

# Untersuchungen von DNA-Protein Wechselwirkungen mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Physik  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

CHRISTIAN KARL  
aus Bruchsal

Hamburg

2003

Gutachter der Dissertation

Prof. Dr. Wick  
Prof. Dr. Schulte

Gutachter der Disputation

Prof. Dr. Wick  
Dr. Krietsch

Datum der Disputation

30.Juli 2003

Dekan des Fachbereichs Physik und  
Vorsitzender des Promotionsausschusses

Prof. Dr. Günter Huber

# Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Messung der Bindungskonstanten der Oestrogenrezeptoren, deren Konzentrationen großen Einfluss auf bestimmte Tumorphiliferationsraten haben. Die Bindungskonstanten ( $k_D$ -Werte) der Oestrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  werden mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt, dem molekularbiologischen 'Bandshift-Assay' und der physikalischen Methode, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Ausgehend von der RNA-Isolierung wird die Expression der Oestrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  bis zum aufgereinigten biologisch aktiven Rezeptor durchgeführt. Mittels des 'Bandshift-Assay' werden die Bindungskonstanten der Rezeptoren bestimmt. Aus der Analyse ergibt sich für die Gleichgewichtskonstanten  $k_{D-\alpha} = 0.42 \pm 0.03$  nM und  $k_{D-\beta} = 0.33 \pm 0.028$  nM.

In systematischen Untersuchungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wird gezeigt, daß die statistischen Abweichungen der Messungen deutlich verringert werden können. Aus der Parametrisierung der fundamentale Autokorrelationsfunktion (AKF), welche die komplette Information der Messung enthält, wurden die Bindungskonstanten bestimmt.

Die mit der FCS-Methode ermittelten Bindungskonstanten betragen  $k_{D-\alpha} = 0.62 \pm 0.015$  nM und  $k_{D-\beta} = 0.28 \pm 0.008$  nM. Der Vergleich der beiden Methoden zeigt eine deutliche Zunahme der Genauigkeit der FCS-Messungen.

# Abstract

This thesis describes the measurement of equilibrium binding constants for the estrogen-receptors by two methods, bandshift-assay and fluorescence correlation spectroscopy. The complete procedure of the protein expression (pro- and eucaryont cells), for the estrogen-receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , is successfully accomplished.

To determine the constants the molecular-biological 'bandshift-assay' method is used. Using this method the equilibrium constants are determined to  $k_{D-\alpha} = 0.42 \pm 0.03$  nM and  $k_{D-\beta} = 0.33 \pm 0.028$  nM.

Substantial systematic studies of the fluorescence correlation spectroscopy (fcs) are performed and a noticeable decrease of the statistical error of the measurements is achieved. The binding constants are determined by parametrisation of the fundamental autocorrelationfunction (acf) which contains the complete information of the measurement.

The equilibrium binding constants for the estrogen receptors measured by the fcs-method are:  $k_{D-\alpha} = 0.62 \pm 0.015$  nM and  $k_{D-\beta} = 0.26 \pm 0.008$  nM. Comparisons of the results of these two methods show that the precision of the fcs measurements is significantly improved.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>8</b>
3.1	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie . . . . .	8
3.1.1	Gaußsche Optik . . . . .	11
3.1.2	Diffusion von Teilchen . . . . .	13
3.1.3	Reaktion von Teilchen . . . . .	16
3.1.4	Anregungsschema der Fluorophore . . . . .	17
3.1.5	Photobleichung . . . . .	20
3.1.6	Untergrundfluoreszenz . . . . .	21
3.1.7	Das Viel-Teilchen System . . . . .	23
3.1.8	Konfokalen Mikroskopie . . . . .	24
3.2	Aufbau des Einzelmolekül-Spektroskops . . . . .	28
3.2.1	Halbleiterdiode . . . . .	28
3.2.2	Avalanchephotodiode . . . . .	29
3.2.3	Laser als Lichtquelle . . . . .	30
3.2.4	Filtercharakterisierung . . . . .	31
3.2.5	Objektive . . . . .	32
3.2.6	$x$ - $y$ -Probentisch . . . . .	33
3.2.7	Datenerfassung und Auswertung . . . . .	34
3.3	DNA, Proteine und ihre Wechselwirkungen . . . . .	35
3.3.1	DNA . . . . .	35
3.3.2	Proteine . . . . .	36
3.3.3	Hormone . . . . .	40
3.3.4	Nachweismethoden von DNA und Proteinen . . . . .	43
3.4	Proteinexpression . . . . .	50
3.4.1	Proteinexpression in Bakterien . . . . .	51
3.4.2	Proteinexpression in Zellen . . . . .	55
3.4.3	Proteinaufreinigungs-Verfahren . . . . .	57
3.5	Theorie der Bindungskinetik beim 'BS-Assay' . . . . .	59
3.5.1	Bindungskinetik . . . . .	59
<b>4</b>	<b>Charakterisierung der Experimente</b>	<b>62</b>
4.1	Expression von nuklearen Rezeptoren . . . . .	62
4.1.1	PCR und Plasmid-Herstellung . . . . .	63

4.1.2	Plasmidvervielfältigung . . . . .	66
4.1.3	Bakterienexpression-Analyse . . . . .	67
4.1.4	Proteinaufreinigung . . . . .	70
4.2	DNA-Oligonukleotide Herstellung . . . . .	71
4.3	Bandshift-Assay . . . . .	72
4.3.1	Aufbau des BS-Systems . . . . .	72
4.3.2	Auswertung der BS-Gele . . . . .	74
4.4	Einzelmolekül-Spektroskopie . . . . .	76
4.5	Datenauswerte-Verfahren . . . . .	76
4.5.1	Simulation der Autokorrelationsfunktion . . . . .	77
4.5.2	Meßdurchführung . . . . .	80
<b>5</b>	<b>Messungen und Diskussion</b>	<b>83</b>
5.1	Systematische Studien des FCS-Systems . . . . .	83
5.2	DNA-Rezeptor Interaktion . . . . .	89
5.2.1	ConfoCore . . . . .	89
5.2.2	Bandshift-Assay . . . . .	96
5.2.3	Biacore . . . . .	99
5.3	Vergleich der Bindungsdaten . . . . .	101
5.4	Diskussion . . . . .	101
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>104</b>
<b>A</b>	<b>Anhang: Molekularbiologischer Teil</b>	<b>106</b>
A.1	PCR . . . . .	106
A.2	DNA-Isolation . . . . .	107
A.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (E.coli) . . . . .	107
A.2.2	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen . . . . .	108
A.2.3	DNA-Fragmentreinigung . . . . .	108
A.2.4	Bakterientransformation (E.Coli) . . . . .	108
A.3	DNA-Sequenz Daten . . . . .	108
A.3.1	Die Sequenz des Oestrogenrezeptor $\alpha$ . . . . .	108
A.3.2	Die Sequenz des Oestrogenrezeptor $\beta$ . . . . .	110
A.3.3	Klonierung von DNA-Fragmenten . . . . .	111
A.3.4	Sequenzierung von DNA . . . . .	111
A.3.5	Computergestützte Sequenzdatenanalyse . . . . .	111
A.4	Proteindaten . . . . .	111
A.4.1	Western-Analysen . . . . .	112
A.4.2	Proteingrößen-Standard . . . . .	113
A.4.3	Coomassiefärbung . . . . .	113
A.5	Verwendete Chemikalien . . . . .	113
<b>B</b>	<b>Anhang: Zellbiologischer Teil</b>	<b>115</b>
B.1	Zusammenstellung der Zelldaten . . . . .	115
B.1.1	HeLa Zellen . . . . .	115
B.1.2	SF9-Insekten Zellen . . . . .	118
B.1.3	HEP-G2 Zellen . . . . .	118
B.1.4	MCF-7 Zellen . . . . .	120

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Initiierung der Transkription durch die Bindung des Oestrogenrezeptors an die DNA-Bindungsstelle (links). Durch diese erste Komplexbildung wird eine ganze Kaskade in Gang gesetzt. Die Transkription ist somit möglich und damit auch die Steuerung der Genexpression. . . . .	2
1.2	Darstellung des Transkriptionsapparates für den Oestrogenrezeptor. . . . .	3
2.1	Der schematische Aufbau der FCS-Messanordnung. . . . .	5
2.2	Die Darstellung zeigt den realen Aufbau der FCS-Messanordnung mit den Komponenten Laser und Mikroskopeinheit. . . . .	6
2.3	Strahlengang des ConfoCor1 mit allen wesentlichen Elementen sowie den Datenerfassungskomponenten. . . . .	7
3.1	Hier ist das effektive Detektionsvolumen sowie die spezielle Laserisoenergiefläche ( $I_{max} = 13.8\%$ ) gezeigt (entnommen aus [1] und modifiziert). . . . .	12
3.2	Freie Diffusion: Darstellung des Diffusionsverlaufs. . . . .	13
3.3	Die Abbildung zeigt das komplette Termschema der Fluorophoranregung. . . . .	17
3.4	a) zeigt das Termschema der Fluorophore. b)+ c) zeigen die Abhängigkeit der AKF von der Laserleistung [2]. . . . .	19
3.5	(links) Zählraten von Wasser ( $\overline{F}_{H_2O} = 0.64$ kHz) und Puffer ( $\overline{F}_P = 0.64$ kHz). (rechts) Zählrate eine Fluorophors ( $\overline{F}_{TMR} = 668 \pm 41$ kHz). Bei der Betrachtung der $y$ -Achsenwerte wird deutlich, wie stark sich das Signal vom Untergrund abhebt. Hier kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von $n_{noise} \approx 600$ angegeben werden. . . . .	22
3.6	In der Abbildung ist exemplarisch die Auswirkung der Fluktuationsrate auf die Autokorrelationskurve gezeigt. . . . .	23
3.7	a) Das Diagramm zeigt die optischen Verhältnisse der konfokalen FCS-Messung. b) Schematische Darstellung eines idealisierten Objektivs. Das auf die Eintrittspupille mit dem Radius $a$ treffende Licht wird durch das Objektiv auf ein virtuelles Kugelsegment mit Radius $f$ , entsprechende der Brennweite projiziert. Der maximale Öffnungswinkel $\alpha$ (Detektionswinkel) bestimmt bei gegebenem Proben-Brechungsindex $n$ die numerische Apertur $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ . . . . .	24

3.8	Geometrische Verhältnisse des Detektionsvolumens. $Z_0$ und $w_0$ sind die Radien, die den Rotationsellipsoid beschreiben. Ferner ist der Ortsvektor $r$ und sein Koordinatensystem eingezeichnet. Desweiteren ist eine Scheibe zu sehen, die eine mögliche Fläche darstellt, von der Fluoreszenz ausgeht. Über diese Scheiben wird integriert, um das 'komplette' Fluoreszenzsignal zu erhalten. . . . .	26
3.9	Optische Absorption für verschiedene Photonenenergien: a) $h\nu = E_G$ , b) $h\nu > E_G$ , c) und d) $h\nu < E_G$ . Im Fall b) wird die überschüssige Energie $E_G - h\nu$ als Wärme (Phononschwingungen) an das Kristallgitter abgegeben. Die Übergänge c) und d) sind möglich, da sie von einem Donatorniveau $E_D$ bzw. von einem Akzeptorniveau $E_A$ erfolgen. . . . .	28
3.10	Energetische Verhältnisse im Halbleiter bei verschiedenen Betriebsarten unter Berücksichtigung der Randbedingungen. . . . .	29
3.11	a) der reale Aufbau einer $p-n$ -Photodiode, b) Raumladungsdichteverteilung $\rho(x)$ in der depletierten Photodiode, c) Verlauf der elektrischen Feldstärke $E(x)$ . . . . .	30
3.12	Wellenlängenabhängige Auftragung der Transmission in [%] für den verwendeten Rhodaminfilter. Der dichroitische Strahlteiler wurden für die Transmissionsmessung unter dem realen Winkel ( $45^\circ$ ) vermessen. . . . .	31
3.13	Hier ist links das Objektiv und rechts der Leistungsmesser gezeigt. . . . .	32
3.14	Der Probentisch des Meßaufbaus. Mit den seitlich angebrachten Schrittmotoren, ist er $\mu\text{m}$ -genau zu positionieren. In der Mitte sind die quadratischen Probenkammern zu sehen. . . . .	33
3.15	Die vier Grundbausteine der DNA. . . . .	35
3.16	Basenpaarung der Purine und Pyrimidine. . . . .	36
3.17	DNA-Helix. . . . .	36
3.18	Oben ist die Aminosäuregrundstruktur (a) zu sehen. Die mit $R$ gekennzeichnete Kreise symbolisieren den Rest der AS, wodurch sie ihre Diversität erhalten. Unten ist die Verbindung zweier AS – die Peptidbindungsenstehung (b) – unter Abgabe eines Wassermoleküls gezeigt. . . . .	37
3.19	(links) $\alpha$ -Helix, (rechts) antiparallele $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Wasserstoffbindungen sind gestrichelt, die Peptidbindung durchgezogen dargestellt. . . . .	38
3.20	DNA-Strang mit den gebundenen Oestrogenrezeptoren. In Abbildung 3.21 ist dieser Teilaspekt schematisch gezeigt. . . . .	39
3.21	Übersicht des Einflusses der Hormon-DNA-Bindung auf den kompletten Transkriptionsapparat. . . . .	39
3.22	Verschiedene Steroidhormone. Durch den Vergleich der verschiedenen Steroidhormone tritt die gemeinsame Grundstruktur deutlich hervor. . . . .	40
3.23	Vergleich verschiedener Steroidrezeptor. Die Zahlen geben den Grad der Homologie der unterschiedlichen Bereiche (Domain) in Prozent an. Hier ist eine zum Teil sehr hohe Homologie zu erkennen. Jeder Eckpunkt repräsentiert ein Kohlenstoffatom. . . . .	41
3.24	Ablaufschema der Aktivierung des Oestrogen-Rezeptors. Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung: HBD Hormonbindungsdomäne, HSP-Komplex Heat Shock Protein Komplex, NTD N-Terminale Domäne, DBD DNA Bindung Domäne, HRE (hormone response element) Hormonrezeptor Bindungsmotiv. . . . .	42



3.25	Nachweis von DNA Fragmenten, die via PCR erzeugt wurden. Die Banden der Proben (1-7) zeigen das Ergebnis einer Optimierungs-PCR. Die Probe 7 zeigt die stärkste Bande. . . . .	44
3.26	Zeitlicher Verlauf der Proteinwanderung bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Die Abbildung ist aus [3, 4] und wurde modifiziert. . . . .	46
3.27	SDS-PAGE Apparatur. . . . .	47
3.28	Ein typischer EMSA Aufbau bestehend aus der Gelapparatur (links) und der Gleichspannungsquelle (rechts). Bei der Gelapparatur sind die beiden Pufferreservoirs, das Gel sowie der Kamm mit seinen breiten Taschen zu sehen, in die, nach Entfernen des Kamms, die Proben pipetiert werden. . . . .	48
3.29	Eukaryontischer Expressionsvektor – pSG5 – der Firma STRATAGENE. Auf der Vektorkarte sind alle wichtigen Sequenzabschnitte angegeben. Der Kasten rechts beinhaltet die Namen der Restriktionsenzyme und zeigt die Stelle zum Einfügen der Fremd-DNA. . . . .	52
3.30	Die Bakterielle Transformation: Um Bakterien zu transformieren, müssen ihre Membranen durch eine Behandlung mit $\text{CaCl}_2$ durchlässig gemacht werden. Zuerst werden die Zellen für 30 Minuten bei $0^\circ\text{C}$ in einer $\text{CaCl}_2$ -Lösung inkubiert. Während dieser Zeit können die Transformationsvektoren in die Zelle eindringen. Danach wird die Temperatur über $37^\circ\text{C}$ wieder auf $25^\circ\text{C}$ erhöht. Zur Regeneration der Zellmembran wird die $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit Nährmedium verdünnt und bei optimaler Wachstumstemperatur für E.Coli $37^\circ\text{C}$ inkubiert. Schließlich werden die Bakterien auf eine Selektionsagar-Platte ausgestrichen. Nach einer weiteren Inkubation der Agarplatten von etwa zwölf Stunden können die Zellen, die den Vektor (blau) aufgenommen haben, selektiert und weiter verarbeitet werden. . . . .	54
3.31	Das Baculo Virus Expressions System: Wie andere Viren-Systemen auch ist das Baculo-Virus zu groß, um es direkt zur Klonierung zu verwenden. Stattdessen wird ein spezieller Transfer-Vektor (Klonierungsvektor) verwandt, der dann in der transfizierten Zelle mit dem Virus-Genom homolog rekombiniert. Die Fremd-DNA (rot) wird in die Klonierungsstelle (ocker) integriert, wo sie von den Kontrollelementen des Polyhedrin-Gens eingeschlossen ist. Dieser gesamte Sequenzbereich ist eingebettet in eine Region, die aus dem Genom des AcMNP-Virus stammt. Über diesen Bereich findet die homologe Rekombination statt. Zellen, in denen keine homologe Rekombination erzielt wird, produzieren Polyhedrons, wohingegen Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattfindet, rekombinante Viren erzeugen. Diese Zellen können auf der Kulturplatte anhand distinkter Zell-Lyse-Zonen erkannt werden (hellrot). . . . .	56
3.32	<i>Ni</i> -NTA Aufreinigung-Schema für 6-His markierte Proteine. . . . .	58
4.1	Hier ist die Aufnahme eines Gels gezeigt, das das Ergebnis der PCR mit Oestrogen-Rezeptor Primer bei verschiedenen Bedingungen repräsentiert. . . . .	63
4.2	Beispiel eines Sequenzgels. Deutlich sind die Banden in den Spalten zu sehen, die das oben angegebene Nukleotid repräsentieren (A,C,G oder T). Bei genauer Betrachtung lassen sich im oberen Drittel erste Unterschiede in der Bandenabfolge und damit in der DNA-Sequenz erkennen (vgl. Ungleichheitszeichen). . . . .	65

4.3	Schematische Darstellung der X-Gal negativ Selektion von Bakterien. . . . .	66
4.4	Gelelektrophorese der DNA-Fragmente wie sie durch die Restriktionsenzyme geschnitten werden. Gezeigt ist der Verdau von 16 verschiedenen Klonen.	67
4.5	Wachstumskurven der verwendeten Bakterien. . . . .	68
4.6	Zeitlicher Verlauf der Proteinexpression in Bakterien: Gezeigt ist hier die Gesamtheit der von den Bakterien exprimierten Proteine. Aber auch hier ist schon die deutliche Zunahme der Proteinmenge zu sehen, die dem Molekulargewicht des Zielproteins von etwa 52 kDa entspricht. ÜN steht für 'über Nacht', M(kDa) steht für Marker und dessen Einheit. Ferner ist die Zeit in Stunden angegeben nach dem Expressionstart durch die Zugabe von IPTG. Die genauen Werte für die angegebenen Marker-Banden (50 und 60) sind $MW_1 = 50.8$ kDa und $MW_2 = 61.5$ kDa. . . . .	69
4.7	Proteinaufreinigung: Gezeigt ist das Ergebnis der Aufreinigung des Oestrogenrezeptors (links, 52 kDa) und die Aufreinigung des Proteins StAR. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text. . . . .	70
4.8	DNA-Oligonukleotid, das für die Bindungsstudien verwendet wurde. Die blau unterlegte Sequenz stellt die Bindungssequenz (DBD) für den Oestrogenrezeptor dar. Die gelb unterlegte Sequenz zeigt die hinzugefügten Nukleotide des Oligo ERE-25bp ( $MW = 17.122$ Da) zu dem Oligo ERE-21bp ( $MW = 14.508$ Da). Es sind zwei Bindungsstellen zu sehen, die durch eine kurze Sequenz –auch 'Spacer' genannt– getrennt sind. Dieses Motiv ist typisch für hetero- oder homogene Bindungen von Rezeptoren an die DNA. Die NNN-Sequenz steht für je eine Nukleotide. Die Wahl ist jedoch nicht beliebig, da sie Einfluß auf die Bindung hat. . . . .	72
4.9	Schematische Darstellung des Glasplattenaufbau für eine BS. . . . .	73
4.10	Ein typisches Ergebnis eines Bandshift-Experiments, aufgenommen mit dem <i>Typhoon</i> Scanner. Der linke gelbe Bereich zeigt die Banden des ER- $\alpha$ Experiments. Der rechte rote Bereich zeigt das Ergebnis des ER- $\beta$ Experiments. Deutlich ist die geringe Migrationstiefe des $\alpha$ -Komplexes im Vergleich zum $\beta$ -Komplex zu sehen. Dieses Ergebnis ist aufgrund des Molekulargewichtsunterschieds zu erwarten. . . . .	75
4.11	$G(\tau)$ in Abhängigkeit der Variation der Parameter. a) Variation des Tripletanteil; eine zu große Laserleistung führt unter anderem zu einer Erhöhung des Tripletanteils, was die 'sichtbaren' Teilchen verringert. b) Variation der Diffusionszeiten; hierdurch bekommt man eine 'Gefühl' für die zu messenden Teilchen. c) Variation des Radienverhältnisparameters $k$ ; der Einfluß auf die Messung ist relativ gering. d) Variation des Anteils der zweiten Komponente ( $R_2$ ). e) Variation der Teilchenzahl $N$ im Detektionsvolumen und damit der Konzentration der Teilchen. f) Variation der Anzahl der Komponenten. Weitere Details finden sich im Text. . . . .	79
4.12	Die chemische Struktur von Tetramethyl-Rhodamin. . . . .	80
4.13	Blick auf die laser-illuminierter Probe. Deutlich sind die acht getrennten Probenbereiche zu sehen. Dies ist ein kleiner Ausschnitt der Abbildung (2.2).	81
5.1	Zählrate in Abhängigkeit der absoluten Position des Laserfokus. Die Messung wurde mit dem Farbstoff TMR durchgeführt. Es wurden $10 \mu\text{l}$ einer $5$ nM Lösung untersucht. . . . .	83

5.2  $G(\tau)$ : typischer Verlauf der Autokorrelationsfunktion für den Farbstoff TMR, aufgetragen in einer halblogarithmischen Darstellung. Die zweite Kurve wurde um  $G_\tau = -0.1$  verschoben, um sie noch sichtbar zu machen (oben). Auftragung der zugehörigen Fluoreszenzmessungen zu obigen AKF (unten). . . . . 84

5.3 Einfluß des Pinholedurchmessers auf die Diffusionszeit. Die Messungen wurden mit dem Fluorophor TMR durchgeführt. . . . . 85

5.4 TMR-Diffusionskoeffizient Messungen: hier sind alle 1500 Eichmessungen gezeigt.  $\Rightarrow D_{\text{TMR}} = 280.7 \pm 16.93 \mu\text{m}^2/\text{s}$  . . . . . 86

5.5 Diffusionszeiten des ERE-25bp Oligos. In dieser Messung wurde die Gesamtzeit konstant gehalten, jedoch die einzelnen Meßzeiten pro Messung von 5 s bis 240 s variiert. Die roten Linie zeigt den Mittelwert, die Blaue die Standardabweichung. . . . . 87

5.6 Mehrere simultane FCS-Analysen: Jede Kurve repräsentiert eine unabhängige Messung. Hier wurde das Oligo ERE-25bp untersucht. Die gezeigte Darstellung ist das Ergebnis, wie es die Zeiss-Software liefert. . . . . 88

5.7 Auswirkung der Variation des Triplettanteils auf die AKF  $G(\tau)$ . . . . . 90

5.8  $G(\tau)$  Analyse. Es sind die Daten der Fit, sowie die Fluoreszenzverteilung und deren Histogramm dargestellt. . . . . 91

5.9 Darstellung eines Photonen'burst' in einer Messung. Deutlich ist die extreme Überhöhung der Fluoreszenzrate (unten links b): in der Verteilung; unten rechts c): im Histogramm) zu sehen. Die fit-Funktion (oben a) durchgezogene Linie) beschreibt die Korrelationswerte (oben a) Punkte) nicht mehr. Eine sinnvolle Parametrisierung ist nicht möglich. Diese Messungen wurden mit Oestrogenrezeptor- $\alpha$  Oligo Bindungssystem durchgeführt. . . . 93

5.10 FCS Messungen:  $G(\tau)$  der Oligo-Rezeptor-Bindung bei ansteigender Konzentrationen des Rezeptor ER- $\alpha$ . Deutlich kann die unterschiedliche Teilchenzahl  $N$  ( $N \approx y$ -Achsenabschnitt  $-1$ ) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration gezeigt werden. Die Zahlen an der  $y$ -Achse korrespondieren mit denen in der Tabelle (5.2). . . . . 94

5.11 FCS Messungen:  $G(\tau)$  der Oligo-Rezeptor-Bindung bei ansteigender Konzentration des Rezeptors ER- $\beta$ . Deutlich kann die unterschiedliche Teilchenzahl  $N$  ( $N \approx y$ -Achsenabschnitt  $-1$ ) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration gezeigt werden. Die Zahlen an der  $y$ -Achse korrespondieren mit denen in der Tabelle (5.3). . . . . 95

5.12 Bindungskurven der Rezeptor DNA Wechselwirkung. Dargestellt ist die ER- $\alpha$  und die ER- $\beta$  Bindungskurve. . . . . 96

5.13 Gel zur Bestimmung der Fehler des BS-Assays. Es wurde der ER- $\alpha$  Rezeptor benutzt. Das Verhältnis Rezeptor-DNA war bei allen Proben gleich. . . 97

5.14 (obere Reihe) Oestrogenrezeptor-DNA Bindungen, (untere Reihe) das ungebundene Oligonukleotid. (1-4) je 50 fmol ERE-25bp Oligonukleotid pro Spur. (5-8) je 1 pmol ERE-25bp-fcs Oligo pro Spur. (9-10) enthalten 0.5 pmol ERE-25bp-fcs Oligo pro Spur. (1,5,9) je 2.5 pmol und (2,6) je 1.25 pmol ER- $\alpha$ ; (3,7,10) je 4.5 pmol und (4,8) je 2.125 pmol ER- $\beta$ . . . . . 97

5.15	(obere Reihe) Oestrogenrezeptor-DNA Bindungen, (untere Reihe) das ungebundene Oligonukleotid. (1-5) ER- $\alpha$ je 1.35 pmol pro Spur, (6) nur ERE-25bp, (7-10) ER- $\beta$ je 2.25pmol pro Spur. (11) 1.35 pmol ER- $\alpha$ + 2.25pmol ER- $\beta$ . Zu jeder Probe wurden 100 fmol ERE-25bp pipetiert. . . . .	98
5.16	Titration des Oestrogensrezeptors- $\alpha$ : (oben) die Spur (1-6) steigt die Stoffmenge wie folgt an (0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0,15.0 fmol); (unten) in jeder Spur wurden 100 fmol Oligo eingesetzt. . . . .	98
5.17	Verlauf der Bindung von ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ an das Oligo ERE-25bp in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration. . . . .	99
A.1	Von der PCR zum 'fertigen' Plasmid. . . . .	107
A.2	Chemische Grundstruktur von Aminosäuren. R steht für Rest und repräsentiert die Seitenketten. . . . .	112
A.3	Bindungsschema zwischen Aminosäuren (Peptidbindung). . . . .	112
A.4	Die Tabelle zeigt den DNA-Code für die Aminosäuren. . . . .	112
B.1	Typische HeLa Zellen. Einige befinden sich in der Zellteilungsphase, zu erkennen an zwei dicht benachbarten, kleinen Kreisen. . . . .	117

# Tabellenverzeichnis

3.1	Einige ausgewählte Fluorophore und deren wichtigste Eigenschaften: Absorptionswellenlänge $\lambda_{Abs.}$ , Emissionswellenlänge $\lambda_{Em.}$ , Quantenausbeute $QA$ , Fluoreszenzlebensdauer $\tau_{flour.}$ . Alle Angaben aus [5]. . . . .	20
3.2	Parameter des verwendeten Objektivs. . . . .	25
3.3	Detektionsvolumina in Abhängigkeit der Wellenlänge. . . . .	27
3.4	Alle Angaben aus [6]. . . . .	36
3.5	Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängen-Trennbereiche. Ferner sind die sichtbaren Farbstoffe Bromphenol und Xylencyanol mit ihren bp-Äquivalenten aufgeführt. . . . .	44
3.6	Die Mengenangaben in der Tabelle beziehen sich auf einen 10ml Ansatz beim Trenngel, dieser reicht für ein Gel und einen 3 ml Ansatz für ein Sammelgel, was für drei Gele reicht. SDS steht für Natrium-Dodecylsulfat und APS für Ammoniumpersulfat. . . . .	45
3.7	Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf einen 50ml Ansatz. Dieser ist ausreichend um ein Gel zu gießen. . . . .	48
4.1	Eigenschaften und Unterscheide verschiedener nuklearer Rezeptoren. . . . .	62
4.2	Zusammenstellen der typischen Parameterwerte der AKF $G(\tau)$ . . . . .	77
4.3	Zusammenfassung der Standard-Parameterwerte. . . . .	81
5.1	Daten der dargestellten Meßreihe. Der Mittelwert beträgt $\overline{\tau_{diff}}=280.97 \times 10^{-6}$ s. Die Bezeichnung ERE verweist auf das in Abb. 4.8 dargestellte Oligo (ERE-25bp). . . . .	87
5.2	Bindungsdatenübersicht für den Oestrogenrezeptor $\alpha$ aus den FCS-Messungen. . . . .	93
5.3	Darstellung der Bindungsdaten für den Oestrogenrezeptor $\beta$ aus den FCS-Messungen. . . . .	94
5.4	Zusammenstellung der Bindungsdaten ( $k_{D-\alpha}, k_{D-\beta}$ ) für den Oestrogenrezeptor aus den verschiedenen Methoden. . . . .	101
B.1	Zusammenfassung der HeLa-Daten. . . . .	115
B.2	DSMZ Cell Culture Data for HeLa Cells. . . . .	116
B.3	DSMZ Scientific Data for HeLa Cells. . . . .	116
B.4	Zusammenfassung der SF9-Daten. . . . .	118
B.5	DSMZ Cell Culture and Scientific Data for SF9 Cells. . . . .	118
B.6	Zusammenfassung der HEP-G2 Daten. . . . .	119
B.7	DSMZ Cell Culture Data for HEP-G2 Cells. . . . .	119
B.8	Scientific Data for HEP-G2 Cells. . . . .	119
B.9	Zusammenfassung der MCF-7 Daten. . . . .	120

B.10 DSMZ Cell Culture Data for MCF-7 Cells. . . . .	120
B.11 Scientific Data for MCF-7 Cells. . . . .	121

# Abkürzungsverzeichnis

FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
$F(t)$	Zeitreihe der gemessenen Fluoreszenz
$G(\tau)$	Autokorrelationsfunktion
$T_{tri}$	Tripletanteil
$\tau_{tri}$	Tripletzeit
$\tau_{diff}$	Diffusionszeit
D	Diffusionskoeffizient eines Moleküls
AKF	Autokorrelationsfunktion
MDE	Molecule Detection Efficiency
CEF	Collection Efficiency Function od. Signaleentstehungsfunktion
$C_i(x, t)$	Konzentration des i-ten Stoffes
APD	Avalanche Photo Diode
N.A.	Numerische Apertur
DBD	DNA Bindungsbereich
HBD	Hormon Bindungsbereich
HRE	Hormon Rezeptor Bindungssequenz (hormon response element)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
BS	Band Shift Assay
EMSA=BS	beide Abkürzungen bezeichnen die gleiche Methode
PCR	Polymerase Chain Reaction – DNA Amplifikationsverfahren
MCS	Multi Cloning Side
ER	Oestrogen Rezeptor
TMR	Tetra Metyl Rhodamin – Fluoreszenzfarbstoff
$k_D$	Bindungsgleichgewichtswert
MW	Molekulargewicht
Da	Dalton: Molekulargewicht-Einheit





# Kapitel 1

## Einleitung

Eine Frage vorweg! Wie kommt ein Physiker, der sein Diplom in der Hochenergie Physik am DESY in Hamburg abgelegt hat, eigentlich dazu sich von diesem spannenden Gebiet abzuwenden und sich dem komplexen interdisziplinären Bereich zwischen Molekularbiologie und Physik zuzuwenden?

Die Entwicklungen der letzten Jahren in der molekularbiologischen Diagnostik haben verdeutlicht, daß diese zunehmend auf physikalische Methoden angewiesen ist. Ein grundlegendes Problem der molekularbiologischen Diagnostik besteht bisher darin die Eigenschaften der einzelnen Moleküle und deren Eigenschaften zu bestimmen. Diese sind die zentralen Elemente, die einen grundlegenden Einfluß auf den Stoffwechsel und somit auch auf das Leben haben. Insofern ist es folgerichtig, die Eigenschaften der Moleküle nicht nur in ihrem Umfeld zu erforschen, sondern die Eigenschaften der Moleküle selbst zu bestimmen. Genau hier liegt das Potential der Einbeziehung physikalischer Methoden.

In dieser Arbeit wird man aber aufgrund der Interdisziplinarität des Themas immer wieder hin und her geworfen zwischen den Begriffs- und Disziplin-Welten, und das ist gut so. So wird sich der geneigte Leser öfters freuen, wenn er auf vertraute Begriffe trifft. Man fühlt sich gleich besser.

Im Fokus dieser Arbeit steht die Optimierung der Erforschung einzelner Moleküle. Hierzu wird ein Vergleich einer molekularbiologischen mit einer physikalischen Methode vorgenommen. Vor diesem Vergleich steht die Herstellung der untersuchten Moleküle mit den Mittel der Molekularbiologie. Die Arbeit läßt sich somit in einen eher molekularbiologischen- und einen physikalischen Abschnitt unterteilen.

Doch nun zurück zur 'harten' Wissenschaft. Das fundamentale Dogma der Molekularbiologie ist, daß DNA in RNA übersetzt wird und daraus die biologisch 'aktiven' funktionellen Einheiten, die Proteine, entstehen. Etwas abstrakter formuliert: bei diesem Prozeß wird eine eindimensionale einfache Information in eine dreidimensionale komplexe Struktur überführt. Hierbei ist der zentrale Prozeß die Transkription (DNA -> RNA) [7]. Eine Fehlübersetzung kann dramatische Folgen nach sich ziehen bzw. den Ablauf der Prozesse eines Lebewesens nachhaltig verändern. Diese Schlüsselrolle, die der Transkription zukommt macht sie zu einem attraktiven Kontrollelement der Expression von Genen in Zellen. Es gibt noch viele weitere Kontrollelemente der Proteinexpression, wie RNA-Splicing, die Lebensdauer der RNA, der Transport des Genprodukts ins Zytoplasma oder die Translation von RNA in Proteine. Diese können jedoch nicht aktiv werden wenn keine

DNA-Sequenzen in RNA transkribiert werden. Neben der Aufdeckung der Steuermechanismen der Proteinexpression wurde mit dem international bekannten Projekt<sup>1</sup> 'HUGO' ein anderer Weg beschritten. Hier wurde das komplette Genom eines Menschen bestimmt, um aus diesen Daten möglichst alle exprimierten Gene bestimmen zu können [8].

Kennt man also die Steuermechanismen der Transkription für ein bestimmtes Gen, so läßt sich die Expression des Genprodukts direkt beeinflussen. Dies ist letztlich das Ziel der modernen Molekularbiologie bzw. der Gentechnik. Man ist damit in der Lage, Fehlsteuerungen des Stoffwechsels des Lebewesens zu korrigieren oder positiv im Sinne einer Heilung zu beeinflussen. Ein Steuerungsmechanismus stellen die Promotorsequenzen (DNA) dar, an die Koaktivatoren binden, so daß die Transkription initiiert werden kann [9, 10]. Bei Proteinen die kontinuierlich im Stoffwechsel benötigt werden, werden die entsprechenden Sequenzen permanent abgelesen, ohne daß es eines komplizierten Steuerungsmechanismus bedarf. Bei Genprodukten, die nur in bestimmten Phasen der Entwicklung oder bei bestimmten äußeren Einflüssen benötigt werden, tritt eine komplizierte Steuerung in Kraft. Es wird zu Beginn der Transkription ein vielschichtiger Transkriptionsapparat benötigt (vgl. Abb.(1.1)). Ein Beispiel wären hierfür der Rezeptor PXR, der in der Pubertät eine wichtige Rolle spielt oder Adrenalin, welches bei extremen Stresssituationen in kürzester Zeit ausgeschüttet wird. Hier wird die Transkription über Rezeptoren, die spezifisch an die DNA binden und (teilweise) über eine Vielzahl weiterer Kofaktoren initiiert. In der Abbildung 1.1 ist die Funktion des Oestrogenrezeptors für den Transkriptionsstart gezeigt. Der Rezeptor bindet als Homodimer an der DNA. Durch eine weitere Bindung, des Hormons Oestrogen, wird eine ganze Bindungs-Kaskade ausgelöst bis schließlich die Initiierung der Transkription möglich ist [11].

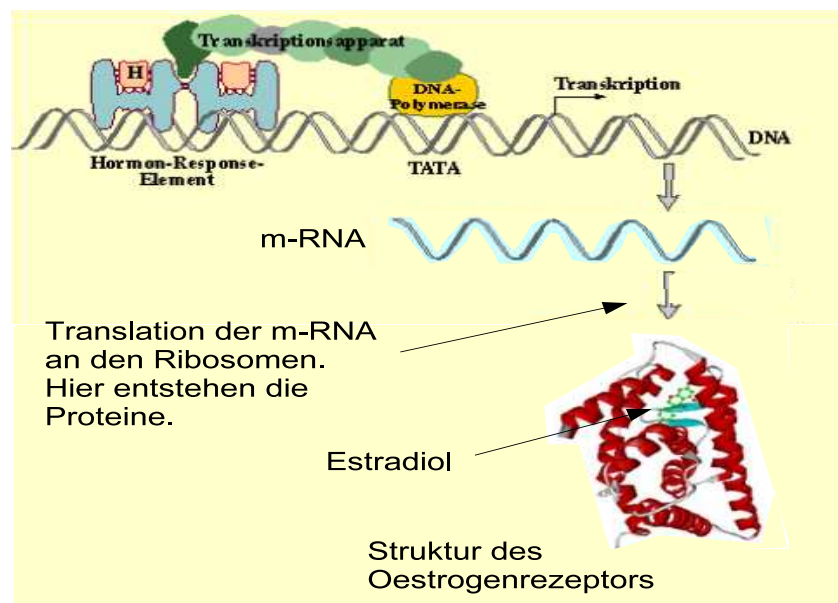


Abbildung 1.1: Initiierung der Transkription durch die Bindung des Oestrogenrezeptors an die DNA-Bindungsstelle (links). Durch diese erste Komplexbildung wird eine ganze Kaskade in Gang gesetzt. Die Transkription ist somit möglich und damit auch die Steuerung der Genexpression.

<sup>1</sup>HUGO – Human Genome Projekt. Im Rahmen diese Projekts wurde die komplette DNA-Sequenz (Genom) eines Menschen bestimmt.

Ein Schlüssel zum tieferen Verständnis der Wirkungsweise von transkriptionellen Rezeptoren ist die Aufklärung der Bindung zwischen dem Rezeptor und der DNA. Insbesondere ist die Wirkung von Liganden auf dieses System von entscheidender Bedeutung. Mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie ist man in der Lage, diese Fragen zum Verständnis der Rezeptor-DNA-Bindung zu beantworten. Mehr noch, man gewinnt weitere, zusätzliche Information gegenüber den klassischen Methoden hinzu und das in einem deutlich kürzeren Zeitraum.

Dies ist wesentlich für diesen Forschungsbereich, in dem nicht einzelne Liganden untersucht werden, sondern ganze 'Ligandenbibliotheken'. Das Ziel ist die Findung von pharmakologischen bzw. stoffwechselaktiven Substanzen. Dies ist praktisch nur zu erreichen, wenn man sich frühzeitig in dieser Suche auf Substanzen konzentrieren kann, die das Potential haben, eine Wirkung zu erzeugen.

Ferner ist dieses Verfahren prinzipiell vollständig automatisierbar: von der Probenbereitstellung über die Gewinnung und Verarbeitung der Daten bis hin zur kompletten Analyse. Dies wird man mit den bisherigen gelgestützten Systemen nicht erreichen können.

In dieser Arbeit soll der Fokus genau auf die Wechselwirkung bzw. die Bindung zwischen DNA und Rezeptor-Proteinen gelegt werden. Insbesondere soll die Art und Weise sowie die Bindungsstärke zwischen diesen völlig verschiedenen Molekülen untersucht werden. Die zentrale Methode ist hierbei die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, die es ermöglicht einzelne Moleküle zu untersuchen, so daß man in der Messung nicht ein Ensemble von Molekülen mißt, sondern den Ensemblewert einzelner Moleküle bilden kann. Dies ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber den sonst üblichen Verfahren. Die folgende Abbildung (1.2), die den kompletten Transkriptionsapparat für den Oestrogenrezeptor zeigt, verdeutlicht das komplexe Zusammenspiel der Initiation der Transkription.

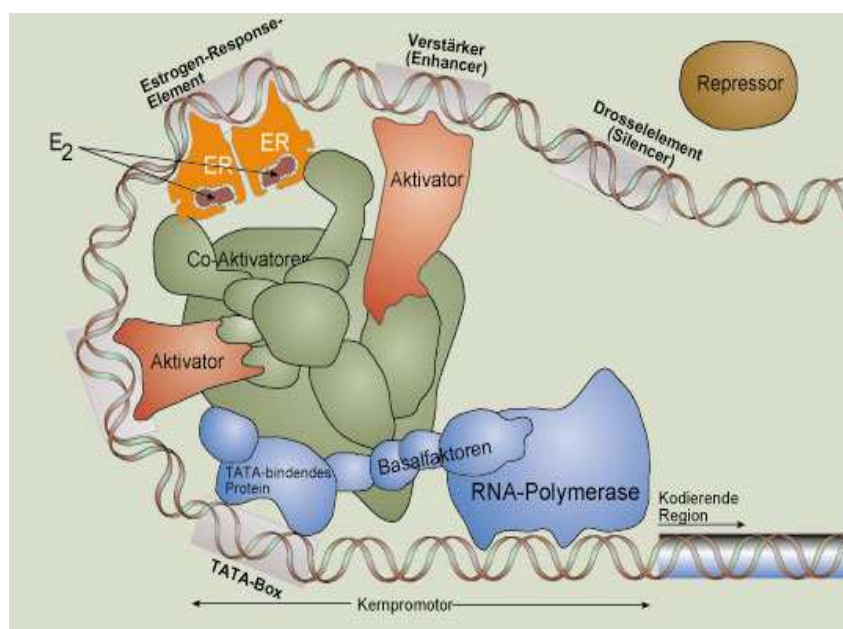


Abbildung 1.2: Darstellung des Transkriptionsapparates für den Oestrogenrezeptor.

Nach dieser eher auf das Meßsystem bezogenen Einführung wird anhand der Wechselwirkung des Oestrogenrezeptors ein Einblick in die Bedeutung der Rezeptorforschung

gegeben [12].

Oestrogen spielt eine zentrale Rolle in der reproduktiven Physiologie. Der zelluläre Effekt von Oestrogen wird über die Bindung an den Nuklearen Rezeptor (ER) vermittelt, welcher die Transkription von Genen aktiviert, die die zelluläre Wachstumskontrolle beeinflussen. Zwei dieser Rezeptoren, bezeichnet als ER- $\alpha$  und - $\beta$  vermitteln diesen Effekt im Zusammenspiel mit weiteren Koaktivatoren. Diese Rezeptoren können auch direkt mit anderen Rezeptoren der Steroid-Rezeptor 'Superfamilie' wechselwirken. Es besteht ferner eine komplexe Wechselwirkung zwischen den Oestrogensignalwegen und Steuerungsereignissen, die durch andere Wachstumsfaktoren, beispielsweise epidermale oder insulinartige, initiiert sind. Oestrogen beeinflusst eine Vielzahl von Krebskrankheiten, unter anderem Brustkrebs und Endometriumkrebs. Antioestrogene, wie Tamoxifen, reduzieren die Tumorgroße bei Brustkrebs, sowie das Risiko an Brustkrebs zu erkranken. Jedoch verursacht dieses Antioestrogen auch 'Nebenwirkungen', wie Endometriumkarzinome bzw. erhöht das Risiko von Thrombosen.

Mit dieser Darstellung der Bedeutung der Rezeptorforschung für das Wohl vieler Menschen soll die Einführung in dieses Feld enden. Diese Arbeit wurde im Rahmen eines Leitprojektes der Bundesanstalt für Forschung und Entwicklung unterstützt und durchgeführt.

## Kapitel 2

# Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine mittlerweile sehr vielseitige, in der Biotechnologie eingesetzte Methode zur Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Dies ist auch in der lebenden Zelle [13] möglich. Die FCS beruht auf der Analyse der gemessenen Fluoreszenzspektren bzw. deren Fluktuationen. Diese werden in einem kleinen Volumenelement, welches durch einen Laser und dessen nachgeschalteter Optik illuminiert aufgenommen.

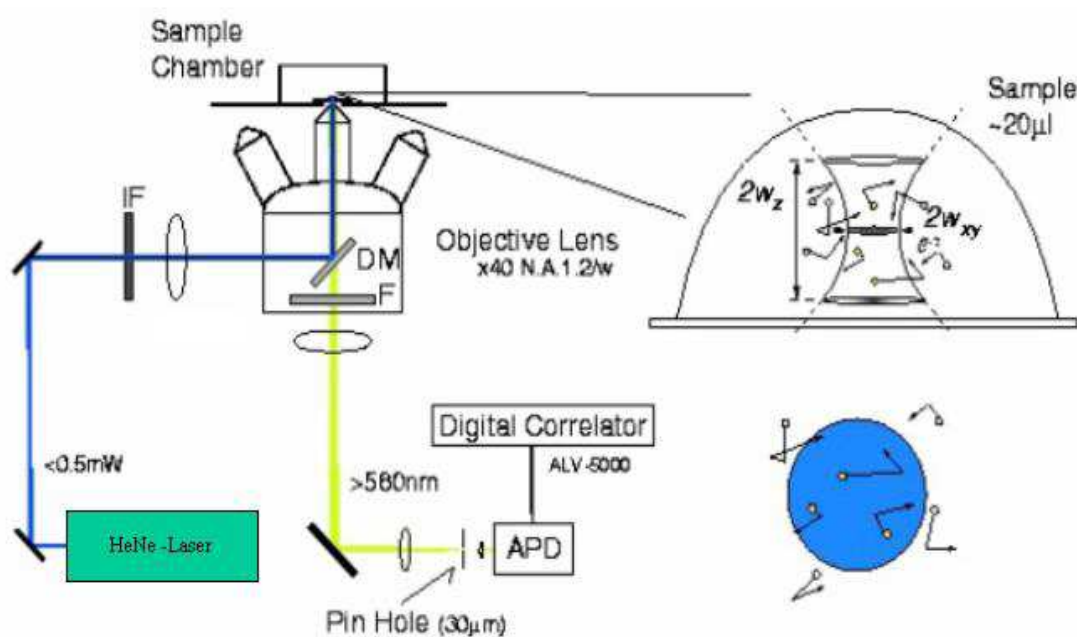


Abbildung 2.1: Der schematische Aufbau der FCS-Messanordnung.

In diesem Volumenelement, typischerweise in der Größenordnung von wenigen femto Liter ( $1\text{fl} \hat{=} 1\mu\text{m}^3$ ), werden die mit Fluorophoren markierten Moleküle angeregt und geben Fluoreszenzlicht ab. Aufgrund des extrem kleinen Volumens kann, bei geeigneter Konzentration der Moleküle, eine Einzelmolekül-Detektion (Single Molecule Detection SMD) durchgeführt werden. Dies gilt nur im Rahmen der Statistik und nicht in dem Sinne, daß mit diesem Verfahren einzelne, individuelle Moleküle über die Meßdauer verfolgt werden.

In Abbildung (2.1) ist der komplette FCS-Messaufbau schematisch dargestellt. Entscheidend bei diesem Verfahren ist dabei die Tatsache, daß die Messung hier an einem 'offenen' System stattfindet, sprich das Detektionsvolumen ist nicht abgeschlossen, sondern stellt vielmehr einen Teil eines Gesamtvolumens von typischerweise  $10\mu\text{l}$  dar. Ein weiterer sehr wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, daß die Messungen, also in diesem Fall die Bestimmung der Bindung zwischen einem DNA-Oligomer und einem Protein, in einer homogenen Phase durchgeführt werden kann und somit näher an der physiologischen Situation ist. Dies ist bei dem sogenannten Gelshiftassay nicht möglich, da hier die Messung nicht in einem thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen kann.



Abbildung 2.2: Die Darstellung zeigt den realen Aufbau der FCS-Messanordnung mit den Komponenten Laser und Mikroskopeinheit.

Dies ist auch nicht bei einer Messung mit einem *BiaCore*<sup>1</sup> Gerät möglich, da ein Bindungspartner immer immobilisiert werden muß, um die Messung durchführen zu können. Diese Immobilisierung wird auf einer Avidin-beschichteten Goldschicht (wenige *nm* dick), die sich auf einem Glasträger befindet, vorgenommen. Hier bedient man sich, von der Stärke der Bindung her gesehen, einer fast kovalenten Bindung zwischen Avidin und Biotin ( $10\text{ nM}$ ). Somit ist man sicher, daß sich der Bindungspartner nicht von der Detektionsschicht löst. Ein derart präparierter 'Chip' ist durch diesen Immobilisierungsschritt für viele weitere Experimente nutzbar, wobei er die gleichen Bedingungen bietet wie zu Beginn der Messung.

---

<sup>1</sup>*BiaCore*® ist ein Meßverfahren, welche sich auf den physikalischen Vorgang der Oberflächen Plasmonen-Resonanz (surface-plasmon-resonance SPR) stützt.

In der Abbildung (2.2) ist die reale FCS-Messanordnung zu sehen. Sie zeigt das FCS-Gerät von Zeiss-Evotec, wie es für diese Arbeit benutzt wurden.

Anhand der Abbildung 2.3 soll nun der Lichtweg des ConfoCor beschrieben werden. Mit dem Laser wird das Anregungslicht erzeugt und über einen Lichtleiter (Glasfaser) in das ConfoCor eingekoppelt. Nach einigen Filtern, Linsen und einem Strahlaufweiter trifft das Laserlicht auf das Objektiv. Dieses fokussiert das Licht auf einen festen Punkt in der Probe (vgl. Ausschnitt in der Abbildung 2.3). Markierte Moleküle, die an diesem Punkt

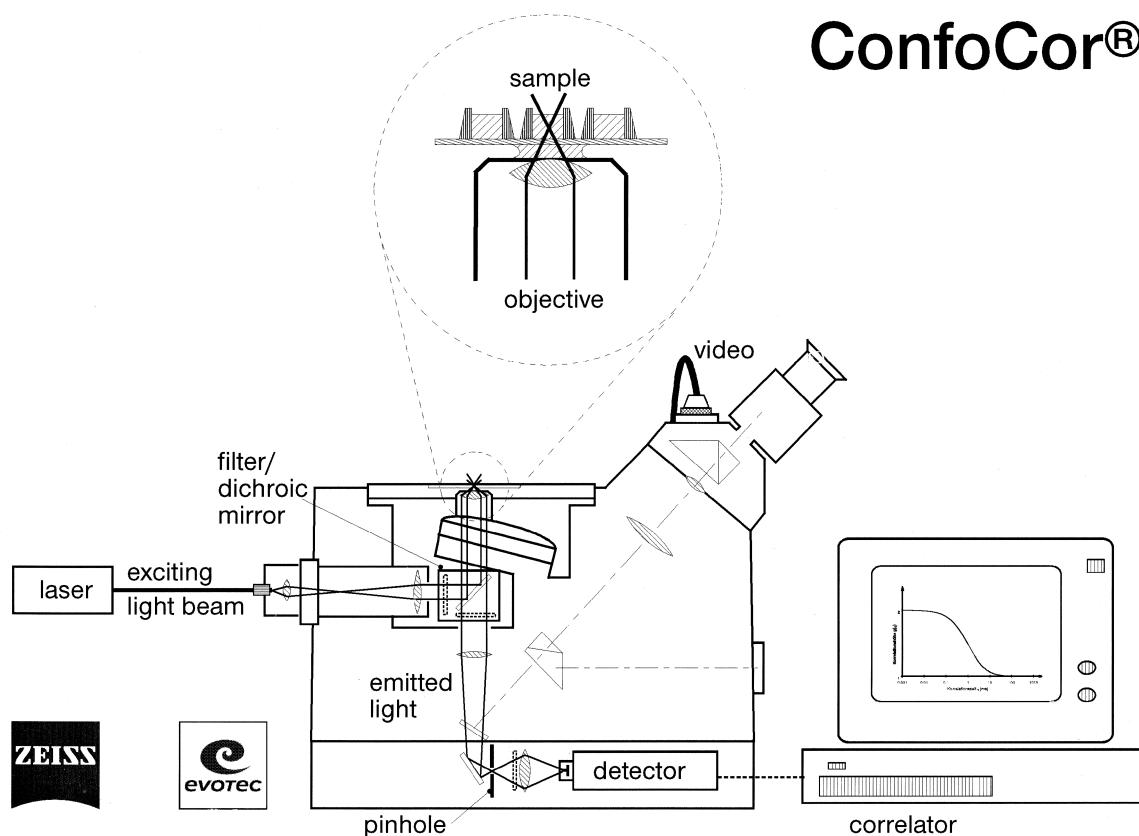


Abbildung 2.3: Strahlengang des ConfoCor1 mit allen wesentlichen Elementen sowie den Datenerfassungskomponenten.

angeregt werden, emittieren Licht in jede Raumrichtung. Der Teil des Emissionslichtes, der von diesem Punkt auf das Objektiv fällt, kann detektiert werden. Hierfür muß das Licht über einen Strahlteiler, ein System aus Linsen, Spiegel und einer Lochblende (pinhole) auf die Detektoreinheit (Photodiode) geleitet werden. Mit der Photodiode werden die emittierten Photonen in ein Fluoreszenz-Signal ( $F(t)$ ) umgewandelt. Die Analyse des Signals ( $F(t)$ ) ist die Grundlage der Autokorrelationsfunktion. Diese wird mit einem 'Hardware' Korrelator berechnet. Die Parametrisierung der Autokorrelationsfunktion liefert die relevanten (Mess)-Größen.

# Kapitel 3

## Grundlagen

In diesem Kapitel werden die wesentlichen Methoden und Konzepte bereitgestellt, die in dieser Arbeit angewandt wurden. Der erste Teil beschäftigt sich mit den Prinzipien der Einzelmolekül-Spektroskopie sowie der technischen Umsetzung. Insbesondere werden die Signalentstehung, die Signaldetektion sowie deren Auswertung beleuchtet. Hierbei wurde der Entwicklung der mathematisch-physikalischen Beschreibung viel Platz eingeräumt, um den Meß-Auswerte-Vorgang komplett darstellen zu können. Ferner werden die Kernbauteile des Meßaufbaus vorgestellt.

Im zweiten Teil werden die Charakteristika verschiedener Moleküle – DNA, Proteine, Hormone – und die Verfahren ihrer Nachweisbarkeit ausführlich besprochen. Anschließend werden die Vorgehensweisen der Proteine-Herstellung beschrieben. Dieser Teil schließt mit der Beschreibung der Bindungskinetik, wie sie für die Auswertung der biologischen Daten benötigt wird.

### 3.1 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Im folgenden Abschnitt wird die für die Auswertung der Messung fundamentale Autokorrelationsfunktion (AKF) hergeleitet. Um der besonderen Meßsituation Rechnung zu tragen bzw. die intrinsischen Eigenschaften der Fluorophore nicht zu vernachlässigen, werden die entsprechenden Korrekturterme zur AKF, entwickelt. Die Korrekturterme beschreiben jeweils eine spezielle physikalische Situation, die je nach Planung des Experiments, je nach dem, welche Objekte (z.b. Zellen, Proteine oder DNA-Oligomere) untersucht werden, ins Kalkül der Auswertung gezogen werden müssen.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) Messung basiert auf der statistischen Analyse des zeitlich aufgelösten Fluoreszenzsignals. Hierbei ist die zeitliche Abfolge der gemessenen Fluoreszenzwerte gemeint, welche mittels einer Avalanchediode bis in den  $fs$ -Bereich aufgezeichnet werden können. Als mathematisches Mittel zur Analyse der Werte wird die Autokorrelationsfunktion herangezogen. Hierbei werden die Fluoreszenzwerte mit sich selbst korreliert und über die Verschiebungszeit  $\tau$  aufgetragen. Aus der Anpassung einer Funktion an die Korrelationswerte können die Kenngrößen der Messung bestimmt werden. Diese eher abstrakte Beschreibung läßt sich im folgenden durch den realen Meßvorgang anschaulicher darstellen. Die grundlegende Idee zur Entwicklung der Modellfunktion ist die mathematische Beschreibung der freien Diffusion von Teilchen.

Die Basis für die Diffusion von Teilchen stellt das Modell des 'random-walk' dar: Man geht davon aus, daß sich die beobachtbaren Teilchen statistisch unabhängig in einem



vorgegebenen Volumen bewegen. Dieser 'random-walk' bzw. die Trajektorie der Teilchen wird nicht als Ortskurve erfaßt, sondern es wird eine Signalfunktion generiert, die proportional zur aktuellen Teilchenzahl ist. Die Diffusion verursacht eine Variation des Mittelwerts der Teilchen im Volumen. Mit der Bewertung dieser Variation des Einzelereignisses gegenüber dem Mittelwert ist damit eine Möglichkeit geschaffen, die mittlere Teilchenzahl im Volumen zu bestimmen. Ein weiterer Aspekt der Signalfunktion ist die mittlere Aufenthaltsdauer. Unter der gemachten Annahme, daß die Teilchen im Volumen frei diffundieren können, nehmen diese, bei genügend langer Beobachtungszeit, jeden Punkt im Volumen gleich häufig an. Bei definierter Volumengeometrie kann aus der Signalfunktion die mittlere Aufenthaltsdauer der Teilchen bestimmt werden welche direkt von der Diffusionskonstante abhängt.

Im folgenden wird auf die Auswertung der gemessenen Fluoreszenzen (Signalfunktion) eingegangen sowie die Autokorrelationsfunktion näher untersucht. Die Fluoreszenz  $F(t)$  wird als Zeitreihe registriert. Der Mittelwert  $\langle F(t) \rangle$  der Fluoreszenz  $F(t)$  ist im thermodynamischen Gleichgewicht konstant. Die Fluktuation um den Mittelwert läßt sich also wie folgt darstellen:

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

Die Schreibweisen  $\overline{F}$  und  $\langle F(t) \rangle$  sind identisch. Allgemein ist der Mittelwert durch folgendes Integral definiert.

$$\langle F(t) \rangle := \frac{1}{T} \int_0^T F(t') dt' \quad (3.2)$$

Ferner gilt für den zeitlichen Mittelwert der Fluktuationen  $\delta F(t)$  folgende Identität.

$$\langle \delta F(t) \rangle = 0$$

Die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  erhält man, indem man die gemessene Fluoreszenz  $F(t)$  mit sich selbst korreliert, sprich die Funktion um eine Zeit  $\tau$  verschiebt und die Werte zur gleichen Zeit  $t$  miteinander multipliziert und normiert. Die normierte Autokorrelationsfunktion läßt sich wie folgt definieren und mit Hilfe der Gleichungen (3.1 und 3.2) umschreiben:

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle F(t) \rangle^2 + \langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = 1 + \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.3)$$

Man erhält die allgemeine AKF. Sie enthält noch keine Korrekturterme, ist jedoch der mathematische Ausgangspunkt für die Entwicklung der speziellen AKF.

$$G(\tau) - 1 = \frac{\langle \delta F(t)\delta F(t+\tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.4)$$

Als nächster Schritt folgt nun die Beschreibung der gemessenen Fluoreszenzfunktion  $F(t)$ , wie sie für die Auswertung der AKF nötig ist. Das gemessene Fluoreszenzsignal setzt sich aus drei Teilen zusammen:

- der Konzentration der fluoreszierenden Moleküle  $C(\vec{r})$  bzw. deren Quantenausbeute,
- der Geräteparameterfunktion  $S(\vec{r})$ ,

- sowie der Intensität  $I(\vec{r})$ , der einfallenden Laserstrahlung.

$$F(t) = \iiint_{\mathbb{R}^3} \underbrace{S(r)I(r)}_{MDE} C(r, t') d^3r dt' \quad (3.5)$$

Hinter der Geräteparameterfunktion  $S(\vec{r})$  verbirgt sich die Beschreibung, wieviel des emittierten Fluoreszenzlichtes den Detektor erreicht und wieviel davon wahrgenommen wird. Diese Funktion wird auch als 'Signalentstehungsfunktion' (CEF) bezeichnet. Die Gleichung (3.5) beschreibt die Molekülnachweiseffizienz (molecule detection efficiency (MDE)) in Abhängigkeit der Konzentration  $C(r, t')$ .

$$MDE = W(\vec{r}) = S(\vec{r})I(\vec{r}) = CEF \cdot I(\vec{r})$$

Das effektive Detektionsvolumen wird durch eine zweidimensionale Gaußfunktion beschrieben, wobei der Laserstrahlradius  $r^2 = x^2 + y^2$  senkrecht zur optischen Achse derjenige ist, bei der die Intensität des Laserstrahls auf  $1/e^2$  (13.5%) abgefallen ist. Er wird allgemein mit  $w_0$  bezeichnet und hat die Form  $w_0 = \sqrt{x_0^2 + y_0^2}$  mit der Bedingung, daß die Intensität des Lasers  $I(w_0) = 1/e^2 \cdot I(\mathbf{r})$  auf  $1/e^2$  abgefallen ist. Entlang der  $z$ -Achse ist der Laserstrahl lorentzförmig, im Fokus des Objektivs [14, 15] gaußförmig. Diese Betrachtung führt, wie in [16] ausführlich hergeleitet, zu folgendem Ansatz.

$$W(\vec{r}) = \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) \quad (3.6)$$

Diese Annahmen werden im realen System durch einen fokussierten gaußförmigen Laserstrahl in der  $(x, y)$ -Ebene und für die  $z$ -Richtung durch die konfokale Geometrie erfüllt.

