

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde

der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät

der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Nina Baudendistel

aus Kehl

Tag der mündlichen Prüfung: 5. November 2004

Thema:

**Zwei-Hybrid-
Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie:
In vivo Charakterisierung
von Protein-Protein-Wechselwirkungen
im AP-1-System**

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Jürgen Wolfrum

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2001 bis August 2004 in der Abteilung „Biophysik der Makromoleküle“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Langowski angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1 Fragestellung	5
2 AP-1-System	7
2.1 Einleitung	7
2.2 Aufbau von AP-1	8
2.3 Regulation und Funktion von AP-1	13
2.3.1 Regulation von c-Jun	13
2.3.2 Regulation von c-Fos	14
2.3.3 Regulation von Fra1	15
3 Autofluoreszierende Proteine	17
3.1 GFP (Green Fluorescent Protein)	19
3.2 YFP (Yellow Fluorescent Protein)	24
3.3 CFP (Cyan Fluorescent Protein).....	25
3.4 DsRed1+2 (<i>Discosoma striata</i> Red).....	26
3.5 mRFP1 (Monomeric Red Fluorescent Protein1).....	30
3.6 EqFP611 (<i>Entacmaea quadricolor</i> Fluorescent Protein).....	31
4 FCS & FCCS	35
4.1 Einleitung	35
4.2 Technischer Aufbau der FCS und FCCS	39
4.3 Theoretische Grundlagen der FCS und FCCS	40
4.3.1 Korrelation einer Spezies	42
4.3.2 Autokorrelation.....	43
4.3.3 Photodynamische Prozesse.....	44
4.3.4 Korrelation mehrerer Spezies	46
4.3.5 Fluoreszenzlöschung	49
4.3.6 Kreuzkorrelation	50
4.3.7 Korrektur des Untergrundsignals.....	53
5 Experimente & Ergebnisse	55
5.1 Charakterisierung der AP-1-XFP-Zellen	55
5.2 Nachweis der AP-1-Proteine mittels Western-Blot.....	57
5.2.1 Nachweis des Fusionsproteins c-Jun-EYFP	57

5.2.2	Nachweis des Fusionsproteins c-Fos-EGFP.....	58
5.2.3	Nachweis des Fusionsproteins Fra1-EYFP	59
5.3	Kalibrierung des FCCS-Aufbaus.....	60
5.4	Kontrollmessungen <i>in vitro</i>	63
5.5	Kontrollmessungen <i>in vivo</i>	66
5.5.1	Freies EGFP in HeLa	67
5.5.2	Freies RFP in HeLa.....	68
5.5.3	<i>In vivo</i> Kontrollen für FCCS	72
5.5.4	Deletionsmutanten von AP-1.....	78
5.6	Messung der Zellzyklusphasen	89
5.6.1	G1/S-Phase	90
5.6.2	Apoptose.....	91
5.7	Zwei-Hybrid-FCCS im AP-1-System.....	93
5.7.1	Keine Wechselwirkung im AP-1-System: c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP und c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1.....	94
5.7.2	Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen im AP-1-System: c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 in HeLa	95
5.8	FRET-Messungen.....	101
5.8.1	Kontrollen.....	101
5.8.2	AP-1-System.....	103
6	Diskussion	105
7	Material & Methoden.....	111
7.1	Verbrauchsmaterialien	111
7.2	Geräte.....	112
7.3	Konstruierte Vektoren.....	112
7.3.1	AP-1-Fusionsproteine	114
7.3.2	Deletionsmutanten von AP-1.....	115
7.3.3	Kontrollplasmide für FCCS-Messungen.....	116
7.4	Mikrobiologische Verfahren	118
7.4.1	Bakterien	118
7.4.2	Nährmedien und Glycerinkulturen	118
7.4.3	Transformation	119
7.5	Molekularbiologische Verfahren.....	119

7.5.1	Plasmidpräparation	119
7.5.2	Enzymatische Reaktionen	120
7.5.3	DNA-Sequenzierung	122
7.5.4	Gelelektrophorese	122
7.6	Zellbiologische Verfahren.....	125
7.6.1	Zellkultur	125
7.6.2	Transfektionen	125
7.6.3	Zellzyklus-Messungen	126
7.6.4	Zelllysate	127
7.7	Fluorimeter	128
7.8	Absorptionsspektroskopie.....	128
7.9	Fluoreszenzfluktationsmikroskopie (FFM).....	129
8	Zusammenfassung	131
9	Abstract	133
	Anhang	135
	Plasmidkarten & -konstruktion (zu Kapitel 7).....	135
	Plasmidübersicht	138
	Abkürzungsverzeichnis.....	141
	Literaturverzeichnis	145
	Danksagung	153

1 Fragestellung

Um die molekularen Mechanismen der Zelle verstehen zu können, muss man Proteine und deren Reaktionspartner auffindig machen. Es ist demnach wichtig, Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Komponenten zu charakterisieren, um sich auf diese Weise ein Bild des meist komplexen, biologischen Systems machen zu können.

Protein-Protein-Wechselwirkungen lassen sich heutzutage *in vitro* auf vielen Wegen nachweisen, z.B. durch Immunpräzipitation, Proteinarrays oder Super-Mobilityshift-Assays. Doch für *in vivo* Nachweise sind die Methoden sehr begrenzt. Wegen der Empfindlichkeit und der Möglichkeit der mikroskopischen Lokalisierung werden für *in vivo* Messungen häufig Fluoreszenztechniken eingesetzt wie z.B. der Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET). FRET ist ein physikalischer Prozess, bei welchem Energie von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül durch intermolekulare Dipol-Dipol-Kopplungen übertragen wird. Die Grundvoraussetzung für FRET ist allerdings eine räumliche Nähe der Fluorophore in einem Bereich zwischen 2 nm und 10 nm und eine geeignete relative Orientierung der Fluorophore zueinander, welche bei größeren Proteinkomplexen zwischen den einzelnen Untereinheiten nicht immer gegeben ist.

Ein anderes, erst in den letzten Jahren etabliertes Verfahren (Schwille et al. 1997), ist die Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS). Diese fordert keine räumliche Nähe im nm-Bereich, sondern nur die korrelierte Bewegung der Fluorophore. Durch FCCS erhält man zusätzlich Information über die Mobilität und Dynamik der Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Zur Markierung der zu untersuchenden Proteine wurden bisher meist kleine, organisch-chemischen Farbstoffe wie Alexa, Fluoreszein oder Cy-Farbstoffe benutzt. Die markierten Proteine mussten dann wieder in die Zellen mikroinjiziert werden. Mit Hilfe autofluoreszierender Proteine ist es jedoch heutzutage möglich, die Reaktions- bzw. Bindungspartner direkt genetisch zu markieren und ohne weitere Eingriffe in ihrer natürlichen Umgebung zu messen. Bisher gelang es jedoch nicht, ein System zu etablieren, in dem beide Proteine genetisch markiert sind und deren Wechselwirkung dann mittels FCCS nachzuweisen.

In dieser Arbeit wird im Folgenden gezeigt, dass die Schwierigkeiten bei der Verwendung autofluoreszierender Proteinkonstrukte wie Aggregation der Chromophore, Photolyse und spektrales Übersprechen mit dem Chromophorpaar EGFP und mRFP1 umgegangen werden können. Somit können Wechselwirkungen direkt in lebenden Zellen mit FCCS nachgewiesen werden. Diese Technik wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit in Anlehnung an die Yeast-Two-Hybrid-Technik, bei der zum Nachweis von Wechselwirkungen ebenfalls zwei Fusionsproteine verwendet werden, als „Zwei-Hybrid“-FCCS bezeichnet. Als Bindungspartner wurden die Hauptkomponenten des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator Protein-1) c-Jun und c-Fos ausgewählt. Sowohl Fos als auch Jun sind Protoonkogene. Bei einigen Krebsarten, wie z.B. dem Lungenkrebs werden diese Proteine hoch reguliert. AP-1 kann seine Funktion, die Aktivierung der Transkription, nur als Dimer ausüben. Die Dimerisierung von c-Fos und c-Jun konnte zwar schon *in vitro* in Extrakten nachgewiesen werden, doch *in vivo* gelang dies bis jetzt nur Kerppola et al. 2002 durch eine bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (biFC) von YFP (Yellow Fluorescent Protein) (Hu et al. 2002; Hu et al. 2003). Dabei wurde an c-Fos und c-Jun jeweils ein nicht-fluoreszierendes Fragment von YFP fusioniert, welches dann nach Dimerisierung von Fos und Jun mit dem zweiten Fragment von YFP ein Chromophor bilden kann. Durch diese Methode werden die Proteine jedoch ihrem normalen Gleichgewicht entzogen, da die Komplementation der AFPs irreversibel ist.

Ziel dieser Arbeit war es, als Beispiel für eine *in vivo* Wechselwirkung, die Bildung des Transkriptionsfaktors AP-1 aus Fos und Jun – sowie die Dynamik des entstandenen Komplexes - mit der Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie unter Verwendung zweier autofluoreszierender Proteine nachzuweisen.

2 AP-1-System

2.1 Einleitung

Der Transkriptionsfaktor AP-1 (Aktivator Protein-1) wurde Ende der 80er Jahre entdeckt. Er wurde zunächst in der Enhancer-Region des SV 40 und Metallothionein-Gens hMT-II_A, später auch im Collagenase-Gen gefunden (Angel et al. 1987; Lee et al. 1987; Lee et al. 1987). Dabei bindet AP-1 überwiegend an die palindromische Basensequenz TGACTCA, welche TRE (TPA-responsive element) genannt wird, da sie Genregulation durch den Tumorpromoter TPA (12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) vermittelt. Später wurden noch eine Reihe anderer Gene mit dieser Erkennungssequenz gefunden (siehe Tab. 2.1).

Kurz nach der Entdeckung von AP-1 wurde v-Jun (v = viral) als neues Onko-Protein des Rous-Sarcoma-Virus mit identischen Bindungseigenschaften wie der Transkriptionsregulator GCN4 in Hefe identifiziert (unter einem Onko-Protein versteht man ein Protein, welches für Krebsentstehung mit verantwortlich ist). Durch TRE-vermittelte Affinitätsreinigung und nachfolgender Proteinsequenzierung konnte das zelluläre Homolog von v-Jun, c-Jun, kloniert werden (Bohmann et al. 1987). Diese Sequenz ist identisch mit der menschlichen c-DNA, die durch Hybridisierung mit einer v-Jun spezifischen Sonde isoliert wurde (Angel et al. 1988), und kodiert für das mit Fos assoziierte p39-Protein (Rauscher et al. 1988; Sassone-Corsi et al. 1988). Der Unterschied zwischen dem viralen und zellulären Jun besteht vermutlich in der Regulation seiner Aktivität durch Phosphorylierung. Durch *in situ* Hybridisierung konnte das menschliche c-Jun dem Chromosom 1 in der Region p31-32 zugeordnet werden (Haluska et al. 1988; Hattori et al. 1988).

Später wurden noch weitere, strukturell ähnliche Proteine isoliert, so dass es sich hier um eine ganze Proteinfamilie handelt.

2.2 Aufbau von AP-1

Der AP-1 Transkriptionsfaktor ist ein dimerer Komplex, dessen Komponenten aus den JUN-, FOS-, ATF- (Activating Transcription Factor) und MAF- (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) Proteinfamilien stammen. Zu diesen gehören unter anderem c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2, wobei c-Jun und c-Fos die Hauptkomponenten von AP-1 darstellen. Deshalb wurden diese beiden Proteine als „Dimerisierungspartner“ zur Messung der Kreuzkorrelation für diese Arbeit ausgewählt.

AP-1 kann eine Vielzahl verschiedener Hetero- bzw. Homodimere bilden, wobei unterschiedliche Dimere auch leicht unterschiedliche DNA-Sequenzen erkennen (siehe Tab. 2.1) und auf diese Weise unterschiedliche Sets von Genen regulieren (Chinenov et al. 2001; Vogt 2002). Einen Überblick über die „Dimerisierungspartner“ und die dazugehörigen Erkennungssequenzen gibt Tab. 2.1.

c-Jun + Dimerisierungspartner	Erkennungs-Sequenz	c-Fos + Dimerisierungspartner	Erkennungs-Sequenz
c-Jun	TRE > CRE	c-Jun	TRE > CRE
JunB	TRE > CRE	JunB	TRE > CRE
JunD	TRE > CRE	JunD	TRE > CRE
c-Fos	TRE > CRE	-	
FosB	TRE > CRE	-	
Fra1	TRE > CRE	-	
Fra2	TRE > CRE	-	
ATFa	TRE = CRE	ATFa	-
ATF2	CRE > TRE	ATF2	CRE > TRE
ATF3	CRE > TRE	-	
ATF4	CRE	ATF4	CRE
B-ATF	TRE > CRE	-	
c-MAF	MARE I/II	c-MAF	MARE I/II
MAFA	MARE I/II	MAFA	MARE I/II
		MAFB	MARE I/II
NRL	TRE-related	NRL	TRE-related
MAFF/G/K	MARE I/II	MAFF/G/K	MARE I/II
NRF-1	ARE	-	
NRF-2	ARE	NRF-2	ARE
NFIL-6	TRE	NFIL-6	TRE

Tabelle 2.1 c-Jun und c-Fos Bindungspartner und die jeweiligen Erkennungssequenzen dieser Dimere. Tabelle aus (Eferl et al. 2003).

Die Erkennungssequenzen von AP-1 lauten:

TRE:	TGACTCA ACTGAGT	(TPA-responsive element)
CRE:	TGACGTCA ACTGCAGT	(cAMP-responsive element)
MARE I:	TGCTGACTCAGCA ACGACTGAGTCGT	(MAF-recognition element)
MARE II:	TGCTGACGTCAGCA ACGACTGCAGTCGT	
ARE:	a/ gTGACnnnGC t/ cACTGnnnCG	(antioxidant-responsive element)

Alle AP-1-Proteine besitzen am carboxyterminalen Ende einen Leucinzipper (*zipper* = Reißverschluss) (Landschulz et al. 1988), welcher auch im Hefetranskriptionsfaktor GCN4 enthalten ist (Vogt et al. 1987). Außerdem weisen die AP-1-Proteine zwei weitere Domänen auf: eine DNA-Bindungs- und eine Transaktivierungsdomäne am aminoterminalen Ende (Abb. 2.1).

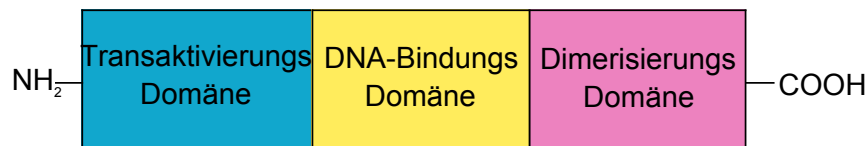


Abbildung 2.1 Aufbau der AP1-Proteine, bestehend aus einer Transaktivierungs-, einer DNA-Bindungs- und einer Dimerisierungsdomäne.

Der Leucinzipper besitzt eine Basensequenz, bei der jede siebte Aminosäure ein Leucin ist. Das ganze in einer fünffachen Wiederholung. Die Dimerisierung der AP-1-Proteine untereinander erfolgt über diesen Zipper. Dabei winden sich die α -helicalen Bereiche der regelmäßigen Leucine zweier AP-1-Proteine umeinander als so genannte „Coiled Coils“ (Abb. 2.2).

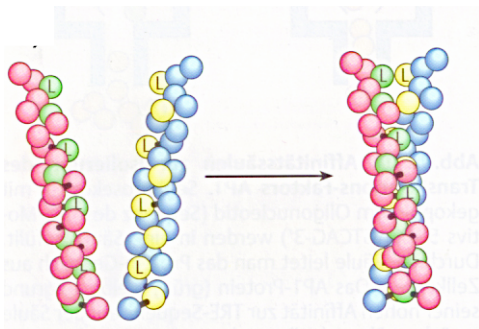


Abbildung 2.2 Die Leucinzipper im Fos und Jun winden sich umeinander und bilden eine Konformation, die „Coiled Coil“ genannt wird (Knippers 1997).

Dadurch entsteht eine amphipathische Doppelhelix (Abb. 2.3), bei der die Leucine (Position d) mit den Aminosäuren in Position a eine hydrophobe Grenzfläche ausbilden. Die hydrophilen Aminosäure-Reste sind direkt daneben angeordnet (Rasmussen et al. 1991). Diese Struktur erklärt auch, warum c-Jun sowohl Homodimere als auch Heterodimere ausbilden kann, c-Fos dagegen nur Heterodimere. Aufgrund der elektrostatischen Abstoßung der Glutamate (Abb. 2.3, Position g in rot) zwischen zwei c-Fos Proteinen und der reduzierten Anzahl hydrophober Wechselwirkungen in c-Fos kann es zu keiner stabilen Fos-Fos-Dimerbildung kommen (Schuermann et al. 1989; Zerial et al. 1989).

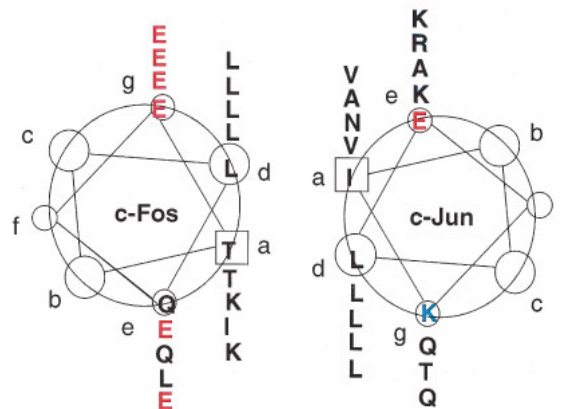


Abbildung 2.3 Helicale Darstellung von c-Fos und c-Jun. Die hydrophilen Aminosäuren der Positionen e und g befinden sich direkt neben der hydrophoben Grenzfläche, die aus den Leucinen in Position d und den Aminosäuren in Position a gebildet wird (van Dam et al. 2001).

Direkt an den Leucinzipper grenzt eine basische Region, die als Kontaktfläche zur DNA dient: die DNA-Bindungsdomäne. Der Leucinzipper und diese basische Region werden zusammen als basischer Zipper (bZip) bezeichnet. Diese charakteristische Anordnung von DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne findet man in vielen Transkriptionsfaktoren wieder. Bis heute wurden über 40 solcher bZip-Proteine im menschlichen Genom identifiziert (Vogt 2001). Die Struktur der bZip-Domäne des Heterodimers aus Fos und Jun wurde 1995 röntgenkristallographisch bestimmt (Glover et al. 1995).

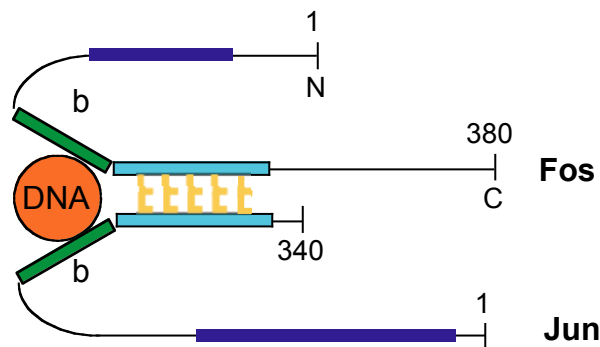


Abbildung 2.4 Transkriptionsfaktor AP-1. Die beiden Untereinheiten Fos und Jun sind parallel angeordnet. Die beiden aminoterminalen Enden sind mit 1 gekennzeichnet, die carboxyterminalen mit 380 für Fos und 340 für Jun (gibt auch die Anzahl der Aminosäuren im Protein an). Die Proteine werden durch den Leucizipper (L und hellgelb) zusammengehalten. Dadurch entsteht eine Y-förmige Konfiguration mit den basischen Regionen (in grün) in den Armen. Diese fassen die DNA (rot) wie die Greifer einer Zange. Die Transaktivierungsdomänen sind in dunkelblau markiert (Knippers 1997).

Die Dimerisierung von AP-1 ist notwendig für eine spätere DNA-Bindung (Halazonetis et al. 1988; Smeal et al. 1989) (Abb. 2.4). Kohler et al. dagegen schließen eine mögliche Bindung an die DNA der AP-1-Monomere nicht aus, da die Dimerisierungsrate in Anwesenheit von DNA erhöht wird. Dies spricht für eine Stabilisierung des Dimers durch die DNA (Kohler et al. 2001). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass c-Fos auch an andere zelluläre Komponenten und Transkriptions-Cofaktoren binden kann. Dazu ist die bZip-Domäne teilweise nicht erforderlich. Beispiele hierfür sind die Wechselwirkung von Fos mit GATA (Transkriptionsfaktor, der an das WGATAR DNA-Motiv bindet) (McBride et al. 2003) oder FHL2 (Four and Half LIM domain) (Morlon et al. 2003).

AP-1 kann nach der Dimerisierung an die entsprechende Bindestelle (hier: TRE) in der Promoterregion stromaufwärts vom jeweiligen Gen binden, woraufhin die Aktivierung der Transkription erfolgen kann (Abb. 2.5). Die Bindung des Dimers an die DNA hängt jedoch immer auch von der Stabilität des jeweiligen Dimers ab. So ist die Bindung des c-Jun-Homodimers weniger stabil als die des c-Jun-c-Fos-Heterodimers.

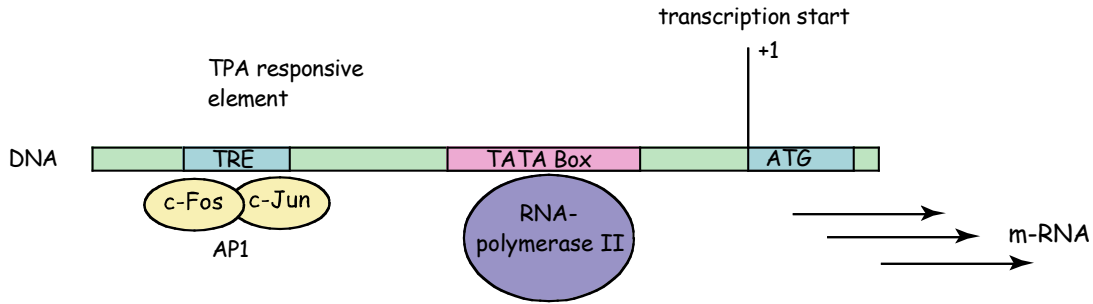


Abbildung 2.5 Region um einen AP-1 regulierten Promoter. Das Fos-Jun-Dimer bindet stromaufwärts von der TATA-Box an das TRE-Element. Daraufhin kann die Transkription erfolgen.

In der basischen Region befindet sich auch die Kernlokalisierungssequenz (NLS, Nuclear Localization Site) der Proteine, eine kurze arginin- und lysinreiche Aminosäuresequenz (etwa 15 Aminosäuren). Die NLS besteht meist aus 2 basischen Aminosäuren auf der aminoterminalen Seite, gefolgt von einem Spacer von etwa 10 Aminosäuren und einer Ausdehnung von 3 bis 4 basischen Aminosäuren auf der carboxyterminalen Seite. Diese NLS wird zweiteilige NLS genannt (stammt von der Nucleoplasmin NLS), im Gegensatz zur einteiligen, die nur aus 3 bis 5 basischen Aminosäuren besteht und z.B. im SV 40 T-Antigen vorkommt. Die NLS sorgt dafür, dass AP-1 aktiv durch den NPC (Nuclear Pore Complex) in den Kern transportiert wird, wo es seine Funktion ausüben kann (Chida et al. 1999). Der Transport von AP-1 erfolgt unabhängig von Importin α , aber in Abhängigkeit von Importin β (Forwood et al. 2001). Sowohl c-Jun als auch c-Fos und Fra1 besitzen eine NLS, wobei das Kernlokalisierungssignal von Jun das stärkste ist. Durch die Dimerisierung von c-Fos mit c-Jun wird dieses verstärkt in den Kern transportiert (Chida et al. 1999). Bei c-Fos befindet sich die NLS zwischen den Aminosäuren 139-160. Die NLS kann in drei Untereinheiten unterteilt werden, wovon jede für sich ein Kernsignal besitzt, welche sich additiv verstärken. c-Fos besitzt wahrscheinlich darüber hinaus noch eine weitere NLS, da bei Entfernung der Sequenz zwischen den AS 139-160 c-Fos dessen ungeachtet in den Kern transportiert wird. Im c-Jun liegt die NLS zwischen den Aminosäuren 257 und 276, bei Fra1 zwischen AS 118 und AS 127 (Tab. 2.2).

Am aminoterminalen Ende befindet sich die Haupt-Aktivierungsdomäne der AP-1-Proteine, die jedoch keine definierten Strukturen aufweist. Die drei AP-1-Domänen sind voneinander unabhängige Module, d.h. sie sind durch andere funktionell

äquivalente Domänen austauschbar. Dadurch wird eine basale Aktivität von AP-1 gewährleistet (Vogt 2001).

AP-1-Protein	DNA-Bindungs-Domäne	Dimerisierungs-Domäne
c-Jun	257-276	280-308
c-Fos	139-160	165-193
Fra1	118-127	133-161

Tabelle 2.2 AP-1 bZip-Domänen. DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von c-Jun, c-Fos und Fra1.

2.3 Regulation und Funktion von AP-1

AP-1 spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Signalübertragung, Tumorentstehung, aber auch Tumorunterdrückung und Apoptose (programmierter Zelltod). AP-1 reguliert demnach viele Aspekte der Zellphysiologie als Antwort auf Umgebungsänderungen, wie z. B. Stress, Bestrahlung oder Wachstumsfaktoren. Es übt die Funktion eines „Biosensors“ aus.

AP-1 wird durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Proteinkinasen und einer Vielfalt an Transkriptions-Cofaktoren kontrolliert und reguliert, von denen bei Weitem noch nicht alle bekannt sind. Die Steuerung der AP-1-Aktivität geschieht auf zwei Hauptebenen: extrazelluläre Reize modulieren sowohl die Menge als auch die Aktivität der AP-1-Proteine. Die Menge der AP-1-Proteine wird meist durch Kontrolle der Transkription seiner Gene kontrolliert (Karin 1995). Andere Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Menge an c-Fos und c-Jun aber auch durch Modulierung der Stabilität dieser Proteine gesteuert werden kann (Treier et al. 1994).

2.3.1 Regulation von c-Jun

Das AP-1-Protein c-Jun weist eine positive Autoregulation auf; d.h. seine Transkription und Expression werden durch sein eigenes Genprodukt aktiviert und gesteuert (Angel et al. 1988; Lamph et al. 1988).

AP-1 und damit auch c-Jun kann durch Tumorpromotoren wie z.B. den Phorbolster TPA und Serumfaktoren aktiviert werden. Dabei bindet TPA an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, welche dann die Proteinkinase C (PKC) aktivieren, die daraufhin mit

AP-1 in Wechselwirkung tritt und den AP-1-Komplex phosphoryliert. Die Aktivierung von c-Jun läuft dabei in zwei Schritten ab: 1.) Unmittelbar nach Zugabe von TPA wird das schon an den Bindungsstellen sitzende Jun/AP-1 durch posttranslationale Modifikationen (z.B. durch JNK) am aminoterminalen Ende aktiviert. Es kommt dadurch zu einer verstärkten Initiation durch Co-Faktoren und einer effizienten Ausbildung des RNA-Polymerase-II-Initiationskomplexes. 2.) In einem zweiten Schritt wird die Transkription von c-Jun durch die Bindung von neuem Jun/AP-1 an seine beiden Bindungsstellen im c-Jun-Promoterbereich (Bp -70 und -180) aktiviert. Gleichzeitig wird die DNA-Bindungsaktivität von AP-1 durch De-/Phosphorylierungen am carboxyterminalen Ende erhöht, was wiederum eine verstärkte Bindung an AP-1-Zielgene bewirkt.

Diese Autoregulation hat zur Folge, dass kurzlebige Signale, die durch TPA hervorgerufen werden, in lang anhaltende zelluläre Ereignisse wie die Transkription solcher Faktoren umgewandelt werden können. Dadurch können die Zellen in die G1- und S-Phase geführt werden.

Die Transkriptionsaktivität hängt aber auch von der Stabilität des AP-1-Komplexes ab. Bei c-Jun reduziert z.B. die Phosphorylierung der Serine und Threonine durch MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) in der aminoterminalen Aktivierungsdomäne die Ubiquitinierung und dadurch auch den Abbau von c-Jun (Musti et al. 1997). Die Phosphorylierung der Serine 63 und 73 von c-Jun durch JNK (Jun N-terminale Kinase) erhöht dessen Stabilität bis zu einem gewissen Maß und damit auch seine Transkriptionsaktivität (Derijard et al. 1994). Im viralen Jun dagegen fehlen diese Sequenzen, welche für die Ubiquitinierung und den Abbau verantwortlich sind. Außerdem kann v-Jun nicht durch JNK reguliert werden. Darin liegt möglicherweise der Grund für sein höheres onkogenes Potential (Vogt 2001).

2.3.2 Regulation von c-Fos

Im Gegensatz zu c-Jun weist c-Fos eine negative Autoregulation auf (König et al. 1989). Fos und Jun sind für die Unterdrückung des Fos-Promoters verantwortlich, der mindestens zwei AP-1-Bindestellen besitzt (Piette et al. 1987; Schönthal et al. 1989; Boyle et al. 1991). Dieser Mechanismus läuft über die Wechselwirkung mit den positiven Transkriptionselementen im Fos-Promoter ab, bei denen es sich um das DSE (Dyad symmetry element) und dessen *trans*-acting Faktor handelt. Dabei werden

nach Serum-Zugabe, die MAP-Kinasen aktiviert, gefolgt von der Aktivierung des TCF (Ternary Complex Factor)/SRF (Serum Responsive Factor)-Komplexes, der an das DSE bindet und dadurch Transkription aktiviert. Die basale Transkriptionsrate dagegen wird durch eine Sequenz um -296 im Enhancerbereich negativ moduliert.

Außerdem fand man heraus, dass das carboxyterminale Ende von c-Fos, welches im viralen Fos nicht vorhanden ist, verantwortlich für einen verstärkten Abbau von c-Fos ist. c-Fos kann an vielen Stellen durch eine Vielzahl von Kinasen phosphoryliert werden. Diese Modifikationen können sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma erfolgen, treten jedoch im Kern häufiger auf. Modifikationen im Phosphorylierungsstatus sind mit verantwortlich für die Feinregulierung der AP-1-Aktivität (König et al. 1989). Die Phosphorylierung von Fos z.B. ist für die verstärkte Unterdrückung der Fos-Transkription verantwortlich (Ofir et al. 1990), auch wenn diese Phosphorylierungen offensichtlich *in vitro* nicht die Fähigkeit von c-Fos, zu dimerisieren oder an DNA zu binden, beeinträchtigen (Piechaczyk et al. 1994). *In vivo* Untersuchungen führten zu abweichenden Ergebnissen (Boyle et al. 1991; Pulverer et al. 1991; Smeal et al. 1991).

2.3.3 Regulation von Fra1

Über die genaue Regulation von Fra1 ist in der Literatur sehr wenig bekannt. Bergers et al. zeigten, dass Fra1 (Fos related antigen 1) durch c-Fos aktiviert wird, da im Fra1-Promoter Bindestellen für c-Fos/AP-1 vorhanden sind. Fra1 wird somit als einziges Mitglied der Fos-Familie durch AP-1 positiv reguliert (Bergers et al. 1995).

Andere Untersuchungen wiesen nach, dass durch Dimerisierung von Fra1 mit c-Jun bzw. c-Fos die Transkriptionsaktivität des entstandenen AP-1-Komplexes im Vergleich zu einem Fos-Jun-Dimer erniedrigt wird. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich das schwache Transaktivierungspotential von Fra1 (Cohen et al. 1988; Cohen et al. 1989).

3 Autofluoreszierende Proteine

Biologische Vorgänge auf molekularer Ebene sichtbar zu machen und zu verstehen, gewinnt heutzutage zunehmend an Bedeutung. Nur so ist es möglich, Krankheiten besser zu verstehen und gezielt Medikamente und Impfstoffe gegen diese Krankheiten zu entwickeln. Die molekulare Bildgebung („Molecular Imaging“) ist deshalb zu einem Eckpfeiler der modernen Zellbiologie und Medizin geworden. Die Methoden reichen von konfokaler, optischer Mikroskopie kombiniert mit Fluoreszenzresonanz-energietransfer (FRET) oder Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), über Elektronenmikroskopie, Magnetresonanztomographie (MRT) bis hin zur Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS).

Durch die Entwicklung einer Bandbreite von autofluoreszierenden Proteinen (AFPs) ist es möglich, ausgewählte Proteine genetisch zu markieren und *in vivo* zu beobachten. Auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Proteinen können untersucht werden, indem diese Proteine mit unterschiedlich fluoreszierenden Proteinen fusioniert werden. Mit Hilfe dieser fluoreszierenden Marker erhält man eine sehr hohe zeitliche und räumliche Auflösung bei der Untersuchung der gewünschten markierten Proteine.

Autofluoreszierende Proteine lassen sich, je nach Herkunftsorganismus des fluoreszierenden Proteins, in verschiedene Gruppen einteilen. Die Hauptgruppe, die zuerst isoliert wurde, stammt aus einer Qualle im Nordpazifik, der *Aequorea victoria*, aus der man GFP (Green Fluorescent Protein) isolierte. GFP wurde in den sechziger Jahren zufällig bei der Reinigung von Aequorin aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria* entdeckt. Schon zu diesem Zeitpunkt fiel die Eigenschaft des Proteins auf, unter UV-Licht intensiv grün zu fluoreszieren. Durch gezielte Punktmutationen im GFP-Gen gelang es später, die spektral unterschiedlichen GFP-Mutanten YFP (Yellow), BFP (Blue) und CFP (Cyan) zu erzeugen (Clontech 2000).

Auch aus anderen Organismen, wie Korallen, z.B. der *Discosoma* oder *Renilla reniformis*, wurden später autofluoreszierende Proteine wie AmCyan1, ZsGreen1, ZsYellow1 und DsRed gewonnen. Dabei spielen vor allen Dingen die im roten Bereich fluoreszierenden Proteine eine wichtige Rolle, da sie sich als spektrale Partner für das beliebte GFP bei FRET- und FCCS-Messungen eignen. Doch gerade diese rot-fluoreszierenden Proteine bringen einige Probleme mit sich. So bildet das

erste isolierte rote Protein, DsRed1 (*Clontech*), Tetramere und höhere Oligomere, die zytotoxische Aggregate bilden können. Durch verschiedene Mutationen am DsRed1-Gen, die zu DsRed2 führten, gelang es nicht, diese Tendenz zu beseitigen. DsRed2 bildet zwar nur Tetramere, die aber nach Fusion mit einem anderen Protein ebenfalls zytotoxische Aggregate bilden. Auch eine weitere Mutante, HcRed1, welche zwar als Dimer vorliegt, dafür aber eine sehr niedrige Fluoreszenzquantenausbeute aufweist, ist kein optimaler Fusionspartner.

Einer Ulmer Gruppe gelang es 2002, ein monomeres rotes Protein, das eqFP611 (*Entacmaea quadricolor* Fluorescent Protein 611) aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* zu isolieren (Wiedenmann et al. 2002). Aber auch Roger Tsien in San Diego erhielt durch gezielte Mutationen am DsRed1-Gen eine monomere Form dieses Proteins, das mRFP1 (Campbell et al. 2002). Beide roten Proteine wurden in dieser Arbeit auf ihre Eignung als GFP-Partner für FCCS-Messungen getestet.

Eine Übersicht über sämtliche autofluoreszierenden Proteine ist in Abb. 3.1 gegeben:

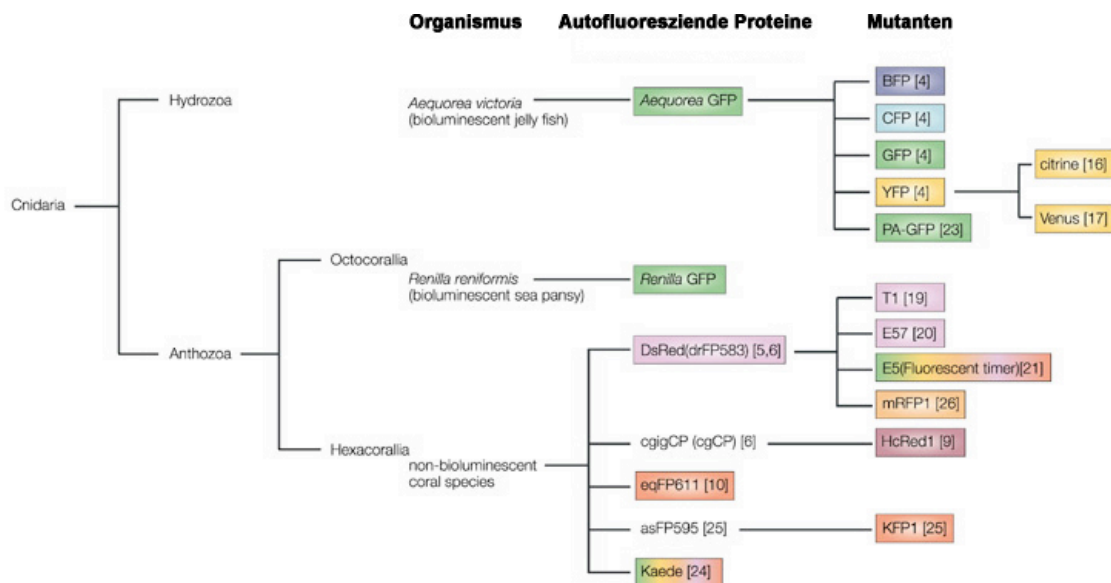


Abbildung 3.1 Übersicht über die autofluoreszierenden Proteine, ihre Mutanten und ihre Herkunftsorganismen (Miyawaki et al. 2003).

Die autofluoreszierenden Proteine (AFPs) haben gegenüber den bisher verwendeten organisch-chemischen Farbstoffen viele Vorteile. Der größte Vorteil besteht darin, dass keine aufwändigen Aufreinigungsprozeduren notwendig sind, um die gewünschten Proteine für eine spätere chemische Markierung zu gewinnen. Auch

Methoden wie die Mikroinjektion der markierten Proteine in die Zellen sind überflüssig geworden, da die Proteine direkt genetisch markiert werden und über einen Expressionsvektor von der Zelle als Fusionsprotein exprimiert werden können. Alle AFPs besitzen außerdem eine sehr hohe Sensitivität. Sie sind so genannte passive Marker, da sie keine Wechselwirkungen mit der Zelle eingehen (Chalfie et al. 1994). Ein Überblick über die einzelnen, in dieser Arbeit verwendeten Proteine wird im Folgenden aufgezeigt.

3.1 GFP (Green Fluorescent Protein)

Eine Pionierrolle bei den fluoreszierenden XFPs hat GFP bzw. Wildtyp-GFP (*wtGFP*) gespielt, welches aus der Nordpazifik-Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Dabei war die Eigenschaft der Qualle, unter UV-Licht grün zu leuchten, erstaunlich (Abb. 3.2). Erst Jahre später fand man heraus, dass GFP in dieser Qualle mit Aequorin assoziiert vorlag, dessen Emissionsmaximum sich mit einem Absorptionsmaximum von GFP deckte. Durch diesen strahlungslosen Energietransfer konnte die Qualle grün leuchten (Morise et al. 1974). Dieses Phänomen wurde schon in den 60er Jahren entdeckt, doch erst 30 Jahre später war es möglich, die genetische Sequenz des Proteins und seine besondere Struktur zu entschlüsseln (Ormö et al. 1996).

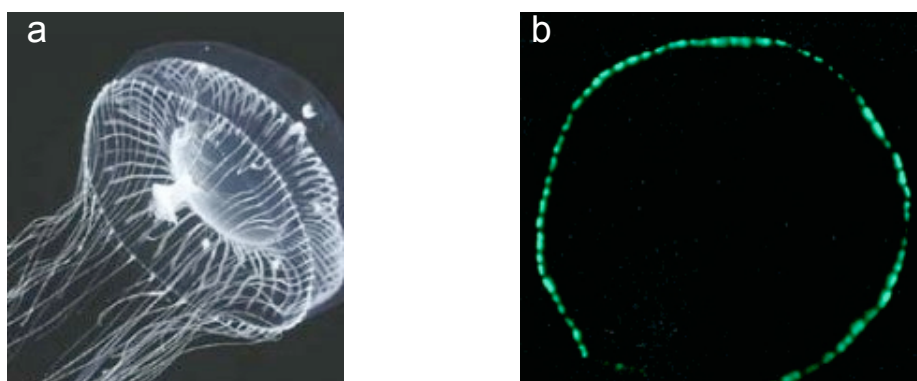


Abbildung 3.2 a) Nordpazifik-Qualle *Aequorea victoria*. Bei den leuchtenden Stellen handelt es sich nicht um Fluoreszenz, sondern um ein Artefakt bei der Aufnahme. **b)** Die Qualle zeigt nach Bestrahlung mit UV-Licht eine grüne Fluoreszenz in den Tentakelansätzen (Aufnahmen von C.E. Mills).

Das *wtGFP* und auch die häufig verwendete Mutante Enhanced GFP (EGFP) bestehen aus 238 Aminosäuren und besitzen ein Molekulargewicht von 27 kDa. Die Proteine bilden eine zylindrische Struktur von ca. 3 nm Durchmesser und einer Höhe von 4 nm

aus 11 β -Strängen (Abb. 3.3, grün markiert) sowie zwei α -Helices (blau markiert) unterhalb und einer Helix innerhalb des Zylinders. Dabei ist das Chromophor (gelb markiert), welches durch zahlreiche Wasserstoffbrücken geschützt ist, in das Zentrum des Zylinders eingebettet. Es handelt sich um ein *p*-Hydroxybenzylidenimidazolinon, das aus den Aminosäuren der Positionen 65-67 durch Faltung gebildet wird. Diese Aminosäuren sind im Wildtyp GFP Serin, Tyrosin und Glycin, im EGFP wird das Serin durch Threonin ersetzt. Für die Fluoreszenz werden keine weiteren Co-Faktoren wie z.B. Luziferase benötigt.

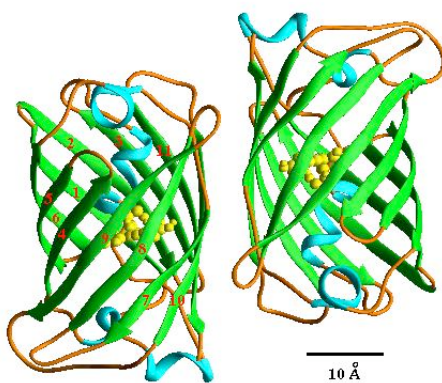


Abbildung 3.3 Struktur von GFP. GFP besitzt eine einzigartige Zylinderstruktur, die aus 11 β -Faltblättern (grün) und 3 α -Helices (blau) besteht. Das Chromophor (gelb) liegt im Innern des Zylinders, geschützt durch zahlreiche Wasserstoffbrücken (Tsien 1998).

Das Chromophor entsteht durch eine autokatalytische Reaktion, die im Folgenden beschrieben wird (Abb. 3.4):

1. Das Protein faltet sich zunächst in eine annähernd endgültige native Form. Dadurch werden die direkt beteiligten Aminosäuren S65, Y66 und G67 in räumliche Nähe zueinander gebracht.
2. Das Imidazolinon wird durch einen nukleophilen Angriff des Amids von Glycin auf die Carbonylgruppe der Aminosäure an Position 65 (Serin oder Threonin) gebildet, gefolgt von einer Dehydratisierung.
3. Durch molekularen Sauerstoff wird die α - β -Bindung an Position 66 dehydrogeniert und die aromatische Gruppe mit dem Imidazolinon konjugiert.

Die *wt*GFP-Mutante EGFP zeichnet sich durch eine schnellere Faltung durch die Mutation F64L bei $T = 37\text{ °C}$ aus (Tsien 1998).

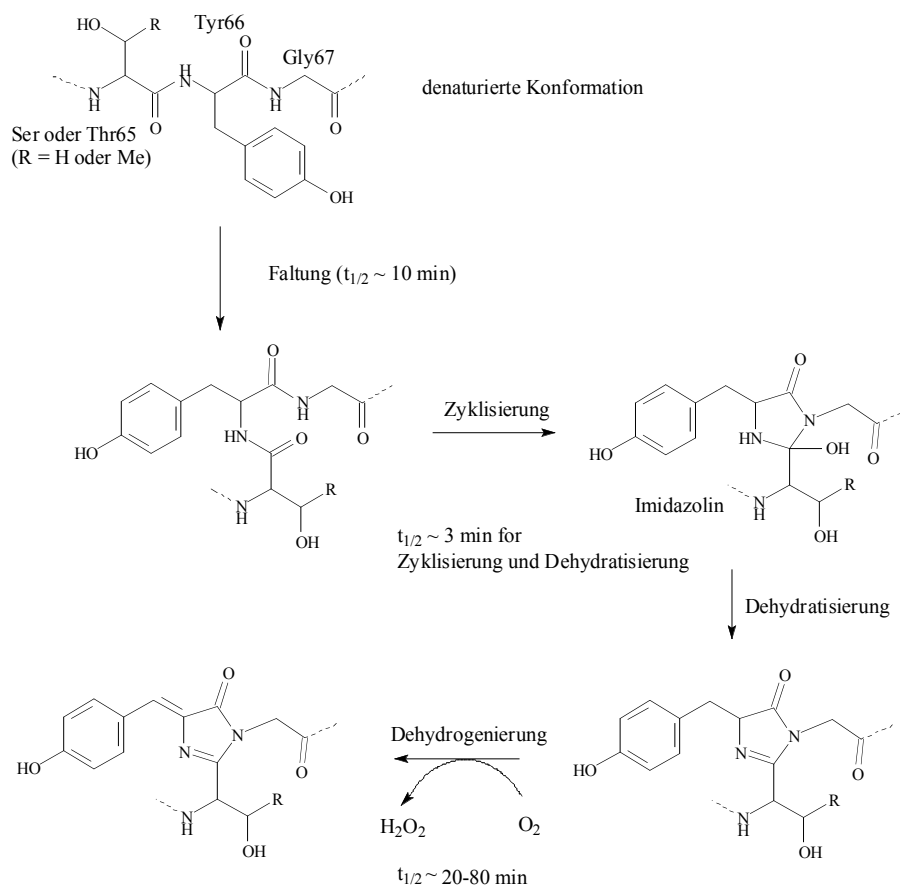


Abbildung 3.4 Autokatalyse von GFP in drei Schritten: 1. Faltung des Proteins, 2. Zyklisierung und Dehydratisierung und 3. Dehydrogenierung

Das *wt*GFP besitzt zwei Absorptionsmaxima, bei 395 nm und 475 nm, deren Verhältnis sich mit steigendem pH-Wert zugunsten des längerwelligen Peaks ändert (Abb. 3.5).

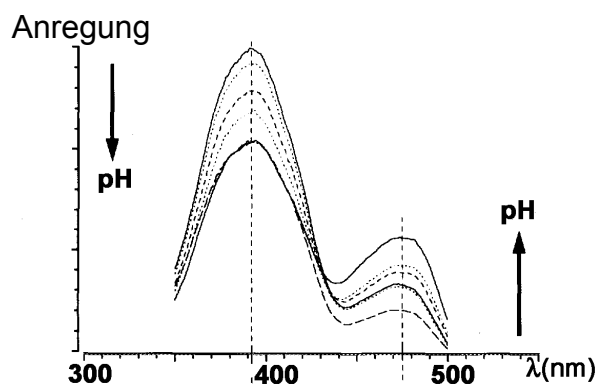


Abbildung 3.5 Anregungsspektrum von *wt*GFP bei einer Emissionswellenlänge von 507 nm, der Peak bei 395 nm wird mit steigendem pH-Wert kleiner, wohingegen der Peak bei 475 nm größer wird (Terry et al. 1995).

Das Emissionsspektrum von *wtEGFP* mit einem Maximum bei 509 nm ist nahezu unabhängig von der Anregungswellenlänge, zeigt jedoch eine anregungsbedingte pH-Abhängigkeit. EGFP weist ein ähnliches Absorptions- und Emissionsverhalten auf, wobei nur noch ein Maximum bei 475 nm im Anregungsspektrum zu erkennen ist (Abb. 3.6). Außerdem besitzt es eine größere molekulare Helligkeit als *wtGFP*. Es hat einen Extinktionskoeffizienten $\epsilon(\lambda)$ von $55000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine Fluoreszenzquantenausbeute η_F von 60 %. Im Vergleich dazu besitzt *wtGFP* zwar eine Quantenausbeute von 80 %, der Extinktionskoeffizient liegt jedoch bei $9500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

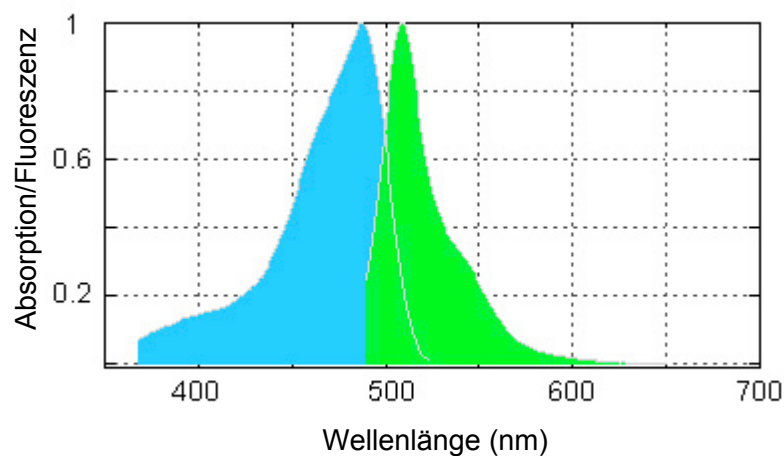


Abbildung 3.6 Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von EGFP. Die UV-Absorption ist hier nahezu verschwunden. Das Absorptionsmaximum liegt bei 475 nm und das Emissionsmaximum bei 509 nm (Spektren aus www.omegafilters.com).

