

**H⁺-ATPsynthasen: Immobilisierung an
Grenzflächen und Einbau in Lipidmembranen
und deren Untersuchung mittels
Einzelmolekül-Fluoreszenz-Spektroskopie**



Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

vorgelegt von

Peter Oswald

aus Bad Neuenahr-Ahrweiler

2011

Dekan: Prof. Dr. H. Hillebrecht

Vorsitzender des Promotionsausschusses: Prof. Dr. R. Schubert

Referent: Prof. Dr.-Ing. P. Gräber

Koreferent: Prof. Dr. T. Koslowski

Tag der Bekanntgabe des Prüfungsergebnisses: 4.8.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Escherichia coli (<i>E. coli</i>)	11
1.2	Die H ⁺ -ATPsynthase aus <i>E. coli</i>	12
1.2.1	Struktur von EF_0F_1	12
1.2.2	Funktionsweise	12
1.3	Konfokale Fluoreszenz Mikroskopie	16
1.4	Totale Interne Reflektions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie	19
1.5	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)	21
1.5.1	Theorie	23
1.5.2	Anwendung	23
1.6	Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)	24
1.7	Quantenpunkte (QD)	24
1.7.1	Größenabhängige Fluoreszenz der QDs	25
1.7.2	Aufbau von QDs	27
1.7.3	Vor- und Nachteile der QDs	27
1.8	Elektrische Messungen an einer Lipiddoppelschichtmembran	28
1.8.1	Einbauen von Enzymen in die Membran	28
1.9	Ziel der Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Chemikalien	31
2.2	Bakterienkultivierung	33
2.2.1	Anzucht	34
2.3	Isolation von F_0F_1	36
2.4	Isolation von F_1	39
2.5	Isolierung von F_1 -His-Tag	42
2.5.1	Mechanischer Aufschluß	42
2.5.2	Membranisolierung	42
2.5.3	Ablösen und Isolation von F_1 -His-Tag	42
2.6	SDS-Gelelektrophorese	45
2.6.1	Gießen der Gele	45
2.6.2	Probenvorbereitung	47
2.6.3	Elektrophorese	47

2.6.4	Dokumentation des Gels	47
2.7	Fluoreszenzmarkierung	48
2.7.1	Aufkonzentrieren	48
2.7.2	Markierung von F_1 mit ATTO 647N	50
2.7.3	Markierung von F_0F_1 mit ATTO 532	50
2.7.4	Markierung von F_0F_1 mit QO_{580}	50
2.8	UV/Vis-Spektroskopie	51
2.9	Bestimmung der Quantenausbeute von Fluorophoren	54
2.10	Liposomenherstellung	56
2.10.1	Dialyseliposomen	57
2.10.2	Ergosterol-Nystatin-Liposomen	57
2.10.3	Biotin-Liposomen	59
2.10.4	TMR-Liposomen	59
2.10.5	TMR-Biotin-Liposomen	59
2.10.6	Dialyse	60
2.11	Rekonstitution von F_0F_1	60
2.12	Aktivitätsmessung der H^+ -ATPsynthase	61
2.12.1	ATP Synthese	61
2.12.2	ATP Hydrolyse	66
2.13	Ablösen und Rückbinden des F_1 -Teils von F_0F_1 -Liposomen	67
2.13.1	Ablösen des F_1 -Teils	68
2.13.2	Rückbindung von F_1 -Teilen	69
2.14	Modifizierung des BSA	69
2.14.1	Durchführung	70
2.15	Immobilisierung der Liposomen	70
2.15.1	Behandlung der Gläser	70
2.15.2	Biotin-BSA/Streptavidin	71
2.15.3	Silan-Biotin-PEG/Streptavidin	71
2.16	Erzeugen der Lipiddoppelschicht	76
2.16.1	Vorbereitung der Lipidlösung	77
2.16.2	Aufbau der Messzelle	77
2.16.3	Messung an der Bilayer	79
2.17	TIRF-Mikroskopie	81
2.17.1	Aufbau	81

2.17.2	Justage	84
2.17.3	Durchführung der Messung	84
2.18	Messung an der Lipiddoppelschicht mit der CCD-Kamera	84
2.19	Konfokale Mikroskopie	85
2.19.1	Aufbau	85
2.19.2	Justage	90
2.19.3	Durchführung der Messung an der Oberfläche	90
2.19.4	Durchführung einer FCS-Messung	90
3	Biochemische und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen	93
3.1	Quantenausbeute des QD ₅₈₅	93
3.2	Isolation von F ₁ - <i>HisTag</i>	94
4	Untersuchungen an der Glasoberfläche	96
4.1	Immobilisierung der Liposomen	96
4.1.1	Biotin/Streptavidin-Methode	96
4.1.2	Ni ²⁺ / <i>HisTag</i> -Immobilisierung	100
4.2	Bestimmung der Größe des konfokalen Volumens	100
4.3	Erreichen des Einzelmolekülniveaus	102
4.4	Verwendung von QDs als Donorfluorophor	106
4.4.1	Anbindung des QDs an bereits rekonstituiertes Enzym	108
4.4.2	Diskussion	109
4.5	FRET-Messungen	109
4.5.1	Korrektur der FRET-Daten	112
4.5.2	Bestimmung der FRET-Effizienzen	114
4.5.3	Bestimmung der intramolekularen Abstände	115
4.5.4	FRET-Messungen an der Grenzfläche	116
4.5.5	Die Größe von QD ₅₈₅	121
4.5.6	Diskussion und Ausblick	124
5	Untersuchungen an der Lipidbilayer	128
5.1	Charakterisierung der Lipidbilayer	128
5.1.1	Stabilität	128
5.1.2	Festigkeit gegenüber Stößen	129
5.1.3	Elektrischer Widerstand	131

5.2	Untersuchung der Fusion von Liposomen mit der Lipidbilayer mit optischen Methoden	132
5.2.1	Liposomen mit markierter und rekonstituierter H ⁺ -ATPsynthase . .	132
5.2.2	TMR-Liposomen mit markierter und rekonstituierter H ⁺ -ATPsynthase	133
5.2.3	Einfluss von Ca ²⁺ auf die Fusion	140
5.3	Untersuchung der Fusion der Liposomen mit der Lipidbilayer mit elektrischen Methoden	141
5.3.1	Beobachtung der Fusion eines Liposoms mit der Lipidbilayer, optisch und elektrisch	141
5.3.2	Diskussion und Ausblick	152
6	Zusammenfassung	155
	Literaturverzeichnis	157
	Tabellenverzeichnis	168
	Abbildungsverzeichnis	170
	Danksagung	173
	Anhang	175

Abkürzungen

A_{xxx}	Absorbanz bei xxx nm
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
APD	Avalanche Photodiode
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BMPS	N-[β -Maleimidohexyloxy]-succinimidester
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau, Natriumsalz
BSA	Rinder Serumalbumin (<i>Bovine Serumalbumin</i>)
CCD	<i>Charge-coupled-device</i>
cps	Ereignisse pro Sekunde (<i>counts per second</i>)
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Da	Dalton
DDM	Dodecylmaltosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreit
ε_{xxx}	Absorptionskoeffizient bei xxx nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure, Dinatriumsalz
EF ₁	peripherer, hydrophiler Teil der H ⁺ -ATPsynthase aus <i>E. coli</i>
EF ₀ F ₁	H ⁺ -ATPsynthase aus <i>E. coli</i>
EP	Elutionspuffer
F ₁	peripherer, hydrophiler Teil der H ⁺ -ATPsynthase
F ₁ -His-Tag	F ₁ -Teil der H ⁺ -ATPsynthase mit einem <i>His</i> ₁₀ -Tag am N-Terminus der β -Untereinheit
F ₀	membranintegrierter, hydrophober Teil der H ⁺ -ATPsynthase
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \frac{m}{s^2}$)
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
<i>His</i> _{xx} -Tag	xx Histidine an einem Peptid

kb	Kilobasenpaare
L I	saurer Inkubationspuffer
L II	basischer Sprungpuffer
MES	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MOPS	(N-Morpholino)ethansulfonsäure
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NTA	Nitrilotriessigsäure
PABA	<i>para</i> -Amino-Benzoesäure
PEG	Polyethylenglycol
P _i	anorganisches Phosphat
PIFOC	Positionierer in z-Richtung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
psi	<i>pound per square inch</i> (1 psi = 0,00689 bar)
PtdAc	Phosphatidsäure
PtdCho	Phosphatidylcholin
QD	Nanokristalle, auch Quantenpunkte, <i>quantum dot</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
T _s	<i>Turnover</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-2-aminoethanesulfonsäure
TIRF	Totale Interne Reflektions Fluoreszenz
TMR	Tetramethylrhodamin
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypropylpolyethoxyethanol
U	<i>Unit</i> (1 U = 1 μmol ATP min ⁻¹)
UV	ultraviolett
w/v	Gewichtsprozent
Vis	visuell
v/v	Volumenprozent

Publikationen

Vorträge

- Oswald P., Einzelmolekülspektroskopie an der Oberfläche Physikalisch-chemisches Seminar (2007), Universität Freiburg.
- Oswald P., Immobilisierung und Detektion von Liposomen an der Oberfläche Graduiertenkolleg „Membranproteine“(2007) Universität Freiburg.
- Oswald P., Erzeugung und Charakterisierung von Lipidbilayern, Institut für physikalische Chemie, Universität Freiburg (2009)

Posterpräsentationen

- Oswald P., Gräber P., Immobilisation of H⁺-ATPsynthase on glass surface Kompetenznetzes „Funktionelle Nanostrukturen“ der Landesstiftung Baden-Württemberg, Bad Herrenalb (2007).
- Oswald P., Schütz I., Förster K., Galvez E., Gräber P., Immobilisation of the H⁺-ATPsynthase on glass surface and Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy, 15th European Bioenergetics Conference, Dublin, Irland (2008)
- Oswald P., Schütz I., Förster K., Galvez E., Gräber P., Immobilisation of the H⁺-ATPsynthase on glass surface and Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy 14th International Workshop on „Single Molecule Spectroscopy and Ultra Sensitive Analysis in the Life Siences“ Berlin-Adlershof (2008).
- Oswald P., Schütz I., Förster K., Galvez E., Gräber P., Immobilisation of the H⁺-ATPsynthase on glass surface and Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy International Congress „Drug Discovery & Delivery: Membrane Proteins and Natural

Product Research“ Freiburg (2009)

- Oswald P., Schütz I., Förster K., Galvez E., Gräber P., Immobilisation of the H⁺-ATPsynthase on glass surface and Single-Molecule Fluorescence Spectroscopy, Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (2008)
- Oswald P., Gräber P., Incorporation of H⁺-ATPsynthase from E. coli into a planar lipid bilayer and observation by spFRET, International Bunsen Discussion Meeting „Förster resonance energy transfer in life science“ Göttingen (2011)
- Oswald P., Gräber P., Incorporation of H⁺-ATPsynthase from E. coli into a planar lipid bilayer and observation by spFRET, Tag der Forschung, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (2011)

1 Einleitung

Die H⁺-ATPsynthase ist ein membranintegriertes Enzym, welches einen transmembranen Protonentransport mit der Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat, P_i, koppelt. Es verwendet die Energie, die bei einem Protonentransport frei wird zur Synthese von ATP. Es kann aber auch ATP hydrolysieren und diese Energie für den Protonentransport nutzen.

H⁺-ATPsynthasen kommen in den Plasmamembranen von Bakterien, den Thylakoidmembranen der Chloroplasten und den inneren Membranen von Mitochondrien vor. Die Funktion wurde durch die chemiosmotische Theorie beschrieben [1]. Durch die Komplexe der Atmungskette wird bei Bakterien und in den Mitochondrien eine transmembrane elektrochemische Potentialdifferenz der Protonen (ΔpH und $\Delta\phi$) aufgebaut. In Chloroplasten wird ΔpH und $\Delta\phi$ durch den photosynthetischen Elektronentransport erzeugt. Diese pH-Differenz führt zu einem Rückfluß der Protonen durch das Enzym und bewirkt eine Rotation eines Teils des Enzyms (Rotor). Diese bewirken Konformationsänderungen im Stator (vgl. Abschnitt 1.2) des Enzyms und führen letztlich zur Bindung der Substrate und zur Synthese von ATP. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die H⁺-ATPsynthasen aus *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet.

1.1 Escherichia coli (*E.coli*)

Escherichia coli ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, das im Darm vorkommt. Seine kurze Generationsfolge (bei optimalen äußeren Bedingungen ca. 20 min) und seine leichte genetische Manipulierbarkeit führen zusammen mit seiner guten Kultivierbarkeit dazu, dass es gut für Forschungszwecke verwendet werden kann. Die Größe wird mit einer Länge von etwa 5 μm und der Durchmesser mit 1-2 μm angegeben [2]. Es besitzt eine doppelsträngige, ringförmige DNS aus 4.600 kb. Zusätzlich zu diesen Genen sind weitere Gene auf Plasmiden zu finden. Diese kodieren unter anderem Antibiotikaresistenzen.

1.2 Die H⁺-ATPsynthase aus *E. coli*

1.2.1 Struktur von EF_0F_1

Die H⁺-ATPsynthase gehört zu den sogenannten *F*-Typ-ATPasen oder F_0F_1 -ATPasen. Man unterteilt das Enzym in einen membranintegrierten F_0 - und einen wasserlöslichen F_1 -Teil. Der F_0 -Teil besteht aus den Untereinheiten a, b, c_{10} , der F_1 -Teil besteht aus den Untereinheiten $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \varepsilon$. Abbildung 1 zeigt die Struktur des Enzyms. Hierfür wurde ein Homologiemodell [3] der Kristallstruktur des Komplexes $\alpha_3, \beta_3, \gamma$ aus dem mitochondrialen Enzym [4], und den Untereinheiten ε und γ [5], sowie der NMR-Struktur von δ [6] verwendet. Dies wurde mit dem F_0 -Teil aus der postulierten Struktur der c-Untereinheiten [7], [8], und den Untereinheiten a und b [9] kombiniert. Man kann das Enzym entsprechend seiner Funktion auch in Stator und Rotor einteilen. Der Stator umfasst die Untereinheiten $\alpha_3, \beta_3, \delta, a, b_2$, der Rotor die Untereinheiten $c_{10}, \gamma, \varepsilon$ [2]. Diese Einteilung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Auf dem Stator befinden sich drei katalytische Bindungsplätze für die Nukletide und Phosphat. Sie befinden sich überwiegend auf den β -Untereinheiten. Die γ -Untereinheit ist in die Mitte des $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer lokalisiert. Sie verknüpft den c-Ring in der Membran mit dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer.

1.2.2 Funktionsweise

Thermodynamik: Die chemiosmotische Theorie beschreibt die Thermodynamik der Kopplung zwischen dem Protonentransport und der Synthese von ATP. Gegeben ist die chemische Reaktion



Die Freie Enthalpie $\Delta G'_p$ der Reaktion ist

$$\Delta G'_p = \Delta G'_p{}^0 + RT \ln \frac{[ATP]c^0}{[ADP][P_i]} = \Delta G'_p{}^0 + 2,3RT \lg Q \quad (2)$$

Hier ist $\Delta G'_p{}^0$ die Freie Enthalpie im biochemischen Standardzustand, Q ist das stöchiometrische Produkt, c^0 ist die Standardkonzentration (1 M), R die allgemeine Gaskonstante und T die Temperatur.

Der Protonentransport von innen nach außen ist durch die folgende Gleichung beschrieben.

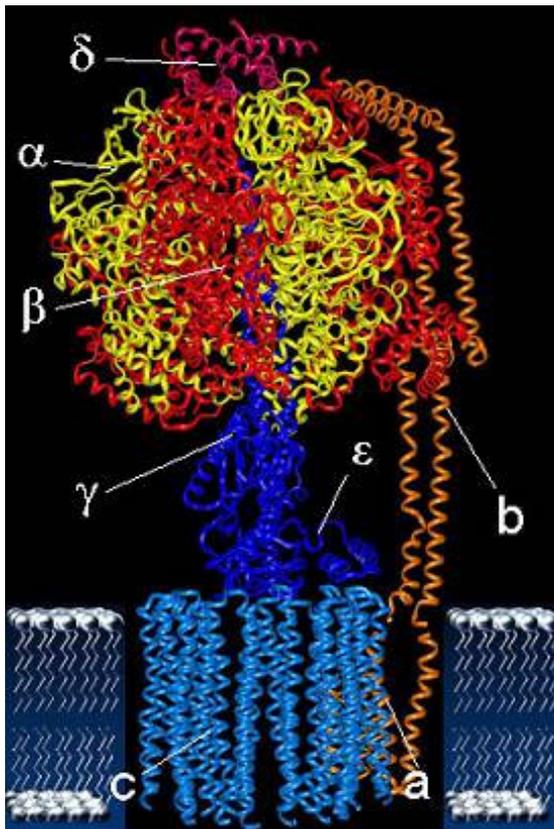


Abbildung 1: Aufbau von EF₀F₁ mit der Bezeichnung der Untereinheiten [63]

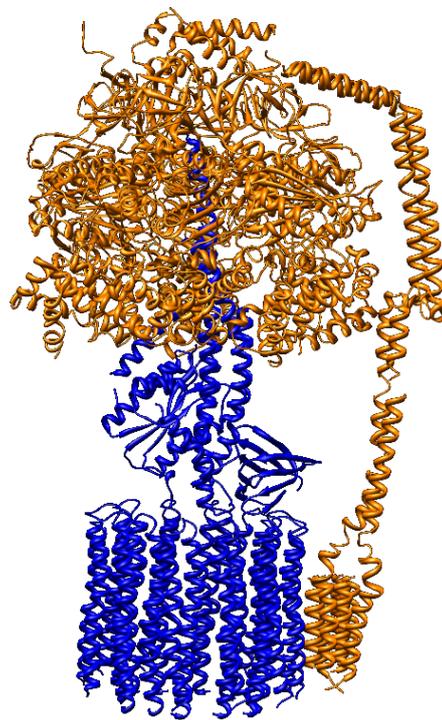


Abbildung 2: Aufteilung der ATPsynthase in Stator (blau) und Rotor (orange)



Verwendet man die Definitionen $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{ausssen} - \text{pH}_{innen}$ und $\Delta\phi = \phi_{innen} - \phi_{ausssen}$, ergibt sich für die transmembrane elektrochemische Potentialdifferenz der Protonen $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$:

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = \tilde{\mu}_{H^+}(innen) - \tilde{\mu}_{H^+}(ausssen) \quad (4)$$

$$= RT\ln[H_{innen}^+] - RT\ln[H_{ausssen}^+] + F\phi_{innen} - F\phi_{ausssen} \quad (5)$$

$$= 2,3RT(\text{pH}_{ausssen} - \text{pH}_{innen}) + F(\phi_{innen} - \phi_{ausssen}) \quad (6)$$

$$= 2,3RT\Delta\text{pH} + F\Delta\phi \quad (7)$$

Fasst man man Gleichungen 2 und 7 zusammen, so erhält man für die Freie Enthalpie:

$$\Delta G' = \Delta G'_p - n\Delta\tilde{\mu}_{H^+} \quad (8)$$

wobei n das Verhältnis zwischen transportierten Protonen und synthetisiertem ATP ist. Im Gleichgewicht ist $\Delta G' = 0$. Läuft die Reaktion freiwillig ab, so muss $\Delta G'$ kleiner 0 sein. Wie man an Gleichung 7 erkennt, kann dies nicht nur durch eine pH-Differenz (ΔpH), sondern auch durch eine elektrische Potentialdifferenz ($\Delta\phi$) erreicht werden [10]. Ein Einbau der H⁺-ATPsynthase in eine Lipiddoppelmembran, an die man eine elektrische Spannung anlegen könnte, würde dazu führen, dass das Enzym elektrisch steuerbar wäre.

Kinetik: Der von Boyer vorgeschlagene *binding change*-Mechanismus [11] geht von 120° Schritten aus, die die γ -Untereinheit und damit der gesamte Rotor bei der Drehung vollführt. Durch diese Drehung verändern sich gleichzeitig die Konformationen der 3 katalytischen Bindungsstellen im F₁-Teil des Enzyms. Es gibt 3 Konformationen.

- **L:** Hier ist die Bindungstasche für für ADP und P_i offen und beide Moleküle können binden (*loose*).
- **T:** Die Bindungstasche wird geschlossen und die beiden Reaktionspartner ADP und P_i werden aufeinander zu bewegt. Die Synthese von ATP findet statt (*tight*).
- **O:** Bei der *open*-Konformation öffnet sich die Bindungstasche und das frisch gebildete ATP verlässt das Enzym *open*.

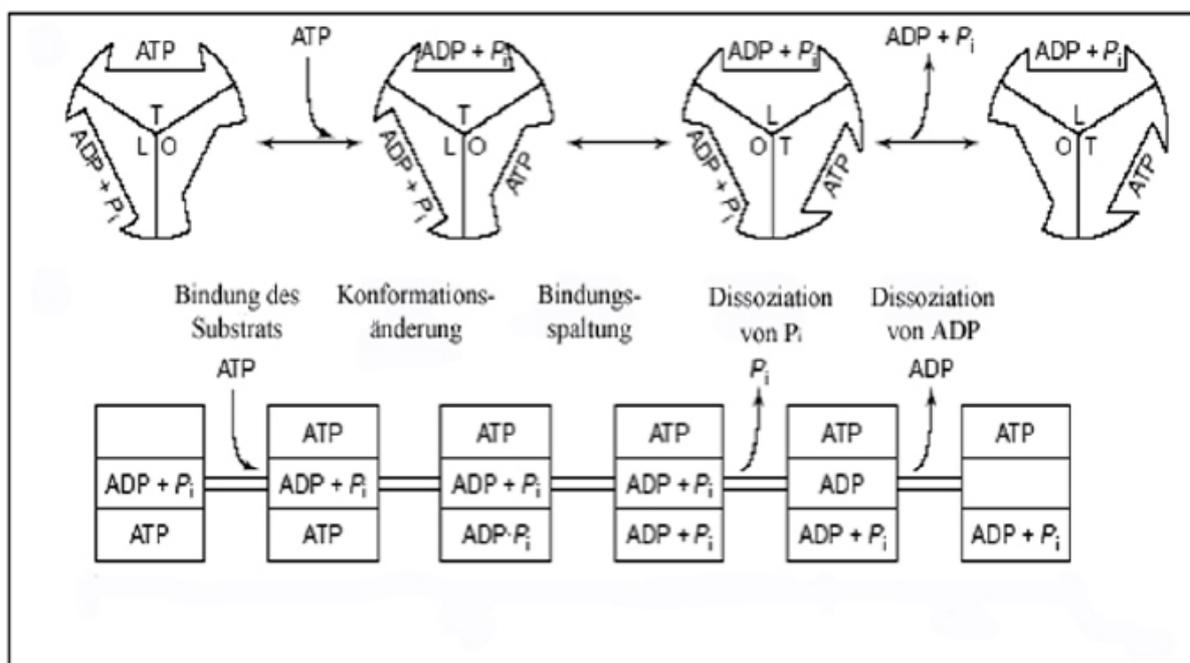


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *binding change*-Mechanismus [11] der H⁺-ATPsynthase

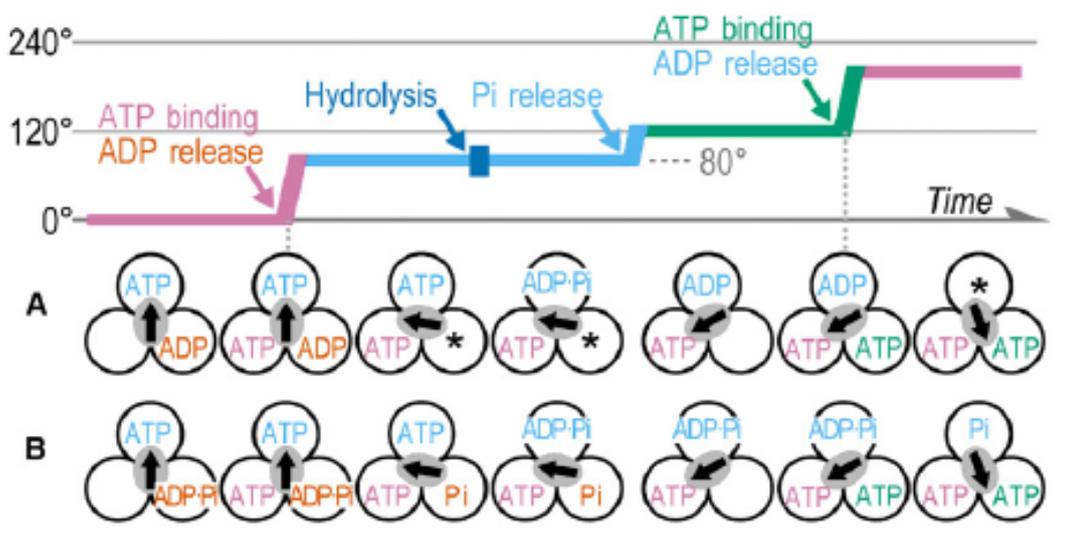


Abbildung 4: Schematische Darstellung des von Kinosita vorgeschlagenen Mechanismus [12] der ATP-Hydrolyse

Der Mechanismus ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

Neuere Untersuchungen von Shimo-Kon *et al.* [12] unterteilen den 120°-Schritt in einen 80°- und einen 40°-Schritt. Hier werden zu unterschiedlichen Zeit ADP und P_i gebunden (vgl. Abbildung 4). Dabei wurde in dieser Arbeit die Hydrolyse beobachtet, da diese einfacher zu messen ist als die Synthese. Zudem erfordert die Untersuchung in Syntheserichtung die Verwendung des gesamten Enzyms F_0F_1 . Die ersten Arbeiten zur Untersuchungen der Syntheserichtungen mit Hilfe der Einzelmolekülspektroskopie gelangen Diez *et al* [58]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Drehung des Rotors während der ATP-Synthese in umgekehrter Richtung erfolgte wie bei der ATP-Hydrolyse.

1.3 Konfokale Fluoreszenz Mikroskopie

Üblicherweise untersucht man eine große Zahl von Enzymen gleichzeitig und hat dabei das Problem, dass man Mittelwerte über die Population erhält. In dieser Population können sich Enzyme in unterschiedlichen Konformationszuständen befinden, und eine zeitaufgelöste Messung der Abfolge der verschiedenen Konformationen ist schwierig. Um die Funktion einer Nanomaschine wie der H^+ -ATPsynthase zu untersuchen ohne das diese Probleme

auftreten, empfiehlt es sich, einzelne Enzyme zu beobachten. Dafür ist die konfokale Fluoreszenz Mikroskopie geeignet.

Hier wird ein Anregungslichtstrahl durch ein Objektiv beugungsbegrenzt in die zu untersuchende Lösung fokussiert. Durch das gleiche Objektiv wird die Fluoreszenz eingesammelt, auf eine Lochblende fokussiert und danach mit einer Photodiode detektiert. Durch Überlagerung des Fokus der Lochblende mit dem Fokus des Anregungslichts entsteht das sogenannte „konfokale Volumen“, das üblicherweise im $f\ell$ -Bereich liegt. Innerhalb dieses konfokalen Volumen werden die Fluorophore der Probe angeregt. Der Aufbau eines solchen konfokalen Mikroskops beinhaltet eine Lichtquelle, ein Objektiv, einen dichroitischen Spiegel, mehrere Linsen, eine Lochblende und eine Detektionseinheit.

In der Regel werden Laser zur Anregung verwendet, um eine hohe Anregungsleistung zu gewährleisten. Zudem hat die monochromatische Strahlung eines Lasers den Vorteil, dass die Breite des beugungsbegrenzten Fokus etwa der Wellenlänge entspricht (vgl. Abschnitt 4.2).

Da gestreutes Anregungslicht die Messung stört, muss es vom Fluoreszenzlicht getrennt werden. Dies geschieht mit einem dichroitischen Spiegel, der Licht kleinerer Wellenlänge reflektiert und Licht mit einer höheren Wellenlänge durchlässt.

Durch die Lochblende wird erreicht, dass nur Fluoreszenzlicht detektiert wird, das von Fluorophoren emittiert wird, die im konfokalen Volumen lokalisiert sind. Die Funktionsweise der Lochblende ist in Abbildung 5 gezeigt.

Die Selektion von Einzelmolekülen ist in diesem Aufbau sehr einfach. Hat man ein konfokales Volumen von 10 fl , so befinden sich bei Konzentrationen von 100 pM in diesem Volumen $0,1$ Molekül, oder anders ausgedrückt, bei einer Beobachtungszeit von 10 s befindet sich im Fokus 9 s lang nichts, und man sieht einen Fluorophor 1 s lang.

Zur Detektion verwendet man *Avalanche Photo Dioden* (APDs) oder CCD-Kameras. Diese Detektoren können einzelne Photonen detektieren. Sollen für FRET-Experimente (vgl. Abschnitt 1.5) zwei Fluorophore gleichzeitig detektiert werden, so wird das Licht der verschiedenen Fluorophore über einen weiteren dichroitischen Spiegel getrennt und mit einer APD der Akzeptor und mit der anderen APD der Donor detektiert. Vor den Detektoren sind noch weitere optische Filter angebracht, um Licht, welches nicht von den Fluorophoren emittiert wurde, auszublenden. Ein schematischer Aufbau eines solchen Mikroskops ist in Abbildung 26 gezeigt.

Soll eine Oberfläche untersucht werden, so muss diese Pixel für Pixel gescannt werden. Es

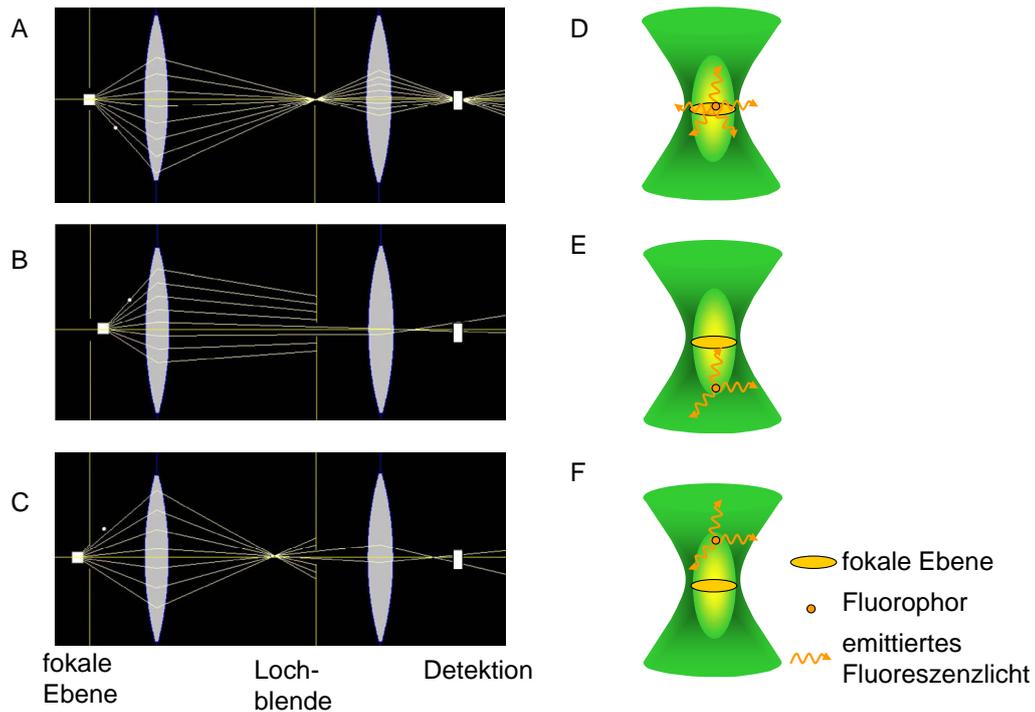


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Lochblende

In den Bildern A bis C ist der Strahlengang schematisch dargestellt. Es ist gezeigt, wie das Licht von einem Fluorophor zum Detektor gelangt. A) Der Fluorophor ist in der fokalen Ebene. B) Er ist etwas unterhalb dieser Ebene. C) Er ist oberhalb dieser Ebene. In den Bildern D) bis F) ist das konfokale Volumen dargestellt. Grün zeigt den Anregungsfokus. Die Intensitätsverteilung nach Gauß ist durch die Schattierung dargestellt, dunkelgrün entspricht einer hohen Intensität, hellgrün einer geringeren Intensität. Gelb ist der elliptische Fokus eines Strahls durch die Lochblende.

wird hierzu eine Scannereinheit verwendet, die eine Positionierung im nm-Bereich erlaubt. In der Regel werden hierfür Piezoscanner benutzt.

1.4 Totale Interne Reflektions Fluoreszenz (TIRF)-Mikroskopie

Die TIRF-Mikroskopie unterscheidet sich von anderen Mikroskop-Arten darin, dass die Probe nicht direkt, sondern durch ein sogenanntes evaneszentes Feld angeregt wird. Dieses entsteht, wenn Licht von einem optisch dichteren Medium in ein optisch dünneres übergeht. Üblicherweise wird der Übergang von Licht zwischen zwei Medien unterschiedlicher optischen Dichte durch der SNELLIUSSchen Brechungssatz beschrieben.

$$n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2 \quad (9)$$

Mit:

- n_1 : Brechungsindex Medium 1
- n_2 : Brechungsindex Medium 2
- θ_1 : Einfallswinkel
- θ_2 : Ausfallswinkel

Bei einem Übergang von einem optisch dichteren Medium in ein optisch dünneres kommt es nun bei einem bestimmten Winkel zur Totalreflektion. Dieser Winkel wird kritischer Winkel θ_c genannt. Er berechnet sich mit:

$$\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2}\right) \quad (10)$$

An der Grenzfläche im optisch dünneren Medium entsteht dann das evaneszente Feld. In diesem Feld können Fluorophore angeregt werden. Die Intensität dieses Feldes kann über folgende Gleichung berechnet werden:

$$I(z) = I(0) e^{-z/d} \quad (11)$$

Mit:

- $I(z)$: Intensität an der Stelle z
- z : Entfernung von der Grenzfläche
- d : Eindringtiefe des evaneszenten Feldes

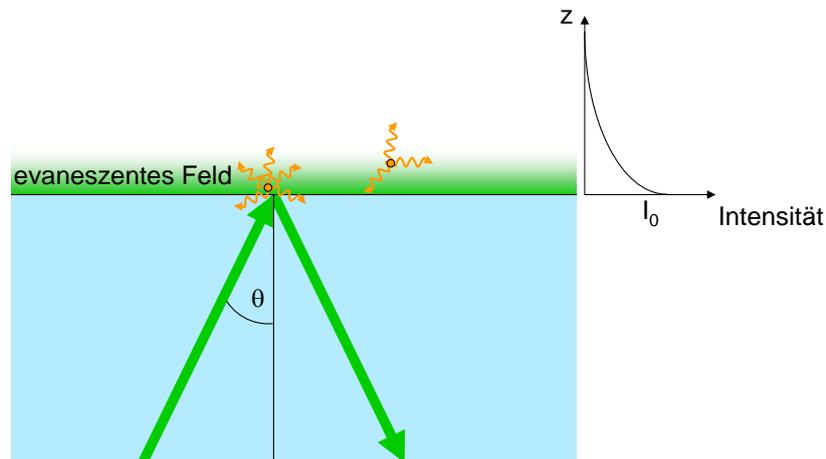


Abbildung 6: Der SNELLIUS'sche Brechungssatz und die Entstehung eines evaneszenten Feldes

Gezeigt ist ein Lichtstrahl mit einem Einfallswinkel θ , dieser Strahl wird total reflektiert. An der Grenzfläche entsteht ein evaneszentes Feld. Der Verlauf der Intensität ist in einem z /Intensität-Diagramm gezeigt.

Die Eindringtiefe hängt mit der Wellenlänge des Lichts λ und den Brechungsindizes zusammen:

$$d = \frac{\lambda}{4 \pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad (12)$$

Man geht von einer Eindringtiefe im Bereich von 50 bis 200 nm [14] aus (vgl. Abbildung 6). Diese Methode eignet sich daher hervorragend für Untersuchungen von Fluorophoren an oder in der Nähe einer Grenzfläche, da nur die an der Grenzfläche liegenden Fluorophore angeregt werden. Die gesamte Oberfläche wird direkt auf eine CCD-Kamera abgebildet. Es muss nicht wie bei der konfokalen Mikroskopie (vgl. Abschnitt 1.3) die Oberfläche gescannt werden.

Die Totalreflektion kann entweder durch eine Prismeneinkopplung oder durch eine Objektiv-einkopplung bewerkstelligt werden. In dieser Arbeit wurde nur die Objektiv-einkopplung verwendet. Dabei wird der Laserstrahl zentral in das Objektiv eingekoppelt und auf eine senkrechte Einkopplung geachtet, damit bei einer späteren Verschiebung des Objektivs in z-Richtung die Einkopplung nicht verändert wird (vgl. Abbildung 7 A). Durch eine darauffolgende Verschiebung des Laserstrahls aus dem Zentrum des Objektivs wird der Einfallswinkel soweit vergrößert, bis es zu einer totalen Reflektion kommt (vgl. Abbildung 7 B). Das Streulicht wird durch einen dichroitischen Spiegel vom Fluoreszenzlicht getrennt. Das Fluoreszenzlicht wird dann auf einen Detektor (hier eine CCD-Kamera) fokussiert und detektiert.

1.5 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET)

Durch Absorption von Licht wird ein Fluorophor in einen elektronisch angeregten Zustand (S_1) angehoben, wobei verschiedene Schwingungszustände erreicht werden können. Ein Übergang des Fluorophors zurück in den elektronischen Grundzustand (S_0) ist auf verschiedene Arten möglich.

- Er kann Licht einer größeren Wellenlänge als das Anregungslicht emittieren (Fluoreszenz).
- Er kann seine Energie durch Stöße auf anderen Molekülen übertragen (statische und dynamische Fluoreszenzlöschung).
- Er kann in einen Triplett-Zustand übergehen (*Inter-System-Crossing*). Eine Relaxation von diesem Zustand in den Grundzustand unter Lichtaussendung wird Phosphoreszenz genannt. Im Triplett-Zustand kann der Fluorophor länger verweilen (ms bis h) als im S_1 -Zustand (10^{-9} s). Im Triplett-Zustand ist eine Reaktion mit O_2 möglich. Durch diese Reaktion ändern sich die photophysikalischen Eigenschaften des Moleküls. Dies ist ein Vorgang, der zum Bleichen eines Fluorophors führt.
- Er kann die Energie strahlungslos über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf ein anderes Molekül übertragen. Dieser Prozess wurde von Theodor Förster entdeckt und ist nach ihm auch Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) benannt [15].

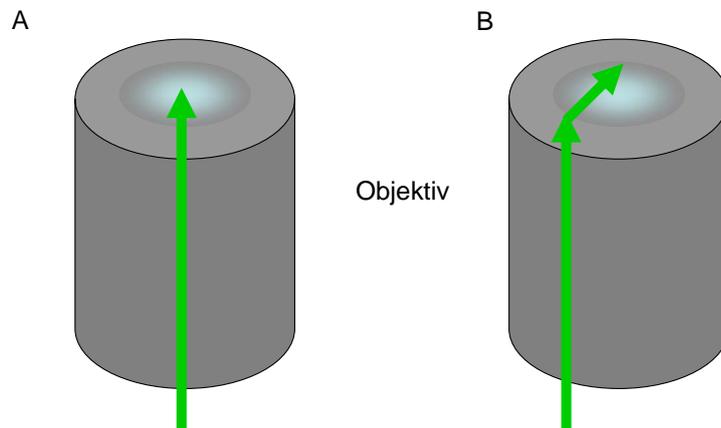


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Strahleinkopplung in ein TIRF-Objektiv

In Bild A) ist eine senkrechte Einkopplung gezeigt. In Bild B) ist gezeigt, wie bei einem Verschieben des Lichtsstrahls dieser abgelenkt wird, und es dadurch zur Totalreflexion kommt.

1.5.1 Theorie

Damit der FRET stattfinden kann, müssen die Fluorophore verschiedene Kriterien erfüllen:

- Der FRET findet bei konstanter Energie statt. Im Donor und Akzeptor müssen Zustände gleicher Energie vorhanden sein, d.h. das Fluoreszenzemissionsspektrum des Donors und das Anregungsspektrum des Akzeptor müssen sich überlappen. Quantenmechanisch wird dies durch das Überlappungsintegral $J(\lambda)$ berechnet:

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda)\varepsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad (13)$$

Mit:

- λ : Wellenlänge des Lichts
- $F_D(\lambda)$ flächennormierte Fluoreszenzintensität des Donors
- $\varepsilon_a(\lambda)$ dekadischer Absorptionskoeffizient des Akzeptors

- Der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren muss sich im Bereich des FÖRSTER-Radius R_0 befinden. Der FÖRSTER-Radius ist der Abstand zwischen den beiden Fluorophoren bei dem die Effizienz der Energieübertragung bei 50 % liegt. R_0 hängt von den Eigenschaften der Fluorophore ab und liegt üblicherweise zwischen 3 und 7 nm. Mit Hilfe des Försterradius und der FRET-Effizienz E_{FRET} (vgl. Gleichung 14) lässt sich der Abstand der Fluorophore r_{DA} berechnen.

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r_{DA}^6} \quad (14)$$

- Die relative Orientierung der Übergangsdipolmomente der beiden Fluorophoren hat einen entscheidenden Einfluss auf die FRET-Effizienz. Üblicherweise geht man von einer freien Drehbarkeit der Fluorophore aus und setzt einen Mittelwert der relativen Orientierung ein. Ist dies nicht gewährleistet, so kann sich die FRET-Effizienz durch Rotation des Fluorophors ändern ohne dass sich der Abstand ändert.

1.5.2 Anwendung

Zur experimentellen Bestimmung FRET-Effizienz werden die Fluoreszenzintensitäten der beiden Fluorophore gemessen und daraus die Abstände ermittelt. Angewandt wurde dies in der vorliegenden Arbeit, um die Änderung der Abstände von Untereinheiten der H^+ -ATPsynthase bei der Katalyse zu untersuchen. Hierzu wurde ein konfokales Mikroskop

verwendet (vgl. Abschnitt 1.3). Aus den Fluoreszenzintensitäten des Donors F_D und des Akzeptors F_A wurde die Transfereffizienz E_{FRET} bestimmt:

$$E_{FRET} = \frac{F_A}{\gamma F_D + F_A} \quad (15)$$

Um der Tatsache gerecht zu werden, dass die Fluoreszenzen beider Fluorophore nicht immer mit der gleichen Empfindlichkeit gemessen werden können, wird ein Korrekturfaktor γ eingeführt.

1.6 Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS)

Mit Hilfe der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (FCS) kann man verschiedene Ereignisse untersuchen, die die Fluoreszenz eines Moleküls beeinflussen. Unter anderem kann die Diffusion von fluoreszierenden Teilchen in Lösung gemessen werden. Hierfür verwendet man ein konfokales Mikroskop (vgl. Abschnitt 1.3). Für die Messung sollten sich nur wenige fluoreszierende Teilchen im Fokus befinden. Aus der gemessenen Fluoreszenzintensität wird eine Autokorrelationsfunktion $G(\tau_c)$ bestimmt, die die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität der Messung beschreibt. Es wird die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t ($F(t)$) mit der Intensität zum Zeitpunkt $t+\tau_c$ ($F(t+\tau_c)$) verglichen, wobei τ_c die sogenannte Korrelationszeit ist.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t + \tau_c) \delta F(t) \rangle}{\langle F(t)^2 \rangle} \quad (16)$$

Durch Anpassung einer Modellfunktion an die Autokorrelationsfunktion lässt sich die Diffusionszeit der fluoreszierenden Teilchen bestimmen.

1.7 Quantenpunkte (QD)

Quantenpunkte (englisch *quantum dots*, QDs) sind kleine halbleitende Kristalle (Nanokristalle) aus einigen hundert bis wenigen tausend Atomen. Es werden verschiedene Zusammensetzungen verwendet, beispielsweise CdSe, CdS oder InGaP. Ihr Durchmesser liegt im nm-Bereich. Sie können als Bindeglied zwischen Molekülen und Festkörpern verstanden werden. In dieser Arbeit werden sie als Fluorophore verwendet. Die Wellenlänge der Fluoreszenz ist abhängig von ihrer Größe. Dieser Zusammenhang soll im folgenden kurz angedeutet werden.

1.7.1 Grössenabhängige Fluoreszenz der QDs

QDs haben eine besondere Stellung, sie lassen sich weder durch das Bändermodell als Metalle noch als Atome bzw. Moleküle beschreiben. Die Wechselwirkung von Licht mit Halbleitern soll kurz erläutert werden. Treffen Photonen auf Halbleiter, werden Elektronen aus dem Valenzband in das Leitungsband angehoben. Es entsteht ein freies Elektron im Leitungsband, im Valenzband hingegen fehlt ein Elektron, es wird auch als „Loch“ bezeichnet. „Loch“ und freies Elektron bilden zusammen ein Exiton. Fällt das Elektron aus dem Leitungsband zurück in das Valenzband, so kann die freiwerdende Energie als Photon abgegeben werden. Das hier abgestrahlte Licht hat die gleiche Wellenlänge wie das eingestrahlte. Eine Beschreibung mit dem Bändermodell zeigt sich als für QDs nicht zutreffend. Da die energetische Struktur der QDs aber auch kontinuierliche Bereiche aufweist, scheitert auch eine genaue Beschreibung mithilfe von Molekülorbitalen [16]. Ein Ausweg zeigt hier das Modell des „Teilchen in der Kugel“. Auf eine ausführliche Beschreibung soll an dieser Stelle verzichtet werden und auf weiterführende Literatur verwiesen werden [17], [18]. Wichtig ist aber das Ergebnis dieser Überlegung. Man erhält für die Energieeigenwerte E_i :

$$E_i = \frac{h^2 n^2}{8m_i r^2} \quad (17)$$

Mit:

- E_i : i-ter Energieeigenwert
- h : PLANCKsches Wirkungsquantum
- n : Quantenzahl
- m_i : effektive Masse
- r : Radius der Kugel (QD)

Man erhält nun im Gegensatz zum Bändermodell mehrere diskrete Energieniveaus, deren Energieeigenwerte vom Radius der Kugel abhängen, d.h. übertragen auf den QD hängen sie von dessen Größe ab. Das Elektron kann nun durch die Anregung in ein höheres Energieniveau angehoben werden und beim Rückkehr in ein niedrigeres Energieniveau kann ein Photon emittiert werden, das eine höhere Wellenlänge besitzt als das Photon, welches das Elektron angeregt hat. Die Wellenlänge ist abhängig vom Abstand der einzelnen Energieniveaus. Da dieser aber nach Gleichung 17 von der Größe des QDs abhängig ist, hängt auch die Fluoreszenzwellenlänge von dessen Größe ab (vgl. Abbildung 8 A).

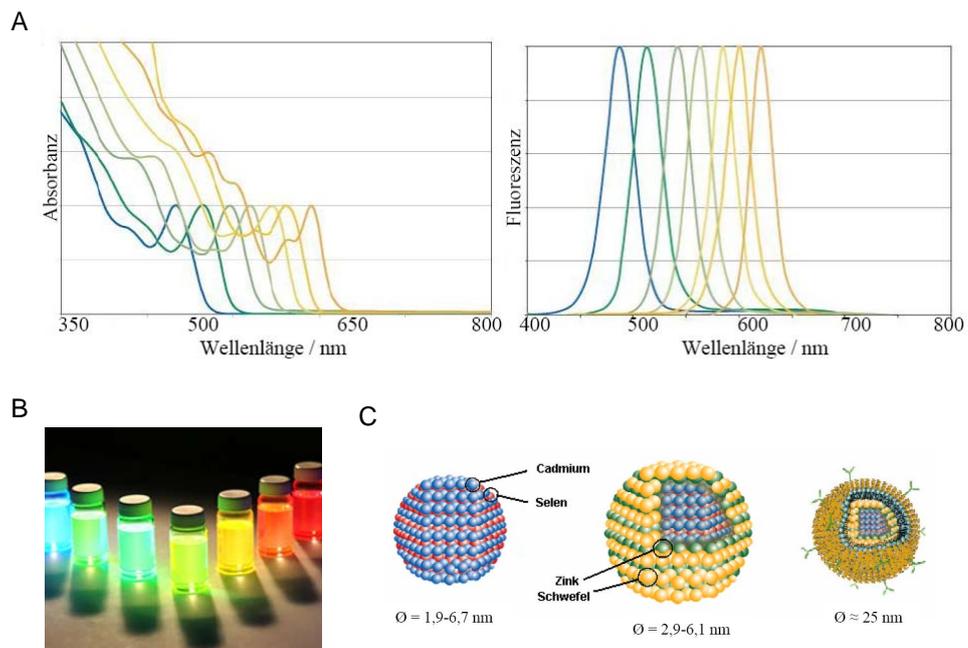


Abbildung 8: Spektren und Aufbau von QDs

In Bild A sind die Absorptionsspektren verschiedener QDs gezeigt. In Bild B sind verschiedene QD-Lösungen gezeigt. In Bild C ist der Aufbau der QDs gezeigt, angefangen von dem CdSe Kern über den mit ZnS beschichteten Kern zum wasserlöslichen QD mit PEG-Hülle [19], (www.evident.com).

1.7.2 Aufbau von QDs

Die QDs aus beispielsweise CdSe werden in organischen Lösungsmitteln wie Toluol, Chloroform oder Heptan aus Cadmiumstearat und Selen synthetisiert [20]. Auf ihrer Oberfläche wird ZnS aufgebracht, um die Partikel zu passivieren. Diese CdSe/ZnS-QDs sind nicht wasserlöslich. Um dies zu erreichen, werden die Kristalle mit mehreren Polyethylenglycolschichten (PEG-Schichten) umgeben. In Abbildung 8 C ist der Aufbau schematisch dargestellt.

1.7.3 Vor- und Nachteile der QDs

Im Vergleich zu organischen Fluorophoren haben QDs Vor-, aber auch Nachteile. Die folgende Liste soll einige Vorteile nennen.

- Die herausragende Eigenschaft von QDs ist ihre hohe Photostabilität. Selbst bei hohen Lichtintensitäten tritt kein Bleichen auf. Dies führt zu einem hohen Signal und damit zu einem sehr guten Signal/Rausch-Verhältnis.
- QDs haben ein sehr breites Anregungsspektrum. Sie können mit verschiedenen Lasern angeregt werden. Ebenso können auch unterschiedliche QDs mit dem gleichen Laser angeregt werden.
- Anregungs- und Fluoreszenzlicht haben sehr unterschiedliche Wellenlängen. Das Fluoreszenzlicht lässt sich sehr gut vom Anregungslicht trennen. Beispielsweise wurde der hier verwendete QD bei 476 nm angeregt, sein Fluoreszenzmaximum lag bei 585 nm. Bei organischen Fluorophoren beträgt der Unterschied meist nur 30 nm.

