilung der Ras-Proteine innerhalb der Plasma-Membran wird durch ihre Aktivierungszustände beeinflusst. Nach dem Erreichen der Plasma-Membran sind die verschiedenen Isoformen der Ras-Proteine in verschiedenen Arten von Nanoclustern lokalisiert. Die Lokalisation einzelner Ras-Isoformen in den jeweiligen Nanoclustern hängt von der Zusammensetzung der Nanocluster und dem Aktivierungszustand (Ras-GDP oder Ras-GTP) der einzelnen Isoformen ab. Auf diese Weise belegen die Ras-Isoformen im aktivierten Zustand räumlich getrennte und miteinander nicht überlappende Nanocluster innerhalb der Plasma-Membran, die oft als *Signalling-Domänen* bezeichnet werden.<sup>[71, 123]</sup> Im inaktiven Zustand (GDP-gebunden) ist H-Ras

in cholesterinhaltigen Clustern lokalisiert und wird bei Aktivierung (GTP-gebunden) an cholesterin-unabhängige Cluster gebunden.<sup>[77]</sup> Im Gegensatz dazu wird aktiviertes N-Ras in cholesterinhaltige Nanoclustern vorgefunden.<sup>[129]</sup>

## 14. Fragestellung

Die bisherigen Untersuchungen der Ras-Proteine und speziell der Isoform N-Ras fokussierten sich im wesentlichen auf den Einfluss der Farnesylierung und der Palmitoylierung der Proteine auf ihre Lokalisation an der Plasma-Membran und des Golgi-Apparats. Wenig Beachtung fand ein möglicher Einfluss der Linker-Domäne an der HVR-Domäne dieser Proteine. Dabei geht aus kürzlich erschienen Studien hervor, dass auch dieses Strukturelement wesentlich zur der korrekten Verteilung der Ras-Proteine im Zellinneren und an der Plasma-Membran beiträgt. <sup>[96,129]</sup>

In diesem Projekt wurde die Diffusion von drei Konstrukten des Proteins N-Ras mit einer modifizierten Linker-Domäne mit der Methode FCS untersucht. Eines der untersuchten Proteinkonstrukte besteht nur aus der N-Ras-HVR-Domäne (Konstrukt Ala1). Die beiden übrigen Konstrukte (Ala2 und Ala3) besitzen die vollständige N-Ras-Proteinsequenz, wobei das Konstrukt Ala2 die konstitutiv aktive Mutante des Proteins N-Ras ist. Bei allen drei Konstrukten wurde die gesamte Linker-Domäne durch Alanin ersetzt.



# 15. Methoden

## 15.1. Zellkultur und Probenpräparation

### 15.1.1. Zellen

Alle Messungen wurden mit COS-7 (*African Green Monkey Kidney*) Zellen durchgeführt. Diese wurden in Zellkulturflaschen (25  $\mu\text{m}^2$ , Hrst. Corning) bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Als Nährmedium wurde das Medium DMEM (Hrst. Gibco) ergänzt mit 10 % fötalen Kälberserums, 1 % Pyruvat, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin verwendet. Für die Mikroskopie wurden die Zellen in den Mikroskopie-Behältern  $\mu$ -Slide (ibiTreat, 2 Kammern, No. 1,5, Hrst. ibidi) gezüchtet. Pro Kammer eines  $\mu$ -Slide wurde 1,5 ml Nährmedium verwendet.

Für die Untersuchungen der Zellen am Mikroskop wurde ein farbstofffreies *Imaging*-Medium (MEM ohne Phenolrot (Hrst. Gibco) mit 10 % Serum) verwendet. Der pH-Wert des Mediums wurde während der Messungen durch Zugabe von 50 mmol/l HEPES stabilisiert.

### 15.1.2. Plasmide

Es wurden drei biochemisch modifizierte Varianten des Proteins N-Ras in lebenden Zellen untersucht. Die Zellen wurden dazu mit den jeweiligen Plasmiden der Proteine transfiziert. Die Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Y. Henis (Universität Tel Aviv, Israel) hergestellt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die drei Proteinkonstrukte sind Fusionskonstrukte mit GFP als Fluoreszenzfarbstoff. Die Proteinkonstrukte und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 15.1 zusammengefasst.

Name	Plasmid	Sequenzmodifizierung
Ala1	GFP-HVR-N-ala	HVR-Domäne von N-Ras, Linker-Domäne der HVR wurde durch Alanin ersetzt
Ala2	GFP-Nv-HVR-N-ala	N-Ras in voller Länge, konstitutiv aktive Mutante, Linker-Domäne der HVR wurde durch Alanin ersetzt
Ala3	GFP-N-HVR-N-ala	N-Ras in voller Länge, Linker-Domäne der HVR wurde durch Alanin ersetzt

**Tabelle 15.1.:** Verwendete Plasmide des Proteins N-Ras,<sup>[96]</sup> zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Y. Henis (Universität Tel Aviv, Israel).

### 15.1.3. Transfektion der Zellen

Für die Transfektion der Zellen wurde das Transfektionsreagenz FuGENE 6 (Promega) verwendet. Bei einer Transfektion wurde zunächst entsprechend der Herstelleranleitung eine Transfektionslösung aus 1  $\mu\text{l}$  FuGENE 6 und 0,5  $\mu\text{g}$  eines Plasmids in 100  $\mu\text{l}$  des Mediums Opti-MEM GlutaMax Medium (zusatzfrei, Hrst. Gibco) gelöst und

15 min bei RT inkubiert. Vor der Transfektion wurde das Nährmedium der Zellen durch frisches ersetzt. Die Zellen wurden danach mit je 100  $\mu$ l Transfektionslösung pro Kammer eines  $\mu$ -Slide versetzt und 18–24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 15.2. Messmethoden

### 15.2.1. Experimentelle Ausstattung

Alle Messungen wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop des Modells Leica TCS SP5 durchgeführt. Dieser verfügte über einen 63 $\times$ /1,2 NA Wasserimmersionsobjektiv, einen FCS-Unit (PicoQuant) und einen kontinuierlichen 65 mW Argon-CW-Laser. Bei Bildaufnahmen erfolgte die Detektion der Fluoreszenz durch Photomultiplier. FCS-Messungen wurden mit einem 500–550 nm Bandpassfilter und einer Avalanche-Photodiode (APD) als Detektor durchgeführt. Die Parameter für die Fluoreszenzanregung und die Detektion wurden entsprechend des Absorptions- und des Emissionsspektrums von GFP (siehe Abb. 3.1) gewählt. Die Experimente wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C durchgeführt. Dazu wurde eine am Lehrstuhl angefertigte Inkubationskammer verwendet.

### 15.2.2. FCS-Messungen im Zytoplasma

Die FCS-Messungen wurden wie es in Abs. 10.2.3 beschrieben wurde durchgeführt und ausgewertet. Zum Fitten der Kurven wurden die Modellfunktionen für zweidimensionale anomale Diffusion mit einer Komponente (Gl. (3.26)) und für zweidimensionale normale Diffusion mit zwei Komponenten (Gl. (3.23)) verwendet.

### 15.2.3. Abschätzung der Diffusionskoeffizienten

Die Bestimmung theoretischer Werte der Diffusionskoeffizienten  $D_{c,theo}$  von Proteinen im Zytosol wurde bereits in Abs. 10.2.4 beschrieben. Für die Bestimmung der hydrodynamischen Radien  $R_H$  der N-Ras-Proteine wurden Anzahlen der Aminosäuren von  $N = 280$  für Ala1 und  $N = 455$  für Ala2/3 verwendet.

## 16. Ergebnisse

### 16.1. Phänotypen der untersuchten Proteinvarianten von N-Ras in Zellen

Die Phänotypen der Konstrukte des N-Ras-Proteins Ala1, Ala2 und Ala3 wurden zunächst anhand von Fluoreszenzbildern lebender Zellen untersucht.

In Abb. 16.1 sind repräsentativ einzelne Zellen zu sehen, die mit den drei Mutanten Ala1, Ala2 und Ala3 transfiziert wurden.

Die Mutante Ala1 ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert. An dem ausgeprägten netzartigen Muster der Fluoreszenz ist zu erkennen, dass die Ala1-Proteine zum größten Teil an der ER-Membran lokalisiert sind (siehe Ala1(Nuk) in Abb. 16.1). Auf der Plasma-Membran (PM) ist keine Lokalisation zu erkennen (siehe Ala1(Nuk) und Ala1(PM) in Abb. 16.1). Für diese Mutante wurde bereits vorher ein ähnlicher Phänotyp beobachtet.<sup>[96]</sup>

Die Mutanten Ala2 und Ala3 zeigen ähnliche Phänotypen in Zellen. Bei beiden Mutanten ist eine starke und inhomogene Färbung des Zytoplasmas zu erkennen. Innerhalb dieser Region sind Bereiche mit höherer und niedrigerer Fluoreszenzintensität zu sehen. Die Inhomogenität der Fluoreszenz deutet darauf hin, dass die Proteine an der ER-Membran und im Zytosol lokalisiert sind. Zusätzlich sind Lokalisationen an der Golgi-Membran (stark fluoreszierende Region in der Nähe des Nukleus) und auf der Plasma-Membran (siehe Pfeile bei Ala2 und Ala3 in Abb.16.1) zu erkennen. Ein ähnlicher Phänotyp wurde für die Mutante Ala3 bereits vorher beobachtet.<sup>[96]</sup>

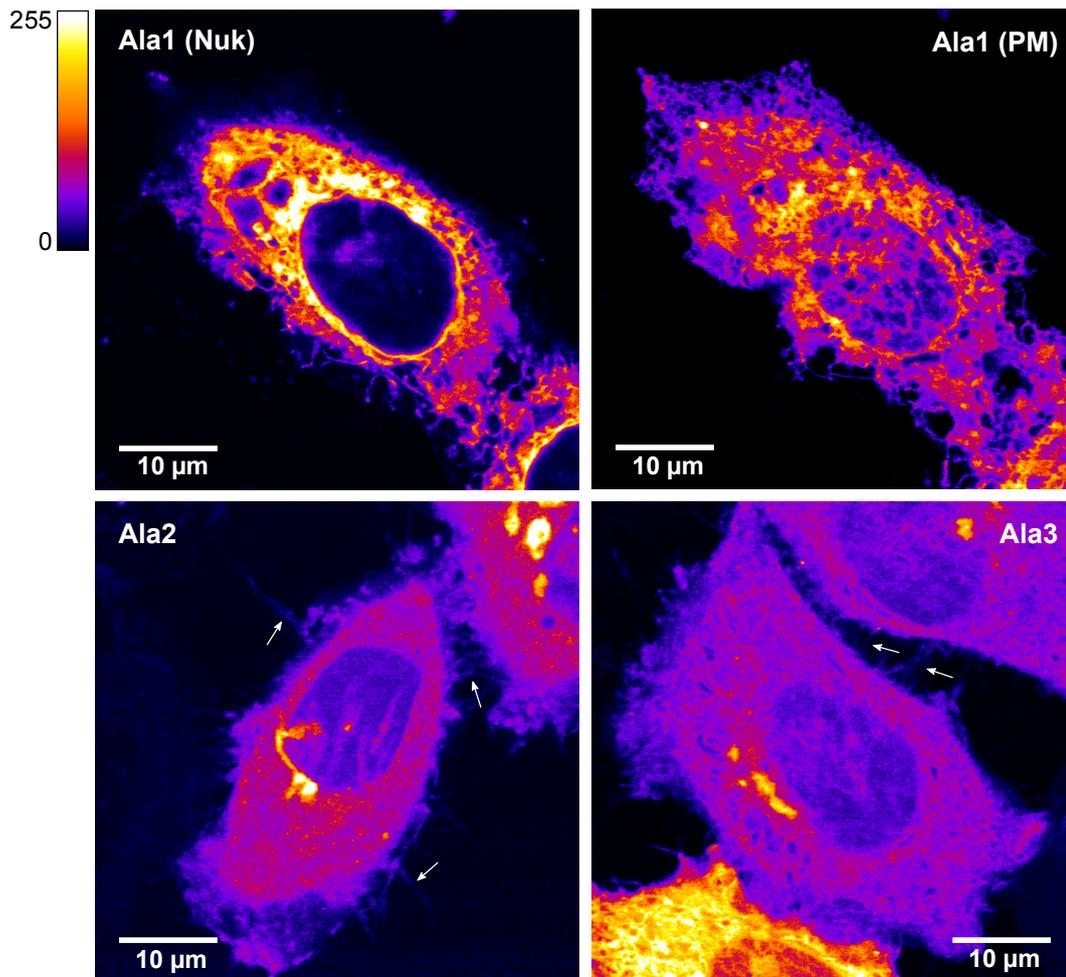
### 16.2. Diffusion der Mutanten von N-Ras im Zytoplasma