Führt man nun den Fluktuationsterm  $\theta(\vec{r}, \vec{r}', \tau)$  der Teilchen ein, der die physikalische Situation der Messung beschreibt [17], die im wesentlichen durch die Schwankung der Konzentration der fluoreszierenden Teilchen gegeben ist, so kann dieser Term durch die Gleichung (3.7) beschrieben werden.

$$\theta(\vec{r}, \vec{r}', \tau) = \langle \delta C(\vec{r}, t), \delta C(\vec{r}', t + \tau) \rangle \quad (3.7)$$

Sie beschreibt die Verschiebung von Teilchen von  $\vec{r}$  nach  $\vec{r}'$  in dem Zeitintervall  $\tau$ , und damit die Konzentrationschwankung, die sie verursachen.

Setzt man diese Ergebnisse (Gleichung 3.5 und 3.6) in Gleichung (3.4) ein, so ergibt sich die spezielle AKF (Gleichung (3.8)), die es zu lösen gilt. Ein ausführliche Lösung der der Messung angepaßten speziellen AKF, wird im Abschnitt 3.1.2 vorgestellt. Nachfolgend wird knapp der Lösungsweg skizziert und das Ergebnis gezeigt.

$$G(\tau) - 1 = \frac{\iiint_{\mathbb{R}^3} \iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r})W(\vec{r}')\theta(\vec{r}, \vec{r}', \tau)d^3rd^3r'}{\left[\iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r})d^3r\right]^2 \langle C \rangle^2} \quad (3.8)$$

Der erste Teil des Nenners der Gleichung (3.8) läßt sich mit dem fundamentalen Integral  $\int_{-\infty}^{\infty} \exp(-ax^2)dx = \sqrt{\frac{\pi}{a}}$  [18] umformen und man erhält folgenden Ausdruck.

$$\iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r})d^3r = \iiint_{\mathbb{R}^3} \exp\left(-2\frac{x^2 + y^2}{w_0^2}\right) \exp\left(-2\frac{z^2}{z_0^2}\right) dr = (\pi/2)^{3/2} w_0^2 z_0 \quad (3.9)$$

Nach der Ersetzung  $\tau_{diff} = \frac{w_0^2}{4D}$  sowie einer quadratischen Ergänzung im Exponent kann auch die Integration des Zählers durchgeführt werden. Dies führt auf folgende AKF, ohne die weiteren Korrekturterme.

$$G_D(\tau) - 1 = G_0 \frac{1}{1 + \tau/\tau_{diff}} \frac{1}{\sqrt{1 + k\tau/\tau_{diff}}} \quad (3.10)$$

Mit den folgenden Ersetzungen:

$$\tau_{diff} = \frac{w_0^2}{4D}, \quad k = \frac{w_0^2}{z_0^2}, \quad V = \frac{4}{3}\pi w_0^2 z_0, \quad N = \langle C \rangle V, \quad G_0 = \frac{1}{N} \cdot \frac{4}{3\sqrt{\pi}} \approx 0.751/N$$

### 3.1.1 Gaußsche Optik

Wie auch hier wird bei den meisten FCS-Experimentanordnungen ein Gauß-förmiger Laserstrahl als Anregungslichtquelle benutzt. Im folgenden Abschnitt soll eine kurze Ableitung der Propagation, sowie der Fokussierung des Laserstrahls gegeben werden, soweit sie für die weitere Darstellung der Meßmethode notwendig ist.

In der skalaren Näherung ist die elektrische Feldamplitude  $E_0$  eines Gauß-schen Laserstrahls gegeben durch die Überlagerung von ebenen Wellen:

$$E_0 = C \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dk_x}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dk_y}{2\pi} \exp \left( ik_x x + ik_y y + i \underbrace{\left( \sqrt{k^2 - k_x^2 - k_y^2} \right)}_{k_z} z \right) \exp \left[ -\frac{w_0^2}{4} (k_x^2 + k_y^2) \right] \quad (3.11)$$

$x$  und  $y$  sind die kartesischen Koordinaten transversal zur Ausbreitungsrichtung –  $z$ -Koordinate – des Lasers,  $C$  ist eine noch zu bestimmende Konstante.  $w_0$  ist der Strahldurchmesser im Fokus,  $k = 2\pi/\lambda$  beschreibt die Wellenzahl mit der Wellenlänge  $\lambda$  und  $k_x$  bzw.  $k_y$  sind die entsprechenden Komponenten von  $k$ . Im Fall  $(k_x^2 + k_y^2) \ll k^2$  gilt die Näherung:

$$E_0 = C \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dk_x}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{dk_y}{2\pi} \exp \left( ik_x x + ik_y y + ik_z z - i \frac{k_x^2 + k_y^2}{2k} z \right) - \frac{w_0^2}{4} (k_x^2 + k_y^2) \quad (3.12)$$

Die Abschätzung, die auf Gl. (3.12) führte, ist erfüllt wenn gilt:  $k_x, k_y \ll k$ . Das Integral kann mit der Sattelpunkt-Methode approximiert werden. Hierbei wird die komplexe Ebene der Integrationsvariablen auf eine Kontur konstanter Phase untersucht. Substituiert man  $q_{x,y} e^{i\alpha}$  mit reellen Werten für  $q_{x,y}$  und  $\alpha$  für  $k_{x,y}$ , so ist die Bedingung für eine konstante Phase:

$$\text{Im} \left[ \left( 1 + i \frac{2z}{w_0^2 k} \right) \exp 2i\alpha \right] = 0; \quad k = \frac{2\pi}{\lambda}; \quad \alpha = -1/2 \arctan(z/z_R)$$

mit der Rayleigh-Länge  $z_R = kw_0^2/2 = \pi w_0^2/\lambda$  und  $e^{2i\alpha} = \frac{1-iz/i_R}{\sqrt{1-(iz/i_R)^2}}$ .

Geht man nun zurück zur Darstellung des elektrischen Feldes mit ebenen Wellen und führt die Integration über  $k_{x,y}$  entlang der Kurve konstanter Phase aus, erhält man:

$$E_0 = \frac{C}{\pi w w_0} \exp \left[ -\frac{r^2}{w^2} + i \left( kz + \frac{z}{z_R} \frac{r^2}{w} - \arctan \frac{z}{z_R} \right) \right] \quad (3.13)$$

wobei  $w \equiv w(z) = w_0 \sqrt{1 + (z/z_R)^2}$  und  $r = \sqrt{x^2 + y^2}$  ist. Der Abstand zur Laserstrahlachse wird durch  $w$  beschrieben. In Abbildung (3.1) ist eine Oberfläche eines Lasers mit gaußförmigem Strahlprofil mit konstanter Intensität dargestellt. Die Laserintensitätsver-

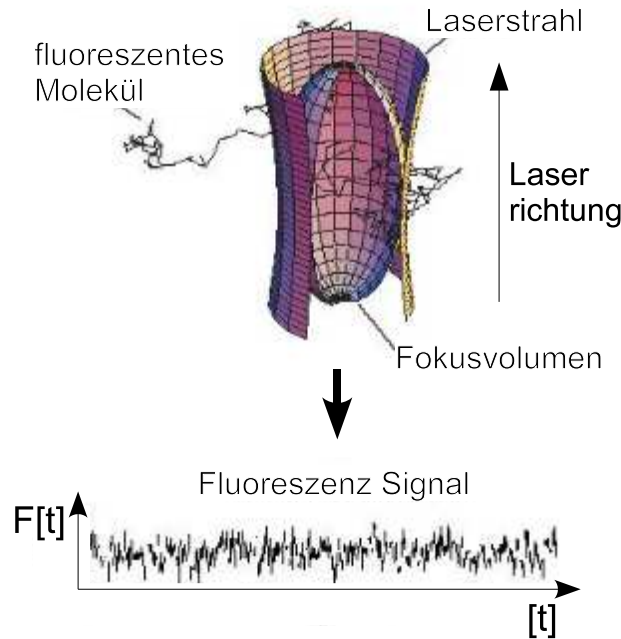


Abbildung 3.1: Hier ist das effektive Detektionsvolumen sowie die spezielle Laserisoeingefläche ( $I_{max} = 13.8\%$ ) gezeigt (entnommen aus [1] und modifiziert).

teilung  $I_0(r, z)$  ist gegeben durch das Betragsquadrat der elektrischen Feldamplitude  $E_0$  multipliziert mit dem Faktor  $c/8\pi$ ,

$$I_0 = \frac{c}{8\pi} \|E_0\|^2 = \frac{cC^2}{8\pi^3 w_0^2 w^2} \exp\left[-\frac{2}{w^2} r^2\right], \quad (3.14)$$

so daß tatsächlich ein Gaußches Intensitätsprofil vorhanden ist, an der Stelle  $z = 0$  mit einem Strahlradius  $w$ , wie es in Gl. (3.6) angenommen wurde.

Berechnet man nun die Gesamtleistung des Lasers  $P_0$ , so kann die Konstante  $C$  bestimmt werden.

$$P_0 = 2\pi \int_0^\infty dr r I_0 = \frac{cC^2}{16\pi^2 w_0^2} \Rightarrow C = 4\pi w_0 \sqrt{\frac{P_0}{c}} \quad (3.15)$$

Die vollständige Abhängigkeit der Intensität von der Zeit führt, wie in [16] ausführlich gezeigt, auf die Form.

$$I(t) = I'_0 \exp\left(-\frac{2(x^2 + y^2)}{w_{xy}}\right) \cdot \exp\left(-\frac{2z^2}{w_z}\right); \quad w_{xy} = w_0 \quad (3.16)$$

Mit dieser Darstellung ermöglicht man die Berechnung der Fläche konstanter Intensität eines Gaußchen Laserstrahls nahe des Fokus. Man erhält dadurch das mathematische Instrumentarium, um die Propagation des Strahls bis zur Probe zu beschreiben.

### 3.1.2 Diffusion von Teilchen

Die Diffusion von Teilchen ist der zentrale Vorgang, der via FCS zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten  $D$  führt. In der Folge soll die freie Diffusion von Teilchen beschrieben werden. Das einfachste System hierzu besteht aus zwei Komponenten, einem Lösungsmittel (meist Wasser) und einem nicht löslichen Molekül. Das zweite Fick'sche Gesetz Gl. (3.17) beschreibt allgemein die räumliche und zeitliche Änderung der Konzentration des Moleküls  $C_i(r, t)$ , d.h. der Auswirkung der Diffusion. Der Index  $i$  bezeichnet die verschiedenen Komponenten des betrachteten Systems.

$$\frac{\partial C_i(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = D \nabla^2 C_i(\mathbf{r}, t) \quad (3.17)$$

Die Gleichung ist jedoch nur für geringe Konzentrationen erfüllt [19]. Der Grund liegt in der Abhängigkeit von  $D$  von Reibungseigenschaften (siehe Gl. (3.34)), die wiederum von den Komponentenkonzentrationen abhängen.

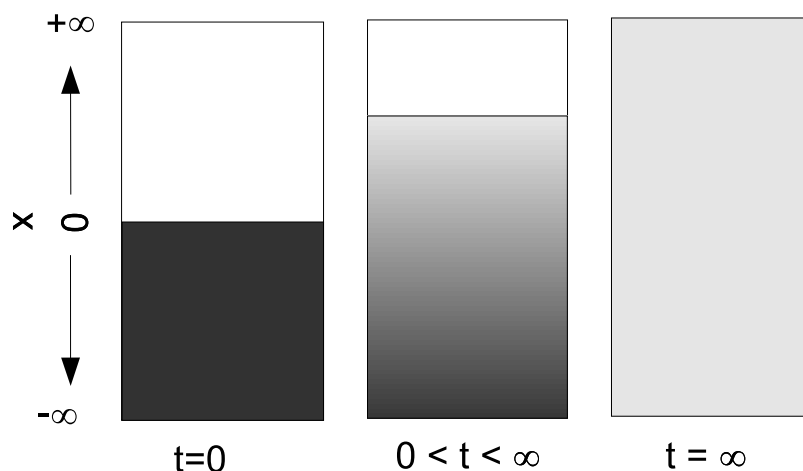


Abbildung 3.2: Freie Diffusion: Darstellung des Diffusionsverlaufs.

Zur Lösung der Gl. (3.17) müssen Randbedingungen festgelegt werden. Zur Vereinfachung der Darstellung soll die Diffusion eines Teilchens in einer Raumrichtung betrachtet werden. In der Abbildung 3.2 ist die Situation des Diffusionsverlaufs schematisch dargestellt. Für den Fall der freien Diffusion gilt dann  $C(x, 0) = C_0 \quad \forall x < 0$  und  $C(x, 0) = 0 \quad \forall x > 0$ . Dies entspricht einer Heaviside-Funktion zum Zeitpunkt ( $t=0$ ). Die Gleichung soll in Einheiten von  $D$ , deren physikalische Einheit Fläche pro Zeit ( $[\mu\text{m}^2/\text{s}]$ ) ist, gelöst werden. Die Diffusionskonstante  $D$  gibt anschaulich die Anzahl der Teilchen an die pro Zeiteinheit  $t$  das Flächenelement passieren. Es liegt also nahe, daß  $C$  eine Funktion von  $x^2/t$  ist. Mit einer Variablentransformation der Art ( $y^2 = x^2/t$ ) erhält man aus dem zweiten Fick'schen Gesetz eine gewöhnliche Differentialgleichung 2.Ordnung in  $y$ . Man hat es also nicht mehr mit einer partiellen Differentialgleichung erster Ordnung in der Zeit und zweiter Ordnung im Raum zu tun.

$$-\frac{y}{2} \frac{\partial C}{\partial y} = D \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} \quad (3.18)$$

Die erste Integration liefert

$$\frac{dC}{dy} = 1/k' \exp\left(\frac{-y^2}{4D}\right) \quad (3.19)$$

wobei  $k'$  die Integrationskonstante darstellt. Die Rücktransformation liefert

$$\frac{\partial C_i}{\partial x} = (1/k't^{1/2}) \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) \quad (3.20)$$

Diese Gleichung kann von  $x = -\infty$  bis  $x = +\infty$  integriert werden unter der Annahme, daß die obigen Randbedingungen erfüllt sind ( $C(-\infty, 0) = C_0$  und  $C(+\infty, t) = 0$ ).

$$\int_{C_0}^0 dC = -C_0 = -\frac{1}{k't^{1/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(\frac{-x^2}{4Dt}\right) dx = -\frac{\sqrt{4\pi Dt}}{k't^{1/2}} \quad (3.21)$$

Die Integrationskonstante läßt sich durch die Integration zu  $k' = \left(\frac{4\pi D}{C_0^2}\right)^{1/2}$  bestimmen. Nun kann diese Gleichung (3.20) unter Beachtung der Randbedingungen erneut von  $x = 0$  bis  $x$  integriert werden. Mit der Variablen  $v^2 = x^2/4Dt$  erhält man folgende Lösung.

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2} \left[ 1 - (2/\sqrt{\pi}) \int_0^{x/\sqrt{4Dt}} \exp(-v^2) dv \right] \quad \forall x > 0, t > 0 \quad (3.22)$$

Für den dreidimensionalen Fall kann mit den entsprechenden Rand- sowie Anfangsbedingungen folgende Lösung bestimmt werden [20].

$$C(x, t) = \frac{C_0}{8(\pi Dt)^{3/2}} \exp\left(\frac{-r^2}{4Dt}\right) \quad (3.23)$$

Mit dieser Gleichung ist man nun in der Lage die Konzentrationsfluktuation  $\delta C$  in Abhängigkeit von  $D$  zu bestimmen. Die Beziehung zwischen dem Diffusionskoeffizienten und der Fluktuation der Konzentration der Teilchen läßt sich nun durch Einsetzen der Gl. (3.23) in den rechten Teil von Gl. (3.24) leicht nachrechnen. In [17] findet man eine ausführliche Darstellung.

$$\langle \delta C(r, t) \delta C(r', t + \tau) \rangle = \langle C \rangle (4\pi D\tau)^{-3/2} \exp\left(\frac{-|r - r'|^2}{4D\tau}\right) \quad (3.24)$$

Im nächsten Schritt geht es darum, die Relation zwischen dem gemessenen Signal  $F(t)$  und den Konzentrationsänderungen  $\delta C$  zu motivieren und abzuleiten. Anschaulich ist die Sache klar. Die fluoreszierenden Moleküle bewegen sich aufgrund der Diffusion durch den Objektivfokus, wodurch ein Signal entsteht. Dieses Signal, das sich in alle Raumrichtungen gleich ausbreitet, wird jedoch nur zu einem geringen Teil aufgrund der Geräteeigenschaften auf den Detektor abgebildet. Die Signalreduktion kann mit einem Faktor  $\kappa^2$  beschrieben werden. Die Signalstärke selbst ist von der Intensität  $I$  des Lasers abhängig.

Nun fehlt nur noch die Detektoreigenschaft, die mit dem Faktor  $Q^2$  Eingang findet, um das Problem komplett zu beschreiben. Mathematisch läßt sich diese Relation zwischen  $\langle \delta C(r, t) \delta c(r, t + \tau) \rangle$  und  $\langle \delta F(r, t) \delta F(r, t + \tau) \rangle$  wie folgt fassen [17]:

$$\langle \delta F(r, t) \delta F(r, t + \tau) \rangle = \kappa^2 Q^2 \int dr \int dr' I^2(r, t) I^2(r', t) \langle \delta C(r, t) \delta C(r', t + \tau) \rangle \quad (3.25)$$

Die Vorfaktoren  $Q^2, \kappa^2$  können durch die Auswertung der Funktion  $S(r)$  (vgl. Gleichung 3.5) bestimmt werden.

Nun kann die Auswertung der in Abschnitt (3.1) gemachten AKF vorgenommen werden. Es ist also folgende Gleichung zu lösen.

$$G(\tau) - 1 = \frac{\iiint_{\mathbb{R}^3} \iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r}) W(\vec{r}') \theta(\vec{r}, \vec{r}', \tau) d^3r d^3r'}{\left[ \iiint_{\mathbb{R}^3} W(\vec{r}) d^3r \right]^2 \langle C \rangle^2} \quad (3.26)$$

Der Nenner ist bereits gelöst. Der Zähler kann durch eine Separation der Variablen  $(x, y, z)$  aufgespalten werden. Durch die Definition von  $\tau_{diff} = w_0^2/4D$  läßt sich das Ergebnis vereinfachen. Mit einer quadratischen Ergänzung im Exponenten kann die erste Integration durchgeführt werden. Unter Verwendung von uneigentlichen Gaußintegralen kann auch die Integration über  $dx'$  erfolgen.

$$\int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} W_x W'_x dx dx' = \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \int_{-\infty-\infty}^{\infty} \exp\left(\frac{-2}{w_0^2} x'^2\right) \exp\left(\frac{-2}{w_0^2} x^2\right) \exp\left(\frac{-(x-x')^2}{4D\tau}\right) \quad (3.27)$$

$$= \frac{\sqrt{\pi} \sqrt{4D\tau}}{\sqrt{2\tau/\tau_{diff}+1}} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(\frac{-1}{4D\tau} \left[-\left(\frac{1}{2\tau/\tau_{diff}+1}\right) + \left(\frac{2\tau}{\tau_{diff}} + 1\right)\right] x'^2\right) \quad (3.28)$$

$$= \frac{\pi}{2} \sqrt{4D\tau} w_0 \frac{1}{\sqrt{1+\frac{\tau}{\tau_{diff}}}} \quad (3.29)$$

Führt man nun diesen Schritt noch für  $y$  und  $z$  aus und setzt die Ergebnisse in die AKF ein, so erhält man die normierte Korrelationsfunktion in einem gaußförmigen Volumen.

$$G(\tau) - 1 = \frac{\frac{\langle C \rangle}{(\pi 4D\tau)^{3/2}} \left(\frac{\pi}{2} \sqrt{4D\tau}\right)^3 \left[w_0 \frac{1}{\sqrt{1+\tau/\tau_{diff}}}\right]^2 z_0 \frac{1}{\sqrt{1+\frac{w_0^2}{z_0^2} \frac{\tau}{\tau_{diff}}}}}{\langle C \rangle \left(\left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} w_0^2 z_0\right)^2} \quad (3.30)$$

$$= \frac{1}{\langle C \rangle w_0^2 z_0} \frac{1}{\left(\frac{\pi}{2}\right)^{3/2} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{w_0^2}{z_0^2} \frac{\tau}{\tau_{diff}}}} \quad (3.31)$$

Zur Auswertbarkeit und Lesbarkeit der Formel werden folgende Ersetzungen vorgenommen.

$$\tau_{diff} = \frac{w_0^2}{4D}, \quad k = \frac{w_0^2}{z_0^2}, \quad V = \frac{4}{3} \pi w_0^2 z_0, \quad N = \langle C \rangle V, \quad G_0 = \frac{1}{N} \frac{4}{3\sqrt{\pi}} \approx 0.75 \frac{1}{N} \quad (3.32)$$

Mit diesen läßt sich die fundamentale Gleichung für die Diffusionsmessung fluoreszierender Teilchen in einem gaußförmigen Detektionsvolumen aufschreiben (vgl. [21]).

$$G_D(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff}}}} \quad (3.33)$$

Die Diffusionszeit  $\tau_{diff}$  beschreibt, wie schnell das Molekül das Volumen  $V$  wieder verlässt. Sie ist nur über den Volumenradius  $w_0$  (in der Fokusebene  $z = 0$ ) mit der Diffusionskonstante  $D$  verknüpft. Der Faktor  $k$  beschreibt das Radienverhältnis des Detektionsvolumens, welches einen Rotationsellipsoid darstellt. Die Spezialfälle,  $k = 1$  gleiche Radien (Kugelvolumen) und  $k \rightarrow 0$  (zweidimensionaler Zylinder in  $z$ -Richtung), geben einen Eindruck, wie sich der Parameter auf die Volumenform auswirkt. Ein typischer Wert wäre  $k = 0.027$ , er stellt einen sechsfach größeren  $z$ -Radius  $z_0 = k^{-\frac{1}{2}}w_0 = 6w_0$  dar. Unter der Annahme von kugelförmigen Teilchen ist der Diffusionskoeffizient  $D$  durch die Stokes-Einstein Beziehung gegeben,

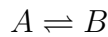
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_{Stokes}}, \quad (3.34)$$

wobei  $R_{Stokes}$  den Radius des Teilchens,  $\eta$  die Viskosität der Probenflüssigkeit,  $T$  die Temperatur und  $k_B$  die Boltzmannkonstante beschreibt. Mit dieser Gleichung kann sodann der Radius des untersuchten Moleküls bestimmt werden.

### 3.1.3 Reaktion von Teilchen

Die Konzentrationsfluktuation im Detektionsvolumen kann nicht nur durch die Diffusion der Moleküle verursacht werden, sondern auch durch Reaktion bzw. Wechselwirkungen zwischen den Teilchen. Hierunter versteht man allgemein chemische Veränderung, Bindung anderer Teilchen oder auch Wechselwirkungen mit Donatormolekülen, so daß es zu keiner detektierbaren Fluoreszenz der markierten Moleküle kommt.

Die Ursachen von Fluoreszenzfluktuationen, die durch Reaktionen hervorgerufen werden, sind die Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften der reagierenden Teilchen. Im Falle einer Gleichgewichtsreaktion führen die Fluktuationen um den Mittelwert zu einer Änderung der Teilchenzahl. Die Reaktion läßt sich wie folgt darstellen.



Dabei ist die Assoziationsrate  $k_{ass}$  symbolisiert durch  $\rightarrow$  und die Dissoziationsrate  $k_{diss}$  durch  $\leftarrow$ .

Der allgemeine Ansatz der Diffusionsgleichung mit einem Reaktionsterm wird durch folgende Gleichung beschrieben,

$$\frac{d\delta c_j(\vec{r}, t)}{dt} = D_j \nabla^2 \delta c_j(\vec{r}, t) + \sum_{k=1}^n T_{jk} \delta c_k(\vec{r}, t) \quad (3.35)$$

wobei  $T_{jk}$  die Matrix der Reaktionsraten bzw. der Reaktionsgeschwindigkeiten beschreibt. Die Lösung der Gleichung kann in Analogie zum Abschnitt (3.1.2) abgeleitet werden. Unter der Annahme, daß die Teilchen A und B den gleichen Diffusionskoeffizienten haben, ergibt sich folgende Formel [17, 22, 23]. Diese Annahme ist zulässig, da hier unter Reaktion ein Umbau des Moleküls zu verstehen ist. Das Molekulargewicht des Molekül bleibt also gleich, womit sich auch die gleiche Diffusionskonstante für Molekül A und B ergibt.

$$G_R(\tau) = G_D(\tau)[(1 - B) + B \exp(-R_{inv} \tau)] \quad (3.36)$$



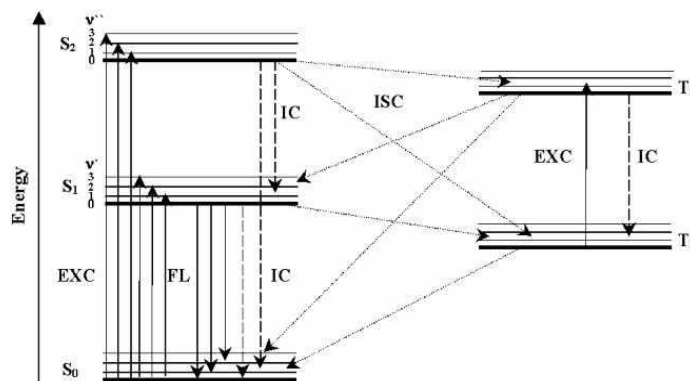


Abbildung 3.3: Die Abbildung zeigt das komplette Termschema der Fluorophoranregung.

Dabei ist  $G_D(\tau)$  die Autokorrelationsfunktion für die Diffusion ist (siehe Gl. 3.33). Ferner sind die noch folgende Ersetzungen eingeführt worden.

$$Q = \frac{Q_A}{Q_B}, \quad K = \frac{k_{ass}}{k_{diss}}, \quad B = \frac{K(1 - Q^2)}{(k + 1)(1 + KQ^2)}, \quad R_{inv.} = k_{ass} + k_{diss}$$

Der Parameter  $Q$  beschreibt den Anteil der Teilchen im Zustand A. Allgemein kann  $Q$  durch  $Q_j = \sigma_{abs_j} \Phi_j g_j$  ausgedrückt werden.  $K$  ist die Gleichgewichtskonstante der Reaktion und  $R_{inv.}$  steht für die inverse Zeitkonstante des reaktionsbedingten Abfalls der Autokorrelationsfunktion. Der Faktor  $B$  beschreibt anschaulich den Teil der AKF, der aufgrund der Reaktion der Teilchen abgezogen werden muss, da er nicht mehr detektierbar ist. Dies wird in der nächsten Darstellung der Gl. (3.36) deutlich.

$$G_R(\tau) = G_D(\tau) - G_D(\tau)B + G_D(\tau)B \exp(-R_{inv.}\tau) \quad (3.37)$$

Der letzte Summand beschreibt also eine Abklingfunktion der AKF aufgrund der Reaktion der Moleküle.

### 3.1.4 Anregungsschema der Fluorophore

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Prozesse, die durch das Anregen der Fluorophore mittels Laserstrahl der geeigneten Wellenlänge  $\lambda$  auftreten, dargestellt. Das Schema der verschiedenen angenommenen Zustände, die durch das Einstrahlen der Energie  $E = \hbar\omega$  erzeugt werden, wird im Jablonski-Diagramm (Abb. 3.3) dargestellt. Die folgenden photophysikalischen Prozesse sind hierbei die führenden:

1. Anregung vom Grundzustand  $S_0$  auf den ersten angeregten Zustand  $S_1$  mit einer Anregungsrate von  $k_{12}$ .
2. der Übergang von  $S_1 \rightarrow S_0$  mit der Rate  $k_{21}$  der als Fluoreszenz bezeichnet wird.
3. der strahlungslose Übergang<sup>1</sup> (durch Phononen vermittelt) von  $S_1 \rightarrow T_1$  zum Triplettzustand  $T_1$  mit der Rate  $k_{23}$ .

<sup>1</sup>Dieser Übergang wird in der Literatur meist als 'intersystem crossing' bezeichnet.

4. der als Phosphoreszenz bezeichnete Übergang vom  $T_1 \rightarrow S_0$  mit einer Rate  $k_{31}$  die etwa 200-1000mal kleiner ist als  $S_1 \rightarrow T_1$ .
5. der Prozeß, bei dem das Fluorophor aufgrund von Prozessen höherer Ordnung nicht mehr fluoresziert, auch 'photobleaching' genannt (vgl. Abschnitt (3.1.5)).

Diese Übergangsraten können anschaulich in einem linearen Differentialgleichungssystem Gl. (3.38) mit zeitabhängigen Besetzungszahlen ausgedrückt werden.

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{12} & k_{21} & k_{31} \\ k_{12} & -(k_{23} + k_{21}) & 0 \\ 0 & k_{23} & -k_{31} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} \quad (3.38)$$

Vom Schwingungsgrundzustand eines angeregten Zustands fällt das Elektron in beliebige Schwingungszustände des Grundzustands zurück. Dies entspricht dem unter 2. beschriebenen Sachverhalt. Der Elektronenspin bleibt dabei erhalten. Die Energiedifferenz  $\delta E = |E_2 - E_1| = \hbar\omega$  wird als Licht  $S_1 \rightarrow S_0 + \hbar\omega$  emittiert, welches als Fluoreszenz bezeichnet wird. Die charakteristische Zeitkonstante, die Zeitspanne, gemessen ab der Anregung des Elektrons in den Zustand  $S_1$ , bis Fluoreszenz beobachtet wird, liegt bei  $\tau \cong 10^{-10}$  bis  $10^{-6}$  s [24]. Geht man von einem angeregten Triplett-Zustand aus, fällt das Elektron unter Spinumkehr  $T_1 \rightarrow S_0 + \hbar\omega$  mit einer Zeitkonstante von  $\tau \cong 10^{-4}$ s [24] unter Abgabe von Licht in den Grundzustand zurück. Die Ursache für die um einige Größenordnungen längere Zeitkonstante ist in der Spinumkehr der Elektronen dieses Übergangs begründet. Mit einem Ausflug in die Quantenmechanik, beispielsweise in [25] ließe sich diese Behauptung beweisen. Hier ist jedoch wichtig festzuhalten, daß ein Molekül welches sich in einem Triplett-Zustand befindet für längere Zeit nicht für die Fluoreszenz zur Verfügung steht. Moleküle in diesem Zustand tragen somit nicht mehr zum Fluoreszenzsignal bei, verringern also die Konzentration der anregbaren und damit 'sichtbaren' Moleküle. Die Auswirkungen der Triplettzustände auf die Autokorrelationsfunktion sind beachtlich und müssen daher berücksichtigt werden (siehe Abschnitt 4.5.1). In Abb. (3.4) sind die Auswirkungen der Laserleistung auf den Anteil der markierten Moleküle, die sich in Triplettzuständen befinden, gezeigt.

Die Besetzungswahrscheinlichkeit  $k_{12}$  für die Anregung in den Zustand  $S_1$  ist proportional zur Laserleistung  $P_0$  und des Anregungsquerschnittes  $\sigma_{exc}$  bzw. der Wechselwirkungswahrscheinlichkeit, daß ein Fluorophor in den ersten angeregten Zustand übergeht.  $\Phi$  beschreibt Anregungsintensität und  $\lambda_{exc}$  die entsprechende Wellenlänge.

$$k_{12} = \sigma_{exc} \Phi = \frac{\sigma_{exc} P_0 \lambda_{exc}}{\pi w_0^2 h c} \quad (3.39)$$

Mit der Annahme, daß der Übergang der Fluoreszenz  $S_1 \rightarrow S_0$  deutlich schneller abläuft als der Triplettübergang  $S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$  ( $k_{21} \gg (k_{23}, k_{31})$ ) kann die Besetzungswahrscheinlichkeit des  $T_1$ -Niveaus wie folgt dargestellt werden [26].

$$T(t) = T_{tri} \left( 1 - \exp\left(\frac{-t}{\tau_{tri}}\right) \right), \quad \text{mit } T_{tri} : \text{Triplettanteil} \quad \tau_{tri} : \text{Triplettzeit} \quad (3.40)$$

Bestimmt man die Eigenwerte der Gleichung (3.38) mit den Randbedingungen

$$k_{21} \gg (k_{23}, k_{31}); \quad \frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S_0(t) \\ S_1(t) \\ T_1(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad t = 0 : \text{Laser wird angeschaltet}$$

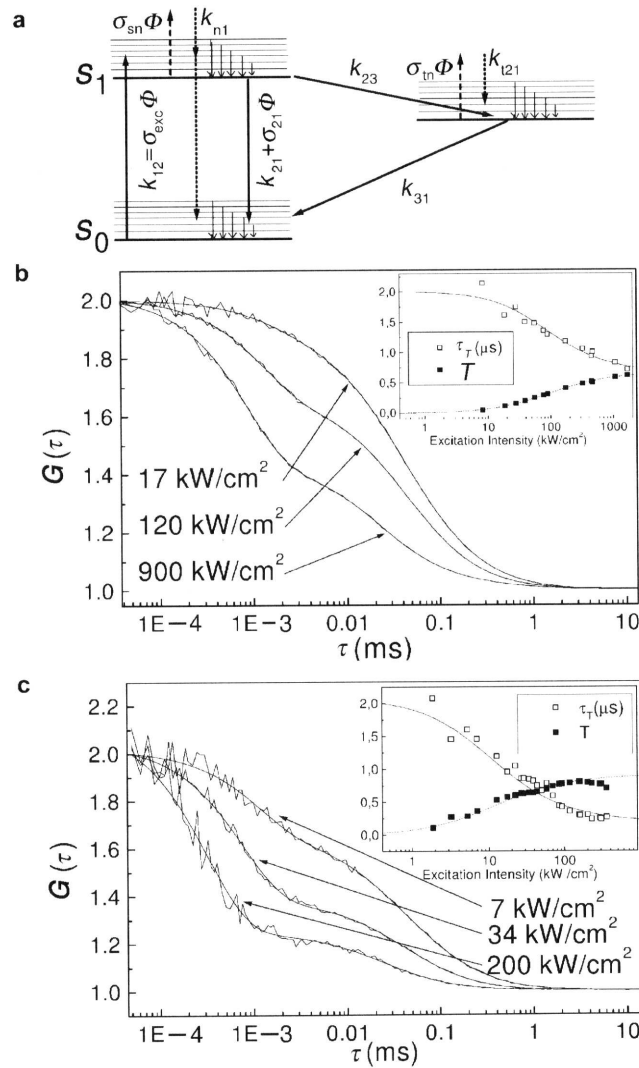


Abbildung 3.4: a) zeigt das Termschema der Fluorophore. b)+ c) zeigen die Abhängigkeit der AKF von der Laserleistung [2].

ergibt sich für  $T_{tri}$  folgende Beziehung zwischen den Übergangswahrscheinlichkeiten.

$$T_{tri} = \frac{k_{23}k_{12}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{31}k_{21}} = \frac{k_{23}}{k_{31}}S_{1eq} \quad (3.41)$$

Die Übergangswahrscheinlichkeiten der Singulett-Zustände können zu

$$S_{1eq} = \frac{k_{12}}{k_{21}}S_{0eq}; \quad S_{0eq} = \frac{k_{21}k_{31}}{k_{12}(k_{23} + k_{31}) + k_{21}k_{31}}$$

bestimmt werden. Die zweite Randbedingung berücksichtigt, daß sich alle Fluorophore zum Zeitpunkt  $t = 0$  im Grundzustand befinden. Die hier dargestellten Übergangswahrscheinlichkeiten beschreiben den Fall des Fließgleichgewichts der Zustände ( $t \rightarrow \infty$ ) und werden mit dem Index (*eq*) bezeichnet. Unter Berücksichtigung des Triplettanteils  $T_{tri}$  der Anregung der Fluorophore erhält man die modifizierte Autokorrelationsfunktion der

Form [26].

$$G_{DT}(\tau) = 1 + \frac{T(\tau)}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \sqrt{\frac{1}{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff}}}} \quad (3.42)$$

$$= T(\tau) \left( \frac{1}{T(\tau)} + G_D(\tau) - 1 \right) \quad (3.43)$$

$$\text{mit } T(\tau) = \frac{1 - T_{tri}(1 - \exp(-\tau/\tau_{tri}))}{(1 - T_{eq})}$$

Mit dieser Gleichung ist man nun in der Lage den Einfluß der Triplettzustände zu kalkulieren. Die Gleichung beschreibt die Diffusion im Detektionsvolumen unter der Annahme, daß kein Verlust von detektierbaren Teilchen durch Photobleichung eintritt. Diesem Phänomen widmet sich der nächste Abschnitt. Doch zuvor soll noch eine Zusammenstellung der benutzten Fluorophore, sowie deren wichtigster Eigenschaften in Tabelle (3.1) gezeigt werden.

Farbstoff	$\lambda_{Abs.} [nm]$	$\lambda_{Em.} [nm]$	QA	$\tau_{flour.} [ns]$
Ethidiumbromid (in DNA u. RNA)	510 – 518	595	0,01	1
<i>SYBRgreenII</i> <sup>®</sup> (an DNA u. RNA)	476 – 495	521	k.A.	3,5
Rhodamin 6G	532	560	k.A.	0,5
Fluoreszein	490 – 496	514 – 520	0,95	3,6
Cy3	550	565	k.A.	k.A.
Cy5	650	670	k.A.	k.A.
<i>SYBERorange</i> <sup>®</sup>	540	560	k.A.	5,5
<i>SYBERyellow</i> <sup>®</sup>	490	515	k.A.	7,3

Tabelle 3.1: Einige ausgewählte Fluorophore und deren wichtigste Eigenschaften: Absorptionswellenlänge  $\lambda_{Abs.}$ , Emissionswellenlänge  $\lambda_{Em.}$ , Quantenausbeute  $QA$ , Fluoreszenzlebensdauer  $\tau_{flour.}$ . Alle Angaben aus [5].

### 3.1.5 Photobleichung

Ein weiterer Prozeß, der bei einer Fluoreszenzmessung auftritt, ist die Photobleichung<sup>2</sup>. Dieser Prozeß verändert den fluoreszierenden Farbstoff so, daß er für einige Minuten oder auch für immer nicht mehr in der Lage ist, den die Fluoreszenz verursachenden Prozeß zu durchlaufen. Die Anregung des Moleküls findet zwar statt, aber die aufgenommene Energie wird nicht in Form von Photonen, sondern in Form von Phononen in bestimmte Schwingungs-Zustände abgegeben (innere Konversion). Der Übergang erfolgt somit strahlungslos. Ein weiterer Effekt, der zur Photobleichung führt, ist die Komplexbildung oder das Abgeben der aufgenommenen Energie durch Stöße mit anderen Molekülen. Ferner sind auch andere Mechanismen diskutiert, die für das Verschwinden der Fluoreszenz verantwortlich gemacht werden. In [27] wird das Problem ausführlicher beschrieben.

<sup>2</sup>In der englischsprachigen Literatur wird dieser Prozeß 'photobleaching' genannt.

Die lokale Konzentration der fluoreszierenden Moleküle wird also durch Photobleichung reduziert. Durch die freie Bewegung der Moleküle in der Probenflüssigkeit wird dieser Verlust zum Teil ausgeglichen. Die Photobleichung kann also als ein Pseudo-Gleichgewichtsprozeß erster Ordnung aufgefaßt werden mit einer Bleichrate  $k_b$  [28, 29]. Die Bleichrate ist im allgemeinen eine Funktion der Intensität des Lasers und somit auch eine Funktion des Ortes. Eine analytische Lösung zur Bestimmung der Bleichrate gibt es noch nicht. Ferner ist diese auch eine fluorophor-spezifische Eigenschaft. Theoretisch kann jeder Singulett- oder Triplettzustand Ausgangspunkt der photoinduzierten Bleichreaktion sein. Aber es wird allgemein angenommen, daß aufgrund der längeren Lebensdauer der Triplettzustände (typischerweise  $10^{-6}$ s) diese Ausgangszustände für photochemische Prozesse sind, da dadurch die Wahrscheinlichkeit mit anderen Molekülen zu reagieren sehr hoch ist. Mit diesen Annahmen und ausgehend von der Autokorrelationsfunktion für frei diffundierende Moleküle, bei der der Triplettanteil berücksichtigt wurde, siehe Gl. (3.42) sowie Gl. (3.10), läßt sich eine Autokorrelations-Bleichfunktion aufschreiben mit der Variablen  $B$ . Sie beschreibt den Teil der Moleküle, die sich nicht verändern.

$$G_{DTB}(\tau) = G_D(\tau)[1 - B(1 - T_{tri})[1 + \exp(-k_b\tau)] - T_{eq}(1 - \exp(-\tau/\tau_{tri}))] \quad (3.44)$$

Hierbei ist jedoch noch von einer gleichmäßigen Anregung von einem Teil  $B$  der angeregten Moleküle sowie einer konstanten Bleichwahrscheinlichkeit  $\tilde{B}_{Bl}$  im Detektionvolumen auszugehen [30].

### 3.1.6 Untergrundfluoreszenz

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten, die Detektion sowie die Entstehung der Fluoreszenz beschrieben wurde, sollen nun die Effekte aufgezeigt werden, die zur Untergrundfluoreszenz führen. Darunter ist der Teil der 'Fluoreszenz' zu verstehen, den man mißt, wenn in dem Probenvolumen keine Fluorophore eingebracht wurden. Die Untergrundstrahlung wird im wesentlichen durch gestreutes Laserlicht verursacht. Die Quellen der Streuung (Streuzentren) sind dabei meist die Moleküle der Pufferlösung<sup>3</sup>, aber auch die Grenzflächen des Probenhalters, in dem die Anregung stattfindet.

Die Steuprozesse lassen sich allgemein in elastische und unelastische Streuung aufteilen. Der Untergrund der elastischen Rayleigh-Streuung von Photonen an Molekülen oder Atomen kann weitgehend durch optische Filter unterdrückt werden, da das Fluoreszenzspektrum meist stark genug durch den Stokes-Effekt gegenüber der Laserwellenlänge  $\lambda_L$  verschoben ist. Bei der unelastischen Raman-Streuung wird das Molekül durch Absorption eines Photons in einen angeregten Zustand gebracht [31]. Das Raman-gestreuete Licht ist im Gegensatz zur Rayleigh-Streuung mit dem Primärlicht nicht kohärent, d.h. das Ramanspektrum ist dem Anregungslicht überlagert und somit nicht so einfach durch geeignete Filter zu diskriminieren. Dieses Problem läßt sich jedoch durch ein relativ kleines Detektionsvolumen und die damit erreichte Reduzierung der Streuzentren sowie eine endliche Meßzeit in Grenzen halten. Zur Reduktion des Streulichtes an den Grenzflächen des Probegefäßes ist das Detektionsvolumen ausreichend weit entfernt von der Oberfläche zu justieren (vgl. experimenteller Teil (5.1)). Ein weitere Reduktion des Untergrundes läßt

---

<sup>3</sup>Unter Pufferlösung versteht man eine spezielle Lösung, in der die zu untersuchenden Moleküle biologisch aktiv bleiben.

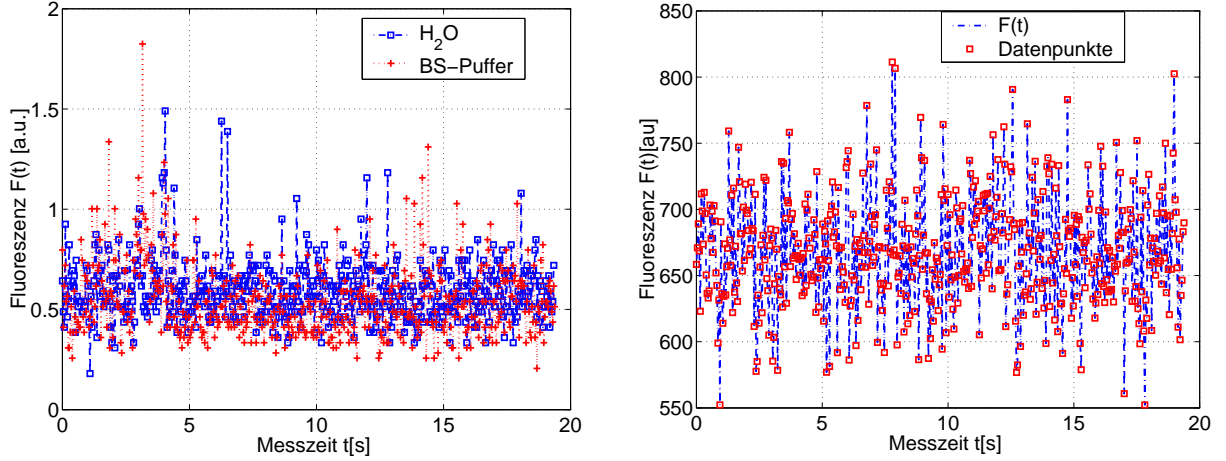


Abbildung 3.5: (links) Zählraten von Wasser ( $\overline{F}_{H_2O} = 0.64$  kHz) und Puffer ( $\overline{F}_P = 0.64$  kHz). (rechts) Zählrate eines Fluorophors ( $\overline{F}_{TMR} = 668 \pm 41$  kHz). Bei der Betrachtung der  $y$ -Achsenwerte wird deutlich, wie stark sich das Signal vom Untergrund abhebt. Hier kann ein Signal/Rausch-Verhältnis von  $n_{noise} \approx 600$  angegeben werden.

sich durch die Verringerung des Pinholedurchmessers erreichen. Jedoch hat diese Verringerung auch Einfluß auf die gemessene Diffusionszeit. Im Abschnitt (5.1) wird diese Untersuchung vorgestellt.

Um die meist in geringer Konzentrationen vorhandenen fluoreszierenden 'Verunreinigungen' der Pufferlösung zu deaktivieren kann der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Prozeß, der Photobleichung, ausgenutzt werden. Dies geschieht, indem der Puffer für einige Zeit einer hohen Lichtintensität ausgesetzt wird, um so die freien Fluorophorzentren zu zerstören. Ferner ist die Untergrundfluoreszenz nicht korreliert und erzeugt deutlich geringere Pulshöhen als das eigentliche Signal, so daß sie durch die Auswertung des Fluoreszenzsignals mittels einer Autokorrelationsfunktion [32] praktisch kaum Einfluß auf das Ergebnis hat, bzw. präzise kalkuliert (vgl. Gl. (3.45)) werden kann.

Die Abbildung (3.6) zeigt die Auswirkungen einer hohen bzw. niedrigen Fluktuation der Teilchen auf die Diffusionszeit. In den beiden Abbildungen (3.5) sind exemplarisch Meßsignale der Untergrundfluoreszenz (links) und des eigentlichen Signals (rechts) dargestellt. Jedoch muß diese Beeinflussung bei neuen Messungen bzw. neuer Grundeinstellung des Gerätes erneut überprüft werden, da die Bedingungen für die Vernachlässigung nicht zwangsläufig erfüllt sind. Aber dennoch läßt sich eine Autokorrelationsfunktion, welche die Untergrundfluoreszenz ( $Bg(t)$ ) mit berücksichtigt, angeben.

$$G_{Bg}(\tau) = \frac{\langle [F(t) + Bg(t)][F(t + \tau) + Bg(t + \tau)] \rangle}{\langle F(t) + Bg(t) \rangle^2} = \frac{\langle F(t) \rangle^2}{\langle F(t) + Bg(t) \rangle^2} \frac{\langle F(t)F(t + \tau) \rangle^2}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.45)$$

Diese Gleichung kann jedoch nur angewandt werden, wenn die Untergrundfluoreszenz nicht mit dem Fluoreszenzsignal  $F(t)$  und natürlich auch nicht mit sich selbst korreliert [33, 34, 35]. Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion nimmt mit dem Ansteigen der Untergrundfluoreszenz zu. Dies liefert eine scheinbar höhere Teilchenzahl im Detektionsvolumen, welche von den zusätzlich fluoreszierenden Teilchen  $N_{Bg}$  stammen [32]:

$$G_{Bg}(\tau = 0) = 1 + \frac{N_{F(t)}}{(N_{F(t)} + N_{Bg})^2} \quad (3.46)$$

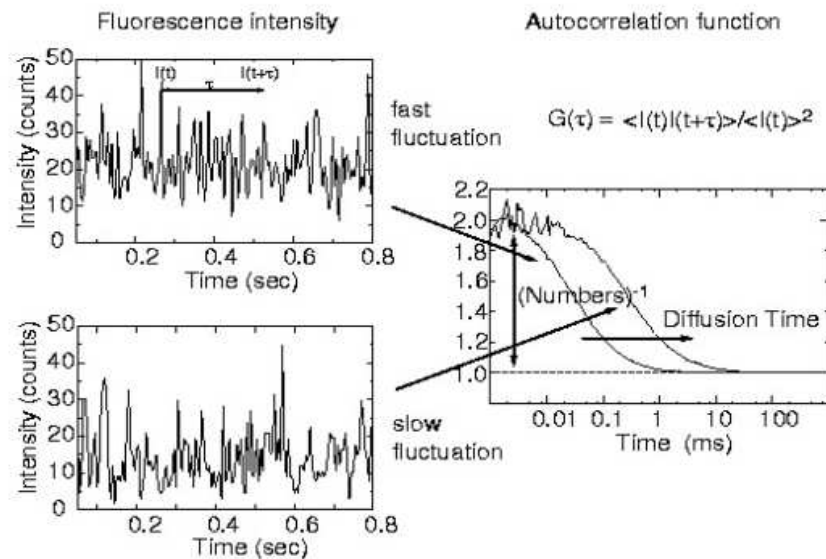


Abbildung 3.6: In der Abbildung ist exemplarisch die Auswirkung der Fluktuationsrate auf die Autokorrelationskurve gezeigt.

Mit dieser Gleichung kann abgeschätzt werden, daß bei einem Signal-zu-Untergrund Verhältnis von 1:50 der Beitrag des Untergrunds zur Autokorrelationsamplitude schon unter einem Prozent liegt. Ein solches Verhältnis ist bei nahezu allen Messungen mit genügend kleinem Detektionsvolumen erfüllt.

### 3.1.7 Das Viel-Teilchen System

In den bisher dargestellten Überlegungen wurden davon ausgegangen, daß sich im Probenvolumen nur eine Art von fluoreszierenden Molekülen befindet. Diese Reduktion ist jedoch nur ein Spezialfall, wie er bei der Justage der FCS-Anlage auftritt oder bei speziellen systematischen Studien. Bei der Betrachtung der Diffusionsbewegung unterschiedlicher voneinander unabhängiger Teilchensorten überlagern sich die einzelnen Korrelationsfunktionen. Die Autokorrelationsfunktion ist also die Summe der Einzelkorrelationsfunktionen. Betrachtet man ein System mit  $m$  unterscheidbaren Teilchen werden die Komponenten durch ihre Anteile  $R_i$ , gewichtet. Bei dieser Erweiterung der AKF (3.33) muß im allgemeinen auch eine unterschiedliche Quantenausbeute  $Q_i$  für die unterscheidbaren Teilchen angenommen werden. Dies geschieht mit dem Faktor  $\alpha_i^2$ .

$$G(\tau)_M = \frac{\sum_{i=1}^R \alpha_i^2 G_{3d_i}(\tau)}{\left[ \sum_{i=1}^R \alpha_i \langle N_i \rangle \right]^2} + G_\infty \quad (3.47)$$

mit

$$\alpha_i = Q_i/Q_1, \quad G_{3d_i}(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{-1} \left(1 + k \frac{\tau}{\tau_{D_i}}\right)^{-1/2}, \quad G_\infty = \lim_{\tau \rightarrow \infty} G_D(\tau) \rightarrow 1$$

Um die Gesamtpartikelzahl korrekt bestimmen zu können muß die Randbedingung  $1 = \sum_{i=1}^M R_i$  erfüllt werden. Mit dieser Gleichung ist man nun in der Lage Mehr-Teilchen-

Systeme zu analysieren, die verschiedene Diffusionszeiten aufweisen [36]. Der Term  $G_\infty$  wird im allgemeinen gleich Eins gesetzt, in [36] wird jedoch gezeigt wann dies nicht zulässig ist. Die hier vorgestellten Ergebnisse erfüllen jedoch die Bedingungen für die Ersetzung  $G_\infty = 1$ .

### 3.1.8 Konfokalen Mikroskopie

In diesem Abschnitt sollen die Grundlagen der konfokalen Mikroskopie dargestellt werden, sofern sie für das Verständnis der Meßmethode gebraucht werden. In erste Linie geht es hier um die Beschreibung der speziellen Abbildungseigenschaften der konfokalen Optik. Diese ist für die Ableitung beziehungsweise für die Entwicklung der Photonensammlungs-Funktion CEF entscheidend. Der Funktion selbst muß bei dieser Betrachtung ein entsprechend großer Platz eingeräumt werden, da sie die Anzahl der Photonen beschreibt, die wirklich nachgewiesen werden. Sie beschreibt also die 'Erzeugung' des Fluoreszenz-Signals wie es letztlich mit der Avalanche-Diode gemessen wird. Die Herleitung dieser Funktionen ist ein wesentlicher Aspekt in der Entwicklung der AKF für die konfokale Mikroskopie. Um nochmal die Bedingungen der Messung klar zu machen, sei auf die Abbildung (3.7) verwiesen.

Ein weitere wichtige Eigenschaft der konfokalen Mikroskopie bzw. der FCS wird durch die Lochblendenöffnung bestimmt. Sie bestimmt über die Größe des Durchmessers wesentlich die Größe des Detektionsvolumen. Ein ausführliche Darstellung, wie dies geschieht, soll jedoch hier nicht gegeben werden. Eine solche findet sich in [16].

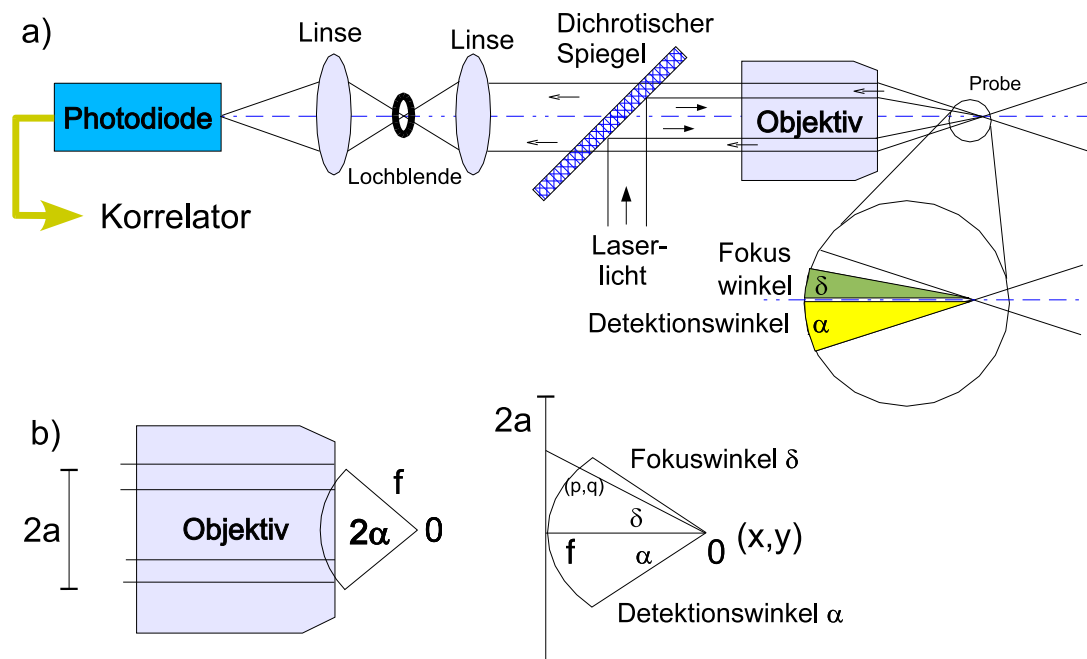


Abbildung 3.7: a) Das Diagramm zeigt die optischen Verhältnisse der konfokalen FCS-Messung. b) Schematische Darstellung eines idealisierten Objektivs. Das auf die Eintrittspupille mit dem Radius  $a$  treffende Licht wird durch das Objektiv auf ein virtuelles Kugelsegment mit Radius  $f$ , entsprechende der Brennweite projiziert. Der maximale Öffnungswinkel  $\alpha$  (Detektionswinkel) bestimmt bei gegebenem Proben-Brechungsindex  $n$  die numerische Apertur  $N.A. = n \cdot \sin \alpha$ .



In der Abbildung (3.7) sind die beide, im allgemeinen verschiedenen Winkel, der Fokusbereich  $\delta$  sowie der Detektionswinkel  $\alpha/2$ , dargestellt. Ziel der Darstellung ist die exakte Beschreibung des illuminierten und des detektierbaren Bereichs in der Probe. Das wesentliche Bauteil des konfokalen Mikroskops ist das spezielle Objektiv. Für dessen Verständnis sollen hier die Objektivparameter und ihre Zusammenhänge erläutert werden. Die Hauptkenngrößen eines Objektivs stellen die Vergrößerung  $M$ , die numerische Apertur  $N.A.$  sowie die Tubusbrennweite  $f_{tubus}$  dar. Weitere Größen sind der mikroskopseitige Aperturradius  $a$  (Eintrittspupille), der probenseitige maximale Öffnungswinkel  $\alpha$  und der Probenbrechungsindex  $n$  ( $N.A. = n \sin \alpha$ ). Die nominale Brennweite  $f = f_{tubus}/M$  ergibt sich bei einem konfokalen Objektiv aus der Tubusbrennweite und der Vergrößerung. Illuminiert man die Eintrittspupille des Objektivs mit einem Laserstrahl, der eine gaußförmige Intensitätsverteilung aufweist, so ergibt sich in der Fokusebene ( $z = 0$ ) ein Intensitätsprofil ( $I(r, z)$ ) welches lorentzförmig in  $z$ -Richtung und gaußförmig in radialer Richtung ist.

$$I(r, z) = \frac{2P_0}{\pi w_0^2} \exp\left(-\frac{2r^2}{w(z)^2}\right) \quad (3.48)$$

mit

$$w^2(z) = w_0^2 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w'}\right)^2$$

Der Strahltaillenradius  $w_0$  des Laserstrahls in der Fokusebene wird durch eine ideale Linse vom Strahltaillenradius vor der Linse mitbestimmt  $w'$  [14].

$$w_0 = \frac{f\lambda}{\pi w'} \quad (3.49)$$

Angemerkt sei hier, daß im allgemeinen  $w' \leq a/2$  gilt. Bei der Betrachtung einer realen Linse läßt sich folgende Abschätzung für  $w_0$  finden [14].

$$w_0 \approx \frac{f\lambda}{2a} \approx \frac{\lambda}{2N.A.} \quad (3.50)$$

In der Tabelle 3.1.8 sind die Kenngrößen für das Objektiv, C-APOCHROMAT 1.2W, von Zeiss zusammengefaßt.