In der zeitaufgelösten Beobachtung der Fluoreszenz einzelner GFP-Moleküle und bei FCS-Messungen von GFP in Lösung wurde ein Blinken oder Flackern einzelner Moleküle mit An- und Auszeiten von wenigen Mikrosekunden bis zu einigen Sekunden beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die unterschiedlichen Konformationen sein, die GFP einnehmen kann (Chattoraj et al. 1996; Brejc et al. 1997; Palm et al. 1997; Creemers et al. 1999):

WtGFP kann in den Konformationen A und B vorliegen, die über ein Intermediat I im Gleichgewicht miteinander liegen. Diese Konformationen unterscheiden sich durch den Protonierungszustand des Chromophors und ihre räumlichen Konfiguration. Zustand A wird bei ca. 395 nm angeregt und kann bei Emission um 430 nm strahlend zerfallen. Sehr viel schneller jedoch ist die Umlagerung eines Protons

(ca. 10 Pikosekunden), so dass der angeregte Intermediärzustand I entsteht. Dieser Intermediärzustand kann strahlend bei ca. 508 nm in seinen Grundzustand relaxieren. Eine zweite Möglichkeit ist die strahlungslose Relaxation in die Konfiguration B oder der Übergang nach A durch Reprotonierung. Der Zustand B kann bei ca. 477 nm angeregt werden und zerfällt entweder strahlend bei einer Emission um die 503 nm oder geht strahlungslos in den Zustand I über, dessen Anregung bei 495 nm erfolgt (Abb. 3.7).

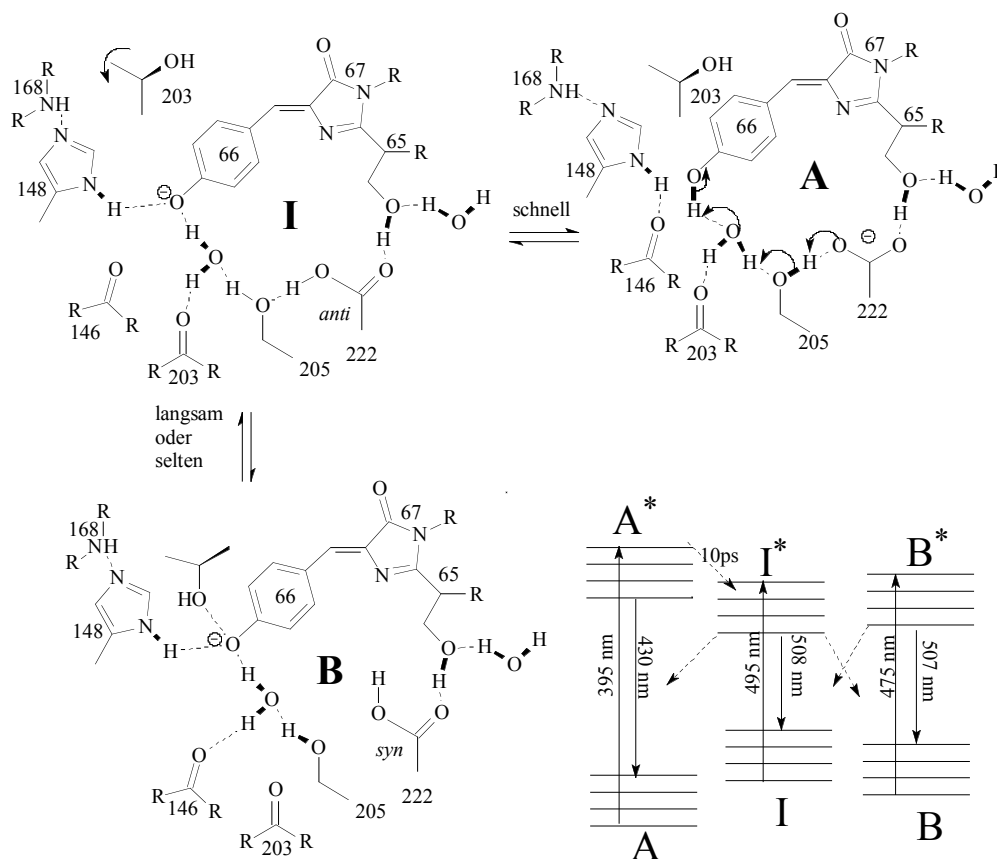


Abbildung 3.7 Mögliche Strukturen von GFP. Dabei ist A, die beim *wt*GFP und B, die bei GFP dominierende Konformation. Durchgezogene Linien stellen kovalente Bindungen dar, gestrichelte Wasserstoffbrücken, I ist der Intermediärzustand. Rechts unten: Mögliches Zustandschema nach (Creemers et al. 1999). Dick gezeichnete Pfeile stehen für die Anregung und Emission, gestrichelte Pfeile für strahlungslose Übergänge.

Bei EGFP (Enhanced GFP) wird durch die S65T Mutation, also die Substitution eines H-Atoms gegen eine Methylgruppe, die deprotonierte Konformation B aus sterischen Gründen bevorzugt eingenommen. Diese unterscheidet sich von I spektral und in der Konformation weniger deutlich als A, so dass hier die Absorptionsmaxima bei etwa

488 nm zusammenfallen. Bei GFP-Molekülen in Lösung kann die Protonierung in Abhängigkeit des pH-Wertes durch H^+ -Ionen des Lösungsmittels erfolgen. Diese Konformationsfluktuationen von A und B im Grundzustand können der Grund für das beobachtete „Blinking“ in Lösung (An- und Aus-Dynamik) sein. Da bei einer Wellenlänge um die 488 nm nur die Zustände I und B angeregt werden können, erscheinen Moleküle, welche sich im Zustand A befinden, „dunkel“ oder „unsichtbar“. Diese können erst wieder nach erneuter Deprotonierung angeregt werden.

GFP ist aufgrund seiner kompakten Struktur, ein außerordentlich stabiles Protein und ist über einen sehr weiten Bereich pH-unabhängig (pH = 5.5-12) und temperaturstabil bis $T = 65\text{ °C}$ (Clontech 2000). Der Diffusionskoeffizient D von GFP beträgt bei Raumtemperatur in wässriger Lösung $8.7 \cdot 10^{-11}\text{ m}^2/\text{s}$. Dies entspricht einem hydrodynamischen Radius R_h von 2.82 nm (Terry et al. 1995).

Ein Nachteil von GFP ist seine Tendenz, bei hohen Konzentrationen zu dimerisieren. Außerdem weist das Chromophor eine langsame Reifung (4-8 Stunden) auf. Um die Eigenschaften von GFP zu optimieren, wurde eine Vielzahl von Mutationen eingeführt, sowohl an direkt dem Chromophor benachbarten Aminosäuren als auch in seiner räumlichen Nähe befindlichen.

3.2 YFP (Yellow Fluorescent Protein)

Das YFP (Yellow Fluorescent Protein) stellt eine Variante von GFP dar. Durch zwei feste Mutationen, S65G und S72A, und eine der Alternativen T203F, T203H oder T203Y, also das Einführen einer weiteren aromatischen Aminosäure, erhält man zwei gestapelte aromatische Ringe (π -stacking), deren mesomeres π -Elektronensystem eine Verschiebung des Anregungsspektrums zu einem Maximum von 513 nm und des Emissionsspektrums zu 527 nm zur Folge hat (Wachter et al. 1998). YFP kann aber trotz seines zu längeren Wellenlängen verschobenen Anregungsspektrums immer noch sehr gut bei 488 nm mit einem Argon-Ionen Laser angeregt werden (Abb. 3.8). Analog zu GFP weisen die Anregungsspektren von YFP eine pH-Abhängigkeit auf. Die wohl am häufigsten verwendete Mutante von YFP ist das EYFP (Enhanced YFP) (S65G, V68T, S72A, T203Y), die eine sehr große molekulare Helligkeit bei einem Extinktionskoeffizienten von $84000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ und einer Fluoreszenzquantenausbeute

von 61 % aufweist. Aber auch das Citrin, bei dem durch Mutation von Q69M ein niedriger pK_a -Wert, eine höhere Photostabilität, Stabilität gegen Chlorid-Ionen und eine bessere Expression bei 37 °C im Vergleich zu YFP erzielt wurden, ist eine beliebte Variante von YFP.

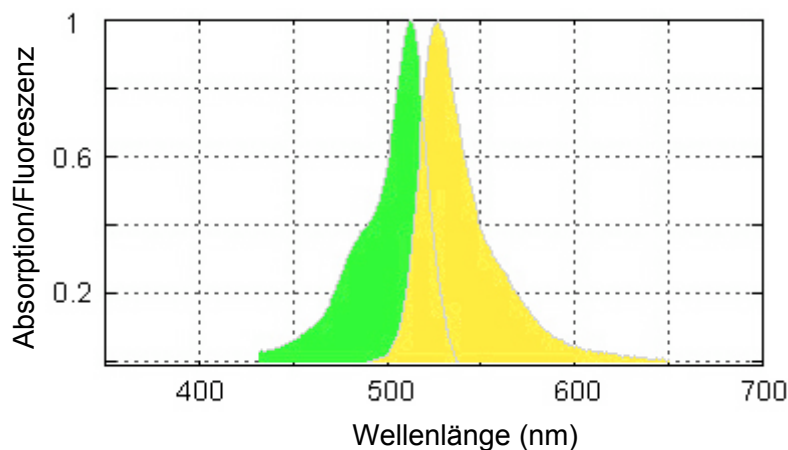


Abbildung 3.8 Normiertes Absorptions- und Emissionsspektrum von EYFP. Das Absorptionsmaximum liegt bei 513 nm, das Emissionsmaximum bei 527 nm.

Die photophysikalischen Eigenschaften von YFP sind denen von GFP sehr ähnlich: Bei zeitaufgelösten Experimenten ist auch hier ein Blinken und Flackern zu beobachten.

3.3 CFP (Cyan Fluorescent Protein)

Eine weitere Mutante von GFP, das CFP, enthält 6 substituierte Aminosäuren (F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A), von denen eine, Y66W, das Absorptionsmaximum des Chromophors zu den Wellenlängen 433 nm (Hauptpeak) und 453 nm (Nebenpeak) verschiebt. Der Grund hierfür ist das Ersetzen eines Phenols durch ein Indol. Das Emissionsmaximum liegt dann bei 475 nm mit einer kleinen Schulter bei 501 nm (Abb. 3.9).

Die übrigen fünf Substitutionen sollen zum einen die Helligkeit entsprechend EGFP verstärken - da das größere Indol im CFP eine schlechtere Faltung des Proteins zur Folge hat - und zum anderen die Löslichkeit des Proteins verbessern. Dennoch wurden dadurch nur eine Quantenausbeute von 40 % und ein Extinktionskoeffizient von $26000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ erreicht.

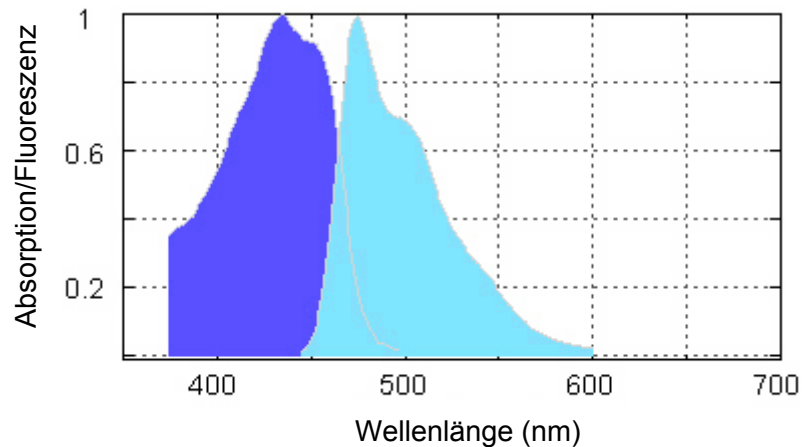


Abbildung 3.9 Ins Blaue verschobene, normierte Spektren von ECFP. Das Absorptionsspektrum weist einen Hauptpeak bei 433 nm und einen Nebenpeak bei 453 nm auf. Das Emissionsspektrum hat einen Hauptpeak bei 475 nm mit einer kleinen Schulter bei 501 nm.

Eine dem *wGFP* analoge Chromophorprotonierung legt die Struktur nicht nahe.

Der größte Nachteil des CFP ist seine starke Tendenz zur Photolyse. Im Verlauf dieser Arbeit zeigte es sich, dass durch die Photolyse des CFP keine auswertbaren FCS-Kurven aufgenommen werden konnten. Deshalb konnte das Chromophorpaar EYFP-ECFP auch für die FCCS-Experimente nicht verwendet werden.

3.4 DsRed1+2 (*Discosoma striata* Red)

Das rot-fluoreszierende Protein DsRed1 und dessen Mutante DsRed2 stammen aus einem anderen Organismus als GFP. Man kann sie der Klasse der Anthozoa zuordnen, zu denen Korallen und Seeanemonen gehören. Das DsRed, auch als drFP583 bekannt, wurde in einer nicht-biolumineszierenden Koralle namens *Discosoma striata* entdeckt (Matz et al. 1999). Das rot-fluoreszierende Protein besteht aus 225 Aminosäuren bei einem Molekulargewicht von 25.9 kDa. Es besitzt ein den GFP-Mutanten sehr ähnliches Chromophor Gln-Tyr-Gly (66-68), d.h. der für die Fluoreszenz notwendige Tyrosin-Ring und das für die Zyklisierung erforderliche Glycin sind enthalten. Die Umgebung des Chromophors unterscheidet sich jedoch deutlich von der des GFP.



Abbildung 3.10 Anthozoa-Koralle *Discosoma striata* zeigt eine orange-rote Färbung an der Mundöffnung (Tsien 1999).

Das Absorptionsmaximum liegt bei 558 nm und das Emissionsmaximum bei 583 nm. Erstaunlich ist die zusätzliche, große Absorptionsbande im UV-Bereich (Abb. 3.11), die auch bei anderen nicht-biolumineszierenden Anthozoa-Proteinen zu beobachten ist. Der Grund hierfür liegt möglicherweise darin, dass diese Organismen in tropischen Regionen mit hoher Sonneneinstrahlung leben. Durch die UV-Absorption wird UV-Strahlung in längerwellige, mindergefährliche Strahlung umgewandelt (Verkhusha et al. 2004). Proteine wie GFP, die in den dunklen Gewässern des Nordpazifiks vorkommen, weisen diese Bande nicht auf. Sie besitzen eine eher im blauen Bereich des Spektrums liegende Absorption.

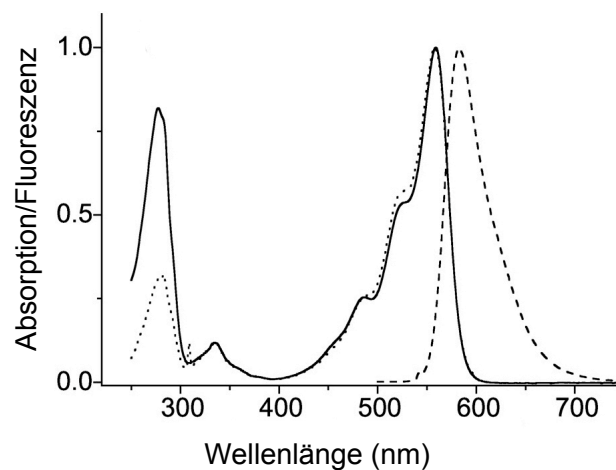


Abbildung 3.11 Das Absorptionsspektrum von DsRed (durchgezogene Linie) weist ein Maximum bei 558 nm, aber auch eine Absorptionsbande im UV-Bereich, auf. Das Emissionsspektrum hat sein Maximum bei 583 nm. Die gepunktete Linie stellt das Anregungsspektrum dar (Campbell et al. 2002). Beide Spektren wurden zur Veranschaulichung auf eins normiert.

DsRed zeigt im Vergleich zu GFP eine sehr langsame Reifungskinetik des Chromophors (48 Stunden). Dabei durchläuft DsRed ein grünes, intermediäres Stadium, welches man anhand des Absorptions- und Emissionsspektrums deutlich erkennen kann. Diese Zwischenstufe weist ein mit GFP vergleichbares System von konjugierten Doppelbindungen auf, sodass sowohl Anregungs- als auch Emissionswellenlänge denen von GFP ähnlich sind. Durch erneute Oxidation dieser Zwischenstufe wird die Anzahl der konjugierten Doppelbindungen erhöht, was eine Rot-Verschiebung des Spektrums zur Folge hat (Abb. 3.12) (Gross et al. 2000).

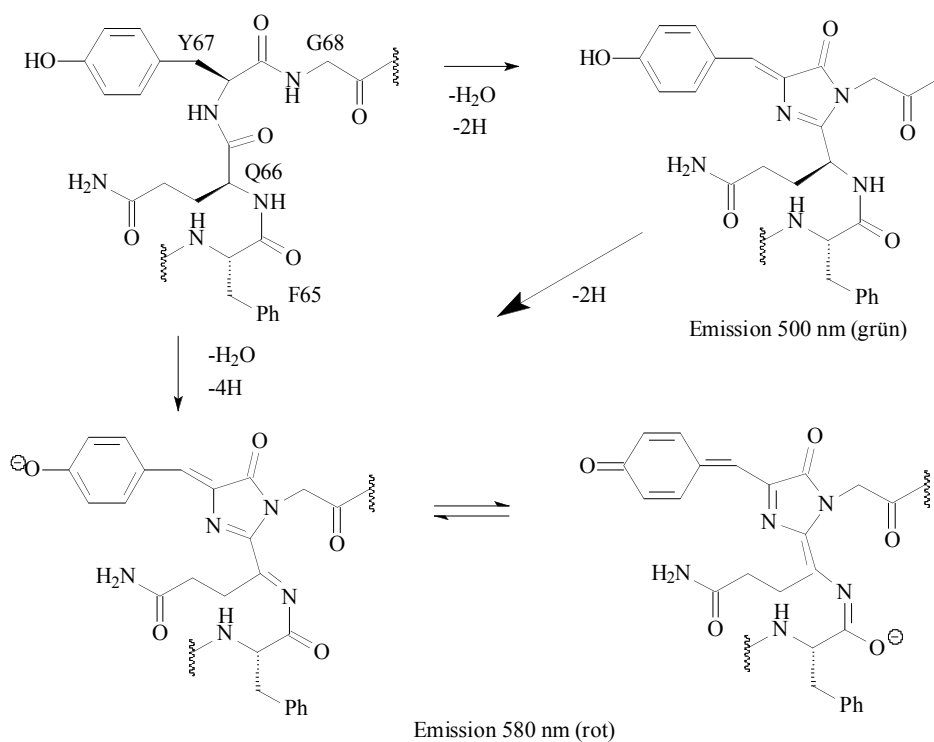


Abbildung 3.12 Autokatalytische Synthese des Chromophors von DsRed durch Oxidation. Die an der Reaktion beteiligten Aminosäuren 66-68 sind Glutamin, Tyrosin und Glycin (Gross et al. 2000). Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, die Emissionsmaxima des Zwischen- und Endproduktes sind angegeben.

Alle nicht-biolumineszierenden Anthozoa-Proteine sind tetramer. Dies stellt einen sehr großen Nachteil für die Verwendung als Fusionsprotein dar, da in lebenden Zellen oft zytotoxische Aggregate entstehen. Die Tetramerisierung vollzieht sich dabei an zwei chemisch unterschiedlichen Protein-Grenzflächen (Abb. 3.13). Die tetramere Struktur scheint aber eine gewisse Schutzfunktion gegen Photoschäden für die Korallenproteine auszuüben, die alle in tropischen Gebieten mit starker

Sonneneinstrahlung leben (Salih et al. 2000). Es hat sich gezeigt, dass das tetramere DsRed eine 4-5mal so hohe Photostabilität wie GFP aufweist, welches im sonnenarmen Nordpazifik vorkommt. Im Vergleich zum monomeren RFP1 besitzt DsRed sogar eine um einen Faktor zehn höhere Photostabilität (Campbell et al. 2002). Alle rot-fluoreszierenden Proteine zeigen eine doppelt exponentiell abfallende Kinetik bei der Photolyse, was auf einen Zwei-Stufen-Prozess hindeutet. Im Gegensatz dazu weist GFP eine nur einfach exponentiell abfallende Kinetik auf (Campbell et al. 2002).

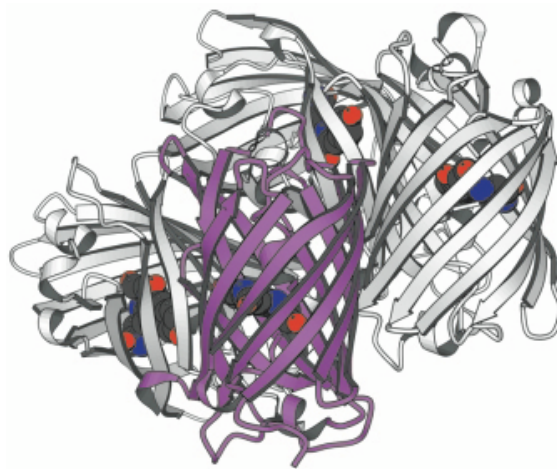


Abbildung 3.13 Struktur der DsRed-Tetramere. Die Chromophore sind in rot-blau abgebildet. Auch zu sehen sind die zwei möglichen, chemisch unterschiedlichen Angriffsflächen (Interface) bei der Tetramerisierung (Zhang et al. 2002).

Die Mutante DsRed2 unterscheidet sich von DsRed1 durch eine 2-3mal schnellere Reifung des Chromophors (24 Stunden) bei $T = 37\text{ °C}$ und somit auch einen kleineren Absorptionspeak bei 475 nm. Eine noch schnellere Reifung des Chromophors weist die DsRed2-Mutante T1 auf, bei der das Chromophor in 10 min gebildet wird (Campbell et al. 2002). Doch auch DsRed2 besitzt eine tetramere Struktur und kann nach Fusion zytotoxische Aggregate bilden.

Ein weiteres dem DsRed strukturell ähnliches Protein, das HcRed1 aus *Heteractis crispera*, bildet zwar Dimere statt Tetramere, büßt dadurch jedoch einen Großteil seiner Fluoreszenzquantenausbeute (1.5 %) ein, bei einem sehr niedrigen Extinktionskoeffizienten ($20000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) (Clontech 2002). Dafür weist es eine deutliche Rot-Verschiebung (35 nm) seines Spektrums im Vergleich zu DsRed auf, sein Absorptionsmaximum liegt bei 588 nm und sein Emissionsmaximum bei 618 nm.

3.5 mRFP1 (Monomeric Red Fluorescent Protein1)

Das erste „echte“ monomere rot-fluoreszierende Protein (mRFP1) wurde 2002 von der Gruppe von R. Tsien in San Diego kloniert. Es entstand bei der Entwicklung von Tandem-Dimeren aus DsRed, bei denen zwei Dimer-bildende Untereinheiten direkt kovalent miteinander über einen Spacer verknüpft sind. Für das monomere Red wurde jede dieser Dimer-Untereinheiten durch die Insertion von Arginin unterbrochen. Dabei konnte die Fluoreszenz durch direkte Mutagenese von insgesamt 33 Aminosäuren wieder hergestellt werden (Abb. 3.14).



Abbildung 3.14 Struktur des monomeren RFP1, welche dem zylindrisch gebauten GFP sehr ähnlich ist. Das Chromophor im Innern des Zylinders ist hier in rot-blau abgebildet (Zhang et al. 2002).

mRFP1 hat im Vergleich zu DsRed ein um 25 nm ins Rote verschobene Spektrum: sein Absorptionsmaximum liegt bei 584 nm, sein Emissionsmaximum bei 607 nm (Abb. 3.15). Es hat sowohl eine niedrigere Quantenausbeute (25 %) als auch einen niedrigeren Extinktionskoeffizienten ($44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) als DsRed (79 %, $57000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und wird 10mal schneller als DsRed photolysiert (Clontech 2002), jedoch in der gleichen Größenordnung wie GFP. Dafür weist es eine sehr schnelle Reifung des Chromophors von weniger als einer Stunde auf, so dass es *in vivo* eine mit DsRed vergleichbare Helligkeit erzielt.

Es durchläuft wie DsRed ein grünes, jedoch nicht-fluoreszierendes Intermediat, das bei einer Wellenlänge von 503 nm absorbiert. Diese grüne Komponente, die allen DsRed-Mutanten gemeinsam ist, kann von einer Proteinfraction stammen, die nie reift

oder in einer Zwischenstufe verharret. Es ist jedoch unklar, warum dieses intermediäre Stadium bei mRFP1 keine Fluoreszenz zeigt.

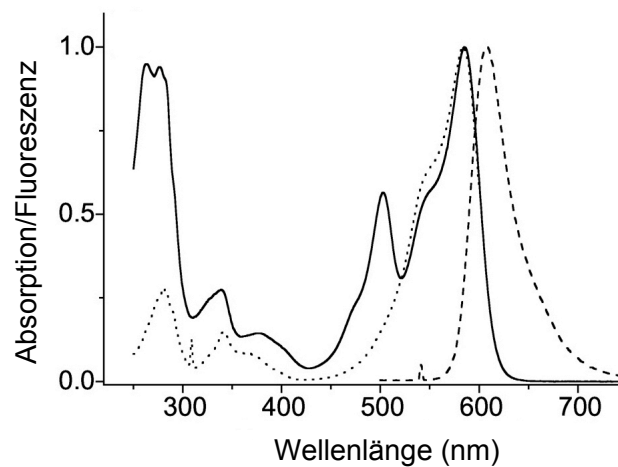


Abbildung 3.15 Das Absorptionsspektrum von mRFP1 (durchgezogene Linie) weist ein Maximum bei 584 nm und ein Nebenmaximum bei 503 nm auf. Dieses Nebenmaximum ist einer nicht-fluoreszierenden Spezies zuzuordnen, wie im Anregungsspektrum (gepunktete Linie) zu erkennen ist. Das Emissionsspektrum besitzt bei 607 nm ein Maximum (Campbell et al. 2002). Alle Spektren wurden zur Veranschaulichung auf eins normiert.

3.6 EqFP611 (*Entacmaea quadricolor* Fluorescent Protein)

Wiedenmann et al. gelang es 2002 ein weiteres monomeres, rot-fluoreszierendes Protein, eqFP611, zu isolieren und zu charakterisieren (Wiedenmann et al. 2002). Es besitzt nach HcRed1 die langwelligste Emission und die größte Stokes-Verschiebung (52 nm) aller XFPs. EqFP611 stammt aus der nicht-biolumineszierenden Anthozoa-Seeanemone *Entacmaea quadricolor*. Bei Bestrahlung mit UV-Licht zeigen diese Nesseltiere eine intensiv orangefarbene Fluoreszenz in den Tentakeln (Abb. 3.16).



Abbildung 3.16 Seeanemone *Entacmaea quadricolor*. Die Tentakeln der Tiere zeigen eine deutliche orangefarbene Fluoreszenz bei Bestrahlung mit UV-Licht (Foto aus www.uni-ulm/aktuelles/aktuelles_thema/aktuell).

Das Absorptionsmaximum von eqFP611 liegt bei 559 nm, das Emissionsmaximum bei 611 nm (Abb. 3.17). EqFP611 besitzt eine Fluoreszenzquantenausbeute von 45 % und einen großen Extinktionskoeffizienten von $78000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Diese Eigenschaften machen eqFP611 zu einem viel versprechenden potentiellen Marker für *in vivo* Experimente.

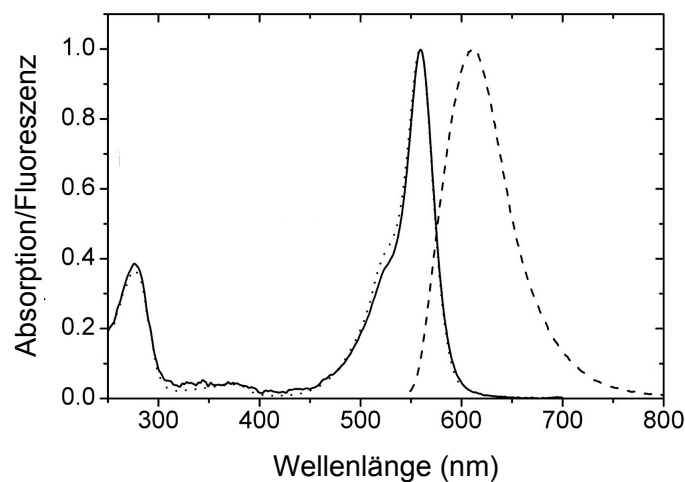


Abbildung 3.17 Das Absorptionsspektrum von eqFP611 (durchgezogene Linie) weist ein Maximum bei 559 nm auf. Die gepunktete Linie stellt das Anregungsspektrum dar. Das Emissionsspektrum (gestrichelte Linie) besitzt ein Maximum bei 611 nm (Wiedenmann et al. 2002). Die Spektren wurden zur Veranschaulichung auf eins normiert.

EqFP611 ist in einem pH-Bereich von 4-10 stabil. Die Reifung des Chromophors dauert etwa 12 Stunden. Wie DsRed und mRFP1 durchläuft auch eqFP611 ein grünes, in diesem Fall fluoreszierendes Stadium, welches aber nach vollständiger Reifung kleiner als 1 % der roten Absorption beträgt. Das Absorptionsspektrum weist dann nur noch eine flache Schulter bei etwa 500 nm auf. EqFP611 ist bei niedrigen Konzentrationen monomer, bei höheren Konzentrationen neigt es zur Oligomerisierung.

In FCS-Experimenten zeigt eqFP611 einen photoinduzierten Übergang zwischen einem dunklen und einem fluoreszierenden Zustand, welcher im Millisekundenbereich oder darunter liegt.

Ein großer Nachteil dieses Proteins ist, dass seine optimale Faltungstemperatur bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ statt $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ liegt. Dies stellt insbesondere für *in vivo* Messungen, die bei $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgen, ein Problem dar.

In Abb. 3.18 sind die Absorptions- und Emissionsspektren der hier beschriebenen AFPs dargestellt und in Tab. 3.1 ihre photophysikalischen Eigenschaften.

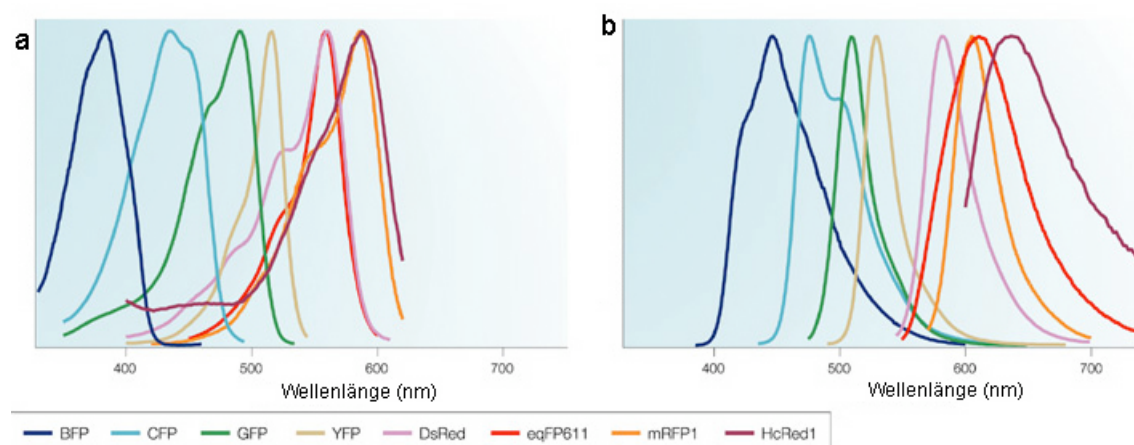


Abbildung 3.18 a) Normierte Anregungsspektren sämtlicher hier beschriebenen, autofluoreszierenden Proteine. b) Normierte Emissionsspektren dieser Proteine (Miyawaki et al. 2003).

AFP	Anregungs- maximum (nm)	Emission- maximum (nm)	Extinktions- koeffizient $\epsilon(\lambda)$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	Quanten- ausbeute η_F (%)
wtEGFP	395 (475)	509 (540)	9500	80
EGFP	475	509	55000	60
EYFP	512	525	84000	61
ECFP	433 (453)	475 (501)	26000	40
DsRed	558	583	57000-72000	79
HcRed1	588	618	20000	1.5
mRFP1	584	607	44000	25
eqFP611	559	611	78000	45

Tabelle 3.1 Übersicht der spektralen Daten der AFPs. Die Daten stammen aus (Patterson et al. 1997; Clontech 2000; Patterson et al. 2001; Campbell et al. 2002; Wiedenmann et al. 2002).

4 FCS & FCCS

4.1 Einleitung

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) wurde in den frühen 70er Jahren von Magde, Elson und Webb entwickelt, um Transporteigenschaften und Konzentrationen von Fluorophoren in Lösung zu messen (Magde et al. 1972; Elson et al. 1974; Magde et al. 1974; Webb 1976).

In der FCS beleuchtet ein stark fokussierter Laserstrahl ein Volumenelement in der Größe von einem Femtoliter und kleiner. Durch diesen Fokus diffundieren fluoreszierende Teilchen aufgrund der Brownschen Molekularbewegung (Abb. 4.1). Das von den Fluorophoren während der Diffusion durch den Fokus emittierte Fluoreszenzlicht wird konfokal gesammelt und detektiert.

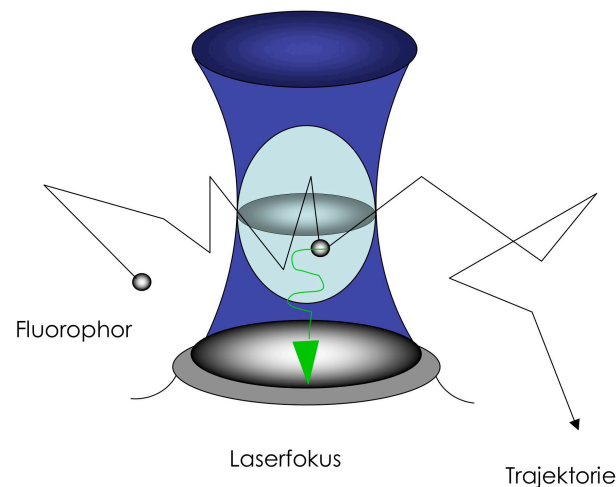


Abbildung 4.1 Fluorophore bewegen sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung durch einen mikroskopisch kleinen Fokus. Dabei emittieren sie Fluoreszenzphotonen, die von der gleichen Optik, durch welche die Anregung erfolgt, gesammelt und detektiert werden.

Die so aufgenommenen Intensitätsfluktuationen liefern Informationen über die hydrodynamischen und photophysikalischen Eigenschaften der fluoreszierenden Teilchen im Fokus. Dabei hängt die Fluktuationsamplitude von der Konzentration und

der Helligkeit der Teilchen ab. Die Frequenz dagegen liefert typische Zeitkonstanten, die von der Diffusionszeit der Moleküle bzw. ihrer Emissionskinetik abhängen.

Zur Analyse der Daten wird das Signal zeitlich korreliert (Abb. 4.2). Durch geeignete Anpassung einer theoretischen Modellfunktion an die Autokorrelationsfunktion können verschiedene physikalische Parameter wie z.B. Diffusions- und Gleichgewichtskonstanten, Konzentrationen, usw. bestimmt werden.

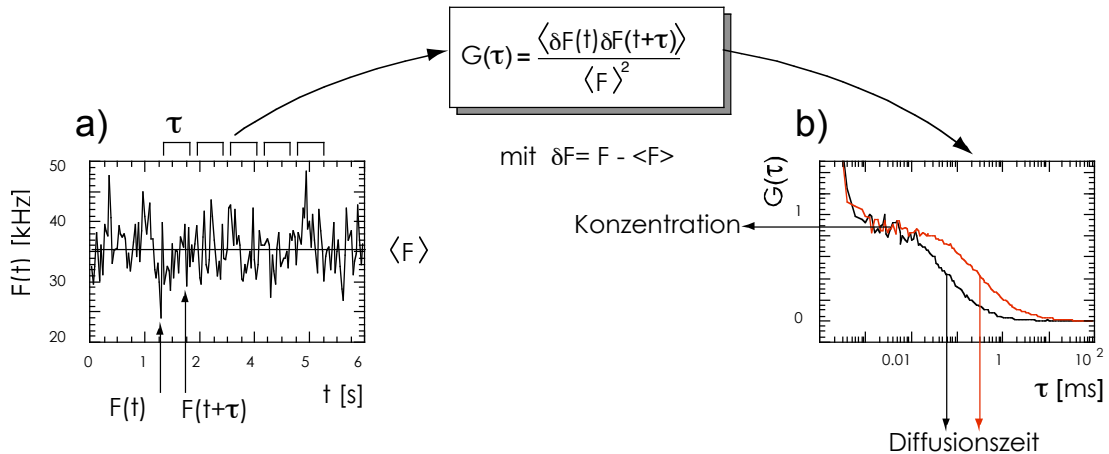


Abbildung 4.2 Autokorrelation: **a)** Fluktuationen des Fluoreszenzsignals, die am Detektor aufgenommen werden. Die Signale werden an eine Korrelatorkarte weitergeleitet, die diese dann zeitlich nach der oben beschriebenen Funktion korreliert. **b)** Daraus erhält man eine Autokorrelationskurve in Abhängigkeit vom zeitlichen Versatz τ , deren Amplitude umgekehrt proportional zur Teilchenzahl im Fokus ist. Bei längeren Diffusionszeiten verschiebt sich die Korrelationskurve nach rechts (rot) (Weidemann 2002).

Durch technische Neuerungen wie den Einsatz von Objektiven mit hoher numerischer Apertur, die ein beugungsbegrenztes, kleines Beleuchtungsprofil erzeugen (Qian et al. 1991), und der Detektion des Signals mit Avalanche-Photodioden, die im roten Bereich eine etwa zehnfach höhere Sensitivität als konventionelle Photomultiplier besitzen (Rigler et al. 1993), ist die FCS heutzutage für ein sehr breites Anwendungsgebiet zugänglich.

Da man in einem sehr kleinen Beobachtungsvolumen misst, gilt die FCS auch als Einzelmolekültechnik. Bei einem Volumen von einem Femtoliter beobachtet man bei einer 1 nM Lösung durchschnittlich weniger als ein Teilchen (0.6) im Fokus.

Ein weiterer Vorteil der FCS im Vergleich zu anderen fluoreszenzspektroskopischen Verfahren ist, dass zeitabhängige Zustände von Molekülen im Mikrosekunden- bis

Sekundenbereich als unterschiedliche Populationen aufgelöst werden können, anstatt nur als Ensemble gemittelt zu werden.

Durch die Entwicklung einer Bandbreite autofluoreszierender Proteine wie das GFP (Green Fluorescent Protein) oder das YFP (Yellow Fluorescent Protein) aus verschiedenen Organismen ist es nun möglich, zu untersuchende Proteine genetisch zu markieren und direkt in lebenden Zellen zu beobachten. Die FCS erfolgt dabei nicht-invasiv und schonend für die biologische Probe, denn aufgrund der hohen Detektionsempfindlichkeit der eingesetzten Avalanche-Photodioden kann die Anregung der Fluorophore bei relativ niedrigen Laser-Intensitäten erfolgen. Durch die neuere Entwicklung von Zwei-Photonen-Lasern ist es außerdem möglich, bei Wellenlängen im Infrarot-Bereich anzuregen, die kaum mit der Zelle in Wechselwirkung treten (Heinze et al. 2002; Kim et al. 2004).

Eine wichtige Erweiterung der Ein-Farben-FCS ist die Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS), auch Zwei-Farben-FCS genannt (Schwille et al. 1997). Das Prinzip der FCCS beruht auf der gleichzeitigen Anregung und Detektion von zwei spektral voneinander getrennten Fluorophoren. Zusätzlich zur Autokorrelation für jeden einzelnen Kanal können die Intensitätsfluktuationen beider Kanäle über Kreuz korreliert werden. Zur Kreuzkorrelation tragen dann nur Teilchen bei, die in beiden Kanälen gleichzeitig ein Signal geben, d.h. beide Farben diffundieren simultan durch das Volumen, wenn sie miteinander in Wechselwirkung treten (Abb. 4.3).

Aus der Kreuzkorrelationsamplitude erhält man den Anteil an zweifarbig durch den Fokus diffundierenden Teilchen, so dass Bindungsstudien möglich sind. Eine Reihe solcher *in vitro* Bindungsstudien wurde schon mit Hilfe der FCCS in unserer Abteilung durchgeführt (Tewes 1998; Rippe 2000; Weidemann et al. 2002). In letzter Zeit wurden aber auch intrazelluläre FCCS-Messungen publiziert (Bacia et al. 2002; Kohl et al. 2002; Kim et al. 2004), bei denen jedoch immer mindestens ein Reaktionspartner chemisch markiert war und durch Mikroinjektion in die Zelle transferiert werden musste. Ziel dieser Arbeit war es, ein System für *in vivo* FCCS zu etablieren und zu charakterisieren, in dem beide Bindungspartner genetisch mit autofluoreszierenden Proteinen markiert waren.

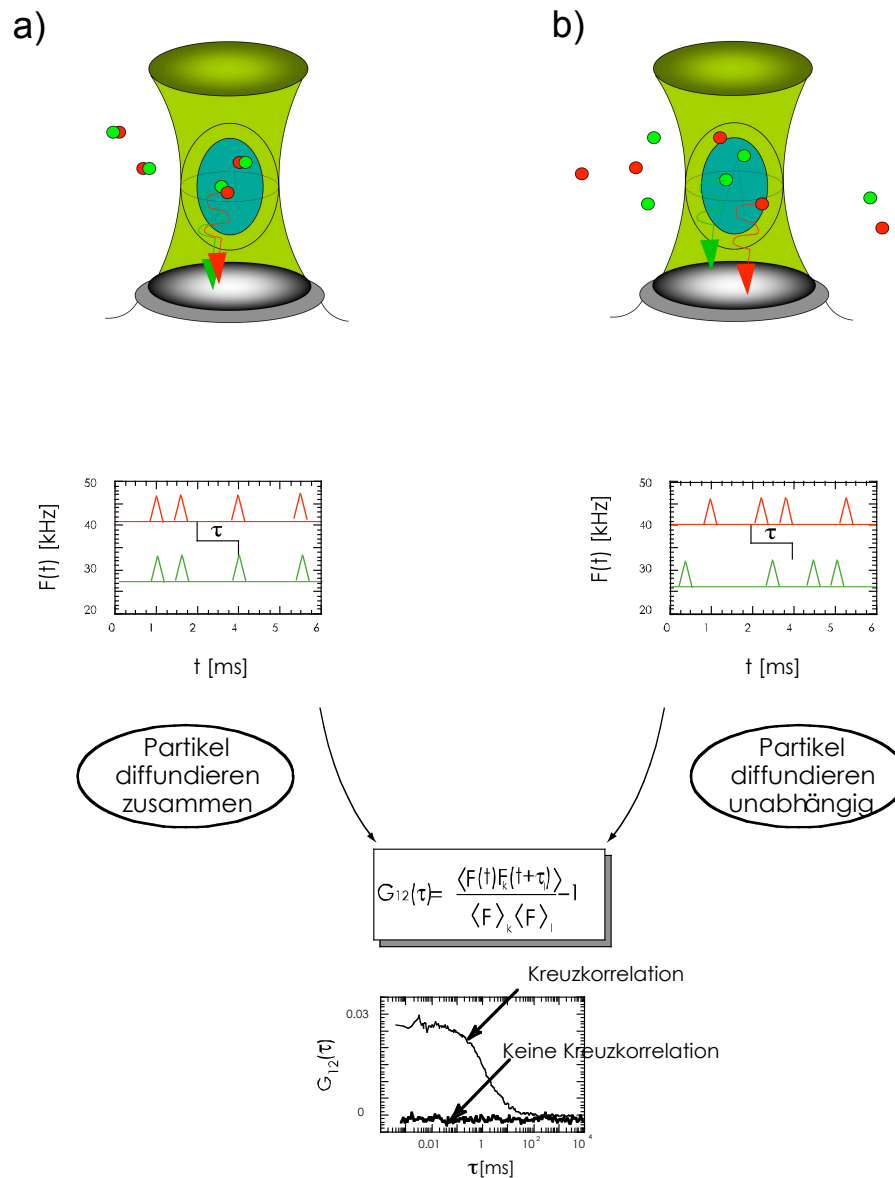


Abbildung 4.3 Im dualen Aufnahmemodus werden die Intensitätsfluktuationen beider Kanäle simultan aufgezeichnet (hier: grüner und roter Kanal). Die zwei Kanäle werden über Kreuz nach der obigen Gleichung korreliert. a) Nur bei zweifarbig markierten Partikeln erhält man eine Kreuzkorrelationsamplitude. b) Diffundieren die Partikel unabhängig voneinander, so ist die Kreuzkorrelationsamplitude gleich Null. Den Anteil an zweifarbig markierten Partikeln erhält man aus dem Verhältnis von Kreuz- zu Autokorrelation.

4.2 Technischer Aufbau der FCS und FCCS

Alle FCS/FCCS-Messungen wurden in einem in unserer Abteilung entwickelten konfokalen Fluoreszenzfluktationsmikroskop (FFM) durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein *Olympus*-Mikroskop IX-70 mit einem angebauten FCS/FCCS-Modul (Tewes 1998), an das in einem zweiten Schritt eine Scaneinheit angehängt wurde (Wachsmuth 2001). Einen Überblick über den Aufbau gibt Abb. 4.4.

Das Licht eines Argon-Krypton-Lasers mit den Linien 488 und 568 nm (*Omnichrome* 643-50YB, *Melles Griot*, Bensheim) bzw. eines Helium-Cadmium-Lasers mit einer Linie bei 440 nm (*Plasma*, *TOPAG Lasertechnik GmbH*, Darmstadt) wird über eine Monomoden-Faser in das FCS/FCCS-Modul eingekoppelt. Der ganze Aufbau ist konfokal angelegt, d. h. die Brennpunkte der Anregung und Detektion fallen zusammen.

Das Anregungslicht wird an der Austrittsöffnung der Faser durch einen Kollimator parallelisiert und durch eine Linse in die Zwischenbildebene fokussiert. Diese achromatische Linse ist in alle drei Raumrichtungen justierbar. Dadurch wird die Position des Brennpunktes und damit des beleuchteten Volumens in der Probe relativ zum Bild der Lochblende definiert. Die Lochblende hat eine Öffnung mit einem Durchmesser von 50 μm . Diese kann aber auch durch andere Lochblenden mit größeren oder kleineren Öffnungen ausgetauscht werden. Sie dient dazu, Streu- und Fluoreszenzlicht, das außerhalb des beleuchteten Fokus entsteht, auszublenden.

Bei optimaler konfokaler Justierung wird das Beleuchtungsprofil in der Lösung koaxial symmetrisch auf die Lochblende und anschließend auf die Detektoren abgebildet. Nach Passieren der Lochblende gelangt das Fluoreszenzlicht durch geeignete dichroitische Spiegel und Filter zum Detektor und erzeugt dort einen elektronischen Impuls an den Avalanche-Photodioden. Dieses Signal wird über Koaxialkabel in eine Korrelatorkarte (*ALV-Laser*, Langen) geleitet und daraus eine Korrelationsfunktion berechnet.

Die Scaneinheit wird über ein eigens dafür in unserer Abteilung entwickeltes Programm namens FFM angesteuert werden (Wachsmuth 2001). Der Verlauf der Messung kann mit einer auf Windows basierten Software ALV-5000/E beobachtet und ebenfalls damit gesteuert werden. Die Intensitätsfluktuationen in kHz und die Korrelationsfunktionen der einzelnen Messläufe können während der Messung

beobachtet werden. Die Rohdaten sind jedoch nicht zugänglich, da die einzelnen Zeitkanäle direkt über die Läufe gemittelt wurden. Bei sämtlichen Messungen wurde über Läufe von 10 Sekunden gemittelt.