#### 16.2.1. Übersicht der Ergebnisse

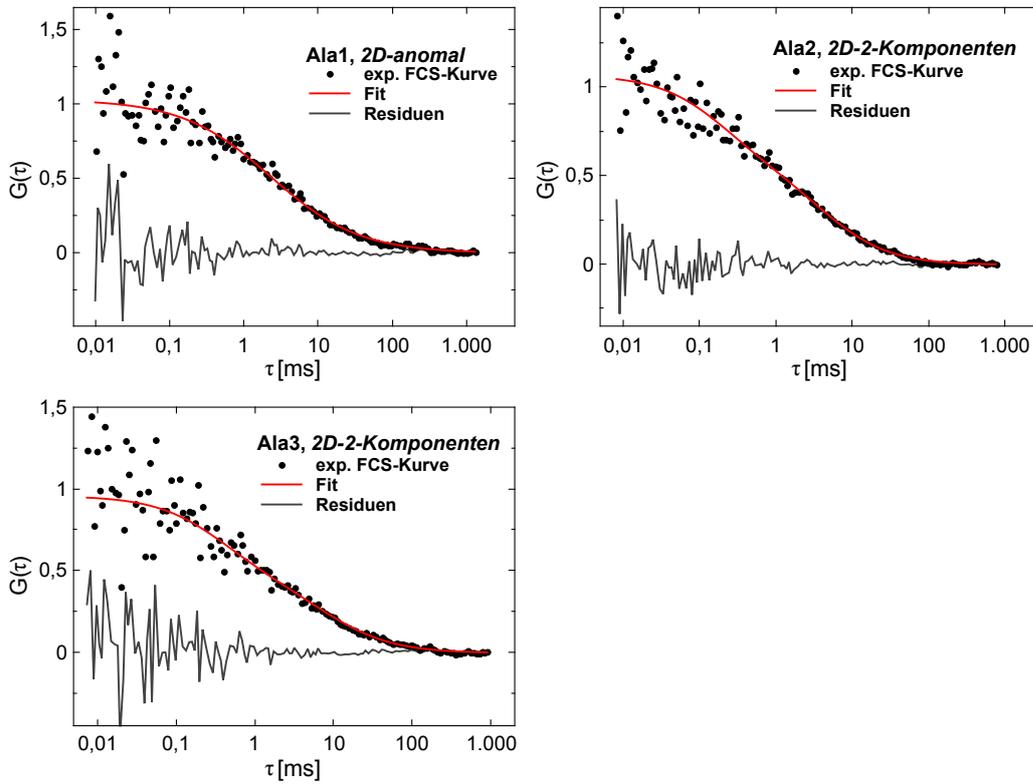
Es wurde die Diffusion der Proteine Ala1, Ala2 und Ala3 im Zytoplasma mit der Methode FCS untersucht. FCS-Messungen wurden in lebenden transfizierten COS-7-Zellen an Stellen mit niedriger Fluoreszenzintensität außerhalb des Nukleus durchgeführt. Die resultierende FCS-Kurven wurden mit geeigneten Modellfunktionen gefittet, um die charakteristischen Parameter für die Diffusion der Proteine zu bestimmen. In Abb. 16.2 sind repräsentative gefittete Kurven der drei Proteinkonstrukte dargestellt. In den folgenden Abschnitten wird die Auswahl der geeigneten Fit-Funktionen für die jeweiligen Proteine erläutert und die Fit-Ergebnisse vorgestellt.

#### 16.2.2. Diffusion der Mutante Ala1

Anhand der Fluoreszenzbilder wurde festgestellt, dass die Mutante Ala1 in Zytoplasma vorwiegend an die ER-Membran lokalisiert ist (siehe Abs. 16.1). Die FCS-Kurven der Mutante Ala1 wurden aus diesem Grund mit der Funktion der anomalen zweidimensionalen Diffusion mit einer Komponente (Abk. *2D-anomal*, Gl. (3.26)) gefittet. In Tab. 16.1 sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Diffusionszeit  $\tau_\alpha$  und der Anomalität  $\alpha$  von Ala1 aufgeführt. Die Diffusionszeit von Ala1 beträgt  $\tau_\alpha = 3,77$  ms und die Anomalität ist  $\alpha = 0,76$ . Die dazugehörigen Häufigkeitsvertei-



**Abbildung 16.1.** Die Phänotypen der Mutanten des Proteins N-Ras Ala1, Ala2, Ala3 in lebenden COS-7-Zellen. **Ala1(Nuk)** zeigt die Fluoreszenz von Ala1 im Zellinneren auf der Ebene des Nukleus und **Ala1(PM)** die Fluoreszenz in der Nähe der Plasma-Membran. Das Protein Ala1 ist vorwiegend an der ER-Membran lokalisiert. **Ala2** und **Ala3** zeigen die Fluoreszenz von Ala2 und Ala3 in Zellen. Ala2 und Ala3 weisen ähnliche Phänotypen auf. Zu vermuten sind Lokalisationen der Proteine im Zytosol und auf der ER-Membran. Zusätzlich ist schwache Fluoreszenz der Mikrovilli zu erkennen (mit Pfeilen markiert), die auf die Lokalisation der Proteine an der Plasma-Membran (PM) hindeutet.



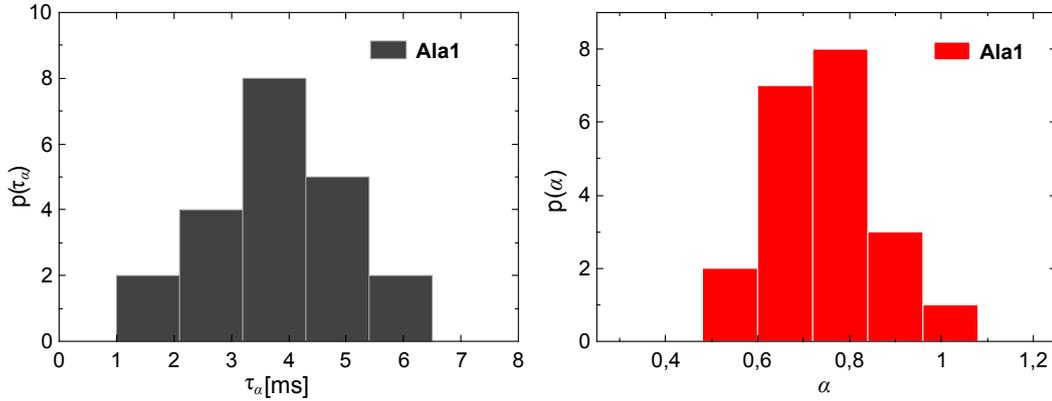
**Abbildung 16.2.** Repräsentative gefittete FCS-Kurven der Mutanten Ala1, Ala2 und Ala3. Die Kurve von Ala1 wurden mit der Modellfunktion *2D-anomal* (Gl.(3.26)) und die Kurven von Ala2 und Ala3 wurden mit der Modellfunktion *2D-2-Komponenten* (Gl.(3.23)) gefittet. Die Ergebnisse des gesamten Datensatzes sind in den Tab. 16.1 und 16.2 zusammengefasst.

lungen der Messwerte  $p(\tau)$  und  $p(\alpha)$  sind Gauß-Verteilungen (siehe Abb. 16.3).

Ähnliche Werte von  $\alpha$  wurden auf intrazellulären Membranen bereits beobachtet.<sup>[104]</sup> Als Vergleichswert für die Diffusionszeit  $\tau_\alpha$  lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung (Gl.(2.4)) für Ala1 im Zytosol eine Diffusionszeit von  $\tau_{c,theo} = 0,30$  ms abschätzen (siehe Abs.15.2.3). Die gemessene Diffusionszeit  $\tau_\alpha$  von Ala1 ist deutlich größer als  $\tau_{c,theo}$  und liegt im Bereich der Diffusionszeiten von Proteinen auf Lipidmembranen.<sup>[135]</sup> Aufgrund dessen lässt sich  $\tau_\alpha$  zur Diffusion von Ala1-Proteinen auf der ER-Membran zuordnen.

Zur Kontrolle wurden einige FCS-Kurven von Ala1 mit der Funktion einer zweidimensionalen Diffusion mit zwei Komponenten (Abk.*2D-2-Komponenten*, Gl. (3.23)) gefittet. Hieraus ergaben sich jedoch keine Werte, die mit den bekannten Eigenschaften des gemessenen Systems in Einklang zu bringen waren. Für die schnelle Komponente wurden deutlich größere Diffusionszeiten gemessen, als sie für die Diffusion von Ala1 im Zytosol zu erwarten wären ( $\tau_c > 1$  ms) und für die langsamere Komponente wurden deutlich größere Diffusionszeiten gemessen, als sie für die Diffusion von membrangebundenen Ala1-Proteinen zu erwarten wären ( $\tau_m > 100$  ms).

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass die Mutante Ala1 im Zyto-



**Abbildung 16.3.** Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_\alpha)$  und  $p(\alpha)$  der Messwerte der Diffusionszeit  $\tau_\alpha$  und der Anomalität  $\alpha$  des Proteins Ala1. Siehe Abs. 16.2.2 für Details.

<i>2D-anomal</i>			
	$\tau_\alpha$ [ms]	$\alpha$	$n$
<b>Ala1</b>	$3,77 \pm 1,26$	$0,76 \pm 0,12$	21

**Tabelle 16.1.** Mittelwerte und Standardabweichungen von der Diffusionszeit  $\tau_\alpha$  und der Anomalität  $\alpha$  von Ala1 aus  $n$  Fit-Kurven gemessen mit dem *2D-anomal*-Modell (Gl.(3.26)).

plasma vorwiegend auf der ER-Membran lokalisiert ist und dort anomale Diffusion aufweist.