Diesen Vorteilen stehen natürlich einige Nachteile gegenüber.

- QDs sind im Vergleich zu organischen Fluorophoren sehr viel größer. Diese Größe hat zur Folge, dass nach einer Markierung eine Abtrennung der nicht reagierten QDs von markiertem Enzym sehr viel schwieriger ist als bei organischen Fluorophoren.
- Durch ihre Größe bedingt interagieren die QDs auch viel mehr mit dem System (Enzym), welches untersucht werden soll. Diese Interaktion kann bei Enzymen bis zur Inhibierung führen.

- Damit QDs an andere Systeme angebunden werden können, werden an der Hülle funktionelle Gruppen angebracht. QDs haben im allgemeinen eine sehr viel größere Anzahl an solchen funktionellen Gruppen als organische Fluorophore, die in der Regel nur eine solche Gruppe besitzen. Gerade bei Einzelmolekülmessungen ist es wichtig, dass nur ein Enzym mit einem QD markiert wird, was jedoch bei einer größeren Anzahl funktioneller Gruppen schwierig zu kontrollieren ist.
- Da sie ein sehr breites Anregungsspektrum besitzen, sind sie bei FRET-Messungen sehr schlecht als Akzeptor einzusetzen.
- Ihre Größe (mit PEG-Hülle) ist manchmal größer als der berechnete FÖRSTER-Radius.

1.8 Elektrische Messungen an einer Lipiddoppelschichtmembran

Lipiddoppelschichten haben eine sehr geringe elektrische Leitfähigkeit, d.h. sie sind für Ionen praktisch nicht durchlässig. In Biomembranen sind daher in diesen Membranen Ionenkanäle eingebaut, die den Ionentransport erlauben. Um den Ionentransport durch diese Kanäle zu untersuchen, kann man eine Lipiddoppelschichtmembran (Bilayer) zwischen zwei Kammern erzeugen [21]. Es wird in jede dieser Kammern eine Ag/AgCl-Elektrode getaucht und eine Spannung bis zu 100 mV angelegt. Die gemessenen Ströme sind äußerst gering und erst nach Einbau von Ionenkanälen in die Membran steigen sie signifikant an, so dass Ströme im Bereich von einigen pA gemessen werden können.

1.8.1 Einbauen von Enzymen in die Membran

Der Einbau von Enzymen in eine Bilayer kann durch die Fusion von Liposomen, die das Enzym enthalten, mit der Bilayer durchgeführt werden [21]. Dabei kann man durch die Messung des Stroms die Fusion verfolgen. Um eine Fusion der Liposomen mit der Bilayer zu erreichen, wird innerhalb des Liposoms und auf einer Seite der Bilayer eine geringere K^+ -Konzentration eingestellt (20 mM KCl). Auf der anderen Seite wird eine hohe K^+ -Konzentration (250 mM) verwendet [22]. Die Liposomen werden auf der Seite mit der hohen K^+ -Konzentration zugegeben und sinken auf die Lipidbilayer herab. Durch die Osmose dringt Wasser in die Liposomen ein. Dadurch schwellen diese an und an einem bestimmten Punkt fusionieren sie mit der Lipidbilayer. Der Vorgang ist schematisch in Abbildung 1.8.1

dargestellt.

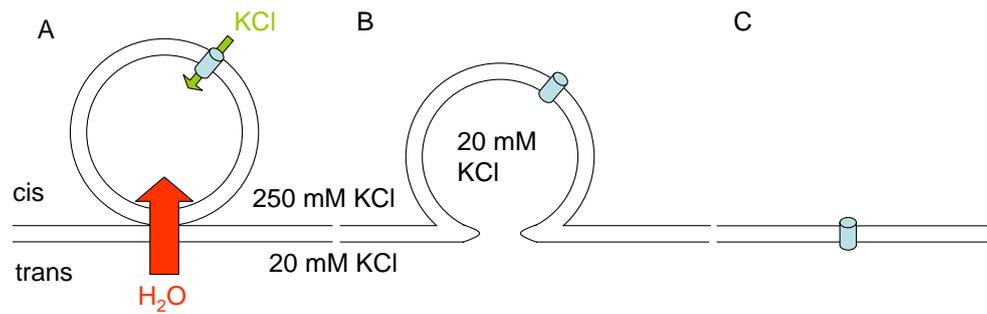


Abbildung 9: Die Fusion der Liposomen mit der Lipidbilayer

(a) Das Liposom liegt auf der Lipidbilayer, der osmotische Druck bewirkt ein Eindringen von Wasser in das Liposom. (b) Durch das erhöhte Volumen vergrößert sich die Oberfläche, so dass das Liposom mit der Lipidbilayer fusioniert. (c) Das Liposom hat fusioniert und das Enzym wurde in die Lipidbilayer eingebaut [22].

1.9 Ziel der Arbeit

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die H^+ -ATPsynthase mit einem Fluoreszenzdonor und -akzeptor zu markieren und in Liposomen zu rekonstituieren. Damit war es erstmalig möglich, mit Hilfe von Einzelpaar-FRET-Messungen an frei diffundierenden Liposomen Konformationsänderungen des Enzyms in einem konfokalen Mikroskop zu messen. Dabei ergaben sich zwei Probleme. Erstens ist die Beobachtungszeit durch die Diffusionszeit der Liposomen durch das konfokale Volumen begrenzt und zweitens muss bei Untersuchungen in Syntheserichtung eine transmembrane pH-Differenz durch einen Pufferwechsel erzeugt werden. Diese pH-Differenz klingt schnell ab und für die Messungen werden große Probenmengen benötigt. In dieser Arbeit sollten zwei Ansätze untersucht werden, die diese Probleme lösen sollten.

In einem Ansatz sollte die H^+ -ATPsynthase an einer Oberfläche immobilisiert werden. Um die Möglichkeit zu haben, auch in Syntheserichtung zu messen, sollte das Enzym zunächst in Liposomen rekonstituiert werden und dann sollte versucht werden, diese Liposomen an einer Glasoberfläche zu immobilisieren. Hierzu sollten Biotinliposomen verwendet werden, die über Streptavidin an die mit Biotin-BSA modifizierte Glasoberfläche gebunden werden. Zusätzlich sollte die vorhandene Apparatur so verändert werden, dass einzelne Moleküle an der Oberfläche zu detektieren waren und mit FRET über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnten.

In einem zweiten Ansatz sollte das Enzym in eine planare Lipiddoppelmembran eingebaut werden, über die mit Hilfe von Ag/AgCl-Elektroden eine Spannung angelegt werden kann. Damit wäre es möglich, die Reaktionsrichtung der H^+ -ATPsynthase elektrisch in Synthese- oder Hydrolyserichtung zu steuern. Für FRET-Messungen würde die Rotationsdiffusion des Enzyms keine Rolle spielen, die Translationsdiffusion in der Membran sollte langsamer als in Lösungen erfolgen. Hierfür sollte eine entsprechende Apparatur aufgebaut werden, in der Lipiddoppelschichten erzeugt und elektrisch charakterisiert werden können. Zusätzlich sollten optische Messungen an der Lipiddoppelschicht mit einem TIRF-Mikroskop möglich sein.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

	Reinheit	Hersteller
2,3-Dihydroxybenzoesäure	99%	Aldrich
Aceton	Uvasol	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid	mix ratio 29:1	Appllichem
ADP	Monokaliumsalz	Alexis
Agar-Agar	für Mikrobiologie	Fluka
Antifoam C		Sigma
APS((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	für biologische Zwecke	Sigma
Arginin	99,5 %	Fluka
ATP	Grade II	Sigma
ATP-Monitoring Kit		Aldrich
ATTO532		ATTO-Tech
ATTO647N		ATTO-Tech
Bernsteinsäure	p.a.	Merck
Biobeads		BIO-RAD
Biotin-Lipid		Molecular Probes
Biotinmaleimid		Sigma
BMPS		PIERCE
BPB	reinst	Serva
BSA	rein	Serva
CaCl ₂	p.a.	Merck
Chloramphenicol		Sigma
Cholsäure	für biologische Zwecke	Fluka
CoCl ₂	p.a.	Merck
DDM	Ultra Grade	Calbiochem
Desoxycholat		Sigma
DMSO	99,8 %	Sigma
DNase		Calbiochem
DTT	99,5 %	Appllichem
ε-Aminocapronsäure	99 %	Fluka
EDTA	99 %	Appllichem
Ergosterol	>95 %	Fluka
Essigsäure	reinst 99-100 %	Riedel-de Haën
FeCl ₂	99 %	Aldrich
Glucose	99,5 %	Roth
Glycerin	p.a.	Appllichem
Guanidiniumchlorid	99 %	Sigma

Tabelle 1: Fortsetzung der Verwendeten Chemikalien

H ₃ BO ₃	p.a.	Merck
HCl	p.a.	Roth
Hefe-Extrakt		Fluka
Hellmanex®II	Reinigungsflüssigkeit	Kummer
HNO ₃	p.a.	Merck
Imidazol	p.a.	Fluka
Isocyanatosilan	95 %	ABCR
Isoleucin	99,5 %	Fluka
KCl	p.a.	Fluka
KH ₂ PO ₄	p.a.	Riedel-de Haën
KOH	p.a.	Fluka
Lactatdehydrogenase		Roche
MES	99,5 %	Applichem
Methanol	p.a.	Baker/a.ChemHH
MgSO ₄	p.a.	Fluka
MnCl ₂	Micro Select f.m.b./p.	Fluka/Merck
MOPS	99,5 %	Applichem
NaCl		Fluka
NADH	99 %	Serva
NaH ₂ PO ₄	p.a.	Merck
NaOH	p.a.	Merck
n-Decan	>99 %	Aldrich
(NH ₄) ₂ SO ₄	für biologische Zwecke	Fluka
NiCl ₂	p.a.	Merck
Nystatin	70 %	Fluka
PABA	free Acid 99 %	Sigma
PEGs		Rapp-Polymere
Phosphoenolpyruvat		Sigma
PMSF	>99 %	Fluka
PtdAc		Sigma
PtdCho	aus Ei	Avanti
Pyruvatdehydrogenase	aus Kaninchenmuskel	Boehringer
QD ₅₈₅		Invitrogen
QD ₆₀₅		eBioscience
Rhodamin6G		Michrome
Saccherose	für die Mikrobiologie	Fluka
SDS	99 %	Sigma
Streptavidin		Molecular Probes
Sulforhodamin 101		Molecular Probes
TEMED	Elektrophorese-Reagenz	Sigma

Tabelle 1: Fortsetzung der Verwendeten Chemikalien

TES	99 %	Sigma
Thiamin		Sigma
TMR		Molecular Probes
TMR-Lipid		Molecular Probes
Tricin	99 %	Applichem
Tris		Applichem
Triton X-100		Boehringer
Trypton		Fluka
Uracil		Merck
Valin		Fluka
Valinomycin	90 %	Sigma
ZnCl ₂	p.a.	Merck

Das für diese Arbeit verwendete Wasser wurde zuerst mit einer Deionisierungsanlage gereinigt. Das deionisierte Wasser (etwa $2 \mu\text{S}/\text{cm}$) wurde weiter mit einer Milli-Q-Anlage gereinigt, es hatte eine Leitfähigkeit von etwa $0,07 \mu\text{S}/\text{cm}$. Sobald der Wert $0,2 \mu\text{S}/\text{cm}$ erreichte wurden die Filter gewechselt.

2.2 Bakterienkultivierung

Es wurde der *E. coli* Bakterienstamm RA1 verwendet [23]. Er ist gegen Kanamycin resistent, allerdings fehlt ihm auf seinem Genom das *unc*-Operon. Dieses Operon ist für die Expression der verschiedenen Untereinheiten von F_0F_1 verantwortlich. Er ist somit ein idealer Wirtsstamm für Plasmide, die das *unc*(ATP)-Operon enthalten. F_0F_1 (sowohl Wildtyp als auch Mutanten) können somit einfach isoliert werden [24], [25] und [26].

Alle dazu verwendeten Plasmide enthalten das *unc*-Operon und Resistenzen gegenüber Chloramphenicol und Tetracyclin. Um den Rotor der H^+ -ATPsynthase zu markieren, wurde an ε oder an γ jeweils ein Cystein eingeführt. Beim Plasmid pRAP100 wurde an der ε -Untereinheit in Position 56 das Histidin durch ein Cystein ersetzt, beim Plasmid pRA114 wurde das Tyrosin an der Position 114 durch ein Cystein ersetzt. All diese Mutanten gab es auch mit einem von Jan Petersen eingeführten *His*₁₀-Tag am N-Terminus der β -Untereinheit (pRAP100 H10 bzw. pRA114 H10). Sollte der Stator markiert werden, wurde das Plasmid pES225 (F_0Q64CF_1) verwendet. Hier war ein Cystein an der Position 21 der b-Untereinheit durch ein Serin ersetzt und ein Cystein an der Position 64 eingefügt [26]

Für diese Arbeit wurden bereits transformierte E.coli-Zellen aus einer Langzeitkultur bei -80°C (freundlicherweise von Jan Petersen zur Verfügung gestellt) verwendet.

2.2.1 Anzucht

Die Anzucht beider Stämme beinhaltete Ausplattieren, zwei Vorkulturen und Kultivierung im Fermenter (Bioengineering, Laborpilot LP 351, Handhabung des Fermenters [25]). In Tabelle 2 sind die hierfür verwendeten Lösungen aufgelistet. Alle Arbeitsschritte wurden in der Sterilbank (51424, MDH) oder unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Lösungen für die Kultivierung

Medium für Agarplatten in Medium I autoklaviert	Agar-Agar	20 mg/ml
Medium I autoklaviert	Trypton (w/v)	1,6 %
	Hefe-Extract (w/v)	1,0 %
	NaCl	85 mM
Chloramphenicol-Lösung in EtOH, steril filtriert Lagerung -20 °C	Chloramphenicol	30 mg/ml
Salz-Lösung 1.000x autoklaviert, Lagerung RT	ZnCl ₂	15 mM
	MnCl ₂ · 2 H ₂ O	1 mM
	H ₃ BO ₃	50 mM
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,5 mg/l
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	1 mM
	FeCl ₂ · 2 H ₂ O	3 mM
Glucose-Lösung 67x autoklaviert, Lagerung RT	(w/v)	20 %
MgSO₄-Lösung 1.000x autoklaviert, Lagerung RT		1 M
Aminosäurelösung 500x steril filtriert lichtgeschützte Lagerung 4 °C	Arginin	250 mM
	Isoleucin	250 mM
	Valin	350 mM

Tabelle 2: Fortsetzung der verwendeten Lösungen für die Kultivierung

	Thiamin	500 mg/l
	2,3-Dihydroxybenzoesäure	40 mM
Medium II	KH ₂ PO ₄	100 mM
autoklaviert,	KOH	71 mM
Lagerung bei RT	Trypton (w/v)	0,1 %
	Hefe-Extrakt (w/v)	0,05 %
	NaCl	17 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
	Uracil	0,4 mM
	Salzlösung (v/v)	0,0001 %
Hauptkulturmedium	KH ₂ PO ₄	100 mM
im Fermenter autoklaviert	KOH	71 mM
	Trypton (w/v)	0,1 %
	Hefe-Extrakt (w/v)	0,05 %
	NaCl	17 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
	Uracil	0,4 mM

Festkultur 2 Agar-Platten wurden mit Chloramphenicol versetzt (30 µg/ml Endkonzentration) und mit *E. coli*-Zellen aus einer Langzeitkultur überimpft. Über Nacht wurde im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

Vorkulturen 2 Vorkulturröhrchen wurden mit 6 ml Medium I (siehe Tabelle 2) gefüllt und mit Chloramphenicol versetzt (Endkonzentration 30 µg/ml). Diese wurden mit einer Kolonie der Festkultur überimpft. Bei 160 rpm und 37 °C im Schüttler (G25, New Brunswick Scientific) wurden die Kulturen etwa 7 h inkubiert.

2 Erlenmeyerkolben mit 1 l Medium II wurden mit 1 ml MgSO₄-Lösung (1 mM Endkonzentration), 15 ml Glucose-Lösung (0,03 % (w/v) Endkonzentration), 2 ml Aminosäurelösung und 1 ml Chloramphenicol-Lösung (30 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Der Inhalt der Vorkulturröhrchen wurde jeweils zugegeben. Über Nacht wurde im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

Hauptkultur Der Fermenter wurde mit 26 l deionisierten H_2O , Hauptkulturmedium und 28 ml Salz-Lösung gefüllt und 25 min bei 121 °C sterilisiert. Über einen sterilen Trichter wurden 28 ml $MgSO_4$ -Lösung (1 mM Endkonzentration), 420 ml Glucose-Lösung (0,03 % (w/v) Endkonzentration), 56 ml Aminosäurelösung, 28 ml Chloramphenicol-Lösung (30 $\mu g/ml$ Endkonzentration), 2 l Vorkulturmedium II und ca. 3 ml Antischaummittel (Anti-foam C) zugegeben. Die Kultivierungstemperatur betrug 37 °C; bei einer Rührgeschwindigkeit von 380 rpm, Luftzufuhr von 1,4 bar und einem Kesseldruck von 1,2 bar. Das Wachstum wurde über die Messung der Absorbanz (Perkin Elmer, Lambda 2) bei 578 nm (anfangs stündlich, gegen Ende alle 1 bis 15 min) überprüft. Mit Beginn der Verzögerungsphase (nach ca. 3 h) wurde die Fermentation durch Abkühlen auf 5 °C beendet (Absorbanz bei 578 nm betrug etwa 1,3 bis 1,4).

Zellernte und Lagerung Die Zellernte schloss sich unverzüglich an den Abbruch der Kultivierung an. Die Zellsuspension wurde mit 9 980 g ca. 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JLA-10, 9 000 rpm). Die feuchte Zellmasse wurde gesammelt und in 20-25 g Fraktionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Ausbeute pro Fermenter ca. 80-90 g). Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.3 Isolation von F_0F_1

Die Isolation von F_0F_1 wurde für alle Mutanten gleich durchgeführt. Es wurde eine Vorschrift von [26] verwendet. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Lösungen für die Isolation von F_0F_1

Membranen-Puffer mit 1 M HCl auf pH 8,0 Lagerung bei 4°C	Tris	50 mM
	KCl	100 mM
	$MgCl_2$	5 mM
	PABA	5 mM
	DTT	2 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	PMSF (frisch zugegeben)	0,002 % (v/v)
Puffer A mit 1 M KOH auf pH 7,5	MOPS	40 mM
	KCl	80 mM

**Tabelle 3: Fortsetzung der Verwendeten Lösungen
für die Isolation von F₀F₁**

filtriert, Lagerung bei 4°C	MgCl ₂	4 mM
	DTT	2 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Saccharose	2 % (w/v)
	DDM	0,1 % 5 (w/v)
	PMSF (frisch zugegeben)	0,002 % (v/v)
Puffer C mit 1 M KOH auf pH 7,5 filtriert, Lagerung bei 4°C	MOPS	40 mM
	KCl	80 mM
	MgCl ₂	4 mM
	DTT	2 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Saccharose	2 % (w/v)
	DDM	0,1 % 5 (w/v)
French Press Puffer mit 1 M HCl auf pH 8,0 Lagerung bei 4°C	Tris	20 mM
	KCl	140 mM
	MgCl ₂	5 mM
	PABA	5 mM
	DTT	2 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	PMSF (frisch zugegeben)	0,002 % (v/v)
Solubilisierungs-Puffer mit 1 M KOH auf pH 7,0 Lagerung bei 4°C	MES	20 mM
	Tricin	20 mM
	MgCl ₂	5 mM
	DTT	2 mM
	PMSF (frisch zugegeben)	0,002 % (v/v)
Puffer B mit 1 M KOH auf pH 7,5 filtriert, Lagerung bei 4°C	MOPS	80 mM
	KCl	160 mM
	MgCl ₂	8 mM
	DTT	4 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	Saccharose	4 % (w/v)

Tabelle 3: Fortsetzung der Verwendeten Lösungen für die Isolation von F_0F_1

	DDM	0,2 % (w/v)
	PMSF (frisch zugegeben)	0,002 % (v/v)
KCl-Lösung	KCl	3 M
Lagerung bei 4°C		
PMSF-Lösung	PMSF	2,5 % (w/v)
in EtOH, Lagerung bei 4°C		

Sämtliche Isolationsschritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt.

Mechanischer Aufschluss Zwei Spatelspitzen DNase wurden zu 40 bis 50 g *E.coli*-Zellen gegeben, welche in 200 ml French Press Puffer gelöst wurden, und 30 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei RT in einer French Press (SLM Aminco, auf 4°C vorgekühlt) aufgeschlossen (Druck 1400 psi, 1-2 Tropfen pro Sekunde). Die Zellsuspension wurde beim ersten Mal auf Eis aufgefangen und beim zweiten Mal direkt in flüssigen Stickstoff getropft. Der Stickstoff wurde abdekantiert.

Membranisolation Die aufgetaute Zellsuspension wurde 15 min bei 20400 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 13000 rpm). Das Sediment wurde verworfen und der Überstand erneut 90 min bei 183632 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 50000 rpm). Das Sediment wurde in 200 ml Membranen-Puffer resuspendiert und 90 min bei 214188 g (54000 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Zellmembranen) gewogen und in Solubilisations-Puffer aufgenommen (pro 1 g Membranen 10 ml Puffer). Es wurde 1,75 % (w/v) DDM frisch zugegeben und 30 min bei 4°C gerührt. Anschließend wurde 90 min bei 214188 g (54000 rpm) und 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand mit 0,001 % (v/v) PMSF versetzt und weiterverarbeitet.

Abtrennung von F_0F_1 Gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde langsam zugetropft (Endkonzentration 45 % (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und 15 min bei 4°C gerührt. Bei 35000 g und 4°C wurde 15 min zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 17000 rpm).

Das Sediment wurde verworfen und der Überstand mit 0,001 % (v/v) PMSF versetzt. Gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurde langsam zugetropft (Endkonzentration 65 % (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und 15 min oder über Nacht bei 4°C gerührt.

Bei 35000 g (17000 rpm) und 4°C wurde 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml Puffer A resuspendiert, filtriert (0,2 μm Porenfilter) und auf eine Gelpermeations-Säule S 300 (Länge 40 cm, \varnothing 3 cm, 24 h bei 40 ml/h mit Puffer A äquilibriert) aufgetragen. Es wurde mit Puffer A bei 40 ml/h in 4 ml Fraktionen eluiert. Die Peakfraktionen wurden einzeln auf die Anionenaustauscher-Säule Poros HQ 20 (Länge 100 mm, \varnothing 4,6 mm) aufgetragen. Weitere Handhabungen sind in [26] zusammengefasst. Mit 50 % Puffer B und KCl-Gradienten wurde bei 3,5 ml/min in 1 ml Fraktionen aufgetrennt. Die Peakfraktionen (Eluation bei ca. 300 mM KCl) wurden vereinigt, danach wurde gesättigte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung langsam zugetropft (Endkonzentration 65 % (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), und 15 min oder über Nacht bei 4°C gerührt.

Die Lösung wurde 15 min bei 35000 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 17000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 0,5 ml Puffer C aufgenommen und 5 min bei 6500 g und 4°C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 10000 rpm). Der Überstand wurde auf eine Gelpermeationssäule S 400 (Länge 1 m, \varnothing 1,5 cm, 24 h bei 20 ml/h mit Puffer A äquilibriert) aufgetragen und mit Puffer C bei 29 ml/h in 5 ml Fraktionen eluiert. Die Proben wurden in 500 μl Protonen schockgefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Von jeder Fraktion wurde eine Probe zur Konzentrationsbestimmung und Syntheseaktivitätsuntersuchung verwendet.

2.4 Isolation von F_1

Die Isolation von F_1 wurde für alle Mutanten gleich durchgeführt. Es wurde eine Vorschrift von [26] verwendet. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4 angegeben. Die Isolation wurde, soweit nicht anderes angegeben, bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

Mechanischer Aufschluss Für eine Präparation wurden 40-50 g Zellen in 125 ml IP2-Puffer aufgetaut und gelöst. Es wurden 2 Spatelspitzen DNase und 0,001 % PMSF zugegeben. Nach 30 min Inkubation wurde die Zellsuspension mithilfe einer French Press (SLM Aminco, auf 4°C vorgekühlt) aufgeschlossen (Druck 1400 psi, 1-2 Tropfen pro Sekunde). Die aufgeschlossenen Zellen wurden auf Eis aufgefangen.

Tabelle 4: Verwendete Lösungen für die Isolation von F₁

IP2-Puffer mit 1 M HCl auf pH 8,0 Lagerung bei 4°C	Tris	10 mM
	KCl	140 mM
	DTT	1 mM
	PABA	5 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
TES + PABA mit 1 M NaOH auf pH 7, Lagerung bei 4°C	TES	2 mM
	ϵ -Aminocaprinsäure	40 mM
	DTT	1 mM
	PABA	5 mM
	EDTA	0,5 mM
	Glycerin	15 % (v/v)
Futai-Puffer mit 1 M HCl auf pH 7,4 Lagerung bei 4°C	Tris	100 mM
	ϵ -Aminocaprinsäure	80 mM
	DTT	2 mM
	EDTA	2 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
TES-50-Puffer mit 1 M NaOH auf pH 7,0 Lagerung bei 4°C	TES	50 mM
	ϵ -Aminocaprinsäure	40 mM
	PABA	5 mM
	DTT	1 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
TES 5 ohne PABA mit 1 M NaOH auf pH 7,0 Lagerung bei RT	TES	2 mM
	ϵ -Aminocaprinsäure	40 mM
	DTT	2 mM
	EDTA	0,5 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
GPC-Puffer mit 1 M HCl auf pH 7,4 Lagerung bei 4°C	Tris	50 mM
	ϵ -Aminocaprinsäure	80 mM
	DTT	1 mM
	EDTA	1 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	ATP	100 μ M
	PMSF (frisch zugegeben)	0,005 % (v/v)
KCl-Lösung Lagerung bei 4°C	KCl	3 M
PMSF-Lösung in EtOH, Lagerung bei 4°C	PMSF	2,5 % (w/v)

Membranisolierung Die Zellsuspension wurde 30 min bei 20400 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 13000 rpm). Das Sediment wurde verworfen und der Überstand erneut 90 min bei 183632 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 50000 rpm). Das Sediment wurde in 90 ml TES 50-Puffer resuspendiert und 90 min bei 214188 g (54000 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Zellmembranen) in 90 ml TES + PABA resuspendiert. Anschließend wurde 90 min bei 214188 g (54000 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment (Membranen) über Nacht bei -80°C gelagert.

Ablösen des F₁-Teils von den Membranen Die Membranen wurden aufgetaut, bei RT in 50 ml TES 5 ohne PABA resuspendiert und 1 h bei RT langsam gerührt. Die Lösung wurde 90 min bei 183632 g und 24°C zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 50000 rpm). Der Überstand wurde bei 4°C gelagert, das Sediment zur Erhöhung der Ausbeute nochmals in 50 ml TES 5 ohne PABA resuspendiert und 1 h bei RT langsam gerührt. Die Zentrifugation wurde nochmals wiederholt (90 min, 183632 g, 24 °C und 50000 rpm). Der Überstand wurde mit dem Überstand der vorhergehenden Zentrifugation vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden mit PMSF (Endkonzentration 0,01 % (v/v)), 1 M TES-NaOH pH 7,0 (Endkonzentration 50 mM), DTT (Endkonzentration 1 mM) und 1 M MgCl₂ (Endkonzentration 50 mM) versetzt. Im Anschluss wurde 10 min bei 4°C gerührt.

Abtrennung von F₁ Die Suspension wurde 20 min mit 12100 g bei 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 10000 rpm). Das Sediment wurde verworfen und der Überstand 15 min bei 48400 g und 4°C zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 20000 rpm). Das Sediment wurde verworfen, der Überstand filtriert (0,2 µm Einmal-Filter, Schleicher & Schuell) und auf eine Anionenaustauscher-Säule Poros HQ 20 (Länge 100 mm, Ø 4,6 mm) aufgetragen. Es wurde mit 50 % Futai-Puffer und einem KCl-Gradienten bei 10 ml/min in 4 ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen bei ca. 250-300 mM KCl wurden mit 1 mM ATP und 0,01 % PMSF versetzt und auf Eis gelagert. Diese Fraktionen wurde auf Hydrolyseaktivität überprüft, und ggf. vereinigt. Im Anschluss wurde gesättigte (NH₄)₂SO₄-Lösung langsam zugetropft (Endkonzentration 65 % (v/v) (NH₄)₂SO₄), und 15 min oder über Nacht bei 4°C gerührt.

Nach einer Zentrifugation 15 min bei 39200 g und 4°C (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor JA-20, 18000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Sediment in 0,25 ml

GPC-Puffer resuspendiert. Es wurde 5 min mit 6500 g bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge, 10000 rpm). Der Überstand wurde auf eine Gelpermeations-Säule S 300 (Länge 1 m, Ø 1,5 cm, 24 h bei 20 ml/h mit GPC-Puffer äquilibriert) aufgetragen. Es wurde mit GPC-Puffer bei 20 ml/h in 2 ml Fraktionen eluiert. Es wurden Proben für ein SDS-Gel entnommen und in 1 ml Portionen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.5 Isolierung von F₁-His-Tag

Zur Isolation von F₁-His-Tag wurde die in Abschnitt 2.4 dargestellte Isolation modifiziert. Die verwendeten Lösungen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

2.5.1 Mechanischer Aufschluß

E. coli-Zellen (ca. 50 g) wurden im IP2-Puffer über Nacht suspendiert. Es wurden 2 Spatelspitzen DNase und 0,75 ml PMSF-Lösung zugegeben. Der Zellaufschluß mittels French-Press (SLM Aminco, bei 4 °C vorgekühlt, 1 200 psi, 1-2 Tropfen pro Sekunde) wurde einmal durchgeführt und die Suspension in einem eisgekühltem Becherglass aufgefangen.

2.5.2 Membranisolierung

Die Zellsuspension wurde bei 13 000 rpm und 4 °C 30 min zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-HS, Rotor Ja-20). Der Niederschlag (Zelltrümmer) wurde verworfen und der Überstand bei ca. 150 000 g und 4 °C 90 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-70, 45 000 rpm). Das Sediment wurde in 90 ml kaltem TES 50-Puffer gelöst und bei 4°C mit einem Pinsel resuspendiert. Es wurde erneut 90 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 46 000 rpm). Der Niederschlag in kaltem TES 5 + PABA mithilfe eines Pinsels bei 4°C resuspendiert. Eine Zentrifugation von 90 min (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 46 000 rpm) schloss die Membranisolation ab. Die Membranen wurde gewogen (ca. 4 g), in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.3 Ablösen und Isolation von F₁-His-Tag

Die His-Tag-Säule nutzt die Eigenschaft von Proteinen, welche mehrere Histidine besitzen, Ni²⁺-Ionen zu komplexieren. Es wird ein Säulenmaterial verwendet, welches NTA-Gruppen an der Oberfläche besitzt. Diese Gruppen binden Ni²⁺-Ionen und an diese binden wiederum die His-Tag-Proteine. Die verwendeten Lösungen können Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 5: Verwendete Lösungen für die F₁-His-Tag-Isolation

IP2-Puffer mit HCl auf pH 8,0	Tris	10 mM
	KCl	140 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	DTT	1 mM
	PABA	5 mM
TES 50 mit NaOH auf pH 7,0	TES-NaOH	50 mM
	ϵ -Aminocapronsäure	40 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	PABA	5 mM
	DTT	1 mM
TES 5 + PABA mit NaOH auf pH 7,0	TES-NaOH	5 mM
	ϵ -Aminocapronsäure	40 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	PABA	5 mM
	DTT	1 mM
TES 5 ohne PABA mit NaOH auf pH 7,0	TES-NaOH	5 mM
	ϵ -Aminocapronsäure	40 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	DTT	1 mM
	EDTA	0,5 mM
PMSF in EtOH, Lagerung 4 °C	PMSF (w/v)	2,5 %

Durchführung Verwendet wurde „Ni-NTA His-Bind Resine“ (ca. 3 ml Säulenmaterial pro g Membranen). Dies wurde nacheinander mit 4 Säulenvolumen (CV) H₂O, 1 CV Guanidinium-HCl, 4 CV H₂O, 2 CV Ni²⁺-Lösung und 4 CV H₂O gespült um das Material zu regenerieren.

Die Membranen (ca. 2 g) wurde in TES 5 ohne PABA Puffer mithilfe eines Pinsels resuspendiert. Die Suspension wurde bei 150 000 g und 4 °C 40 min zentrifugiert (Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-60, 54 000 rpm). Der Überstand, der F₁-His-Tag enthält, wurde 1h mit dem regenerierten Säulenmaterial gerührt. Die Säule wurde gepackt und mit 10 CV WP II gewaschen. Die Elution erfolgte mit 4 CV Elutionspuffer. Das Säulenmaterial wurde im Anschluss regeneriert und in 20 % Ethanol gelagert.

Die Elutionsfraktionen wurde auf ihre Hydrolyseaktivität überprüft (vgl. Abschnitt 2.12.2), von den hydrolyseaktiven Fraktionen wurde eine Probe für ein SDS-Gel (vgl. Abschnitt 2.6) vorbereitet. Die Fraktionen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen für die *His-Tag*-Säule

WP I mit HCl auf pH 7,5	Tris	50 mM
	PMSF (v/v)	0,005 %
	NaCl	150 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	DDM (w/v)	0,05 %
WP II mit HCl auf pH 7,5	Tris	50 mM
	PMSF (v/v)	0,005 %
	NaCl	150 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	DDM (w/v)	0,05 %
Elutionspuffer mit HCl auf pH 7,5	Tris	50 mM
	PMSF (v/v)	0,005 %
	NaCl	150 mM
	Glycerin (v/v)	10 %
	DDM (w/v)	0,05 %
Guanidinium-Cl	Imidazol	200 mM
	Guanidiniumchlorid	6 M
NiCl₂-Lösung	Essigsäure	0,2 M
	NiCl ₂	0,1 M

2.6 SDS-Gelelektrophorese

Eine der zentralen Analyseverfahren der Biochemie ist die SDS-PAGE, womit Proteine durch die Wanderung in einem elektrischen Feld auf Grund ihres Masse/Ladungsverhältnisses getrennt werden können. Die Lösungen und Puffer können Tabelle 7 entnommen werden.

2.6.1 Gießen der Gele

Es wurde das *BioRad Mini Protean 3 Cell System* verwendet, um die Gele zu gießen. Dabei wurde zuerst das 13 %ige Trenngel gegossen. Dieses bestand aus:

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE

Acrylamidlösung	Acrylamid/Bisacrylamid	40 %
Gelpuffer mit 5 M HCl pH 8,45	Tris	3 M
	SDS (w/v)	0,3 %
APS-Lösung	APS (w/v)	10 %
TEMED	TEMED (w/v)	10 %
Ethanol-Lösung	(v/v)	50 %
Probenpuffer pH 8	SDS (w/v)	10 %
	DTT	5 mM
	Glycerin (v/v)	50 %
	BPB (w/v)	0,2 %
	Tris/HCl	100 mM
Anodenpuffer mit 5 M HCl auf pH 8,9	Tris	0,2 mM
Kathodenpuffer	Tris	0,1 mM
	Tricin	0,1 mM
	SDS (w/v)	0,1 %
Färbelösung	Ethanol (v/v)	20 %
	Essigsäure (v/v)	10 %
	Coomassie R250 (w/v)	0,5 %
Entfärbelösung	Ethanol (v/v)	30 %
	Essigsäure (v/v)	10 %

Trenngel 13 %

Acrylamidstammlösung	1.800 μ l
Gelpuffer	1.840 μ l
H ₂ O	1.880 μ l
TEMED	8 μ l
APS	28 μ l

Über das Trenngel wurde für eine glatte Oberkante die Ethanollösung aus Tabelle 7 gegossen und nach vollständiger Polymerisation (ca. 30 min) wieder entfernt. Hierauf wurde das Sammelgel (4%) gegossen, in welches zügig ein Probenkamm eingesetzt wurde.

Sammelgel 4 %

Acrylamidstammlösung	188 μ l
Gelpuffer	465 μ l
H ₂ O	1.215 μ l
TEMED	4 μ l
APS	18 μ l

Auch hier war die Polymerisation nach ca. 30 min beendet.

2.6.2 Probenvorbereitung

Zu 10-20 μ l Probe wurden 5 μ l Probenpuffer zugegeben und 20 min bei 90 °C inkubiert. Danach wurde die Probenlösung mit einer Hamiltonspritze in die Sammelgeltaschen gefüllt.

2.6.3 Elektrophorese

Die Elektrophorese wurde bei 20 mA (für ein Gel) für den Sammelgelbereich gestartet; als Netzteil diente ein *Shandon Southern SAE 2761*. Nach dem Erreichen des Trenngels durch die Probe, wurde die Stromstärke verdoppelt. Wenn die BPB-Front das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

2.6.4 Dokumentation des Gels

Handelte es sich bei der Probe um fluoreszenzmarkiertes Enzym, so wurde erst ein Bild des Gels auf dem UV-Tisch gemacht. Angefärbt wurde jedes Gel mit Coomassie Brilliant Blue

R250. Hierfür wurde das Gel erst einige Stunden in die Färbelösung und im Anschluss in die Entfärbelösung gelegt, die mehrfach gewechselt wurde. Das Gel wurde nun dokumentiert (*INTAS Digit Store System 95KFE103*).

2.7 Fluoreszenzmarkierung

Für die Markierung des Enzyms mit einem Fluorophor wurde immer ein genetisch eingefügtes Cystein verwendet, das mit einem Maleimid-Fluorophor kovalent verbunden wurde. Es wurden für die Einzelmolekülmessungen sowohl anorganische, fluoreszierende Nanokristalle (sogenannte Quantenpunkte, englisch *Quantum Dots*, QD) als auch organische Fluorophore verwendet. QDs haben den Vorteil, dass sie sehr photostabil sind, ihr Nachteil besteht in ihrer Größe, was zu einer Deaktivierung des Enzyms führt [27]. Organische Fluorophore sind hingegen bleichanfällig [28], haben aber den Vorteil einer geringen Größe.

Die Fluoreszenzmarkierung mit organischen Fluorophoren wurde nach Zimmermann [2] durchgeführt. Hierfür wurde das Enzym zunächst aufkonzentriert. Im Anschluss wurde die Reaktion des Enzyms mit dem Fluorophor durchgeführt. Bei der Markierung mit den QDs wurde sowohl die Reaktionsdauer verlängert als auch die Reinigung verändert.

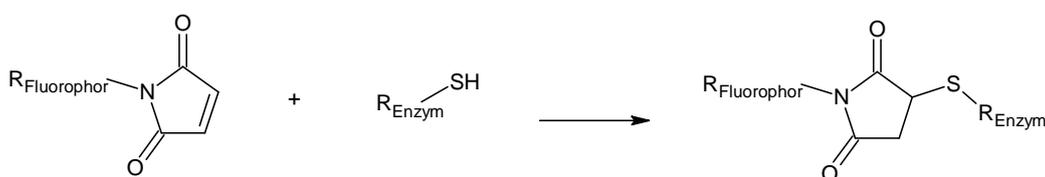


Abbildung 10: Reaktion zur kovalenten Bindung der Fluorophore an das Enzym

2.7.1 Aufkonzentrieren

Um die Konzentration der Enzymlösung zu erhöhen, wurde zuerst das Enzym gefällt. Hier wurde eine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung verwendet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass durch die Fällung DTT aus der Lösung entfernt werden kann. Dieses würde die spätere

Tabelle 8: Verwendete Lösungen und Puffer für die Fluoreszenzmarkierung

(NH ₄) ₂ SO ₄ -Lösung pH 7,5 Lagerung 4 °C	(NH ₄) ₂ SO ₄	gesättigt
MOPS-Puffer mit 1 M NaOH auf pH 7,5 Lagerung 4 °C	MOPS MgCl ₂	50 mM 2,5 mM
MOPS/DDM-Puffer mit 1 M NaOH auf pH 7,5 Lagerung 4 °C	MOPS MgCl ₂ DDM	50 mM 2,5 mM 0,1 % (w/v)
DMSO Lagerung RT	DMSO (wasserfrei)	
Crosslinker-Lösung in DMSO (wasserfrei)	BMPS	1 mM

Kopplungsreaktion mit dem Maleimid stören. Bei der Aufkonzentration der F₀F₁-Lösung muß darauf geachtet werden, dass immer genügend DDM in der Pufferlösung enthalten ist, da sonst das Enzym zerfällt [2].

Durchführung mit F₁ Die F₁-Lösung (1 ml) wurde aufgetaut und mit 2 ml gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt. Es wurde 1,5 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 25 min bei 4 °C und 26384 g zentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, Rotor HFA 28.1 # 3740, 20000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 75 µl MOPS pH 7,5 resuspendiert. DTT und (NH₄)₂SO₄ wurde mit einer Zentrifugationssäule (Länge 7,5 cm, Ø = 0,5 cm, Sephadex G50 fine in MOPS-Puffer, 2 min mit 561 g bei 23 °C vorzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 23 °C abgetrennt. Die Proteinkonzentration wurde über UV/Vis Spektroskopie bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). Falls das Enzym nicht sofort verwendet wurde, wurde es mit 10 % Glycerin versetzt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Durchführung mit F_0F_1 Die Konzentrierung von F_0F_1 wurde wie für F_1 beschrieben durchgeführt. Es wurde in diesem Fall aber der Puffer MOPS/DDM verwendet.

2.7.2 Markierung von F_1 mit ATTO 647N

Ein Krümel ATTO 647N wurde in 10 μl DMSO gelöst und die Konzentration spektroskopisch bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). F_1 -Lösung (67 μl , $c=3,2 \mu\text{M}$) wurden mit 0,2 μl ATTO 647N-Lösung ($c=950 \mu\text{M}$) vermischt. Die Lösung wurde 4 min auf Eis im Dunkeln gerührt. Nicht gebundener Fluorophor wurde über 2 Zentrifugationssäulen (Länge 7,5 cm, $\emptyset = 0,5$ cm, Sephadex G50 fine in MOPS-Puffer, 2 min mit 561 g bei 23°C vorzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 4°C abgetrennt. Spektroskopisch wurde die Konzentration des Enzyms und des Fluorophors bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). Das Verhältnis der Konzentrationen ergab dann den Markierungsgrad. Die Lösung wurde mit Glycerin (10 % (v/v)) versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.3 Markierung von F_0F_1 mit ATTO 532

Ein Krümel ATTO 532 wurde in 10 μl DMSO gelöst und die Konzentration spektroskopisch bestimmt. 80 μl F_0F_1 -Lösung ($c= 10 \mu\text{M}$) wurden mit 0,5 μl ATTO 532-Lösung ($c=1,5$ mM) vermischt. Die Lösung wurde 90 min auf Eis im Dunkeln gerührt. Nicht gebundener Fluorophor wurde über eine Zentrifugationssäulen (Länge 7,5 cm, $\emptyset = 0,5$ cm, Sephadex G50 fine in MOPS-Puffer pH 7,5, 2 min mit 561 g bei 4°C vorzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 4°C abgetrennt. Spektroskopisch wurde die Konzentration des Enzyms und des Fluorophors bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8). Das Verhältnis der Konzentrationen ergab dann den Markierungsgrad. Die Lösung wurde mit Glycerin (10 % (v/v)) versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.4 Markierung von F_0F_1 mit QO₅₈₀

Um den QD an eine Cysteingruppe des Enzyms zu binden, wurde eine Maleimidgruppe verwendet. Da aber kommerziell nur QDs mit NH_2 -Gruppen verfügbar waren, wurde ein

Crosslinker verwendet. Dieser *Crosslinker* (siehe Abbildung 11, N-[β -Maleimidohexyloxy]-succinimidester, BMPS) enthält eine NHS-Gruppe, die mit den Aminogruppen des QD reagieren kann und eine Maleimidgruppe, die mit der Cysteingruppe des Proteins reagieren kann. Die QDs hatten an ihrer Oberfläche mehrere Aminogruppen, so dass der QD nach der Reaktion mit dem *Crosslinkers* über mehrere Maleimidgruppen auf der Oberfläche verfügbar ist. Nach der Reaktion mit einem Cystein des Enzyms wurde das markierte Protein mit einer Zentrifugationssäule aufgereinigt.

Reaktion von BMPS mit dem QD *Crosslinker*-Lösung in DMSO (3,6 μ l, 1 mM BMPS) wurde mit 30 μ l QD-Lösung ($c = 12 \mu$ M) und 7,5 μ l MOPS pH 7,5 versetzt. Dies entspricht einem Verhältnis QD:*Crosslinker* von 10,7 μ M: 107 μ M oder 1:10. Die Reaktion erfolgte 2 h bei RT. Nicht gebundener *Crosslinker* wurde über 2 Zentrifugationssäulen (Länge 7,5 cm, $\emptyset = 0,5$ cm, Sephadex G25 fine in MOPS-Puffer pH 7,5, 2 min mit 561 g bei 23°C vorzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 23°C abgetrennt. Die Konzentration des QDs wurde spektroskopisch bestimmt (vgl. Abschnitt 2.8).

Markierung von F₀F₁ mit QD QD-Lösung (90 μ l, 6,8 μ M) F₀F₁-Lösung (40 μ l, 18,7 μ M) wurden gemischt und die Reaktion dauerte 4 h bei RT. Nichtgebundener QD wurde über 2 Zentrifugationssäulen (Länge 7,5 cm, $\emptyset = 0,5$ cm, Sephadex G25 fine in MOPS/DDM-Puffer pH 7,5, 2 min mit 561 g bei 4°C vorzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 4°C abgetrennt. Es wurde von der Lösung ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen und daraus die Protein- und QD-Konzentration berechnet (vgl. Abschnitt 2.8). Die Lösung wurde mit Glycerin (10 % (v/v)) versetzt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.8 UV/Vis-Spektroskopie

Durchführung Die Konzentrationsbestimmungen wurden meist an Hand eines UV/Vis-Spektrums durchgeführt. Als Spektrometer diente ein Lambda 2, Perkin Elmer. Als Küvetten wurden entweder Quarz-Küvetten (Hellma QS 1.0000, Schichtdicke 1 cm, Mindestvolumen 75 μ l) oder Plastikkuvetten (Plastibrand 1,5 ml halbmikro, Schichtdicke 1 cm,

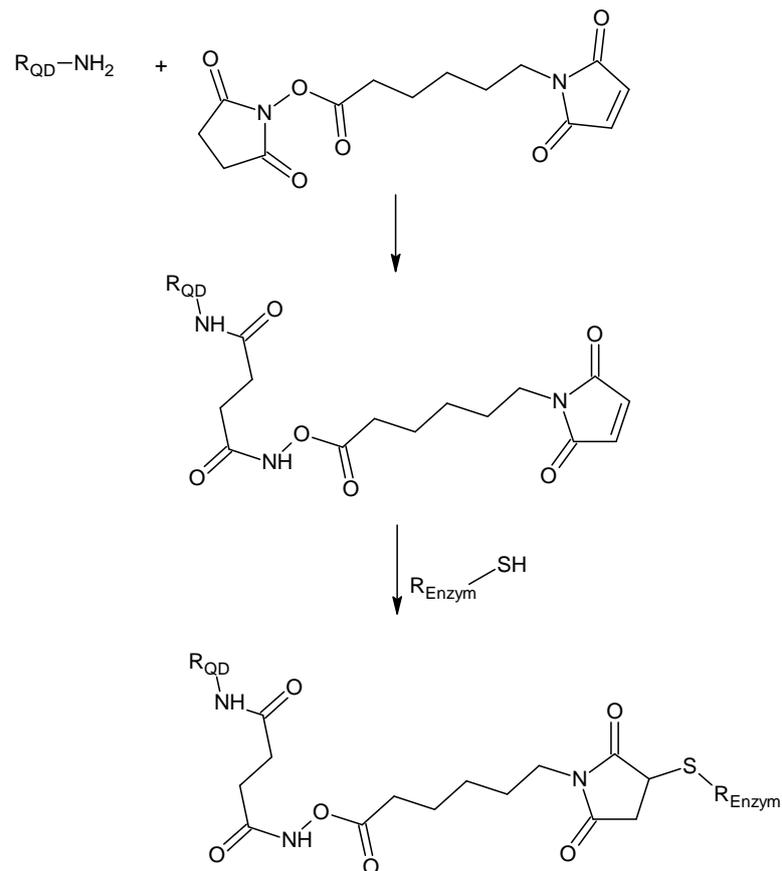


Abbildung 11: Modifikation der Aminogruppen der QDs mit N-[β -Maleimidohexyloxy]-succinimidester (BMPS)

Mindestvolumen 800 μl). Vor jeder Messung wurde ein Untergrundspektrum gemessen. Hierfür wurde die Küvette mit dem Mindestvolumen des jeweiligen Lösungsmittels, bzw. des Puffers gefüllt und ein Nullabgleich in dem jeweiligem Wellenlängenbereich durchgeführt. Die Enzymkonzentration wurde an Hand der Absorbanz bei 278 nm gemessen. Bei den Fluorophoren wurde das Maximum im Absorptionsspektrum ermittelt und der entsprechende Absorptionskoeffizient verwendet.

Auswertung Aus dem Spektrum wurde die Absorption im Maximum ermittelt und mit den entsprechenden Absorptionskoeffizienten konnte mit Hilfe des LAMBERT-BEER'schen-Gesetzes die Konzentration bestimmt werden.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} \quad (18)$$

mit:

A Absorbanz der Probe

ε molarer dekadischer Absorptionskoeffizient ($\frac{1}{M \cdot \text{cm}}$)

d Dicke der Küvette (cm), hier 1 cm

Markierungsgrad Der Markierungsgrad ist das Verhältnis der Konzentration des gebundenen Fluorophors (c_{FL}) und der Enzymkonzentration (c_{Enzym}).

$$\text{Markierungsgrad} = \frac{c_{FL}}{c_{Enzym}} \quad (19)$$

Falls der Fluorophor auch bei 278 nm absorbierte, wurde dessen molarer Absorptionskoeffizient bei 278 nm bestimmt und aus der gemessenen Absorbanz (A_{278} siehe Tabelle 9) die Absorbanz des Enzyms berechnet (vgl. Abbildung 12).

$$A_{278}(FL) = \frac{\varepsilon_{278}(FL)}{\varepsilon_{max}(FL)} \cdot A_{max}(FL) \quad (20)$$

$$A_{278}(Enzym) = A_{278}(Total) - A_{278}(FL) \quad (21)$$

Tabelle 9: Absorptionskoeffizienten verwendeter Fluorophore

Fluorophor	Wellenlänge / nm	$\varepsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Quelle
QD ₅₈₅	532	305 000	invitrogen
	488	530 000	invitrogen
	278	6 100 000	diese Arbeit
QD ₆₀₅	608	266 000	eBioscience
	278		diese Arbeit
F ₁	278	203 000	[2]
F ₀ F ₁	278	340 000	[2]
ATTO647 N	644	150 000	ATTO-Tech
ATTO532	532	115 000	ATTO-Tech
TMR	555	95 000	Molecular Probes
	278	19 500	[2]

mit:

A_x Absorbanz bei $\lambda = x$ nm

ε_x molarer dekadischer Absorptionskoeffizient ($\frac{1}{M \text{ cm}}$) bei $\lambda = x$ nm

FL Fluorophor

Absorptionskoeffizienten Die molaren Absorptionskoeffizienten sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

2.9 Bestimmung der Quantenausbeute von Fluorophoren

Die Fluoreszenzquantenausbeute ist das Verhältnis von emittierten zu absorbierten Lichtquanten. Aus praktischen Gründen führt man keine Absolutmessungen durch, sondern ermittelt die Quantenausbeute durch Vergleich mit einem Referenzfluorophor, dessen Quantenausbeute bekannt ist. Als Referenzfluorophor wurde in dieser Arbeit Sulforhodamin 101 verwendet, das eine Quantenausbeute von 1,0 hat [30].