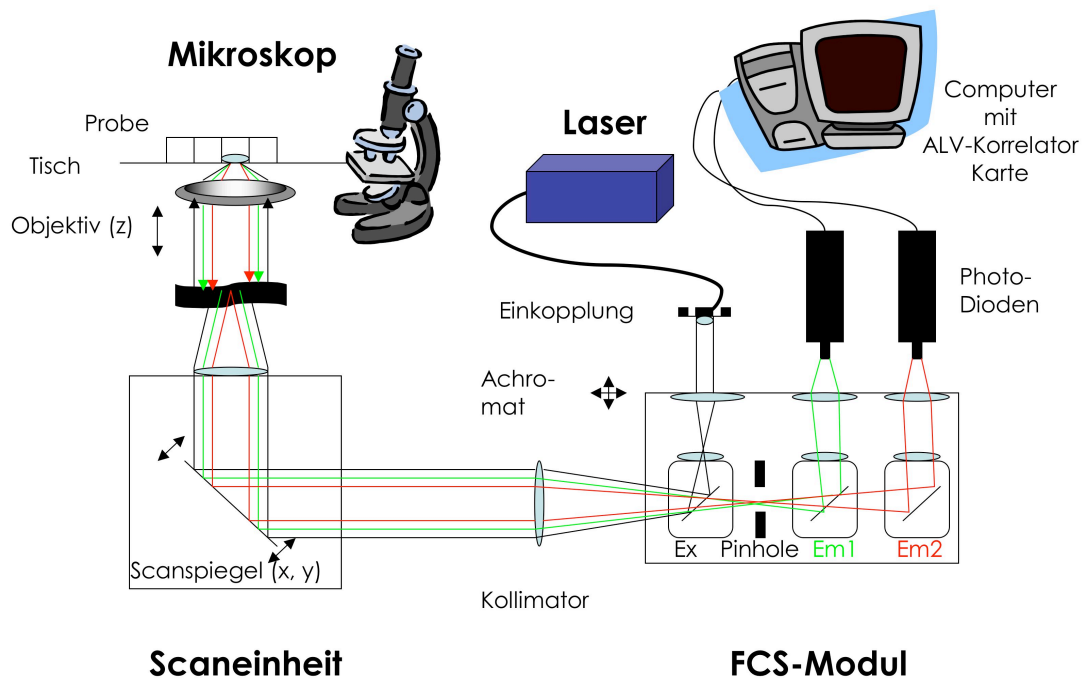


Abbildung 4.4 Schematischer Aufbau des FFM. Die einzelnen Komponenten und der Strahlengang werden im Text näher erläutert. Für diese Versuche wurde ein Argon-Ionen-Laser mit den Linien 488 nm und 568 nm verwendet, dessen Leistung regulierbar ist. Die konfokale Justierung erfolgte durch Verstellen der Achromaten. Die Lösungen bzw. Zellen wurden in kommerziell erhältlichen Kammerdeckgläsern beobachtet.

4.3 Theoretische Grundlagen der FCS und FCCS

Als Quelle für die folgenden theoretischen Ausführungen der FCS und FCCS dienen die Dissertationen von Dr. Michael Tewes, Dr. Malte Wachsmuth und Dr. Thomas Weidemann (Tewes 1998; Wachsmuth 2001; Weidemann 2002).

In der FCS werden die Fluktuationen der Fluoreszenzintensität analysiert. Diese entstehen durch Fluorophore, die durch den Fokus diffundieren. Dabei ist die gemessene Lichtintensität ein Ergebnis von Absorption, elektronischer An- und Abregung des Fluorophors, sowie der Detektion der emittierten Photonen. Folgende Komponenten sind dabei von Bedeutung:

Laser: Die Anregung wird durch die Intensitätsverteilung der Laserstrahlen in der Nähe des Fokus bestimmt, welche das Produkt aus der Laserleistung P_i und einer geräteabhängigen Funktion $\Omega_i(\vec{r})$ ist:

$$I_i(\vec{r}) = P_i \Omega_i(\vec{r}). \quad (4.1)$$

$\Omega_i(\vec{r})$ hängt dabei vom Strahlprofil des Lasers und von den Abbildungseigenschaften des Objektivs und des optischen Systems ab.

Die spektrale Abhängigkeit kommt vor allem durch Beugungseffekte und chromatische Fehler in der Optik zustande. Die zwei verwendeten Laserlinien (488 nm und 568 nm) werden mit $i = 1, 2$ bezeichnet.

Fluorophor: Fluorophore lassen sich durch ihr Emissionsspektrum bzw. durch ihren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda_{ex,i})$, welcher als wellenabhängiger Wirkungsquerschnitt eines Farbstoffmoleküls aufgefasst werden kann, und das Emissionsspektrum charakterisieren. Letzteres wird durch die Fluoreszenzquantenausbeute $q(\lambda_{em,i})$ bestimmt, die als Verhältnis der Anzahl an emittierten Photonen zur Anzahl an absorbierten Photonen definiert wird.

Detektion: Fluoreszenzphotonen werden isotrop abgestrahlt. Die Wahrscheinlichkeit, von einem Fluorophor am Ort \vec{r} im Probenvolumen ein Photon im Kanal j zu detektieren, wird als geometrische Transferfunktion $GTF_j(\vec{r})$ bezeichnet. In die spektrale Transferfunktion $STF_j(\lambda_{em})$ dagegen gehen die Eigenschaften der Emissionsfilter und die spektrale Nachweiseffizienz der Detektoren ein.

Zusammengefasst ergibt sich so für den am Detektor j nachgewiesenen Photonenfluss folgende Gleichung (unter der Voraussetzung, dass alle Komponenten linear voneinander abhängen):

$$f_j(\vec{r}) = \underbrace{P_i \cdot \Omega_i(\vec{r}) \cdot \varepsilon(\lambda_{ex,i})}_{\text{Anregung}} \cdot \underbrace{GTF_j(\vec{r}) \cdot \int q_j(\lambda_{em}) \cdot STF_j(\lambda_{em}) d\lambda_{em}}_{\text{Emission, Detektion}}. \quad (4.2)$$

Zur Vereinfachung der Formel wird die Farbmatrix

$$\sigma_{ij} = \varepsilon(\lambda_{ex,i}) \int q_j(\lambda_{em}) STF_j(\lambda_{em}) d\lambda_{em} \quad (4.3)$$

eingeführt, welche abhängig von der Wellenlänge i ist. Die verbleibenden ortsabhängigen Funktionen, welche das Beobachtungsvolumen definieren, werden als Detektionswahrscheinlichkeit

$$\Psi_{ij}(\vec{r}) = \Omega_i(\vec{r}) \cdot GTF_j(\vec{r}) \quad (4.4)$$

zusammengefasst. Bei Verwendung mehrerer Anregungswellenlängen wie z.B. bei der Kreuzkorrelation ergibt sich für das am Detektor nachgewiesene Signal:

$$f_j(\vec{r}) = \sum_i P_i \sigma_{ij} \Psi_{ij}(\vec{r}). \quad (4.5)$$

4.3.1 Korrelation einer Spezies

Betrachtet wird ein System aus N nicht-wechselwirkenden, frei diffundierenden, fluoreszierenden Teilchen in einem Probenvolumen V . Der am Detektor j nachgewiesene Photonenfluss $F_j(t)$ ergibt sich aus der Summe der Flüsse der einzelnen Teilchen, die sich zum Zeitpunkt t an den Orten $\vec{r}_n(t)$ befinden:

$$F_j(t) = \sum_{n=1}^N f_j(\vec{r}_n(t)). \quad (4.6)$$

Die normalisierte Korrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität $F_j(t)$ am Detektor j wird wie folgt berechnet:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\langle F_k(t) F_l(t + \tau) \rangle}{\langle F_k \rangle \langle F_l \rangle} - 1 = \frac{\langle \delta F_k(t) \delta F_l(t + \tau) \rangle}{\langle F_k \rangle \langle F_l \rangle}. \quad (4.7)$$

Die Indizes k und l bezeichnen die zwei Detektionskanäle, die miteinander korreliert werden. Für $k = l$ tritt der Fall der Autokorrelation $G_{jj}(\tau)$ ein, für $k \neq l$ spricht man von Kreuzkorrelation (Kap. 4.3.6). Die Variable τ bezeichnet die Verzögerungszeit, eckige Klammern bedeuten eine Mittelung über die gesamte Messzeit und δ eine Abweichung von diesem Mittelwert. Es gilt: $\delta F = F - \langle F \rangle$.

Das Signal ist proportional zur Anzahl der Teilchen N im Beobachtungsvolumen. Die Korrelationsfunktion $G_{kl}(\tau)$ kann auf die Korrelationsfunktion $g_{kl}(\tau)$ eines einzelnen Teilchens im Fokus zurückgeführt werden. Setzt man Gl. (4.6) in (4.7) ein, so ergibt sich:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\sum_n \langle \delta f_k(\vec{r}_n(t)) \cdot \delta f_l(\vec{r}_n(t+\tau)) \rangle}{\sum_n \langle f_k \rangle \sum_n \langle f_l \rangle} = \frac{N \langle \delta f_k(\vec{r}(t)) \cdot \delta f_l(\vec{r}(t+\tau)) \rangle}{N \langle f_k \rangle N \langle f_l \rangle} = \frac{1}{N} g_{kl}(\tau). \quad (4.8)$$

Aus Gl. (4.8) ergeben sich zwei wichtige Eigenschaften der Korrelationsamplitude:

- 1.) Die Korrelationsamplitude ist umgekehrt proportional zur beobachteten Teilchenzahl N_{beob} im Fokusvolumen. Unter der Voraussetzung einer Poissonstatistik mit $\langle (\delta N)^2 \rangle = \langle N \rangle$ ergibt sich aus Gl. (4.8) nämlich $G_{kl}(0) = 1 / \langle N_{beob} \rangle$.
- 2.) Die gesamte Korrelationskurve setzt sich additiv aus den Korrelationskurven der einzelnen Teilchen zusammen. Dies ist für eine analytische Behandlung von Proben mit spektral unterschiedlichen Spezies von Bedeutung.

4.3.2 Autokorrelation

Die Autokorrelation ist der einfachste Fall der FCS, man spricht hier auch von Ein-Farben-FCS. Dabei sind die zwei Detektionskanäle k und l identisch und nur eine Anregungswellenlänge wird benötigt. Durch die Autokorrelation lassen sich Konzentrationen und Diffusionskonstanten von fluoreszierenden Teilchen in Lösungen bestimmen. Dazu muss man einen analytischen Term, der die gewünschten Parameter enthält, an die gemessene Korrelationsfunktion anpassen. Die Korrelationsfunktion für die Translationsdiffusion und chemische Reaktionen basieren auf der Näherung, dass die Detektionswahrscheinlichkeit $\Psi_{ij}(\vec{r})$ als dreidimensionale Gaußfunktion beschrieben werden kann. Diese Näherung kann gut für ein System am Beugungslimit, wie das hier vorliegende, gemacht werden. Die analytische Modellfunktion lautet dann:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{1}{cV_{eff}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{diff}} \right)^{-\frac{1}{2}}. \quad (4.9)$$

Gl. 4.9 gilt nur für die freie Diffusion eines Teilchens in einem, gemessen am Fokus, unendlich großen Probenvolumen. Dabei ist τ_{diff} die mittlere Aufenthaltsdauer des Teilchens im Fokus, c die Konzentration der Fluorophore und V_{eff} das effektive Fokusvolumen. Der Diffusionskoeffizient lässt sich dann wie folgt annähern:

$$D \approx \frac{w_0^2}{4\tau_{diff}}. \quad (4.10)$$

Ein weiterer wichtiger Parameter für die Strahlgeometrie ist der Strukturfaktor $\kappa = z_0 / w_0$, wobei w_0 der transversale und z_0 der axiale Radius des Fokus ist. Für unseren optischen Aufbau konnte der Strukturfaktor bei der Auswertung auf 4 fixiert werden (Wachsmuth 2001). Meist liegt der Strukturfaktor je nach optischem Aufbau zwischen 4 und 8. Die FCS eignet sich daher sehr gut für die relative Bestimmung von Diffusionskoeffizienten. Für eine absolute Bestimmung empfehlen sich andere Methoden, wie z.B. die dynamische Lichtstreuung (Berne et al. 1976) oder die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) (Tanford 1961).

4.3.3 Photodynamische Prozesse

Tripletprozesse

Die Fluktuation des Fluoreszenzsignals am Detektor kann auch andere Ursachen haben als die Diffusion der Moleküle. Ein Grund für diese können Tripletprozesse sein, die sich in der Korrelationsfunktion bemerkbar machen.

Fluoreszenzphotonen entstehen durch eine schnelle Folge von Übergängen eines Elektrons zwischen einem angeregten Zustand S_1 und einem Grundzustand S_0 . Dieser Übergang erfolgt in wenigen Nanosekunden. Da typische Aufenthaltsdauern im Fokus im Mikro- bis Millisekundenbereich liegen, erscheint der Photonenfluss als kontinuierlich und kann nicht mit der FCS aufgelöst werden. Er kann aber durch den Übergang in einen Tripletzustand (intersystem crossing, ISC) unterbrochen werden. Da dies nur vom angeregten Zustand aus geschehen kann, ist der Prozess photoinduzierbar. Es ist ein quantenmechanisch „verbotener“ Übergang, bei dem der Besetzungsgrad von der Intensität abhängt. Da Tripletzustände Lebensdauern von einigen Mikrosekunden besitzen, können sie in der FCS aufgelöst werden. Die Folge ist eine Erhöhung der Amplitude um einen Faktor $(1-\Theta_1)^{-1}$, die bei sehr kurzen Zeiten mit einer charakteristischen Zeitkonstante von τ_{trip} abfällt (Abb. 4.5). Dies wirkt sich jedoch nur auf die Autokorrelationsfunktion $G_{ij}(\tau)$ aus, da die Tripletprozesse zweier unterschiedlicher Fluorophore nicht miteinander korrelieren. In der Modellfunktion wird das durch einen Vorfaktor wie folgt berücksichtigt (Widengren et al. 1995):

$$G_{jj}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff}}} \underbrace{\left(\frac{1 - \Theta_1 + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}}}{1 - \Theta_1} \right)}_{\text{Vorfaktor}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}} \right)^{-\frac{1}{2}}. \quad (4.11)$$

Im benutzten Programm *Quickfit* erhält man die „inverse“ Teilchenzahl aus dem Achsenabschnitt der Korrelationsfunktion. Diese muss mit dem Faktor $(1 - \Theta_1)$ nach unten korrigiert werden, um die Amplitude ohne Triplettanteil zu erhalten.

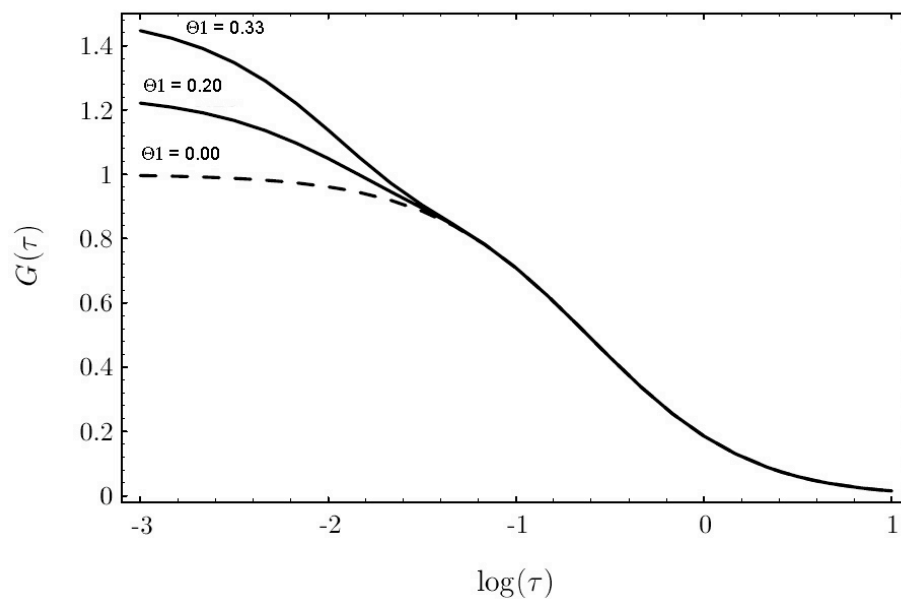


Abbildung 4.5 Autokorrelationsfunktionen mit verschiedenen Triplettanteilen Θ_1 .

Photodestruktion/Photolyse

Eine weitere Ursache für die nicht-diffusionsbedingten Intensitätsschwankungen des Signals kann das irreversible Bleichen eines Fluorophors, auch Photodestruktion genannt, sein. Fluorophore können nur eine mittlere maximale Anzahl von etwa 10^6 Fluoreszenzphotonen emittieren (Moerner et al. 1999), bis sie durch eine photoinduzierte Veränderung ihrer Molekülstruktur in einen strahlungslosen Zustand gelangen.

Da die Photodestruktion nur von den angeregten Zuständen ausgeht, ist die Geschwindigkeit dieses Prozesses von der eingestrahlten Lichtintensität abhängig. Um dieses Problem bei unseren Messungen zu umgehen, wurde bei möglichst kleinen Laserleistungen gemessen.

Blinken autofluoreszierender Proteine

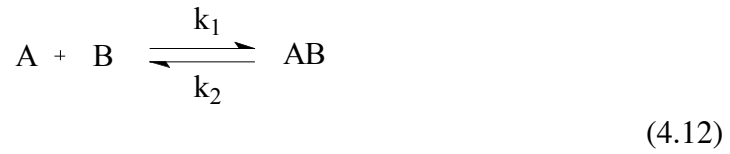
Die bei dieser Arbeit verwendeten verschiedenen GFP-Mutanten und Red Fluorescent Proteine (RFPs) weisen in Lösung eine so genannte „An- und Aus-Dynamik“ auf, die auch als Blinken bezeichnet wird. Dabei gehen die GFP-Mutanten in bis zu zwei nicht-strahlende Zustände über. Ursache hierfür sind Protonierungsgleichgewichte, bei denen die Fluorophore in andere Konformationen übergehen. Diese Zustände besitzen Lebensdauern von wenigen Mikro- bis zu einigen Millisekunden, die unter anderem vom pH-Wert, dem Ionengehalt der Lösung (Haupts et al. 1998) oder der Anregungsintensität (Schwille et al. 2000) abhängen. Zur mathematischen Behandlung dieses Problems findet man verschiedene Ansätze in der Literatur, die jedoch alle eine zusätzliche nicht-strahlende Komponente in Analogie zur Triplettkorrektur berücksichtigen.

Bei der Auswertung der Korrelationskurven für diese Arbeit war die Anpassung von nur einer nicht-fluoreszierenden Komponente ausreichend: Die Anpassung mit zwei nicht-fluoreszierenden Komponenten führt zu gleichen Diffusionszeiten und relativen Anteilen bei den fluoreszierenden Komponenten wie die Anpassung mit nur einer nicht-fluoreszierenden Komponente.

4.3.4 Korrelation mehrerer Spezies

In Lösungen und speziell in Zellen liegt meistens mehr als nur eine Spezies von Teilchen vor. Untersucht man z.B. chemische Reaktionen im Gleichgewicht, so hat man Edukte und Produkte vorliegen. Es können aber auch Teilchen mit unterschiedlichen molekularen Helligkeiten (siehe Kap. 4.3.5), z.B. durch Dimerisierung zweier Fluorophore, vorkommen. Für eine einfache theoretische Behandlung dieser Korrelationskurven sollten bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein:

- das zu untersuchende System muss sich im thermodynamischen Gleichgewicht befinden
- die Teilchen dürfen untereinander nicht in Wechselwirkung treten. Dies muss man vor allen Dingen bei der Untersuchung von reversiblen chemischen Reaktionen oder Bindungsgleichgewichten berücksichtigen:



Dabei sollte die mittlere Lebensdauer des Komplexes AB deutlich länger sein als seine mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus ($1/k_2 \gg \tau_{diff}$), so dass keine Dissoziation des Komplexes während der Messzeit auftritt. Ist dies nicht der Fall, so wird eine theoretische Behandlung der Daten sehr kompliziert (Lamb et al. 2000). Sind alle oben genannten Bedingungen erfüllt, so können analog zu Gl. 4.6 und 4.7 die einzelnen Fluoreszenzbeiträge aller Spezies addiert werden zu:

$$F_k(t) = \sum_s F_{k,s}(t), \quad (4.13)$$

wobei $s = 1, 2, 3, \dots$ die einzelnen, spektral unterschiedlichen Spezies im Detektionskanal k sind.

Das mittlere Signal einer Spezies kann durch das mittlere Signal eines Teilchens dieser Spezies dargestellt werden:

$$\langle F_{k,s}(t) \rangle = c_s V \langle f_{k,s}(t) \rangle, \quad (4.14)$$

dabei ist c_s die Konzentration dieser Spezies und V das Fokusvolumen.

Die Korrelation dieser Spezies kann ausgedrückt werden durch die Korrelationsfunktion $g_{kl,s}(\tau)$ eines Teilchens im Fokusvolumen V mit $g_{kl,s}(0) = 1$:

$$G_{kl,s}(\tau) = \frac{1}{c_s V_{eff}} g_{kl,s}(\tau). \quad (4.15)$$

Unter den oben getroffenen Annahmen lautet der Ansatz für die Korrelationsfunktion mehrerer Spezies dann:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\left\langle \sum_s \delta F_{k,s}(t) \sum_s \delta F_{l,s}(t + \tau) \right\rangle}{\left\langle \sum_s F_{k,s}(t) \right\rangle \left\langle \sum_s F_{l,s}(t) \right\rangle}. \quad (4.16)$$

Unter der Annahme, dass die Intensitäten der einzelnen Spezies nicht korreliert sind, da diese nicht in Wechselwirkung miteinander treten, ergibt sich dann Gl. 4.17:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\sum_s \langle F_{k,s}(t) \rangle \langle F_{l,s}(t) \rangle G_{kl,s}(\tau)}{\sum_s \langle F_{k,s}(t) \rangle \sum_s \langle F_{l,s}(t) \rangle} = \frac{\sum_s c_s \tilde{F}_{k,s} \tilde{F}_{l,s} \tilde{G}_{kl,s}(\tau)}{\sum_s c_s \tilde{F}_{k,s} \sum_s c_s \tilde{F}_{l,s}} = G_{kl}(0) V_{\text{eff},kl} \sum_s \rho_s \tilde{G}_{kl,s}(\tau). \quad (4.17)$$

Um die Konzentrationsabhängigkeit darzustellen, wurden hier die *charakteristische Intensität* im Kanal j $\tilde{F}_{j,s} = \langle F_{j,s} \rangle / c_s$ und die *charakteristische Korrelationsfunktion* $\tilde{G}_{kl,s}(\tau) = c_s G_{kl,s}$ eingeführt. Darunter versteht man die Intensität bzw. die Korrelationsfunktion einer reinen Spezies in einer Lösung mit der Konzentration $c_s = 1M$. ρ_s ist der Anteil der Subspezies nach $\rho_s = c_s / c$ bezogen auf die Gesamtkonzentration aller Spezies c .

Da die charakteristischen Größen $\tilde{G}_{kl,s}(\tau)$, $\tilde{F}_{k,s}$ und $\tilde{F}_{l,s}$ durch Messung der isolierten Proben zugänglich sind, kann ein System aus drei unterschiedlichen Spezies mit Hilfe der Zwei-Farben-FCS durch Aufnahme von zwei Auto- und einer Kreuzkorrelationsamplitude charakterisiert werden. Dies gilt auch bei gleichen Diffusionszeiten der einzelnen Spezies.

Bei der Ein-Farben-FCS kann in einem solchen Fall die Unterscheidung der einzelnen Spezies nur aufgrund eines unterschiedlichen zeitlichen Verhaltens erfolgen. Dies ist allerdings häufig schwierig, da die Diffusionszeiten nur schwach von der molekularen Größe abhängen: Nach Stokes und Einstein ist der Diffusionskoeffizient $D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}$,

wobei η die Viskosität der Lösung und R_h der hydrodynamische Teilchenradius ist. Für globuläre Proteine ist $R_h \propto M^{1/3}$ und wegen $\tau_{\text{diff}} \propto D^{-1}$ (Gl. 4.10) gilt dann: $\tau_{\text{diff}} \propto M^{1/3}$. Ein Monomer ist daher also kaum von einem Dimer unterscheidbar.

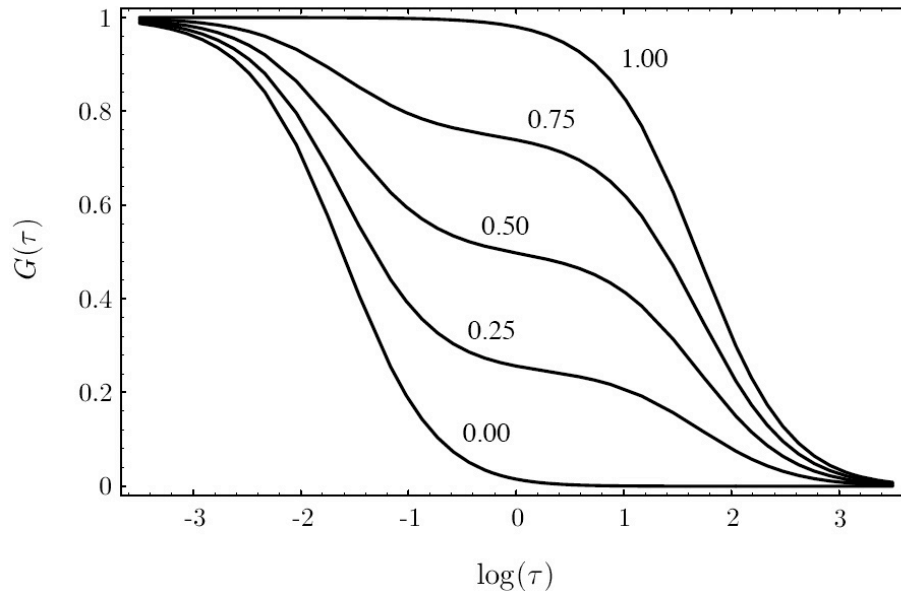


Abbildung 4.6 Theoretische Korrelationsfunktion für ein Gemisch aus einer langsam und einer schnell diffundierenden Spezies ($s = 2$) mit identischen spektralen Eigenschaften (Tewes 1998). Die Gesamtkonzentration wurde dabei konstant gehalten. Die Zahlen geben den Anteil ρ der langsamen Komponente bezogen auf die Gesamtkonzentration aller Spezies an. Der Anteil der schnellen Komponente berechnet sich aus $1-\rho$.

Ein weiteres Problem bei der Ein-Farben-FCS stellen alle nicht-linearen Prozesse wie z.B. Fluoreszenzlöschung, photophysikalische Übergänge, Multimerisierung der Fluorophore dar, bei denen nur sehr schwer, eine quantitative Behandlung möglich ist.

4.3.5 Fluoreszenzlöschung

Unter Fluoreszenzlöschung (Quenching) versteht man die strahlungslose Deaktivierung des angeregten Zustands des Fluorophors. Quenching setzt die Fluoreszenzquantenausbeute und die Fluoreszenzintensität herab und kann durch verschiedene Prozesse erfolgen, z.B. durch Energietransfer, Elektronen- bzw. Protonentransfer und chemische Reaktionen im Anregungszustand.

Meist hat man in einer Lösung unterschiedlich helle Partikel vorliegen. Dies kommt z.B. durch Oligo- oder Polymerisierung einzelner Fluorophore zustande, aber auch durch chemische Reaktionen, bei denen durch nicht-kovalente Bindung oder molekularem Austausch von markierten Untereinheiten Fluoreszenzlöschung auftritt. Man erhält also ein Gemisch von Spezies, die zwar in einem definierten, aber nicht unbedingt ganzzahligen Verhältnis ihrer Quantenausbeuten stehen.

Da wie in Gl. 4.17 beschrieben, die Beiträge der einzelnen Spezies mit dem Quadrat ihrer charakteristischen Intensität $\tilde{F}_{j,s}$ gewichtet werden, repräsentiert die Amplitude der Korrelationsfunktion nicht mehr genau die mittlere Anzahl der Teilchen im Fokusbereich. Sie ist zugunsten der helleren Komponente verschoben.

Zur Erfassung führt man die relative Quantenausbeute $\eta_{k,s} = \tilde{F}_{k,s} / \tilde{F}_{k,s=1}$ ein, wobei sich hier die Quantenausbeute auf eine willkürlich gewählte Spezies $s = 1$ bezieht, z.B. auf den freien Farbstoff bei Markierungsreaktionen. Man erhält eine im Vergleich zu einer einheitlichen Lösung gleicher Konzentration der Standardspezies erhöhte Amplitude (Thompson 1991; Widengren et al. 1998):

$$G_{kl}(0) = \frac{1}{cV_{eff,kl}} \frac{\sum_s c_s \eta_{k,s} \eta_{l,s}}{\left(\sum_s c_s \eta_{k,s} \right) \left(\sum_s c_s \eta_{l,s} \right)}. \quad (4.18)$$

Bei Unterscheidung der einzelnen Spezies nach ihrer Diffusionszeit erhält man die relativen Anteile ρ_s , die ebenfalls zugunsten der helleren Komponente verschoben sind. Diese Privilegierung der helleren Komponente kann durch Normalisierung berücksichtigt werden, so dass mit $\rho_{s,kor}$ die wirklichen Molenbrüche der einzelnen Spezies ausgedrückt werden:

$$\rho_{s,kor} = \frac{c_s}{\sum_s c_s} = \frac{\rho_s / \eta_{k,s} \eta_{l,s}}{\sum_s \rho_s / \eta_{k,s} \eta_{l,s}}. \quad (4.19)$$

4.3.6 Kreuzkorrelation

Bei der Kreuzkorrelationspektroskopie, auch Zwei-Farben-FCS genannt, müssen einige zusätzliche Aspekte berücksichtigt werden:

Anregungsvolumina

Die Anregungsvolumina beider Kanäle sind unterschiedlich groß, da bei einem beugungsbegrenzten Fokus die linearen Abmessungen nach Gl. 4.20 in erster Näherung proportional zur Anregungswellenlänge sind, weil für das Gaußsche Strahlprofil gilt:

$$w_0 = \frac{\lambda_{ill}}{n\pi\alpha}, \quad NA = n \sin\alpha, \quad (4.20)$$

wobei w_0 der transversale Radius, NA die numerische Apertur des Objektivs, α der maximale Winkel des konvergenten Lichts und n der Brechungsindex ist. Folglich gilt für das Beobachtungsvolumen: $V_{eff} \propto \lambda_{ex}^3$. Für unsere Hauptlinien 488 nm und 568 nm erhält man so einen Faktor von 1.58 für den Größenunterschied der beiden Anregungsvolumina. Man beobachtet also im Schnitt mehr rote als grüne Teilchen bei gleicher Konzentration der Teilchen.

Detektionsvolumina

Bei der Autokorrelationsfunktion sind die Detektionswahrscheinlichkeiten $\Psi_l(\vec{r})$ und $\Psi_k(\vec{r})$ identisch, daher verschwindet auch ihr Versatz. Bei der Kreuzkorrelation kann es jedoch zu einem lateralen oder axialen Versatz aufgrund chromatischer Abbildungsfehler entlang der optischen Achse kommen (Abb. 4.7). Dieser ist durch einen analytischen Korrekturfaktor, wie in Gl. 21 beschrieben, zu berücksichtigen:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{1}{cV_{eff}} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{0,eff}^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_{0,eff}^2}\right)^{-\frac{1}{2}} \exp\left(-\frac{d_x^2 + d_y^2}{4D\tau + w_{0,eff}^2} - \frac{d_z^2}{4D\tau + z_{0,eff}^2}\right). \quad (4.21)$$

Dabei ist $\vec{d} = \vec{p}_k - \vec{p}_l$ der Versatzvektor zwischen den Zentren beider Foki der Anregungslinien \vec{p}_k und \vec{p}_l . $w_{0,eff}^2 = (w_{0,k}^2 + w_{0,l}^2)/2$ und $z_{0,eff}^2 = (z_{0,k}^2 + z_{0,l}^2)/2$ sind die $1/e^2$ Radien der Gaußprofile senkrecht und parallel zur optischen Achse. Das Beobachtungsvolumen entspricht, abgesehen von einem Faktor 1.33, dem eines Rotationsellipsoids mit $V_{eff,kl} = \pi^{\frac{3}{2}} w_{0,k} w_{0,l} (z_{0,k} z_{0,l})^{\frac{1}{2}}$ mit den Halbachsen w_0 und z_0 . Für die Autokorrelation verschwindet der exponentielle Term, da $\vec{d} = 0$ ist, und man erhält die Funktion Gl. 4.9 in ihrer ursprünglichen Form.

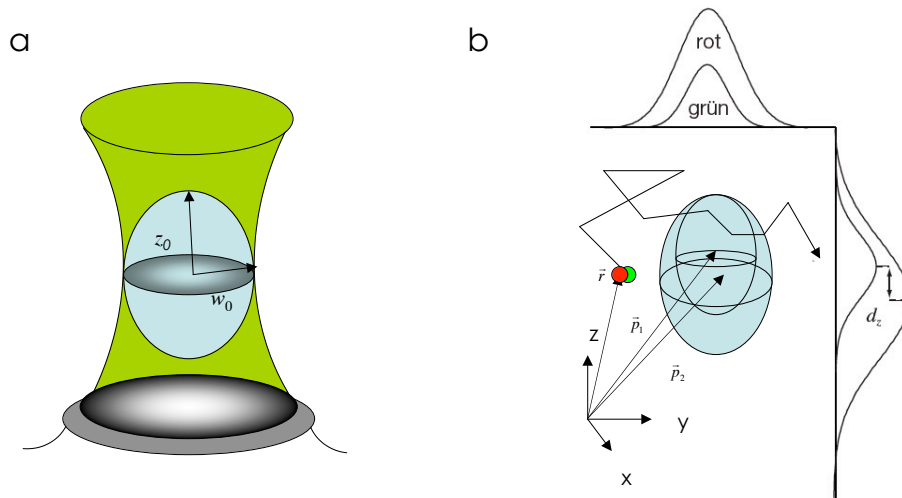


Abbildung 4.7 Fokusgeometrie **a)** Die Detektionsfunktion kann in einem konfokalen Aufbau mit hoher numerischer Apertur durch eine dreidimensionale Gaußfunktion beschrieben werden, wobei w_0 der transversale und z_0 der axiale Radius des Fokus ist. **b)** \vec{p}_1 und \vec{p}_2 sind die Positionen der Zentren der beiden Foki, die hier einen chromatischen Versatz \vec{d} in z -Richtung aufweisen (Weidemann et al. 2002).

Bei der Kreuzkorrelation führt dieser chromatische Versatz zu einer deutlichen Reduktion der Kreuzkorrelationsamplitude und einem leicht verlangsamten Abfall der Kurve, also bei Anpassung mit Gl. 4.9 zu einer scheinbar verlangsamten Diffusionszeit.

Übersprechen der Kanäle

Ein weiteres Problem für die Kreuzkorrelation stellt das Übersprechen („Crosstalk“) der Kanäle dar. Es kommt durch eine unvollkommene Passung von Kanal und Fluorophor zustande und erzeugt in den zuvor beschriebenen Gleichungen Off-Diagonalelemente in der Farbmatrix σ_{ij} . Dies beinhaltet sowohl Anregung mit beiden Wellenlängen als auch Detektion in beiden Farbkanälen. Ein grünes Fluorophor kann z.B. eine Autokorrelationskurve im roten Kanal und eine artifizielle Kreuzkorrelationskurve erzeugen. Diese ist zwar verrauscht, hat aber die gleiche Amplitude wie die Autokorrelationskurve im grünen Kanal. Das Übersprechen wird vermindert, sobald in der Lösung „wahre“ rote Teilchen vorhanden sind, da die charakteristische Intensität $\tilde{F}_{j,s}$, welche in den anderen Kanal überspricht, in der Regel nur sehr klein ist.

Um dieses Übersprechen der Kanäle zu vermeiden, sollten die Emissionsspektren der zwei Fluorophore spektral möglichst weit auseinander liegen. Außerdem sollten die Fluorophore in stöchiometrischen Mengen vorliegen und eine vergleichbare molekulare Helligkeit ϕ besitzen.

Übersprechen kann leicht durch Betrachtung der schnellen Kanäle in der Korrelationsamplitude erkannt werden: Tripletprozesse und „Blinking“-Phänomene sollten bei einer wahren Kreuzkorrelationskurve nicht auftreten, da die photophysikalischen Prozesse eines grünen Chromophors nicht mit denen eines roten Chromophors korreliert sind. Alle Kreuzkorrelationskurven wurden deshalb ohne eine nicht-fluoreszierende Komponente angepasst.

Einfluss von Photodestruktion

Ein anderes Artefakt, das eine scheinbare Kreuzkorrelation zur Folge hat, ist die Photodestruktion (Photolyse) der Fluorophore (siehe Kap. 4.3.3). Ein starker gleichzeitiger Abfall in der Zählrate in beiden Kanälen lässt darauf schließen. Um dies zu vermeiden, sollte wie bei der Ein-Farben-FCS auch bei möglichst kleinen Anregungsintensitäten gemessen werden. Bei stark immobilisierten Partikeln, die trotz niedrigen Anregungsintensitäten gebleicht werden, kann man z.B. durch Scannen des FCS-Volumens das positionsabhängige Signal zu einem zeitabhängigen umwandeln (Bacia et al. 2003).

4.3.7 Korrektur des Untergrundsignals

Trotz des sehr guten Signal-zu-Rausch-Verhältnisses durch die verwendeten sensitiven Photodioden und den konfokalen optischen Aufbau erhält man immer ein nicht-korreliertes Untergrundsignal $U(t)$ durch das verbleibende Streu- oder Anregungslicht oder durch Ramanstreuung am Lösungsmittel. Das Gesamtsignal am Detektor setzt sich demnach wie folgt zusammen:

$$F_{j,total}(t) = F_j(t) + U(t) \quad (4.22)$$

mit $F_j(t) = \sum_s F_{j,s}(t)$.

Dieses nicht-korrelierte Untergrundsignal $U(t)$ hat eine Reduktion der Korrelationsamplitude, also eine Überschätzung der Teilchenzahl, zur Folge. Diese Reduktion lässt sich in der Modellfunktion leicht durch einen Vorfaktor erfassen (Koppel 1974):

$$G_{kl}(0) = \left(1 + \frac{\langle U_k \rangle}{\langle F_k \rangle}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\langle U_l \rangle}{\langle F_l \rangle}\right)^{-1} \frac{1}{\langle N_{beob} \rangle}. \quad (4.22)$$

Der Vorfaktor kann vernachlässigt werden sobald für beide Kanäle $\langle U \rangle \ll \langle F \rangle$ gilt.

5 Experimente & Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der AP-1-XFP-Zellen

Sämtliche für AP-1-kodierende Gene wurden in den Vektor pSV-XFP kloniert. Dieser für Säugetierzellen geeignete Vektor steht unter der Kontrolle des frühen SV 40 Promoters, der über den Zellzyklus hinweg gleichmäßig aktiv ist. Mit Hilfe dieses Vektors können Fusionsproteine bestehend aus einem AP-1-Protein (Aktivator Protein 1) und einem XFP konstruiert werden. Die Konstruktion der einzelnen Fusionsproteine und ihre Übersicht ist dem Anhang zu entnehmen.

Zur Etablierung der stabilen Zelllinien wurden HeLa-Zellen mit dem Vektor transfiziert und anschließend mit einem geeigneten Antibiotikum selektiert. Dadurch ließ sich das fusionierte Gen stabil ins Genom der Zellen integrieren.

Da die Integration eines neuen Gens ins Genom einer Zelllinie ihr Wachstumsverhalten verändern kann, wurde dieses mit nicht-transfizierten HeLa-Zellen verglichen. Dazu wurden 200000 Zellen in einer Kulturflasche angelegt und alle 24 Stunden in einer Neubauerkammer über einen Zeitraum von 4 Tagen gezählt. Die Wachstumskurven sind in Abb. 5.1 zu sehen. Die Zelllinie pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP wächst hier besonders langsam, die HeLa-Kontrolle am schnellsten.

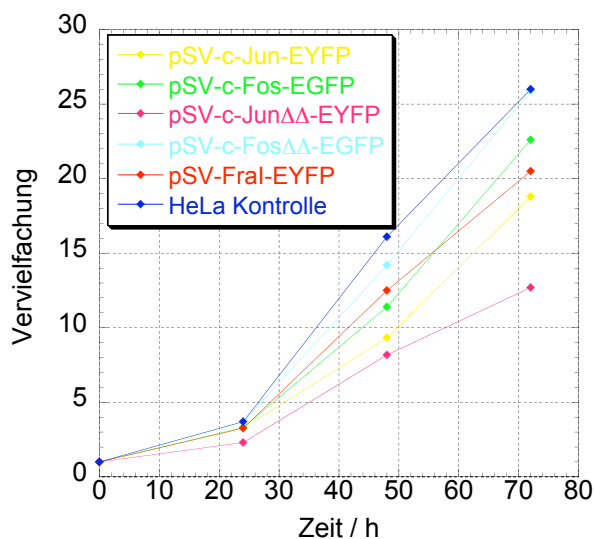


Abbildung 5.1 Wachstumskurven der stabilen Zelllinien. Die Vervielfachung wird gegen die Zeit [h] aufgetragen.

Außerdem wurde die Progression dieser Zelllinien im Zellzyklus im Vergleich zur HeLa-Kontrolle untersucht. Für die Zellzyklus-Messungen mittels Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) wurden die Zellen vor der Messung mit Ethanol fixiert und die DNA in den Kernen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Anhand ihres DNA-Gehalts konnten die Zellen den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Die Zellzyklus-Messungen wurden freundlicherweise von Monika und Michael Stöhr (DKFZ) durchgeführt. Die Tab. 5.1 zeigt, dass alle Zelllinien eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Progression im Zellzyklus aufweisen. Danach befinden sich ca. 58 % der Zellen in der G1-Phase, 31 % in der S-Phase und 11 % in der G2-Phase bzw. Mitose.

Zelllinie	G1	S	G2/M
c-Jun-EYFP	59 %	30 %	11 %
c-Fos-EGFP	59 %	32 %	9 %
c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP	57 %	33 %	10 %
c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP	58 %	30 %	12 %
Fra1-EYFP	58 %	31 %	12 %
HeLa	58 %	31 %	11 %

Tabelle 5.1 Progression im Zellzyklus: prozentuale Anteile der Zellen in der G1-Phase, in der S-Phase und in der G2/Mitose.

Ferner wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensität der XFP-Fluoreszenz in den Zelllinien gemessen, um zu untersuchen, ob die Fluoreszenzintensität innerhalb eines Klons stark variierte. Die Zellen sollten alle ähnliche Mengen an EYFP bzw. EGFP exprimieren, da die Plasmid-DNA stabil ins Genom der HeLa-Zellen integriert ist.

Die Anzahl der gezählten Zellen (Counts) wurde gegen die Fluoreszenzintensität auf einer logarithmischen Skala aufgetragen (Abb. 5.2). Bei allen transfizierten Zelllinien waren zwei Populationen zu erkennen, die sich in ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden. Bei der Population mit niedriger Fluoreszenzemission handelt es sich um reine HeLa-Zellen, die bei Anregung mit 488 nm eine gewisse Autofluoreszenz besitzen (siehe Kontrolle 5.2 f). Die zweite Population bei sehr viel höherer Fluoreszenzemission ist charakteristisch für Zellen, die EGFP bzw. EYFP exprimieren. Diese Messungen wurden freundlicherweise von V. Ehemann (Universität Heidelberg) durchgeführt.

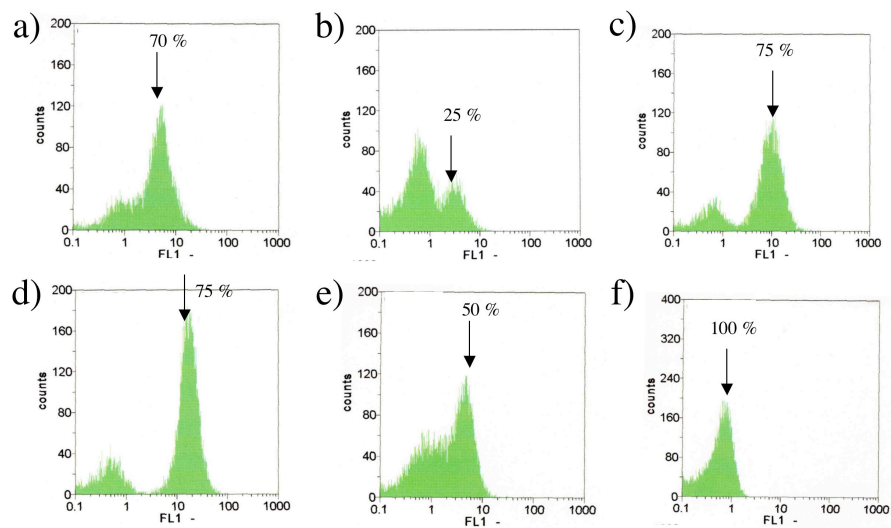


Abbildung 5.2 FACS-gemessene Fluoreszenzverteilung der etablierten Zelllinien: **a)** pSV-c-Jun-EYFP 70 %, **b)** pSV-c-Fos-EGFP 25 %, **c)** pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP 75 %, **d)** pSV-c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP 75 %, **e)** pSV-Fra1-EYFP 50 %, **f)** HeLa-Kontrolle 100 % Autofluoreszenz.

Durch Integration der Zählratenkurven erhielt man die relativen Anteile der einzelnen Populationen (Abb. 5.2). Dabei fällt insbesondere die Zelllinie pSV-c-Fos-EGFP auf, bei welcher der Anteil an fluoreszierenden Zellen nur bei 25 % liegt. Dieses Phänomen verstärkte sich nach mehrfachem Umsetzen. Die Expression von c-Fos-EGFP wird nach einer gewissen Zeit von der Zelle eingestellt, da es möglicherweise toxisch für die Zelle ist. Die Zellen ohne c-Fos-EGFP vermehren sich daraufhin wieder schneller und überwachsen die übrigen noch fluoreszierenden Zellen.

5.2 Nachweis der AP-1-Proteine mittels Western-Blot

Die Expressionsniveaus aller AP-1-Komponenten in Zellen wurden mit Hilfe von Western-Blots bestimmt (siehe Material & Methoden, Kap. 7.6.4).

5.2.1 Nachweis des Fusionsproteins c-Jun-EYFP

In Abb. 5.3 ist auf der linken Seite die nicht-transfizierte HeLa-Kontrolle aufgetragen. Die Bande bei ca. 40 kDa entspricht dem endogenen c-Jun (35 kDa). Die Zahlen bezeichnen das Molekulargewicht in kDa. Die zweite Spur stammt von einer HeLa-Kontrolle, welche zuvor mit TPA (12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) inkubiert

wurde. TPA ist ein Tumorpromoter und induziert AP-1 (Angel et al. 1991; Karin et al. 1997; Wagner 2001). Die Menge an c-Jun ist hier im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erhöht.

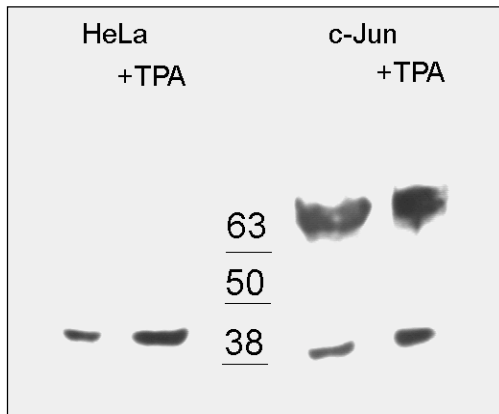


Abbildung 5.3 Western-Blot gegen c-Jun. Der Molekulargewichtsmarker wurde mit einem Bildbearbeitungsprogramm nachgezeichnet, da die Banden nach der Filmentwicklung nur noch schwach zu erkennen waren.

Auf der rechten Seite sind Lysate aus Zellen, die das Fusionsprotein c-Jun-EYFP exprimieren, aufgetragen. Eine zusätzliche Bande im Vergleich zur Kontrolle bei einer Größe von etwa 65 kDa ist hier zu sehen. Dies stimmt gut mit dem für das Fusionsprotein berechneten Molekulargewicht von 63 kDa überein. Endogenes und markiertes c-Jun werden etwa im gleichen molaren Verhältnis von der Zelle exprimiert. Die relativen Mengenanteile der beiden Banden wurden mit Hilfe des Programms *Bio Image® Intelligent Quantifier™* (Version 2.1.1) berechnet.

Dieses Ergebnis ist sehr wichtig für die FCCS-Messungen. Nur Fos-Jun-Dimere, bei denen sowohl c-Fos wie auch c-Jun markiert sind, tragen zur Kreuzkorrelation bei (siehe Kap 4.1). Für eine erfolgreiche Messung sollte ein Überschuss an markierten AP-1-Proteinen gegenüber den endogenen vorhanden sein.

5.2.2 Nachweis des Fusionsproteins c-Fos-EGFP

Der Western-Blot gegen c-Fos-EGFP führte zu ähnlichen Ergebnissen (Abb. 5.4). Das molare Verhältnis von endogenem zu markiertem c-Fos ist hier 1:5. Auffallend ist allerdings, dass die Banden nicht der erwarteten Größe entsprechen (c-Fos: 41 kDa und c-Fos-EGFP: 68 kDa), sondern größer sind. Ein Grund hierfür kann ein anderer Phosphorylierungsgrad von c-Fos *in vivo* sein (Soto et al. 1999).