### 16.2.3. Diffusion der Mutanten Ala2 und Ala3 im Zytosol und auf der ER-Membran

Die Phänotypen der Mutanten Ala2 und Ala3 wurden, anhand der Fluoreszenzbilder in Abb. 16.1, als Mischungen aus im Zytosol gelösten und an die ER-Membran gebundenen Proteine identifiziert (siehe Abs. 16.1). Sowohl im Zytosol als auch auf der ER-Membran ist für die beiden Proteine anomale Diffusion zu erwarten (siehe Abs. 1.4 und 2.2.1). Zum Fitten der FCS-Kurven eignet sich aus diesem Grund grundsätzlich eine Autokorrelationsfunktion, die zwei Komponenten der anomalen Diffusion in den beiden unterschiedlichen Medien berücksichtigt. Für den Beitrag der Diffusion im Zytosol eignet sich die Funktion der dreidimensionalen anomalen Diffusion (Gl. (3.25)) und für den Beitrag membrangebundener Proteine eignet sich die Funktion der zweidimensionalen anomalen Diffusion (Gl. (3.26)). Eine solche Fit-Funktion enthält insgesamt fünf frei wählbare Parameter und ist aufgrund dessen, wie es bereits in Abs. 11.2.2 für das Projekt *Regulation und Organisation der ERES* ausführlich erläutert wurde, ungeeignet um verwendbare Informationen über die Diffusion der Proteine aus FCS-Kurven zu gewinnen. Für die Auswertung der FCS-Kurven von Ala2 und Ala3 wurde aus diesem Grund eine weniger komplexe Autokorrelationsfunktion für zweidimensionale Diffusion mit zwei Komponenten ohne Anomalität (*2D-2-Komponenten*, Gl. (3.23)) gewählt.

<i>2D-2-Komponenten</i>				
	$\tau_c$ [ms]	$\tau_m$ [ms]	$f_c$	
<b>Ala2</b>	$0,46 \pm 0,19$	$6,68 \pm 3,72$	$0,68 \pm 0,16$	
<b>Ala3</b>	$0,65 \pm 0,59$	$33,04 \pm 40,73$	$0,67 \pm 0,17$	
	$\tau_c$ [ms]	$\tau_{m,1}$ [ms]	$\tau_{m,2}$ [ms]	$f_c$
<b>Ala3*</b>	(konst.) 0,46	$8,32 \pm 2,47$	$25,15 \pm 6,23$	$0,63 \pm 0,15$

**Tabelle 16.2.:** Fit-Ergebnisse für die Proteine Ala2 und Ala3 gemessen mit dem Modell *2D-2-Komponenten*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der Diffusionszeiten löslicher Proteine  $\tau_c$  und membrangebundener Proteine  $\tau_m$ , sowie der relativen Anteile löslicher Proteine  $f_c$  der Konstrukte Ala2 und Ala3 im Zytoplasma. Unter Ala3\* sind die Fit-Ergebnisse zu den Kurven des Konstrukts Ala3 gemessen mit Einschränkung von  $\tau_c = \text{konst.} = 0,46$  ms aufgeführt. Ala3\* beinhaltet zwei Populationen der Diffusionszeiten membrangebundener Proteine  $\tau_{m,1}$  und  $\tau_{m,2}$ .

Durch Fitten der FCS-Kurven mit Gl. (3.23) wurden für die Proteine Ala2 und Ala3 die Diffusionszeiten  $\tau_c$  und  $\tau_m$  sowie der relative Anteil der schnellen Komponente  $f_c$  bestimmt. Die Fit-Ergebnisse sind in Tab. 16.2 zusammengefasst.

Die Diffusionszeit der schnelleren Komponente von Ala2 mit  $\tau_c = 0,46$  ms und Ala3 mit  $\tau_c = 0,65$  ms konnte, anhand der abgeschätzten Diffusionszeit im Zytosol mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung ( $\tau_{c,\text{theo}} = 0,36$  ms), der Diffusion der Proteine im Zytosol zugeordnet werden. Der Mittelwert von  $\tau_c$  ist bei Ala3 etwas größer als bei Ala2. Im Rahmen ihrer Fehler stimmen die beiden Werte jedoch überein. Auch mit einem Student-t-Test wird kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Messreihen von  $\tau_c$  festgestellt. Es ist zusätzlich eine gute Übereinstimmung der Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_c)$  der Diffusionszeiten im Zytosol (Abb.16.4) der beiden Proteine zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Proteine Ala2 und Ala3 im Zytosol ähnliche Diffusionszeiten aufweisen.

Für die langsamere Komponente ergaben sich mittlere Diffusionszeiten von  $\tau_m = 6,68$  ms für Ala2 und  $\tau_m = 33,04$  ms für Ala3, die gut mit den Erwartungen für die Diffusionszeiten auf der ER-Membran übereinstimmen.<sup>[135]</sup> Auffällig ist, dass die Messwerte  $\tau_m$  von Ala3 eine starke Streuung aufweisen (Standardabweichung von 40,73 ms). Die dazugehörigen FCS-Kurven wurden aus diesem Grund nochmals mit dem *2D-2-Komponenten*-Modell (Gl. (3.23)) bei einem konstanten Wert des Parameters  $\tau_c = 0,46$  ms (Mittelwert von  $\tau_c$  der Mutante Ala2) gefittet. Diese Einschränkung wurde mit der Berechtigung vorgenommen, dass für die Proteine Ala2 und Ala3 im Zytosol keine signifikanten Unterschiede zwischen den Diffusionszeiten  $\tau_c$  festgestellt wurden. Die Ergebnisse zu dieser Fit-Methode werden im Folgenden mit Ala3\* bezeichnet.

Um festzustellen, ob zwischen den Messwerten  $\tau_m$  von Ala2 und Ala3\* Unterschiede bestehen wurden zunächst die kumulativen Verteilungen  $P(\tau_m)$  der beiden Proteine untersucht (siehe Abb. 16.5). Der Vergleich der beiden Verteilungen zeigt, dass die Messwerte  $\tau_m$  der beiden Mutanten unterschiedlich verteilt sind. Durch Fitten der Kurven  $P(\tau_m)$  an Verteilungsfunktionen von unimodalen (Gl. (10.4)) und bimodalen Normalverteilungen (Gl. (10.5)) wurde weiterhin festgestellt, dass die Messwerte von

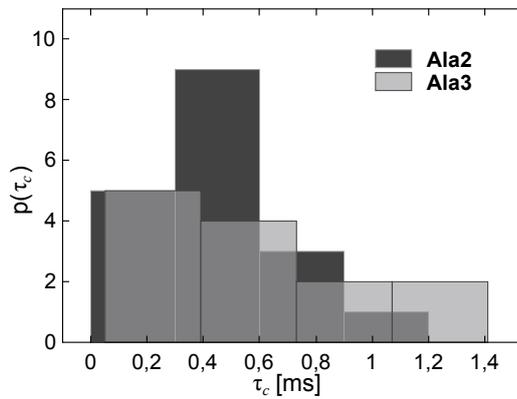


Abbildung 16.4. Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_c)$  der Messwerte der Diffusionszeit löslicher Proteine  $\tau_c$  der Konstrukte Ala2 und Ala3. Siehe Abs. 16.2.3 für Details.

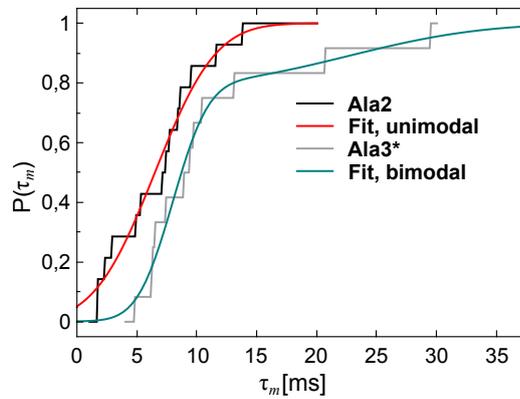


Abbildung 16.5. Kumulative Verteilungen  $P(\tau_m)$  der Diffusionszeiten  $\tau_m$  von Ala2 und Ala3\*.  $P(\tau_m)$  von Ala2 wurde mit der Verteilungsfunktion einer unimodalen Normalverteilung (Gl.(10.4)) und  $P(\tau_m)$  von Ala3\* wurde mit der Verteilungsfunktion einer bimodalen Normalverteilung (Gl.(10.5)) gefittet. Siehe Abs. 16.2.3 für Details.

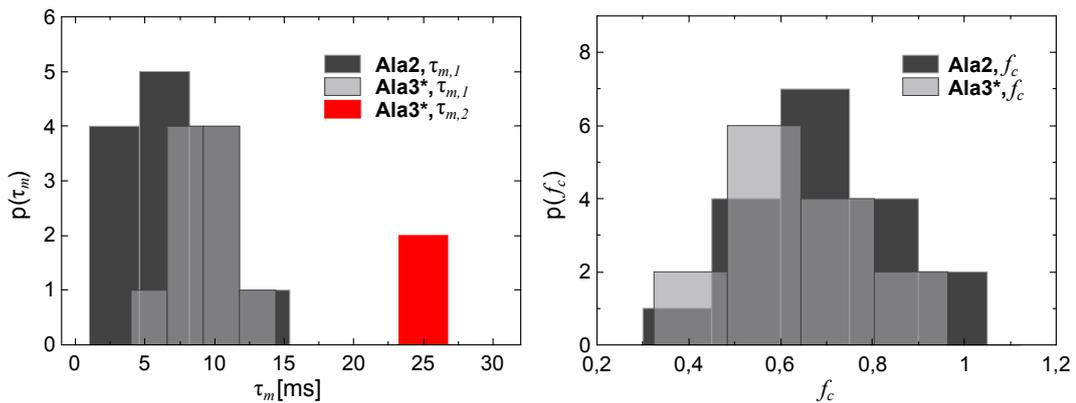


Abbildung 16.6. Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_m)$  und  $p(f_c)$  der Messwerte der Diffusionszeit membrangebundener Proteine  $\tau_m$  und der relativen Anteile löslicher Proteine  $f_c$  im Zytoplasma der Messreihen von Ala2 und Ala3\*. Siehe Abs. 16.2.3 für Details.

Ala3\* bimodal verteilt sind und demnach zwei Populationen von  $\tau_m$  aufweisen. Die Messwerte der Mutante Ala2 sind dagegen unimodal verteilt.

Für weitere Analysen wurden die Messwerte  $\tau_m$  von Ala3\* in die beiden Populationen aufgeteilt. Die Teilungen der Messwerte wurde anhand der Schnittpunkte der Wahrscheinlichkeitsdichten der beiden Populationen vorgenommen. Die genaue Vorgehensweise zur Ermittlung der Schnittpunkte ist in Abs. 10.2.5 ausführlich beschrieben. Die Mittelwerte und die Standardabweichungen der resultierenden Diffusionszeiten  $\tau_{m,1}$  und  $\tau_{m,2}$  sowie des Anteils  $f_c$  löslicher Proteine in Zytoplasma von Ala3\* sind in Tab. 16.2 aufgeführt.