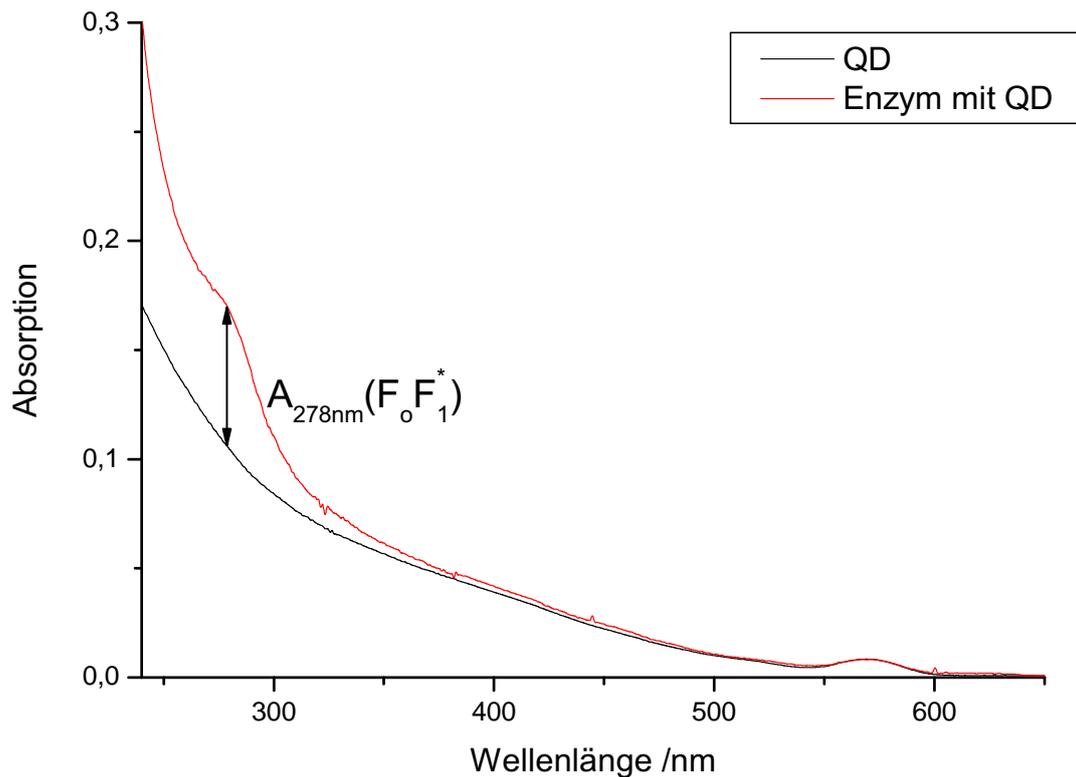


Abbildung 12: Absorptionsspektrum eines mit QD_{585} markierten F_0F_1 (rot) Zusätzlich ist ein Absorptionsspektrum des freien QD_{585} (schwarz) gezeigt. Zum genauen Vergleich wurde das Maximum des freien QDs bei 578 nm auf das Maximum des enzymgebundenen QDs normiert. Die Absorptionsdifferenz bei 278 nm entspricht der Absorption des Enzyms.

Durchführung Von beiden Fluorophoren wurde eine etwa gleich konzentrierte Lösung verwendet (ca. 50 nM, bestimmt mit Hilfe eines UV/Vis-Spektrums) und jeweils das Fluoreszenzspektrum gemessen. Es wurde bei drei verschiedenen Anregungswellenlängen gemessen (466, 476 und 486 nm). Diese dreimalige Messung verringerte Messfehler.

Auswertung Die Absorbanzen des verwendeten Fluorophors bei den jeweiligen Wellenlängen wurden aus den gemessenen Spektren entnommen. Für Sulforhodamin 101 wurden die Daten aus [31] verwendet. Die emittierte Fluoreszenzintensität wurde aus dem Integral des Fluoreszenzspektrums ermittelt. Da Anregungswellenlänge und Fluoreszenzwellenlänge sehr weit auseinander lagen, wurde auf einen Nulllinienausgleich verzichtet. Zur Auswertung wurde folgende Gleichung verwendet [32]:

$$\Phi_{Probe} = \frac{I(\lambda)_{Probe} \cdot A(\lambda)_{Ref} \cdot n_{Probe}^2}{I(\lambda)_{Ref} \cdot A(\lambda)_{Probe} \cdot n_{Ref}^2} \cdot \Phi_{Ref} \quad (22)$$

mit:

Φ_{Probe}	Quantenausbeute der Probe
Φ_{Ref}	Quantenausbeute der Referenz (Sulforhodamin 101)
$I(\lambda)_{Probe}$	Integral unter dem Emissionsspektrum der Probe bei der Anregungswellenlänge (λ)
$I(\lambda)_{Ref}$	Integral unter dem Emissionsspektrum der Referenz bei der Anregungswellenlänge (λ)
$A(\lambda)_{Probe}$	Absorbanz der Probe bei der Anregungswellenlänge (λ)
$A(\lambda)_{Ref}$	Absorbanz der Referenz bei der Anregungswellenlänge (λ)
n_{Probe}	Brechungsindex des Lösungsmittels der Probe
n_{Ref}	Brechungsindex des Lösungsmittels der Referenz

2.10 Liposomenherstellung

Für die Herstellung der Liposomen wurden verschiedene Lipide (PtdCho, PtdAc, Biotin-Lipid, TMR-Lipid und Ergosterol, genaue Bezeichnungen sind Tabelle 10 zu entnehmen) verwendet. Die Herstellung erfolgte analog zu Fischer [29].

Zur Messung an Lipiddoppelschichten (Bilayer) wurden spezielle Liposomen mit einem K^+ -Ionenkanal (Nystatin/Ergosterol) benötigt [33]. Er erfüllt zwei Aufgaben, den Ausgleich

der K^+ -Konzentration im Liposom mit der Umgebung, außerdem kann über den dann auftretenden Stromfluss die Fusion der Liposomen detektiert werden.

Die Herstellung erstreckte sich über 2 Tage. Am ersten Tag wurde das Lösungsmittel gewechselt und die Lipide beschallt. Diese müssen über Nacht eingefroren werden, um später intakte Liposomen zu erhalten. Am zweiten Tag wurde eine Dialyse durchgeführt, um das Detergenz zu entfernen. Die Lösungen, welche verwendet wurden, sind in Tabelle 10 angegeben.

2.10.1 Dialyseliposomen

Zur Herstellung von Liposomen [29] wurden 6,8 ml der PtdCho-Lösung und 3,6 ml der PtdAc-Lösung vermischt. Bei RT wurde in einem Rotationsverdampfer das Chloroform im Vakuum abgezogen. Da die Lipide im trockenen Zustand oxidationsempfindlich sind, wurde die Apparatur mit Inertgas (N_2) belüftet. Dann wurden 10 ml Beschallungspuffer zugegeben. Die Lipide wurden durch Schwenken und Vortexen vollständig gelöst. Die so hergestellte Lipid-Lösung wurde auf Eiswasser beschallt (Branson Sonifier 250, Stufe 4, Duty cycle 90 % 4x30 s mit jeweils 30 s Pause). Die Lipid-Lösung wurde über Nacht bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Dialyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10.6).

2.10.2 Ergosterol-Nystatin-Liposomen

Zur Herstellung von Ergosterol-Nystatin-Liposomen wurden 5,2 ml der PtdCho-Lösung, 2,4 ml der PtdAc-Lösung, 45 mg Ergosterol und 45 mg Nystatin vermischt. Bei RT wurde in einem Rotationsverdampfer das Chloroform im Vakuum abgezogen. Da die Lipide im trockenen Zustand oxidationsempfindlich sind, wurde die Apparatur mit Inertgas (N_2) belüftet. Dann wurden 10 ml Beschallungspuffer zugegeben. Die Lipide wurden durch Schwenken und Vortexen vollständig gelöst. Die so hergestellte Lipid-Lösung wurde auf Eiswasser beschallt (Branson Sonifier 250, Stufe 4, Duty cycle 90 % 4x30 s mit jeweils 30 s Pause). Die Lipid-Lösung wurde über Nacht bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Dialyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10.6).

Tabelle 10: Verwendete Lösungen und Puffer für die Liposomenherstellung

PtdCho-Lösung in Chloroform, Lagerung -20°C, lichtgeschützt	Phosphatidylcholin aus Hühnereigelb	25 g/l
PtdAc-Lösung in Chloroform, Lagerung -20°C, lichtgeschützt	Phosphatidsäure aus Hühnereigelb	2,5 g/l
Dialyse-Puffer 15x mit 5 M NaOH pH 8,0	Tricin	150 mM
	EDTA	3 mM
	DTT	3,75 mM
	MgCl ₂	37,5 mM
Beschallungspuffer mit 5 M NaOH pH 8,0 Lagerung -20°C	Tricin	10 mM
	EDTA	100 μM
	DTT	0,5 mM
	Cholsäure	7,2 g/l
	Desoxycholat	3,6 g/l
TMR-Lipid-Stammlösung in Chloroform, Lagerung -20°C, lichtgeschützt	N-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)- 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamin, <i>tri</i> -Ethylammoniumsalz	0,4 mM
Biotin-Lipid-Stammlösung in Chloroform, Lagerung -20°C, lichtgeschützt	N-((6-(biotinoyl)amino)hexanoyl)-1,2- dihexadecanoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamin, <i>tri</i> -Ethylammoniumsalz	2 g/l

2.10.3 Biotin-Liposomen

Zur Herstellung von biotinhaltigen Liposomen, wurden 6,8 ml der PtdCho-Lösung, 3,6 ml der PtdAc-Lösung und 200 μ l Biotin-Lipide-Stammlösung vermischt. Bei RT wurde in einem Rotationsverdampfer das Chloroform im Vakuum abgezogen. Da die Lipide im trockenen Zustand oxidationsempfindlich sind, wurde die Apparatur mit Inertgas (N_2) belüftet. Dann wurden 10 ml Beschallungspuffer zugegeben. Die Lipide wurden durch Schwenken und Vortexen vollständig gelöst. Die so hergestellte Lipid-Lösung wurde auf Eiswasser beschallt (Branson Sonifier 250, Stufe 4, Duty cycle 90 % 4x30 s mit jeweils 30 s Pause). Die Lipid-Lösung wurde über Nacht bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Dialyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10.6).

2.10.4 TMR-Liposomen

Um die Liposomen später zu detektieren, wurde fluoreszierendes Lipid zugegeben. Hierfür wurde TMR markiertes Lipid verwendet. Zu einer Mischung aus 6,8 ml PtdCho-Lösung und 3,6 ml PtdAc-Lösung wurde zusätzlich 70 μ l TMR-Lipid-Stammlösung gegeben. Bei RT wurde in einem Rotationsverdampfer das Chloroform im Vakuum abgezogen. Da die Lipide im trockenen Zustand oxidationsempfindlich sind, wurde die Apparatur mit Inertgas (N_2) belüftet. Es wurden 10 ml Beschallungspuffer zugegeben. Die Lipide wurden durch Schwenken und Vortexen vollständig gelöst. Die entstandene Lösung wurde auf Eiswasser beschallt (Branson Sonifier 250, Stufe 4, Duty cycle 90 % 4x30 s mit jeweils 30 s Pause). Die Lipid-Lösung wurde über Nacht bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Dialyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10.6).

2.10.5 TMR-Biotin-Liposomen

Für die Herstellung von fluoreszierenden, biotin-haltigen Liposomen wurde zu der Mischung aus 6,8 ml PtdCho-Lösung und 3,6 ml PtdAc-Lösung zusätzlich 70 μ l TMR-Lipid-Stammlösung und 100 μ l Biotin-Lipid-Stammlösung gegeben. Bei RT wurde in einem Rotationsverdampfer das Chloroform im Vakuum abgezogen. Da die Lipide im trockenen Zustand oxidationsempfindlich sind, wurde die Apparatur mit Inertgas (N_2) belüftet. Es wurden 10 ml Beschallungspuffer zugegeben. Die Lipide wurden durch Schwenken und Vortexen vollständig gelöst. Die entstandene Lösung wurde auf Eiswasser beschallt (Branson

Sonifier 250, Stufe 4, Duty cycle 90 % 4x30 s mit jeweils 30 s Pause). Die Lipid-Lösung wurde über Nacht bei $-30\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Dialyse durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.10.6).

2.10.6 Dialyse

Mehrere Dialysemembranen (Diachema Dialysis Membrane von Dianorm, Typ 10.14) wurden einen Tag zuvor mit H_2O gewässert. Der Dialyse-Puffer bestand aus 14 l H_2O und 1 l Dialysepuffer 15 x. Er wurde auf $30\text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Die Dialysemembranen wurden in die Dialysekammern (Dianorm, große Kammern mit 2 ml) eingespannt und mit aufgetauter Lipid-Lösung (jeweils 2 ml) befüllt. Es wurde 5 h bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ dialysiert. Jede Kammer wurde auf trübe Liposomen-Lösung geprüft, klare Lösungen wurden verworfen. Die Lösung wurde geerntet, in $500\text{ }\mu\text{l}$ fraktioniert, in flüssigem N_2 schockgefroren und in flüssigem N_2 gelagert. Jede Liposomencharge wurde mittels der Messung der ATP Synthese eines Referenz-Enzyms auf Tauglichkeit getestet (siehe Abschnitt 2.11). Taugliche Liposomen wurden für weitere Messungen verwendet.

2.11 Rekonstitution von F_0F_1

Die Rekonstitution von H^+ -ATPsynthasen in Liposomen wurde verwendet, um erstens die Tauglichkeit der Liposomen aus Abschnitt 2.10 an Hand der ATP-Syntheseaktivität zu überprüfen und zweitens, um Proben für die Einzelmolekülexperimente zu generieren. Die Proteinkonzentration wurde für die Aktivitätsmessungen auf 80 nM eingestellt. Dies bedeutet, dass im Mittel ca. 4 F_0F_1 pro Liposom eingebaut werden (Durchmesser der Liposomen ca. 120 nm [34]). Für die Proben der Einzelmolekülmessung wurde die Konzentration auf 20 nM eingestellt, so dass nur eine H^+ -ATPsynthase pro Liposom enthalten war.

Für die Rekonstitution wurden die Lösungen aus Tabelle ?? verwendet:

Aktivitätsmessungen mit 4 H^+ -ATPsynthasen pro Liposom: MgCl_2 -Lösung (0,5 μl , 1 M) wurden mit 100 μl Liposomen versetzt. Zu dieser Lösung wurde 2,2 μl einer EF_0F_1 -Lösung (7,35 μM) gegeben. Liposomenpuffer (82 μl) wurde zugegeben. Unter Vortexen wurde diese Lösung mit 16 μl Triton X-100-Lösung versetzt. Die entstandene Lösung wurde bei RT 1 h gerührt. Um das Triton X-100 zu entfernen, wurden zu der Lösung 64 mg leicht feuchte Biobeads gegeben und erneut 1 h gerührt. Danach wurden die Biobeads

Tabelle 11: Verwendete Lösungen und Puffer für die Rekonstitution

MgCl₂	MgCl ₂	1 M
Triton X-100	fertige Lösung von Boehringer	100 g/l
Biobeads (SM-2)	Biobeads in Methanol	
Liposomenpuffer mit 5 M NaOH pH 8,0	Bernsteinsäure	20 mM
	Tricin	20 mM
	KCl	0,6 mM

abgetrennt. Die so hergestellten Proteoliposomen können bis zu eine Woche bei RT für die ATP Synthesemessung gelagert werden, ohne dass ein Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte.

Einzelmolekülmessungen mit 1 H⁺-ATPsynthase pro Liposom: MgCl₂-Lösung (2,5 μl, 1 M) wurden mit 500 μl Liposomen versetzt. Zu dieser Lösung wurde 2,7 μl einer *EF₀F₁*-Lösung (7,35 μM) gegeben. Liposomenpuffer (409 μl) wurde zugegeben. Unter Vortexen wurde diese Lösung mit 80 μl Triton X-100-Lösung versetzt. Die entstandene Lösung wurde bei 1 h RT gerührt. Um das Triton X-100 zu entfernen, wurden zu der Lösung 320 mg leicht feuchte Biobeads gegeben und erneut 1 h gerührt. Danach wurden die Biobeads abgetrennt. Die so hergestellten Proteoliposomen können bis zu eine Woche bei RT für die ATP Synthesemessung gelagert werden, ohne dass ein Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte.

2.12 Aktivitätsmessung der H⁺-ATPsynthase

2.12.1 ATP Synthese

Da für die ATP Synthese eine transmembrane elektrochemische Potentialdifferenz der Protonen notwendig ist (vgl. Abschnitt 1), kann die ATP Synthesemessung zur Untersuchung der Tauglichkeit der Liposomen verwendet werden. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der ATP Synthese wurde hier das Luciferin/Luciferase-System verwendet [29].

Durchführung Die einzelnen Lösungen können Tabelle 12 entnommen werden.

Am Versuchstag wurden die bei -20°C gelagerten LI- bzw. LII-Puffer aufgetaut und mit folgenden Zusätzen ergänzt:

Tabelle 12: Verwendete Lösungen und Puffer für die Synthesemessung

ADP (Mononatriumsalz)	ADP	100 mM
ATP (Dinatriumsalz)	ATP	10 μ M
Valinomycin	in Methanol	10 mM
LI-Puffer mit 1 M NaOH pH 4,7	Bernsteinsäure	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	5 mM
	KOH	0,6 mM
LII-Puffer mit 5 M NaOH pH 8,8	Tricin	200 mM
	NaH ₂ PO ₄	5 mM
	KOH	160 mM
ATP-Monitoring Kit	in H ₂ O	

LI (5 ml)	12,5 μ l	1 M MgCl ₂	(Endkonzentration 2,5 mM)
	4,3 μ l	117 mM ADP	(Endkonzentration 100 μ M)
	10 μ l	10 mM Valinomycin	(Endkonzentration 20 μ M)
LII (25 ml)	62,5 μ l	1 M MgCl ₂	(Endkonzentration 2,5 mM)
	21,4 μ l	117 mM ADP	(Endkonzentration 100 μ M)

Kalibrierung Um aus dem Schreiberausschlag die ATP-Konzentration zu bestimmen, muss vor jeder Messung die Apparatur kalibriert werden. Zudem ist ADP mit ca. 0,1 % ATP verunreinigt [13], diese Verunreinigung kann bei den Kalibrierung mitbestimmt werden.

Hierzu wurden 940 μl LII-Puffer und 20 μl ATP-Monitoring Kit in einer 2 ml Küvette (Clinicon) vorgelegt und durch vorsichtiges Drehen vermischt. Das Untergrundsignal dieser Lösung wurde aufgenommen. Durch Zugabe von 40 μl ATP-Standard wurde die Konzentration um 4×10^{-7} M erhöht und das Signal erneut aufgenommen. Zur Kalibrierung wurden 4 solcher Messungen durchgeführt.

Synthesemessung Um nun die ATP-Syntheseaktivität der Probe zu bestimmen, wurden 20 μl der zu testenden Proteoliposomenlösung mit 80 μl LI-Puffer 3 min inkubiert. Währenddessen wurden 880 μl LII-Puffer in einer Küvette mit 20 μl ATP-Monitoring Kit versetzt, durch vorsichtiges Drehen der Küvette vermischt und eine Untergrundlinie aufgezeichnet. Danach wurden nach 3 min Inkubationszeit 100 μl der sauren Proteoliposomenlösung eingespritzt. Der Blattvorschub wurde anfangs auf 5 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$ eingestellt und nach ca. 10 s Messzeit (bis die Anfangssteigung abflacht) auf 0,1 $\frac{\text{mm}}{\text{s}}$ verringert. Die Messung wurde dreimal wiederholt. Bei geringen Proteinkonzentrationen wurden 30 μl Proteoliposomen und 120 μl LI-Puffer verwendet werden.

Auswertung In Abbildung 13 ist eine Eichmessung schematisch dargestellt. Mit Gleichung 23 konnte aus der Höhe des Schreiberausschlag bei dem Untergrundsignal und bei dem Eichsignal die Konzentration des ATPs im LII-Puffer bestimmt werden. Über den Untergrund bei der Synthesemessung war damit auch diese Messung kalibriert.

$$C_{LII} = \frac{H_U V_2 C_{st}}{H_E V_1} \quad (23)$$

Mit:

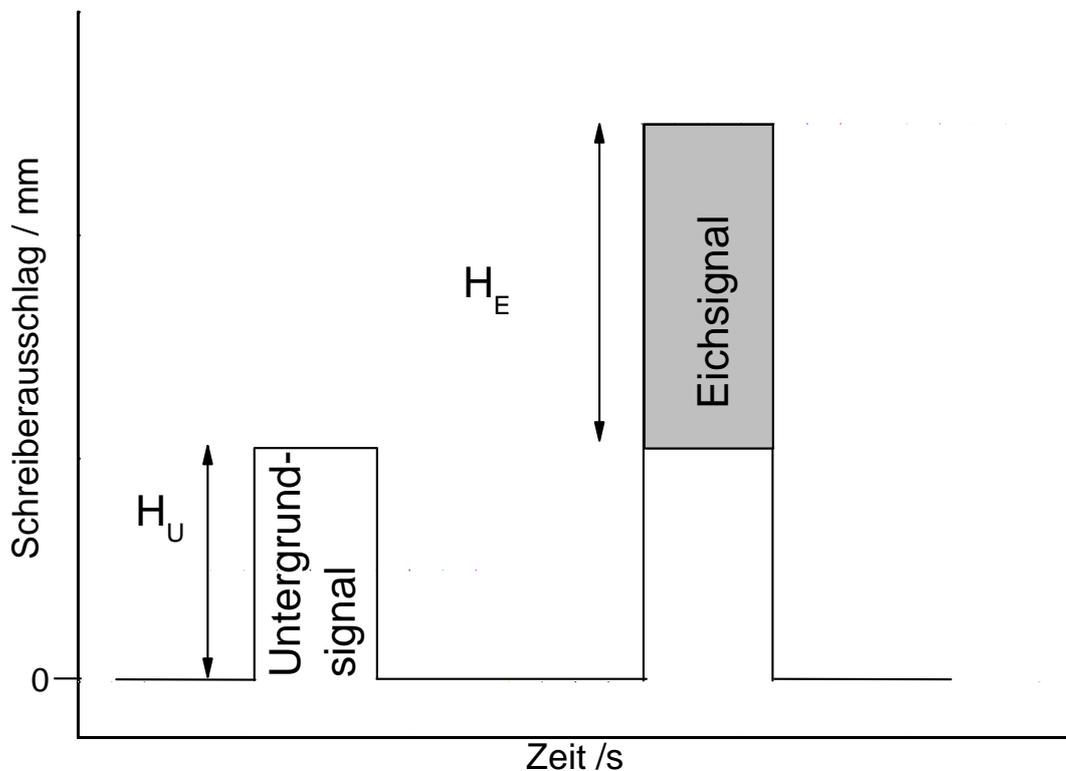


Abbildung 13: Schema der Eichmessung

- C_{LII} ATP-Konzentration in LII (M)
- H_U Höhe Untergrundsignal (mm)
- H_E Höhe Eichsignal (mm)
- V_1 Volumen LII (μ l) hier 940 μ l
- V_2 Volumen LII + Kit (μ l) hier 960 μ l
- C_{st} ATP-Konzentration des Eichsignals (M) hier 4×10^{-7} M

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der ATP Synthese wurde die Höhe des Untergrundsignals H_U in $[ATP \frac{1}{mm}]$ und die Anfangssteigung m verwendet. Abbildung 14 zeigt schematisch eine ATP Synthesemessung. Mit Gleichung (24) wurde die Geschwindigkeit

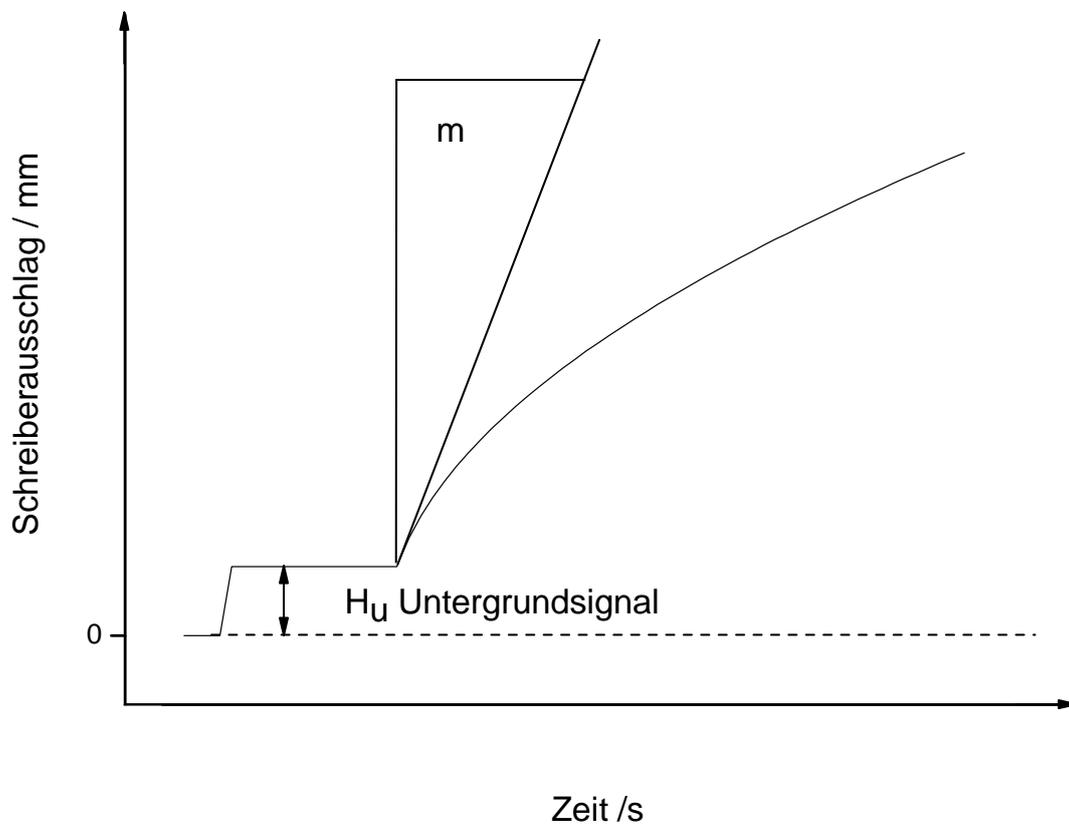


Abbildung 14: Schema der Messung der ATP Syntheseaktivität

der ATP-Synthese R_S in $[\text{M s}^{-1}]$ bestimmt:

$$R_S = \frac{C_{LII} \frac{V_1}{V_2} m}{H_U} \quad (24)$$

Mit:

- C_{LII} ATP-Konzentration in LII (M)
- V_1 Volumen LII (μl)
- V_2 Volumen LII + Kit (μl)
- m Anfangssteigung der ATP Synthese (mm s^{-1})

Die Geschwindigkeit der ATP Synthese T_S (Wechselzahl = *Turnover* = Anzahl der pro Sekunde synthetisierten ATP Moleküle pro EF_0F_1 -Molekül) ergibt sich mit der Enzym-

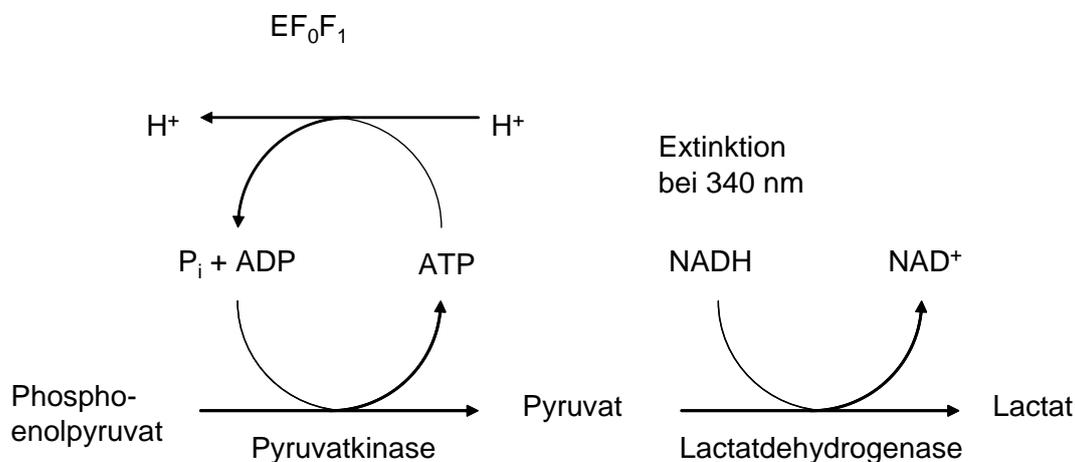


Abbildung 15: Reaktionsschema des gekoppelten Enzymtests bei der ATP Hydrolyse

konzentration C_E im Ansatz aus Gleichung (25).

$$T_S = \frac{R_S}{C_E} \quad (25)$$

2.12.2 ATP Hydrolyse

Zur Charakterisierung von F_1 -His-Tag erfolgte die ATP Hydrolysemessung wie bei Fischer [29] beschrieben. Es handelt sich um einen gekoppelten Enzymtest. Das aus der Hydrolyse von ATP entstehende ADP wird durch die Pyruvatkinase und Phosphoenolpyruvat wieder zu ATP phosphoryliert, hierbei entsteht Pyruvat. Dieses Pyruvat wird, katalysiert durch die Lactatdehydrogenase, zu Lactat abgebaut. Bei diesem Schritt wird NADH verbraucht, dessen Abnahme durch die Messung der Absorbanz bei 340 nm verfolgt wird. Tabelle 13 zeigt den verwendeten Hydrolyse-Kit.

Durchführung Eine Halbmikroküvette (PMMA) mit 1 ml Hydrolyse-Kit (vgl. Tabelle 13) wurde auf 37 °C temperiert. Die Küvette wurde in den Küvettenhalter des Spektrometers (Lambda 2, Perkin Elmer) eingesetzt und ca. 20 s die Nulllinie bei 340 nm aufgezeichnet. Durch Zugabe der Probe mit F_1 (20 μ l) wurde die Hydrolyse gestartet. Das Signal

Tabelle 13: Zusammenstezung des Hydrolyse-Kit

Hydrolyse-Kit Lagerung -20°C, in 1 ml Plastikkuvetten (Plastibrand)	Tris-HCl pH 8	100 mM
	KCl	25 mM
	MgCl ₂	4 mM
	Phosphoenolpyruvat	2,5 mM
	ATP	2 mM
	NADH	0,4 mM
	Lactatdehydrogenase (850 U/mg bei 37 °C)	16 U/ml
	Pyruvatdehydrogenase (500 U/mg bei 37 °C)	18 U/ml

wurde weitere 300 s aufgezeichnet.

Auswertung Die Geschwindigkeit der ATP Hydrolyse $\frac{\partial[ATP]}{\partial t}$ berechnet sich wie folgt:

$$A_{340} = d \varepsilon_{340} [NADH] \quad (26)$$

$$\frac{\partial A_{340}}{\partial t} = d \varepsilon_{340} \frac{\partial [NADH]}{\partial t} \quad (27)$$

mit:

$$\frac{\partial [ATP]}{\partial t} = - \frac{\partial [NADH]}{\partial t} \quad (28)$$

ergibt sich:

$$\frac{\partial [ATP]}{\partial t} = - \frac{1}{d \varepsilon_{340}} \frac{\partial A_{340}}{\partial t} \quad (29)$$

$\frac{\partial [NADH]}{\partial t}$	Änderung der NADH-Konzentration
$\frac{\partial [ATP]}{\partial t}$	ATP Hydrolysegeschwindigkeit
A_{340}	Absorbanz bei 340 nm
ε_{340}	Absorptionskoeffizient bei 340 nm ($6220 \frac{1}{Mcm}$)
d	Länge der Messküvette

2.13 Ablösen und Rückbinden des F₁-Teils von F₀F₁-Liposomen

Für Einzelmolekül-FRET-Messungen benötigt man ein doppelt markiertes Enzym. Dieses Enzym wurde dadurch hergestellt, dass zuerst F₀F₁ markiert und in Liposomen eingebaut

Tabelle 14: Verwendete Puffer für die F₁-Ablösung und Rückbindung

Stripping-Puffer mit NaOH auf pH 8,0 Lagerung RT	Tricin	1 mM
	EDTA	0,5 mM
	DTT	1 mM
	Glycerin	4 % (v/v)
Rückbindungs-Puffer mit NaOH pH 8,0 Lagerung RT	Bernsteinsäure	20 mM
	Tricin	20 mM
	KCl	0,6 mM
	NaCl	50 mM
NaCl Lagerung 4 °C	MgCl ₂	2,5 mM
	NaCl	1 M
MgCl₂ Lagerung 4 °C	MgCl ₂	1 M
EDTA Lagerung -20 °C	EDTA	100 mM

wurde. Dann wurde der F₁-Teil entfernt und durch einen zuvor markierten F₁-Teil ersetzt. Das Ablösen und das Rückbinden wurde mithilfe von ATP-Synthesemessungen kontrolliert (vgl. Abschnitt 2.12).

2.13.1 Ablösen des F₁-Teils

Um den F₁-Teil abzulösen, wurde die Ionenstärke der Lösung stark reduziert. Um eine vollständige Ablösung zu erreichen, wurde zweimal mit Strippingpuffer inkubiert und zentrifugiert. Folgende Punkte müssen für eine vollständige Ablösung von F₁ beachtet werden:

- kleine Proteoliposomenkonzentrationen
- alle Arbeitsschritte bei RT (Kälte wirkt der F₁-Ablösung entgegen)
- geringe Ionenstärke
- Mg²⁺ entfernen

Durchführung F_0F_1 -Liposomen (1 ml, 80 nM) wurden mit 24 ml Stripping-Puffer (vgl. Tabelle 14) verdünnt und im Anschluss zentrifugiert (24 °C, 264 428 g, 90 min, Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-70, 60 000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment (F_0F_1 -Liposomen) in 25 ml Stripping-Puffer resuspendiert und 90 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (24 °C, 264.428 g, 90 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 25 ml Stripping-Puffer aufgenommen. Es wurde ein weiteres Mal bei RT 90 min inkubiert. Auch die Zentrifugation wurde ein weiteres Mal durchgeführt, das Sediment wurde abschließend in 150 μ l Stripping-Puffer aufgenommen. Die F_0 -Liposomen wurden bei RT einen Tag gelagert oder alternativ in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Es wurde eine Probenmenge von 10 μ l zur ATP-Synthesemessung (siehe Abschnitt 2.12) entnommen.

2.13.2 Rückbindung von F_1 -Teilen

F_1 wird im 1,5-fachen Überschuss zum F_0 -Teil in Anwesenheit von Mg^{2+} zu den F_0 -Liposomen gegeben.

Durchführung Zu 190 μ l F_0 -Liposomen (14 pmol) wurden 0,5 μ l 1 M $MgCl_2$ (Endkonzentration 2,5 mM) und 10 μ l 1 M NaCl (Endkonzentration 50 mM) gegeben. Diese Lösung besitzt unter der Annahme, dass während der Rekonstitution und des Ablösens keine Verluste entstanden sind, eine F_0 -Konzentration von 75 nM. Es wurde ein 1,5 facher Überschuss an F_1 (21 pmol) zugegeben. Im Anschluss wurde 45 min bei 37 °C inkubiert und 90 min bei 0 °C. Es wurden ca. 25 ml Rückbindungspuffer (vgl. Tabelle 14) und 25 μ l EDTA-Lösung (Endkonzentration 0,1 mM) zugegeben. Danach wurde zentrifugiert (24 °C, 264 428 g, 90 min, Beckman Ultrazentrifuge L7, Rotor Ti-70, 60 000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 75 μ l Rückbindungspuffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, fraktioniert und bei -80 °C gelagert.

2.14 Modifizierung des BSA

Für die Immobilisierung wurde unter anderem Biotin-BSA verwendet. Dies wurde zuvor mithilfe von BSA und Biotinmaleimid hergestellt. Die Abtrennung von nicht reagierten Maleimid erfolgte mithilfe einer Zentrifugationssäule.

2.14.1 Durchführung

Es wurde eine 1,54 mM Biotinmaleimid-Lösung (Endkonzentration 180 μM in einem Verhältnis von 6:1 mit BSA (Endkonzentration 30 μM) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nicht gebundenes Maleimid wurde über eine Zentrifugationssäule (Länge 7,5 cm, $\varnothing = 0,5$ cm, Sephadex G25 fine in MOPS-Puffer pH 7,5, 2 min mit 561 g bei 4°C vorzentrifugiert (Hereaus Megafuge 1.0 R, Rotor 3360, 1800 rpm)) 2 min mit 443 g (1600 rpm) bei 4°C abgetrennt. Die Konzentration des Proteins wurde spektroskopisch ermittelt ($\varepsilon = 43\,824\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Lösung wurde aliquotiert und bei -30°C gelagert.

2.15 Immobilisierung der Liposomen

Um die Liposomen mittels Fluoreszenzmikroskopie immobilisiert zu beobachten, wurden verschiedene Methoden zur Immobilisierung angewendet.

1. Es wurden Liposomen über BSA direkt an der Oberfläche immobilisiert [35]. Dies kann zur Folge haben, dass das Enzym an der Oberfläche denaturiert.
2. Es wurden Liposomen an einer PEG-Biotin Oberfläche immobilisiert. Dies verhindert unspezifische Bindungen an die Oberfläche und die Denaturierung der Liposomen. Für beide Methoden mussten die Gläser zuvor gereinigt werden. Es wurde eine Vorschrift von Ha [36] verwendet.

2.15.1 Behandlung der Gläser

Um eine definierte Oberfläche auf den Deckgläsern zu schaffen und eventuell vorhandene lumineszierende Teilchen der Gläser zu entfernen, wurden die Deckgläser, die zur Immobilisierung verwendet wurden, mit verschiedenen Lösungen im Ultraschallbad behandelt. Zwischen jeder Beschallung wurden die Deckgläser mit H_2O gespült.

Zuerst wurden die Deckgläser 1 h in einem Detergenz (Hellmanex II, 2 %) beschallt, anschließend 25 min in H_2O , dann 20 min in Aceton, 5 min in H_2O , 15 min in Ethanol und 15 min in KOH (1 M). Nach weiteren 15 min in H_2O war die Behandlung beendet. Bis zur Verwendung wurden die Gläser in H_2O gelagert.

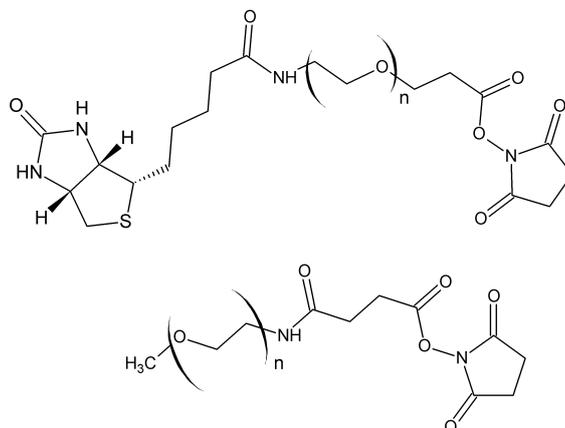


Abbildung 16: Strukturformel der verwendeten PEGs

Oben ist das Biotin-PEG gezeigt, an der rechten Seite ist eine NHS-Gruppe (N-Hydroxysuccinimid) angebracht. Dies wird für die Kopplung an die NH_2 -Gruppen der Oberfläche benötigt (vgl. Abbildung 20). Unten ist das Methoxy-PEG gezeigt, auch dieses hat eine NHS-Gruppe zur Bindung an die Oberfläche.

2.15.2 Biotin-BSA/Streptavidin

Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Auf die Gläser wurde Biotin-BSA-Lösung ($50 \mu\text{l}$, 1 mg/ml) gegeben. Nach 10 min wurde das Glas mit Liposomenpuffer (vgl. Abschnitt 2.11, $400 \mu\text{l}$) gespült. Im Anschluss wurde Streptavidin-Lösung ($50 \mu\text{l}$, $0,2 \text{ mg/ml}$) auf die Oberfläche gegeben, nach weiteren 10 min wurde wieder mit Liposomenpuffer ($400 \mu\text{l}$) gespült. Danach wurden die hergestellten Biotin-Liposomen ($50 \mu\text{l}$, ca. $0,8 \text{ nM}$) aufgetragen. Nach 10 min wurden nochmals mit Liposomenpuffer ($2 \times 400 \mu\text{l}$) gespült. Bis zur Messung wurde die Oberfläche feucht gehalten, indem sie in einem Becherglas mit H_2O gelagert wurden. Abbildung 17 zeigt schematisch die Immobilisierung von Liposomen mittels Biotin-Streptavidin-Biotin.

2.15.3 Silan-Biotin-PEG/Streptavidin

Silanisierung Alle Arbeiten wurden bei RT und - um H_2O auszuschließen - unter einer Aceton-Atmosphäre durchgeführt, indem in ein Becherglas einige ml Aceton gegeben wurden und dieses mit einem Uhrglas zugedeckt wurde. Die Gläser wurden in einen speziellen Teflonhalter gesteckt, welcher in das Becherglas gestellt wurde. Es wurde darauf geachtet, dass das Glas nicht das Aceton im Becherglas berührt. Es wurden $10 \mu\text{l}$ einer 1:200 Verdünnung eines Isocyanatosilans (3-Isocyanatopropyltrimethoxysilan) als Tropfen auf das Glas

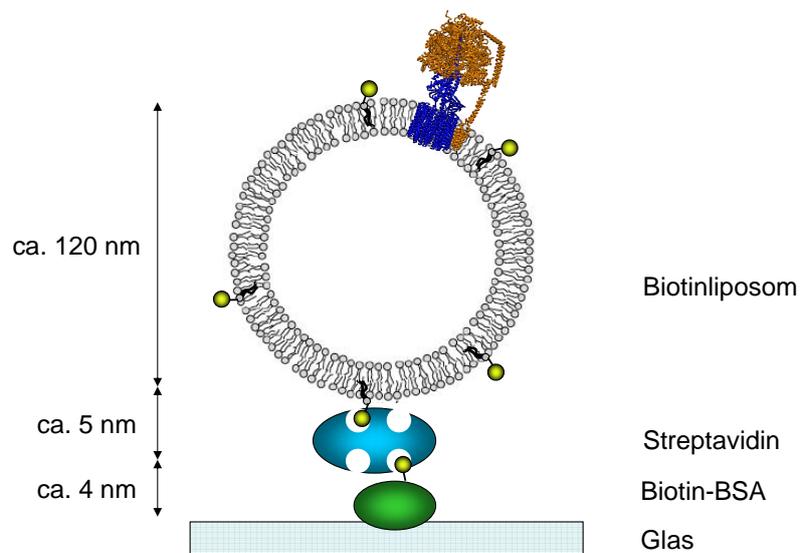


Abbildung 17: Schema zur Immobilisierung der Liposomen mit Biotin-BSA
Die grünen Kugeln stehen für Biotin-Moleküle. In den Liposomen (132 000 Lipide pro Liposom, [28]) befanden sich ca. 200 Biotin-Lipid-Moleküle in einem Liposom, ein BSA-Protein hatte ca. 6 Biotine kovalent gebunden. Diese sind aber wegen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Es befand sich eine H^+ -ATPsynthase in einem Liposom.

Tabelle 15: Verwendete Puffer und Lösungen für die Immobilisierung

Biotin-BSA-Lösung Lagerung -20 ° C	Biotin-BSA	1 mg/ml
Streptavidin-Lösung Lagerung -20 ° C	Streptavidin	0,2 mg/ml
Isocyanatosilan	(3-Isocyanatopropyltrimethoxysilan)	0,5 % (v/v)
Biotin-Maleimid-Lösung Lagerung -20 °C	Biotin-Maleimid	1 mg/l
PEG-Lösung in NaCO ₃ pH 8,3 Lagerung -20 °C	Biotin-PEG Methoxy-PEG	0,5 (w/v) 20 (w/v)

aufgetragen. Nach 2-3 min wurde die Lösung mit Aceton abgespült. Im Anschluss wurde nochmals mit H₂O gespült und die Gläser getrocknet. Bis zur Verwendung wurden die Gläser in Linsenwischtüchern (Thorlabs) gelagert. In Abbildung 18 ist die Reaktion gezeigt.

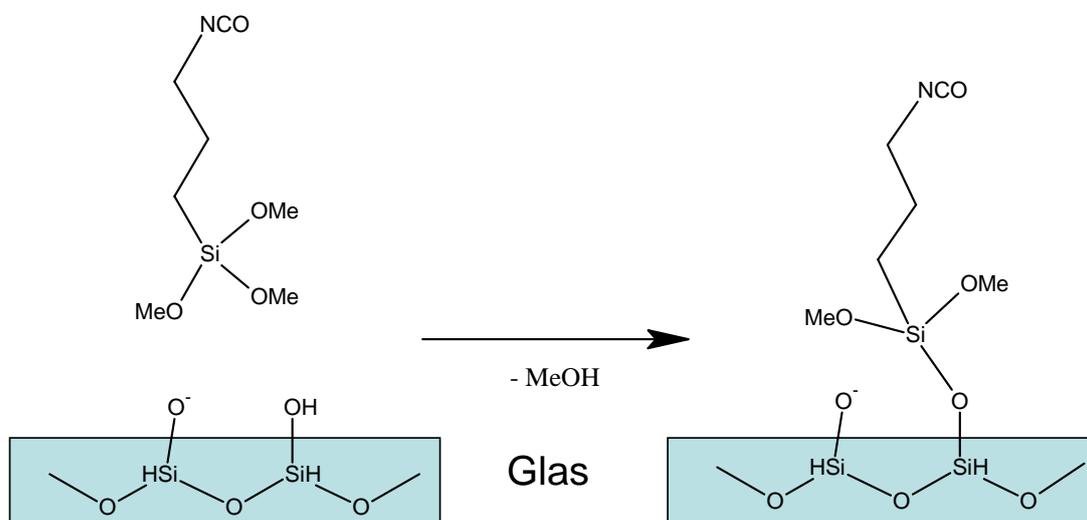


Abbildung 18: Silanisierung der Glasoberfläche

Immobilisierung Für die Kopplung der silanisierten Oberfläche mit PEG brauchte man Aminogruppen an der Oberfläche. Um diese aus den Isocyanaten zu erhalten, wurde auf die Gläser $20 \mu\text{l}$ $0,1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ gegeben und diese 30 min inkubiert. Die Reaktion ist in Abbildung 19 gezeigt. Danach wurden die Gläser mit Wasser gespült. Anschließend wurde mit $64 \mu\text{l}$ PEG-Lösung (vgl. Tabelle 15) mindestens 3 h, besser über Nacht, inkubiert. Die Gläser wurden mit $400 \mu\text{l}$ Liposomenpuffer gespült. Auf diese Oberfläche wurde Streptavidin-Lösung ($50 \mu\text{l}$, $0,2 \text{ mg/ml}$) gegeben und 10 min gewartet. Die Oberfläche wurde mit $400 \mu\text{l}$ Liposomenpuffer gespült und dann eine 1:50 Verdünnung der zu messenden Biotinliposomen ($50 \mu\text{l}$, ca. $0,8 \text{ nM}$) gegeben. Nach 10 min wurde dieses Glas 2 mal mit $400 \mu\text{l}$ gespült. Im Anschluss konnte die Probe gemessen werden.

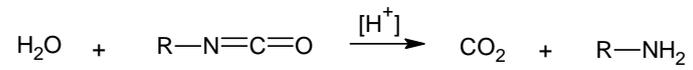


Abbildung 19: Bildung des Amins aus der Isocyanatgruppe an der Oberfläche

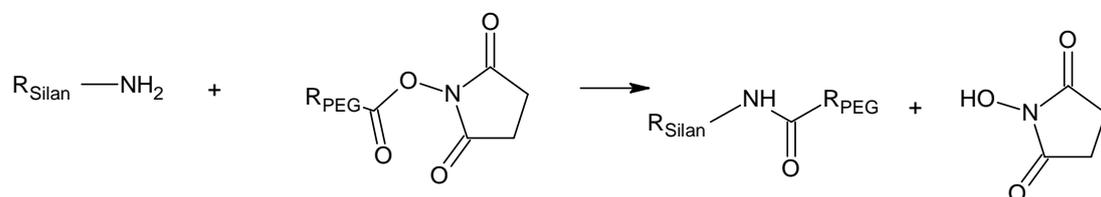


Abbildung 20: Reaktion zur Bindung des Biotin- bzw. Methoxy-PEG-NHS an das Amin des Silans an der Oberfläche

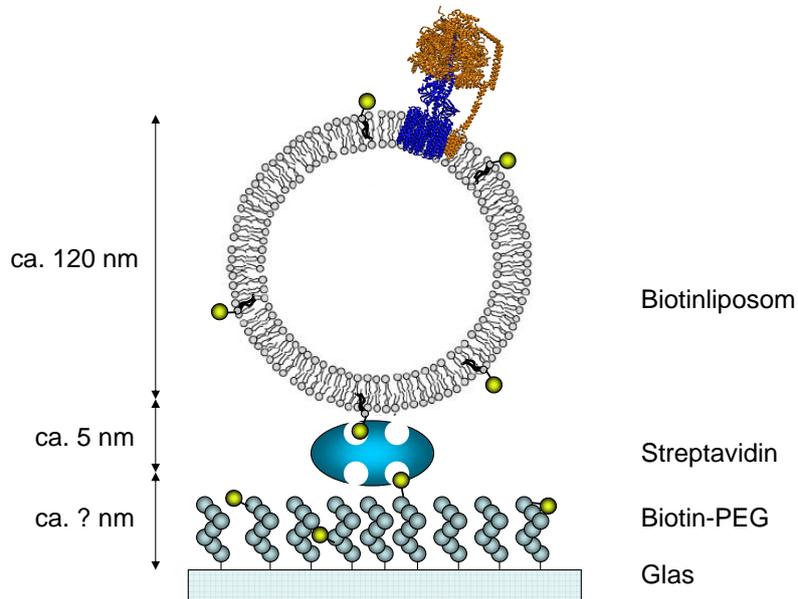


Abbildung 21: Schema zur Immobilisierung von Liposomen mit PEG-Biotin
 Die grünen Kugeln stehen für Biotin-Moleküle. In den Liposomen (132 000 Lipide pro Liposom, [28]) befanden sich ca. 200 Biotin-Lipid-Moleküle in einem Liposom, das Verhältnis von Methoxy-PEG zu Biotin PEG war 40:1. Es befand sich eine H^+ -ATPsynthase in einem Liposom.