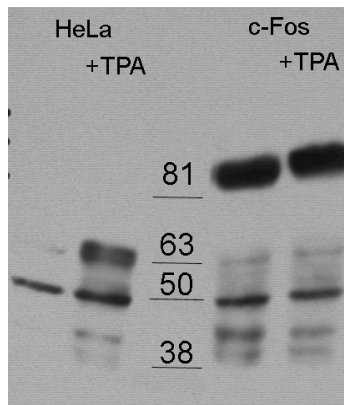


Abbildung 5.4 Western-Blot gegen c-Fos.

5.2.3 Nachweis des Fusionsproteins Fra1-EYFP

Auch der Western-Blot gegen Fra1 zeigt im Vergleich zu den Kontrollzellen eine zusätzliche Bande auf der rechten Seite bei etwa 63 kDa (Abb. 5.5). Das endogene Fra1 hat eine Größe von etwa 29 kDa, das markierte ca. 57 kDa. Endogenes und markiertes Fra1 werden auch hier in äquimolaren Mengen von der Zelle exprimiert.

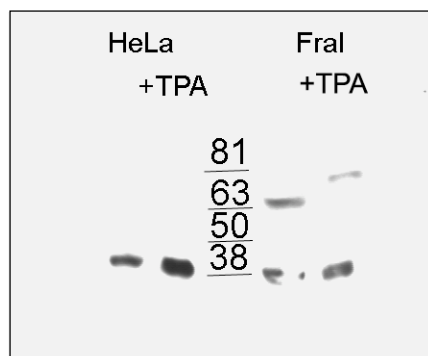


Abbildung 5.5 Western-Blot gegen Fra1.

Die markierten und endogenen AP-1-Komponenten werden also etwa in äquimolaren Mengen von HeLa-Zellen exprimiert.

5.3 Kalibrierung des FCCS-Aufbaus

Um den FCCS-Aufbau zu kalibrieren, wurde zunächst die Diffusionszeit von 5-(6-)Carboxy-Fluoreszein (*Molecular Probes*) im grünen Kanal und die Diffusionszeit von Alexa 568TM Carboxylsäure-Succinimidylester im roten Kanal gemessen (die Diffusionszeiten sollten so kurz wie möglich sein, um ein minimales Fokusvolumen zu erhalten). Die beiden Farbstoffe (Abb. 5.6) eignen sich sehr gut für eine solche Kalibrierung, da sie hohe Fluoreszenzquantenausbeuten η_F besitzen und außerdem nicht an Oberflächen (von z.B. Messkammern) adsorbieren, was bei vielen anderen roten Farbstoffen der Fall ist.

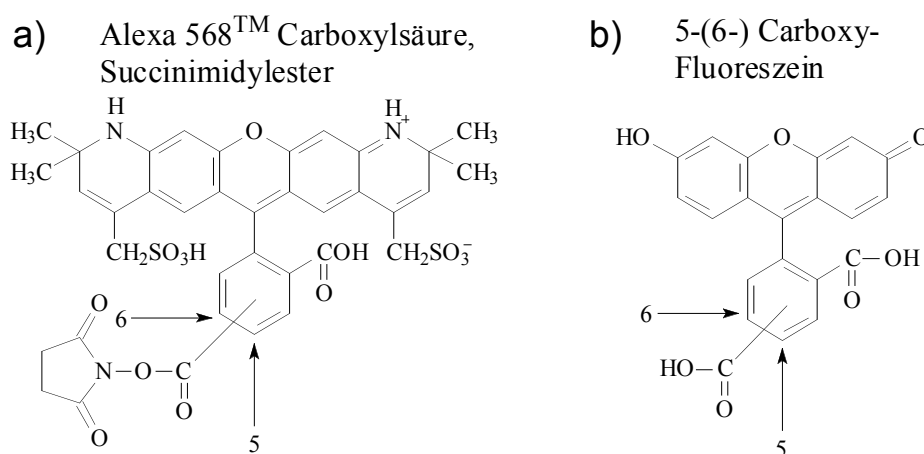


Abbildung 5.6 Für die Justierung des FCCS-Aufbaus verwendete Farbstoffe: **a)** Alexa 568TM Carboxylsäure-Succinimidylester für den roten Kanal und **b)** 5-(6-)Carboxy-Fluoreszein für den grünen Kanal.

Die Gl. 4.11 (siehe Kap. 4.3.3) wurde an die mittels FCS/FCCS erhaltenen Autokorrelationskurven mit Hilfe des Programms *Quickfit* unter Annahme einer nicht-fluoreszierenden und einer fluoreszierenden Komponente angepasst. Die Diffusionszeit von Alexa 568, $\tau_D = 58.5 \mu\text{s} \pm 1.1 \mu\text{s}$, war um etwa 20 % länger als die von Fluoreszein, $\tau_D = 48.4 \mu\text{s} \pm 3.6 \mu\text{s}$. Der Diffusionskoeffizient des Fluoreszein liegt bei $D_{Fluo} = 2.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (Swaminathan et al. 1996), der von Alexa 568 bei $D_{Alex} = 2.3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (Weidemann 2002). Demnach würde man bei gleichen Anregungsvolumina für Alexa 568 eine Diffusionszeit von $54.7 \mu\text{s}$ erwarten. Wegen $V \propto \lambda^3$ und $V \propto \tau^{3/2}$ ergibt sich für das Verhältnis der Diffusionszeiten im roten und grünen Kanal ein Zahlenwert von 1.35. Deshalb würde man für Alexa 568 eine

Diffusionszeit von 74 μs erwarten. Ein Grund für die kürzere Diffusionszeit von 58.5 μs kann die Photolyse des Farbstoffes sein oder aber die große Ungenauigkeit in der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten aus der Literatur.

Bei Messung der Korrelationsfunktionen von Fluoreszein im Dual-Modus (also im roten und grünen Kanal gleichzeitig) war das Übersprechen vom grünen in den roten Kanal deutlich zu beobachten. Abb. 5.7 zeigt die Autokorrelationsfunktion von Fluoreszein im roten und im grünen Kanal und die erhaltene Kreuzkorrelationskurve. Sowohl die beiden Autokorrelations- als auch die Kreuzkorrelationskurve weisen nahezu identische Amplituden auf, was für eine gute Überlappung (ca. 80 %) der Detektionsvolumina spricht. Diese Kurven unterscheiden sich lediglich in ihrer Verrauschtheit. Bei Alexa 568 dagegen ist das Übersprechen in den grünen Kanal so minimal, dass man dort keine Autokorrelationskurve und somit auch keine Kreuzkorrelationskurve erhält.

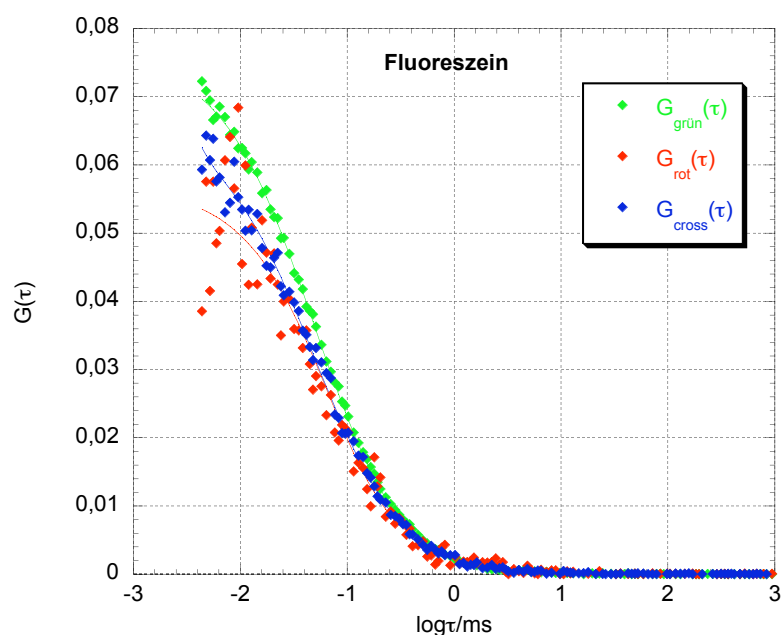


Abbildung 5.7 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurven im roten und im grünen Kanal (rot bzw. grün) und Kreuzkorrelationskurve (blau) einer 30 nM Fluoreszein-Lösung bei pH 9.0. Die Amplituden sind nahezu identisch.

Um eine maximale Kreuzkorrelationsamplitude erhalten zu können, war die Überlappung der Detektions- und Anregungsvolumina zu optimieren. Dazu wurde ein 157 bp DNA-Fragment gemessen, welches an einem Ende mit Alexa 488 und am anderen mit Rhodamin X markiert war. In beiden Kanälen erhielt man annähernd die gleichen Autokorrelationsamplituden $G_k(\tau)$ und $G_l(\tau)$ (Abb. 5.8 a), was gleichen Konzentrationen an Alexa 568 und Fluoreszein entspricht. Die Autokorrelationskurven wurden zur Veranschaulichung auf einen maximalen Amplitudenwert von eins normiert (Abb. 5.8 b). Die maximale Kreuzkorrelationsamplitude für diese 100 % doppelt-markierte Probe betrug bei diesem FCCS-Aufbau bei optimaler Justierung $46\% \pm 1\%$. Dies befindet sich in guter Übereinstimmung mit früheren Messungen unserer Arbeitsgruppe (Tewes 1998; Rippe 2000; Weidemann et al. 2002).

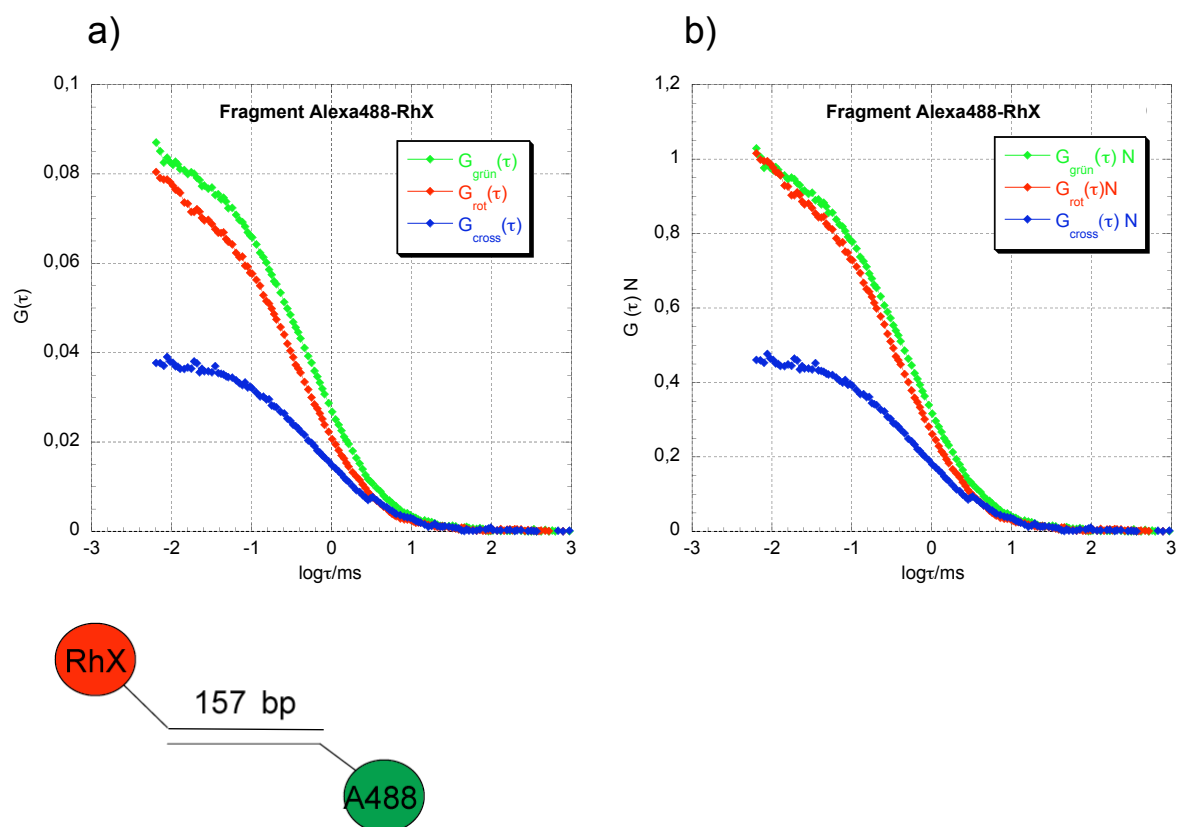


Abbildung 5.8 FCCS-Kalibrierungsmessung mit einem 157 bp DNA-Fragment, welches an einem Ende mit Alexa 488 und am anderen mit Rhodamin X markiert war. **a)** Autokorrelationskurven im roten (rot) und grünen Kanal (grün) zeigen fast identische Amplituden. Es liegen folglich gleiche Mengen an roten und grünen Farbstoff vor. **b)** Auf eins normierten Autokorrelationskurven. Die Kreuzkorrelationskurve in blau zeigt eine Amplitude von $46\% \pm 1\%$.

5.4 Kontrollmessungen *in vitro*

Vorab sollten die freien Proteine, die aus den Zelllysaten (siehe Kap. 7.6.4) isoliert wurden, mittels FCS gemessen werden, um die Mobilität der Proteine in Lösung zu quantifizieren. Durch Vergleich mit den Mobilitäten *in vivo* ist eine Abschätzung der Viskosität in den Zellen möglich.

Dazu wurden die Zelllysate 1:10 in einem isotonischen Tris-Puffer bei pH 7.4 verdünnt und 200 μl davon in eine Messkammer gegeben. An die gemessenen Autokorrelationsfunktionen wurde die Modellfunktion (Gl. 4.11, siehe Kap. 4.3.3) mit einer fluoreszierenden und einer nicht-fluoreszierenden Komponente angepasst. Es wurden jeweils 10 Autokorrelationskurven aufgenommen und der Mittelwert der Diffusionszeiten gebildet. Eine Übersicht über die einzelnen Messungen ist in Tab. 5.2 aufgeführt:

AFP	Diffusionszeit τ_D (ms)	Diffusionskoeffizient D ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	Diffusionskoeffizient D Literaturwert ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)
EGFP	0.19 ± 0.06	6.6 ± 2.1	8.7 (Terry et al. 1995)
EYFP	0.17 ± 0.08	7.6 ± 3.5	-
DsRed2	0.09 ± 0.05	14.8 ± 7.8	2.6 (Heikal et al. 2000)
eqFP611	0.22 ± 0.10	6.1 ± 2.8	4.1 (Wiedenmann et al. 2002)
mRFP1	0.17 ± 0.04	7.8 ± 1.8	-
c-Jun-EYFP	0.49 ± 0.10	2.5 ± 0.5	-

Tabelle 5.2 Übersicht der *in vitro* gemessenen Diffusionszeiten und –koeffizienten der isolierten autofluoreszierenden Proteine.

Die dazugehörigen Autokorrelationskurven sind in Abb. 5.9 dargestellt. Um die unterschiedlichen Diffusionszeiten besser zu verdeutlichen, wurden die Amplituden auf eins normiert.

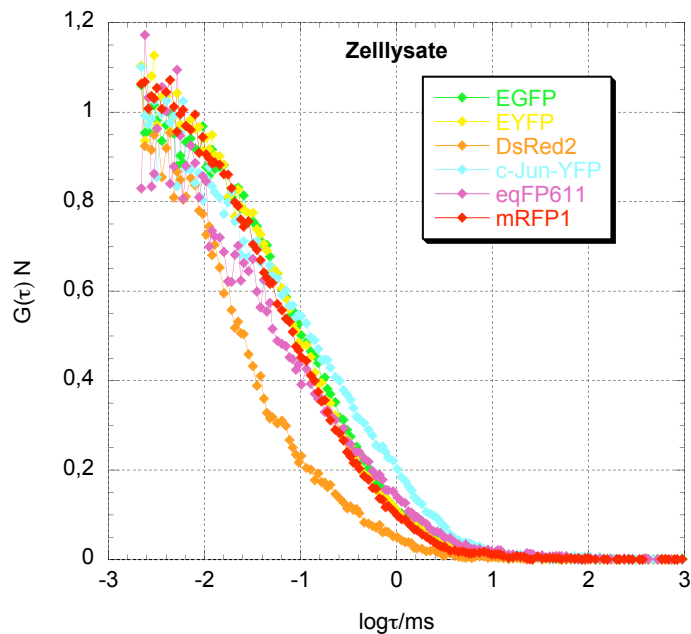


Abbildung 5.9 Vergleich der normierten Autokorrelationskurven von EGFP, EYFP, eqFP611, DsRed2, mRFP1 und c-Jun-EYFP.

Die Diffusionszeiten von EGFP, EYFP, eqFP611 und mRFP1 befinden sich alle in der gleichen Größenordnung (Tab. 5.2). Auffallend ist allerdings die kurze Diffusionszeit von DsRed2 $\tau_D = 0.09 \text{ ms} \pm 0.05 \text{ ms}$, entsprechend einem großen Diffusionskoeffizienten $D = (14.8 \pm 7.8) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, im Vergleich zum Literaturwert von $D = 2.6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Ein Grund hierfür kann die photoinduzierte An- und Ausdynamik („Blinking“) von DsRed sein, welche intensitätsabhängig ist. Beim Verringern der Laserintensität von 50 auf $0.3 \text{ kW}/\text{cm}^2$ wurde die Diffusionszeit deutlich länger ($90 \text{ }\mu\text{s}$ auf $350 \text{ }\mu\text{s}$) und der Diffusionskoeffizient entsprechend kleiner $D = (3.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ (Abb. 5.10). Dies stimmt gut mit den Ergebnissen von Malvezzi-Campeggi et al. überein (Malvezzi-Campeggi et al. 2001). Die gemessene Diffusionszeit von $90 \text{ }\mu\text{s}$ bei Laserintensitäten von über $10 \text{ kW}/\text{cm}^2$ ist also wahrscheinlich eine reine „Blinking“-Zeit und keine Diffusionszeit. Der Diffusionskoeffizient bei kleineren Laserintensitäten von $D = (3.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ kommt dem Literaturwert von $D = 2.6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ näher.

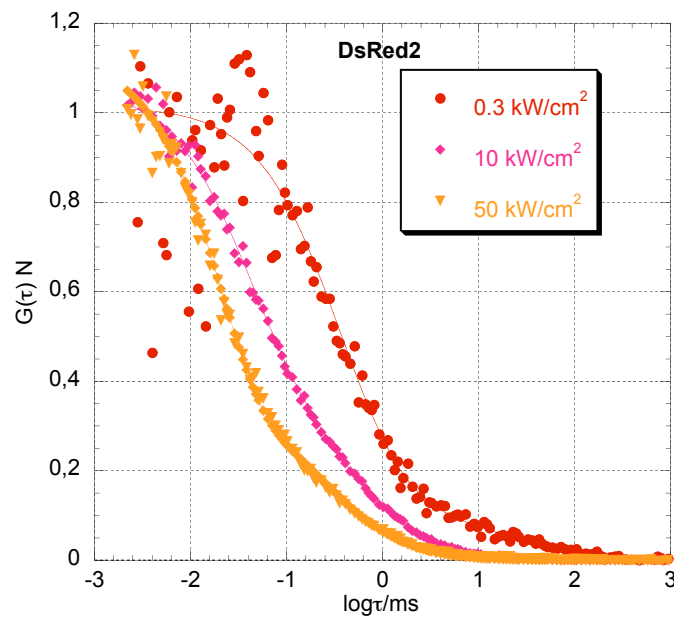


Abbildung 5.10 Normierte gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurven von DsRed2-Zelllysaten bei drei verschiedenen Laserintensitäten.

Außerdem wurden Fluoreszenzspektren dieser Protein-Lösungen aufgenommen, um diese mit den Spektren aus der Literatur zu vergleichen. Einen Überblick über die normierten Fluoreszenzspektren der isolierten Proteine ist in Abb. 5.11 dargestellt.

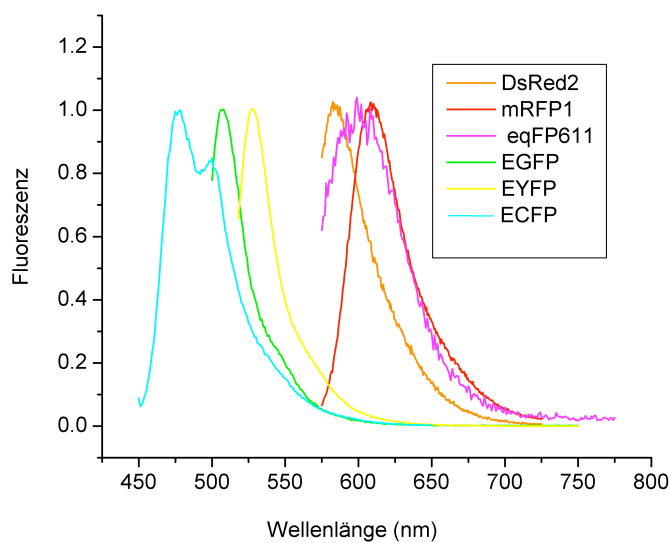


Abbildung 5.11 Normierte, gemessene Fluoreszenzspektren der isolierten, autofluoreszierenden Proteine DsRed2 (orange), mRFP1 (rot), eqFP611 (rosa), EGFP (grün), EYFP (gelb) und ECFP (cyan).

Die Emissionsmaxima der fluoreszierenden Proteine stimmen gut mit den Literaturwerten überein (Tab. 5.3), nur das Emissionsmaximum von eqFP611 ist um 8 nm nach links verschoben. Ein Grund hierfür könnte das stark verrauschte Signal sein, da die Zellen nur sehr wenig eqFP611 exprimierten. Wie in der Literatur beschrieben, zeigt das Emissionsspektrum von ECFP ein Maximum bei 478 nm mit einer Schulter bei 501 nm.

AFP	Emissionsmaximum gemessen in nm	Emissionsmaximum Literatur in nm
ECFP	478/501	477/505
EGFP	507	507
EYFP	528	525
DsRed2	585	583
EqFP611	603	611
mRFP1	609	607

Tabelle 5.3 Vergleich der gemessenen Emissionsmaxima der isolierten, auto-fluoreszierenden Proteine (AFP) mit den Literaturwerten (Campbell et al. 2002; Wiedenmann et al. 2002; Clontech 2003).

5.5 Kontrollmessungen *in vivo*

Nach den *in vitro* Messungen wurden alle freien XFPs in Zellen gemessen, um die Mobilität zu bestimmen und das Übersprechen in den anderen Kanal der einzelnen XFPs zu quantifizieren.

Für jedes Proteinkonstrukt wurden 20 Zellen gemessen. Es wurden Bilder vor und nach der Messung aufgenommen. Falls die Zelle sich während der Messung bewegt hatte, wurden diese Messungen bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Pro Zelle wurden höchstens drei Messpunkte aufgenommen, da die Zelle ansonsten stark geschädigt bzw. durch Photolyse zerstört worden wäre. An alle erhaltenen Korrelationskurven wurde eine Modellfunktion (siehe Kap. 4, Gl. 4.11 bzw. 4.17) unter der Annahme einer nicht-fluoreszierenden Komponente und zwei fluoreszierenden, diffusiven Komponenten angepasst. Der Strukturfaktor wurde bei der Anpassung auf 4 fixiert.

Bei den Zwei-Farben-FCCS-Messungen wurden nur Zellen ausgewertet, die in beiden Kanälen ähnliche Konzentrationen des roten sowie des grünen Protein besaßen. Die Autokorrelationsamplituden wurden auf eins normiert. Die Kreuzkorrelationsamplitude wurde mit Hilfe des Mittelwerts aus beiden Autokorrelationsamplituden

normiert. Der Anteil an zweifarbigen Proteinkomplexen konnte dadurch unmittelbar dem Graphen entnommen werden. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurde als Anfangswert (Origo) für die Abszissenachse stets $1 \mu\text{s}$ gewählt.

5.5.1 Freies EGFP in HeLa

Zunächst wurden nicht-transfizierte HeLa-Zellen bei Standardlaserintensitäten zwischen 5 kW/cm^2 und 10 kW/cm^2 gemessen, um eine Abschätzung der Autofluoreszenz in den Zellen vornehmen zu können. Diese war jedoch vernachlässigbar klein (weniger als 1 % der GFP- bzw. RFP-Fluoreszenz). Als nächstes wurden Zellen, die EGFP exprimierten (Abb. 5.12), mittels FCCS gemessen. Das Übersprechen von EGFP in den roten Kanal betrug etwa 10 % der Rate (in kHz) im grünen Kanal. In Abb. 5.13 sind die gemessenen und angepassten Autokorrelationskurven im grünen und roten Kanal dargestellt. Durch das Übersprechen erhält man auch im roten Kanal eine Autokorrelationskurve, was zu einer Kreuzkorrelationsamplitude von etwa 80 % führt. Die Anregungsvolumina waren etwa gleich groß, da nur mit einer Wellenlänge angeregt wurde.

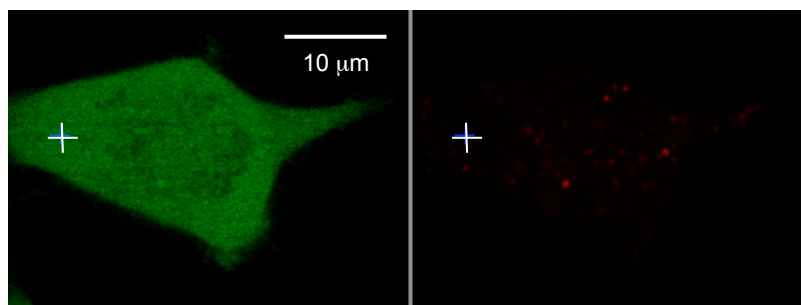


Abbildung 5.12 EGFP-Zelle. Man sieht nur im grünen Kanal (links) Fluoreszenz, da das Übersprechen in den roten Kanal (rechts) nur 10 % beträgt.

Die schnelle Komponente zeigte in allen Zellen eine Diffusionszeit von $\tau_D = 0.51 \text{ ms} \pm 0.07 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (2.4 \pm 0.3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Die Diffusionszeit der zweiten Komponente variierte dagegen zwischen 50 ms und 300 ms in Abhängigkeit von der Behinderung des Proteins innerhalb der Zelle. Der Anteil der zweiten Komponente lag bei etwa $10 \% \pm 5 \%$ bezogen auf die Gesamtkonzentration aller Spezies (siehe Kap. 4.3.4). Diese Komponente ist bei allen autofluoreszierenden Proteinen in Zellen zu beobachten.

Die Konzentration von EGFP variierte je nach Zelle zwischen 0.8 μM und 4.1 μM .

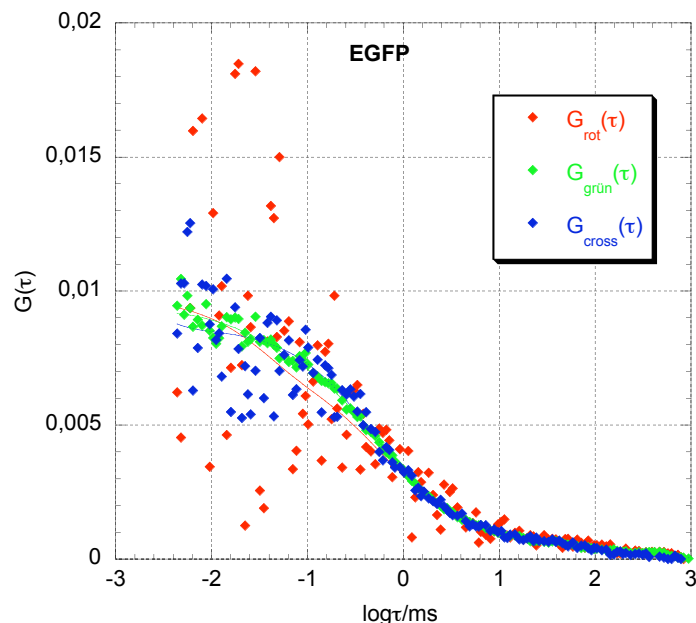


Abbildung 5.13 FCCS-Messung in EGFP-Zellen. Die beiden Autokorrelationskurven im grünen (grün) und roten Kanal (rot) und die Kreuzkorrelationskurve (blau) besitzen gleiche Amplituden. Die Rauten stellen die gemessenen Autokorrelationskurven dar, die durchgezogene Linie kennzeichnet die angepassten Kurven.

5.5.2 Freies RFP in HeLa

Als FCCS-Partner für EGFP wurden verschiedene rot-fluoreszierende Proteine (RFPs) getestet, um ihre Eignung für die FCCS-Messungen zu bewerten.

DsRed2 (*Discosoma striata* Red2), mRFP1 (monomeric Red Fluorescent Protein 1) und eqFP611 (*Entacmaea quadricolor* Fluorescent Protein 611) wurden über einen eukaryontischen Expressionsvektor in HeLa-Zellen transient bei 37 °C exprimiert und diese Zellen nach 24 Stunden durch FCCS gemessen. DsRed2- und mRFP1-Zellen zeigten 24 Stunden nach der Transfektion eine starke, rote Fluoreszenz. Zellen, die mit dem Vektor pSV-eqFP611 transfiziert worden waren, zeigten dagegen nur vereinzelt und dann auch nur eine sehr schwache Fluoreszenz. Expressionsversuche in Bakterien ergaben für eqFP611 eine optimale Expressionstemperatur von 30 °C (Dross 2004). Bei einer Temperatur von 37 °C wird das Protein nur sehr langsam exprimiert und gefaltet. Deshalb wurden für diese Messungen HeLa-Zellen bei einer Temperatur von 37 °C angelegt bis sie sub-konfluent gewachsen waren, dann mit dem

Expressionsvektor für eqFP611 transfiziert und über Nacht bei 30 °C inkubiert, so dass sich das Protein falten konnte.

Die Abb. 5.14 zeigt die Fluoreszenz dieser Zellen im roten und im grünen Kanal. Die Hauptfluoreszenz ist bei allen Zellen im roten Kanal zu sehen. Im grünen Kanal ist dagegen nur bei DsRed2 (Abb. 5.14 a) eine sehr schwache Fluoreszenz zu beobachten. Die Ursache hierfür kann eine unreife Form von DsRed2 sein, welche ein dem GFP ähnliches Spektrum aufweist (siehe Kap 3.4).

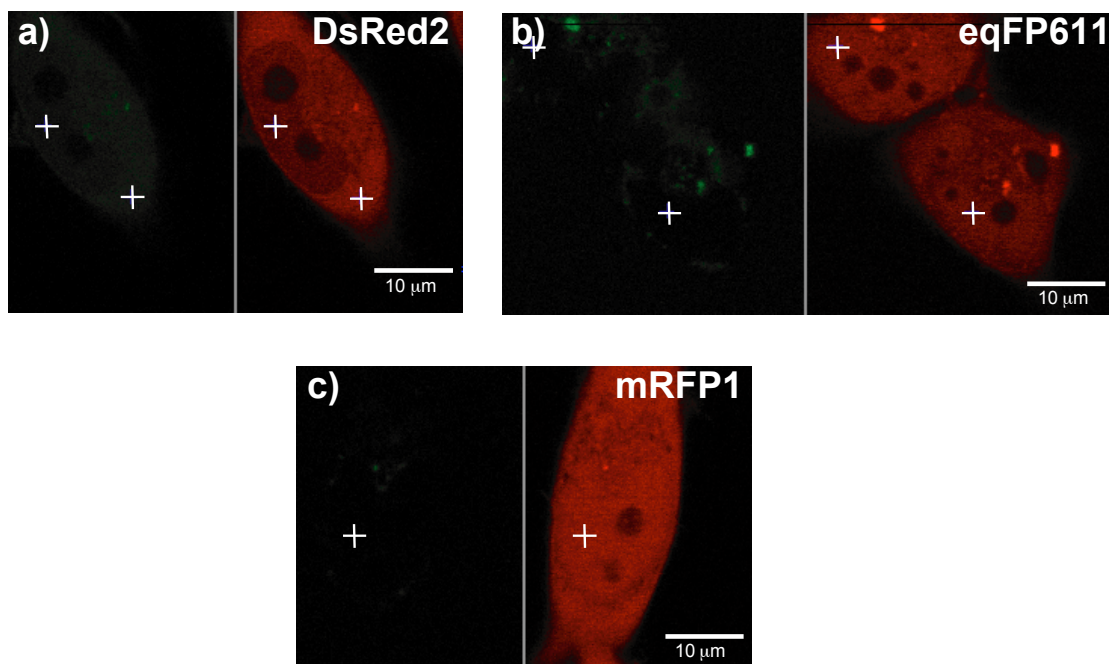


Abbildung 5.14 a) DsRed2-Zellen, b) eqFP611-Zellen und c) mRFP1-Zellen. Die Hauptfluoreszenz ist im roten Kanal zu sehen.

In Abb. 5.15 sind die Auto- und Kreuzkorrelationskurven von DsRed2- (a), eqFP611- (b) und mRFP1-Zellen (c) dargestellt. FCCS-Messungen in DsRed2-Zellen liefern auch im grünen Kanal eine Autokorrelationskurve, die jedoch nicht mit dem roten Kanal korreliert, was an der kleinen Kreuzkorrelationsamplitude erkennbar ist. Ein Übersprechen vom roten in den grünen Kanal kann daher als Ursache ausgeschlossen werden. In der Literatur ist bekannt, dass der Reifungsprozess rot-fluoreszierender Proteine ein zweistufiger Prozess ist, welcher über eine grün-fluoreszierende Zwischenstufe läuft. Diese Zwischenstufe zeigt ein dem EGFP ähnliches Spektrum (Gross et al. 2000; Wiedenmann et al. 2002). Da die Messung schon 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte, scheint ein großer Teil von DsRed2 noch nicht vollständig gereift zu sein, was die Autokorrelationskurve im grünen Kanal

erklärt. Bei eqFP611 war der Anteil dieser Zwischenstufe nach 24 Stunden so gering (ca. 1%), dass man nur eine sehr verrauschte Autokorrelationskurve im grünen Kanal beobachtet, die bei der gewählten Skala nicht aufgetragen werden konnte. Eine solche Zwischenstufe, welche allerdings nicht fluoresziert, ist auch bei mRFP1 bekannt (Campbell et al. 2002). Außerdem reift mRFP1 so schnell, dass 24 Stunden nach der Transfektion nur noch ein geringer Anteil dieser Zwischenstufe verbleibt.

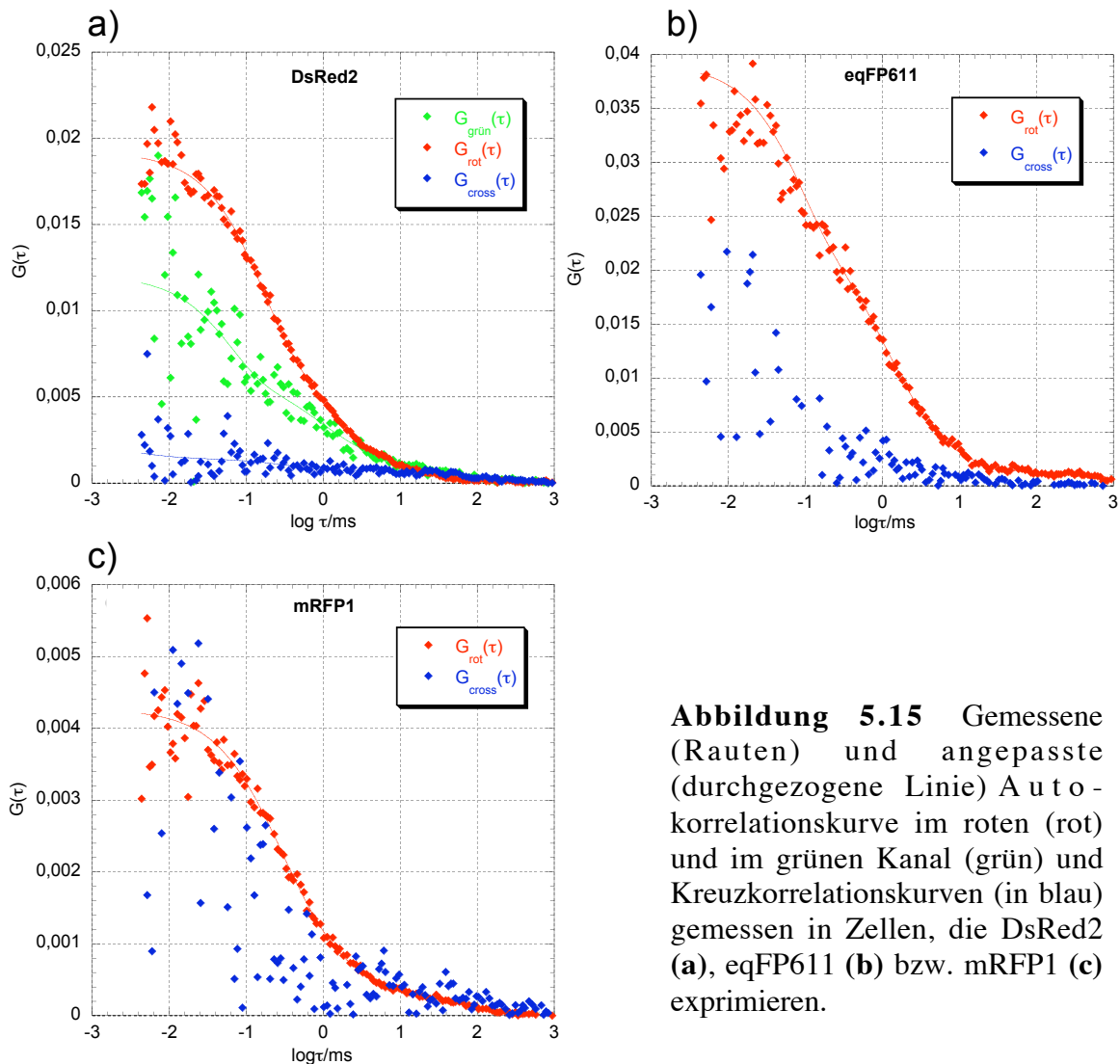


Abbildung 5.15 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurve im roten (rot) und im grünen Kanal (grün) und Kreuzkorrelationskurven (in blau) gemessen in Zellen, die DsRed2 (a), eqFP611 (b) bzw. mRFP1 (c) exprimieren.

Durch Anpassung der Modellfunktion in Gl. 4.11 bzw. 4.17 an die Auto- und Kreuzkorrelationskurven erhielt man für die schnelle Komponente eine Diffusionszeit von $0.24 \text{ ms} \pm 0.09 \text{ ms}$ für DsRed2, von $0.99 \text{ ms} \pm 0.23 \text{ ms}$ für eqFP611 und von $0.35 \text{ ms} \pm 0.05 \text{ ms}$ für mRFP1. FCS-Messungen im Zytoplasma und im Kern lieferten

dieselben Ergebnisse. Diese Diffusionszeiten stehen im Einklang mit den *in vitro* Messungen der isolierten Proteine unter der Annahme, dass in Zellen eine 2-3mal so hohe Viskosität wie in wässriger Lösung vorliegt. Der Anteil der langsamen Komponente betrug bei allen Zellen etwa $13\% \pm 5\%$ bezogen auf die Gesamtkonzentration aller Spezies.

FCS-Messungen von DsRed2 im Zytoplasma von Zellen ergaben eine bis zu doppelt so große molekulare Helligkeit wie Messungen im Kern (Tab. 5.4). Die molekulare Helligkeit ϕ ist hier als Fluoreszenzintensität pro Teilchen definiert. Dieses Phänomen lässt sich folgendermaßen erklären: DsRed zeigt eine starke Tendenz, Dimere und Tetramere zu bilden. Die Tetramere sind jedoch im Gegensatz zu Dimeren zu groß, um durch reine Diffusion in den Kern zu gelangen. Folglich sind im Kern vorwiegend nur Dimere oder Monomere vorhanden. Dies ist auch der Grund für die unterschiedlichen molekularen Helligkeiten im Zytoplasma und im Kern. Tetramere, Dimere und Monomere lassen sich allerdings kaum durch ihre Diffusionszeit unterscheiden. EqFP611- und mRFP1-Zellen zeigten dieses Phänomen nicht. Die molekularen Helligkeiten im Kern und Zytoplasma sind hier identisch (Tab 5.4).

RFP	Diffusionszeit τ_D (ms)	Diffusionskoeffizient D ($10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$)	Molekulare Helligkeit ϕ_{CP}/ϕ_{Kern}	Form	c (nM)
DsRed2	0.24 ± 0.09	5.5 ± 2.1	2.20 ± 1.21	Tetramer	130 - 330
eqFP611	0.99 ± 0.23	1.3 ± 0.3	1.38 ± 0.17	Monomer	140 - 450
mRFP1	0.35 ± 0.05	3.8 ± 0.5	1.28 ± 0.21	Monomer	930 - 1950

Tabelle 5.4 Eigenschaften der verschiedenen RFPs.

Zur Übersicht sind in Abb. 5.16 noch einmal alle Autokorrelationskurven der RFPs dargestellt.

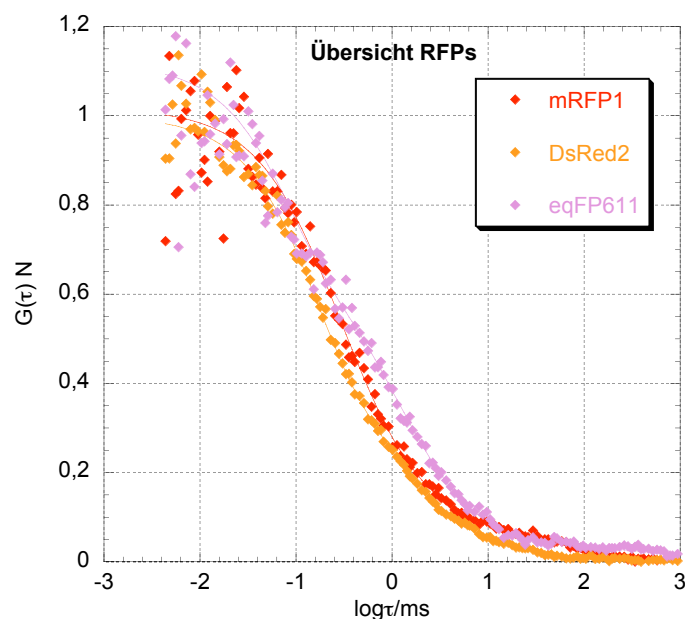


Abbildung 5.16 Übersicht der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurven im roten Kanal von DsRed2, eqFP611 und mRFP1.

5.5.3 *In vivo* Kontrollen für FCCS

Nachdem das FCCS-Gerät mit einem doppelt-markierten DNA-Fragment *in vitro* kalibriert worden war, wurde es *in vivo* mit den autofluoreszierenden Proteinen geeicht. Dazu wurden als Positivkontrolle für die Kreuzkorrelation Fusionsproteine aus EGFP mit jeweils einem der roten Proteine konstruiert. Durch die Kopplung war eine Kreuzkorrelation von 100 % zu erwarten. Für die Negativkontrolle, also für den Fall, dass keine Wechselwirkungen zwischen den Proteinen auftreten, wurde ein Vektor konstruiert, der die beiden Proteine in gleichen Mengen, aber getrennt exprimiert. Dies ist mit einem IRES-Vektor von *Clontech* möglich. Der IRES-Vektor ist ein *bicistronischer* Vektor, der eine Messenger-RNA (mRNA) mit der genetischen Information beider Proteine produziert, aber zwei getrennte Proteine translatiert.

FCCS-Negativkontrolle: Getrennte rote und grüne Proteine in Zellen

Der pIRES-EGFP-RFP-Vektor mit dem jeweiligen roten Protein (RFP) wurde in HeLa-Zellen semi-stabil exprimiert, d.h. der Vektor wurde transfiziert und die Zellen mit Hilfe von Antibiotika selektiert, aber keine einzelnen Klone ausgewählt. In Abb. 5.17 ist die Fluoreszenz im grünen und im roten Kanal dargestellt.

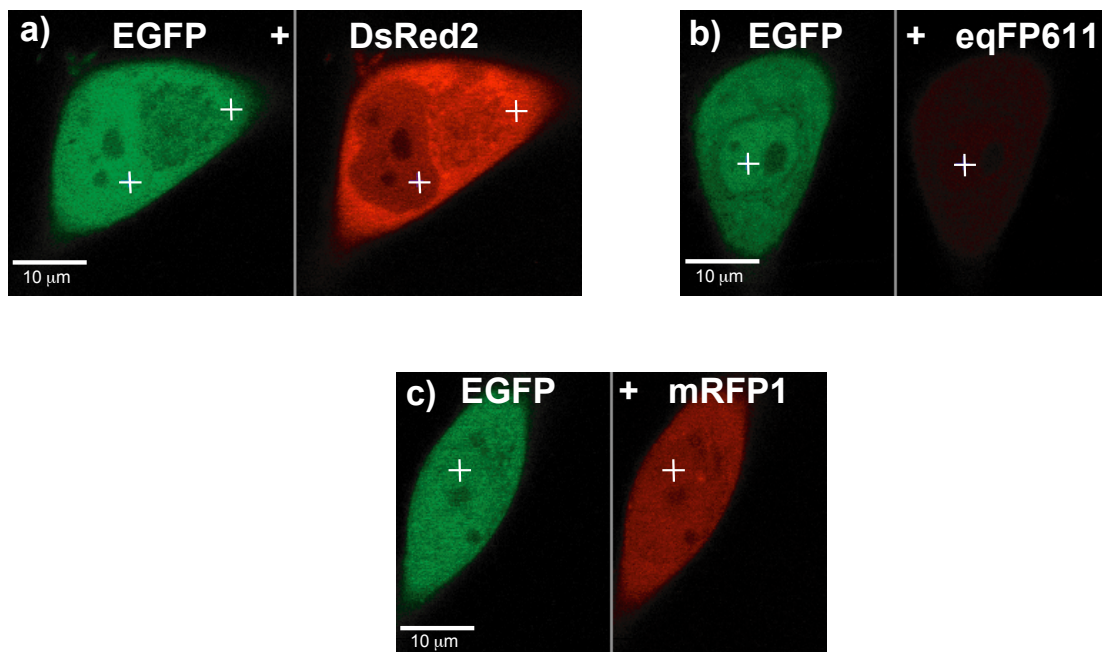


Abbildung 5.17 Fluoreszenzbilder von Zellen, die **a)** EGFP und DsRed2, **b)** EGFP und eqFP611 und **c)** EGFP und eqFP611 simultan, aber getrennt exprimieren.

Die Abb. 5.17 a zeigt, dass im roten Kanal der Kern von Zellen, die EGFP und DsRed2 exprimieren, dunkler als das Zytoplasma ist. Die molekulare Helligkeit im roten Kanal ist im Zytoplasma teilweise doppelt so groß wie im Kern ($\phi_{CP}/\phi_{Kern} = 1.65 \pm 0.63$), im grünen Kanal sind die molekularen Helligkeiten dagegen vergleichbar ($\phi_{CP}/\phi_{Kern} = 1.11 \pm 0.11$). Zellen, die EGFP und eqFP611 exprimieren, zeigen im Vergleich zum grünen Kanal eine sehr schwache Fluoreszenz im roten Kanal, da eqFP611 kaum exprimiert bzw. gefaltet wird (Abb. 5.17 b). Die Konzentration von EGFP war zehnmal größer als die von eqFP611 (siehe Tab. 5.5). Dies war bei allen Zellen zu beobachten, so dass in diesen Zellen keine auswertbaren FCCS-Messungen durchgeführt werden konnten, da vergleichbare Mengen an Protein in beiden Kanälen benötigt werden. Zellen, die EGFP und mRFP1 exprimieren, zeigen eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz innerhalb der Zelle. Die

molekularen Helligkeiten im Zytoplasma und Kern sind auch hier fast identisch (grüner Kanal: $\phi_{CP}/\phi_{Kern} = 1.13 \pm 0.06$; roter Kanal: $\phi_{CP}/\phi_{Kern} = 1.17 \pm 0.28$), da mRFP1 nicht oligomerisiert.

Die Abb. 5.18 zeigt die Auto- und Kreuzkorrelationskurven, die in diesen Zellen mit Hilfe von FCCS aufgenommen wurden. Für EGFP und DsRed2 erhielt man im grünen Kanal eine Diffusionszeit von $0.44 \text{ ms} \pm 0.13 \text{ ms}$ ($D = (2.8 \pm 0.8) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) und im roten Kanal von $0.47 \text{ ms} \pm 0.14 \text{ ms}$ ($D = (2.8 \pm 0.8) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), was in guter Übereinstimmung mit den vorherigen Messungen der Proteine ist (siehe Kap 5.5.1 und 5.5.2). Die Kreuzkorrelationsamplitude beträgt hier nur $13 \% \pm 4 \%$ (Abb. 5.18 a). Daraus lässt sich schließen, dass EGFP und DsRed2 nicht miteinander in Wechselwirkung treten.