Es zeigt sich, dass  $\tau_m$  von Ala2 und  $\tau_{m,1}$  von Ala3\* in der gleichen Größenordnung liegen, während die Diffusionszeit  $\tau_{m,2}$  von Ala3\* zu größeren Zeiten verschoben ist. Die Häufigkeitsverteilungen  $p(\tau_m)$  in Abb. 16.6 zeigen eine gute Überlappung zwischen den Messwerten  $\tau_m$  von Ala2 und  $\tau_{m,1}$  von Ala3\*. Mit einem t-Test wird zwischen den beiden Messreihen  $\tau_m$  und  $\tau_{m,1}$  von Ala2 und Ala3\* kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die beiden Proteine Ala2 und Ala3 auf der ER-Membran unterschiedliche Charakteristika der Diffusion aufweisen. Aufgrund der zusätzlichen Population mit größerer Diffusionszeit  $\tau_m$  und dementsprechend langsamerer Diffusion der Proteine von Ala3 lässt sich für dieses Protein *Clustering*, d.h. Einbindung in größere Proteinkomplexe mit langsamer Diffusion, auf der ER-Membran vermuten.

Für den Anteil der löslichen Proteine im Zytoplasma ergaben sich für beide Mutanten Ala2 und Ala3 Werte von  $f_c \approx 0,65$ . Die Verteilungen der Messwerte  $p(f_c)$  in Abb. 16.6 zeigen eine gute Überlappung miteinander und ein t-Test zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Messreihen. Es ist anzumerken, dass sich der Parameter  $f_c$  durch Fitten der FCS-Kurven von Ala3 mit und ohne Einschränkung von  $\tau_c$  nicht signifikant geändert hat. Dies zeigt auch der t-Test zwischen den Messreihen  $f_c$  von Ala3 und Ala3\*.

Die Gesamtzahl der Proteine im konfokalen Volumen während einer FCS-Messung setzt sich aus den Anteilen der löslichen Proteine  $f_c$  und der membrangebundenen Proteine  $f_m$  zusammen. Aus den Beobachtungen zum Parameter  $f_c$  lässt sich feststellen, dass die Mutanten Ala2 und Ala3 gleiche Aufteilung der Proteine zwischen der ER-Membran und dem Zytosol zeigen mit einem höheren löslichen Anteil der Proteine von 65 %.

#### 16.2.4. Vergleich der Diffusion der Mutanten Ala1 und Ala2/Ala3 auf der ER-Membran

Da die Diffusionszeiten membrangebundener Proteine  $\tau_\alpha$  der Mutante Ala1 mit dem *2D-anomal*-Modell für anomale Diffusion und die Diffusionszeiten  $\tau_m$  der Mutanten Ala2 und Ala3\* mit dem *2D-2-Komponenten*-Modell für Diffusion ohne Anomalität bestimmt wurden, können diese Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden.

Die Diffusion der drei Proteine auf der ER-Membran kann jedoch anhand der mittleren quadratischen Verschiebungen (MSD) verglichen werden.

Der MSD der Proteine bei normaler und anomaler Diffusion hängt wie folgt mit ihrer Diffusionszeit  $t$  zusammen:

$$\text{MSD} = 4 \cdot D_m \cdot t \quad \text{für normale Diffusion} \quad (16.1)$$

$$\text{MSD} = 4 \cdot \Gamma \cdot t^\alpha \quad \text{für anomale Diffusion} \quad (16.2)$$

Hier ist  $D_m$  der Diffusionskoeffizient und  $\Gamma$  ist der Transportkoeffizient der Proteine auf der ER-Membran.

Die Parameter  $\tau_\alpha$  von Ala1 und  $\tau_m$  von Ala2/Ala3, die aus FCS-Messungen gewonnen wurden, entsprechen den Diffusionszeiten der Proteine im fokalen Volumen mit der Querschnittsfläche (xy-Ebene)  $\omega_0^2$ . Hieraus wurden die Koeffizienten  $D_m$  der Proteine Ala2/Ala3 und  $\Gamma$  des Proteins Ala1 berechnet:

$$D_m = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot \tau_m} \quad \text{und} \quad \Gamma = \frac{\omega_0^2}{4 \cdot \tau_\alpha^\alpha}$$

Die Querschnittsfläche  $\omega_0^2$  des fokalen Volumens wurde dabei mit den Parametern der Wellenlänge für die Anregung der Fluorophore  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und der numerischen Apertur des verwendeten Objektivs  $\text{NA}=1,2$  abgeschätzt:

$$\omega_0 = \frac{\lambda}{2 \cdot \text{NA}} \quad (16.3)$$

Die Fehler der Koeffizienten  $D_m$  und  $\Gamma$  wurden durch Fehlerfortpflanzung bestimmt:

$$\Delta D_m = \sqrt{\left(\frac{\partial D_m}{\partial \tau_m} \Delta \tau_m\right)^2} \quad \text{und} \quad \Delta \Gamma = \sqrt{\left(\frac{\partial \Gamma}{\partial \tau_\alpha} \Delta \tau_\alpha\right)^2 + \left(\frac{\partial \Gamma}{\partial \alpha} \Delta \alpha\right)^2}$$

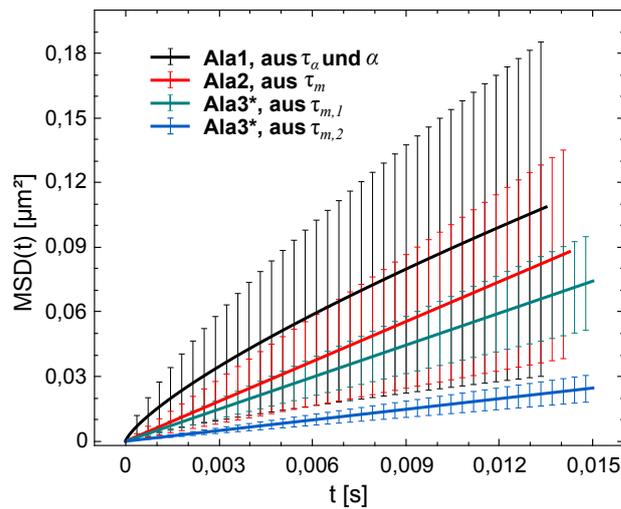
Die berechneten Parameter  $D_m$  und  $\Gamma$  der Proteine Ala1, Ala2 und Ala3 sind in Tab. 16.3 zusammengefasst. Aus den Parametern  $D_m$ ,  $\Gamma$  und ihren Fehlern nach Gl.(16.1) und (16.2) lassen sich die Kurven  $\text{MSD}(t)$  der Proteine Ala1, Ala2 und Ala3 bestimmen, die in Abb. 16.7 dargestellt sind.

Auf der Größenskala der Querschnittsfläche des konfokalen Volumens hat das Protein Ala1 im Mittel einen steileren Anstieg des MSD über die Zeit als Ala2 und die schnellere Population von Ala3 ( $\tau_{m,1}$ ). Innerhalb der Fehlerbalken zeigen diese drei Kurven jedoch eine vollständige Überlappung miteinander. Hieraus lässt sich schließen, dass die Proteine Ala1, Ala2 und die der schnellere Population von Ala3 ähnliche Diffusion Proteine auf der ER-Membran aufweisen.

Die zweite Population membrangebundener Proteine von Ala3 zeigt eine deutlich niedrigere Steigung des MSD über die Zeit als übrige Kurven. Auch mit Berücksichtigung der Fehlerbalken ist keine Überlappung mit den übrigen  $\text{MSD}(t)$ -Kurven zu erkennen. Demnach weist die Mutante Ala3 auf der ER-Membran eine Population von Proteinen mit deutlich langsamer Diffusion auf als Ala1 und Ala2.

Ala1	Ala2	Ala3*
$\Gamma = 0,72 \pm 0,51 \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,76}$	$D_m = 1,55 \pm 0,86 \mu\text{m}^2/\text{s}$	$D_{m,1} = 1,24 \pm 0,37 \mu\text{m}^2/\text{s}$
		$D_{m,2} = 0,41 \pm 0,10 \mu\text{m}^2/\text{s}$

**Tabelle 16.3.** Die mittleren Diffusionskoeffizienten  $D_m$  membrangebundener Proteine von Ala2 und Ala3 und der mittlere Transportkoeffizient  $\Gamma$  von Ala1 auf der ER-Membran, ermittelt aus den Diffusionszeiten  $\tau_m$  von Ala2 und Ala3\* und  $\tau_\alpha$  nach Gl. (16.3) und (16.4).



**Abbildung 16.7.** Mittlere quadratische Verschiebung  $\text{MSD}(t)$  membrangebundener Proteine von Ala1, Ala2 und Ala3 berechnet nach Gl.(16.1) und (16.2) mit dazugehörigen Fehlerbalken. Im Rahmen der Ungenauigkeit der Messungen sind zwischen den  $\text{MSD}$ -Kurven von Ala1 (berechnet aus  $\tau_\alpha$  und  $\alpha$ ), Ala2 (berechnet aus  $\tau_m$ ) und der schnellen Population von Ala3 (berechnet aus  $\tau_{m,1}$ ) keine Unterschiede zu erkennen. Die Diffusion dieser Proteine auf der ER-Membran ist demnach im Rahmen der Messungenauigkeit ununterscheidbar.  $\text{MSD}$  und damit die Diffusion der langsamen Population von Ala3 ( $\tau_{m,2}$ ) ist deutlich langsamer als bei den übrigen Proteinpopulationen.



## 17. Diskussion

In diesem Projekt wurde die Diffusion von drei verschiedenen Mutanten des Proteins N-Ras im Zytoplasma mit der Methode FCS in lebenden Zellen untersucht.

Es wurde die Mutante Ala1 bestehend ausschließlich aus der HVR-Domäne von N-Ras untersucht. Die beiden weiteren Mutanten, Ala2 und Ala3, verfügten über die volle Proteinsequenz von N-Ras. Dabei ist die Mutante Ala2 die konstitutiv aktive Proteinvariante von N-Ras. Bei allen Mutanten wurde die Linker-Domäne durch Alanin ersetzt.

Es ist bekannt, dass die alleinständige HVR-Domäne von N-Ras (Ala1) nicht palmitoyliert wird und dementsprechend über eine Farnesyl-Gruppe als einzigen Lipidanker verfügt.<sup>[96]</sup> Die Farnesyl-Gruppe gilt grundsätzlich als ein schwacher Lipidanker für Ras-Proteine in voller Länge und reicht für eine stabile Anbindung der Proteine an intrazelluläre Membranen nicht aus.<sup>[66,70]</sup> Speziell das N-Ras Protein zeigt *in vitro* eine schnellere Dissoziation von Lipidmembran und eine niedrigere membrangebundene Fraktion im monofarnesylierten Zustand.<sup>[62]</sup> Entsprechend diesen Beobachtungen wurden in den hier vorgestellten Untersuchungen für die Mutanten mit voller N-Ras-Proteinlänge (Ala2 und Ala3) unter anderem Lokalisationen der Proteine im Zytosol und auf der ER-Membran beobachtet. Dies deutet auf eine instabile Bindung zwischen den N-Ras-Mutanten und der ER-Membran. Für die alleinständige N-Ras-HVR-Domäne (Ala1) wurde dagegen keine Lokalisation im Zytosol, sondern eine stabile Anbindung an die ER-Membran festgestellt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass für die alleinständige HVR-Domäne von N-Ras ohne der relativ großen löslichen G-Domäne in der Proteinsequenz, ein einziger Farnesyl-Lipidanker ausreichend ist, um eine stabile Bindung an Lipid-Membranen zu erreichen.