2.16 Erzeugen der Lipiddoppelschicht

Es gibt mehrere Möglichkeiten, Lipiddoppelschichten (Bilayer) zu erzeugen. Hier wurde die „Painted planar lipid bilayer“-Methode verwendet [21], wie sie von der Arbeitsgruppe von Prof. Wagner, Universität Osnabrück durchgeführt wird [22]. Zuerst wird das Chloroform entfernt, in welchem die Lipide gelagert sind. Das Lipid wird in n-Decan aufgenommen (18 mg/ml) und diese Lösung mit einer Spritze über ein Loch in einer Teflonfolie gestrichen. Diese Teflonfolie ist in eine Meßzelle (vgl. Abbildung 22) eingespannt.

Tabelle 16: Verwendete Lösungen für die Bilayer

Lipidstammlösung	PtdCho-Lösung (vgl. Abschnitt 2.10)	6,8 ml
	PtdAc-Lösung (vgl. Abschnitt 2.10)	3,6 ml
n-Decan	n-Decan	

2.16.1 Vorbereitung der Lipidlösung

Die 100 μl Lipidstammlösung wurden in ein braunes Gläschen gefüllt. Anschließend wurde am Vakuum das Chlorofom entfernt. Der Druck sollte 30 min unter 25 mbar liegen. Im Anschluss wurde das Lipid in 100 μl n-Decan aufgenommen.

2.16.2 Aufbau der Messzelle

In Abbildung 22 ist der Aufbau schematisch dargestellt. In Tabelle 17 sind die verwendeten Lösungen zusammengefasst. Die genauen Daten der Teflonmesszelle sind im Anhang (vgl. Abbildung) zu finden. Auf die Teflonmesszelle wurde doppelseitiges Klebeband (SCOTCH-3M Doppelseitiges Klebeband, transparent, 19 mm x 33 m (B x L)) geklebt. Das mittlere Loch zur *cis*-Kammer wurde mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Das Klebeband wurde mit der stumpfen Seite des Skalpells glattgestrichen und die überstehenden Teile des Klebebands wurden mit dem Skalpell entfernt. Auf dieses Klebeband wurde eine Teflonmembran (S4 PTFE 0,025 mm x 25 mm, Fa. H. Sauf, Laborbedarf) aufgeklebt. In die Teflonmembran wurde mit einer Nähnadel eine Delle gedrückt. Diese Delle wurde dann mit einem elektrischen Funken vergrößert, wobei darauf geachtet wurde, dass sich ein gleichmäßiger Rand bildet. Dieses Loch sollte möglichst zentral in der Messzelle sein. Die Teflonmembran wurde mit der Rückseite des Skalpells glattgestrichen. Auf eine Schablone wurde ein weiteres doppelseitiges Klebeband geklebt (vgl. Abbildung 22, 2. doppelseitiges Klebeband), und ein Teil wurde entsprechend der Schablone mit dem Skalpell ausgeschnitten. Das Klebeband wurde dann von der Schablone entfernt und so auf die Messzelle geklebt, dass die beiden *trans*-Kammern untereinander verbunden waren und zusätzlich mit dem Loch in der Teflonmembran zur *cis*-Kammer. Die überstehenden Teile des Klebebands wurden mithilfe des Skalpells entfernt. Das 2. doppelseitige Klebeband wurde glattgestrichen. Auf dieses Klebeband wurde ein rundes Objektträgerglas (\varnothing 30 mm) geklebt. Mithilfe eines Laborwischuches wurde das Glas fest angedrückt, um Fingerabdrücke zu vermeiden.

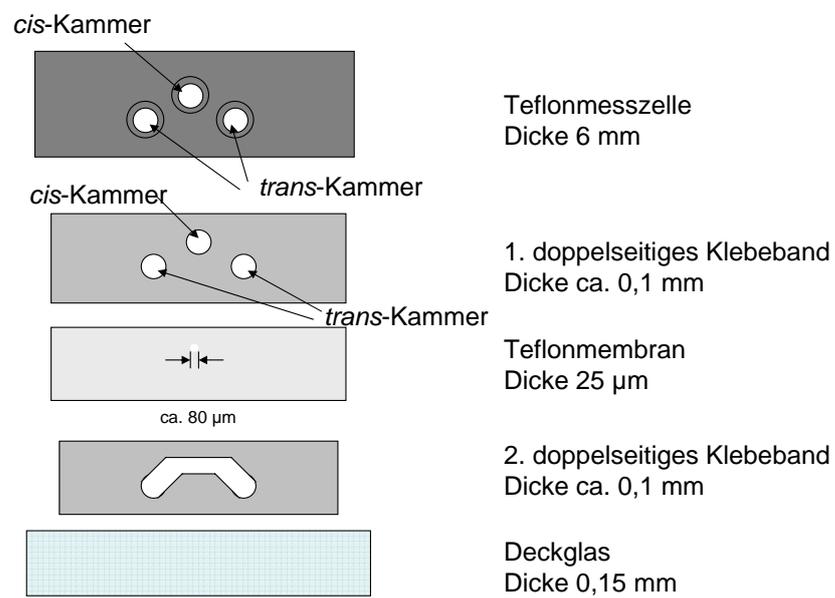


Abbildung 22: Aufbau der Zelle für die Erzeugung der Bilayer

Die einzelnen Komponenten wurden in der Reihenfolge von oben nach unten auf die Teflonmesszelle geklebt.

Anschließend wurde die Messzelle mit 400 μl *trans*-Puffer gespült, in die Halterung für den Scanner eingebaut und mit 400 μl *trans*-Puffer gefüllt. Es wurde eine Agaroselösung (vgl. Tabelle 17) erwärmt und zwei kurze Schläuche in diese Lösung gehalten, die sich durch die Kapillarkräfte selber befüllen. Als Elektroden wurden zwei Silberdrähte verwendet, die zuvor 1 h in eine Chlorierungslösung getaucht wurden (vgl. Tabelle 17). Diese Prozedur muss ca. alle 3 Monate wiederholt werden. Die Elektroden wurden in die Schläuche gesteckt und dann mit dem Vorverstärker (Verstärker mit Spannungsquelle, PC-ONE, Dragan) verbunden. Der Verstärker war mit einem Oszilloskop verbunden. Die Stromstärke, die mit dem Verstärker gemessen wurde, wurde als Spannung am Oszilloskop angezeigt.

Es wurde eine Spannung von 20 mV an der Stromquelle eingestellt und eine Stromstärke von etwa 500 pA gemessen. Mit einer Hamiltonspritze, deren Spitze um 90° gebogen war, wurde die n-Decan/Lipidlösung (siehe Unterkapitel 2.16.1) aufgenommen. Der Stempel der Spritze wurde soweit gedrückt bis ein Tropfen an der Spitze zu erkennen war. Dieser Tropfen wurde an einem Papiertuch abgewischt. Mit der Spitze wurde nun über das Loch in der Teflonmembran gestrichen. Es bildete sich eine Bilayer aus, was durch eine Messung des Stroms zwischen der *cis*-Kammer und *trans*-Kammer überprüft wurde. Nimmt der Strom bei dieser Prozedur auf einen konstanten Wert ab, der durch Veränderung der Spannung kleiner als die Auflösungsgrenze der Apparatur war, und nicht beobachtet werden konnte, war die Bilayer gebildet worden. Durch das Mikroskop wurde optisch geprüft, ob die Bilayer wirklich intakt war. Die Beobachtung eines dunklen Zentrums und dunkler Ränder deuten auf die Bildung einer Bilayer hin.

2.16.3 Messung an der Bilayer

Nachdem die Zelle wie in 2.16.2 beschrieben aufgebaut worden war, konnte die Lösung in der *cis*-Kammer entfernt werden und es wurden 100 μl *cis*-Puffer eingefüllt. Zur Kontrolle wurde die Bilayer zuerst optisch überprüft. Man erkannte die Lipidbilayer daran, dass im Vergleich zum offenen Loch der äußere Rand schwarz war. Dies war besonders gut zu erkennen, wenn die z-Position verändert wurde. Die Bilayer wurde danach noch elektrisch überprüft, indem die Spannung zwischen +60 mV und -60 mV variiert wurde. Bei einer intakten Bilayer wurde keine Veränderung im Stromfluss beobachtet. Der beobachtete Wert von 1 pA wurde als Nullpunkt verwendet.

Dann wurde eine Lösung aus Ergosterol/Nystatin-Liposomen mit eingebauter und markierter H⁺-ATPsynthase (2 μl , 40 nM, vgl. Abschnitt 2.11) in die *cis*-Kammer gegeben. Nach

Tabelle 17: Verwendete Lösungen für die Messung an der Bilayer

<i>trans</i>-Puffer	Bernsteinsäure	20 mM
	Tricin	20 mM
	NaCl	60 mM
	KCl	0,6 mM
<i>cis</i>-Puffer	Bernsteinsäure	20 mM
	Tricin	20 mM
	NaCl	60 mM
	KCl	200 mM
Ca²⁺-Lösung	CaCl ₂	100 mM
n-Decan/Lipidlösung	siehe Unterkapitel 2.16.1	
Chlorierungslösung	konz. HNO ₃	1 Teil
	KCl 3 M	2 Teile
Agaroselösung	Agarose	1,5 %
	KCl	2 M
	MOPS/Tris pH 7	10 mM

10 min wurden 10 μl CaCl_2 (100 mM) zu gegeben. Die Fusion wurde anhand der Stromstärke durch die Lipidbilayer verfolgt. Nach einer erfolgreichen Fusion stieg die Stromstärke an. Für die optischen Untersuchungen wurde entweder das TIRF- oder das konfokale Mikroskop verwendet. Die Beschreibung hierzu ist in den jeweiligen Abschnitten (2.18, bzw. 2.19) nachzulesen.

2.17 TIRF-Mikroskopie

Um einen Überblick über die Grenzflächen zu erhalten, wurde für erste Messungen meist das TIRF-Mikroskop verwendet. Die zu beobachtende Grenzflächen war in der Regel Glas/Wasser. Das Prinzip der TIRF-Mikroskopie ist in Abschnitt 1.4 erklärt. Die Vor- bzw. Nachteile eines TIRF-Mikroskops gegenüber einem konfokalen Mikroskop sind in [28] dargestellt.

2.17.1 Aufbau

Der Aufbau des TIRF-Mikroskops ist in Abbildung 23 gezeigt (Aufbau von Dr. M. Börsch). Ein Foto des Aufbaus ist in Abbildung 24 gezeigt. Zur Anregung wurde ein Krypton-Ionen-Laser (Inova 90C, Coherent, 530 nm / 476 nm) oder ein Diodenlaser (OXX-488-50-COL-CE Laserdiodenmodul, 488 nm, 50 mW) verwendet. Bei dem Gaslaser wurde das Detektionssystem vom Laser durch eine Faserkopplung getrennt, da die Vibrationen der Laserkühlung die Messung störten. Der Diodenlaser konnte direkt auf dem Tisch installiert werden. Hinter dem Laser bzw. der Faserauskopplung wurde ein Abschwächerrad installiert. Durch ein Teleskop, bestehend aus zwei Linsen ($f_1 = 40$ mm, $f_2 = 200$ mm), wird der Strahl aufgeweitet. Mit einer dritten Linse ($f_3 = 1\,000$ mm) wird der Strahl in das TIRF-Mikroskop-Öl-Immersionsobjektiv (PlanAPO 60 mm, N. A. 1.45, Olympus) fokussiert, wodurch ein evaneszentes Feld entsteht. Die von der auf dem Deckglas platzierten Probe emittierte Strahlung wird durch einen dichroitischen Spiegel (DCLP 545 nm, AHF) von dem gestreuten Licht getrennt. Die Photonen können mit einem verstellbaren Spiegel entweder auf das Okular oder auf die mit flüssigem Stickstoff gekühlte CCD-Kamera (Rosperscientific; LN/CCD-1340/400-EB) geleitet werden. Die Signale der CCD-Kamera werden mit Hilfe des Programms *WinView* als 2D-Bild dargestellt.

Die Intensität des Laserstrahls des Gaslasers konnte direkt am Laser durch eine Modenblende und durch einem Abschwächer zwischen Faserauskopplung und Teleskop reguliert werden. Meist wurde für TIRF aber volle Leistung (9 mW, nach der Faser) verwendet.

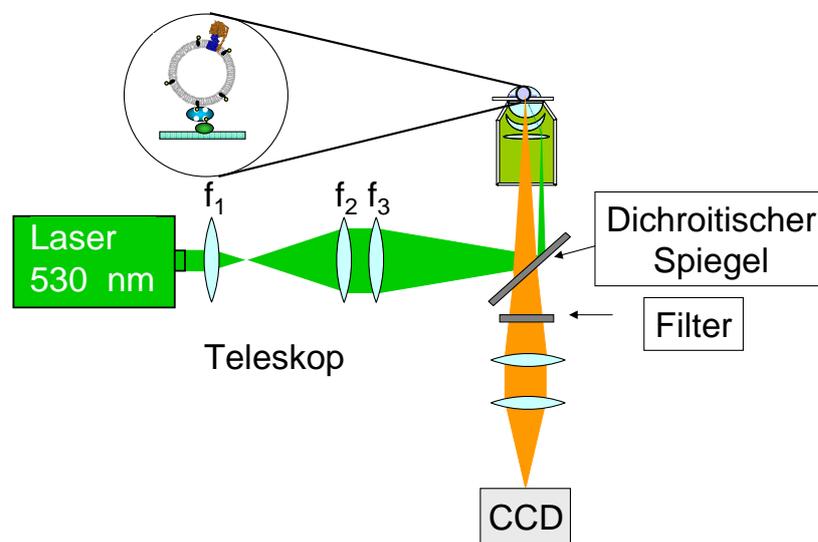


Abbildung 23: Schematischer Aufbau des TIRF-Mikroskops

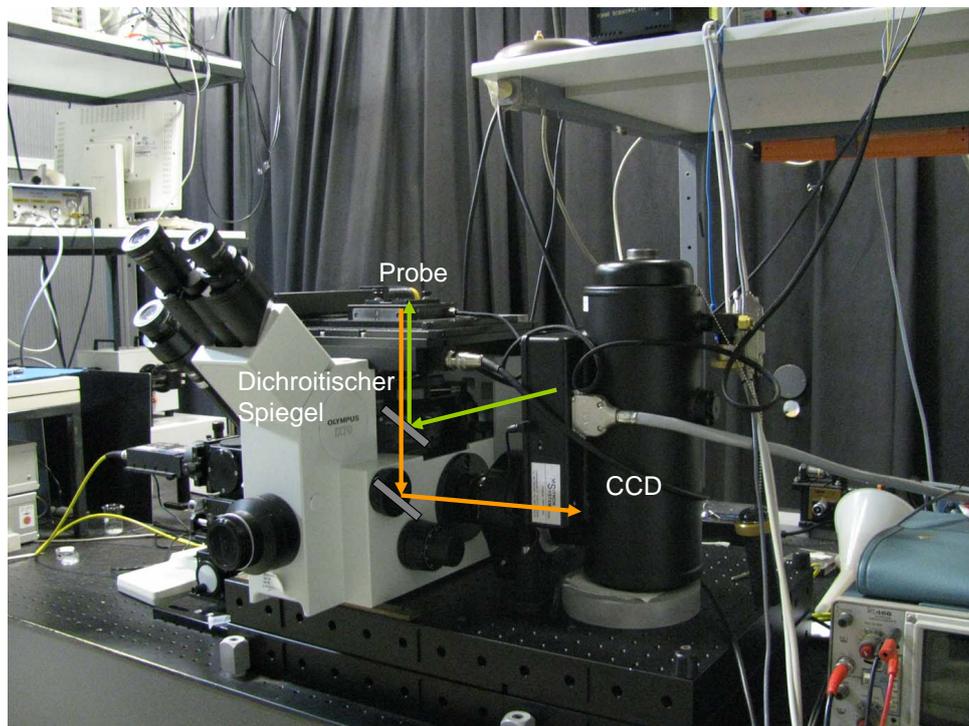


Abbildung 24: Foto des TIRF-Mikroskops mit angedeutetem Strahlengang
Grün: Anregungslaser, Orange: Fluoreszenz der Probe.

2.17.2 Justage

Die Laserleistung, die Fasereinkopplung und die Objektivinkopplung wurden an jedem Versuchstag neu auf maximale Laserleistung justiert. Um das TIRF-Feld zu erkennen, wurden erst auf dem Objektträger Fluorospheres (Microspheres, Molecular Probes, $\varnothing = 1 \mu\text{m}$, Emission 575 nm) aufgetragen. Durch Verschieben der Linsen konnte nun das TIRF-Feld optimiert werden.

2.17.3 Durchführung der Messung

Die Deckgläser mit den immobilisierten Liposomen (vgl. Abschnitt 2.15) wurden in eine Durchflusskammer eingespannt. Das CCD-Bild wurde durch richtige Positionierung des Objektivs scharf gestellt und anschließend konnten Bilder mit einer Zeitauflösung von ca. 0,5 s aufgenommen werden.

2.18 Messung an der Lipiddoppelschicht mit der CCD-Kamera

Um die Bilayer mit der CCD-Kamera zu beobachten, wurde der Aufbau des TIRF-Mikroskops verwendet (vgl. Abschnitt 2.17). Da aber das evaneszente Feld bei der TIRF-Mikroskopie nur eine Eindringtiefe von ca. 200 nm besitzt, konnte der Aufbau nicht ohne Veränderung übernommen werden. Die einfachste Lösung, den Anregungsstrahl nicht abzuknicken, führte zu einem zu hohen Signal auf der CCD-Kamera. Eine Detektion von einzelnen Fluorophoren war nicht möglich. Deshalb wurde der Strahl abgelenkt, allerdings nicht bis zur totalen Reflexion. Das Problem bei der Anregung ohne Abknicken bestand darin, dass Bereiche oberhalb der fokalen Ebene angeregt wurden. Auch beim Abknicken des Anregungsstrahls werden Bereiche oberhalb der fokalen Ebene angeregt, diese liegen aber nicht über dem beobachteten Bereich. Auf diese Art konnte das Streulicht reduziert werden. Abbildung 25 verdeutlicht diesen Zusammenhang.

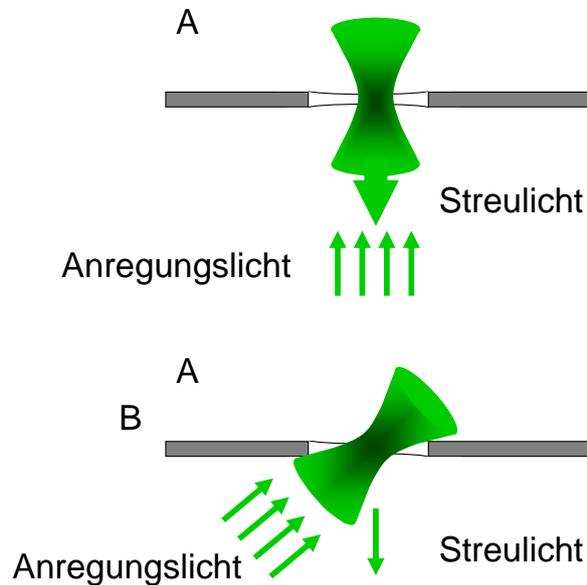


Abbildung 25: Darstellung zur Reduktion des Streulichtes

A) mit senkrechter Anregung, B) mit schräger Anregung.

2.19 Konfokale Mikroskopie

Mithilfe eines Positioniertisches, der in x - und y -Richtung nm-genau verschoben werden kann, können an einer Oberfläche immobilisierte fluoreszenzmarkierte Proben durch Verschieben des konfokalen Volumens in x - und y -Richtung visualisiert werden. Um die z -Position zu variieren, wurde ein sogenanntes PIFOC eingebaut.

2.19.1 Aufbau

Verwendet wurde ein konfokales Mikroskop (Aufbau M. Börsch). Zur Anregung wurde ein Krypton-Ionen-Laser (Inova 90C, Coherent, 530 nm / 476 nm) oder ein Diodenlaser (OXX-488-50-COL-CE Laserdiodenmodul, 488 nm, 50 mW) verwendet. Bei dem Gaslaser wurde das Detektionssystem vom Laser durch eine Faserkopplung getrennt, da die Vibrationen der

Tabelle 18: Verwendete Spiegel bzw. Filter bei der konfokalen Mikroskopie

Die Spiegel waren alle von AHF, für die Messungen mit TMR und R6G wurde der grüne Laser verwendet (530 nm), für die QD₅₈₅-Probe konnte sowohl der grüne (530 nm) als auch der blaue Laser (476 bzw. 488 nm) verwendet werden.

Verwendeter Fluorophor	dichroitischer Spiegel 1	dichroitischer Spiegel 2	Donor-Filter	Akzeptor-Filter
TMR	545 DCLP	-	-	570/60 HQ
R6G	545 DCLP	-	-	570/60 HQ
F ₁ QD ₅₈₅ F ₀ ATTO-647N	545 DCLP	630 DCLP	608/60 HQ	HQ635LP

Laserkühlung die Messung störten. Der Diodenlaser konnte direkt auf dem Tisch installiert werden. Hinter dem Laser bzw. der Faserauskopplung wurde ein Abschwächerrad installiert. Die Leistung des Lasers wurde durch eine Modenblende auf ca. 80 μ W reduziert. Durch ein Teleskop, bestehend aus zwei Linsen ($f_1 = 200$ mm, $f_2 = 40$ mm), wurde der Durchmesser des Laserstrahls reduziert. Als Objektiv diente ein Wasser-Immersionsobjektiv (UplanAPO 60x, N.A. 1.2, Olympus), das den Laserstrahl in die Probe fokussiert.

Abhängig vom verwendeten Fluorophorenpaar wurden verschiedene Spiegel eingesetzt, die in Tabelle 18 angegeben sind. Die emittierte Strahlung wird durch den dichroitischen Spiegel 1 vom Streulicht getrennt. Durch eine Lochblende (85 μ m, OWIS) wird Strahlung außerhalb des Beobachtungsvolumens ausgeblendet. Ein weiterer dichroitischer Spiegel 2 teilt die Fluoreszenzstrahlung in zwei spektrale Bereiche. Vor den Detektoren waren auch jeweils Filter angebracht. Zwei Avalanche Photodioden (SPCM AQR 151, EG&G) wurden für die Detektion verwendet und das registrierte Signal (Zeitauflösung 0,2 ms) wurde von einer PC-Karte (*TimeHarp 200*, PicoQuant) registriert. In Abbildung 26 ist der Aufbau schematisch gezeigt. Ein Foto des Aufbaus ist in Abbildung 27 zu sehen.

Die Funktionsweise des x-y-Positioniertisches (P 733.2CL, Physik Instrumente) und des z-Positionierers (PIFOC P 721.CLO, Physik Instrumente) basiert auf dem piezoelektrischen Effekt. Die technischen Daten sind in [28] zusammengefasst. Das Objektiv ist in den Halter des z-Positionierers eingeschraubt. Durch das PIFOC kann in z-Richtung nm-genau positioniert werden. Gesteuert wird der Positioniertisch und das PIFOC über einen Digital Piezo Controller (E-710, Physik Instrumente). Der Positioniertisch ist über die Anschlüsse CH1 und CH2 mit dem Piezo Controller verbunden, an CH3 ist das PIFOC angeschlossen. Über den Anschluss RS-232 ist der Controller mit dem Router (PRT 400,

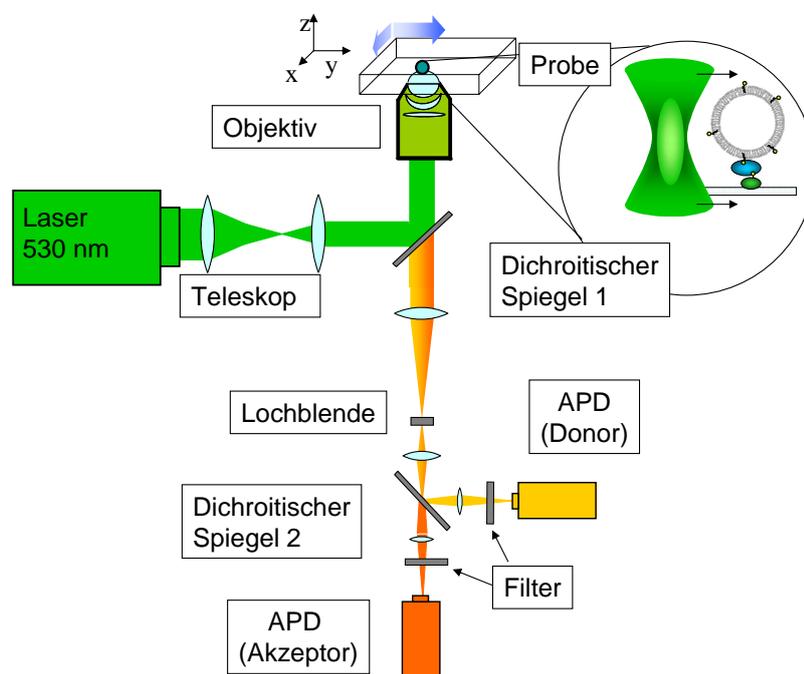


Abbildung 26: Schematischer Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops

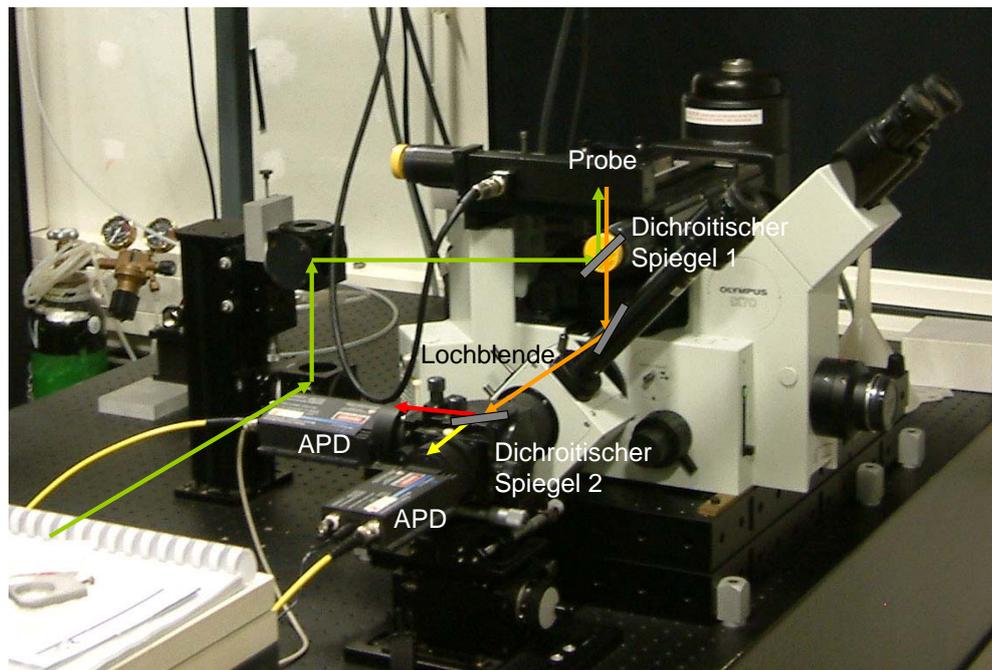


Abbildung 27: Foto des Mikroskops. Der Strahlengang ist in dem Foto angedeutet

Grün: Anregungslaser, Orange: Fluoreszenzlicht der Probe (Donor und Akzeptor), Rot: Donorfluoreszenzlicht, Gelb: Akzeptorfluoreszenzlicht.

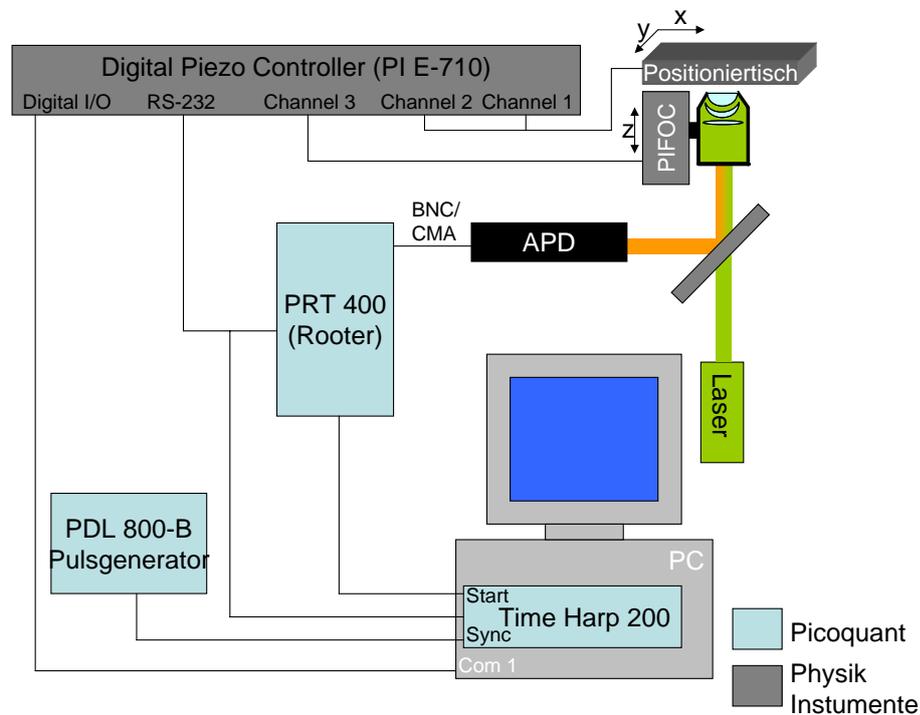


Abbildung 28: Schematischer Aufbau der Steuerung des Positionierers

Gesteuert werden der Positioniertisch und das PIFOC über den PC. Der PC wird zudem für die Signalauswertung verwendet. Das eigentliche Mikroskop ist in Abbildung 26 dargestellt. In dieser Abbildung ist die Vernetzung der einzelnen Komponenten gezeigt.

Physik Instrumente) und der *Time Harp*-Karte verbunden. Am Anschluss Digital I/O ist ein weiteres Kabel mit dem COM 1-Port des Computers verbunden. An dem Router sind am Anschluss mit der Bezeichnung *Input 0* bzw. *1* die Donor-APD bzw. Akzeptor-APD mit einem BNC-Kabel angeschlossen. Ein CMA-Kabel führt vom Router in den Start-Anschluss der *Time Harp*-Karte. Die *Time Harp*-Karte ist über den Sync-Anschluss mit einem CMA-Kabel an den Pulsgenerator (PDL 800-B, Physik Instrumente) verbunden. In Abbildung 28 ist die Vernetzung der einzelnen Komponenten schematisch dargestellt.

Die PC-Software *SymPhoTime Version 5* (Picoquant) diente zur Steuerung und Verarbeitung der von den APDs detektierten Photonen mit Messort und erzeugt ein 2D-Bild. Die z-Position blieb während der Messung konstant.

2.19.2 Justage

Zu Beginn jedes Messtages wurde bei beiden Lasern die Objektivkopplung optimiert, für den Gaslaser musste zusätzlich der Laser und die Fasereinkopplung optimiert werden. Zur Justage der Lochblende und der APDs wurde auf die Glaskante fokussiert. Die Positionierschrauben für die Lochblende und die APDs wurden so optimiert, dass ein maximales Signal beobachtet wurde. Das Signal wurde über das Software-Feature *Oscilloscope* verfolgt. Nun konnte entweder an der Oberfläche gemessen werden (vgl. Abschnitt 2.19.3) oder in der Lösung eine FCS-Messung vorgenommen werden (vgl. Abschnitt 2.19.4).

2.19.3 Durchführung der Messung an der Oberfläche

Die Deckgläser mit den immobilisierten Liposomen (vgl. Abschnitt 2.15) wurden in den Probenhalter des x,y-Positioniertisches eingespannt. Das Objektiv wurde bis zum Kontakt des Immersionswassers mit dem Deckglas nach oben verschoben. Um die Glasoberfläche zu finden, wurden die entstehenden Reflexe über das Okular beobachtet. Durch Verschieben des Okjektivs nach oben veränderten sich die Reflexe. An zwei Punkten war ein fokussierter Laserstrahl zu beobachten. Der erste Punkt ist die Unterkante des Glases, der zweite die Oberkante. Es wurde auf die Oberkante fokussiert. Ein *Prescan* der Fläche von $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ mit einer Auflösung von 100×100 Pixel und einer Scangeschwindigkeit von $0,6\ \text{ms}$ pro Pixel ergab ein erstes Bild der Oberfläche. Für detailliertere Bilder wurde die Auflösung auf 512×512 Pixel erhöht, die Fläche von $80\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$ und die Scangeschwindigkeit von $0,6\ \text{ms}$ pro Pixel wurde beibehalten. Da die Beschaffenheit der Oberfläche nun bekannt war, konnten einzelne Liposomen ausgewählt und deren Intensität im Verlauf der Zeit gemessen werden (*TimeTrace*).

2.19.4 Durchführung einer FCS-Messung

Nachdem das konfokale Mikroskop justiert war (vgl. Abschnitt 2.19.2), wurde auf ein Deckglas eine $0,2\ \text{nM}$ Lösung der zu untersuchenden Probe aufgetragen. Der Fokus wurde so eingestellt, dass er sich oberhalb der Glaskante in der Probenlösung befand. Es wurde die Fluoreszenzintensität der Probe im Donorkanal als Funktion der Zeit (Spur) gemessen. Eine solche Messung dauerte 120 Sekunden. Es wurde das Programm *SymPhoTime Version 5* verwendet.

Auswertung Die aufgenommenen Spur wurde mit dem Programm *SymPhoTime Version 5* analysiert. Dieses berechnete eine Autokorrelationsfunktion (vgl. Abschnitt 1.6). Im einfachsten Fall lässt sich eine solche Kurve mit einer Modell-Funktion anpassen, wie sie in Gleichung 30 angegeben ist.

$$G(\tau_c) = G_D(\tau_c) \cdot G_T(\tau_c) \quad (30)$$

Diese unterteilt sich in einen Diffusionsterm 31 und einen Term für die Triplettlebensdauer 32.

$$G_D(\tau_c) = \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + (\tau_c/\tau_D)} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_o/z_o)^2(\tau_c/\tau_D)} \right) \quad (31)$$

$$G_T(\tau_c) = [1 - T(1 - \exp(-\tau_c/\tau_D))] \quad (32)$$

Mit:

- τ_c : Korrelationszeit
- N : mittlere Anzahl der Fluorophore im konfokalen Volumen
- τ_D : Diffusionszeit durch das konfokale Volumen
- T : Anteil der Fluorophore im Tripletzustand
- τ_T : Triplettlebensdauer
- ω_o : laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens
- z_o : axiale Ausdehnung des Detektionsvolumens

All diese Parameter lassen sich durch Anpassen der Modellfunktion (vgl. Gleichung 30) an die gemessene FCS-Kurve (vgl. Gleichung 16) bestimmen. Aus der hier angegebenen Gleichung lässt sich zunächst nur das ω_o/z_o -Verhältnis bestimmen. Kennt man auch den Diffusionskoeffizienten D des verwendeten Fluorophors, so kann man ω_o und damit auch z_o bestimmen. In Abbildung 29 sind z_o und ω_0 gezeigt.

$$D = \frac{\omega_o^2}{4\tau_D} \quad (33)$$

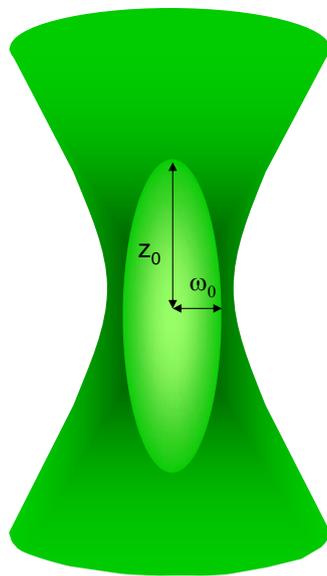


Abbildung 29: Elliptischer Fokus mit den Radien ω_0 und z_0

3 Biochemische und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen

3.1 Quantenausbeute des QD₅₈₅

Zur Berechnung der Zählrate muss die Quantenausbeute des QD₅₈₅ (Quantenpunkt) gemessen werden. Die Messung erfolgte durch einen Vergleich des Fluoreszenzspektrums von QD₅₈₅ mit dem von Sulforhodamin 101, dessen Quantenausbeute bekannt ist (vgl. Abschnitt 2.9). Es wurde bei 3 verschiedenen Anregungswellenlängen (466, 476 und 486 nm) die Quantenausbeute bestimmt und dann der Mittelwert berechnet. Wichtig war die Anregungswellenlänge von 476 nm, da bei dieser Wellenlänge später gemessen wurde.

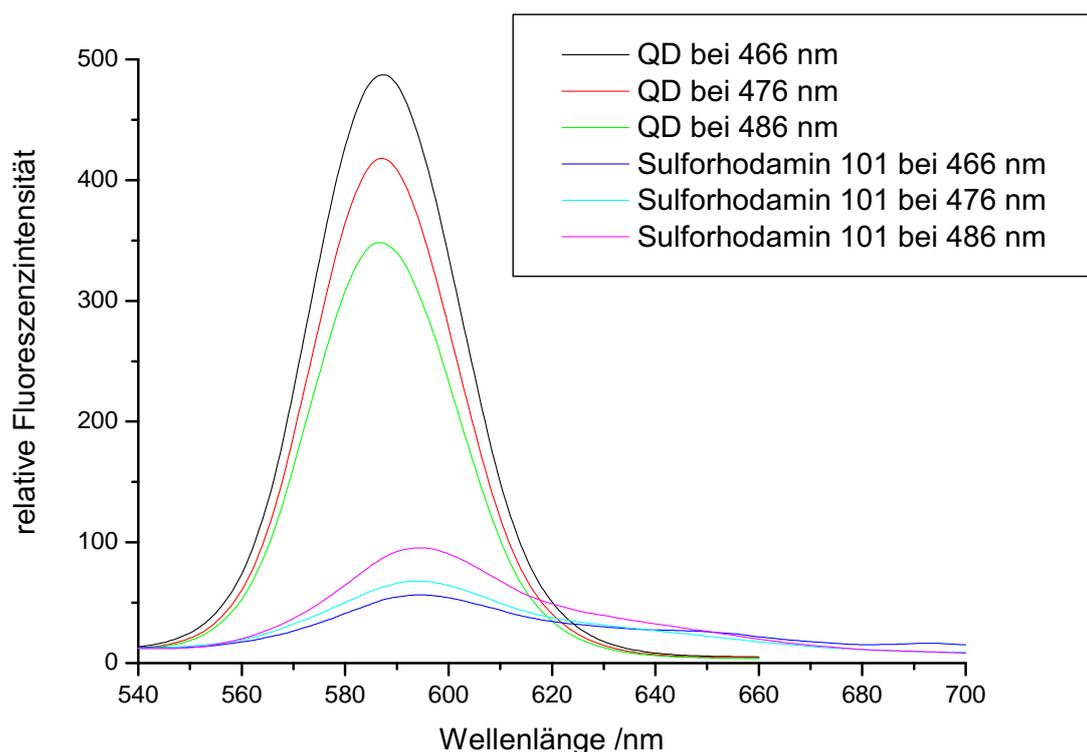


Abbildung 30: Emissionsspektren von QD₅₈₅ (6 nM) und von Sulforhodamin 101 (50 nM) bei verschiedenen Anregungswellenlängen

Da nicht bei den gleichen Konzentrationen gemessen werden konnte, wurden bei der Anregungswellenlänge λ die Integrale unter den Emissionsspektren $I(\lambda)$ durch die Konzentration c geteilt, man erhielt so das normierte Integral $I(\lambda)_n$. Für die Absorptionskoeffizienten wurden die molaren Koeffizienten verwendet (vgl. Tabelle 9). Mit Gleichung 22 wurden folgende Werte für die Quantenausbeute Φ erhalten:

Tabelle 19: Bestimmung der Quantenausbeuten des QD₅₈₅ bei verschiedenen Wellenlängen

Fluorophor	λ /nm	$I(\lambda)$	$I(\lambda)_n$	$\varepsilon_x / \text{M cm}^{-1}$	n	Φ_{xnm}
QD ₅₈₅	466	18287	$3,05 \cdot 10^{12}$	561 000	1,333	0,09
QD ₅₈₅	476	15314	$2,56 \cdot 10^{12}$	488 000	1,333	0,11
QD ₅₈₅	486	13037	$2,17 \cdot 10^{12}$	421 000	1,333	0,17
Sulforhodamin 101	466	4749	$9,50 \cdot 10^{10}$	1 718	1,3614	1
Sulforhodamin 101	476	4972	$9,94 \cdot 10^{10}$	2 180	1,3614	1
Sulforhodamin 101	486	4749	$1,24 \cdot 10^{11}$	4 255	1,3614	1

3.2 Isolation von F₁-HisTag

Um F₁-HisTag zu erhalten, wurden nacheinander die Anzucht (vgl. Abschnitt 2.2), die Membranisolation und anschließende die Aufreinigung (vgl. Abschnitt 2.5) durchgeführt. Im Vergleich zu der bisherigen Isolation von F₁-HisTag [28] wurde bei dieser Isolation auf die Chromatografieschritte nach der Ablösung des F₁-HisTag-Teils aus den Membranen fast gänzlich verzichtet. Nur die letzte Chromatografie, eine HisTag-Säule, wurde beibehalten. Die Fraktionen der HisTag-Säule wurden auf Aktivität (vgl. Hydrolysetest in Abschnitt 2.12.2) und Reinheit (über ein SDS-Gel wie in Abschnitt 2.6) überprüft. Abbildung 31 zeigt das Gel der aktivsten Fraktion der Isolation, die eine Hydrolyseaktivität von 45 s^{-1} zeigte. Bei dieser Isolation fehlte die Untereinheit ε . Dies führt zu höheren Hydrolyseaktivitäten, da die ε -Untereinheit die ATP Hydrolyse inhibiert. Wegen der fehlenden ε -Untereinheit ist aber die Rückbindung von F₁-HisTag schwierig. Das so erhaltene Enzym wurde nicht für Rückbindungsversuche verwendet.

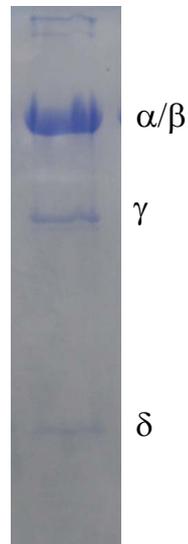


Abbildung 31: Fraktion 5 der *HisTag*-Isolation

Diese Fraktion enthielt die Untereinheiten α , β , γ und δ . Die ε -Untereinheit konnte bei dieser Aufreinigung nicht mitisoliert werden.

4 Untersuchungen an der Glasoberfläche

Um Konformationsänderungen an Einzelmolekülen bei der H^+ -ATPsynthase zu beobachten, gibt es verschiedene Ansätze. Es wurde beispielsweise ein fluoreszierendes Actinfilament an das Enzym gebunden. Das Enzym wurde auf einer Grenzfläche immobilisiert, bei ATP-Zugabe fing das Enzym an zu rotieren [37]. Auch eine Anbindung von einem Goldkügelchen anstatt des Actinfilaments ist möglich [38]. Ein anderer Ansatz ist, das Enzym mit zwei verschiedenen Fluorophoren (Donor/Akzeptor) zu markieren und über FRET-Messungen (vgl. Abschnitt 1.5) die Änderungen des Abstands zu beobachten [13]. Hierfür wird das Enzym in Liposomen eingebaut und mit einem konfokalen Mikroskop (vgl. Abschnitt 1.3) beobachtet. Dieses Verfahren bietet den Vorteil, dass nicht an der Grenzfläche sondern in Lösung gemessen werden kann, das Enzym ist so für die Substrate besser zugänglich. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Beobachtungszeit, diese ist nämlich durch die Diffusion des Liposoms durch das konfokale Volumen begrenzt (10-100 ms). Um die Beobachtungszeit zu verlängern gibt es verschiedene Wege. Man kann versuchen, das Liposom mithilfe einer optischen Pinzette festzuhalten [39]. Ein anderer Ansatz ist, die Proteoliposomen an der Glasoberfläche zu immobilisieren, dann einzelne Liposomen zu selektieren und diese spektroskopisch zu untersuchen. Für diese Immobilisierung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

4.1 Immobilisierung der Liposomen

Zur Immobilisierung der Liposomen wurde zwei verschiedene Ansätze untersucht. Zum einen wurde $F_1HisTag$ verwendet, welcher auf eine Ni^{2+} -Grenzfläche gebunden wurde. Zum anderen wurden Biotinliposomen auf einer Biotin/Streptavidin-Grenzfläche immobilisiert. In beiden Fällen mussten die Grenzflächen zuvor gereinigt werden, da sonst bei den späteren Einzelmolekülmessungen ein zu hoher Untergrund auftrat. Die einzelnen Schritte sind in Abschnitt 2.15.1 beschrieben.

4.1.1 Biotin/Streptavidin-Methode

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie der Aufbau zur Immobilisation der Liposomen war, wird dies am Beispiel Biotin-BSA/Streptavidin/Biotinliposomen ausführlich dargestellt. Auf die gereinigte Glasoberfläche wurde Biotin-BSA (vgl. Abschnitt 2.14) gegeben.

Dies lagerte sich durch ionische Wechselwirkungen an der Grenzfläche an. Auf diese biotinylierte Grenzfläche wurde dann Streptavidin gegeben. Im Anschluss wurden Biotinliposomen (vgl. Abschnitt 2.10) zugegeben, diese banden dann an das Streptavidin und waren somit mit der Grenzfläche verbunden. Die einzelnen Punkte der Durchführung sind in Abschnitt 2.15 beschrieben. Ein schematischer Aufbau ist in Abbildung 17 zu finden.

Für diese Immobilisierungsmethode wurden Biotinliposomen benötigt. Diese wurde nach der Vorschrift in Abschnitt 2.10.3 hergestellt. Im Rahmen der Diplomarbeit [28] wurde die Anzahl der Biotinmoleküle pro Liposom (25, 63, 125) variiert. Je größer die Anzahl der Biotinmoleküle, die in einem Liposom enthalten waren, desto mehr Liposomen wurden auf der Grenzfläche immobilisiert.

Für erste Messungen an der Grenzfläche wurden in die Liposomen zusätzlich zu den Biotinmolekülen noch TMR-Moleküle eingebaut. Die Vorschrift ist in Abschnitt 2.10.5 dargestellt. Die Anzahl der TMR-Moleküle pro Liposom lag bei etwa 20 [28]. Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass die Liposomen eine hohe Fluoreszenzintensität zeigten und sehr gut beobachtet werden konnten, besser als wenn einzelne markierte H^+ -ATPsynthasen eingebaut worden wären.

Zur Analyse wurde ein konfokales Mikroskop verwendet, wie es in Abschnitt 2.19 beschrieben ist. Die Abbildung 32 A zeigt die an der Grenzfläche über Biotin-BSA/Streptavidin immobilisierten Biotin-TMR-Liposomen.

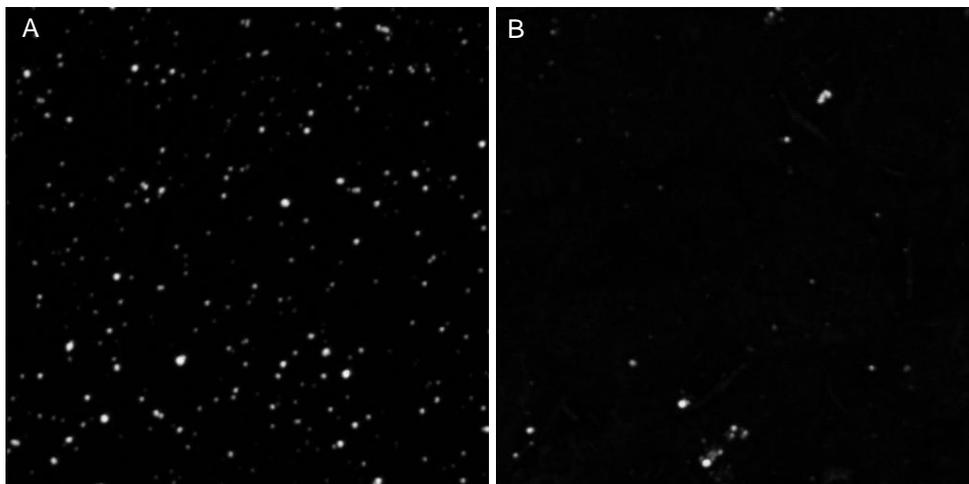


Abbildung 32: Immobilisierte TMR-Biotinliposomen

Auf biotinyliertem Glas wurden über Streptavidin TMR-Biotinliposomen immobilisiert. In Abbildung A ist die Variante mit Biotin-BSA gezeigt. In Abbildung B wurde Biotin-PEG verwendet. Die Abbildungen sind Rasteraufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop. Die Auflösung beträgt $0,156 \mu\text{m}$ pro Pixel. Die Aufnahme enthält 512×512 Pixel. Kantenlänge der gezeigten Bilder beträgt jeweils $80 \mu\text{m}$. Die Aufnahme eines solchen Bildes dauerte etwa 7 min, zur Aufnahme wurde das Programm *SymPhoTime Version 5* verwendet.

Die durchgeführten Variationen dieser Methode unterschieden sich in der Art, wie die Grenzfläche biotinyliert wurde. Bei der zweiten Variante wurde die Grenzfläche mit Isocyanatosilan silanisiert. Die Isocyanatgruppe wurde durch Zugabe von Säure in eine Aminogruppe umgewandelt. An die Aminogruppen konnte dann ein NHS-PEG, welches auch Biotin als funktionelle Gruppe enthielt, gebunden werden. Der genaue Ablauf ist in Abschnitt 2.15.3 beschrieben. Für erste Messungen wurden auch hier Biotin-TMR-Liposomen (vgl. Abschnitt 2.10.5) verwendet. Die Grenzfläche wurde mittels einem konfokalen Mikroskops untersucht. In Abbildung 32 B ist eine solche Aufnahme gezeigt.

