

# **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplomchemiker Daniel Barzan  
aus  
Mannheim, Deutschland

Tag der mündlichen Prüfung  
08. März 2013



Einzelmolekül-spektroskopische  
Methoden zur Untersuchung  
von Dynamiken des STAT5b-Proteins in  
lebenden Maus Fibroblasten

Gutachter: PD Dr. Dirk-Peter Herten  
Prof. Dr. Reiner Dahint



# Inhaltsverzeichnis

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
ABSTRACT .....	3
1 EINLEITUNG .....	5
1.1 Biologisches System .....	6
1.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	17
1.3 Fluoreszenz-Mikroskopie.....	22
1.4 Zielsetzung .....	38
2 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE.....	40
2.1 Das Fusionsprotein STAT5b-mCherry in Maus Fibroblasten .....	40
2.1.1 Die Untersuchung der Diffusion von STAT5b-mCherry in lebenden NIH3T3 Zellen mittels FCS .....	41
2.1.2 Diffusion von STAT5b-mCherry mittels DIFIM .....	43
2.2 Verwendung des SNAP-Tag zur spezifischen Markierung .....	46
2.3 Markierung des STAT5b-SNAP Proteins in lebenden NIH3T3 Zellen.....	49
2.3.1 TMR-Star Konzentration und Auswaschen des ungebundenen Farbstoff .....	50
2.3.2 Regulation der Expression des Fusionsproteins .....	55
2.3.3 Spezifische Markierung des STAT5b-SNAP in Maus Fibroblasten .....	56
2.3.4 Funktionalität von markiertem STAT5b-SNAP .....	58
2.4 Diffusion von STAT5b-SNAP-TMR-Star in lebenden NIH3T3 mittels FCS .....	60
2.4.1 Platzierung des konfokalen Volumen in der Zelle .....	60
2.4.2 Vergleich von Zellkern und Zytosol unterschiedlich behandelte Zellen .....	62
2.4.3 Histogramm unbehandelter, in DMEM ohne Serum inkubierter und mit Epo stimulierter Zellen .....	67

2.5	Messungen der Bindung des STAT5b an der apikalen Zellmembran mittels “Variable-Angle-TIRF” .....	69
2.6	Bildkorrelation von Videos unterschiedlich behandelter Zellen.....	75
3	<b>DISKUSSION</b> .....	80
3.1	FCS STAT5b-mCherry .....	80
3.2	DIFIM mit STAT5b-mCherry.....	82
3.3	Markierung von Synptophysin-SNAP mit BG-Atto700 .....	84
3.4	Die Markierung des STAT5b-SNAP in NIH3T3 Maus Fibroblasten.....	85
3.4.1	Die Markierung mit verschiedenen BG-Substraten.....	85
3.4.2	Konzentration von TMR-Star und Waschschrte .....	86
3.4.3	Regulierung des Fusionsproteins.....	87
3.4.4	Spezifität der Markierung.....	87
3.4.5	Funktionalität des Proteins .....	88
3.5	FCS mit TMR-Star markiertem STAT5b-SNAP .....	89
3.6	Bindungskinetik des STAT5b mit der Membran über “VA-TIRF”.....	92
3.7	Bildkorrelation der “Variable-Angle-TIRF” Aufnahmen – ImTIR-FCS.....	94
4	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	95
4.1	Die verschiedenen Modifikationen der Zelllinie und die Kultivierung der NIH3T3 Maus Fibroblasten.....	95
4.1.1	Klonierung des Fusionsproteins STAT5b-mCherry.....	95
4.1.2	Zellkultur der NIH3T3 Maus Fibroblasten.....	98
4.2	Kopplung der BG-Substrate .....	100
4.2.1	Aufreinigung über die HPLC .....	101
4.2.2	Bestimmung der Konzentration am Absorptionsspektrometer .....	101
4.3	Experimenteller Aufbau für die DIFIM-Messungen.....	102
4.4	Durchführung der FCS- und DIFIM-Messungen von Maus Fibroblasten die das Fusionsprotein STAT5b-mCherry exprimieren .....	104

4.5	Experimenteller Aufbau für die FCS-Messungen.....	105
4.6	Datenerfassung der SNAP-Tag modifizierten Maus Fibroblasten am TCS SP5 X.....	106
4.7	Die Aufnahmen des Synaptophysins am TCS SP5 X.....	108
4.8	Experimenteller Aufbau für die „VA“-TIRF- Messungen.....	109
4.9	Durchführung der Messungen am TIRF .....	111
4.10	Auswertung der TIRFM Aufnahmen .....	112
5	LITERATURVERZEICHNIS .....	113
6	ANHANG .....	124
6.1	Markierung der NIH3T3 Maus Fibroblasten mit weiteren BG-Substraten.....	124
6.2	Zeitserien der Scans stimulierter und nicht stimulierter NIH3T3 Zellen.....	126
6.3	XY- und XZ-Scans einer NIH3T3 Zelle zur Lokalisierung des konfokalen Volummens.....	128
6.4	Abkürzungsverzeichnis .....	129
7	DANKSAGUNG .....	131

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Zusammenspiel der verschiedenen Organe in einem komplexen System wie dem menschlichen Körper erfordert fein aufeinander abgestimmte Steuer- und Kontrollmechanismen. Der JAK/STAT Signalweg ist einer der direktesten Informations-Übertragungswege von extrazellulären Botenstoffen, die das Signal über die Zellmembran in das Zytosol bis in den Zellkern zu den jeweiligen Zielgenen weiterleiten. Der Wachstumsfaktor Epo spielt unter anderem in der Erythropoese in Zusammenhang mit dem EpoR und dem Signalprotein STAT5b eine wesentliche Rolle. In dieser Arbeit wird das STAT5b-Protein in lebenden NIH3T3 Maus Fibroblasten hinsichtlich seiner Diffusion im Zytosol und im Zellkern und bezüglich der Bindungseigenschaften an seinen aktivierenden Rezeptor (EpoR) untersucht.

Die Experimente werden mit den Einzelmolekül-spektroskopischen Methoden FCS und „VA-TIRF“ durchgeführt. Hierfür muss zunächst eine geeignete Farbstoffmarkierung des STAT5b gefunden werden. Die Verwendung eines Fusionsproteins aus STAT5b und fluoreszierendem mCherry bietet eine spezifische und stöchiometrische Markierung. Allerdings zeigt mCherry in den Versuchen eine ausgeprägte Fluktuation in seiner Emission, das so genannte „Blinken“, und eine geringe Photostabilität. Damit ist das Fluoreszenzprotein für FCS-Messungen nur bedingt geeignet. Für DIFIM, eine Methode die durch punktweise FCS-Analysen ein Raster von relativen Diffusionszeiten eines Ausschnitts einer Zelle anfertigt, ist STAT5b-mCherry ungeeignet.

Um die Untersuchungen der Diffusion und Bindung des STAT5b dennoch erfolgreich durchzuführen wird es mit dem SNAP-Tag-Protein fusioniert, welches dann mit dem organischen Farbstoff TMR-Star stöchiometrisch markiert wird. In dieser Arbeit konnte ein Markierungsprotokoll etabliert werden, welches sicherstellt, dass die Markierung spezifisch und das Signalübertragungsprotein funktional ist.

Die FCS-Messungen im Zytosol und Zellkern ergeben für unterschiedlich behandelte Zellen verschiedene Diffusionskoeffizienten ( $D$ ). Für unbehandelte und gehungerte Zellen sind die mittleren  $D$  im Zytosol schneller als im Zellkern. Nach der Aktivierung des Signalwegs mit Epo kehrt sich das Verhältnis um und der mittlere  $D$  im Zellkern nimmt zu. Wahrscheinlich führt die Dimerisierung des aktivierten Proteins zu einer Verringerung, während die Bindung des aktivierten STAT5b-Dimers an die DNA im Zellkern vermutlich zu der Erhöhung des  $D$  führt.

Die Messungen mit „VA-TIRF“ zeigen für die Bindung des Proteins an der Zellmembran keine einheitliche Bindungszeit und auch keinen Unterschied hinsichtlich Epo-stimulierten und -unstimulierten Zellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass unspezifische

Wechselwirkungen des STAT5b mit der Zellmembran und anderen Rezeptoren in der Zellmembran der Bindung mit dem EpoR überlagert sind. Bei der Analyse der gesamten Aktivität des Proteins an der Zellmembran zu verschiedenen Zeitpunkten nach Epo-Stimulierung ergibt sich ein Aktivitätsmaximum bei 7,5 min. In den Bindungs-An-Zeiten des STAT5b ist hingegen kein Unterschied zu erkennen. Die gesteigerte STAT5b-Aktivität ließe sich durch verkürzte Bindungs-Aus-Zeiten des Proteins zum EpoR oder durch eine erhöhte Anzahl der Rezeptoren in der Zellmembran infolge der Epo-Stimulierung erklären. In Übereinstimmung zeigen Untersuchungen der Phosphorylierung von STAT5b durch V. Becker et. al. die maximale Phosphorylierung bei 7.5 min durch eine erhöhte Rekrutierung von EpoR aus dem zytosolischen Pool an die Zellmembran.

Videoaufnahmen mittels „Variable-Angle-TIRF“ mit Belichtungszeiten von nur 5 ms pro Einzelbild zeigten, dass es möglich ist über ImTIR-FCS-Analysen Diffusionskoeffizienten des STAT5b zu erhalten. Die Wechselwirkung mit der Zellmembran wird durch die langsame Diffusion des Proteins widerspiegelt, die mit  $1,4 - 2,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$  zwischen der von zytosolischen und Transmembran -Proteinen liegt.

Die ermittelten Diffusionskoeffizienten und der Verlauf der STAT5b-Aktivität können im Weiteren in Modelle für den JAK/STAT Signalweg eingefügt werden und so den Ablauf der Aktivierung in diesem System verdeutlichen. Diese Arbeit leistet somit einen Beitrag zum tieferen Einblick in die Signalweiterleitung.

## ABSTRACT

In a complex system such as the human body, the interplay between different organs requires a fine tuned control mechanism. Signaling via the JAK/STAT pathway is one of the most direct ways to transmit information carried by extracellular messengers into the cell. The signal is transferred across the cell membrane into the cytosol and finally reaches the target genes in the nucleus to alter gene expression. The growth factor Epo, in conjunction with the receptor EpoR and the signaling protein STAT5b, plays an important role most notable in erythropoiesis.

This work investigates the diffusion of STAT5b in the cytosol and in the nucleus of living NIH3T3 mouse fibroblasts and its binding to the activated EpoR. The experiments were performed with FCS and ‘Variable-Angle-TIRF’, both being single-molecule spectroscopy techniques.

At first, an appropriate labeling of STAT5b had to be established. The use of a fusion protein consisting of STAT5b and the fluorescent protein mCherry provided a specific and stoichiometric label. However, mCherry displayed fluctuations in fluorescence emission, the so called blinking, in experiments and was prone to photobleaching. This fluorescent protein is thus only a mediocre choice as a dye for FCS and proved to be ill-suited for DIFIM, a method that constructs raster images of relative diffusion times in a cell from point-FCS measurements.

To continue the investigation of diffusion and binding of STAT5b, an alternative fusion protein was constructed containing SNAP-tag, which was labeled with the fluorescent dye TMR-Star. In this work, a labeling protocol was established to ensure specific labeling of the functional construct. FCS measurements in the cytosol and the nucleus delivered distinct diffusion constants ( $D$ ) for differently treated cells. For untreated and starved cells, the mean value for  $D$  is larger in cytosol than in the nucleus for untreated and starved cells. After activation of the signaling pathway with Epo, a reverse ratio was observed. Probably a dimerization of the activated protein leads to diffusion deceleration and thus to a decrease of  $D$  in cytosol, whereas in the nucleus the movement is accelerated and the mean value for  $D$  increased presumably by the effective binding of the active STAT5b-dimer to the DNA.

Measurements with ‘Variable-Angle-TIRF’ did not deliver any uniform time values for the binding between the labeled protein STAT5b to the cell membrane and no difference in response to Epo stimulation. Thus, it can be inferred that unspecific interactions of STAT5b with the cell membrane and other receptors superimpose the binding to EpoR.

By analyzing the protein activity at the cell membrane after Epo stimulation it reveals a maximum in the time course of activity at 7.5 min. Yet, there is no change in the binding on-time of STAT5b. The amplified STAT5b activity could be explained either by shortened binding off-times or by an increase in the number of EpoR in the cell membrane upon Epo stimulation. A study of STAT5b phosphorylation by Verena Becker et al. found maximal phosphorylation at 7.5min through enhanced recruitment of EpoR from the cytosolic pool to the cell membrane and confirms the result.

By applying a short exposure time of only 5ms per image in movies taken in 'Variable-Angle-TIRF' experiments, diffusion constants of STAT5b could be obtained by using the ImTIR-FCS analysis.

The interaction with the cell membrane leads to slow diffusion of the protein. This was reflected in the observed diffusion constant values being in the range of 1.4-2.4  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , what is in between the values known for cytosolic and transmembrane proteins.

The determined diffusion constants and the time course of STAT5b activity can now be implemented in models of the JAK/STAT pathway to highlight the sequence of events after Epo activation. This work thus contributes to the deeper understanding of signal transduction.

## 1 EINLEITUNG

Der Menschliche Körper ist ein sehr Komplexes System und besteht aus mehreren Organen, die insgesamt aus 10 – 100 Billionen Zellen aufgebaut sind. Die Kommunikation zwischen den Zellen und den Organen ist notwendig, um deren Vorgänge, wie die Zellteilung, Differenzierung oder das Überleben zu regulieren. Fehler innerhalb dieser Vorgänge können zur Entartung und damit unter anderem zu Krebs führen [1].

Ein wichtiger Vorgang im menschlichen Körper ist die Erythropoese die Blutbildung aus blutbildenden Stammzellen. Treten hier Fehler in der Zellkommunikation oder der Teilung, der Differenzierung und das Überleben der Zellen auf, führt dies zu Krankheiten, wie Blutarmut, Blutkrankheit oder Blutkrebs [2].

Das Blut im menschlichen Körper ist eine Suspension hauptsächlich aus roten und weißen Blutkörperchen, den Blutplättchen und dem Blutplasma, eine Mischung aus Nährstoffen und Wasser. Die roten Blutkörperchen sind für den Transport und damit für die Versorgung aller Organe mit Sauerstoff verantwortlich. Da diese im Blutkreislauf hohen Kräften (Druck und Scherkräften) ausgesetzt sind haben sie nur eine kurze Lebensdauer von ca. 120 Tagen [3]. Ein wichtiger Abschnitt in der Erythropoese ist die Aktivierung des Proteins der Signalweiterleitung und Aktivierung der Transkription 5b (engl. „Signal Transduction and Aktivation of Transcription 5b“ – STAT5b) über das Hormon Erythropoietin (Epo) und den Erythropoietinrezeptor (EpoR).

Um effiziente Therapien zur Heilung der Blutkrankheiten aufgrund von möglichen Störungen zu entwickeln, müssen die zellulären Vorgänge möglichst detailliert verstanden werden. Zur Untersuchung dieser Vorgänge eignen sich Einzelmolekül-fluoreszenzspektroskopischen Methoden (engl. „Single Molecule Fluorescence Spectroscopy – SMFS), die Wechselwirkungen auf molekularer Ebene veranschaulichen können. In dieser Arbeit wird mit Hilfe von SMFS das Verhalten des Proteins STAT5b hinsichtlich seiner Diffusion und Bindungseigenschaften zu dem EpoR untersucht.

## 1.1 Biologisches System

### Zelluläre Kommunikation

Lebewesen bestehen aus Zellen, kleine durch eine Plasmamembran abgeschlossene lebens- und vermehrungsfähige Einheiten. In höheren Organismen schließen sich Zellen mit unterschiedlicher Funktion zu einem Zellverbund zusammen. Diese unterschiedlichen Zellen differenzieren aus einer einzelnen sogenannten omnipotenten Stammzelle. Im Menschen entstehen dabei in etwa 200 verschiedene Zelltypen. Die einzelnen Zelltypen übernehmen jeweils hochspezialisierte Aufgaben wie beispielsweise die Reizweiterleitung durch Nervenzellen, die Bewegung durch Muskelzellen oder die Versorgung des gesamten Organismus mit Sauerstoff durch rote Blutkörperchen (Erythrozyten). Um ihre jeweiligen Aufgaben zu erfüllen, ist die Kommunikation zwischen den einzelnen Zellen in einem komplexen Organismus wie dem Menschen unerlässlich. Sie ermöglicht es zelluläre Entscheidungen wie Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben zu steuern. Die Signalübertragung zwischen den Zellen geschieht dabei auf verschiedene Arten: durch direkte Zell- Zellkontakte, oder durch lösliche Mediatoren, wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Chemokine und Zytokine.

Die Kommunikation via Zell- Zellkontakt verläuft über Kanäle („gap junctions“) innerhalb der Zellmembran, welche die Zellen direkt miteinander verbinden. Durch diese Kanäle können kleine intrazelluläre Signalmoleküle (max. 1 kDa) wie  $\text{Ca}^{2+}$  und zyklisches Adenosinmonophosphat direkt von einer Zelle zur anderen ausgetauscht werden, ohne dabei den Umweg über den extrazellulären Raum zu nehmen. Eine weitere Möglichkeit der direkten Zell- Zellkommunikation verläuft über Membran gebundene Signalmoleküle der einen Zelle, welche an einen entsprechenden Rezeptor auf einer anderen Zelle binden. Diese Art der Signalübertragung spielt hauptsächlich beim Immunsystem und der embryonalen Entwicklung eine Rolle.

Anders gestaltet sich die Signalweiterleitung durch lösliche Mediatoren. Unter ihnen gibt es kleine hydrophobe Moleküle wie Steroidhormone oder Vitamin  $\text{D}_3$ , die durch die Zellmembran nach außen diffundieren und mittels Trägerproteinen über den Blutkreislauf zu den Zielzellen transportiert werden. Hier dissoziieren sie von den Trägerproteinen, diffundieren in die Zelle und binden dort direkt an ihre Rezeptorproteine, welche daraufhin aktiviert werden und an die DNA binden können, um dort die Transkription spezifischer Gene zu regulieren. Die meisten Signalmoleküle sind jedoch hydrophil und binden an die extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne von Transmembranrezeptoren, die ein somit

entstandenes Signal in das Zellinnere weiterleiten. Prinzipiell lassen sich Transmembranrezeptoren entsprechend ihrem Signalübertragungs-Mechanismus in drei Klassen einteilen: Ionenkanal-gekoppelte, G-Protein-gekoppelte und katalytische Rezeptoren. Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren sind eingebunden in der schnellen synaptischen Signalweiterleitung zwischen elektrisch reizbaren Zellen. Sie öffnen oder schließen sich nach Bindung des entsprechenden Liganden, wodurch die Ionenpermeabilität der Zellmembran verändert wird und eine rasche Signalweiterleitung an die postsynaptische Zelle erfolgt.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus sieben die Zellmembran durchspannende Helixstrukturen deren extrazelluläre Enden Signalmoleküle binden, während das zytosolische Ende ein assoziiertes trimeres GTP-bindendes Protein (G-Protein) aktiviert. Daraufhin dissoziiert das G-Protein vom Rezeptorkomplex und vermittelt spezifische Signalwege.

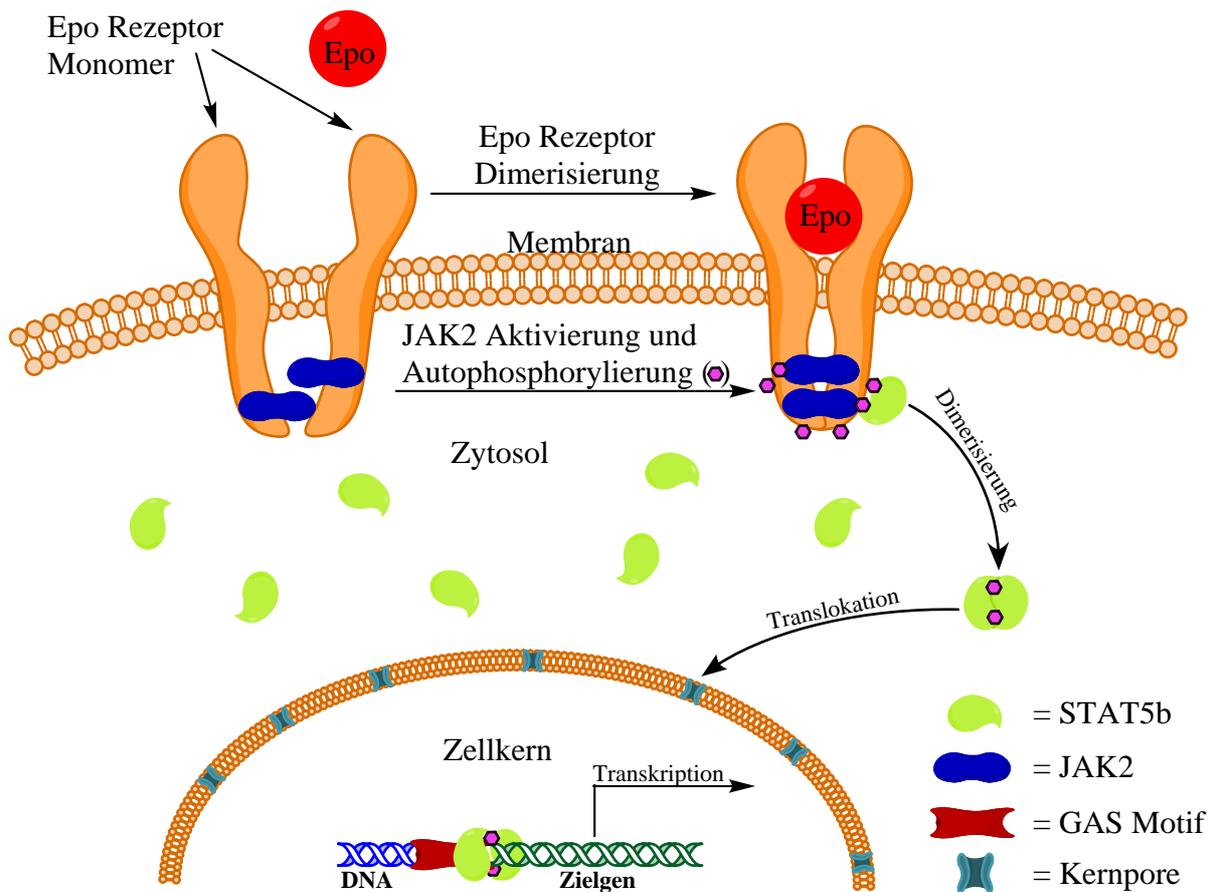
Katalytische Rezeptoren verändern nach Bindung der jeweiligen Liganden am extrazellulären Teil des Rezeptors ihre Konformation. Durch diese Änderung wird entweder der zytosolische Teil des Rezeptors selbst zur Weiterleitung des Signals aktiviert oder ein intrazelluläres Rezeptor-gekoppeltes Enzym aktiviert, welches das Signal weiterleitet. In den meisten Fällen besitzen die Rezeptoren eine intrinsische Kinaseaktivität oder sie sind mit Proteinkinasen verbunden, welche nach Ligandenbindung spezifische Proteine zur Weiterleitung des Signals phosphorylieren. Detailliertere und umfangreichere Informationen finden sich in Lehrbüchern, wie *Molecular Biology of The Cell*, Alberts [4].

Zusammenfassend führen alle extrazellulären Signale über die verschiedenen Rezeptorklassen zu einer Veränderung intrazellulärer Vorgänge, beispielsweise dem Umbau des Zytoskeletts oder eine differenzielle Gentranskription. Grundlegende zelluläre Vorgänge (Proliferation, Differenzierung, Überleben und Migration) werden durch diese Zellregulation gesteuert und die Fehlsteuerung einzelner oder mehrerer dieser Vorgänge kann zur Entartung der Zelle und damit zu Krebs führen. Vor allem bei den katalytischen Rezeptoren spielen Unregelmäßigkeiten in der Signalweiterleitung eine wesentliche Rolle in der Krebsentstehung [1].

Ein Mitglied der katalytischen Rezeptoren ist der Erythropoietinrezeptor (EpoR). Nach Bindung des Erythrozyten Wachstumsfaktors Erythropoietin (Epo) kommt es zur Aktivierung der rezeptorassoziierten Janus Kinase 2 (JAK2), welche wiederum den Transkriptionsfaktor (TF) für die Signaltransduktion und Aktivierung der Transkription (engl. „Signal Transduction and Activation of Transcription“ – STAT5b) phosphoryliert und damit aktiviert. Der JAK/STAT Signalweg stellt damit einen der direktesten Übertragungswege vom extrazellulären Signal bis zur Bindung des TF an die DNA im Zellkern dar, der nachfolgend im Detail erläutert wird [5].

## Der JAK/STAT Signalweg

JAKs wurden zum ersten Mal in Untersuchungen über die transkriptionelle Aktivierung als Reaktion auf die Liganden Interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) beschrieben [6]. Sie stellen eine Familie von vier Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinassen dar (JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2), die mit dem zyttoplasmatischen Teil von Zytokinrezeptoren verbunden sind. Durch die Bindung der Liganden (Zytokine wie z.B. IL-2, INF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , Epo) kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zu einer trans-Autophosphorylierung der assoziierten JAKs (Abbildung 1.1).



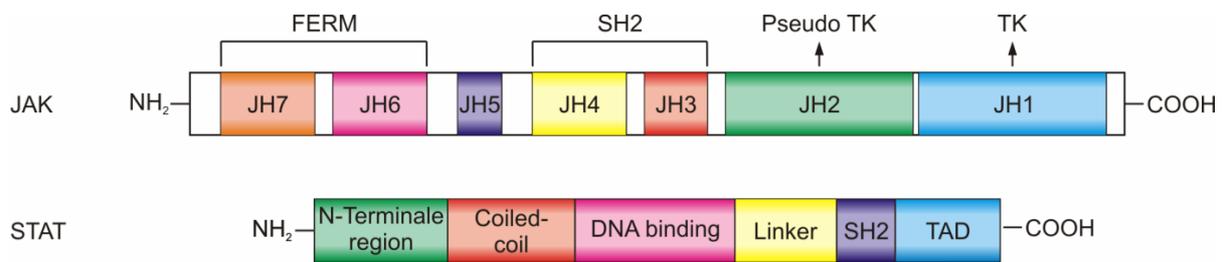
**Abbildung 1.1:** Der JAK/STAT Signalweg am Beispiel von Epo. Die durch das Zytokin Epo induzierte Dimerisierung bzw. Reorganisation des Epo-Rezeptors aktiviert assoziierte JAK2-Moleküle durch Autohosphorylierung von Tyrosinresten. So aktivierte JAKs phosphorylieren ihrerseits Tyrosinreste am zytosolischen Teil des Zytokinrezeptors, welche als Bindungsstellen für die SH2 Domäne der STAT5 Transkriptionsfaktoren dienen. Die am Rezeptor gebundenen STATs können nun von den JAKs phosphoryliert werden, dimerisieren nach Dissoziation vom Rezeptor und translozieren in den Zellkern, in dem das Dimer die Transkription des Zielgens induziert.