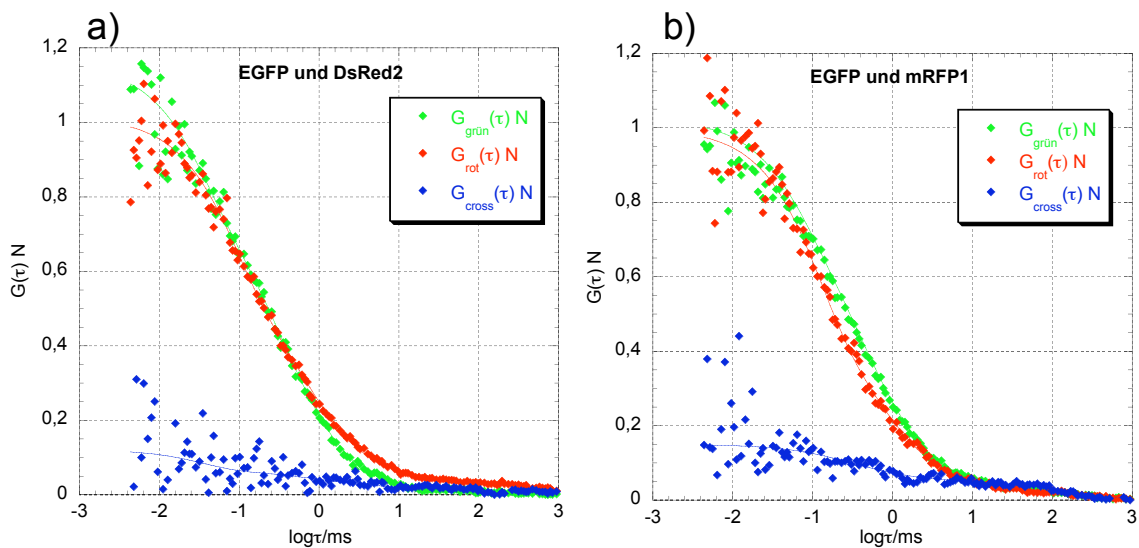


Abbildung 5.18 Negativkontrolle für FCCS: Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven von Zellen, die EGFP und DsRed2 (a) bzw. EGFP und mRFP1 (b) exprimieren. Die Kreuzkorrelationsamplituden liegen bei $13 \% \pm 3 \%$.

Zellen, die mRFP1 statt DsRed2 exprimieren, zeigten im grünen Kanal eine Diffusionszeit von $0.49 \text{ ms} \pm 0.09 \text{ ms}$ ($D = (2.5 \pm 0.4) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) und im roten von $0.42 \text{ ms} \pm 0.12 \text{ ms}$ ($D = (3.1 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), ähnlich den Ergebnissen der Messungen der einzelnen Proteine. Die Kreuzkorrelationsamplitude beträgt auch hier nur $13 \% \pm 3 \%$ (Abb. 5.18 b). Diese Amplitude kann folglich gut als Referenzwert für eine fehlende Wechselwirkung genommen werden. Des Weiteren zeigen diese

Messungen, dass sobald genügend „wahre“ (helle) rot-fluoreszierende Fluorophore vorhanden sind, das Übersprechen vom grünen in den roten Kanal vermindert wird (siehe Kap. 4.3.6) und eine minimale Amplitude von 13 % bleibt. Im Gegensatz dazu zeigten die Messungen von EGFP-Zellen durch das Übersprechen des grünen in den roten Kanal eine signifikante Kreuzkorrelationsamplitude (80 %).

Zur Übersicht sind in Tab. 5.5 die Diffusionszeiten, die Konzentrationen und die Verhältnisse der molekularen Helligkeiten von Zytoplasma zu Kern im roten und grünen Kanal aufgelistet.

AFPs	τ_D (ms) grüner Kanal	τ_D (ms) roter Kanal	ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} grüner Kanal	ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} roter Kanal	c (nM) grüner Kanal	c (nM) roter Kanal
EGFP + DsRed2	0.44 ± 0.13	0.47 ± 0.14	1.11 ± 0.11	1.65 ± 0.63	290 - 970	180 - 890
EGFP + mRFP1	0.49 ± 0.09	0.42 ± 0.12	1.13 ± 0.06	1.17 ± 0.28	300 - 850	460 - 1130
EGFP + FP611	-	-	-	-	2500	300

Tabelle 5.5 Diffusionszeiten τ_D , Konzentrationen c und Verhältnis der molekularen Helligkeiten von Zytoplasma zu Kern ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} im roten und grünen Kanal von Zellen, die EGFP und DsRed2 bzw. EGFP und mRFP1 oder EGFP und eqFP611 exprimieren.

FCES-Positivkontrolle: Gekoppelte rot-grüne Proteine in Zellen

Als Positivkontrolle für eine „ideale Kreuzkorrelation“ wurde ein Fusionsprotein aus EGFP mit jeweils einem der drei roten Proteine in HeLa-Zellen exprimiert und die Zellen mittels FCES gemessen. In Abb. 5.19 sind die Fluoreszenzbilder der jeweiligen Zellen zu sehen.

Die Abb. 5.19 a zeigt eine ungleichmäßige Verteilung von EGFP und DsRed2 in den Zellen. Die Kerne sind dunkler als das Zytoplasma, und zwar in beiden Kanälen, was auf eine Kolokalisation von EGFP und DsRed2 hindeutet. Ein Grund hierfür kann, wie oben schon erwähnt, die Größe des Fusionsproteins sein (wahrscheinlich bilden sich größere Komplexe wie Tetramere und Oktamere über das DsRed2), aufgrund derer die Proteine nicht mehr die Kernmembran passieren können. Diese Annahme wird durch den Vergleich der molekularen Helligkeiten von Kern und Zytoplasma belegt. Man beobachtet einen Unterschied bis zu einem Faktor drei sowohl im grünen als auch im roten Kanal. Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-eqFP611 bzw. EGFP-

mRFP1 exprimieren, zeigen indessen eine gleichmäßige Fluoreszenz in beiden Kanälen (Abb. 5.19 b + c), auch ihre molekularen Helligkeiten im Zytoplasma und Kern sind vergleichbar (siehe Tab. 5.6).

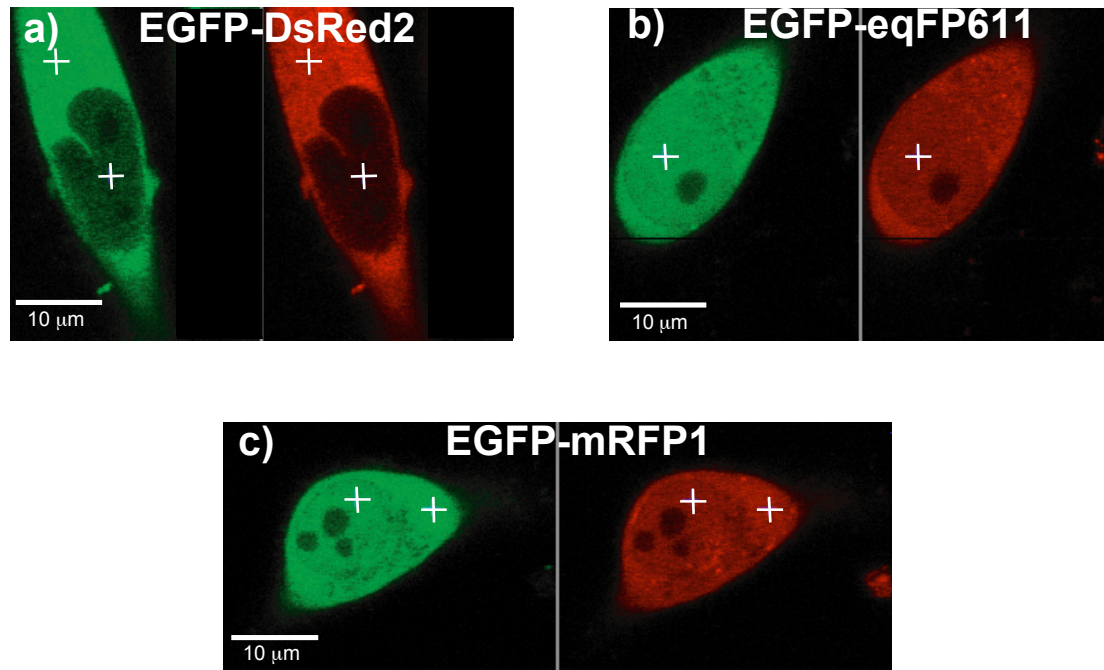


Abbildung 5.19 HeLa-Zellen, die ein Fusionsprotein aus a) EGFP und DsRed2, b) EGFP und eqFP611 und c) EGFP und mRFP1 exprimieren.

Es wurden nur Zellen in die Auswertung aufgenommen, die gleiche Amplituden im roten und grünen Kanal aufweisen. Die Autokorrelationskurven wurden auf eins normiert. Zellen, die das Fusionsprotein EGFP-mRFP1 exprimieren, zeigten meist eine etwas höhere Konzentration von EGFP als von mRFP1 (siehe Tab. 5.6), da mRFP1 vermutlich schneller als EGFP photolytisiert wird. Für das Fusionsprotein EGFP-DsRed2 erhielt man eine Diffusionszeit von $1.23 \text{ ms} \pm 0.42 \text{ ms}$ ($D = (1.0 \pm 0.3) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) in beiden Kanälen, für EGFP-eqFP611 ergab sich eine Zeit von $1.18 \text{ ms} \pm 0.51 \text{ ms}$ ($D = (1.0 \pm 0.4) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) und EGFP-mRFP1 lieferte eine Diffusionszeit von $0.66 \text{ ms} \pm 0.25 \text{ ms}$ ($D = (1.9 \pm 0.7) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$). Diese im Vergleich zu den nicht-gekoppelten Proteinen längeren Diffusionszeiten lassen sich wegen $\tau_{\text{diff}} \propto M^{1/3}$ (siehe Kap. 4, S. 48) nicht durch das größere Molekulargewicht des Fusionsproteins erklären, wohl aber durch eine mögliche veränderte Tertiärstruktur verglichen mit den einzelnen Proteinen. Die Ursache für diese längere Diffusionszeit könnte aber auch eine Behinderung der Proteine in der Zelle sein, die sich bei größeren Proteinen überproportional stark auswirkt.

EGFP-DsRed2 zeigt eine Kreuzkorrelationsamplitude von $51 \% \pm 13 \%$, EGFP-eqFP611 von $44 \% \pm 9 \%$ und EGFP-mRFP1 von $45 \% \pm 4 \%$ (Abb. 5.20). Diese Amplituden befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den *in vitro* FCCS-Messungen des doppelt-markierten DNA-Fragments (Kap. 5.3). Fazit: Die maximale Kreuzkorrelationsamplitude für ein 100 %-Fusionsprotein beträgt auch *in vivo* $44 \% - 51 \%$. Dieser Wert wurde als Referenzwert für eine 100 %ige Wechselwirkung angenommen. Aufgrund unterschiedlicher Anregungs- und Detektionsvolumina (siehe Kap. 4.3.6) erreicht dieser Wert nie 100 %, wie auch schon die *in vitro* Kontrolle zeigte. Diese besaß eine Kreuzkorrelationsamplitude von 46 %, obwohl ein 100 % doppelt-markierte Probe vorlag.

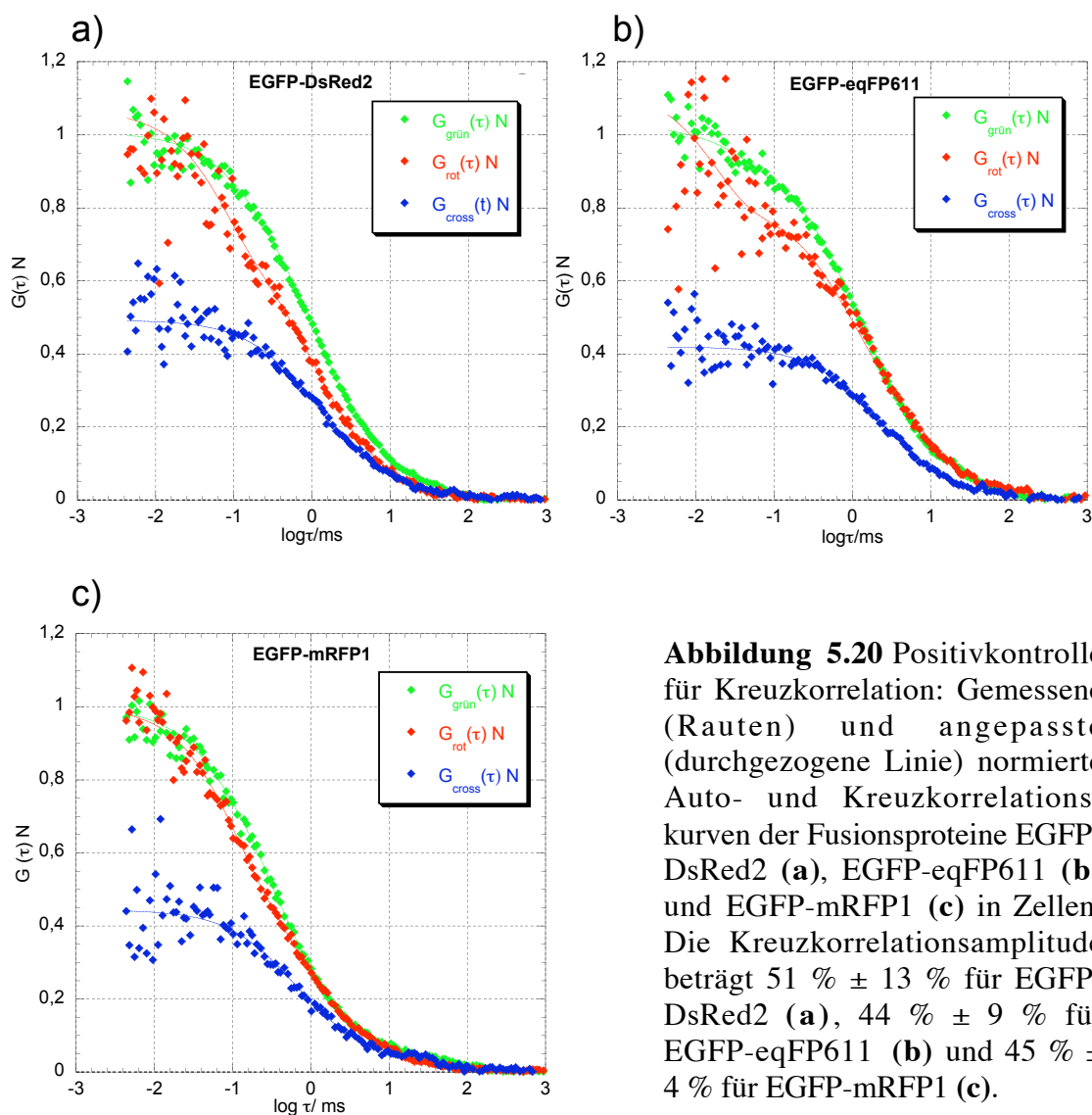


Abbildung 5.20 Positivkontrolle für Kreuzkorrelation: Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Auto- und Kreuzkorrelationskurven der Fusionsproteine EGFP-DsRed2 (a), EGFP-eqFP611 (b) und EGFP-mRFP1 (c) in Zellen. Die Kreuzkorrelationsamplitude beträgt $51 \% \pm 13 \%$ für EGFP-DsRed2 (a), $44 \% \pm 9 \%$ für EGFP-eqFP611 (b) und $45 \% \pm 4 \%$ für EGFP-mRFP1 (c).

Abb. 5.20 zeigt deutlich, dass die Kreuzkorrelationskurven im Gegensatz zu den Autokorrelationskurven keinen Tripletanteil erkennen lassen, da die Tripletprozesse des roten und grünen Proteins nicht miteinander korrelieren. Dies ist ein zusätzlicher Beweis dafür, dass die Kanäle nicht übersprechen (siehe Kapitel 4.3.6).

AFPs	τ_D (ms)	D (10^{-11} m^2/s)	$G_{cross}(\tau)$ N (%)	ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} grüner Kanal	ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} roter Kanal	c (nM) grüner Kanal	c (nM) roter Kanal
EGFP-DsRed2	1.23 ± 0.39	1.0 ± 0.3	51 ± 13	2.88 ± 0.80	2.99 ± 1.20	100 - 640	100 - 410
EGFP-eqFP611	1.18 ± 0.51	1.0 ± 0.4	45 ± 4	1.10 ± 0.07	1.45 ± 0.16	75 - 350	75 - 260
EGFP-mRFP1	0.66 ± 0.25	1.9 ± 0.7	44 ± 9	1.14 ± 0.11	1.25 ± 0.15	250 - 920	170 - 450

Tabelle 5.6 Diffusionszeiten τ_D , Diffusionskoeffizient D , normierte Kreuzkorrelationsamplituden $G_{cross}(\tau)$ N , Konzentrationen c und Verhältnis der molekularen Helligkeiten von Zytoplasma zu Kern ϕ_{CP}/ϕ_{Kern} im roten und grünen Kanal von Zellen, welche das Fusionsprotein EGFP-DsRed2 bzw. EGFP-mRFP1 oder EGFP-eqFP611 exprimieren.

5.5.4 Deletionsmutanten von AP-1

AP-1 kann seine Funktion, also die Aktivierung der Transkription, nur als Dimer ausüben (Allegretto et al. 1990; Angel et al. 1991; Karin et al. 1997). Ob jedoch erst das Dimer entsteht und dann die Bindung an die DNA erfolgt oder ob die Dimerisierung an der DNA stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Einerseits beweisen *in vitro* Untersuchungen, dass sich das Dimer in Abwesenheit von DNA bildet (Rauscher et al. 1988; Abate et al. 1990). Andererseits zeigten Kohler et al. 2001, dass durch DNA-Zugabe, die Dimerisierungsrate von AP-1 erhöht wird (Kohler et al. 2001).

Um die Bedeutung und Funktion der Dimerisierungsdomäne zu untersuchen, wurden Deletionsmutanten hergestellt, denen die Dimerisierungsdomäne (ΔDim) fehlte, in Zellen exprimiert und in der Ein-Farben-FCS gemessen. Ferner wurde eine Negativkontrolle konstruiert, bei der weder eine DNA-Bindung noch eine Wechselwirkung unter den Proteinen vorlag. Dazu wurde im c-Fos und c-Jun zusätzlich die DNA-Bindungsdomäne entfernt (ΔDNA). Zellen, die sowohl c-Fos $\Delta Dim\Delta DNA$ -EGFP als auch c-Jun $\Delta Dim\Delta DNA$ -mRFP1 exprimierten, dienten dann für die Zwei-Farben-FCCS als Negativkontrolle für das AP-1-System (im

weiteren Verlauf der Arbeit werden diese Mutanten zur Vereinfachung nur noch mit Δ oder $\Delta\Delta$ gekennzeichnet).

Keine Dimerisierung und keine DNA-Bindung: c-Fos Δ Dim Δ DNA-EGFP

Durch Deletion der Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne im c-Fos-Gen mittels PCR erhielt man den Vektor pSV-c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP, welcher in HeLa-Zellen stabil exprimiert wurde.

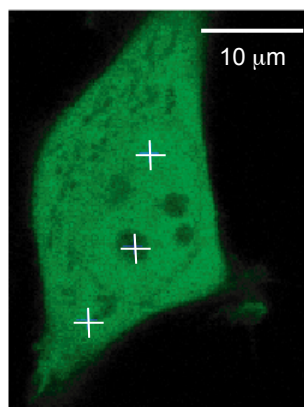


Abbildung 5.21 c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP in HeLa.

Abb. 5.21 zeigt eine Zelle, die c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP exprimiert, im Fluoreszenzlicht. Das Protein ist gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt, da der Teil der Gensequenz, der die Kernlokalisierungssequenz enthält (AS 139-160), entfernt wurde. Das Protein gelangt aufgrund seiner geringen Größe dennoch durch Diffusion vom Zytoplasma in den Kern.

FCS-Messungen in diesen Zellen ergaben eine mittlere Diffusionszeit des Proteins von $0.79 \text{ ms} \pm 0.28 \text{ ms}$ ($D = (1.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$), sowohl im Kern als auch im Zytoplasma. Die zweite, langsamere Komponente besitzt einen Amplitudenanteil von nur $8 \% \pm 6 \%$ (Abb. 5.22). Daraus lässt sich schließen, dass das Protein sich analog zu freiem EGFP verhält und nicht an DNA oder andere zellulären Komponenten bindet. Für alle weiteren Anpassungen der Modellfunktion (Gl. 4.11 bzw. 4.17) an die Autokorrelationskurven von c-Fos konnte die schnelle Komponente auf den Wert von 0.79 ms fixiert werden. Die Konzentration von c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP in den gemessenen Zellen variierte zwischen $0.8 \mu\text{M}$ und $3.3 \mu\text{M}$.

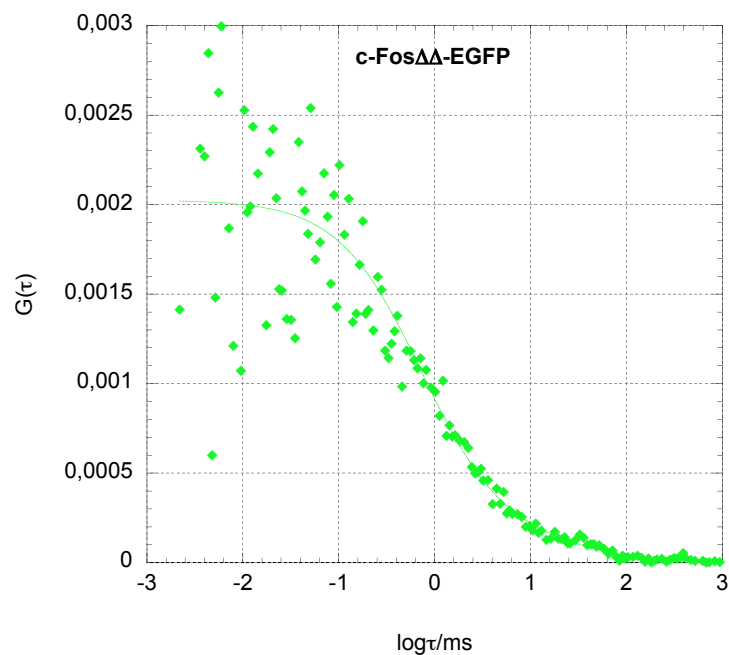


Abbildung 5.22 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurve von $c\text{-Fos}\Delta\Delta\text{-EGFP}$ im grünen Kanal. Die Diffusionszeit beträgt $0,79 \text{ ms} \pm 0,28 \text{ ms}$.

Keine Dimerisierung: $c\text{-Fos}\Delta\text{Dim-EGFP}$

Um die Bedeutung und Funktion der Dimerisierungsdomäne *in vivo* besser verstehen zu können, wurde diese Domäne mit Hilfe einer PCR im $c\text{-Fos}$ -Gen deletiert. Der konstruierte Vektor $p\text{SV-}c\text{-Fos}\Delta\text{-EGFP}$ wurde dann in HeLa-Zellen exprimiert. Der größte Teil des Proteins ist im Kern lokalisiert, da die NLS hier erhalten geblieben ist (Abb. 5.23).

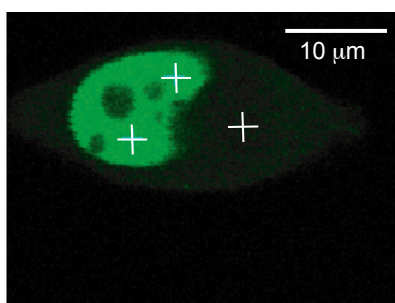


Abbildung 5.23 $c\text{-Fos}\Delta\text{Dim-EGFP}$ -Zellen.

Durch Anpassung der analytischen Funktion (Gl. 4.11 bzw. 4.17) an die gemessenen Autokorrelationskurven erhält man sowohl im Kern als auch im Zytoplasma zwei Komponenten, deren relative Anteile sich jedoch deutlich unterscheiden. In

Abb. 5.24 a sind die nicht normierten Autokorrelationskurven der FCS-Messungen im Kern und im Zytoplasma abgebildet: Im Zellkern ist etwa 2-4mal soviel c-Fos Δ als im Zytoplasma vorhanden. Die Konzentrationen von c-Fos Δ -EGFP variierten im Zytoplasma zwischen 65 nM und 420 nM und im Kern zwischen 170 nM und 1600 nM. Im Kern erhielt man nach Fixierung der Diffusionszeit der schnellen Hauptkomponente auf einen Wert von $0.79 \text{ ms} \pm 0.28 \text{ ms}$ für die langsame Komponente eine Diffusionszeit von $12 \text{ ms} \pm 7 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten von $D = (0.10 \pm 0.06) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, bei einem relativen Anteil von $38 \% \pm 15 \%$. Dieses Ergebnis deutet auf eine Immobilisierung von c-Fos trotz Entfernung der Dimerisierungsdomäne hin. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Bindung von c-Fos an DNA oder zelluläre Komponenten oder an Transkriptionsfaktoren, z.B. GATA oder FHL2 sein (McBride et al. 2003; Morlon et al. 2003). In letzterem Fall ist keine bZip-Domäne erforderlich. Der Anteil der langsamen Komponente im Zytoplasma beträgt dagegen nur $22 \% \pm 10 \%$.

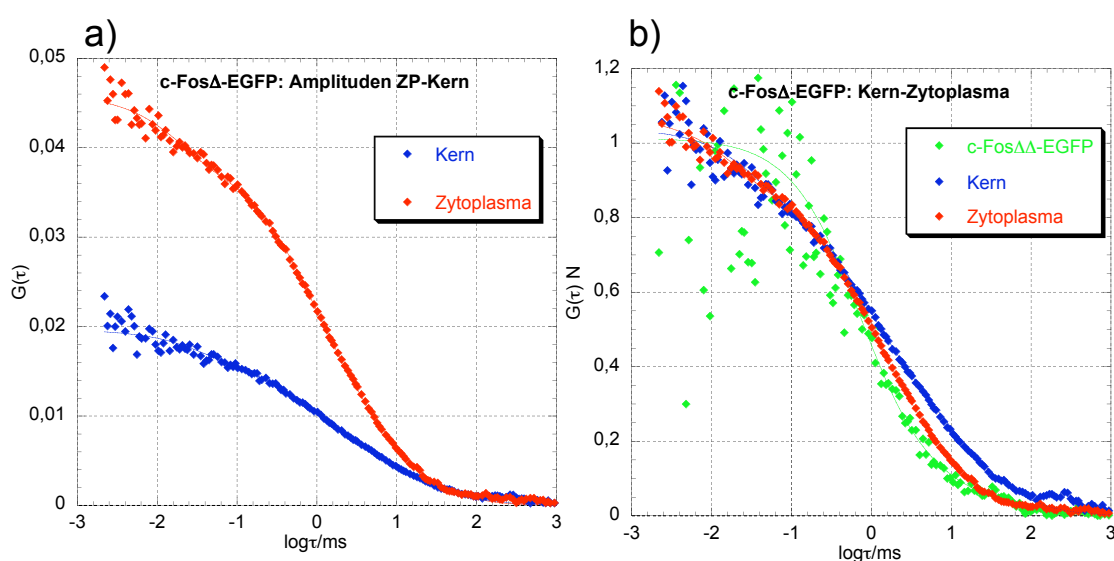


Abbildung 5.24 a) Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Autokorrelationsamplituden von c-Fos Δ -EGFP im Kern (blau) und Zytoplasma (rot). b) Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im Kern und Zytoplasma von c-Fos Δ -EGFP-Zellen und c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP-Zellen (grün).

Dimerisierung und DNA-Bindung: c-Fos-EGFP (ECFP)

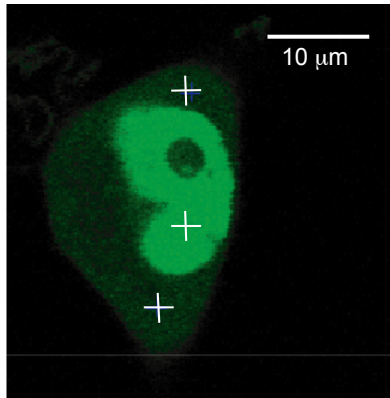


Abbildung 5.25 c-Fos-EGFP in HeLa-Zellen.

Wurde das vollständige, intakte c-Fos-EGFP-Protein in HeLa-Zellen exprimiert und diese Zellen mittels FCS gemessen, so erhielt man nach Auswertung der Autokorrelationskurven im Zytoplasma für die langsame Komponente einen relativen Anteil von $23 \% \pm 7 \%$ und eine Diffusionszeit von $8 \text{ ms} \pm 1 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (0.16 \pm 0.019) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Die Diffusionszeit der ersten Komponente wurde auf 0.79 ms fixiert. Im Kern dagegen beträgt der Anteil der langsamen Komponente $41 \% \pm 11 \%$, dessen Diffusionszeit von $19 \text{ ms} \pm 7 \text{ ms}$ ($D = (0.065 \pm 0.023) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) mehr als doppelt so lang ist als die im Zytoplasma ist. Dies ist ein Indiz für eine Bindung des Protein an DNA (Abb. 5.26 b).

Die nicht normierten Autokorrelationskurven (Abb. 5.26 a) zeigen im Kern eine etwa dreifach höhere Konzentration des Proteins c-Fos-EGFP als im Zytoplasma. Die Konzentrationen von c-Fos-EGFP variierten im Kern zwischen 150 nM und 950 nM und im Zytoplasma zwischen 35 nM und 350 nM (wobei die Konzentrationen im Kern der c-Fos-EGFP-Zellen meist höher waren, da ein Teil des c-Fos-EGFP während der Messung photolytisiert wurde).

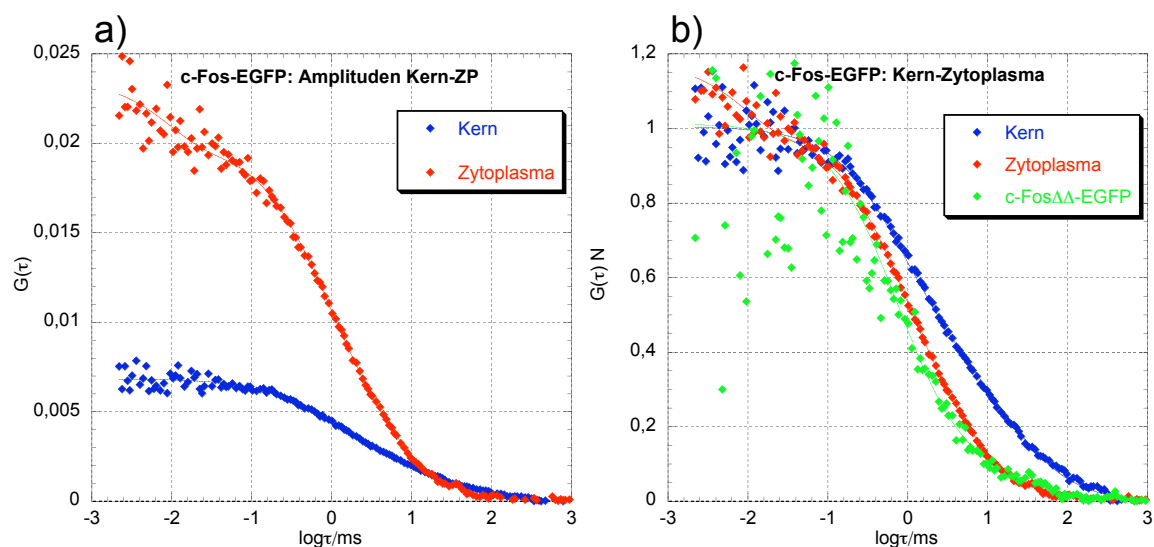


Abbildung 5.26 a) Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Autokorrelationsamplituden von c-Fos-EGFP im Zellkern (blau) und Zytoplasma (rot). **b)** Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) normierten Autokorrelationskurven von Kern und Zytoplasma von c-Fos-EGFP-Zellen mit c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP-Zellen (grün).

Ursprünglich sollte das Konstrukt c-Fos-ECFP anstelle des Fusionsproteins c-Fos-EGFP eingesetzt werden, da das Chromophorpaar ECFP-EYFP für die Kreuzkorrelation verwendet werden sollte. Dazu wurde eine stabile Zelllinie mit c-Fos-ECFP etabliert und diese in der Ein-Farben-FCS gemessen. Das Fluoreszenzbild (Abb. 5.27 a) zeigt eine ähnliche Gestalt wie das von c-Fos-EGFP. Nach einer FCS-Messung von 30 Sekunden war die Zelle jedoch fast vollständig photolytiert (Abb. 5.27 b).

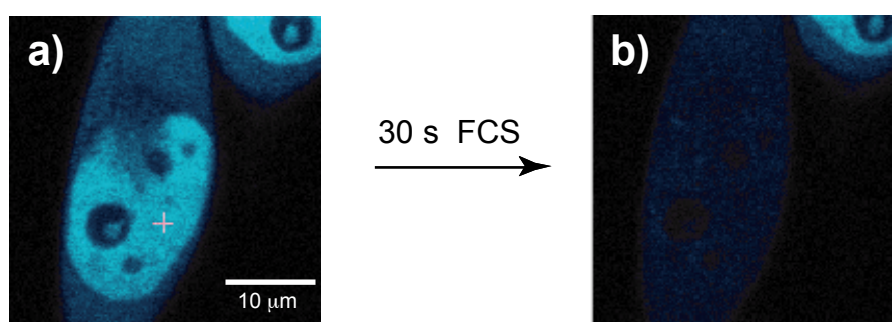


Abbildung 5.27 a) Fluoreszenzbild im grünen Kanal von Fos-ECFP-Zellen. Die Zelle wurde zum besseren Verständnis mit *Photoshop* blau angefärbt, da die Bilder im grünen Kanal automatisch auch in grün vom Programm ausgegeben wurden. **b)** Fluoreszenzbild der Zelle nach einer FCS-Messung von 30 Sekunden.

FCS-Messungen in diesen Zellen ergaben Autokorrelationskurven, die zu verrauscht waren, um eine exakte Auswertung zu ermöglichen. Die Autokorrelationsamplituden zeigen einen sehr hohen Tripletanteil (Abb. 5.28). Des Weiteren waren die Fos-ECFP-Zellen nach 30 Sekunden fast vollständig photolysiert. Um zu sehen, ob die Ursache für die Photolyse die Immobilisierung von c-Fos ist oder das Chromophor ECFP an sich, wurden Zellen gemessen, die ECFP exprimieren. Diese Messungen führten zu vergleichbaren Ergebnissen. Auch hier erhielt man nur sehr verrauschte Kurven mit sehr hohen Tripletanteilen (Abb. 5.28 b).

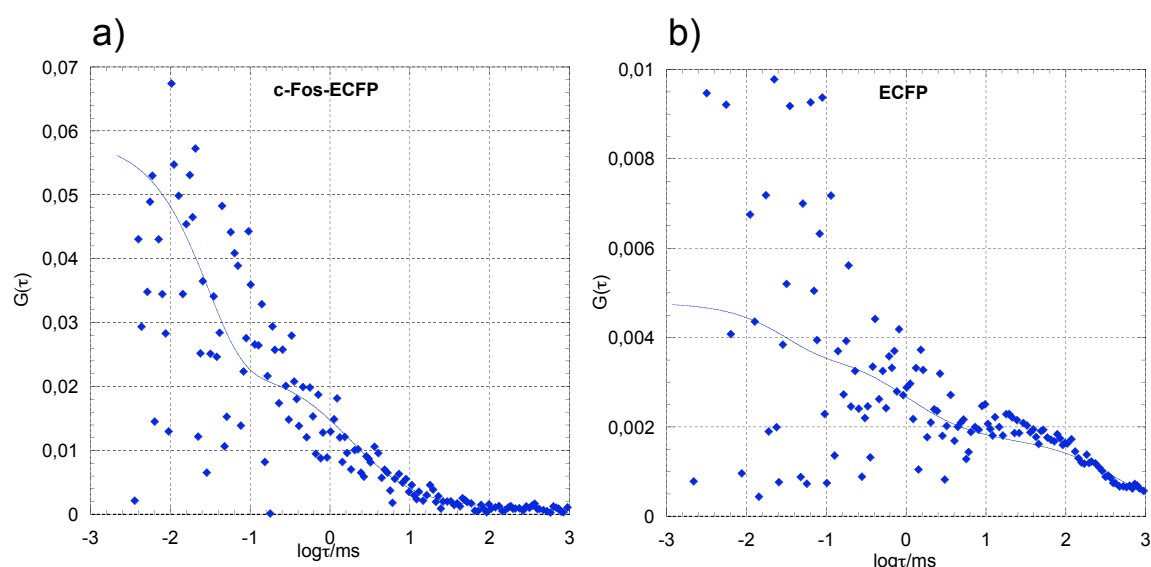


Abbildung 5.28 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurve von Fos-ECFP-Zellen (a) bzw. ECFP-Zellen (b). Dabei wurde die Tripletzeit auf einen Wert von 0.03 ms fixiert (Weidemann 2002).

Um das Ausmaß der Photolyse zu bewerten, wurde folgende Abschätzung gemacht: aus der Amplitude errechnet man etwa 200 ECFP-Moleküle im Fokus. Im gesamten Zellkern liegen demnach ungefähr 60000 Moleküle vor (unter der Annahme, dass der Zellkern einen Durchmesser von etwa 5 μm besitzt). Nach 30 Sekunden waren alle 60000 ECFP-Moleküle photolysiert (Abb. 5.27). Demnach wird ein ECFP-Molekül etwa in 0.5 Millisekunden photolysiert. Dies ist ungefähr die Zeit, die das Protein benötigt, um durch den Fokus zu diffundieren. Gebundenes Fos-ECFP braucht noch länger. Die Proteine werden also photolysiert, während sie durch den Fokus diffundieren, so dass man aus den Autokorrelationskurven keine Information über die Diffusionszeit der Proteine gewinnen kann.

Keine Dimerisierung und DNA-Bindung: c-Jun Δ Dim Δ DNA-EYFP/mRFP1

Beim Dimerisierungspartner von c-Fos, dem AP-1-Protein c-Jun, wurde die DNA- und Dimerisierungsdomäne ebenfalls entfernt. Die Fluoreszenz im grünen Kanal ist gleichmäßig über den ganzen Kern verteilt, da die NLS von c-Jun fehlt (Abb. 5.29).

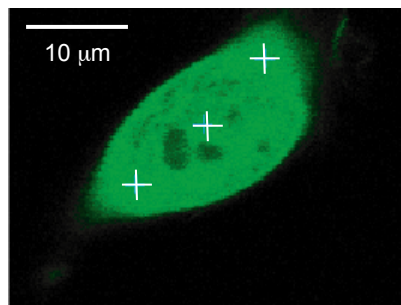


Abbildung 5.29 c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP in HeLa.

Ein-Farben-FCS-Messungen ergaben hier für die schnelle Komponente sowohl im Kern als auch im Zytoplasma eine Diffusionszeit von $0.72 \text{ ms} \pm 0.26 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (1.7 \pm 0.6) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnissen für c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP überein. Der Anteil der zweiten Komponente betrug $12 \% \pm 9 \%$ der Gesamtkonzentration an c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP. Die Konzentration von c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP variierte in den Zellen zwischen $0.1 \text{ } \mu\text{M}$ und $1.1 \text{ } \mu\text{M}$. Bei Entfernung der DNA- und Dimerisierungsdomäne verhalten sich sowohl c-Fos als auch c-Jun wie freie, nicht wechselwirkende Proteine.

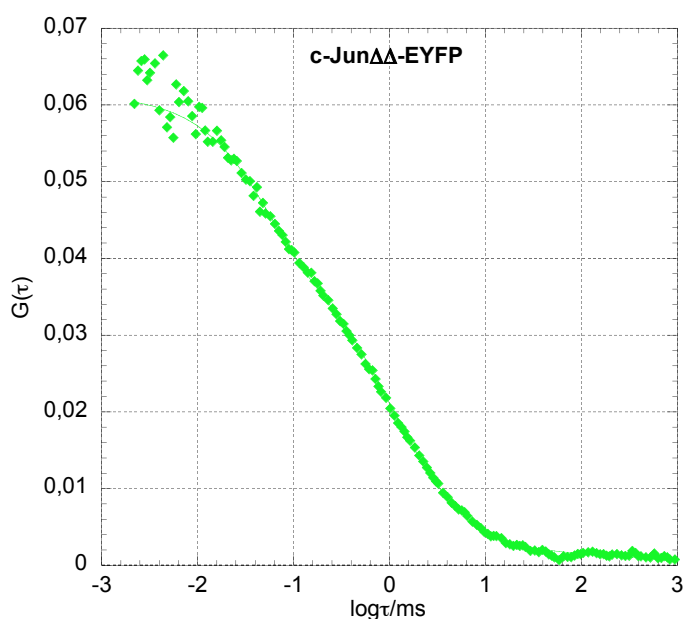


Abbildung 5.30 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) Autokorrelationskurve der AP-1 Deletionsmutante c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP im grünen Kanal.

Dimerisierung und DNA-Bindung: c-Jun-EYFP/mRFP1

Zunächst wurde EYFP an c-Jun fusioniert, da das Chromophorpaar ECFP-EYFP benutzt werden sollte. Später wurde dann zum EGFP-RFP-Paar gewechselt. Dazu wurden verschiedene Fusionsproteine aus c-Jun mit einem der RFPs konstruiert.

Die Abb. 5.31 zeigt die Fluoreszenz im grünen Kanal. Das intakte c-Jun-EYFP ist im Kern lokalisiert. Im Zytoplasma ist nur eine sehr schwache Fluoreszenz zu sehen (Abb. 5.31 b).

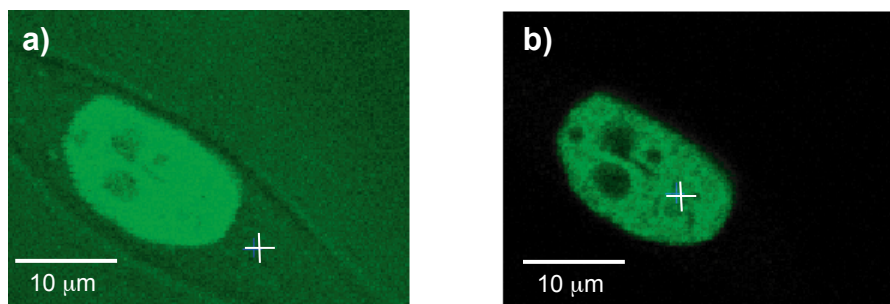


Abbildung 5.31 Durchlicht- (a) und Fluoreszenzaufnahme (b) von c-Jun-EYFP-Zellen.

Zum gleichen Ergebnis gelangt man bei Betrachtung der Amplituden der Autokorrelationskurven im Kern und im Zytoplasma: im Kern ist ungefähr zehnmal so viel c-Jun als im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 5.32 a). Die Konzentrationen von c-Jun-EYFP variierten im Zytoplasma zwischen 20 nM und 85 nM und im Kern zwischen 170 nM und 690 nM (die Konzentration von c-Jun-EYFP war im Kern eher noch höher, da während der FCS-Messung ein Teil des c-Jun-EYFP photolysiert wurde). Der Grund für diese hohen c-Jun-Konzentrationen im Kern ist das starke Kernsignal von c-Jun (Chida et al. 1999).

FCS-Messungen im Zytoplasma von c-Jun-EYFP-Zellen ergaben nach Anpassung der Gl. 4.11 bzw. 4.17 an die Autokorrelationsfunktion eine schnelle Hauptkomponente mit einer Diffusionszeit von $0.67 \text{ ms} \pm 0.22 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (1.8 \pm 0.6) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Dieser ist fast identisch mit dem Diffusionskoeffizienten der Deletionsmutante c-Jun $\Delta\Delta$ (siehe Abb. 5.32 b). Die langsam diffundierende Komponente mit einem relativen Amplitudenanteil von $14 \% \pm 6 \%$ diffundierte mit einer Diffusionszeit von $11 \text{ ms} \pm 4 \text{ ms}$ durch den Fokus. Zur Auswertung der Autokorrelationskurven im Kern wurde die schnelle Komponente auf den oben erhaltenen Wert von 0.67 ms fixiert. Man erhielt daraufhin

für die langsame Komponente eine Diffusionszeit von $16 \text{ ms} \pm 5 \text{ ms}$ und einen Diffusionskoeffizienten $D = (0.08 \pm 0.02) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Amplitudenanteil von $67 \% \pm 8 \%$ (Abb. 5.32 b). Dies deutet auf eine starke Immobilisierung von c-Jun hin.

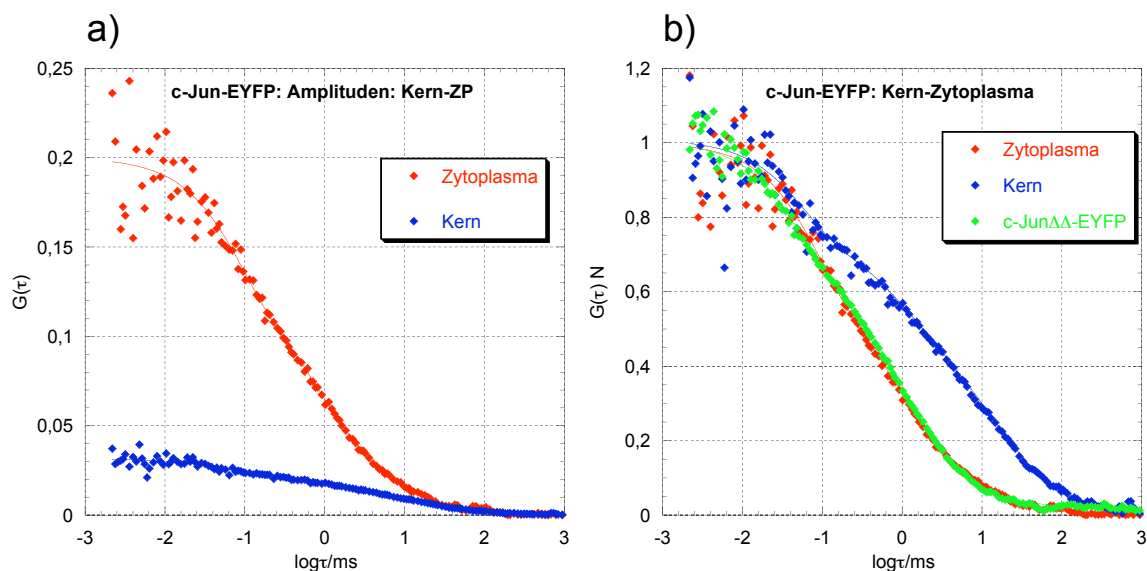


Abbildung 5.32 a) Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Autokorrelationsamplituden von c-Jun-EYFP im Kern und Zytoplasma. b) Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im Kern und Zytoplasma von c-Jun-EYFP-Zellen und Autokorrelationskurve der Deletionsmutante c-Jun $\Delta\Delta$ -EYFP.

Das Fusionsprotein aus c-Jun und DsRed2 konnte aufgrund der Zytotoxizität von DsRed nicht in Zellen exprimiert werden. Die Zellen starben nach der Transfektion. Das Konstrukt aus c-Jun und eqFP611 konnte zwar exprimiert werden, zeigte aber nur eine sehr schwache Fluoreszenz, wahrscheinlich aufgrund seiner unvollständigen Faltung. Kreuzkorrelationsmessungen führten hier zu keinem Ergebnis (siehe Kap. 5.4). FCS-Messungen von c-Jun-mRFP1-Zellen führten jedoch zu ähnlichen Ergebnissen wie die c-Jun-EYFP-Messungen. Die langsame Hauptkomponente besaß hier einem relativen Anteil von $65 \% \pm 12 \%$ und einen Diffusionskoeffizienten von $D = (0.03 \pm 0.01) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Der Unterschied der Diffusionskoeffizienten von c-Jun-EYFP und c-Jun-mRFP1 befindet sich im Rahmen des Messfehlers. Außerdem handelt es sich hier um eine transiente Transfektion, bei der das Protein zunächst überexprimiert wird im Vergleich zu den Zellen mit stabil integrierten c-Jun-EYFP. Dies kann sich auf die Mobilität und das Bindungsverhalten der Proteine auswirken.

Dimerisierung und DNA-Bindung: Fra1-EYFP

Eine weitere Komponente des Transkriptionsfaktors AP-1 ist das Protein Fra1 (Fos related antigene 1). Aus der Literatur ist bekannt, dass Fra1 eine negative Autoregulation bezüglich der Transkriptionsaktivierung zeigt (Cohen et al. 1988; Cohen et al. 1989). Auch diese AP-1 Komponente wurde mittels Ein-Farben-FCS gemessen werden, um seine Mobilität und seine DNA-Bindung *in vivo* zu charakterisieren.

Die Abb. 5.33 zeigt eine Fluoreszenzlichtaufnahme von Fra1, welches analog zu c-Fos und c-Jun ebenfalls im Kern lokalisiert ist.

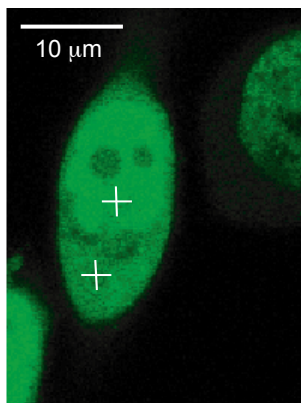


Abbildung 5.33 Fra1-EYFP-Zellen.