Bei einer weiteren Variante wurde Mercaptosilan verwendet, um mittels Biotin-Maleimid Biotin kovalent an die Grenzfläche zu binden. Der genaue Ablauf ist in der Diplomarbeit beschrieben [28]. Da diese Immobilisierung aber im Vergleich zu der Biotin-BSA-Methode keinen Vorteil in Bezug auf die Anzahl der immobilisierten Liposomen, des Untergrundes oder der Einfachheit bot, soll sie hier nur erwähnt werden. Es wurde keine weiteren Untersuchungen damit durchgeführt.

Man erkennt, dass in beiden Fällen Liposomen immobilisiert werden konnten. Um die Biotin-BSA-Grenzfläche mit der Biotin-PEG-Grenzfläche zu vergleichen, wurden zwei Kriterien überprüft, zum einen die Anzahl der immobilisierten Liposomen und zum anderen der Untergrund. Zur Bestimmung der Anzahl der Liposomen wurde auf den Bildern die Zahl der gleichmäßig runden Liposomen in einem bestimmten Bereich ($80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$) bestimmt. Als Untergrund wurde der am häufigsten auftretende Wert der Intensität verwendet. Um das Signal/Rausch-Verhältnis zu berechnen, wurde dieser Untergrund (Rauschen) mit dem hellsten Liposom der Messung verglichen. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist allerdings in diesem Fall nicht so aussagekräftig wie der absolute Untergrund. Bei der jeweiligen Messung waren unterschiedlich helle Liposomen zu sehen, da die Anzahl der TMR-Moleküle um den statistischen Mittelwert von 20 TMR-Moleküle pro Liposom schwankte.

Die gemessenen Werte sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Vergleich der Immobilisierung von TMR-Biotinliposomen über Biotin-BSA oder Biotin-PEG an der Grenzfläche

Immobilisierungsmethode	Anzahl Liposomen	Untergrund-Signal / s^{-1}	maximales Signal / s^{-1}	Signal/Rausch-Verhältnis
Biotin-BSA	232	10	637	64
Biotin-PEG	28	11	647	59

Wie man erkennt, sind die Ergebnisse hinsichtlich Untergrund und Fluoreszenzintensität des hellsten Liposoms sehr ähnlich. Allerdings ist die Anzahl der immobilisierten Liposomen bei der PEG-modifizierten Grenzfläche sehr viel kleiner. Dies könnte in künftigen Untersuchungen durch eine Erhöhung des Biotin-PEG-Anteil verändert werden. Für die Immobilisierung mittels Biotin-PEG mussten die Gläser, im Vergleich zur Immobilisierung zur Biotin-BSA-Methode, zusätzlich silanisiert, die Isocyanatgruppe an der Grenzfläche in eine Aminogruppe umgewandelt und mit PEG über Nacht inkubiert werden. Da diese Me-

thode aufwändiger war als die Immobilisierung mittels Biotin-BSA, wurde sie nicht weiter verfolgt.

4.1.2 Ni^{2+} /*HisTag*-Immobilisierung

Als *HisTag* bezeichnet man eine Abfolge von mehreren Histidinen in einem Protein, welche gentechnisch eingeführt wurde. Dieser *HisTag* kann Ni^{2+} komplexieren, Ni^{2+} kann auch von Nitrilotriessigsäure (NTA) komplexiert werden. Bindet man NTA kovalent an eine Grenzfläche, kann über Ni^{2+} ein Protein mit einem *HisTag* an dieser Grenzfläche immobilisiert werden. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen der Diplomarbeit untersucht. Hierfür wurde F_1 -*HisTag* isoliert wie in [28] gezeigt. EF_0F_1 wurde in Liposomen rekonstituiert (vgl. Abschnitt 2.11). Im Anschluss wurde der F_1 -Teil des Enzyms entfernt (vgl. Abschnitt 2.13.1) und F_1 -*HisTag* zurückgebunden (vgl. Abschnitt 2.13.2). Man erhielt EF_1 -*HisTag* F_0 -Liposomen.

Um die erhaltenen Liposomen auf der Grenzfläche zu immobilisieren, musste NTA/ Ni^{2+} auf der Grenzfläche gebunden werden. Hier wurden zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurde NTA-BSA verwendet, zum anderen Mercaptosilan, welches mithilfe von NTA-Maleimid weiter modifiziert wurde. Die Details dieser Methode sind in [28] beschrieben.

Auch hier gelang es, Liposomen an der Grenzfläche zu immobilisieren. Im Vergleich zu den Messungen mit Biotin-BSA war der Untergrund ähnlich hoch, die Anzahl der immobilisierten Liposomen war jedoch deutlich geringer, vermutlich wegen der geringen Effizienz der Rückbindung von F_1 *HisTag* an F_0 . Zusätzlich ist bei dieser Methode das Enzym direkt an die Grenzfläche gebunden. Eine Diffusion der Substrate zu dem Enzym war hierdurch erschwert. Diese beiden Tatsachen führten dazu, dass die Immobilisierung über den *HisTag* nicht weiter verfolgt wurde. Die Ergebnisse sind in dem Mitarbeiterprotokoll von Marc Riehle [40] zusammengefasst.

4.2 Bestimmung der Größe des konfokalen Volumens

Um die Fluoreszenzintensität eines einzelnen Moleküls abschätzen zu können, ist es wichtig, die Größe des konfokalen Volumens zu kennen. Um diese zu bestimmen wurde eine Fluoreszenz-Korrelations-Messung (FCS, *Fluorescence-Correlation-Spectroscopy*, vgl. Abschnitt 1.6) durchgeführt, wie in Abschnitt 2.19.4 beschrieben. Als Probe wurde eine 0,2

nM Rhodamin6G Lösung verwendet. Es wurde 120 Sekunden die Fluoreszenz der Lösung gemessen. Die erhaltene Autokorrelationskurve (vgl. Gleichung 16, Programm *SymPhoTime Version 5*) und die Ausgleichskurve (vgl. Gleichung 30) sind in Abbildung 33 gezeigt.

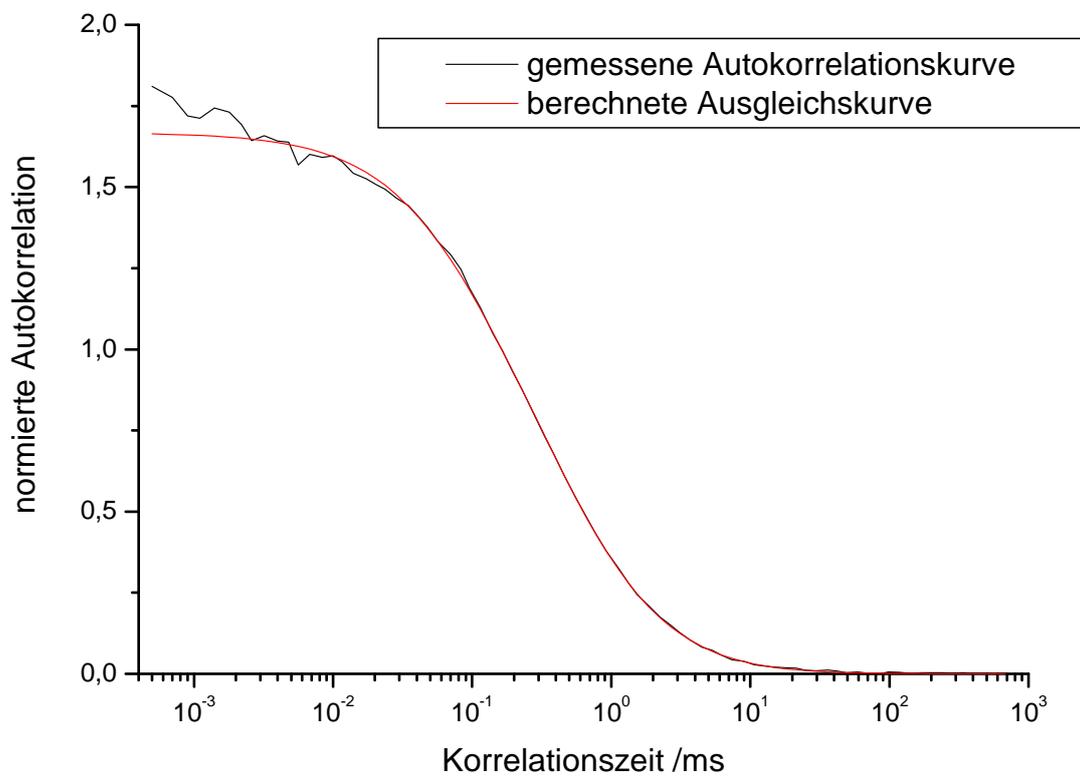


Abbildung 33: FCS-Kurve einer Rhodamin6G-Probe

Die gemessene Autokorrelationsfunktion 16 ist in schwarz, die angepasste Modellfunktion in rot gezeigt.

Die mit der Ausgleichskurve bestimmten Werte sind in Tabelle 21 angegeben.

Tabelle 21: Anpassungsparameter der FCS-Messung aus Abbildung 33

Mit τ_D : Diffusionszeit durch den Fokus, N: Anzahl der Teilchen im Fokus, c: Konzentration, ω_0/z_0 : Verhältnis der Radien (ω_0 und z_0) des Ellipsoides, T: Triplettanteil, τ_T : Triplettlebensdauer

τ_D	N	c	ω_0/z_0	T	τ_T
0,34 ms	0,68	0,18 nM	0,20	0,12	0,07 ms

Da der Diffusionskoeffizient ($2,8 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$, [41]) von Rhodamin6G bekannt ist, konnte über Gleichung 33 ω_0 mit Hilfe des Programms *SymPhoTime Version 5* bestimmt werden. Es betrug $0,6 \mu\text{m}$. Durch das bekannte ω_0/z_0 -Verhältnis wurde z_0 zu $3 \mu\text{m}$ bestimmt und das konfokale Volumen zu $6,4 \text{ fl}$. Da ω_0 der Radius (r) des Fokus ist, ist der Durchmesser des Fokus mit $1,2 \mu\text{m}$ gegeben. Dies entspricht in etwa der 2-fachen Anregungswellenlänge von 532 nm .

4.3 Erreichen des Einzelmolekülniveaus

Bevor Einzelmolekülexperimente an der Grenzfläche durchgeführt werden können, muss sichergestellt werden, dass die Empfindlichkeit der Apparaturen für die Detektion einzelner Moleküle geeignet ist. Im Rahmen der Diplomarbeit war dies noch nicht gelungen [28]. Dies ist hier durch Verbesserung des Aufbaus der Apparatur erreicht worden (vgl. Abschnitt 2.19). Das Erreichen des Einzelmolekülniveaus wurde wie folgt gezeigt. Es wurden TMR-Biotin-Liposomen (20 TMR-Moleküle pro Liposom, vgl. Abschnitt 2.10.5) hergestellt. Diese Liposomen wurden über Biotin-BSA/Streptavidin an der Glasoberfläche immobilisiert (vgl. Abschnitt 2.15). Diese Grenzfläche wurde mit dem konfokalen Mikroskop (Anregungsleistung $20 \mu\text{W}$) gescannt (vgl. Abschnitt 2.19) und es ergab sich ein Bild, wie es in Abbildung 32 A gezeigt ist. Anschließend wurde ein Liposom selektiert und dessen Fluoreszenzintensität als Funktion der Zeit gemessen (vgl. Abbildung 34). Die höchste Fluoreszenzintensität ist 420 kHz und nimmt mit der Zeit ab, wobei die Fluoreszenzabnahme nicht kontinuierlich, sondern in Stufen erfolgt. In jeder Stufe ist eine Abnahme von etwa 20 kHz zu beobachten und man kann eine Stufe auf das Bleichen eines TMR-Moleküls zurückführen.

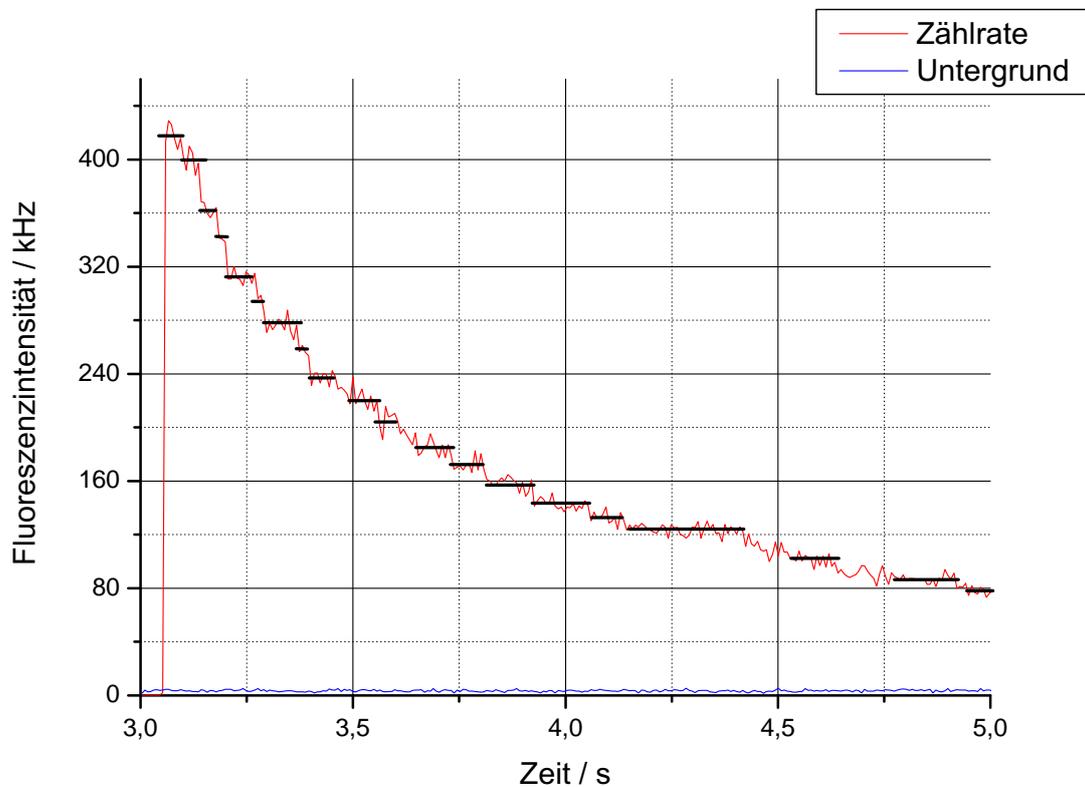


Abbildung 34: Fluoreszenzintensität eines immobilisierten, mit TMR-markierten Liposoms als Funktion der Zeit

Zur Zeit 3 Sekunden wurde das Anregungslicht ($20 \mu\text{W}$, 532 nm) eingeschaltet. Die Abnahme der Fluoreszenz erfolgt nicht kontinuierlich sondern in Stufen zu je 20 kHz . Die einzelnen Stufen sind als Mittelwerte durch schwarze Linien gekennzeichnet. Der Untergrund der Messung ist als blaue Linie dargestellt. Bei $t=5 \text{ s}$ sind 19 TMR-Moleküle gebleicht, 4 emittieren noch Fluoreszenzlicht.

Die Fluoreszenzintensität eines einzelnen TMR-Moleküls wurde folgendermaßen abgeschätzt. Wir nehmen an, dass das TMR-Liposom im Fokus an der Stelle mit höchster Anregungsintensität lokalisiert ist. Diese Fläche A an der engsten Stelle des Fokus (vgl. Abbildung 35) wurde als Kreis mit dem Radius r der Wellenlänge (532 nm) berechnet (vgl. Abschnitt 4.2).

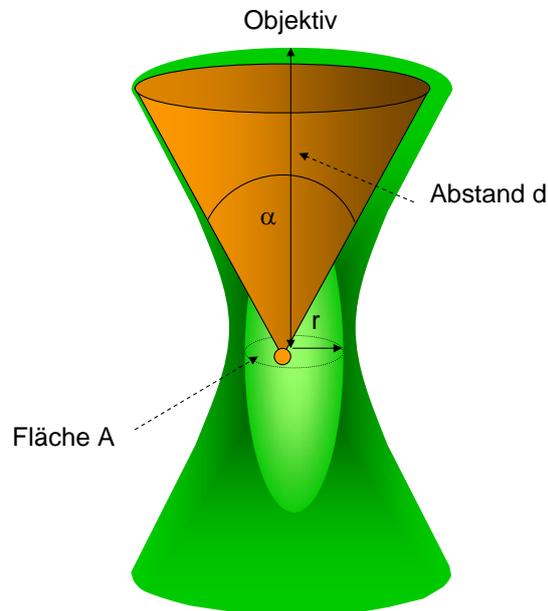


Abbildung 35: Die Geometrie des Fokus bei einem konfokalen Mikroskop

Gezeigt ist mit A die fokale Ebene als Kreis mit dem Radius r , mit α der Öffnungswinkel des Objektivs, mit d der Abstand der fokalen Ebene zum Objektiv. Der Radius r ist identisch mit dem ω_0 einer FCS-Messung.

Man erhält:

$$A = r^2 \cdot \pi = (532 \cdot 10^{-9} \text{m})^2 \cdot \pi = 9 \cdot 10^{-13} \text{m}^2 \quad (34)$$

Bei einer eingestrahelten Leistung P von $20 \mu\text{W}$ beträgt die Lichtintensität in der fokalen Ebene:

$$I = \frac{P}{A} = \frac{20 \cdot 10^{-6} \text{W}}{9 \cdot 10^{-13} \text{m}^2} = 2,3 \cdot 10^7 \text{Wm}^{-2} \quad (35)$$

Um nun die Anzahl der Photonen zu erhalten, wurde folgende Umformung durchgeführt:

$$I = \frac{dN \cdot h\nu}{dt \cdot A} \Rightarrow \frac{dN}{dt \cdot A} = \frac{I}{h \cdot \nu} = \frac{I \cdot \lambda}{hc} = \frac{2,3 \cdot 10^7 \text{Wm}^{-2} \cdot 532 \cdot 10^{-9} \text{m}}{6,6 \cdot 10^{-34} \text{Js} \cdot 3 \cdot 10^8 \text{ms}^{-1}} = 6,1 \cdot 10^{25} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} \quad (36)$$

Nachdem die Anzahl an Photonen pro Fläche und Sekunde bekannt ist, muss nun die Absorption eines einzelnen TMR-Moleküls berechnet werden. Der Absorptionkoeffizient ε (530 nm) ist mit $51\,200 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1} = 5\,120 \text{m}^2\text{mol}^{-1}$ (Molecular Probes) für 530 nm gegeben. Der Absorptionkoeffizient eines TMR-Moleküles ist dann:

$$\varepsilon(1) = \frac{\varepsilon(530\text{nm})}{N_A} = \frac{5120 \text{m}^2 \text{mol}^{-1}}{6 \cdot 10^{23} \text{mol}^{-1}} = 8,5 \cdot 10^{-21} \text{m}^2 \quad (37)$$

Die Anzahl an absorbierten Photonen pro Zeit berechnet sich dann zu:

$$\frac{dN(\text{abs})}{dt} = \varepsilon(1) \cdot I = 8,5 \cdot 10^{-21} \text{m}^2 \cdot 6,1 \cdot 10^{25} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} = 5,2 \cdot 10^5 \text{s}^{-1} \quad (38)$$

Die Quantenausbeute von TMR ist 0,4 [42] und man erhält für die Anzahl der emittierten Photonen pro Zeit:

$$\frac{dN(\text{em})}{dt} = \frac{dN(\text{abs})}{dt} \cdot \phi_D = 5,2 \cdot 10^5 \text{s}^{-1} \cdot 0,4 = 2,1 \cdot 10^5 \text{s}^{-1} \quad (39)$$

Da durch den Aufbau bedingt nur ein kleiner Teil der emittierten Photonen detektiert wurde, muss dieses Ergebnis mit der Detektionseffizienz D von 0,08 [42] korrigiert werden.

Mit dieser Detektionseffizienz berechnet sich die detektierte Zählrate eines einzelnen TMR-Moleküls wie folgt:

$$\frac{dN(\text{det})}{dt} = \frac{dN(\text{em})}{dt} \cdot D = 1,9 \cdot 10^5 \text{s}^{-1} \cdot 0,08 = 1,7 \cdot 10^4 \text{s}^{-1} = 17 \text{kHz} \quad (40)$$

Nach dieser Abschätzung sollte ein einzelnes TMR-Molekül bei der hier verwendeten Anregungsintensität zu einer Zählrate von 17 kHz führen. Da die Zählrate des TMR-Liposoms in Stufen zu je 20 kHz abnimmt wird geschlossen, dass jede Stufe dem Bleichen eines TMR-Moleküls entspricht (vgl. Abbildung 34). In Hinblick auf Annahmen die bei der Abschätzung zur Berechnung der Zählrate im Mikroskop ist dies eine hervorragende Übereinstimmung. Bei einer Gesamthöhe des Signals von 420 kHz kann man darauf schließen,

dass 21 TMR-Moleküle in diesem Liposom enthalten sind.

Die blaue Linie in Abbildung 34 zeigt den Untergrund, d.h. das Rauschen bei dieser Messung. Dieses hat mit 5 kHz eine sehr viel geringere Zählrate als ein TMR-Molekül. Dies bedeutet, dass mit diesem Aufbau die Fluoreszenz einzelner Moleküle mit einem Signal/Rausch-Verhältnis von etwa 5 detektiert werden kann.

Eine weitere Erkenntnis aus dieser Messung ist, dass die Beobachtungsdauer durch das Ausbleichen der Fluorophore begrenzt ist. Aus der Abbildung 34 wurde der Mittelwert der Zeit bis zum Ausbleichen (450 ± 160) ms berechnet. Wenn man nun zum Vergleich Messungen mit diffundierenden Liposomen heranzieht, ist zu erkennen, dass dies sehr viel länger ist als die Beobachtungszeit dieser Experimente (41 ms, [39]). Allerdings wurde bei diesen Messungen nur mit $20 \mu\text{W}$ angeregt. Um ein besseres Signal/Rauschverhältnis zu bekommen, wurde die Anregungsleistung auf etwa $80 \mu\text{W}$ erhöht. Es wurden Experimente mit H^+ -ATPsynthasen, die mit ATTO 532 als Donor an b64 und ATTO 647N als Akzeptor an $\epsilon 56$ markiert waren, durchgeführt. Die mittleren Bleichzeiten betragen (70 ± 60) ms, d.h. die höhere Intensität führt zu einem schnelleren Bleichen und man verliert den Vorteil der längeren Beobachtungszeit. Entweder muss die Zeit bis zum Bleichen des Fluorophors verlängert werden, oder es muss ein Fluorophor verwendet werden, welches nicht bleicht. Möglichkeiten, um dies zu erreichen, sind die Verwendung eines *Anti-Bleaching-Kits* oder die Benutzung von Nanokristallen, sogenannten Quantenpunkten (engl. *quantumdot*, QD) als Fluorophor. Versuche zur Verwendung eines *Anti-Bleaching-Kit* wurde bereits in der Arbeit von V. Rombach durchgeführt [65] und führte zu unbefriedigenden Ergebnissen. Also wurden in dieser Arbeit für weitere Experimente QDs verwendet.

4.4 Verwendung von QDs als Donorfluorophor

Wie sich in Abschnitt 4.3 herausstellte, konnte zwar durch die Immobilisation die Beobachtungszeit erhöht werden. Allerdings bleichten die Fluorophore schon nach etwa (70 ± 60) ms. Daraufhin wurden statt der organischen Fluorophore Nanokristalle (Quantenpunkte, QDs, vgl. Abschnitt 1.7) als Donor verwendet. Diese Halbleiterkristalle zeigen eine sehr gute Photostabilität. Ein sehr breites Anregungsspektrum und ein sehr großer Abstand zwischen Anregungs- und Emissionsspektrum sind weitere Vorteile der QDs.

Um die QDs an das Enzym zu binden, wurden an die Aminogruppen der Oberfläche des QDs *Crosslinker* gebunden, die eine funktionelle Gruppe zur Reaktion mit den Aminogruppen besaßen und eine Maleimidgruppe zur Reaktion mit dem Enzym enthielten. Nach der

Reaktion des *Crosslinkers* mit dem Enzym erfolgte eine Abtrennung des nicht reagierten *Crosslinkers* über eine Gelpermeationschromatographie (GPC). Im Anschluss daran wurde der QD über die Maleimidgruppe an das Enzym (Cystein b64) gebunden. Die Abtrennung des nichtreagierten QD erfolgte erneut über eine GPC. Die Markierung des Enzyms ist in Abschnitt 2.7.4 beschrieben.

Zur Analyse, ob der QD wirklich an das Enzym gebunden war, konnte kein SDS-Gel verwendet werden, da der QD nicht in das Trenngel eindrang. Stattdessen wurde ein Absorptionsspektrum des QD-markierten Enzyms aufgenommen (vgl. Abschnitt 2.8). Ein solches Spektrum ist in Abbildung 12 gezeigt. Mit Hilfe dieses Spektrums konnte der Markierungsgrad bestimmt werden (vgl. Abschnitt 2.8), er lag in der Regel bei etwa 50 %.

Nach der Markierung des Enzyms und Rekonstitution in Liposomen wurde die Syntheseaktivität überprüft (vgl. Abschnitt 2.11). Es stellte sich heraus, dass dieses inaktiv war. Um festzustellen, ob die Aktivität bei der Abtrennung des nicht reagierten QDs verloren ging oder ob dies an der Markierung mit dem QD selber lag, wurden verschiedene Abtrennmethoden verglichen. Als mögliche Abtrennmethoden wurden eine Gelpermeationschromatographie (GPC) und eine Dichtegradientenzentrifugation untersucht [27]. Die Abtrennung war deshalb wichtig, da bei späteren Einzelmolekülmessungen freie QDs stören würden.

Abtrennung mit GPC Hier wurde die Länge (von 3 bis 7 cm) der GPC-Säule variiert (vgl. Abschnitt 2.7.4). Es konnte keine Möglichkeit der Abtrennung mit einer GPC gefunden werden, bei der die Syntheseaktivität erhalten wurde. Die einzelnen Ergebnisse sind detailliert in [27] dargestellt.

Dichtegradient Es wurde zur Abtrennung eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Es wurden verschiedenen Dichtegradienten zwischen 0,3 M und 6 M Saccharose verwendet. Die genaue Durchführung kann [27] entnommen werden. Die Ausbeuten waren mit denen der GPC vergleichbar. Eine Syntheseaktivität wurde nicht gefunden.

4.4.1 Anbindung des QDs an bereits rekonstituiertes Enzym

In den in Abschnitt 4.4 beschriebenen Experimenten wurde versucht, vor der Rekonstitution das Enzym zu markieren, und dann den freien QD abzutrennen. Um markierte Probe zu erhalten, kann aber auch das rekonstituierte Enzym mit dem QD markiert werden. Als weitere Möglichkeit wurde daher versucht, zu einer Lösung aus rekonstituiertem Enzym (20 nM Enzym, vgl. Abschnitt 2.11) mit *Crosslinker* (NHS-Maleimid) verknüpfter QD (20 nM, vgl. Abschnitt 2.7.4) zuzugeben. Um die Bindung des Enzyms mit dem QD zu beobachten, wurden zu verschiedenen Zeiten FCS-Messungen (vgl. Abschnitt 2.19.4) durchgeführt. Zur Anpassung der FCS-Daten wurde folgende Modellfunktion verwendet.

$$G(\tau_c) = [1 - T(1 - \exp(-\tau_c/\tau_T))] \cdot \sum_{i=1}^2 \rho_i \left(\frac{1}{1 + (\tau_c/\tau_i)} \right) \left(\frac{1}{1 + (\omega_o/z_o)^2(\tau_c/\tau_i)} \right) \quad (41)$$

τ_c : Korrelationszeit

ρ_i : Anteil der Spezies i

τ_i : Diffusionszeit durch das konfokale Volumen der i-ten Spezies

T : Anteil der Fluorophore im Triplettzustand

τ_T : Triplettlebensdauer

ω_o : laterale Ausdehnung des Detektionsvolumens

z_o : axiale Ausdehnung des Detektionsvolumens

Zu Anfang sollte nur eine Spezies mit einer kurzen Diffusionszeit beobachtet werden. Bei dieser Spezies handelt es sich um den freien QD. Nach einer gewissen Zeit sollte sich eine weitere Spezies bilden, die eine längere Diffusionszeit besitzt. Dies wäre dann ein QD, der kovalent an das Enzym in einem Liposom gebunden ist. Die Reaktionszeit sollte auf Grund der sehr geringen Konzentrationen sehr viel länger sein, als bei den vorherigen Versuchen. Die Untersuchungen lieferten aber keine interpretierbaren Ergebnisse und analoge Messungen in der Diplomarbeit von Neukom [27] waren nicht interpretierbar. Die Messungen ergaben weder den gleichen Triplettanteil noch die gleiche Triplettlebensdauer des QDs im Verlauf der Reaktion. Die Diffusionszeit des QDs variierte zudem stark.

4.4.2 Diskussion

Keine der hier durchgeführten Abtrennmethode führte zu einem aktiven Enzym. Die Abtrennung ist deshalb so schwierig, weil die Größe des QDs (Durchmesser etwa 5 nm) etwa der Größe des F_1 -Kopfes entspricht. Bei der GPC werden die unterschiedlichen Teilchen anhand ihrer Größe getrennt. Führt man die Abtrennung mit QD-markiertem Enzym durch, so verliert man komplett die Syntheseaktivität. Aber auch eine Abtrennung über Dichtegradientenzentrifugation führt nicht zu syntheseaktivem Enzym. Eine Markierung von rekonstituiertem Enzym konnte nicht gezeigt werden.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, die zu einer Inhibierung des Enzyms bei diesen Verfahren führen können.

- Der QD besitzt eine hydrophile Hülle (vgl. Abschnitt 1.7), welche aus mehreren Schichten PEG besteht. Der QD könnte sich an das Enzym anlagern und damit die Rotation unterbinden.
- Die Größe des QDs verhindert einen korrekten Einbau des Enzyms in das Liposom. Somit wäre kein Protonenfluss durch die Membran möglich und es würde keine Synthese beobachtet.
- Bei der Abtrennung der markierten H^+ -ATPsynthase vom QD könnte das Enzym denaturieren.
- Es konnte nicht sichergestellt werden, dass nur eine H^+ -ATPsynthase mit einem QD verknüpft war. Da auf dem QD mehrere Maleimidgruppen vorhanden sind, könnte ein QD mehrere Enzyme binden und dann wäre eine korrekte Rekonstitution in die Liposomen nicht mehr möglich.

Welcher der hier aufgeführten Gründe zu der Deaktivierung des Enzyms führte, konnte nicht festgestellt werden. Die Messungen mit QD-markierter H^+ -ATPsynthase wurde deshalb mit Enzymen durchgeführt, die keine ATP Syntheseaktivität zeigten.

4.5 FRET-Messungen

Die H^+ -ATPsynthase wurde im folgenden nach der Methode aus Abschnitt 2.7.4 mit QD markiert, und danach in Biotin-Liposomen (vgl. Abschnitt 2.10.3) rekonstituiert (vgl. Abschnitt 2.11). Mit der in Abschnitt 2.13.1 beschriebene Prozedur wurde dann der F_1 -Teil

des Enzyms entfernt und mit ATTO-647N markiertes F_1 (vgl. Abschnitt 2.7.2) wurde, wie in Abschnitt 2.13.2 beschrieben, zurückgebunden. Die erhaltene Probe konnte nun für Messungen an der Grenzfläche verwendet werden. Diese Biotinliposomen mit QD-markiertem Enzym wurden über Biotin-BSA/Streptavidin an der Glasoberfläche immobilisiert (vgl. Abschnitt 2.15) und die Grenzfläche wurde mit dem konfokalen Mikroskop untersucht (vgl. Abschnitt 2.19). Die Abbildung 36 zeigt das Ergebnis einer solchen Aufnahme. Abbildung 36 A zeigt die Signale des Donor- und des Akzeptorkanals, in B ist nur das Signal des Donorkanal gezeigt, in C nur das des Akzeptorkanals.

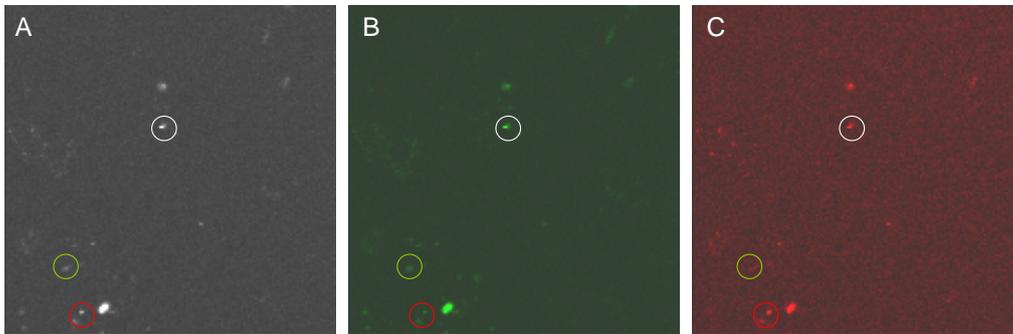


Abbildung 36: Konfokale rastermikroskopische Aufnahme einer Glasoberfläche, an der doppelmarkierte H^+ -ATPsynthasen in Biotin-Liposomen mit Biotin-BSA/Streptavidin immobilisiert wurden

In Bild A ist das Signal von Donor und Akzeptorkanal gezeigt, Bild B zeigt nur das des Donorkanals, Bild C das des Akzeptorkanals. Die Kantenlänge beträgt $80 \mu\text{m}$. Die Pixelgröße ist $0,533 \mu\text{m}$. Die Aufnahme eines solchen Bildes dauerte 1,5 min. Mit den Kreisen sind Liposomen markiert, die im Falle des roten Kreises hauptsächlich im Akzeptorkanal, beim grünen Kreis hauptsächlich im Donorkanal und beim weißen Kreis in beiden Kanälen detektiert wurden.

Es ist zu erkennen, dass es immobilisierte Enzyme gibt, die hauptsächlich Donorfluoreszenz zeigen (grüner Kreis), als auch Enzyme die hauptsächlich Akzeptorfluoreszenz zeigen (roter Kreis). In einem weißen Kreis ist ein Enzym dargestellt, in welchem Donor- und Akzeptorsignal etwa gleich groß sind. Es wurden im Mittel auf einer Fläche von $80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m}$ 25 Liposomen gefunden. Diese konnten dann einzeln selektiert werden und es wurde die Fluoreszenz im Donor- und Akzeptorkanal über die Zeit verfolgt. Es wurden insge-

samt $N = 200$ Liposomen beobachtet. Davon konnten die Signale von $N_B = 95$ Liposomen ausgewertet werden, $N_D = 24$ zeigten nur Donor Signale, $N_{AD} = 71$ zeigten Donor- und Akzeptorsignale. Tabelle 22 zeigt die Zusammenstellung dieser Daten.

Tabelle 22: Verteilung der beobachteten Liposomen

N Anzahl der beobachtete Liposomen, N_B Anzahl der ausgewerteten Signale, N_D Fluoreszenz nur im Donorkanal beobachtet, N_{AD} Fluoreszenz in Donor- und Akzeptorkanal beobachtet.

N	N_B	N_D	N_{AD}
200	95	24	71
100 %	48 %	12 %	36 %

4.5.1 Korrektur der FRET-Daten

Um aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten des Donors und des Akzeptors die FRET-Effizienz (E_{FRET} , vgl. Abschnitt 1.5) zu bestimmen, mussten die Daten korrigiert werden. Diese Korrektur beinhaltete die Subtraktion des Untergrundes, die Bestimmung der Detektionseffizienz und eine Bestimmung der Anzahl Photonen des Donors, die im Akzeptor detektiert werden, auch *Crosstalk* genannt.

Bestimmung des Untergrunds: Um den Untergrund zu bestimmen, wurde bei jeder Messreihe ein Punkt an der Grenzfläche gewählt, an dem kein Liposom vorhanden war. Im Anschluss wurde dann 60 s lang die Fluoreszenzintensität im Donor und im Akzeptorkanal verfolgt. Eine solche Messung ist in Abbildung 37 gezeigt. Von beiden Intensitäten wurden die Mittelwerte bestimmt und diese als Untergrund für die Messungen verwendet. Für den Donorkanal betrug diese $F_D(U)=8$ kHz, für den Akzeptorkanal $F_A(U)=4$ kHz.

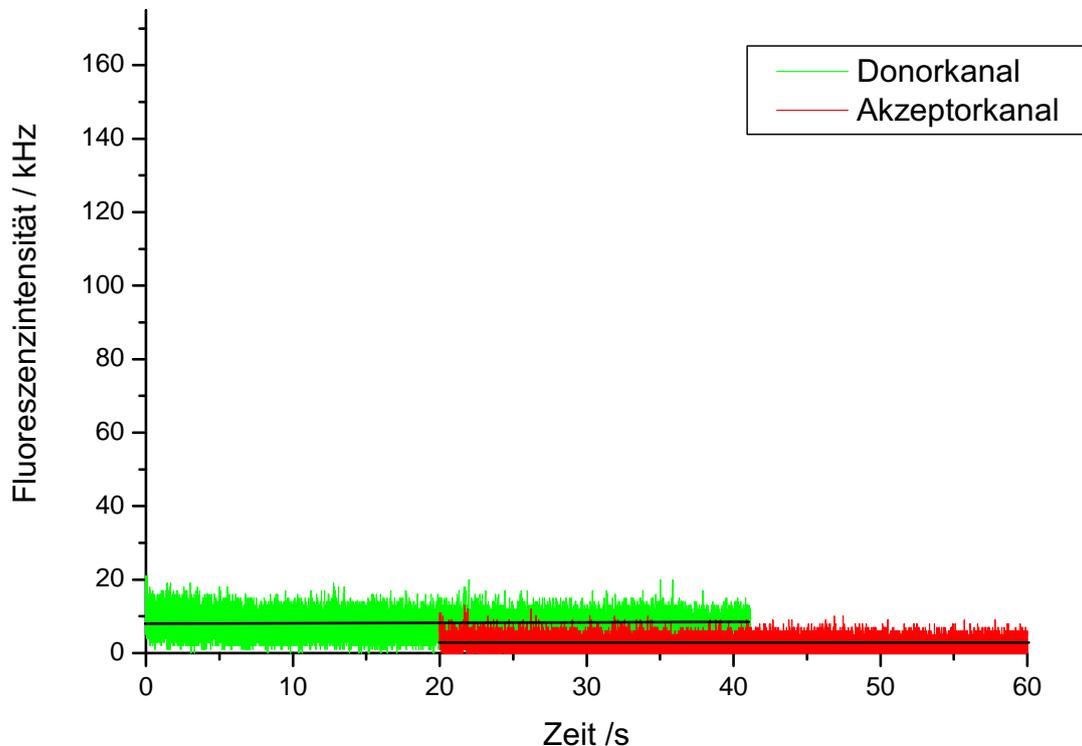


Abbildung 37: Untergrundintensität im Donor- und im Akzeptorkanal an einer mit Puffer bedeckten Oberfläche

Das Donorsignal wurde von 0 bis 40 s gezeigt, das Akzeptorsignal wurde von 20 bis 60 s, damit das Donorsignal nicht von dem Akzeptorsignal in der graphischen Auftragung überdeckt wurde.

Bestimmung des *Crosstalks*: Jeder Fluorophor emittiert ein Spektrum von Photonen mit verschiedenen Wellenlängen. Bei einer gleichzeitigen Messung zweier Fluorophore muss der Anteil von jedem Fluorophor gemessen werden, der im Kanal des anderen Fluorophors beobachtet wird. Man spricht hier auch von einem *Crosstalk*. Es wird meist nur der Einfluss des Donors auf das Signal im Akzeptorkanal berücksichtigt, da im Donorkanal nur wenige Photonen des Akzeptors gemessen werden. Zur Bestimmung des *Crosstalks* im Akzeptorkanal wird das Signal verwendet, welches in diesem Kanal beobachtet wird, wenn nur der Donorfluorophor vorhanden ist. Der Korrekturfaktor C wurde mithilfe der um den Untergrund korrigierten Signalintensität im Akzeptorkanal F_A und der im Donorkanal F_D

bestimmt.

$$C = \frac{F_A - F_A(U)}{F_D - F_D(U)} = \frac{4 \text{ kHz}}{110 \text{ kHz}} = 0,04 \quad (42)$$

In Abbildung 38 ist ein solches Nur-Donor-Signal dargestellt. Wie sich herausstellte, betrug der *Crosstalk* nur 4 %, er wurde bei den für die weiteren Auswertungen vernachlässigt.

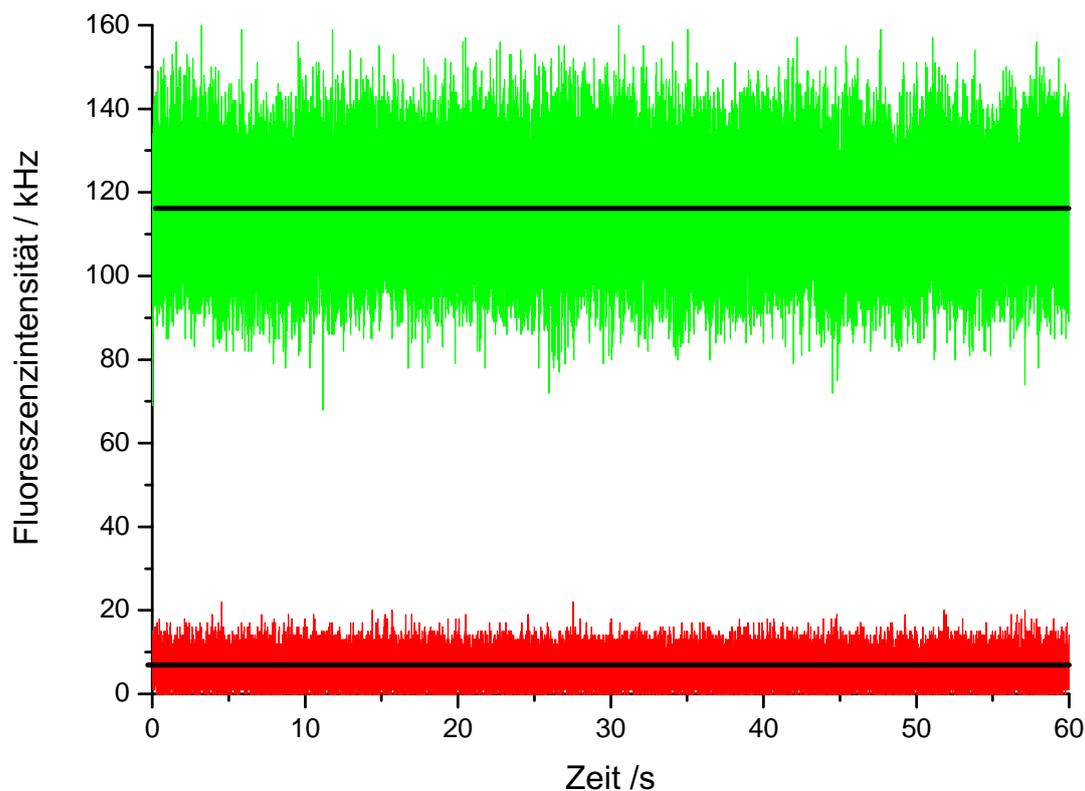


Abbildung 38: Verlauf der Fluoreszenzintensität im Donor- und im Akzeptorkanal, wenn nur Donorfluorophor vorhanden ist.

4.5.2 Bestimmung der FRET-Effizienzen

Aus den gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde zuerst der Abstandsfaktor P bestimmt.

$$P = \frac{F_A}{F_A + F_D} \quad (43)$$

Eine weitere Korrektur der gemessenen Fluoreszenzintensitäten berücksichtigt die Tatsache, dass die Photonen der beiden Fluorophore nicht mit der gleichen Effizienz beobachtet werden können. Dies liegt zum einen an einem möglichen Unterschied der Detektionseffizienz der APDs für beide Fluorophore, aber auch die Fluoreszenzquantenausbeute hat einen Einfluss hierauf. In [2] wurden die Detektionseffizienzen bestimmt und Abweichungen betragen weniger als 1 %, d.h. $\eta_{Donor} \approx \eta_{Akzeptor}$. Die Quantenausbeuten des QDs Φ_{QD} wurde in dieser Arbeit zu 0,12 bestimmt (vgl. Abschnitt 3.1). Für die Quantenausbeute von ATTO 647N $\Phi_{ATTO647N}$ wurde die Herstellerangabe 0,65 verwendet [43]. Der Korrekturfaktor γ ergibt sich damit zu:

$$\gamma = \frac{\eta_{Donor} \Phi_{Akzeptor}}{\eta_{Akzeptor} \Phi_{Donor}} = \frac{\Phi_{ATTO\ 647N}}{\Phi_{QD}} = \frac{0,65}{0,12} = 5,4 \quad (44)$$

Mit bekannten P und bekannten γ konnte nun die FRET-Effizienz E_{FRET} bestimmt werden [45].

$$E_{FRET} = \frac{P}{P + \gamma(1 - P)} \quad (45)$$

4.5.3 Bestimmung der intramolekularen Abstände

Wie in Gleichung 14 gezeigt, kann bei bekanntem FÖRSTER-Radius R_0 und E_{FRET} der Abstand zwischen Donor und Akzeptor bestimmt werden. Um R_0 zu bestimmen benötigt man unter anderem das normierte Überlappungsintegral $J(\lambda)$ [$M^{-1}cm^{-1}nm^4$] [44].

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \cdot \varepsilon_A(\lambda) \cdot \lambda^4 d\lambda \quad (46)$$

Mit:

- $F_D(\lambda)$: Fluoreszenzintensität des Donors des flächennormierten Emissionsspektrums
- $\varepsilon_a(\lambda)$: molarer Absorptionskoeffizient des Akzeptors [$M^{-1}cm^{-1}$]
- λ : Wellenlänge des Lichts [nm]

R_0 lässt sich nun berechnen

$$R_0 = konst. \cdot (\kappa^2 n^{-4} \Phi_D J(\lambda))^{\frac{1}{6}} \quad (47)$$

Mit:

R_0	: FÖRSTER-Radius [nm]
κ	: Orientierungsfaktor hier $\frac{2}{3}$
n	: Brechungsindex des Lösungsmittels hier 1,33
Φ_D	: Quantenausbeute des Donors hier 0,12
$J(\lambda)$: normierte Überlappungsintegral hier $4,35 \cdot 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$
konst.	: $0,0211 \text{ nm}^{\frac{2}{6}} \text{ M}^{\frac{1}{6}} \text{ cm}^{\frac{1}{6}}$

Für das hier verwendete Fluorophorenpaar QD₅₈₅/ATTO647N wurde ein FÖRSTER-Radius von 4,66 nm erhalten. Mit dem bekannten FÖRSTER-Radius konnte der Abstand zwischen Donor und Akzeptor r_{AD} mit Gleichung 48 bestimmt werden.

$$r_{AD} = R_0 \left(\frac{1}{E_{FRET}} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (48)$$

4.5.4 FRET-Messungen an der Grenzfläche

Um die FRET-Effizienz zu untersuchen, wurde jeweils ein Liposom in Abbildung 36 selektiert und die Fluoreszenz im Donor- (grün) und Akzeptorkanal (rot) als Funktion der Zeit 60 s lang gemessen. In Abbildung 39 sind verschiedene Beispiele solcher Messungen gezeigt. Aus den korrigierten Fluoreszenzintensitäten (vgl. Abschnitt 4.5.1) konnte nach Gleichung 43 der Abstandsfaktor P (blau) berechnet werden.

Bei den Spuren wurde kein Wechsel des Abstandsfaktors gefunden, was bedeutet, dass während der Messdauer (60 s) keine Bewegung zwischen den markierten Untereinheiten stattgefunden hatte. Beobachtet man verschiedene Liposomen, so findet man verschiedene Zustände. Es wurde über das Programm *Symphotime Version 5* eine Auswertung der in Abbildung 39 gezeigten Spuren gemacht, indem von jeder Spur eine Verteilung der Abstandsfaktoren erstellt wurde (vgl. Abbildung 40). Es ist auffällig, dass bei Abbildung 39

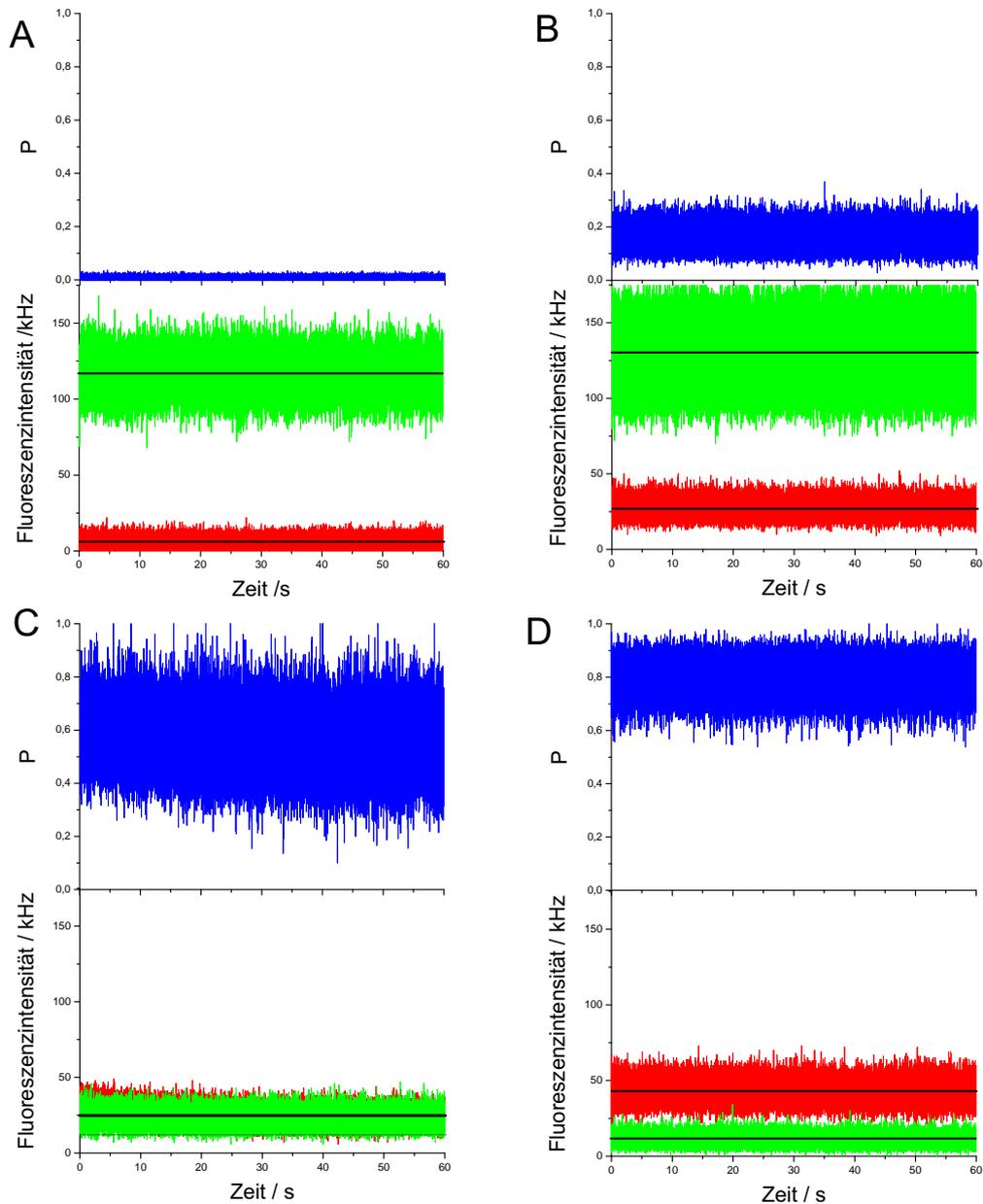


Abbildung 39: Fluoreszenzintensitäten im Donor- (grün) und im Akzeptorkanal (rot) von immobilisierten H^+ -ATPsynthase, die mit QD_{585} und ATTO 647N markiert ist.