Vergrößerung	N.A.	a [nm]	Tubusbrennweite $f_{tubus}$ [mm]	Brennweite f [mm]
40X	1.2	9.5	164.4	4.11
60X	1.2	6.0	156.6	2.61

Tabelle 3.2: Parameter des verwendeten Objektivs.

Mit diesen Angaben und der Anregungswellenlänge  $\lambda = 543$  nm, sowie der Abschätzung (Gl. 3.50) ergibt sich  $w_0 = 226.5$  nm. Die Gleichung (3.48) beschreibt mit welcher Intensität ein fluoreszierendes Molekül in der Probe am Ort  $(r, z)$  angeregt werden kann.

Nach dieser Betrachtung soll nun die Detektierbarkeit der emittierten Photonen am Ort  $(r, z)$  dargestellt werden. Dies geschieht in Anlehnung an [37, 38]. Hierfür muss zunächst die Punktausbreitungsfunktion<sup>4</sup>  $PSF(r', r, z)$  definiert werden.

$$PSF(r', r, z) := \frac{\text{circ}\left(\frac{r-r'}{R(z)}\right)}{\pi R^2(z)} \quad (3.51)$$

<sup>4</sup>'point spread funktion'

Sie beschreibt die radiale Intensitätsverteilung des emittierten Lichts in der Bildebene  $r'$ , das von einer Punktquelle vom Ort  $(r, z)$  herrührt. Die Scheibenflächenfunktion  $\text{circ}(r', r)$  ist abschnittsweise definiert:

$$\text{circ}\left(\frac{r - r'}{R(z)}\right) := \begin{cases} 1 & \text{für } |r - r'| \leq 1 \\ 0 & \text{für } |r - r'| > 1 \end{cases} \quad R^2(z) = R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha$$

$r = (x, y)$  : radiale Koordinate der Punktquelle

$r'$  : radiale Koordinate in der Bildebene

$\alpha$  : halber Öffnungswinkel des Objektivs ( $N.A. = n \sin \alpha$ )

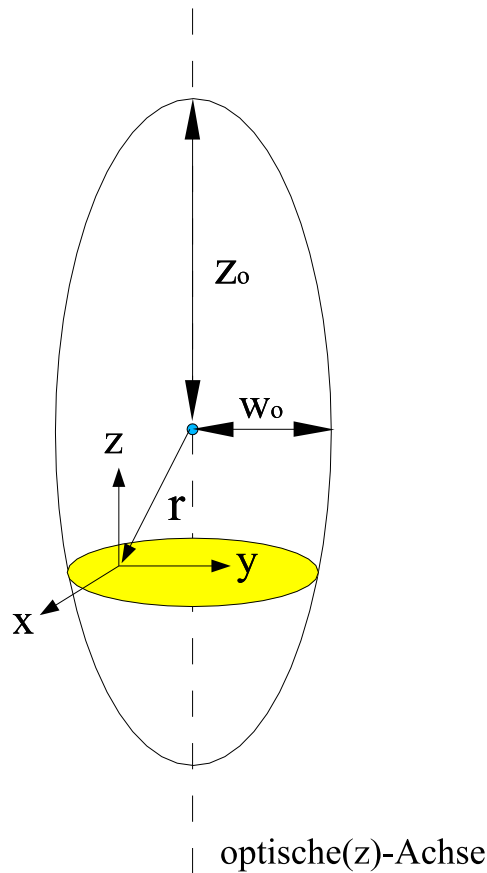


Abbildung 3.8: Geometrische Verhältnisse des Detektionsvolumens.  $Z_0$  und  $w_0$  sind die Radien, die den Rotationsellipsoid beschreiben. Ferner ist der Ortsvektor  $r$  und sein Koordinatensystem eingezeichnet. Desweiteren ist eine Scheibe zu sehen, die eine mögliche Fläche darstellt, von der Fluoreszenz ausgeht. Über diese Scheiben wird integriert, um das 'komplette' Fluoreszenzsignal zu erhalten.

Eine leuchtende Quelle am Ort  $(r', z)$  wird in der Fokusebene ( $z = 0$ ) als kleine Scheibe einer Größe, entsprechend dem optischen Auflösungsvermögen<sup>5</sup>  $R_0$  abgebildet. Für Punkte außerhalb der Fokusebene wird diese Scheibe aufgrund der Lorentzfunktion<sup>6</sup>  $R^2(z) =$

<sup>5</sup> $R_0 = 0.61\lambda/N.A.$  ist das Auflösungsvermögen des Objektivs, welches als der Radius des ersten dunklen Ringes des Airy Beugungsbildes definiert ist.

<sup>6</sup> $R(z)$  beschreibt den Radius des Bildpunktes einer Punktquelle im Abstand  $z$  von der Fokusebene.

Wellenlänge[nm]	Laserart	$w_0$ [nm]	k	$z_0$ [nm]	Volumen [fl]	Moleküleanzahl
543	(HeNe)	226.25	6.5	1470.625	0.3153	0.1899
514	(Ar)	214.16	6.5	1392.04	0.2675	0.1611
488	(Ar)	203.3	6.5	1321.645	0.2289	0.1379

Tabelle 3.3: Detektionsvolumina in Abhängigkeit der Wellenlänge.

$R_0^2 + z^2 \tan^2 \alpha$  vergrößert. Diese Funktion berücksichtigt somit die Unschärfe, die durch die Abbildung des Punktes auf die Fokusebene entsteht.

Nun haben wir mathematisch gesehen das Objektiv hinter uns gelassen und bewegen uns mit den Photonen auf die Lochblende<sup>7</sup> zu.

Um die Wirkung der Lochblende zu beschreiben, muß eine weitere Funktion  $T(r)$  definiert werden. Mit der konfokalen Geometrie kann die Lochblende mit dem Radius  $R_{hole}$  via Vergrößerungsfaktor  $M$  auf eine verkleinerte Scheibe mit dem Radius  $r_{hole} = R_{hole}/M$  projiziert werden. Diese Übertragung wird durch die Transmissionsfunktion  $T(r)$  beschrieben (3.52).

$$T(r) := \text{circ} \left( \frac{r}{r_{hole}} \right) = \begin{cases} 1 & \text{für } \frac{r}{r_{hole}} \leq 1 \\ 0 & \text{sonst} \end{cases} \quad (3.52)$$

Der Effekt der Lochblende in der Bildebene kann durch die Sammeleffizienzfunktion  $CEF(r, z)$  ('collection efficiency function') beschrieben werden. Diese Funktion ordnet jedem Punkt  $r$  im Probenvolumen eine integrierte Detektionseffizienz zu. Ein am Punkt  $r$  emittiertes Photon passiert mit einer zur  $CEF$  proportionalen Wahrscheinlichkeit das Objektiv und die Lochblende.

$$CEF(r, z) = \frac{\int_{\mathbb{R}} T(r) PSF(r', r, z) dr'}{\int_{\mathbb{R}} PSF(r', r, z) dr'} \quad (3.53)$$

Die Hauptwirkung der Lochblende ist die Begrenzung des Detektionsvolumen entlang der optischen Achse. Eine ausführlichere Darstellung der Wirkung der Lochblende auf die  $CEF$  findet sich in [16].

Kombiniert man nun die Anregbarkeit mit der Detektierbarkeit eines bestimmten Probenpunktes, definiert sich daraus die 'Molecule Detection Efficiency' MDE [39].

$$MDE(r, z) = CEF(r, z) \cdot I(r, z) \quad (3.54)$$

Mit dieser Kombination wird erst, bei geeigneter Wahl von Pinhole und Laseranregungsradius, eine idealisierte Intensitätsfunktion möglich, die eine Vereinfachung des Systems zuläßt

$$MDE(r, z) \approx W(\vec{r}')_{ideal} = I_0 \exp \left( -2 \frac{r^2}{w_0^2} \right) \exp \left( -2 \frac{z^2}{w_0^2} \right)$$

und erlaubt das Fokusvolumen durch eine dreidimensionale Gaußfunktion zu nähern.

<sup>7</sup>Die Lochblende wird meist auch als 'pinhole' bezeichnet. Sie reduziert die emittierte Fluoreszenz, die nicht ihren Ursprung in der Fokusebene hat.

## 3.2 Aufbau des Einzelmolekül-Spektroskops

Die Grundlage des Meßsystems stellt das kompakte Gerät Namens *ConfoCor*<sup>®</sup> dar, das in Zusammenarbeit von *Zeiss*<sup>8</sup> und *Evotec*<sup>9</sup> Mitte der neunziger Jahre entwickelt wurde. Alle in dieser Arbeit dargestellten FCS-Messungen wurden mit diesem System durchgeführt. Das System besteht aus zwei Lasern der Mikroskopeinheit, womit der *x-y*-Tisch, die optischen Filter und das Objektiv gemeint sind. Ferner aus einer Detektionseinheit, der Avalanchephotodiode, die in diesem Abschnitt noch genauer beschrieben wird, und einer Computerkarte, die die Photopulse registriert und weiterleitet. Um die Anlage zu steuern sowie die Daten aufnehmen und auswerten zu können, steht eine weitere Steuereinheit und ein Computer zur Verfügung. Die aufgenommenen Rohdaten werden in Echtzeit prozessiert, so daß die Messungen direkt verfolgt und grob bewertet werden können. Die Rohdaten sind die Fluoreszenzwerte, aus denen die Korrelationswerte generiert werden.

Der Abschnitt zeichnet den Weg der detektierten Photonen nach und beschreibt die einzelnen Komponenten.

### 3.2.1 Halbleiterdiode

Eine Photodiode (Halbleiterdiode bzw. p-n-Diode) entsteht durch den Kontakt eines p-Halbleiters mit einem n-Halbleiter. Die Produktion von Halbleitern geschieht jedoch nicht durch das Zusammenfügen von zwei unterschiedlichen Halbleitern, sondern durch das Dotieren von Halbleiterkristallen. Unter Dotierung versteht man das Einbringen von Fremd- atomen durch Diffusion in die Oberfläche (Plasmaverfahren) oder durch Implantation mittels eines Ionenstrahls.

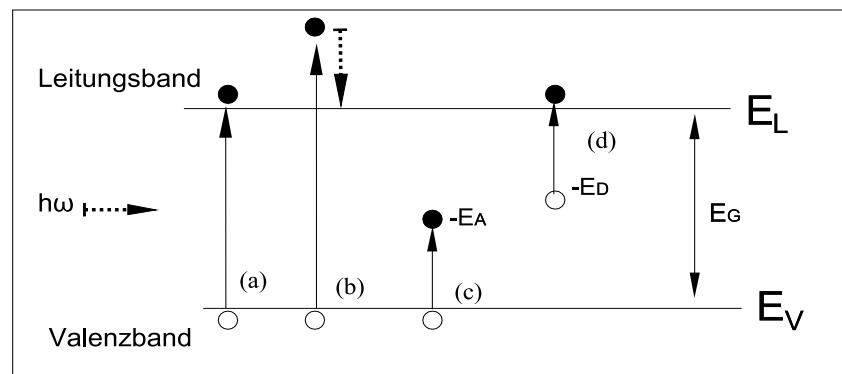


Abbildung 3.9: Optische Absorption für verschiedene Photonenenergien: a)  $h\nu = E_G$ , b)  $h\nu > E_G$ , c) und d)  $h\nu < E_G$ . Im Fall b) wird die überschüssige Energie  $E_G - h\nu$  als Wärme (Phononschwingungen) an das Kristallgitter abgegeben. Die Übergänge c) und d) sind möglich, da sie von einem Donatorniveau  $E_D$  bzw. von einem Akzeptorniveau  $E_A$  erfolgen.

Durch das Vorhandensein von Fremdatomen und anderen Störstellen ist die Fermi-Energie  $E_F$  des p-Halbleiters zum Valenzband und die des n-Halbleiters zum Leitungsband verschoben. Mit den beiden Forderungen (Randbedingungen), daß die Fermi-Energie eines p-n-Übergangs im thermodynamischen Gleichgewicht für beide Zonen gleich sein muß und

<sup>8</sup>Hersteller für optische Geräte

<sup>9</sup>Biotechnologiefirma in Hamburg

daß der Verlauf der Energieniveaus über beide Halbleiter kontinuierlich sein muß, ergibt sich eine Bandstruktur. In Abbildung (3.9) sind diese Energiebänder dargestellt.

Aufgrund des Konzentrationsunterschiedes an freien Ladungsträgern an den Kontaktstellen bildet sich ein Driftstrom und ein Diffusionsstrom aus. Durch diese Ströme bildet sich eine Raumladungszone, die keine freien Ladungsträger mehr enthält. Wird nun eine positive Spannung an der Kathode (n-Seite) gegenüber der Anode (p-Seite) angelegt, so breitet sich diese Zone (Depletionsbereich) über die ganze Diode aus (siehe Abb. 3.10).

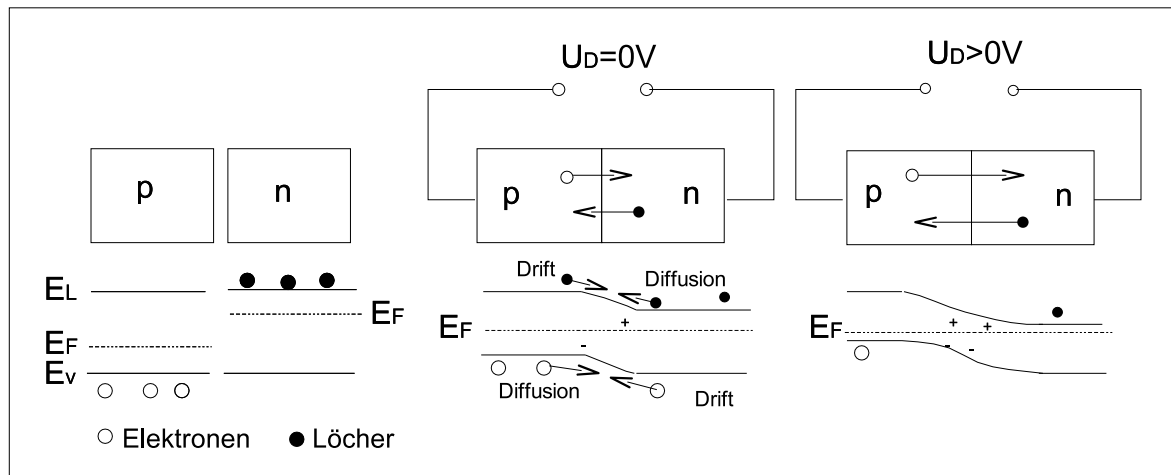


Abbildung 3.10: Energetische Verhältnisse im Halbleiter bei verschiedenen Betriebsarten unter Berücksichtigung der Randbedingungen.

Das Photosignal in einem solchen Halbleiter entsteht nun indem ein Photon in dem Depletionsbereich freie Ladungsträger entstehen läßt (Absorption), die aufgrund der angelegten Spannung zu den Elektroden wandern und somit einen Photostrom  $I_p$  induzieren. Ein wichtiges Maß dieser Halbleiterdioden ist die Quanteneffizienz  $QE$ , definiert in Gleichung (3.55). Darunter versteht man das Verhältnis von generierten freien Ladungsträgern  $n_e$  (Elektron-Loch-Paare) und einfallenden Photonen  $n_{ph}$ :

$$QE[\%] = 100 \frac{I_p/e}{P_{opt}/\hbar\nu} = 100 \frac{n_e}{n_{ph}} \quad (3.55)$$

mit der Einheitsladung  $e$ , der applizierten optischen Leistung  $P_{opt}$  und der Photonenenergie  $\hbar\nu$ . Die typische Quanteneffizienz einer Photodiode beträgt etwa 70% bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 530nm$  [40].

### 3.2.2 Avalanchephotodiode

Für den Nachweis von optischen Photonen<sup>10</sup> sind zwei Arten von Dioden von Bedeutung. Beide Dioden sind p-n-Dioden, wie sie oben beschrieben wurden, jedoch erhalten diese durch Veränderung ihrer Dotierungszone spezielle Eigenschaften. Zum einen gibt es PIN-Dioden bzw. Avalanche-Dioden (APD)<sup>11</sup>. Im folgenden wird nur der Avalanchetyp

<sup>10</sup>Unter optischen Photonen versteht man Photonen, deren Wellenlänge im sichtbaren Bereich liegt.

<sup>11</sup>APD steht für Avalanche Photo Diode. Diese Diodenart ist die gängigste Bauweise, die in der Einzelmolekül-Spektroskopie verwandt wird. In ihr wird ein Photon lawinenartig verstärkt, so daß ein meßbarer Strom entsteht.

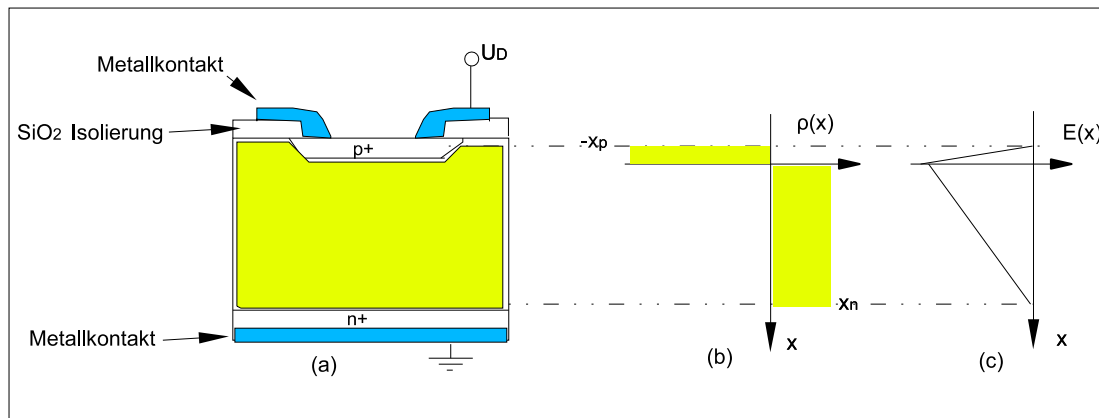


Abbildung 3.11: a) der reale Aufbau einer  $p$ - $n$ -Photodiode, b) Raumladungsdichteverteilung  $\rho(x)$  in der depletierten Photodiode, c) Verlauf der elektrischen Feldstärke  $E(x)$

beschrieben, wie er in der Einzelmolekül-Spektroskopie Anwendung findet. In der Abbildung (3.11) ist der prinzipielle Photodiodenaufbau gezeigt. Der Aufbau einer Avalanche-Diode lässt sich in einen Absorptionsbereich und in einen Verstärkungsbereich einteilen. Wie bei einer normalen Diode werden im Absorptionsbereich die photonengenerierten Elektron-Loch-Paare separiert und durch das Driftfeld zu den Elektroden hin beschleunigt. Treten nun die Elektronen in den Verstärkungsbereich ein, werden sie durch das dort extrem hohe elektrische Feld so stark beschleunigt, daß ihre kinetische Energie ausreicht durch Stoßionisation weitere Elektron-Loch-Paare zu erzeugen, welche ebenfalls sehr stark beschleunigt werden und weitere Elektron-Loch-Paare bilden. Dieser Prozeß wiederholt sich in dieser Schicht immer wieder, so daß eine Elektronenlawine ausgelöst wird. Diese erzeugt ein meßbares verstärktes Signal. Durch das Auftreffen eines einzigen Photons auf die Diode kann somit ein meßbares Strom-Signal nachgewiesen werden. Die obere Grenze der linearen Verstärkung von typisch  $10^3$  wird durch die Durchbruchspannung bestimmt. Ab der Durchbruchspannung arbeitet die Diode im sogenannten Geiger-Modus. Das Ausgangssignal ist dann unabhängig von der Anzahl der generierten Photonen. In dieser Betriebsart erreicht man eine Verstärkung von  $10^5 - 10^6$ . Dieser Modus ermöglicht die Detektion einzelner Photonen und zeichnet sich durch eine sehr gute Zeitauflösung aus. Die QE erreicht Werte von etwa 70 – 95% [41]. Diese Eigenschaften machen die Avalanche-Dioden zum idealen Instrument für den Nachweis von Einzelphotonen, wie sie in der Fluoreszenzspektroskopie meist gebraucht werden.

### 3.2.3 Laser als Lichtquelle

Die Fluorophore werden mit einem Laser angeregt. Bei dem hier verwendeten Aufbau stehen mittels eines Strahlteilers zwei Laser zur Verfügung, jedoch nicht gleichzeitig. Eine sogenannte Kreuzkorrelationsmessung kann mit diesem Aufbau nicht durchgeführt werden. Es kann also nur mit einer Anregungswellenlänge gearbeitet werden. Der *HeNe*-Laser emittiert bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 543.5$  nm. Der *Ar*-Ionen-Laser hat nicht nur eine diskrete Emissionswellenlänge wie der *HeNe*-Laser, sondern emittiert bei zwei Wellenlängen  $\lambda_1 = 488$  nm und  $\lambda_2 = 514.5$  nm, wobei 70% der Energie auf die 488 nm-Linie fallen bei einer Gesamtleistung von etwa  $P = 200$  mW. Mindestens 95% des Lichts werden im

$TEM_{00}^{12}$  Mode abgestrahlt. Auch der  $HeNe$ -Laser emittiert im  $TEM_{00}$  Mode bei einer Leistung von  $P = 0.4$  mW mit einem Strahldurchmesser von  $d = 0.48$  mm einer Divergenz von etwa  $\delta_{div} = 1.3$  mrad.

Der  $HeNe$ -Laser wird für Experimente eingesetzt, die Rhodamin G6 bzw. Thetramethylrhodamin als Fluorophore benutzen, da hier die Wellenlänge des Lasers dem Maximum der Absorptionskurve am nächsten kommt. Direkt nach dem Strahlaustritt passiert das Laserlicht den Abschwächungsbereich. Hier kann mit verschiedenen Abschwächgläsern die benötigte Lichtleistung reduziert werden. Dies muß vor der Einkopplung des Lichts in den Lichtleiter geschehen, da diese Abschwächung Einfluß auf die Strahlage hat. Die Einkopplung des Lichts in den Lichtleiter wird mit einem Koppler (KINEFLEX) der Firma *POINT-SOURCE*<sup>®</sup> durchgeführt, der eine Effizienz von über 65% erreicht. Die optimale Einkopplung des Lichts ist für das Experiment von entscheidender Bedeutung, da sie signifikanten Einfluß auf die Strahlqualität und die Strahlleistung am Ort der Messung hat.

### 3.2.4 Filtercharakterisierung

Zur Auswahl der entsprechenden Wellenlänge werden Filterschieber verwendet. Diese sind mit verschiedenen Filtern bestückt, die entsprechend der Stellung des Schiebers, bestimmte Messungsmodi zulassen. Die Wahl des Filterschiebers hängt von dem verwendeten Fluorophore und vom verwendeten Laser, der für das Experiment benutzt wird, ab.

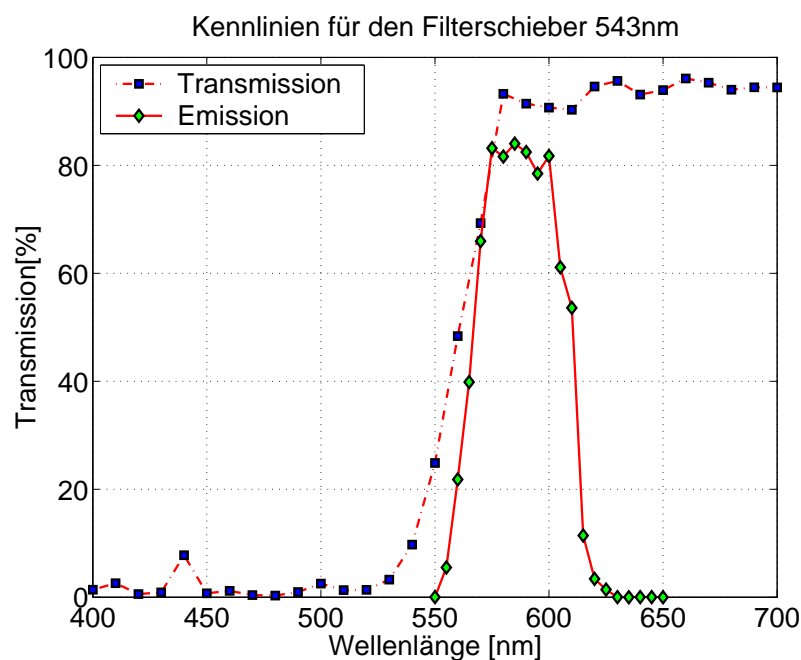


Abbildung 3.12: Wellenlängenabhängige Auftragung der Transmission in [%] für den verwendeten Rhodaminfilter. Der dichroitische Strahlteiler wurden für die Transmissionsmessung unter dem realen Winkel ( $45^\circ$ ) vermessen.

<sup>12</sup>TEM steht für Transverse Electromagnetic Modes. Diese bezeichnet die Form des Laserdurchmessers. Der Index 00 beschreibt eine kreisrunde Strahlform.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich der Filterschieber für Rhodamin R6 verwandt. Dieser Filtersatz besteht aus:

- einem Anregungsfilter,
- einem Strahlteiler, der optimiert ist auf die Trennung der  $HeNe$ -Linie von der Emissionslinie von Rhodamine R6 ( $\lambda = 560 \text{ nm}$ ),
- und einem Sperrfilter.

In der Abbildung (3.12) ist Transmission in [%] über die Wellenlänge, für die verschiedenen Filterschieber, aufgetragen. Der benötigte Filter wird über die Position des Filterschiebers bestimmt.

### 3.2.5 Objektive

Das *ConfoCor* wurde mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur (N.A.) ausgestattet. Das Objektiv ist eines der wesentlichen Bauteile des Mikroskops und stellt somit auch einen der zentralen Bauteile für die in dieser Arbeit vorgestellten FCS-Messungen dar.

In dem hier beschriebenen Aufbau wurde das Objektiv, C-APOCHROMAT 40X/1.2 W Korr  $\infty/0.14-0.18$  der Firma ZEISS<sup>®</sup>, benutzt.



Abbildung 3.13: Hier ist links das Objektiv und rechts der Leistungsmesser gezeigt.

Die hohe numerische Apertur ( $N.A. = 1.2$ ) ermöglicht die Korrektur der Probenhalterdicke, die in einem Bereich von  $d = 0.14-0.18 \text{ mm}$  variiert werden kann. Durch die Meßanordnung kann die Probenhalterdicke mit dem Mikroskop mit einer Genauigkeit von einem  $\mu\text{m}$  bestimmt werden und durch das Objektiv korrigiert werden. In der Abbildung (3.13) ist das obige Objektiv sowie der Leistungsmesser gezeigt. Die Leistungsmessung wird vor jeder Messung durchgeführt, um zum einen den Laser auf seine Funktion bzw. auf seine maximale Leistung zu überprüfen. Dies liefert Daten über den Zustand des Lasers, womit Fehlmessungen, die auf den Laserzustand zurückzuführen sind, vermieden werden. Die Kenntnis der Laserleistung ist jedoch auch entscheidend für die anschließenden Messungen, um beispielsweise Abschätzungen über das zu erwartende Signal machen zu können



sowie den Triplettanteil des verwendeten Fluorophors zu kalkulieren. Ein weiterer Punkt bei der die aktuelle Laserleistung von Bedeutung ist, ist die Wahl der Abschächer, die eventuell benötigt werden.

### 3.2.6 *x-y*-Probentisch

Um mit diesem Aufbau auch mehrere Proben automatisiert messen zu können, wurde ein *x-y*-Tisch über dem Objektiv angeordnet, der den Probenhalter positioniert. Hier hat man sich für das Bewegen der Proben entschieden und nicht für das Bewegen von optischen Komponenten. Dieser Ansatz wurde gewählt, da ein starrer optischer Aufbau die Qualität der Messungen deutlich steigert. Eine hochgenaue Positionierung der Proben ist hier nicht von Nöten, da die Proben im allgemeinen eine Ausdehnung im mm-Bereich haben.



Abbildung 3.14: Der Probentisch des Meßaufbaus. Mit den seitlich angebrachten Schrittmotoren, ist er  $\mu\text{m}$ -genau zu positionieren. In der Mitte sind die quadratischen Probenkammern zu sehen.

Der Probentisch (siehe Abbildung 3.14) wird mit Schrittmotoren bewegt, die eine Schrittweite von einem  $\mu\text{m}$  bei einem maximalen Weg von 25 mm ermöglichen. Die Steuerung der Motoren wird über eine PC-Karte MCU-6000 der Firma *Rösch&Walter*<sup>13</sup> vorgenommen. Über diese Karte können 96 Positionen angesteuert und die dort befindlichen Proben in einer festgelegten Reihenfolge gemessen werden. Diese Teilautomation der Messungen ist nicht nur wichtig für eine Weiterentwicklung zu einer vollständig automatisierten Anordnung, sondern trägt auch dazu bei, die äußeren Meßbedingungen, soweit es möglich ist, konstant zu halten. Insbesondere stellen Erschütterungen, wie das Betreten

<sup>13</sup>Weitere Details zu dieser Karte findet man unter [www.rw-gmbh.de](http://www.rw-gmbh.de).

des Meßraums oder Temperaturschwankungen von wenigen °C eine Störung der Messung dar.

### 3.2.7 Datenerfassung und Auswertung

Die von der Avalancheodiode erzeugten Pulse werden während der Messung mit der digitalen Korrelatorkarte ALV-5000E der Firma *ALV GmbH* registriert und dargestellt. Diese Computersteckkarte berechnet die normierte Korrelationsfunktion der registrierten Intensitätssignale und ebenso die Zählrate, 'online' während der Messung. Die Karte verfügt über 288 Kanäle, die als 'Multiple-Tau-Digital-Korrelator' eine quasilogarithmische Zeitverteilung aufweisen. Der Registerbereich ist in mehrere lineare Zeitbereiche eingeteilt und verfügt über einen der möglichen Zahl der Ereignisse angepaßten Speicherbereich von 8 Bit für die kleinen Kanalzeiten ab  $t = 125$  ns bis 32 Bit für Zeiten ab  $t = 409$   $\mu$ s. Die maximale Meßzeit, die der Hardware-Korrelator bearbeiten kann, kann einige Stunden umfassen. Bei den hier beschriebenen Messungen wird diese Meßzeit nicht erreicht. Als Standardeinstellung für die Meßaufzeichnung wird die Karte in einen *SINGLE-AUTO-MODE* versetzt.

Ferner kann der Korrelator vor jeder Messung einer automatischen Skalierung unterzogen werden. Diese Einstellung wird jedoch nur für recht hohe Farbstoffkonzentrationen ( $> pM$ ) eingesetzt. Hier wird die Karte mit einer festen Einstellung von  $f = 4.98$  MHz betrieben. Die typische Meßzeit liegt zwischen 10 – 100 Sekunden, da bei den verwendeten Farbstoffkonzentrationen von einem Partikel pro Meßvolumen eine Vielzahl von Fokusedurchtritten erfolgen würde und die Korrelationskurve daher nicht mehr weiter verbessert würde.

Mit der beigelegten Software lassen sich die Diffusions- und Tripletzeiten sowie deren Schwankungen berechnen und darstellen. Jedoch ist diese Software (Version: ALV-5000/E V2.0orp; Version 1.0.12 20/09/1996) für eine wirkliche Auswertung unbrauchbar, da nur einzelne Messungen analysiert werden können. Für eine praktikable Meßdatenanalyse wurde verschiedene eigene Programme entwickelt.

### 3.3 DNA, Proteine und ihre Wechselwirkungen

Dieses Kapitel beschreibt die Eigenschaften der DNA und die hier untersuchten Proteine. Desweiteren wird die Bedeutung dieser Molekülklassen in der Molekularbiologie sowie in der Medizin dargestellt. Dies ist einer der Gründe dafür, daß die Forschung, gerade in den letzten Jahren, auf diesem Gebiet sehr stark zunahm. Denn ohne das reibungslose und funktionelle Zusammenspiel dieser immens variablen Moleküle ist ein geregelter Ablauf des Stoffwechsels in Lebewesen nicht möglich. Die Forschung in diesem Bereich verbindet immer mehr verschiedene Methoden und auch Meßprinzipien aus anderen Naturwissenschaften, insbesondere der Physik, um diesem enormen Anstieg der Fragestellungen aus den Biowissenschaften Rechnung zu tragen.

#### 3.3.1 DNA

Die DNA (Desoxyribonucleinacid) ist ein Polymer aus Desoxyribonukleotiden. Ein Nukleotid besteht aus einer stickstoffhaltigen Base, einem Zucker (Desoxyribose) und einer Phosphatgruppe. Die genetische Information ist durch die Abfolge der Basen des Polymers gegeben. Der Zucker sowie die Phosphatgruppe erfüllen im wesentlichen strukturelle Aufgaben.

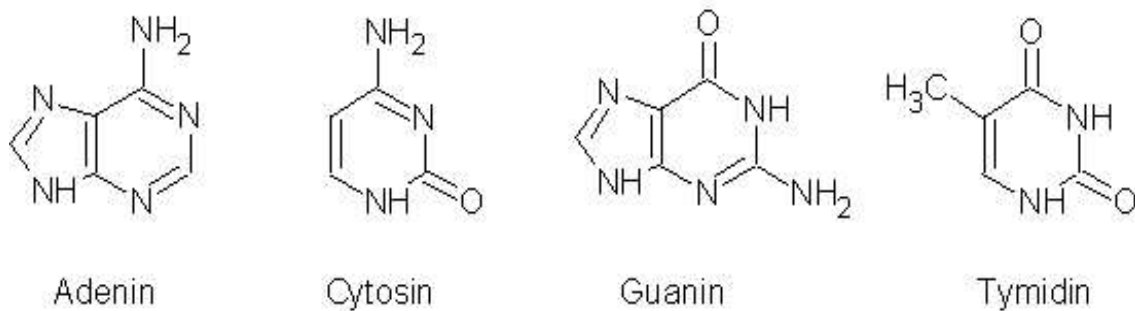


Abbildung 3.15: Die vier Grundbausteine der DNA.

Die Basen lassen sich in Purine – bestehend aus einem fünf und einem sechs Kohlenstoffring – Adenin (A) und Guanin (G) und in Pyrimidine (einem sechs Kohlenstoffring), Thymin (T) und Cytosin (C) unterteilen. Die komplementären Basen A und T bzw. C und G können sich via 2 bzw. 3 Wasserstoffbrückenbindungen paaren und bilden so die Grundlagen für doppelsträngige DNA.

Die Aneinanderreihung von Basenpaaren (siehe Abbildung 3.16) ist aus sterischen Gründen nur in Form einer entgegenlaufenden Doppelhelix möglich, welche in Abbildung (3.17) dargestellt ist. Die dreidimensionale Struktur der DNA wurde im Jahre 1953 von *Watson* und *Crick* aus Röntgenstrukturdaten abgeleitet. Mittlerweile kennt man drei verschiedene DNA Arten, deren Eigenschaften in der folgenden Tabelle (3.4) zusammengefaßt sind. Das sich immer wiederholende Elemente des DNA-Moleküls, die Desoxyriboseeinheit bildet das 'Rückgrat' der Struktur. Die Verbindung dieser Elemente wird über die 3'-Hydroxylgruppe des Zuckers mit der 5'-Hydroxylgruppe des nächsten Zuckers über eine Phosphordiesterbrücke hergestellt. Diese Eigenschaften machen es möglich, daß ein einzelnes Molekül leicht mehrere Millionen Basenpaare enthalten kann. Die DNA Doppelhelix ist jedoch keine starre Struktur, vielmehr führen Neigungsänderungen oder Verdrehungen

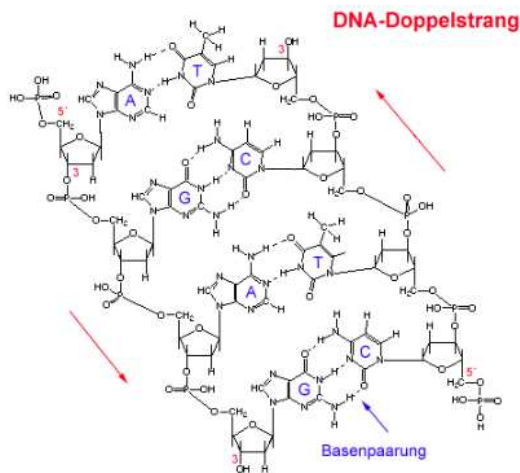


Abbildung 3.16: Basenpaarung der Purine und Pyrimidine.

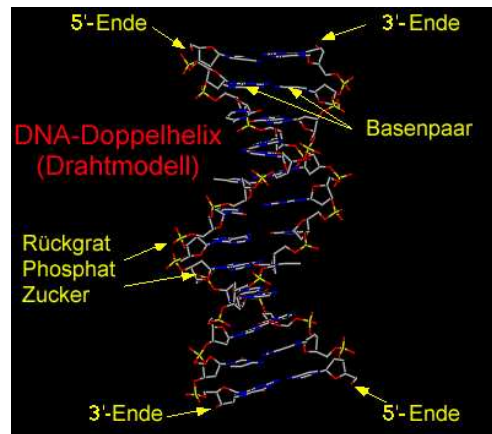


Abbildung 3.17: DNA-Helix.

	DNA-Helixtyp		
	A	B	C (bzw. Z)
Händigkeit	rechts	rechts	links
Ganghöhe [nm]	2.46	3.32	4.56
Durchmesser [nm]	2.37	2.37	2.37
Drehung [°/bp]	33.6	35.9 ± 4.2	-60
# bp pro Drehung	11	10.4	12

Tabelle 3.4: Alle Angaben aus [6].

zwischen den Basenpaaren zu sequenzabhängigen lokalen Veränderungen ihrer Symmetrie. Diese Symmetrieänderungen dienen sequenzerkennenden Proteinen zur Erkennung ihrer Zielsequenz. Ferner hängen derartige Konformationsänderungen auch vom Hydrationsgrad, dem pH-Wert der Umgebung sowie dem Kondensationsgrad der DNA und weiteren Faktoren ab.

### 3.3.2 Proteine

Wie schon in den einleitenden Worten des Kapitels angesprochen spielen die Proteine in nahezu allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Die Bereiche ihrer Aktivität reichen von der enzymatischen Katalyse der meisten Reaktionen in biologischen Organismen über Transport- und Steuerprozesse, koordinierte Bewegungen, mechanische Stützfunktion, Immunabwehr, Erzeugung und Übertragung von Nervenimpulsen bis zur Kontrolle von Wachstum und Differenzierung von Zellen. Wie ist eine derartige Diversität verstehbar? Der Schlüssel liegt in der Abfolge der einzelnen Bausteine sowie der Möglichkeiten der räumlichen Anordnung dieser Abfolge.

Proteine sind Ketten von Aminosäuren (20 verschiedene, vgl. Anhang A.4), die einzelnen Aminosäuren sind durch eine Carbonsäureamid-Bindung zwischen den  $\alpha$ -Carboxy- und  $\alpha$ -Amino-Gruppen, einer sogenannten Peptidbindung (kurz CO-NH), miteinander verknüpft (siehe Abb. (3.18)).

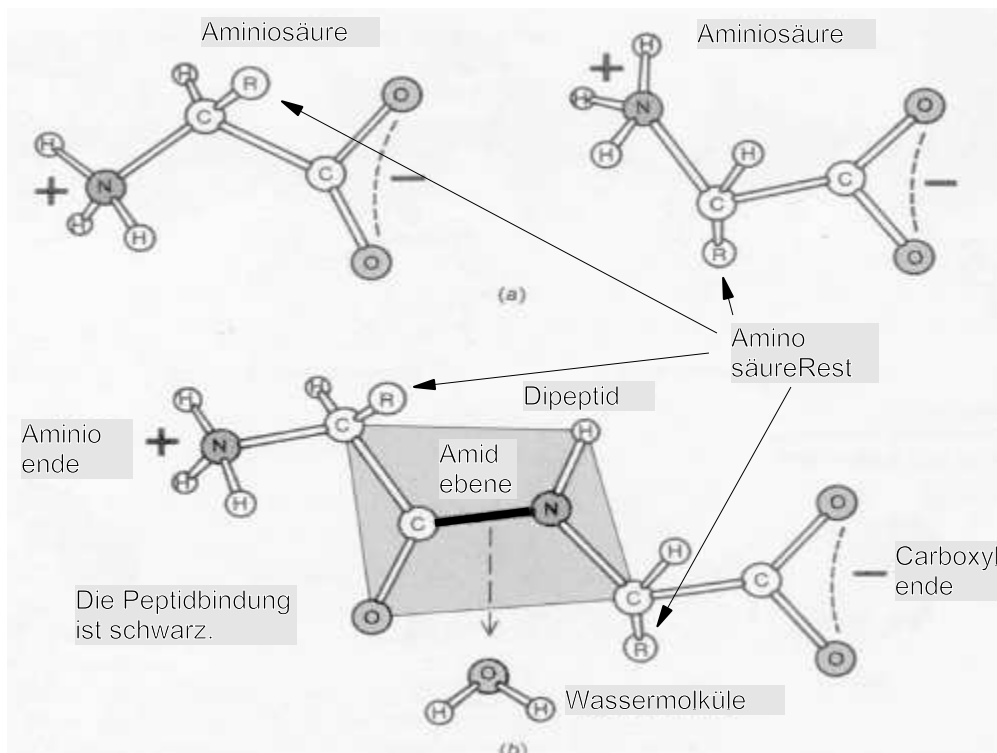


Abbildung 3.18: Oben ist die Aminosäuregrundstruktur (a) zu sehen. Die mit  $R$  gekennzeichnete Kreise symbolisieren den Rest der AS, wodurch sie ihre Diversität erhalten. Unten ist die Verbindung zweier AS – die Peptidbindungsbildung (b) – unter Abgabe eines Wassermoleküls gezeigt.

Diese so erhaltene linearen Ketten bildet mittels Wasserstoffbrückenbindungen einen weiteren Grad der Organisation: die Sekundärstrukturen. Es werden vier Strukturen unterschieden, die rechts- bzw. linkshändige  $\alpha$ -Helix, das  $\beta$ -Faltblatt sowie die  $\beta$ -Schleife. Diese Strukturen ordnen sich aufgrund der elektromagnetischen Wechselwirkungen bzw. durch Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zwischen den Aminosäuren ,weiter an. Sie bilden komplexe dreidimensionale Untereinheiten von höherstrukturierten Proteinen oder stellen schon fertige Proteine dar.

Hier nun einige Beispiele. Die Histone zählen zu den Strukturproteinen sie setzen sich aus fünf gleichen Untereinheiten zusammen und sind ein wesentlicher Bestandteil bei der Organisation der DNA im Chromatin. Ein weiteres lebensnotwendige Protein ist das Hämoglobin der Erythrocyten<sup>14</sup>, das für den Transport von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Lunge und dem Gewebe verantwortlich ist, welches sich aus vier (hier gleichen) Untereinheiten zusammensetzt. Aber neben diesen bekannteren Proteinen stellt die Molekül-Klasse der Hormone zum Teil Proteine dar. Hormone werden auf unterschiedlichen Zeitskalen der Entwicklung eines Lebewesens verschieden stark exprimiert, sind somit in unterschiedlichen Konzentration im Körper präsent. Dieser Wechsel der Konzentrationen von Hormonen beeinflusst so, wesentlich die Entwicklung von Lebewesen bzw.

<sup>14</sup>Das rote Blutkörperchen (Erythrocytus, Erythrocyt) ist eine Zelle, die ihre Organellen komplett verloren hat. Sie hat die Form einer bikonkaven Scheibe mit einem maximalen Durchmesser von  $7.2 \mu\text{m}$  bis  $7.8 \mu\text{m}$ . Im Zentrum der Scheibe beträgt die Dicke eines roten Blutkörperchens ca.  $0.8 \mu\text{m}$ , am Rand etwa  $2.6 \mu\text{m}$ . Die Oberfläche eines Erythrocyten beträgt ca.  $135 \mu\text{m}^2$ ; das Volumen ('mean corpuscular volume' = MCV)  $82$  bis  $96 \mu\text{m}^3$  (Femtoliter).

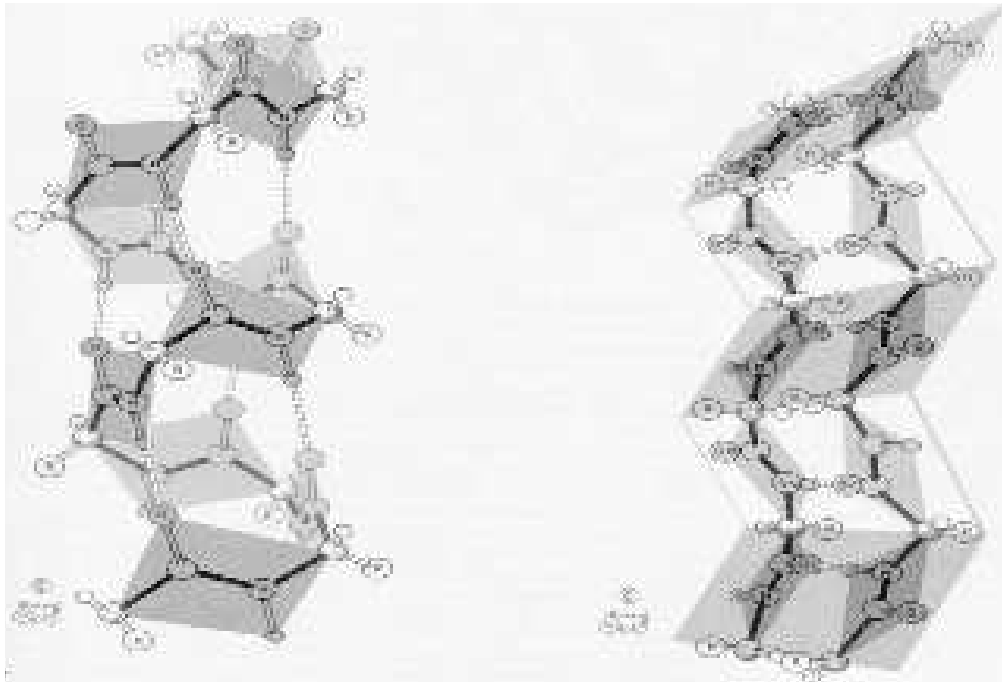


Abbildung 3.19: (links)  $\alpha$ -Helix, (rechts) antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die Wasserstoffbindungen sind gestrichelt, die Peptidbindung durchgezogen dargestellt.

bestimmt den augenblicklichen Zustand dieser.

Viele der Hormone sind klassische Steuer- und Regelungsmoleküle. Aufgrund der großen Bedeutung, die sie für die Entwicklung spielen und des großen Einflusses auf eine Vielzahl von Krankheiten, insbesondere Krebs, rückt deren Funktionalität immer weiter in den Fokus der Forschung.

In dieser Arbeit wird der Oestrogenrezeptor untersucht bzw. seine Bindungseigenschaften zur DNA mit den schon näher beschriebenen Methoden der FCS und EMSA (vgl. Abschnitt 3.3.4). Der Vergleich der ermittelten Bindungsdaten soll zeigen, daß man mit beiden Systemen zu den gleichen Ergebnissen kommt und diese auch durch Literaturwerte Bestätigung finden. Jedoch können die mit der FCS Technologie erzielten Ergebnisse deutlich schneller und automatisierter gewonnen werden als mit dem herkömmlichen EMSA-System. Somit kann diese deutlich sensitivere und proteinschonendere Methode für weitere Untersuchungen dieser wichtigen Molekülklasse neue Impulse für die funktionelle Erforschung der Proteine liefern. Ferner wird einmal mehr gezeigt wie wichtig es ist, daß die Wissenschaften sich weiter annähern damit man das Potential, das gerade sogenannte 'fachfremde' Forschungsbereiche, bieten nutzen kann, um neue Sichtweisen zu entwickeln.

In der Abbildung 3.20 ist die Bindung zwischen der DNA und dem Oestrogenrezeptor gezeigt. Diese Visualisierung wurde aufgrund von Kristallstrukturdaten möglich. Diese Bindung des Rezeptors ist eine wichtige Bedingung für die Regulation des eigentlichen Gens. In der nächsten Abbildung 3.21 ist nun der volle Verlauf der Aktivierung der Transkription des Gens gezeigt. Dies verdeutlicht nocheinmal die Komplexität in der man sich befindet. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem oberen Bild (Abb. 3.20), also den DNA-Bindungseigenschaften des Rezeptors. Eine vollständige Beschreibung der Bindungszustände zwischen den einzelnen Molekülen des Transkriptionsapparates (Abb. 3.21) sowie die Bindung zur DNA würden den Rahmen hier bei weitem sprengen.

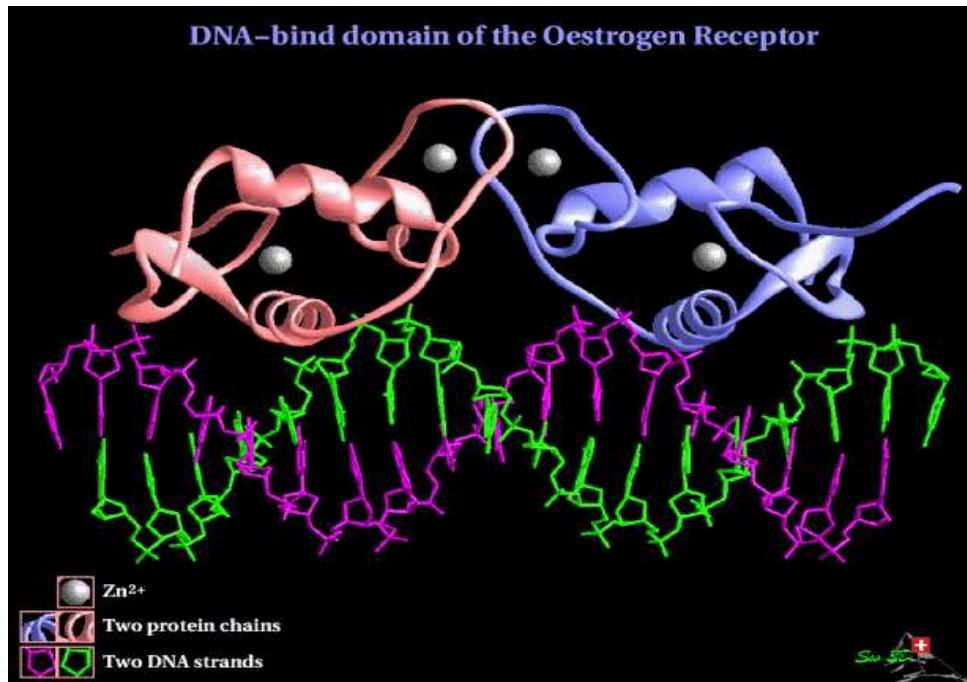


Abbildung 3.20: DNA-Strang mit den gebundenen Oestrogenrezeptoren. In Abbildung 3.21 ist dieser Teilaspekt schematisch gezeigt.

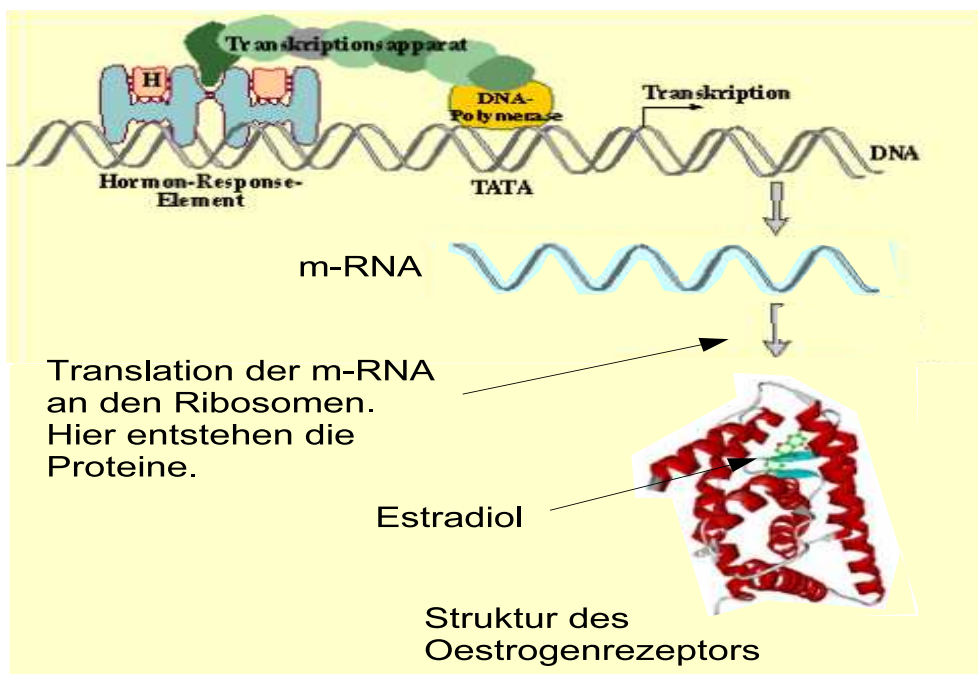


Abbildung 3.21: Übersicht des Einflusses der Hormon-DNA-Bindung auf den kompletten Transkriptionsapparat.

### 3.3.3 Hormone

Eine weitere wichtige Klasse von Molekülen stellen Hormone dar. Hormone sind organische Verbindungen, die die Regulation und Koordination des Stoffwechselgeschehens bewirken. Sie wirken dabei - in äußerst niedriger Konzentration - als chemische Signalstoffe und nehmen als solche an den Reaktionen, die sie anregen, selbst nicht teil. Hormone werden jedoch auch wie folgt definiert: Hormone sind chemische Signalstoffe (Botenstoffe), die in Drüsen gebildet, vom Blutstrom im Körper verteilt, von Zielzellen mit Rezeptoren erkannt werden, die sie zu spezifischen Reaktionen veranlassen. Hormone sind nicht artspezifisch, aber wirkungsspezifisch.

Bildungs- und Wirkort können weit voneinander entfernt liegen<sup>15</sup>. Bei physiologischem Bedarf werden sie in dafür spezialisierten Zellen bzw. Drüsen synthetisiert und in freier Form oder an ein Trägerprotein gebunden meist im Blut, aber auch in Lymphe oder interzellulärer Flüssigkeit zu ihren Zielorganen transportiert. In den dortigen Zellen erfolgt die Bindung an ein hormonspezifisches Rezeptorprotein. Um eine Übersättigung des Organismus mit Hormonen zu verhindern, werden sie nach relativ kurzer Zeit aus der Blutbahn entfernt und durch Abbau inaktiviert. Der gesamte Hormonstoffwechsel unterliegt einer gut abgestimmten Regulation, wobei durch entsprechende Rückkopplungsmechanismen hormonale Regelkreise entstehen.

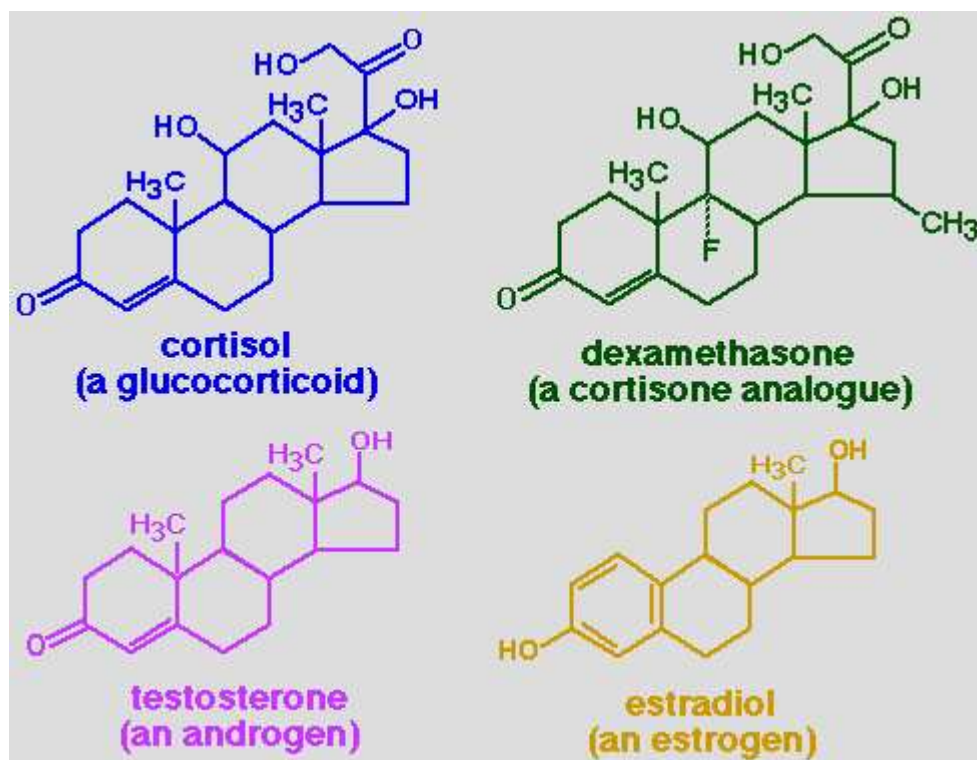


Abbildung 3.22: Verschiedene Steroidhormone. Durch den Vergleich der verschiedenen Steroidhormone tritt die gemeinsame Grundstruktur deutlich hervor.

<sup>15</sup>Hormonen werden auch noch nach ihrem Wirk- und Entstehungsort unterteilt. Endokrine Hormone werden in ganz bestimmten Drüsen produziert und über den Blutkreislauf verteilt. Parakrine Hormone werden über kurze Distanzen und normalerweise über einen genau definierten Weg - z.B. vom Hypothalamus zur Hypophyse - ausgeschüttet. Autokrine Hormone wirken durch Sekretion der Zellen untereinander.



Die Steroidhormone bilden eine umfangreiche Gruppe von Hormonen, die nur im tierischen (und menschlichen) Organismus vorkommen. Hierzu gehören neben den Kortikoiden auch die Sexualhormone. Bildungsort der Steroidhormone sind vor allem die Nebennierenrinde (hauptsächlich Kortikoide) und die Keimdrüsen (Sexualhormone). Die Biosynthese erfolgt aus Cholesterin. Künstlich strukturmodifizierte Steroidhormone haben als Ovulationshemmer ('Pille') und als Anabolika sowie als entzündungshemmende oder antiallergische Arzneimittel (Kortikoide) pharmakologische Bedeutung.

Kortikoide, auch Kortikosteroide oder Nebennierenrindenhormone genannt, sind lebenswichtige Steroidhormone mit Wirkung auf den Kohlenhydrat- und Mineralstoffwechsel. Von den etwa 50 bekannten Kortikoiden sind beim Menschen Kortisol, Kortikosteron und Kortison sowie Aldosteron und Kortexon die wichtigsten Vertreter. Je nach Überwiegen der biologischen Hauptwirkung unterscheidet man Gluco- von Mineralokortikoiden. Strukturmodifizierte Kortikoide wie Prednisolon, Prednison, und Dexamethason werden wegen ihrer hohen entzündungshemmenden und antiallergischen Wirkung bei Rheuma, Asthma, Allergien, Entzündungen u.ä. als Arzneimittel eingesetzt.