Die Amplituden ergeben eine 1.5-fache Konzentration an Fra1 im Kern im Vergleich zum Zytoplasma (Abb. 5.34 a). Die Konzentration von Fra1-EYFP variierte im Kern zwischen 90 nM und 370 nM und im Zytoplasma zwischen 100 nM und 300 nM. In Abb. 5.34 b wurden die Autokorrelationskurven im Kern und im Zytoplasma normiert. Die Diffusionszeiten im Zytoplasma und Kern waren vergleichbar, im Zytoplasma ergab sich eine Diffusionszeit von $0.48 \text{ ms} \pm 0.23 \text{ ms}$, entsprechend $D = (2.6 \pm 1.2) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, und im Kern $0.53 \text{ ms} \pm 0.21 \text{ ms}$, entsprechend $D = (2.3 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Die langsame Komponente hat sowohl im Zytoplasma als auch im Kern einen Amplitudenanteil von nur $13 \% \pm 7 \%$. Fra1 ist also nur sehr schwach immobilisiert. Ein Grund hierfür könnte eine schwache DNA-Bindung von Fra1 sein. In der Literatur wurde gezeigt, dass Fra1 eine negative Wirkung durch sein schwaches Transaktivierungspotential auf die Transkription von AP-1 regulierten Genen aufweist.

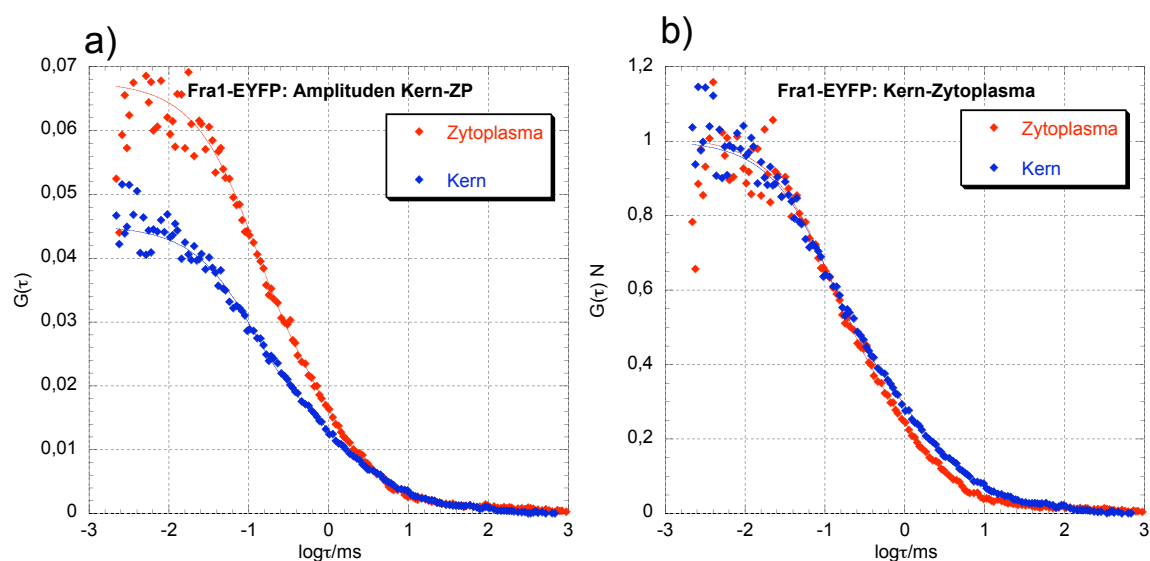


Abbildung 5.34 a) Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Autokorrelationsamplituden von Fra1-EYFP im Kern und im Zytoplasma der Zellen. Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im grünen Kanal gemessen im Zytoplasma und im Kern von Fra1-EYFP-Zellen.

5.6 Messung der Zellzyklusphasen

Eine Zelle vermehrt sich durch eine geordnete Kette von Ereignissen, während derer sie zunächst ihren Inhalt verdoppelt und sich dann teilt. Der Zellzyklus besteht aus den aufeinander folgenden Phasen (Alberts et al. 2004):

- 1.) Synthese-Phase: Die Zelle verdoppelt vor ihrer Teilung ihren DNA-Gehalt. Die Synthese-Phase (S-Phase) dauert etwa 10-12 Stunden und macht etwa die Hälfte der Dauer des Zellzyklus aus.
- 2.) G2-Phase: Lücke (Englisch: gap) zwischen der S-Phase und der Mitose
- 3.) Mitose: Teilung der Zelle in zwei Tochter-Zellen. Die Mitose dauert bei Säugetierzellen nur etwa eine Stunde.
- 4.) G1-Phase: Lücke zwischen der Mitose und der S-Phase

G1-, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet. Ein Zellzyklus bei Säugetierzellen dauert zwischen 18 und 24 Stunden.

Die Tab. 5.1 (Kap. 5.2, S. 56) zeigt, dass sich unsynchronisierte Zellen nicht alle in der gleichen Zellzyklusphase befinden. Die Mehrheit aller Zellen weilt in der G1- bzw. S-Phase (zusammen 90 %) und etwa 10 % der Zellen befinden sich in der G2-Phase oder Mitose. Um sicher zu sein, dass man nicht apoptotische Zellen, sondern

Zellen in der G1-, G2-, S-Phase oder Mitose misst, wurden Zellen mit Hilfe von Chemikalien in den entsprechenden Zellzyklusphasen inhibiert. In der Literatur sind Inhibitoren für die unterschiedlichen Phase bekannt (Urbani et al. 1995). c-Jun-EYFP-Zellen wurden in der G1/S-Phase geblockt bzw. in die Apoptose geleitet, repräsentativ für alle Zelllinien, da wie aus Tab. 5.1 hervorgeht, alle Zelllinien die gleiche Progression im Zellzyklus aufweisen.

5.6.1 G1/S-Phase

Um die Zellen in der G1/S-Phase zu inhibieren, wurde Aphidicolin bei einer Konzentration von 2.5 µg/ml eingesetzt. Aphidicolin verhindert die DNA-Kettenverlängerung durch Inhibierung der DNA-Polymerase α . Dieses wurde 4 Stunden nach Synchronisation der Zellen zugegeben und die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Danach erfolgten die Ein-Farben-FCS-Messungen. Das Fluoreszenzbild (Abb. 5.35) zeigt keine abweichende Form im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

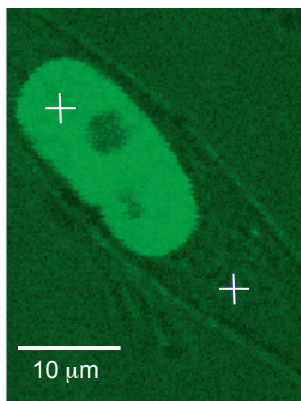


Abbildung 5.35 c-Jun-EYFP-Zellen, die in der G1/S-Phase inhibiert wurden.

Nach Anpassung einer nicht-fluoreszierenden und zwei fluoreszierender, diffusiver Komponenten an die Autokorrelationskurve im grünen Kanal, erhielt man für die langsame Komponente eine Diffusionszeit von $20 \text{ ms} \pm 8 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (0.06 \pm 0.02) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, bei einem relativen Amplitudenanteil von $64 \% \pm 8 \%$ (die Diffusionszeit der ersten Komponente wurde auf einen Wert von 0.72 ms fixiert). Dieses Ergebnis stimmt gut mit den Werten der unsynchronisierten Zellen überein, die eine Diffusionszeit von $16 \text{ ms} \pm 5 \text{ ms}$ und einen Anteil von $67 \% \pm 8 \%$ für die langsame Komponente zeigten (Abb. 5.36).

Die Konzentrationen von c-Jun-EYFP in den mit Aphidicolin behandelten Zellen waren mit denen von unbehandelten Zellen vergleichbar. Die Konzentrationen im Kern bewegten sich zwischen 190 nM und 660 nM.

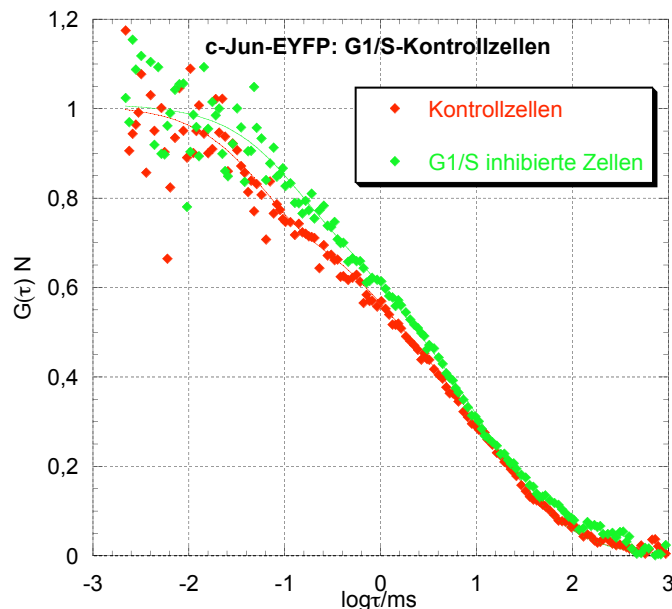


Abbildung 5.36 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im grünen Kanal von unsynchronisierten Zellen (rot) und von in G1/S-Phase inhibierten Zellen (grün).

5.6.2 Apoptose

Um die Zellen in die Apoptose zu führen, wurde Natriumbutyrat in einer Konzentration von $c = 6$ mM zu den Zellen gegeben. Natriumbutyrat ist dafür bekannt, dass es die Apoptose durch Hemmung der Histondeacetylase (HDAC) einleitet (Janson et al. 1997; Medina et al. 1997). Die Zellen wurden 24 Stunden nach Zugabe von Natriumbutyrat gemessen. Zellen, die mit Natriumbutyrat behandelt worden waren, erschienen heller als die Kontrollzellen. Außerdem hatte sich ihre äußere Erscheinung sehr stark verändert, wie die Abb. 5.37 verdeutlicht. Der Zellkern fluoresziert nicht mehr einheitlich, da er unter Bildung apoptotischer Körperchen auseinander gebrochen ist.

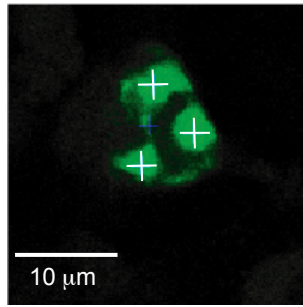


Abbildung 5.37 c-Jun-EYFP-Zellen während der Apoptose (apoptotische Körper)

Ein-Farben-FCS-Messungen in diesen Zellen zeigen deutliche Unterschiede zu den Kontrollzellen: die Autokorrelationskurve weist eine völlig andere Form als die gewohnten Autokorrelationskurven auf (Abb. 5.38). Es liegt ein sehr inhomogenes System mit mehreren langsamen Komponenten vor. Bei Anpassung der Funktion aus Gl. 4.11 bzw. 4.17 an die Autokorrelationskurve erhielt man für die langsame Komponente eine Diffusionszeit von $207 \text{ ms} \pm 79 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (0.006 \pm 0.002) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, mit einem relativen Amplitudenanteil von $73 \% \pm 14 \%$ (Abb. 5.38). In Wirklichkeit hat man hier jedoch eine breite Verteilung der Diffusionszeiten. Auch die Konzentrationen von c-Jun-EYFP waren in den mit Natriumbutyrat behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen deutlich erhöht. Die Konzentrationen bewegten sich zwischen $1.6 \mu\text{M}$ und $6 \mu\text{M}$.

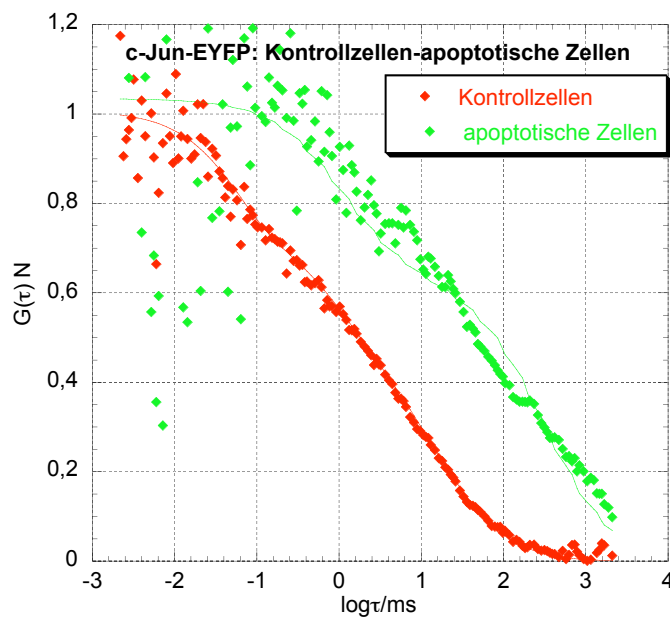


Abbildung 5.38 Vergleich der gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) normierten Autokorrelationskurve im grünen Kanal von unbehandelten c-Jun-EYFP-Kontrollzellen (rot) und Zellen, die zuvor mit Natriumbutyrat versetzt worden waren (grün).

5.7 Zwei-Hybrid-FCCS im AP-1-System

Nach der Kalibrierung des FCCS-Aufbaus und der Messung der Kontrollen konnten die FCCS-Messungen in Zellen mit markierten c-Jun und c-Fos durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Proteine miteinander in Wechselwirkung treten. Dazu wurden stabile c-Fos-EGFP-Zellen über Nacht in einer Messkammer angelegt und am nächsten Tag mit dem Vektor pSV-c-Jun-mRFP1 transfiziert. Die Messung wurde dann am folgenden Tag durchgeführt. Ebenso wurde mit der Negativkontrolle für das AP-1-System verfahren. Stabile c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP-Zellen wurden angelegt, die dann mit dem Vektor pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1 transfiziert wurden.

Die Western-Blots von AP-1 zeigten, dass die markierten Fos- und Jun- Proteine etwa im gleichen molaren Verhältnis in der Zelle vorliegen wie die endogenen, nicht markierten Proteine (siehe Kap. 5.2). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für FCCS-Messungen, da nur Fos-Jun-Dimere, bei denen sowohl c-Fos als auch c-Jun markiert sind, zur Kreuzkorrelation beitragen.

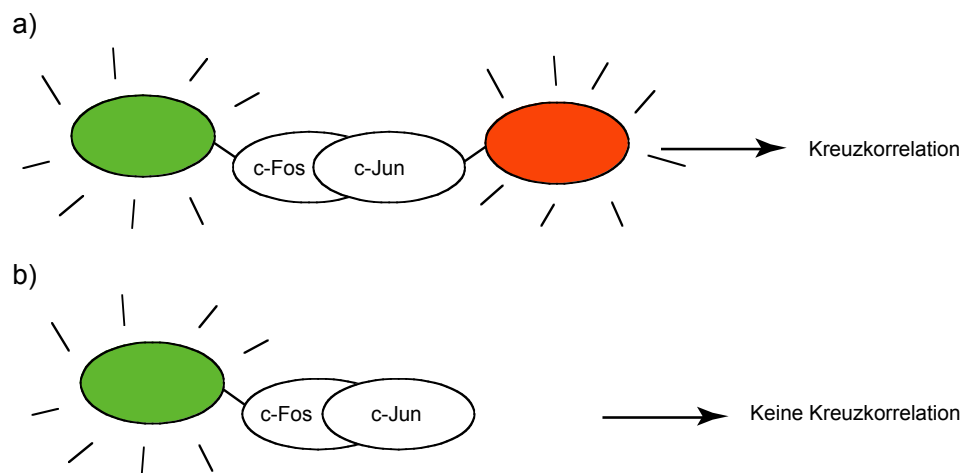


Abbildung 5.39 a) Fos-Jun-Dimere, bei denen beide Proteine markiert sind, tragen zur Kreuzkorrelation bei. b) Dimere mit nur einem markierten Protein liefern keinen Beitrag zur Kreuzkorrelation.

Unter der Annahme, dass endogene und markierte Proteine äquimolar vorliegen, sollte die Kreuzkorrelationsamplitude aus statistischen Gründen 25 % betragen, falls alle Proteine als Dimere vorliegen.

5.7.1 Keine Wechselwirkung im AP-1-System: c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP und c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1

Zellen, die c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP und c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1 exprimieren, dienen als Negativkontrolle für die Zwei-Farben-FCCS im AP-1-System. In diesem System treten die Proteine nicht miteinander in Wechselwirkung. Das Fluoreszenzbild (Abb. 5.40) zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Fluoreszenz in den Zellen im grünen und im roten Kanal, da beide Deletionsmutanten keine NLS mehr besitzen.

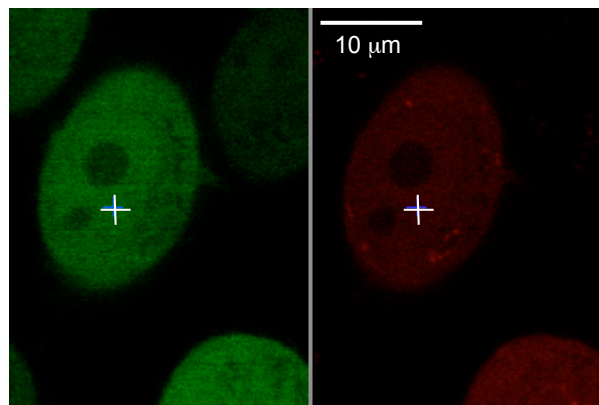


Abbildung 5.40 Zellen, welche die Deletionsmutanten c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1 und c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP exprimieren.

Aus den Autokorrelationskurven in Abb. 5.41 lässt sich im grünen Kanal eine Diffusionszeit von $0.55 \text{ ms} \pm 0.17 \text{ ms}$, entsprechend $D = (2.3 \pm 0.7) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, für c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP und im roten Kanal eine Diffusionszeit von $0.39 \text{ ms} \pm 0.11 \text{ ms}$, entsprechend $D = (3.4 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, für c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1 ermitteln. Diese Diffusionszeiten bzw. -koeffizienten liegen in der Größenordnung der Diffusionszeiten bzw. -koeffizienten von freien XFPs in Zellen. Die Diffusionszeiten im Kern und im Zytoplasma sind identisch. Die Kreuzkorrelationsamplitude beträgt hier $18 \% \pm 4 \%$. Diese ist im Rahmen des Messfehlers mit der Negativkontrolle, den getrennt exprimierten EGFP und mRFP1, vergleichbar. Die Deletionsproteine zeigten also keine Wechselwirkung.

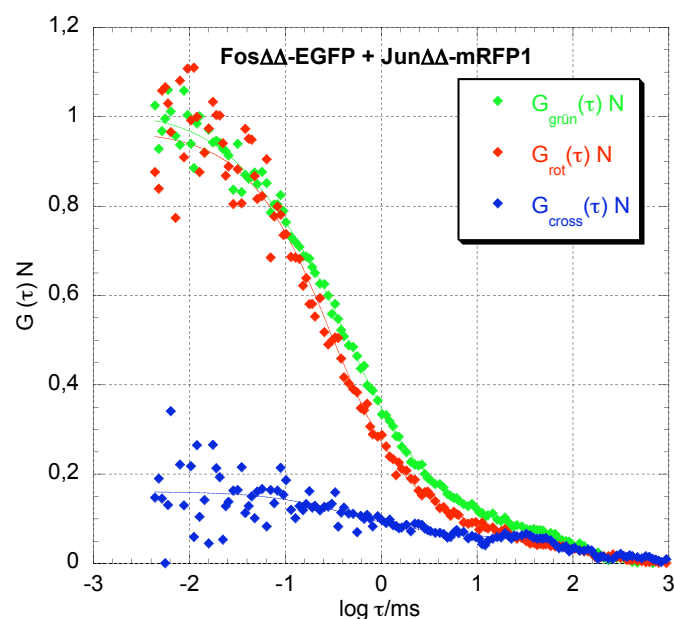


Abbildung 5.41 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im roten und grünen Kanal und Kreuzkorrelationskurve (blau), gemessen in Zellen, welche die Deletionsmutanten von c-Fos und c-Jun exprimieren. Die Kreuzkorrelationsamplitude beträgt $18\% \pm 4\%$.

5.7.2 Protein-Protein- und Protein-DNA-Wechselwirkungen im AP-1-System: c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 in HeLa

Die Abb. 5.42 zeigt die Fluoreszenz im roten und grünen Kanal für HeLa-Zellen, die mit c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 transfiziert worden waren. Beide Proteine sind im Kern lokalisiert, da sowohl c-Fos als auch c-Jun eine NLS besitzen.

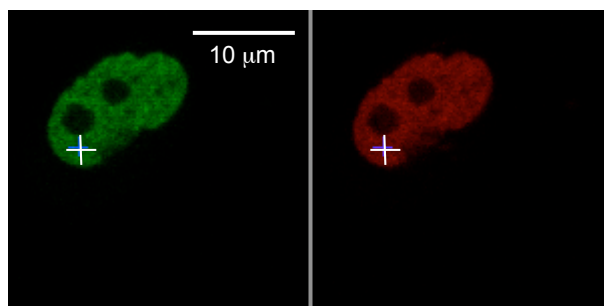


Abbildung 5.42 c-Fos-EGFP-Zellen, die mit c-Jun-mRFP1 transfiziert wurden.

In Abb. 5.43 sind die normierten Auto- und Kreuzkorrelationskurven der FCCS-Messungen im Kern dieser Zellen abgebildet. Durch Anpassung der Modellfunktion (Gl. 4.11 und 4.17) an diese Kurven erhielt man eine schnelle Komponente mit einer Diffusionszeit von $1.42 \text{ ms} \pm 0.55 \text{ ms}$ und $D = (0.9 \pm 0.34) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ im grünen Kanal welche dem wahrscheinlich frei diffundierendem c-Fos entspricht, und eine schnelle Komponente mit einer Diffusionszeit von $1.18 \text{ ms} \pm 0.50 \text{ ms}$ und $D = (1.1 \pm 0.5) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ im roten Kanal, welche dem freien c-Jun zuzuordnen ist. Wegen $\tau_{diff} \propto M^{1/3}$ (siehe S. 48) lassen sich Dimere durch ihre Diffusionszeit kaum von Monomeren unterscheiden. Dieser Unterschied liegt innerhalb des Messfehlers. Zusätzlich erhielt man eine zweite, langsame Komponente mit einem relativen Anteil von $58 \% \pm 15 \%$ und einer Diffusionszeit von $68 \text{ ms} \pm 22 \text{ ms}$ ($D = (0.018 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) im grünen Kanal. Im roten Kanal ergab sich eine langsame Fraktion von $50 \% \pm 8 \%$ mit einer Diffusionszeit von $73 \text{ ms} \pm 30 \text{ ms}$ ($D = (0.018 \pm 0.007) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$). Bei Fixierung der Diffusionszeiten der schnellen Komponenten auf die im vorherigen Kapitel 5.5.4 erhaltenen Werte von 0.72 ms für c-Jun bzw. 0.79 ms für c-Fos erhielt man vergleichbare Ergebnisse für die zweite Komponente: $66 \% \pm 9 \%$ und $70 \text{ ms} \pm 35 \text{ ms}$ ($D = (0.017 \pm 0.008) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) für den grünen Kanal und $49 \% \pm 8 \%$ und $72 \text{ ms} \pm 38 \text{ ms}$ ($D = (0.018 \pm 0.009) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$) für den roten Kanal. Diese zweite Komponente deutet auf eine starke Immobilisierung bzw. Bindung der Proteine an die DNA hin (z.B. an die TRE-Bindestelle von AP-1 regulierten Promotern). Das Diffusionsverhalten von DNA und Chromatin in Zellen bewegt sich in einem Bereich von einigen bis zu hunderten von Millisekunden (Marshall et al. 1997; Gehlen 2004). Da die Diffusionszeiten und -koeffizienten von Fos und Jun genau in diesem Bereich liegen, kann man von einer Bindung des AP-1-Komplexes an die DNA sprechen.

Die Kreuzkorrelationskurve zeigt eine signifikante Amplitude von $31 \% \pm 6 \%$. Im Vergleich dazu weisen die Deletionsmutanten eine Kreuzkorrelationsamplitude von nur $18 \% \pm 4 \%$ auf. Ein t-Test zeigte, dass dieser Unterschied wegen $p < 0.01$ signifikant ist. Nach Subtraktion des Wertes der Negativkontrolle (18%) bleibt eine Kreuzkorrelationsamplitude von etwa 13% . Bezieht man diese 13% auf die aufgrund der Optik maximal mögliche Kreuzkorrelationsamplitude von etwa 50% (siehe Kap. 4.3.6 und 5.3), so erhält man eine absolute Kreuzkorrelation von etwa 25% . Dieses Ergebnis stimmt gut mit der statistisch maximal möglichen Kreuzkorrelations-

amplitude von 25 % bei einem äquimolaren Verhältnis von endogenen zu markierten Proteinen überein. Da noch weitere endogene AP-1 Komponenten (Fra1, Fra2, FosB, JunB, JunD) in den Zellen vorliegen und mit c-Fos bzw. c-Jun Dimere bilden können, ist der Wert für die Kreuzkorrelationsamplitude teilweise kleiner. Das Ergebnis zeigt also eindeutig die Wechselwirkung zwischen c-Jun und c-Fos. Auffallend ist außerdem, dass die langsame Komponente im Kreuzkorrelationskanal einen deutlich höheren Anteil von $77 \% \pm 13 \%$ als im Autokorrelationskanal zeigt. Daraus lässt sich schließen, dass nahezu alle markierten Fos-Jun-Dimere immobilisiert sind. Die Diffusionszeit im Kreuzkorrelationskanal betrug $84 \text{ m} \pm 35 \text{ ms}$, entsprechend einem Diffusionskoeffizienten $D = (0.015 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

FCFS-Messungen im Zytoplasma dieser doppelt-transfizierten Zellen führten zu keinen auswertbaren Ergebnissen, da wie im Fluoreszenzbild Abb. 5.42 erkennbar ist, nur sehr geringe Mengen von c-Jun und c-Fos im Zytoplasma lokalisiert sind. Die erhaltenen Autokorrelations- und Kreuzkorrelationskurven waren zu verrauscht, um zuverlässige Werte bestimmen zu können.

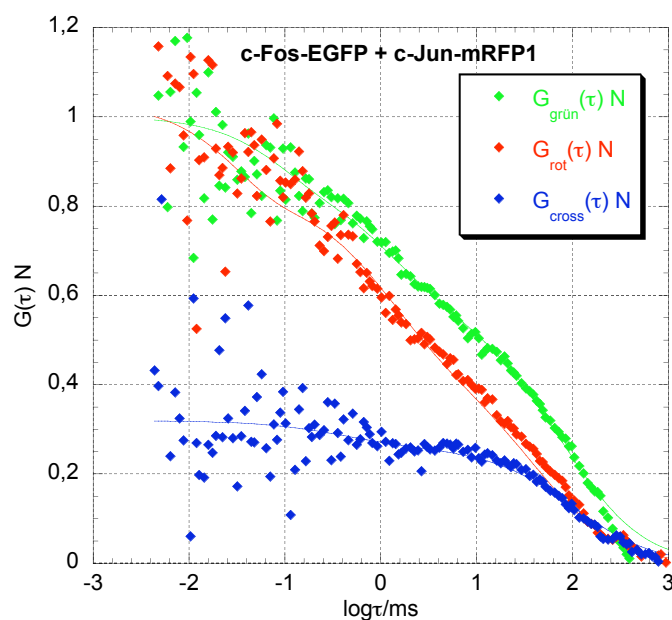


Abbildung 5.43 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im roten und grünen Kanal von Zellen, die c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 exprimieren. Die Kreuzkorrelationsamplitude (blau) beträgt $31 \% \pm 6 \%$.

Diese Messungen wurden auch mit dem Fusionsprotein c-Jun-eqFP611 statt c-Jun-mRFP1 durchgeführt. Dabei erhielt man jedoch nie eine signifikante Kreuzkorrelationsamplitude (Abb. 5.44). Vermutlich waren zu wenige eqFP611-Moleküle so gefaltet, so dass sie fluoreszieren können. Das Fusionsprotein c-Jun-DsRed2 konnte nicht in Zellen gemessen werden, da diese sofort nach der Expression starben.

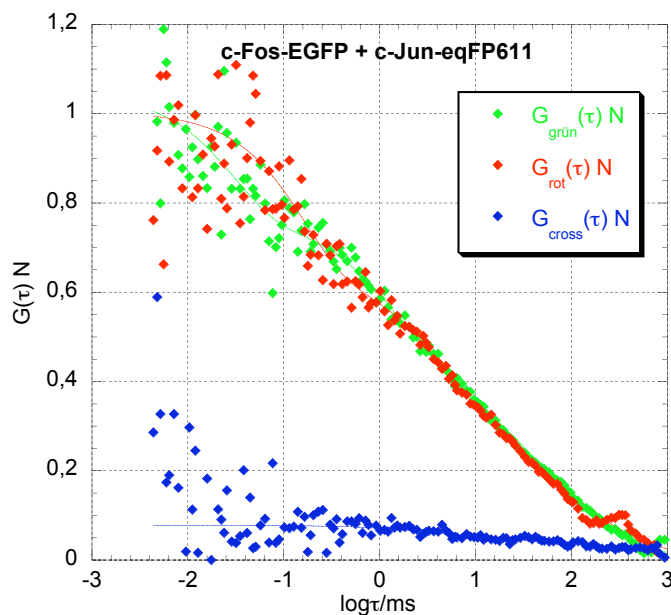


Abbildung 5.44 Gemessene (Rauten) und angepasste (durchgezogene Linie) normierte Autokorrelationskurven im roten und grünen Kanal von Zellen mit c-Fos-EGFP und c-Jun-eqFP611. Die Kreuzkorrelationsamplitude (blau) beträgt $8\% \pm 4\%$.

Zur Übersicht sind in Tab. 5.7 die relativen Anteile der schnellen und langsamen Komponenten ρ_1 und ρ_2 und deren Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 aus dem roten und grünen Autokorrelationskanal der einzelnen Zelllinien zusammengefasst. Des Weiteren werden die normierten Kreuzkorrelationsamplituden und die im Kreuzkorrelationskanal erhaltenen Diffusionskoeffizienten D_{cross} aufgelistet, wobei hier zur Veranschaulichung nur die Hauptkomponente gezeigt wird (diese trägt jeweils einen Amplitudenanteil von über 80 %). Die Diffusionskoeffizienten D_{cross} aus den Kreuzkorrelationskurven der Negativkontrollen konnten nicht berechnet werden, da sie zu verrauscht waren (da die Proteine nicht miteinander in Wechselwirkung treten). Während die Messung von AP-1 in den Autokorrelationskanälen zwei Komponenten gleichen Anteils lieferte, zeigte der Kreuzkorrelationskanal nur eine

langsame Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von $D = (0.015 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$, wie auch deutlich in Abb. 5.45 zu sehen ist. Dieses Ergebnis zeigt, dass alle markierten Fos-Jun-Dimere an DNA gebunden sind.

Die Diffusionskoeffizienten D_1 der Deletionsmutanten und der freien XFPs liegen etwa in der gleichen Größenordnung. Die Diffusionskoeffizienten D_1 des Fusionsproteins und der AP-1-Proteine sind etwas kleiner. Dies kann an der veränderten Tertiärstruktur dieser Proteine, ihrem größeren Molekulargewicht oder auch an transienten Wechselwirkungen mit zellulären Komponenten liegen. Die relativen Anteile der langsamen Komponente ρ_2 sind außer bei AP-1 sehr klein (10 % - 20 %), da diese Proteine nicht an DNA binden. Diese langsame Komponente lässt sich durch die Behinderung der freien Proteine innerhalb der Zelle erklären. Sie tritt bei allen Messungen in Zellen auf. Die Diffusionskoeffizienten D_2 variieren hier sehr stark.

Zellen	ρ_1 (%)	D_1 $10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$	ρ_2 (%)	D_2 $10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$	$G_{\text{cross}}(\tau)$ N (%)	D_{cross} $10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$
c-Fos-EGFP c-Jun-mRFP1	58±15 50±8	0.9±0.3 1.1±0.5	42±11 50±8	0.018±0.006 0.018±0.007	31 ± 6	0.015 ± 0.006
c-FosΔΔ-EGFP c-JunΔΔ-mRFP1	81±4 86±4	2.3±0.7 3.4±0.9	19±4 14±4	0.02	18 ± 4	-
Fusionsprotein EGFP-mRFP1	86±5 89±4	1.9±0.7	14±5 11±5	-	45 ± 4	1.9 ± 0.7
EGFP und mRFP1	91±7 88±5	2.5±0.4 3.1 ± 0.9	9±7 12±5	0.003	13 ± 3	-

Tabelle 5.7 Übersicht der relativen Anteile der schnellen und langsamen Komponenten ρ_1 und ρ_2 , deren Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 , der Kreuzkorrelationsamplituden $G_{\text{cross}}(\tau)N$ und der Diffusionskoeffizienten im Kreuzkorrelationskanal D_{cross} . In grün sind die Messungen im grünen Kanal und in rot die Messungen im roten Kanal aufgelistet.

In Abb. 5.45 sind zur Übersicht alle Kreuzkorrelationskurven noch einmal aufgetragen. Deutlich zu sehen, ist die durch die DNA-Bindung stark verlangsamte Diffusionszeit des Dimers aus c-Fos und c-Jun ($D = (0.015 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{m}^2/\text{s}$), im Vergleich zum Fusionsprotein EGFP-mRFP1. Die Negativkontrolle bestehend aus c-FosΔΔ-EGFP und c-JunΔΔ-mRFP1 liefert eine Kreuzkorrelationsamplitude von 18 % ± 4 % ähnlich den Kontrollzellen, die EGFP und mRFP1 exprimieren (13 % ± 3 %). Im Gegensatz dazu zeigt das AP-1-System eine signifikante

Kreuzkorrelationsamplitude von $31\% \pm 6\%$. Dies belegt somit eindeutig die Wechselwirkung zwischen c-Fos und c-Jun.

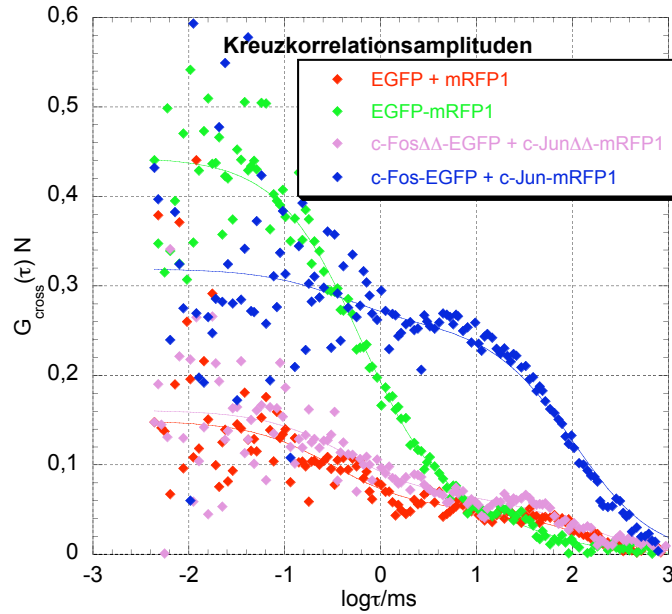


Abbildung 5.45 Übersicht der einzelnen gemessenen (Rauten) und angepassten (durchgezogene Linie) Kreuzkorrelationskurven und –amplituden.

5.8 FRET-Messungen

Als weiteren Beleg für die Wechselwirkung zwischen den Proteinen c-Fos und c-Jun im AP-1-System sollten FRET-Messungen (Fluoreszenzresonanzenergietransfer) durchgeführt werden. FRET ist ein physikalischer Prozess, bei dem Energie von einem Donormolekül (hier: EGFP) auf ein Akzeptormolekül (hier: RFP) durch intermolekulare Dipol-Dipol-Kopplung übertragen wird. Die Grundvoraussetzung für FRET ist eine räumliche Nähe zwischen 2 nm und 10 nm und eine geeignete spektrale Überlappung der beiden Fluorophore (Förster 1948).

5.8.1 Kontrollen

Für die FRET-Untersuchungen wurden Spektren von allen Zellsuspensionen bei Anregung mit 475 nm bzw. mit 550 nm aufgenommen. Es wurden sowohl Zellen, die EGFP bzw. DsRed2 exprimieren, als auch die *in vivo* Kontrollen, bestehend aus dem Fusionsprotein EGFP-DsRed2 als Positivkontrolle und dem IRES-EGFP-DsRed2-Vektor als Negativkontrolle, gemessen.

In Abb. 5.46 sind die Emissionsspektren des Fusionsproteins EGFP-DsRed2 bei Anregung mit 475 nm (a) bzw. 550 nm (b) dargestellt. EGFP hat ein Emissionsmaximum bei 509 nm, DsRed2 bei 585 nm. Die Autofluoreszenz der HeLa-Zellen (kleiner als 1% der grünen bzw. roten Fluoreszenz) wurde subtrahiert.

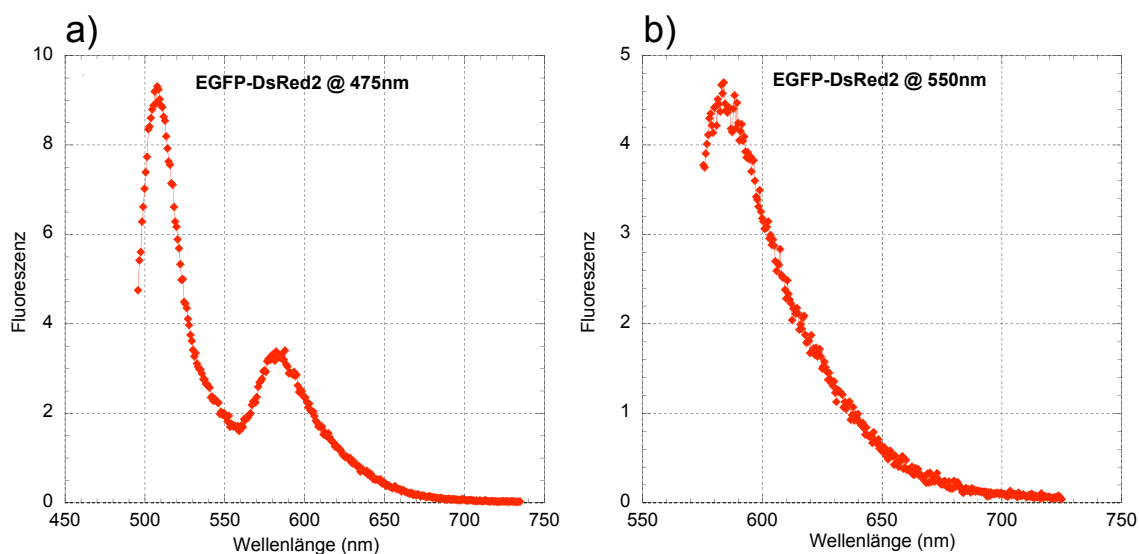


Abbildung 5.46 Emissionsspektren des Fusionsproteins EGFP-DsRed2 bei Anregung mit 475 nm (a) bzw. 550 nm (b).

Der erste Peak bei 509 nm repräsentiert die Emission von EGFP, der zweite Peak bei 585 nm setzt sich wie folgt zusammen: 1.) Fluoreszenz von DsRed2 durch die direkte Anregung mit 475 nm (D), 2.) Emission von EGFP bei 585 nm und 3.) die sensibilisierte Emission (SE) von DsRed2.

Durch Subtraktion der ersten beiden Komponenten aus den Messungen von EGFP- bzw. DsRed2-Zellen von der gesamten, gemessenen Fluoreszenz erhält man für das Verhältnis der sensibilisierten Emission im Verhältnis zur direkten Anregung des Akzeptors (D):

$$SE/D = \left(\underbrace{F_{GFP-Re d}^{475}(575-595)}_{3.18} - \underbrace{F_{GFP-Re d}^{550}(575-595) \frac{F_{Re d}^{475}(575-595)}{F_{Re d}^{550}(575-595)}}_{D=0.98} - \underbrace{F_{GFP-Re d}^{475}(495-515) \frac{F_{GFP}^{475}(575-595)}{F_{GFP}^{475}(495-515)}}_{0.30} \right) / 0.98 = 1.9$$

Bei der Auswertung wurde über einen Bereich von 20 nm integriert, um so Fehler durch verrauschte Signale zu vermeiden.

In Abb. 5.47 sind die Emissionsspektren von pIRES-EGFP-DsRed2-Zellen bei Anregung mit 475 nm bzw. 550 nm abgebildet.

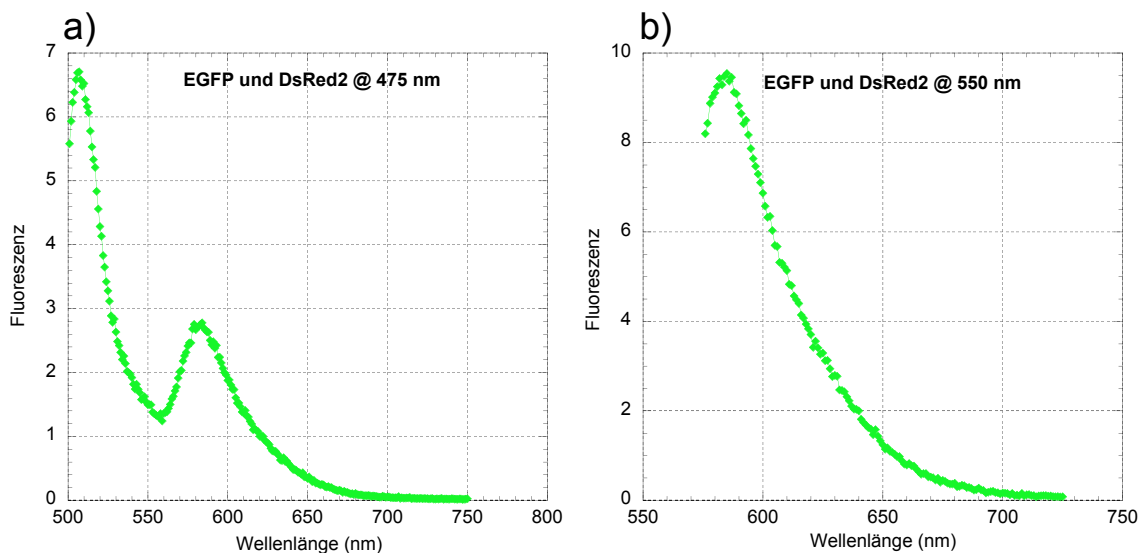


Abbildung 5.47 Emissionsspektren von Zellen (Suspensionen), die EGFP und DsRed2 über den IRES-Vektor exprimieren, bei Anregung mit 475 nm (a) und 550 nm (b).

Berechnet man das SE/D -Verhältnis für diese Zellsuspension, erhält man folgenden Wert:

$$SE/D = \left(\underbrace{F_{IRES-Re d}^{475}(575-595)}_{2.67} - \underbrace{F_{IRES-Re d}^{550}(575-595) \frac{F_{Re d}^{475}(575-595)}{F_{Re d}^{550}(575-595)}}_{D=2.07} - \underbrace{F_{IRES-Re d}^{475}(495-515) \frac{F_{GFP}^{475}(575-595)}{F_{GFP}^{475}(495-515)}}_{0.25} \right) / 2.07 = 0.14$$

Die Messungen zeigen also eine signifikante sensibilisierte Emission (SE) für das Fusionsprotein EGFP-DsRed2 im Gegensatz zu den getrennt exprimierten Proteinen.

Um die FRET-Effizienz zu erhalten, müssten zusätzlich die Absorptionsbeiträge des Donors (abs_{475}^{EGFP}) und des Akzeptors (abs_{475}^{DsRed2}) in den Zellen nach folgender Gleichung berücksichtigt werden:

$$FRET = \frac{SE / abs_{475}^D}{D / abs_{475}^A} \quad (5.1)$$

Eine genaue Messung der getrennten Absorptionen von EGFP und DsRed2 war bei den Zellsuspensionen wegen der starken Lichtstreuung nicht möglich. Der Förster-Radius R_0 ist außerdem für dieses Chromophorpaar nicht bekannt.

Dennoch lässt sich aus diesen Messungen schließen, dass EGFP und DsRed2 sich als Chromophorpaar für FRET-Messungen eignen. Im vorliegenden Fusionsprotein befinden sie sich in einer räumlichen Nähe von weniger als 10 nm zueinander und zeigen deutlich FRET.

5.8.2 AP-1-System

FRET-Messungen am AP1-System führten zu keinen auswertbaren Spektren, da die Zellen ein nur sehr schwaches Fluoreszenzsignal zeigten. Der Grund hierfür war, dass nur etwa 20 % der Zellen doppelt transfiziert waren. Für FCCS-Messungen stellt dies kein Problem dar, da man sich einzelne Zellen aussuchen kann. Bei den FRET-Messungen konnte jedoch nur über das Ensemble gemittelt werden. Für dieses System würde sich die FRET-Technik in Kombination mit der Durchflusszytometrie eignen, um so ebenfalls einzelne Zellen messen zu können und verschiedene Population zu diskriminieren (Szöllösi et al. 2004).

In Abb. 5.48 ist das Emissionsspektrum von Zellen, die c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 exprimieren, dargestellt. Bei 607 nm, dem Emissionsmaximum von mRFP1, ist kein Peak zu erkennen. Selbst bei direkter Anregung von c-Jun-mRFP1 mit 550 nm erhält man nur ein sehr verrauschtes Emissionsspektrum.

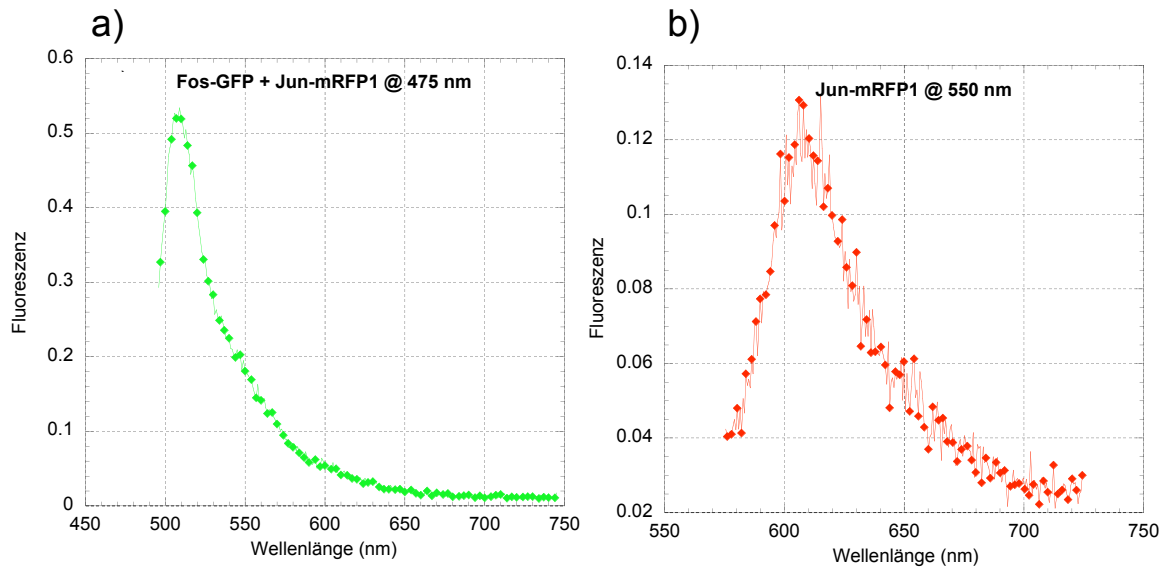


Abbildung 5.48 Emissionsspektrum von Zellen, die Fos-EGFP und Jun-mRFP1 exprimieren bei Anregung mit 475 nm (a) und 550 nm (b).

6 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung zweier AP-1-Komponenten *in vivo* mit Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS) unter Verwendung zweier autofluoreszierender Proteine (AFPs) nachzuweisen. Mit Hilfe von FCCS können Wechselwirkungen durch die Detektion der korrelierten Bewegung zweier Fluorophore nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), bei welchem sich die Fluorophore in einem Abstand von 2-10 nm zueinander befinden müssen, ist bei der FCCS nur die korrelierte Bewegung der Fluorophore erforderlich.

Durch die Verwendung autofluoreszierender Proteine (AFPs) ist es möglich, Proteine genetisch zu markieren und diese *in vivo* mit Hilfe von Fluoreszenztechniken oder mikroskopischen Methoden zu beobachten. Heutzutage ist eine Vielzahl verschiedener AFPs erhältlich. Von EGFP aus der Nordpazifikqualle *Aequorea victoria* bis hin zur wachsenden Zahl rot-fluoreszierender Proteine (RFP) wie die aus Korallen isolierten Proteine DsRed2 (*Discosoma striata*) und HcRed1 (*Hetera Crispa*) (Clontech 2002), oder eqFP611 aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* (Wiedenmann et al. 2002) bzw. die erst kürzlich konstruierte DsRed-Mutante, das monomere mRFP1 (Campbell et al. 2002).