Es wurden 4 verschiedene FRET-Zustände beobachtet. In den Diagrammen ist zusätzlich der Abstandsfaktor P (blau) gezeigt. Die Zeitmittelwerte sind durch schwarze Linien dargestellt. A) Nur Donor-Signal B) Niedrig-FRET-Zustand (großer Abstand zwischen Akzeptor und Donor) C) Mittlerer-FRET-Zustand (mittlerer Abstand zwischen Donor und Akzeptor). D) Hoch-FRET-Zustand (geringer Abstand zwischen Donor und Akzeptor)

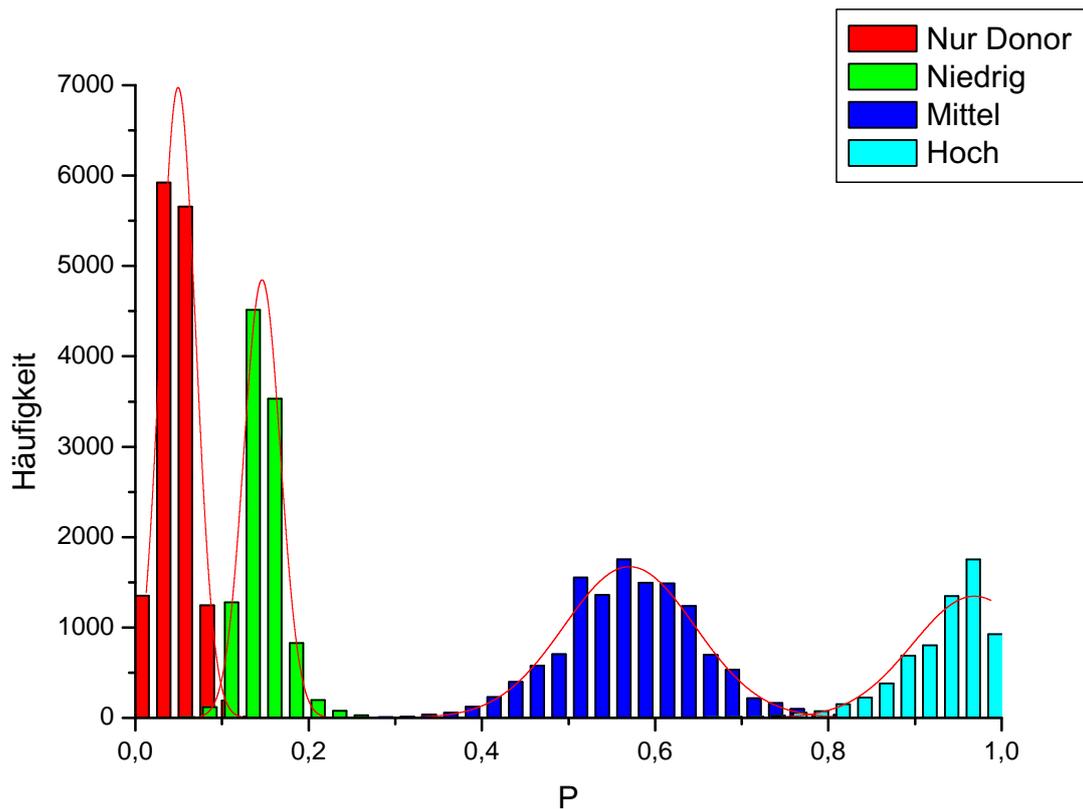


Abbildung 40: Verteilung der Abstandsfaktoren P der Spuren aus Abbildung 39

Abbildung 39 A ergibt eine Nur-Donorsignal (rot); Abbildung 39 B ergibt einen Niedrig-FRET-Zustand (grün); Abbildung 39 C ergibt einen Mittel-FRET-Zustand (blau); Abbildung 39 D ergibt einen Hoch-FRET-Zustand (cyan).

C eine große Verteilung im Abstandsfaktor gefunden wurde. Dies liegt daran, dass bei einem Abstand, der dem FÖRSTER-Radius entspricht, kleine Abstandsänderungen zu einer großen Änderung der Energieübertragung führen.

Jede Verteilung wurde mit einer GAUSS-Funktion angepasst. Aus den P_{max} -Werten wurde mit Gleichung 45 die FRET-Effizienz bestimmt und der Abstand von Donor und Akzeptor r_{AD} in jedem der vier Zustände konnte mit Hilfe von Gleichung 48 bestimmt werden. In Tabelle 23 sind die Parameter zusammengefasst.

Tabelle 23: Parameter der GAUSS-Verteilungen aus Abbildung 40

P_{max} : Abstandsfaktor, bei dem die das Maximum der Verteilung gefunden wurde, σ : Standardabweichung, $E_{FRETmax}$: FRET-Effizienz bei P_{max} , r_{AD} : Abstand zwischen Donor und Akzeptor.

Zustand	P_{max}	σ	$E_{FRETmax}$	r_{AD} / nm
Nur-Donor	0,05	0,04	0,01	10,1
niedrig	0,14	0,04	0,03	8,4
mittel	0,57	0,15	0,20	5,9
hoch	0,96	0,14	0,82	3,6

In Abbildung 41 ist die Häufigkeit der Abstandsfaktoren aus allen Messungen (insgesamt 71 Liposomen) zusammengefasst. Spuren, in denen im Akzeptorkanal kein Signal zu sehen war, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen, da es sich hier um nur mit dem Donor markierte Proben handelte. Gut zu erkennen sind drei Zustände: niedrig (P von 0,05 bis 0,54), mittel (0,56 bis 0,88) und hoch (0,9 bis 1,0). Will man mit früheren Ergebnissen vergleichen, muss man die P_{max} -Werte Abbildung 36 verwenden.

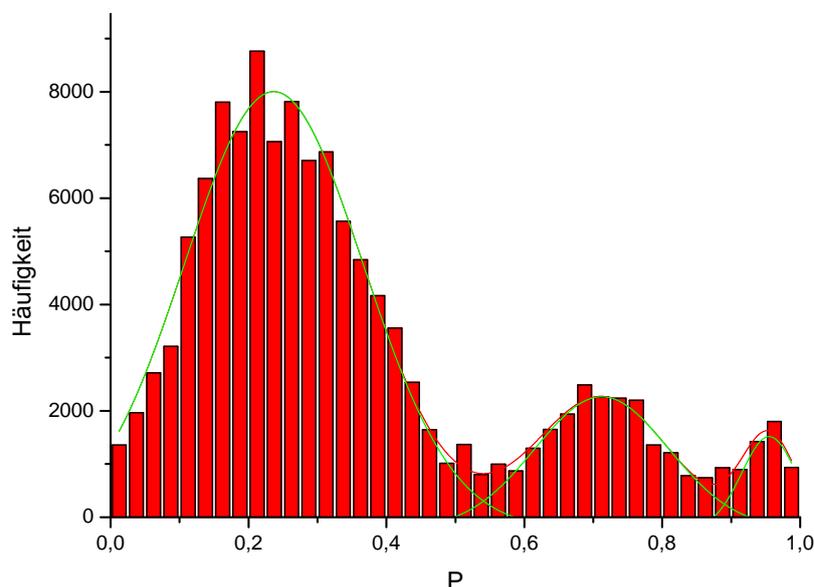


Abbildung 41: Häufigkeit des Abstandsfaktors P als Funktion der Größe von P

Diese Verteilungen wurde mit je einer GAUSS-Funktion angepasst. Die Werte der Maxima P_{max} und der Standardabweichung σ sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Aus P_{max} wurde mit Gleichung 45 $E_{FRETmax}$ und deren Standardabweichung ΔE bestimmt.

Tabelle 24: Ergebnisse der Anpassung der GAUSS-Verteilung aus Abbildung 41
 P_{max} : Abstandsfaktor, bei dem das Maximum der Verteilung gefunden wurde, σ : Standardabweichung, $E_{FRETmax}$: maximaler Wert der Verteilung für E_{FRET} , ΔE : Unsicherheit für E_{FRET}

Zustand	P_{max}	σ	$E_{FRETmax}$	ΔE
niedrig	0,23	0,26	0,06	$\pm 0,04$
mittel	0,71	0,19	0,31	$\pm 0,08$
hoch	0,95	0,08	0,78	$\pm 0,26$

Um diese Abstände einordnen zu können, wurden die Abstände mit dem Modell der H^+ -ATPsynthase aus [2] verglichen. Hierfür wurde das Modell von Engelbrecht und Junge [3] verwendet, wie es in Abschnitt 1.2 beschrieben ist. Aus diesem Modell erhält man die

Hoch-FRET-Konformation. Durch Drehen des γ/ε -Komplexes um 120° bzw. 240° um eine zentrale Rotationsachse [13] wurden die Positionen für die Mittel- und Niedrig-FRET-Konformationen erhalten. Die Abstände aus Modell und Messung sind in in Tabelle 25 angegeben.

Tabelle 25: Donor- Akzeptorabstände aus den FRET-Experimenten mit immobilisierten H^+ -ATPsynthasen an der Grenzfläche

Zustand	P_{max}	$E_{FRETmax}$	r_{AD} aus der Messung /nm	r_{AD} aus Modell /nm aus [2]
niedrig	0,23	0,06	$7,5 \pm 1,5$	8,3
mittel	0,71	0,31	$5,3 \pm 0,8$	5,1
hoch	0,95	0,78	$3,7 \pm 0,4$	4,2

4.5.5 Die Größe von QD_{585}

Um die Größe der QDs zu bestimmen, wurden elektronenmikroskopische Bilder verwendet, die freundlicherweise von Dr. Steffani Schäfer zur Verfügung gestellt wurden. Solche Aufnahmen sind in Abbildung 42 zu sehen. In Abbildung 42 A sind die Kerne und die Hüllen der QDs zu sehen. Abbildung 42 B zeigt nur die Kerne.

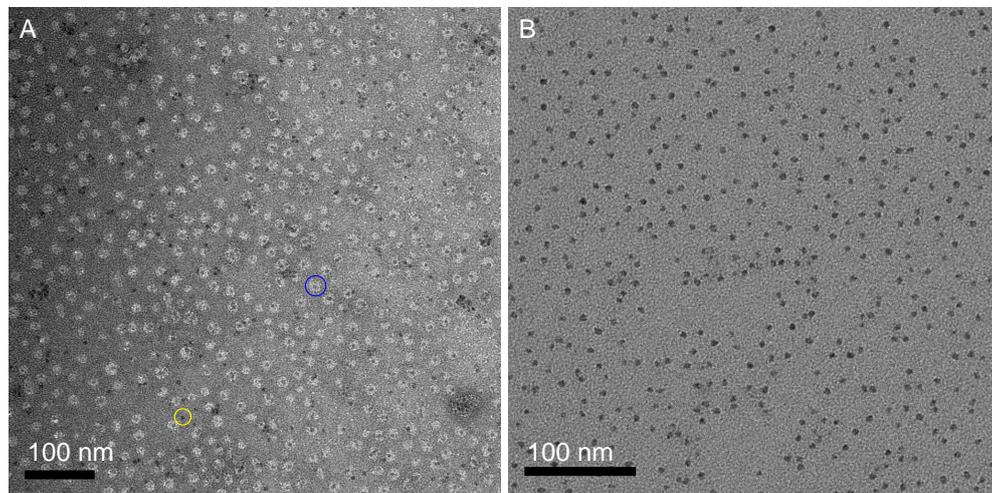


Abbildung 42: Elektronenmikroskopische Aufnahmen des QD₅₈₅

A) Elektronenmikroskopische Aufnahme des QD₅₈₅, man erkennt die Kerne und die Hüllen der QDs. In dem gelben Kreis sieht man einen QD, dessen Hülle nicht zu erkennen ist, der blaue Kreis zeigt einen QD mit Hülle. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme des QD₅₈₅, bei dem die Hülle nicht zu erkennen ist. Die Aufnahmen wurden bereitgestellt von Dr. Steffani Schäfer.

Mit dem Programm *ImageJ* wurde der Durchmesser von 100 QDs aus der Aufnahme Abbildung 42 A gemessen. Die Verteilung der Radien ist in Abbildung 43 dargestellt. Man erkennt deutlich zwei Verteilungen. Beide Verteilungen wurde mit je einer GAUSS-Funktion angepasst. Es wurden mittlere Durchmesser von $(14 \pm 3,8)$ nm und $(6,4 \pm 3,3)$ nm gefunden. Daraus ergibt sich Radien von $(7 \pm 1,9)$ nm und $(3,2 \pm 1,7)$ nm für die beiden Verteilungen. In Abbildung 42 ist ein Beispiel für einen QD mit kleinem Radius (gelber Kreis) und ein Beispiel für einen QD mit großem Radius (blauer Kreis) gezeigt.

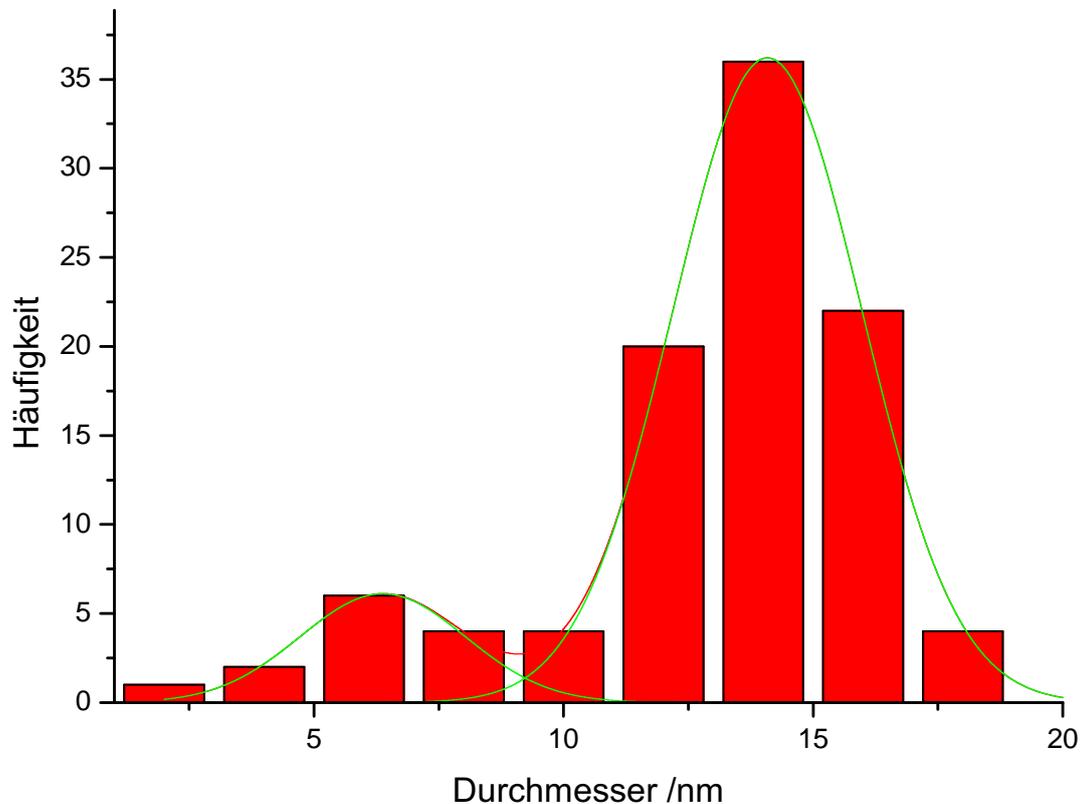


Abbildung 43: Verteilung der Durchmesser der elektronenmikroskopische Aufnahme des QD_{585} aus Abbildung 42 A

Zusätzlich sind die GAUSS-Verteilungen gezeigt. Es wurden zwei Verteilungen gefunden mit $(14 \pm 3,8)$ nm und $(6,4 \pm 3,3)$ nm.

Wie aus diesen Verteilungen zu erkennen ist, gibt es QDs mit verschiedenen Radien. Bei den QDs mit dem größeren Durchmesser erkennt man sehr gut die Hülle, bei den QDs mit dem kleineren Radius erkennt man manchmal keine Hülle. Es ist möglich, dass bei diesen nur eine sehr dünne Hülle um die Kerne existiert. Analog wurden die Kerne aus Abbildung 42 B analysiert. Der mittlere Radius betrug hier $(2,5 \pm 0,5)$ nm. Vergleicht man dies mit dem Ergebnis der Teilchen mit kleinerem Radius aus Abbildung 42 A, so kommt man zu dem Schluss, dass bei diesen Teilchen eine sehr dünne Hülle (im Mittel 0,7 nm) vorhanden ist, die in den Aufnahmen aber nur bei manchen Teilchen direkt zu erkennen ist.

4.5.6 Diskussion und Ausblick

Es wurde gezeigt, dass es möglich ist, Liposomen mit donor- und akzeptormarkierter H^+ -ATPsynthase, die sowohl mit mit Hilfe von Biotin/Streptavidin an einer Glasoberfläche zu immobilisieren. Einzelne Liposomen wurden durch konfokales Scannen selektiert und die Fluoreszenz des Donors QD_{585} und des Akzeptors ATTO 647N untersucht. Bei 200 untersuchten Liposomen ergaben sich 95 auswertbare Spuren, bei 24 Spuren wurde nur ein Fluoreszenzsignal des Donors detektiert, 71 Spuren enthielten sowohl Akzeptor- als auch Donorsignal.

Die detektierte Fluoreszenzintensität des Donors (120 kHz) stimmt mit der aus den Laseranregungsleistung abgeschätzten Intensität überein und dies zeigt, dass bei diesen Experimenten einzelne Moleküle untersucht wurden. Die Fluoreszenz von Donor und Akzeptor wurde jeweils 60 s gemessen. Es wurden keine Spuren gefunden, bei denen die Intensität in einem Kanal auf die Höhe des Untergrunds sinkt. Dies wäre entweder durch den Effekt des Bleichens des organischen Fluorophors oder durch das Blinkens des QDs zu erklären [66], [67].

Dieser Befund zeigt, dass dieses System geeignet ist, die Eigenschaften der markierten H^+ -ATPsynthase in einem sehr viel längeren Zeitraum zu untersuchen als das in früheren Arbeiten möglich war [13], [2], [45], [46]. Aus den Fluoreszenzintensitäten von Donor und Akzeptor wurden die Abstandsfaktoren mit Gleichung 43, mit Hilfe des Korrekturfaktors die FRET-Effizienz (vgl. Gleichung 45) und schließlich daraus die Abstände (vgl. Gleichung 48) ermittelt. Es ergaben sich drei Abstände (3,7 nm, 5,3 nm und 7,5 nm). Um diese mit der Struktur des Enzyms vergleichen zu können, wurden an Hand des Homologiemodells von EF_0F_1 [3] die C_α -Abstände zwischen $\epsilon 56$ und b64 ermittelt. Diese C_α -Abstände unterschieden sich etwa um 10 % von den aus den FRET-Daten ermittelten Abständen.

Dies ist verwunderlich, da im Modell von den Abständen der C_α -Atome der jeweiligen Aminosäuren ausgegangen wird. Da die hier verwendeten Fluorophore aber über einen Linker an das Enzym gebunden waren, erwartet man eigentlich größere Abstände als die aus dem Homologiemodell berechneten. Bei dem gebundenen ATTO 647N hat man eine Länge des Linkers von etwa 1 nm, d.h. das Übergangsdipolmoment von ATTO 647N ist bei freier Drehbarkeit um die Enzym-Linker-Bindung entweder um 1 nm näher oder weiter entfernt vom QD_{585} . Bei Verwendung des QDs ist dieser Effekt größer. Bei einem Radius mit Hülle von 7 nm (vgl. Abschnitt 4.5.5) ergibt sich ein Abstand des Zentrums von QD_{585} zur Bindungsstelle auf dem Enzym b64- C_α von 8 nm bei Einbeziehung der Länge des *Crosslinker*. Wenn das Übergangsdipolmoment im Zentrum des QDs lokalisiert ist, erwartet man einen

um 8 nm größeren Abstand zwischen den beiden Übergangsdipolmomenten im Vergleich zu den C_α -Abständen, der aber nicht gefunden wird.

Deutlich zu erkennen ist, dass bei den Niedrig-FRET-Zuständen eine breitere Verteilung des Abstandsfaktors P gefunden wurde als bei den beiden anderen Zuständen. Dies hat zur Folge, dass der Mittelwert des Abstandes zu $\epsilon 56$ in diesem Zustand ungenauer bestimmt werden kann.

Der für dieses Donor/Akzeptorpaar berechnete FÖRSTER-Radius beträgt $R_0=4,7$ nm (vgl. Abschnitt 4.5.1). Betrachtet man nur den Nanokristall, so hat dieser einen Radius von 2,5 nm (vgl. Abschnitt 4.5.5) und dies ist mit dem berechneten FÖRSTER-Radius verträglich. Betrachtet man aber den QD₅₈₅ mit Hülle, so ist der kleinste Abstand zum Akzeptor durch den Radius des QD von 7 nm gegeben, so dass eigentlich kürzere Abstände mit diesem Donor-/Akzeptorpaar nicht gemessen werden können.

Die Größenverteilung des verwendeten QD₅₈₅ wurde elektronenmikroskopisch bestimmt. Es ergab sich eine Verteilung mit zwei Maxima bei Radien von 7 nm und 3,2 nm (vgl. Abschnitt 4.5.5), wobei der Anteil der kleineren QDs etwa 10 % beträgt. Es könnte daher möglich sein, dass bei der Untersuchung des Einzelmolekül-FRET nur solche H⁺-ATPsynthasen selektiert werden, an die ein kleiner QD gebunden ist, da Enzyme mit einem großen QD keine oder nur einen geringen FRET zeigen und daher als Nur-Donor-Enzyme klassifiziert werden.

Bisher wurde nur berücksichtigt, dass der QD einen um seinen Durchmesser plus *Crosslinker* größeren Abstand zu $\epsilon 56$ hat als den C_α -Abstand zwischen b64 und $\epsilon 56$ entspricht. Der QD kann aber auch umklappen und sich zwischen den peripheren und den zentralen *stalk* an das Enzym anlagern und sich so dem Akzeptor nähern. Dadurch wird es möglich, dass sich ATTO 647N an $\epsilon 56$ bis an die Hülle des QD₅₈₅ annähern kann. Für die Abschätzung der Abstände wurde ein Durchmesser des QDs von 3,2 nm verwendet. Beide Fälle sind in Abbildung 44 gezeigt. Bei der bisher angenommenen Position, wie sie in Abbildung 44 A gezeigt ist, ergeben sich Abstände zu den drei Positionen von $\epsilon 56$, die durch die 120° Schritte erzeugt werden, von 5,7 nm, 10,3 nm und 10,5 nm. Die Anlagerung des QDs an das Enzym, wie sie in Abbildung 44 B gezeigt ist, ergibt die drei Abstände von 3,3 nm, 7,0 nm und 8,8 nm. Alle Abstände wurden mit dem Programm *PyMOL* im Modell abgemessen. Im Experiment wurde für die Messungen, die in Abbildung 39 gezeigt sind, Abstände von 10,1 nm, 8,4 nm, 5,9 nm und 3,6 nm gefunden. Für die Verteilung von allen Messungen wurden die Abstände zu 3,7 nm, 5,3 nm und 7,5 nm gefunden (vgl. Abbildung 41). Es zeigte sich, dass für jeden im Modell gefundenen Abstand entsprechende Messwerte vorliegen.

Dies würde bedeuten, dass nicht nur eine Verteilung von verschiedenen Positionen von ε gefunden wurden, sondern dass auch verschiedene Positionen des QDs bei der Abstandsverteilung eine Rolle spielen. Der Vergleich der Messwerte mit den Daten der Modelle zeigt, dass das Modell A zur Beschreibung nicht verwendet werden kann, dass aber das Modell B hierfür durchaus geeignet ist. Vermutlich könnte sich nach Optimierung der Position des QDs eine bessere Übereinstimmung ergeben. Dies wurde hier aber nicht weiter untersucht. Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigen erstmals, dass es möglich ist, QD₅₈₅ und ATTO 647N markierte H⁺-ATPsynthasen in einem Zeitraum bis zu einer Minute zu untersuchen, ohne dass eine Zerstörung der Fluorophore beobachtet wird. Erste Ergebnisse zeigen, dass drei stabile Zustände des Enzyms beobachtet werden, die einen unterschiedlichen Abstand der ε -Untereinheit zur b-Untereinheit zeigen. Die drei Zustände können durch Rotation um eine zentrale Achse ineinander überführt werden. Aus Zeitgründen konnte in dieser Arbeit das Verhalten dieser immobilisierten Enzyme bei der Katalyse nicht mehr untersucht werden.

Mit der hier gezeigten Methode kann die Beobachtungsdauer der H⁺-ATPsynthase im Vergleich zur Messung an diffundierenden Liposomen deutlich erhöht werden. Sie ist, was die Dauer angeht, sogar der optischen Pinzette [39] überlegen. Falls das Enzym, wie es hier verwendet wurde, noch hydrolyseaktiv ist, kann man diese Methode zur Untersuchung der Konformationsänderungen in Hydrolyserichtung verwenden. Ob mit dieser Methode die von Shimo-Kon *et al* [12] beschriebenen 80° und 40°-Schritte bei der Hydrolyse aufgelöst werden können, müsste untersucht werden. Auf Grund des großen Abstands zwischen den beiden Fluorophoren ist eine Ortsauflösung in dieser Genauigkeit sicher nicht einfach zu erreichen.

Für eine Messung in Syntheserichtung muss regelmäßig der Puffer gewechselt werden, um ein elektrochemische Potentialdifferenz der Protonen über die Membran zu erzeugen. Dies ist auch bei der hier verwendeten Methode möglich, da die Liposomen nach dem Spülen mit neuem Puffer noch an der Oberfläche gebunden sind. Es würde für solche Messungen weniger Probe benötigt als für Messungen mit frei diffundierenden Liposomen [2]. Allerdings erfordert dies ein syntheseaktives und mit QD markiertes Enzym. Dies konnte im Rahmen der Arbeit nicht erhalten werden. Ob eine Markierung des Enzyms mit einem QD gelingt, ohne die Syntheseaktivität zu verlieren, bleibt fraglich.

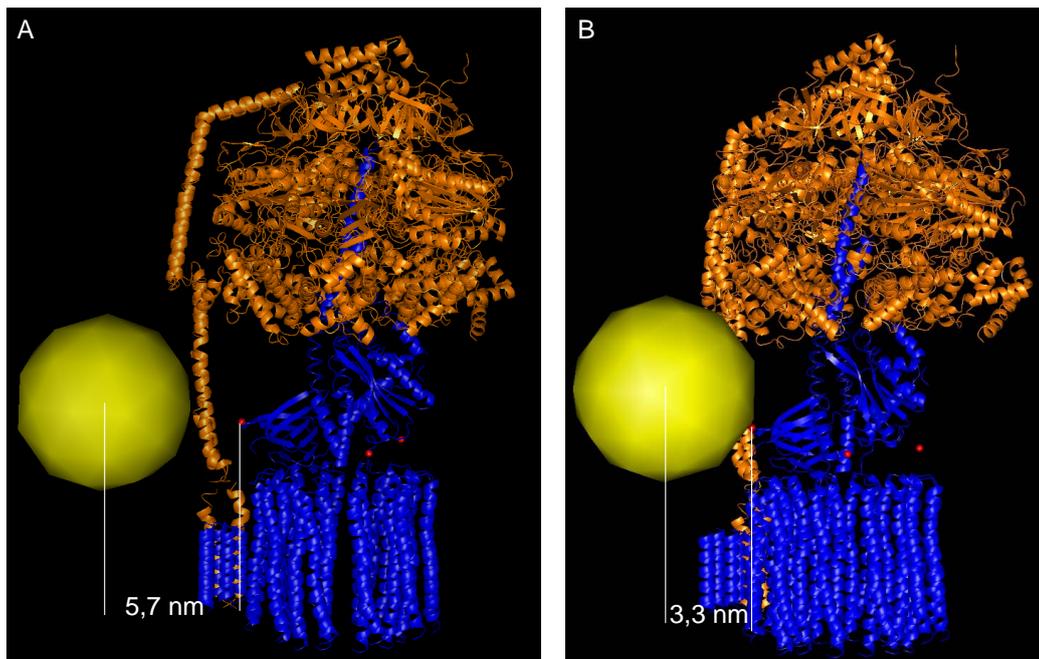


Abbildung 44: Lokalisierung des QD₅₈₅ an der H⁺-ATPsynthase

Die große gelbe Kugel stellt einen QD₅₈₅ mit einem Radius von 3,2 nm dar, mit den roten Kugeln sind die Positionen von ϵ 56 in den drei um 120°gedrehten Zustände des Rotors dargestellt. In den beiden Teilbildern sind zwei Grenzfälle dargestellt. A Der QD₅₈₅ weist vom Enzym weg nach außen. Damit ergibt sich ein großer Abstand zwischen dem Zentrum des QD₅₈₅ und ϵ 56 im Hoch-FRET-Zustand von 5,7 nm. B Der QD₅₈₅ ist zwischen den beiden Verbindungen vom F₀-Teil zum F₁-Teil lokalisiert. Damit ergibt sich ein kleinerer Abstand zwischen dem Zentrum des QD₅₈₅ und ϵ 56 im Hoch-FRET-Zustand von 3,3 nm.

5 Untersuchungen an der Lipidbilayer

Bisher wurden die FRET-Einzelmolekülexperimente an der H^+ ATPsynthase immer in diffundierenden Liposomen durchgeführt und in einem konfokalen Mikroskop beobachtet. Diese Methode hat zwei Nachteile. Zum einen ist die Beobachtungszeit durch die Diffusion beschränkt. Zum anderen konnte, wenn man in Syntheserichtung messen wollte, nur über den Austausch des Puffers eine elektrochemische Potentialdifferenz an der Membran des Liposoms erzeugt werden. Ein Einbau der H^+ -ATPsynthase in eine planare Lipidbilayer, über die man mit Elektroden eine elektrische Potentialdifferenz erzeugen kann, würde den Austausch des Puffers bei Synthesemessungen ersetzen. Eventuell wäre es sogar möglich, die Beobachtungszeit zu erhöhen und die Richtung der elektrochemischen Potentialdifferenz zu ändern.

Hierfür wurde ein Verfahren, das im Arbeitskreis von Prof. Wagner, Universität Osnabrück, entwickelt wurde, für die geplanten Messungen adaptiert. Es wurde mit Unterstützung der Arbeitsgruppe von Prof. Wagner eine Messzelle aufgebaut wie sie in Abschnitt 2.16.2 beschrieben ist. Sie bestand aus einer Teflonmembran, die ein kleines Loch von ca. $80\ \mu\text{m}$ hatte. Dieses Loch verband die beiden Teile der Messzelle, die *cis*- und *trans*-Kammer genannt wurden, wobei die *cis*-Kammer oberhalb des Lochs lokalisiert war und die *trans*-Kammer unterhalb. In diesem Loch wurde dann die Lipidbilayer erzeugt. Um das vorher markierte Enzym einzubauen, wurde es in Liposomen rekonstituiert (vgl. Abschnitt 2.11). Diese Liposomenlösung wurde in die *cis*-Kammer gegeben. Durch den K^+ -Gradienten fusionierten die Liposomen mit der Lipidbilayer (vgl. Abschnitt 1.8).

5.1 Charakterisierung der Lipidbilayer

Für diese Experimente wurde die in Abschnitt 2.16.2 beschriebene Messzelle verwendet und eine Lipidbilayer erzeugt wie in Abschnitt 2.16.3 beschrieben. Die Anforderungen an die Lipidbilayer waren Stabilität über einen längeren Zeitraum (mehr als 20 min) und Dichtigkeit sowohl gegenüber Partikeln als auch Ionen. Zu Beginn der Experimente wurden diese Eigenschaften überprüft.

5.1.1 Stabilität

Nachdem die Lipidbilayer gebildet war, konnte sie optisch mithilfe des Mikroskops beobachtet werden. Da das Mikroskop keine eigene Lichtquelle besitzt, wurde mit einer Lampe die Messzelle beleuchtet. Die Lipidbilayer wurde daran erkannt, dass im Vergleich zum of-

fenen Loch der äußeren Rand schwarz war. Dies war besonders gut zu erkennen, wenn die z-Position verändert wurde. Waren im Loch mehrere größere Blasen zu erkennen, die große Teile des Lochs in der Teflonmembran verstopften, wurde davon ausgegangen, dass zu viel Lipid zugegeben worden war. War dies der Fall, so wurde die Zelle zerlegt und wieder neu aufgebaut.

Um eine stabile Lipidbilayer zu erhalten, wurden sowohl die Lipidzusammensetzung als auch die Lipidkonzentration variiert. Das Verhältnis von PtdCho/PtdAc in der Lipidmischung wurde zwischen 50 zu 1 und 5 zu 1 geändert. Die optimale Zusammensetzung war 21 zu 1. Die Gesamtkonzentration von Lipid in n-Decan wurde zwischen 36 mg/ml und 5,4 mg/ml variiert. Die optimale Konzentration betrug 18 mg/ml. Die damit erzeugten Bilayer waren meist über eine Stunde stabil. Es soll noch erwähnt werden, dass die Stabilität der Bilayer größer war, wenn kleinere Löcher in der Teflonmembran verwendet wurden.

5.1.2 Festigkeit gegenüber Stößen

Um zu überprüfen, ob die Bilayer vorhanden ist, wurden nach der optischen Kontrolle fluoreszierende Kügelchen (Fluorospheres, Microspheres, Molecular Probes, $\varnothing = 1 \mu\text{m}$, Emission 575 nm) in die *cis*-Kammer gegeben. Angeregt wurde deren Fluoreszenz mit dem Kr-Ionen-Laser (530 nm). Der Aufbau ist in Abschnitt 2.18 beschrieben und im Teilbild A der Abbildung 45 schematisch die Messung gezeigt.

Die Abbildung 45 B zeigt einen Blick von unten, das heißt durch die *trans*-Kammer auf die Bilayer. Die Bilayer selbst ist nicht zu sehen, sondern nur die Fluorospheres in der *cis*-Kammer. Die Bildfolge dauert 20 Sekunden lang, alle 0,5 Sekunden wurde ein Bild aufgenommen. Die fokale Ebene wurde auf die Höhe der Bilayer eingestellt. Bis zu Sekunde 9 ist die Diffusion von mehreren Fluorospheres in der *cis*-Kammer zu sehen. Ein Fluorosphere ist scharf zu sehen, die anderen befinden sich oberhalb der fokalen Ebene und sind deshalb unscharf. Bei Sekunde 9 platzt die Bilayer. Dadurch können die Fluorospheres jetzt durch das Loch in die *trans*-Kammer schwimmen. Sie sind nicht mehr scharf zu erkennen, da sie sich nicht mehr in der fokalen Ebene aufhalten.

Dies bedeutet, dass die Bilayer dicht für diese Partikel ist, solange sie nicht platzt. Es ist hiermit gezeigt, dass die Lipidbilayer für diese Teilchen dicht ist und entsprechend vermutlich auch für Liposomen, die in späteren Experimenten verwendet werden. Diese können also nicht durch das Loch schwimmen, wenn die Lipidbilayer vorhanden ist. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Lipidbilayer nicht durch Stöße von kleineren Partikeln

platzte und dass sich die Liposomen nur von der Seite ihrer Zugabe her (*cis*-Kammer) an die Bilayer anlagern konnten und später fusionierten. Damit ist auch sichergestellt, dass die H⁺-ATPsynthase in der vorgegebenen Richtung (F₁-Teil zur *cis*-Kammer hin ausgerichtet) eingebaut wurde, und somit beim Anlegen einer Spannung die eingebauten H⁺-ATPsynthasen einheitlich nur in entweder in Synthese- oder in Hydrolyserichtung betrieben werden konnten.

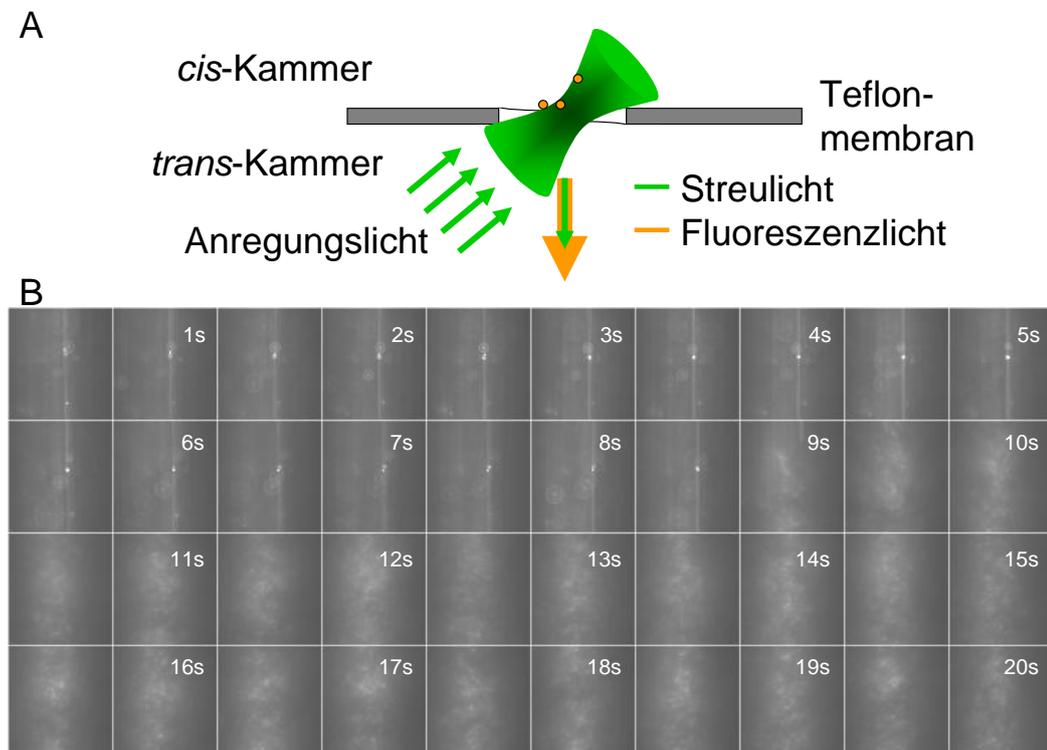


Abbildung 45: Zeitliche Abfolge der Bewegung von Fluorospheres nach deren Zugabe in die *cis*-Kammer

Die Blickrichtung ist von unten durch die *trans*-Kammer in die *cis*-Kammer A) Schematischer Aufbau des Experiments. Die orangenen Punkte stellen die Fluorospheres dar. B) Man sieht eine Bildfolge über einen Zeitraum von 20 Sekunden, alle 0,5 Sekunden wurde ein Bild gemacht. Zu erkennen sind in den Bilder 1 - 8 s mehrere Fluorospheres, die in der *cis*-Kammer diffundieren. In Bild 9 s ist die Lipidbilayer geplatzt und die Fluorospheres bewegen sich durch das Loch in die *trans*-Kammer.

5.1.3 Elektrischer Widerstand

Wichtig für die Charakterisierung der Bilayer ist auch die Ionenleitfähigkeit. Zu deren Bestimmung wurde die Stromstärke zwischen der *cis*- und der *trans*-Kammer bei einer Spannung von 20 mV gemessen. Spannungen oberhalb von 100 mV wurden nicht verwendet, da bei höheren Spannungen die Lipidbilayer platzte.

Es wurde jeweils aus der angelegten Spannung und dem gemessenen Stromfluss der Wider-

stand berechnet. War die Kammer nur mit Puffer gefüllt, so wurde je nach Lochgröße ein Widerstand zwischen 250 k Ω und 10 M Ω gemessen. War eine Bilayer in dem Loch der Teflonmembran gebildet worden, so konnte durch Veränderung der Spannung der Stromfluss innerhalb der Messgenauigkeit nicht beeinflusst werden, d.h. der Widerstand war größer als 10 G Ω . In die Lipidbilayer konnten durch Fusion mit entsprechenden Liposomen K⁺-Ionenkanäle (Nystatin/Ergosterol) eingebaut werden. Nach erfolgreicher Fusion stieg der Strom kontinuierlich an. Dementsprechend sank der Widerstand und es wurden Werte zwischen 28 und 40 M Ω gemessen (vgl. Abschnitt 5.3.1).

Der große Unterschied bei den Messungen des Widerstandes mit offenem Loch ist durch die Tatsache zu erklären, dass die Löcher sehr unterschiedliche Durchmesser hatten. Dies ist eine Folge der beschriebenen Technik (vgl. Abschnitt 2.16.2). Wurde die Bilayer gebildet, so konnte kein Stromfluss gemessen werden. Dies wurde sowohl von einer Lipiddoppelmembran als auch von einem Öltropfen, der das Loch verstopft, erwartet. Erst durch den erfolgreichen Einbau eines Ionenkanals konnte die Tatsache bestätigt werden, dass es sich hier um eine Lipiddoppelmembran handelte.

5.2 Untersuchung der Fusion von Liposomen mit der Lipidbilayer mit optischen Methoden

Nach Etablierung der Bilayer wurde versucht, das rekonstituierte und QD-markierte Enzym in die Lipidbilayer einzubauen. Es wurde erwartet, die Fluoreszenz der QDs als hellen Punkt zu sehen war, der sich in x- und y-Richtung bewegt. Bewegungen in z-Richtung führten entweder zu Diffusion aus der fokalen Ebene heraus und von der Bilayer weg, oder zur Fusion, wodurch sich dann die Diffusion des markierten Enzyms verlangsamen sollte. Dazu wurde der Aufbau, wie er in Abschnitt 2.18 (mit der Messzelle aus Abschnitt 2.16.2 beschrieben ist) verwendet.

5.2.1 Liposomen mit markierter und rekonstituierter H⁺-ATPsynthase

Es wurden Liposomen mit QD-markierter H⁺-ATPsynthase verwendet. Diese Liposomen wurden nach Erzeugen der Lipidbilayer in die *cis*-Kammer gegeben und mikroskopisch beobachtet. Die Abbildung 46 zeigt die Bilayer von unten. Man erkennt einige Liposomen und in der Mitte einen QD als hellen Punkt. Im Zeitraum der Beobachtung (10 min) bewegte sich der Punkt nicht. Während der Aufnahme wurde die Fokusebene variiert und man sieht

den Punkt unscharf werden, verschwinden und wieder auftauchen, wenn die Fokusebene auf die Lipidbilayer eingestellt wird. Ebenfalls zu erkennen sind einige größere Liposomen oder Lipidtröpfchen. Diese entstehen bei der Erzeugung der Bilayer, ob es sich um Liposomen oder Lipidtröpfchen, konnte nicht geklärt werden. Diese Bildfolge ist als Film im Anhang zu sehen (QDLiposom.avi).

Aus diesen Beobachtungen kann man folgern, dass das Liposom mit markiertem Enzym auf der Bilayer liegt. Eine Fusion ist aber als unwahrscheinlich anzunehmen, da man erwarten würde, dass das markierte Enzym im Lipidbilayer diffundieren würde, d.h. es handelt sich um ein Liposom, welches auf der Lipidbilayer liegt, aber nicht fusioniert ist. Die hohe Fluoreszenzintensität lässt vermuten, dass sich mehrere markierte H^+ -ATPsynthasen in diesem Liposom befinden.

5.2.2 TMR-Liposomen mit markierter und rekonstituierter H^+ -ATPsynthase

Um die Fusion direkt beobachten zu können, wurden TMR-Liposomen (vgl. Abschnitt 2.10.4) verwendet, diese enthielten 20 TMR-Lipide [28] und eine QD-markierte H^+ -ATPsynthase. Bei diesem Versuch wurde erwartet, dass man ein Liposom als hellen Punkt (Fluoreszenz des TMR und des QDs) sieht, welcher bei Fusion mit der Lipidbilayer dunkler wird. Dies sollte deshalb geschehen, da die TMR-Lipide von der Stelle der Fusion wegdiffundieren und nur die Fluoreszenz des QD-markierten Enzyms sollte als heller Punkt zu sehen sein.

Die Abbildung 47 zeigt eine Bildfolge einer solchen Messung. Man erkennt das Liposom als hellen Punkt markiert mit einem roten Kreis, der sich durch das Bild bewegt. Die Fluoreszenzintensität des Liposoms wurde über die Zeit verfolgt und die Intensität des hellsten Pixel des Punktes als Funktion der Zeit gemessen. Der Verlauf der Intensität als Funktion der Zeit ist in Abbildung 48 gezeigt. Ein Bleichen wie im Abschnitt 4.3 wurde nicht beobachtet, da hier der TIRF-Aufbau verwendet wurde bei dem die Anregungsintensität sehr viel geringer ist.

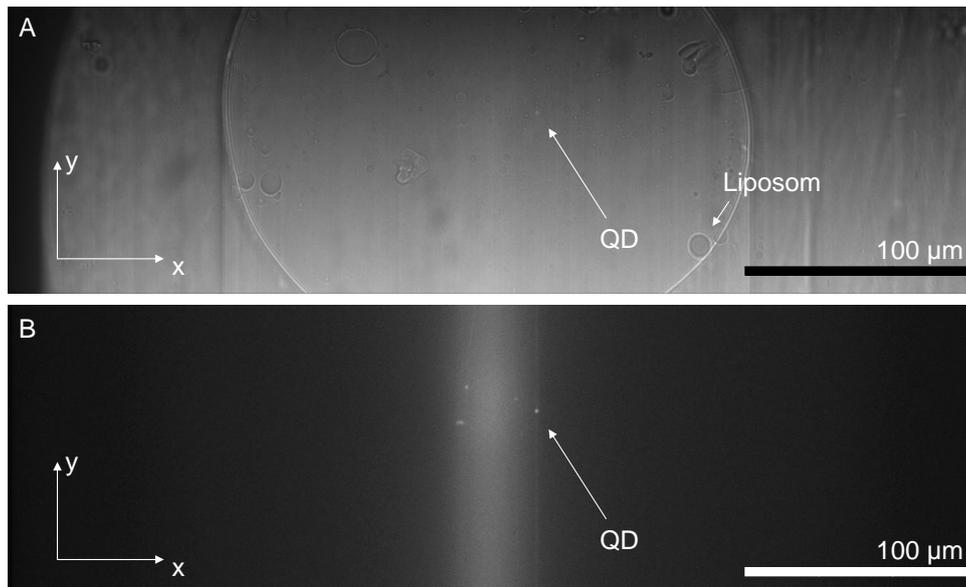


Abbildung 46: Bild der Bilayer von unten 10 min nach der Zugabe der Liposomen mit QD-markierter H^+ -ATPsynthase

A) Dieses Bild wurde im Gegenlicht einer Lampe aufgenommen. Die äußeren Ränder sind die Abgrenzung zwischen Teflonmembran und Lipidbilayer. Einige Liposomen oder Fetttröpfchen sind auf der Lipidbilayer zu erkennen. Bei Verstreichen des n-Decans, in welchem das Lipid gelöst ist, entsteht nicht nur die Bilayer, sondern auch immer einige Liposomen bzw. Lipidtröpfchen. Zu erkennen ist außerdem ein heller Punkt in der Mitte (siehe Pfeil). Hier handelt es sich vermutlich um ein Liposom mit markiertem Enzym, das auf der Bilayer liegt. B) Bei diesem Bild handelt es sich um die gleiche Abbildung wie in A, nur ist die Lampe abgeschaltet. Man erkennt den gleichen QD wie oben und es sind auch noch andere QDs zu erkennen.

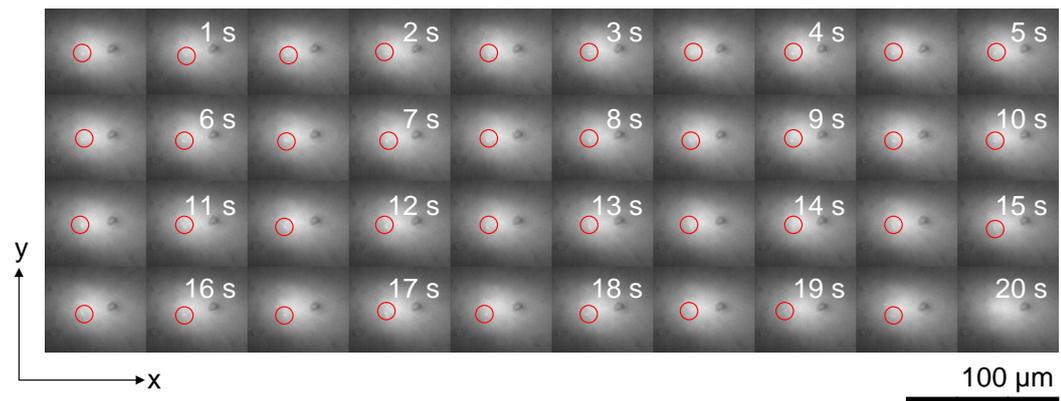


Abbildung 47: Zeitliche Abfolge der Bewegung eines TMR-Liposoms mit eingebauter markierter H^+ -ATPsynthase auf der Bilayer

Der Aufbau des Experiments ist gleich dem aus Abbildung 45 A. Man sieht einen Zeitbereich von 20 Sekunden, alle 0,5 Sekunden wurde ein Bild gemacht. Die Blickrichtung ist von unten durch die *trans*-Kammer in die *cis*-Kammer. Zu erkennen ist ein Liposom oder Lipidtröpfchen auf der Bilayer (schwarzer Punkt), welches bei der Erzeugung der Bilayer entstanden ist. Daneben ist ein heller Punkt, der sich über die Bilayer bewegt (markiert durch einen roten Kreis). Dies ist ein TMR-Liposom mit eingebauter und QD-markierter H^+ -ATPsynthase, welches in die *cis*-Kammer gegeben wurde.