Die Sexualhormone gehören nach ihrer Struktur zur Gruppe der Steroidhormone. Bildungsort sind hauptsächlich die Keimdrüsen. Primär steuern sie die Entwicklung und Funktion der Sexualorgane. Allerdings werden beim Menschen auch einige nicht geschlechtsspezifische Organe bzw. Körperfunktionen durch Sexualhormone beeinflusst. Man unterscheidet Androgene, Oestrogene und Gestagene. Den vorgestellten fünf Hauptklassen der

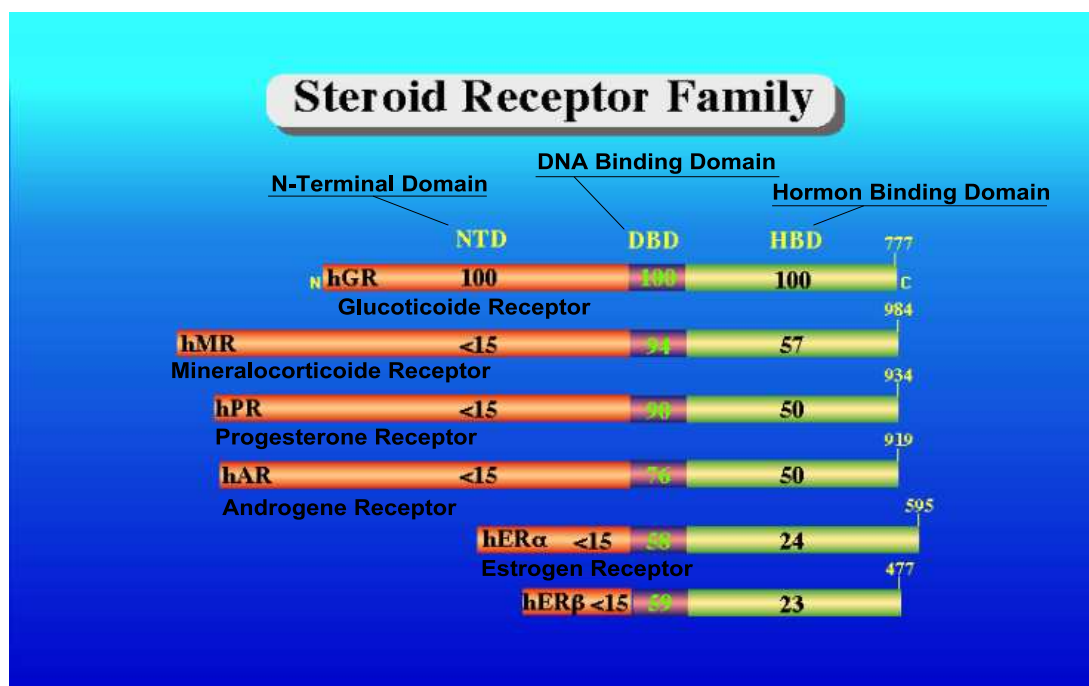


Abbildung 3.23: Vergleich verschiedener Steroidrezeptor. Die Zahlen geben den Grad der Homologie der unterschiedlichen Bereiche (Domain) in Prozent an. Hier ist eine zum Teil sehr hohe Homologie zu erkennen. Jeder Eckpunkt repräsentiert ein Kohlenstoffatom.

Steroidhormone, Gluco-, Mineralokortikoide sowie Gestagen, Oestrogen und Androgene ist ihr chemisches Grundgerüst gemeinsam. Es besteht aus drei sechser Kohlenstoffringen und einem fünfer Kohlenstoffring, wie in Abbildung 3.22 gezeigt. Die einzelnen Steroidhor-

mone entstehen durch die Modifikation von Cholesterin in dem bestimmte Seitenketten an das Grundgerüst synthetisiert werden bzw. das Gerüst selbst leicht verändert wird.

Die Wirkung der Hormone wird über ihre hochspezifischen Rezeptoren vermittelt. Diese wiederum binden, teilweise direkt oder im Komplex mit anderen Molekülen, an die DNA. Ein solcher DNA-bindender Komplex wird auch als Transkriptionsapparat bezeichnet. Die Konzentrationen von Hormonen wie seiner Rezeptoren nehmen direkt Einfluß auf die Transkription der DNA, da sie den Effekt der DNA-Bindung mitbestimmen.

Das große Interesse an den Bindungsbedingungen, Bindungssequenzen sowie an den Eigenschaften der Bindung von Steroidrezeptoren an ihren Zielmolekülen, spiegelt nicht zuletzt die immense Bedeutung dieser Moleküle für den Menschen wieder.

In der Abbildung (3.23) ist ein Vergleich der verschiedenen (wichtigsten) Steroidrezeptoren auf Aminosäure-Ebene gezeigt [42]. Auffallend ist der hohe Homologiegrad im DNA-Bindungs-Bereich (DBD). Doch neben diesen wichtigen vergleichenden Studien, die im Bereich der Bioinformatik anzusiedeln sind, sind auch direkte Studien am Rezeptor, sprich am Molekül entscheidend, um den komplexen Wirkmechanismus zu verstehen. Die Abbildung (3.24) zeigt den komplexen Mechanismus der Rezeptoraktivierung.

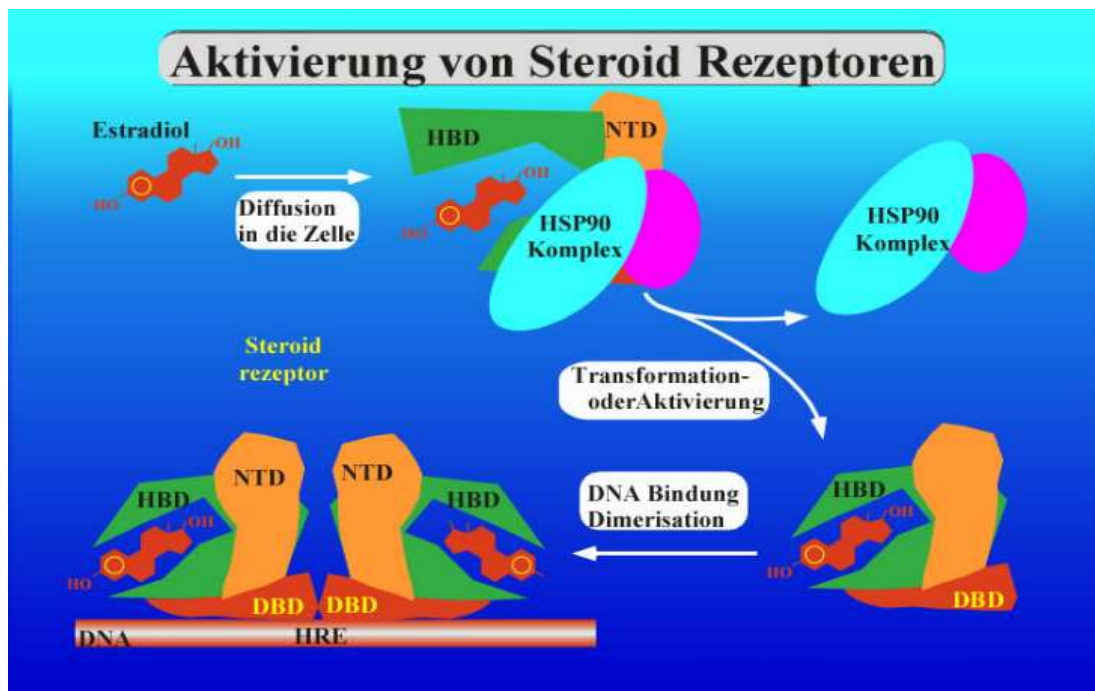


Abbildung 3.24: Ablaufschema der Aktivierung des Oestrogen-Rezeptors. Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung: HBD Hormonbindungsdomäne, HSP-Komplex Heat Shock Protein Komplex, NTD N-Terminale Domäne, DBD DNA Bindung Domäne, HRE (hormone response element) Hormonrezeptor Bindungsmotiv.

Wie schon angedeutet ist das Interesse an der Aufklärung dieser Prozesse von Krankheitsbildern bestimmt, die eine große Zahl von Menschen betrifft. Zwei der bekanntesten Erscheinungsbilder sind das Mammakarzinom und das Prostatakarzinom, die mit dem Oestrogenrezeptor bzw. mit dem Androgenrezeptor assoziiert sind. Studien zeigen, daß etwa 10% alle Frauen und etwa 40% aller Männer über 65 Jahren die angegebenen Krankheiten ausbilden. Die beiden angegebenen Krebsarten zählen mit zu den häufigsten Krebsarten bei Frauen und Männer insgesamt. Bei Männern macht Prostatakrebs etwa 18% bei Frauen

macht der Brustkrebs etwa 25% der Krebsarte insgesamt aus. Die Zahlen wurden vom Robert Koch Institut (Hamburg) im Januar 2003 veröffentlicht [43]. Mit diesen Zahlen im Hintergrund wird auch das große Interesse an der Wechselwirkung von DNA und Molekülen deutlich.

### 3.3.4 Nachweismethoden von DNA und Proteinen

Nachdem die DNA sowie Proteine und ihre Eigenschaften behandelt wurden, werden jetzt die Methoden beschrieben. Zuerst wird das gängige Nachweisverfahren für DNA-Sequenzen dargestellt. Es wird hauptsächlich zum Nachweis von längeren DNA-Fragmenten benutzt, die bei Klonierungsschritten zur deren Evaluierung entstehen. Daran anschließend werden die Protein-Nachweismethoden beleuchtet. Man braucht sie, um die via Klonierung und Expression erzeugten Proteine zu untersuchen. Ferner kann mit einer weiteren 'Protein-Methode' geprüft werden, um welche es sich handelt. Ebenso kann die biologisch funktionelle Aktivität und ihre Bindungsstärke charakterisiert werden. Letztlich wird noch der Weg von der DNA-Sequenz zum fertigen Protein dargestellt werden. Dieser wird sowohl mit Bakterien sowie mit Zellen beschriftet.

#### DNA-Nachweis

Mit Nachweis ist hier nicht der prinzipielle Nachweis gemeint, sondern man möchte die Länge<sup>16</sup> der DNA-Sequenz bestimmen. Geladene Moleküle lassen sich mit Hilfe der Gel-elektrophorese trennen. Dieses Verfahren nutzt die unterschiedlichen Mobilitäten eines geladenen Moleküls im elektrischen Feld, die im allgemeinen von Größe und Gesamtladung des Moleküls abhängen. Die Vernetzungsdichte und die chemischen Eigenschaften des Gels bestimmen im wesentlichen den Trennbereich.

DNA ist ein Molekül dessen Monomereinheiten je eine Ladungseinheit trägt. Die Gesamtladung eines DNA-Moleküls ist also proportional zur Länge der DNA. Aufgrund des Zusammenhangs, daß die relative Mobilität linear vom Logarithmus des Molekulargewicht abhängt, können Nukleinsäuren gut nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden [44]. Diese Trennung führt man mit Agarosegelen<sup>17</sup> durch. Die Agarosegel-Elektrophorese [45] ist die einfachste Methode, DNA-Fragmente von 0.5 kb → 30kb Länge voneinander zu trennen und ihre Länge zu bestimmen. Für ringförmige DNA (Plasmide) sowie superhelikale DNA gilt der einfache Zusammenhang zwischen Mobilität und Molekulargewicht nicht, da hier die Konformation der DNA noch einen entscheidenden Einfluß auf die Mobilität nimmt.

Vorgehensweise: Man löst die Agarose in Elektrophoresepuffer durch Erhitzen, gießt die heiße Flüssigkeit in einer sogenannte Gelkammer. Durch das Hinzufügen eines Kamms erhält man nach dem Erkalten ein Gel mit Kammern. Diese Kammern bzw. Taschen – wie sie auch genannt werden – nehmen die DNA-Proben auf. Nun kann eine elektrische Spannung zwischen Gelanfang und Gelende angelegt werden. Das entstehende elektrische Feld sorgt für das Einwandern der Proben in das Gel. Ferner gibt man dem DNA-Längenstandard noch Bromphenol sowie Xylencyanol bei, um den Gellauf zu kontrollieren. Diese Verbin-

---

<sup>16</sup>Die Länge von DNA-Molekülen wird über die Anzahl der Basen angegeben. Man findet folgende Bezeichnungen: bp (basepair) für 1 → 1000 Basen, kb(kilobasen)usw. .

<sup>17</sup>Agarose, ein Polysaccharid aus Meeresalgen, ist ein lineares Polymer aus alternierend 1,3-verknüpften  $\beta$ -D-Galactopyranose- und 1,4-verknüpften 3,6-Anhydro- $\alpha$ -L-Galactopyranose-Resten.

Agarosekonzentration		0.5%	0.7%	1.0%	1.2%	1.5%	2.0%
Bromphenolblau	[bp]	1000	700	300	200	120	<100
Xylencyanol	[kb]	10	6	3	1.5	1	0.8
Trennbereich	[kb]	1-30	0.8-12	0.5-7.0	0.4-6.0	0.2-3.0	0.1-2.0

Tabelle 3.5: Agarosekonzentrationen und die jeweiligen Fragmentlängen-Trennbereiche. Ferner sind die sichtbaren Farbstoffe Bromphenol und Xylencyanol mit ihren bp-Äquivalenten aufgeführt.

dungen erzeugen jeweils eine blaue Bande, die einer bestimmten DNA-Länge entsprechen (vgl. Tabelle (3.5)). In der Tabelle (3.5) sind die DNA-Trennbereiche und Agarosekonzentrationen einander zugeordnet. Nach einer typischen Laufdauer von einer halben Stunde kann das Gel gefärbt werden, um die DNA-Fragmente sichtbar zu machen. Das Färben der DNA kann sehr effizient mit dem DNA-interkalierenden Ethidiumbromid (**Achtung:** mutagen und toxisch!!) gemacht werden oder mit ungiftigeren Fluoreszenzfarbstoffen, wie SYBERGOLD. Mit einem UV-Licht Tisch können nun die angefärbten DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Eine ausführlichere Darstellung, dieser Vorgehensweise findet sich in [46, 47].

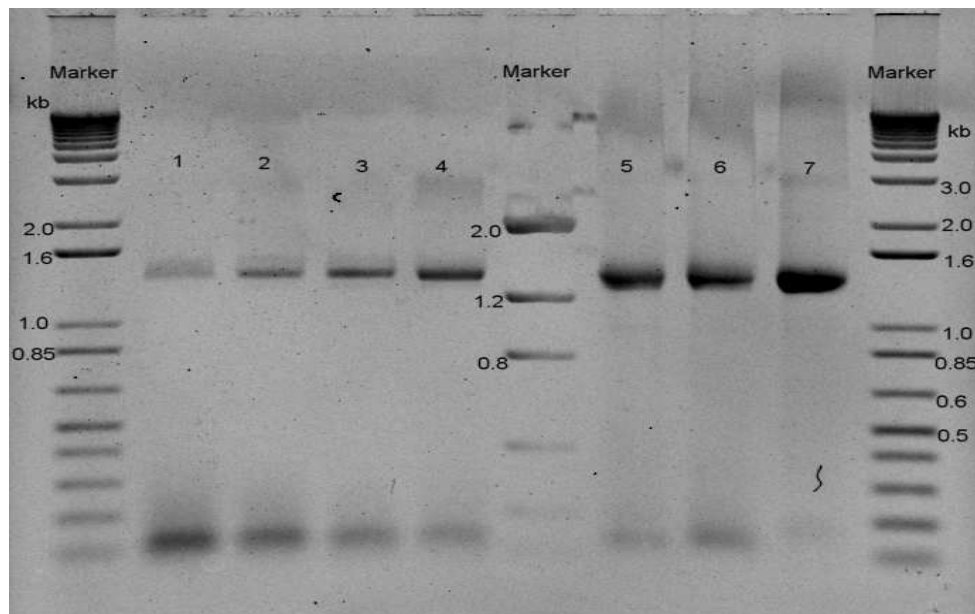


Abbildung 3.25: Nachweis von DNA Fragmenten, die via PCR erzeugt wurden. Die Banden der Proben (1-7) zeigen das Ergebnis einer Optimierungs-PCR. Die Probe 7 zeigt die stärkste Bande.

Zur Trennung sehr kurzen DNA-Fragmente (Oligomere 1 – 100 bp) verwendet man Polyacrylamidgele, deren Vernetzungsdichte deutlich höher als bei Agarosegelen ist und somit ein größere Trennkapazität im unteren Molekulargewichtsbereich hat. Polyacrylamidgele werden nachfolgend besprochen.

### Protein-Nachweis (SDS-PAGE)

Zum Nachweis von Proteinen existieren eine Vielzahl von unterschiedlichen Methoden. Im folgenden soll jedoch nur die eindimensionale Trennung via Gel-Elektrophorese be-

handelt werden. Für die Analyse von Proteinen verwendetet man Gele, bestehend aus polymerisiertem und vernetztem Acrylamid. Die Größe, der sich während der Polymerisation bildenden Poren, hängt von der Konzentration des monomeren Acrylamid und dem Quervernetzer N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid, ab. Die Grundeinheiten (Aminosäuren) von Proteinen sind im Gegensatz zu denen der DNA-Moleküle nicht einheitlich geladen, so daß die Trennung im elektrischen Feld sowohl nach der Ladung als auch nach der Größe erfolgt (native Polyacrylamidgele). Um Proteine nur nach ihrer Länge trennen zu können werden dies denaturiert, so daß sie als lineare Kette ihrer Grundeinheiten vorliegen. Die Trennung wird mit denaturierenden Polyacrylamidgele durchgeführt. Im folgenden, wird die Denaturierung sowie die Trennung der Proteinen, beschrieben.

Die Proteine werden unter Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol und Natrium-Dodecylsulfat (SDS) auf 95 °C (5 min.) erhitzt. Wobei die vorhandenen Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen<sup>18</sup> reduziert werden und mittels des anionischen Detergenz SDS alle Wechselwirkungen, die zu höheren Strukturen des Protein führen, aufgehoben werden. Das Protein wird also komplett entfaltet und von einer SDS-Mizelle eingeschlossen. Die Länge und die Ladung der Mizelle ist proportional zur Länge des Proteins und damit zum Molekulargewicht. Nach dieser Prozedur können die Proteine nach ihrer Länge in einem Gel analysiert werden. Durch die Zugabe eines Größenstandards (vgl. A.4.2) zum Gellauf, kann das Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins bestimmt werden. In Abbildung (3.26) ist der Ablauf der Trennung eines Proteingemischs mit der Lamli-Methode gezeigt.

Im allgemeinen verwendet man, das diskontinuierliche Lämli-System [48, 49], welches aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht. Ein Gel nach Lamli besteht aus

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	8%	10%	12%	
dest. Wasser	4.6 ml	4.0 ml	3.3 ml	2.1 ml
Acrylamid 30%	2.7 ml	3.3 ml	4.0 ml	0.5 ml
1.5 M Tris(pH=8.8)	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	0.38 1.0M Tris(pH=6.8)
SDS(10%)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	30 $\mu$ l
APS	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l	30 $\mu$ l
TEMED <sup>19</sup>	6 $\mu$ l	4 $\mu$ l	4 $\mu$ l	3 $\mu$ l
Trennbereich [kDa]	40-200	20-180	13-150	

Tabelle 3.6: Die Mengenangaben in der Tabelle beziehen sich auf einen 10ml Ansatz beim Trenngel, dieser reicht für ein Gel und einen 3 ml Ansatz für ein Sammelgel, was für drei Gele reicht. SDS steht für Natrium-Dodecylsulfat und APS für Ammoniumpersulfat.

dem etwa 1 cm langen Sammelgel und dem etwa 5.5 cm langen Trenngel, die Breite beträgt 10 cm. In dieser Arbeit werden nur Protein-Gele nach Lamli benutzt, die sich je nach Proteingrößennachweisbereich aus anderen Mischungsverhältnissen der Komponenten zusammensetzen. Die Tabelle (3.6) faßt die Komponentenverhältnisse für diese Gele zusammen.

Um die Proteine sichtbar zu machen wird das Gel nach dem Gellauf, in einer Coomassie-Blau-Lösung etwa 10 min inkubiert. Der Farbstoff (Coomassie) bindet unspezifisch an die Proteine im Gel [50]. Nach einem anschließenden Waschschrift, der den überschüssigen

<sup>18</sup>Cystein, ist eine der 20 Aminosäuren aus denen Proteine aufgebaut sind.

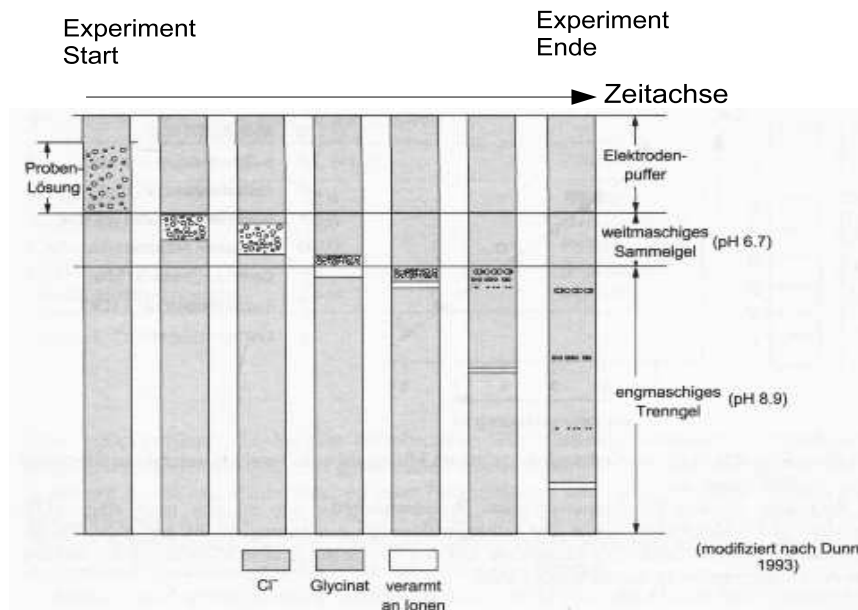


Abbildung 3.26: Zeitlicher Verlauf der Proteinwanderung bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese. Die Abbildung ist aus [3, 4] und wurde modifiziert.

Farbstoff wieder entfernt, werden die Proteine als blaue Banden sichtbar. Somit ist eine Größenbestimmung möglich. Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß die Empfindlichkeit (untere Grenze 200–400 ng pro Bande) dieser Methode eher mäßig ist, jedoch meist für eine erste Abschätzung reicht.

Nach der Elektrophorese gibt es prinzipiell zwei weitere Vorgehensweisen, deren Wahl davon abhängt welche Frage man an das Experiment stellt. Zum einen die Sichtbarmachung aller getrennten Proteine, wie zu vor beschrieben. Zu anderen den Nachweis bestimmter Proteine mit dem Westernblot-Verfahren. Um spezifisch ein Protein nachzuweisen, müssen die Proteine des Gels mittels Westernblot [51] auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden, um anschließend mit einem entsprechenden Antikörper markiert zu werden. Trägt der Antikörper ein Fluorophore, so kann das Protein mit einem Laser-Scanner direkt detektiert werden. Wird ein peroxidase konjugierter Antikörper benutzt wird das spezielle photographische Verfahren, ECL<sup>20</sup>, zur Sichtbarmachung der Protein-Antikörperbanden benutzt. Ein weiteres Proteindetektionsverfahren stellt die Silberfärbung<sup>21</sup> dar. Details zu Protein-Nachweis-Verfahren finden sich in der Standardliteratur [47]. Im Anhang (A.4.1) werden, die Details des in dieser Arbeit angewandten Protein-Nachweisverfahrens, beschrieben.

In der Abbildung (3.27) ist der Aufbau der Apparatur gezeigt sowie der Kamm und die verschiedenen Gelbereiche. Nun soll auch nicht unerwähnt bleiben, daß es noch einige andere Methoden zum Nachweis von Proteinen gibt, die hier jedoch nicht weiter behandelt werden können. In dem wunderschön geschriebenen Buch [52] sind sie jedoch zu finden.

<sup>20</sup>ECL ist ein Detektionsverfahren, das die Chemolumineszenz der Lösung nutzt, in der das Gel zu inkubieren ist. Der Hauptanbieter dieses Verfahrens ist *Amersham Biosciences*.

<sup>21</sup>Bei dieser Methode reagiert das Silber mit einzelnen Aminosäuren. Es gibt sehr viele dieser Methoden, die alle eins gemeinsam haben: Sie sind sehr aufwendig und färben nicht nur Proteine an. Die Methode wird daher nur noch bei speziellen Fragestellungen angewandt. Nachweisbereich 5–30 ng.

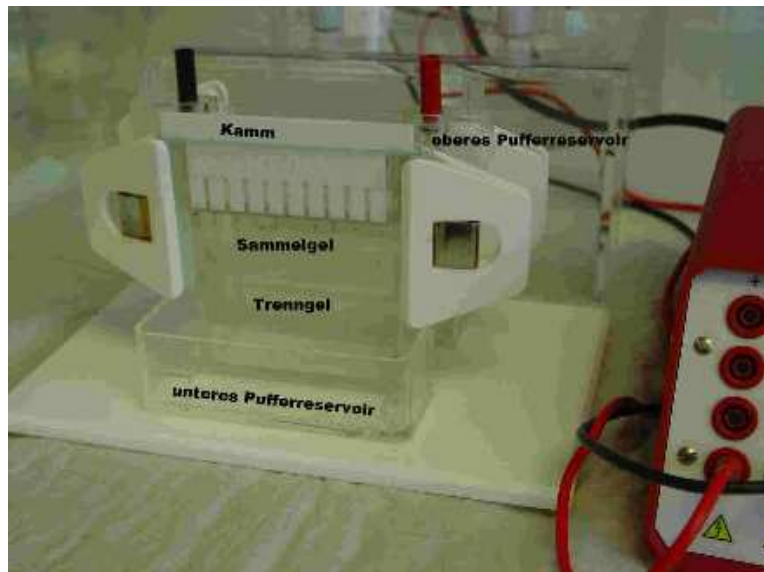


Abbildung 3.27: SDS-PAGE Apparatur.

### Protein-DNA-Nachweis (EMSA)

Zum Nachweis von Protein-DNA Komplexen bedient man sich der EMSA-Methode<sup>22</sup>. Die Methode basiert auch hier darauf, daß sich die Moleküle im elektrischen Feld aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladung sowie ihrer Form und Größe, unterschiedlich schnell durch die Polyamidmatrix (Gel) bewegen. Dieser Zusammenhang trifft natürlich ebenso für ungebundene DNA-Oligomere und Protein-DNA-Komplexe zu. Bindet ein Protein an das DNA-Oligomer, so nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit des Komplexes ab. Man erhält somit eine Trennung der Komplexe von der freien DNA-Oligomere aufgrund der verschiedenen Migrationsgeschwindigkeiten.

Bei diesem Verfahren, ist die DNA entweder endständig mit einem radioaktiven oder mit einem fluoreszierenden Marker, versehen. In der vorliegenden Arbeit wurden nur fluoreszierende Marker eingesetzt, da der Zugewinn an Sensitivität bei der Benutzung radioaktiver Marker für das Experiment nicht von Bedeutung war. Einer der wesentlichen Unterschiede zum Trennsystem der Proteine (SDS-PAGE) besteht darin, daß das hier verwendete Gel nicht denaturierend auf das Protein wirkt und nicht zwei unterschiedliche Bereiche aufweist. Damit stellt man sicher, daß die Proteine biologisch aktiv bleiben, sprich, ihre Bindungsfähigkeit nicht während des Experiments verlieren. Der typische Ablauf eines solchen Experiments, soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

Bevor die Proben analysiert werden können, muß zuerst die Gelmatrix hergestellt werden. Dies geschieht wie bei den Proteingelen, jedoch weisen die Komponenten des Acrylamidgels eine andere Zusammensetzung auf (vgl. Tabelle 3.7). Nach dem Mischen der Komponenten wird die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen, sowie der Kamm eingesetzt, der die Taschen für die Proben erzeugt. Nun braucht das Gel etwa 20-30 Minuten bis zur vollständigen Polymerisation (Vernetzung des Acrylamids). Diese Zeit wird für die Probenvorbereitung genutzt. Dabei werden die markierten DNA-

<sup>22</sup>Electrophoretic Mobility Shift Assay = Gelretardation = Gel Mobility Shift Assay = Band Shift Assay; all diese Begriffe werden für diese Methode benutzt.

Komponente	4.5%	6%	8%
Acrylamid 40%	5.625 ml	7.5 ml	10 ml
TBE(10X)	1.25 ml	1.25 ml	1.25 ml
TEMED	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS(10%)	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l	250 $\mu$ l
dest. Wasser	42.825 ml	40.825 ml	38.45 ml
Trennbereich [bp]	> 100	50-100	20- 60

Tabelle 3.7: Die Angaben in der Tabelle beziehen sich auf einen 50ml Ansatz. Dieser ist ausreichend um ein Gel zu gießen.

Oligomere mit dem Protein und einem speziellen Puffer gemischt und bei typischerweise 25 °C 20 min. inkubiert, so daß sich in dem Gemisch die DNA-Protein-Komplexe bilden können. In der Abbildung (3.28) ist der Aufbau exemplarisch gezeigt. Nach der Inkubati-

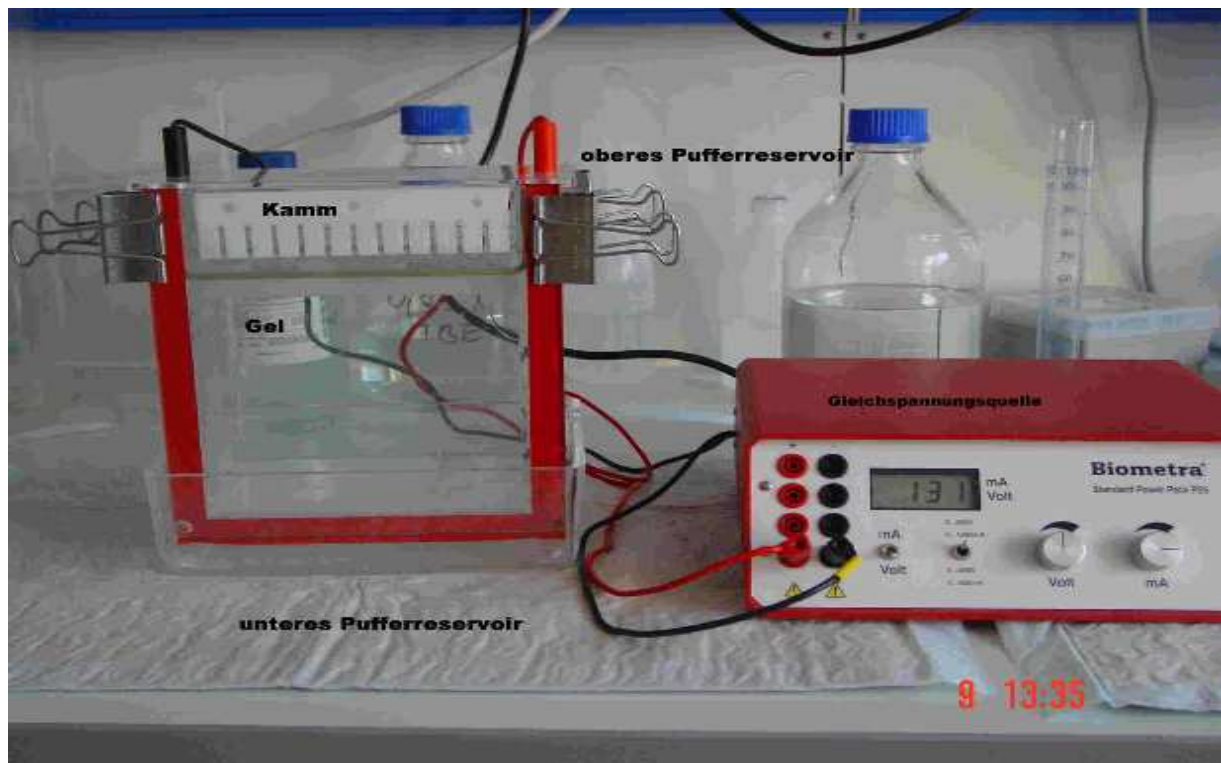


Abbildung 3.28: Ein typischer EMSA Aufbau bestehend aus der Gelapparatur (links) und der Gleichspannungsquelle (rechts). Bei der Gelapparatur sind die beiden Pufferreservoirs, das Gel sowie der Kamm mit seinen breiten Taschen zu sehen, in die, nach Entfernen des Kamms, die Proben pipetiert werden.

onszeit werden allen Proben Ficoll zugegeben, dadurch wird die Probendichte gegenüber dem Puffer erhöht. Die Proben sinken somit auf den 'Taschenboden', wodurch ein Vermischen der Proben mit dem Puffer verhindert wird, bevor sie aufgrund des elektrischen Feldes in das Gel einwandern. Direkt nach dem sogenannten 'Beladen' des Gels wird die Spannung von  $U = 250V$  zwischen den beiden Pufferreservoirs angelegt. Das sich aufbauende elektrische Feld, sorgt für die Migrationsbewegung der geladenen Proteine. Nach



etwa einer Stunde haben sich die Komplexe sowie die freie DNA soweit getrennt, daß man das Experiment analysieren kann. Dies geschieht mit einem überdimensionalen Scanner Namens 'Typhoon' der Firma AMERSON PHARMACIA BIOTEC. Dieses Gerät besitzt zwei Laser, mit denen die Fluorophore, des DNA-Oligos, angeregt werden können. Ähnlich, dem FCS-Aufbaus, wird, die entstehende Fluoreszenz via einer Photodiode detektiert. Das komplette Gel wird in bestimmten Schrittweiten abgetastet, so daß ein zweidimensionales Bild der Fluoreszenz entsteht. Man erhält eine Antwortfunktion der Art  $F(x, y)$ . Mit den Typhoon zugehörigen Programmen (IMAGEQUANT Version 5.2, 1999) lassen sich nun die Intensitätsverteilungen darstellen, messen und analysieren. Je nach Experimentaufbau, bzw. Probenzusammensetzung lassen sich damit Banden im Gel nachweisen, die der freien DNA, dem DNA-Protein-Komplex oder dem DNA-Protein-Antikörper-Komplex (dem sogenannten 'super-shift'), zuordenbar sind.

## 3.4 Proteinexpression

Der folgende Abschnitt behandelt die Expression von Protein in Bakterien und Zellen, jedoch ohne auf Labordetails einzugehen. Im Fokus einer Proteinexpression steht, die Herstellung möglichst großer Mengen des Zielproteins, in biologisch aktiver Form. Die Expression, die Herstellung eines humanen Proteins ist in einer Bakterienzelle (Prokaryont) ebenso möglich wie in einer Zelle (Eukaryont). Jedoch fehlen, dem fertigen Protein bei der bakteriellen Expression bestimmte Modifikationen, die nur ein eukaryontisches System durchführen kann.

Warum man diesen 'bakteriellen' Weg meist doch beschreitet, liegt an den immensen Vorteilen, die diese Expression bietet. Sie ist, vom ersten Klonierungsschritt bis zum 'fertigen' Protein, wesentlich schneller und einfacher durchführbar als die eukaryontische Expression. Die Auswirkungen, der nicht durchgeführten Modifikationen der bakteriellen Expression stehen, für einen großen Teil der Fragen an das Experiment nicht im Vordergrund. Eine wichtige Frage, die diese Expression beantworten soll, ist die, nach der prinzipiellen Durchführbarkeit der Expression. Läßt sich die bakterielle Expression durchführen erhält man Informationen bzw. kann abschätzen, ob eine (aufwendige) eukaryontische Expression überhaupt sinnvoll ist. Sind beide Expressionen abgeschlossen erhält man, neben ausreichenden Mengen des zu untersuchenden Proteins, durch den Vergleich der Expressionen Aufschluss über die Expressionsstruktur.

Die Herstellung großer Mengen rekombinaten Proteins ist, insbesondere für die Proteinstrukturuntersuchungen, die Röntgenstrukturanalyse, oder für die Antikörper-Produktion von Bedeutung. Aber von diesen Fällen abgesehen, ist eine hohe Expressionrate des Proteins natürlich auch für die hier vorgestellten Untersuchungen von Interesse. Da nach der Expression, die aufwendige und schwierige Arbeit, der Aufreinigung des Proteins beginnt. Nach dieser ist meist nur noch ein Bruchteil der ursprünglichen Protein-Menge verfügbar.

Um jedoch die Ergebnisse, die man durch die Bakterienexperimente gewonnen hat, auf höhere Lebewesen übertragen zu können, muß die Expression der Proteine auch in Zellen (Eukaryonten) durchgeführt werden. Sie setzen alle Posttranslationsmodifikationen<sup>23</sup> um, so daß man ein 'komplettes' Protein erhält. Ein anderes Problem der Expression in Prokaryonten ist die Überexpression. Die Proteine werden in diesem Fall in einem so hohen Maße produziert, daß sie in einer unlöslichen Form, in sogenannten 'inclusion bodies' eingeschlossen sind. Die Aufreinigung solch 'unlöslicher' Proteine ist meist schwierig bzw. hat zur Folge, daß man nur einen geringen Prozentsatz aktiven Proteins erhält. Eine andere Folge der Überexpression ist, das Absterben der Bakterien bzw. Zellen. Dies geschieht wenn das exprimierte Protein bei höheren Konzentrationen eine toxische Wirkung entwickelt. Aber beide Probleme lassen sich im allgemeinen nicht theoretisch lösen, auch deshalb müssen beide Expressionen durchgeführt werden. Die folgenden Abschnitte behandeln die Details der pro- wie der eukaryontischen Expression.

---

<sup>23</sup>Im Anschluß an die Proteinbiosynthese wird die Kette vielfach modifiziert. Es werden Teile entfernt, einige Aminosäuren verändert, Kohlenhydrate oder Lipide an bestimmte Stellen angeheftet, oder es erfolgt eine Aktivierung durch Acetylierung, Methylierung oder Phosphorylierung. Zusammengefaßt bezeichnet man alle diese Veränderungen als Posttranslationsmodifikationen oder Modulation.

### 3.4.1 Proteinexpression in Bakterien

Für die Proteinexpression in Bakterien werden typischerweise *E.coli*-Bakterien verwandt. Diese wachsen sehr schnell (typische Verdopplungszeit 20min) und liefern das Protein in großen Mengen. Wie wird nun überhaupt ein Protein exprimiert? Um dies kurz darzustellen wird dieser Vorgang wie folgt unterteilt.

- DNA-Sequenz, die das Protein kodiert via PCR<sup>24</sup> vervielfältigen.
- Einfügen der DNA-Sequenz in ein Plasmid.
- Einschleusen des Plasmids in das Bakterium sowie Kontrollen durchführen.
- Vermehrung der Bakterien.
- Gezieltes Anschalten der Expression des gewünschten Proteins, nebst Proteinnachweis.
- Aufreinigen des Proteins.

Hält man nach dieser einige Tage in Anspruch nehmenden Prozedur das gewünschte Protein in Händen, können die eigentlichen DNA-Protein-Bindungsexperimente begonnen werden. Doch nun zu den einzelnen Schritten der Expression.

Als Grundlage der Expression dienen die via Datenbankrecherche gefundenen DNA-Sequenzen. Hier, unter anderem die Oestrogen-Rezeptor Sequenzen  $\alpha$  und  $\beta$  (siehe Anhang A.3). Mit diesen Sequenzen entwickelt man die sogenannten 'Primer'-Paare<sup>25</sup>, die die zu amplifizierende Sequenz einschließen. Dieser Schritt wird mit dem Programm DNA-STAR ausgeführt. Als nächstes benötigt man die DNA, an die die Primer binden sollen und die somit die PCR möglich macht. Hierfür wird eine RNA-Präparation aus humanen Hela-Zellen<sup>26</sup> und MCF-Zellen (vgl. Anhang B.1.4) durchgeführt. Mit dem Enzym 'reverse Transkriptase' (RT)<sup>27</sup> wird die RNA<sup>28</sup> in DNA übersetzt. Dies DNA-Moleküle sind die Basis für, die sich anschließende PCR. Mit der PCR läßt sich mit Hilfe der Primer die gewünschten DNA-Fragmente millionenfach identisch kopieren. Durch die geeignete Wahl, der Polymerase lassen sich die Fehlerraten, bei der Amplifikation der DNA, auf 1:1 Million reduzieren.

Um sicher zu sein, daß man wirklich die richtige Sequenz vervielfältigt hat, bedient man sich bestimmter Restriktionsenzyme, die selektiv nur bestimmte DNA-Sequenzen durchtrennen. Man erhält dadurch Fragmente der Gesamtsequenz, deren Längen via DNA-Nachweis analysiert werden und mit der theoretisch zu erwartenden Fragmentlängen-Verteilung verglichen werden können. Erhält man eine Übereinstimmung, so geht es zum

---

<sup>24</sup>PCR steht für Polymerase Chain Reaction. Dieses Verfahren ermöglicht die Vervielfältigung von DNA-Sequenzen von bis zu 30 kb Länge in etwa einer Stunde.

<sup>25</sup>Primer sind kurze Ketten (14-30bp) von Nukleinsäure-Bausteinen, sprich, Oligo-DNA-Sequenzen, die nur als Einzelstrang vorliegen. Diese synthetisch hergestellten DNA-Abschnitte binden an ihre komplementären, einzelsträngigen Nukleinsäure-Moleküle, nach den Regeln der Basenpaarung. In der PCR dienen die so erzeugten kurzen Doppelstrang-DNA-Stücke als Startpunkt der DNA-Polymerase.

<sup>26</sup>Hela-Zellen sind epithelartige Zellen und gehören zu den Standardzelllinien in der Molekularbiologie. Sie sind seit fast fünfzig Jahren etabliert. Weitere Informationen über den Zelltyp finden sich im Anhang (B.1.1)

<sup>27</sup>Die reverse Transkriptase übersetzt die RNA in DNA und kann als das Schlüsselenzym der modernen Molekularbiologie betrachtet werden.

<sup>28</sup>Ribon-Nuklein-Acid, Informationsübertragendes Molekül.

zweiten Schritt der basenweise Amplifikat-Analyse, der Sequenzierung. Mit diesem Verfahren läßt sich die amplifizierte Sequenz Base für Base identifizieren; man erhält also die Sequenz des Amplifikats. Stimmt diese wiederum mit der der Datenbank überein, kann mit dem nächsten Schritt, der Proteinexpression fortgeföhren werden, der Herstellung des Plasmids<sup>29</sup>, das die Fremd-DNA enthält.

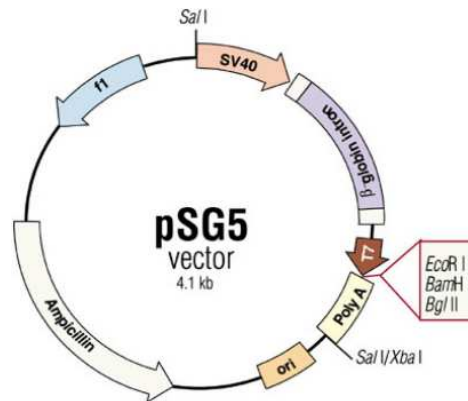


Abbildung 3.29: Eukaryontischer Expressionsvektor – pSG5 – der Firma STRATAGENE. Auf der Vektorkarte sind alle wichtigen Sequenzabschnitte angegeben. Der Kasten rechts beinhaltet die Namen der Restriktionsenzyme und zeigt die Stelle zum Einfügen der Fremd-DNA.

Als Plasmid wird unter anderem der von der Firma *STRATAGENE*<sup>®</sup> vertriebene eukaryontische Expressions-Vektor benutzt<sup>30</sup>. Er zeichnet sich durch eine hohe Expressionsrate aus. In der Abbildung (3.29) ist der gesamte Vektor mit sämtlichen für die Expression und Klonierung wichtigen Teilsegmenten dargestellt. Auf diese wird jedoch, an dieser Stelle, nicht weiter eingegangen. Um die Zielsequenz einzusetzen, muß der Vektor zuerst mit den Restriktionsenzymen 'geschnitten' werden. Mit den so erzeugten Enden wird die Zielsequenz in den Vektor eingesetzt. Die anschließende Ligation verbindet die Enden des Vektor mit denen der Fremd-DNA. Durch, das diesen Vorgang ausführende Enzym, der Ligase, erhält man wieder ein geschlossenes Plasmid.

Um die Bakterien zur Aufnahme des fertigen Plasmids zu bringen müssen sie kompetent gemacht werden. Hierzu stehen im wesentlichen zwei Methoden zur Verfügung, eine Chemische und eine Elektrische, die in [53] beschrieben sind. Ein Maß der Kompetenz von Bakterien ist, die Anzahl der Bakterien-Kolonien pro  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA, die nach der Transformation gewachsen sind. Bei den chemischen Methoden läßt sich eine Kompetenz von  $10^6$  bis  $10^8$  Kolonien pro  $\mu\text{g}$  Test-DNA erzielen. Die elektrische Methode erreicht Werte bis  $10^{10}$ . Kompetente Bakterien können jedoch auch fertig von Firmen bezogen werden.

Ist die Ligation erfolgreich verlaufen, wird das Plasmid mit kompetenten oder superkompetenten Bakterien (z.B. ONE SHOT TOP-10-Bakterien<sup>31</sup>), welche fremde DNA noch leichter aufnehmen, gemischt. Der Ligation-Bakterien-Mix (etwa  $100\ \mu\text{l}$  –  $400\ \mu\text{l}$ ) wird

<sup>29</sup>Ein Plasmid ist ein zirkulär geschlossenes doppelsträngiges DNA-Molekül, welches alle wichtigen Sequenzen enthält, die zur Transkription sowie deren Steuerung in der Zelle notwendig sind. Es ist somit unabhängig vom bakteriellen Genom.

<sup>30</sup>Dieser Vektor ist aufgrund seiner Promotorsequenz auch für Prokaryonten wie sie Bakterien darstellen geeignet.

<sup>31</sup>Diese Bakterien werden von der Firma INVITROGEN vertrieben.

nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37 °C auf eine Nährmediumschale (Agarplatten)<sup>32</sup> aufgebracht. Während einer weiteren Inkubation, meist über Nacht bei 37 °C entwickeln sich Bakterienkolonien.

Um die Bakterienkolonien bzgl. der Aufnahme des Vektor selektionieren zu können besitzt dieser eine Antibiotikaresistenz<sup>33</sup>. Bei Bakterienkolonien, deren Wachstum normal verlief, kann man also davon ausgehen, daß der Vektor aufgenommen wurde und auch funktionsfähig ist. Leider ist das Wachstum des Bakteriums, zur Kolonie, noch kein eindeutiger Beweis, so daß auch hier die Bakterien-DNA jeder einzelnen Kolonie überprüft werden muß. Erst nach dieser Analyse, der Bakterien-DNA, kann die Vektor-DNA für weitere Experimente eingesetzt werden.

Nach dieser Vorarbeit hat man also einen Bakterienstamm in entwickelt, der das Plasmid enthält. Nun sind drei Wege einzuschlagen: Erstens, die Gewinnung von ausreichend Plasmid-DNA für die Transfektion und zweitens, Expression des Proteins und drittes, die Konservierung des gewonnenen Bakterienstamms.

Ersteres geschieht in dem man das Bakterium nochmals auf mehrere Agarplatten aufbringt und über Nacht inkubiert. Lassen sich ausreichend große Kolonien erkennen impft man mit diesen Flüssignährmedium an. Nach der Übernachtsinkubation wird mittels 'MiniPräp'<sup>34</sup> die Plasmid-DNA extrahiert. Man hat also nun ausreichend Plasmid-DNA zur Verfügung für eine Transfektion eukaryontischer Zellen. Details zu den Zelllinien finden sich im Anhang B.1. Die Transfektion ist Thema des nachfolgenden Abschnitts.

Die Sicherung bzw. Lagerung des Bakterienstamms geschieht, durch das Einfrieren eines Glycerol/Bakteriensuspensions Gemisches. Auch hier impft man Flüssigmedium mit dem Bakterienstamm an und läßt die Bakterien wachsen. Diese Bakteriensuspension wird im Verhältnis 6:1 mit Glycerol gemischt. Nach dem Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff können die sogenannten 'Glycerolstocks' bei -80 °C gelagert werden. Das Glycerol soll die Bakterien beim Auftauen schützen.

Die ersten vier Punkte der Übersicht sind bis hierher beschrieben. Die weiteren Punkte werden in Abschnitt 3.4.3 'Proteinaufreinigungs Verfahren' und im Kapitel 4 'Charakterisierung der Experimente' behandelt werden.

---

<sup>32</sup>Agar ist ein sehr reichhaltiges Nährmedium. Durch Mischen und Erhitzen mit Wasser bildet Agar beim Abkühlen eine gallertartige feste Masse. Auf diesen 'Agarplatten' finden die Bakterien beste Wachstumsbedingungen.

<sup>33</sup>Antibiotika sind Stoffe, die entweder das Wachstum von Bakterien hemmen oder sie abtöten. Hemmende Antibiotika sind beispielsweise Penicilline und Cephalosporine. Abtötende Wirkung vermitteln folgende Antibiotika: Kanamycin, Tetrazykline oder Streptomycin. Die Wirkungsstätten der Antibiotika sind dabei sehr verschieden, beispielsweise beeinflussen sie die Zellwand- oder die Proteinsynthese oder greifen direkt in die DNA-Replikation ein.

<sup>34</sup>Mit diesem Begriff ist, die Isolierung der DNA aus den Bakterien gemeint; hier wurde sie mit der Standardprozedur der Firma QIAGEN durchgeführt (siehe auch A.2.1).

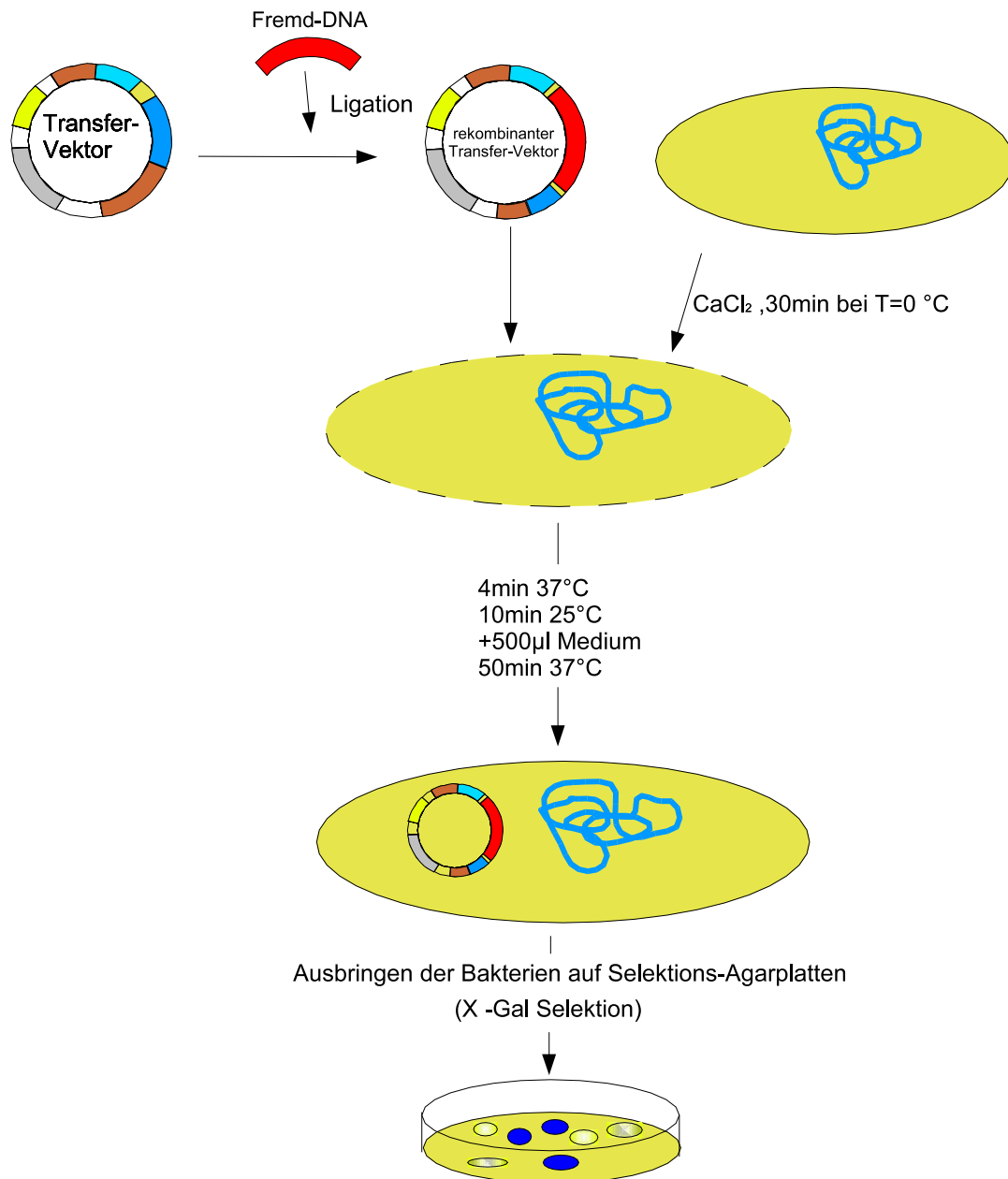


Abbildung 3.30: Die Bakterielle Transformation: Um Bakterien zu transformieren, müssen ihre Membranen durch eine Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  durchlässig gemacht werden. Zuerst werden die Zellen für 30 Minuten bei  $0^\circ\text{C}$  in einer  $\text{CaCl}_2$ -Lösung inkubiert. Während dieser Zeit können die Transformationsvektoren in die Zelle eindringen. Danach wird die Temperatur über  $37^\circ\text{C}$  wieder auf  $25^\circ\text{C}$  erhöht. Zur Regeneration der Zellmembran wird die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit Nährmedium verdünnt und bei optimaler Wachstumstemperatur für E.Coli  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Schließlich werden die Bakterien auf eine Selektionsagar-Platte ausgestrichen. Nach einer weiteren Inkubation der Agarplatten von etwa zwölf Stunden können die Zellen, die den Vektor (blau) aufgenommen haben, selektiert und weiter verarbeitet werden.

### 3.4.2 Proteinexpression in Zellen

Bei der Proteinexpression in Zellen ist der Ablauf der Expression ähnlich dem in Bakterien. Um einen Überblick zu bekommen, wird auch in diesem Kapitel zuerst der komplette Ablaufplan in Stichpunkten angegeben, bevor auf die einzelnen Abschnitte der Expression eingegangen wird.

- DNA-Sequenz, die das Protein kodiert, via PCR vervielfältigen.
- Einfügen der DNA-Sequenz in einen Transfer-Vektor<sup>35</sup> (bakterielles Plasmid) mittels PCR, Ligation und Transformation.
- Propagation des Vektors in Bakterien, für die Transfektion von Zellen.
- Transfektion der Zellen mit dem Virus, sowie eine Positiv-Kontrolle durchführen.
- Vermehrung der Zellen (SF9 od. HeLa vgl. Anhang B.1).
- Gezieltes Anschalten der Expression des gewünschten Proteins.
- Aufreinigen des Proteins.
- Nachweis der Bindungsaktivität des aufgereinigten Proteins.

Die ersten drei Punkte wurden schon im Abschnitt 3.4.1 behandelt, auf diesen hier verwiesen werden soll. Die Transfektion der Zellen soll exemplarisch an Hand des Baculo-Virus-Systems beschrieben werden. Andere Virus-Systeme, wie das Vaccinia-System<sup>36</sup> oder das BPV-Virus<sup>37</sup>, funktionieren mit den entsprechenden systemabhängigen Modifikationen ähnlich.

Das Baculo-Virus-System infiziert ausschließlich Insektenzellen. Diese Tatsache macht dieses System sehr attraktiv und sicher im Umgang, da es keine höheren Organismen infizieren kann. Die Insekten-Zell-Linie Sf-9 (*Spodoptera frugiperda*) läßt sich mit diesem Virus infizieren und propagieren. In Anhang B.1.2 werden die Spezifika der Zellen ausführlich dargestellt. Das gebräuchlichste Virus ist, das *Autographa californica* Multiple Nuclea Polyhedrosis Virus (AcMNPV). Während des Infektionszyklus werden zwei Formen des Virus entwickelt. Eine Form besteht darin, daß einzelne Viren die Zelle einfach verlassen. Diese sind sofort in der Lage weitere Zellen zu infizieren. Bei der anderen Form werden die Viren durch eine Polyhedrinmatrix geschützt und verpackt; sie reichern sich so in der Zelle an. Diese Pakete, auch Polyhedrone genannt, verlassen die Zelle erst nach ihrer Zerstörung, der Zellyse. Nimmt ein anders Insekt eines der Pakete auf, so wird es infiziert. Um für beide Formen genügend Viren bereit zu stellen, bedarf es eines starken Promotors, der die Expression der benötigten Proteine steuert. Bei der Protein-Expression mit diesem System nutzt man die Stärke des Polyhedrin-Promotors, indem man die Fremd-DNA danach plaziert, so daß das fremde Gen ebenso stark exprimiert wird wie das Polyhedrin.

---

<sup>35</sup>Der Transfektionsvektor ist ein bakterielles Plasmid, das neben der bakteriellen Selektions-Sequenz auch eine AcMNPV-DNA-Sequenz mit der auf der Zellebene selektiert werden kann.

<sup>36</sup>Vaccinia-Viren sind die Erreger der Pocken. Sie besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom. Ihre Viren befallen Vertebraten, sowie einige Invertebraten. Das Virus repliziert sich im Zytoplasma infizierter Zellen und nicht, wie die meisten anderen Viren, im Zellkern.

<sup>37</sup>Das Rinder-Papilloma-Virus besitzt ebenfalls ein ds DNA-Genom. Das Besondere an diesem Virus ist, daß die Zelle episomal persistiert, also das Plasmid nicht ins Wirtsgenom integriert wird. Ferner ist es in der Lage bestimmte Nagerzellen zu transformieren.

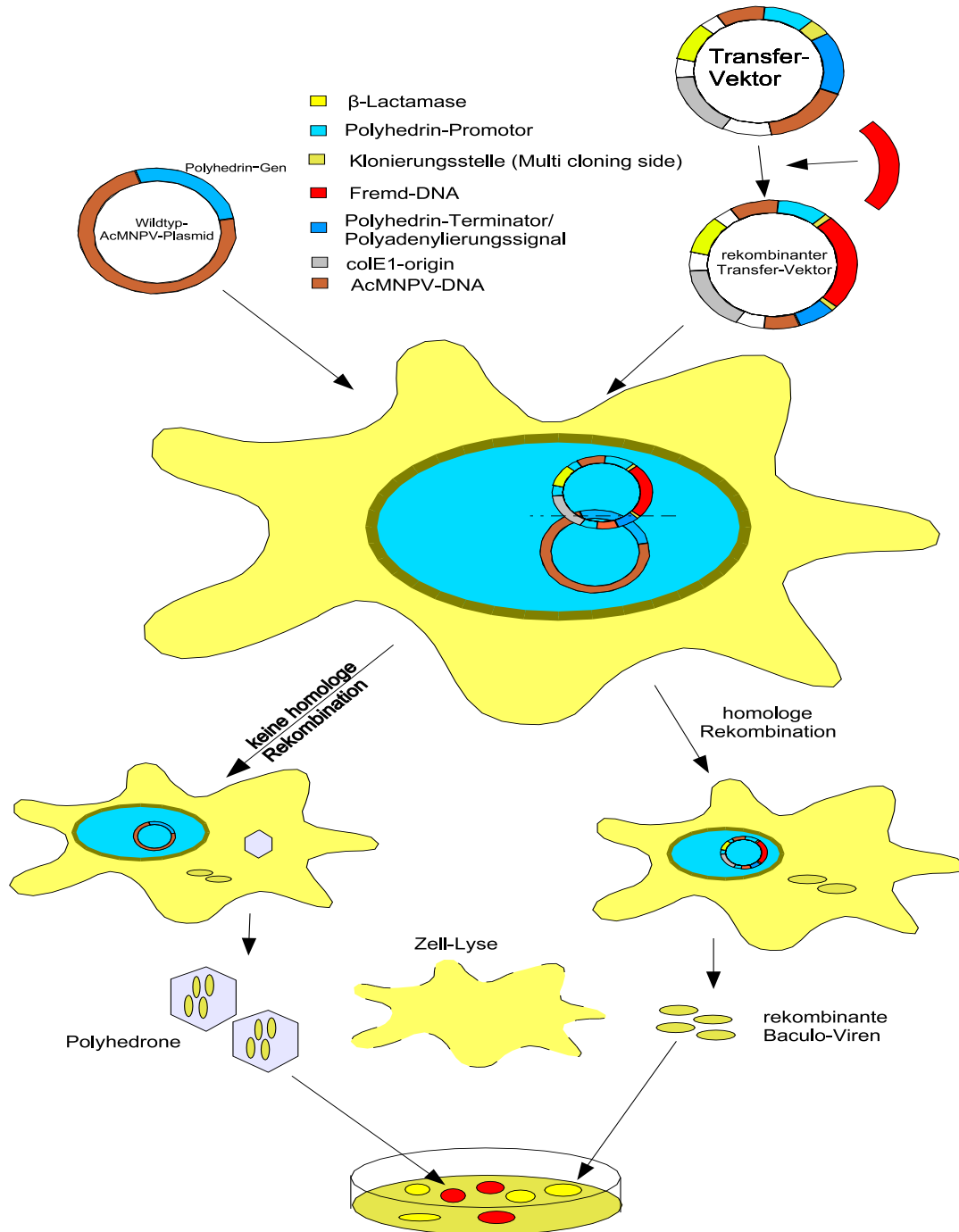


Abbildung 3.31: Das Baculo Virus Expressions System: Wie andere Viren-Systemen auch ist das Baculo-Virus zu groß, um es direkt zur Klonierung zu verwenden. Stattdessen wird ein spezieller Transfer-Vektor (Klonierungsvektor) verwendet, der dann in der transfizierten Zelle mit dem Virus-Genom homolog rekombiniert. Die Fremd-DNA (rot) wird in die Klonierungsstelle (ocker) integriert, wo sie von den Kontrollelementen des Polyhedrin-Gens eingeschlossen ist. Dieser gesamte Sequenzbereich ist eingebettet in eine Region, die aus dem Genom des AcMNPV-Virus stammt. Über diesen Bereich findet die homologe Rekombination statt. Zellen, in denen keine homologe Rekombination erzielt wird, produzieren Polyhedrons, wohingegen Zellen, in denen eine homologe Rekombination stattfindet, rekombinante Viren erzeugen. Diese Zellen können auf der Kulturplatte anhand distinkter Zell-Lyse-Zonen erkannt werden (hellrot).