Wechselwirkungen zweier Moleküle wurden zwar schon *in vitro* (Rippe 2000; Weidemann et al. 2002) und auch *in vivo* (Bacia et al. 2002; Bacia et al. 2003; Kim et al. 2004) mit Hilfe von FCCS nachgewiesen, bei all diesen Studien war jedoch mindestens einer der beiden Bindungs- bzw. Reaktionspartner chemisch markiert. Dies erforderte langwierige Aufreinigungsprozeduren, um das Protein aus den Zellen zu gewinnen, es dann *in vitro* mit einem organischen Farbstoff zu markieren und schließlich über Mikroinjektion wieder in die Zelle zu transferieren. Solche Prozeduren sind aufwendig und spiegeln nicht mehr das Verhalten des Proteins in seiner natürlichen Umgebung wider. Nur Kohl et al. gelang es 2002 in einem Protease-Assay unter Verwendung der autofluoreszierenden Proteine DsRed und EGFP Kreuzkorrelation zu messen, allerdings *in vitro* (Kohl et al. 2002).

Der in dieser Arbeit charakterisierte Proteinkomplex AP-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der als Dimer verschiedener Komponenten vorliegt. Die Hauptbestandteile

sind dabei c-Fos und c-Jun. Die Dimerisierung ist essentiell für die Aktivierung der Transkription, wie aus *in vitro* Untersuchungen bekannt ist (Allegretto et al. 1990; Angel et al. 1991; Wagner 2001). Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit die Proteine c-Jun und c-Fos als Referenz für die Dimer-Bildung ausgewählt. Die Wechselwirkung zwischen Jun und Fos konnte bislang *in vivo* nur von Kerppola et al. 2002 durch eine Methode namens bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (biFC) nachgewiesen werden. Dabei wurde sowohl an c-Fos als auch an c-Jun ein nicht-fluoreszierendes Fragment von YFP fusioniert (YN bzw. YC), welches nach Dimerisierung von Fos und Jun mit dem zweiten Fragment von YFP ein Chromophor bilden kann (Hu et al. 2002; Hu et al. 2003). Der Nachteil dieser Methode ist aber, dass die Fluoreszenzkomplementation irreversibel ist und somit die Proteine ihrem natürlichen Gleichgewicht entzogen werden. Im Gegensatz dazu kann man mit Hilfe von FCCS Gleichgewichtskonstanten bestimmen und darüber hinaus die Dynamik des entstandenen Komplexes charakterisieren.

Als Chromophorpaare für die FCCS boten sich einerseits ECFP-EYFP und andererseits EGFP-RFP an, wobei als RFPs DsRed2, eqFP611 und mRFP1 zur Verfügung standen. Im Laufe dieser Arbeit stellte sich heraus, dass Ein-Farben-FCS-Messungen sowohl von freiem ECFP in Zellen als auch im Fusionsprotein mit c-Fos keine auswertbaren Autokorrelationskurven lieferten. ECFP zeigte eine sehr starke Tendenz zur Photolyse. Die Photolyserate liegt bei etwa 1 Molekül pro 0.5 ms. Das ist etwa die Diffusionszeit des Proteins. Aus diesem Grund konnten aus den Autokorrelationskurven keine Diffusionszeiten gewonnen werden: das Chromophorpaar ECFP-EYFP wurde verworfen und stattdessen das EGFP-RFP-Paar verwendet. Welches der drei roten Proteine (RFPs) sich dafür am besten eignete, sollte im Laufe dieser Arbeit evaluiert werden.

EGFP, mRFP1, eqFP611 und DsRed2 wurden in Zellen exprimiert und diese Zellen mittels FCS gemessen, um die intrazelluläre Mobilität dieser Proteine zu untersuchen und einen Vergleich der drei roten Proteine zu erhalten. Die Autofluoreszenz der Zellen stellte dabei kein Problem dar, da sie kleiner als 1 % der im grünen bzw. roten Kanal gemessenen Intensität war. Für FCCS-Kontrollmessungen wurden einerseits Fusionsproteine aus EGFP und einem RFP konstruiert, welche als Referenz für 100 % Kreuzkorrelation dienen sollten, und andererseits ein IRES-Vektor mit EGFP und RFP etabliert. Dieser IRES-Vektor (Internal Ribosomal Entry Site) produziert nur eine

mRNA mit der Information beider Proteine, translatiert jedoch zwei Proteine im Verhältnis 1:1. Dieses Konstrukt ergab etwa äquimolare Mengen an nicht miteinander wechselwirkendem EGFP und RFP in Zellen und diente somit als Negativkontrolle für die FCCS. Die Fusionsproteine aus EGFP und einem der drei roten Proteine lieferten Kreuzkorrelationsamplituden zwischen 45 % und 51 %, bezogen auf die Autokorrelationsamplituden. Dieses Ergebnis war mit dem des doppelt-markierten DNA-Fragments *in vitro* vergleichbar, welches eine Kreuzkorrelationsamplitude von 46 % zeigte. Diese Werte wurden als Referenz für 100 % Kreuzkorrelation *in vivo* festgelegt. Die Ergebnisse stimmten gut mit früheren *in vitro* Messungen in unserer Arbeitsgruppe überein (Tewes 1998; Rippe 2000; Weidemann et al. 2002). Aufgrund unterschiedlicher Anregungs- und Detektionsvolumina erreichte die Kreuzkorrelationsamplitude nie einen Wert von 100 %. Die Kreuzkorrelationsamplituden der getrennt exprimierten Proteine EGFP und mRFP1 lagen dagegen bei nur $13 \% \pm 3 \%$, was als Referenzwert für fehlende Wechselwirkung angenommen wurde. Diese beiden Kontrollen definierten so die Grenzen, in denen sich die Kreuzkorrelationsamplituden des AP-1-Komplexes *in vivo* bewegen sollten.

Probleme traten bei der Expression von eqFP611 auf, welches bei 37 °C nur sehr schlecht gefaltet wird. Expressionsversuche in Bakterien zeigten, dass seine optimale Faltungs- und Expressionstemperatur bei 30 °C liegt (Dross 2004). Es gelang nicht, Zellen zu messen, die EGFP und eqFP611 in gleichen Mengen exprimierten. Durch Fusion an EGFP wurde die Faltung von eqFP611 allerdings beschleunigt bzw. erleichtert. Für DsRed2 zeigte der Vergleich der molekularen Helligkeiten von Zytoplasma und Kern (Faktor 2-3), dass das Protein nicht nur als Monomer, sondern auch als Dimer und Tetramer vorlag. Die Kerne der Zellen, die DsRed exprimierten, waren deshalb meist dunkler als das Zytoplasma, da die größeren Oligomere von DsRed nicht mehr durch Diffusion in den Kern gelangen konnten. eqFP611 und mRFP1 hingegen zeigten im Kern gleiche molekulare Helligkeiten wie im Zytoplasma. Die kleine Fluoreszenzquantenausbeute und der niedrige Extinktionskoeffizient von mRFP1 stellten für diese Messungen kein Problem dar, da mRFP1 im Vergleich zu DsRed2 oder auch GFP sehr schnell reift und das Fusionsprotein eine deutliche Kreuzkorrelationsamplitude lieferte. Seine Tendenz zur Photolyse war mit EGFP vergleichbar.

Fusionsproteine aus c-Jun und einem der drei roten Proteine wurden hergestellt. Zellen, die das Fusionsprotein aus DsRed2 und c-Jun exprimierten, konnten nicht gemessen werden, da diese wenige Stunden nach der Transfektion aufgrund der Bildung zytotoxischer Aggregate starben. Außerdem reifte DsRed2 nur sehr langsam: 24 Stunden nach der Transfektion war immer noch eine grüne Zwischenstufe im Emissionsspektrum von DsRed2 zu beobachten. Das Fusionsprotein von Jun und eqFP611 wurde zwar ohne Bildung von Aggregaten in HeLa exprimiert, doch FCCS-Messungen zusammen mit c-Fos-EGFP zeigten keine signifikanten Kreuzkorrelationsamplituden. Wahrscheinlich wurde ein großer Teil von eqFP611 zwar exprimiert, jedoch nicht gefaltet, und zeigte demnach keine Fluoreszenz. Dagegen zeigte mRFP1 weder die Bildung von Aggregaten, noch Probleme bei der Reifung des Chromophors oder der Faltung, womit es ein viel versprechendes Chromophor für die FCCS-Messungen ist. FCCS-Messungen in Zellen, die c-Jun-mRFP1 und c-Fos-EGFP exprimierten, lieferten schließlich eine signifikante Kreuzkorrelationsamplitude von $31 \% \pm 6 \%$, was auf eine deutliche Wechselwirkung zwischen c-Fos und c-Jun schließen lässt. FCCS-Messungen in Zellen, die Deletionsmutanten von AP-1 exprimierten, denen die Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne fehlte, ergaben dagegen eine Kreuzkorrelationsamplitude von nur $18 \% \pm 4 \%$, was im Rahmen des Messfehlers mit der Negativkontrolle übereinstimmt. Wie zu erwarten war, konnten die AP-1-Proteine nach Entfernung der Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne weder miteinander in Wechselwirkung treten noch an DNA binden, wie die Diffusionskoeffizienten von $D = (2.3 \pm 0.7) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ für c-Fos $\Delta\Delta$ -EGFP und $D = (3.4 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ für c-Jun $\Delta\Delta$ -mRFP1 belegen. Diese entsprechen nämlich den Diffusionskoeffizienten von frei diffundierendem EGFP oder RFP. Im Gegensatz dazu waren die Autokorrelationskurven von c-Fos-EGFP und c-Jun-mRFP1 zweiphasig:

1.) eine schnelle Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von $D = (0.9 \pm 0.34) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ bzw. $D = (1.1 \pm 0.5) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, welche dem frei diffundierenden Fos bzw. Jun entspricht. Die im Vergleich zu den Deletionsmutanten kleineren Diffusionskoeffizienten lassen sich eventuell durch eine veränderte Tertiärstruktur erklären. Wegen $\tau \propto M^{1/3}$ lassen sich Monomere und Dimere nicht durch ihre Diffusionszeit unterscheiden, da der Unterschied im Bereich des Messfehlers liegt.

2.) eine langsame Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von $D = (0.018 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, welche die immobilisierten Proteine repräsentiert. Das Diffusionsverhalten von Chromatin im Zellkern ergibt in der FCS typische Diffusionszeiten von einigen Millisekunden bis hin zu mehreren hundert Millisekunden. Demnach befinden sich die hier gemessenen Diffusionskoeffizienten mit $D = 0.018 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($\tau_{\text{Diff}} \approx 80 \text{ ms}$) in der Größenordnung von Chromatinbewegungen im Interphasekern (Marshall et al. 1997; Gehlen 2004). Diese zweite langsame Komponente stellt also die Bindung des Proteins an DNA dar.

Die Kreuzkorrelationskurve zeigte dagegen nur eine Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten $D = (0.015 \pm 0.006) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Aus der Abwesenheit einer schnellen Komponente in der Kreuzkorrelationskurve lässt sich folgern, dass alle markierten Fos-Jun-Dimere an DNA gebunden sind. Die Bindung an DNA/Chromatin stabilisiert möglicherweise das Dimer oder aber das Dimer entsteht erst an der DNA, was jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Bisher wurde immer davon ausgegangen, dass AP-1 nur als Dimer an DNA binden kann. Kohler et al. zeigten 2001 jedoch, dass die Dimerisierungsrate von Fos und Jun durch DNA-Zugabe erhöht wird. FCS-Messungen einer Deletionsmutante von c-Fos ohne Dimerisierungsdomäne zeigten trotz Entfernung der Dimerisierungsdomäne eine Immobilisierung von c-Fos im Gegensatz zur Mutante, bei der zusätzlich die DNA-Bindungsdomäne entfernt wurde (Kap. 5.5.4). Dies lässt auf eine Bindung des monomeren c-Fos an DNA oder andere zelluläre Komponenten schließen, wie erst kürzlich veröffentlicht wurde, z.B. die Bindung von c-Fos an GATA (McBride et al. 2003) oder an FHL2 (Morlon et al. 2003).

Mit Hilfe der „Zwei-Hybrid“-FCCS konnte eindeutig die Wechselwirkung der Proteine c-Fos und c-Jun unter Verwendung zweier autofluoreszierender Proteine *in vivo* gezeigt werden. Außerdem wurde die Bindung von AP-1 an DNA nachgewiesen. Die Anwendung dieser Technik mit einem Hochdurchsatz-System könnte in Zukunft in der Proteomik genutzt werden, Protein-Protein-Wechselwirkungen und deren Dynamik direkt *in vivo* nachzuweisen, um so die molekularen Mechanismen der Zelle und damit auch von Krankheiten besser verstehen zu können.

7 Material & Methoden

7.1 Verbrauchsmaterialien

Der Großteil der verwendeten Chemikalien stammte von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma* (Deisenhofen) und hatte den Reinheitsgrad p.a. (*pro analysi*).

Das zum Ansetzen der Lösungen, insbesondere der Puffer, verwendete Wasser wurde einer Reinstwasseranlage *Seralpur* PRO90-CN von *Seral* entnommen, bei der das Wasser einen Aktivkohlefilter, zwei Ionenaustauscher und einen Sterilfilter durchläuft.

Weitere Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Produkt	Firma
Acrylamid/Bisacrylamid	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Agarose Seakem	<i>FMC</i> Rockland, ME, USA
Antikörper Living Colors HRP	<i>Clontech Laboratories</i> , Heidelberg
Antikörper AP-1	<i>Santa Cruz Biotechnology</i> Santa Cruz, CA, USA
Proteasehemmer Aproptinin, Leupeptin, Pefabloc	<i>Roche Diagnostics</i> Mannheim
Luminol (Western-Blots)	<i>New England Biolabs</i> , Beverly, MA, USA
Protein MW-Marker (10-220 kDa)	<i>Invitrogen Life Technologies</i> , Karlsruhe
Protein MW-Marker prestained (8.4-176.5 kDa)	<i>Invitrogen Life Technologies</i> , Karlsruhe
Nitrocellulose Blotting-Membran, <i>Hybond</i> <i>ECL</i>	<i>Amersham Lifesciences</i> , Buckinghamshire, UK
Film X-Omat	<i>Kodak</i>
Gel-Blotting- Papier	<i>Schleicher und Schuell</i> , Dassel
DNA MW-Marker 1 kbp	<i>Fermentas GmbH</i> St. Leon-Rot
DNA-MW-Marker 100 bp	<i>Fermentas GmbH</i> St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme	<i>Fermentas GmbH, St. Leon-Rot</i>
RPMI 1640 ohne Phenolrot	<i>Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe</i>
FuGene 6 Transfection Reagent Kit	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
TransFectin™ Transfection Reagent Kit	<i>BioRad, München</i>
Fluoreszenzfarbstoffe	<i>Molecular Probes, Leiden, Niederlande</i>
Gekammerte Deckgläser	<i>Nunc Naperville, IL, USA</i>

Tabelle 7.1 Verbrauchsmaterialien

7.2 Geräte

Funktion	Gerät	Hersteller
Geldokumentation	BioDocAnalyzer	<i>Biometra Göttingen</i>
Absorptionsspektren	Spektralphotometer Cary-4E	<i>Varian, Mulgrave Australia</i>
Fluoreszenzspektren	Fluoreszenzspektrometer <i>SLM-Aminco 8100</i>	<i>SLM, Urbana, IL, USA</i>
Maxipräparation	Präparative Ultrazentrifuge	<i>Beckman München</i>
PCR	<i>T3-Thermocycler</i>	<i>Biometra, Göttingen</i>
FCS & FFM	Fluoreszenzfluktuations- Mikroskopie (FFM)	Eigenentwicklung der Arbeitsgruppe am DKFZ

Tabelle 7.2 Großgeräte

7.3 Konstruierte Vektoren

Im Folgenden wird die Konstruktion der einzelnen Plasmide erläutert. Die dazugehörigen Plasmidkarten sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Sequenzen der dafür verwendeten Primer befinden sich in Tab. 7.3 und 7.4:

Primernamen	Sequenz
c-Fos-EcoRI	5'-CTT CGA ATT CTG ATG ATG TTC TCG GGC TTC AAC GC-3'
c-Fos-BamHI	5'-CGG TGG ATC CCG CAG GGC CAG CAG CGT GGG TGA GC-3'

Fra1-EcoRI	5'-CTT CGA ATT CTG ATG TTC CGA GAC TTC GGG GAA CCC-3'
Fra1-BamHI	5'-CGG TGG ATC CCG CAA AGCGAG GAG GGT TGG-3'
c-Jun-PstI	5'-CGG CTG CAG GCC CTG AAG GAG GAG CCT CAG ACA GT-3'
c-Jun-BamHI	5'-CGG TGG ATC CCG AAA TGT TTG CAA CTG CTG CG-3'
c-Fos Δ Dim-BamHI	5'-ATA AAT TGG ATC CCG GAG TGT ATC AGT CAG CTC CC-3'
c-Fos Δ Dim Δ DNA-BamHI	5'-ATA AAT TGG ATC CCG CTC TTC TTC TTC TGG AGA TAA CTG TTC C-3'

Tabelle 7.3 Primersequenzen für das AP-1-System

Primernamen	Sequenz
EGFP-SalI	5'-AAT TAA CAG TCG ACG ATG GTG AGC AAG GGC GAG G-3'
EGFP-BamHI	5'-AAT ATA TGG ATC CCG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GC-3'
DsRed2-SalI	5'-AAT TAA CAG TCG ACG ATG GCC TCC TCC GAG AAC G-3'
DsRed2-BamHI	5'-AAT TTA TGG ATC CCG CTA CAG GAA CAG GTG GTG GCG-3'
eqFP611-SalI	5'-AAT TAA CAG TCG ACG ATG AAT TCA CTG ATC AAG G-3'
eqFP611-BamHI	5'-AAT TTA TGG ATC CCG TCA AAG ACG TCC CAG TTT GGA TGG-3'
mRFP1-SalI	5'-AAT TAA CAG TCG ACG ATG GCC TCC TCC GAG GAC G-3'
mRFP1-BamHI	5'-AAT TTA TGG ATC CCG TTA GGC GCC GGT GGA GTG GCG-3'
mRFP1-AgeI	5'-AAT TTA CCA CCG GTC ATG GCC TCC TCC GAG GAC G-3'
mRFP1-NotI	5'-TAA ATT GCG GCC GCT TTA GGC GCC GGT GGA GTG GCG-3'
Alexa488-157-Frag	5'-GAA TTC GAG CTC GCC CGG GGA-3'
RhoX-157-Frag	5'-GTA CTA ACC AGG CCC GAC-3'

Tabelle 7.4 Primersequenzen für Kontrollplasmide

7.3.1 AP-1-Fusionsproteine

Als Ausgangsmaterial für die hier konstruierten Vektoren diente der Vektor pSV-EYFP. Dieser Vektor wurde in unserer Abteilung aus dem ursprünglich von *Clontech* stammenden Vektor pECFP-1 konstruiert (G. Müller). Dabei wurde dem promoterlosen Vektor pECFP-1 der Promoter des SV 40-Virus in die HindIII-Schnittstelle inkloniert und die Farbe ECFP über die AgeI und NotI-Schnittstelle in der Multiple Cloning Site gegen EYFP ausgetauscht. Die verschiedenen AP-1-Proteine und XFPs wurden wie folgt in diesen Vektor eingesetzt:

pSV-Fos-EGFP: Das von der Abteilung F. Rösl (DKFZ) stammende c-Fos-Gen wurde mit Hilfe einer PCR mit den Oligonukleoid-Primern c-Fos-EcoRI und c-Fos-BamHI ohne Stopp-Codon amplifiziert, mit EcoRI und BamHI geschnitten und in die Schnittstellen EcoRI und BamHI in die Multiple Cloning Site (MCS) des Vektors pSV-EYFP ligiert. Das autofluoreszierende Protein (XFP) konnte beliebig über die Schnittstellen AgeI und NotI ausgetauscht werden.



pSV-Fra1-EYFP: Das ebenfalls von der Abteilung F. Rösl (DKFZ) erhaltene Fra1-Gen wurde analog zu c-Fos nach Amplifikation mit den Primern Fra1-EcoRI und Fra1-BamHI mit EcoRI und BamHI geschnitten und mit dem Vektor pSV-EYFP ligiert.



pSV-c-Jun-EYFP: Die genetisch kodierende Region von c-Jun wurde in zwei Schritten in den pSV-EYFP Vektor eingesetzt. Zunächst wurde die Region zwischen HindIII und PstI mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus dem Vektor pBAT-c-Jun von P. Angel (DKFZ) herausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen der MCS von pSV-EYFP ligiert. In einem zweiten Klonierungsschritt wurde die 2. Hälfte von c-Jun mit den Primern c-Jun-PstI und c-Jun-BamHI amplifiziert und in die PstI- und BamHI-Schnittstellen von pSV-EYFP ohne Stopp-Codon ligiert. Zum Schluss

musste der SV 40-Promoter erneut in die HindIII-Schnittstelle eingesetzt werden, da dieser im 1. Klonierungsschritt (HindIII-PstI) ebenfalls herausgeschnitten wurde. Die Leserichtung des SV 40-Promoters wurde mit Hilfe der Enzyme KpnI und BamHI überprüft (KpnI liegt asymmetrisch im Promoter vor).

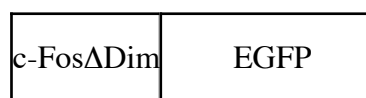
Bei pSV-Jun-EYFP wurde das EYFP gegen mRFP1 über die Schnittstellen AgeI und NotI ausgetauscht, um so den Vektor **pSV-c-Jun-mRFP1** zu erhalten.



7.3.2 Deletionsmutanten von AP-1

Für Kontrollmessungen wurden Deletionsmutanten der AP-1-Proteine hergestellt, bei denen die Dimerisierungsdomäne (Δ Dim) bzw. die Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne (Δ Dim Δ DNA) (siehe Kap. 5.5.4) über eine PCR-Amplifizierung entfernt wurden.

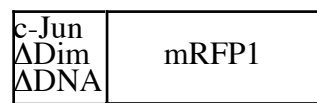
pSV-c-Fos Δ Dim-EGFP: Hier wurde durch Amplifikation mit Hilfe einer PCR der genetisch kodierende Bereich für die Dimerisierungsdomäne (Bp. 495-579) mit den Primern c-Fos-EcoRI und c-Fos Δ Dim-BamHI entfernt. Das amplifizierte Fragment (Bp. 1-495) und der Vektor pSV-EGFP wurden mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten und anschließend ligiert.



pSV-c-Fos Δ Dim Δ DNA-EGFP: Bei diesem Konstrukt wurde zusätzlich eine weitere Proteindomäne, und zwar die DNA-Bindungsdomäne (Bp. 417-480), entfernt. Dies erfolgte analog der ersten Mutante von c-Fos mit den Primern c-Fos-EcoRI und c-Fos Δ Dim Δ DNA-BamHI.



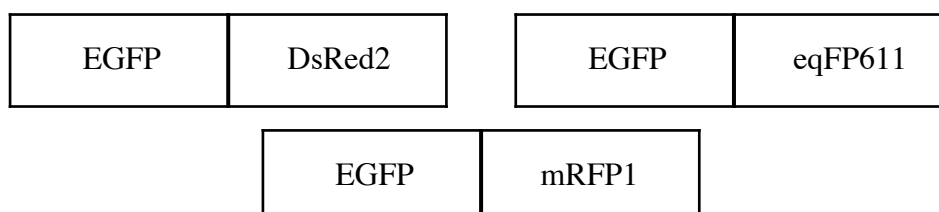
pSV-c-Jun Δ Dim Δ DNA-EYFP: Für die Klonierung der c-Jun-Deletionsmutante, wurde das c-Jun Fragment (Bp 1-435) aus dem Vektor RSV-c-Jun Δ 146-221 (von Abt. P. Angel, DKFZ) mit HindIII und BglIII herausgeschnitten und in die Schnittstellen HindIII und BamHI in die MCS des pSV-EYFP-Vektors eingesetzt. Anschließend wurde der SV 40-Promoter wieder in die HindIII-Schnittstelle eingesetzt. Für die Konstruktion von **pSV-c-Jun Δ Dim Δ DNA-mRFP1** wurde der Vektor mit AgeI und NotI geschnitten und anschließend mit einem entsprechenden mRFP1-Fragment ligiert. Das mRFP1-Fragment erhielt man aus einer PCR-Amplifikation des Vektors pRSET_B-mRFP1 mit den Primern mRFP1-AgeI und mRFP1-NotI.



7.3.3 Kontrollplasmide für FCCS-Messungen

Als **Positivkontrolle** für die FCCS-Messungen in Zellen wurden Fusionsproteine aus den entsprechenden autofluoreszierenden Proteinen konstruiert:

pEGFP-DsRed2, pEGFP-eqFP611 und pEGFP-mRFP1: Die für EGFP genetisch kodierende Sequenz aus dem Vektor pEGFP-N1 (*Clontech*) wurde durch eine PCR mit Hilfe der Primer EGFP-SalI und EGFP-BamHI amplifiziert. Das amplifizierte Fragment und die Plasmide pDsRed2-N1 (*Clontech*), pSV-eqFP611 (Diplomarbeit N. Dross, DKFZ) und pSV-mRFP1 (Eigenkonstruktion: PCR-Amplifizierung der genetisch kodierenden Region von mRFP1 aus pRSET_B-mRFP1 mit den Primern mRFP1-AgeI und mRFP1-NotI und Ligation mit pSV-Vektor in die AgeI- und NotI-Schnittstellen) wurden mit SalI und BamHI geschnitten. Anschließend wurde das geschnittene EGFP-Fragment mit dem jeweiligen Vektor ligiert, um so die entsprechenden Fusionsproteine herzustellen. Der Linker zwischen EGFP und dem roten Protein enthielt je sieben Aminosäuren (RDPPVAT), die aus der MCS stammten.



Als **Negativkontrolle** für die FCCS-Messungen wurde ein Vektor benötigt, der beide fluoreszierende Proteine (rot und grün) simultan, aber einzeln exprimiert. Dazu wurde der Vektor pIRES2-EGFP von *Clontech* benutzt. Der IRES-Vektor besitzt eine „Internal Ribosomal Entry Site“ vor der kodierenden Sequenz des EGFP's und erlaubt dadurch eine gleichzeitige Expression von zwei einzelnen Genen durch nur eine mRNA. Die Plasmide wurden wie folgt konstruiert:

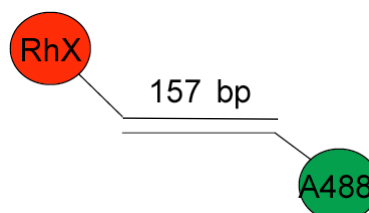
pIRES2-EGFP-DsRed2/eqFP611/mRFP1:

Die kodierende Sequenz von DsRed2 aus pDsRed2-N1 (*Clontech*), eqFP611 aus pcDNA3.1-eqFP611 (Wiedenmann et al. 2002) bzw. mRFP1 aus pRSET_B-mRFP1 (Campbell et al. 2002) wurden mit Hilfe der Primer DsRed2-SalI und DsRed2-BamHI für DsRed2, eqFP611-SalI und eqFP611-BamHI für eqFP611 und mRFP1-SalI und mRFP1-BamHI für mRFP1 unter Beibehaltung der Stopp-Codons amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente und der Vektor pIRES2-EGFP wurden mit SalI und BamHI geschnitten und anschließend ligiert.



157 bp DNA-Fragment-RhX-Alexa 488

Die Konstruktion des doppelt-markierten DNA-Fragmentes erfolgte über eine PCR mit den Primern Alexa488-157-Frag und RhoX-157-Frag, die mit Alexa 488 bzw. Rhodamin X markiert waren, an der 5S-Positionierungssequenz von *Xenopus Borealis* pXP 10 (Rhodes 1985).



7.4 Mikrobiologische Verfahren

7.4.1 Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmid-DNA wurden XL10-Gold ultrakompetente *Escherichia coli* (Stratagene, Amsterdam, Niederland) Zellen verwendet. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine erhöhte Effizienz bei Transformationen aus. Die Zellen sind Endonuklease negativ (*endA1*) und verhindern die homologe Rekombination (*recA*).

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA, musste diese zunächst in die Bakterien eingeschleust werden. Danach konnte das Plasmid repliziert werden.

7.4.2 Nährmedien und Glycerinkulturen

- Bakterien wurden in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, *Becton Dickinson*, Sparks, ML, USA, 10 g in 400 ml) gezüchtet.
- Agarplatten wurden aus LB-Agar (*Gibco BRL*, 6.4 g in 200 ml Wasser) in 10-cm-Petrischalen gegossen.
- Transformationen wurden in SOC-Medium ausgeführt. Das SOC-Medium wurde wie folgt hergestellt:
 - 1.) Zunächst wurde das SOB-Medium angesetzt (20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0.5 g/l NaCl, 2.5 mM KCl, pH 7.5) und autoklaviert.
 - 2.) 20 mM steril filtrierte Glucose wurden zugegeben, sobald die Lösung auf 60 °C abgekühlt war. Vor Gebrauch des Medium wurden 5 ml einer sterilen 2 M MgCl₂-Lösung pro Liter Medium zugegeben.

Alle Medien wurden für 60 min bei 121 °C und 1.2 bar autoklaviert. Zur Selektion der Plasmid-DNA wurde ein entsprechendes Antibiotikum zugegeben, da die verwendeten Vektoren immer ein Antibiotika-Resistenzgen trugen (Ampicillin 50 µg/ml, Kanamycin 30 µg/ml).

Die für diese Arbeit klonierten Bakterienstämme wurden als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert. In 2-ml-Kryoröhrchen wurden jeweils 700 µl steriles Glycerin und 700 µl Bakteriensuspension gegeben und gut gemischt.

7.4.3 Transformation

Die neu konstruierten Plasmide wurden wie folgt transformiert:

20 µl der ultrakompetenten *Escherichia coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit ca. 1 ng der zu transformierenden DNA versetzt. Die Zellsuspension wurde zunächst 30 min auf Eis gelegt. In dieser Zeit können die Plasmide in die Zellen eindringen. Danach wurde sie einem Hitzeschock unterzogen (45 s bei 42 °C), um die Replikation der Plasmid-DNA zu aktivieren. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 800 µl SOC-Medium zugegeben und die Mischung 1 h bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die Reparatur der Zellwand und die Expression der Antibiotikaresistenzproteine.

Zum Schluss wurde das Gemisch auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Einzelkolonien in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum transferiert und vermehrt.

7.5 Molekularbiologische Verfahren

7.5.1 Plasmidpräparation

Minipräparation

Durch die Minipräparation wurde Plasmid-DNA aus 5 ml-Kulturen zur Analyse der Ligationen und Klonierungen gewonnen. Bei diesem Verfahren wurde der NucleoSpin®Plasmid-Kit von *Macherey-Nagel* (Düren) benutzt, mit einer Ausbeute von 10-30 µg Plasmid-DNA.

Dabei wurden die pelletierten Zellen resuspendiert, mit RNase behandelt und dann in einem NaOH/SDS-Puffer bei pH 13.0 lysiert, wobei die chromosomale und makromolekulare DNA denaturiert. Nach darauf folgender Neutralisierung mit einem Kaliumacetat-Puffer bei pH 4.0 wurden chromosomale DNA, Zellwandbestandteile und SDS präzipitiert und anschließend abzentrifugiert. Die Plasmid-DNA bleibt im Überstand, welcher auf eine Silikat-Säule gegeben wurde. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 mM Tris-HCl bei pH 8.5 eluiert.

Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (siehe auch (Birnboim 1983)).

Maxipräparation

Durch die Maxipräparation wurden größere Mengen an Plasmid-DNA (ca. 500 µg), die für die Transfektionen der Zellen benötigt wurden, aus 400 ml-Kulturen gewonnen.

Dazu wurde der Nucleobond®AX-Kit von *Macherey-Nagel* verwendet. Das Präparationsprinzip ist dem der Minipräparation ähnlich. Die Bindung und Elution der DNA erfolgte hier mittels Anionenaustauscher. Dabei wurde die DNA unter Niedrigsalz-Bedingungen an die Säule gebunden und bei hohen Salzkonzentrationen (15 % EtOH, 100 mM Tris/H₃PO₄, 1 M KCl, pH 8.5) eluiert.

7.5.2 Enzymatische Reaktionen

Restriktionsschnitte

Restriktionsspaltungen zur qualitativen Analyse der DNA nach Ligationen fanden unter geeigneten Bedingungen (siehe Protokoll des Herstellers) in 20 µl-Ansätzen statt. Ca. 1 µg DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym bei 37 °C für 1.5 h inkubiert. Die geschnittene DNA wurde anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

Für präparative Restriktionsspaltungen zur späteren Klonierung wurden 15 µg DNA mit 15 U Restriktionsenzym in 300 µl bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die spätere Entfernung der Enzyme bzw. die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem NucleoSpin®Extract-Kit von *Macherey-Nagel* oder bei größeren, geschnittenen Fragmenten (≥ 100 bp) durch ein quantitatives Gel mit späterer Gelextraktion der DNA (auch NucleoSpin®Extract-Kit). Bei der Aufreinigung nach dem Protokoll des Herstellers wurde die DNA bei hohen Salzkonzentrationen an eine Silikat-Säule gebunden. Bei Gelextraktion der DNA werden die Gelstücke vorher durch Erhitzen bei 50 °C in einem Puffer gelöst und dann auf die Silikat-Säule gegeben. Durch einen Waschschrift werden die verbleibenden Enzyme oder Primer (nach PCR) entfernt. Die DNA wird anschließend mit 5mM Tris-Puffer bei pH 8.5 eluiert.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von der Firma *Fermentas GmbH* (St. Leon-Rot).

Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion ist die enzymatische Vermehrung eines gewünschten DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre Stränge gebunden sind. Die PCR erfolgt in 3 Stufen:

- Die Oligonukleotid-Primer werden im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen (50 °C, 30 s) zu einer DNA-Präparation gegeben, bei der zuvor die DNA-Doppelstränge denaturiert wurden.
- Die DNA-Taq-Polymerase katalysiert die Primerverlängerung in 5'-3'-Richtung (72 °C, 60 s).
- Die entstandenen DNA-Synthese-Produkte werden bei hohen Temperaturen denaturiert (96 °C, 30 s).

Die Zyklen – Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese – wurden mehrfach wiederholt (hier 33mal). Dabei wurden minimale Mengen an DNA (ca. 500 ng) um das Millionenfache amplifiziert. Es wurde eine hitzebeständige Taq-Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) verwendet.

Die PCRs wurden mit dem PCR Master Mix von *Promega* (Madison, WI, USA) in einem T3 Thermocycler ausgeführt. 100 µl Reaktionsansatz enthielten: 5 U Taq-Polymerase, 500 ng der zu vervielfältigenden DNA, je 0.01 mM der Primer, je 0.4 mM dNTPs in 3 mM MgCl₂-Puffer, pH 8.5. Anschließend wurden die Oligonukleotide und Polymerase mit dem NucleoSpin[®]Extract-Kit von *Macherey-Nagel* nach dem Herstellerprotokoll entfernt (siehe oben). Zum Schluss wurden die PCR-Fragmente zur späteren Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten.

Sämtliche verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden freundlicherweise von Wolfgang Weinig (DKFZ) synthetisiert.

Ligation

Zur Ligation von Vektor-DNA mit einem gewünschten DNA-Fragment wurde die T4 DNA-Ligase von *New England Biolabs* verwendet. DNA-Ligasen katalysieren die kovalente Verknüpfung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe eines Nukleotids und dem 3'-OH-Ende eines anderen. Mit der T4-Ligase können sowohl kohäsive als auch glatte Enden verknüpft werden.

Die Ligationen fanden in einem Volumen von 20 µl statt. Jeweils 250 ng Vektor und Insert-DNA wurden in einem Puffer von 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP und 25 µg/ml BSA bei pH 7.5 mit 1 µl = 400 U T4-Ligase über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend in Bakterien transformiert (siehe Kap 1.5.2).

7.5.3 DNA-Sequenzierung

Sämtliche neu klonierten Plasmide wurden zur Kontrolle sequenziert. Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Herrn Andreas Hunziker (DKFZ) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *DNA-Strider 3.1* (Macintosh) mit den Originalsequenzen aus der Literatur bzw. aus einer Datenbank verglichen. Alle Sequenzen stimmten mit den Originalsequenzen der Ursprungsplasmide überein.

7.5.4 Gelelektrophorese

Agarosegele

Die Plasmid-DNA der Mini- und Maxipräparationen und der Kontrollsnitte wurde auf 1 %iger-Agarose in 6.5 × 10 cm (Minipräparation) bzw. 18 × 18 cm (Maxipräparationen) Flachbettgelkammern (*NeoLab*, Heidelberg) untersucht. Die Auftrennung erfolgte in einem 1X TAE Puffer (40 mM Tris, 1.14 % (v/v) Eisessig, 1.0 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA), pH 8.0) für ca. 2 h bei 100 V (Minigel) bzw. über Nacht bei 40 V (Maxigel). Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) für 10-20 min angefärbt. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung mit Hilfe einer CCD-Kamera fotografiert und als TIF-Datei mittels des Programms BioDocAnalyzer (*Biometra*) digitalisiert.

Native Polyacrylamidgele

PCR-Produkte wurden in nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophoresen (PAGE) aufgetrennt. Es wurden 8 %ige PA-Gele in einem 1X TBE-Laufpuffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2.0 mM EDTA, pH 8.0) benutzt. 10 ml Gellösung wurden wie folgt hergestellt:

- 2 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 1 ml 10X TBE

- 0.2 ml 10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS)
- 6.8 ml bidestilliertes Wasser
- Zugabe von 15 µl TEMED (*N, N, N', N'*-Tetramethylethyldiamin) kurz vor dem Gießen des Gels zwischen 2 Glasplatten (8 × 10 cm)

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurden die Taschen mit der DNA in einem 5X Ladepuffer (25 mM Tris-HCl, 150 mM EDTA, 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % Glycerin, pH 7.0) beladen und die DNA für 90 min bei einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Die nativen Polyacrylamidgele wurden wie die Agarosegele angefärbt und dokumentiert.

Denaturierende SDS-Gele

Die AP-1-Proteine c-Jun, c-Fos und Fra1 aus den Zelllysaten wurden für einen folgenden Western-Blot unter denaturierenden Bedingungen (SDS, Sodium Dodecyl Sulfate) getrennt. Zwischen dem 5 %igen Sammelgel (ca. 1.5 cm Laufstrecke) und dem 12 %igen Trenngel bestand ein pH-Sprung von 6.8 auf 9.0. Das 12 %ige Trenngel setzte sich wie folgt zusammen:

- 3 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 2.5 ml 1 M Tris pH 9.0
- 0.1 ml 10% APS
- 0.1 ml 10% SDS
- 4.3 ml Wasser
- 15 µl TEMED

und das 5 %ige Sammelgel:

- 1.7 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)
- 1.3 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8
- 0.1 ml 10% APS
- 0.1 ml 10 % SDS
- 6.8 ml Wasser
- 15 µl TEMED

Beim Gießen wurde das Trenngel zunächst mit Wasser überschichtet, bevor das Sammelgel gegossen wurde. Die Gele (8 × 10 cm) wurden mindestens 2 h und maximal 12 h auspolymerisiert. Die Proteine wurden in einem 2X SDS-Ladepuffer (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % (v/v) Glycerin, 2 % (v/v) SDS, 300 mM

Mercaptoethanol und 0.1 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen, 15 min bei 90 °C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in einem SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0.1 % (v/v) SDS, pH 8.3) bei einer Spannung von 150 V für 90 min.

Das Gel wurde entweder für 15 min in Coomassie (Maniatis et al. 1982) oder mit Silber nach (Wray et al. 1981) gefärbt und anschließend unter Weißlicht fotografiert (BioDocAnalyzer, *Biometra*).

Western-Blots

Zum Nachweis der endogenen und markierten AP-1-Proteine wurden die Zelllysate (siehe Kap 1.5) nach dem oben beschriebenen Protokoll zunächst elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel getrennt. Das Gel wurde dann für 5 min in einem Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, 175 mM Glycin, 15 % (v/v) Methanol) geschwenkt. Drei zurechtgeschnittene (8 × 10 cm) Gel-Blotting-Papierstücke (*Schleicher und Schuell*) und die Nitrocellulose-Membran (*Hybond ECL, Amersham*) wurden kurz im Transferpuffer geschwenkt und anschließend blasenfrei auf die Anodenseite der Blottingkassette (Transfer 180, *ABL Scientific*) gelegt. Darauf wurden anschließend das Polyacrylamidgel und drei weitere Gel-Blotting-Papierstücke gebettet. Das semidry-Blotting erfolgte dann bei einer konstanten Stromstärke von 225 mA für die Dauer von 1 h. Die Membran wurde anschließend über Nacht in einem Blocking-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % (v/v) Tween-20, 10 % (w/v) Milchpulver, pH 7.6,) geschwenkt, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Nitrocellulose-Membran zu vermeiden. Nach drei Waschschritten von je 5 min mit 1X TBS/T (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.6, 0.1 % (v/v) Tween-20) wurden die Antikörper appliziert. Dazu wurde die Membran mit 5 ml einer 1:500-Verdünnung der primären Antikörper-Stammlösung gegen c-Jun, c-Fos bzw. Fra1 (polyklonaler rabbit IgG, *Santa Cruz Biotechnology*) in Blocking-Puffer in Folie eingeschweißt und für 2 h inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für jeweils 5 min in TBS/T gewaschen und danach mit dem sekundären, anti-rabbit-HRP (Horseradish Peroxidase)-Antikörper (1:1000-Verdünnung) wie oben beschrieben inkubiert und erneut mit TBS/T gewaschen. Die Detektion der Peroxidase erfolgte mittels Chemolumineszenz: Es wurden je 0.5 ml einer Luminol- und Peroxid-Lösung (*New England Biolabs, Beverly MA, USA*) in

10 ml Wasser verdünnt, auf der Membran verteilt und 1 min geschwenkt. Nach dem Dekantieren der Lösung wurde die Membran in eine Kassette gelegt, mit *Kimwipes* abgetupft und in den darauf folgenden Minuten ein *Kodak*-Film (X-Omat) in der Dunkelkammer für 20 s belichtet und danach in der Abteilung A. Poustka (DKFZ) (CURIX HAT-330, *Agfa*) entwickelt.

7.6 Zellbiologische Verfahren

7.6.1 Zellkultur

Adhärente HeLa-Zellen (ATCC CCL 2) wuchsen in phenolrotfreiem RPMI-Medium 1640 (*Invitrogen*) mit 10 % fötalem Kälberserum in einer 5 %igen CO₂-Atmosphäre und bei einer Temperatur von 37 °C. Zweimal pro Woche wurden die Zellen umgesetzt, indem sie zunächst mit einem Hanks-Puffer (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.4 mM MgSO₄·7 H₂O, 0.5 mM MgCl₂·6 H₂O, 0.35 mM Na₂HPO₄·2 H₂O, 0.44 mM KH₂PO₄, 2 mM HEPES, pH 7.4) gewaschen und dann mit einer 0.125 % (w/v) Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Gewebekulturflaschen gelöst wurden. Die Zellen wurden dann 1:10 bzw. 1:20 in Medium verdünnt und in Gewebekulturflaschen neu angelegt.

Für FCS- und FCCS-Messungen wurden die Zellen in der Regel zwei Tage vorher auf gekammerten Deckgläsern (*Nunc*) angelegt, damit sie am Tag der Messung subkonfluent und fest angewachsen waren. Dazu wurden je 20000 Zellen in 0.4 ml Medium in die Kammern (8-kammerige Küvetten) gegeben. Die Zellzählung erfolgte in Neubauerkammern.

7.6.2 Transfektionen

Zur Messung der markierten Proteine, die nicht stabil in Zellen exprimiert wurden oder für Zwei-Farben-FCCS-Messungen, wurden HeLa-Zellen bzw. stabil transfizierte HeLa-Zellen zwei Tage vor der Messung in der Messkammer angelegt und am folgenden Tag mit dem gewünschten Vektor mittels Transfektionsreagenz TransFectin™ von *BioRad* nach einem leicht optimierten Protokoll des Herstellers transfiziert (0.01 µg DNA + 0.03 µl TransFectin™ pro Kammer).

Es wurden stabile Zelllinien mit Hilfe von Antibiotika-Selektionsdruck (Neomycin/G418) von folgenden Vektoren etabliert:

- pSV-c-Jun-EYFP
- pSV-c-Fos-EGFP
- pSV-c-Fos-ECFP
- pSV-c-Fos-EGFP
- pSV-Fra1-EYFP
- pSV-Fra1-ECFP
- pSV-c-Jun Δ Dim Δ DNA-EYFP
- pSV-c-Fos Δ Dim-EGFP
- pSV-c-Fos Δ Dim Δ DNA-EGFP

Stabile Zelllinien wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGene 6 (*Roche Diagnostics*) nach einem optimierten Protokoll des Herstellers etabliert. Alle übrigen Plasmide wurden transient exprimiert.

7.6.3 Zellzyklus-Messungen

Für die FCS-Messungen von Zellen in verschiedenen Zellzyklus-Phasen mussten die Zellen in der jeweiligen Phase inhibiert werden. Dazu wurden die Zellen zunächst wie folgt synchronisiert: die Zellen wurden in einer Gewebekulturflasche angelegt. Nachdem die Zellen sub-konfluent waren, wurden sie vorsichtig mit einem Hanks-Puffer gewaschen. Die mitotischen Zellen wurden dabei durch Scherkräfte (nicht durch Trypsinieren!) vom Boden der Flasche gelöst und in Medium aufgenommen. Je 20000 Zellen in 0.4 ml Medium wurden in die Kammern der 8-kammerigen Messküvetten gegeben.

Nach 4 Stunden (2.5 μ g/ml Aphidicolin) bzw. 24 Stunden (6 mM Natriumbutyrat) wurde das entsprechende Reagenz (Aphidicolin bzw. Natriumbutyrat, *Sigma*) zu den Zellen gegeben, um sie in der G1/S-Phase zu inhibieren bzw. in die Apoptose zu führen. 24 Stunden (Aphidicolin) bzw. 48 Stunden (Natriumbutyrat) nach Inkubation mit dem Reagenz wurden die Zellen schließlich gemessen.

7.6.4 Zelllysate

Zelllysate für Western-Blots wurden nach einem von *Santa Cruz Biotechnology* empfohlenen Protokoll hergestellt:

- 10-cm-Kulturschalen wurden mit den entsprechenden Zellen angelegt. Nachdem diese sub-konfluent gewachsen waren, wurde das Medium abgeschüttet und die Schalen mit PBS-Puffer (136 mM NaCl, 15 mM KCl, 7.9 mM Na₂HPO₄, 1.7 mM KH₂PO₄, pH 7.4) bei Raumtemperatur gewaschen.
- Bei 4 °C wurden 0.6 ml RIPA-Puffer (1 % (v/v) NP40, 0.1 % (v/v) SDS, 0.5 % (w/v) Natriumdeoxycholat in 1X PBS bei pH 7.4) zugegeben und die Platten für 15 min geschwenkt. Zuvor wurde der RIPA-Puffer mit Proteasehemmern (0.22 µM Aprotinin, 2 µM Leupeptin, 2 mM Pefabloc SC) versetzt.
- Nach 15 min wurden die Zellen von der Platte gelöst und das gewonnene Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt.
- Das Zelllysate wurde 10 min bei 10000 × g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann im Western-Blot analysiert.

Bei dieser Präparation erhielt man sowohl Kernproteine als auch zytoplasmatische Proteine.

Zelllysate für die *in vitro* FCS-Messungen der autofluoreszierenden Proteine wurden nach einem anderen Protokoll zubereitet. Nach diesem Protokoll erhält man nur die Proteine aus dem Zytoplasma.

- Der Überstand wurde von der Kulturschale dekantiert und die Platte mit einem isotonischem Tris-Puffer (137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM MgCl₂, 0.7 mM CaCl₂, 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) gewaschen.
- Der restliche Puffer wurde abpipettiert und die Zellen mit einem hypotonischem Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.5) gewaschen. Der restliche Puffer wurde erneut abpipettiert.
- Nachdem die Zellen 5 min gequollen waren, wurden diese von der Platte abgelöst und in einen Homogenisator (Douncer) überführt.
- Die Zellsuspension wurde zwölfmal im Douncer zerkleinert und dann für 5 min bei 3000 × g zentrifugiert.

- Der Überstand wurde dann 1:10 mit isotonischem Tris-Puffer pH 7.4 verdünnt und konnte in der FCS gemessen werden.

7.7 Fluorimeter

Sämtliche Fluoreszenzspektren wurden bei Raumtemperatur in einem Fluoreszenzspektralphotometer SLM-Aminco 8100 gemessen. Als Lichtquelle diente eine 150 W Xenon-Lampe, mit der über Monochromatoren und Blenden (Schlitzweite 4 mm bzw. 8 mm), eine dreifenstrige Quarzküvette (50 µl, 3 mm, *Hellma*, Müllheim) beleuchtet wurde. Es wurde gegen eine interne Referenz bei einer Spannung von 900 V für den Photomultiplier PMT 1 und 300 V für PMT 2 gemessen. Emissionsspektren wurden zwischen 450 nm und 700 nm aufgenommen. Für Messungen mit EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) wurde bei 475 nm angeregt, für EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) bei 515 nm und für mRFP1 (monomeric Red Fluorescent Protein1), DsRed2 (*Discosoma striata* Red2) bzw. eqFP611 (*Entacmaea quadricolor* Fluorescent Protein 611) bei 550 nm. ECFP (Enhanced Cyan Fluorescent Protein) wurde bei 440 nm angeregt.