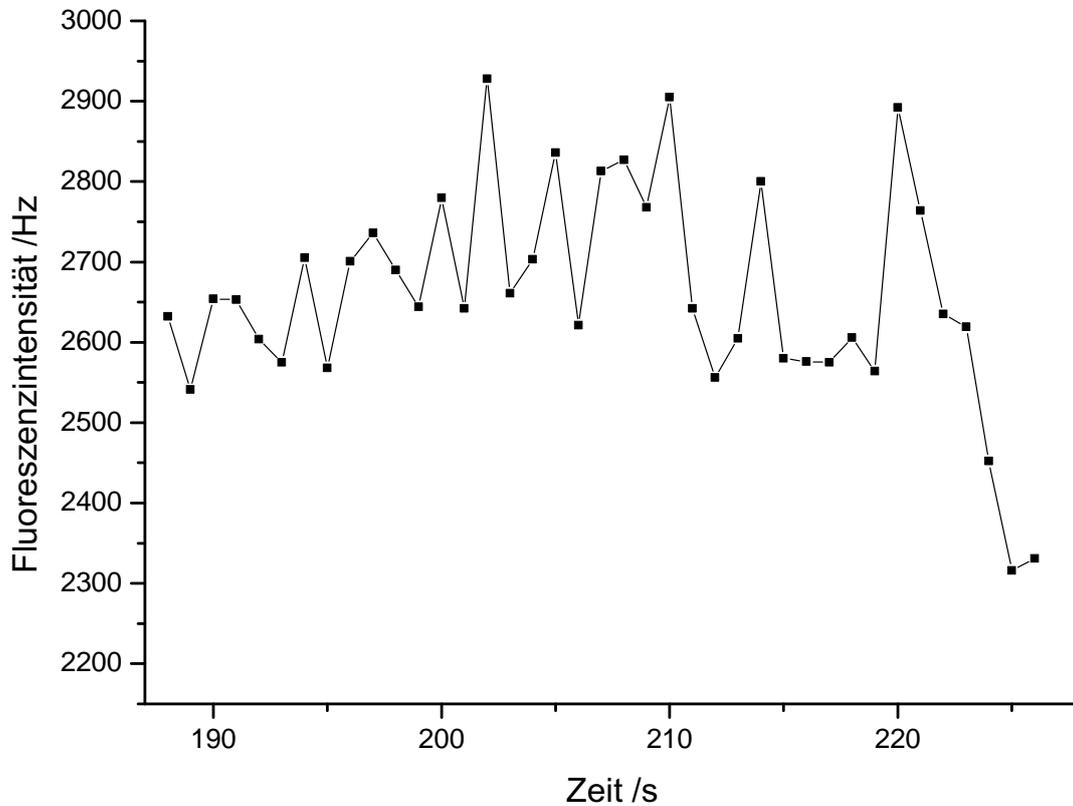


Abbildung 48: Der Verlauf der Intensität des hellsten Pixels des Liposoms aus Abbildung 47 als Funktion der Zeit

Man erkennt, dass die Intensität zu Beginn nicht abnimmt, sondern im Mittel schwach zunimmt. Erst bei ca. 220 s nimmt die Intensität ab. Dies könnte auf eine Fusion des Liposoms mit der Bilayer zurückzuführen sein. Allerdings könnte das Liposom den Fokus auch in z-Richtung verlassen haben. Auch dies würde zu einer Intensitätsabnahme führen. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die x- und y-Koordinaten des hellsten Pixel jeden Bildes des Filmes gemessen (Programm *WinSpec/32*). Diese Spur ist in Abbildung 49 dargestellt. Mit Hilfe dieser Daten wurden die Weglängen für jeden Punkt nach einem Bild (0,5 s), nach jedem zweiten Bild (1 s) und nach jedem dritten Bild (1,5 s) in x- (Δx) und y-Richtung (Δy) berechnet. Aus diesen Weglängen wurden die Verschiebungquadrate (Δx^2 bzw. Δy^2) und der Mittelwert bestimmt. Das mittlere Verschiebungsquadrat ($\overline{\Delta r^2} = \overline{\Delta x^2} + \overline{\Delta y^2}$)

wurde berechnet. Nach EINSTEIN-SMOLUCHOWSKI gilt:

$$\overline{\Delta x^2} = \overline{\Delta y^2} = 2Dt \quad (49)$$

$$\overline{\Delta r^2} = 4Dt \quad (50)$$

Dabei ist D der Diffusionskoeffizient und t die Zeit zwischen den Messpunkten. Durch Auftragung von $\overline{\Delta r^2}$ gegen t wurde aus der Steigung der Diffusionskoeffizient bestimmt (vgl. Abbildung 50 Programm *Origin 7*).

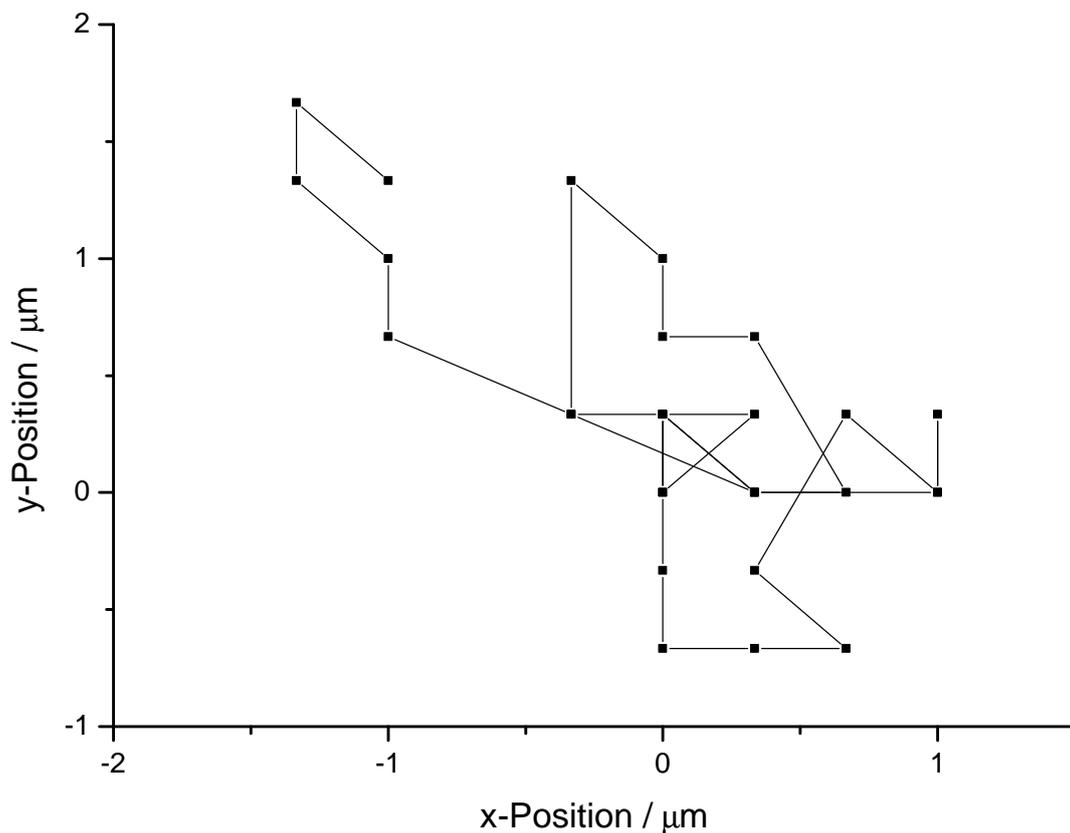


Abbildung 49: Position des Liposoms aus der Bildfolge in Abbildung 47
Der Anfangspunkt der beobachteten Diffusion wurde als Ursprung gewählt.

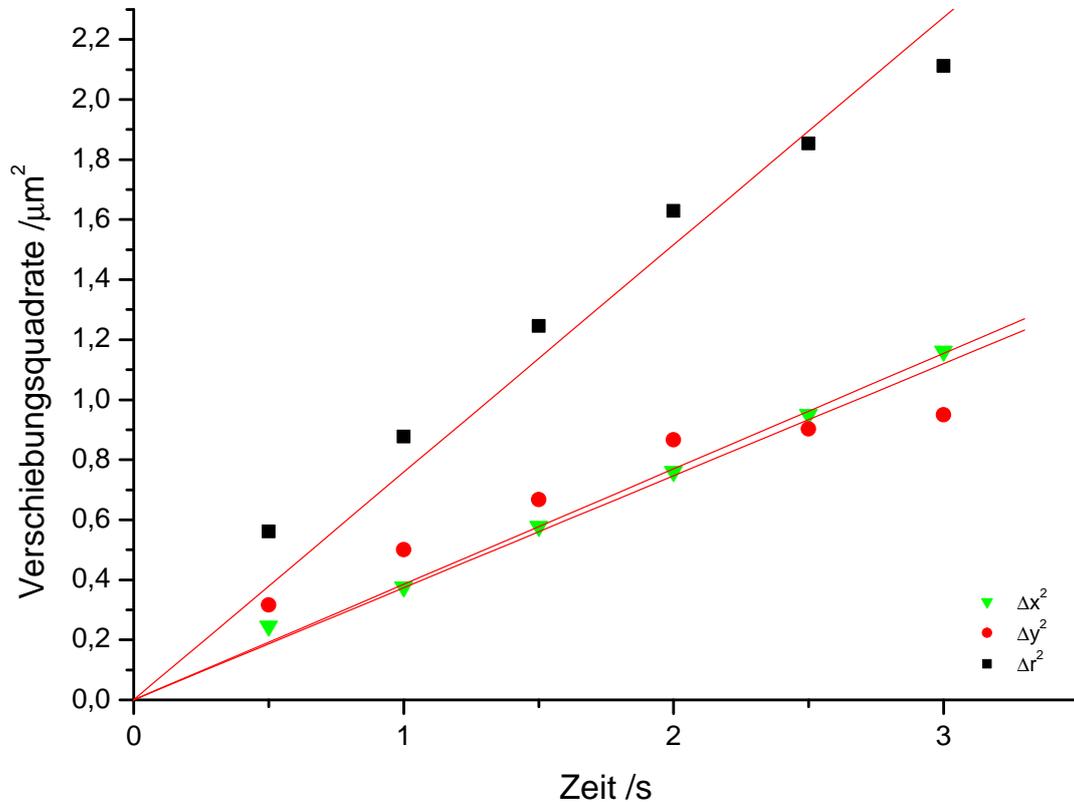


Abbildung 50: Auftragung der mittleren Verschiebungsquadrate von $\overline{\Delta x^2}$, $\overline{\Delta y^2}$ und $\overline{\Delta r^2}$ aus der Bildfolge in Abbildung 47

Die aus den Verschiebungsquadraten berechneten Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 26 angegeben.

Tabelle 26: Diffusionskoeffizienten eines TMR-Liposoms mit QD-markierter H^+ -ATPsynthase

$D_x / \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	$D_y / \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$	$D_r / \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$
$0,193 \pm 0,003$	$0,187 \pm 0,015$	$0,190 \pm 0,008$

Die drei Diffusionskoeffizienten sind innerhalb ihrer Fehler gleich groß ($D = 0,19 \pm 0,05 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

In einem anderen Ansatz wurde ein Mittelwert $\overline{\Delta x^2}$ von allen Δx^2 gebildet. Mit Gleichung 49 wurde der Diffusionskoeffizient zu $0,24 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bestimmt. Eine analoge Berechnung ergab für $\overline{\Delta y^2}$ $0,31 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Der Mittelwert, der beiden Diffusionskoeffizienten betrug $0,28 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und entspricht im Rahmen der Genauigkeit dem Diffusionskoeffizienten der im ersten Ansatz berechnet wurde.

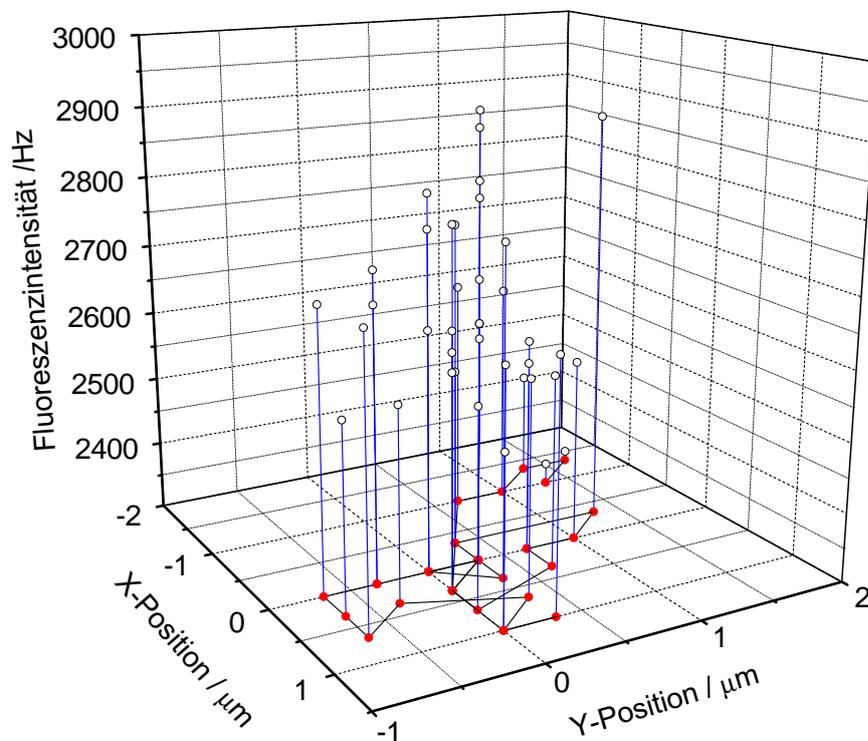


Abbildung 51: Koordinaten und die jeweilige gemessene Intensität des QDs aus Abbildung 47

Der Startpunkt wurde als Ursprung verwendet.

Abbildung 51 zeigt zusätzlich zu der Position auch noch die jeweilige Intensität. Die Betrachtung der Position und der Intensität des QDs zeigt, dass die beobachtete Abnahme

der Intensität nicht Folge einer Fusion ist, sondern dass sich das Liposom aus der Fokusebene heraus in z-Richtung bewegt hat. Im Bild bei 18 s ist das Liposom noch deutlich zu erkennen, in den weiteren Bildern ist es dann nicht mehr genau zu erkennen, weil es an Schärfe verliert. Es verlässt den Bereich der Anregung nicht in der xy-Ebene sondern die fokale Ebene in z-Richtung. Wäre eine Fusion mit der Lipidbilayer geschehen, so könnte das Enzym nur aus dem Bild verschwinden, indem es den Bereich der Anregung innerhalb der beobachteten xy-Ebene verlässt. Ein Verlassen in z-Richtung ist nur möglich, wenn keine Fusion stattgefunden hat. Es konnte bei insgesamt 480 Versuchen keine Bildfolge gefunden werden, die dieses Kriterium erfüllte und damit auf eine Fusion hinweisen würde.

Bei einigen Positionen wurden unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten gemessen (vgl. Abbildung 51 in den Punkten (0/0), (0,3/0) und (0/0,3)). Dies könnte auf das Blinken des QDs zurückzuführen sein. Es ist aber auch möglich, dass sich das Liposom in z-Richtung zu einer Stelle mit einer geringeren Anregungsintensität bewegt. Beides würde zu einer geringeren Fluoreszenzintensität des hellsten Pixels bei gleicher Position führen.

Der Diffusionskoeffizient, der aus den Verschiebungsquadraten eines einzelnen Liposoms erhalten wurde, wurde mit dem Diffusionskoeffizienten verglichen, der mit der STOKES'schen Gleichung berechnet wurde. Hierfür wurden folgende Daten verwendet: die BOLTZMANN-Konstante $k_B = 1,38 \cdot 10^{-23}$, $T=292$ K, Radius des Liposoms $a=(75 \pm 5)$ nm [46], Viskosität des Wassers $\mu = 1,05 \cdot 10^{-3}$ Pa s [47]. Es ergibt sich

$$D_{\text{STOKES}} = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \mu \cdot a} = \frac{1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J K}^{-1} \cdot 292 \text{ K}}{6 \cdot \pi \cdot 10^{-3} \text{ Pa s} \cdot 75 \text{ nm}} = 2,70 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1} \quad (51)$$

Geht man von einem Fehler von a von 5 nm aus, erhält man einen Fehler von D von $0,2 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. Der beobachtete Diffusionskoeffizient ist wesentlich kleiner als der aus Gleichung 51 abgeschätzte Wert. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die 2-dimensionale Diffusion eines Liposoms in der Nähe der Bilayer auf Grund von Wechselwirkungen mit der Grenzfläche langsamer erfolgt als die 3-dimensionale Diffusion in wässriger Lösung.

5.2.3 Einfluss von Ca^{2+} auf die Fusion

In verschiedenen Arbeiten wurde berichtet, dass die Fusion von Liposomen mit der Bilayer erst nach Zugabe von Ca^{2+} erfolgte [48], [49]. Um dies zu untersuchen, wurde ca. 10 min nach der Zugabe der Liposomenlösung $10 \mu\text{l}$ 100 mM CaCl_2 in die *cis*-Kammer zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 mM Ca^{2+} entstand. Das Ca^{2+} wurde erst später

zugegeben, damit die Liposomen schon auf der Bilayer lagen, bevor das Ca^{2+} zugegeben wurde. Diese Vorgehensweise sollte eine Fusion der Liposomen untereinander verringern. Die Liposomen bewegten sich wie in den Abbildungen 47 bis 51 beschrieben, d. h. es konnte aber auch hier keine Fusion festgestellt werden.

5.3 Untersuchung der Fusion der Liposomen mit der Lipidbilayer mit elektrischen Methoden

Offenbar ist die Beobachtung der Fusion auf optischen Weg nicht möglich. Deshalb wurde versucht, die Fusion über eine Änderung der Leitfähigkeit der Bilayer zu verfolgen. Die genaue Vorgehensweise ist in Abschnitt 2.18 beschrieben, es wurde über Ag/AgCl-Elektroden an die Bilayer eine Spannung von 20 mV angelegt und der Strom gemessen.

Zunächst wurde die Bilayer wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben charakterisiert. Um eine Fusion des Liposoms nachzuweisen, wurden Liposomen verwendet, in die Nystatin und Ergosterol eingebaut waren, die eine K^+ -Leitfähigkeit der Liposomenmembran bewirken. Nach erfolgreicher Fusion dieser Liposomen mit der Bilayer sollte ein elektrischer Strom über die Bilayer beobachtet werden.

5.3.1 Beobachtung der Fusion eines Liposoms mit der Lipidbilayer, optisch und elektrisch

Es wurden das Mikroskop, welches in Abschnitt 2.18 beschrieben ist, und die Messzelle aus Abschnitt 2.16.2 verwendet. Nach Erzeugung der Lipidbilayer wurde eine Spannung von 20 mV angelegt. Ein Strom konnte nicht gemessen werden, d.h. die Stromstärke lag unter 1 pA (Nachweisempfindlichkeit der verwendeten Apparatur). Dann wurden in die *cis*-Zelle Liposomen gegeben (Endkonzentration 0,8 nM), die eine QD markierte H^+ -ATPsynthase pro Liposom und sowohl Nystatin als auch Ergosterol enthielten. Zehn Minuten nach der Zugabe der Liposomen wurden 10 μl 100 mM Ca^{2+} -Lösung zugegeben (Endkonzentration 10 mM).

Zu beobachten war nach der Zugabe der Liposomen ein leichter Anstieg des Stromflusses. Nach der Zugabe des Ca^{2+} wurde die Anstieg deutlicher. Dies ist schematisch in Abbildung 52 gezeigt. Die Zunahme der Leitfähigkeit der Lipidbilayer weist darauf hin, dass Fusionen von Liposomen mit der Bilayer erfolgt sind und dabei Nystatin/Ergosterol-Ionenkanäle eingebaut wurden.

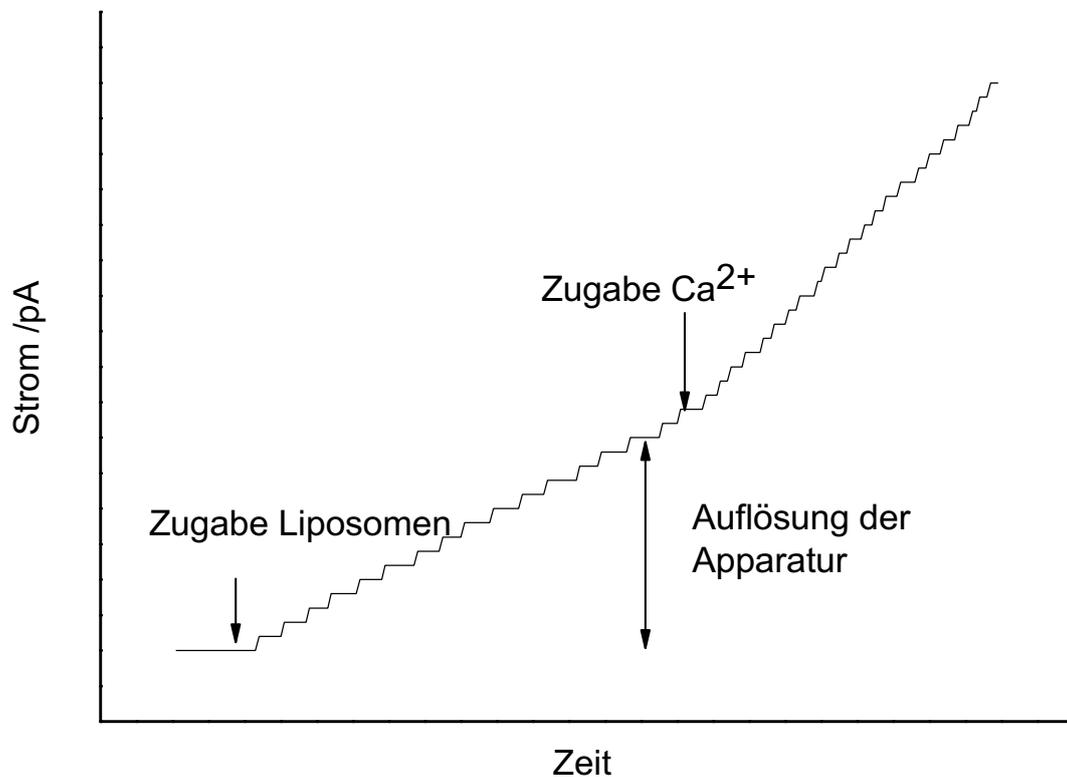


Abbildung 52: Erwarteter Verlauf des Stromes bei Zugabe von Liposomen mit Nystatin und Ergosterol in die *cis*-Kammer der Messzelle.

Erwartet wird ein stufenweiser Anstieg des Stroms, wobei jede Stufe der Fusion eines Liposoms zugeschrieben wird. Die Stufe entspricht etwa 70 fA bei einer Spannung von 20 mV. Da aber nur 1 pA aufgelöst werden kann, wird eine kontinuierliche Stromzunahme beobachtet. Nach der Zugabe von Ca²⁺ steigt die Anzahl der Fusionen pro Zeit an und die Steigung der Kurve wird größer.

Die Leitfähigkeit eines einzelnen Nystatin/Ergosterol-Kanals wird mit 0,6 pS angegeben [33]. Die Konzentration von Nystatin in der Liposomenlösung betrug etwa 5 μ M. Bei einer Liposomenkonzentration von 149 nM [28] sind also im Schnitt 32 Nystatinmoleküle in einem Liposom enthalten. 6 ± 2 Nystatinmoleküle bilden einen Ionenkanal [50], d.h. es wird bei der Fusion eines Liposoms im Mittel eine Leitfähigkeitsanstieg von 3,6 pS erwartet.

Bei einer angelegten Spannung von 20 mV sollte daher die Fusion eines Liposoms mit einer Stromzunahme von etwa 70 fA verknüpft sein (vgl. Gleichung 52). Da die Messapparatur nur eine Auflösung von 1 pA besitzt, kann der Effekt von etwa 15 Fusionen beobachtet werden. Dementsprechend wurde ein stetiger Anstieg des Stromes gemessen.

$$\Delta I = U \cdot L \cdot N \approx 70 \text{ fA} \quad (52)$$

Mit:

- ΔI : Strom pro fusioniertem Liposom
- U : angelegte Spannung hier 20 mV
- L : Leitfähigkeit pro Kanal 0,6 pS [33]
- N : Anzahl der Nystatinkanäle pro Liposom, hier 32

Die Zugabe von Ca^{2+} destabilisiert die Bilayer. Um sicherzustellen, dass ein Anstieg der Stromstärke nicht auf die Zugabe von Ca^{2+} zurückzuführen ist, wurde der Strom nach Zugabe von Ca^{2+} (1 mM - 10 mM) ohne Zugabe von Liposomen gemessen. Unter diesen Bedingungen wurde kein Anstieg des Stromflusses beobachtet. Daraus konnte geschlossen werden, dass durch Ca^{2+} alleine keine Leitfähigkeit der Bilayer bewirkt wird.

Parallel zu diesen elektrischen Messungen wurden auch optische Messungen durchgeführt wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben. Der Aufbau des Experiments entspricht dem aus der Abbildung 45 A. Die Abbildung 53 zeigt eine Bildfolge nach Zugabe der Liposomen und des Ca^{2+} in die *cis*-Kammer. Ab 2 s erkennt man einen QD als dunklen Punkt, der sich nur in x- und y-Richtung bewegt. Ab 6 s ist dieser scharf zu erkennen, zu diesem Zeitpunkt findet die Fusion möglicherweise statt. Er ist mit über den gesamten Beobachtungszeitraum (30 s) deutlich und scharf zu erkennen, daraus lässt sich schließen, dass die z-Position während der Aufnahme konstant bleibt. Ein solches Verhalten wurde bei 22 Messungen von je 30 min gefunden. Die x-/y-Koordinaten sind in Abbildung 54 aufgetragen. Abbildung 55 zeigt die Position und die zugehörige Intensität des hellsten Pixels.

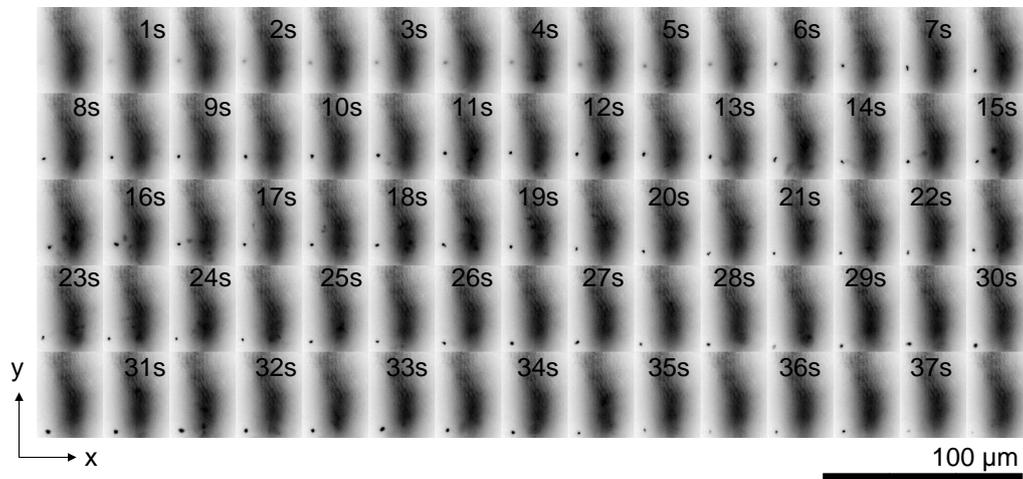


Abbildung 53: Zeitliche Abfolge der Bewegung der markierten H^+ -ATP synthase nach der Fusion des Liposoms mit der Lipidbilayer

Der Aufbau des Experiments entspricht dem aus der Abbildung 45 A. Man sieht aus der *trans*-Kammer in Richtung der *cis*-Kammer. Die Aufnahmezeit eines einzelnen Bildes betrug 0,5 Sekunden, es wurden insgesamt 37 s gemessen. Zur besseren Sichtbarkeit wurde die Intensität invertiert. Zu erkennen ist ein QD als dunkler Punkt, der sich in der fokalen Ebene bewegt. Er ist während der gesamten Messzeit scharf zu erkennen.

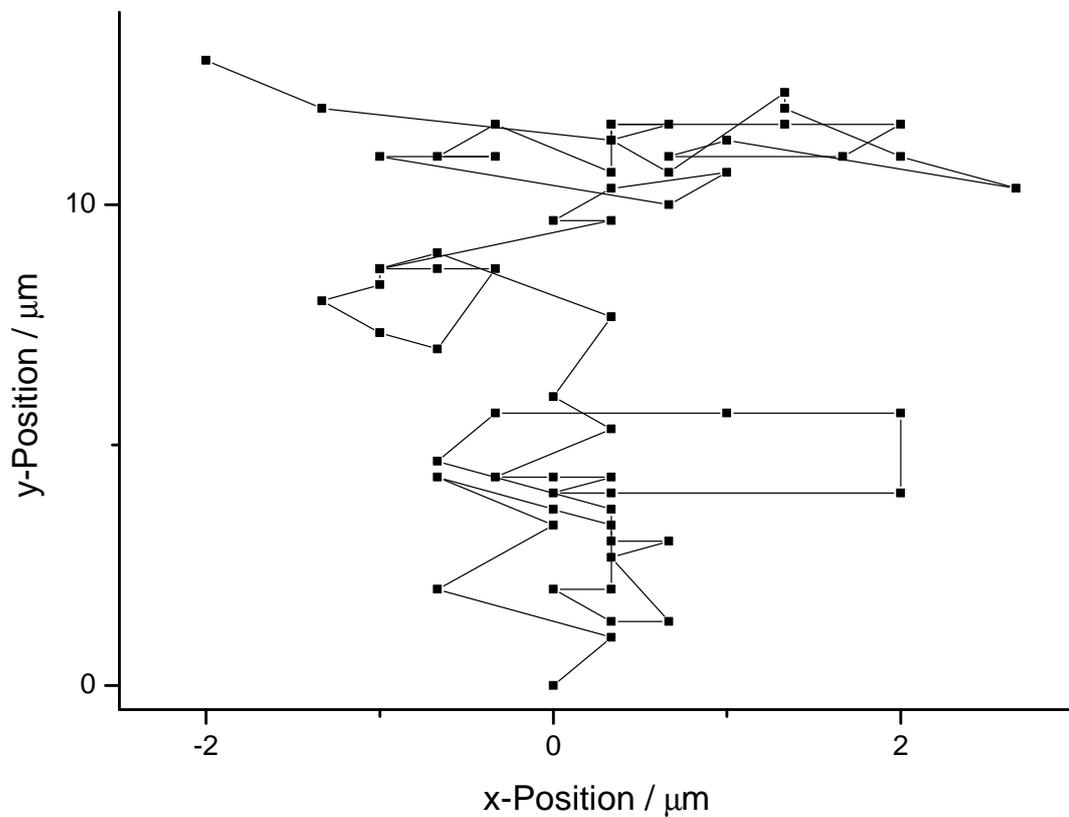


Abbildung 54: Die Koordinaten des QDs aus der Bildfolge in Abbildung 53
Der Anfangspunkt der beobachteten Diffusion wurde als Ursprung gewählt.

Die Schwankungen in der Intensität kommen vermutlich daher, dass sich das markierte Enzym im Laufe der Messung an Orten mit unterschiedlichen Anregungslichtintensitäten befindet. Abbildung 55 zeigt, dass bei kleinen y-Werten und kleinen x-Werten die Fluoreszenzintensität größer ist, das heißt, dass sich in diesem Bereich das Maximum der Anregungsintensität befand.

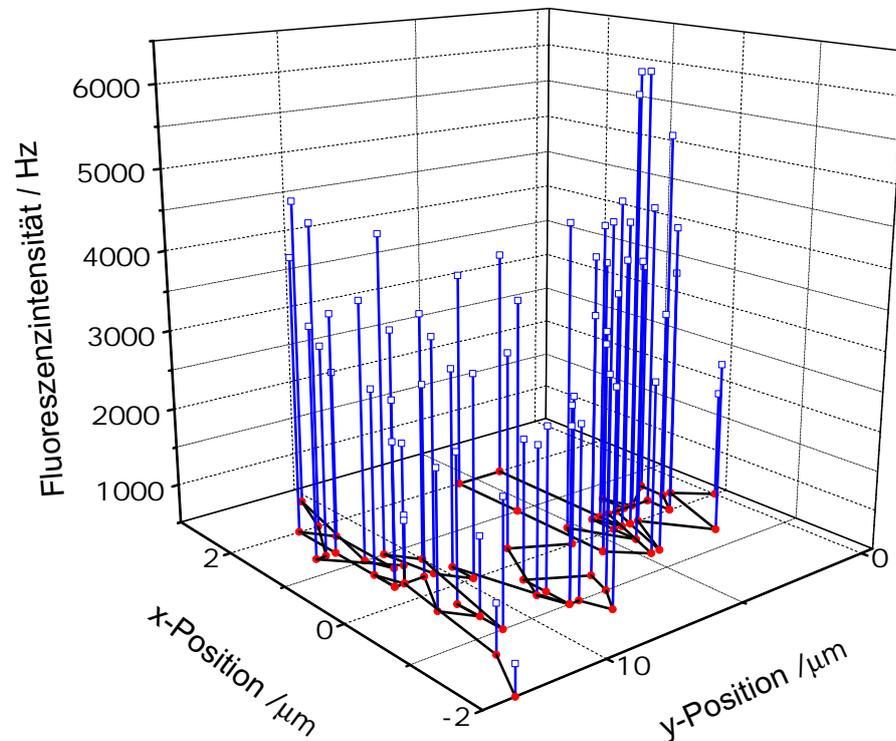


Abbildung 55: Koordinaten des QDs und die jeweiligen Fluoreszenzintensität aus Abbildung 53

Da sich die markierten H^+ -ATPsynthasen nur in x- und y-Richtung bewegte, wird auf eine erfolgreiche Fusion geschlossen. Dies wurde durch die Tatsache unterstrichen, dass der QD am Punkt (-2/13) eine sehr geringe Fluoreszenzintensität besaß und er in weiteren Bildern nicht mehr beobachtet werden konnte. Er hat den beobachteten Bereich verlassen, und zwar in x/y-Richtung, wie für eine eingebaute H^+ -ATPsynthase erwartet wird.

Auch bei dieser Messung wurde der Diffusionskoeffizient aus den Daten der Abbildung 54 bestimmt (siehe Abbildung 56), allerdings wurden nur die ersten 6 Werte verwendet. Bei größeren Schritten weichen die Werte stark von einem linearen Verlauf ab (vgl. Abbildung 56 B) und wurden deshalb nicht berücksichtigt. Die Rechenschritte sind in Abschnitt 5.2.2

beschrieben. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 27 angegeben.

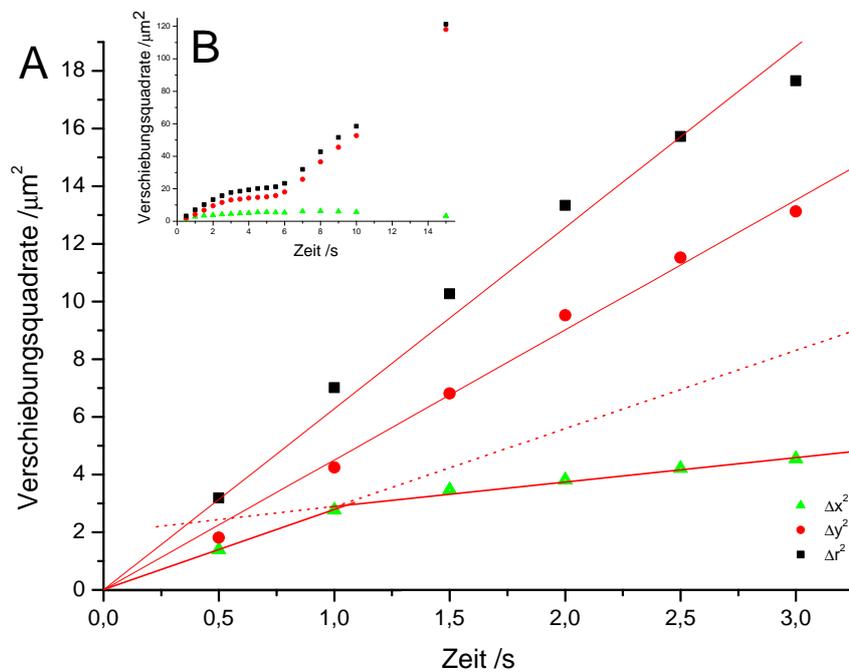


Abbildung 56: Auftragung der mittleren Verschiebungsquadrate von x, y und r aus der Bildfolge in Abbildung 53

A) Durch die Werte für r und y wurde eine Ausgleichsgerade gelegt. Da die Verschiebung in x-Richtung nicht mit einer Geraden beschrieben werden konnten, wurde 2 Bereiche getrennt untersucht. Zum einen wurden die ersten 2 Werte verwendet, zum anderen wurden die letzten 4 Werte verwendet. B) In der Abbildung sind die mittleren Verschiebungsquadrate für längere Schritte gezeigt.

Tabelle 27: Diffusionskoeffizienten einer QD-markierten H⁺-ATPsynthase in einer Bilayer

$D_x / \mu m^2 s^{-1}$	$D_y / \mu m^2 s^{-1}$	$D_r / \mu m^2 s^{-1}$
$1,38 \pm 0,08$	$2,25 \pm 0,05$	$1,57 \pm 0,05$
$0,43 \pm 0,03$		

Die Berechnung von D_x erfolgte über zwei Geradenanpassungen. Für die erste wurden nur die Zeiten bis 1s, für die zweite die Zeiten zwischen 1 und 3 s verwendet. Bildet man den Mittelwert der beiden Diffusionskoeffizienten so erhält man $D_x = 0,90 \mu m^2 s^{-1}$. Die Ursache für dieses Verhalten ist nicht bekannt.

In einem anderen Ansatz wurde ein Mittelwert $\overline{\Delta x^2}$ von allen Δx^2 gebildet. Mit Gleichung 49 wurde der Diffusionskoeffizient zu $1,2 \mu m^2 s^{-1}$ bestimmt. Eine analoge Berechnung ergab für $\overline{\Delta y^2}$ $1,6 \mu m^2 s^{-1}$. Der Mittelwert, der beiden Diffusionskoeffizienten betrug $1,4 \mu m^2 s^{-1}$ und entspricht im Rahmen der Genauigkeit dem Diffusionskoeffizienten der im ersten Ansatz berechnet wurde.

Es ist auffällig, dass die Diffusionskoeffizienten in x- und y-Richtung sich unterscheiden. Liegen die Werte in y-Richtung noch sehr gut auf einer Geraden, weichen die Werte in x-Richtung doch schon deutlich von dieser Beschreibung ab. Dies führt auch zu einer nicht optimalen Anpassung der r-Werte an eine Gerade.

Für die Berechnung der Diffusionskoeffizienten eines Enzyms in einer Lipidbilayer gibt es verschiedene Ansätze, [51], [52], [54] und [53]. Um den Diffusionskoeffizienten in einer Lipidmembran abzuschätzen, kann man in erster Näherung die STOKES'schen Gleichung verwenden (vgl. Gleichung 53). Für die Viskosität der Lipidbilayer wurde der Wert $0,125 \text{ Pa s}$ [55] verwendet. Die Größe a entspricht dem Radius des F_0 -Teils der H⁺-ATPsynthase. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

$$D_{\text{STOKES}} = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \mu_L \cdot a} = \frac{1,3810^{-23} JK^{-1} \cdot 292K}{6 \cdot \pi \cdot 0,125 Pa s \cdot 2,5nm} = 0,68 \mu m^2 s^{-1} \quad (53)$$

Als zweite Näherung kann man die von Petrov und Schwille [52] angegebene Gleichung für die Diffusion in Membranen verwenden.

$$D_{\text{SCHWILLE}} = \frac{k_B \cdot T}{4 \cdot \pi \cdot \eta} \left[\ln \left(\frac{2}{\varepsilon} \right) - C + \frac{4\varepsilon}{\pi} - \left(\frac{\varepsilon^2}{2} \right) \ln \left(\frac{2}{\varepsilon} \right) \right] \cdot \left[1 - \left(\frac{\varepsilon^3}{\pi} \right) \ln \left(\frac{2}{\varepsilon} \right) + \frac{0,73761 \cdot \varepsilon^{2,74819}}{1 + 0,52119 \cdot \varepsilon^{0,61465}} \right]^{-1} \quad (54)$$

$$\varepsilon = \frac{2 \cdot a \mu_w}{\eta} \quad (55)$$

Mit:

D_{STOKES}	: Diffusionskoeffizient nach Gleichung 53
D_{SCHWILLE}	: Diffusionskoeffizient nach Gleichung 54
k_B	: BOLTZMANN-Konstante mit $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$
T	: Temperatur 292 K
$\eta = \mu_L \cdot d$: Oberflächenviskosität des Lipids $6,25 \cdot 10^{-10} \text{ Pa} \cdot \text{s} \cdot \text{m}$
ε	: reduzierter Radius des betrachteten Enzyms (vgl. Gleichung 55)
C	: Eulerkonstante 0,5772
a	: Radius des c-Rings der H^+ -ATPsynthase 2,5 nm
μ_w	: Viskosität von Wasser $0,001 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ [47]
μ_L	: Viskosität des Lipids $0,125 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ [55]
d	: Dicke der Membran 5 nm

Einsetzen der angegebenen Werte ergibt einen Diffusionskoeffizienten von $2,51 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. Bei beiden Rechnungen wurde nur der Radius des hydrophoben c-Rings des Enzym in der Bilayer berücksichtigt. Geht man davon aus, dass sich die Lipidmoleküle in der direkten Umgebung an das Enzym anlagern und mit diesem in der Bilayer diffundieren, so müssten diese ebenfalls berücksichtigt werden. Nimmt man für den Radius $a = 3,5 \text{ nm}$ an (dies entspricht einem Ring von 2 Lipidmolekülen um das Enzym [34]), so ergeben sich in beiden Modellen andere Werte. Aus Gleichung 53 erhält man $D_{\text{STOKES}} = 0,57 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ und aus Gleichung 54 $D_{\text{SCHWILLE}} = 2,42 \mu\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$. In Tabelle 28 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 28: Diffusionskoeffizienten der H⁺-ATPsynthase in wässriger Lösung und in einer Lipidmembran nach verschiedenen Modellen

Partikel	Medium	verwendeter Radius /nm	D _{STOKES} / $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$	D _{SCHWILLE} / $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
H ⁺ -ATPsynthase (ohne)	Wasser	10	20	-
(mit Detergenzmizelle)	Wasser	10,5	18	-
H ⁺ -ATPsynthase (ohne)	Lipidmembranen	2,5	0,68	2,51
(mit einer Lipidschicht)	Lipidmembranen	3	0,57	2,42

Diese berechneten Werte sollen mit dem gemessenen Wert von $1,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ verglichen werden. Hier fällt auf, dass die nach STOKES berechneten Werte für das Enzym in der Bilayer nicht mit den gemessenen Werten übereinstimmen. Gleichung 53 beschreibt die Diffusion in der Bilayer offenbar nur unzureichend. Nimmt man aber für die Beschreibung der Diffusion in der Membran Gleichung 54 [52] und vergleicht den berechneten Wert mit dem gemessenen so findet man eine bessere Übereinstimmung. Die Übereinstimmung wird sogar noch besser, wenn man nicht nur den Radius des Enzyms verwendet, sondern den Radius erhöht und eine Lipidschicht berücksichtigt, die direkt an das Enzym gebunden ist und mit dem Enzym diffundiert. Eine mögliche Ursache für die Abweichung der berechneten Diffusionskoeffizienten von dem gemessenen ist die Oberflächenviskosität, die im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt wurde. Sie ist stark von der Beschaffenheit und der Zusammensetzung der Bilayer abhängig. Zudem ragt der F₁-Teil des Enzyms in die Lösung und verlangsamt die Diffusion.

Drei verschiedene Fälle der Diffusion wurden berechnet und sind im folgenden einzeln diskutiert.

1. **Liposomen in Lösung** Nach STOKES haben Liposomen in Wasser bei einem Radius von 75 nm einen Diffusionskoeffizienten von $2,7 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Dies stimmt mit früheren Messungen überein. Bienert gibt eine Diffusionszeit für Liposomen von 41 ms an [39], ω_0 wurde von Zimmermann an dem gleichen Aufbau zu 686 nm bestimmt [2]. Nach Gleichung 33 ergibt sich aus diesen Daten ein Diffusionskoeffizient von $2,87 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Befindet sich ein solches Liposom auf einer Lipidbilayer, so findet man einen Diffusionskoeffizienten von $0,19 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ (vgl. Abschnitt 5.2.2), dieser unterscheidet sich deutlich von dem eines frei diffundierendem Liposom. Dies hat vermutlich mit

Wechselwirkungen des Liposoms mit der Oberfläche der Lipidbilayer zu tun. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich das Liposom zusätzlich in der z-Richtung bewegt, diese Bewegung konnte nicht gemessen werden und wurde für diese Rechnung nicht berücksichtigt.

2. **EF₀F₁-Mizellen in Wasser** Die Diffusion einer H⁺-ATPsynthase in Wasser wurde nach STOKES berechnet. Dies ist nur eine Näherung, da nach STOKES nur kugelförmige Teilchen beschrieben werden können und es sich bei der H⁺-ATPsynthase um ein hantelförmiges Teilchen handelt (vgl. Abbildung 1). Um trotzdem die STOKES'sche Gleichung verwenden zu können, wurde die Hantel als Kugel approximiert, wobei das Zentrum der Kugel zwischen dem F₀-Teil und dem F₁-Teil lag. Dies ergibt einen Radius von 10 nm. Damit errechnete sich ein Diffusionskoeffizient von $20 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Berücksichtigt man, dass um den F₀-Teil eine Detergenzmizelle vorhanden ist, so kann man von einem Radius von 10,5 nm ausgehen. Der Diffusionskoeffizient hat dann den Wert $19 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Wie man sieht, hat diese Mizelle keinen großen Einfluss auf den berechneten Wert.
3. **EF₀F₁ in der Bilayer** Der Diffusionskoeffizient der H⁺-ATPsynthase in der Bilayer wurde nach zwei Modellen berechnet. Zum einen wurde nach Gleichung 53 (STOKES) der Diffusionskoeffizient eines Partikels mit dem Radius des F₀-Teils (2,5 nm) berechnet. Es ergab sich ein Diffusionskoeffizient von $0,68 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Geht man davon aus, dass sich um das Enzym eine Schicht aus Lipiden anlagert, so muss der Radius des Partikels auf 3 nm erhöht werden, und man erhält einen Diffusionskoeffizienten von $0,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Benutzt man das Modell von Petrov und Schwille [52] und geht von einem Radius von 2,5 nm aus, so erhält man nach Gleichung 54 für den Diffusionskoeffizienten einen Wert von $2,51 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, bei 3 nm erhält man $2,42 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, ergaben einen Diffusionskoeffizienten von $1,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Dieser Wert ist dem der Berechnung nach Petrov und Schwille am nächsten. Die Abweichungen könnten auf die nicht gemessene Viskosität der hier verwendeten Bilayer zurückzuführen sein. Es gilt aber auch zu bedenken, dass sich nur ein Teil des Enzyms in der Bilayer befindet. Der F₁-Teil des Enzyms ragt in die Lösung hinein und wird die Diffusion des Enzyms verlangsamen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch überprüft werden, wie schnell die Diffusion des Enzyms in der Bilayer verglichen mit der Diffusion eines Liposoms in Lösung ist. Vergleicht man den gemessenen Diffusionskoeffizienten eines Liposoms mit rekonstituierter

H⁺-ATPsynthase mit der der H⁺-ATPsynthase in der Bilayer so findet man, dass das Enzym in der Bilayer nur wenig langsamer als das Liposom diffundiert. Für die dreidimensionale Diffusion in Lösung lässt sich aus Gleichung 33 die mittlere Beobachtungsdauer (Aufenthaltsdauer im konfokalen Volumen) aus dem Diffusionskoeffizienten $1,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ und $\omega_0=0,6 \mu\text{m}$ (vgl. Abschnitt 4.2) zu 57 ms berechnen. Diese Beobachtungszeit entspricht etwa der von Bienert angegeben [39] von 41 ms.

Verwendet man aber für die Messungen nicht ein konfokales Mikroskop, sondern den wie in Abschnitt 2.18 beschriebenen TIRF-Aufbau, so hat man eine sehr viel längere Beobachtungszeit. In Abbildung 53 ist zu erkennen, dass in einem Bereich von $33 \mu\text{m} \times 42 \mu\text{m}$ (gezeigter Bildausschnitt) ein QD beobachtet werden kann. Mit Gleichung 33 kann analog eine Beobachtungszeit berechnet werden. Es wurden für ω_0 die Ausdehnung in x- bzw. y-Richtung verwendet. Man erhält dann eine mittlere Beobachtungszeit der H⁺-ATPsynthase von 230 s. Im Laufe dieser Arbeit wurde aber nur Diffusionszeiten von maximal 37 s beobachtet. Dies lag daran das kein Enzym durch das gesamte Bild geschwommen ist. Bei einer größeren Anzahl von Messungen wäre also hierdurch eine längere Beobachtungszeit möglich.

5.3.2 Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde nach der „*Painted planar lipid bilayer*“-Methode Lipiddoppelschichtmembranen erzeugt, die über mehrere Stunden stabil waren. Die elektrische Leitfähigkeit der Membran ist sehr gering. Um die Fusion von Liposomen mit der Bilayer zu zeigen, wurden Liposomen verwendet, die zusätzlich zu der H⁺-ATPsynthase Nystatin und Ergosterol enthielten. Bei der Fusion bildeten sich Nystatin/Ergosterol-Ionenkanäle in der Membran (etwa 6 pro Liposom, Leitfähigkeit pro Kanal 0,6 pS) und man kann die Fusionen an Hand des Anstiegs der elektrischen Leitfähigkeit verfolgen. Da jedes Liposom eine H⁺-ATPsynthase enthielt, kann man auch die Zahl der eingebauten Enzyme abschätzen. Der Erfolg des Einbaus des Enzyms in diese Bilayer wurde auch optisch untersucht. Das mit einem QD markierte Enzym konnte in einem Lasermikroskop mit einem TIRF-Aufbau verfolgt werden. Da das QD-markierte Enzym sich nur in x- bzw. y-Richtung bewegte, wurde geschlossen, dass das Enzym in die Bilayer eingebaut ist. Aus der Bewegung des Enzyms konnte der Diffusionskoeffizient des Enzyms in der Bilayer zu $1,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bestimmt werden. Bei der Diffusion eines Proteins in einer Lipidbilayer handelt es sich um eine Diffusion in zwei Dimensionen. Falls das Liposom nicht mit der Bilayer fusionierte, könnte

die beobachtete Bewegung des QDs auch auf ein diffundierendes Liposom zurückzuführen sein. Daher wurden die Diffusionskoeffizienten für beide Fälle berechnet und mit dem gemessenen verglichen. Anhand der Diffusionskoeffizienten kann man eine Aussage über die Unterschiede der beiden Fälle treffen und man kann die jeweilige Beobachtungszeit beurteilen. Der berechnete Diffusionskoeffizient der H^+ -ATPsynthase in einer Lipidbilayer ist $2,42 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Der gemessene Wert lag bei $1,57 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Die Unterschiede zwischen Messung und Berechnung lassen sich über die geschätzte Viskosität der Bilayer und die Tatsache, dass der F_1 -Teil in die Lösung hineinragte und die Bewegung des Enzyms in der Bilayer verlangsamt, erklären. Die Diffusion eines Liposoms mit rekonstituierter H^+ -ATPsynthase auf der Bilayer wurde ebenfalls gemessen und der Diffusionskoeffizient wurde zu $0,19 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ bestimmt. Dieser ist deutlich kleiner als der berechnete. Dies ist womöglich eine Folge der Wechselwirkungen der Lipidoberflächen von Bilayer und Liposom.