Die Abbildung (3.31) zeigt das Einschleusen der Fremd-DNA, die Propagation des Virus bis hin zur Selektion der homolog rekombinaten Transfektion.

An dem Übergang vom Transfervektor zum rekombinaten Transfervektor ist der Ort der Fremd-DNA zwischen den Polyhedron-Steuerelementen eingezeichnet. Der Transfervektor ist ein bakterielles Plasmid, das neben den bakteriellen Selektions-Sequenzen auch ein AcMNPV-Segment aufweist. Auf dieser Plasmid-Sequenz befinden sich ferner der Polyhedrin-Promoter, eine MCS<sup>38</sup>, der Polyhedrin-Terminator, eine Polyadenylierungs-Sequenz und DNA-Bereiche über die eine homologe Rekombination mit der Helfer-Virus-DNA<sup>39</sup> ermöglicht wird. Mit diesem rekombinaten Virus können nun Zellen sehr effizient infiziert werden. Das rekombinante Protein kann nach 4 bis 5 Tagen Zellwachstum in hohen Ausbeuten 'geerntet' werden. Das gezielte Anschalten der Expression erfolgt über die Aktivierung des Polyhedrin-Promotors. Der Erfolg der Transfektion läßt sich auf den Kulturplatten sehen, die scharf begrenzte runde Zell-Lyse-Zonen (Plaques) aufweisen. Der große Vorteil dieses Systems besteht darin, daß die Proteine in ihrer aktiven und löslichen Form vorliegen. Und sie erhalten bei ihrer Expression die korrekten posttranslationalen Modifikationen.

Dies ist nur ein Weg um das gewünschte Protein zu erhalten. Ein Anderer, der auch eingeschlagen wurde, ist die Stimulierung von Zellen, die bekanntermassen das gewünschte Protein exprimieren. Dieser Weg wird mit sogenannten MCF7-Zellen<sup>40</sup> besprochen. Sie sind in der Lage durch geeignete Stimulation (beispielsweise mit Oestradiol E2), ihre ER- $\alpha$ , bzw. ER- $\beta$  Expression deutlich zu steigern. Bei dieser Methode liegt jedoch das Problem darin, daß man aus dem gewonnen Zellkernextrakt kaum Möglichkeiten hat das gewünschte Protein spezifisch aufzureinigen. Hier wird für die Messung der komplette Zellkernextrakt eingesetzt. Die Spezifität muß nach der Bindung mit den entsprechenden Antikörpern gezeigt werden.

### 3.4.3 Proteinaufreinigungs-Verfahren

Zur Aufreinigung, der exprimierten Proteine bedient man sich des durch den Vektor erzeugten Histidin-Endes des Proteins. Unter dem Begriff 'Aufreinigung' ist hier die Trennung des Zielproteins von der Gesamtheit aller exprimierten Proteine zu verstehen. Für die Trennung wurde, das 'QIAexpress Protein Purification System' der Firma QiaGen verwendet. In diesem System wird, die hohe Affinität von sechs Histidin-Resten (6-His-TAG) an einen *Ni*-Chelat Komplex (*Ni*-NTA) ausgenutzt [54]. Proteine mit einem 6-His-TAG können mit diesem Verfahren zu annähernd 95% aus einem Lysat isoliert werden. Die Methode ist unabhängig von der Herkunft des Lysats, aus Bakterien, Mammalia Zellen oder Insektenzellen.

Die Methode kann in vier Schritte unterteilt werden: Lysieren der Zellen, Binden der Proteine an *Ni*-NTA-Komplex, Waschen des Komplexes und Eluieren des Proteins. Das Lysieren der Zellen erfolgt mit einem Puffer, der die Zellmembran zerstört, so daß man ein Lysat erhält bei dem die Proteine 'frei' zugänglich sind. Je nach Wahl des Puffers liegen dann die Proteine in nativer oder denaturierter Form vor. Im nächsten Schritt gibt man dem Lysat *Ni*-NTA Agarose zu und inkubiert diese Mischung eine Stunde. Wäh-

---

<sup>38</sup>Die Abkürzung bezeichnet die Klonierungsstelle, Multi-Cloning-Side, mit deren Hilfe die Fremd-DNA eingefügt werden kann.

<sup>39</sup>Die Helfer-Virus-DNA stellt hier eine intakte Wildtyp AcMNPV-DNA dar.

<sup>40</sup>Im Anhang B.1.4 ist dieser Zelltyp in aller Ausführlichkeit dokumentiert.

rend dieser Zeit bilden sich die *Ni*-NTA-Protein Komplexe. Die sich nun anschließenden Waschschrte beseitigen, die nicht gebundenen sowie die Proteine, die keinen 6-His-TAG aufweisen. Es bleiben nur, die an die *Ni*-NTA Matrix gebundenen Proteine übrig. Im letzten Schritt, der Elution der Proteine, nutzt man die ebenfalls hohe Affinität von Imidazol an *Ni*-NTA, aus. Das Zielprotein und Imidazol konkurrieren bei der Elution um die Bindungsstelle. Bei steigender Konzentration von Imidazol wird, das zuvor gebundene Protein ausgewaschen. Die Elution wird in fünf Stufen durchgeführt. Bei jeder Stufe wird die Imidazol-Konzentration, beginnend bei 0.1 M, um 0.1 M erhöht, bis eine Konzentration von 0.5 M erreicht wird. Die so erhaltene fraktionierte Protein-Elution wurde anschließend mit der SDS-Gelelektrophorese analysiert.

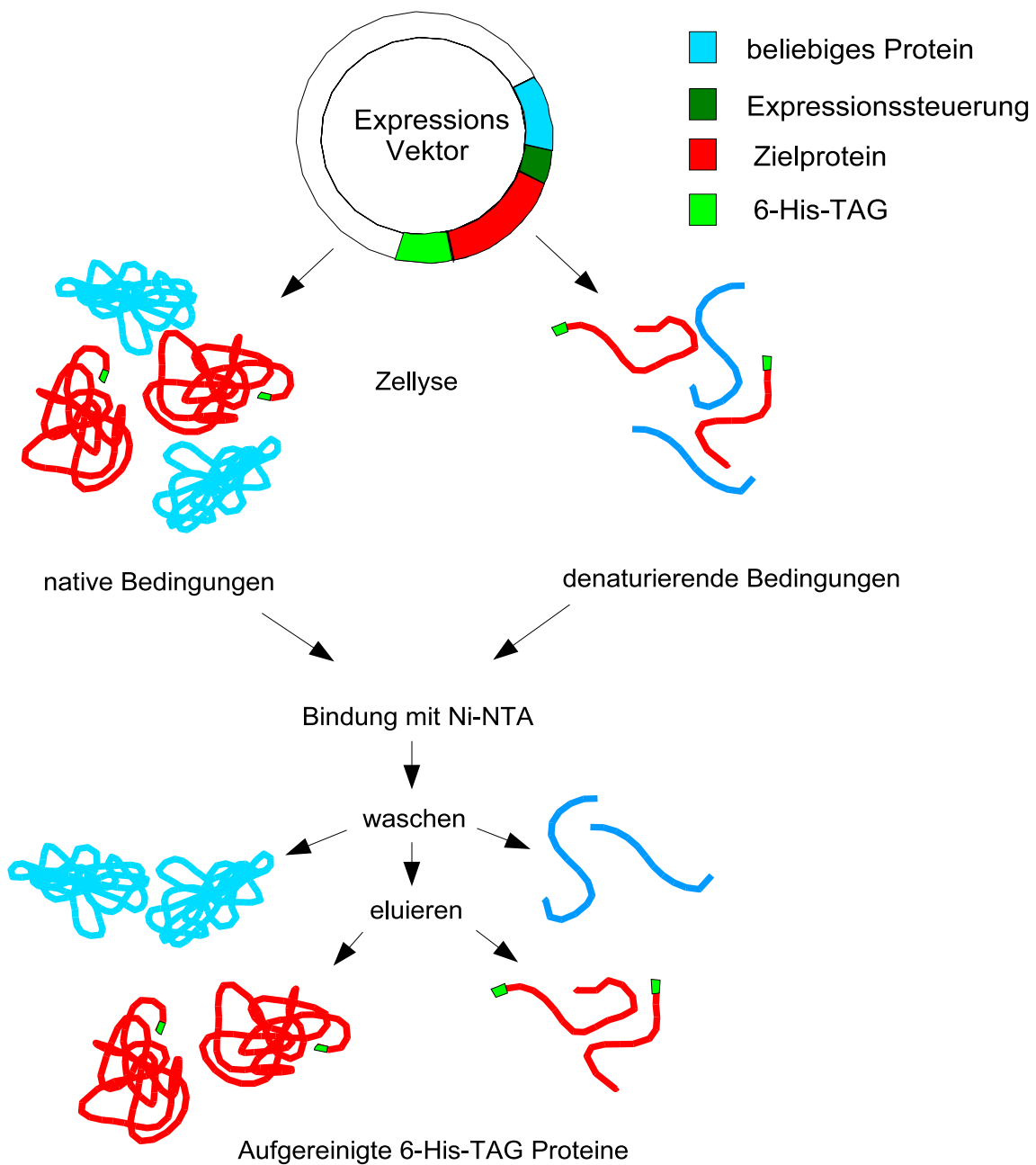


Abbildung 3.32: *Ni*-NTA Aufreinigungs-Schema für 6-His markierte Proteine.

## 3.5 Theorie der Bindungskinetik beim 'BS-Assay'

Das Ziel des Kapitels ist die Darstellung der Bindungskinetik, wie sie für die Auswertung der nachfolgend präsentierten Experimente gebraucht wird. Aus den zentralen Begriffen der Thermodynamik, freie Energie und thermodynamisches Gleichgewicht wird die Bindungskinetik abgeleitet.

### 3.5.1 Bindungskinetik

Die Diffusion von Teilchen wird durch ein Streben zu einer Gleichverteilung der Teilchen verursacht oder durch die Brownsche Molekularbewegung. Eine einfache biologische Reaktion stellt der Umsatz eines Substrats (S) mittels Enzym (E) zu einem Produkt (P) dar. Das Enzym bleibt bei dieser Betrachtung erhalten. Das Zwischenprodukt (ES), der Enzym-Substrat-Komplex dient nur zur Umsetzung des Substrats.



Um diese Reaktion mit thermodynamischen Größen beschreiben zu können, müssen noch folgende Definitionen vorgenommen werden. Die allgemeine Konvention, Konzentrationen oder Stoffkonzentrationen in [ ] Klammern zu schreiben, wird auch in dieser Darstellung beachtet.

Die Umsatzrate  $\nu$  eines Edukts A ist definiert als die zeitliche Änderung der chemischen Konzentration [A].

$$\nu_A = -\frac{d[A]}{dt}$$

Nun ist noch der Reaktionsfluss J zu definieren. Er ist das Produkt aus der konstanten Umsatzrate<sup>41</sup>  $k$  und der Konzentration [C].

$$J = k[C]^n$$

Der Exponent  $n$  beschreibt hier die Ordnung der Reaktion. Betrachtet man die Reaktionsgleichung  $A + B \xrightleftharpoons{k_1} AB$  wäre  $n = 2$  mit  $J_A = J_B = k_1[A][B]$ .

Ein guter Einstiegspunkt in die Ableitung der Michaelis-Menden Kinetik, ist die Definition des chemischen Potentials  $\mu_i$ . Diese Kinetik war für die durchgeführten Experimente eine der maßgeblichen, weshalb sie hier detailliert abgeleitet werden soll.

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (3.58)$$

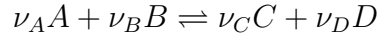
wobei  $i$  die einzelnen Komponenten bezeichnet; R ist die Gaskonstante  $R = 8.314 \frac{J}{Kmol}$ ;  $a_i$  die chemische Aktivität der i-ten Komponente und  $\mu_i^0$  ist das chemische Potential der i-ten Komponente im Grundzustand. Die chemische Aktivität ist einfach über einen Koeffizienten  $\gamma_i$  mit der Konzentration der i-ten Komponente verknüpft.

$$a_i = \gamma_i[i]$$

---

<sup>41</sup>Die konstante Umsatzrate stellt die Inverse der Zeitkonstante  $\tau$  einer chem. Reaktion dar.

Betrachtet man eine chemische Reaktion bei konstantem Druck und konstanter Temperatur wird diese mit der Änderung der freien Gibb'schen Energie beschrieben. Für eine allgemeine Reaktion zweier Edukte (A und B) zu zwei Produkten (C und D) kann folgende Gleichung aufgeschrieben werden.



$$\Delta G = \nu_C \mu_C + \nu_D \mu_D - \nu_A \mu_A - \nu_B \mu_B \quad (3.59)$$

Mit der obigen Definition des chemischen Potentials (Gl. 3.58) läßt sich die Gleichung umformen zu

$$\Delta G = \Delta G^0 RT(\nu_C \ln a_C + \nu_D \ln a_D - \nu_A \ln a_A - \nu_B \ln a_B) \quad (3.60)$$

mit  $\Delta G^0 = \nu_C \mu_C^0 + \nu_D \mu_D^0 - \nu_A \mu_A^0 - \nu_B \mu_B^0$ . Mit den Identitäten des Logarithmus gelangt man zur van't Hoff Gleichung.

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \left( \frac{a_C^{\nu_C} \cdot a_D^{\nu_D}}{a_A^{\nu_A} \cdot a_B^{\nu_B}} \right) \quad (3.61)$$

Unter der Annahme des thermodynamische Gleichgewichts ändert sich die Gibb'sche Freie Energie nicht;  $\Delta G = 0$ . Nimmt man ferner geringe Konzentrationen an, so können die Koeffizienten der chemischen Aktivität Eins gesetzt werden. Mit diesen Annahmen erhält man aus der van't Hoff Gleichung die fundamentale Gleichgewichtskonstante  $K_{eq}$ .

$$K_{eq} = \frac{[C]_{eq}^{\nu_C} [D]_{eq}^{\nu_D}}{[A]_{eq}^{\nu_A} [B]_{eq}^{\nu_B}} = \exp \left( -\frac{\Delta G^0}{RT} \right) \quad (3.62)$$

Mit dieser Gleichung, die anschaulich den Quotienten aus Reaktionskonstanten in die rückwärts Richtung und den Reaktionskonstanten in die vorwärts Richtung darstellt, kann nun die Michaelis-Menden Konstante abgeleitet werden.

$$K_{eq} = \frac{(\text{Übergangsrate in Richtung Produkt})}{(\text{Übergangsrate in Richtung Edukt})} \quad (3.63)$$

Mit der Annahme das die Rückreaktion aufgrund der geringen Konzentration vernachlässigt werden kann erhält man folgenden vereinfachten Reaktionsablauf.



Unter der Anwendung der Herleitung der van't Hoff Gleichung kann nun die Gleichung für die Michaelis-Menden Gleichung für einen einfachen Prozeß dargestellt werden.

$$[ES] = \frac{k_1}{k_1' + k_2} [E][S] = \frac{[E][S]}{K_M} \quad K_M = \frac{k_1' + k_2}{k_1} \quad (3.66)$$

Für sehr kleine Übergangsraten  $k_2 \rightarrow 0$  erhält man die finale Gleichung.

$$k_a := \frac{[ES]}{[E][S]} = \frac{k_1}{k_1'} = 1/K_d \quad (3.67)$$

Mit dieser Gleichung kann also nur über die Kenntnis der Konzentrationen der Edukte und der Produkte die Gleichgewichtskonstante berechnet werden. Über die leicht bestimmbareren Konzentrationen der Reaktion erhält man die zentrale Größe, die Gleichgewichtskonstante der Bindungsreaktion.

Bei der Bestimmung der Konzentrationen aus den 'aufgenommenen' BS-Assay-Gelen wird ein weiteres Programm namens *ImageQuant*<sup>42</sup> eingesetzt. Es mißt die Fluoreszenz pro Pixel in Abhängigkeit des Ortes,  $F(x, y)$ . Bei hinreichend guter Trennung der Edukte- und Produkte-Bereiche lassen sich deren Konzentration ermitteln. Diese Bedingung ist praktisch immer erfüllt, da die Molekulargewichte derart weit auseinanderliegen, so daß die Auftrennung in einem Gel immer gegeben ist.

Die Aufnahmen der BS-Gele werden mit dem Fluoreszenz Scanner *Typhoon* durchgeführt. Bei diesem Gerät wird das Fluoreszenzsignal, das durch die Anregung des gebundenen Fluorophors am Molekül erzeugt wird, zur Bildgebung eingesetzt. Die Funktion zwischen Fluoreszenzsignal und Pixelstärke ist leider nicht explizit bekannt. Jedoch besteht eine lineare Beziehung. Dieses Verfahren unterscheidet sich also prinzipiell von einer FCS-Messung. Bei der die Konzentrationen über die Bestimmung der Teilchenzahl in einem Volumen direkt ermittelbar ist.

---

<sup>42</sup>Das Softwarepaket *ImageQuant*, von der Firma *molecular dynamics* vertrieben, dient zur Auswertung und Steuerung des Fluorescence Scanner *Typhoon* von der gleichnamigen Firma.

# Kapitel 4

## Charakterisierung der Experimente

In den nachfolgenden Abschnitten werden die konkreten Experimente beschrieben. Die Abfolge der Beschreibungen wurde nach der Logik der Arbeitsabfolgen zur Messung der Rezeptorbindungseigenschaften gewählt.

### 4.1 Expression von nuklearen Rezeptoren

In diesem Abschnitt soll die Expression von nuklearen Rezeptoren beschrieben werden: insbesondere der des Rezeptors PXR sowie der Oestrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Begonnen wird mit der ersten PCR zu Vervielfältigung der codierenden Sequenz. Diese Sequenz wird dann in den Transfer-Vektor kloniert. Nachdem dieser via Bakterien in ausreichender Menge vorliegt, schließt sich die Expression in Bakterien sowie die 'eigentliche' Expression des Rezeptors in SF-9 Zellen an. Nach der Aufreinigung des Proteins und dem Nachweis, daß man den richtigen Rezeptor hat, können die Bindungsexperimente begonnen werden, die in dem Kapitel 4.3 und Kapitel 4.4 besprochen werden.

Doch vorab sollen noch einige Daten bzgl. der Rezeptoren zusammengetragen werden. Die komplette Sequenz für den  $\beta$ -Rezeptor ist im Anhang (siehe Abschnitt A.3) zu finden. In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Eigenschaften des  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptors zusammengefaßt sowie eines weiteren nuklearen Rezeptors. Die Daten sind beim  $\alpha$ -Rezeptor

Eigenschaften		ER- $\alpha$	ER- $\beta$	PXR
DNA Länge	[bp]	1753	1413	1304
Molekulargewicht	[kDa]	66.4	53.4	50.1
DNA-Bindung	[nM]	0.2	0.38	nicht bekannt
Ligand-Bindung	[nM]	2	1.5	nicht bekannt
Bindungstyp		hetero/homo dimer	hetero/homo dimer	heterodimer

Tabelle 4.1: Eigenschaften und Unterscheide verschiedener nuklearer Rezeptoren.

entnommen aus [55, 56, 57, 58] und beim  $\beta$ -Rezeptor aus [55, 56].

Aktiviert Steroidhormon-Rezeptoren gelangen aus dem Zytoplasma in den Zellkern (vgl. Darstellung 3.24). Dort binden sie an bestimmte DNA-Sequenzen im regulatorischen Abschnitt entsprechend Hormon-responsiver Gene an, d.h. an sogenannte Hormon-Response-Elemente. Dies sind palindromartige Sequenzen, an denen jeweils zwei gleiche

Rezeptoren (Homo-Dimere) Kopf an Kopf Platz finden. Beispielsweise liest sich die DNA-Sequenz für das Oestrogen- Response-Element, das ursprünglich im Vitellogenin-Gen des Krallenfrosches identifiziert worden ist, wie folgt: GGTCA NNN TGACC, und der Komplementärstrang entsprechend: CCAGT NNN ACTGG. Mit >>N<< bezeichnete Positionen können durch beliebige Basen besetzt sein, mit der Einschränkung, daß keine Base doppelt vorkommen darf. Sie haben nur die Funktion eines Abstand-Halters. Die an Response-Elemente gebundenen und aktivierten Rezeptor-Dimere interagieren ferner mit einem riesigen Komplex verschiedener Proteine (vgl. Abbildung 1.2). Dieser fungiert als Transkriptionsapparat. Er beeinflusst maßgeblich die Transkriptions-Rate, mit der mRNA<sup>1</sup>-Kopien des entsprechenden Gens hergestellt werden. Diese mRNA Moleküle stehen nun für die Translation der Information in Proteine, die funktionellen Einheiten, zur Verfügung.

### 4.1.1 PCR und Plasmid-Herstellung

Als Grundlage für die PCR dient eine aus MCF-7 Zellen hergestellte RNA-Isolierung, die mit einem QiaGen-Kit (vgl. Anhang A.1) durchgeführt wird. Die MCF-7 Zellen werden unter den im Anhang angegebenen Bedingungen vermehrt. Die RNA wurde mit entsprechenden Primern und reverser Transkriptase in DNA übersetzt. Die PCR zur Amplifikation der Oestrogen-Rezeptor-DNA wurde mittels Primer so gestaltet, daß das erhaltene Amplifikat direkt in den Transfer-Vektor ligiert werden konnte. In der Abbildung 4.1 ist das Ergebnis

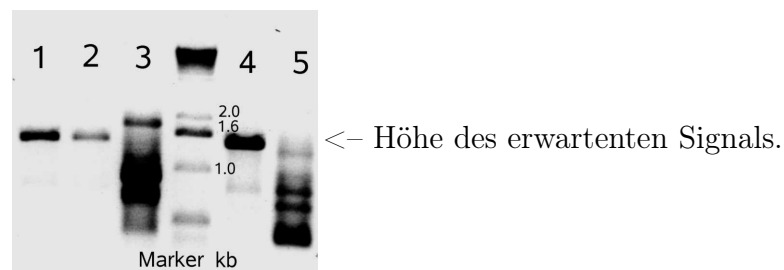


Abbildung 4.1: Hier ist die Aufnahme eines Gels gezeigt, das das Ergebnis der PCR mit Oestrogen-Rezeptor Primer bei verschiedenen Bedingungen repräsentiert.

dieser PCR gezeigt. Die Bande von 1,2 und 4 liegen auf der richtigen Höhe, sprich haben die korrekte DNA-Länge für den Oestrogen-Rezeptor. Ferner liefert der PCR-Ansatz NR. 4 die kräftigste Bande, was auf die optimalen Bedingungen der PCR hinweist. Nach diesem Ergebnis wird das Amplifikat aufgereinigt. Bei diesem Schritt entfernt man die restliche DNA des PCR-Ansatzes, die nicht die richtige Länge hat. Man erhält somit eine fast 99% reine Rezeptor-DNA. Erreicht wird dies, indem man nur die gewünschte Bande aus dem Gel ausschneidet und daraus wieder die DNA extrahiert.

Um die Richtigkeit der Basenabfolge des Amplifikats zu überprüfen, bedient man sich des spezifischen 'Verdaus' der DNA sowie des Sequenzierens. Beim sogenannten 'Verdau' wird das Amplifikat bestimmten Restriktionsenzymen ausgesetzt, welche die DNA an der

<sup>1</sup>Messenger-RNA (mRNA) ist Einzelsträngige Nukleinsäure, die im Zellkern jeweils komplementär zu einem Strang der DNA-Doppelhelix gebildet (transkribiert) wird. Sie transportiert die genetische Information der DNA ins Zytoplasma und dient den Ribosomen als Matrize für die Herstellung eines bestimmten Proteins.

für das Enzym charakteristischen Basenabfolge durchtrennen. Man erhält durch den Verdau verschieden lange DNA-Fragmente, die sich mittels Gelelektrophorese analysieren lassen. Ein Vergleich mit den via Computeranalyse erhaltenen Fragmentlängen lieferte keine Unterschiede. Da man so jedoch immer noch nicht sicher sein kann, ob die Vervielfältigung der DNA fehlerfrei in Bezug auf die Basenabfolge ist, bedient man sich noch der Sequenzierung.

Auch dieses Verfahren basiert auf der Trennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese. Die 'PCR' mit der diese Fragmente erzeugt werden, unterscheiden sich dahingehend, daß sie jeweils nur mit einer detektierbaren Base durchgeführt werden. Die einzelnen Fragmente, sprich Banden, können somit den verschiedenen Basen zugeordnet werden. Man kann damit die Abfolge der Basen des Amplifikats auflösen. In der Abbildung 4.2 ist eine solche Abfolge gezeigt und den Basen zugeordnet.

Nach dieser Vorarbeit kann mit dem Einsetzen der Rezeptor-DNA in den Transfervektor, der Ligation, begonnen werden. Dies geschieht indem sowohl der Vektor als auch das Amplifikat mit den gleichen Restriktionsenzymen 'geschnitten' werden. Diese Enzyme sorgen dafür, daß die jeweiligen Enden des Amplifikats und des Vektors eine kurze Sequenz komplementärer einzelsträngiger DNA aufweisen. Mit einem weiteren Enzym, der Ligase, gehen diese komplementären Stücke wieder eine Basenpaarung ein und verbinden somit die zwei Fragmente zu einem Strang, bzw. in diesem Fall zu einem Plasmid. In der folgenden Abbildung ist dieser Vorgang für das Einsetzen des  $\alpha$ -Oestrogen-Rezeptors in den Vektor gezeigt.



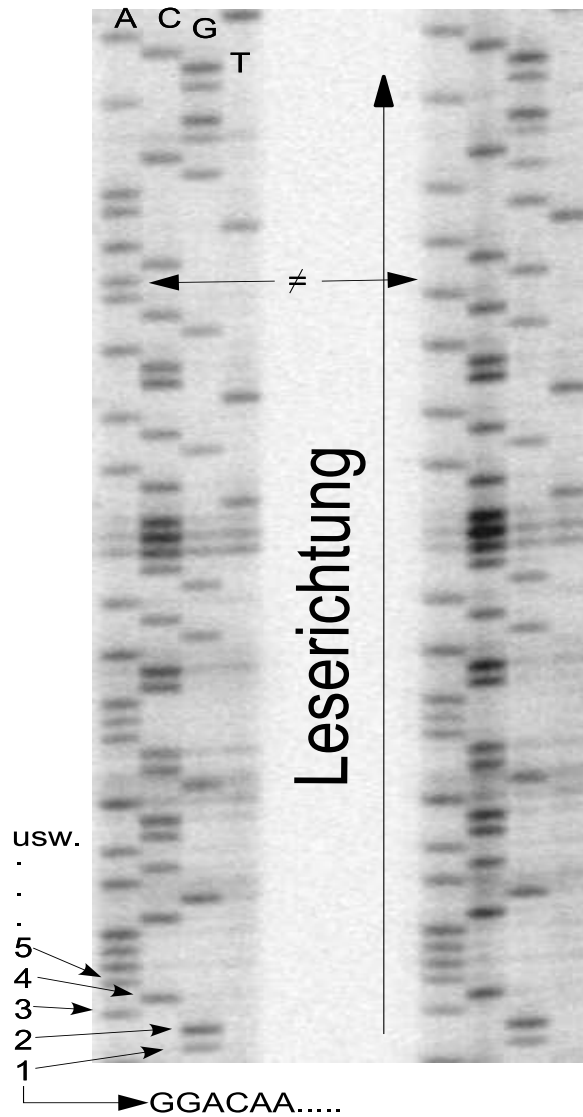


Abbildung 4.2: Beispiel eines Sequenzgels. Deutlich sind die Banden in den Spalten zu sehen, die das oben angegebene Nukleotid repräsentieren (A,C,G oder T). Bei genauer Betrachtung lassen sich im oberen Drittel erste Unterschiede in der Bandenabfolge und damit in der DNA-Sequenz erkennen (vgl. Ungleichheitszeichen).

### 4.1.2 Plasmidvervielfältigung

Nach der Ligation der Fremd-DNA in den Vektor pUC19 sowie pSG5 werden die Bakterien transformiert. Hierfür werden die superkompetenten Zellen 'Top10' von QiaGen verwendet. Die Transformation wurde nach Maßgabe des Herstellers durchgeführt.

Die über Nacht bei 37 °C auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien, welche den Transfervektor aufgenommen hatten, zeigen keine typische bläuliche Färbung. Sie wurde, wie in der Transformationsübersicht (vgl. Abbildung 3.30) gezeigt, über Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-idolyl- $\beta$ -D-galactopyranoosid) hervorgerufen. Die Umsetzung wird durch die Transkription/Translation des  $\beta$ -Galactosidase-Gens hervorgerufen. Wird ein rekombinanter Vektor von dem Bakterium aufgenommen, ist das Leseraster für das  $\beta$ -Galactosidase-Gen zerstört und kann nicht exprimiert werden. In Abbildung 4.3 ist das X-Gal Selektionsprinzip nochmals graphisch dargestellt. Hier sei noch eine andere

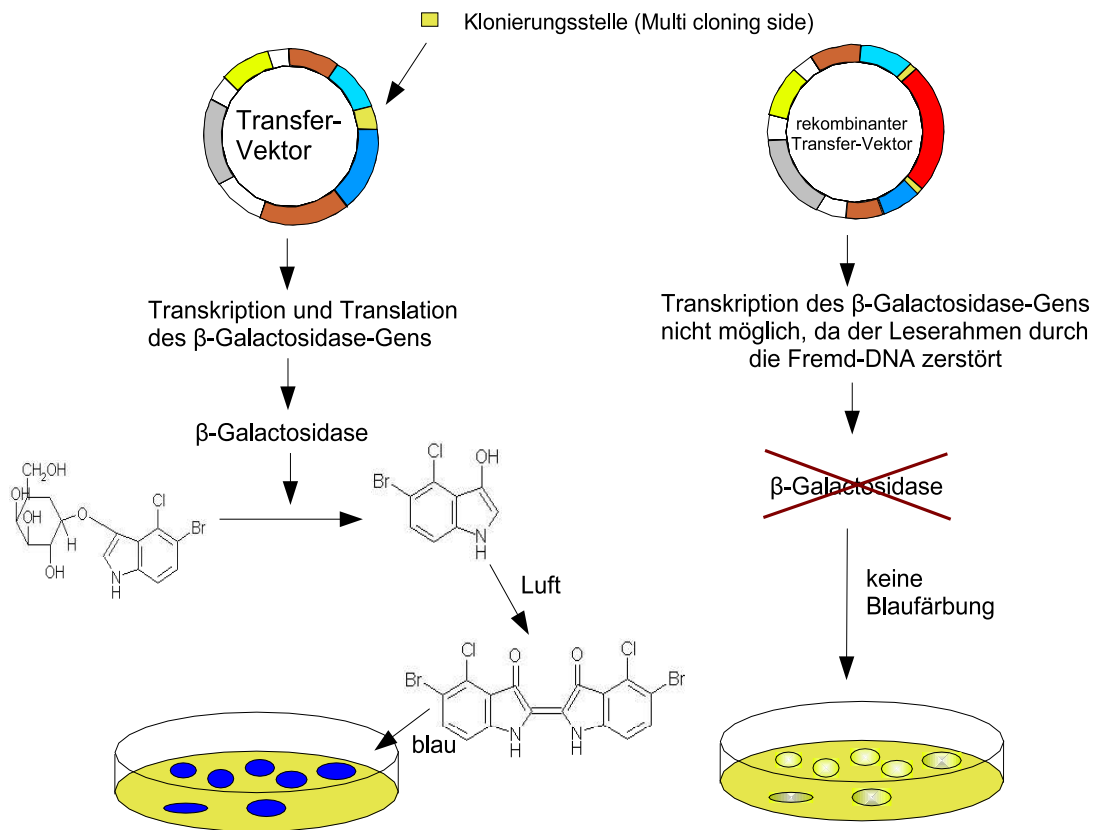


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung der X-Gal negativ Selektion von Bakterien.

Selektionsmethode erwähnt, die der Ampicillin-Resistenz. Man gibt hier den Agarplatten Ampicillin anstatt X-Gal zu. Nimmt nun das Bakterium den Transformationsvektor auf, ist es durch die im Vektor integrierte Amicilinresistenz unempfindlich gegenüber dem Bakteriumtoxin, Ampicillin. Die Zelle kann normal wachsen und bildet Bakterienkolonien. Die anderen Bakterien sterben ab. Diese Methode existiert für verschiedenste Antibiotika. Beide Selektionsmethoden können auch kombiniert werden.

Wie jedoch in der Mokekularbiologie nicht selten, hält sich die Natur nicht zwangsläufig an derartige Bedingungen. Die X-Gal-Selektion oder die Amicilinresistenz ist zwar ein notwendiges aber nicht hinreichendes Kriterium für die Selektion der Bakterien. Deshalb

analysiert man auch von den 'blauen' Bakterienkolonien jeweils eine Probe. Diese werden nun in einem Flüssignährmedium für etwa 12h inkubiert. Aus den Flüssigkulturen der einzelnen Klone wird nun die DNA der Bakterien extrahiert (Mini-Präp). Diese DNA wird im nächsten Schritt Restriktionsenzymen ausgesetzt, so daß bei einer anschließenden Gelelektrophorese ein spezifisches 'Banden-Muster' nachgewiesen werden kann (vgl. Abbildung 4.4).

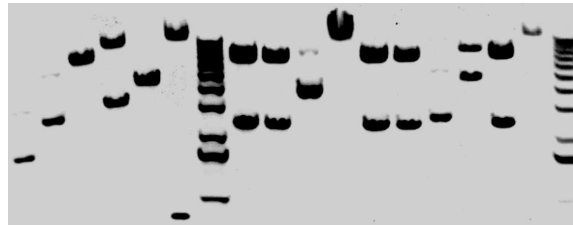


Abbildung 4.4: Gelelektrophorese der DNA-Fragmente wie sie durch die Restriktionsenzyme geschnitten werden. Gezeigt ist der Verdau von 16 verschiedenen Klonen.

Diese Abfolge der Schritte: Ligation, Transformation, Bakterien-Klon-Selektion wird so lange durchgeführt, bis die Oestrogenrezeptor-DNA in dem Bakterien-Klon eindeutig nachgewiesen werden kann. Abschließend wird der 'richtige' Klon sequenziert, um sicher zu sein, daß die Basenabfolge mit der Basenabfolge, die für den Oestrogenrezeptor bekannt ist, übereinstimmt. Hat man den richtigen Klon gefunden, wird eine etwas größere Flüssigkultur angesetzt. Zum einen, um ausreichend Plasmid-DNA daraus zu gewinnen, zum anderen, um den neuen Bakterienstamm einzufrieren/lagern ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) zu können. Dies ist eine einfache Möglichkeit diese veränderten Bakterien zu archivieren und immer wieder schnell verfügbar zu machen. Der Vektor wird in vier verschiedene Bakterienstämme kloniert, K5254, B121, B121Lys3 und GF196. Somit läßt sich bei mehr oder minder gleichem Aufwand die Wahrscheinlichkeit, daß man eine hohe Proteinausbeute in einer der Bakterienkulturen bekommt, deutlich erhöhen.

### 4.1.3 Bakterienexpression-Analyse

Nachdem nun mit der Herstellung des rekombinaten Vektors die erste Hürde in der Expression von Proteinen genommen wurde, geht es zur zweiten, der Optimierung der Expression. Hier versteht man unter der 'Optimierung der Expression', daß man den Zeitpunkt des Bakterienwachstums ermittelt, an dem die Proteinkonzentration am höchsten ist. Um dies zu tun, sind sehr umfangreiche Vorarbeiten notwendig. Den genauen Ablauf findet man in der Standardliteratur, beispielsweise in [59, 52, 60], und dieser soll hier nicht Gegenstand der Betrachtung sein.

Die Expression wird durch die Zugabe von IPTG (1 nM final) zu einer Flüssigkultur der Bakterien initiiert. Diese Initiierung erfolgt bei einer optischen Dichte<sup>2</sup> ( $\lambda = 575\text{ nm}$ ) der Bakterienkulturen von etwa  $OD = 0.4$ . IPTG<sup>3</sup> induziert die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase

<sup>2</sup>Die optische Dichte ( $OD$ -Wert) wird bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 575\text{ nm}$  gemessen. Die Messung erfolgt in einem Spektrometer. Es mißt die Lichtdurchlässigkeit der Flüssigkultur in einer Küvette. Man erhält den  $OD$ -Wert aus dem Quotienten aus den Lichtintensitäten vor ( $I_0$ ) und nach ( $I_t$ ) der Animpfung  $OD = \frac{I_t}{I_0}$  der Flüssigkultur.

<sup>3</sup>IPTG steht für isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside.

und somit auch die Expression des gewünschten Proteins. Dies ist durch die Anordnung der DNA-Sequenzen auf dem Vektor bedingt (vgl. Abbildung 4.3). Nach der Induktion wurde die Bakteriensuspension weiter in einem Schüttler inkubiert. Die Inkubationszeit betrug fünf bis sechs Stunden. Nach jeder Stunde wurde eine Probe von etwa einem ml entnommen und der *OD*-Wert bestimmt. Der *OD*-Wert ist ein Maß für die Zelldichte der Flüssigkultur und stellt somit einen einfach zugänglichen Parameter für das Bakterienwachstum dar. Die Probe wurde nach der Bakterien-Wachstums-Messung (time-course-measurement) für die Proteinexpressions-Bestimmung verwandt. Die Abbildung 4.5 zeigt diese Meßreihe für die vier verwendeten Bakterienstämme. Aus der Graphik wird deutlich, daß die Bakterien BL21, B21Lys3 sowie GF196 eine deutlich höhere Wachstumsrate zeigen als K5254. Jedoch ist dies noch kein Ausschlußkriterium für die Zelllinie K5254, da die Wachstumsrate noch nichts über den Anteil des exprimierten Proteins aussagt.

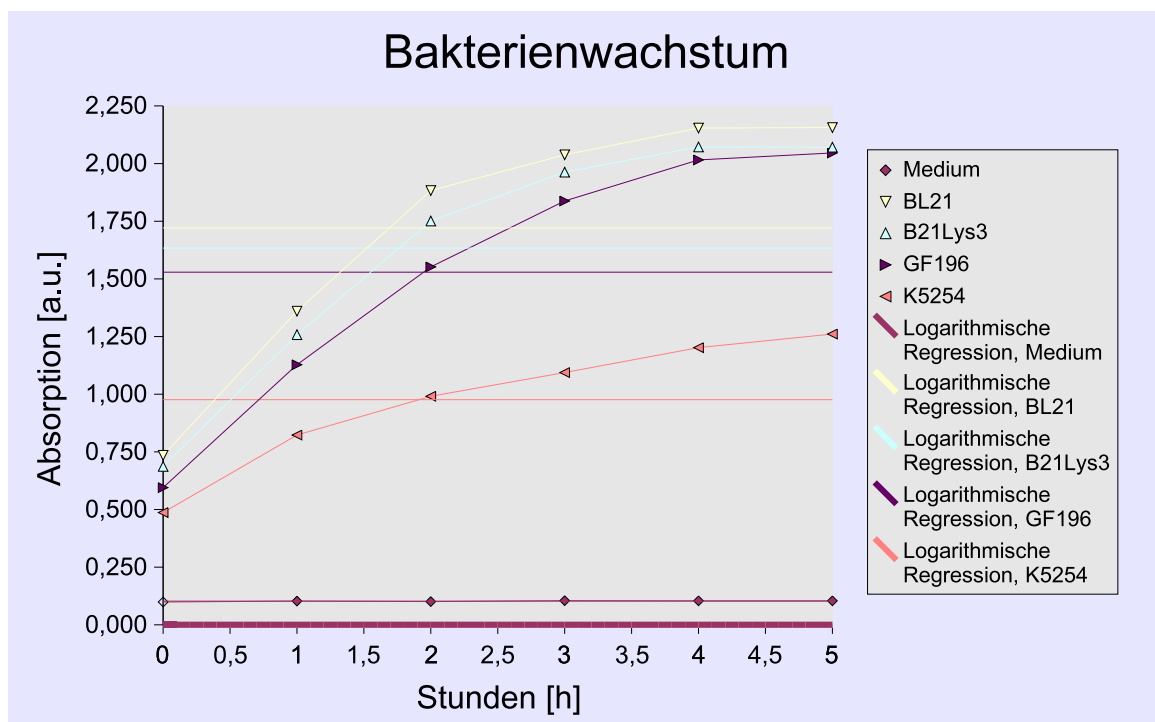


Abbildung 4.5: Wachstumskurven der verwendeten Bakterien.

Als nächstes werden alle zwanzig gewonnenen Proben für die Analyse in einem SDS-Page-Gel vorbereitet. Diese Prozedur beinhaltet das Entfernen des flüssigen Mediums, das Aufschließen der Zellen, sowie die Zerstörung der DNA und RNA. Sonach erhält man ein Proteineluat von jeder einzelnen Probe. Das Entfernen der Nährlösung erfolgt durch einfaches Zentrifugieren, wonach man den flüssigen Überstand verwirft und das Pelett aufbewahrt. Das Aufschließen der Zellen erfolgt durch Resuspension des Pelletts in einem 'Lysis Puffer'. Die nachfolgende Behandlung mit Ultraschall sorgt für die Zerkleinerung der langen DNA/RNA-Moleküle. Bei dieser Ultraschall-Methode nutzt man im wesentlichen die hohen Scherkräfte aus, die beim 'Anregen' der langen Moleküle und der Zellwände durch die starken Vibrationen entstehen. Die Flüssigkeit verliert dadurch auch deutlich an Viskosität, so daß ein  $\mu\text{l}$  genaues Pipetieren wieder möglich wird.

Nach dieser Vorbehandlung können die Proben für eine Analyse im SDS-Gel benutzt werden. Eine Behandlung der Proben wie es für Gel-Proben üblich ist muß jedoch zusätzlich durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.3.4). Die Gele werden anschließend mit dem Proteinfarbstoff 'Coomasie' gefärbt, so daß die Proteine als blaue Banden sichtbar werden. Um die Gele dokumentieren zu können, werden sie meist noch vollständig getrocknet, bevor sie mit einem 'Scanner' eingelesen werden. In den folgenden Abbildungen ist der zeitliche Verlauf der Proteinexpression dargestellt. Zu sehen sind die Verläufe für das Bakterium BL21 (Abb. 4.6, links) und K5254 (Abb. 4.6, rechts).

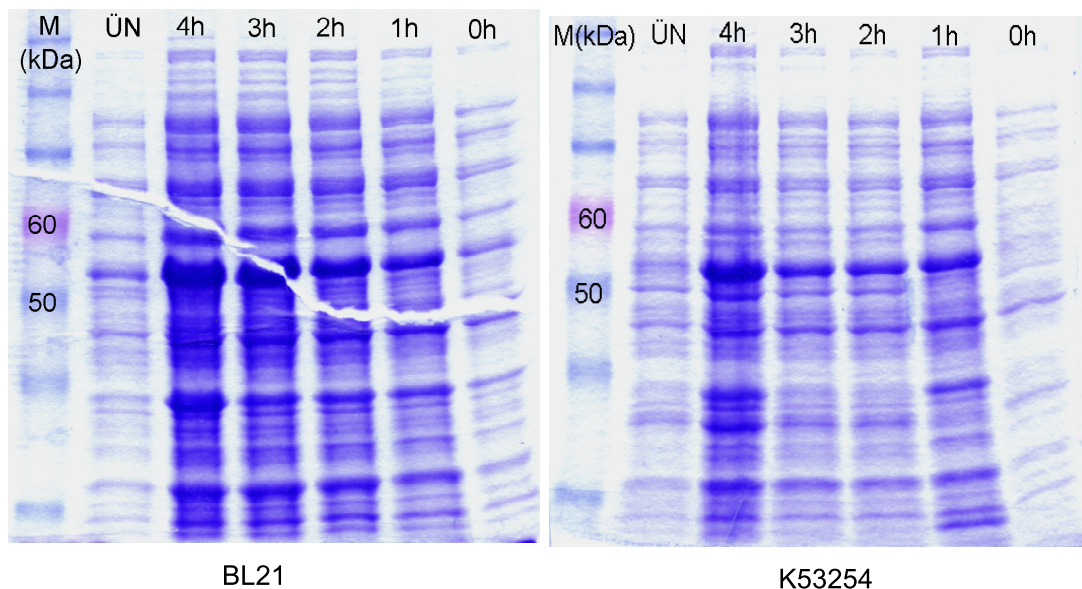


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf der Proteinexpression in Bakterien: Gezeigt ist hier die Gesamtheit der von den Bakterien exprimierten Proteine. Aber auch hier ist schon die deutliche Zunahme der Proteinmenge zu sehen, die dem Molekulargewicht des Zielproteins von etwa 52 kDa entspricht. ÜN steht für 'über Nacht', M(kDa) steht für Marker und dessen Einheit. Ferner ist die Zeit in Stunden angegeben nach dem Expressionstart durch die Zugabe von IPTG. Die genauen Werte für die angegebenen Marker-Banden ( $50$  und  $60$ ) sind  $MW_1 = 50.8$  kDa und  $MW_2 = 61.5$  kDa.

Die Verläufe bei den anderen Bakterien (B21Lys3, GF196) zeigen nur eine recht schwache Expression des (wahrscheinlichen) Zielproteins, daher werden diese Stämme nicht mehr weiter analysiert. Die hier als ÜberNacht-Probe bezeichneten Spalten (ÜN) zeigen das Expressionsmuster, das ohne die Initiierung der Expression mit IPTG auftritt. Es stellt also die sogenannte Nullmessung des Systems dar. Bei dem Vergleich der Spalten ÜN und 4h wird insbesondere beim Bakterium BL21 deutlich, wie stark Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa  $MW_1 = 53$  kDa durch die Zugabe von IPTG exprimiert werden. Dieser Befund stellt zwar ein Indiz für die Expression des gewünschten Proteins dar, aber keinen Beweis.

Auf dieser Stufe der Analyse muß man noch vorsichtig mit der Interpretation bzgl. der Expression des richtigen Proteins sein. In dieser Phase werden auch alle bakteriellen Proteine mitdetektiert, die ebenfalls durch die IPTG-Initiierung höher exprimiert werden. Dies wird in der Abbildung (4.6) auch auf dem Molekulargewichtsniveau über und unter 50 kDa deutlich.

Ein Vergleich mit dem Molekulargewicht des  $\beta$ -Oestrogenrezeptors (Tabelle 4.1) zeigt nur die Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht der hier detektierten Proteine. Dieses

Experiment zeigt erstens, daß es eine deutlich erhöhte Proteinexpression gibt, hier sogar auf dem richtigen Molekulargewichtsniveau. Zweitens scheint das Fremdprotein auf das Bakterium nicht toxisch zu wirken. Drittens schränkt es die weitere Analyse auf zwei erfolversprechende Bakterienstämme ein.

#### 4.1.4 Proteinaufreinigung

Das Ziel der Aufreinigung ist das Isolieren des überexprimierten Fremd-Proteins von denen, die vom Bakterium normalerweise exprimiert werden. Man möchte idealerweise ein Eluat, am Ende des Verfahrens haben, in dem sich nur noch das Zielprotein befindet.

Die Aufreinigung der Proben erfolgt über die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie [54]. Bei diesem Verfahren macht man sich den sogenannten N-Terminalen His-Tag des rekombinaten Proteins zunutze. Der His-Tag besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, die dem Protein N-Terminal durch den Expressionsvektor angehängt werden (vgl. Abschnitt 3.4.3). Dieses künstlich erzeugte 'Ende' des Proteins wird auch bei der spezifischen Proteindetektion mit entsprechendem Antikörper (Western Blot) genutzt.

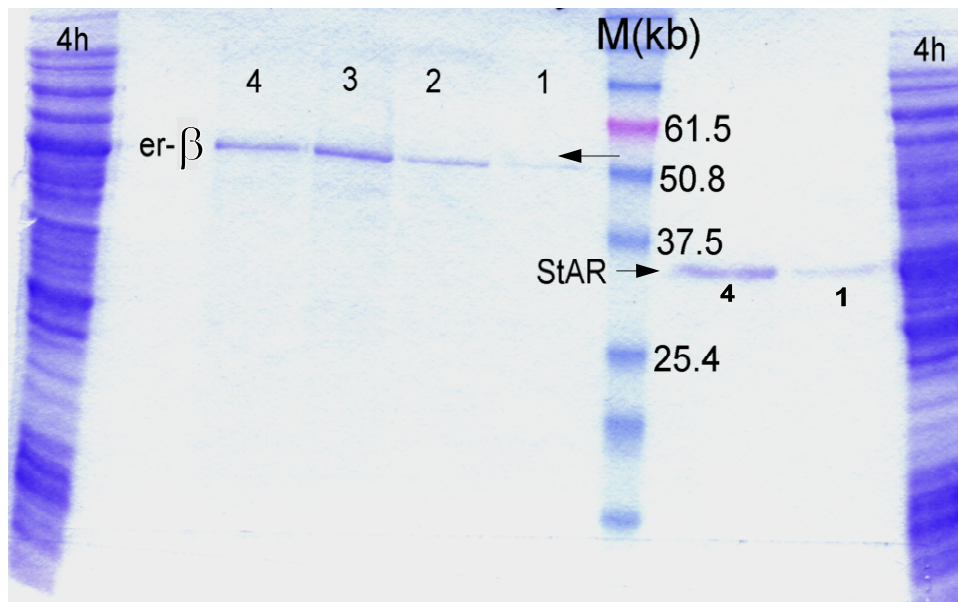


Abbildung 4.7: Proteinaufreinigung: Gezeigt ist das Ergebnis der Aufreinigung des Oestrogenrezeptors (links, 52 kDa) und die Aufreinigung des Proteins StAR. Eine detaillierte Beschreibung findet sich im Text.

Als Ausgangsmaterial dienten die pelletierten Proben der Bakterien BL21 sowie K5254, die am Ende der Expression (4h) – vgl. Abb.(4.6) – genommen werden. Das Pellet einer Expressionskultur wurde 5-fach konzentriert im Lysispuffer aufgenommen (z.B. Pellet einer 10 ml Kultur in 2 ml aufnehmen). Nach dem darauffolgenden Aufschluß durch eine Ultraschallbehandlung wird die Suspension zentrifugiert. Der Überstand wird mit *Ni*-NTA<sup>4</sup> Agarose (QiaGen) bei 4 °C für eine Stunde auf dem Rotator inkubiert. Durch diese ständige Durchmischung wird eine hohe Bindungseffizienz des rekombinaten Proteins an

<sup>4</sup>*Ni*-NTA: Nickel-Nitrilotriaceticacid.

die *Ni*-NTA Agarose erreicht. Danach schliessen sich einige Waschschriffe und die fraktionierte Elution der Proteine an. Dies wurde nach Maßgabe des Herstellers der *Ni*-NTA Agarose – QiaGen – durchgeführt. Bei der Durchführung der Elution der Proteine ist auf die genaue Erfüllung der Herstellerangaben zu achten, um die maximale Proteinmenge zu erhalten. Bei jeder Stufe der Elution wird die Imidazole-Konzentration erhöht, beginnend bei 0.1 M, um je 0.1 M bis 0.5 M. Die einzelnen Fraktionen des Eluats werden wieder in einem SDS-PAGE-Gel analysiert. In der Abbildung (4.7) ist das Coomasie gefärbte, getrocknete Gel zu sehen.

Ein Vergleich der Spalten 4h (Ausgangsmaterial) und Eluate 4 (spezifische Elution), der Abbildung (4.7) zeigt, daß es mit diesem Verfahren gelang: i) den Oestrogenrezeptor spezifisch anzureichern (s. Western Blot, Spur 10) und ii) den zellulären Hintergrund in der spezifischen Elutionsfraktion praktisch vollständig zu eliminieren (vgl. Proteingel 4.6, Spalte 4h).

## 4.2 DNA-Oligonukleotide Herstellung

Für die Herstellung der doppelsträngigen DNA werden HPLC-aufgereinigte DNA-Einzelstränge von MWG Biotec (Ebersberg) oder NAPS (Göttingen) bezogen. Einer der komplementären Einzelstränge ist mit Tetramethylrhodamine<sup>5</sup> (vgl. 4.12) am 5'-Ende mittels einer C<sub>6</sub> Aminoalkyl-Verbindung markiert. Das markierte DNA-Fragment ERE-1 besitzt exakt zwei Bindungsstellen für den Oestrogen-Rezeptor, die durch drei Nukleotide getrennt sind, wie in Abbildung 4.8 gezeigt. Die drei trennenden Nukleotide können fast in beliebiger Reihenfolge angeordnet werden, müssen jedoch die Maßgabe erfüllen, daß kein Nukleotid doppelt vorkommen darf. Die Bindungsstelle bildet ein sogenanntes Palendrom, d.h. die Bindungssequenz wiederholt sich nach den drei beliebigen Nukleotiden 'NNN' in komplementär umgekehrter Reihenfolge. Dieses Bindungsmotiv ist typisch für die Bindungsstellen nuklearer Rezeptoren an die DNA.

Nach der Bestimmung der Konzentration der erworbenen einzelsträngigen Oligonukleotide werden beide 1:1 gemischt. In der Regel wird von jedem DNA Strang jeweils 20 µl genommen, sowie eine NaCl Konzentration von 180 mM (final) eingestellt. Die Erhöhung der Ionenstärke durch die Zugabe von NaCl vermindert unspezifische Bindungen zwischen den einzelsträngigen Oligonukleotiden. Die Oligolösung werde nach der Durchmischung auf 95 °C erhitzt, somit stellt man sicher, daß nur noch Einzelstränge in der Lösung vorliegen. Nun schließt sich eine langsame Abkühlungsphase –meist über Nacht durchgeführt– auf Raumtemperatur an. In diesem Schritt bilden sich die doppelsträngigen komplementären DNA-Oligonukleotide aus, wie sie auch in der Abbildung 4.8 gezeigt sind.

Um nur die 'gewünschten' DNA-Oligonukleotide in einer Stammlösung zu haben, müssen diese analysiert und selektiert werden. Dies geschieht über Acrylamid-Gele und dem Aufreinigen der aus dem Gel ausgeschnittenen Fragmente. In diese Form gebracht, werden die DNA-Oligonukleotide in den Bindungsstudien mit dem FCS-Gerät, bzw. in der BS-Gel-Analyse eingesetzt.

---

<sup>5</sup>Tetramethylrhodamine (TMR) wird für die Markierung der DNA-Oligo's verwandt, da es leicht an diese zu synthetisieren ist. Wichtig für die Bindungsstudien ist das geringe Molekulargewicht  $MW_{TMR} = 608$  g/mol.

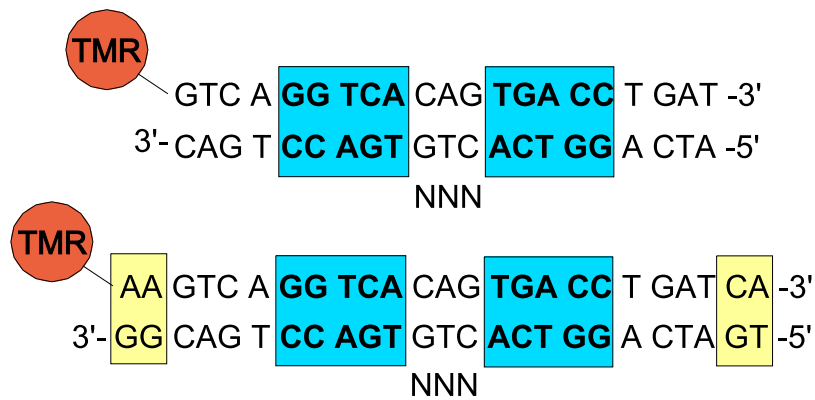


Abbildung 4.8: DNA-Oligonukleotid, das für die Bindungsstudien verwendet wurde. Die blau unterlegte Sequenz stellt die Bindungssequenz (DBD) für den Oestrogenrezeptor dar. Die gelb unterlegte Sequenz zeigt die hinzugefügten Nucleotide des Oligo ERE-25bp (MW = 17.122 Da) zu dem Oligo ERE-21bp (MW = 14.508 Da). Es sind zwei Bindungsstellen zu sehen, die durch eine kurze Sequenz –auch 'Spacer' genannt– getrennt sind. Dieses Motiv ist typisch für hetero- oder homogene Bindungen von Rezeptoren an die DNA. Die NNN-Sequenz steht für je eine Nucleotide. Die Wahl ist jedoch nicht beliebig, da sie einen Einfluss auf die Bindung hat.

## 4.3 Bandshift-Assay

Der Bandshift-Assay (BS-Assay, kurz BS), im folgenden nur noch als BS bezeichnet, ist eine alte und etablierte Methode Moleküle nach ihrer Größe zu trennen. Dies ist die Kernaussage des Experiments. Je nachdem wie das Experiment aufgebaut ist, können mit dieser Methode auch Bindungsstudien zwischen Molekülen durchgeführt werden, worauf hier der Fokus liegt. In dem Wort 'Bindungsstudien' verbirgt sich eine immense Anzahl von Experimenten. Hier sei nur eine kleine Auswahl angesprochen: DNA-DNA-, Hormon-DNA-, Protein-DNA, RNA-DNA-, Hormon-Protein-DNA-Bindung... die Liste könnte noch lange fortgesetzt werden. Wie man sieht, ist die Methode in sehr vielen Bereichen einsetzbar. Jedoch hat sie einen entscheidenden Nachteil: Sie ist zeitaufwendig und die Ergebnisse sind nicht direkt elektronisch erfassbar. Dieser Vergleich gilt natürlich nur in Bezug auf die FCS-Technologie. Ein weiterer Nachteil ist das Hantieren mit Acrylamid; diese Substanz ist hochmutagen. Dennoch bietet die Methode, nach wie vor, in vielen Bereichen das Mittel der Wahl. Ein oft entscheidender Vorteil des BS ist die Unkompliziertheit und Einfachheit der Methode, und nicht zuletzt ist sie sehr kostengünstig.