Bei den Proteinen Ala2 und Ala3 wurden im Zytoplasma ähnliche Anteile löslicher (65 %) und an die ER-Membran gebundener (35 %) Protein beobachtet. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Mutanten Ala2 und Ala3 ist ihr Aktivitätszustand. Während Ala2 die konstitutiv aktive Mutante ist, wurde der Aktivitätszustand von Ala3 nicht modifiziert. Aus den ähnlichen Verteilungen der Proteine im Zytoplasma lässt sich schlussfolgern, dass der Aktivitätszustand von N-Ras keinen Einfluss auf den Assoziations-Dissoziationsprozess der Proteine mit der ER-Membran hat.

Weiterhin wird im Zusammenhang mit der Lokalisation von N-Ras in Zellen angenommen, dass N-Ras nur im palmitoylierten Zustand und auf dem sekretorischen Pfad an die Plasma-Membran gelangen kann.<sup>[70,129]</sup> Wie bereits angeführt wurde, wurde beobachtet, dass die N-Ras-Mutante, die nur aus der HVR-Domäne von N-Ras besteht und einen Linker aus Alanin hat, nicht palmitoyliert wird.<sup>[96]</sup> Dementsprechend ist für die Mutante Ala1 keine Lokalisation an der Plasma-Membran zu erwarten, was die Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen. Für die Proteinkonstrukte mit voller N-Ras-Proteinsequenz und einem Alanin-Linker sind keine Untersuchungen bezüglich ihrer Palmitoylierung bekannt. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die gleiche Mutation der Linker-Domäne in einem Proteinkonstrukt mit voller N-Ras-Länge ebenfalls zum Blockieren der Palmitoylierung führt. In einem solchen Fall ist auch für die beiden Proteine Ala2 und Ala3 keine Lokalisation an der Plasma-Membran zu erwarten. In dieser Arbeit wurde jedoch eine solche Lokalisation beobachtet. Ein

Grund für dieses Ergebnis könnte eine unspezifische Anbindung der Proteine an die Plasma-Membran sein. Da die beiden Proteinkonstrukte über einen löslichen Proteinpool verfügen, ist es möglich, dass diese Proteine durch Diffusion an die Plasma-Membran gelangen und mit dieser unspezifisch in Interaktion treten.

Durch Computer-Simulationen haben Guigas et al. gezeigt, dass die Diffusion monomerer Proteine auf Membranen umso schneller wird, je kleiner der lösliche Teil der Proteine ist.<sup>[65]</sup> Die Ursache für diesen Effekt ist die niedrigere Reibung der Proteine mit kleineren löslichen Proteindomänen im Vergleich zu Proteinen mit größeren löslichen Proteindomänen im Zellinneren. Dementsprechend wäre zu erwarten, dass die Mutante Ala1, die eine kleinere lösliche Proteindomäne aufweist als die beiden übrigen Konstrukte, eine schnellere Diffusion auf der ER-Membran aufweist als Ala2 und Ala3. In dieser Arbeit wurde zwar festgestellt, dass die Mutante Ala1 im Mittel eine schnellere Diffusion auf der ER-Membran aufweist, im Rahmen der Messungengenauigkeit konnten jedoch zwischen der Diffusion membrangebundener Proteine von Ala1, Ala2 und der schnelleren Population von Ala3 keine Unterschiede festgestellt werden.

Darüber hinaus deuten die vorgestellten Untersuchungen darauf hin, dass die Diffusion des Proteins N-Ras auf der ER-Membran von seinem Aktivitätszustand beeinflusst wird. Bei den Untersuchungen zeigte das Proteinkonstrukt mit dem unmodifizierten Aktivitätszustand Ala3 gegenüber der konstitutiv aktiven Mutante Ala2 eine langsamere Diffusion auf der ER-Membran.

Ein ähnlicher Unterschied wurde bereits bei der Untersuchung der Diffusion des Wildtyp N-Ras-Proteins und einer konstitutiv aktiven N-Ras-Mutante auf der Plasma-Membran beobachtet.<sup>[44]</sup> Dabei wurde festgestellt, dass bei einem normalen Cholesteringehalt in Zellen die beiden N-Ras-Konstrukte gleiche Diffusionskoeffizienten an der Plasma-Membran aufweisen ( $D \approx 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für beide Konstrukte). Bei Erniedrigung des Cholesteringehalts um  $\sim 30\%$  weist die konstitutiv aktive Mutante mit  $D = 1,35 \mu\text{m}^2/\text{s}$  einen höheren Diffusionskoeffizienten als N-Ras-Wildtyp ( $D = 0,74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ). Es ist bekannt, dass die ER-Membran im Vergleich zur Plasma-Membran einen um  $\sim 10-20\%$  niedrigeren Cholesteringehalt aufweist.<sup>[159]</sup> Es lässt sich demnach vermuten, dass der Unterschied zwischen den Diffusionskoeffizienten der beiden N-Ras-Mutanten Ala2 und Ala3 an der ER-Membran auf ähnliche Weise zustande kommt wie bei einem Cholesterimangel an der Plasma-Membran. Andere Untersuchungen belegen, dass die Ras-Proteine an der Plasma-Membran im aktiven und im nicht aktiven Zustand an unterschiedlichen Domänen lokalisiert sind.<sup>[129]</sup> Dementsprechend ist es vorstellbar, dass die Mutanten Ala2 und Ala3 aufgrund unterschiedlicher Aktivitätszustände unterschiedliche Domänen der ER-Membran belegen. Weitere mögliche Erklärungen sind Konformationsunterschiede im aktivierten und nicht aktivierten Zustand oder unterschiedliche Bindungspartner der beiden Proteine auf der ER-Membran.

# Literaturverzeichnis

- [1] <http://fiji.sc/fiji>, Dezember 2015.
- [2] <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html>, Dezember 2015.
- [3] <http://www.uniprot.org/uniprot/o15027>, Dezember 2015.
- [4] AIZENBUD, B. M., AND GERSHON, N. D. Diffusion of molecules on biological membranes of nonplanar form. a theoretical study. *Biophysical Journal* 38, 3 (1982), 287–293.
- [5] ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WALTER, P. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, 2., korrigierte auflage ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [6] ALDRIDGE, B. B., BURKE, J. M., LAUFFENBURGER, D. A., AND SORGER, P. K. Physicochemical modelling of cell signalling pathways. *Nature Cell Biology* 8, 11 (2006), 1195–1203.
- [7] ANTONNY, B., GOUNON, P., SCHEKMAN, R., AND ORCI, L. Self-assembly of minimal COPII cages. *EMBO Reports* 4, 4 (2003), 419–424.
- [8] ANTONNY, B., MADDEN, D., HAMAMOTO, S., ORCI, L., AND SCHEKMAN, R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature Cell Biology* 3, 6 (2001), 531–537.
- [9] APOLLONI, A., PRIOR, I. A., LINDSAY, M., PARTON, R. G., AND HANCOCK, J. F. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Molecular and Cellular Biology* 20, 7 (2000), 2475–2487.
- [10] ARIDOR, M., FISH, K. N., BANNYKH, S., WEISSMAN, J., ROBERTS, T. H., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., AND BALCH, W. E. The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly. *Journal of Cell Biology* 152, 1 (2001), 213–229.
- [11] ARIDOR, M., AND TRAUB, L. M. Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic* 3, 8 (2002), 537–546.
- [12] AXELROD, D. Cell surface heating during fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* 18, 1 (1977), 129–131.
- [13] AXELROD, D., KOPPEL, D. E., SCHLESSINGER, J., ELSON, E., AND WEBB, W. W. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical Journal* 16, 9 (1976), 1055–1069.
- [14] BAKER, T. L., ZHENG, H., WALKER, J., COLOFF, J. L., AND BUSS, J. E. Distinct rates of palmitate turnover on membrane-bound cellular and oncogenic H-ras. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21 (2003), 19292–19300.
- [15] BANNYKH, S. I., ROWE, T., AND BALCH, W. E. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *Journal of Cell Biology* 135, 1 (1996), 19–35.

- [16] BARLOWE, C., AND SCHEKMAN, R. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 6444 (1993), 347–349.
- [17] BAUMGART, T., HAMMOND, A. T., SENGUPTA, P., HESS, S. T., HOLOWKA, D. A., BAIRD, B. A., AND WEBB, W. W. Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 9 (2007), 3165–3170.
- [18] BEVIS, B. J., HAMMOND, A. T., REINKE, C. A., AND GLICK, B. S. De novo formation of transitional ER sites and Golgi structures in *Pichia pastoris*. *Nature Cell Biology* 4, 10 (2002), 750–756.
- [19] BHARUCHA, N., LIU, Y., PAPANIKOU, E., MCMAHON, C., ESAKI, M., JEFFREY, P. D., HUGHSON, F. M., AND GLICK, B. S. Sec16 influences transitional ER sites by regulating rather than organizing COPII. *Molecular Biology of the Cell* 24, 21 (2013), 3406–3419.
- [20] BHATTACHARYYA, D., AND GLICK, B. S. Two mammalian Sec16 homologues have nonredundant functions in endoplasmic reticulum (ER) export and transitional ER organization. *Molecular Biology of the Cell* 18, 3 (2007), 839–849.
- [21] BI, X., MANCIAS, J. D., AND GOLDBERG, J. Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23-Sar1 complexed with the active fragment of Sec31. *Developmental Cell* 13, 5 (2007), 635–645.
- [22] BLOOM, J. A., AND WEBB, W. W. Photodamage to intact erythrocyte membranes at high laser intensities: methods of assay and suppression. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32, 6 (1984), 608–616.
- [23] BLUMENTAL-PERRY, A., HANEY, C. J., WEIXEL, K. M., WATKINS, S. C., WEISZ, O. A., AND ARIDOR, M. Phosphatidylinositol 4-phosphate formation at ER exit sites regulates ER export. *Developmental Cell* 11, 5 (2006), 671–682.
- [24] BOUCHAUD, J.-P., AND GEORGES, A. Anomalous diffusion in disordered media: Statistical mechanisms, models and physical applications. *Physics Reports* 195, 4–5 (1990), 127 – 293.
- [25] BROCKMANN, D. Anomalous diffusion and the structure of human transportation networks. *The European Physical Journal Special Topics* 157, 1 (2008), 173–189.
- [26] BUDNIK, A., AND STEPHENS, D. J. ER exit sites–localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Letters* 583, 23 (2009), 3796–3803.
- [27] BULINSKI, J. C., ODDE, D. J., HOWELL, B. J., SALMON, T. D., AND WATERMAN-STORER, C. M. Rapid dynamics of the microtubule binding of ensconsin in vivo. *Journal of Cell Science* 114, Pt 21 (2001), 3885–3897.
- [28] CHALFIE, M., TU, Y., EUSKIRCHEN, G., WARD, W. W., AND PRASHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 5148 (1994), 802–805.
- [29] CHEN, H., RHOADES, E., BUTLER, J. S., LOH, S. N., AND WEBB, W. W. Dynamics of equilibrium structural fluctuations of apomyoglobin measured by

- fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 25 (2007), 10459–10464.
- [30] CHEN, Z., OTTO, J. C., BERGO, M. O., YOUNG, S. G., AND CASEY, P. J. The C-terminal polylysine region and methylation of K-Ras are critical for the interaction between K-Ras and microtubules. *Journal of Biological Chemistry* 275, 52 (2000), 41251–41257.
- [31] CHOY, E., CHIU, V. K., SILLETTI, J., FEOKTISTOV, M., MORIMOTO, T., MICHAELSON, D., IVANOV, I. E., AND PHILIPS, M. R. Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 1 (1999), 69–80.
- [32] COLE, N. B., SCIACKY, N., MAROTTA, A., SONG, J., AND LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Molecular Biology of the Cell* 7, 4 (1996), 631–650.
- [33] COLE, N. B., SMITH, C. L., SCIACKY, N., TERASAKI, M., EDIDIN, M., AND LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* 273, 5276 (1996), 797–801.
- [34] CONNERLY, P. L., ESAKI, M., MONTEGNA, E. A., STRONGIN, D. E., LEVI, S., SODERHOLM, J., AND GLICK, B. S. Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Current Biology* 15, 16 (2005), 1439–1447.
- [35] CORMACK, B. P., VALDIVIA, R. H., AND FALKOW, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 1 Spec No (1996), 33–38.
- [36] DANCOURT, J., AND BARLOWE, C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annual Review of Biochemistry* 79 (2010), 777–802.
- [37] DE VOS, W. H., HOEBE, R. A., JOSS, G. H., HAFFMANS, W., BAATOUT, S., VAN OOSTVELDT, P., AND MANDERS, E. M. M. Controlled light exposure microscopy reveals dynamic telomere microterritories throughout the cell cycle. *Cytometry. Part A* 75, 5 (2009), 428–439.
- [38] DILL, K., AND BROMBERG, S. *Molecular Driving Forces: Statistical Thermodynamics in Chemistry and Biology*. Garland Science, 2011.
- [39] DILL, K. A., GHOSH, K., AND SCHMIT, J. D. Physical limits of cells and proteomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 44 (2011), 17876–17882.
- [40] DIX, J. A., AND VERKMAN, A. S. Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* 37 (2008), 247–263.
- [41] DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* 3, 1 (2003), 11–22.
- [42] DUDOGNON, P., MAEDER-GARAVAGLIA, C., CARPENTIER, J.-L., AND PACCAUD, J.-P. Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis. *FEBS Letters* 561, 1-3 (2004), 44–50.
- [43] EINSTEIN, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen.

- Annalen der Physik* 322, 8 (1905), 549–560.
- [44] EISENBERG, S., BECKETT, A. J., PRIOR, I. A., DEKKER, F. J., HEDBERG, C., WALDMANN, H., EHRLICH, M., AND HENIS, Y. I. Raft protein clustering alters N-Ras membrane interactions and activation pattern. *Molecular and Cellular Biology* 31, 19 (2011), 3938–3952.
- [45] ELLIS, R. J. Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 10 (2001), 597–604.
- [46] ELLIS, R. J., AND MINTON, A. P. Cell biology: Join the crowd. *Nature* 425, 6953 (2003), 27–28.
- [47] ELOWITZ, M. B., SURETTE, M. G., WOLF, P. E., STOCK, J. B., AND LEIBLER, S. Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 181, 1 (1999), 197–203.
- [48] ELSNER, M., HASHIMOTO, H., SIMPSON, J. C., CASSEL, D., NILSSON, T., AND WEISS, M. Spatiotemporal dynamics of the COPI vesicle machinery. *EMBO Reports* 4, 10 (2003), 1000–1004.
- [49] ENDERLEIN, J., AND GREGOR, I. Using fluorescence lifetime for discriminating detector afterpulsing in fluorescence-correlation spectroscopy. *Review of Scientific Instruments* 76, 3 (2005), –.
- [50] ERNST, D., HELLMANN, M., KOHLER, J., AND WEISS, M. Fractional Brownian motion in crowded fluids. *Soft Matter* 8 (2012), 4886–4889.
- [51] ESPENSHADE, P., GIMENO, R. E., HOLZMACHER, E., TEUNG, P., AND KAISER, C. A. Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *Journal of Cell Biology* 131, 2 (1995), 311–324.
- [52] FARHAN, H., AND RABOUILLE, C. Signalling to and from the secretory pathway. *Journal of Cell Science* 124, Pt 2 (2011), 171–180.
- [53] FARHAN, H., WEISS, M., TANI, K., KAUFMAN, R. J., AND HAURI, H.-P. Adaptation of endoplasmic reticulum exit sites to acute and chronic increases in cargo load. *EMBO Journal* 27, 15 (2008), 2043–2054.
- [54] FARHAN, H., WENDELER, M. W., MITROVIC, S., FAVA, E., SILBERBERG, Y., SHARAN, R., ZERIAL, M., AND HAURI, H.-P. MAPK signaling to the early secretory pathway revealed by kinase/phosphatase functional screening. *Journal of Cell Biology* 189, 6 (2010), 997–1011.
- [55] FARRUKH, M. R., NISSAR, U.-A., KAISER, P. J., AFNAN, Q., SHARMA, P. R., BHUSHAN, S., AND TASDUQ, S. A. Glycyrrhizic acid (GA) inhibits reactive oxygen species mediated photodamage by blocking ER stress and MAPK pathway in UV-B irradiated human skin fibroblasts. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 148 (2015), 351–357.
- [56] FICK, A. Über diffusion. *Annalen der Physik* 170, 1 (1855), 59–86.
- [57] FORSTER, R., WEISS, M., ZIMMERMANN, T., REYNAUD, E. G., VERISSIMO, F., STEPHENS, D. J., AND PEPPERKOK, R. Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Current Biology* 16, 2 (2006), 173–179.

- [58] FROMME, J. C., RAVAZZOLA, M., HAMAMOTO, S., AL-BALWI, M., EYALID, W., BOYADJIEV, S. A., COSSON, P., SCHEKMAN, R., AND ORCI, L. The genetic basis of a craniofacial disease provides insight into COPII coat assembly. *Developmental Cell* 13, 5 (2007), 623–634.
- [59] FULTON, A. B. How crowded is the cytoplasm? *Cell* 30, 2 (1982), 345–347.
- [60] GEDDE, U. W. *Polymer Physics*, 1999 ed. Springer, May 2008. 00541.
- [61] GLICK, B. S. Integrated self-organization of transitional ER and early Golgi compartments. *Bioessays* 36, 2 (2014), 129–133.
- [62] GOHLKE, A., TRIOLA, G., WALDMANN, H., AND WINTER, R. Influence of the lipid anchor motif of N-ras on the interaction with lipid membranes: a surface plasmon resonance study. *Biophysical Journal* 98, 10 (2010), 2226–2235.
- [63] GOODWIN, J. S., DRAKE, K. R., ROGERS, C., WRIGHT, L., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., PHILIPS, M. R., AND KENWORTHY, A. K. Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *Journal of Cell Biology* 170, 2 (2005), 261–272.
- [64] GUIGAS, G., KALLA, C., AND WEISS, M. The degree of macromolecular crowding in the cytoplasm and nucleoplasm of mammalian cells is conserved. *FEBS Letters* 581, 26 (2007), 5094–5098.
- [65] GUIGAS, G., AND WEISS, M. Membrane protein mobility depends on the length of extra-membrane domains and on the protein concentration. *Soft Matter* 11, 1 (2015), 33–37.
- [66] GUTIERREZ, L., MAGEE, A. I., MARSHALL, C. J., AND HANCOCK, J. F. Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *EMBO Journal* 8, 4 (1989), 1093–1098.
- [67] HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine* 91, 3C (1991), 14S–22S.
- [68] HAMMOND, A. T., AND GLICK, B. S. Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells. *Molecular Biology of the Cell* 11, 9 (2000), 3013–3030.
- [69] HANCOCK, J. F., CADWALLADER, K., PATERSON, H., AND MARSHALL, C. J. A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO Journal* 10, 13 (1991), 4033–4039.
- [70] HANCOCK, J. F., MAGEE, A. I., CHILDS, J. E., AND MARSHALL, C. J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 7 (1989), 1167–1177.
- [71] HANCOCK, J. F., AND PARTON, R. G. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochemical Journal* 389, Pt 1 (2005), 1–11.
- [72] HANCOCK, J. F., PATERSON, H., AND MARSHALL, C. J. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 1 (1990), 133–139.

- [73] HAUPTS, U., MAITI, S., SCHWILLE, P., AND WEBB, W. W. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 23 (1998), 13573–13578.
- [74] HEIM, R., CUBITT, A. B., AND TSIEN, R. Y. Improved green fluorescence. *Nature* 373, 6516 (1995), 663–664.
- [75] HEIM, R., AND TSIEN, R. Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* 6, 2 (1996), 178–182.
- [76] HEINZER, S., WÖRZ, S., KALLA, C., ROHR, K., AND WEISS, M. A model for the self-organization of exit sites in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 121, Pt 1 (2008), 55–64.
- [77] HENIS, Y. I., HANCOCK, J. F., AND PRIOR, I. A. Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (review). *Molecular Membrane Biology* 26, 1 (2009), 80–92.
- [78] HOFFMANN, J., FICKENTSCHER, R., AND WEISS, M. Influence of organelle geometry on the apparent binding kinetics of peripheral membrane proteins. *Physical Review E* 91, 2 (2015), 022721.
- [79] HU, J., PRINZ, W. A., AND RAPOPORT, T. A. Weaving the web of ER tubules. *Cell* 147, 6 (2011), 1226–1231.
- [80] HUGHES, H., BUDNIK, A., SCHMIDT, K., PALMER, K. J., MANTELL, J., NOAKES, C., JOHNSON, A., CARTER, D. A., VERKADE, P., WATSON, P., AND STEPHENS, D. J. Organisation of human ER-exit sites: requirements for the localisation of Sec16 to transitional er. *Journal of Cell Science* 122, Pt 16 (2009), 2924–2934.
- [81] HUMPHRIES, N. E., QUEIROZ, N., DYER, J. R. M., PADE, N. G., MUSYL, M. K., SCHAEFER, K. M., FULLER, D. W., BRUNNSCHWEILER, J. M., DOYLE, T. K., HOUGHTON, J. D. R., HAYS, G. C., JONES, C. S., NOBLE, L. R., WEARMOUTH, V. J., SOUTHALL, E. J., AND SIMS, D. W. Environmental context explains lévy and brownian movement patterns of marine predators. *Nature* 465, 7301 (2010), 1066–1069.
- [82] INUMA, T., SHIGA, A., NAKAMOTO, K., O'BRIEN, M. B., ARIDOR, M., ARIMITSU, N., TAGAYA, M., AND TANI, K. Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* 282, 24 (2007), 17632–17639.
- [83] IVAN, V., DE VOER, G., XANTHAKIS, D., SPOORENDONK, K. M., KONDYLLIS, V., AND RABOUILLE, C. Drosophila sec16 mediates the biogenesis of tER sites upstream of Sar1 through an arginine-rich motif. *Molecular Biology of the Cell* 19, 10 (2008), 4352–4365.
- [84] JAENICKE, L., ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., AND WALTER, P. *Molekularbiologie der Zelle*, 4. auflage ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2003. 00013.