Die somit aktivierten JAKs phosphorylieren nun die Tyrosinreste innerhalb des zytoplasmatischen Abschnitts des Rezeptors und kreieren damit die Bindestelle für Sarkoma-

Homologie 2 (engl. „Sarcoma-homology“ 2 – SH2) Domän-tragende Proteine, die Bestandteil der STATs sind [7]. Die STATs stellen eine Familie von sieben strukturell und funktionell verwandten Proteinen dar, STAT1-4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Sie liegen im Zytosol als „ruhende“ TF vor, bis sie an aktivierte Zytokinrezeptoren binden und von den JAKs an einem Tyrosinrest phosphoryliert werden. Nach der Phosphorylierung dimerisieren die jeweiligen STATs, woraufhin die direkte Translokation in den Zellkern stattfindet, um die Transkription zu aktivieren [8]. Zu diesem Zweck bindet das Dimer an die  $\gamma$ -Interferon-Aktivierungsposition (GAS), welche die Konsensussequenz TTNCNNNA hat. Diese Sequenz ist ein Element in der Promotorregion der Zielgene [9, 10]. Aufgrund der Größe von ca. 180 kDa pro STAT Dimer liegt es nahe, dass der Transfer in den Zellkern aktiv erfolgt [11]. STAT Dimere binden an Importin, eine der Untereinheiten des kernzytoplasmatischen Transportmechanismus, wobei in einigen Zelllinien auch unphosphoryliertes STAT in den Zellkern transportiert wird [12]. Nach Aktivierung der Transkription wird STAT im Zellkern dephosphoryliert, was ein wichtiges Signal für den Export in das Zytoplasma darstellt. Der Export wird möglicherweise von CRM1 (engl. „Chromosome Region Maintenance“ 1), einem Kern-Export-Protein, vermittelt [13].

### **Struktur und Funktion der JAKs und STATs**

Die Struktur der JAKs unterscheidet sich klar von anderen Mitgliedern der Protein Tyrosinkinase Familie. Eine besondere Eigenschaft dieser Proteine sind zwei benachbarte Domänen: eine C-Terminale Kinase Domäne (JAK Homologie 1, JH1) und eine katalytisch inaktive Pseudokinase Domäne (JH2), in der eine Kinase Domäne gefaltet ist, der aber entscheidende Reste für die katalytische Aktivität und die Bindung an Nukleotide fehlen [14]. Es gibt immer mehr Hinweise die zeigen, dass die JH2 Domäne notwendig ist, um die basale Aktivität der Kinase Domäne zu unterdrücken [15, 16]. Innerhalb der N-Terminalen Seite der JAK-Proteine liegen zwei Sequenzen vor, eine Region die der SH2 Domäne gleicht (JH3-4) und eine „four-Point-one“, Ezrin, Radixin, Moesin (FERM) Domäne (JH6-7). Abgesehen von der Homologie zur SH2 Sequenz, scheint die SH2-gleiche Domäne nicht an Phosphotyrosinreste zu binden und ihre Funktion muss noch festgestellt werden [17, 18]. Für die FERM Domäne wurde gezeigt, dass sie die Annäherung zu den Rezeptoren vermittelt. Die Bindung findet an den Box1/Prolin-reichen membrannahen Teil des Zytokinrezeptors statt [19]. In jüngsten Studien wurde angenommen, dass die Reste innerhalb der FERM Domäne wichtig für die Stabilisierung des hydrophoben Proteinkerns und die katalytische Funktion von JAK-Molekülen sind [20]. Abbildung 1.2 zeigt die Domänenstruktur der JAKs.



**Abbildung 1.2:** Domänen Struktur der Janus Kinasen (JAKs) und der „Signal transducers and activators of transcription“ (STATs). Sequenzanalysen zeigten, dass sich die JAKs und STATs aus konservierten Domänen zusammensetzten. JAKs beinhalten sieben JAK Homologie Domänen (JH1-7). Die katalytische Aktivität der Tyrosinkinase Domäne JH1 wird in Interaktion mit der Pseudo-Tyrosinkinase JH2 reguliert. Dagegen spielen die Domänen JH3-JH7 diverse Rollen in den Protein-Protein Interaktionen, wie z.B. der Verbindung zum Rezeptor. STATs bestehen aus sechs definierten Domänen. Die N-Terminale Region ist entscheidend für STAT-Funktionen, wie den Kernimport und -export. Der Abschnitt der „coiled-coil“ Domäne ist beteiligt an der Rezeptorbindung und an Verbindungen mit weiteren Regelproteinen. Für die Bindung an spezifische Phospho-Tyrosinreste anderer STATs oder des Rezeptors ist die SH2 Domäne verantwortlich. Die C-Terminale Transaktivierungs Domäne (TAD) variiert innerhalb der Familienmitglieder, ihre detaillierte Funktionsweise ist nicht vollständig bekannt.

Wie die meisten Transkriptionsfaktoren, sind STATs aus sechs eindeutig definierten Domänen aufgebaut. Sie setzen sich zusammen aus einer konservierten N-Terminale Domäne, einer „coiled-coil“ Domäne, einer DNA-Bindungs Domäne, einem Verbindungs-Abschnitt, einer SH2 Domäne und der C-Terminale Transaktivierungs Domäne (TAD) (Abbildung 1.2). Diese Struktur wurde über Homologie-Studien und Kristallstrukturanalysen der Kernaminosäuren (130-710) von DNA gebundenem dimeren STAT1 bzw. dimeren STAT3 aufgeschlüsselt [21]. Die N-Terminale Region innerhalb der Familie aller STATs ist hoch konserviert und scheint notwendig für die Funktion der STATs zu sein. Sie spielt eine Rolle für den Kern-Import, und -Export und die Bindung an den Zytokinrezeptor. Die „coiled-coil“ Domäne hat wie der Name besagt die Konformation einer  $\alpha$ -Helix deren Funktion die Bindung zum Rezeptor und die Assoziation zu Regulationsproteinen umfasst [22]. Auch die DNA-Bindungs Domäne ist zwischen allen STATs hoch konserviert. Dagegen übernimmt der Verbindungs-Abschnitt die Aufgabe eines Abstandshalters, um die korrekte Konformation zwischen der Dimerisierungs- und DNA-Bindungs Domäne zu erhalten. Die SH2 Domäne ist zuständig für die Rekrutierung der STATs an den aktivierten Rezeptorkomplex und die für die Translokation notwendige Dimerisierung. Unmittelbar unterhalb (engl. „downstream“) der SH2 Domäne, etwa an Position 700 haben alle STATs einen Tyrosinrest der essentiell für die Aktivierung und Dimerisierung ist [23, 24]. Zusätzlich zu der Tyrosinphosphorylierung können einige STATs über eine Serinphosphorylierung

reguliert werden, die über Serin- Threoninkinasen, wie p38 oder JNK, vermittelt wird [25]. Die Transaktivierungs Domäne variiert zwischen den Familienmitgliedern, wobei die Spezifität und Funktion der transkriptionellen Regulation der verschiedenen STAT Isoformen noch weiter untersucht werden muss.

### **Bildung und Entwicklung der Erythrozyten: Die Erythropoese**

Während der Erythropoese (Entwicklung der roten Blutkörperchen) ist Erythropoietin (Epo) der wichtigste Regulator für die häufigsten Blutzellen, den Erythrozyten (rote Blutkörperchen). Epo ist der Wachstumsfaktor, der den JAK/STAT Signalweg im Falle der Erythropoese aktiviert. Die Aufgabe der roten Blutkörperchen ist der Transport von Sauerstoff aus der Lunge in das gesamte Gewebe.

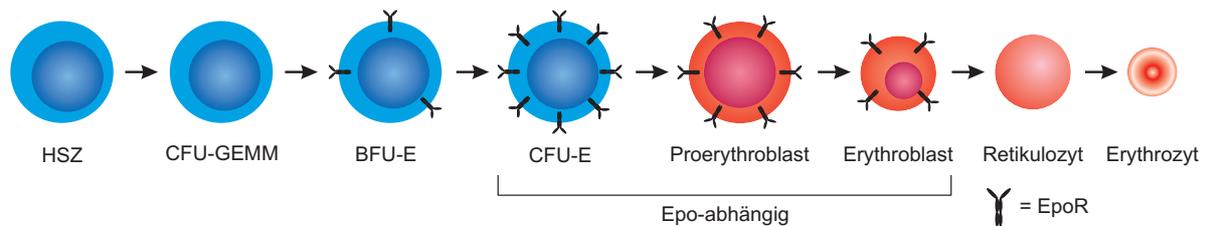
Ausgereifte Erythrozyten sind mit 120 Tagen eher kurzlebig, im Gegensatz dazu überleben „memory“ T- und B-Zellen mehrere Jahre. Daher ist es notwendig, dass Erythrozyten durch blutbildende Stammzellen (Hämatopoetische Stammzelle, HSZ) kontinuierlich erneuert werden [26]. HSZs liegen in ausgewachsenen Säugern im Knochenmark vor und können sich stufenweise in die verschiedenen blutbildenden Zellen (z.B. Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, T- B- und NK-Zellen) differenzieren [27]. Der Prozess der Differenzierung in die jeweiligen hämatopoetische Abstammungslinien wird dabei durch pleiotrope Hämatopoetine (hämatopoetische Zytokine, z.B. GM-CSF, IL-1) reguliert.

Im murinen Fötus sind die ersten Orte der Erythrozytenbildung die Blutinseln des Dottersacks. In diesem Stadium der primitiven Erythropoese werden kernhaltige Erythrozyten produziert, die embryonales Hämoglobin exprimieren und unabhängig von Epo sind [28]. Um den 12. Tag der Tragezeit (E12) verlagert sich die Bildung der roten Blutkörperchen in die fetale Leber, in welcher voll entwickelte, kernlose Erythrozyten gebildet werden, die embryonales und adultes Hämoglobin exprimieren. Die endgültige Umlagerung für die voll entwickelte Erythropoese findet kurz vor der Geburt im Knochenmark und der Milz statt, von wo aus während der gesamten Lebenszeit die Erythrozyten produziert werden [29].

Für die Erythropoese in der fetalen Leber oder im Knochenmark, sind die als frühesten bekannten *ex vivo* Vorläufer Zellen die „burst-forming-unit erythroid“ (BFU-Es) identifiziert worden. Die BFU-Es bilden sich in Gegenwart der Stammzell-Faktoren Interleukin-3 (IL-3) und Epo zu den „colony-forming-unit erythroid“ (CFU-E) Zellen aus [30].

In Gegenwart von Epo bilden sich die CFU-Es schrittweise über vier verschiedene Stufen: Pro-, basophile-, polychromatische- und orthochromatische-Erythroblasten (Abbildung 1.3). Bei der fortschreitenden Differenzierung zeigen die Erythroblasten eine sukzessive Verkleinerung der Zellgröße, eine höhere Chromatinkondensation und einen Anstieg der Hämoglo-

binanzahl. Schließlich wird der Zellkern ausgestoßen und Retikulozyten gebildet, die sich von ihrer Umgebung ablösen, um in den Blutkreislauf einzutreten. Beim fortschreitenden Austreten aus den Organellen reifen sie zu den Sauerstoff transportierenden Erythrozyten aus [29]. Die Expression des Eporezeptors ist gering im Stadium der BFU-E Zellen und am stärksten im Stadium der CFU-E Zellen, wobei sie sich im späten Erythroblasten wieder verringert und die Zellen keine Abhängigkeit mehr von Epo zeigen.



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung über die Bildung von Erythrozyten aus den Hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) während der endgültigen Erythropoese in Mäusen. Die HSZ bilden „colony forming unit-granulocyte-erythroid-macrophage-megakaryocyte“ (CFU-GEMM), die sich, nach Festlegung zur Erythroidlinie, weiter zu den Erythroid Burst Forming Unit (BFU-E) entwickeln. Unter Einfluss der Stammzellfaktoren Interleukin-(IL)3 und Erythropoietin (Epo) schreiten die Zelle vom BFU-E Stadium zum Erythroid Colony Forming Unit (CFU-E) Stadium, welches strikt Epo abhängig ist, voran. Die CFU-E entwickeln sich unter strenger Epo-Kontrolle zu Erythroblasten weiter. Nach dem Ausstoß des Zellkerns treten die Retikulozyten in den Blutkreislauf ein und reifen zu den Erythrozyten. Abbildung modifiziert von U. Klingmüller [31].

### Epo und der Eporezeptor

Die physiologische Rolle von Epo und EpoR bei der Erythropoese wurde hauptsächlich über Mäuse bestimmt, die Nullmutationen in den Genen tragen, die entweder Epo oder den EpoR kodieren. Diese Knockout-Mäuse sterben an den Tagen E12,5 – E13,5 während der Embryogenese, ein Stadium mit massiver erythroider Ausdehnung. Die fetale Leber dieser Mäuse haben eine normale Anzahl an CFU-E Zellen, was daraufhin deutet, dass das Epo-Signal im frühen Stadium der Hämatopoese nicht notwendig ist [32]. Während der Embryogenese wird Epo in der fetalen Leber, in Erwachsenen hauptsächlich im Tubular und Juxtatubular des Endothels und in interstitiell Zellen der Niere und außerhalb der Niere in Hepatozyten und Kupffer Zellen gebildet [33]. Ein niedriger Sauerstoffgehalt im Gewebe durch hohen Blutverlust erhöht die Expression des Epo Gen erheblich durch die Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren HIF-1 und HIF-2 [34]. Als typisches Zytokin besteht Epo aus vier  $\alpha$ -Helices, die zu einer kompakten kugelförmigen Struktur gefaltet sind. Die Kohlenhydrat-Seitenkette ist für die komplette biologische Funktionalität des Glykoproteins *in vivo* notwendig.

Der murine EpoR gehört zu der Familie der Typ-I-Zytokinrezeptoren, welche aus einer N-Terminal extrazellulären Ligandenbindungs-Domäne, einer einzelnen Transmembran-Domäne und einer zytosolischen Domäne zusammengesetzt sind. Sie besitzt keine eigene enzymatische Aktivität und sind daher innerhalb der zytosolischen Domäne mit JAK assoziiert [35]. Die extrazelluläre Domäne ist aus zwei Fibronectin Typ-II-Domänen zusammengesetzt, D1 und D2. In jeder der beiden Unterdomänen sind zwei konservierte Cysteinreste vorhanden, die untereinander Disulfidbrücken ausbilden. Das Aminosäure Motiv WSXWS ist für die Interaktion mit dem Liganden verantwortlich [36] und befindet sich gerade überhalb der transmembran Domäne [37, 38]. Es ist innerhalb der hämatopoetischen Zytokinrezeptor Superfamilie konserviert. Die signalweitergebende Domäne im zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors enthält zwei prolinreiche Motive, Box 1 und Box 2, welche für die JAK-Funktionalität benötigt werden [39].

Mutationen des EpoR, die zur Expression einer verkürzten Variante des Rezeptors führen, wurden mit familiärer Polyglobulie in Verbindung gebracht [40, 41]. Diese gutartige Erythrozytose ist durch einen erhöhten Hämatokrit-Wert oder einen zu niedrigen Plasma-Spiegel charakterisiert. Kultivierte Erythroid-Vorläufer-Zellen solcher Patienten zeigen eine erhöhte Epo-Sensitivität verglichen mit Zellen die den Wild-Typ EpoR exprimieren.

### **Die Signalweiterleitung durch den Erythropoietin Rezeptor**

Die Signalweiterleitung über den EpoR fördert das Zellüberleben, unterstützt die Proliferation und treibt die Differenzierung der Erythropoese von dem Stadium der BFU-E über die CFU-E Zellen zu den späten Erythroblasten voran. Über die letzten Jahrzehnte wurden die meisten Signalproteine identifiziert, die von Epo aktiviert werden. Als typischem Zytokinrezeptor fehlt dem EpoR die eigene Kinaseaktivität und er ist daher mit der Tyrosinkinase JAK2 verbunden. Mit Hilfe von JAK2 Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass JAK2 essentiell für die Signalweitergabe des EpoR ist. Die Mäuse sterben zwischen E13 und E15 an schwerer Anämie, wodurch die Bedeutung von JAK2 innerhalb der vollständigen Erythropoese gezeigt wurde [42].

Aufgrund der Bindung des Epo am EpoR erfolgt eine strukturelle Umorientierung der zytoplasmatischen Domäne. Daraufhin findet eine schnelle Aktivierung von JAK2 durch die Transphosphorylierung am Tyrosin 1007 innerhalb der Aktivierungsschleife statt [43]. Im Gegenzug phosphoryliert JAK2 verschiedene Tyrosinreste innerhalb des zytoplasmatischen Teil des Epozeptors. Diese dienen so als Bindungsstellen für betreffende Proteine, welche die SH2 Domäne enthalten. Zu den Signalmolekülen bzw. Signalwegen, die nach Rekrutierung aufgrund des phosphorylierten EpoRs aktiviert wurden gehören STAT5,

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-K), die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Proteinkinase C (PKC).

### **Die Weiterleitung des Signals über STAT5**

Der direkteste Weg, um die Rezeptorstimulation in den Zellkern weiterzuleiten, ist die Aktivierung von STAT5. Der im Zytosol latent vorliegende Transkriptionsfaktor verbindet sich mit den phosphorylierten Tyrosinresten. Der zytosolische Teil des Rezeptors verfügt über 8 Tyrosinreste. Durch Mutationen der 8 Tyrosinreste konnte gezeigt werden, dass entweder Y343 oder Y401 benötigt wird, um die Phosphorylierung von STAT5 zu aktivieren. Die Bindung an die Tyrosinreste Y429 und Y431 führt nur zu 30% der Aktivierung des STAT5 Proteins gegenüber den Wild-Typ EpoR in der BaF3-Zelllinie [44]. Nach der Phosphorylierung dissoziiert STAT5 vom Rezeptor und dimerisiert. Das Dimer verlagert sich in den Zellkern und bindet an seine GENELEMENTE in verschiedenen Promotoren, um die Transkription der Zielgene zu aktivieren. Dazu gehören die negativen Regulatoren wie das Zytokin induzierbare SH2 enthaltende Protein (CIS) [45] und der Unterdrücker von Zytokin Signalen (engl. „Supressor of Cytokine Signaling“ – SOCS)-3 und auch Ziele wie Pim-1, c-myc, OncostatinM, Bcl-X<sub>L</sub> oder D-Typ Zykline, welche notwendig sind damit die Erythropose funktioniert [46-48].

Die physiologische Rolle von STAT5 in der Erythropese wurde in den letzten Jahren umfangreich untersucht. Obwohl kontrovers diskutiert, steigen die Anzeichen dafür, dass STAT5 das Überleben in Erythroid Vorläuferzellen über die direkte Induktion der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-X<sub>L</sub> fördert [48, 49]. Untersuchungen an STAT5ab<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten fetale Anämie und eine erhöhte Apoptoserate der Erythroid Vorläuferzellen als Auswirkung eines Fehlers in der Hochregulierung von Bcl-X<sub>L</sub> [50]. In einer zweiten Studie mit STAT5ab<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen wurde herausgefunden, dass diese *in utero* perinatal letal und hoch anämisch sind [51]. Dies unterstützt zusätzlich die Annahme, dass STAT5 eine essentielle Bedeutung in der Erythropese einnimmt.

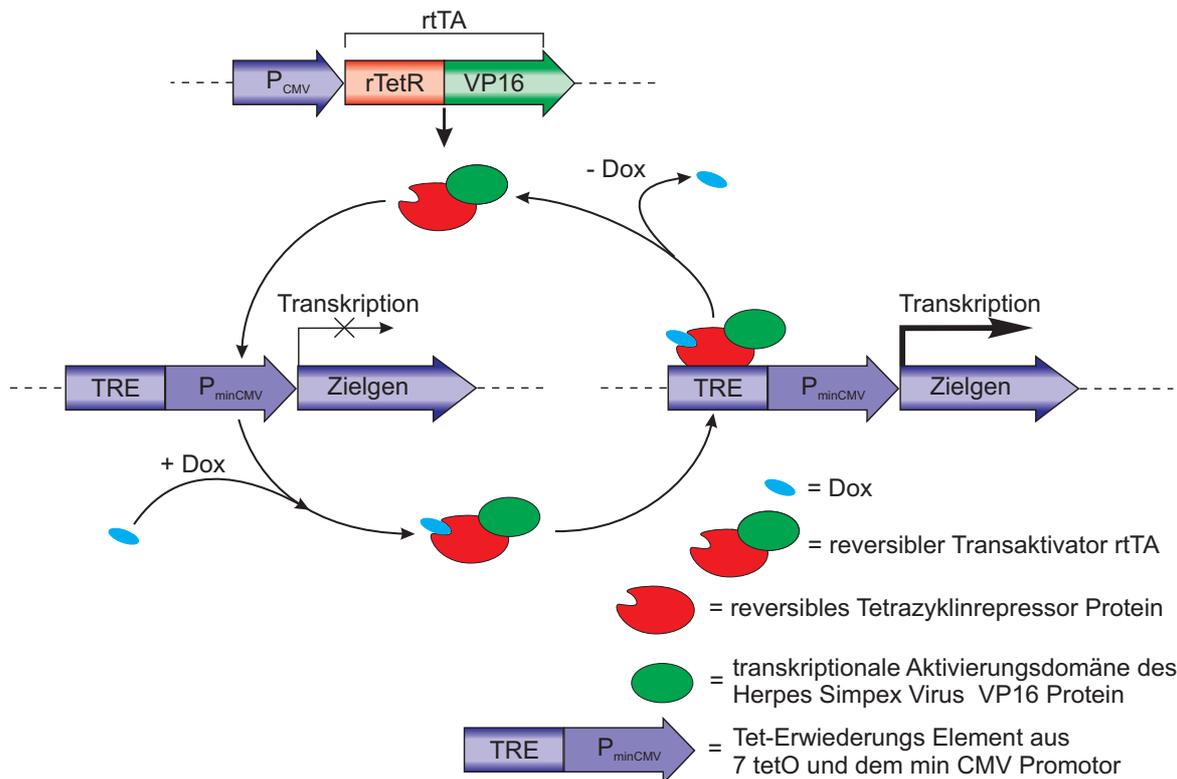
### **Das Tet-Induktions System – Eine Technik um die Proteinexpression zu steuern**

In dieser Arbeit wird das STAT5b Proteins nach Aktivierung durch Epo untersucht. Über SMFS werden die Diffusion und die Bindungseigenschaften des Proteins an den EpoR beobachtet. Die Untersuchung dieser Prozesse erfolgt über experimentell gewonnene Daten die durch systematische Änderungen und deren Reaktionen identifiziert werden. Das gezielte und reproduzierbare Beeinflussen der zellulären Systeme stellt allerdings eines der größten Probleme in biologischen Experimenten dar. Prinzipiell können unspezifische Inhibitoren wie

der generische Transkriptions Inhibitor Actinomycin D angewandt werden [4]. Weitere typischerweise verwendete Methoden, um das dynamische Verhalten zu steuern, sind die Erhöhung der Proteinkonzentration durch Überexpression oder der zielgerichteten Abschaltung von Genen (engl. „knockdown“) über RNA-Interferenz (siRNA) [52]. Eine fortgeschrittene Methode die mengen- und zeitabhängige Überexpression der signalgebenden Komponenten zu handhaben, ist das Tetrazyklin-Induzierbare (Tet)-System.

Tetrazyklin (Tet) – ein Antibiotikum – stellt die Grundlage des Tet-Systems dar. Diese Systeme werden weit verbreitet verwendet, um die Genexpression in Eukaryoten zu kontrollieren [53]. Das Prinzip dieses Regulierungssystems basiert auf dem *E.coli* Tetrazyklinresistenz-Operon (Tn10), welches das Tetrazyklinrepressor Protein (TetR) beinhaltet und dessen spezifische DNA Bindungsstelle, die Tetrazyklin Operatorsequenz (tetO). Im ursprünglichen System blockiert TetR die Transkriptionsresistenz vermittelnder Gene über die Bindung der tetO Sequenz. In Anwesenheit von Tet oder dessen Derivat Doxzyklin (Dox) dissoziiert TetR vom tetO ab und die Gentranskription wird induziert. Um die Anwendung für Säuger-Organismen und –Zelllinien zu optimieren, wurden die künstlichen Tet-Off [54] und Tet-On [55] Systeme entwickelt.

Das Schlüsselement des zuerst etablierten Tet-Off Systems ist der durch Tet kontrollierte Transaktivator (tTA). Dieses Fusionsprotein besteht aus der DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen TetR und der transkriptionalen Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus VP16 Protein, welches die Interaktion in Form der Aktivierung der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie erlaubt. Der zweite Bestandteil ist das künstliche Tet-Erwiderungs Element (engl. „Tet-response-element“ – TRE), bestehend aus einer Fusion zwischen einem Minimal CMV Promotor und einer Reihe von sieben tetO Sequenzen. Da das Tet-Off System ständig Tet oder dessen Derivat Dox zur Regulierung benötigt, um die Genexpression zu unterdrücken, können unerwünschte Nebeneffekte auftreten. Daher wurde das Tet-On System entwickelt (Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung des Tet-On Systems. Der reversible Transaktivator (rtTA), zusammengesetzt aus der mutierten bakteriellen DNA Bindungsdomäne (rTetR) und der transkriptionalen Aktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus VP16 Protein, wird in der zu beeinflussenden Zelle exprimiert. In Abwesenheit von Doxyzyklin (Dox) kann rtTA nicht an in die Zelle eingebrachten Tet-response Element (TRE) binden und die Transkription des Zielgens wird verhindert. Bei Zugabe von Dox, welches am rtTA bindet und so dessen Bindung an TRE ermöglicht, wird die Transkription eingeleitet.