### 4.3.1 Aufbau des BS-Systems

Der BS ist ein gelgestütztes System. Um das Gel herstellen zu können müssen zwei Glasplatten mit Abstandhalter zusammengebaut werden. Beim 'Zusammenbau' ist peinlich auf die Sauberkeit der Glasplatten zu achten. Mit dem Abreiben der Platten mit 70%-igem Alkohol entfernt man alle eigenfluoreszenten Moleküle, die das Ergebnis der Gelaufnahme verfälschen könnten oder, im schlimmsten Fall, einfach nur eine schwarze Fläche erzeugen. Leider lassen sich auch durch intensives Putzen nicht immer alle Verunreinigungen beseitigen, was dann meistens zur Folge hat, daß der Versuch wiederholt werden muß. In der Abbildung (4.9) ist schematisch der Aufbau zum Gießen des Gels gezeigt. Die noch flüssige Gellösung wird langsam unter Vermeidung von Luftblasen in den Zwischenraum



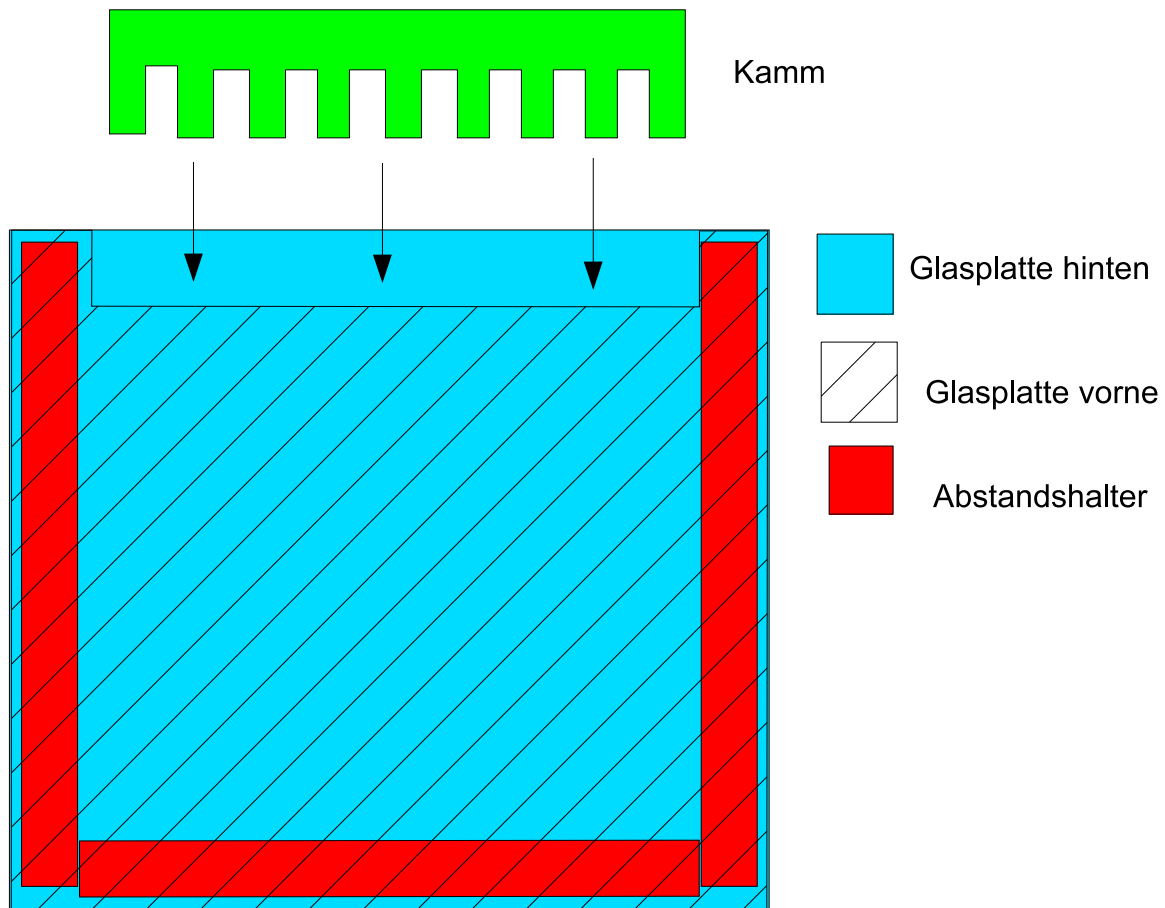


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Glasplattenaufbau für eine BS.

der Glasplatten gefüllt. Ist der Zwischenraum restlos gefüllt wird der Kamm von oben zwischen die Platten geschoben. Der Kamm erzeugt die 'Taschen' im Gel um die Proben einzufüllen.

Nach etwa einer halben Stunde ist die Polymerisierung abgeschlossen und das fertige Gel kann verwendet werden. Hierfür wird der untere Abstandshalter sowie der Kamm entfernt und, mit dem U-förmigen Glasausschnitt nach innen, mit Klammern an der Gelapparatur befestigt. Nach dem Auffüllen der Pufferreservoirs können die Proben in die Taschen pipetiert werden. Mit dem Anlegen der Spannung an die Pufferreservoirs wird der Versuch gestartet. Das dadurch erzeugte elektrische Feld erzwingt, die Migration der Proben in das Gel. Nach typischerweise einer Stunde, bei einer Spannung  $U=250V$ , haben sich die im Gel nach ihrer Größe unterschiedlich schnell migrierenden Moleküle weit genug separiert, um eine Auswertung vornehmen zu können.

Die Abbildung (4.10) zeigt exemplarisch das via Scanner aufgenommene Gel. Deutlich sind hierbei die einzelnen Taschen (oben) zu sehen in die die Proben eingebracht werden. Ferner sieht man die Banden auf unterschiedlicher Höhe. Vergleicht man die Spalte 1 mit der Spalte 3 so ist sehr schön zu erkennen, daß die Banden auf gleichen Höhen detektiert werden, jedoch in unterschiedlicher Intensität. Beide Proben unterscheiden sich nur in Konzentration des an die DNA bindenden Proteins. Dies ist so zu interpretieren, daß bei einer bestimmten Anzahl von Molen nur eine feste Menge an die DNA bindet. Somit ist

man also in der Lage die Bindungskonstante dieses Prozesses zu berechnen. Dies ist mit der Kenntnis der Konzentration des Produkts wie des Edukts möglich, wie im Abschnitt (3.5) gezeigt.

### 4.3.2 Auswertung der BS-Gele

Der erste Teil der Auswertung dieser 'Aufnahmen' (Abb. 4.10) erfolgt mit dem Programmpaket *Image Quant*. Mit diesem Programm lassen sich die Intensitäten der einzelnen 'Banden', die auf den Aufnahmen zu sehen sind, bestimmen. Nimmt man nun einen linearen Zusammenhang zwischen der Intensität und der Anzahl der fluoreszierenden Moleküle an, so läßt sich die Konzentration der verschiedenen Banden durch einfachen Dreisatz ermitteln. Die Intensität  $I(x, y)$  wird über den markierten Bereich integriert und der Untergrund der pro Pixel gemessen wurde, wird abgezogen.

$$I_{bd}(x, y) = \sum_{y=1}^M \sum_{x=1}^M [f(x, y) - \text{Untergrund}] \quad \text{Untergrund} = bg \quad (4.1)$$

Nun werden die 'Intensitätsvolumina' aller in einer Spalte detektierbaren Banden auf ihre Summen normiert, wodurch man die prozentualen Anteile erhält. Unter einer weiteren Annahme, der Erhaltung der Anzahl der fluoreszierenden Moleküle, sind die errechneten prozentualen Anteile auch gleichzeitig die Anteile der Mole von der Gesamtmenge dieser Moleküle. Mit dem weiteren Schritt der Übertragung der Mole auf die Konzentrationen erhält man aus diesen mit der Gleichung (3.66) für die Bindungskinetik die Gleichgewichtskonstante  $k_D$ . Die Gleichung zur Bestimmung des  $k_D$ -Werts läßt sich somit wie folgt schreiben, womit wir auch im zweiten Teil der Auswertung angekommen sind.

$$k_d = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{\sum_A [f(x, y) - bg] \sum_B [f(x, y) - bg]}{\sum_{bd} \sum_{y=1}^M \sum_{x=1}^M [f(x, y) - bg]} \quad (4.2)$$

Die Summe A bzw. B beschreibt die Summation über die jeweilige Bande. Die Summe im Nenner beschreibt die Summation über alle detektierbaren Banden und wird dann mit der Anzahl der detektierbaren also fluoreszierenden Moleküle gleichgesetzt. Die Reaktion findet hier zwischen dem Oestrogenrezeptor  $\alpha$  und einem DNA-Oligomer statt. Sehr schön ist der DNA-Komplex (obere Bande) und die freie DNA (unten) zu sehen. Alle in dieser Arbeit präsentierten Daten aus BS wurden mit dieser Methode ausgewertet.

Nun noch ein paar Worte zur Bestimmung des Untergrunds. Dieser wird mit einer Standardprozedur aus den Intensitäts-Histogrammen bestimmt. Hierzu werden die Intensitäten  $I(x, y)$  an den Orten  $(x', y')$  von beliebig ausgewählten Bereichen über die Häufigkeit aufgetragen. Dieses Vorgehen liefert im allgemeinen, d.h. bei einem gleichmäßigen Untergrund gute Korrekturen. Bei einem sehr inhomogenen Untergrundsignal werden mehrere verschiedene aber gleich große Bereiche ohne eine sichtbare Bande zur Bestimmung genutzt. Auch hier werden die Intensitätswerte in einem Histogramm aufgetragen. Die jeweiligen Mittelwerte liefern dann die Untergrundkorrektur, wie sie in der Gleichung (4.2) Eingang finden. Die Anfangs getroffene Wahl von gleich großen Bereichen für die Bestimmung des Untergrunds ermöglicht, wie bei der Auswahl gleich großer Bandenbereiche, den Verzicht auf eine nachträgliche Flächennormierung.

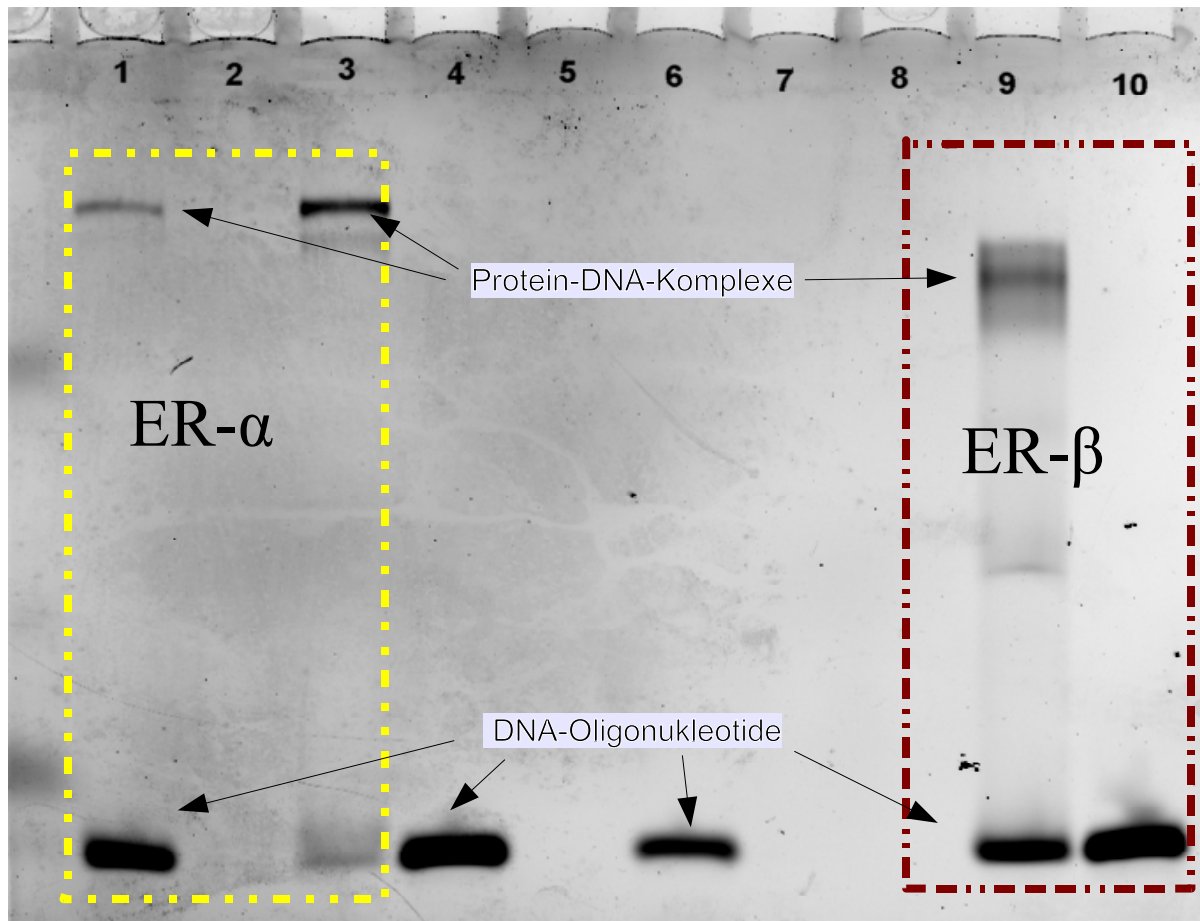


Abbildung 4.10: Ein typisches Ergebnis eines Bandshift-Experiments, aufgenommen mit dem *Typhoon* Scanner. Der linke gelbe Bereich zeigt die Banden des ER- $\alpha$  Experiments. Der rechte rote Bereich zeigt das Ergebnis des ER- $\beta$  Experiments. Deutlich ist die geringe Migrationstiefe des  $\alpha$ -Komplexes im Vergleich zum  $\beta$ -Komplex zu sehen. Dieses Ergebnis ist aufgrund des Molekulargewichtsunterschieds zu erwarten.

## 4.4 Einzelmolekül-Spektroskopie

## 4.5 Datenauswerte-Verfahren

Die Meßdatenanalyse wird mit einem selbstentwickelten Programm durchgeführt. Die nichtlineare Anpassung einer Funktion an die Daten beruht auf einer Standardimplementierung [61]. Das Fit-Verfahren wurde unabhängig von Levenberg [62] und Marquardt [63] entwickelt und zielt auf die Minimierung der Summe der Fehlerquadrate ( $\chi^2$ ). Als Maß für die Güte der Anpassung einer Funktion an die Daten wird der  $\chi^2$ -Test verwandt. Vergleicht man einen Datensatz  $[x_i, y_i, \sigma_i]$ , der aus  $N$  Elementen besteht, mit einer Modellfunktion ( $y = y(x; \mathbf{a})$ ), die diese Daten beschreiben soll, so berechnen sich die Fehlerquadrate zu:

$$\chi^2(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^N \left[ \frac{y_i - y(x_i; \mathbf{a})}{\sigma_i} \right]^2 \quad (4.3)$$

Bei der Gleichung (4.3) wird das gemessene Wertepaar durch  $(x_i, y_i)$  beschrieben, hier  $(\tau, G_\tau)$ . Die Abweichung der Daten an der  $i$ -ten Stelle wird durch  $\sigma_i$  ausgedrückt. Die mit Gleichung (4.3) erhaltenen Fehlerquadrate beschreiben die Abweichung der Modellfunktion von den Daten in Abhängigkeit vom ermittelten Parametersatz  $\mathbf{a}$ . Um eine möglichst perfekte Beschreibung der Daten durch die Modellfunktion zu erhalten fordert man, daß das  $\chi^2$  möglichst zu minimieren ist [64, 65]. Durch dieses Verfahren kann der Parametersatz  $\mathbf{a}$  der Modellfunktion bestimmt werden, der die Daten am besten beschreibt. Der Vorteil dieses Algorithmus ist seine schnelle und exakte Konvergenz.

Wendet man diesen Formalismus auf die in Abschnitt 3.1.2 entwickelte AKF  $G(\tau)$  an, so erhält man folgende Gleichung für die Berechnung des  $\chi^2$ . Es ist die Summe der quadratisch gewichteten Differenzen zwischen der experimentellen  $G^E(t)$  und theoretischen  $G^E(t, \mathbf{a})$  AKF mit der Anzahl der gemessenen Datenpunkte  $t_i$  mit  $i = [1, \dots, N]$ .

$$\chi^2(\mathbf{a}) = \sum_{i=1}^N w(t_i) [G^E(t_i) - G^E(t_i, \mathbf{a})]^2 \quad (4.4)$$

wobei  $\mathbf{a} = [k, G_0, G_1, \tau_{tri}, R_1 \dots R_M, \tau_{diff_1}, \dots, \tau_{diff_M}]$  den Vektor der unbekannt Parameter,  $N$  die Anzahl der Meßpunkte und  $w_i(t)$  den Wichtungsfaktor darstellt [66, 67].

Die für die jeweilige Auswertung verwendete Formel ist eine Möglichkeit aus der Formelschar, wie sie Gleichung (3.47) darstellt. Sie läßt sich leicht an die experimentelle Fragestellung anpassen. Die folgende Gleichung ist aus Gleichung (3.47) entwickelt.

$$\begin{aligned} G(\tau) = & 1 + G_1 + G_0 \left\{ 1 - T_{tri} \left[ 1 - \exp \left( \frac{\tau}{\tau_{tri}} \right) \right] \right\} \\ & \cdot \left\{ (1 - R_2 - R_3) \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff_1}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff_1}}}} \right. \\ & \left. + R_2 \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff_2}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \delta_{k_{diff_2}} k \frac{\tau}{\tau_{diff_2}}}} + R_3 \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff_3}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \delta_{k_{diff_3}} k \frac{\tau}{\tau_{diff_3}}}} \right\} \quad (4.5) \end{aligned}$$

Diese Gleichung berücksichtigt drei verschiedene fluoreszierende Komponenten mit den dazugehörigen Diffusionszeiten  $\tau_{diff}$  und ihre Anteile an der Gesamtteilchenzahl  $R_2, R_3$

und  $R_1 = (1 - R_2 - R_3)$ . Der Triplettanteil  $T_{tri}$  und die Triplettzeit  $\tau_{tri}$  wird für alle Komponenten gleich bestimmt. Mit dem Parameter  $\delta_{k_{diff_i}}$  läßt sich das Volumenmodell für jede Komponente entkoppeln. Die möglichen Werte für  $\delta_{k_{diff_i}}$  liegen zwischen Null und Eins ( $\delta_{k_{diff_i}} \in [0, \dots, 1]$ ). Mit dieser Definition des Parameters kann für die erste Komponente ein dreidimensionales, Gaußförmiges Diffusionsmodell angenommen werden und für die anderen eine Kopplung an dieses  $k = 1$  oder ein zweidimensionales Modell  $k = 0$  Berücksichtigung finden. In der Analyse der Daten wird nur ein Teil der hier dargestellten möglichen Parameter ausgewertet, da sich trotz logarithmischer Zeit-Darstellung nicht alle Strukturwerte eindeutig definieren lassen. Zur Übersicht werden in der Tabelle (4.2) alle wesentlichen Parameter der AKF  $G(\tau)$  zusammengefaßt. Anzumerken ist hier

Beschreibung		Parameter	typ. Werte
Triplettanteil	[%]	$T_{tri}$	15 – 20
Triplettzeit	[ $\mu$ s]	$\tau_{tri}$	2 – 6
mittlere Teilchenzahl		N	0,4 – 6
Radienverhältnis		r	2 – 8
Anteil der Teilchenart i		$R_i$	0 – 1
Diffusionszeit	[ $\mu$ m]	$\tau_{diff_i}$	30 – 1000

Tabelle 4.2: Zusammenstellen der typischen Parameterwerte der AKF  $G(\tau)$ .

der Zusammenhang zwischen den Radienverhältnisparametern  $r$  und  $k$ ;  $r = \frac{1}{\sqrt{k}}$ . Die Definition beider Radienverhältnisse  $r$  und  $k$  erlaubt bei der Benutzung des Parameters  $k$  ein übersichtlichere Schreibweise der AKF.

Die Schwierigkeit in der Parameterbestimmung der dem Experiment angepaßten Funktion, liegt in der Auswahl der 'richtigen Anfangswerte'  $\mathbf{a}_0$ . Dies wird bei einer genaueren Betrachtung der Funktion und der Auswirkung der Parameter deutlich. Um eine gute Anpassung der Funktion an die Daten zu erhalten muß prinzipiell eine Voranalyse durchgeführt werden. Diese unterteilt sich in eine automatisierte Analyse, die bei einfachen Systemen gute 'Startwerte' liefert. Zum anderen werden Daten aus Referenzmessungen verwandt, um die Startwerte zu vergleichen und so bessere Anfangswerte zu bekommen. Bei einer Mehrkomponentenmessung ist es unumgänglich eine aufwendige Voranalyse durchzuführen, da sich diese Funktionen nur schlecht automatisiert anpassen lassen. Das der Auswertekarte (ALV) beigefügte Simulations-Programm leistet für eine ausgedehnte Voranalyse wertvolle Dienste.

#### 4.5.1 Simulation der Autokorrelationsfunktion

Um die Funktion  $G(\tau)$ , vgl. Gleichung (4.5), anschaulich zu machen, wurden die Auswirkungen der vielen Parameter auf die Form der Kurve simuliert. Der Simulation wurden folgende Standard-Parameter zugrunde gelegt:

$$N = 1; \quad k = 0.04; \quad T_{tri} = 15\%; \quad \tau_{tri} = 2\mu\text{s};$$

$$\tau_{diff_1} = 50\mu\text{s}; \quad \tau_{diff_2} = \tau_{diff_3} = 0\mu\text{s}; \quad R_2 = R_3 = 0;$$

Die Abbildung (4.11) stellt die Ergebnisse der Simulation der verschiedenen Parameter dar. Für das Teilbild (4.11 a ) wurde der Triplettanteil für die Werte  $T_{tri} = 0, 10, 20, 30, 40\%$  berechnet. Es ist zu erkennen, daß sich diese Variation nur im Bereich kleiner  $\tau$ -Werte auswirkt. Bei der Variation der Diffusionszeit (4.11 b ) hat diese eine Verschiebung der Kurve zu größeren  $\tau$ -Werten zur Folge. Die Kurve werden für  $\tau = 10 \mu s, 100 \mu s, 1 ms, 10 ms$  simuliert. In der nächsten Teilgraphik (4.11 c ) ist die Veränderung der Kurve bei der Variation des Radienverhältnisses  $k$  gezeigt. Dieser Faktor beschreibt das Detektionsvolumen. Die Form der Kurve bleibt auch für die Spezialfälle  $k = 0$  und  $k = 1$  fast konstant.

Die Variation des Anteils der Teilchen einer Sorte, werden in dem Schaubild (4.11 d ) dargestellt. Der korrespondierende Parameter hierfür ist  $R_2$  (vgl. Gleichung 4.5).  $R_2$  wird in einem Bereich von  $R_2 = 0\%, 20\%, 50\%, 80\%, 100\%$  dargestellt. Auf eine Variation des Parameters  $R_3$  wird verzichtet, da diese keine weitere Information liefern würde.

Das vorletzte Teilbild (4.11 e ) weist die Variation der Konzentration der Teilchen auf. Die Teilchenzahl  $N$ , die im Detektionsvolumen 'gesehen' wird, wird damit geändert. Deutlich ist die Antwort der AKF im Verschieben des Schnittpunktes mit der  $y$ -Achse zu sehen. Je größer der Wert des  $y$ -Achsen-Abschnittes ist, desto größer ist auch die Konzentration im Detektionsvolumen. Im letzten Teilbild (4.11 f ) wurde nun die Anzahl der Komponenten variiert. Es wurde eine Komponente, zwei Komponenten und drei Komponenten simuliert. Der Unterschied zwischen einer Komponente und zwei Komponenten ist am deutlichsten beim Vergleich mit der AKF ist dieses Ergebnis leicht nachzuvollziehen.

Dieses Simulationsprogramm wurde eine wichtige Hilfe zum Auffinden der Parametrisierung der Korrelationsdaten sowie bei der ersten Einschätzung der Messung.

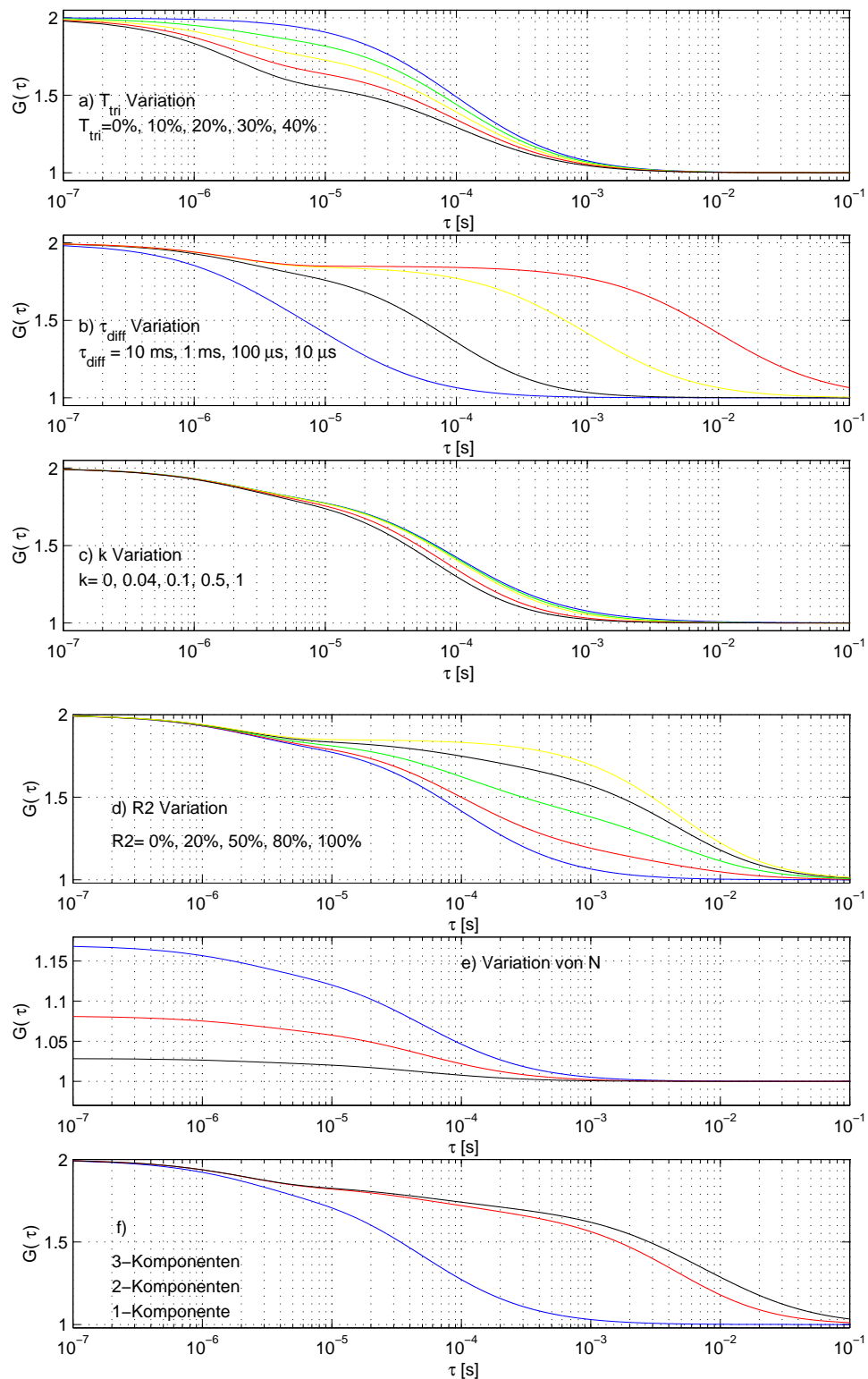


Abbildung 4.11:  $G(\tau)$  in Abhängigkeit der Variation der Parameter. a) Variation des Tripletanteil; eine zu große Laserleistung führt unter anderem zu einer Erhöhung des Tripletanteils, was die 'sichtbaren' Teilchen verringert. b) Variation der Diffusionszeiten; hierdurch bekommt man eine 'Gefühl' für die zu messenden Teilchen. c) Variation des Radienverhältnisparameters  $k$ ; der Einfluß auf die Messung ist relativ gering. d) Variation des Anteils der zweiten Komponente ( $R_2$ ). e) Variation der Teilchenzahl  $N$  im Detektionsvolumen und damit der Konzentration der Teilchen. f) Variation der Anzahl der Komponenten. Weitere Details finden sich im Text.

## 4.5.2 Meßdurchführung

### Vorbereitung

Um eine Messung durchführen zu können, müssen zunächst die Laser angeschaltet werden. Danach werden der Reihe nach das FCS-Steuerungsmodul nebst Schrittmotoren, die CCD-Kamera und zuletzt der Steuerungs-PC angestellt. Diese Abfolge des Anschaltens ist wichtig, da einige der Geräte doch sehr hohe Einschaltströme verursachen, die den anderen Meßkomponenten schaden können. Insbesondere ist die Avalanche-Diode hierbei zu erwähnen. Nach einer Aufwärm- und Stabilisierungsphase wird die Laserleistung, die gaußförmige Ausleuchtung des Objektiv und grob die Lage des Fokus bestimmt.

Nach diesen ersten Schritten wird mit Hilfe der CCD-Kamera das Objektiv auf die Proben-trägerplättchendicke korrigiert. Mit dem Tetramethyl-Rhodamin (Abb. 4.12) in einer nanomolaren Lösung wird bei einer Leistung von  $P = 100 \mu\text{W}$  der Fokus etwa  $200 \mu\text{m}$  in die aufgetragene Probe gefahren.

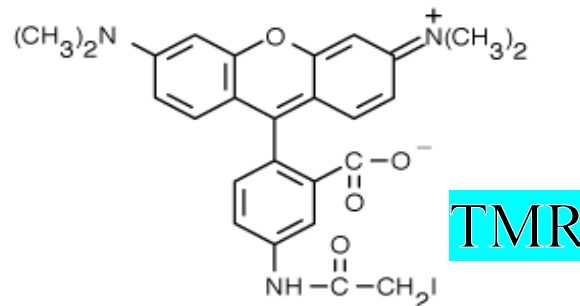


Abbildung 4.12: Die chemische Struktur von Tetramethyl-Rhodamin.

Nun kann auch die Pinhole-Justage bei zuvor gewähltem Pinhole-Durchmesser ausgeführt werden. Hierbei wird die Lage des Pinhole via Schrittmotoren in allen drei Raumrichtungen nacheinander variiert und die Zählrate detektiert. Diese Justage geschieht mittels Software und kann einige Minuten in Anspruch nehmen, da die jeweils gefundenen maximalen Zählraten nicht unabhängig von ihrer Richtung sind. Im allgemeinen müssen bei diesen Grundeinstellungen kaum größere Änderungen vorgenommen werden. Alle Messungen werden in einem leicht abgedunkeltem Raum durchgeführt, um die Ergebnisse nicht etwa durch reflektiertes oder gestreutes Licht zu verfälschen.

Bei einer Laserleistung von maximal  $P = 100 \mu\text{W}$  werden mit der oben erwähnten Rhodamin-Lösung die ersten Messungen durchgeführt. Die sich dabei ergebenden Korrelationskurven werden analysiert und mit den früher ermittelten verglichen. Gegebenenfalls wird durch kleine Korrekturen die Amplitude der Korrelation verbessert und das Detektionsvolumen weiter optimiert. Nachdem nun die optimalen Einstellungen gefunden wurden, werden mit der Rhodamin-Lösung einige Referenzmessungen durchgeführt. Für Rhodamin erhält man bei Raumtemperatur ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in Wasser eine Diffusionskonstante von  $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Dieser Wert wird in der Literatur bestätigt, vgl. [26].

### Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung beginnt mit der Festlegung des Ziels des Experiments und den daraus zu kombinierenden Komponenten. Nach dem Auftauen der Komponenten werden



sie, entsprechend den berechneten Mengen, in ein Probengefäß pipetiert. Hier verbleiben sie für fünf Minuten bei  $T = 25\text{ °C}$ , die mittels eines Wärmeblocks konstant gehalten werden. Nach dieser Inkubationszeit wird ein Teil der Probe, meist zehn  $\mu\text{l}$ , in die Probenkammern (vgl. Abb. 4.13) pipetiert.

### Durchführung

Nachdem die Proben in die Probenkammern pipetiert wurden, empfiehlt es sich diese fünf Minuten equilibrieren zu lassen. Dieser Schritt ist wichtig, damit Konzentrationsfluktuationen, die aufgrund von Oberflächenreaktionen verursacht werden, die Messung nicht beeinflussen. Nach dieser Equilibrierungszeit kann mit den ersten Versuchsmessungen begonnen werden. Hier werden die wichtigen Parameter, wie Triplettanteil (15% – 20%), Zählrate ( $> 100\text{kHz}$ ), das Radienverhältnis des Detektionsvolumen (4 – 10) sowie die  $\chi^2$ -Werte überprüft. Sind die Parameter in den in Tabelle (4.3) angegebenen Bereichen, und

Parameter	Werte	
Triplettanteil $T_{tri}$	[%]	15 – 20
Zählrate	[kHz]	$> 100$
Radienverhältnis k		4 – 10
Pinhole-Durchmesser $S_0$	[ $\mu\text{m}$ ]	30 - 40

Tabelle 4.3: Zusammenfassung der Standard-Parameterwerte.

weist die Intensitätsfluktuation keine abnormen Spitzenwerte auf, können die bisher gefundenen Einstellungen für die automatisiert ablaufende Messung benutzt werden. Im Falle großer Abweichungen von dem Standard-Parameter-Satz muß die Vorbereitungsprozedur nochmals für diese spezielle Probe durchgeführt werden. Zeigt hingegen die Fluktuationszeitreihe eine große Standardabweichung, muß die Probe nachbehandelt werden. Im allgemeinen läßt sich das Problem durch zentrifugieren der Probe und Verwenden des Überstandes beheben. Hierdurch entfernt man große und damit langsam diffundierende Molekül-Akkumulationen, die sehr große Intensitätsschwankungen hervorrufen. In der Abbildung (5.9) ist eine Messung gezeigt, die solch extreme Fluktuationen aufweist.

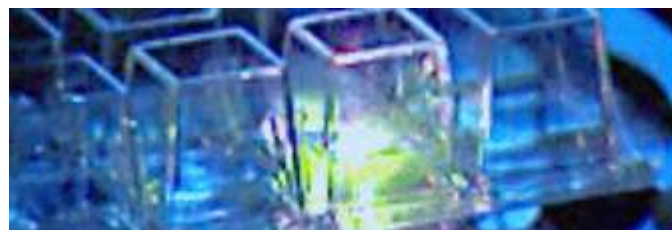


Abbildung 4.13: Blick auf die laser-illuminierte Probe. Deutlich sind die acht getrennten Probenbereiche zu sehen. Dies ist ein kleiner Ausschnitt der Abbildung (2.2).

Nach dieser letzten Überprüfung der Messung kann mit der automatisierten Messung begonnen werden. Diese Vorbereitungsroutine ist zwar oftmals lästig, da jedoch die Voreinstellungen des letzten Meßtages nicht geändert werden müssen, steht der Aufwand in

einem vertretbaren Verhältnis zu den Gesamtmeßzeiten, die einige Stunden betragen können. In der Abbildung (4.13) ist der Blick auf die laser-illuminierte Probe gewährt. Die nun folgenden Referenzmessungen mit Rhodamin werden bei einer Laserleistung  $P = 100\mu\text{W}$  (im Fokus) durchgeführt. Bleibt noch abschließend zu erwähnen, daß immer darauf geachtet werden muß, daß genügend reinst Wasser (entmineralisiertes Wasser) zwischen Objektivpupille und Objektträger vorhanden ist. Diese Wasserschicht sorgt für die annähernde Konstanz des Brechungsindex bis zur Probe. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die speziellen Abbildungseigenschaften der hier dargestellten konfokalen Mikroskopie.

# Kapitel 5

## Messungen und Diskussion

### 5.1 Systematische Studien des FCS-Systems

Um mit dem System verlässliche Daten zu bekommen, waren umfangreiche systematische Studien notwendig, die in der Folge dargestellt werden. Wichtig bei der Charakterisierung des FCS-Systems ist es, die Auswirkungen der vielen Parameter auf die reale Messung zu verstehen und beurteilen zu können. Speziell wurden die Auswirkungen der Geräte-Parameter, wie der Lochblendendurchmesser sowie die Meßdauer und die Anzahl der Messungen, auf die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten und deren Genauigkeit untersucht. Ferner wurde die Auswirkung der Fokusposition in Abhängigkeit der Zählrate, wie in Abb. 5.1 gezeigt, untersucht. Deutlich ist hier der sprunghafte Übergang der Zählrate

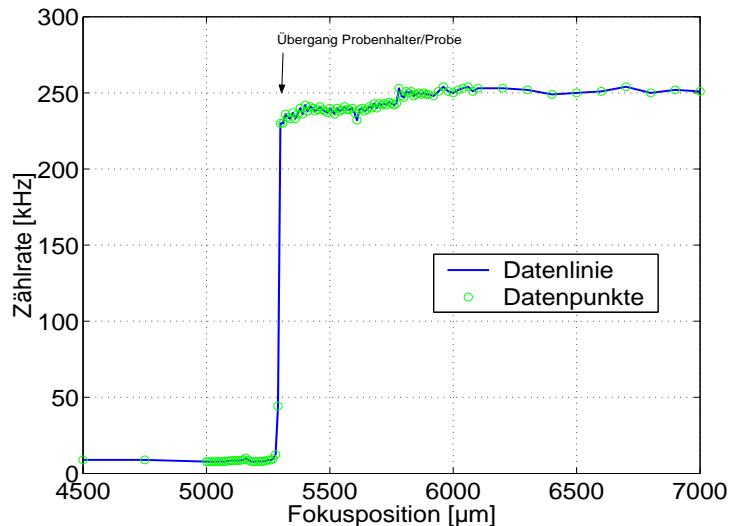


Abbildung 5.1: Zählrate in Abhängigkeit der absoluten Position des Laserfokus. Die Messung wurde mit dem Farbstoff TMR durchgeführt. Es wurden 10  $\mu\text{l}$  einer 5 nM Lösung untersucht.

beim Eindringen des Fokus in die Probe zu sehen. Die Fokusposition ( $z = 5293\mu\text{m}$ ), an dem die Zählrate sprunghaft ansteigt, stellt den Übergang zwischen der Probenbox und der Probe dar. Dies konnte über die Veränderung des Beugungsbilds, das bei Änderungen der Brechzahl beim Übergang Probenbox/Luft entsteht, sprich ohne Probe, ebenfalls bestätigt werden. Die Messung macht deutlich, daß die Wahl des Laserfokus 200  $\mu\text{m}$  ober-

halb dieser Sprungposition immer ausreichend ist, um im Maximum der Zählrate messen zu können. Ein weiteres 'Hineinfahren' in die Probe würde keine verbesserte Zählrate ergeben.

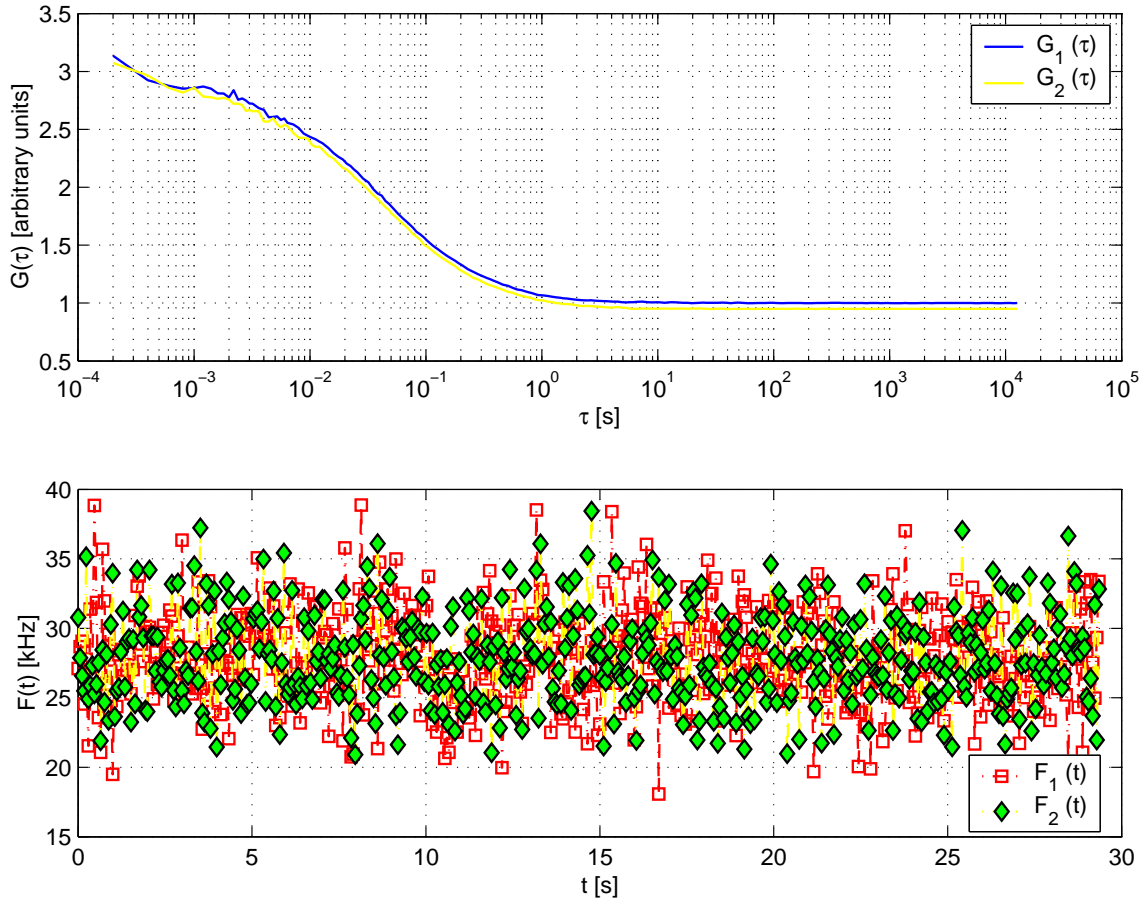


Abbildung 5.2:  $G(\tau)$ : typischer Verlauf der Autokorrelationsfunktion für den Farbstoff TMR, aufgetragen in einer halblogarithmischen Darstellung. Die zweite Kurve wurde um  $G_\tau = -0,1$  verschoben, um sie noch sichtbar zu machen (oben). Auftragung der zugehörigen Fluoreszenzmessungen zu obigen AKF (unten).

Die Graphik 5.2 zeigt den typischen Verlauf der Autokorrelationskurve. Grundlage der nachfolgend beschriebenen Analyse ist die einkomponentige AKF.

$$G(\tau) = 1 + G_0 \left\{ 1 - T_{tri} \left[ 1 - \exp\left(\frac{\tau}{\tau_{tri}}\right) \right] \right\} \cdot (R_1 \cdot \tau'_1) \quad (5.1)$$

$$\text{mit } \tau'_1 = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff1}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff1}}}}$$

Der Schnittpunkt mit der  $y$ -Achse ( $y' - 1$ ) spiegelt den Kehrwert der durchschnittlichen Teilchenzahl  $N$  im Detektionsvolumen wieder. Bei dieser Messung lassen sich die folgenden Werte ermitteln: die Teilchenzahl  $N = 0,2$  und deren Diffusionszeit  $\tau = 46,0 \mu\text{s}$ . Beide Werte liegen im Bereich der Standardmessungen für den reinen Farbstoff TMR. Als Standardmessung wird die Ermittlung der Diffusionszeit von TMR (Konzentration  $C = 5 \times 10^{-6} M$ ) bezeichnet. Sie dient vor jeder FCS-Messung als Eichung.

Zur weiteren Ermittlung der Meßparameter gehört die Bestimmung des Einflusses des Pinholedurchmessers. In Kapitel (3.1.6) wurde schon auf den Einfluß eingegangen. Die Größe des Pinholedurchmesser steuert wieviel Untergrundfluoreszenz die Avalancheodiode bzw. wieviel 'echtes' Signal die Diode erreicht. In der Abbildung (5.3) ist die Variation des Lochblendendurchmessers und dessen Einfluß auf die Diffusionszeit dargestellt. Die in der Abbildung eingetragenen Diffusionszeiten sind die jeweiligen Mittelwerte, bezogen auf den festen Lochblendendurchmesser. Die Messungen werden mit dem reinen Farbstoff (TMR) durchgeführt. Für die weiteren Messungen wird, falls nichts anderes angegeben wird, mit einem Lochblendendurchmesser  $d_{pin} = 35 \mu\text{m}$  gearbeitet. Bei diesem Durchmesser ist die Standardabweichung der gemessenen Diffusionszeit des Fluorophors am geringsten.

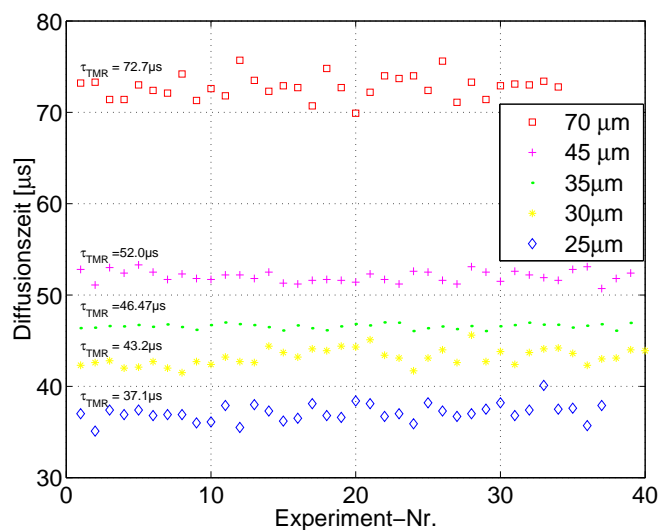


Abbildung 5.3: Einfluß des Pinholedurchmessers auf die Diffusionszeit. Die Messungen wurden mit dem Fluorophor TMR durchgeführt.

Wie die Abbildung 5.3 zeigt, ist der Einfluß des Lochblendendurchmessers auf die gemessene Diffusionszeit sehr deutlich. Dies liegt an den Abbildungseigenschaften, die das Signal durch die Veränderung des Lochblendendurchmessers erfährt.

Für die Abbildung 5.4 wurden insgesamt 1500 Einzelmessungen mit einer jeweiligen Meßzeit von 40 Sekunden analysiert und dargestellt. Daraus ließen sich die folgenden Werte ermitteln:

$$\tau = 46.06 \mu\text{s} \text{ und } D = 280.7 \pm 16.93 \mu\text{m}^2/\text{s}.$$

Sie stehen im Einklang mit den in (vgl. [68]) vorgestellten Werten. Die Berechnung der Diffusionskonstante wurde mit  $D = \frac{w_0^2}{4\tau_{diff}}$  (vgl. Gleichungen 3.32) durchgeführt. Die Werte der einzelnen Meßpunkte wurden simultan unter Verwendung des Marquardt-Algorithmus [63] ermittelt. Als Grad der Güte der Anpassung der Datenpunkte an die AKF (5.1) konnte der Fehlerquadratwert  $\chi^2 = 2.3 \times 10^{-5}$  bestimmt werden. Das Radien-Achsenverhältnis wurde dabei auf  $r = 6.5$  ( $r = \frac{1}{\sqrt{k}} \Rightarrow k = 0.024$ ) gesetzt.

Die durchgeführte Analyse lieferte noch weitere Werte, wie die mittlere Teilchenzahl im Detektionsvolumen  $N = \frac{1}{G_0} \frac{4}{3\sqrt{\pi}} = \frac{1}{G_0} 0.752 \approx 0.301$  und die Diffusionskonstante  $D = \frac{w_0^2}{4\tau_{diff}} = \frac{(0.226 \mu\text{m})^2}{4 \times 45.59 \mu\text{s}} \approx 280.7 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ . Aus der Teilchenzahl  $N$  läßt sich die Teilchendichte bestimmen  $\bar{C} = \frac{N}{V} = \frac{N}{\frac{4}{3}\pi w_0^2 z_0} \approx 1.24 \frac{\text{Teilchen}}{\mu\text{m}^3}$ . Dies läßt sich umrechnen in die Konzentration

des Farbstoffes  $\overline{C}_{mol} = 1.24 \frac{10^{15}}{N_{A11}} = 2.06 \frac{nMol}{l} = 2.06 \text{ nM}$ . Mit  $N_A$  ist hier die Avogadrozahl bezeichnet.

Die Ergebnisse im Überblick:

$$\tau = 46.06 \mu s; D = 280.7 \pm 16.93 \mu m^2/s; N = 0.301; \overline{C}_{mol} = 2.06 \text{ nM}; \chi^2 = 2.3 \times 10^{-5}$$

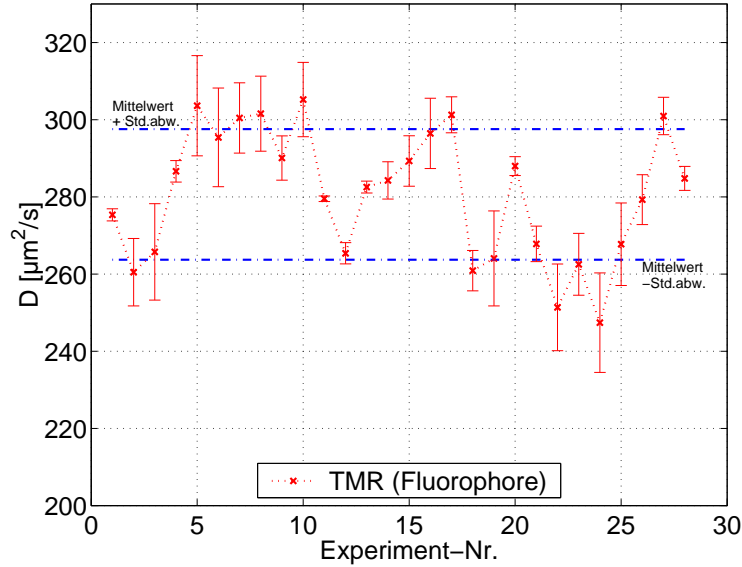


Abbildung 5.4: TMR-Diffusionskoeffizient Messungen: hier sind alle 1500 Eichmessungen gezeigt.  $\Rightarrow D_{TMR} = 280.7 \pm 16.93 \mu m^2/s$

In der Literatur (unter anderem in [26]) findet man einen Wert von  $D = 280 \mu m^2/s$ , die Standardabweichung wurde jedoch nicht angegeben. Mit der hier beschriebenen Meßanordnung konnte der Literaturwert bestätigt werden. Für weitere Analysen wurden die Ergebnisse aus den Messungen für die Abbildung 5.4 benutzt.

Die Graphik 5.5 zeigt die Abhängigkeit der Diffusionszeit  $\tau_{diff}$  von der Meßzeit der Einzelmessung. Nach einer Meßzeit von etwa 20 Sekunden erhält man keine Verbesserung des Meßwertes mehr. Die Vorteile der Messung, die sich durch die Statistik innerhalb der Messung ergeben, heben den Zugewinn an Meßgenauigkeit durch die Statistik aufgrund der Anzahl der Messungen auf. Diese Messungen in Abhängigkeit der Meßdauer pro Messung haben zwei Kernaussagen. Eine Kurzzeitmessung im Bereich unter einer Sekunde pro Messung liefert mit diesem Aufbau keine verlässlichen Daten. Im allgemeinen würde man eine zu große Diffusionszeit messen. Jedoch wäre es in Zukunft mit einer deutlich erhöhten Ausleserate, der APD, möglich, dieses Manko zu beseitigen. Letzten Endes ist die Messung aber durch die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen limitiert. Die andere Kernaussage der Messung ist, daß durch sehr lange Meßzeiten kein Zugewinn an Meßgenauigkeit zu erreichen ist. Diese Langzeitmessungen erscheinen also nur für Studien des Ausbleich- oder 'Blinking' -Verhaltens der Fluorophore sinnvoll. Die Messung zeigt, daß eine Meßzeit von etwa 20 Sekunden pro Messung zu einer Messung mit vertretbarer Standardabweichung führt.

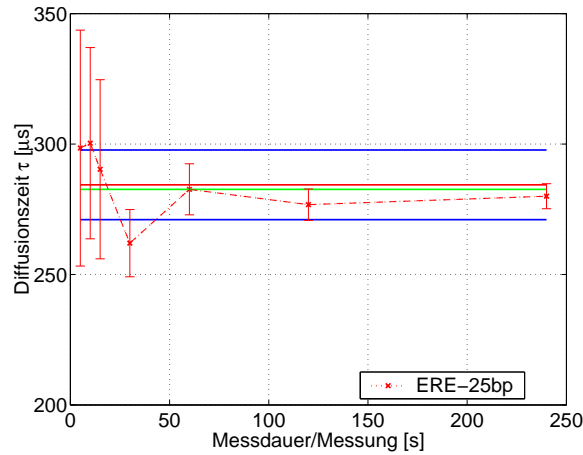


Abbildung 5.5: Diffusionszeiten des ERE-25bp Oligos. In dieser Messung wurde die Gesamtzeit konstant gehalten, jedoch die einzelnen Meßzeiten pro Messung von 5 s bis 240 s variiert. Die roten Linie zeigt den Mittelwert, die Blaue die Standardabweichung.

Die Gesamtmeßzeit für einen Meßzyklus wird konstant gehalten, um das Bleichverhalten der Proben in erster Näherung als konstant annehmen zu können. Die Tabelle 5.1 faßt die Ergebnisse nochmals zusammen.

Meßzeit [s]	Anzahl	$ERE_{\tau_{diff}}$ [ms]	$\sigma_{ERE_{\tau_{diff}}}$ [ $10^{-6}$ ]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]
5	240	0,29945	0,045	42.821
10	120	0,30133	0,036	42.017
15	80	0,29534	0,034	43.381
30	40	0,26065	0,012	48.365
60	20	0,27801	0,01	46.845
120	10	0,27476	0,006	46.032
240	5	0,27924	0,004	46.220

Tabelle 5.1: Daten der dargestellten Meßreihe. Der Mittelwert beträgt  $\overline{\tau_{diff}} = 280.97 \times 10^{-6}$  s. Die Bezeichnung ERE verweist auf das in Abb. 4.8 dargestellte Oligo (ERE-25bp).

Das in Abbildung 5.5 gemessene Oligo ERE-25bp weist ein Molekulargewicht<sup>1</sup> von  $MW_{ERE-25bp} = 17.122$  Da auf. Die aus den FCS-Messungen ermittelte Diffusionszeit für das Oligo  $\tau_{diff_{ERE-25bp}} = 280.97 \mu\text{s}$  wird für die weiteren Auswertungen als Startwert verwandt. Ein Vergleich der Diffusionszeit eines 18-Basenpaar langen Oligo ( $\tau_{diff_{18bp}} = 160 \mu\text{s}$ ) [69] sowie einer theoretischen Betrachtung der Diffusionszeitmessung auf der Grundlage von [70] liefert eine gute Übereinstimmung. Der Analyse der Diffusionszeit lag die erweiterte AKF mit zwei Komponenten zugrunde. Die Abkürzung  $\tau'$  wird, wie bei Gleichung (5.1) eingeführt, benutzt.

$$G(\tau) = 1 + G_0 \left\{ 1 - T_{tri} \left[ 1 - \exp \left( -\frac{\tau}{\tau_{tri}} \right) \right] \right\} \cdot \{ (1 - R_2) \cdot \tau'_1 + R_2 \cdot \tau'_2 \}$$

<sup>1</sup>In der Molekularbiologie werden Gewichtsangaben in Dalton (Da) bzw. kilo Dalton (kDa) gemacht. In SI-Einheiten entspricht ein Dalton ( $[\text{Da}] = 1\text{g/mol}$ ). Die Masse eines Moleküls ist auf  $N_A$  Teilchen bezogen, sprich auf eine Stoffmenge von einem Mol.

Damit konnten schon drei Parameter für die weiteren Messungen festgelegt werden. Das Festlegen der Parameter ist wichtig für die weitere Analyse, um während der Fitroutine nicht in Nebenminima 'hängen' zu bleiben.

Die bisher gezeigten systematischen Messungen dieses Abschnitts zeigen eindrucksvoll die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (vgl. Abbildung 5.6). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die weiteren Messungen, die zur Bestimmung der Wechselwirkung der Oestrogenrezeptoren mit ihrer DNA-Bindungssequenz führen sollen. Die Abbildung (5.6) zeigt eine Messung der AKF der DNA-Bindungssequenz (ERE-25bp) des Oestrogenrezeptors. Auch hier wird die Reproduzierbarkeit der Messungen bewiesen. Die aus der Parametrisierung der AKF gewonnenen Parameter konnten mit einem Fehler unter einem Prozent für jede einzelne Messung verifiziert werden. Die Darstellung zeigt das Ergebnis, wie es die Zeiss-Software liefert, unglücklicherweise in einem Format, das die weitere Bildverarbeitung fast unmöglich macht.

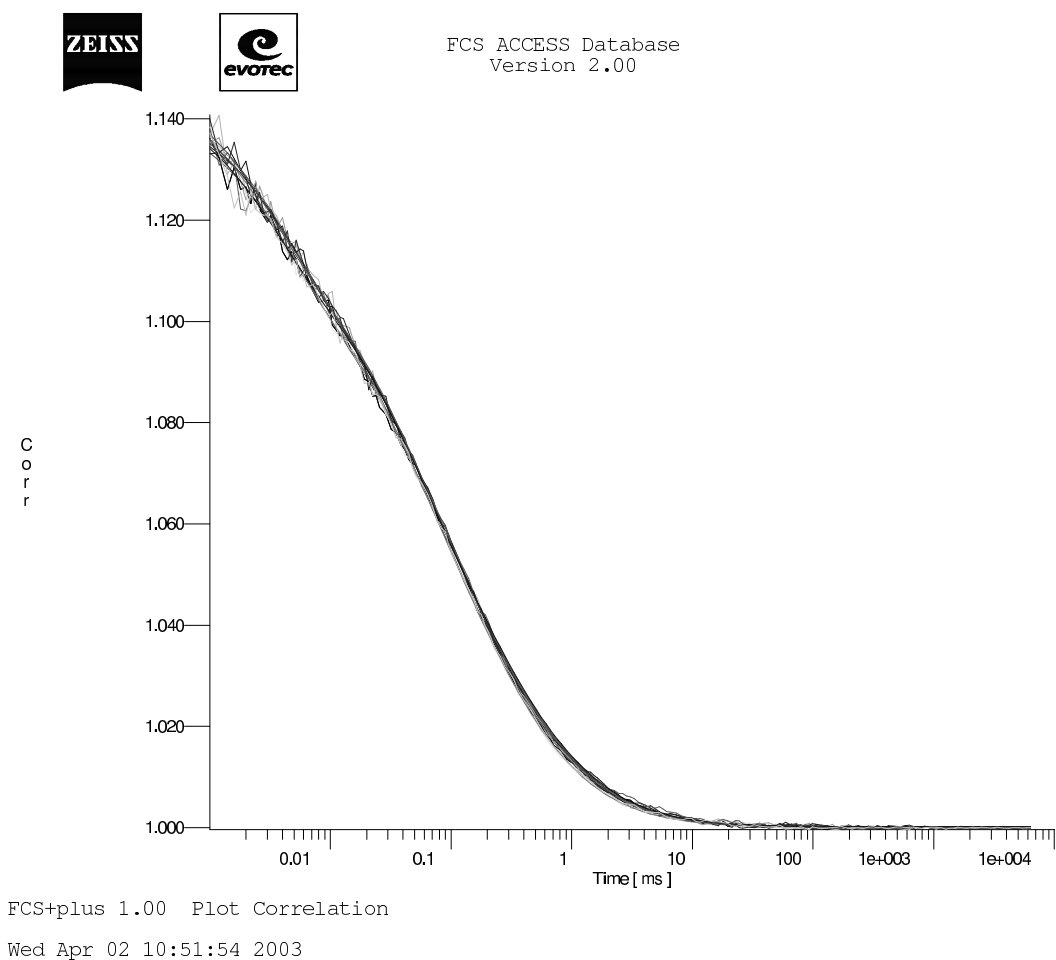


Abbildung 5.6: Mehrere simultane FCS-Analysen: Jede Kurve repräsentiert eine unabhängige Messung. Hier wurde das Oligo ERE-25bp untersucht. Die gezeigte Darstellung ist das Ergebnis, wie es die Zeiss-Software liefert.