- [85] KAISER, C. A., AND SCHEKMAN, R. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 4 (1990), 723–733.
- [86] KANO, F., TANAKA, A. R., YAMAUCHI, S., KONDO, H., AND MURATA, M. Cdc2 kinase-dependent disassembly of endoplasmic reticulum (ER) exit sites inhibits ER-to-Golgi vesicular transport during mitosis. *Molecular Biology of the Cell* 15, 9 (2004), 4289–4298.
- [87] KAPITULNIK, J., WEIL, E., RABINOWITZ, R., AND KRAUSZ, M. M. Fetal and adult human liver differ markedly in the fluidity and lipid composition of their microsomal membranes. *Hepatology* 7, 1 (1987), 55–60.
- [88] KATZ, M. E., AND MCCORMICK, F. Signal transduction from multiple Ras effectors. *Current Opinion in Genetics and Development* 7, 1 (1997), 75–79.
- [89] KAUFMAN, E. N., AND JAIN, R. K. Measurement of mass transport and reaction parameters in bulk solution using photobleaching. reaction limited binding regime. *Biophysical Journal* 60, 3 (1991), 596–610.
- [90] KLINKENBERG, D., LONG, K. R., SHOME, K., WATKINS, S. C., AND ARIDOR, M. A cascade of ER exit site assembly that is regulated by p125A and lipid signals. *Journal of Cell Science* 127, Pt 8 (2014), 1765–1778.
- [91] KOPPEL, D. E., AXELROD, D., SCHLESSINGER, J., ELSON, E. L., AND WEBB, W. W. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophysical Journal* 16, 11 (1976), 1315–1329.
- [92] KOREISHI, M., YU, S., ODA, M., HONJO, Y., AND SATOH, A. CK2 phosphorylates Sec31 and regulates ER-to-Golgi trafficking. *PLoS One* 8, 1 (2013), e54382.
- [93] KREMERS, G.-J., GILBERT, S. G., CRANFILL, P. J., DAVIDSON, M. W., AND PISTON, D. W. Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science* 124, Pt 2 (2011), 157–160.
- [94] KUNG, L. F., PAGANT, S., FUTAI, E., D’ARCANGELO, J. G., BUCHANAN, R., DITTMAR, J. C., REID, R. J. D., ROTHSTEIN, R., HAMAMOTO, S., SNAPP, E. L., SCHEKMAN, R., AND MILLER, E. A. Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO Journal* 31, 4 (2012), 1014–1027.
- [95] LANOIX, J., OUWENDIJK, J., LIN, C. C., STARK, A., LOVE, H. D., OSTERMANN, J., AND NILSSON, T. GTP hydrolysis by Arf-1 mediates sorting and concentration of Golgi resident enzymes into functional COPI vesicles. *EMBO Journal* 18, 18 (1999), 4935–4948.
- [96] LAUDE, A. J., AND PRIOR, I. A. Palmitoylation and localisation of RAS isoforms are modulated by the hypervariable linker domain. *Journal of Cell Science* 121, Pt 4 (2008), 421–427.
- [97] LEE, M. C. S., MILLER, E. A., GOLDBERG, J., ORCI, L., AND SCHEKMAN, R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20 (2004), 87–123.

- [98] LEPOCK, J. R., CHENG, K. H., CAMPBELL, S. D., AND KRUV, J. Rotational diffusion of TEMPONE in the cytoplasm of chinese hamster lung cells. *Biophysical Journal* 44, 3 (1983), 405–412.
- [99] LIANG, L.-F., DA, X., CHEN, T.-S., AND PEI, Y.-H. [nucleoplasmic viscosity of living cells investigated by fluorescence correlation spectroscopy]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi* 29, 2 (2009), 459–462.
- [100] LIEBMAN, P. A., AND ENTINE, G. Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes. *Science* 185, 4149 (1974), 457–459.
- [101] LÓPEZ-DUARTE, I., VU, T. T., IZQUIERDO, M. A., BULL, J. A., AND KUI-MOVA, M. K. A molecular rotor for measuring viscosity in plasma membranes of live cells. *Chemical Communications* 50, 40 (2014), 5282–5284.
- [102] LUBY-PHELPS, K. Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *International Review of Cytology* 192 (2000), 189–221.
- [103] MAGIDSON, V., AND KHODJAKOV, A. Circumventing photodamage in live-cell microscopy. *Methods in Cell Biology* 114 (2013), 545–560.
- [104] MALCHUS, N., AND WEISS, M. Anomalous diffusion reports on the interaction of misfolded proteins with the quality control machinery in the endoplasmic reticulum. *Biophysical Journal* 99, 4 (2010), 1321–1328.
- [105] MASTRO, A. M., BABICH, M. A., TAYLOR, W. D., AND KEITH, A. D. Diffusion of a small molecule in the cytoplasm of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 11 (1984), 3414–3418.
- [106] MATSUOKA, K., ORCI, L., AMHERDT, M., BEDNAREK, S. Y., HAMAMOTO, S., SCHEKMAN, R., AND YEUNG, T. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 2 (1998), 263–275.
- [107] METZLER, R., AND KLAFTER, J. The random walk’s guide to anomalous diffusion: a fractional dynamics approach. *Physics Reports* 339, 1 (2000), 1 – 77.
- [108] MILLER, E., ANTONNY, B., HAMAMOTO, S., AND SCHEKMAN, R. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO Journal* 21, 22 (2002), 6105–6113.
- [109] MILLER, E. A., BEILHARZ, T. H., MALKUS, P. N., LEE, M. C. S., HAMAMOTO, S., ORCI, L., AND SCHEKMAN, R. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114, 4 (2003), 497–509.
- [110] MOERNER, W. E., AND ORRIT, M. Illuminating single molecules in condensed matter. *Science* 283, 5408 (1999), 1670–1676.
- [111] MONTEGNA, E. A., BHAVE, M., LIU, Y., BHATTACHARYYA, D., AND GLICK, B. S. Sec12 binds to Sec16 at transitional ER sites. *PLoS One* 7, 2 (2012), e31156.

- [112] NAKANO, A. Spinning-disk confocal microscopy – a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell Structure and Function* 27, 5 (2002), 349–355.
- [113] NOMURA, M., HE, Z., KOYAMA, I., MA, W.-Y., MIYAMOTO, K.-I., AND DONG, Z. Involvement of the Akt/mTOR pathway on EGF-induced cell transformation. *Molecular Carcinogenesis* 38, 1 (2003), 25–32.
- [114] OLSON, M. F., AND MARAIS, R. Ras protein signalling. *Seminars in Immunology* 12, 1 (2000), 63–73.
- [115] PATTERSON, G. H., HIRSCHBERG, K., POLISHCHUK, R. S., GERLICH, D., PHAIR, R. D., AND LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* 133, 6 (2008), 1055–1067.
- [116] PAWLEY, J. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Springer, New York, NY, 2006.
- [117] PETROV, E. P., OHRT, T., WINKLER, R. G., AND SCHWILLE, P. Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. *Physical Review Letters* 97, 25 (2006), 258101.
- [118] PRASHER, D. C., ECKENRODE, V. K., WARD, W. W., PRENDERGAST, F. G., AND CORMIER, M. J. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111, 2 (1992), 229–233.
- [119] PRESLEY, J. F., WARD, T. H., PFEIFER, A. C., SIGGIA, E. D., PHAIR, R. D., AND LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport. *Nature* 417, 6885 (2002), 187–193.
- [120] PRIOR, I. A., AND HANCOCK, J. F. Compartmentalization of Ras proteins. *Journal of Cell Science* 114, Pt 9 (2001), 1603–1608.
- [121] PRIOR, I. A., AND HANCOCK, J. F. Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 23, 2 (2012), 145–153.
- [122] PRIOR, I. A., HARDING, A., YAN, J., SLUIMER, J., PARTON, R. G., AND HANCOCK, J. F. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nature Cell Biology* 3, 4 (2001), 368–375.
- [123] PRIOR, I. A., MUNCKE, C., PARTON, R. G., AND HANCOCK, J. F. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains. *Journal of Cell Biology* 160, 2 (2003), 165–170.
- [124] RESZKA, A. A., SEGER, R., DILTZ, C. D., KREBS, E. G., AND FISCHER, E. H. Association of mitogen-activated protein kinase with the microtubule cytoskeleton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 19 (1995), 8881–8885.
- [125] RIGLER, R., METS, Ü., WIDENGREN, J., AND KASK, P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal* 22, 3 (1993), 169–175.
- [126] ROCKS, O., GERAUER, M., VARTAK, N., KOCH, S., HUANG, Z.-P., PECHLIVANIS, M., KUHLMANN, J., BRUNSVELD, L., CHANDRA, A., ELLINGER, B.,

- WALDMANN, H., AND BASTIAENS, P. I. H. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* *141*, 3 (2010), 458–471.
- [127] ROCKS, O., PEYKER, A., KAHMS, M., VERVEER, P. J., KOERNER, C., LUMBIERRES, M., KUHLMANN, J., WALDMANN, H., WITTINGHOFER, A., AND BASTIAENS, P. I. H. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* *307*, 5716 (2005), 1746–1752.
- [128] ROY, M. O., LEVENTIS, R., AND SILVIUS, J. R. Mutational and biochemical analysis of plasma membrane targeting mediated by the farnesylated, polybasic carboxy terminus of K-ras4B. *Biochemistry* *39*, 28 (2000), 8298–8307.
- [129] ROY, S., PLOWMAN, S., ROTBLAT, B., PRIOR, I. A., MUNCKE, C., GRAINGER, S., PARTON, R. G., HENIS, Y. I., KLOOG, Y., AND HANCOCK, J. F. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 15 (2005), 6722–6733.
- [130] RUNZ, H., MIURA, K., WEISS, M., AND PEPPERKOK, R. Sterols regulate ER-export dynamics of secretory cargo protein ts-O45-G. *EMBO Journal* *25*, 13 (2006), 2953–2965.
- [131] SAETZLER, R. K., JALLO, J., LEHR, H. A., PHILIPS, C. M., VASTHARE, U., ARFORS, K. E., AND TUMA, R. F. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* *45*, 4 (1997), 505–513.
- [132] SALAMA, N. R., CHUANG, J. S., AND SCHEKMAN, R. W. Sec31 encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* *8*, 2 (1997), 205–217.
- [133] SALAUN, C., GREAVES, J., AND CHAMBERLAIN, L. H. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *Journal of Cell Biology* *191*, 7 (2010), 1229–1238.
- [134] SAXTON, M. J. Anomalous diffusion due to obstacles: a monte carlo study. *Biophysical Journal* *66*, 2 Pt 1 (1994), 394–401.
- [135] SCHWILLE, P., HAUPTS, U., MAITI, S., AND WEBB, W. W. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophysical Journal* *77*, 4 (1999), 2251–2265.
- [136] SEGER, R., AND KREBS, E. G. The MAPK signaling cascade. *The FASEB Journal* *9*, 9 (1995), 726–735.
- [137] SEIBEL, N. M., ELJOUNI, J., NALASKOWSKI, M. M., AND HAMPE, W. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Analytical Biochemistry* *368*, 1 (2007), 95–99.
- [138] SEKSEK, O., BIWERSI, J., AND VERKMAN, A. S. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *Journal of Cell Biology* *138*, 1 (1997), 131–142.
- [139] SHAHINIAN, S., AND SILVIUS, J. R. Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes. *Biochemistry*