Zellsuspensionen wurden in einem Hanks-Puffer bei einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen/ml gemessen. Die numerische Behandlung der aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Programm *Kaleidagraph* an einem Macintosh-Computer. Für FRET-Berechnungen wurde das Signal in einem spektralen Bereich von 15 nm um das jeweilige Maximum integriert.

7.8 Absorptionsspektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit dem Spektralphotometer Cary 4E gemessen. Mit diesem Gerät können Spektren in einem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 750 nm mit einer Genauigkeit von 0.001 OD (Optische Dichte) aufgenommen werden. Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen über die Absorption bei 260 nm wurde mit $1 \text{ OD} = 50 \text{ µg/ml}$ gerechnet. Konzentrationsbestimmungen von Fluorophoren erfolgten bei dem jeweiligen Emissionsmaximum mit Hilfe der literaturbekannten Absorptionskoeffizienten nach dem Lambert-Beerschen Gesetz. Alle Messungen

wurden bei Raumtemperatur in Quarzküvetten mit einem Lichtweg von 3 mm durchgeführt.

7.9 Fluoreszenzfluktationsmikroskopie (FFM)

Alle Auto- und Kreuzkorrelationsmessungen wurden in einem Fluoreszenzfluktationsmikroskop (FFM) (Wachsmuth 2001) ausgeführt, welches in dieser Abteilung konstruiert wurde. Der Aufbau kombiniert ein FCS/FCCS-Modul (Tewes et al. 1996; Tewes 1998) mit einem Zwei-Achsen-Galvanometer-Scanner, der an den Videoausgang eines inversen IX-70 Mikroskops (*Olympus*, Hamburg) mit einem UplanApo 60X, 1.2 Wasserimmersions-Objektiv (*Olympus*) montiert ist.

Intrazelluläre Messungen wurden in einer Inkubatorkammer durchgeführt (EMBL, Heidelberg), die auf das Mikroskop montiert ist. So war es möglich, Zellen bei optimalen Bedingungen ($T = 37\text{ °C}$, 5 % CO_2) und damit länger als 2-3 Stunden (gegebenenfalls auch über Nacht) zu messen.

Die EGFP- und EYFP-Fluoreszenz wurde durch die 488-nm-Linie eines Argon-Krypton-Lasers von *Omnichrome (Melles Griot, Bensheim)* angeregt und zwischen 515 nm und 545 nm mit Hilfe von Avalanche-Photodioden (SPCM-AQR-13, *Perkin-Elmer*, Wellesley, MA, USA) durch einen Bandpassfilter (530DF30) detektiert. Die DsRed2-, eqFP611- und mRFP1-Fluoreszenz wurde mit der 568-nm-Linie des Argonlasers angeregt und durch einen Bandpassfilter (635DF55) zwischen 608 nm und 662 nm detektiert. Für Zwei-Farben-Messungen wurden zwei dichroitische Strahlteiler (490-577DBEX und 490-575DBDR) für die Anregung eingesetzt. Die ECFP-Fluoreszenz wurde durch die 440-nm-Linie eines Helium-Cadmium-Lasers von *Plasma (TOPAG Lasertechnik GmbH, Darmstadt)* angeregt und zwischen 465 nm und 495 nm durch einen Bandpassfilter (480AF30) detektiert. Alle Filter stammten von der Firma *Omega Optical* (Brattleboro, VE, USA).

Mittels der Kontroll- und Steuerungssoftware, die in unserem Labor entwickelt wurde (Wachsmuth 2001), konnten sowohl Konfokal- als auch Durchlicht-Aufnahmen von Zellen gemacht werden, mit Hilfe derer dann der Laser mit einer Genauigkeit von 50 nm für die FCS- und FCCS-Messungen positioniert werden konnte. Die Fluoreszenzfluktationen wurden von einer ALV-5000/E Korrelator-Karte (*ALV Laser GmbH, Langen*) aufgenommen.

Die vom Korrelator ausgegebenen Autokorrelationsfunktionen wurden mit einem in der Abteilung entwickelten Programm ausgewertet (*Quickfit*). Die Gl. 4.11 bzw. 4.17 (siehe Kap. 4) konnten interaktiv über einen Marquardt-Levenberg-Algorithmus an die gemessenen Kurven angepasst werden. Verschiedene Modellfunktionen konnten damit ausgewählt werden, Parameter als Startwerte vorgegeben oder bei Anpassung fixiert werden. Über einen iterativen Prozess konnten die Abweichungen der Modellfunktion von der Messkurve minimiert werden. Die angepassten Kurven, sowie alle daraus errechneten Parameter, konnten als Textdateien exportiert werden. FCS-Messungen in freier Lösung wurden bei einer Fokustiefe von 50 μm relativ zum Laserreflex in z -Richtung gemessen, FCS- und FCCS-Messungen in Zellen hingegen bei einer Fokustiefe von 5 μm . Die Position des Deckglases konnte vor der Messung festgestellt werden, indem die Reflexionen des Anregungslichtes über das Okular beim Durchfahren des z -Bereiches beobachtet wurden. Die Koordinaten konnten dann im Mikroskopprogramm FFM auf die Grenzfläche zwischen Probe und Deckglas zurückgesetzt werden, was eine relative Orientierung in z -Richtung erlaubte.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung zwischen den AP-1-Komponenten c-Fos und c-Jun mit der so genannten „Zwei-Hybrid“-Fluoreszenz Kreuzkorrelationspektroskopie *in vivo* nachgewiesen. Des Weiteren wurden die Mobilität und die Dynamik dieses Komplexes in lebenden Zellen charakterisiert.

AP-1 (Aktivator Protein-1) ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Komponenten nur als Dimere ihre Funktion ausüben können, wobei c-Jun und c-Fos die Hauptkomponenten sind.

Mit der FCCS können Wechselwirkungen zweier Fluorophore aufgrund ihrer korrelierten Bewegung nachgewiesen werden. Das Prinzip der FCCS beruht auf der gleichzeitigen Anregung und Detektion zweier Fluorophore in einem konfokalen Mikroskopaufbau. Die Intensitätsfluktuationen in beiden Kanälen werden über Kreuz korreliert. Zur Kreuzkorrelation tragen nur Teilchen bei, die in beiden Kanälen gleichzeitig ein Signal erzeugen, d.h. die beide Farben simultan durch das Beobachtungsvolumen tragen. In der „Zwei-Hybrid“-FCCS werden als Fluorophore ausschließlich autofluoreszierende Proteine (AFP) statt organisch-chemischer Farbstoffe eingesetzt. Dies hat den großen Vorteil, dass die Proteine nicht aufgereinigt, dann chemisch markiert und schließlich in die Zelle mikroinjiziert werden müssen, sondern direkt von der Zelle als Fusionsprotein *in vivo* exprimiert werden und ohne weitere Eingriffe in die Zelle gemessen werden können. Unter den getesteten AFPs (EYFP, ECFP, EGFP, DsRed2, mRFP1 und eqFP611) war das Chromophorpaar EGFP-mRFP1 das einzige, das zum Erfolg führte.

Der FCCS-Aufbau wurde *in vivo* einerseits mit einem Fusionsprotein aus EGFP und mRFP1 als Referenz für 100 % Kreuzkorrelation und andererseits mit den zwei über einen IRES-Vektor getrennt exprimierten EGFP und mRFP1 als Negativkontrolle für fehlende Wechselwirkung kalibriert. Es wurden Fusionsproteine von c-Jun und mRFP1 bzw. c-Fos und EGFP, sowie von deren Deletionsmutanten c-Jun $\Delta\Delta$ und c-Fos $\Delta\Delta$, denen die Dimerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne fehlte, hergestellt. Während die AP-1 Deletionsmutanten eine Kreuzkorrelationsamplitude von $18 \% \pm 4 \%$ lieferten, vergleichbar mit der Negativkontrolle von $13 \% \pm 3 \%$, zeigte das AP-1-System eine signifikante Kreuzkorrelationsamplitude von $31 \% \pm 6 \%$. Im Vergleich dazu lieferte die Positivkontrolle, das Fusionsprotein aus EGFP und

mRFP1, eine Amplitude von $45 \% \pm 4 \%$. Außerdem zeigte das AP-1-System nur eine langsam diffundierende Komponente, was darauf schließen lässt, dass alle markierten Fos-Jun Dimere an DNA gebunden sind.

So konnte mit der „Zwei-Hybrid“-FCCS sowohl die Wechselwirkung zwischen c-Jun und c-Fos als auch die Bindung dieses Komplexes an DNA nachgewiesen werden. Diese Methode eignet sich somit sehr gut, um Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* zu charakterisieren.

9 Abstract

In this work the interactions between the AP-1 components c-Fos and c-Jun were characterised *in vivo* by the use of „Two-Hybrid“-Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy (THFCCS). Furthermore the mobility and dynamics of the AP-1 complex were studied.

AP-1 (Activator Protein-1) is a transcription factor, which is known to exert its function as a dimer, whereby c-Fos and c-Jun are the major components.

Interactions between two fluorophores can be detected via Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy (FCCS) by their correlated motion. The principle of FCCS is based upon the simultaneous excitation and detection of two fluorophores in an confocal microscope setup. The fluctuations of the intensity in both channels are cross-correlated. Only particles that induce a signal in both channels simultaneously contribute to the cross-correlation function.

In THFCCS, autofluorescent proteins (AFPs) instead of small organic dyes are used. This way, the interaction partners do not need to be purified, chemically labeled and microinjected into the cell. The AFPs were directly expressed as a fusion protein by the cells in their natural environment. Among the tested AFPs (EYFP, ECFP, EGFP, DsRed2, mRFP1 and eqFP611) only the chromophore pair EGFP-mRFP1 gave satisfactory cross-correlation signals upon protein-protein binding.

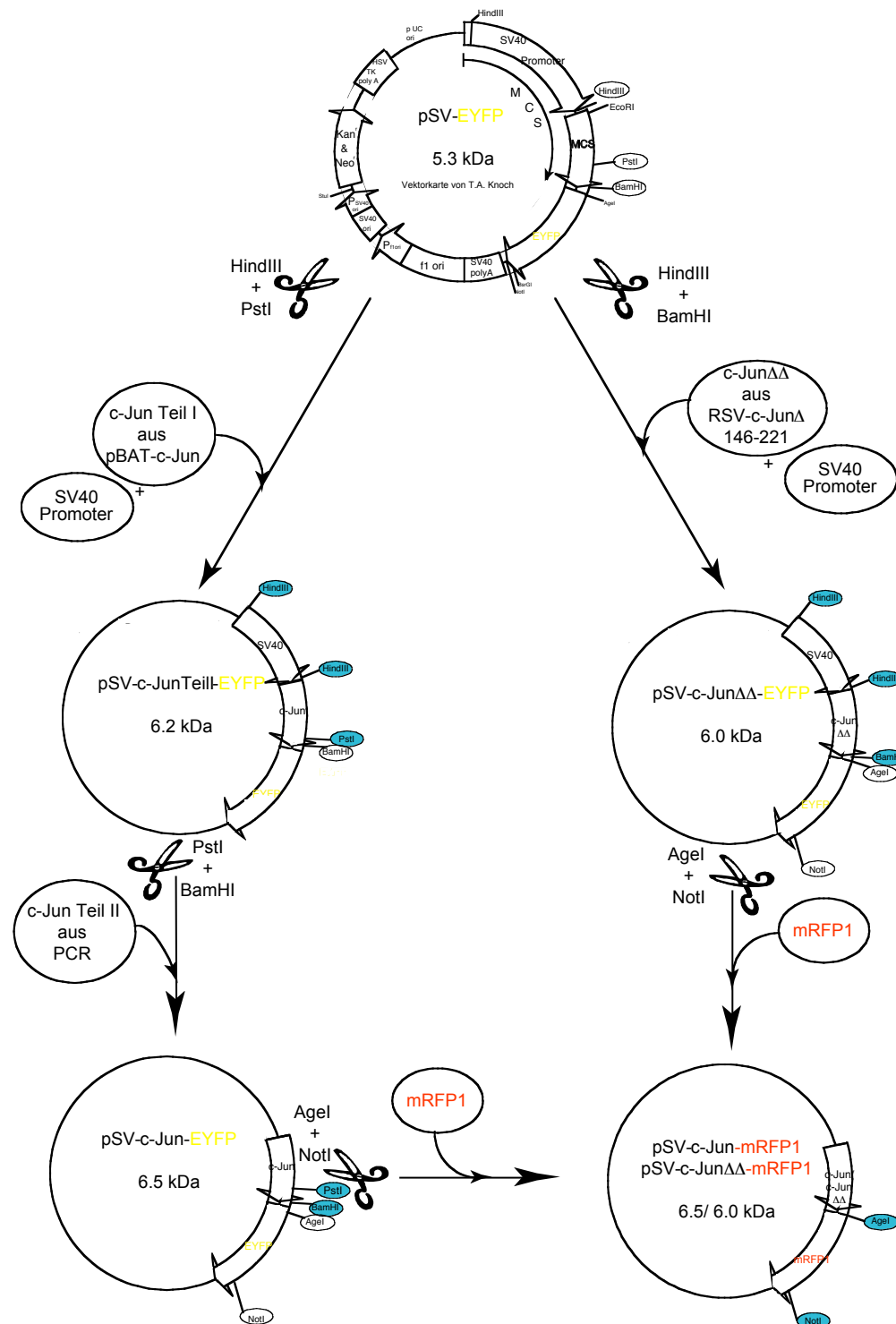
The FCCS setup was calibrated *in vivo* on one hand with a fusion construct of EGFP and mRFP1 as reference for 100 % cross-correlation and on the other with the two separate proteins EGFP and mRFP1 as a negative control. In addition, fusion proteins of c-Jun and mRFP1 and c-Fos and EGFP as well as of their deletion mutants, which had the dimerisation and DNA-binding domains removed, were constructed. While the cross-correlation amplitude for the deletion constructs ($18 \% \pm 4 \%$) was at the background level of $13 \% \pm 3 \%$, cells that expressed the full-length protein showed an increased cross-correlation amplitude of $31 \% \pm 6 \%$. The cross-correlation amplitude of the EGFP-mRFP1 fusion construct was $45 \% \pm 4 \%$. Furthermore the cross-correlation function of the Fos-Jun complex shows only a slowly decaying component, indicating that all dimers are bound to DNA.

With this technique the interactions between c-Jun and c-Fos as well as the binding of their complex could be shown in living cells. It is conceivable that the THFCCS combined with a scanning system could be applied to screen protein-protein interactions.

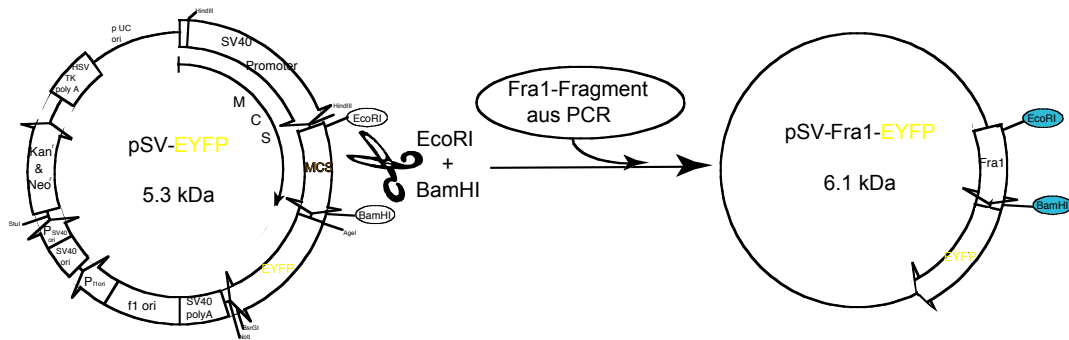
Anhang

Plasmidkarten & -konstruktion (zu Kapitel 7)

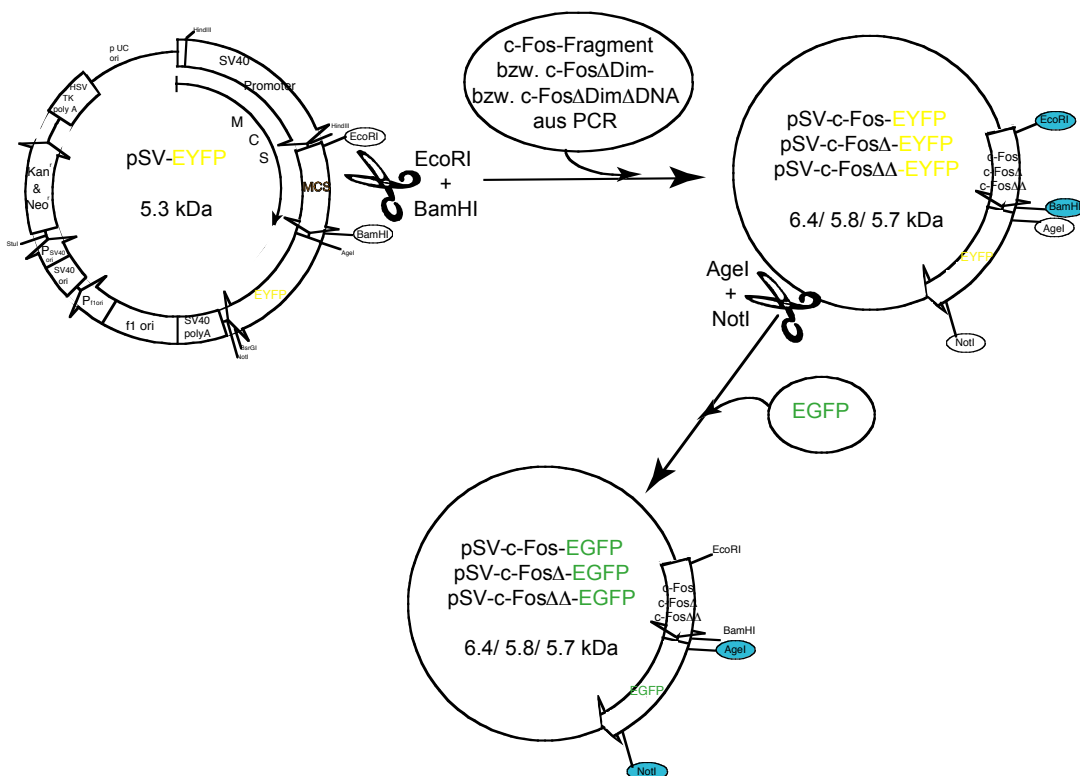
Konstruktion von pSV-c-Jun(c-Jun $\Delta\Delta$)-mRFP1



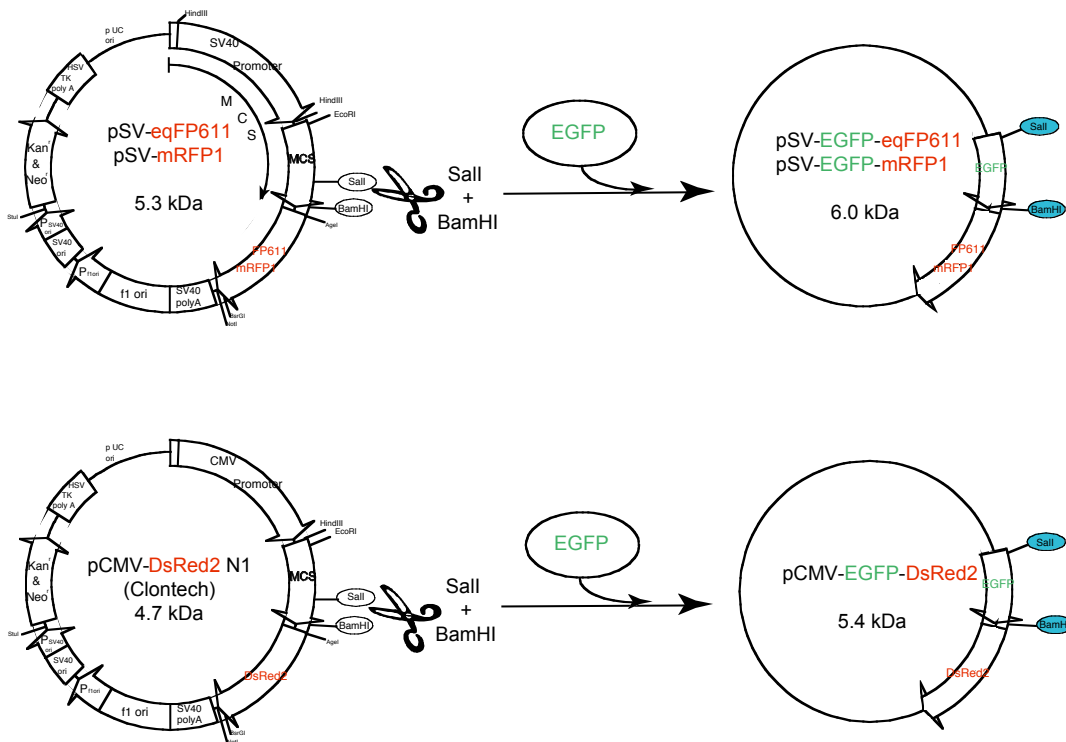
Konstruktion von pSV-Fra1-EYFP



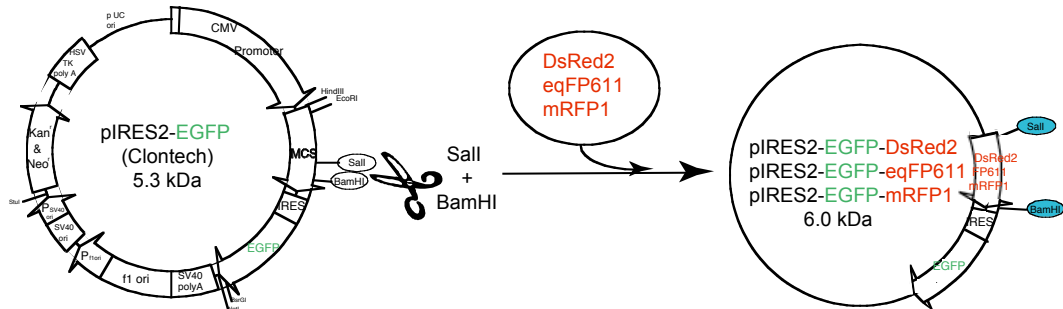
Konstruktion von pSV-Fos(Fos Δ , Fos $\Delta\Delta$)-EGFP



Konstruktion der Fusionsproteine EGFP-RFP



Konstruktion von pIRES-EGFP-RFP



Plasmidübersicht

Plasmid-name	Länge AP-1 Protein (bp)	MCS	AFP	Bp zw. AP-1 und AFP	Länge Fusion-protein (bp)	Größe (bp)
pSV-c-Jun- EYFP	996	HindIII BamHI	YFP	18	1734	6466
pSV-c-Jun- EGFP	996	AgeI- NotI	GFP	18	1734	6466
pSV-c-Jun- DsRed2	996	AgeI- NotI	DsRed2	18	1692	6424
pSV-c-Jun- eqFP611	996	AgeI- NotI	eqFP611	18	1710	6442
pSV-c-Jun- mRFP1	996	AgeI- NotI	mRFP1	18	1692	6424
pCMV-c-Jun- EGFP	996	HindIII BamHI	EGFP	18	1734	5900
pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ - EYFP	438	HindIII -BglII	YFP	18	1176	5908
pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ - eqFP611	438	HindIII -BglII	eqFP611	18	1152	5884
pSV-c-Jun $\Delta\Delta$ - mRFP1	438	HindIII -BglII	mRFP1	18	1134	5886
pSV-c-Fos- ECFP	1140	EcoRI- BamHI	CFP	18	1881	6388
pSV-c-Fos- EYFP	1140	AgeI- NotI	YFP	18	1899	6406
pSV-c-Fos- EGFP	1140	AgeI- NotI	EGFP	18	1881	6388
pSV-c-Fos- DsRed2	1140	AgeI- NotI	DsRed2	18	1839	6346
pSV-c-Fos Δ - EGFP	495	EcoRI- BamHI	EGFP	18	1236	5743
pSV-c-Fos $\Delta\Delta$ - EGFP	417	EcoRI- BamHI	EGFP	18	1158	5665
pSV-Fra1- ECFP	813	EcoRI- BamHI	CFP	18	1515	6100

pSV-Fra1- EYFP	813	AgeI- NotI	YFP	18	1536	6100
pSV-mRFP1	-	-	mRFP1	-	678	5300
pTRE						
pSV-c-Fos- ECFP dam-	1140		CFP	18	1881	6388
pTRE-c-Fos- ECFP	1140	EcoRI- XbaI	CFP	18	1881	5020
pTRE-c-Fos- EYFP	1140	AgeI- NotI	YFP	18	1881	5020
pTRE-c-Fos- EGFP	1140	AgeI- NotI	EGFP	18	1881	5020
pTRE-c-Fos- DsRed2	1140	AgeI- NotI	DsRed2	18	1839	4978
pET-17b- c-Jun-YFP- His	996	HindIII -NotI	YFP-His	18	1734	5300
pCMV- EGFP- DsRed2	720	Sall- BamHI	EGFP- DsRed2	18	1416	5400
pSV-EGFP- FP611	720	Sall- BamHI	EGFP- FP611	18	1434	6000
pSV-EGFP- mRFP1	720	Sall- BamHI	EGFP- mRFP1	18	1416	6000
pIRES2- EGFP- DsRed2	678	Sall- BamHI	EGFP+ DsRed2		2 Proteine	6000
pIRES2- EGFP- FP611	696	Sall- BamHI	EGFP+ FP611		2 Proteine	6000
pIRES2- EGFP- mRFP1	678	Sall- BamHI	EGFP+ mRFP1		2 Proteine	6000

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFP	Autofluoreszierendes Protein
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	Antioxidant-Responsive Element
AS	Aminosäure
ATF	Activating Transcription Factor
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
CCD	Charge Coupled Device
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
CRE	cAMP-Responsive Element
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DNS (desoxyribonucleic acid)
DsRed	<i>Discosoma striata</i> Red
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBFP	Enhanced Blue Fluorescent Protein
ECFP	Enhanced Cyan Fluorescent Protein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EqFP611	<i>Entacmaea quadricolor</i> Fluorescent Protein 611
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FCCS	Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy

FFM	Fluoreszenzfluktationsmikroskop
fl	Femtoliter
Fra1	Fos related antigene 1
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluoreszenzresonanzenergietransfer
Gl.	Gleichung
GTF	geometrische Transmissionsfunktion
HcRed1	<i>Heteractis crispa</i> Red1
HeLa	Henrietta Lacks
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz
IRES	Internal Ribosomal Entry Site
JNK	Jun N-terminale Kinase
Kap.	Kapitel
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Mol/Liter
MARE	MAF-Recognition Element
MCS	Multiple Cloning Site
MW	Molekulargewicht
mRFP1	monomeric Red Fluorescent Protein1
MRT	Magnetresonanztomographie
NLS	Nuclear Localisation Site
NPC	Nuclear Pore Complex
NP-40	Nonidet P-40
ns	Nanosekunden
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Pixel Distance
PMT	Photomultiplier
PSF	Point Spread Function
PT	Pixel Time
RNA	Ribonucleic Acid

RFP	Rot-fluoreszierendes Protein
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SRF	Serum Responsive Factor
SE	sensibilisierte Emission
STF	spektrale Transmissionsfunktion
SV 40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TCF	Ternary Complex Factor
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TIF	Tagged Image File
TPA	12- <i>O</i> -tetradecanoyl-phorbol-13-acetat
TRE	TPA-Responsive Element
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
µs	Mikrosekunden
UV	Ultraviolett
(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
<i>wt</i>	Wildtyp
XFP	X-beliebige spektrale Variante von GFP
ZP	Zytoplasma

Literaturverzeichnis

- Abate, C., D. Luk, R. Gentz, F. J. Rauscher, 3rd and T. Curran (1990). "Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(3): 1032-6.
- Alberts, B., A. B. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter (2004). Molekularbiologie der Zell. WILEY-VCH Verlag, Weinheim.
- Allegretto, E. A., T. Smeal, P. Angel, B. M. Spiegelman and M. Karin (1990). "DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos." J Cell Biochem **42**(4): 193-206.
- Angel, P., E. A. Allegretto, S. T. Okino, K. Hattori, W. J. Boyle, T. Hunter and M. Karin (1988). "Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1." Nature **332**(6160): 166-71.
- Angel, P., K. Hattori, T. Smeal and M. Karin (1988). "The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1." Cell **55**(5): 875-85.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich and M. Karin (1987). "Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor." Cell **49**(6): 729-39.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim Biophys Acta **1072**(2-3): 129-57.
- Bacia, K., I. V. Majoul and P. Schwille (2002). "Probing the endocytic pathway in live cells using dual-color fluorescence cross-correlation analysis." Biophys J **83**(2): 1184-93.
- Bacia, K. and P. Schwille (2003). "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy." Methods **29**(1): 74-85.
- Bergers, G., P. Graninger, S. Braselmann, C. Wrighton and M. Buslinger (1995). "Transcriptional activation of the fra-1 gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron." Mol Cell Biol **15**(7): 3748-58.
- Berne, B. and R. Pecora (1976). Dynamic Light Scattering. Wiley, New York.
- Birnboim, H. C. (1983). "A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA." Meth. Enzymol. **100**: 243-255.
- Bohmann, D., T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt and R. Tjian (1987). "Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1." Science **238**(4832): 1386-92.
- Boyle, W. J., T. Smeal, L. H. Defize, P. Angel, J. R. Woodgett, M. Karin and T. Hunter (1991). "Activation of protein kinase C decreases phosphorylation of c-Jun at sites that negatively regulate its DNA-binding activity." Cell **64**(3): 573-84.
- Brejce, K., T. K. Sixma, P. A. Kitts, S. R. Kain, R. Y. Tsien, M. Ormo and S. J. Remington (1997). "Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Proc. Natl Acad. Sci. USA **94**(6): 2306-11.

- Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2002). "A monomeric red fluorescent protein." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 7877-82.
- Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-5.
- Chattoraj, M., B. A. King, G. U. Bublitz and S. G. Boxer (1996). "Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer." Proc. Natl Acad. Sci. USA **93**(16): 8362-7.
- Chida, K., S. Nagamori and T. Kuroki (1999). "Nuclear translocation of Fos is stimulated by interaction with Jun through the leucine zipper." Cell Mol Life Sci **55**(2): 297-302.
- Chinenov, Y. and T. K. Kerppola (2001). "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." Oncogene **20**(19): 2438-52.
- Clontech (2000). BD Living Colors User Manual. Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA.
- Clontech (2002). BD Living Colors RCFP Licensing Program. Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA.
- Clontech (2003). BD Living Colors Fluorescent Proteins. Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA.
- Cohen, D. R. and T. Curran (1988). "fra-1: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen." Mol Cell Biol **8**(5): 2063-9.
- Cohen, D. R., P. C. Ferreira, R. Gentz, B. R. Franza, Jr. and T. Curran (1989). "The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes." Genes Dev **3**(2): 173-84.
- Creemers, T. M., A. J. Lock, V. Subramaniam, T. M. Jovin and S. Volker (1999). "Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning [published erratum appears in Nat Struct Biol 1999 Jul;6(7):706]." Nat Struct Biol **6**(6): 557-60.
- Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin and R. J. Davis (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." Cell **76**(6): 1025-37.
- Dross, N. (2004). "Diffusion des rot-fluoreszierender Proteins eqFP611 in lebenden HeLa-Zellkernen in der Interphase." Diplomarbeit. Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Eferl, R. and E. F. Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **3**(11): 859-68.
- Elson, E. L. and D. Magde (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory." Biopolymers **13**: 1-27.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Ann. Phys. **2**: 55-75.
- Forwood, J. K., M. H. Lam and D. A. Jans (2001). "Nuclear import of Creb and AP-1 transcription factors requires importin- beta 1 and Ran but is independent of importin-alpha." Biochemistry **40**(17): 5208-17.
- Gehlen, L. (2004). "Untersuchungen zur Mobilität von Chromosomen in *Saccharomyces cerevisiae*: Fluoreszenzspektroskopie und Brownsche-

- Dynamik Simulation." Diplomarbeit. Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Glover, J. N. M. and S. C. Harrison (1995). "Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-fos-c-jun bound to DNA." Nature **373**(6511): 257-261.
- Gross, L. A., G. S. Baird, R. C. Hoffman, K. K. Baldrige and R. Y. Tsien (2000). "The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(22): 11990-5.
- Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, M. E. Greenberg and P. Leder (1988). "c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities." Cell **55**(5): 917-24.
- Haluska, F. G., K. Huebner, M. Isobe, T. Nishimura, C. M. Croce and P. K. Vogt (1988). "Localization of the human JUN protooncogene to chromosome region 1p31-32." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(7): 2215-8.
- Hattori, K., P. Angel, M. M. Le Beau and M. Karin (1988). "Structure and chromosomal localization of the functional intronless human JUN protooncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(23): 9148-52.
- Haupts, U., S. Maiti, P. Schwille and W. W. Webb (1998). "Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy." Proc. Natl Acad. Sci. USA **95**(23): 13573-13578.
- Heikal, A. A., S. T. Hess, G. S. Baird, R. Y. Tsien and W. W. Webb (2000). "Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine)." Proc. Natl Acad. Sci. USA **97**(22): 11996-2001.
- Heinze, K. G., M. Rarbach, M. Jahnz and P. Schwille (2002). "Two-Photon Fluorescence Coincidence Analysis: Rapid Measurements of Enzyme Kinetics." Biophys J **83**: 1671-1681.
- Hu, C. D., Y. Chinenov and T. K. Kerppola (2002). "Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation." Mol Cell **9**(4): 789-98.
- Hu, C. D. and T. K. Kerppola (2003). "Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis." Nat Biotechnol **21**(5): 539-45.
- Janson, W., G. Brandner and J. Siegel (1997). "Butyrate modulates DNA-damage-induced p53 response by induction of p53-independent differentiation and apoptosis." Oncogene **15**(12): 1395-406.
- Karin, M. (1995). "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases." J Biol Chem **270**(28): 16483-6.
- Karin, M., Z. Liu and E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 240-6.
- Kim, S. A., K. G. Heinze, M. N. Waxham and P. Schwille (2004). "Intracellular calmodulin availability accessed with two-photon cross-correlation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(1): 105-10.
- Knippers, R. (1997). Molekulare Genetik. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kohl, T., K. G. Heinze, R. Kuhlemann, A. Koltermann and P. Schwille (2002). "A protease assay for two-photon crosscorrelation and FRET analysis based solely on fluorescent proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **3**: 3.
- Kohler, J. J. and A. Schepartz (2001). "Kinetic studies of Fos.Jun.DNA complex formation: DNA binding prior to dimerization." Biochemistry **40**(1): 130-42.

- König, H., H. Ponta, U. Rahmsdorf, M. Buscher, A. Schönthal, H. J. Rahmsdorf and P. Herrlich (1989). "Autoregulation of fos: the dyad symmetry element as the major target of repression." *Embo J* **8**(9): 2559-66.
- Koppel, D. (1974). "Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy." *Phys. Rev. A* **10**: 1938-1945.
- Lamb, D. C., A. Schenk, C. Rucker, C. Scalfi-Happ and G. U. Nienhaus (2000). "Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection." *Biophys J* **79**(2): 1129-38.
- Lamph, W. W., P. Wamsley, P. Sassone-Corsi and I. M. Verma (1988). "Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA." *Nature* **334**(6183): 629-31.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson and S. L. McKnight (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." *Science* **240**(4860): 1759-64.
- Lee, W., A. Haslinger, M. Karin and R. Tjian (1987). "Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40." *Nature* **325**(6102): 368-72.
- Lee, W., P. Mitchell and R. Tjian (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." *Cell* **49**(6): 741-52.
- Magde, D., E. L. Elson and W. W. Webb (1972). "Thermodynamic fluctuations in a reacting system - measurement by fluorescence correlations spectroscopy." *Phys. Rev. Lett.* **29**: 705-708.
- Magde, D., E. L. Elson and W. W. Webb (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization." *Biopolymers* **13**(1): 29-61.
- Malvezzi-Campeggi, F., M. Jahnz, K. G. Heinze, P. Dittrich and P. Schwille (2001). "Light-induced flickering of dsred provides evidence for distinct and interconvertible fluorescent states." *Biophys J* **81**(3): 1776-85.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Marshall, W. F., A. Straight, J. F. Marko, J. Swedlow, A. Dernburg, A. Belmont, A. W. Murray, D. A. Agard and J. W. Sedat (1997). "Interphase chromosomes undergo constrained diffusional motion in living cells." *Curr Biol* **7**(12): 930-9.
- Matz, M. V., A. F. Fradkov, Y. A. Labas, A. P. Savitsky, A. G. Zaraisky, M. L. Markelov and S. A. Lukyanov (1999). "Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [see comments] [published erratum appears in Nat Biotechnol 1999 Dec;17(12):1227]." *Nat Biotechnol* **17**(10): 969-73.
- McBride, K., F. Charron, C. Lefebvre and M. Nemer (2003). "Interaction with GATA transcription factors provides a mechanism for cell-specific effects of c-Fos." *Oncogene* **22**(52): 8403-12.
- Medina, V., B. Edmonds, G. P. Young, R. James, S. Appleton and P. D. Zalewski (1997). "Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway." *Cancer Res* **57**(17): 3697-707.
- Miyawaki, A., A. Sawano and T. Kogure (2003). "Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores." *Nat Cell Biol Suppl*: S1-7.

- Moerner, W. E. and M. Orrit (1999). "Illuminating single molecules in condensed matter." *Science* **283**(5408): 1670-6.
- Morise, H., O. Shimomura, F. H. Johnson and J. Winant (1974). "Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*." *Biochemistry* **13**(12): 2656-62.
- Morlon, A. and P. Sassone-Corsi (2003). "The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional coactivator of AP-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(7): 3977-82.
- Musti, A. M., M. Treier and D. Bohmann (1997). "Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases." *Science* **275**(5298): 400-2.
- Ofir, R., V. J. Dwarki, D. Rashid and I. M. Verma (1990). "Phosphorylation of the C terminus of Fos protein is required for transcriptional transrepression of the c-fos promoter." *Nature* **348**(6296): 80-2.
- Ormö, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." *Science* **273**(5280): 1392-5.
- Palm, G. J., A. Zdanov, G. A. Gaitanaris, R. Stauber, G. N. Pavlakis and A. Wlodawer (1997). "The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein [letter]." *Nature Structural Biology* **4**(5): 361-5.
- Patterson, G., R. Day and D. Piston (2001). "Fluorescent protein spectra." *J Cell Sci* **114**(5): 837-8.
- Patterson, G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain and D. W. Piston (1997). "Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy." *Biophys J* **73**(5): 2782-90.
- Piechaczyk, M. and J. M. Blanchard (1994). "c-fos proto-oncogene regulation and function." *Crit Rev Oncol Hematol* **17**(2): 93-131.
- Piette, J. and M. Yaniv (1987). "Two different factors bind to the alpha-domain of the polyoma virus enhancer, one of which also interacts with the SV40 and c-fos enhancers." *Embo J* **6**(5): 1331-7.
- Pulverer, B. J., J. M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki and J. R. Woodgett (1991). "Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases." *Nature* **353**(6345): 670-4.
- Qian, H. and E. L. Elson (1991). "Analysis of Confocal Laser-Microscope Optics for 3-D Fluorescence Correlation Spectroscopy." *Appl. Opt.* **30**(10): 1185-1195.
- Rasmussen, R., D. Benvegnu, E. K. O'Shea, P. S. Kim and T. Alber (1991). "X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(2): 561-4.
- Rauscher, F. J., 3rd, D. R. Cohen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian and B. R. Franza, Jr. (1988). "Fos-associated protein p39 is the product of the jun proto-oncogene." *Science* **240**(4855): 1010-6.
- Rauscher, F. J., 3rd, P. J. Voulalas, B. R. Franza, Jr. and T. Curran (1988). "Fos and Jun bind cooperatively to the AP-1 site: reconstitution in vitro." *Genes Dev* **2**(12B): 1687-99.
- Rhodes, D. (1985). "Structural analysis of a triple complex between the histone octamer, a *Xenopus* gene for 5S RNA and transcription factor IIIA." *Embo J* **4**(13A): 3473-82.

- Rigler, R., Ü. Mets, J. Widengren and P. Kask (1993). "Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion." *Eur. Biophys. J.* **22**: 169-175.
- Rippe, K. (2000). "Simultaneous binding of two DNA duplexes to the NtrC-enhancer complex studied by two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy." *Biochemistry* **39**(9): 2131-2139.
- Salih, A., A. Larkum, G. Cox, M. Kuhl and O. Hoegh-Guldberg (2000). "Fluorescent pigments in corals are photoprotective." *Nature* **408**(6814): 850-3.
- Sassone-Corsi, P., W. W. Lamph, M. Kamps and I. M. Verma (1988). "fos-associated cellular p39 is related to nuclear transcription factor AP-1." *Cell* **54**(4): 553-60.
- Schönthal, A., M. Buscher, P. Angel, H. J. Rahmsdorf, H. Ponta, K. Hattori, R. Chiu, M. Karin and P. Herrlich (1989). "The Fos and Jun/AP-1 proteins are involved in the downregulation of Fos transcription." *Oncogene* **4**(5): 629-36.
- Schuermann, M., M. Neuberg, J. B. Hunter, T. Jenuwein, R. P. Ryseck, R. Bravo and R. Muller (1989). "The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation." *Cell* **56**(3): 507-16.
- Schwille, P., S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner and W. W. Webb (2000). "Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins." *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97**(1): 151-156.
- Schwille, P., F. J. Meyer-Almes and R. Rigler (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." *Biophysical Journal* **72**(4): 1878-1886.
- Smeal, T., P. Angel, J. Meek and M. Karin (1989). "Different requirements for formation of Jun: Jun and Jun: Fos complexes." *Genes Dev* **3**(12B): 2091-100.
- Smeal, T., B. Binetruy, D. A. Mercola, M. Birrer and M. Karin (1991). "Oncogenic and transcriptional cooperation with Ha-Ras requires phosphorylation of c-Jun on serines 63 and 73." *Nature* **354**(6353): 494-6.
- Soto, U., B. C. Das, M. Lengert, P. Finzer, H. zur Hausen and F. Rosl (1999). "Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex." *Oncogene* **18**(21): 3187-98.
- Swaminathan, R., S. Bicknese, N. Periasamy and A. S. Verkman (1996). "Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: translational diffusion of a small fluorescent solute measured by total internal reflection-fluorescence photobleaching recovery." *Biophys. J.* **71**(2): 1140-51.
- Szöllösi, J., G. Vamosi, G. Vereb, K. Toth, N. Baudendistel and S. Damjanovich (2004). Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer. *Diagnostische Zytometrie*. G. Rothe, U. Sack and A. Tárnok.
- Tanford, C. (1961). *Physical chemistry of macromolecules*. Wiley, New York.
- Terry, B. R., E. K. Matthews and J. Haseloff (1995). "Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**(1): 21-7.
- Tewes, M. (1998). "Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie, Erweiterung der theoretischen

- Grundlagen und biologische Anwendungen." Dissertation. Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Tewes, M. and J. Langowski (1996). Fluoreszenzkorrelationsspektroskopiemodul für ein Mikroskop. Deutsche Patentanmeldung 196 49 605.5. Germany.
- Thompson, N. L. (1991). Fluorescence Correlation Spectroscopy. Topics in Fluorescence Spectroscopy. J. R. Lakowicz. New York, Plenum Press. **1**: 337-378.
- Treier, M., L. M. Staszewski and D. Bohmann (1994). "Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain." Cell **78**(5): 787-98.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annu. Rev. Biochem. **67**: 509-44.
- Tsien, R. Y. (1999). "Rosy dawn for fluorescent proteins." Nat Biotechnol **17**(10): 956-7.
- Urbani, L., S. W. Sherwood and R. T. Schimke (1995). "Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization." Exp Cell Res **219**(1): 159-68.
- van Dam, H. and M. Castellazzi (2001). "Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis." Oncogene **20**(19): 2453-64.
- Verkhusha, V. V. and K. A. Lukyanov (2004). "The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins." Nat Biotechnol **22**(3): 289-96.
- Vogt, P. K. (2001). "Jun, the oncoprotein." Oncogene **20**(19): 2365-77.
- Vogt, P. K. (2002). "Fortuitous convergences: the beginnings of JUN." Nat Rev Cancer **2**(6): 465-9.
- Vogt, P. K., T. J. Bos and R. F. Doolittle (1987). "Homology between the DNA-binding domain of the GCN4 regulatory protein of yeast and the carboxyl-terminal region of a protein coded for by the oncogene jun." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(10): 3316-9.
- Wachsmuth, M. (2001). "Fluoreszenzfluktationsmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern." Dissertation. Fakultät für Physik und Astronomie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Wachter, R. M., M. A. Elsliger, K. Kallio, G. T. Hanson and S. J. Remington (1998). "Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein." Structure **6**(10): 1267-77.
- Wagner, E. F. (2001). "AP-1--Introductory remarks." Oncogene **20**(19): 2334-5.
- Webb, W. W. (1976). "Applications of fluorescence correlation spectroscopy." Q Rev Biophys **9**(1): 49-68.
- Weidemann, T. (2002). "Quantitative Untersuchung der Verteilung, Mobilität und Bindung von fluoreszenzmarkierten Histonen mit Fluoreszenzfluktationsmikroskopie." Dissertation. Fakultät für Biologie, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Weidemann, T., M. Wachsmuth, M. Tewes, K. Rippe and J. Langowski (2002). "Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy." Single Molecules **3**(1): 49-61.
- Widengren, J., Ü. Mets and R. Rigler (1995). "Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study." J. Phys. Chem. **99**(36): 13368-13379.

- Widengren, J. and R. Rigler (1998). "Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces." Cell. Mol. Biol. **44**(5): 857-79.
- Wiedenmann, J., A. Schenk, C. Rocker, A. Girod, K. D. Spindler and G. U. Nienhaus (2002). "A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria)." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11646-51.
- Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray and R. Hancock (1981). "Silver staining of proteins in polyacrylamide gels." Anal Biochem **118**(1): 197-203.
- Zerial, M., L. Toschi, R. P. Ryseck, M. Schuermann, R. Muller and R. Bravo (1989). "The product of a novel growth factor activated gene, fos B, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity." Embo J **8**(3): 805-13.
- Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting and R. Y. Tsien (2002). "Creating new fluorescent probes for cell biology." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 906-18.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben:

Ich danke Prof. Dr. Jörg Langowski für die Überlassung der interessanten Themenstellung, die fachlichen Diskussionen, die kritische Durchsicht der Arbeit und die nette Arbeitsatmosphäre in seiner Abteilung

Prof. Dr. Jürgen Wolfrum danke ich für die Annahme und Vertretung dieser Arbeit in der Chemischen Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Gabriele Müller gilt ein ganz besonders herzliches Dankeschön für ihre Geduld beim Einlernen, für tausende von Labortipps und für die Milliarden von „leuchtenden“ Zellen, die sie für mich gemacht hat

Waldemar Waldeck für immer hilfreiche Tipps in Sachen Biologie, sein unermüdliches Korrekturlesen, seine Aufmunterungen und unsere schöne Zeit als Zimmerkollegen

Nathalie Brun für ihre Hilfe im Laboralltag, ihre für mich gegossenen Gele für die „perfekten“ Western-Blots und unsere auch außerhalb der Arbeit lustige gemeinsame Zeit

Malte Bussiek danke ich für seine Geduld beim Korrekturlesen und seine Hilfe bei allen Mac-Problemen

Kati Toth und Serena Bernacchi danke ich für ihre Hilfe bei der Fluoreszenz- und Absorptionsspektroskopie und unsere schöne Woche in Spanien

Peter Angel danke ich besonders für seine Hilfe in Sachen AP-1, die AP-1-Plasmide, die er uns zur Verfügung gestellt hat, und für sein Korrekturlesen

Bei R. Tsien möchte ich mich für das Plasmid pRSET_B-mRFP1 und bei J. Wiedenmann für das Plasmid pcDNA3.1-eqFP611 bedanken

Andreas Hunziker für sämtliche Sequenzierungen und Wolfgang Weinig für die Herstellung aller Oligonukleotidprimer

Michael und Monika Stöhr und Volker Ehemann danke ich für die FACS-Messungen

Sehr großer Dank gilt auch den früheren Mitarbeitern Malte Wachsmuth und Thomas Weidemann, die mich in die Kunst der FCS eingeführt haben und mir immer hilfreich zur Seite standen bei jeglichen FCS-Problemen

Alexander Gansen danke ich für seine Hilfe bei den theoretischen Ausführungen in Sachen FCS und sein Korrekturlesen dieser Kapitel

Des Weiteren will ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Hilfe und ihre Aufmunterungen und für die schönen drei Jahre bedanken

Ein riesiges Dankeschön gilt meinem Vater, der unermüdlich jeden kleinen Fehler in meiner Arbeit gesucht hat

Meinem Freund Matthias danke ich ganz besonders für seine seelische Unterstützung und seine liebevollen Aufmunterungen