Ein Ziel der Arbeit war es, durch den Einbau der H^+ -ATPsynthase in die Lipidmembran die Beobachtungszeit zu erhöhen. Daher wurden aus den gemessenen Diffusionskoeffizienten die jeweiligen Beobachtungszeiten abgeschätzt. Die Beobachtungsfläche bei der konfokalen Anregung kann als $\omega_0^2 = (0,6 \mu\text{m})^2$ abgeschätzt werden. Damit erhält man für die Beobachtungszeit für das Enzym 57 ms, für die durch das konfokale Volumen diffundierende Liposomen 41 ms. Eine signifikante erhöhte Beobachtungsdauer mittels konfokaler Mikroskopie ist demzufolge nicht zu erwarten.

Verwendet man hingegen statt des konfokalen Mikroskops einen TIRF-Aufbau wie er in Abschnitt 2.18 beschrieben ist, so beträgt die Beobachtungsfläche $1384 \mu\text{m}^2$ und man erhält Beobachtungszeiten bis zu 227 s. Für Untersuchungen von Konformationsänderungen des Enzyms durch FRET müsste hierfür der Aufbau modifiziert werden, so dass gleichzeitig Donor- und Akzeptorfluoreszenz mit der CCD-Kamera beobachtet werden können. Ein weiteres Problem stellt die Zeitauflösung dar. Es werden mittlere Verweilzeiten in den einzelnen Konformationen während der Hydrolyse mit 18,4 ms [2] angegeben. Die verwendete CCD-Kamera hat eine zeitliche Auflösung von 5 ms, d.h. man hätte pro Stufe nur 3-4 Messpunkte.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Einbau der H^+ -ATPsynthase in eine Lipidbilayer möglich ist. Zu untersuchen bleibt, ob mit dieser Methode durch Anlegen einer Spannung an die Lipidbilayer eine Messung der Konformationsänderungen bei Hydrolyse und Synthese möglich ist. Die Vorteile dieser Methoden wären ein geringerer Probenbedarf bei der Synthesemessung, da die elektrische Potentialdifferenz nicht durch einen Wechsel des Puffers, sondern durch das Anlegen einer Spannung erzeugt werden kann. Der Aufbau

für eine Messung während der Synthese und während der Hydrolyse wäre der gleiche, es wäre sogar möglich, beides während einer Messreihe aufzunehmen.

6 Zusammenfassung

H⁺-ATPsynthasen sind membranintegrierte Enzyme, die die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat mit einem transmembranen Protonentransport koppeln. Bei dieser Reaktion treibt der Protonentransport die Rotation der Rotoruntereinheiten ($\gamma\epsilon c_{10}$) relativ zu den Statoruntereinheiten ($\alpha_3\beta_3\delta ab_2$) an und diese Bewegung ruft Konformationsänderungen in den Nukleotidbindungsstellen hervor, die zur Synthese von ATP führen. Der Mechanismus dieser Reaktion kann in einem konfokalen Mikroskop an einzelnen Enzymmolekülen mit Hilfe des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (spFRET) untersucht werden. Hierzu wird die H⁺-ATPsynthase an einer Rotoruntereinheit (ϵ) und einer Statoruntereinheit (b) mit einem Donor- und einem Akzeptorfluorophor markiert und danach in die Membran eines Liposoms integriert. Bei diesen Untersuchungen tritt das Problem auf, dass die Beobachtungszeit durch die Diffusion der Liposomen durch das konfokale Volumen auf etwa 50 ms begrenzt ist. In dieser Arbeit wurden untersucht, ob und wie es möglich ist, eine signifikante Verlängerung der Beobachtungszeit zu erreichen.

Zuerst wurde versucht, Liposomen mit einer eingebauten H⁺-ATPsynthase an einer Glasoberfläche zu immobilisieren. Die optimalen Ergebnisse (in Bezug auf Stabilität, Anzahl der immobilisierten Liposomen und Untergrundsignal) wurden durch Modifizierung der Glasoberfläche mit Biotin, gebunden an Serumalbumin, erreicht. Zugabe von Streptavidin erlaubt dann die Bindung von Liposomen, sofern diese Biotinlipide enthalten. Der Erfolg der Bindung wurde untersucht mit Biotinliposomen, die zusätzlich etwa 20 Tetramethylrhodaminlipidmoleküle (TMR-Lipid) pro Liposom enthielten. Die Oberfläche wurde durch konfokales Rastern abgebildet und es wurden etwa 4 immobilisierte Liposomen pro 100 μm^2 detektiert. Es wurde ein Liposom selektiert und dessen Fluoreszenz beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz schrittweise abnimmt, wobei ein Schritt dem Ausbleichen eines TMR-Moleküls entspricht. Die mittlere Lebensdauer eines TMR-Moleküls im Anregungsfokus des konfokalen Volumens war 450 ms. Die gemessene Fluoreszenzintensität eines Moleküls stimmte mit der aus apparativen Daten und Moleküldaten abgeschätzten gut überein, so dass die Methode geeignet ist, einzelne Moleküle auf der Oberfläche zu detektieren. Um das markierte Enzym beobachten zu können, wurden die bleichanfälligen organischen Fluorophore durch Nanokristalle (Quantenpunkte, QDs) ersetzt. QD₅₈₅ konnte über einen *Crosslinker* an das Enzym gebunden werden, allerdings ging dabei die Syntheseaktivität verloren. Diese markierten H⁺-ATPsynthasen enthielten QD₅₈₅ gebunden an b64C als Donor und ATTO 647N gebunden an ϵ 56C als Akzeptor. Mit

diesem System konnten erste Einzelmolekülmessungen an der Oberfläche durchgeführt werden. Als Beobachtungszeit wurde 60 s gewählt. Die gemessenen FRET-Effizienzen konnten in drei Zustände unterteilt werden. Die Daten wurden mit GAUSS-Verteilungen angepasst und aus den mittleren FRET-Effizienzen wurden drei Abstände erhalten. Diese Abstände stimmten mit den C_{α} -Abständen zwischen b64C und $\epsilon 56C$ des Homologiemodell von EF_0F_1 überein. Die Befunde zeigen, dass Einzelmoleküluntersuchungen mit an der Glasoberfläche immobilisierten in Liposomen rekonstituierten H^+ -ATPsynthasen möglich sind, und dass deutlich längere Beobachtungszeiten erreicht wurden.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, das Enzym in eine Lipiddoppelschicht einzubauen. Hierdurch wäre es möglich, eine elektrischen Potentialdifferenz an der Membran anzulegen, und durch deren Variation die H^+ -ATPsynthase in ATP-Hydrolyse- und ATP-Syntheserichtung zu betreiben. Es wurde mit Hilfe der „*Painted planar lipid bilayer*“-Methode eine Lipiddoppelschicht in einem Loch (80 μm Durchmesser) in einer Teflonmembran erzeugt. H^+ -ATPsynthasen, die mit QD₅₈₅ markiert war, wurden in Nystatin/Ergosterol-Liposomen rekonstituiert. Die Fusion dieser Liposomen konnte elektrisch verfolgt werden, da dabei in die Lipiddoppelschicht Nystatin/Ergosterol-Ionenkanäle eingebaut wurden. Die dabei auftretende Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit der Membran wurde gemessen. Die Diffusion des Enzyms in der Lipidbilayer wurde optisch in einem Mikroskop mit TIRF-Anregung gemessen. Aus diesen Diffusionskoeffizient in der Lipidbilayer ergaben sich Beobachtungszeiten des Enzyms in der Beobachtungsfläche von mehr als 37 s.

Literatur

- [1] Mitchell P., **1961**, *Coupling of phosphorylation and hydrogen transfer by chemiosmotic type of mechanism*, Nature, 191, 144-152.
- [2] Zimmermann B., **2005**, *Die H⁺-ATP-Synthase aus Escherichia coli: Untersuchung der Bewegung der ε-Untereinheit während der Katalyse mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie*, Dissertation, Universität Freiburg
- [3] Engelbrecht S., Junge W., **1997**, *ATP synthase: a tentative structural model*, FEBS Lett., 414, 485-491.
- [4] Abrahams J. P., Leslie A. G. W., Lutter R., Walker J. E., **1994**, *Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria*, Nature, 370, 621-628.
- [5] Rodgers A., Wilce M., **2000**, *Structure of the γ/ε complex of ATP synthase: the camshaft in rotary motor of life*, Nat. Struct. Biol., 7, 1051-1054.
- [6] Wilkens S., Dunn S., Chandler J., Dahlquist F. W., Capaldi R. A., **1997**, *Solution structure of the N-terminal domain of the δ subunit of the E. coli ATP synthase (ECF₁F₀)*, Nat. Struct. Biol., 4, 198-201.
- [7] Fillingame R. H., Angevine C. M., Dmitriev O. Y., **2002**, *Coupling proton movements to c-ring rotation in F₁F₀ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface*, BBA, 1555, 29-36.
- [8] Girvin M. E., Rastogi V. K., Abildgaard F., Markley J. L., Fillingame R. H., **1998**, *Solution structure of the transmembrane H⁺-transporting subunit c of the F₀F₁ ATP synthase*, Biochemistry, 37, 8817-8824.
- [9] Del Rizzo P. A., Dunn S., Bi Y., Shilton B. H., **2002**, *The 'second stalk' of Escherichia coli ATP synthase: structure of the isolated dimerization domain*, Biochemistry, 41, 6875-6884.
- [10] Steigmiller S., Turina P., Gräber P., **2008**, *The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and Escherichia coli*, PNAS, 105(10), 3745-3750.
- [11] Boyer P.D., **1999**, *What makes ATP synthase spin*, Nature 402, 247-249,

- [12] Shimo-Kon R., Muneyuki E., Sakai H., Adachi K., Yoshida M., Kinoshita K., **2010**, *Chemo-mechanical coupling in F1-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis*, *Biophys. J.*, 98, 1227-1236.
- [13] Diez M., **2003**, *H⁺-ATPsynthase aus E. coli: Beobachtung der Protonen angetriebenen Rotation der γ -Untereinheit mit Einzelmolekül Fluoreszenzspektroskopie*, Dissertation, Universität Freiburg
- [14] Pilarczyk G., Joos U., Westphal I., Kahl H., **2004**, *Mikroskopieren im evaneszenten Feld: Die TIRF Mikroskopie ermöglicht neue Einsichten in lebende Kulturzellen*, *Biospektrum* 10
- [15] Förster Th., **1948**, *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*, *Ann. Phys.*, 2, 55-70.
- [16] Schlegel G., **2005**, *Temperaturabhängige Fluoreszenzdynamik einzelner Halbleiternanokristalle*, Dissertation, Universität Mainz.
- [17] Bruns L. E., **1984**, *Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state*, *J. Chem. Phys.*, 80(9), 4403-4409.
- [18] Bruns L. E., **1983**, *A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites*, *J. Chem. Phys.*, 79(11), 5566-5571.
- [19] Schütz I., **2007**, *Charakterisierung und Einsatz von fluoreszierenden Halbleiterkristallen in Einzelmolekül-FRET-Messungen an der H⁺-ATPsynthase*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [20] Ehlert O., **2007**, *Extrinsische und intrinsische Defekte in Nanokristallen*, Doktorarbeit, Universität Freiburg.
- [21] Tien H.T., Ottova-Leitmannova A., **2003**, *Planar Lipid Bilayers (BLMs) and their Applications*, Elsevier Amsterdam
- [22] Honigmann A., **2006**, *Evaluation of the oligomeric structure of the Sec61p complex by spectroscopic and electrophysiological techniques*, Master thesis, Universität Osnabrück

- [23] Aggeler R., Chicas-Cruz K., Cai S. X., Keana J. F., Capaldi R. A., **1992**, *Introduction of reactive cysteine residues in the ϵ subunit of Escherichia coli F_1 ATPase, modification of these sites with tetrafluorophenyl azide-maleimides, and examination of changes in the binding of the ϵ subunit when different nucleotides are in catalytic sites*, Biochemistry, 31, 2956-2961.
- [24] Grüber G., Hausrath A., Sagermann M., Capaldi R. A., **1997**, *An improved purification of ECF_1 and ECF_1F_0 by using a cytochrome b_0 - deficient strain of Escherichia coli facilitates crystallization of these complexes*, FEBS Lett., 410, 165-168
- [25] Reuter R., **1996**, *Fermentation von Escherichia coli und Optimierung der Isolation der H^+ -ATPase aus E.coli*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [26] Reuter R., **2005**, *Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der ATP-Synthase aus Escherichia coli*, Dissertation, Universität Freiburg.
- [27] Neukom C., **2010**, *Optimierung der Markierung der H^+ -ATPsynthase aus E. coli mit fluoreszierenden Nanokristallen*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [28] Oswald P., **2006**, *Immobilisierung von Liposomen und der H^+ -ATPsynthase an Grenzflächen*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [29] Fischer S., **1999**, *Die H^+ -ATPase aus Escherichia coli*, Dissertation, Universität Stuttgart
- [30] Karstens T., Kobs K., **1980**, *Rhodamine B and rhodamine 101 as reference substances for fluorescence quantum yield measurements*, J. Phys Chem, 84, 1871.
- [31] http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/abs_html/sulforhodamine101.html.
- [32] Vamosi G., Gohike C., Clegg R.M., **1996**, *Fluorescence Characteristics of 5-Carboxytetramethylrhodamine Linked Covalently to the 5' End of Oligonucleotides: Multiple Conformers of Single-Stranded and Double-Stranded Dye-DNA Complexes*, Biophys. J. 71(2), 972-994.
- [33] Woodbury D. J., Miller C., **1990**, *Nystatin-induced liposome fusion: A versatile approach to ion channel reconstitution into planar bilayers*, Biophys. J., 58, 833-839.

- [34] Rottler R., **2002**, *Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der H^+ -ATPase aus Chloroplasten und der transmembranen Protonenflüsse in Proteoliposomen*, Dissertation, Universität Stuttgart
- [35] Ahluwalia A., De Rossi D., Ristori C., Schirone A., Serra G., **1991**, *A comparative study of protein immobilization technique for optical immunosensors*, *Biosensors & Bioelectronics*, 7, 207-214.
- [36] Ha. T., Selvin P., **2008**, *Single Molecule Techniques: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [37] Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K., **1997**, *Direct observation of the rotation of F_1 -ATPase*, *Nature*, 386, 299-302
- [38] Furuike S., Nakano M., Adachi K., Noji H., Kinosita H., Yokoyama K., **2011**, *Resolving stepping rotation in *Thermus thermophilus* H^+ -ATPase/synthase with an essentially drag-free probe*, *Nature Communications*, 2, 233.
- [39] Bienert R., **2010**, *Protonentransportgetriebene Konformationsänderungen in einzelnen H^+ -ATPsynthasen aus Chloroplasten sowie Kombination einer optischen Falle mit konfokaler Fluoreszenzspektroskopie*, Dissertation, Universität Freiburg.
- [40] Riehle M., **2007**, *Immobilisierung von Liposomen mittels HisTag- F_0F_1 an Ni^{2+} -Oberflächen*, Mitarbeiterprotokoll, Universität Freiburg.
- [41] Widengren J., Mets Ü., Rigler R., **1995**, *Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: a theoretical and experimental study*. *J. Phys. Chem.*, 99, 13368-13379.
- [42] Zimmermann B., Diez M., Börsch M., Gräber P., **2006**, *Subunit movements in membrane-integrated EF_0F_1 during ATP synthesis detected by single-molecule spectroscopy*, *BBA* 1757, 311-319.
- [43] http://www.atto-tec.com/fileadmin/user_upload/Katalog_Flyer_Support/Dye_Properties_01.pdf, Herstellerhomepage der Firma ATTO-Tec vom 2.6.2011.
- [44] Lakowicz J. R., **1999**, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Kluwer Academic, New York.

- [45] Steigmiller S., **2005**, *Die H^+ -ATPsynthase aus Escherichia coli: Beobachtung der Nukleotidbindung, Abstandsbestimmung am äußeren Stator und Bestimmung des thermodynamischen H^+ - zu ATP-Verhältnisses*, Dissertation, Universität Freiburg.
- [46] Rombach-Riegraf V., **2010**, *Untersuchung des F_0 -Motors der H^+ -ATPsynthase aus Escherichia coli mit Einzelmolekül-Fluoreszenzspektroskopie*, Dissertation, Universität Freiburg.
- [47] Lide D. R., **2005**, *CRC-Handbook of Chemistry and Physics (86th Edition)*.
- [48] Miller C., **1978**, *Voltage-Gated Cation Conductance Channel from Fragmented Sarcoplasmic Reticulum: Steady-State Electrical Properties*, J. Membrane Biol., 40, 1-23.
- [49] Miller C., Racker E., **1976**, *Ca^{2+} -Induced Fusion of Fragmented Sarcoplasmic Reticulum with Artificial Planar Bilayers*, J. Membrane Biol., 30, 283.
- [50] Coutinho A., Silva L., Fedorov A., Prieto M., **2004**, *Cholesterol and Ergosterol Influence Nystatin Surface Aggregation: Relation to Pore Formation*, Biophys. J., 87, 3264-3276.
- [51] Kahya N., Scherfeld D., Bacia K., Poolman B., Schwille P., **2003**, *Probing Lipid Mobility of Raft-exhibiting Model Membranes by Fluorescence Correlation Spectroscopy*, J. Bio. Chem., 278(30), 28109-28115.
- [52] Petrov E. P., P. Schwille, **2008**, *Translational diffusion in lipid membranes beyond the Saffman-Delbrück approximation*, Biophys J., 94, L41-L43.
- [53] Korlach J., Schwille P., Webb W. W., Feigenson G. W., **1999**, *Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 8461-8466.
- [54] Saffman P. G., Delbrück M., **1975**, *Brownian motion in biological membranes*, Proc. Nat. Acad. Sci., 72(8), 3111-3113.
- [55] Esko J., Gilmore J. R., Glaser M., **1977**, *Use of a Fluorescent Probe to Determine the Viscosity of LM Cell Membranes with Altered Phospholipid Compositions*, Biochemistry, 16(9), 1881-1890.
- [56] Ha T., **2001**, *Single-Molecule Fluorescence Resonance Energy Transfer*, Methods 25, 78-86

- [57] Zhao, H., **2005**, *H⁺-ATP-Synthase aus E. coli: Isolation und biochemische Charakterisierung von β -Histag-Mutanten*, Diplomarbeit, Universität Freiburg
- [58] Diez M., Zimmermann B., Börsch M., Schweinberger E., Steigmiller S., Reuter R., Felekyan S., Kudryavtsev V., Seidel C., Gräber P., **2004** *Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F₀F₁-ATP synthase*, Nat. Struct. Mol. Biol., 11, 135-141
- [59] Tsiavaliaris G., Manstein D. J., **2003**, *TIRF-Mikroskopie und ihre Anwendung in der Biologie*, Biospektrum 9
- [60] Fischer S., Gräber P., Turina P., **2000**, *The Activity of the ATP synthase from Escherichia coli Is Regulated by the Transmembrane Proton Motive Force*, J. Biol. Chem. 275, 30157-30162
- [61] Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinosita K., Itho H., **2001**, *Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase*, Nature 410, 898-904
- [62] Steigmiller S., Zimmermann B., Diez M., Börsch M., Gräber P., **2004**, *Binding of single nucleotides to H⁺-ATP synthases observed by fluorescence resonance energy transfer (FRET)*, Bioelectrochemistry 63, 79-85
- [63] Senior A. E., Nadanaciva S., Weber J., **2002**, *The molecular mechanism of ATP synthesis by F₁F₀-ATP synthase*, BBA 1553, 188-211
- [64] Hoffmann C., **2002**, *Selbstorganisierende Organosilansysteme zur Funktionalisierung oxidischer Siliziumoberflächen für gerichtete Peptid- und Proteinimmobilisierung*, Dissertation, Universität Stuttgart
- [65] Rombach V., **2005**, *Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung konformativer Änderungen der ϵ -Untereinheit an einzelnen H⁺-ATP synthasen aus E. coli*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [66] Kuno M., Fromm D. P., Hamann H. F., Gallagher A., Nesbitt D. J., **2000**, *Non-exponential "blinking", kinetics of single CdSe quantum dots: A universal power law behavior*, J. Chem. Phys., 112 (7), 3117.

- [67] Kuno M., Fromm D. P., Hamann H. F., Gallagher A., Nesbitt D. J., **2001**, “On”, “Off”, *fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots*, J. Chem. Phys., 115 (2), 1028.
- [68] v. Ballmoos C., Wiedenmann A., Dimroth P., **2009**, *Essentials for ATP Synthesis by F_1F_0 ATP Synthases*, Annu. Rev. Biochem., 78, 649-672,
- [69] Adachi K., Oiwa K., Nishizaka T., Furuike S., Noji H., Itoh H., Yoshida M., Kinoshita K., **2007**, *Coupling of Rotation and Catalysis in F_1 -ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation*, Cell, 130, 309-321.
- [70] Weiss S., **2000**, *Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy*, Nat. Struct. Biol., 7(9), 724-729.
- [71] Pänke O., Gumbiowski K., Junge W., Engelbrecht S., **2000**, *F-ATPase: specific observation of rotating c subunit oligomer of EF_0F_1* , FEBS Lett., 472, 34-38.
- [72] Pänke O., Cherepanov D., Gumbiowski K., Junge W., Engelbrecht S., **2001**, *Viscoelastic Dynamics of Actin Filaments Coupled to Rotary F-ATPase: Angular Torque Profile of the Enzyme*, Biophys. J., 81, 1220-1233.
- [73] Yoshida M., Muneyuki E., Hisabori T., **2001**, *ATP Synthase - A marvellous Rotary Engine of the Cell*, Mol. Cell Biol., 2, 669-677.
- [74] Pedersen P., **2005**, *Transport ATPases: Structure Motors, Mechanism and Medicine: A Brief Overview*, J. Bioen. Biomem., 37(6), 349-357.
- [75] Adachi K., Yasuda R., Noji H., Itoh H., Harada Y., Yoshida M., Kinoshita K., **2000**, *Stepping rotation of F_1 -ATPase visualized through angle-resolved single-fluorophore imaging*, Proc. Natl. Acad. Sci., 97(13), 7243-7247.
- [76] Rasnik I., McKinney S., Ha T., **2006**, *Nonblinking and longlasting single-molecule fluorescence imaging*, Nat. Methods, 3(11), 891-893.
- [77] Nann T., Schneider J., **2003**, *Origin of permanent electric dipole moments in wurzite nanocrystals*, Chem. Phys. Lett., 384, 150-152.
- [78] Leake M., Chandler J., Wadhams G., Bai F., Berry R., Armitage J., **2006**, *Stoichiometry and turnover in single, functioning membrane protein complexes*, Nature, 443(21), 355-358.

- [79] Chon J., Gu M., **2004**, *Scanning total internal reflection fluorescence microscopy under one-photon and two-photon excitation: image formation*, Appl. Opt., 43(5), 1063-1071.
- [80] Ellens H., Bentz J., Szoka F., **1985**, *H⁺- and Ca²⁺-Induced Fusion and Destabilization of Liposomes*, Biochemistry, 24, 3099-3106.
- [81] Hemmler R., Böse G., Wagner R., Peters R., **2005**, *Nanopore Unitary Permeability Measured by Electrochemical and Optical Single Transporter Recording*, Biophys. J., 88, 4000-4007.
- [82] Pintschovius J., Fendler K., Bamberg E., **1999**, *Charge Translocation by Na⁺/K⁺-ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Cytoplasmic Cation Binding and Release*, Biophys. J., 76, 827-836.
- [83] Hanke W., Eibl H., Boheim G., **1981**, *A New Methode for Membrane Reconstitution: Fusion of Protein-Containing Vesicles with Planar Bilayer Membranes Below Lipid Phase Transition Temperature*, Biophys. Struct. Mech., 7, 131-137.
- [84] Bamberg E., Dencher N. A., Fahr R., Heyn M. P., **1981**, *Transmembraneous incorporation of photoelectrically active bacteriorhodopsin in planar lipid bilayer*, Proc. Natl. Acad. Sci., 78(12), 7502-7506.
- [85] Schindler H., **1980**, *Formation of planar bilayers from artificial or native membrane vesicles*, FEBS Lett., 122(1), 77-79.
- [86] Bamberg E., Apell H.-J., Dencher N. A., Sperling W., Stieve H., Läger P., **1979**, *Photocurrents Generated by Bacteriorhodopsin on Planar Bilayer Membranes*, Biophys. Struct. Mech., 5, 277-292.
- [87] Kelly M., Woodbury D., **1996**, *Ion Channels from Synaptic Vesicle Membrane Fragments Reconstituted into Lipid Bilayers*, Biophys. J., 70, 2593-2599.
- [88] Bunjes N., Schmidt E. K., Jonczyk A., Rippmann F., Beyer D., Ringsdorf H., Gräber P., Knoll W., Naumann R., **1997**, *Thiopeptide-Supported Lipid Layers on Solid Substrates*, Langmuir, 13(23), 6188-6194.
- [89] Burkhardt B., Grassman R., Langs D., Pangborn W., Duax W., Pletnev V., **1999**, *Gramicidin D Conformation, Dynamics and Membrane Ion Transport*, Biopolymers, 51, 129-144.

- [90] Watzke N., Diekert K., Obrdlik P., **2010**, *Electrophysiology of Respiratory Chain Complexes and the ADP-ATP Exchanger in Native Mitochondrial Membranes*, *Biochemistry*, 49, 10308-10318.
- [91] Pintschovius J., Fendler K., **1999**, *Charge Translocation by the Na^+/K^+ -ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Rapid Solution Exchange with a New Technique*, *Biophys. J.*, 76, 814-826.
- [92] Wang D., Mistry A., Kahlig K., Kearney J., Xiang J., George A., **2010**, *Propranolol blocks cardiac and neuronal voltage-gated sodium channels*, *Frontiers Pharmacol*, 1, 144.
- [93] Gandhavadi M., Allende D., VBidal A., Simon S. A., McIntosh T. J., **2002**, *Structure, Composition, and Peptide Binding Properties of Detergent Soluble Bilayers and Detergent Resistant Rafts*, *Biophys. J.*, 82, 1469-1482.
- [94] Haque M. E., McIntosh T., Lentz B., **2001**, *Influence of Lipid Composition on Physical Properties and PEG-Mediated Fusion of Curved and Uncurved Model Membrane Vesicles: "Nature's Own,, Fusogenic Lipide Bilayer*, *Biochem.*, 40, 4340-4348.
- [95] Akashi K.-I., Miyata H., Itoh H., Kinoshita K., **1998**, *Formation of Giant Liposomes Promoted by Divalent: Critical Role of Electrostatic*, *Biophys. J.*, 74, 2973-2982.
- [96] Akashi K.-I., Miyata H., Itoh H., Kinoshita K., **1996**, *Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their Characterization under an Optical Microscope*, *Biophys. J.*, 71, 3242-3250.
- [97] Chung H., Louis J., Eaton W., **2009**, *Experimental determination of upper bound for transition path times in protein folding from single-molecule photon-by-photon trajectories*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(29), 11837-11844.
- [98] Groll J., Amirgoulova E., Ameringer T., Heyes C., Röcker C., Nienhaus G., Möller M., **2003**, *Biofunctionalized, Ultrathin Coatings of Cross-Linked Star-Shaped Poly(ethylene oxid) Allow Reversible Folding of Immobilized Proteins*, *JACS*, 126, 4234-4239.
- [99] Okumus B., Wilson T., Lilley D., Ha T., **2004**, *Vesicle Encapsulation Studies Reveal that Single Molecule Ribozyme Heterogeneities Are Intrinsic*, *Biophys. J.*, 87, 2798-2806.

- [100] Czeslik C., **2006**, *Erwünschte und unerwünschte Proteinadsorption an festen Grenzflächen*, *Chemie in Unserer Zeit*, 40, 238-245.
- [101] Williams R. A., Blanch H. W., **1992**, *Covalent immobilization of protein monolayers for biosensor application*, *Biosensors & Bioelectronics*, 9, 159-167.
- [102] Ruiz-Taylor L. A., Martin T. L., Zaugg F. G., Witte K., Indermuhle P., Nock S., Wagner P., **2001**, *Monolayer of derivatized poly(L-lysine)-grafted poly(ethylene glycol) on metal oxides as a class of biomolecular interfaces*, *PNAS*, 98(3), 852-857.
- [103] Feng X., Fryxell G. E., Wang L.-Q., Kim A. Y., Liu J., Kemner K. M., **1997**, *Functionalized Monolayers on Ordered Mesoporous Supports*, *Science*, 276, 923-926.
- [104] Ulman A., **1996**, *Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers*, *Chem. Rev.*, 96, 1533-1554.
- [105] Weetall H., **1993**, *Preparation of Immobilized Proteins Covalently Coupled Through Silane Coupling Agents to Inorganic Supports*, *Appl. Biochem. Biotech.*, 41, 157-188.
- [106] Kodadek T., **2001**, *Protein microarrays: prospects and problems*, *Chem. & Bio.*, 8, 105-115.
- [107] Polzius R., Schneider T., Bier F. F., Bilitewski U., **1996**, *Optimization of biosensing using grating couplers: immobilization on tantalum oxid waveguides*, *Biosensors & Bioelectronics*, 11(5), 503-514.
- [108] Heinlein T., Knemeyer J.-P., Piestert O., Sauer M., **2003**, *Photoinduced Electron transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins*, *J. Phys. Chem. B*, 107, 7957-7964.
- [109] Burger M., **2008**, *Untersuchung eines FRET-Systems an der H⁺-ATPase aus E. coli mittels Einzelmolekülspektroskopie an der Oberfläche*, Mitarbeiterprotokoll, Universität Freiburg.
- [110] Börsch M., Turina P., Eggeling C., Fries J., Seidel C., Labahn A., Gräber P., **1998**, *Conformational changes of the H⁺-ATPase from Escherichia coli upon nucleotide binding detected by single molecule fluorescence*, *FEBS Lett.*, 437, 251-254.

-
- [111] Peters R., Cherry R. J., **1982**, *Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: Experimental test of the Saffman-Delbrück equations*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4317-4321.
- [112] Werner M., **2008**, *Charakterisierung und Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer mit fluoreszierenden Halbleiter-Nanokristallen (Quantum Dots)*, Diplomarbeit, Universität Freiburg.
- [113] Prasuhn D., Feltz A., Blanco-Canosa J., Susumu K., Stewart M., Mei B., Yakovlev A., Louko C., Mallet J.-M., Oheim M., Dawson P., Medintz I., **2010**, *Quantum Dot Peptide Biosensors for Monitoring Caspase 3 Proteolysis and Calcium Ions*, ASCnano, 4(9), 5487-5497.
- [114] Prasuhn D., Blanco-Canosa J., Vora G., Delehanty J., Susumu K., Mei B., Dawson P., Medintz I., **2010**, *Combining Chemoselective Ligation with Polyhistidine-Driven Self-Assembly for the Modular Display of Biomolecules on Quantum Dots*, ASCnano, 4(1), 267-278.
- [115] Medintz I., Tetsuo Uyeda H., Goldman E., Mattoussi H., **2005**, *Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing*, Nature Materials, 4, 435-446.

Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Chemikalien	31
1	Fortsetzung der Verwendeten Chemikalien	32
1	Fortsetzung der Verwendeten Chemikalien	33
2	Verwendete Lösungen für die Kultivierung	34
2	Fortsetzung der verwendeten Lösungen für die Kultivierung . . .	35
3	Verwendete Lösungen für die Isolation von F_0F_1	36
3	Fortsetzung der Verwendeten Lösungen für die Isolation von F_0F_1	37
3	Fortsetzung der Verwendeten Lösungen für die Isolation von F_0F_1	38
4	Verwendete Lösungen für die Isolation von F_1	40
5	Verwendete Lösungen für die F_1 - <i>His-Tag</i> -Isolation	43
6	Verwendete Lösungen für die <i>His-Tag</i> -Säule	45
7	Verwendete Lösungen und Puffer für die SDS-PAGE	46
8	Verwendete Lösungen und Puffer für die Fluoreszenzmarkierung	49
9	Absorptionskoeffizienten verwendeter Fluorophore	54
10	Verwendete Lösungen und Puffer für die Liposomenherstellung .	58
11	Verwendete Lösungen und Puffer für die Rekonstitution	61
12	Verwendete Lösungen und Puffer für die Synthesemessung	62
13	Zusammenstezung des Hydrolyse-Kit	67
14	Verwendete Puffer für die F_1 -Ablösung und Rückbindung	68
15	Verwendete Puffer und Lösungen für die Immobilisierung	73
16	Verwendete Lösungen für die Bilayer	77
17	Verwendete Lösungen für die Messung an der Bilayer	80
18	Verwendete Spiegel bzw. Filter bei der konfokalen Mikroskopie .	86
19	Bestimmung der Quantenausbeuten des QD_{585} bei verschiedenen Wellenlängen	94
20	Vergleich der Immobilisierung von TMR-Biotinliposomen über Biotin- BSA oder Biotin-PEG an der Grenzfläche	99
21	Anpassungsparameter der FCS-Messung aus Abbildung 33	102
22	Verteilung der beobachteten Liposomen	112
23	Parameter der GAUSS-Verteilungen aus Abbildung 40	119
24	Ergebnisse der Anpassung der GAUSS-Verteilung aus Abbildung 41	120

25	Donor- Akzeptorabstände aus den FRET-Experimenten mit immobilisierten H^+ -ATPsynthasen an der Grenzfläche	121
26	Diffusionskoeffizienten eines TMR-Liposoms mit QD-markierter H^+ -ATPsynthase	138
27	Diffusionskoeffizienten einer QD-markierten H^+ -ATPsynthase in einer Bilayer	148
28	Diffusionskoeffizienten der H^+ -ATPsynthase in wässriger Lösung und in einer Lipidmembran nach verschiedenen Modellen	150

Abbildungsverzeichnis

1	Aufbau von EF_0F_1 mit der Bezeichnung der Untereinheiten [63]	13
2	Aufteilung der ATPsynthase in Stator (blau) und Rotor (orange)	13
3	Schematische Darstellung des <i>binding change</i> -Mechanismus [11] der H^+ -ATPsynthase	15
4	Schematische Darstellung des von Kinosita vorgeschlagenen Mechanismus [12] der ATP-Hydrolyse	16
5	Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Lochblende	18
6	Der SNELLIUS'sche Brechungssatz und die Entstehung eines evaneszenten Feldes	20
7	Schematische Darstellung der Strahleinkopplung in ein TIRF-Objektiv	22
8	Spektren und Aufbau von QDs	26
9	Die Fusion der Liposomen mit der Lipidbilayer	29
10	Reaktion zur kovalenten Bindung der Fluorophore an das Enzym	48
11	Modifikation der Aminogruppen der QDs mit N- $[\beta$ -Maleimidohexyloxy]-succinimidester (BMPS)	52
12	Absorptionsspektrum eines mit QD_{585} markierten F_0F_1 (rot)	55
13	Schema der Eichmessung	64
14	Schema der Messung der ATP Syntheseaktivität	65
15	Reaktionsschema des gekoppelten Enzymtests bei der ATP Hydrolyse	66
16	Strukturformel der verwendeten PEGs	71
17	Schema zur Immobilisierung der Liposomen mit Biotin-BSA	72
18	Silanisierung der Glasoberfläche	74
19	Bildung des Amins aus der Isocyanatgruppe an der Oberfläche	75
20	Reaktion zur Bindung des Biotin- bzw. Methoxy-PEG-NHS an das Amin des Silans an der Oberfläche	75
21	Schema zur Immobilisierung von Liposomen mit PEG-Biotin	76
22	Aufbau der Zelle für die Erzeugung der Bilayer	78
23	Schematischer Aufbau des TIRF-Mikroskops	82
24	Foto des TIRF-Mikroskops mit angedeutetem Strahlengang	83
25	Darstellung zur Reduktion des Streulichtes	85
26	Schematischer Aufbau des konfokalen Fluoreszenzmikroskops	87

27	Foto des Mikroskops. Der Strahlengang ist in dem Foto angedeutet	88
28	Schematischer Aufbau der Steuerung des Positionierers	89
29	Elliptischer Fokus mit den Radien ω_0 und z_0	92
30	Emissionsspektren von QD ₅₈₅ (6 nM) und von Sulforhodamin 101 (50 nM) bei verschiedenen Anregungswellenlängen	93
31	Fraktion 5 der <i>HisTag</i> -Isolation	95
32	Immobilisierte TMR-Biotinliposomen	98
33	FCS-Kurve einer Rhodamin6G-Probe	101
34	Fluoreszenzintensität eines immobilisierten, mit TMR-markierten Liposoms als Funktion der Zeit	103
35	Die Geometrie des Fokus bei einem konfokalen Mikroskop	104
36	Konfokale rastermikroskopische Aufnahme einer Glasoberfläche, an der doppeltmarkierte H ⁺ -ATPsynthasen in Biotin-Liposomen mit Biotin-BSA/Streptavidin immobilisiert wurden	111
37	Untergrundintensität im Donor- und im Akzeptorkanal an einer mit Puffer bedeckten Oberfläche	113
38	Verlauf der Fluoreszenzintensität im Donor- und im Akzeptorkanal, wenn nur Donorfluorophor vorhanden ist.	114
39	Fluoreszenzintensitäten im Donor- (grün) und im Akzeptorkanal (rot) von immobilisierten H ⁺ -ATPsynthase, die mit QD ₅₈₅ und ATTO 647N markiert ist.	117
40	Verteilung der Abstandsfaktoren P der Spuren aus Abbildung 39	118
41	Häufigkeit des Abstandsfaktors P als Funktion der Größe von P .	120
42	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des QD ₅₈₅	122
43	Verteilung der Durchmesser der elektronenmikroskopische Aufnahme des QD ₅₈₅ aus Abbildung 42 A	123
44	Lokalisierung des QD ₅₈₅ an der H ⁺ -ATPsynthase	127
45	Zeitliche Abfolge der Bewegung von Fluorophores nach deren Zugabe in die <i>cis</i> -Kammer	131
46	Bild der Bilayer von unten 10 min nach der Zugabe der Liposomen mit QD-markierter H ⁺ -ATPsynthase	134
47	Zeitliche Abfolge der Bewegung eines TMR-Liposoms mit eingebauter markierter H ⁺ -ATPsynthase auf der Bilayer	135

48	Der Verlauf der Intensität des hellsten Pixels des Liposoms aus Abbildung 47 als Funktion der Zeit	136
49	Position des Liposoms aus der Bildfolge in Abbildung 47	137
50	Auftragung der mittleren Verschiebungsquadrate von $\overline{\Delta x^2}$, $\overline{\Delta y^2}$ und $\overline{\Delta r^2}$ aus der Bildfolge in Abbildung 47	138
51	Koordinaten und die jeweilige gemessene Intensität des QDs aus Abbildung 47	139
52	Erwarteter Verlauf des Stromes bei Zugabe von Liposomen mit Nystatin und Ergosterol in die <i>cis</i> -Kammer der Messzelle.	142
53	Zeitliche Abfolge der Bewegung der markierten H ⁺ -ATPsynthase nach der Fusion des Liposoms mit der Lipidbilayer	144
54	Die Koordinaten des QDs aus der Bildfolge in Abbildung 53	145
55	Koordinaten des QDs und die jeweiligen Fluoreszenzintensität aus Abbildung 53	146
56	Auftragung der mittleren Verschiebungsquadrate von x, y und r aus der Bildfolge in Abbildung 53	147
57	Technische Zeichnung der Probenkammer für die Bilayerexperi- mente	175
58	Zeichnung des Probenhalters mit Kammer für die Bilayerexperi- mente	176

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Institut für Physikalische Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg in der Zeit vom November 2006 bis Juli 2011 unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Peter Gräber, bei dem ich mich an dieser Stelle für die Möglichkeiten und Freiheiten während meiner Arbeit an diesem Institut bedanken möchte. Seine akribische Art hat mich vor mancher Peinlichkeit bewahrt.

Auch möchte ich mich bei meinem Koreferenten Prof. Dr. Thorsten Koslowski bedanken.

Besonderer Dank geht nach Osnabrück zu Herrn Prof. Dr. Richard Wagner und seinem Mitarbeiter Dr. Alf Honigmann, die mir die Bilayer-Technologie beibrachten, und mir die Möglichkeit gaben sie hier in Freiburg anzuwenden.

Auch bedanken möchte ich mich bei dem Graduiertenkolleg „Biochemie der Enzyme“, das mich zeitweise während meiner Arbeit finanziert hat.

Weiterer Dank geht an Dr. Jan Petersen, der mir noch einiges über das Lasermikroskop beigebracht hat, was ich sonst nur in mühevoller Kleinarbeit gelernt hätte.

Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Roland Bienert und Markus Burger bedanken, mit denen ich jede Einzelheit über FCS und FRET diskutieren konnte.

Aber ich brauchte nicht nur Rat, was die Spektroskopie betraf, auch Rat in biochemischen Fragen wurde mir erteilt. Hier muss ich Kathrin Förster, Dr. Verena Rombach-Riegraf und Ilka Starke erwähnen.

Willi Wangler will ich für die Hilfe bei den verschiedenen Präparationen und seinen Zuwendungen an Obst und Gemüse danken.

Wie ist physikalische Chemie ohne eine Werkstatt überhaupt durchzuführen? Natürlich braucht man hin und wieder ein Teil, welches käuflich nicht zu erwerben ist. Gut, dass wir hier in Freiburg auf eine Feinmechanikwerkstatt mit Herrn Karl Rich und seinem Team zurückgreifen können und auf eine Elektronikwerkstatt mit Andreas Gimbel.

Weiterer Dank geht an die anderen „Kellerkinder“, hier ist Dr. Steffani Schäfer zu erwähnen, die mir nicht nur die EM-Bilder zur Verfügung gestellt hat, sondern sich auch auf die Suche nach Tippfehlern gemacht hat.

Aber man kann nicht immer nur arbeiten, auch muss ab und zu entspannt werden. Dass dies möglich war, habe ich einer Einrichtung zu verdanken, die in der Besetzung, von der Ausnahme Dr. Bernard Rudolf einmal abgesehen, sich stetig änderte, aber immer mit Menschen gefüllt war, die ihren Intellekt nicht nur an die Arbeit „verschwendeten“, sondern ihn auch in sinnvollen und sinnlosen Diskussionen angewendet haben. Die Rede ist natürlich von der legendären Kaffeegrunde. All ihren Mitglieder nochmals ein Danke.

To my sister I want to apologize, not writing the work in english, so this is for you, my „little“ sister.

Auch muss ich mich bei meinen studentischen Mitarbeitern bedanken, die ich im Laufe dieser Arbeit betreut habe. Hervorzuheben sind hier Markus Burger, Christine Neukom und Marc Riehle, deren Messungen zu einem Teil dieser Arbeit geworden sind. Die anderen Namen sollen aber dennoch erwähnt werden: Volker Pupp, Klaudia Morena, Mathias Ruf und Chunyan Yao.

Und natürlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mich bis über das Ende meines Studiums unterstützt haben und, wie ich sie kenne, werden.

Anhang

Anhang A

Technische Zeichnung der Probenkammer für die Bilayerexperimente

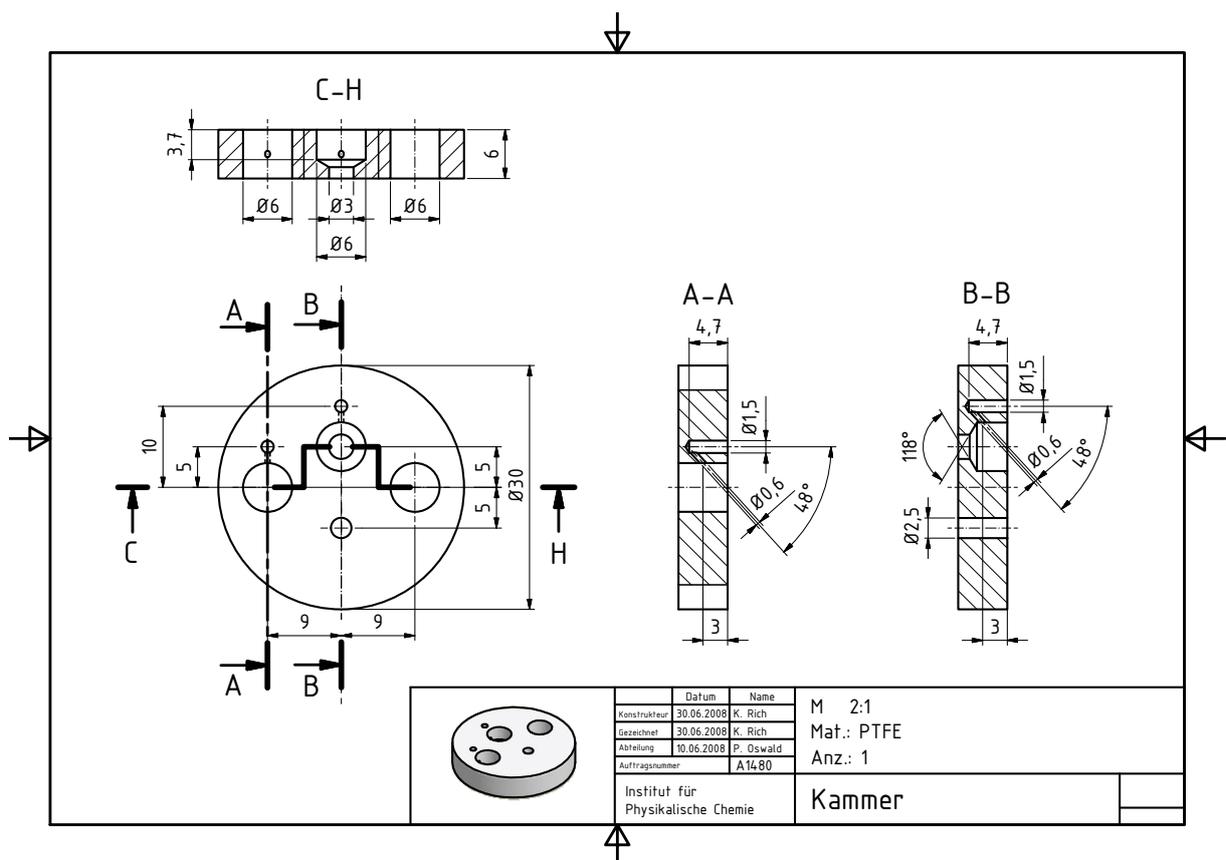


Abbildung 57: Technische Zeichnung der Probenkammer für die Bilayerexperimente

Anhang B

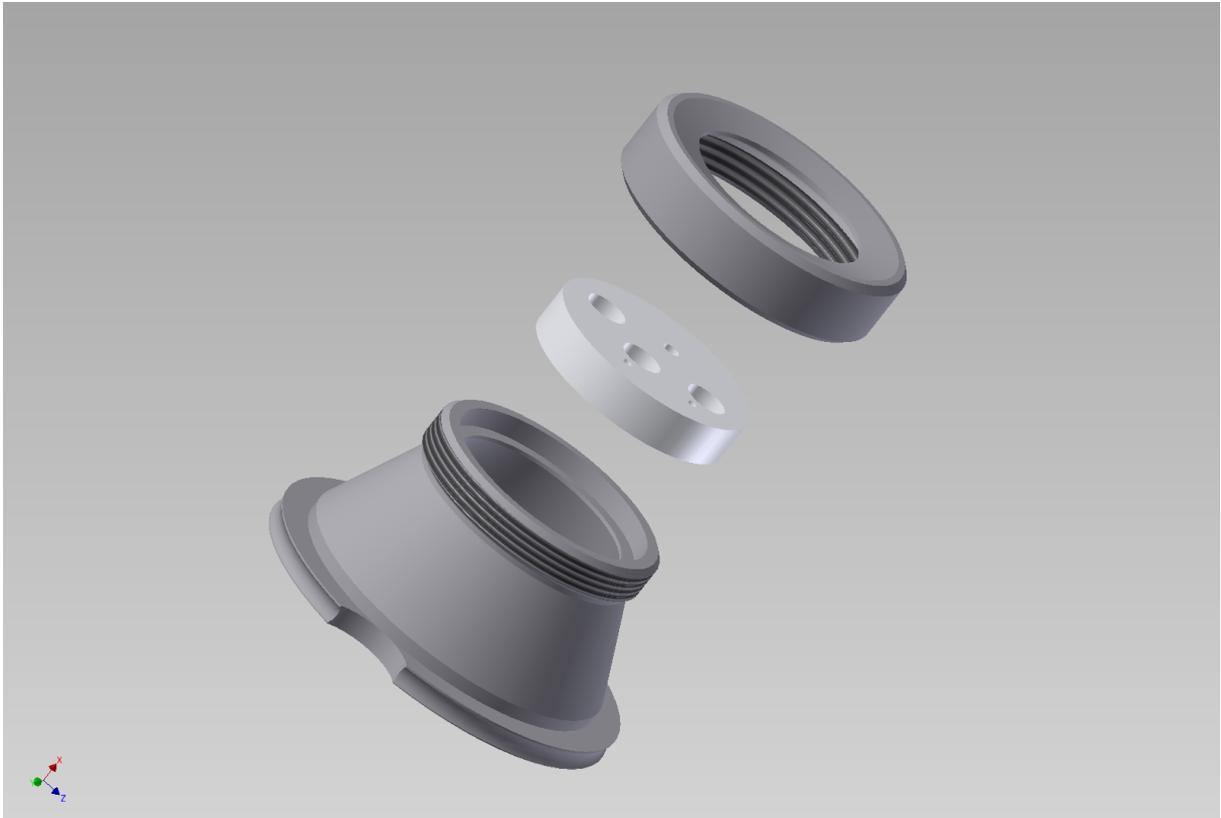


Abbildung 58: Zeichnung des Probenhalters mit Kammer für die Bilayerexperimente