Dieses System basiert auf dem reversiblen Transaktivator (rtTA), der vier gezielte Mutationen in der TetR Domäne trägt und dadurch umgekehrte Bindungseigenschaften zeigt. So findet die Bindung von rtTA an das TRE in Anwesenheit von Dox statt und die Transkription der Zielgene wird aktiviert. In Abwesenheit von Dox kann rtTA nicht an das TRE binden und die Expression der Zielgene wird verhindert.

Ein Nachteil des Tet-Systems ist die basale transkriptionelle Aktivität im Aus-Zustand des Systems. Diese Hintergrundtranskription resultiert aus der intrinsischen Aktivität des Minimal CMV Promotors und einer niedrigen noch vorhandenen Affinität des rtTA zum TRE in Abwesenheit von Tet oder Dox. Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurden verbesserte rtTA Proteine und verschiedene neu entworfene oder optimierte TRE Sequenzen entwickelt [53, 56]. Diese zeigen höhere Sensitivität gegenüber Tet und Dox und eine niedrigere basale Aktivität im Off-Zustand. Abgesehen von der neuen Generation an Tet-Komponenten hängt die Effizienz der tetrazyklinabhängigen Genexpression stark von der Zelllinie und dem Vektorsystem ab, welches das TRE und den rtTA beinhaltet.

## 1.2 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Wie zuvor beschrieben (Kapitell 1.1) ist es möglich die Expression von Proteinen gezielt zu steuern (Tet-Induktions-System). Somit wird das zu untersuchende Protein im gewünschten Maße exprimiert. Um das Protein nun hinsichtlich seiner Eigenschaften zu untersuchen ist es notwendig eine geeignete Markierung zu gewährleisten. Die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und die Untersuchung, der so markierten Proteine stellt eine minimal-invasive Methode für diese und deren Wirtszelle dar [57, 58].

Um die Proteine mit fluoreszenten Sonden zu markieren, steht eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Verfügung. Von kleinen organischen Farbstoffmolekülen über Fluoreszenzproteine (FP) bis hin zu Quantendots (QDs) bieten die jeweiligen Varianten entsprechende Vor- und Nachteile.

QDs sind Halbleiter-Nanokristalle in der Größenordnung von wenigen Nanometern, die aus Materialien wie CdS, CdSe, CdTe, InP oder InAs bestehen [59]. Die Nanokristalle absorbieren Photonen mit Energie über der Halbleiter Bandlücke, was zur Folge hat, dass sich ein Elektronen-Loch-Paar (Exziton) bildet. Die Rekombination eines Exzitons führt zur Emission eines Photons mit einem engen symmetrischen Energieband. Die Wellenlänge hängt von ihrer Größe ab, kleinere emittieren im grünen Wellenlängenbereich und je größer sie werden, desto mehr verschieben sie die Emission zum roten hin. QDs jeglicher Größe können mit Licht hoher Energie, von niedriger Wellenlänge bis hin zu einer Wellenlänge kurz vor ihrer Emission, angeregt werden. Noch von Vorteil ist die Stabilität gegen hohe Photostabilität und sehr hohe Extinktionskoeffizienten wodurch sie heller sind als übliche Farbstoffe[60]. Von Nachteil ist, dass sie auf komplexe Weise blinken, viel größer als organische Farbstoffe oder FPs sind und bei der Aufnahme in die Zelle, üblicherweise durch Endozytose, verbleiben sie in den Endosomen statt ins Zytosol einzudringen [61]. Das Blinken macht QDs ungeeignet für die Bestimmung von Bindungskinetiken des untersuchten Proteins (STAT5b). Außerdem können QDs zytotoxisch sein [62, 63].

Mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurde von Shimomura et. al. das erste FP aus der Qualle *Aequorea victoria* extrahiert [64]. 1994 gelang es Chalfie et. al. das Gen außerhalb der Qualle zur Expression zu bringen [65]. Die Arbeiten um Tsien führten zu einer Fülle von verschiedenen FPs [64, 66]. Die Vorteile von FPs sind die spezifische und stöchiometrische Markierung des zu untersuchenden Proteins bei Verwendung der FP als Fusionsproteine und die damit einhergehende einfache Anwendung in lebenden Zellen. Allerdings zeigen FPs auch Nachteile besonders hinsichtlich Einzelmolekülfluoreszenzmessungen (engl. „Single

Molecule Fluorescence Spectroscopy“ – SMFS). Die Photostabilität der FPs variiert stark und photophysikalische Eigenschaften wie Blinken und pH-Sensitivität einiger FPs beeinträchtigen ihre Verwendung für SMFS. Auch die langsame Faltung und damit einhergehend die langsame Chromophorbildung stellt für einige Messungen Probleme dar. Außerdem liegen FPs oft als Dimere oder Tetramere vor. Die Dimere oder Tetramere stellen sehr große Proteine dar, die stellenweise größer sind als das mit ihnen fusionierten und zu untersuchenden Proteine. Daher kann es vorkommen, dass die Funktionalität des Fusionsproteins beeinträchtigt ist. Dennoch wurden in jüngster Zeit Modifikationen an FPs vorgenommen, die dazu führen, dass sie für SMFS-Anwendungen benutzt werden können, wie beispielsweise mCherry. Die Photostabilität scheint hoch genug zu sein und das Blinken auf der Millisekenskala voraussichtlich nicht zu stören [67]. Daher wurde in dieser Arbeit das zu untersuchende Protein STAT5b mit dem FP mCherry fusioniert.

Inzwischen existiert eine sehr umfangreiche Auswahl von kleinen organischen Farbstoffen. Aus dieser Fülle von Farbstoffen kann entsprechend der Anforderungen für die Messungen einer oder auch mehrere ausgewählt werden. So können sie nach Eigenschaften wie ihrer Anregungswellenlänge, Helligkeit, Photostabilität, Stokes-Verschiebung, pH-Sensitivität, usw., selektiert werden. Modifikationen oder Einführung von funktionellen Gruppen erlauben die spezifische und stöchiometrische Markierung der Untersuchungsobjekte.

Mit Antikörpern werden die gewünschten Proteine mit hoher Spezifität markiert. Die gängigste Variante verläuft über einen primären Antikörper gegen das Protein, der wiederum von einem sekundären Antikörper, welcher mit organischen Farbstoffen markiert ist, erkannt wird. Hier wiederum besteht das Problem der nicht stöchiometrischen Markierung, da der primäre Antikörper von mehreren sekundären gebunden wird. Um Proteine innerhalb der Zelle mit den Antikörpern zu markieren, muss diese fixiert und permeabilisiert werden. So ist die Messung von Dynamiken innerhalb der lebenden Zellen nicht möglich. Die Nutzung von Antikörpern in lebenden Zellen ist nur umsetzbar bei der Markierung von extrazellulären Zellbestandteilen oder über die Mikroinjektion von primären Antikörpern, die direkt mit dem Farbstoff markiert sind, in die lebende Zelle. Die Mikroinjektion allerdings stellt einen starken Eingriff für die Zellen dar. Außerdem hat ein Antikörper mehrere Bindungsstellen was dazu führen kann, dass die Zielmoleküle in lebenden Zellen oligomerisieren. Die Größe des Komplex aus Antikörper und Farbstoff ist typischerweise größer als 200 kDa und führt daher evtl. zu Problemen bei der Mehrfacherkennung eines einzelnen Proteins innerhalb eines Proteinkomplex [58].

Eine sehr junge Variante der Proteinmarkierung ist die Nutzung chemischer „Tags“ [68]. Hierfür wird das zu untersuchende Protein statt mit einem Fluoreszenzprotein mit einem

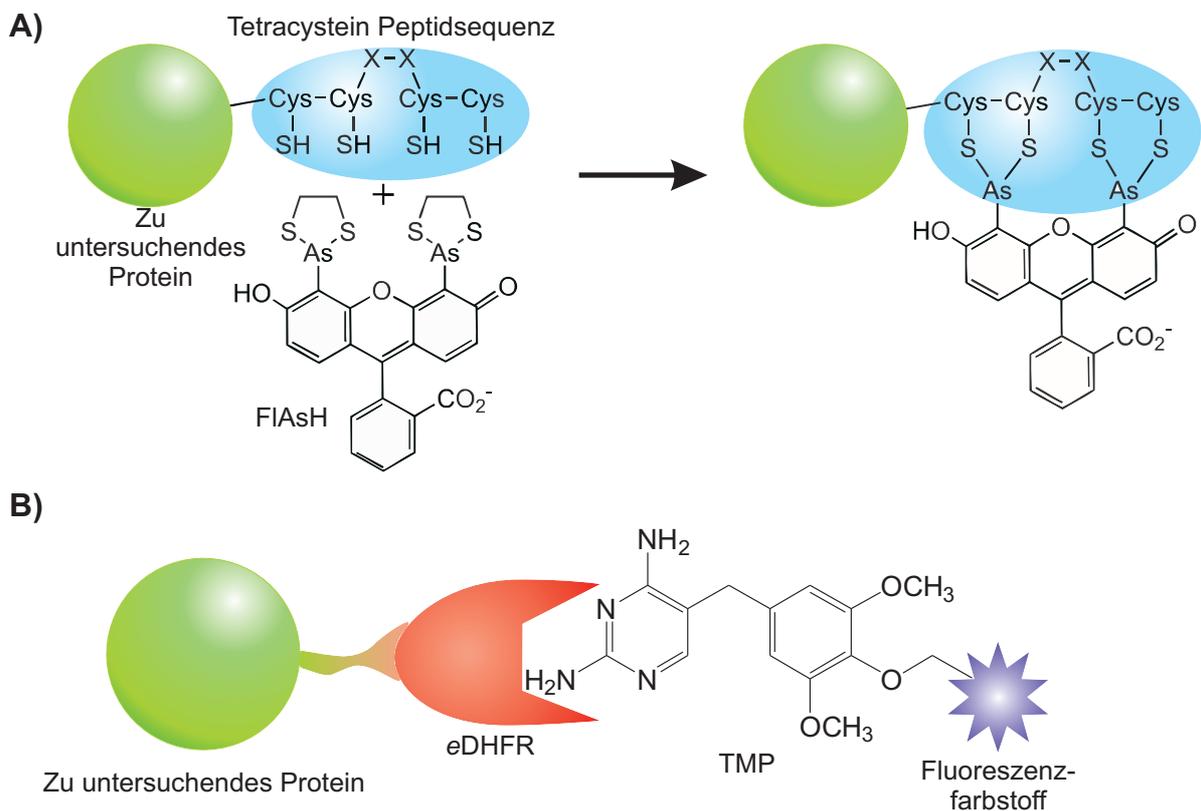
Fusionsprotein (dem sogenannten Tag) exprimiert, an welches ein organischer Farbstoff oder auch eine weitere funktionelle Einheit, wie z.B. Biotin binden kann. Vorteilhaft ist die geringe Größe des „Tags“ gegenüber der FPs, die mit geringerer Wahrscheinlichkeit die Funktion des zu untersuchenden Proteins beeinflussen können. So können Farbstoffe mit der gewünschten Anregungswellenlänge und vor allem für die SMFS wichtigen Anforderungen, wie hoher Extinktionskoeffizient und Quantenausbeute, Photostabilität und konstante Emission für die Markierung gewählt werden [69].

Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde eine Vielzahl an „Tags“ entwickelt. In Tabelle 1.1 sind einige dieser „Tags“ aufgelistet.

Tag		Substrat / Ligand	Größe	Ref.
hAGT (SNAP-Tag)	Protein	Benzyl-Guanin Derivate	20 kDa	[70-73]
hAGT Variante (CLIP-Tag)		Cytosin Derivate	20 kDa	[74]
Dehalogenase (Halo-Tag)		Alkylhalogenid Derivate	33 kDa	[75, 76]
<i>E. Coli</i> Dihydrofolate Reduktase (eDHFR)		Trimethoprim Derivate	18 kDa	[77, 78]
Tetracystein Helix Motiv	Peptid	Biarsenische Derivate (FlAsH; ReAsH)	6 AS	[79]
His <sub>6</sub>		NTA Derivate (nur extrazellulär)	6 AS	[80, 81]

**Tabelle 1.1:** Zusammenstellung einer kleine Auswahl von Chemischen Tags für die Anwendung der Fluoreszenz Spektroskopie in lebenden Zellen.

Tsien et. al. haben als erste ein Protein mit einer kurzen 15 Aminosäure langen Sequenz fusioniert, welche einen organischen Farbstoff bindet. Die Peptidsequenz beinhaltet als Kernbestandteil ein CCXXCC Motif, das den kleinen Farbstoff FlAsH (engl. „Fluorescin Arsenical Hairpin“) binden kann (Abbildung 1.5) [82]. Diese Methode hat allerdings den Nachteil der unspezifischen Markierung von Thiolreichen Regionen in der Zelle und die toxische Wirkung des biarsenischen Liganden.

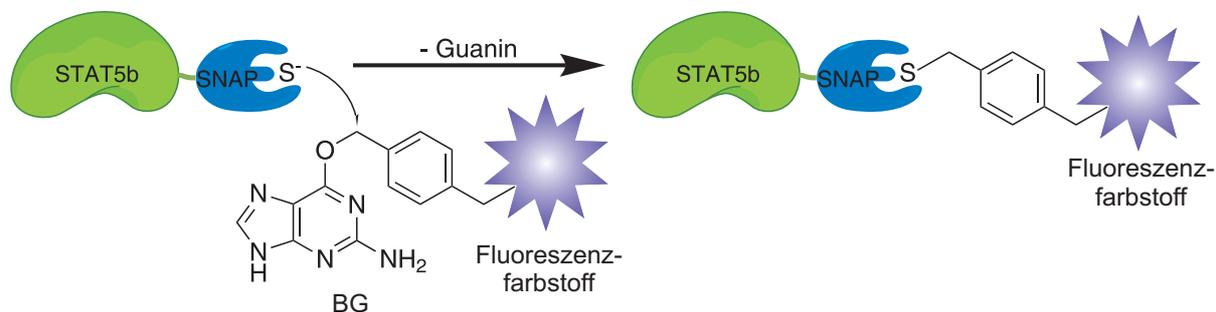


**Abbildung 1.5:** Die schematische Darstellung von Proteinen, die mit Tags versehen sind. So können die Proteine mit modifizierten Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. A) Ein kurzes Peptid, gebunden an das zu untersuchende Protein, mit der Kernsequenz CCXXCC. Diese Sequenz bindet FIAsh kovalent. B) Das zu untersuchende Protein wird mit der *E. Coli* Dihydrofolate Reduktase (*eDHFR*), welche eine nicht kovalente Bindung mit Trimpethoprim (TMP) eingeht.

Ein weiteres Beispiel für einen proteinbasierten chemischen „Tag“ ist die *E. Coli* Dihydrofolate Reduktase (*eDHFR*), welche mit einer hohen Affinität ( $1 \text{ nM } K_D$ ) Trimpethoprim (TMP) bindet (Abbildung 1.5) [78, 83]. Die nicht kovalente Bindung hat eine Dissoziationskonstante zu TMP-Fluoreszin von  $32 \pm 3 \text{ nM}$  [78]. *eDHFR* ist etwa nur zwei drittel mal so groß wie ein monomeres Fluoreszenzprotein, außerdem bildet es keine Oligomere, ist schnell gefaltet und umgeht somit die teilweise langen Halbwertszeiten der Reifung des Chromophors der FPs [84].

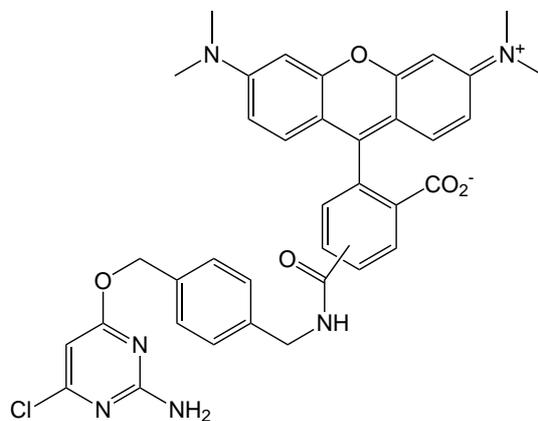
In dieser Arbeit wurde die SNAP-Tag Methode für die Markierung des zu untersuchenden Proteins STAT5b benutzt. Der SNAP-Tag macht sich die Eigenschaft der  $O^6$ -Alkylguanin-Transferase (AGT – im menschlichen Körper hAGT) zu nutze, beschädigte  $O^6$ -Alkylierte Guaninreste in der DNA zu dealkylieren [85]. Die Bindung eines  $O^6$ -Benzyl-Guanin (BG) modifizierten Farbstoffes an den SNAP-Tag erfolgt kovalent über eine  $S_N2$  Reaktion und Bildung eines stabilen Thioesters an einem reaktiven, nukleophilen Cysteinrest. Dieser Mechanismus ist für lebende Organismen unüblich, da das Protein irreversibel inaktiviert

wird. Um das zu untersuchende Protein zu markieren wird eine Mutante der hAGT, welche eine signifikant erhöhte Aktivität gegen BG Substrate zeigt, an das Protein fusioniert [70-72, 86]. In Abbildung 1.6 wird der Reaktionsmechanismus schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.6:** Die schematische Darstellung der S<sub>N</sub>2 Reaktion des STAT5b-SNAP Fusionsprotein mit einem Benzyl-Guanin(BG)-Fluoreszenzfarbstoff.

Zum Markieren des Fusionsproteins STAT5b-SNAP wurde in dieser Arbeit TMR-Star (zellpermeabel) und BG-ATTO633 verwendet. Der Farbstoff TMR-Star trägt als reaktives Substrat nicht BG sondern ein Chloropyrimidin-Derivat, welches auch von SNAP erkannt wird. Die Struktur ist in Abbildung 1.7 und das Absorptions- und Emissionsspektrum in Abbildung 1.9 gezeigt.



**Abbildung 1.7:** Strukturformel von TMR-Star

Im BG Kopplungsprodukt werden einige der Farbstoffe durch das Guanin gelöscht [69]. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um ungebundenen von gebundenem Farbstoff zu unterscheiden. Bei ausreichend starker Löschung zeigt der freie Farbstoff nur ein schwaches Hintergrundsignal.

### 1.3 Fluoreszenz-Mikroskopie

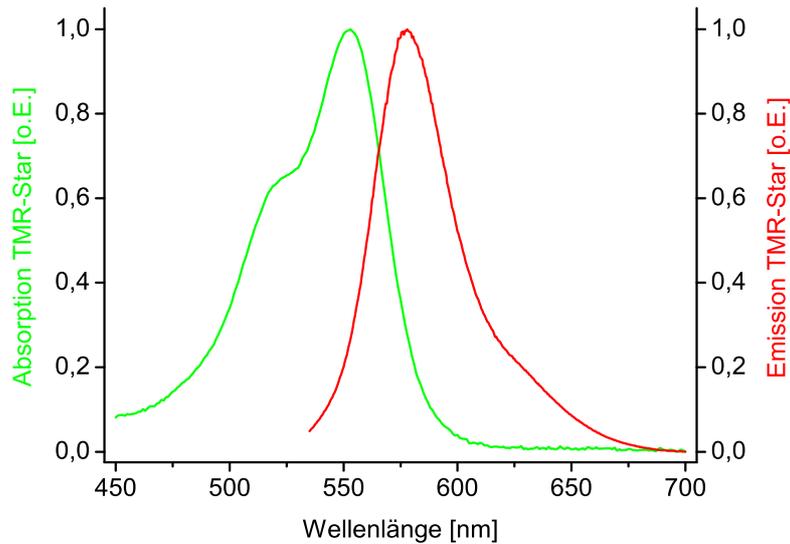
Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine sehr wenig invasive Methode, die Untersuchungen von dynamischen Prozessen innerhalb lebender Zellen ermöglicht. Sie wurde Anfang des 20. Jahrhunderts erstmal von August Köhler und Carl Reichert verwendet. Sie regten Moleküle zum Leuchten an und untersuchten diese mit einem Mikroskop [87]. Mit der Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in den 60er Jahren bekam die Fluoreszenzmikroskopie für die Biologie einen enormen Schub (vergl. Abschnitt Fluoreszenzmarkierung von Proteinen und [88, 89]). Seit dem haben sich die Mikroskope, die Detektoren und auch die Fluoreszenzfarbstoffe stetig weiterentwickelt. So ist es inzwischen möglich mit der Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie kleinste Strukturen mit einer Auflösung von wenigen Nanometern zu identifizieren [90-93].

Es besteht auch die Möglichkeit einzelne Fluoreszenzmoleküle in lebenden Zellen zu detektieren und zu verfolgen. Die SMFS liefert so einen Weg genaue Einblicke in zelluläre Abläufe wie den JAK/STAT Signalweg zu bekommen. Wird das zu untersuchende Objekt spezifisch fluoreszenzmarkiert so sind gezielt Informationen über das Objekt zu erhalten. In dieser Arbeit wird das STAT5b Protein auf seine Diffusion innerhalb verschiedener Regionen in der Zelle und die Bindung an einen seiner aktivierenden Rezeptoren (den EpoR) hin untersucht. Die so durchgeführten Untersuchungen geben detaillierte Informationen des Proteins im Hinblick auf seine Aktivierung.

#### **Fluoreszenz**

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird sich das Phänomen der Fluoreszenz zu nutze gemacht. Fluoreszente Moleküle können Photonen einer bestimmten Energie im Wellenlängenbereich von 200 – 800 nm absorbieren und werden darufhin aus dem Molekülgrundzustand  $S_0$  in einen elektronisch angeregten Molekülzustand  $S_1$  oder höher angehoben. Die Relaxation erfolgt auf unterschiedliche Weise. Findet sie kurz nach der Absorption, unter Aussendung eines Photons statt, spricht man von Fluoreszenz. Die Dauer im angeregten Zustand (einige Nanosekunden) ist die so genannte Fluoreszenzlebensdauer des Moleküls.

Das Absorptionsspektrum kommt dadurch zustande, dass mehrere Übergänge möglich sind. Betrachtet man in einer Ensemblemessung viele Moleküle gleichzeitig sieht man alle Übergänge und es ergibt sich das farbstoffspezifische Absorptionsspektrum (Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9:** Absorptions- (grün) und Emissionsspektrum (rot) von TMR-Star. Die Differenz des Emissionsmaximum bei 578 nm gegenüber dem Absorptionsmaximum bei 553 nm wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet.

Beim Einstrahlen einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  wird ein Teil der Photonen entsprechend der Übergangswahrscheinlichkeit absorbiert, angegeben durch den molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$ . Findet die Absorption bei Einstrahlung von Licht nicht zu hoher Intensität statt, werden höhere elektronische Zustände nur wenig besetzt und der Extinktionskoeffizient bleibt von der Intensität unabhängig. So ist die Übergangswahrscheinlichkeit für den elementaren Prozess der Absorption proportional zur Intensität  $I$  und es gilt das Lambert-Beersche-Gesetz:

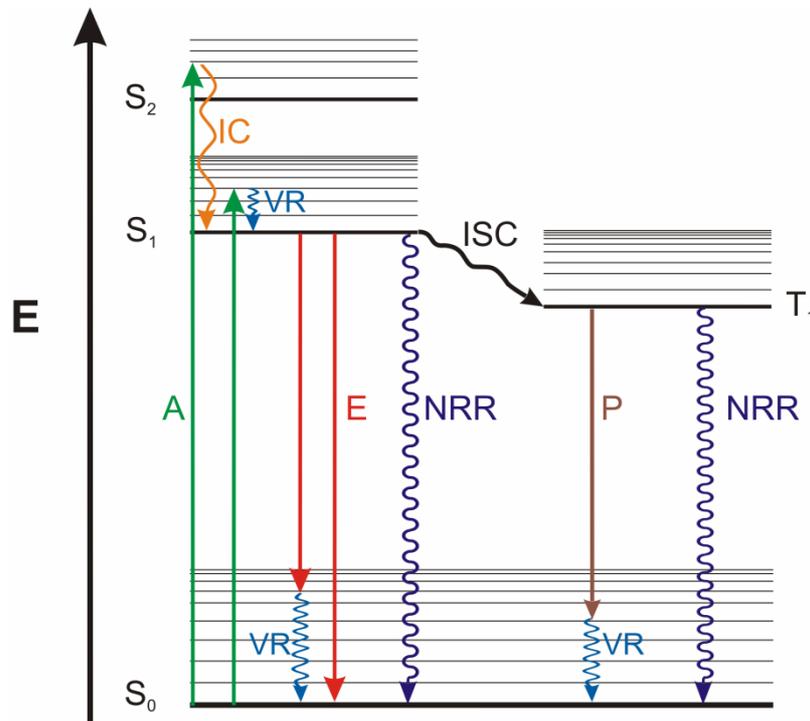
$$I(x) = I_0 e^{(-\epsilon(\lambda) \times c \times x)} \quad \text{Gl. 1}$$

$I_0$  ist hierbei die Intensität der einfallenden Lichtstrahlung direkt vor dem Durchgang und  $I(x)$  die Intensität bei der Eindringtiefe  $x$  (in Strahlrichtung). Werden Proben in Lösung vermessen so wird direkt  $\log(I_0/I)$  bestimmt und es ergibt sich der Zusammenhang:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon_\lambda \times c \times d \quad \text{Gl. 2}$$

$A(\lambda)$  ist die Absorption,  $c$  für die Konzentration der Lösung und  $d$  für die Weglänge durch die Probe stehen und bei bekanntem Extinktionskoeffizienten  $\epsilon(\lambda)$  mit der obigen Gleichung die Konzentration bestimmt werden kann.

Die Möglichkeiten der Relaxationen die dem angeregten Molekül zur Verfügung stehen lassen sich schematisch in einem sogenannten Jablonski-Diagramm (Abbildung 1.10) darstellen. Das Jablonski-Diagramm zeigt vereinfacht die Energieniveaus eines Moleküls.  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$  und weitere stehen für die Singulett-Zustände mit dem Gesamtelektronenspin von null sowie die Triplett-Zustände  $T_1$ ,  $T_2$  und weitere mit dem Gesamtspin eins. Die elektronischen Zustände im Molekül werden weiter in Schwingungs- und diese weiter in Rotationszustände aufgespalten.