- (*Mosc.*) 34, 11 (1995), 3813–3822.
- [140] SHARPE, L. J., LUU, W., AND BROWN, A. J. Akt phosphorylates Sec24: new clues into the regulation of ER-to-Golgi trafficking. *Traffic* 12, 1 (2011), 19–27.
- [141] SHAYWITZ, D. A., ESPENSHADE, P. J., GIMENO, R. E., AND KAISER, C. A. COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *Journal of Biological Chemistry* 272, 41 (1997), 25413–25416.
- [142] SHINDIAPINA, P., AND BARLOWE, C. Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 21, 9 (2010), 1530–1545.
- [143] SIMON, H. U., HAJ-YEHIA, A., AND LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 5 (2000), 415–418.
- [144] SINNECKER, D., VOIGT, P., HELLWIG, N., AND SCHAEFER, M. Reversible photobleaching of enhanced green fluorescent proteins. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 18 (2005), 7085–7094.
- [145] SOUMPASIS, D. M. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal* 41, 1 (1983), 95–97.
- [146] SPRAGUE, B. L., PEGO, R. L., STAVREVA, D. A., AND MCNALLY, J. G. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical Journal* 86, 6 (2004), 3473–3495.
- [147] STAGG, S. M., GÜRKAN, C., FOWLER, D. M., LAPOINTE, P., FOSS, T. R., POTTER, C. S., CARRAGHER, B., AND BALCH, W. E. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 7073 (2006), 234–238.
- [148] STEPHENS, D. J. De novo formation, fusion and fission of mammalian COPII-coated endoplasmic reticulum exit sites. *EMBO Reports* 4, 2 (2003), 210–217.
- [149] STIEHL, O., WEIDNER-HERTRAMPF, K., AND WEISS, M. Macromolecular crowding impacts on the diffusion and conformation of DNA hairpins. *Physical Review E* 91, 1 (2015), 012703.
- [150] STORRIE, B., WHITE, J., RÖTTGER, S., STELZER, E. H., SUGANUMA, T., AND NILSSON, T. Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *Journal of Cell Biology* 143, 6 (1998), 1505–1521.
- [151] SUPEK, F., MADDEN, D. T., HAMAMOTO, S., ORCI, L., AND SCHEKMAN, R. Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles. *Journal of Cell Biology* 158, 6 (2002), 1029–1038.
- [152] SWAMINATHAN, R., HOANG, C. P., AND VERKMAN, A. S. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophysical Journal* 72, 4 (1997), 1900–1907.
- [153] SZYMANSKI, J., AND WEISS, M. Elucidating the origin of anomalous diffusion in crowded fluids. *Physical Review Letters* 103, 3 (2009), 038102.

- [154] THISSEN, J. A., GROSS, J. M., SUBRAMANIAN, K., MEYER, T., AND CASEY, P. J. Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. evidence for a role in subcellular trafficking. *Journal of Biological Chemistry* 272, 48 (1997), 30362–30370.
- [155] TILLMANN, K. D., REITERER, V., BASCHIERI, F., HOFFMANN, J., MILLARTE, V., HAUSER, M. A., MAZZA, A., ATIAS, N., LEGLER, D. F., SHARAN, R., WEISS, M., AND FARHAN, H. Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion. *Journal of Cell Science* 128, 4 (2015), 670–682.
- [156] VENDITTI, R., WILSON, C., AND DE MATTEIS, M. A. Exiting the ER: what we know and what we don't. *Trends in Cell Biology* 24, 1 (2014), 9–18.
- [157] VOICE, J. K., KLEMKE, R. L., LE, A., AND JACKSON, J. H. Four human ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24 (1999), 17164–17170.
- [158] WATSON, P., TOWNLEY, A. K., KOKA, P., PALMER, K. J., AND STEPHENS, D. J. Sec16 defines endoplasmic reticulum exit sites and is required for secretory cargo export in mammalian cells. *Traffic* 7, 12 (2006), 1678–1687.
- [159] WATTENBERG, B. W., AND SILBERT, D. F. Sterol partitioning among intracellular membranes. testing a model for cellular sterol distribution. *Journal of Biological Chemistry* 258, 4 (1983), 2284–2289.
- [160] WEAST, R. C. *CRC Handbook of Chemistry and Physics 61st edition*. Chemical Rubber Co., 1981.
- [161] WEISS, M. Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic* 5, 9 (2004), 662–671.
- [162] WEISS, M. Single-particle tracking data reveal anticorrelated fractional brownian motion in crowded fluids. *Physical Review E* 88 (2013), 010101.
- [163] WEISS, M., ELSNER, M., KARTBERG, F., AND NILSSON, T. Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells. *Biophysical Journal* 87, 5 (2004), 3518–3524.
- [164] WEISS, M., AND NILSSON, T. A kinetic proof-reading mechanism for protein sorting. *Traffic* 4, 2 (2003), 65–73.
- [165] WENDELER, M. W., PACCAUD, J.-P., AND HAURI, H.-P. Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports* 8, 3 (2007), 258–264.
- [166] WHITTLE, J. R. R., AND SCHWARTZ, T. U. Structure of the Sec13-Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *Journal of Cell Biology* 190, 3 (2010), 347–361.
- [167] WIDENGREN, J., RIGLER, R., AND METS, U. Triplet-state monitoring by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Fluorescence* 4, 3 (1994), 255–258.
- [168] WILLUMSEN, B. M., CHRISTENSEN, A., HUBBERT, N. L., PAPAGEORGE, A. G., AND LOWY, D. R. The p21 ras C-terminus is required for transformation and

- membrane association. *Nature* 310, 5978 (1984), 583–586.
- [169] WOLFMAN, J. C., AND WOLFMAN, A. Endogenous c-N-Ras provides a steady-state anti-apoptotic signal. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25 (2000), 19315–19323.
- [170] WONG, I. Y., GARDEL, M. L., REICHMAN, D. R., WEEKS, E. R., VALENTINE, M. T., BAUSCH, A. R., AND WEITZ, D. A. Anomalous diffusion probes microstructure dynamics of entangled F-actin networks. *Physical Review Letters* 92, 17 (2004), 178101.
- [171] YAN, J., ROY, S., APOLLONI, A., LANE, A., AND HANCOCK, J. F. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 37 (1998), 24052–24056.
- [172] YORIMITSU, T., AND SATO, K. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Molecular Biology of the Cell* 23, 15 (2012), 2930–2942.
- [173] YOSHIHISA, T., BARLOWE, C., AND SCHEKMAN, R. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259, 5100 (1993), 1466–1468.
- [174] ZDOLSEK, J. M. Acridine orange-mediated photodamage to cultured cells. *APMIS* 101, 2 (1993), 127–132.
- [175] ZDOLSEK, J. M., OLSSON, G. M., AND BRUNK, U. T. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochemistry and Photobiology* 51, 1 (1990), 67–76.
- [176] ZHENG, Y., PENG, M., WANG, Z., ASARA, J. M., AND TYNER, A. L. Protein tyrosine kinase 6 directly phosphorylates AKT and promotes AKT activation in response to epidermal growth factor. *Molecular and Cellular Biology* 30, 17 (2010), 4280–4292.
- [177] ZIMMERMAN, S. B., AND MINTON, A. P. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 22 (1993), 27–65.
- [178] ZIMMERMAN, S. B., AND TRACH, S. O. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 222, 3 (1991), 599–620.



## Publikationen

1. J. Hoffmann, R. Fickentscher, M. Weiss  
**Influence of organelle geometry on the apparent binding kinetics of peripheral membrane proteins**  
*Physical Reviews E*, 91, (2015), 022721
2. K.D. Tillmann, V. Reiterer, F. Baschieri, J. Hoffmann, V. Millarte, M.A. Hauser, A. Mazza, N. Atias, D.F. Legler, R. Sharan, M. Weiss, H. Farhan  
**Regulation of Sec16 levels and dynamics links proliferation and secretion**  
*Journal Cell Science*, 128, (2015), 670-682



# Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Weiss bedanken für die Möglichkeit in einem interdisziplinären Umfeld promovieren zu können und seine freundliche und kompetente Betreuung meiner Arbeit. Die Zeit in seiner Arbeitsgruppe hat mein Verständnis für Forschung und Naturwissenschaft sehr geprägt und bereichert.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Benedikt Westermann und Prof. Dr. Andreas Fery für ihr freundliches Interesse an meiner Arbeit als Mitglieder des Mentorats im Rahmen meiner Promotion an der BayNAT.

Mein großer Dank gilt Dr. Gernot Guigas für seine hilfreichen Antworten zu meinen zahlreichen Fragen und sein unermüdliches Interesse an Diskussionen über Wissenschaft, Biophysik und weitere Nebensächlichkeiten.

Mein Dank gilt weiterhin Kathrin Weidner-Hertrampf für ihre kompetente und freundliche Unterstützung meiner Arbeit bei allen Belangen im Labor und der Zellkultur.

Mein Dank gilt meinem Bürokollegen Rolf Fickentscher, der Programmieren beherrscht wie kein anderer und immer bereit war mir bei Schwierigkeiten zu helfen.

Ich bedanke mich auch bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Yoav Henis (Universität Tel Aviv) und Dr. Hesso Farhan (BITg, Universität Konstanz) für die Bereitstellung der Plasmide der Proteine, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei allen weiteren Kollegen der AG Weiss und der AG Kress des Lehrstuhls für Experimentalphysik I der Universität Bayreuth, die für eine freundliche Arbeitsatmosphäre während meiner Promotion sorgten.

Ich bedanke mich auch bei meinen Eltern, meiner Schwester und ihrer Familie und bei meinen Freunden (Oxana, Karl, Galina, Jieying, Konrad u.a.) für ihre moralische Unterstützung und gelegentliche Ablenkung während der Promotionszeit.



# **(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen**

## **§ 8 S. 2 Nr. 8 PromO**

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

## **§ 8 S. 2 Nr. 9 PromO**

Ich habe die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades anderweitig eingereicht und habe auch nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden.

## **§ 8 S. 2 Nr. 10 PromO**

Hiermit erkläre ich, dass ich keine Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. -vermittlern in Anspruch genommen habe und auch künftig nicht nehmen werde.

Bayreuth, den 14. 12. 2015

---

Julia Hoffmann