Zur Veranschaulichung des Diffusionskoeffizienten sei hier nochmals erwähnt, daß der Diffusionskoeffizient die Anzahl der Teilchen pro Zeit beschreibt, die durch eine bestimmte Fläche (hier  $1\mu\text{m}^2$ ) dringen. Somit wird auch verständlich, warum größere Teilchen einen geringeren Diffusionskoeffizienten aufweisen. Je kleiner ein Teilchen ist, desto 'schneller' kann es diffundieren: somit durchdringen mehr Teilchen pro Zeit eine bestimmte Fläche.



Bei dieser Argumentation sei an die Einstein-Stokessche Definition des Diffusionskoeffizienten erinnert.

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (5.2)$$

$R$  beschreibt den Radius des Teilchens,  $\eta$  die Viskosität der Probenflüssigkeit,  $T$  die Temperatur und  $k_B$  die Boltzmannkonstante. Die Gleichung zeigt, daß der Teilchenradius  $1/R$  zum Diffusionskoeffizienten beiträgt und somit für größere Teilchen, sprich größere  $R$  immer kleiner wird. Vergegenwärtigt man sich noch die Einsteinsche Diffusionsgleichung [71],

$$D = \frac{\langle x^2 \rangle}{6\tau_x}, \quad (5.3)$$

wobei die  $\langle x^2 \rangle$  die quadratische Verschiebung und  $\tau_x$  die Zeit, in der diese stattfindet beschreibt, wird der obige Zusammenhang der Größen deutlicher.

## 5.2 DNA-Rezeptor Interaktion

Das Ziel der Messungen, die Bestimmung der Bindungskonstante zwischen dem Rezeptor und dem bindungssequenztragenden DNA-Oligonukleotid soll im folgenden dargestellt werden. Vorab werden die Daten vorgestellt, die mit dem ConfoCore gemessen und analysiert wurden. Sodann werden die gelgestützten Daten, die mit dem Bandshift-Assay ermittelt werden konnten, präsentiert. Neben den eigenen Messungen sollen hier jedoch auch die Daten, die mit der SPR-Technologie<sup>2</sup> (Biacore) ermittelt wurden, vorgestellt werden. Dieser abschließende Teil vervollständigt die wesentlichen Methoden, mit denen Bindungsdaten gewonnen werden können.

Es werden die Ergebnisse aus drei unterschiedlichen Methoden (FCS, BS-Assay, SPR (Biacore)) beschrieben. Begonnen werden soll mit den FCS Messungen. Diese können zum Teil direkt mit den Ergebnissen des BS-Assay's verglichen werden, da die identischen Proben untersucht wurden. Bei diesem direkten Vergleich wird auch die Zuverlässigkeit sowie höhere Sensitivität der lasergestützten Methoden gegenüber der gelgestützten BS-Assay Methode deutlich. Die dritte Methode, SPR, wird kurz vorgestellt sowie die Ergebnisse aus der Veröffentlichung von J. Cheskis *et al.* dargestellt. Abschließend folgt eine Gegenüberstellung aller Daten aus den drei Methoden.

### 5.2.1 ConfoCore

Die Auswertung der FCS Daten wurde in mehreren Stufen durchgeführt. Diese lassen sich wie folgt unterteilen.

- Kollektive Anpassung der Daten einer Meßreihe an die jeweilige AKF-Funktion (ein-, zwei- oder drei-Komponenten)
- Bestimmung der Diffusionszeiten  $\tau_{diff}$  und Diffusionskoeffizienten  $D_{diff}$
- Bestimmung der prozentualen Anteile der Komponenten, sowie letzte Selektion nach  $\chi^2$  der Daten

---

<sup>2</sup>SPR surface Plasmon resonance.

- finaler simultaner Fit über alle Messungen und Bestimmung aller Mittelwerte der Parameter

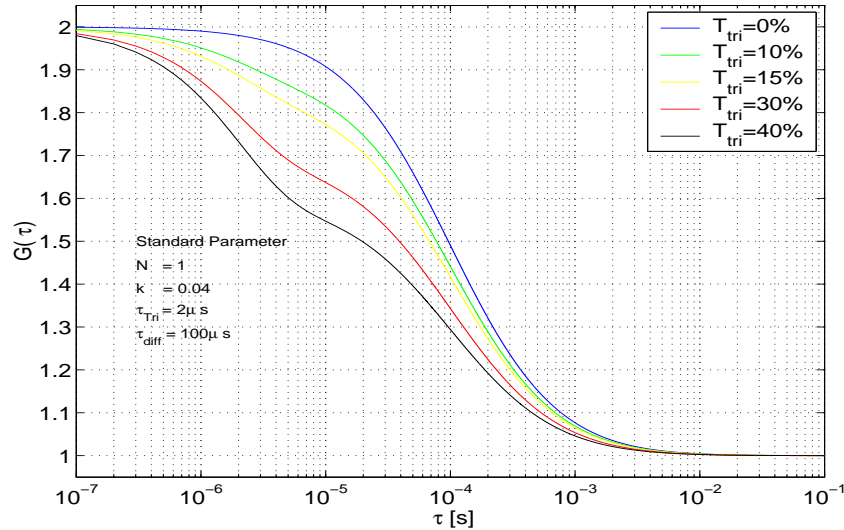


Abbildung 5.7: Auswirkung der Variation des Triplettanteils auf die AKF  $G(\tau)$ .

Der erste Punkt kann anhand der schon ermittelten StandardDiffusionszeiten sowie der Experimentplanung auf einfache Weise ermittelt werden. Der nächste Schritt, die Ermittlung der Diffusionszeiten, kommt praktisch nicht ohne die Festlegung eines Parameters der Fitfunktion, z.B. des Radienverhältnisses  $k$ , aus. Erhält man hier überhöhte Triplettzeiten  $\tau_{Tri}$  oder sehr große Abweichungen von dem ermittelten Mittelwert, so müssen die erhaltenen Parametersätze für jede einzelne Messung überprüft werden. Die prozentualen Anteile der Teilchensorten ( $R_i$ ) sind die maßgeblichen Werte zur Bestimmung der Gleichgewichtsbindungskonstanten  $k_D$ . Diese beschreibt die Anzahl der Mole, die im Experiment an die DNA gebunden haben. Mit dieser Information über die Einzelmessungen kann ein 'abschließender' Fit über alle Messungen einer Reihe durchgeführt werden.

Zur Beurteilung der Korrelationsfunktion wurden ihre Parameter variiert und die Auswirkungen in der Abbildung (4.11) dargestellt. Die Abbildung (5.7) zeigt die Auswirkung der Variation des Triplettanteils. Die graphische Darstellung ermöglicht die einfache visuelle Beurteilung der Messungen, und man entwickelt durch diese Simulationen der Autokorrelationsfunktion eine klare Vorstellung, welche Form die Meßkurven haben können, bei einer bestimmten Experimentkonfiguration.

Ein Vergleich der Simulation (Abb. 5.7) mit der Messung (vgl. Abb. 5.8) liefert eine gute Übereinstimmung, für den Fall, daß der Triplettanteil 15% beträgt. Die Parametrisierung der Messung am Fluorophore TMR (vgl. 5.8) liefert unter anderem den  $T_{tri} = 13.8\%$  für den Triplettanteil. Die Abbildung zeigt ferner eine gute Anpassung an die Daten. Die durchgezogene Linie (Anpassungsfunktion) beschreibt die Datenpunkte fast deckungsgleich, die Daten sind von der Modellfunktion (5.4) optimal beschrieben. Es wurde die Modell-Funktion mit einer Komponente ( $R_1 = 1.0$ ) benutzt. Als Startwert für die Voranalyse wurden die Standardparameter benutzt.

$$G(\tau) = 1 + G_0 \left\{ 1 - T_{tri} \left[ 1 - \exp \left( \frac{\tau}{\tau_{tri}} \right) \right] \right\} \cdot \left\{ R_1 \cdot \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff1}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff1}}}} \right\} \quad (5.4)$$

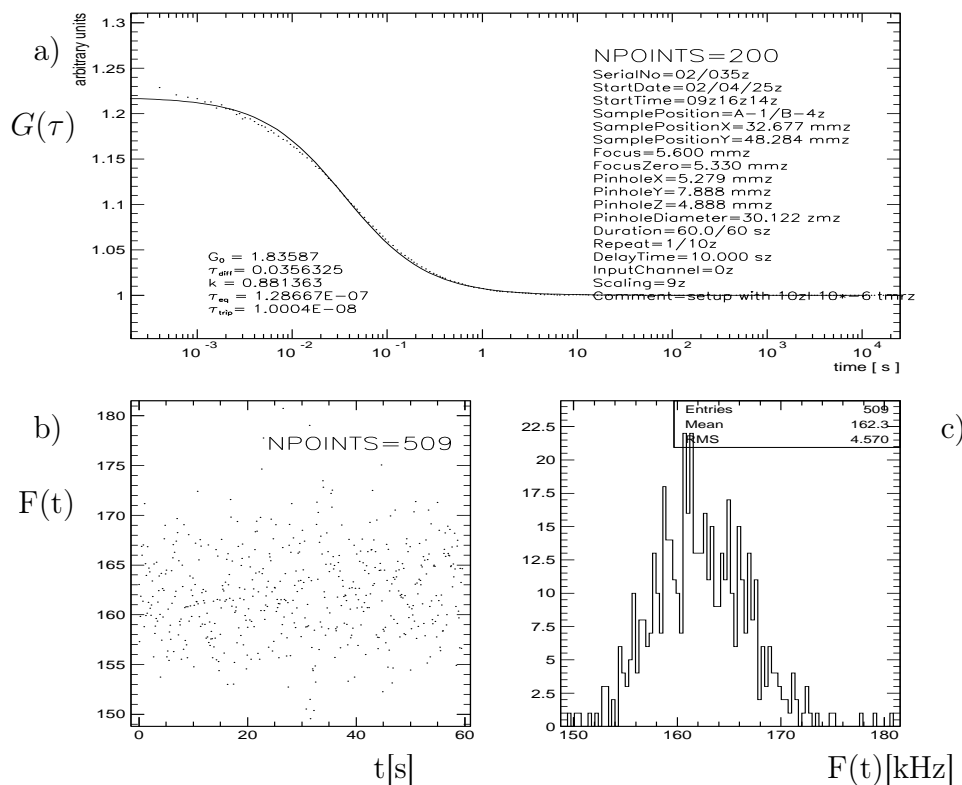


Abbildung 5.8:  $G(\tau)$  Analyse. Es sind die Daten der Fit, sowie die Fluoreszenzverteilung und deren Histogramm dargestellt.

In einem weiteren Programmteil werden einzelne Messungen aus einer Meßreihe selektiert, bei der die berechnete Anpassung an die Daten deutlich von den Daten abweicht. Eine vollständige Automation dieser Selektion konnte leider nicht gefunden werden, da es schwierig ist, allgemeine Kriterien für eine solche Selektion zu finden. Selbst der  $\chi^2$ -Wert einer Anpassung liefert kein eindeutiges Kriterium für das Verwerfen einer Messung. Dies liegt im wesentlichen an der Sensitivität der Anpassungsroutine auf die Startwerte der Parameter.

Die in Abbildung (5.9) dargestellte Messung, die mit dem Oligo ERE-25bp Oestrogenrezeptor ER- $\alpha$  System durchgeführt wurde, zeigt eine Messung, bei der die Korrelation problemlos durchgeführt werden konnte, die anschließende Anpassung der Modellfunktion an die Daten jedoch nicht mehr möglich war. Der Grund hierfür liegt in der Bildung von sehr großen Moleküle-Konglomeraten. Diese erzeugen, aufgrund ihrer langen Verweildauer im Fokusvolumen einen Photonen'burst', der die gemessene Fluoreszenz im Vergleich zum eigentlichen Mittelwert um Größenordnungen übersteigt.

Eine grobe Abschätzung der Diffusionszeit würde im Bereich von mehreren Minuten liegen. Die in der Abbildung (5.9) gezeigte Messung ist ein willkürlich ausgewähltes Beispiel. Prinzipiell könnte man durch die Zugabe geeigneter Chemikalien diese Konglomeratbildung unterdrücken, jedoch hätte dies Auswirkungen auf alle Molekül-Molekül Wechselwirkungen. Ein 'echte' Messung der Rezeptorbindungskonstanten wäre mithin nicht mehr möglich. In der Abbildung (5.9b) sind die extremen Anstiege der Fluoreszenzrate bei  $t \approx 6$  s, 18 s und  $t \approx 50$  s zu erkennen. In dem nebenstehenden Histogramm ist der Effekt noch deutlicher zu sehen. Die Verteilung der Fluoreszenzwerte ist auf einen sehr schmalen Bereich konzentriert. Ferner liegt der Mittelwert der Fluoreszenz und dessen Abweichung, wie in diesem Fall, in der gleichen Größenordnung. Das Teilbild (Abb. 5.9 oben) zeigt die Anpassung an die Daten (durchgezogene Linie) sowie die Korrelationswerte (Punkt). Deutlich ist das Versagen der Anpassungsfunktion an die Daten zu sehen. Die Anpassungsprozedur ist nicht mehr in der Lage, einen Parametersatz zu finden, der die Daten beschreibt.

Einzelmessungen, die nicht mehr durch eine Modellfunktion parametrisiert werden können, müssen also für eine simultane Anpassung einer ganzen Meßreihe unberücksichtigt bleiben. Sie würden die Mittelwerte des Fits sowie ihre Fehlerberechnung ins absurde, nicht physikalische führen. Eine weitere Analyse wäre mit einem solchen Datensatz nicht mehr möglich.

Nachdem die Selektion 'problematischer' FCS-Messungen aufgezeigt ist, konzentriert sich der folgende Abschnitt nun auf die grundlegenden Messungen der Oestrogenrezeptor-Interaktion mit der DNA-Bindungssequenz (ERE-25bp). Hier sei noch abschließend zu den problematischen FCS-Messungen erwähnt, daß diese Methode trotz allem eine sehr robuste Methode darstellt. Aufgrund der typischerweise 50 bis 300 Messungen pro Probe läßt sich eine Fehlmeßrate von ungefähr einer Messung pro 300 Messungen verkraften. Und fürmit führt eine Fehlmessung einer Meßreihe einer Probe nicht zu einem völligen Verlust dieser Meßreihe. Das Problem stellt sich in der Selektion dieser Fehlmessung. Dieses Problem ist noch nicht befriedigend gelöst. Die Robustheit der Methode ist also so zu verstehen, daß selbst eklatante Fehlmessungen nicht zu einer Unauswertbarkeit der Meßreihe führen. Und dies ist möglich, da das Konzept der FCS-Technologie, Wechselwirkungen von Molekülen in einer 'Flüssigkeit' zu messen, eine hohe Wiederholrate einzelner Messungen zuläßt. Eine solche Möglichkeit ist bei der BS-Methode nicht gegeben. Hier bedeutet die Messung einer Probe gleichzeitig den Verlust der Probe. Die Probe ist nach der Messung mit der BS-Assay Methode nicht ohne erheblichen Aufwand wiederzugewinnen.

Die Abbildung (5.10) zeigt die AKF-Kurven für vier unterschiedliche ER- $\alpha$  ERE-25bp Oligo Konzentrationen. Für jede Konzentration wurden 100 Messungen durchgeführt. Die Abbildung enthält nur eine Auswahl aus den gemessenen Kurvenscharen, da eine vollständige Darstellung keine weitere Information liefern, jedoch die Abbildung völlig unübersichtlich machen würde. Auch hier stellen die Punkte die Korrelationswerte  $G(\tau)$  und die durchgezogene Linie die Anpassungsfunktion an die Daten dar.

Zur Auswertung dieser FCS-Messungen wurden eine Zwei-Komponenten-Anpassungsfunktion benutzt, wie sie in Gleichung (5.5) zu sehen ist. Die erste Komponente beschreibt das freie nicht gebundene Oligo ERE-25bp. Mit der zweiten Komponente wurde das Rezeptor-Oligo Molekül assoziiert. Die Analyse wurde mit den Standardparametern begonnen. Für die endgültige Analyse wurde lediglich das Radienverhältnis  $k$ , sowie die Diffusionszeit des freien Oligos ( $\tau_1$ ) fest vorgegeben, die anderen Parameter wurden in bestimmten Grenzen variiert, mit dem Ziel, den  $\chi^2$ -Wert zu minimieren.

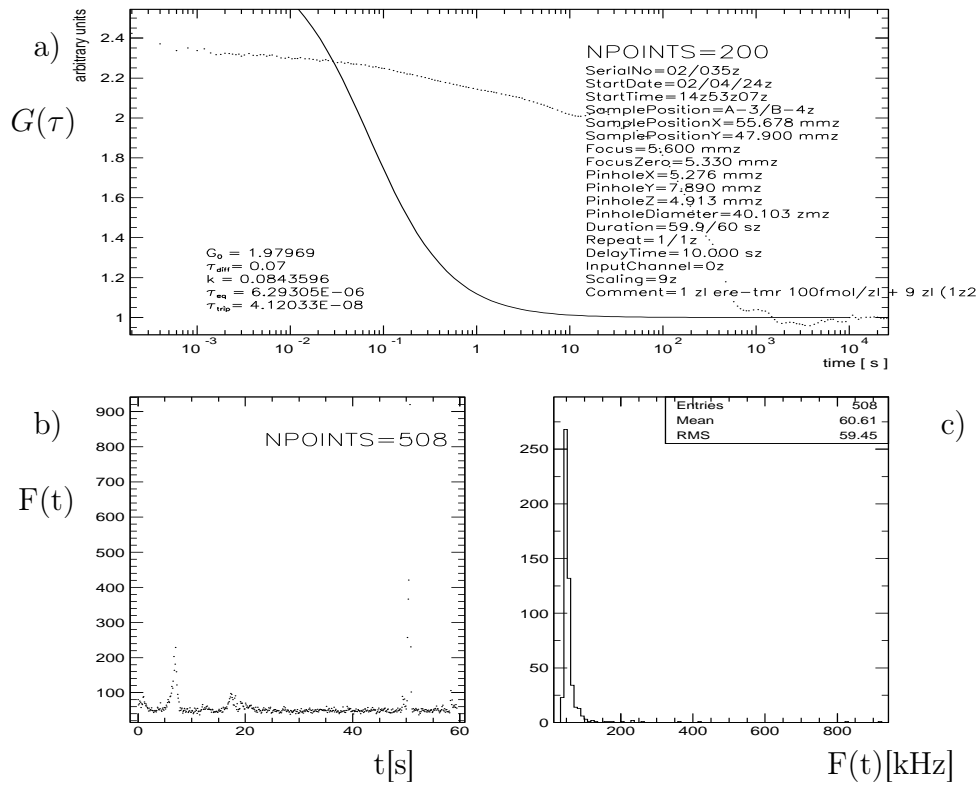


Abbildung 5.9: Darstellung eines Photonen'burst' in einer Messung. Deutlich ist die extreme Überhöhung der Fluoreszenzrate (unten links b): in der Verteilung; unten rechts c): im Histogramm) zu sehen. Die fit-Funktion (oben a) durchgezogene Linie) beschreibt die Korrelationswerte (oben a) Punkte) nicht mehr. Eine sinnvolle Parametrisierung ist nicht möglich. Diese Messungen wurden mit Oestrogenrezeptor- $\alpha$  Oligo Bindungssystem durchgeführt.

$$G(\tau) = 1 + G_0 \left\{ 1 - T_{tri} \left[ 1 - \exp \left( -\frac{\tau}{\tau_{tri}} \right) \right] \right\} \cdot \{ (1 - R_2) \cdot \tau'_1 + R_2 \cdot \tau'_2 \} \quad (5.5)$$

$$\text{mit } \tau'_i = \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff_i}}} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + k \frac{\tau}{\tau_{diff_i}}}} \quad i = 1, 2; \quad \text{und } R_1 = (1 - R_2)$$

In der Tabelle (5.2) sind die Ergebnisse der Analyse aus der Messung, die in Abbildung (5.10) dargestellt ist, aufgeführt.

$\alpha$ -Rezeptor	1	2	3	4	5	6	7
Stoffmenge [fmol]	0.05	0.20	0.4	1.4	4	10	20
$R_2$ [%]	13.12	22.01	29.47	46.01	49.77	51.55	52.12
$\sigma_{R_2}$	0.3529	0.8132	0.6038	0.5389	0.2028	0.1987	0.299

Tabelle 5.2: Bindungsdatenübersicht für den Oestrogenrezeptor  $\alpha$  aus den FCS-Messungen.

Deutlich ist die Zunahme des gebundenen Anteil des Rezeptors ( $R_2$ ) mit dem Anstieg der Rezeptorkonzentration zu sehen. Dieser Anstieg zeigt sich auch in der Zunahme der

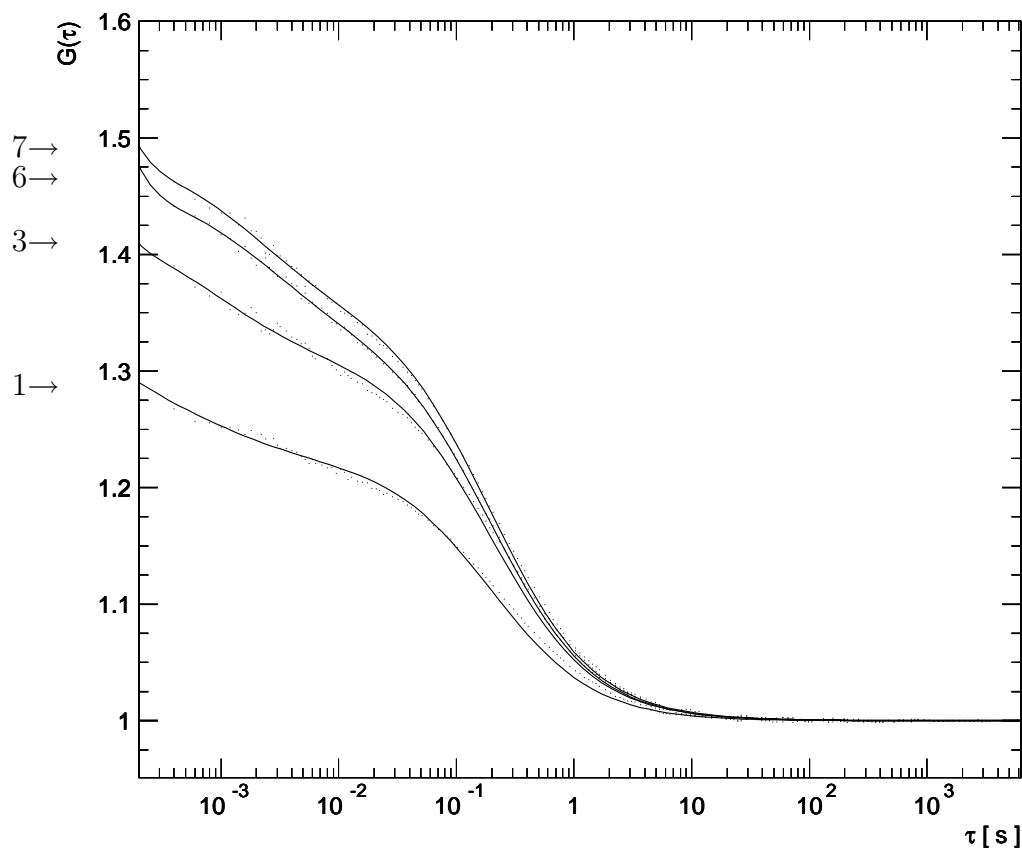


Abbildung 5.10: FCS Messungen:  $G(\tau)$  der Oligo-Rezeptor-Bindung bei ansteigender Konzentrationen des Rezeptor ER- $\alpha$ . Deutlich kann die unterschiedliche Teilchenzahl  $N$  ( $N \approx y$ -Achsenabschnitt  $-1$ ) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration gezeigt werden. Die Zahlen an der  $y$ -Achse korrespondieren mit denen in der Tabelle (5.2).

im Detektorvolumen gemessenen Teilchen  $N$ . In der Abbildung (5.10) kann dieser Verlauf an dem  $y$ -Achsenabschnittswert erkannt werden, der mit der Konzentrationszunahme des Rezeptors steigt. Ein weiteres wichtiges Merkmal ergibt sich aus den Abständen zwischen den Einzelmessungen, welche abnehmen. Dies ist mit der zunehmenden Sättigung der Bindung zu erklären.

Nach dieser Betrachtung für den ER- $\alpha$  Rezeptor werden die Ergebnisse für den ER- $\beta$  Rezeptor dargestellt. Bei genauer Betrachtung der Abbildung (5.11) lassen sich auch in diesem Experiment ähnliche Zusammenhänge wie bei der  $\alpha$ -Rezeptor Messung erkennen. Auch hier steigt die Teilchenzahl  $N$  mit der Zunahme der Konzentration des Rezeptors. Ferner lässt sich auch bei diesem Experiment die Abnahme der Abstände zwischen den AKF-Kurven mit der Zunahme der Konzentration feststellen.

$\beta$ -Rezeptor	1	2	3	4	5	6	7
Stoffmenge [fmol]	0.05	0.20	0.5	1.5	4	10	20
$R_2$ [%]	16.59	26.78	42.02	52.01	54.47	56.05	58.4
$\sigma_{R_2}$	0.6979	0.5897	0.6822	0.3028	0.5417	0.4509	0.1934

Tabelle 5.3: Darstellung der Bindungsdaten für den Oestrogenrezeptor  $\beta$  aus den FCS-Messungen.

Im Unterschied zu den Daten des ER- $\alpha$  Rezeptors geschieht dies jedoch in einem deutlich engeren Konzentrationsbereich. Somit wird auch bei einer geringeren Konzentration die Sättigung erreicht. Dies zeigt sich an den fast 'aufeinanderliegenden' AKF-Kurven, die in der Abbildung (5.11) zu sehen sind. Die Anpassung an die Daten der  $\beta$ -Rezeptor Messung wurde mit den gleichen Startwerten begonnen wie für die Anpassung für die  $\alpha$ -Rezeptor Messung. Dies ist zulässig, da das gleiche Oligo (ERE-25bp) benutzt wurde. Der Anteil der Komplexbildung  $R_2$  (vgl. Tabelle 5.3) für diese Messung wurde unter Zugrundelegung der AKF, wie sie in Gleichung (5.5) dargestellt ist, ermittelt.

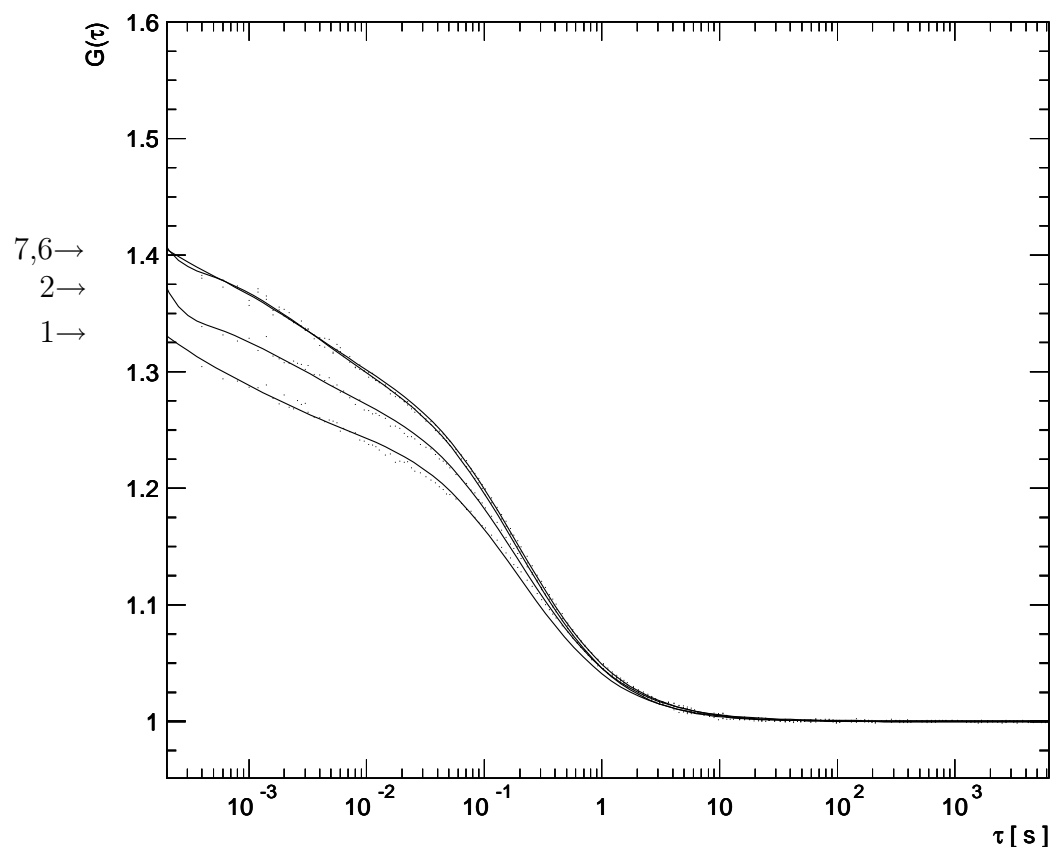


Abbildung 5.11: FCS Messungen:  $G(\tau)$  der Oligo-Rezeptor-Bindung bei ansteigender Konzentration des Rezeptors ER- $\beta$ . Deutlich kann die unterschiedliche Teilchenzahl  $N$  ( $N \approx y$ -Achsenabschnitt  $-1$ ) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration gezeigt werden. Die Zahlen an der  $y$ -Achse korrespondieren mit denen in der Tabelle (5.3).

In der Tabelle (5.3) sind die Ergebnisse der Analyse aus der Messung, die in Abbildung (5.11) dargestellt ist, aufgeführt. Nach der Ermittlung aller relevanten Daten kann mit der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten für die FCS-Messungen fortgefahren werden. Hierfür müssen die ermittelten Bindungsanteile  $R_2$  über die Stoffmenge aufgetragen werden. Dies ist in der Abbildung (5.12) geschehen. Mit der Kenntnis, daß die Stoffmenge des jeweiligen Rezeptors in  $10\mu\text{l}$  Experimentpuffer enthalten war, kann die Molarität der Rezeptorlösung bestimmt werden. Die Molarität  $M$  bezeichnet die Anzahl der Mole pro Liter. Die entstehende Einheit mol/Liter wird mit  $M$  abgekürzt ( $[M] = \frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ).

Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstante werden die in der Abbildung (5.12) dargestellten Kurven mittels eines weiteren kleinen Programms mathematisch beschrieben. Mit dieser Beschreibung ermittelt man die Stoffmenge, bei der die Hälfte des Sättigungs-

bereichs erreicht wird. Aus dieser Stoffmenge, in der Abbildung (5.12) jeweils mit einer Raute ( $m'$ ) gekennzeichnet, errechnet man die Molarität. Dieser Wert beschreibt die Gleichgewichtskonstante  $k_D$  der Bindung zwischen dem Rezeptor und dem DNA-Oligo, welches die Bindungssequenz für den Rezeptor trägt.

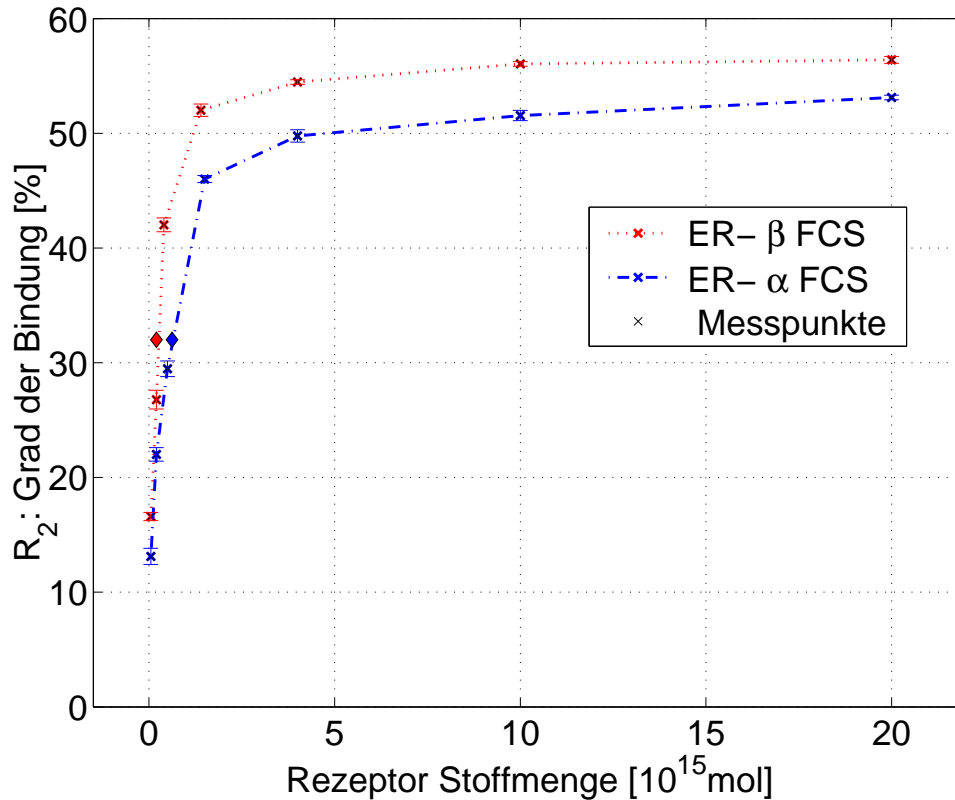


Abbildung 5.12: Bindungskurven der Rezeptor DNA Wechselwirkung. Dargestellt ist die ER- $\alpha$  und die ER- $\beta$  Bindungskurve.

Die Gleichgewichtskonstanten für die Rezeptoren errechnen sich wie folgt:

$$ER - \alpha : \text{ Bestimmte Stoffmenge } m' = 0.62 \text{ fmol} \quad M' = \frac{0.62 \text{ fmol}}{10 \mu\text{l}} = 0.62 \pm 0.015 \text{ nM}$$

$$ER - \beta : \text{ Bestimmte Stoffmenge } m' = 0.26 \text{ fmol} \quad M' = \frac{0.26 \text{ fmol}}{10 \mu\text{l}} = 0.26 \pm 0.008 \text{ nM}$$

Im Abschnitt (5.3) werden die Gleichgewichtskonstanten mit den anderen Methoden verglichen.

### 5.2.2 Bandshift-Assay

Auch in diesem Abschnitt wird Bandshift-Assay kurz mit BS abgekürzt. Die Gele wurden, wie in Abschnitt 4.3.2 beschrieben, ausgewertet. Zur Reduktion des Platzbedarfs der Gelabbildungen werden im folgenden nur die Bereiche dargestellt, in denen Banden zu



sehen sind, die die relevante Information tragen. In Abb. 4.10 ist ein komplettes Gel aufgenommen. Wie man sieht enthält der Bereich zwischen den 'Bandenlinien' keine weitere Information.

Zur Abschätzung der bei diesem Experiment gemachten Fehler wurden zehn identisch behandelte Proben in einem Gel untersucht. Abb. (5.13) zeigt die analysierten Banden. Bei

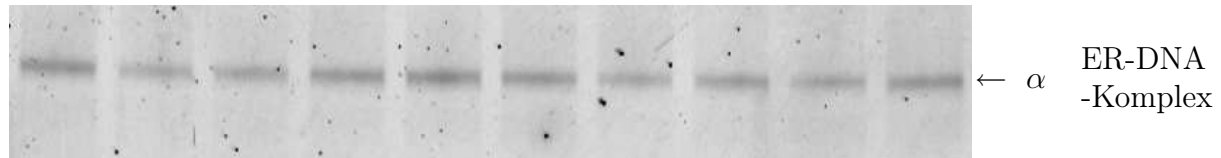


Abbildung 5.13: Gel zur Bestimmung der Fehler des BS-Assays. Es wurde der ER- $\alpha$  Rezeptor benutzt. Das Verhältnis Rezeptor-DNA war bei allen Proben gleich.

jeder Probe wurden 2.7 pmol Oestrogenrezeptor- $\alpha$  und 200 fmol ERE-25bp eingesetzt. Die Proben wurden nach dem Mischen 25 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Analyse zeigt eine Standardabweichung von 4.9%. Der Fehler hierbei kann hauptsächlich dem Pipetieren, d.h. dem Abmessen der exakten Flüssigkeitsmengen, zugeschrieben werden. Ein weiterer Fehler, der unterschiedliche Untergrund, kann mit einem Fehler von etwa 1% angegeben werden. Dieser 'background'-Fehler wurde ebenfalls bei diesem Experiment analysiert. Hier wurde so vorgegangen, daß man sich beliebige gleichgroße Bereiche auf dem Gel ausgesucht hat und die Intensitätsverteilung bestimmt wurde.

Vor den eigentlichen Bindungsstudien wurden auch hier umfangreiche Vorversuche durchgeführt, um die optimale Kombination der verschiedenen Oligonukleotide, sowie die richtigen Pufferbedingungen zu bestimmen. In der Abbildung (5.14) wurden verschiedene aufgereinigte Oligonukleotide auf ihre Bindung mit dem Rezeptor untersucht.

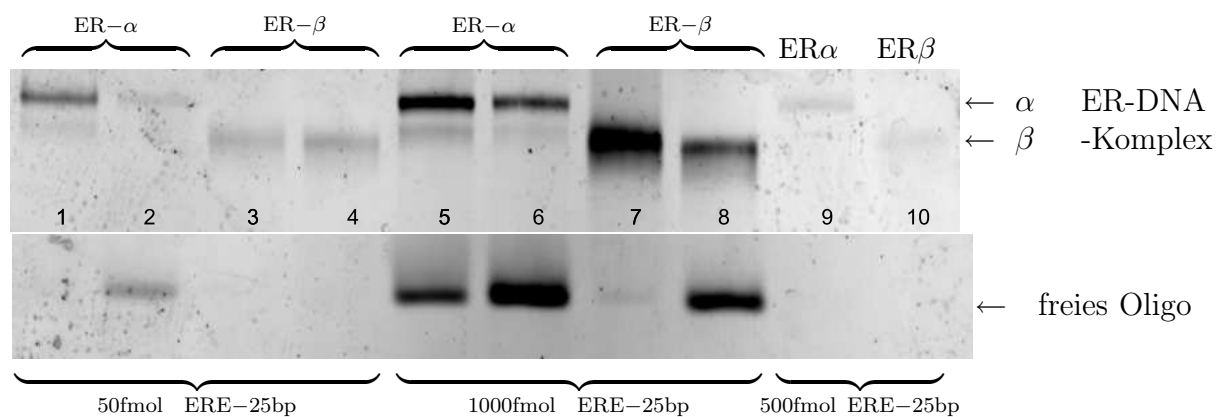


Abbildung 5.14: (obere Reihe) Oestrogenrezeptor-DNA Bindungen, (untere Reihe) das ungebundene Oligonukleotid. (1-4) je 50 fmol ERE-25bp Oligonukleotid pro Spur. (5-8) je 1 pmol ERE-25bp-fcs Oligo pro Spur. (9-10) enthalten 0.5 pmol ERE-25bp-fcs Oligo pro Spur. (1,5,9) je 2.5 pmol und (2,6) je 1.25 pmol ER- $\alpha$ ; (3,7,10) je 4.5 pmol und (4,8) je 2.125 pmol ER- $\beta$ .

Diese Abbildung zeigt sehr deutlich den Unterschied des Bindungsverhaltens der Oligonukleotide ERE-25bp und ERE-25bp-fcs zu den Rezeptoren. Das zweite Oligo wurde in einem mehrstufigen Verfahren aufgereinigt und zeigt gut detektierbare Banden. Diese

Detektierbarkeit ist jedoch nur gegeben, wenn das molare Verhältnis<sup>3</sup> bei etwa  $R \approx 2$  liegt (Spur 5-8). Bei einem molaren Verhältnis von  $R = 5$  oder gar  $R = 9$  (siehe Spur 9 und 10 Abb. 5.14) kann mit dem Oligo ERE-25bpfc nur schwach eine Bindung nachgewiesen werden. Dies ist für das Oligo ERE-25bp jedoch bis zu einem molaren Verhältnis von  $R = 90$  bzw.  $R = 45$  möglich, wie die Spuren 3 und 4 zeigen. Für die weiteren Experimente wurde daher das Oligo ERE-25bp verwendet.

Zur Optimierung der Bindung des Rezeptors an das DNA-Oligonukleotid wurden Bindungsstudien durchgeführt, die den Einfluß verschiedener Puffer auf die Bindung charakterisieren sollten. In der nächsten Abbildung ist ein Überblick dieser Experimente gezeigt. Nachdem die optimalen Oligonukleotide sowie die besten Pufferbedingungen be-

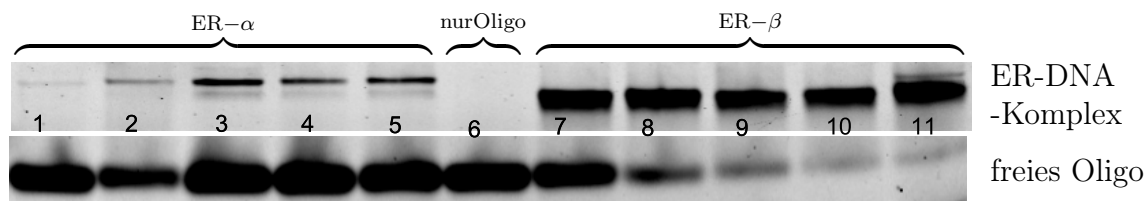


Abbildung 5.15: (obere Reihe) Oestrogenrezeptor-DNA Bindungen, (untere Reihe) das ungebundene Oligonukleotid. (1-5) ER- $\alpha$  je 1.35 pmol pro Spur, (6) nur ERE-25bp, (7-10) ER- $\beta$  je 2.25pmol pro Spur. (11) 1.35 pmol ER- $\alpha$  + 2.25pmol ER- $\beta$ . Zu jeder Probe wurden 100 fmol ERE-25bp pipetiert.

stimmt werden konnten, wurden die Titrationsexperimente durchgeführt. Hierbei variiert man die Konzentration des Rezeptors bei fester Konzentration der Oligonukleotids oder umgekehrt. Ziel des Experiments ist es, das Gleichgewichts-Verhältnis der Bindung zu bestimmen, den  $k_D$ -Wert. In der Abb. (5.16) ist das Experiment für den Oestrogenrezeptor- $\alpha$  gezeigt.

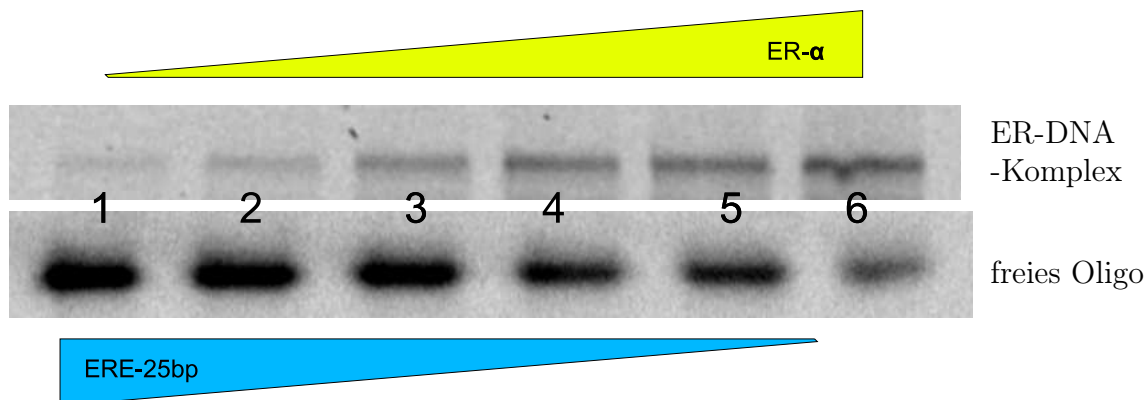


Abbildung 5.16: Titration des Oestrogenrezeptors- $\alpha$ : (oben) die Spur (1-6) steigt die Stoffmenge wie folgt an (0.25, 0.5, 1.0, 3.0, 6.0,15.0 fmol); (unten) in jeder Spur wurden 100 fmol Oligo eingesetzt.

Deutlich ist die Zunahme der Komplexe (DNA-Rezeptor) mit der Zunahme der Rezeptormenge zu sehen. Das gleiche Experiment wurde auch für den  $\beta$ -Rezeptor durchgeführt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils des Komplexes wie des freien Oligo-Nukleotides wurde wieder mit dem Programm *ImageQuant* durchgeführt. Das Ergebnis ist in der Abbildung (5.17) gezeigt.

<sup>3</sup>Das molare Verhältnis beschreibt den Quotient  $R = \frac{\#der\Rezeptor-Mole}{\#derOligo-Mole}$

Wichtig für die Ermittlung der  $k_D$ -Werte ist das Erreichen des Sättigungsbereichs, der bei beiden Rezeptoren klar erkennbar ist. Eine Erhöhung der Rezeptormenge hat in diesem Bereich keine Zunahme des Komplexes (DNA-Rezeptor) zur Folge. Zur Berechnung des  $k_D$ -Wertes wurden die in Abb. (5.17) dargestellten Daten mit einer Modellfunktion beschrieben. Mit dieser Funktion wurde der Mol-Wert ermittelt, bei dem die Hälfte des maximalen, gesättigten Wertes erreicht wurde. Dieser Wert stellt den  $k_D$ -Wert der Bindung dar.

Mit diesen Daten können die Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden:  $k_{D_\alpha} = 0.42 \pm 0.03$  nM und  $k_{D_\beta} = 0.33 \pm 0.028$  nM.

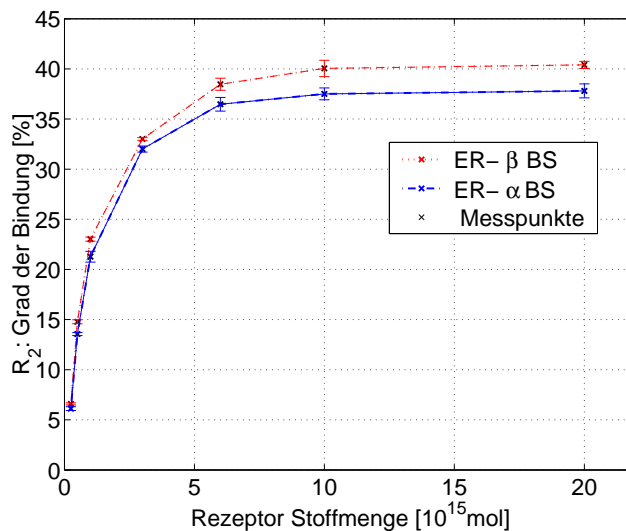


Abbildung 5.17: Verlauf der Bindung von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  an das Oligo ERE-25bp in Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration.

Die Form der Bindungskurve gibt Aufschluß über die Bindungsart. Hier hat man es nicht mit einer kompetitiven Bindung zu tun. Eine solche würde einen sigmoidalen Verlauf aufweisen. Die in Abbildung (5.17) gezeigte Form zeigt, daß die beiden Rezeptoren simultan an ihre DNA-Bindungssequenz (ERE-25bp) binden.

### 5.2.3 Biacore

Die in diesem 'Einschub' vorgestellten Daten wurden von Boris J. Cheskis *et al* [72, 73] und A. Jungbauer *et al* [74] veröffentlicht. Die Daten wurden mit einem Biacore-Gerät, welches auf der Veränderung der Oberflächenplasmonen Resonanz (SPR) fußt, ermittelt. Die Änderungen der SPR werden beim Binden von Molekülen an der Meß-Oberfläche erzeugt. Das gemessene Signal ist direkt proportional zur Masse der gebundenen Moleküle. Aus diesen Daten lassen sich die Bindungseigenschaften, sowie die Gleichgewichtskonstante ermitteln.

Cheskis [72] benutzt, wie in dieser Arbeit dargestellt, in SF-9 Zellen exprimierte Oestrogenrezeptoren, die über ein *Ni*-Resin Chromatograph aufgereinigt wurden. Für die Bindungsexperimente wurden jedoch 75-bp lange ERE-DNA Oligonukleotide verwandt. Als Ergebnis konnte ein Gleichgewichtswert für den Rezeptor  $k_{D_\alpha} = 6.19 \times 10^{-8}$  M ermittelt werden. Dieser liegt deutlich höher als in anderen Literaturangaben. Die Vergleichbarkeit

der Werte ist jedoch ein prinzipielles Problem. Diese hochkomplexen Bindungen sind stark beeinflusst von ihrer jeweiligen Umgebung, beispielsweise dem pH-Wert oder den Konzentrationen verschiedener Chemikalien. In seiner zweiten Veröffentlichung [73] werden beide Oestrogenrezeptoren,  $\alpha$  und  $\beta$  untersucht. Der  $\alpha$ -Oestrogenrezeptor wurde für diese Messungen von der Firma *PanVera* bezogen. Dieser Rezeptor wurde ebenfalls in SF-7 Zellen exprimiert und über eine *Ni*-Affinitätsäule aufgereinigt. Der  $\beta$ -Rezeptor wurde, wie ebenfalls in dieser Arbeit beschrieben, in Bakterien (BL21) exprimiert und über eine *Ni*-NTA Säule aufgereinigt. Hier konnten folgende Gleichgewichtswerte für  $\alpha$   $k_D = 1.02$  nM und für  $\beta$   $k_D = 768$  nM gemessen werden. Dieser enorme Unterschied ist um so erstaunlicher, wenn man sich vor Augen führt, daß die jeweiligen DNA-Bindungssequenzen zu  $\sim 55\%$  homolog (vgl. Abb. 3.23) sind. In einer weiteren SPR-Arbeit von A. Jungbauer [74] werden die Oestrogenrezeptor-Gleichgewichtsbindungswerte zu  $k_{D_\alpha} = 0.74$  nM für ER- $\alpha$  und  $k_{D_\beta} = 0.23$  nM für ER- $\beta$  bestimmt. In dieser Messung wurden ebenfalls die von PanVera vertriebenen Rezeptoren untersucht. In diesem Fall werden beide Rezeptoren in SF-9 Zellen exprimiert und über eine *Ni*-NTA Affinitätsäule aufgereinigt. Diese Werte stehen in guter Übereinstimmung mit anderen Literaturwerten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach der Veröffentlichung von Cheskis [72] in Zusammenarbeit mit dem ZMNH<sup>4</sup> versucht, die Oestrogenrezeptor Bindungsgleichgewichtswerte zu bestimmen. Jedoch konnten trotz intensiver Studien die Messungen der Veröffentlichung nicht bestätigt werden. Das Problem hierbei lag im wesentlichen daran, daß der Rezeptor nicht in einer 'aktiven' Form an die Bedingung der Biacore-Messung angepaßt werden konnte. Dies ist ein grundsätzliches Problem in der Rezeptorforschung, einheitliche Bedingungen für Bindungsstudien zu finden, die für alle Meßsysteme ihre Gültigkeit haben. Erschwert wird dies durch die Tatsache, daß diese Bedingungen sehr stark vom den zu untersuchenden Rezeptor abhängen. Ein Standardmethode gibt es hierfür noch nicht.

Die 'BiaCore' Werte von Cheskis *et al.*, wurden in diese Arbeit aufgenommen, da das Verfahren eine bedeutsame Entwicklung in der Rezeptorforschung, sowie allgemein in der Molekül-Molekül Wechselswirkungsforschung einnimmt. Bei der FCS-Technologie agieren die Bindungspartner frei, bei der SPR-Technologie ist einer der Bindungspartner auf einer Oberfläche immobilisiert. Trotz der Unterschiedlichkeit der Konzepte der Verfahren, BiaCore und FCS, liegt der Vergleich nahe, da beide Verfahren den 'typischen' molekularbiologischen Weg (Gelsysteme) verlassen und die Möglichkeiten, die physikalische Lasersysteme bieten, aufgreifen. Der größte Vorteil dieser Methode liegt in dem direkt beobachtbaren Bindungsverlauf. Der Grad der Bindung kann zu jedem Zeitpunkt der Messung bestimmt werden. Damit ist man auch in der Lage die sogenannten 'Off-' und 'On-Rates' direkt zu messen. Die Werte beschreiben den Zuwachs bzw. die Abnahme der Bindung pro Zeit. Der Quotient ist die Gleichgewichtskonstante bzw. die Assoziationskonstante.

$$\text{GleichgewichtsDissoziationskonstante} \quad k_D = \frac{[A][B]}{[AB]} = \frac{k_d}{k_a}$$

$$\text{GleichgewichtsAssoziationskonstante} \quad k_A = \frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_a}{k_d}$$

---

<sup>4</sup>Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg, Universität Hamburg.

## 5.3 Vergleich der Bindungsdaten

Der Vergleich der Bindungsdaten, wie sie in den Experimenten (vgl. Absch. 5.2.1, 5.2.2) und in Abschnitt (5.2.3) dargestellt wurden, ist immer problembehaftet. Hier werden Methoden verglichen, die gerade im Fall des BS nicht wirklich optimiert werden können auf die Fragestellung, die man mit ihnen versucht zu beantworten. Aber dennoch soll dieser Vergleich hier durchgeführt werden.

In der Tabelle 5.3 sind die gemessenen Bindungsdaten für den Oestrogenrezeptor zusammengestellt. Die Fehler für die Daten aus den BiaCore Messungen konnten leider nicht ermittelt werden, jedoch ist die Veröffentlichung zitiert, aus der die Daten entnommen wurden. Bei der Betrachtung der zusammengestellten Bindungsdaten kann festgehalten

Werte in [nM]	BS-Assay	FCS-Analyse	BiaCore [74]
$k_{D-\alpha}$	$0.42 \pm 0.03$	$0.62 \pm 0.015$	0.74
$k_{D-\beta}$	$0.33 \pm 0.02$	$0.26 \pm 0.008$	0.23

Tabelle 5.4: Zusammenstellung der Bindungsdaten ( $k_{D-\alpha}, k_{D-\beta}$ ) für den Oestrogenrezeptor aus den verschiedenen Methoden.

werden, daß die Werte in etwa übereinstimmen. Auch der Vergleich mit den Literaturwerten, wie sie in Tabelle 4.1 aufgeführt sind, bestätigen die Messungen. Bei einer genaueren Analyse wird deutlich, daß die mit der FCS-Methoden ermittelten Werte deutlich kleinere Fehler aufweisen. Die BS-Messungen sind mit einem Fehler von etwa 10% belegt, während die FCS-Messungen bei einem Fehler von  $< 3\%$  liegen. Bei der BS-Methode kann der Fehler wohl nicht mehr wesentlich verbessert werden, da er sehr stark vom exakten Abmessen der zu mischenden Komponenten abhängt. Zu diesen Fehlern kommt noch der Fehler hinzu, der bei der Auswertung der sichtbaren Banden gemacht wird. Dieser läßt sich, wie in Abschnitt (5.2.2) gemessen, mit etwa fünf Prozent angeben.

Die FCS-Messungen sind praktisch unabhängig von der exakten Bestimmung der zu mischenden Volumina. Bei jeder Messung läßt sich die Konzentration der meßbaren Teilchen angeben, durch die Bestimmung der Teilchenanzahl und des Detektionsvolumens. Dies wurde im Abschnitt (5.1) exemplarisch durchgeführt.

Die Übereinstimmung der Daten der BS-Messungen mit den FCS-Messungen ist nur unter Einbeziehung der systematischen Fehler beider Methoden, zu erzielen. Betrachtet man nur die statistischen Fehler, so liegt der  $k_D$  für die  $\alpha$ -Messungen um etwa 25% und für die  $\beta$ -Messung um etwa 18% auseinander. Diese kann wohl hauptsächlich auf die genaue Bestimmung der tatsächlichen Rezeptor-Konzentrationen, während der Messung, bei der FCS-Methode zurückgeführt werden.

## 5.4 Diskussion

Die Expression der Proteine stellte im Rahmen dieser Arbeit die größte Herausforderung dar. In Kapitel (4.1) konnte die erfolgreiche Expression der Rezeptoren sowie deren Isolierung und Aufreinigung gezeigt werden. Die Schwierigkeit bestand in der Aufreinigung, deren Ziel es ist, das Protein in hoher Ausbeute, bei Beibehaltung der biologischen Aktivität zu eluieren. Die Parameter der Expression mußten immer wieder angepaßt werden, so daß es schwierig ist, allgemein gültige Parameter anzugeben. Dies liegt an der Natur von

biologischen Objekten, insbesondere Proteinen, deren veränderte 'Aktivität' bei einer Veränderung der Umgebung noch nicht vollständig beschrieben werden kann. Gerade bei der Isolation, dem Herauslösen aus ihren eigentlichen Bedingungen (Zelle, Pufferbedingungen, Temperatur,...) können diese unvorhersehbar reagieren. Leider sind diese Zusammenhänge auch in der Literatur noch sehr unzureichend beschrieben.

Aus einem theoretischeren Standpunkt betrachtet, ist dieses Ergebnis jedoch nicht verwunderlich. Man hat es hier mit einem Vielteilchenproblem zu tun, in dem noch nicht einmal die Teilcheneigenschaften auch nur annähernd geschlossen beschrieben werden können. Ebenso ist die Beschreibung der Interaktion der (unterscheidbaren) Teilchen nicht in dem Maße möglich, wie es notwendig wäre. Man ist also, nach wie vor, auf umfangreiche Experimente angewiesen, um die Parameter für die Herstellung von Proteinen zu finden. Ein wichtiger Beitrag in dieser Richtung wird sicher mit der sich rasch entwickelnden Disziplin, der Bioinformatik, und einem Teilbereich der Proteinforschung, der Proteonomik, zu leisten sein.

Die Messungen der Bindungskonstanten, die mit der BS-Methoden ermittelt wurden, zeigen im Vergleich mit den FCS-Messungen etwa doppelt so hohe Fehler. Diese Methode kann daher nicht als Mittel der Wahl betrachtet werden, um ein genaueres Bild der Interaktionen zwischen diese Molekülen zu gewinnen. Die Ursache der Abweichungen sind zum einen in der Herstellung der Proben, zum anderen in der Auswertung zu suchen. Auf die Fehler, die auf die Probenpräparierung zurückzuführen sind, wurde schon zuvor eingegangen. Die Auswertung der BS-Gele wie sie vom Laser'Scanner' *Typhoon* ermöglicht wird, liefert einen zusätzlichen Fehler, der zu 2 – 4% abgeschätzt werden kann. Dieser Fehler könnte weiter minimiert werden. Dies würde jedoch voraussetzen, daß man das gemessene Signal direkt darstellen kann. Hier würden sich viele Analyse-Programme aus der Physik anbieten, die sehr schnell auf die jeweiligen Bedingungen des Experiments abgestimmt werden können.

In dieser Arbeit wurde unter anderem das Mathematik-Programm *Matlab*<sup>5</sup> und *PAW*<sup>6</sup> zur Analyse und Darstellung der Daten sowie für Simulationen benutzt.

Die Bindungskonstanten, die aus den Korrelationsdaten der FCS-Methode ermittelt wurden, weisen geringe Fehler auf. Die Meßwerte können zu  $k_{D-\alpha} = 0.62 \pm 0.015$  nM und  $k_{D-\beta} = 0.26 \pm 0.008$  nM bestimmt werden. Bei dieser Methode ist der führende Fehler in dem Anpassungsverfahren, mit dem die Daten beschrieben werden, zu suchen. Wie schon zuvor beschrieben hat die Voranalyse entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis der finalen Parametrisierung der Daten. Diese liefert die Startparameter für die Hauptanalyse. Um die Analyse in endlicher Zeit abschließen zu können, müssen ferner die Bereiche festgelegt werden, in denen die Startparameter variiert werden. Auch diese Bereiche wirken sich sensibel auf die Konvergenz des Anpassungsverfahrens aus. Dies kann auf die Überbestimmtheit der Parametrisierung zurückgeführt werden. Jedoch ist genau diese Form wichtig für die physikalische Interpretation der Parameter. Ein weitere Verringerung der Fehler ließe sich also mit einer längeren Analysezeit oder einer anderen Parametrisierung erreichen. Ein solches Vorgehen könnte für Analysen sinnvoll sein, bei denen es auf ei-

---

<sup>5</sup>Matlab ist eine Programm zur Darstellung und Analyse von Daten und zeichnet sich durch einfache Handhabung aus.