**Abbildung 1.10:** Das Jablonski-Diagramm. Hier werden die photophysikalischen Prozesse eines Chromophors gezeigt. Die Absorption (A) erfolgt aus dem elektronischen Grundzustand in einen schwingungsangeregten elektronisch angeregten Zustand (grün). Aus höheren elektronischen Zuständen findet eine strahlungslose Relaxation, interne Konversion (IC) statt (orange). Die Schwingungsrelaxation (VR) erfolgt strahlungslos aus schwingungsangeregten Zuständen in die Schwingungsgrundzustände der jeweiligen elektronischen Zustände (hellblau). Aus dem ersten elektronisch angeregten Zustand steht die Emission (E – rot) unter Aussendung eines Photons, eine strahlungslose Relaxation (NRR – dunkelblau) und der Übergang in den Triplett-Zustand (ISC – schwarz) zur Verfügung. Aus dem Triplett-Zustand ereignet sich die Relaxation strahlungslos (NRR – dunkelblau) oder unter Aussendung eines Photons als Phosphoreszenz (P – dunkelrot).

Nach der Absorption befindet sich das Elektron in einem schwingungsangeregten elektronisch angeregten Zustand, wobei höhere elektronische Zustände als  $S_1$  weniger wahrscheinlich sind. Findet die Relaxation aus einem schwingungsangeregten in den  $S_1$  Schwingungsgrundzustand statt, spricht man von Schwingungsrelaxation (engl. „Vibrational Relaxation“ – VR). Bei der Relaxation aus höheren elektronischen Zuständen von innerer Konversion (engl. „Internal Conversion“ – IC). Diese Relaxationen erfolgen durch Wechselwirkung mit umgebenden

Lösungsmittelmolekülen auf einer Zeitskala von wenigen Pikosekunden und sind strahlungslos. Im  $S_1$  Schwingungsgrundzustand ist das Molekül für einen Zeitraum von wenigen Nanosekunden stabil, was die Fluoreszenzlebensdauer widerspiegelt. Von hier stehen mehrere Möglichkeiten zur Auswahl, um die überschüssige Energie zu verlieren. Entweder durch Aussendung eines Photons, dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet. Oder auch durch strahlungslose Relaxationen („Non-Radiative Relaxation“, NNR) und Übergänge vom  $S_1$  zum  $T_1$  Zustand zur Verfügung.

Der Übergang von  $S_1$  nach  $T_1$  (engl. „Inter-System-Crossing“ – ISC) erfolgt unter Änderung des Spins eines Elektrons. Aus dem elektronisch angeregten Zustand  $T_1$  wiederum kann die Relaxation unter Aussendung eines Photons oder strahlungslos erfolgen. Da der Übergang vom metastabilen  $T_1$  zurück in den  $S_1$  Zustand wegen der nötigen Spinumkehr verboten ist, findet die Strahlungsemission erst nach  $10^{-4}$  bis  $10^2$  Sekunden statt und man spricht von Phosphoreszenz.

Die Fluoreszenz erfolgt im Allgemeinen in einen schwingungsangeregten Grundzustand  $S_0$ , aus dem das Elektron komplett über VR in den bei Raumtemperatur am häufigsten besetzten Grundzustand  $S_0$  zurückfällt. Da im Verlauf der Relaxation Energie strahlungslos abgegeben wird hat die Fluoreszenz gegenüber der Absorption eine Energiedifferenz. Diese Energiedifferenz wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet und zeigt sich in einer Rotverschiebung im Emissionsspektrum (siehe Abbildung 1.9) [94].

### **Fluoreszenzmikroskopie**

In der Fluoreszenzmikroskopie unterscheidet man verschiedene Beleuchtungsarten. Üblicherweise wird bei einem Fluoreszenz-Mikroskop von derselben Seite der Probe angeregt wie detektiert. Dies wird als Epi-Fluoreszenzmikroskop bezeichnet. So sammelt das Objektiv nur Fluoreszenzlicht und ein geringen Teil von reflektiertem Anregungslicht. Mit einer geeigneten Auswahl von Filtern kann das Fluoreszenz- vom Anregungslicht getrennt werden und es wird nur noch die Fluoreszenz detektiert.

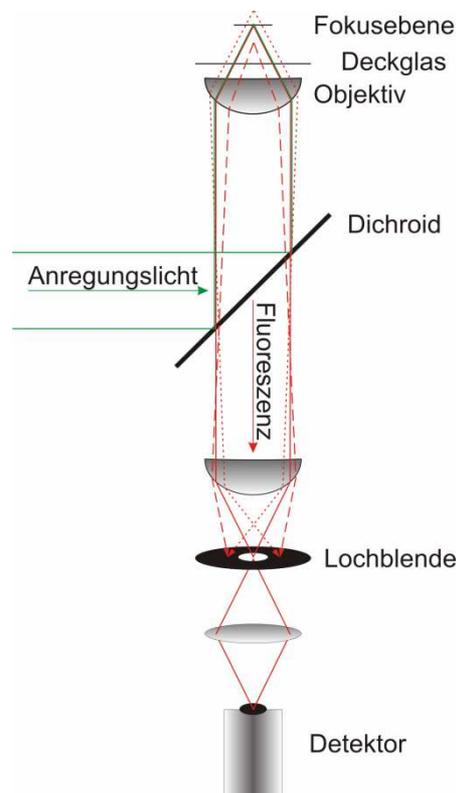
### **Weitfeld-Mikroskopie**

Bei der Weitfeld-Mikroskopie wird die Probe von parallel aus dem Objektiv austretendem Anregungslicht auf einer Fläche beleuchtet. So lassen sich biologische Proben, wie zum Beispiel gesamte Zellen, mit einer hohen Eindringtiefe und einer Schichtdicke von  $1 - 2 \mu\text{m}$  abbilden. Zur Anregung dienen entweder Quecksilberdampflampen oder Xenon-Quellen bei denen mittels geeigneter Filter die passende Anregungswellenlänge selektiert werden kann. Eine andere Möglichkeit sind Laser, die von Grund auf ein schmales Spektrum

(monochromatisches Licht) besitzen, die gepulst werden können und die Strahlen hoher Parallelität mit einer großen Kohärenzlänge besitzen. Die Detektion kann über das bloße Auge erfolgen oder es werden 2D-Sensoren wie CCD Kameras verwendet. Die so abgebildete Fläche kann eine Größe von bis zu  $140 \times 140 \mu\text{m}$ , je nach CCD-Chip und Optik im Detektionsstrahlengang, haben.

### Konfokale Mikroskopie

Mit der Methode der konfokalen Mikroskopie wird das Anregungslicht in einem kleinen Punkt fokussiert. Zusätzlich wird mit einer Lochblende im Detektionspfad Licht, das nicht aus der Fokalebene stammt, und Streulicht effektiv geblockt und somit der Kontrast deutlich erhöht (Abbildung 1.10). Dieses Prinzip wurde von Marvin Minsky 1957 als Patent angemeldet [95, 96].



**Abbildung 1.10:** Das Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. Streulicht oder Fluoreszenz die nicht aus der Fokalebene stammen werden von der Lochblende blockiert und damit nicht detektiert.

Der Durchmesser der Lochblende bestimmt wie viel Licht von der Detektion ausgeschlossen wird. Die Lochblende hat typischerweise den Durchmesser, der dem ersten Minimum der Beugungsringe entspricht. Wie groß der Durchmesser des Beugungsrings ist hängt von der Vergrößerung und der numerischen Apertur des Objektivs ab. Somit wird in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eine Punktabbildung erreicht dessen Signal aus einem konfokalen

Volumen von ca. 300 nm lateral und ca. 700 nm axial stammt. Um in einer biologischen Probe ein ganzes Bild aufzunehmen, muss entweder der Laserfokus durch die Probe oder die Probe durch den Laserfokus gerastert werden. Da die Bewegung von einem Probentisch dazu führen kann, dass sich Teile innerhalb der Probe selbst bewegen und so Artefakte entstehen können, werden für die Methode der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (CLSM) Spiegel vor dem Objektiv mittels Piezomotoren gezielt verkippt. Das konfokale Volumen wird so zeilenweise über die Probe gerastert. Die Stärke der Auslenkung der Spiegel bestimmt die Bildgröße, wobei die Anzahl der Zeilen und die Häufigkeit mit der die Fluoreszenz innerhalb einer Bildzeile ausgelesen wird, die Anzahl der Bildpunkte (Pixel) ergibt. Detektiert wird die Fluoreszenz üblicherweise mit Photoelektronenvervielfacher (engl. „Photomultiplier Tubes“ – PMT) oder Photolawinendioden (engl. „Avalanche Photodiode“ – APD). Durch die zusätzliche Verschiebung des Fokus in der Z-Ebene lassen sich über Computerprogramme 3D Strukturen rekonstruieren [97, 98].

### **Interne-Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie (TIRFM)**

Eine weitere Methode, auf deren Prinzip ein Teil der Untersuchungen in dieser Arbeit durchgeführt wurden und die daher eingehender beschrieben wird, stellt die Interne-Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie (engl. „Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy – TIRFM) dar. Das Prinzip basiert auf der Eigenschaft von Licht an der Grenzfläche von zwei Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes. Unter der Bedingung der totalen internen Reflektion (TIR) wird ein evaneszentes Feld von Licht erzeugt welches selektiv die Farbstoffe nahe der Grenzfläche anregt. Mit TIRFM ist es möglich einen Anregungsbereich von < 100 nm über der Grenzfläche zu erzeugen. Damit ist die axiale Auflösung deutlich höher als die der konfokalen Mikroskopie von ca. 700 nm. Allerdings beschränkt sich der Anregungsbereich auf die ca. 100 nm direkt über der Grenzfläche. Grundlage bildet das snelliussche Gesetz (Gl. 3), welches beschreibt wie Licht beim Durchqueren von Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes reflektiert oder gebrochen wird. Wenn Licht mit einem flachen Winkel in ein zweites Medium mit geringerem Brechungsindex eintritt, wird es vom Lot weggebrochen.

$$\sin \theta_2 = \frac{n_1}{n_2} \sin \theta_1 \quad \text{Gl. 3}$$

Der exakte Winkel der Brechung kann über das snelliussche Gesetz berechnet werden, wobei  $n_1$  und  $n_2$  jeweils für den höheren und niedrigeren Brechungsindex eines Mediums, und  $\theta_1$  und  $\theta_2$  für die Winkel relativ zum Lot stehen (grüner Strahl Abbildung 1.11).

Ein spezieller Fall ergibt sich, wenn der Winkel des einfallenden Lichts über den sogenannten Winkel  $\theta_k$  erhöht wird. Unter dieser Voraussetzung breitet sich das Licht nicht aus, sondern verläuft parallel zur Grenzfläche (rot Strahl Abbildung 1.11). Hierbei gilt,  $\sin 90^\circ = 1$  und das Snelliussche Gesetz vereinfacht sich zu:

$$\theta_k = \sin^{-1} \left( \frac{n_2}{n_1} \right) \quad \text{Gl. 4}$$

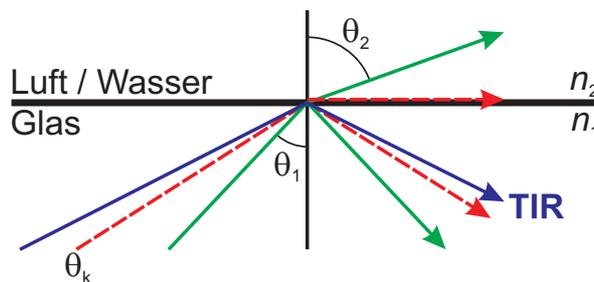
Nimmt man beispielsweise ein Deckglas und Wasser so ergibt sich ein kritischer Winkel von  $\sin^{-1} (1,33 / 1,51) = 61,7^\circ$ , oder für auf dem Glas angewachsenen Zellen von  $\sim 64^\circ - 66^\circ$ . In Tabelle 1.2 sind einige typische Brechungsindizes aufgeführt.

Material	Brechungsindex
Luft	1,00
Wasser	1,33
Zytosol in Zellen	1,36 – 1,38
Deckglas	1,51

**Tabelle 1.2:** Brechungsindizes typischer Materialien.

Es ist sehr wichtig den kritischen Winkel zu kennen, um den minimalen Grenzwert für TIR setzen zu können.

Ist der der kritische Winkel überschritten, wird das einfallende Licht in das Medium mit dem höheren Brechungsindex komplett reflektiert (blauer Strahl Abbildung 1.11).



**Abbildung 1.11:** Schematische Darstellung der Beugung des Lichts, des kritischen Winkels und der totalen internen Reflexion. Wenn das Licht in ein Medium mit geringerem Brechungsindex eintritt, wird es vom Lot weggebrochen und (grüner Strahl). Beim kritischen Winkel verläuft es parallel zu den beiden Medien und auch teilweise reflektiert (roter Strahl) und bei Winkeln größer als der überkritische Winkel findet totale interne Reflexion statt (blauer Strahl).

Trotz der Reflektion der Lichtwelle wird ein exponentiell abfallendes elektromagnetisches Feld oder auch evaneszentes Feld im Medium des geringeren Brechungsindex erzeugt.

Die Intensität eines evaneszenten Feld  $I$  bei verschiedenen Abständen  $z$  von der Glasoberfläche und die Eindringtiefe  $d$  (definiert als der Abfall von  $I(z)$  auf  $1/e$  oder  $\sim 37\%$  der Intensität) können durch die folgenden zwei Gleichungen ausgedrückt werden:

$$I(z) = I(0) \times e^{-\frac{z}{d}} \quad \text{Gl. 5}$$

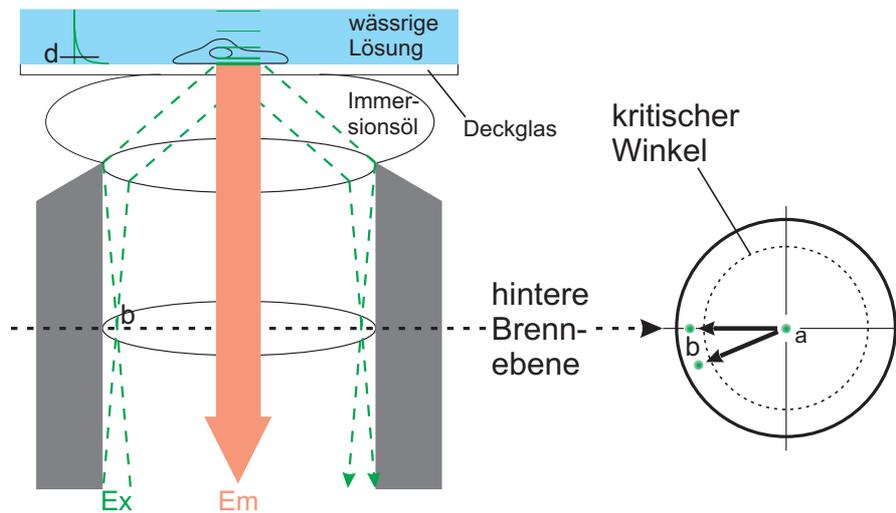
Wobei für  $d$  gilt:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta_1 - n_2^2}} \quad \text{Gl. 6}$$

Demnach kann ein flacheres evaneszentes Feld erzeugt werden indem, erstens der Unterschied zwischen den Brechungsindizes der zwei Medien groß ist, zweitens Licht mit einer kurzen Wellenlänge  $[\lambda_0]$  verwendet wird und drittens mit einem großen Einfallswinkel des Anregungslichts. Im experimentellen Fall sind diese Parameter üblicherweise eingeschränkt: Der Brechungsindex wird durch die Deckgläser und darauf adhärenen Zell bestimmt (siehe Tabelle 1.1), die Wellenlänge des Anregungslicht wird vorgegeben durch den verwendeten Farbstoff und der maximale Winkel für die Beleuchtung ist festgelegt durch die numerische Apertur ( $NA$ ) des Objektivs bei der Anwendung von Objektiv basiertem TIRFM:

$$NA = n_2 \sin \theta_1 \quad \text{Gl. 7}$$

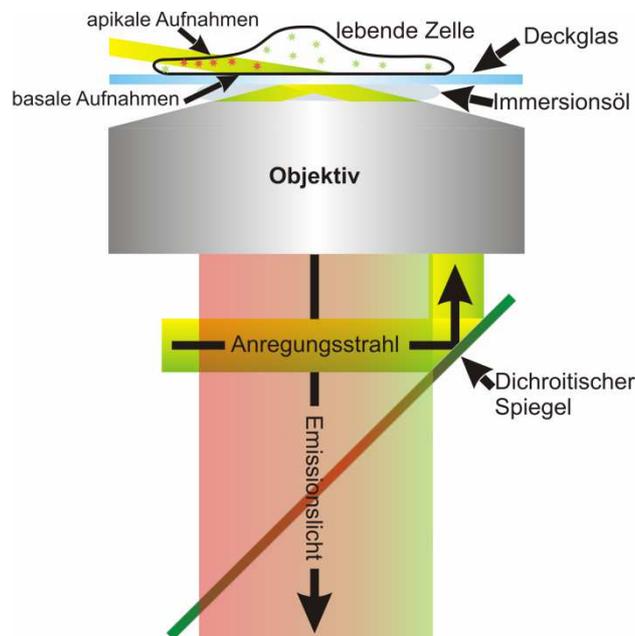
Wobei  $n_2$  für den Brechungsindex des Immersionsöl steht, welches üblicherweise 1,51 für Ölimmersionsojektive mit hoher  $NA$  ist. Da die  $NA$  des Objektivs den maximalen Winkel des einfallenden Lichts (fokussiert auf einen äußeren Umkreis der hintere Brennebene des Objektivs, siehe Abbildung 1.12) bestimmt, wird die minimale Eindringtiefe für Objektiv basiertem TIRFM weiter eingeschränkt.



**Abbildung 1.12:** Die schematische Darstellung des Strahlengangs innerhalb eines TIRFM-Objektivs. Nachdem das Anregungslicht (grün) im Weitfeld mittig auf die hintere Brennebene des Objektivs eingerichtet ist, wird es für TIR auf einen Punkt im äußeren Umkreis der hinteren Brennebene fokussiert (b). Die Anregung (grün) findet an der Peripherie des Objektivs statt, während die Emission (rot) durch das Zentrum verläuft. Abbildung adaptiert aus [99].

So kann im günstigsten Fall für Objektiv-Typ TIRFM eine Eindringtiefe des evaneszenten Feld von  $< 100$  nm erreicht werden.

In dieser Arbeit wird eine Variante verwendet die den Einfallswinkel des Anregungsstrahls variabel lässt (engl. „Variable-Angle-TIRF“ – VA-TIRF) [100, 101]. In Abbildung 1.13 ist die Methode skizziert.



**Abbildung 1.13:** Schematische Darstellung der Variante VA-TIRF. Die Position des Anregungslichts geht nicht über den äußeren Umkreis der hinteren Brennebene (kritischer Winkel) des Objektivs hinaus, der für TIR erforderlich ist. So wird ein Teil des Anregungslichts an der Grenzfläche Deckglas/Zelle gebrochen und erzeugt einen Anregungsstrahl durch die Zelle.

Für VA-TIRF wird die Position des Anregungsstrahls auf der hinteren Brennebene variabel gehalten. Wird eine Position gewählt die nicht über den äußeren Umkreis der hinteren Brenneben, der den kritischen Winkel markiert, hinaus geht (Abbildung 1.12), so wird ein Teil des Anregungslichts gebrochen (Abbildung 1.11) und erzeugt einen Anregungsstrahl durch die Zelle. Alle Fluorophore die sich in diesem Strahl aufhalten werden angeregt. Wird das Objektiv in Z so eingestellt, dass der Fokus nicht auf der Deckglasoberfläche liegt sondern darüber, können im Fall der Untersuchung von Zellen die apikale Zellmembran beobachtet werden.

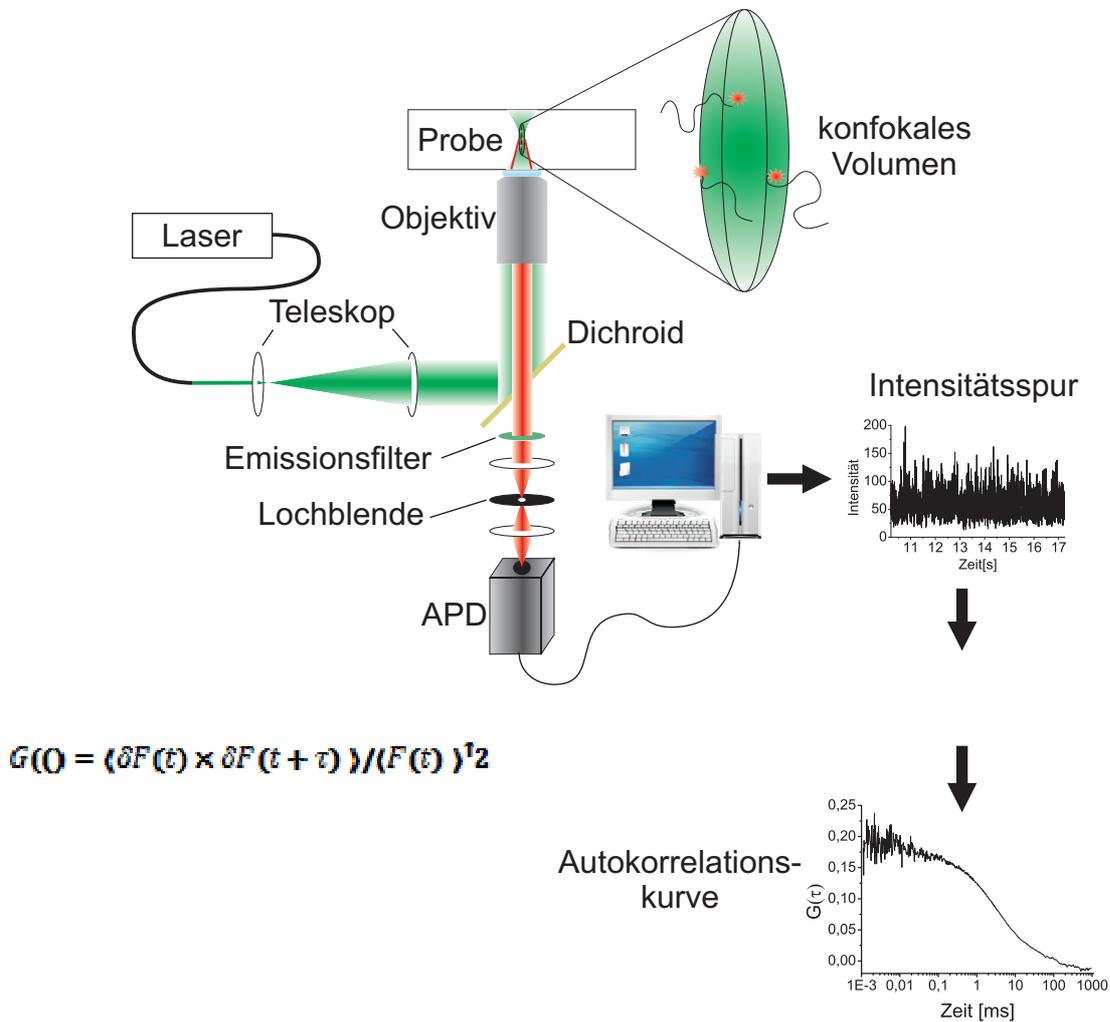
### **Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)**

Durch die stetige Weiterentwicklung der Mikroskopie über die letzten Jahrzehnte eröffneten sich verschiedene Methoden Dynamiken in unterschiedlichen Systemen zu beobachten. In dieser Arbeit wird das Protein STAT5b mit Hilfe von SMFS Methoden in lebenden Zellen untersucht. Die am häufigsten verwendeten Methoden können zu den so genannten F-Techniken zusammengefasst werden: Die Fluoreszenzerholung nach Photobleichen (FRAP), der Försterresonanzenergietransfer (FRET), die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) [102, 103]. Auch die Verfolgung einzelner Partikel (engl. „single particle tracking“ – SPT) gehört zu einer weit verbreiteten Methode [104].

Mit der FCS, basierend auf der konfokalen Mikroskopie, wird die Diffusion von STAT5b in lebenden Zellen bestimmt und soll daher näher erläutert werden.

Die Anfänge der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie machten Magde, Elson und Webb, in Untersuchungen der Diffusion des Farbstoffes Rhodamin G6 und der Bildung eines fluoreszierenden Komplexes von Ethidiumbromid interkaliert in die DNA [105-107] Das Prinzip der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie basiert auf der Fluktuation der Fluoreszenz innerhalb eines meist konfokalen Volumens. Üblicherweise wird die Fluktuation durch die thermische Bewegung fluoreszierender Moleküle verursacht, die das kleine Volumen passieren. Eine weitere Form der Fluktuation kann durch das aktive Anlegen eines Flusses erzeugt werden. Inter- oder intramolekulare Reaktionen können auch dazu führen, dass sich das Fluoreszenzsignal ändert und so deren Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden. Um die Fluktuation tatsächlich messen zu können, ist es erforderlich ein Observationsvolumen zu erzeugen, in welchem einzelne Fluorophore beobachtet werden können. Mit einer Konzentration von etwa 0,1 – 100 nM des Farbstoffes und einem Volumen von ca. 1 fL ist dies möglich. Rigler und Mitarbeiter setzten die Anforderungen um, indem sie FCS mit der konfokalen Detektion kombinierten und so das Hintergrundsignal unterdrückten

und das Observationsvolumen verringerten [108, 109]. Der Aufbau eines konfokalen Mikroskops ist in Abbildung 1.13 und Kapitel 4.xx erläutert.



**Abbildung 1.13:** Schematischer Aufbau eines FCS Mikroskops. Die Basis stellt ein konfokales Mikroskop dar. Das Objektiv fokussiert das Anregungslicht auf ein kleines Volumen. Durch eine Lochblende in der Detektion wird das konfokale Volumen definiert. Das Fluoreszenzsignal wird über eine APD detektiert und an einen PC weitergeleitet. Dort wird die Intensitätsspur aufgenommen und die Korrelationskurve  $G(\tau)$  durch die Autokorrelation berechnet.

Die zeitaufgelöste Detektion der Fluoreszenz erfolgt mit einzelmolekülempfindlichen APDs, deren Signal entweder direkt an eine Korrelatorkarte oder an einen Computer weitergeleitet wird. Hier wird die Fluktuation hinsichtlich ihrer Stärke und Frequenz über eine zeitliche Autokorrelation des aufgenommenen Intensitätssignals quantifiziert. Die Autokorrelation vergleicht eine Kopie der Fluoreszenzintensitätsspur zu einem versetzten Zeitpunkt  $\tau$  mit sich selbst und stellt damit ein Maß für die Selbstähnlichkeit des Signals dar:

$$G(0) = \langle (F(t) \times F(t + \tau)) / (F(t))^2 - 1 \rangle = \langle \delta F(t) \times \delta F(t + \tau) \rangle / (F(t))^2 \quad \text{Gl. 8}$$

$F(t)$  steht für die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$  und  $F(t + \tau)$  für die zum Zeitpunkt  $t + \tau$ . Die Mittelung aller Werte über die Zeit  $t$  wird durch die spitzen Klammer gekennzeichnet. So resultiert aus der Fluoreszenzfluktuation  $\delta F(t)$  die Anzahl der Moleküle die im zeitlichen Mittel durch das konfokale Volumen diffundieren. Hervorgerufen werden diese Fluktuationen durch unterschiedliche Phänomene. Löschung oder Bleichen der Fluorophore ändert die Intensität des Signals aber auch photophysikalische Vorgänge wie ISC in den Triplet Zustand oder Verschiebungen in den Absorptions- und Emissionsspektren durch Konformationsänderungen. Ist die Änderung der lokalen Konzentration  $\delta c$  im effektiven Volumen ( $V_{\text{eff}}$ ) des Fokus die Ursache der Fluktuation, kann sie über die räumliche Integration der Konzentrationsschwankungen  $\delta c(r)$ , gewichtet über eine Wahrscheinlichkeitsfunktion  $\Phi(r)$  ein Photon in  $V_{\text{eff}}$  zu detektieren, berechnet werden [110]:

$$\delta F(t) = \iiint \Phi(r) \delta c(r, t) dr \quad \text{Gl. 9}$$

$\Phi(r)$ , die Funktion ein Molekül zu detektieren (engl. „Molecule Detection Function“ – MDF), ist zeitunabhängig [111]. Durch sie wird die Form und das Volumen von  $V_{\text{eff}}$  charakterisiert, welches angenähert wird mit einem Gausschen Ellipsoid mit dem Radius  $\omega_0$  in der x-y-Ebene und einer axialen Ausdehnung von  $Z_0$ :

$$\Phi(x, y, z) = \alpha e^{-\frac{(x^2 + y^2)}{\omega_0^2}} e^{-\frac{z^2}{Z_0^2}} \quad \text{Gl. 10}$$

$\alpha$  steht für einen Vorfaktor der abhängig ist von der Anregungsintensität, von Verlusten durch Filter und der Detektoreffizienz.

Aus dem Fickschen Gesetz können die Konzentrationsschwankungen abhängig von der Diffusion beschrieben werden:

$$\frac{\partial \delta c(r, t)}{\partial t} = D \nabla^2 \delta c(r, t) \quad \text{Gl. 11}$$

Wird vorausgesetzt, dass nur eine Art von frei diffundierender Teilchen durch  $V_{\text{eff}}$  vorliegt, kann mittels Fouriertransformation die Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  aus den Gleichungen 8, 9 und 10 berechnet werden [110, 112, 113]:

$$G(\tau) = G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Gl. 12}$$

Dabei ist  $G(0)$  die Amplitude bei  $\tau = 0$ . Sie ist antiproportional zur Gesamtzahl der Fluorophore  $N$  im Detektionsvolumen. Für  $N$  gilt  $N = c V_{eff}$  mit  $V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0$  und  $c$  Konzentration. Die Größe des Laserfokus und der Lochblende legen den Strukturparameter  $k = \frac{z_0}{\omega_0}$  fest. Für das Volumen wird wie oben schon erwähnt ein dreidimensionales Gauss-Profil angenommen. Somit ist  $\omega_0$  der radiale Abstand bei dem die Intensität um  $e^{-\frac{1}{2}}$  abgefallen ist und  $z_0$  entspricht dem axialen Abstand zur optischen Achse. Zusätzlich wird die Beziehung (Einstein-Smoluchowski-Beziehung) zwischen der lateralen Diffusionszeit  $\tau_D$  und dem Aufbau unabhängigen Diffusionskoeffizienten  $D$  berücksichtigt:

$$\tau_D = \frac{\omega_0^2}{4D} \quad \text{Gl. 13}$$

Entsprechend können bei bekannten Dimensionen von  $\omega_0$  und  $z_0$  des Detektionsvolumens aus Kalibrationsmessungen (für ausführlichere Beschreibungen siehe [114]) die lokale Konzentration an Fluoreszenzmolekülen aus der Amplitude von  $G(0)$  bestimmt werden:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} \times (c)} \quad \text{Gl. 14}$$

Der Diffusionskoeffizient lässt sich einfach über Gleichung 12 und der durch die Autokorrelationsfunktion erhaltenen Diffusionszeit  $\tau_D$  ableiten.

Bisher wurde angenommen, dass sich die Eigenschaften, während das Fluorophor das konfokale Volumen passiert, nicht ändern. In vielen Fällen ist dies allerdings nicht der Fall. Bei höheren Anregungsleistungen zeigen die Farbstoffe ein „Blinken“. Die häufigste Ursache dafür ist der Übergang in den ersten angeregten Triplet Zustand. Aus diesem benötigt das Fluorophor länger um in den Grundzustand zurück zu kehren. Während dieser Dauer emittiert es keine Photonen und erscheint dunkel. Dies führt zu einer falschen Messung gegenüber den tatsächlich im konfokalen Volumen vorhanden Farbstoffmolekülen.

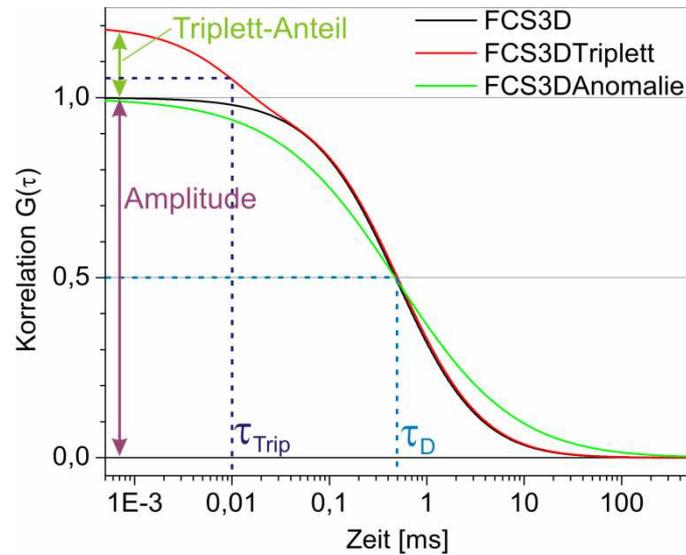
Eine einfache Methode dieses „Blinken“ aufgrund der photophysikalischen Eigenschaften mit in der Autokorrelationsfunktion in Betracht zu ziehen ist, die Fluktuation bezüglich der Diffusion von der durch die Photophysik ( $X_{Photo}(\tau)$ ) zu trennen:

$$G_{total}(\tau) = X_{Photo}(\tau) \times G_{Diff}(\tau) \quad \text{Gl. 15}$$

Diese Trennung kann nur dann durchgeführt werden wenn der Diffusionskoeffizient durch die Reaktion (in diesem Fall die Photophysik) nicht beeinflusst wird [115, 116]. Das „Blinken“ aufgrund des Übergangs in den Triplet-Zustand kann über einen einfachen exponentiellen Abfall beschrieben werden:

$$X_{\text{Triplet}}(\tau) = 1 - T + T \times e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{Triplet}}}} \quad \text{Gl. 16}$$

T steht für die Triplet-Anteil und  $\tau_{\text{Triplet}}$  für die Tripletzeit. Dies führt zu einer zusätzlichen Schulter bei kurzen Zeiten in der Auto-Korrelations-Kurve (Abbildung 1.14).



**Abbildung 1.14:** Darstellung der Korrelationskurven für verschiedene Anpassungsmodelle. Der reziproke Wert der Amplitude bei  $\tau = 0$  (1) gibt die Anzahl der Fluorophore an. Der Triplet-Anteil (15%) entspricht dem Anteil an Fluorophoren die aufgrund des Übergangs in den Triplet-Zustand dunkel sind.  $\tau_{\text{Trip}}$  (0,01 ms) ist die Zeit bei der der Triplet-Anteil auf  $1/e$  abgefallen ist.  $\tau_D$  (0,5 ms) ist die Diffusionszeit, welche beim halben Amplitudenwert (0,5) abgelesen wird. Für das Modell mit Berücksichtigung der Anomalie ist ein Anomaliefaktor ( $\alpha$ ) von 0,7 gewählt worden.

Durch Einsetzen der Gleichungen 12 und 16 in Gl. 15 erhält man so die gesamte Auto-Korrelations-Kurve für frei diffundierende Farbstoffe:

$$G_{\text{total}}(\tau) = \left(1 - T + T \times e^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{Triplet}}}}\right) \times G(0) \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad \text{Gl. 17}$$

Das „Triplet-Blinken“ kann auf jegliches photophysikalisches Phänomen bezogen werden welches sich auf einer schnellen Zeitskala abspielt und dazu führt, dass ein Übergang

zwischen dem fluoreszenten (F) und dunklen (D) Zustand statt findet [117]. Entsprechend kann Gleichung 16 allgemein ausgedrückt werden:

$$X_{\text{Blincken}}(\tau) = 1 - B + B \times e^{-\frac{\tau}{\tau_B}} \quad \text{Gl. 18}$$

Mit  $\tau_B = \frac{1}{k_D + k_F}$ : Relaxationszeit, wobei gilt  $\begin{matrix} k_D \\ \rightarrow \\ F \\ \leftarrow \\ D \end{matrix}$

Und  $B = \frac{k_D}{k_D + k_F}$ : Der durchschnittliche Anteil an dunklen Fluorophoren

Wird allerdings die Bewegung der Teilchen auf eine andere Art und Weise beeinflusst, so muss Gleichung 12 in einer allgemeinen Form ausgedrückt werden:

$$G_{\text{Diff}}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \frac{\sum_i \eta_i(c_i) M_i(\tau)}{(\sum_i \eta_i(c_i))^2} \quad \text{Gl. 19}$$

Hier werden verschiedene Möglichkeiten der Bewegung berücksichtigt und gemäß ihrer Emissionsrate gewichtet. Dabei muss der Bewegungs-Term  $M_i(\tau)$  auf die jeweiligen Fälle angepasst werden. Einige Fälle sind hier aufgeführt:

Freie Diffusion in drei Dimensionen: 
$$M_i(\tau) = \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right) \left(1 + \frac{\tau}{k^2 \tau_{D,i}}\right)^{\frac{1}{2}}} \quad \text{Gl. 20a}$$

Membrandiffusion in zwei Dimensionen: 
$$M_i(\tau) = \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D,i}}\right)} \quad \text{Gl. 20b}$$

Aktiver Transport mit der Geschwindigkeit  $v_i$ : 
$$M_i(\tau) = e^{-\left(\frac{v_i \tau}{\omega_a}\right)^2} \quad \text{Gl. 20c}$$

In Membranen und innerhalb von lebenden Zellen kann in den meisten Fällen nicht von der idealen brownischen Diffusion ausgegangen werden, sondern man spricht stattdessen von anomaler Diffusion. Die Bewegung der Teilchen ist durch zelluläre Strukturen, einer hohen

Dichte anderer Vesikel, Proteine und Teilchen und der Wechselwirkungen bzw. unspezifischen Bindungen zu diesen beeinträchtigt. So zeigt die Diffusion auch starke lokale Schwankungen [118-120]. Das Problem der anomalen Diffusion ist bis jetzt noch nicht komplett verstanden. Aus unterschiedlichen Gründen ist die mittlere quadratische Verschiebung nicht mehr direkt proportional zur Zeit. Sie hängt stattdessen von  $t^\alpha$  ab, folglich muss bei anomaler Diffusion in den Gleichungen 20a, b und c der Term  $\tau/\tau_{D,i}$  durch  $(\tau/\tau_{anom,i})^\alpha$  ersetzt werden [121, 122]:

$$\langle r^2 \rangle \propto t^\alpha \Leftrightarrow \frac{\tau}{\tau_{D,i}} \rightarrow \left( \frac{\tau}{\tau_{anom,i}} \right)^\alpha \text{ mit } \alpha < 1 \quad \text{Gl. 21}$$

In diesem Fall kann der Diffusionskoeffizient nicht mehr auf konventionelle Weise definiert werden und es gilt  $\tau_{anom,i}^\alpha = \omega_0^2 / 2\Gamma_i$  wobei  $\Gamma_i$  für einen Transportkoeffizienten mit der Einheit  $\mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ , statt  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  für den normalen Diffusionskoeffizienten, steht.

### **Bildgebende Diffusionsmikroskopie (DIFIM)**

Die Aussagen die mittels der Fluoreszenz-Korrelations-Mikroskopie gemacht werden können sind auf einen sehr kleinen lokalen Bereich eingeschränkt. Es können Ergebnisse über die Konzentration und über Diffusionsprozesse gewonnen werden, allerdings nur im Rahmen der Fluktuationen innerhalb des konfokalen Volumens. Mit dem Aufkommen der konfokalen Laserscanning Mikroskopie (CLSM) stieg das Interesse in der Biologie die aus der FCS gewonnen Informationen mit dieser bildgebenden Technik zu vereinen. Der Ansatz FCS mit einer Form von Abtasten (engl. „scanning“) einer Probe (engl. „Scanning-FCS“ – sFCS) zu kombinieren wurde mittels verschiedener Techniken verwirklicht.

Weissmann et al. hat als Erster in den 70er Jahren die Methode des sFCS genutzt. Er führte Messung der Fluoreszenzfluktuation innerhalb eines Volumenelements, welches in einem aus Plexiglas rotierenden Zylinder positioniert ist, durch. Damit ist es möglich Molekulargewichte von Makromolekülen wie der DNA aufgrund spontaner Konzentrationsänderungen zu bestimmen [123]. Später wurde die CLSM mit der Methode des sFCS kombiniert. So war es möglich zusätzlich zu den zeitlichen Informationen auch räumliche zu erhalten. Diese Methode wurde Bild-Korrelations-Spektroskopie (engl. „Image-Correlation-Spectroscopy“ – ICS) genannt [124]. Mit ICS lassen sich, durch die Korrelation einzelner CLSM Bilder, die Clusterdichte und der Grad der Aggregation bestimmen. In der Variation der zeitlichen ICS

(engl. „temporal ICS“ – TICS) ist es möglich über eine Zeitserie von CLSM Bildern Dynamiken zu extrahieren [125]. Sie eignet sich um sehr langsame Diffusionsprozesse zu untersuchen. Diese müssen im Bereich von wenigen Millisekunden liegen, denn die Abtastfrequenz muss schneller sein als der Diffusionsprozess. Bei der Diffusion von Transmembranproteinen in der Membran ist das der Fall. Aufgrund der benötigten schnelleren Abtastrate wird allerdings die Auflösung von ICS gegenüber der normalen CLSM geringer. Eine Übersicht der verschiedenen Methoden von ICS findet sich in [126]. Eine weitere Methode die Informationen der Dynamik mit der Ortsauflösung zu kombinieren gelang Kuricheti et. al. [127]. Sie erstellten zweidimensionale Geschwindigkeitskarten, indem sie Geschwindigkeitsprofile in Mikrokanälen aufnahmen.

Die bildgebende Diffusionsmikroskopie (engl. „Diffusion Imaging Microscopy“ – DIFIM) stellt eine Methode dar, mit der FCS und FLIM kombiniert werden [128]. Die gleichzeitige Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer im Intensitätssignal macht es möglich Farbstoffe von Hintergrundsignal in Zellen zu trennen. Mit dieser Technik wird die Probe abgerastert indem sie verfahren wird, während das konfokale Volumen fix bleibt (Kapitel 4.3). So können kleine Bereiche innerhalb der Zelle über einen Piezotisch schnell abgetastet und für jeden Bildpunkt eine eigene Korrelation berechnet werden. Im Gegensatz zur ICS ist es so möglich auch sehr schnelle Diffusionen zu erfassen. Da sich die Piezotische sehr genau ansteuern lassen, können die Schrittweiten der Bildpunkte sehr klein gewählt und somit eine hohe Auflösung erzielt werden. Die Methode erlaubt es so Heterogenitäten der Diffusion in unterschiedlichen Zellkompartimenten zu untersuchen und eine Diffusionskarte darzustellen, welche die relativen Diffusionseigenschaften innerhalb des abgetasteten Bereichs zeigt.

## **1.4 Zielsetzung**

Die grundlegende Aufgabe in dieser Arbeit ist es fluoreszenzspektroskopische Methoden zur Messungen dynamischer Prozesse innerhalb der Zelle zu untersuchen. Das System an welchem diese Untersuchungen durchgeführt wurden ist der JAK/STAT-Signalweg. Er stellt einen der direktesten Kommunikationswege von extrazellulären Signalen bis in den Zellkern dar. Nach Aktivierung des Signalwegs findet eine Translokation des beteiligten STAT5b Proteins von der Zellmembran hin zum Zellkern statt. Die Dynamiken des STAT5b Proteins soll eingehender untersucht werden. Hierfür ist zunächst sicher zu stellen, dass eine geeignete Markierung des Proteins gefunden wird. Es stehen verschiedene Methoden der Markierung von Proteinen in lebenden Zellen zu Verfügung (siehe Fluoreszenzmarkierung von

Proteinen). Zwei dieser Methoden wurden untersucht, zum einen die Markierung mit einem Fluoreszenzprotein (mCherry) fusioniert an STAT5b und zum anderen die Fusion mit dem SNAP-Tag. Die Markierung des SNAP-Tag mit dem zellpermeablen Farbstoff TMR-Star wurde detailliert charakterisiert.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten fluoreszenzmarkierte Proteine in lebenden Zellen zu untersuchen. Die FCS stellt eine etablierte Methode dar die Diffusion zu charakterisieren. Sie wird verwendet, um in Punktmessungen innerhalb unterschiedlicher Zellkompartimente die Diffusionseigenschaften verschieden behandelte Maus Fibroblasten zu analysieren.

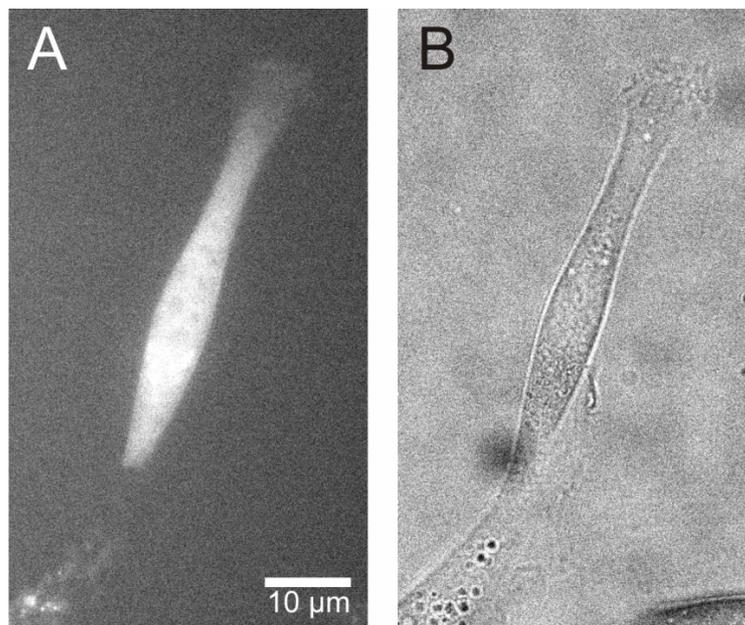
DIFIM ist eine Methode die es ermöglicht nicht nur die Diffusion in einem Punkt zu messen, sondern in einem ausgewählten Ausschnitt einer ganzen Zelle eine Diffusionskarte darzustellen. Damit wäre innerhalb einer kurzen Messdauer die Darstellung von Heterogenitäten innerhalb derselben Zelle möglich.

Basierend auf der Technik von TIRFM sollen Bindungseigenschaften des Proteins (STAT5b) mit dem aktivierenden Rezeptor (EpoR) beobachtet werden. Hierfür werden mit einer modifizierten Variante von TRIFM dem VA-TIRF Videos im Bereich der apikalen Zellmembran aufgenommen und mit einer eigens dafür in Matlab geschriebenen Software analysiert.

## 2 EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

### 2.1 Das Fusionsprotein STAT5b-mCherry in Maus Fibroblasten

Eine häufig angewandte Methode, um Proteine spezifisch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren sind Fluoreszenzproteine, die mit dem zu untersuchende Protein fusioniert werden. In dieser Arbeit wurde STAT5b mit dem Fluoreszenzprotein mCherry kombiniert. Bei der Transduktion der NIH3T3 Zelllinie mit STAT5b-mCherry wurde das Plasmid für das Tet-Induktions-System (Siehe Kap. 1.1) zusätzlich in die Zelle eingebracht, um die Expression des Fusionsproteins steuern zu können (Kapitel 4.1). Links in Abbildung 2.1 ist die Epifluoreszenzaufnahme einer NIH3T3 Zelle gezeigt, welche das Protein STAT5b-mCherry exprimiert.



**Abbildung 2.1:** Fluoreszenz (A)- und Durchlichtaufnahme (B) einer NIH3T3 Zelle, in welcher das Fusionsprotein STAT5b-mCherry mit Doxyzyklin exprimiert wurde.

Die Expression wurde mit 20 ng/ml Doxyzyklin über Nacht induziert. Rechts in der Abbildung 2.1 ist die zugehörige Durchlichtaufnahme abgebildet. Für die Fluoreszenzaufnahme wurde als Anregung eine Quecksilberdampfampe mit einem für mCherry geeigneten Filtersatz (Texas Red, mCherry) verwendet und mit einer auf 4°C gekühlten CCD-Kamera detektiert.

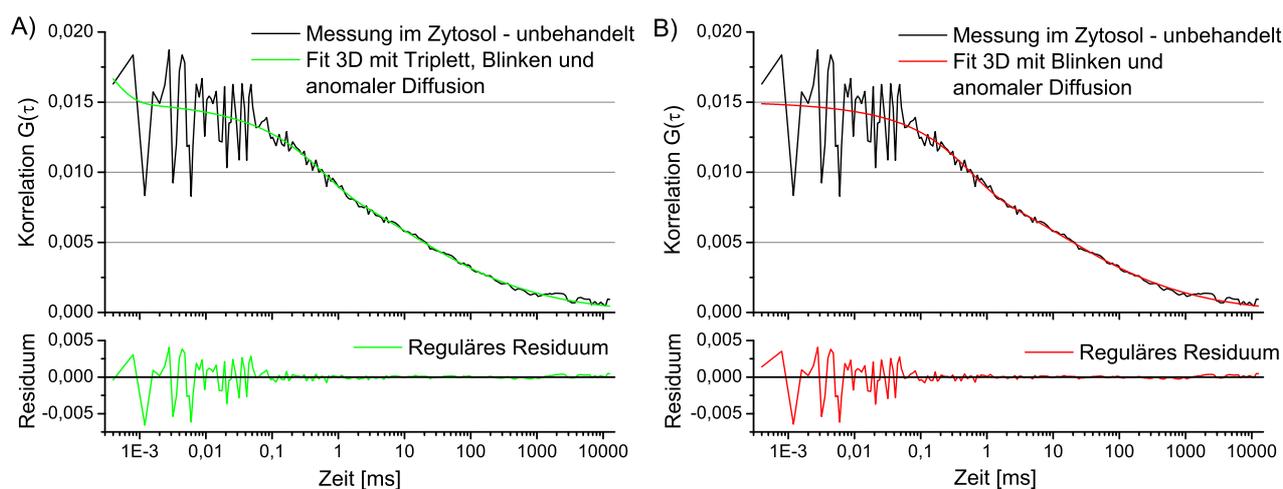
Die Zelle ist homogen markiert. Im Bereich des Zellkerns ist die Fluoreszenz intensiver, da das Volumen der Zelle hier deutlich zunimmt und somit im Zellkern mehr mCherry markierte

STAT5b Proteine detektiert werden. Die homogene Verteilung der Fluoreszenz zeigt, dass sich das Protein sowohl innerhalb des Zytoplasmas als auch im Zellkern frei bewegen kann. In der linken unteren Ecke der Durchlichtaufnahme ist ein Teil einer weiteren Zelle zu erkennen. In diesem Bereich sind in der Fluoreszenzaufnahme nur heterogen verteilte Punkte zu sehen. Diese Punkte zeigen die Autofluoreszenz der Zelle, die um den Zellkern verteilt vorliegt, wie in späteren Aufnahmen (Abbildung 2.12 E) noch deutlicher zu erkennen ist.

Aufgrund der vorliegenden Daten konnte gezeigt werden, dass sich STAT5b durch das Fusionsprotein mCherry markieren und mit fluoreszenzmikroskopische Methoden abbilden lässt. In den folgenden Kapiteln soll nun untersucht werden, ob mCherry als Fluoreszenzmarker für Einzelmolekül-spektroskopische Methoden, wie FCS und DIFIM (Kapitel 1.3) geeignet ist.

### Die Untersuchung der Diffusion von STAT5b-mCherry in lebenden NIH3T3 Zellen mittels FCS

Die FCS-Messungen wurden an einem in der Gruppe eigenständig aufgebauten konfokalen Fluoreszenzmikroskop durchgeführt (siehe Kapitel 4.3). Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte über zwei APDs, welche direkt mit einer Korrelatorkarte verbunden waren. Das Signal wurde mit einem 50/50 Strahlteiler auf beide APDs aufgeteilt. So konnten setupspezifische Artefakte bei der Kreuzkorrelation des identischen Signals mit der Korrelatorkarte vermieden werden.



**Abbildung 2.2:** Fit der Korrelation einer FCS-Messung von STAT5b-mCherry im Zytosol einer unbehandelten NIH3T3 Zelle. Das Modell der grünen Anpassung A) beinhaltet Terme für Triplett, Blinken und anomale Diffusion, für die rote Anpassung B) nur Blinken und anomale Diffusion.