<sup>6</sup>PAW steht für Physics Analysis Workstation. Es ist eine sehr leistungsfähige Analyse-Software und hat in der Physik sehr große Verbreitung gefunden. Ferner wurden weitere Programmpakete, wie Minuit benutzt. Nähere Informationen erhält man unter <http://wwwinfo.cern.ch/asd/paw/> oder <http://wwwasdoc.web.cern.ch/wwwasdoc/minuit/>.

ne extreme Reduktion der Fehler ankommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieser Weg jedoch nicht weiter verfolgt, da die Untersuchung eines Verfahrens mit geringer Analysezeit im Vordergrund stand. Eine geringe Analysezeit ist eine wichtige Bedingung für den Einsatz in der Wirkstoffforschung.

# Kapitel 6

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Methoden zur Untersuchung von DNA-Protein Wechselwirkungen vorgestellt und verglichen, die molekularbiologische Methode des Bandshift Assay und die physikalische Methode der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie.

Im molekularbiologischen ersten Teil wurde die erfolgreiche Klonierung und Expression zweier nuklearer Rezeptoren gezeigt, zum einen die des Oestrogen-Rezeptors und zum anderen die des Orphan-Rezeptors PXR. Beide spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung zum adulten Lebewesen, sowie bei der Steuerung vieler regulatorischer Prozesse des Stoffwechsels. Die Expression konnte sowohl in Bakterien sowie in Zellen erfolgreich durchgeführt werden. Für die Nutzung der Rezeptoren in weiteren Experimenten wurden diese mit hoher Effizienz isoliert. Nach dieser Prozedur wurde die biologische Aktivität über die spezifische Bindung an die Erkennungsstelle auf der DNA nachgewiesen. Ferner konnte gezeigt werden, daß monoklonale Antikörper die Rezeptoren erkennen. Somit konnte belegt werden, daß ein weiterer Teil des Proteins mit einer typischerweise hochkomplexen räumlichen Struktur funktional ist. Die Funktionalität konnte auch in den Bindungsstudien mit dem 'Bandshift'-Verfahren gezeigt werden. Die mit dieser Methode ermittelten Werte der Gleichgewichtskonstanten sind  $k_{D-\alpha_{bs}} = 0.42 \pm 0.03$  nM und  $k_{D-\beta_{bs}} = 0.33 \pm 0.028$  nM.

Im physikalischen Teil wird die FCS-Methode vorgestellt. In dieser Methode wird die Fluoreszenz der DNA-Rezeptorkomplexe bei Bestrahlung ausgenutzt, um Fluktuationen der Rezeptorteilchen optisch vermessen zu können. Die Fluktuationen werden in einer Autokorrelationsfunktion beschrieben. Die Gleichgewichtskonstanten der Oestrogenrezeptoren konnten daraus zu  $k_{D-\alpha_{fcs}} = 0.62 \pm 0.015$  nM und  $k_{D-\beta_{fcs}} = 0.26 \pm 0.008$  nM bestimmt werden.

Umfangreiche systematische Studien wurden durchgeführt, wie z.B. der Einfluß der vielen Meßgeräteparameter (Pinholedurchmesser, Dauer der Einzelmessung, usw. ...) auf die wesentlichen Meßparameter (Diffusionszeit, prozentualer Anteil der Komponenten, Triplettanteil, usw. ...). Es wurde ein allgemeines Verfahren zur Evaluierung der Vormessungen entwickelt, sowie Meßbedingungen für Standardmessungen präsentiert. In einem weiteren, eher theoretischen Teil, konnte mit einem Simulationsprogramm der Einfluß der verschiedenen mathematisch-physikalischen Parameter auf die Autokorrelationsfunktion (AKF) gezeigt werden. Der Vergleich der theoretisch ermittelten AKF mit der gemessenen ist ein wichtiges Werkzeug, um Effekte der Messungen zu bewerten.

Erstmalig wird in dieser Arbeit ein direkter Vergleich, der beiden Systeme gezeigt. 'Direkt' heißt hier, daß identisch gleiche Proben analysiert wurden. Damit konnte der



meist erhebliche Einfluß verschiedener Pufferbedingungen auf die Bindung der Rezeptoren an die DNA ausgeschlossen werden. Wie groß dieser sein kann, zeigt die Darstellung der Biacore-Messungen im Abschnitt 5.2.3.

Das wesentliche Ziel der Arbeit, die Bestimmung und der Vergleich der Bindungskonstante der Oestrogenrezeptoren  $ER\alpha$  und  $ER\beta$ , wurde erreicht. Die Daten der FCS Messungen verglichen mit denen aus dem gelgestützten Bandshift stimmen im Rahmen der systematischen Meßungenauigkeiten überein. Ein Vergleich mit Literaturwerten mit den FCS-Daten untermauert die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse. Es konnte jedoch, die wesentlich höhere Sensitivität, der konfokalen Methode gezeigt werden.

Die Ergebnisse, zeigen die Überlegenheit des lasergestützten FCS-Systems, gerade in bezug auf die Sensitivität sowie in bezug auf den statistischen Fehler der Messungen. Das macht diese Methode gerade im Bereich der Hormonforschung, die eine hohe Sensitivität verlangt, zur Methode der Wahl.

# Anhang A

## Anhang: Molekularbiologischer Teil

### A.1 PCR

Die PCR ist in der modernen Molekularbiologie als DNA/RNA Nachweismethode nicht mehr wegzudenken. Sie hat mittlerweile ältere Verfahren, wie Northern- oder Southern-Blot<sup>1</sup>, praktisch völlig verdrängt. Die Methode nutzt eine thermostabile Polymerase zur Verknüpfung von Nukleotidtriphosphaten, welche einen DNA-Einzelstrang in 5'-Richtungen zu einem neuen Doppelstrang synthetisiert. Ferner benötigt man das zu vervielfältigende DNA-Molekül, ein Primerpaar und, nicht zu vergessen, den richtigen Puffer, die Nucleotide und die PCR-Maschine. Die Methode ermöglicht beliebige DNA-Sequenzen zu vervielfältigen.

Ein typisches PCR-Programm setzt sich zusammen aus einem Denaturierungs-, einem Hybridisierungs- und einem Elongationsschritt. Die Denaturierung der DNA findet bei 94 °C (5 min) statt. Hierbei trennt sich der Doppelstrang in Einzelstränge. Danach wird die Temperatur innerhalb weniger Sekunden auf 55 °C abgesenkt, so daß es zur Bindung der massiv im Überschuß vorhandenen 'Primer' an die einzelsträngige DNA kommt. Im nächsten Schritt wird die Temperatur wieder rasch auf 72 °C erhöht, die optimale Arbeitstemperatur für die Taq-Polymerase<sup>2</sup>. Das Enzym synthetisiert nun ab der Primerbindungsstelle den restlichen Einzelstrang zum Doppelstrang. Mit jedem gerade beschriebenen Zyklus verdoppelt man somit die gewünschten DNA-Moleküle. Nach etwa dreißig dieser Zyklen fügt man noch einen finalen Elongationsschritt von zirka 5 min an, in dem die Polymerase auf jeden Fall ihre Arbeit beenden kann. Um jegliche weitere Reaktion im Gemisch zu unterbinden, lagert man den Ansatz bei 4 °C. Durch diese Prozedur lassen sich die gewünschten DNA-Moleküle bis zu einer Länge von dreißig *kb* in einer fast beliebigen Menge herstellen. Theoretisch reicht ein einzelnes DNA-Molekül als Anfangsmolekül für eine Vervielfältigung mit dieser Methode. Dies ist auch der Grund warum die Methode gerade in der modernen forensischen Forschung so bedeutend wurde. In der Abbildung

---

<sup>1</sup>Diese Verfahren werden zum Nachweis von RNA bzw. DNA benutzt. Ihr großer Nachteil ist ihre geringere Nachweisgrenze.

<sup>2</sup>Die Taq-Polymerase ist die meist benutzte Polymerase. Sie wird aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert, daher auch die Bezeichnung Taq Polymerase. Das *Thermophilus aquaticus* Bakterium besiedelt heiße Quellen. Seine Enzyme, wie die DNA-Polymerase, weisen deshalb eine hohe Temperatur-Toleranz auf. D.h. sie können auch noch bei sehr hohen Temperaturen arbeiten und werden nicht zerstört. Dies macht man sich für die PCR-Reaktion zunutze, bei der die DNA bei 94 °C denaturiert wird, die DNA-Polymerase jedoch stabil bleibt. Neben der Taq-Polymerase gibt es noch weitere Enzyme, die bei der PCR eingesetzt werden können und von der Indikation abhängig sind.

(A.1) ist eine Anwendung, die Klonierung eine DNA-Sequenz in einen Vektor gezeigt.

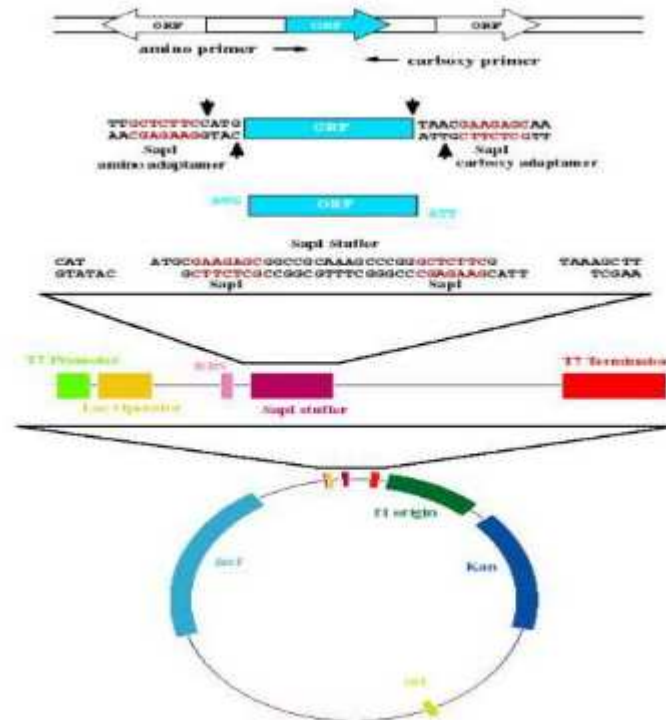


Abbildung A.1: Von der PCR zum 'fertigen' Plasmid.

## A.2 DNA-Isolation

### A.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (*E.coli*)

Je nach Verwendungszweck werden verschiedene Arten der Plasmidpräparation eingesetzt. Für einfache Anwendungen, die einen hohen Probendurchsatz erfordern, wird die Methode der alkalischen Lyse, modifiziert nach Birnboom und Doly (1979) [75], verwendet. Die pelletierten Bakterien aus 2 ml Übernachtskulturen werden in 100  $\mu$ l Lysispuffer (50 mM TrisHCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 15 % Saccharose) aufgenommen, mit 200  $\mu$ l alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1 % SDS) maximal 5 Min. lysiert und anschließend mit 150  $\mu$ l Kaliumazetat-Puffer (60 ml 5 M Kaliumazetat; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml  $H_2O$  dd (doppelt destilliert oder MilliQ- Reinstwasser) versetzt. Die Zelltrümmer sowie die ausgefallenen Proteine werden abzentrifugiert und die DNA aus dem wässrigen Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Das Pellet wird mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) oder 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen. Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA erfordern, werden Mini- und Midi-Plasmidreinigungskits der Firma QIAGEN nach den Angaben der Hersteller verwendet, die nach der alkalischen Lyse die DNA über einen säulenchromatographischen Schritt aufreinigen.

## A.2.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der analytische Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgt standardgemäß in 10  $\mu$ l Gesamtvolumen, das 0,5-2U<sup>3</sup> einer Restriktionsendonuklease enthält. Die Inkubation erfolgt in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2-5 h bei 37 °C. Anschließend wird der Verdau mit Hilfe eines analytischen Agarosegels analysiert. Soll die DNA in weiteren Reaktionen verwendet werden, so ist es notwendig, einen Reinigungsschritt durchzuführen. Hierzu wird das QIAquick-spin PCR Purification Kit der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. Der präparative Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen erfolgt in 60  $\mu$ l Gesamtvolumen, das 2 – 8 U einer Restriktionsendonuklease enthält. Die Inkubation erfolgt in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 – 5 h bei 37 °C. Anschließend wird die geschnittene DNA auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und das gewünschte DNA-Fragment aufgereinigt (siehe A.2.3). Die Restriktionsendonukleasen wurden, wenn nichts anderes angegeben, von New England BioLabs (UK), Boehringer (Mannheim), Gibco BRL (Eggenstein) oder von Roche Diagnostics (Mannheim) bezogen.

## A.2.3 DNA-Fragmentreinigung

DNA-Fragmente in den Gelen werden angefärbt mit Ethidiumbromid oder SYBERGOLD und unter UV-Licht Bestrahlung aus den Agarosegelen ausgeschnitten. Unter Verwendung des QiaEx-kits QIAGEN wird die DNA aus der Agarosegelmatrix nach den Angaben des Herstellers isoliert.

## A.2.4 Bakterientransformation (E.Coli)

Chemisch kompetente Bakterien werden mittels Hitzeschock transformiert. Die zu transformierenden Plasmide werden zu den kompetenten Bakterien gegeben, diese für 5 – 30 Min. auf Eis inkubiert, für 30 – 90 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und weitere 5 Min. auf Eis gestellt. Danach wird vorgewärmtes LB- bzw. SOC<sup>4</sup> zugegeben und die Kulturen für 30 – 60 Min. bei 37 °C geschüttelt. Anschließend werden Aliquots der Kulturen auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

## A.3 DNA-Sequenz Daten

### A.3.1 Die Sequenz des Oestrogenrezeptor $\alpha$

LOCUS ESR1 6450 bp mRNA linear PRI 05-NOV-2002

DEFINITION Homo sapiens estrogen receptor 1 (ESR1), mRNA

ACCESSION NM000125

VERSION NM000125.1 GI:4503602

SOURCE Homo sapiens (human)

REFERENCE [76] (bases 1 to 6450)

AUTHORS S.Green, P.Walter, V.Kumar, A.Krust, J.M.Bornert, P.Argos,

---

<sup>3</sup>Eine Unit(U) ist als die Menge der Restriktionsendonuklease definiert, die 1  $\mu$ g  $\lambda$ DNA in einer Stunde bei 37 °C schneidet, bei einem Gesamtreaktionsvolumen von 50  $\mu$ l.

<sup>4</sup>LB- bzw. SOC ist hochangereichertes Nährmedium.

TITLE Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A

JOURNAL Nature 320 (6058), 134-139 (1986)

BASE COUNT 1642 a 1496 c 1534 g 1778 t

ORIGIN kodierende Sequenz 1753bp 367-2148 Molecular Weight 66025.03 Daltons 593 Amino Acids

```

  1 gagttgtgcc tggagtgatg tttaagccaa tgtcagggca aggcaacagt ccctggccgt
 61 cctccagcac ctttghtaatg catatgagct cgggagacca gtacttaaag ttggaggccc
121 gggagcccag gagctggcgg agggcgttcg tcttgggagc tgactttgct ccgtcgggtc
181 gccggcttca ccggaccgca ggctcccggg gcagggccgg ggccagagct cgcgtgtcgg
241 cgggacatgc gctgcgtcgc ctctaacctc gggctgtgct ctttttccag gtggcccgcc
301 ggtttctgag ctttctgccc tgcggggaca cggctgcac cctgcccgcg gccacggacc
361 atgacatga ccctccacac caaagcatct gggatggccc tactgcatca gatccaaggg Start
421 aacgagctgg agcccctgaa ccgtccgcag ctcaagatcc ccctggagcg gcccctgggc
481 gaggtgtacc tggacagcag caagcccgcc gtgtacaact accccgaggg cgccgcctac
541 gagttcaacg ccgcggccgc cgccaacgcg caggtctacg gtcagaccgg cctcccctac
601 ggccccgggt ctgaggctgc ggcgttcggc tccaacggcc tgggggggtt cccccactc
661 aacagcgtgt ctccgagccc gctgatgcta ctgcacccgc cgccgcagct gtcgcctttc
721 ctgcagcccc acggccagca ggtgccctac tacctggaga acgagcccag cggctacacg
781 gtgcgcgagg ccggcccgcc ggcattctac aggccaaatt cagataatcg acgccagggt
841 ggcagagaaa gattggccag taccaatgac aagggaagta tggctatgga atctgccaaag
901 gagactcgct actgtgcagt gtgcaatgac tatgcttcag gctaccatta tggagtctgg
961 tcttgtgagg gctgcaaggc cttcttcaag agaagtattc aaggacataa cgactatatg
1021 tgtccagcca ccaaccagtg caccattgat aaaaacagga ggaagagctg ccaggcctgc
1081 cggctccgca aatgctacga agtgggaatg atgaaagggt ggatacgaag agaccgaaga
1141 ggaggagaaa tgttgaacaa caagcgccag agagatgatg gggagggcag ggggtgaagtg
1201 gggctctgct gagacatgag agctgccaac ctttggccaa gcccgtcat gatcaaacgc
1261 tctaagaaga acagcctggc cttgtccctg acggccgacc agatggctag tgccttgttg
1321 gatgctgagc ccccatact ctattccgag tatgatccta ccagaccctt cagtgaagct
1381 tcgatgatgg gcttactgac caacctggca gacagggagc tggttcatat gatcaactgg
1441 gcgaagaggg tgccaggcct tgtggatttg accctccatg atcaggtcca ctttctagaa
1501 tgtgcctggc tagagatcct gatgattggt ctctgtctggc gctccatgga gcaccagtg
1561 aagctactgt ttgctcctaa cttgctcttg gacaggaacc agggaaaatg tgtagagggc
1621 atggtggaga tcttcgacat gctgctggct acatcatctc ggttccgcat gatgaatctg
1681 caggagagagg agtttgtgtg cctcaaatct attattttgc ttaattctgg agtgtacaca
1741 tttctgtcca gcaccctgaa gtctctggaa gagaaggacc atatccaccg agtcctggac
1801 aagatcacag aactttgat ccacctgatg gccaaaggcag gcctgaccct gcagcagcag
1861 caccagcggc tggcccagct cctcctcatc ctctcccaca tcaggccat gatgaacaaa
1921 ggcagtgagc atctgtacag catgaagtgc aagaacgtgg tgcccctcta tgacctgctg
1981 ctggagatgc tggacgccc cgcctacat gcgcccacta gccgtggagg ggcacccgtg
2041 gaggagacgg accaaagcca cttggccact gcgggctcta cttcatcgca ttccttgaag
2101 aagtattaca tcacggggga ggcagagggt ttccctgcca cagtctga Ende

```

Die Sequenz wurde hier abgebrochen. Unter obiger Angabe erhält man die volle Sequenz.

### A.3.2 Die Sequenz des Oestrogenrezeptor $\beta$

LOCUS ESR2 2011 bp mRNA linear PRI 05-NOV-2002

DEFINITION Homo sapiens estrogen receptor 2(ER $\beta$ ) (ESR2) mRNA.

ACCESSION NM001437

VERSION NM001437.1 GI:10835012

SOURCE Homo sapiens (human)

REFERENCE 1 (bases 1 to 2011) [57]

MEDLINE 96354875

PUBMED 8769313

ORIGIN kodierende Sequenz 599-2011=> 1413bp => Molecular Weight 52590.19 Daltons 470 Amino Acids

```

  1  tttcagtttc tccagctgct ggctttttgg acaccctc ccccgccagg aggcagttgc
 61  aagcgcggag gctgcgagaa ataactgcct cttgaaactt gcagggcgaa gagcaggcgg
121  cgagcgcctgg gccggggagg gaccaccga gctgcgacgg gctctggggc tgcggggcag
181  ggctggcgcc cggagcctga gctgcaggag gtgctgctgc tttcctcaac aggtggcggc
241  ggggcgcgcg cgggagacc cccctaata cggaaaaagc acgtgtccgc attttagaga
301  aggcaaggcc ggtgtgttta tctgcaagcc attatacttg cccacgaatc tttgagaaca
361  ttataatgac ctttgtgcct cttcttgcaa ggtgttttct cagctgttat ctcaagacat
421  ggatataaaa aactcaccat cttagcctaa ttctccttcc tcctacaact gcagtcaatc
481  catcttacc ctaggagcag gctccatata cataccttcc tcctatgtag acagccacca
541  tgaatatcca gccatgacat tctatagccc tgctgtgatg aattacagca tccccagcaa Start
601  tgtcactaac ttggaagggt ggccctggctg gcagaccaca agcccaaatg tgttgtggcc
661  aacacctggg cacctttctc ctttagtggg ccatcgccag ttatcacatc tgtatgcgga
721  acctcaaaag agtccctggt gtgaagcaag atcgctagaa cacaccttac ctgtaaacag
781  agagacactg aaaaggaagg ttagtgggaa ccgttgccc agccctgtta ctggtccagg
841  ttcaaagagg gatgctcact tctgctgctg ctgcagcgat tacgcatcgg gatatcacta
901  tggagtctgg tcgtgtgaag gatgtaaggc cttttttaa agaagcattc aaggacataa
961  tgattatatt tgtccagcta caaatcagtg tacaatcgat aaaaaccggc gcaagagctg
1021 ccaggcctgc cgacttcgga agtgttacga agtgggaatg gtgaagtgtg gctcccggag
1081 agagagatgt gggtagcggc ttgtgaggag acagagaagt gccgacgagc agctgcactg
1141 tgccggcaag gccaagagaa gtggcggcca cgcgccccga gtgcgggagc tgctgctgga
1201 cgccctgagc cccgagcagc tagtgctcac cctcctggag gctgagccgc cccatgtgct
1261 gatcagccgc cccagtgctc cttcaccga ggcctccatg atgatgtccc tgaccaagtt
1321 ggccgacaag gagttggtac acatgatcag ctgggccaag aagattcccg gctttgtgga
1381 gctcagcctg ttcgaccaag tgcggctctt ggagagctgt tggatggagg tgttaatgat
1441 ggggctgatg tggcgtcaa ttgaccacc cggcaagctc atctttgctc cagatcttgt
1501 tctggacagg gatgagggga aatgcgtaga aggaattctg gaaatctttg acatgctcct
1561 ggcaactact tcaaggtttc gagagttaa actccaacac aaagaatata tctgtgtcaa
1621 ggccatgatc ctgctcaatt ccagtatgta ccctctggtc acagcgacc aggatgctga
1681 cagcagccgg aagctggctc acttgctgaa cgccgtgacc gatgctttgg tttgggtgat
1741 tgccaagagc ggcatctcct cccagcagca atccatgctc ctggctaacc tcctgatgct
1801 cctgtcccac gtcaggcatg cgagtaaaa gggcatggaa catctgctca acatgaagtg
1861 caaaaatgtg gtcccagttg atgacctgct gctggagatg ctgaatgcc acgtgcttcg
1921 cgggtgcaag tcctccatca cggggtccga gtgcagcccg gcagaggaca gtaaaagcaa
1981 agagggctcc cagaaccac agtctcagtg a Ende

```

### A.3.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente werden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Restriktion mittels geeigneter Endonukleasen nach den Angaben und mit den Puffern der entsprechenden Hersteller gewonnen. PCR-Fragmente werden mittels T4-Ligase nach den Angaben des Herstellers in pCR-Vektoren ligiert. Restriktionsfragmente werden ebenfalls mittels T4-Ligase mit glatten oder kompatiblen überhängenden Enden in linearisierte Vektoren kloniert.

### A.3.4 Sequenzierung von DNA

Die nichtradioaktive, automatisierte Sequenzierung wird im Service der Firma SEQUISERVE sowie selbst nach der Methode des 'cycle sequencing' mit fluoreszenzmarkierten Primern (IRD 700 bzw. 800, MWG-BIOTECH) auf einem LICOR (4000L oder LONGREADIR 4200; MWG-BIOTECH) durchgeführt. Für die manuelle Sequenzierung mit Harnstoffsequenzgelen werden 6%ige denaturierende Polyacrylamidgele (8M Harnstoff; 1 x TBE: 0,1M Tris, 0,1M Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0; 15% Gel 40-Lösung der Firma ROTH: Acrylamid/N,N'-Methylen-bisacrylamid 19:1; 38%) zur Auftrennung der Polynukleotide verwendet. Auf 80 ml Sequenzgellösung wurden 200  $\mu$ l 10%iges Ammoniumsulfat und 80  $\mu$ l TEMED zur Aktivierung der Polymerisation eingesetzt.

### A.3.5 Computergestützte Sequenzdatenanalyse

Die Sequenzdaten werden mit Hilfe der DNASIS- und der LASERGENE DNA\*STAR-Software analysiert, sowie mit öffentlich zugänglichen Online-Programmen, die im Ergebnis jeweils angegeben werden.

## A.4 Proteindaten

Proteine bilden mit fast 50 % der 'trockenen' Masse den Hauptbestandteil jeder Zelle. Sie bilden die wichtigsten Strukturelemente der Zelle und besitzen eine Schlüsselrolle, bei fast allen intra- und interzellulären Prozessen. Sie sind ubiquitär in allen Lebewesen enthalten. Proteine sind unverzweigte Kettenmoleküle (Polymere), die aus 20 verschiedenen Aminosäuren (AS), aufgebaut sind. Jede Aminosäure hat ein zentrales Kohlenstoffatom, das sogenannte  $C_{\alpha}$ -Atom. Das  $C_{\alpha}$ -Atom bindet ein Wasserstoffatom, eine Aminogruppe ( $NH_2$ ), eine Carboxylgruppe ( $COOH$ ) und eine Seitenkette (siehe Abb. A.2). Die verschiedenen Aminosäuren unterscheiden sich lediglich in der Seitenkette (R).

Die folgende Abbildung A.4 zeigt die Codetafel der Aminosäuren, die Grundbausteine der Proteine. In einem Protein sind die AS über Peptidbindungen (Abb. A.3) miteinander verbunden. Das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe von der AS  $A_i$  hat eine kovalente Bindung zum Stickstoffatom der Aminogruppe von AS  $A_{i+1}$ . Bei der Bildung einer Peptidbindung wird ein Wassermolekül freigesetzt. Die AS-Kette eines Proteins faltet sich auf spezifische Art und Weise, wodurch das Protein eine wohldefinierte dreidimensionale Struktur annimmt, welche entscheidenden Einfluß auf die Aktivität hat. In diesem Zusammenhang spricht man auch von der Tertiärstruktur, 3D-Struktur oder Konformation des Proteins.

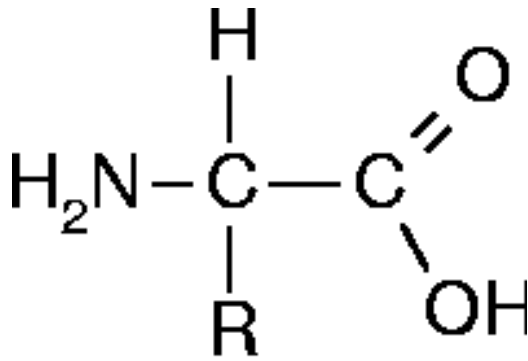


Abbildung A.2: Chemische Grundstruktur von Aminosäuren. R steht für Rest und repräsentiert die Seitenketten.

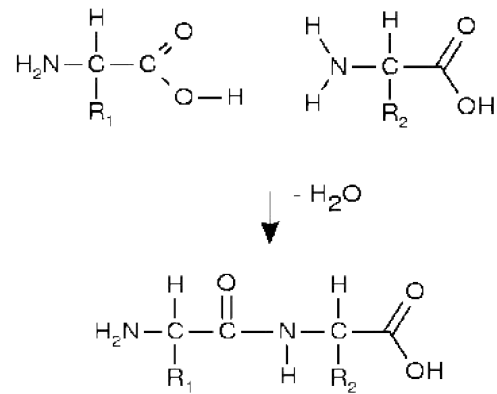


Abbildung A.3: Bindungsschema zwischen Aminosäuren (Peptidbindung).

		Zweite Base				
		U	C	A	G	
Erste Base	U	UUU Phenylalanin UUC UUA Leucin UUG	UCU Serin UCC UCA UCG	UAU Tyrosin UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cystein UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucin CUC CUA CUG	CCU Prolin CCC CCA CCG	CAU Histidin CAC CAA Glutamin CAG	CGU Arginin CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucin AUC AUA AUG Startcodon	ACU Threonin ACC ACA ACG	AAU Asparagin AAC AAA Lysin AAG	AGU Serin AGC AGA Arginin AGG	U C A G
	G	GUU Valin GUC GUA GUG	GCU Alanin GCC GCA GCG	GAU Asparaginsäure GAC GAA Glutaminsäure GAG	GGU Glycin GGC GGA GGG	U C A G

Abbildung A.4: Die Tabelle zeigt den DNA-Code für die Aminosäuren.

### A.4.1 Western-Analysen

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden halbtrocken auf eine PVDF-Membran transferiert [77], wobei ein dreistufiger Puffergradient wie folgt angelegt wird (Puffer 1: 300 mM Tris/HCl pH 10,4; 20% Methanol; Puffer 2: 25 mM Tris/HCl pH 10,4; 20% Methanol; Puffer 3: 300 mM Tris/HCl pH 9,4; 20 % Methanol; 40 mM 6-Aminocapronsäure). Der Transfer erfolgt bei 50 mA für 1,5 h in einer semi-dry Blot-Apparatur der Firma BIOTECH FISCHER. Anschließend werden die Membranen entweder getrocknet und bei RT gelagert, oder direkt 1 h unter Schütteln oder über Nacht bei 4 °C in 3% BSA in PBS (1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O; 0,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 100 mM NaCl) inkubiert, um die Membran abzublocken. Der erste Antikörper wird 1:500 bis 1:8000 verdünnt in 1,5 % BSA in PBS 1 h unter Schwenken auf der Membran belassen. Anschließend wird überschüssiger Antikörper 2 x 10 Min. mit PBST (PBS mit 0,1% Tween 20) und 2 x 15 Min. mit 1,5% BSA in PBS gewaschen. Der zweite Antikörper, ein anti-Kaninchen-Peroxidase-Konjugat wird 30 Min. inkubiert und 4 x 15 Min. mit PBS gewaschen. Die



Detektion erfolgt nach den Angaben des Protokolls zu dem chemiluminescence western blotting kit (mouse/rabbit) der Firma BOEHRINGER. Die Lumineszenz wird mit Hilfe von Biomax XR-Filmen detektiert.

### A.4.2 Proteingrößen-Standard

Bei allen in dieser Arbeit präsentierten Proteingelen oder Western-Analysen wird der Proteingrößen-Standard der Firma *Gibco Brl* benutzt. Er trägt die Bezeichnung 'Protein Ladder Benchmark Prestained'. In der folgenden Übersicht sind die Banden dem Molekulargewicht zugeordnet. Prestained Molecular Weight Markers. BenchMark Prestained Protein Ladder (GibcoBRL/Life Technologies. Cat. No. 10748-010).

Protein ladder	1. 184 kD
	2. 115 kD
	3. 83.6 kD
	4. 61.5 kD (pink)
	5. 50.8 kD
	6. 37.6 kD
	7. 25.4 kD
	8. 20 kD

### A.4.3 Coomassiefärbung

Zur Kontrolle der Gelbeladung und der Bloteffizienz werden die Proteingele nach dem Transfer mit Coomassie-Brilliant Blue R-250-Lösung (0,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 45% Methanol; 45%  $H_2O$ ; 10% Eisessig (Essigsäure)) angefärbt. Mit Entfärbelösung (45% Methanol; 45%  $H_2O$ ; 10% Eisessig) wird überschüssiger Farbstoff wieder entfernt und nach 30-minütiger Haltbarmachung in Trockenlösung (20% Glycerol) in Folie getrocknet.

## A.5 Verwendete Chemikalien

Alle Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg), Biorad (München), Fluka (Buchs,CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Steinheim) geliefert. Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Riedel-de-Haen (Hannover), Fluka und Merck bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien stammen von Difco Lab. (Detroit, USA), Merck und Duchefa (Haarlem, NL). Nukleinsäure modifizierende Enzyme wurden von Boehringer (Mannheim), Roche Diagnostics (Mannheim), Clontech (Heidelberg), Eurogentec (Seraing, B), Gibco BRL (Eggenstein), Promega (Mannheim) und Pharmacia Biotech verwendet. Blottingmembranen wurden von Boehringer (Mannheim) oder Amersham-Pharmacia (Buckinghamshire, UK) bezogen und Gel-Blotting-Papier von Schleicher & Schuell (Dassel). Radiochemikalien wie  $^{32}P$ -dATP,  $^{33}P$ -dATP,  $^{35}S$ -dATP sowie  $^{32}P$ -UTP wurden von NEN Dupont (Bad Homburg) bzw. von ICN Pharmaceuticals (Irvine, USA)

geliefert. Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersberg) oder NAPS (Göttingen) synthetisiert. Autoradiographien wurden mittels des PhosphoImagers Storm II der Firma Molecular Dynamics-Amersham-Pharmacia oder mit Filmen der Firmen Fuji (Tokio, Japan) oder Kodak (bezogen über Sigma, Steinheim) detektiert.

# Anhang B

## Anhang: Zellbiologischer Teil

### B.1 Zusammenstellung der Zelldaten

#### B.1.1 HeLa Zellen

HeLa Zellen gehören zu einer epithelartigen Zell-Linie. Die Zellen, die aus einem Zervix-Karzinom einer Patientin isoliert wurden, sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Die Bezeichnung der Zellen geht auf den Namen der Patientin, Henrietta Lacks, zurück.

Bereits seit Anfang der 50er Jahre werden diese Zellen als Standardzellen verwendet, um virologische, molekular- und zellbiologische Vorgänge zu erforschen. In der Molekularbiologie verwenden die Wissenschaftler weltweit die Zellen zur Züchtung von Viren, zum Beispiel von Adenoviren und von Poliomyelitis-Viren. Inzwischen haben Forscher Varianten der HeLa Zellen erzeugt, die sich zum Beispiel in der Morphologie, in der Virusempfindlichkeit und der Chromosomenzahl voneinander unterscheiden.

Nachfolgend sind die genauen Daten der Zelllinie aus der Datenbank der DEUTSCHEN SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GMBH (DSMZ) aufgelistet.

Cell line	HeLa
Cell type	Human Cervix Carcinoma
DSMZ No	ACC 57
Origin	established from the epitheloid cervix carcinoma of a 31-year-old black woman in 1951; later diagnosis changed to adenocarcinoma; first aneuploid, continuously cultured human cell line
References	Scherer et al., J. Exp. Med. 97: 695 (1953); Gey et al., Cancer Res. 12: 264 (1952)
Depositor	obtained from ATCC (CCL 2), Rockville, Maryland, USA

Tabelle B.1: Zusammenfassung der HeLa-Daten.

Morphology	epithelial-like cells growing in monolayers
Medium	90% MEM (with Earle's salts) + 10% FBS + 2 mM L-glutamine +non-essential amino acids (cells also grow well in 90-95% RPMI 1640 + 5-10% FBS)
Subculture	split confluent culture 1:4 to 1:6 every 3-5 days using trypsin/EDTA; cells reach confluence quickly; seed out at ca. $1-2 \times 10^6$ cells/80 cm <sup>2</sup>
Incubation	at 37 °C with 5% CO <sub>2</sub>
Doubling time	doubling time of ca. 48 hours
Harvest	cell harvest of ca. $5-15 \times 10^6$ cells/175 cm <sup>2</sup>
Storage	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about $2 \times 10^6$ cells/ampoule

Tabelle B.2: DSMZ Cell Culture Data for HeLa Cells.

Mycoplasma	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology	cytokeratin+, cytokeratin-7+, cytokeratin-8+, cytokeratin-17+, cytokeratin-18+, desmin-, endothel-, GFAP-, HMB-45-, neurofilament-, vimentin+
Fingerprint	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species	confirmed as human with IEF of G6PD, MDH, NP
Cytogenetics	human hypertriploid/hypotetraploid karyotype with 15% polyploidy; 82(77-84)< 4n >XXX, -X, -2, -3, -4, +5, +5, +5, +5, -7, -8, -11, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21, -22, +mar; der(1)t(1;3)(p11;q11), add(2)(q37), del(3)(q13), der(3)t(3;5)(q11;q11), i(5p)x4, del(6)(q15), der(9)t(1;9)(p11;p11), add(12)(q23), i(15q), der(19)t(13;19)(q22;p13)x1-2, add(21)(p11), del(22)(q12)
Viruses	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8-, HIV-, HTLV-I/II-

Tabelle B.3: DSMZ Scientific Data for HeLa Cells.

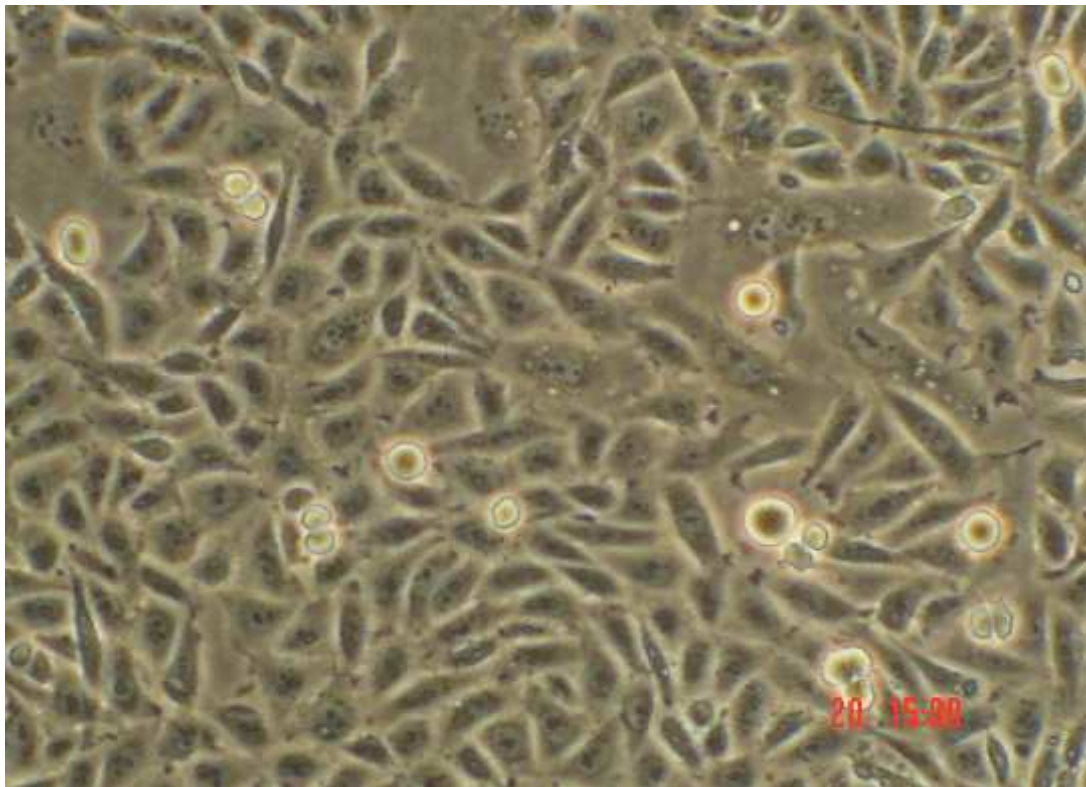


Abbildung B.1: Typische HeLa Zellen. Einige befinden sich in der Zellteilungsphase, zu erkennen an zwei dicht benachbarten, kleinen Kreisen.

### B.1.2 SF9-Insekten Zellen

Die Insekten-Zelllinie SF9 ist eine der Standardzelllinien, die für das Baculo-Virus Expressionssystem verwandt wird. Im folgenden werden die wesentlichen Daten dieser Zelllinie aus dem Archiv des DSMZ aufgeführt.

Cell line	SF-9
Cell type	insect - fall armyworm ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )
DSMZ No	ACC 125
Origin	cloned from the parent cell line, IPLB-SF-21-AE, derived from pupal ovarian tissue of the fall armyworm (species <i>Spodoptera frugiperda</i> , family Sciaridae, order Lepidoptera); cells are susceptible to infection with MNPV and other Baculoviruses; cells can be used with Baculovirus expression vectors
References	Vaughn et al., <i>In Vitro</i> 13: 213-217 (1977); Smith et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 82: 8404-8408 (1985)
Depositor	Dr. Asta Cramer, Institute for Virology, Marburg, Germany

Tabelle B.4: Zusammenfassung der SF9-Daten.

Morphology	polymorphic round cells, adherent
Medium	90% TC 100 medium + 10% FBS
Subculture	split culture 1:2 to 1:3 every 3-5 days (cells grow adherent, but trypsin is not necessary as cells can be detached by tapping the flask or with a rubber policeman); seed out at ca. $2 \times 10^6$ cells/80 cm <sup>2</sup> ; immediately after thawing, cell viability may be low
Incubation	at RT (about 20 °C) without CO <sub>2</sub> (keep lid of flask closed)
Doubling time	doubling time of ca. 50 hours
Harvest	about 5-10 x 10 <sup>6</sup> cells/80 cm <sup>2</sup>
Storage	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about 1-2 x 10 <sup>6</sup> cells/ampoule
Mycoplasma	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Species	confirmed with IEF of AST, PEP B as not primate or murine

Tabelle B.5: DSMZ Cell Culture and Scientific Data for SF9 Cells.

### B.1.3 HEP-G2 Zellen

Die humane Zelllinie Hep G2 wurde 1975 aus einer Leberbiopsie eines Kindes, das an einem primären Hepatoblastom erkrankt war, isoliert. Zuerst wurde diese Zelllinie von Aden [78] beschrieben. Diese Zelllinie besitzt noch alle wesentlichen Funktionen, die für normale humane Hepatozyten typisch sind.

Cell line	HEP-G2
Cell type	human hepatocellular carcinoma
DSMZ No	ACC 180
Origin	established from the tumor tissue of a 15-year-old Argentine boy with hepatocellular carcinoma in 1975; cell line is patented; cells were described to not harbor a hepatitis B virus genome; cells reportedly produce a variety of proteins: alpha-fetoprotein, albumin, alpha2-macroglobulin, alpha1-antitrypsin, transferrin, alpha1-antichymotrypsin, haptoglobin, ceruloplasmin, plasminogen, complement (C3, C4), C3 activator, fibrinogen, alpha1-acid glycoprotein, alpha2-HS glycoprotein, á-lipoprotein, retinol binding protein
References	Aden et al., Nature 282: 615-616 (1979); Knowles et al., Science 209: 497-499(1980);
Depositor	obtained from ATCC (HB 8065), Rockville, Maryland, USA

Tabelle B.6: Zusammenfassung der HEP-G2 Daten.

Morphology	adherent, epithelial-like cells growing as monolayers and in small aggregates
Medium	90% RPMI 1640 + 10% FBS
Subculture	split confluent culture 1:2 to 1:4 every 3-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. $2-3 \times 10^6$ cells/25 cm <sup>2</sup> ; after thawing, initially to be cultured with 20%FBS
Incubation	at 37 °C with 5% CO <sub>2</sub>
Doubling time	doubling time of ca. 50-60 hours
Harvest	cell harvest of about $25-30 \times 10^6$ cells/80 cm <sup>2</sup> ,
Storage	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about $3 \times 10^6$ cells/ampoule

Tabelle B.7: DSMZ Cell Culture Data for HEP-G2 Cells.

Mycoplasma	negative in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR assays
Immunology	cytokeratin+, desmin-, endothel-, GFAP-, neurofilament-, vimentin-
Fingerprint	multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile
Species	confirmed as human with IEF of AST, MDH
Cytogenetics	human hyperdiploid karyotype; $52(47-54) <2n>XY, +2, +14, +17, +20, +2mar, t(1;21) (p22.2;p11-12), i(17q)/der(17)t(17;17)(p11;q11)$
Viruses	ELISA: reverse transcriptase negative; PCR: EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8-, HIV-, HTLV-I/II-

Tabelle B.8: Scientific Data for HEP-G2 Cells.

### B.1.4 MCF-7 Zellen

Die Quelle der Daten ist auch hier das DSMZ in Braunschweig.

Cell line	MCF-7
Cell type	human breast adenocarcinoma
DSMZ No.	ACC 115
Origin	established from the pleural effusion of a 69-year-old Caucasian woman with metastatic mammary carcinoma (after radio- and hormone therapy) in 1970; cells were described of being positive for cytoplasmic estrogen receptors and having the capability to form domes
References	Soule et al., J. Natl. Cancer Inst. 51: 1409-1413 (1973)
Depositor	obtained from ATCC (HTB 22), Rockville, Maryland, USA

Tabelle B.9: Zusammenfassung der MCF-7 Daten.

Morphology	epithelial-like cells growing as monolayers
Medium	90% RPMI 1640 + 10% FBS + MEM non-essential amino acids + 1 mM sodium pyruvate + 10 microg/ml bovine insulin
Subculture	split confluent culture 1:2 to 1:4 every 2-6 days using trypsin/EDTA; seed out at ca. $0.1-0.2 \times 10^5$ cells/cm <sup>2</sup>
Incubation	at 37 °C with 5% CO <sub>2</sub>
Doubling time	doubling time of ca. 50 hours (range 30-72 hours)
Harvest	about $20-25 \times 10^6$ cells/175 cm <sup>2</sup>
Storage	frozen with 70% medium, 20% FBS, 10% DMSO at about $3 \times 10^6$ cells/ampoule

Tabelle B.10: DSMZ Cell Culture Data for MCF-7 Cells.



Mycoplasma	neg. in DAPI, microbiological culture, RNA hybridization, PCR cytokeratin+, cytokeratin-7-, cytokeratin-8+, cytokeratin-17-, cytokeratin-18+, desmin-, endothel-, GFAP-, neurofilament-, vimentin multiplex PCR of minisatellite markers revealed a unique DNA profile confirmed as human with IEF of AST, MDH human hypotetraploid karyotype with 8% polyploidy; 86(80-87) <4n>XX, -X, -X, -1, -1, +6, +7, -9, -10, -10, -12, -13, -13, +14, -17, -17, -18, -18, -20, -20, -20, -22, +6-8mar, add(X)(q27), add(2)(q35-37) x1-2, add(5)(p15), del(6)(q25)x1-2, add(7)(p11), add(7)(p14;hsr), add(10)(q23), del(11)(q21q23), add(15)(p11), i(15q), add(16)(q24), add(19)(q13), add(19)(p13)x1-2; corresponds to published karyotype
Immunology	
Fingerprint	
Species	
Cytogenetics	
Viruses	ELISA: reverse transcriptase neg.; PCR: EBV-, HBV-, HCV-, HHV-8-, HIV-, HTLV-I/II-

Tabelle B.11: Scientific Data for MCF-7 Cells.

# Literaturverzeichnis

- [1] <http://icpsg3.epfl.ch/thorsten/www-test/index.html>.
- [2] Jerker Widengren. *Fluorescence Correlation Spectroscopy; Theory and Applications*, chapter Photophysical Aspects of FCS Measurements. Springer Verlag, 2001.
- [3] Claus Urbanke und Alfred Pingoud. *Arbeitsmethoden der Biochemie*. Walter De Gruyter, 1. edition, 1997. s.113.
- [4] M.J.DUNN. *Gel Elektrophoresis: Proteins*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1. edition, 1993.
- [5] G. Kalusche. *Analyse von Drift- und Diffusionsbewegungen einzelner Moleküle in Lösung mittels laserinduzierter Fluoreszenz*. PhD thesis, Friedrich Schiller Universität Jena, 1999.
- [6] R.E. Dickerson *et al.*. The anatomy of a-, b-, and z-dna. *Science*, 5(216):475–485, 1982.
- [7] J.R. Nevins. The pathway of eukaryotic mrna transcription. *Annual Review of Biochemistry*, 52:441–446, 1983.
- [8] THE GENOME INTERNATIONAL SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409:860–921, 15 February 2001.
- [9] Christoph A.Meier. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors. *Journal of Receptor & Signal Transduction Research*, 17(1-3):319–335, 1997.
- [10] Miguel Beato and Aurora Sánchez-Pacheco. Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocrine Reviews*, 17(6):587–609, 1996.
- [11] David S.Latchman. *Eukaryotic Transcription Factors*. ACADEMIC PRESS, 1. edition, 1991.
- [12] K. Dhingra. Antiestrogens–tamoxifen, serms and beyond. *Invest. New Drugs*, 17(3):285–311, 1999.
- [13] Randolf Jordan. *Anwendung der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zur Untersuchung dynamischer Prozesse in lebenden Zellen*. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Göttingen, 2000.
- [14] A.E. Siegman. *An Introduction to Lasers and Masers*. McGraw-Hill, 1971.

- [15] W. Demtröder. *Laser Spectroscopy*. Springer-Verlag, 2. edition, 1996.
- [16] Jörg Enderlein and Christoph Zander. *Single Molecule Detection in Solutions*. WILEY-VCH Verlag Berlin GmbH, 1. edition, 2002. Methods and Applications.
- [17] E.L. Elson D. Magde. Fluorescence correlation spectroscopy: I. conceptual basis and theory. *Biopolymers*, 13:1–27, 1974.
- [18] Ilja N. Bronstein and Konstantin A. Semendjajew. *Handbook of Mathematics*. Springer, Berlin, new ed. edition, 2002. ISBN: 3-540-43491-7.
- [19] Charles R. Cantor and Paul R. Schimmel. *Biophysical Chemistry, Part II. Techniques for study of biological structure and function*. W.H. Freeman and Company, 1. edition, 1980.
- [20] Peter W. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH Weinheim, 1. edition, 1987. Kapitel: Moleküle in Bewegung, Diffusion.
- [21] R. Pecora S.R. Aragon. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J. Chem. Phys.*, 64:1791–1803, 1976.
- [22] N.L. Thompson A.G. Palmer. Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy. *Spectroscopy Biophys. J.*, 51:339–343, 1987.
- [23] R. Rigler J. Widengren. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell Mol. Biol.*, 44:857–879, 1998.
- [24] V.E. Korobov and Alexander Konstantinovich Chibisov. Primary photoprocesses in colorant molecules. *Russ. Chem. Rev.*, 52:27, 1983.
- [25] Schwabl. *Quantenmechanik*. Springer Verlag, 2. edition, 1992.
- [26] R. Rigler J. Widengren, Ü. Mets. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J. Phys. Chem.*, 99:13368–13379, 1995.
- [27] P.S. Dittrich P. Schwille. Photobleaching and stabilization of fluorophores used for single-molecule analysis with one- and two-photon excitation. *Appl. Phys. B Laser and Optics*, 73:829–837, 2001.
- [28] C. Seidel C. Eggeling J. Widengren R. Rigler. Photobleaching of fluorescent dyes under conditions used for single-molecule detection: evidence of two-step photolysis. *Anal. Chem.*, 70:2651–2659, 1998.
- [29] R. Rigler J. Widengren. Mechanism of photobleaching investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Bioimaging*, 4:149–157, 1996.
- [30] W.P. Ambrose P.M. Goodwin J.H. Jett A. van Orden J.H. Werner and R.A. Keller. Single molecule fluorescence spectroscopy at ambient temperature. *Chem. Rev.*, 99:2929–2956, 1999.
- [31] H. Haken H.C. Wolf. *Molekülphysik und Quantenchemie*. Springer Verlag Berlin, 1. edition, 1991.

- [32] D.E.Koppel. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev.*, 10:1938–1945, 1974.
- [33] N.L.Thompson. *Fluorescence Correlation Spectroscopy; Topics in Fluorescence Spectroscopy Vol. 1, Techniques*. Plenum Press, New York, 1. edition, 1991. p.337-378.
- [34] R.D.Icenogle E.L.Elson. Fluorescence correlation spectroscopy and photobleaching recovery of multiple binding reactions. ii. fpr and fcs measurements at low and high dna concentrations. *Biopolymers*, 22:1949–1966, 1983.
- [35] A.G.Palmer N.L.Thompson. Molecular aggregation characterized by high-order autocorrelation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 52:257–270, 1987.
- [36] Thorsten Wohland Horst Vogel. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*, 80:2987–2999, 2001.
- [37] E.L. Elson H. Qian. Analysis of confocal laser-microscope optics for 3-d fluorescence correlation spectroscopy. *Applied Optics*, 30(10):1186–1195, 1991.
- [38] J.Widengren P.Kask R.Rigler, Ü.Metz. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22(nn):169–175, 1993.
- [39] J.Schlessinger *et al.*D.E.Koppel. Dynamics of fluorescence marker concentrations as a probe of mobility. *Biophys. J.*, 16(nn):1315–1329, 1976.
- [40] S.M. Sze. *Semiconductor Devices*. John Wiley & Sons, 1985.
- [41] Technican. Avalanche photodiodes: A user's guide. EG&G Optoelectronic Canada.
- [42] J.M. Wurtz *et al.*. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nature Struct. Biol.*, 1(4):87–94, 1996.
- [43] Robert-Koch-Institut. <http://icpsg3.epfl.ch/thorsten/www-test/index.html>, Januar 2003.
- [44] Dietmar Tietz *et al.*. Concave ferguson plots of dna fragments and convex ferguson plots of bacteriophages: Evaluation of molecular and fiber properties, using desktop computers. *Electrophoresis*, 2(13):286–294, 1992.
- [45] D. Patel & D. Rickwood. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*. IRL Press, Oxford, 2. edition, 1990. ISBN 3827410258.
- [46] F.M. Ausubel *et al.*. *Short Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, 4. edition, 1999. ISBN: 047132938X.
- [47] T. Maniatis *et al.*. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1. edition, 1989.
- [48] Lämmlli *et al.*. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 6(227):680–685, 1970.

- [49] J.V.Jr. Maizel. Polyacrylamide gel electrophoresis of viral proteins. *Meth. Virol.*, 1(5):179–246, 1971.
- [50] M. Moreno *et al.*. Silverstaining of proteins in polyacrylamide gels: increased sensitivity through a combined coomassie blue-silverstain procedure. *Anal. Biochem.*, 1(151):466–470, 1985.
- [51] H. Towbin *et al.*. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1(76):4350–4354, 1979.
- [52] Hubert Rehm. *Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, 3. edition, 2000. ISBN 3827410258.
- [53] Cornel Mühlhardt. *Der Experimentator: Molekularbiologie*. Gustav Fischer, 1. edition, 1999. siehe Seite 116 ff.
- [54] I. Olsson J. Porath, J. Carlsson and G. Belfrage. Metal chelat affinity chromatographie, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 1(258):598–599, 1975.
- [55] K. Paech *et al.*. Differential transactivation properties of the estrogen receptor isotypes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ):estrogen-like effects with antiestrogens and antiestrogen effects with estrogen. *Science*, 1(277):1508–1510, 1997.
- [56] G.G.J.M. Kuiper *et al.*. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology*, 1(138):863–870, 1997.
- [57] S. Mosselmann *et al.*. Er beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, 1(392):49–53, 1996.
- [58] G.G.J.M. Kuiper *et al.*. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1(93):5925–5930, 1996.
- [59] Theodor Dingermann. *Gentechnik, Biotechnik: Prinzipien und Anwendung in Pharmazie und Medizin*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1. edition, 1999.
- [60] Toni Lindl. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum Akademischer Verlag, 4. edition, 2000. ISBN 3827408032.
- [61] S.A.Teukolsky W.T.Vetteröomg B.P.Flannery. *Numerical Recipies in C*. Cambridge University Press, 2. edition, 1996.
- [62] K.Levenberg. A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quarterly Applied Math.*, 2:164–168, 1944.
- [63] D.W.Marquardt. An algorithm for least-squares etimation of nonlinera parameters. *J. Soc. Indust. Appl. Math.*, 11(2):431–441, 1963.
- [64] R. Flecher. *Practical Methods of Optimization*. John Wiley&Sons, New York, 1987.

- [65] M.A. Saunders P.E. Gill, W. Murray and M.H. Wright. *Practical Optimization*. Academic Press, New York, 1989.
- [66] P.R. Bevington. *Data Reduction And Error Analysis For The Physical Sciences*. McGraw-Hill, New York, 1969.
- [67] J.N. Demas. *Excited State Lifetime Measurements*. Academic Press, New York, 1983.
- [68] R.Rigler Ü. Mets. Diffusion of single molecules through a gaussian laser beam. *Laser Spectroscopy of biomolecules*, 1921:239–248, 1992.
- [69] Manfred Eigen and Rudolf Rigler. Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 91(10):5740–5774, 1994.
- [70] José García de la Torre M.Mercedes Tirado. Comparison of theories for the translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. application to short dna fragments. *J.Chem.Phys.*, 8(4):2047–2052, 1984.
- [71] Albert Einstein. Zur theorie der brownschen bewegung. *Annalen der Physik*, 19:289ff.,371–381, 1906.
- [72] Boris J. Cheskis *et al.*. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with dna. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17):11384–11391, 1997.
- [73] Boris J. Cheskis *et al.*. A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3 selectibely augments steroid receptor transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(42):27645–27653, 1998.
- [74] A. Jungbauer *et al.*. Transcriptional activities of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in yeast properties of raloxifene. *Biochemical Pharmacology*, 62:953–961, 2001.
- [75] H.C. Birnboom and J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic Acids Res.*, 1(7):1513–23, 1979.
- [76] P. Walter S. Green. Human oestrogen receptor cdna: sequence, expression and homology to v-erb-a. *Nature*, 320(6058):134–139, 1986.
- [77] Kyhse-Anderson *et al.*. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J.Biochem.Biophys.Methods.*, 1(10):203–209, 1984.
- [78] S. Plotkin D.P. Aden, A. Fogel. Controlled synthesis of hbsag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 1(282):615–616, 1979.

# Danksagung

Wie immer beim Entstehen ebensolcher Werke tragen viele Menschen, bewußt oder unbewußt, zum Gelingen und erfolgreichen Abschluß bei.

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all diesen Menschen bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung der Weg zur fertigen, vorliegenden Arbeit ungleich mühseliger und weniger erfreulich gewesen wäre.

VIELEN DANK!

Herrn Professor Schulte möchte ich für das interessante Thema danken. Ein besonderer Dank gilt Frau Heyens und Herrn Domagalski für ihre wunderbare Art, mich mit den Methoden der Molekularbiologie sowie der Proteinbiochemie vertraut zu machen. Ferner möchte ich mich bei Herrn Dr. Krietsch herzlich bedanken, der die Arbeit direkt betreute. Er sorgte mit seiner ständigen Gesprächsbereitschaft immer wieder für Inspiration, nicht nur im wissenschaftlichen Bereich.

Herrn Professor Wick vom Institut für Experimentalphysik der Universität Hamburg möchte ich danken für die Übernahme der Betreuung dieser interdisziplinären Arbeit am Fachbereich Physik.

Abschließend möchte ich mich noch bei der Firma CCS bedanken, die mir durch das unkomplizierte Bereitstellen eines Arbeitsplatzes für die letzten Monate ermöglichte, meine Arbeit ohne einen weiteren Umzug beenden zu können.

Jedoch sollen zum Schluß folgende Personen nicht unerwähnt bleiben, die sich dem für sie meist fachfremden Text annahmen und durch ihre Fragen und Anregungen großen Anteil an der vorliegenden Form des Textes haben, oder mich sonst unterstützen:

M. Besendörfer, B. Eickhoff, K. Frieler, O. Nagel, A. Meyer, B. Wirtz.

MERCI!

# Lebenslauf

Name: CARL Christian  
geboren am 13. Februar 1968 in Bruchsal

## Schulbildung

1988 Abitur am Technischen Gymnasium in Sinsheim

## Zivildienst

1988-1990 Schwerbehinderten-Betreuung in Heidelberg

## Studium

- 10/1991 - 10/1998 Studium der Physik an der Universität Hamburg  
Diplomarbeitsthema 'Aufbau und Test eines CVD-Diamant  
Streifendetektors'.
- 1/1999 - 12/2002 Doktorand am Institut für Hormon und  
Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg,  
in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. Schulte und Dr. Krietsch,
- 1/2001 06/2003 Doktorand am  
Endokrinologikum einer Forschungsgesellschaft,  
in der Arbeitsgruppe von Prof.Dr. Schulte und Dr. Krietsch



# Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt zu haben und nur die angegebene Literatur und Hilfsmittel verwendet zu haben.

(Ch. CARL)