In Abbildung 2.2 ist die Korrelation des STAT5b-mCherry Signals im Zytosol einer lebenden, nicht stimulierten und mit 20 ng/ml Doxyzyklin induzierten NIH3T3 Zelle, deren Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme in Abbildung 2.1 gezeigt ist, dargestellt. Die Korrelation wurde mit zwei verschiedenen Modellen angepasst, um fest zu stellen welche Terme für die Anpassung notwendig sind und so die Korrelation am besten beschreiben. Die grüne Kurve im Graph A) ist eine 3D Anpassung, welche Terme für Triplet, Blinken und anomale Diffusion berücksichtigt. Die rote Kurve im Graph B) berücksichtigt in der 3D Anpassung nur das Blinken und die anomale Diffusion.

Terme	3D Anpassung mit Triplet, Blinken und anomale Diffusion	3D Anpassung nur mit Blinken und anomale Diffusion
Tripletzeit	$0,00029 \pm 0,00062$ [ms]	-
Blinkzeit	$0,619 \pm 0,409$ [ms]	$0,608 \pm 0,307$ [ms]
Anomaliefaktor $\alpha$	$0,4122 \pm 0,1085$	$0,4232 \pm 0,1055$
Diffusionszeit	$9,9557 \pm 9,1964$ [ms]	$13,5731 \pm 12,1151$ [ms]

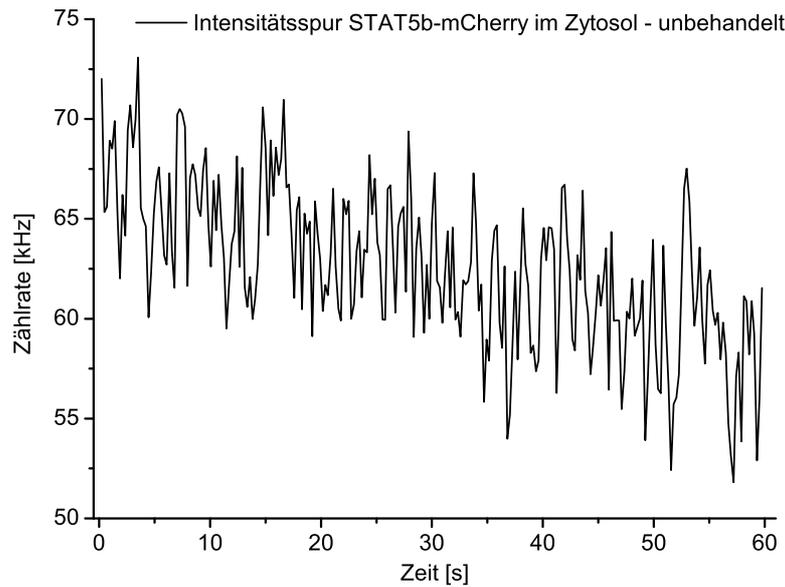
**Tabelle 2.1:** Werte mit Standardabweichung für die Anpassungen der Korrelation von STAT5b-mCherry in einer lebenden NIH3T3 Zelle.

Für die 3D Anpassung mit Triplet, Blinken und anomale Diffusion erhält man 3 Relaxationszeiten, eine langsame mit ca. 10 ms, eine mittlere mit ca. 600  $\mu$ s und eine schnelle mit ca. 0,3  $\mu$ s. Für die 3D Anpassung ohne Triplet liegt die mittlere Zeit ebenfalls bei ca. 600  $\mu$ s und die langsame bei etwa 13,5 ms. Der Faktor  $\alpha$  für die anomale Diffusion liegt für beide Anpassungen bei ca. 0,4 (Tabelle 2.1).

Für die Anpassung mit Triplet ist die Tripletzeit zu sehr kurzen Korrelationszeiten in den Submikrosekundenbereich verschoben. Da die geringe Zeitauflösung der Korrelatorkarte mit einer „Lagtime“ von 0,4  $\mu$ s nicht ausreicht um die Tripletzeit für Fluoreszenzproteine zu erfassen, ist der Wert der Anpassung von ca. 0,3  $\mu$ s nicht aussagekräftig. Somit spielt die 3D Anpassung mit Triplet, um die Tripletzeiten zu erhalten, in diesem Fall keine Rolle. Daher ist die Anpassung, welche nur das Blinken und die anomale Diffusion berücksichtigt in diesem Fall besser geeignet, um die Diffusion in lebenden Zellen zu beschreiben.

Zusätzlich ist im Graph zu sehen, dass die Korrelation für lange Zeiten nicht auf 0 abfällt. Das ist in der Regel der Fall, wenn der Fluoreszenzmarker teilweise gebleicht wird. Abbildung 2.3

zeigt die Intensitätsspur eines Kanals für das Fluoreszenzsignal über 60 Sekunden, welches für die oben gezeigte Korrelation verwendet wurde.



**Abbildung 2.3:** Die Intensitätsspur des STAT5b-mCherry Signals im Zytosol einer NIH3T3 Zelle über 60 Sekunden.

In der Intensitätsspur ist zu erkennen, dass das Fluoreszenzsignal zu Beginn bei ca. 67,5kHz liegt und während der Messung kontinuierlich auf ca. 57,5kHz abfällt. Dieser Intensitätsabfall (Photobleichen) ist die Ursache dafür, dass die Korrelation für lange Zeiten nicht auf 0 absinkt.

Das Bleichen des Fluoreszenzsignals führt dazu, dass die Korrelationskurve angehoben wird. Dies wiederum hat ein Einfluss auf die Werte der Diffusionszeit, die bei der Anpassung der Korrelationskurve erhalten werden. Daher lassen sich die Diffusionszeiten so nicht zuverlässig bestimmen. Somit ist das Fusionsprotein STAT5b-mCherry nur bedingt geeignet, um die Diffusionseigenschaften von STAT5b zu charakterisieren.

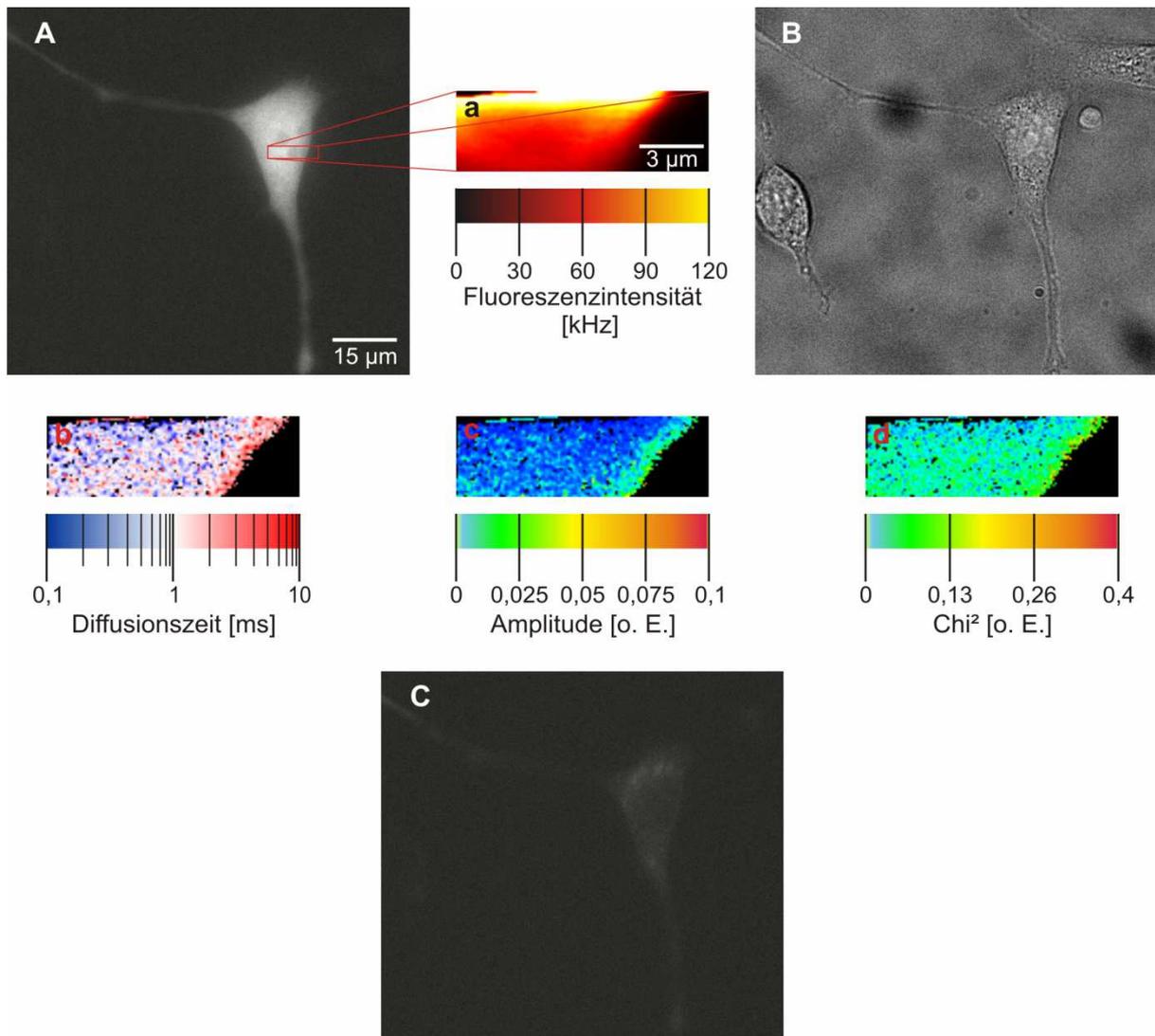
### Diffusion von STAT5b-mCherry mittels DIFIM

Im Gegensatz zu den Punkt-FCS Messungen mit denen die Diffusion in einem Punkt innerhalb der Zelle gemessen wird, ermöglicht DIFIM die Diffusion eines ganzen Ausschnitts einer Zelle zu vermessen (Kapitel 1.3 und 4.3). Hierfür wurde derselbe Aufbau, wie für die in Kapitel 2.1.1 durchgeführten FCS Messungen verwendet. Allerdings waren die APDs nicht an die Korrelatorkarte angeschlossen, sondern an Zeitkorrelierte Einzelphotonenzähl (engl. „Time-correlated single photon counting“ – TCSPC)-Karten. Die Fluoreszenz wurde von den

APDs detektiert und mit den TCSPC-Karten nach dem FIFO (first in first out) Prinzip aufgenommen. Das Auslesen der Karten erfolgte mit einer zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelten Software in LabView (Kapitel 4.4). Diese wird anschließend auch für die Analyse der Scans verwendet. Abbildung 2.4 zeigt die Ergebnisse einer DIFIM Messung einer lebenden NIH3T3 Zell.

Die Epifluoreszenz- und Durchlichtaufnahme (2.4 A und B) wurden mit der an das Mikroskop angebrachten CCD-Kamera vor der DIFIM Messung und eine Epifluoreszenzaufnahme nach der Messung (2.4 C) durchgeführt (Einstellungen siehe 4.xx). Die Belichtungszeit – in diesem Fall 150ms – für die Fluoreszenzaufnahmen vor und nach der DIFIM Messung waren identisch. In A) ist sehr gut zu erkennen, dass eine Zelle sowohl im Zellkern als auch im Zytosol homogen gefärbt ist. In der Durchlichtaufnahme B) sind zwei weitere Zellen zu sehen, die STAT5b-mCherry nicht exprimieren und damit keine Fluoreszenz in Abbildung 2.4 A) zeigen. Da der „reversible“ Tet-On Promotor über die Transduktion mittels viralen Partikeln ohne Antibiotikaresistenz in die Zellen gebracht wurde (Kapitel 4.1), überleben auch die Zellen in Kultur, die den Promotor nicht mehr besitzen und somit nach Induktion mittels Doxyzyklin kein STAT5b-mCherry mehr exprimieren (Kapitel 4.1). Für die DIFIM Messungen wurden die Zellen selektiv ausgewählt und nur solche gemessen, die Fluoreszenz zeigten. In der Aufnahme C) ist die Fluoreszenz des STAT5b-mCherry in der Zelle nach der DIFIM Messung zu sehen. Aufgrund des Photobleichens von mCherry ist im Zellkern keine Fluoreszenz mehr zu erkennen und im Zytosol nur noch sehr schwach.

Um die Diffusion bzw. Diffusionsänderungen des STAT5b Proteins nach Stimulation des JAK/STAT Signalweg über DIFIM Messungen zu bestimmen, darf der gesamte Scan eine Messdauer im einstelligen Minutenbereich nicht überschreiten. In der Software ist es entsprechend möglich die Pixelgröße, die Verweildauer der Probe im Fokus pro Pixel und die gesamte Größe des zu scannenden Bereichs frei zu wählen. In diesem Beispiel wurde für die Pixelgröße 100 nm gewählt. Die Verweildauer war auf 100 ms pro Pixel eingestellt und der gesamte gescannte Bereich war 12 x 4  $\mu\text{m}$  groß (rotes Rechteck in Abbildung 2.4 A). Damit betrug die gesamte Messdauer für diesen Scan 8 Minuten.



**Abbildung 2.4:** DIFIM Messung einer NIH3T3 Zelle, die das Fusionsprotein STAT5b-mCherry exprimiert, mit DIFIM. A) die gesamten Zelle vor der Messung, B) die zugehörige Durchlichtaufnahme. C) ist die Fluoreszenzaufnahme nach der DIFIM Messung. Das rote Rechteck in A) stellt den gescannten Ausschnitt dar. a) zeigt die Fluoreszenzintensität während des Scans. b), c) und d) jeweils die Diffusionszeit, Amplitude und das  $\text{Chi}^2$  der Anpassung an die Korrelation der einzelnen Pixel des Scans nach der Auswertung mit der eigens dafür geschriebenen Software.

Um innerhalb der Verweildauer von nur 100 ms pro Pixel genügend Photonen für eine Korrelation zu erhalten, muss zum einen die Laserintensität zur Anregung hoch sein – in dieser Messung waren es 100  $\mu\text{W}$  vor Einkopplung in das Objektiv – und zum anderen die Anzahl der fluoreszierenden STAT5b-mCherry Proteine im Fokus sehr hoch sein. Es wurde daher eine Doxyzylinkonzentration von 20 ng/ml gewählt, um eine ausreichend hohe Expression des STAT5b-mCherry Proteins zu garantieren.

Abbildung 2.4 a) zeigt die Fluoreszenzintensität des DIFIM Scans. Der gescannte Ausschnitt wurde so in der Zelle positioniert, dass ein Teil des Zellkerns, des Zytoplasmas, der Zellmembran

und ein kleiner Bereich außerhalb der Zelle berücksichtigt ist. Für den kleinen schwarzen Bereich links oben in Abbildung 2.4 a) konnte die Software die Fluoreszenzintensität nicht auslesen. Rechts im Bild ist der Bereich außerhalb der Zelle in dem keine Fluoreszenz detektierbar ist. Die Abbildungen b), c) und d) zeigen die von der Software analysierten Ergebnisse.

In b) ist eine Karte der Diffusionszeiten pro Pixel dargestellt, in welcher die Software ein vereinfachtes 2D Modell für die Anpassung anwendet. Die vereinfachte 2D Anpassung berücksichtigt keine zusätzlichen Terme wie Triplett, Blinken oder anomale Diffusion. Da der unterschied in den Diffusionszeiten gegenüber der Anpassung mit den erweiterten Termen gering ist und die relativen Zeiten zueinander vergleichbar bleiben, ist mit dem 2D Modell die Analyse in erheblich geringerer Rechenzeit möglich. Die Diffusionszeiten variieren von 0,1 bis 10 ms. Entlang der Zellmembran liegen die Diffusionszeiten bei 10 ms, innerhalb der Zelle liegt eine heterogene Verteilung der Diffusionszeiten vor. Für schwarze Pixel konnte keine Diffusionszeit, entsprechend Amplitude, bzw.  $\chi^2$  bestimmt werden.

In dem Bild für die Amplitude der Anpassung c) sind die Amplituden der einzelnen Pixel mit  $\leq 0,1$  sehr klein. Im Bereich der hohen Fluoreszenzintensität ist die Amplitude mit  $\leq 0,01$  am niedrigsten, was einer Anzahl von über 100 STAT5b-mCherry Molekülen im konfokalen Volumen bedeutet. Bei der Zellmembran und im unteren Bereich des Scans ist der Wert mit  $\leq 0,05$  etwas höher.

Die Abbildung 2.4 d) gibt das reduzierte  $\chi^2$ , welches für die Güte der Anpassung steht, pro Pixel wieder. Mit Werten  $\leq 0,4$  ist das reduzierte  $\chi^2$  für die Anpassungen an die Korrelation pro Pixel klein.

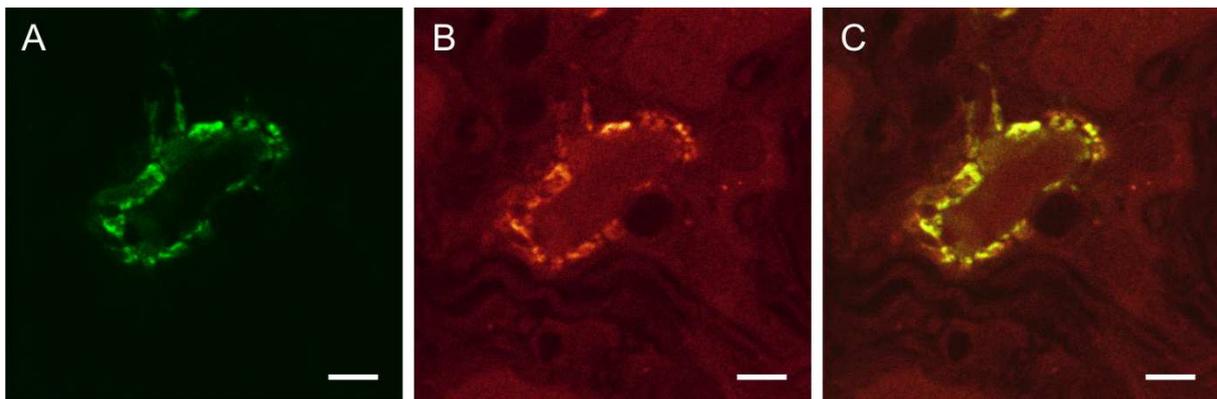
Um in einer möglichst kurzen Zeit von  $\leq 10$  Minuten einen Ausschnitt einer Zelle mittels DIFIM zu scannen ist es nötig die Parameter an die Grenzbereiche wie einer hohen Konzentration an Fluoreszenzmolekülen (STAT5b-mCherry), hohe Laserleistung und kurze Verweildauern pro Pixel zu bringen. Unter diesen Bedingungen wird die Analyse der Messdaten ungenau. Daher ist in diesem Fall die Aussagekraft eines DIFIM Scans kritisch zu betrachten.

## **2.2 Verwendung des SNAP-Tag zur spezifischen Markierung**

Eine weitere Methode, um spezifische Fluoreszenzmarkierungen zu erreichen ist die Nutzung des SNAP-Tags. Der Tag wird an das zu untersuchende Protein fusioniert und kann funktionalisierte Fluoreszenzfarbstoffe kovalent binden. Hinzu kommt der Vorteil einen

gewünschten Farbstoff zu funktionalisieren und so eine Vielzahl an verschiedenen Farbstoffen zur Markierung nutzen zu können.

Im Falle des SNAP-Tags, für dessen Bindungsmechanismus der Farbstoff mit einer BG-Gruppe funktionalisiert wird (s. Einleitung 1.2), zeigt das Guanin die Eigenschaft einige Farbstoffe erheblich zu löschen. Dies stellt bezüglich der spezifischen Markierung einen zusätzlichen Vorteil dar. Nicht gebundene Farbstoffe liegen in der Probe als gelöschte BG-Substrate vor und tragen wenig bis fast gar nicht mehr zur Fluoreszenz bei. In Abbildung 2.5 sind die soeben aufgeführten Eigenschaften an einer Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) Aufnahme gezeigt (Einstellungen in Kapitel 4.7). Die Probe ist ein fixierter Hirnschnitt einer Maus in dem Synaptophysin (ein Protein in Vesikeln in der Calyx von Axonen) mit eGFP und SNAP-Tag fusioniert wurde. Sie wurde, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Thomas Kuner am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg, von Christian Kempf präpariert.

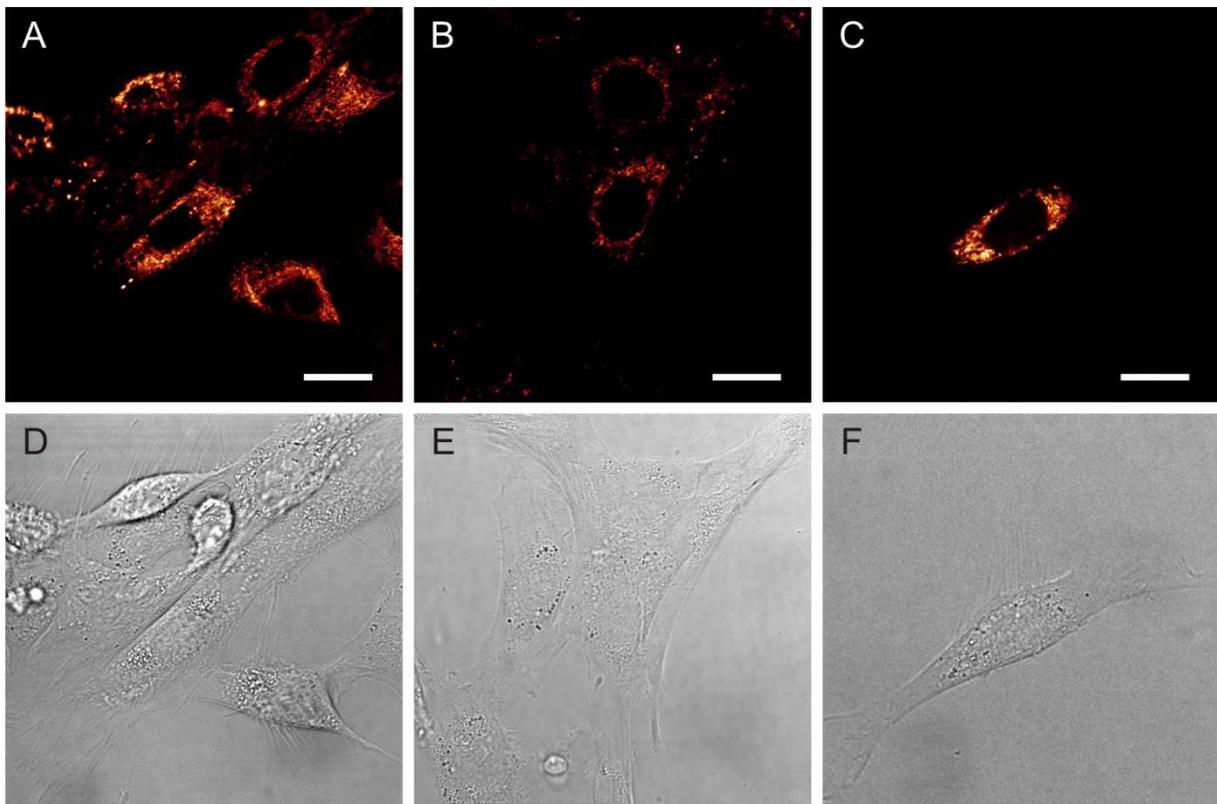


**Abbildung 2.5:** LSM Aufnahme eines fixierten Hirnschnitts einer Maus. Zu sehen ist Synaptophysin – fusioniert mit eGFP und SNAP – in der Calyx. A) Die Aufnahme im grünen eGFP Kanal, B) im roten SNAP-Atto700 Kanal und C) die Überlagerung beider Kanäle. Maßstabsbalken 5  $\mu\text{m}$ .

Die Aufnahme A) in Abbildung 2.5 zeigt die Fluoreszenz von eGFP bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und die Detektion mit PMTs in einem Emissionsfenster von 500 – 580 nm. In B) ist die Fluoreszenz von Atto700 zu sehen. Die Anregungswellenlänge welche zur Anregung von Atto700 verwendet wurde, liegt bei 670 nm. Das Detektionsfenster der PMT lag zwischen 715 und 800 nm. In Abbildung 2.5 A) besteht ein deutlicher Kontrast zwischen Fluoreszenzsignal und Hintergrund. Der Grund für den deutlichen höheren Hintergrund in B) ist, dass der Schnitt nach dem Färben mit BG-Atto700 nicht gewaschen wurde und daher noch ungebundener und damit zwar gelöschter, aber nicht komplett dunkler Farbstoff in der Probe vorliegt. Dennoch lässt sich das intensivere Fluoreszenzsignal des

gebunden Farbstoffs gut vom Hintergrund unterscheiden. Die Überlagerung der beiden Kanäle – die gelben Regionen – in Aufnahme C), zeigt deutlich die Übereinstimmung des grünen eGFP mit den intensiv fluoreszierenden Regionen im roten Atto700 Kanal.

Wie oben gezeigt, lässt sich das SNAP-Tag Fusionsprotein in fixierten Proben mit BG-Substraten färben. Um Diffusion oder Bindungsereignisse von dem Protein STAT5b in lebenden Zellen zu untersuchen, ist es erforderlich festzustellen, ob BG-Farbstoffe auch in lebenden Zellen das SNAP-Tag Fusionsprotein markieren können. Hierfür wurden lebende NIH3T3 Zellen, welche das Fusionsprotein STAT5b-SNAP exprimieren, mit verschiedenen Konzentrationen an BG-Atto633 Farbstoff inkubiert (siehe 4.6).



**Abbildung 2.6:** Lebende NIH3T3 Zellen inkubiert mit BG-Atto633. A) und B) Expression von STAT5b-SNAP mit 50 ng/ml Doxyzyklin induziert und Inkubation in A) mit 5 µM und in B) mit 0,2 µM Farbstoff. In C) wird kein Protein exprimiert und mit 5 µM Farbstoff inkubiert. Maßstabsbalken betragen 20 µm.

In Abbildung 2.6 A) werden die Zellen mit einer Farbstoffkonzentration von 5 µM inkubiert. Die Färbung zeigt eine punktförmige Markierung der Zellen ausschließlich um den Zellkern lokalisiert. In B) ist ein vergleichbares Muster zu sehen, allerdings mit einem deutlich geringeren Fluoreszenzsignal als in A). Dies ist auch zu erwarten, da die Inkubation der Zellen in B) mit 0,2 µM BG-Atto633 viel geringer ist als in A). In C) wird der Farbstoff mit der gleichen Konzentration wie in A) inkubiert. Das Markierungsmuster ist das gleiche wie in

Abbildung 2.6 A), auch mit der gleichen Signalintensität. Jedoch wurde in dieser Probe kein Fusionsprotein exprimiert. Eine Vielzahl weiterer BG-Farbstoffe wurde, bezüglich ihrer Möglichkeit mit dem SNAP-Tag des Fusionsproteins zu reagieren, getestet:

Farbstoffsubstrat	Inkubations-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Zellpermeabilität
BG-Atto550	1	-
BG-Atto620	3	-
BG-AttoRho14	1	-
BG-MR121	2,5	-
BG-Atto633	5 und 0,2	-
BG-Atto647N	1	-
BG-AttoOxa12	1	-
BG-Atto700	0,5	-
TMR-Star	2,5, 1, 0,1 und 0,05	+

**Tabelle 2.2:** Die Verwendeten BG-Substrate um STAT5b-SNAP exprimierende NIH3T3 Maus Fibroblasten zu Markieren mit der Farbstoffkonzentration, welche zur Inkubation benutzt wird.

Alle BG-substrate zeigten jedoch das gleiche unspezifische punktförmige Muster um den Zellkern und sind somit zur Markierung des Proteins nicht geeignet (Abbildungen 6.1 – 6.6). Mit TMR-Star ist dennoch ein Farbstoff gegeben, der bei Inkubation der Zellen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern dem SNAP-Tag des Fusionsproteins frei zur Bindung vorliegt. In den nächsten Kapiteln wird dargestellt unter welchen Bedingungen eine spezifische Markierung für Einzelmolekül-spektroskopische Untersuchungen möglich ist.

### 2.3 Markierung des STAT5b-SNAP Proteins in lebenden NIH3T3 Zellen

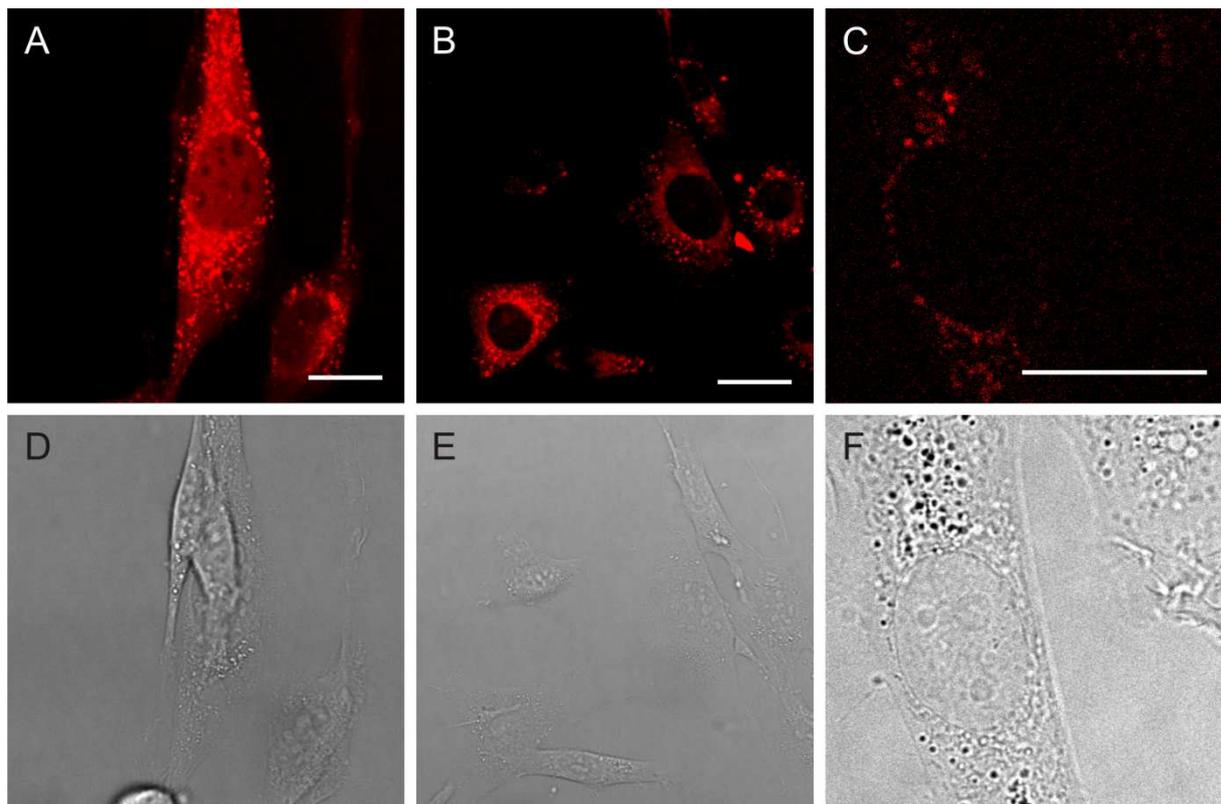
Um quantitative Aussagen über die Diffusion von STAT5b-SNAP innerhalb lebender Zellen treffen zu können, musste zunächst sichergestellt werden, dass die Markierung des Fusionsproteins mit TMR-Star spezifisch ist. Nur so ist es möglich die Beobachtungen der Fluoreszenz direkt mit der Lokalisation des Proteins zu korrelieren. Hierfür stellten sich folgende Fragen: Lässt sich die Expression des Fusionsproteins steuern? Wie hoch ist die

optimale TMR-Star Konzentration? Bindet der Farbstoff spezifisch an das Fusionsprotein? Diese Fragen wurden in den folgenden Experimenten untersucht.

#### TMR-Star Konzentration und Auswaschen des ungebundenen Farbstoff

Im folgenden Kapitel wird das Diffusionsverhalten von TMR-Star in die Zellen hinein und aus den Zellen heraus untersucht. Dafür wird die Farbstoffkonzentration mit der die Zellen zum Markieren inkubiert werden variiert und getestet ob und wie oft das Waschen der Zellen notwendig ist.

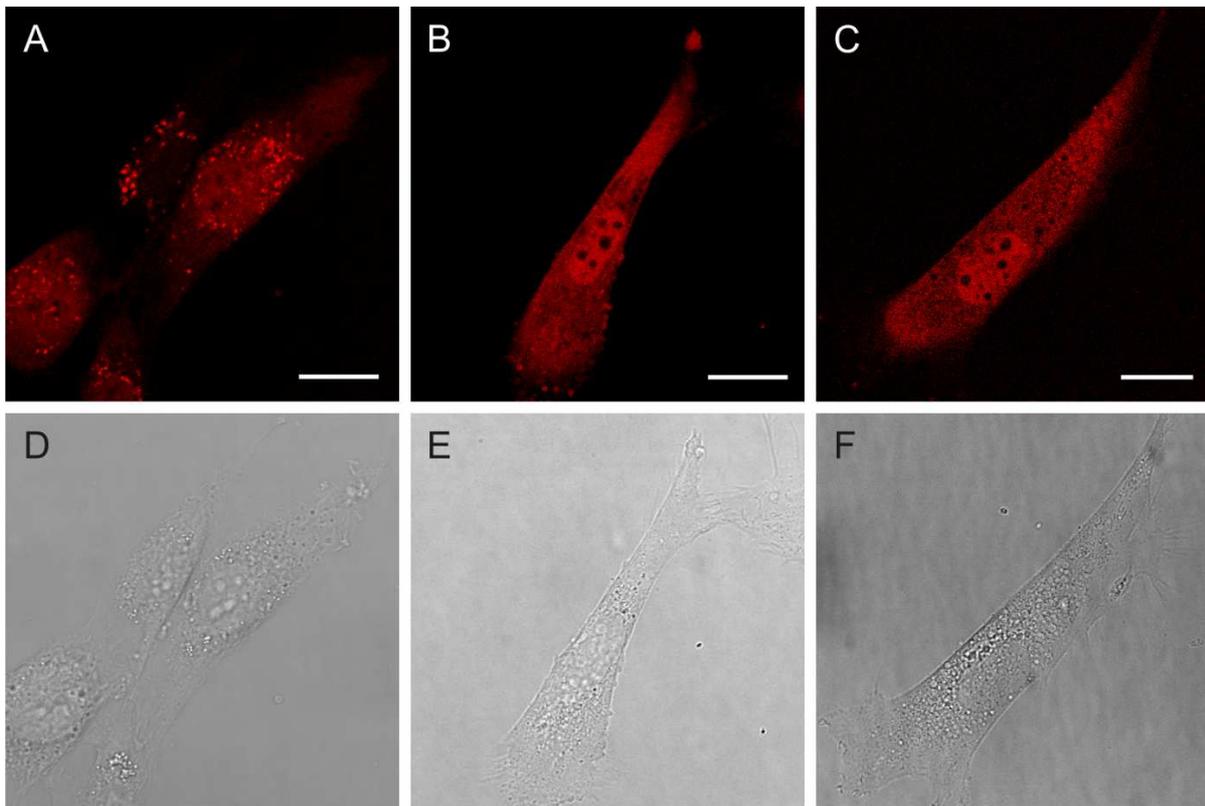
Wie schon in der Einleitung erwähnt, wird STAT5b mit dem Fusionsprotein SNAP exprimiert. So kann sichergestellt werden, dass jeweils nur ein Protein mit maximal einem Farbstoffmolekül – in diesem Fall TMR-Star – kovalent gebunden ist. Der Farbstoff TMR-Star ist zellpermeabel, d.h. er diffundiert durch die Zell- und auch durch die Kernmembran. Damit ist er in der gesamten Zelle frei zugänglich (Kapitel 1.2). Um zu gewährleisten, dass möglichst alle Proteine markiert sind, wird der Farbstoff im Überschuss zugegeben.



**Abbildung 2.7:** Fluoreszenzaufnahmen von NIH3T3 Zellen. A) Behandlung der Zellen mit Doxozyklin zur Expression von STAT5b-SNAP, markiert mit 2,5 µM Farbstoff (TMR-Star). In B) wurde ebenfalls mit 2,5 µM Farbstoff inkubiert, wobei kein Protein exprimiert wurde. In C) wurde weder Protein exprimiert, noch mit Farbstoff inkubiert. D), E) und F) sind die jeweils dazugehörigen Durchlichtbilder. Die Maßstabsbalken betragen 20 µm.

Über das Tet-Induktions-System (Kapitel 1.1) lässt sich nicht direkt abschätzen, wie hoch die Konzentration an exprimiertem Protein ist. Daher wurde zum Markieren zunächst die Farbstoffkonzentration mit  $2,5 \mu\text{M}$  so gewählt, wie sie als Minimum im Protokoll des Herstellers empfohlen wird. Nach Inkubation mit TMR-Star und Waschen der Zellen (s. 4.6) ist zu erkennen, dass alle Zellen fluoreszieren, allerdings in unterschiedlicher Intensität und Struktur (Abbildung 2.7). In Abbildung 2.7 A) erkennt man, dass eine Zelle homogen gefärbt ist, wobei eine intensiv fluoreszierende, punktartige Markierung innerhalb des gesamten Zytoplasmas überlagert ist. Im Zellkern ist die Markierung, bis auf die Kernkörperchen, ebenfalls homogen. Die intensive punktartige Markierung lässt die Frage aufkommen, ob die Markierung spezifisch ist. Um dies zu testen, wurden die Zellen auf unterschiedliche Art und Weise markiert. Die Aufnahme B) in Abbildung 2.7 zeigt Zellen, welche mit der gleichen Konzentration an Farbstoff wie in Aufnahme A) inkubiert und gewaschen wurden, allerdings wurde kein Doxycyclin zugegeben und damit auch kein Protein exprimiert. Die Fluoreszenz zeigt ein punktförmiges Muster, ähnlich wie in der Zelle in Abbildung 2.7 A). Jedoch fehlt die homogene Markierung im Zytoplasma und Zellkern. In Abbildung 2.7 C) ist die Fluoreszenzaufnahme von einer Zelle zu sehen, welche kein Protein exprimiert und auch nicht mit Farbstoff inkubiert wurde. Hier ist eine schwache, punktartige Fluoreszenz, die nur um den Zellkern lokalisiert ist, zu erkennen. In den Aufnahmen A) und B) der Abbildung 2.7 wurden PMTs als Detektoren benutzt und in C) APDs. APDs sind sensitiver als PMTs, daher lässt sich auch eine sehr schwache Fluoreszenz detektieren. Entsprechend ist die Fluoreszenz in Abbildung 2.7 C) als deutlich geringer, im Vergleich zu Abbildung 2.7 A) und B), einzuschätzen. Bei dieser geringen Fluoreszenz handelt es sich um die Autofluoreszenz der Zelle.

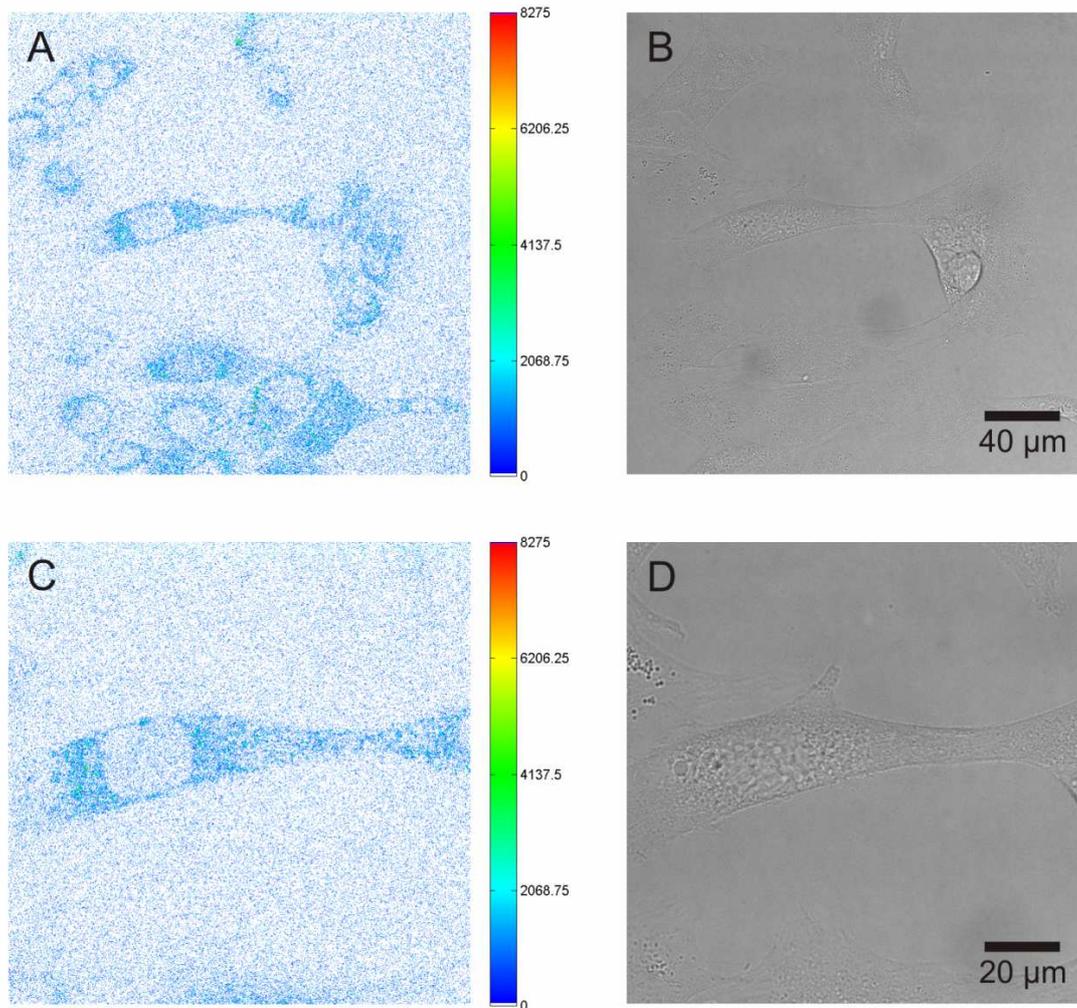
Die Aufnahmen A), B) und C) in Abbildung 2.8 zeigen jeweils die Markierung der Zellen, die mit 1000, 100 und 50 nM TMR-Star gefärbt wurden. In allen Aufnahmen wurde das Fusionsprotein zuvor durch Stimulation mit 20 ng/ml Doxycyclin exprimiert. Die Detektion erfolgte in den Abbildungen 2.8 A) durch PMTs und in 2.8 B) und C) über APDs. Das Muster der Färbung in Aufnahme 2.8 A) ist mit der homogenen Färbung der gesamten Zelle und der Überlagerung einzelner intensiver fluoreszierender punktartiger Strukturen, ähnlich dem in 2.7 A). In den Aufnahmen 2.8 B) und C) fällt das punktartige Muster weg und es ist nur noch die nahezu homogene Färbung der gesamten Zelle zu erkennen, sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern, mit Ausnahme der Kernkörperchen.



**Abbildung 2.8:** Fluoreszenzaufnahmen von TMR-Star markiertem STAT5b-SNAP in NIH3T3 Zellen. Mit Farbstoffkonzentrationen von 1  $\mu$ M in A), 100 nM in B) und 50 nM in C). D) – F) die dazugehörigen Durchlichtbilder. Die Maßstabsbalken betragen 20  $\mu$ m.

Das Muster der Fluoreszenz der Zellen bei hohen Konzentrationen von 2,5 und 1  $\mu$ M TMR-Star unterscheidet sich deutlich von der homogenen Färbung der Zellen bei der Verwendung von niedrigen Farbstoffkonzentrationen von 100 und 50 nM.

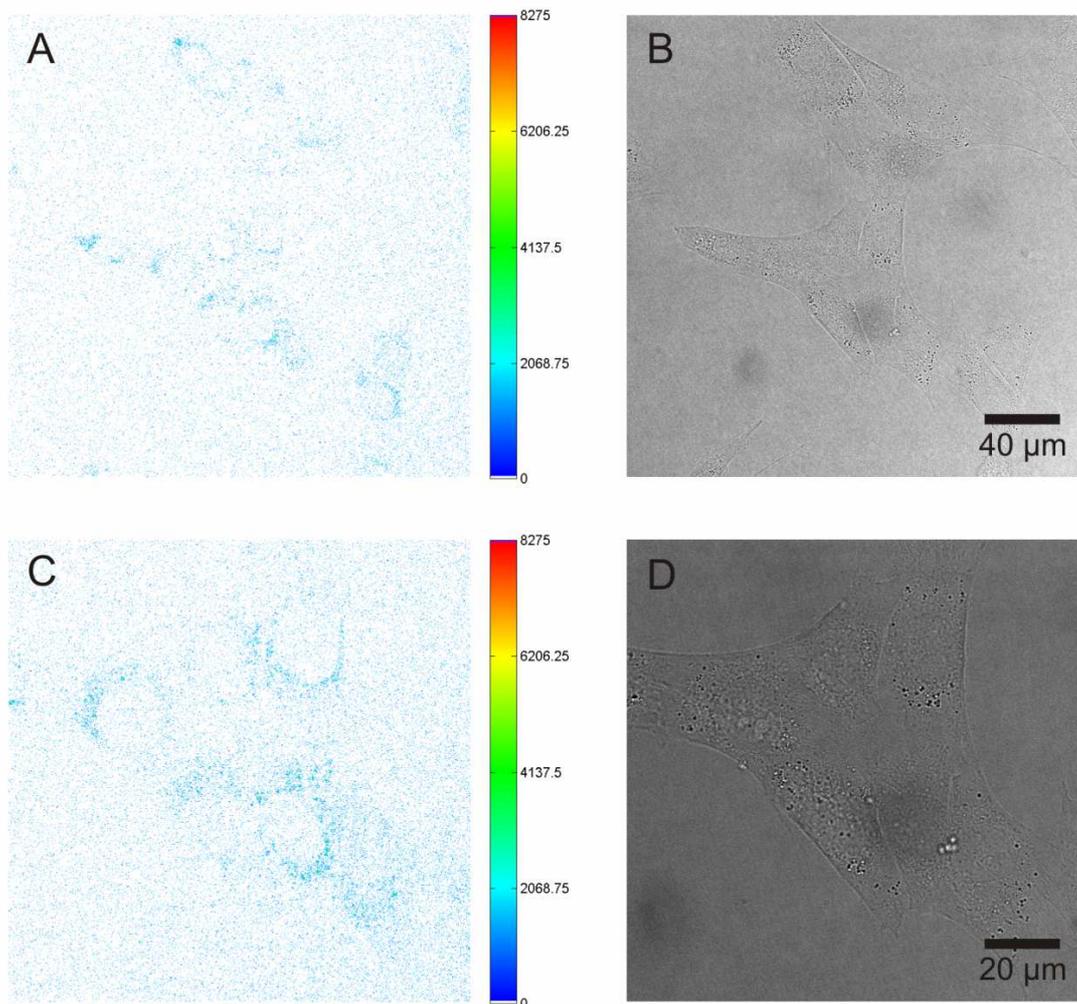
Neben der Untersuchung der zu verwendenden Farbstoffkonzentration müssen gegebenenfalls noch Waschschrte in Betracht gezogen werden. Um sicher zu gehen, dass kein freier Farbstoff mehr in den Zellen vorliegt, muss klargestellt werden, dass sich nicht gebundener Farbstoff komplett aus der Zelle waschen lässt. Hierfür wurden Fluoreszenzaufnahmen von Zellen nach den jeweiligen Waschschrten gemacht, die mit Farbstoff inkubiert wurden aber STAT5b-SNAP nicht exprimieren.



**Abbildung 2.9:** Inkubation der Zellen mit 50 nM TMR-Star und anschließend **einmaligem** Waschen mit DMEM ohne Phenolrot. A) Ein Scan über mehrere Zellen, B) zeigt das dazugehörige Durchlichtbild. C) Ein vergrößerter Scan der zentralen Zelle aus Bild A, D) das entsprechende Durchlichtbild.

In Abbildung 2.9 wurden die Zellen nach der Inkubation mit 50 nM TMR-Star einmal mit DMEM ohne Phenolrot gewaschen. Bild A) zeigt einen Scan über das gesamte Sichtfeld von mehreren Zellen die alle das gleiche Färbemuster haben. Im Zytosol ist eine geringe Fluoreszenz zu sehen, wobei die Fluoreszenzintensität direkt um den Zellkern leicht zunimmt, was sehr gut in der Aufnahme C) zu erkennen ist, in welcher die mittlere Zelle aus Bild A) vergrößert gescannt wurde. Weiterhin ist im gesamten Hintergrund eine leichte Fluoreszenz zu detektieren, die über der des normalen Rauschens der Detektoren liegt. Bereits nach zweimaligem Waschen, wie in Abbildung 2.10 A) und C) (vergrößerter Scan) zu erkennen ist, fällt die Fluoreszenz deutlich ab. Sowohl innerhalb der Zellen, in denen nur noch leichte Fluoreszenz direkt um den Zellkern erkennbar ist. Als auch der gesamte Hintergrund, dessen

Fluoreszenz nur noch eine geringe Intensität hat, welche kaum über der des normalen Rauschens der Detektoren liegt.



**Abbildung 2.10:** Inkubation der Zellen mit 50 nM TMR-Star und anschließend **zweimaligem** Waschen mit DMEM ohne Phenolrot. A) Ein Scan über mehrere Zellen, B) zeigt das dazugehörige Durchlichtbild. C) Ein vergrößerter Scan der zentralen Zelle aus Bild A), D) das entsprechende Durchlichtbild.

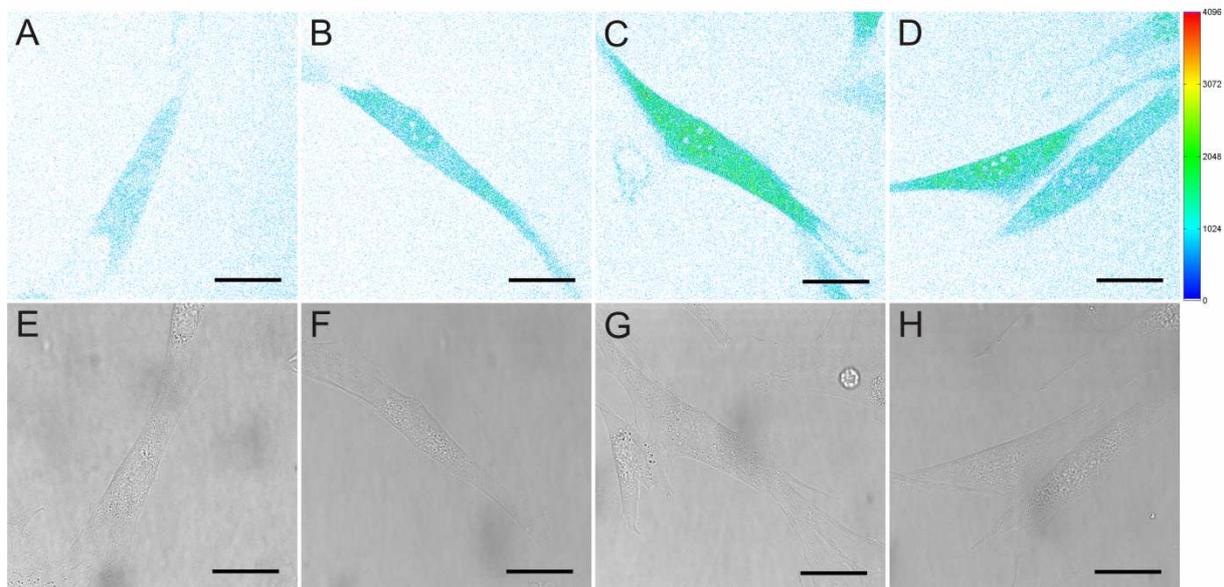
Die Aufnahmen der Abbildungen 2.9 und 2.10 zeigen, dass es nötig ist die Zellen vor den Messungen mehrmals zu waschen. Weiterhin wird auch deutlich, dass es möglich ist die Zellen zu waschen und freien, ungebundenen Farbstoff auszuwaschen. Die verbleibende geringe Fluoreszenz innerhalb der Zellen ist die Autofluoreszenz. Ein Vergleich der Aufnahme aus Abbildung 2.10 C) mit der aus Abbildung 2.12 E) in der kein Farbstoff inkubiert wurde zeigt, dass die Fluoreszenzintensitäten gleich sind. Die Zellen wurden in den folgenden Experimenten entsprechend mindestens dreimal gewaschen um sicherzugehen, dass jeglicher ungebundener Farbstoff ausgewaschen ist. Weiterhin wurden Waschschritte über viermal hinaus vermieden. Die Scherkräfte die beim Waschen auf die Zellen wirken

führen dazu, dass sie ihre Adhäsion verlieren und dementsprechend kreisförmig aussehen und an der Zellmembran so genannte bläschen bilden oder sich komplett ablösen.

Das so erfolgreich etablierte Waschprotokoll wird so im Folgenden für alle weiteren Experimente angewendet.

### Regulation der Expression des Fusionsproteins

Neben der Konzentration des Farbstoffs, um das Fusionsprotein in den Zellen zu markieren, ist für Einzel-Molekül-Fluoreszenz Experimente noch wichtig die gesamte Fluoreszenz auf einem niedrigen Niveau zu belassen. Die Intensität kann über die Menge des exprimierten Fusionsproteins gesteuert werden.



**Abbildung 2.11:** NIH3T3 Zellen mit TMR-Star (50 nM) markiertem STAT5b-SNAP bei Zugabe unterschiedlicher Doxyzyklinkonzentrationen zur Expression. In A) 50 ng/ml, in B) 100 ng/ml, in C) 200 ng/ml und in D) 500 ng/ml. E – H zeigen die jeweils dazugehörigen Durchlichtaufnahmen. Die Maßstabsbalken betragen 20  $\mu\text{m}$ .

Mit dem Tet-Induktions-System (Kapitel 1.1) wird die Menge des Proteins über die Konzentration von Doxyzyklin festgelegt. Es induziert konzentrationsabhängig die Expression von STAT5b-SNAP.

In Abbildung 2.11 ist eine Konzentrationsreihe gezeigt. Die Expression wurde mit 50, 100, 200 und 500 ng/ml Doxyzyklin induziert. Von 50 bis 200 ng/ml Doxyzyklin steigt die Fluoreszenz innerhalb der Zelle an. Bei einer Konzentration von 500 ng/ml, in Aufnahme D) zu sehen, sind zwei Zellen markiert. Zum einen ist die Fluoreszenz-intensität in beiden Zellen

unterschiedlich und zum anderen zeigt die intensiver gefärbte Zelle keine höhere Fluoreszenz als die Zelle in Aufnahme C, welche mit 200 ng/ml Doxyzyklin induziert wurde.

Daraus kann geschlossen werden, dass mit etwa 200 ng/ml Doxyzyklin die höchstmögliche Expression erreicht ist und dass sich die einzelnen Zellen innerhalb derselben Probe bezüglich der Expression heterogen verhalten. Dennoch zeigt die Konzentrationsreihe der Expression des Proteins, dass sie auf einen eingegrenzten Bereich kontrollierbar ist. Für die weiteren Experimente wird demnach eine Doxyzyklinkonzentration von 20 ng/ml verwendet, um eine geringe Expression zu erzielen.

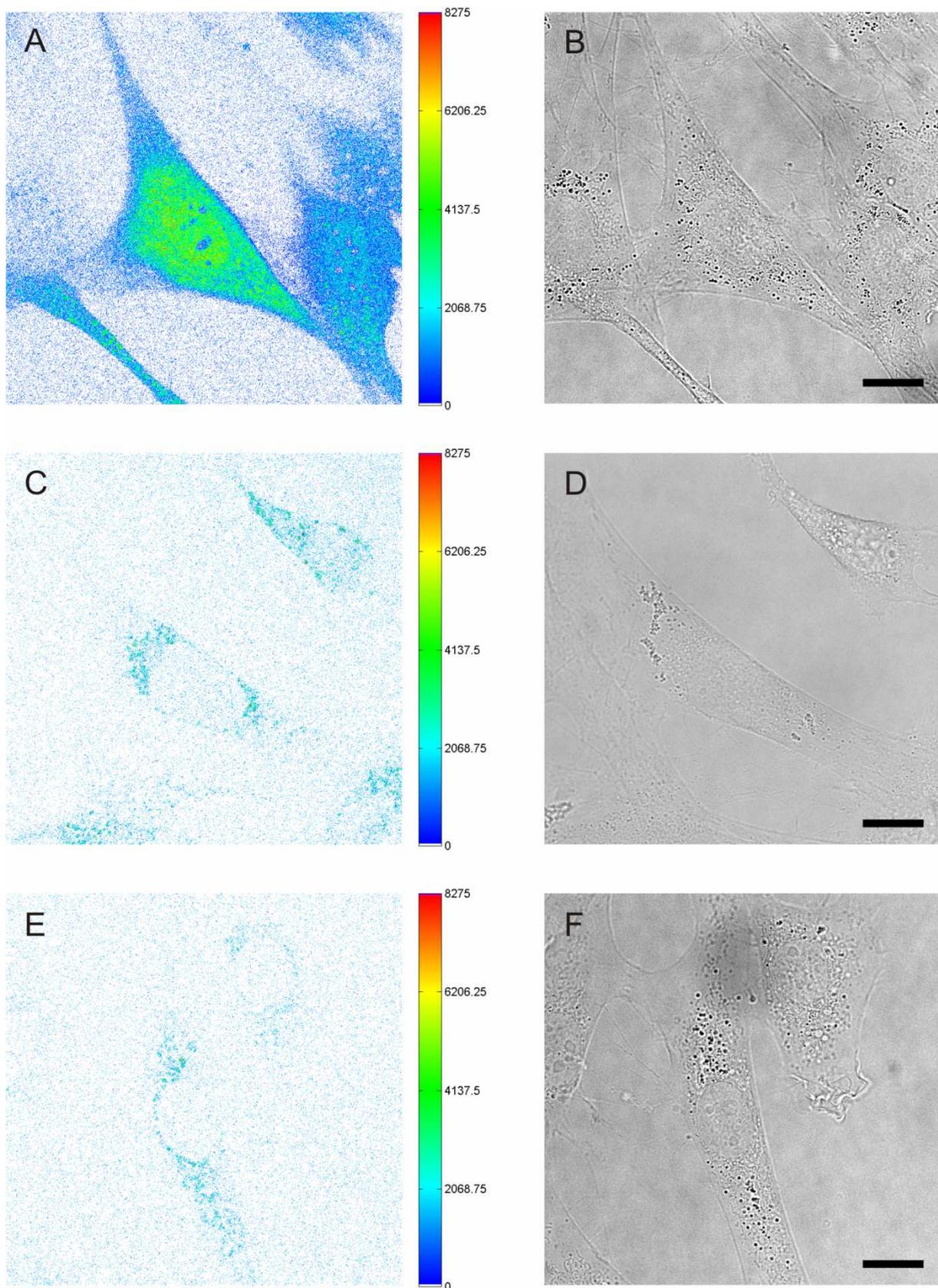
### Spezifische Markierung des STAT5b-SNAP in Maus Fibroblasten

Wie zuvor gezeigt lässt sich die Expression des Proteins über das Tet-Induktions-System (Kapitel 1.1), der stabil in die NIH3T3 Zellen eingebracht ist, kontrollieren.

Die Markierung erfolgt über den zellpermeablen Farbstoff TMR-Star, welcher eine kovalente Bindung mit SNAP am Fusionsprotein eingeht und anschließend überschüssiger ungebundener Farbstoff ausgewaschen wird. Da STAT5b-SNAP nach Expression im Zytosol vorliegt und das Protein frei zwischen dem Zellkern und dem Zytosol pendeln kann, wird eine homogene Färbung der Zellen erwartet.

In Abbildung 2.12 wird ein Vergleich unterschiedlich behandelter Zellen gezeigt. Im Fluoreszenzbild der Zelle die STAT5b-SNAP exprimiert und mit 50 nM TMR-Star markiert wurde (Bild A), ist zu erkennen, dass die gesamte Zelle gefärbt ist. Die Fluoreszenz im und unmittelbar um den Kern herum ist höher als zu den Lamellipodien hin. Dies liegt daran, dass die Zelle im Bereich um den Kern herum deutlich dicker ist als an den Rändern. Demnach liegen hier mehr markierte Proteine vor, wodurch auch bei einem konfokalen Scan in diesem Bereich eine höhere Fluoreszenz detektiert wird.

In der Aufnahme bei welcher den Zellen kein Doxyzyklin zur Expression des Proteins STAT5b-SNAP zugegeben wurde, sondern nur mit 50 nM TMR-Star inkubiert (Bild C), ist eine punktförmige, geringe Fluoreszenz in einem engen Bereich um den Kern herum zu sehen. Wobei im Kern selbst und in der Peripherie der Zellen kein Fluoreszenzsignal, bzw. nur Rauschen der Detektoren zu detektieren ist.



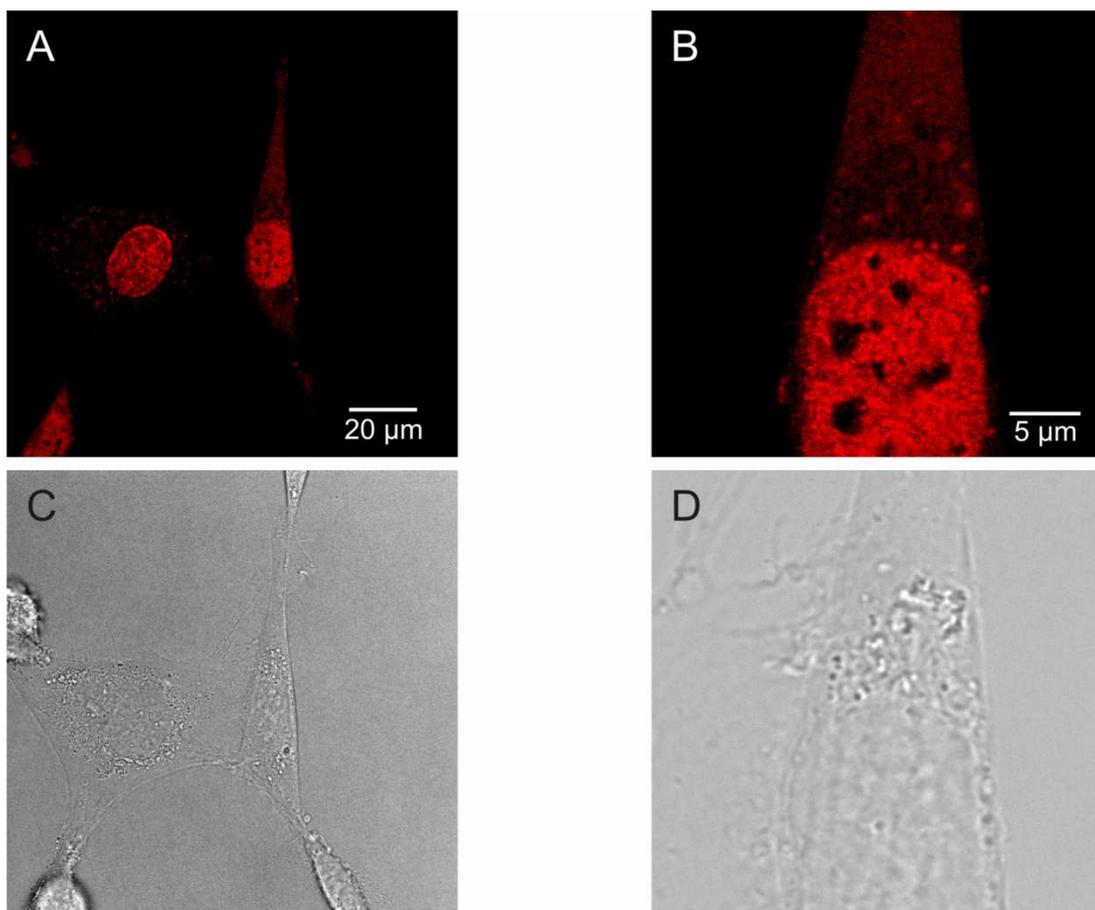
**Abbildung 2.12:** A) Fluoreszenzbild TMR-Star (50 nM) markierter NIH3T3 Zellen welche STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Doxyzyklin über Nacht exprimierten. C) Fluoreszenzaufnahme von Zellen ohne Doxyzyklin, aber Inkubation mit TMR-Star (50 nM). E) Fluoreszenzaufnahme der Zellen ohne Doxyzyklin und ohne TMR-Star. B), D) und F) die jeweils zugehörige Durchlichtaufnahme. Maßstabsbalken betragen 15  $\mu\text{m}$ .

Die Aufnahme der Zellen ohne Doxyzyklin und ohne Inkubation mit TMR-Star (Bild E), zeigen dieselbe Fluoreszenzverteilung wie die Zellen in Bild C).

Die identische Fluoreszenzverteilung der Aufnahmen C und E zeigt, dass TMR-Star, welches nicht an STAT5b-SNAP bindet, vollständig aus den Zellen herausgewaschen wird. In Aufnahme A hingegen, nach Expression des Proteins und Inkubation mit TMR-Star, ist die Fluoreszenz innerhalb der gesamten Zelle zu detektieren. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Markierung des Fusionsproteins STAT5b-SNAP spezifisch erfolgt.

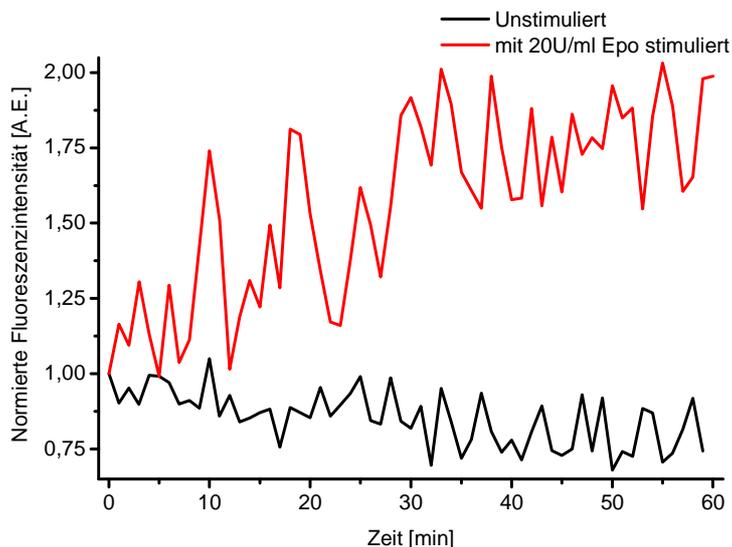
#### Funktionalität von markiertem STAT5b-SNAP

Nachdem in den vorherigen Abschnitten (2.1.1 – 2.1.3) gezeigt werden konnte, dass die murinen Fibroblasten spezifisch markiert wurden, ist nun noch zu klären, ob das Protein nach der Stimulierung mit Epo in den Zellkern kommt und dort akkumuliert (Kapitel 1.1).



**Abbildung 2.13:** A) Scan einer NIH3T3 Zelle die STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Doxyzyklin exprimiert, mit 50 nM TMR-Star markiert und mit 40 U Epo für 1 Stunde stimuliert wurde. B) Vergrößerte Aufnahme der rechten Zelle aus A in der sehr gut zu erkennen ist, dass die Fluoreszenzintensität im Zellkern viel höher ist als im Zytoplasma. C) und D) sind die jeweils dazugehörigen Durchlichtaufnahmen.

Die Aufnahme A) in Abbildung 2.13 zeigt zwei Zellen in denen das mit TMR-Star markierte STAT5b-SNAP hauptsächlich im Zellkern vorliegt. Die zuvor für mindestens 3 Stunden in DMEM ohne Serum inkubierten NIH3T3 Zellen wurden 1 Stunde vor dem Scan im Inkubator mit 40 U Epo stimuliert. Wie in 1.1 erläutert, dimerisiert STAT5b nach Stimulierung und es erfolgt die Transduktion in den Zellkern, wo es an das Zielgen bindet. Der Transport aus dem Zellkern heraus dauert länger, somit akkumuliert das Protein im Zellkern. In Abbildung 2.13 B) ist ein vergrößerter Scan eines Teils der rechten Zelle aus Abbildung 2.13 A) zu sehen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die intensive Fluoreszenz ausschließlich innerhalb des Zellkerns vorliegt und gut von der geringeren Fluoreszenz im Zytosol zu unterscheiden ist. In Abbildung 2.14 ist der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzanstiegs im Zellkern einer zuvor in DMEM ohne Serum inkubierten und anschließend stimulierten Zelle gegenüber dem einer nicht stimulierten Zelle aufgetragen.



**Abbildung 2.14:** Fluoreszenzintensität im Zellkern von Zeitserien über 60 min mit einem Scan pro Minute von NIH3T3 Zellen. Die Zellen exprimieren STAT5b-SNAP, welches mit TMR-Star markiert wurde. Der schwarze Graph zeigt die Intensität einer unstimulierten und der rote Graph einer mit 20 U/ml Epo stimuliert Zelle.

Nach Zugabe von 20 U/ml Epo zum Zeitpunkt 0 wurde für 60 Minuten jede Minute ein Scan der gesamten Zelle durchgeführt. Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität relativ zum Startwert innerhalb eines ausgewählten Bereichs im Zellkern (siehe Anhang 6.2). Da sich die lebende Zelle während der Aufnahmezeit von einer Stunde bewegt, ist für die einzelnen Scans nicht der identische Teil des Zellkerns in der ausgewählten Region. Daher unterliegt der Fluoreszenzanstieg sehr hohen Schwankungen. Dennoch ist klar zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzintensität während der einen Stunde auf nahezu das Doppelte erhöht.

Die Intensitätsspur aus einem Bereich im Zellkern einer Zelle, die nicht stimuliert wurde, zeigt keinen Fluoreszenzanstieg. Wie für die stimulierte Zelle, ist auch hier die Schwankung der Fluoreszenzintensität über die Aufnahmezeit von einer Stunde hoch.

Die Akkumulierung und damit der Fluoreszenzanstieg im Zellkern von Epo stimulierten Zellen erfolgt nur dann, wenn STAT5b am aktivierten Epo-Rezeptor phosphoryliert wird, daraufhin dimerisiert, die Signalweitergabe in den Zellkern übermittelt und dort an das Zielgen bindet. Da die Abbildungen 2.13 und 2.14 genau dies wiedergeben, kann davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein STAT5b-SNAP, markiert mit TMR-Star seine volle Funktionalität besitzt.

Die in Kapitel 2.3 dargestellten Untersuchungen zeigen, dass die Markierung des Fusionsproteins spezifisch und die Funktionalität des mit TMR-Star markierten STAT5b-SNAP gegeben ist.

Damit ist es möglich in weiteren Einzelmolekül-spektroskopischen Untersuchungen neue Erkenntnisse über die Diffusion oder Bindungseigenschaften des Proteins mit dem EpoR in lebenden Zellen zu erhalten.

#### **2.4 Diffusion von STAT5b-SNAP-TMR-Star in lebenden NIH3T3 mittels FCS**

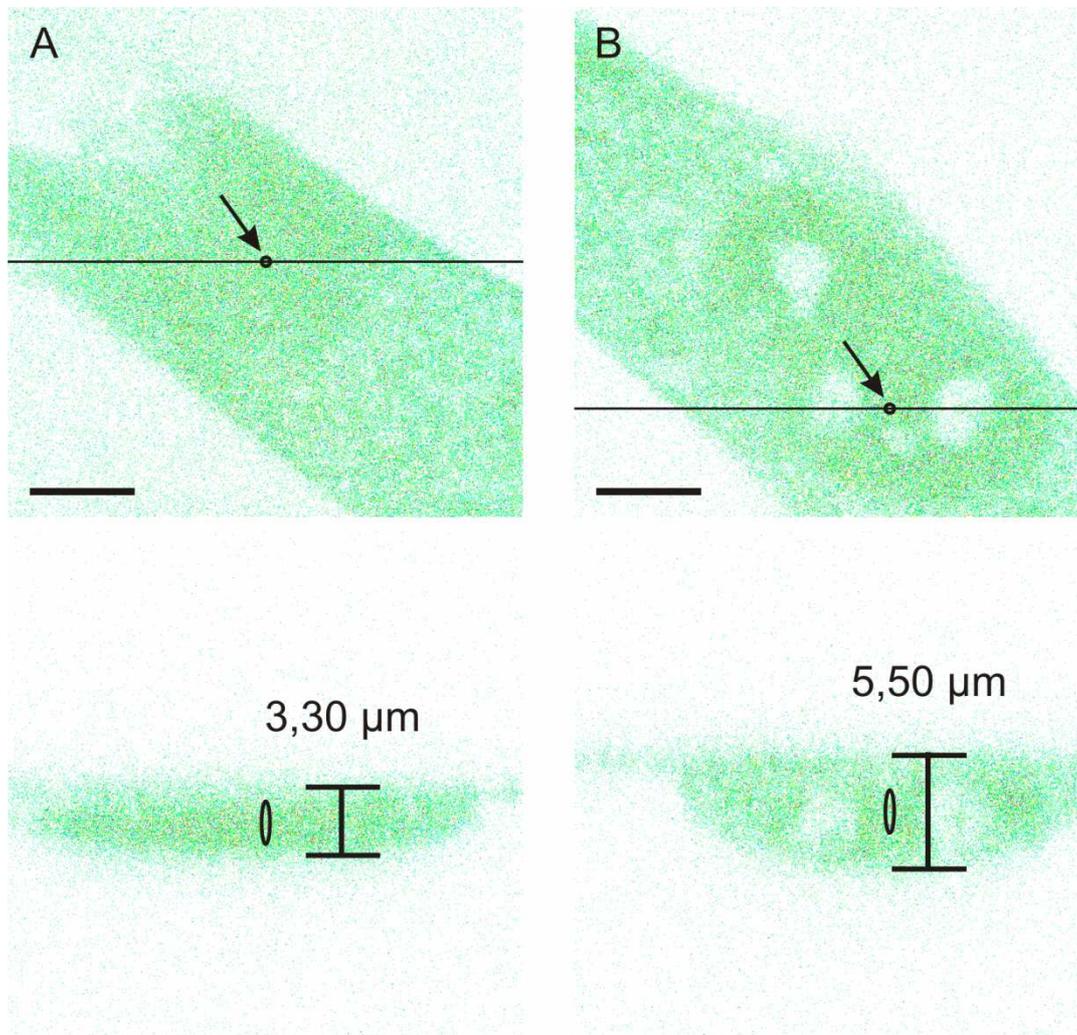
Wie schon in Kapitel 2.1 mit STAT5b-mCherry beschrieben, wird die Diffusion von STAT5b in lebenden NIH3T3 Maus Fibroblasten beobachtet. In diesen Experimenten exprimieren die NIH3T3 Zellen das Fusionsprotein STAT5b-SNAP, welches mit TMR-Star markiert wird. An den markierten Zellen werden die FCS-Messungen durchgeführt. Mit diesen FCS-Messungen können die Diffusionseigenschaften des Proteins in verschiedenen Bereichen – dem Zytosol und dem Zellkern – für unterschiedlich behandelte Zellen bestimmt werden. Die FCS Messungen werden an unbehandelten, in DMEM ohne Serum inkubierten und schließlich mit 20 U/ml Epo stimulierten Zellen vorgenommen.

Ziel der Untersuchungen war es festzustellen, ob die Diffusion in den verschiedenen Bereichen und unterschiedlich behandelten Zellen zu unterscheiden ist.

##### **Platzierung des konfokalen Volumen in der Zelle**

Bei FCS Messungen wird der Laserfokus für die gesamte Messzeit an einem Punkt festgehalten. Da Aggregate oder größere Vesikel die Messung stören würden, ist es wichtig den Messpunkt innerhalb der Zelle gut auszuwählen. Wie schon in den verschiedenen

Aufnahmen unter Kapitel 2.3 zu sehen ist, zeigen die Zellen unmittelbar um den Zellkern Autofluoreszenz. Dieser Bereich darf daher nicht für FCS Messungen innerhalb des Zytoplasmas benutzt werden. Der Messpunkt wird entsprechend in einer Region abseits vom Zellkern gewählt. An einer Zelle wird in den Abbildungen 2.15 beispielhaft dargestellt, wie die Messpunkte in den verschiedenen Regionen gewählt wurden.



**Abbildung 2.15:** XY- und XZ-Fluoreszenz-Scans einer NIH3T3 Zelle mit TMR-Star markiertem STAT5b-SNAP A) im Zytoplasma und B) im Zellkern. Die Messpunkte sind jeweils mit einem Pfeil im XY-Scan und einer Ellipse im darunter gezeigten XZ-Scan skizziert. Die Maßstabsbalken betragen 5 µm.

Abbildung 2.15 zeigt die vergrößerten Scans zum einen in A) des Zytoplasmas oberhalb des Zellkerns der Zelle und zum anderen in B) des Zellkerns. Die schwarzen Linien in den XY-Scans stellen die Schnittebenen dar in welcher die XZ-Scans durchgeführt wurden. Die durch die Pfeile markierten Punkte (Abbildung 2.15 A) und B) oben) bilden schematisch die Ausdehnung des konfokalen Volumens ab, welches für die FCS Messung gewählt wurde. Der XZ-Scan ist wichtig, um sicherzustellen, dass die Zelle an der Stelle der Messung hoch genug ist, da an manchen Stellen das konfokale Volumen des Laserfokus mit etwa 2000 nm höher ist

als die Zelle selbst. Würde der Laserfokus die Zellmembran oder den Objektträger schneiden, könnten Messartefakte verursacht werden. Um das zu vermeiden, wird der Fokus anhand des XZ-Scans mittig zwischen Objektträger und apikaler Zellmembran gesetzt, wie schematisch in Abbildung 2.15 A) und B) (unten) als Ellipsen dargestellt.

Für die Messungen im Zellkern spielt der XY- und XZ-Scan eine zusätzliche Bedeutung. Im Zellkern liegen Kernkörperchen vor, bestehend aus mit Proteinen dicht verpackte kugelförmige DNA. Diese Regionen sind für die markierten STAT5b Proteine nicht zugänglich. Sie sind sehr gut als nicht fluoreszierende runde Bereiche zu erkennen, in denen keine Fluoreszenz vom markierten STAT5b zu sehen ist. Diese Kernkörperchen dürfen auch nicht innerhalb des konfokalen Volumens liegen. Entsprechend wird der Messpunkt ausschließlich innerhalb des fluoreszierenden Bereichs gesetzt. Ein Scan der gesamten Zelle und die entsprechenden vergrößerten Bereiche mit den dazugehörigen Durchlichtbildern werden in Abschnitt 6.3 gezeigt.

So bieten die XY- und XZ-Scans die Möglichkeit den Fokus exakt zu positionieren, um die oben aufgeführten Problematiken zu vermeiden.

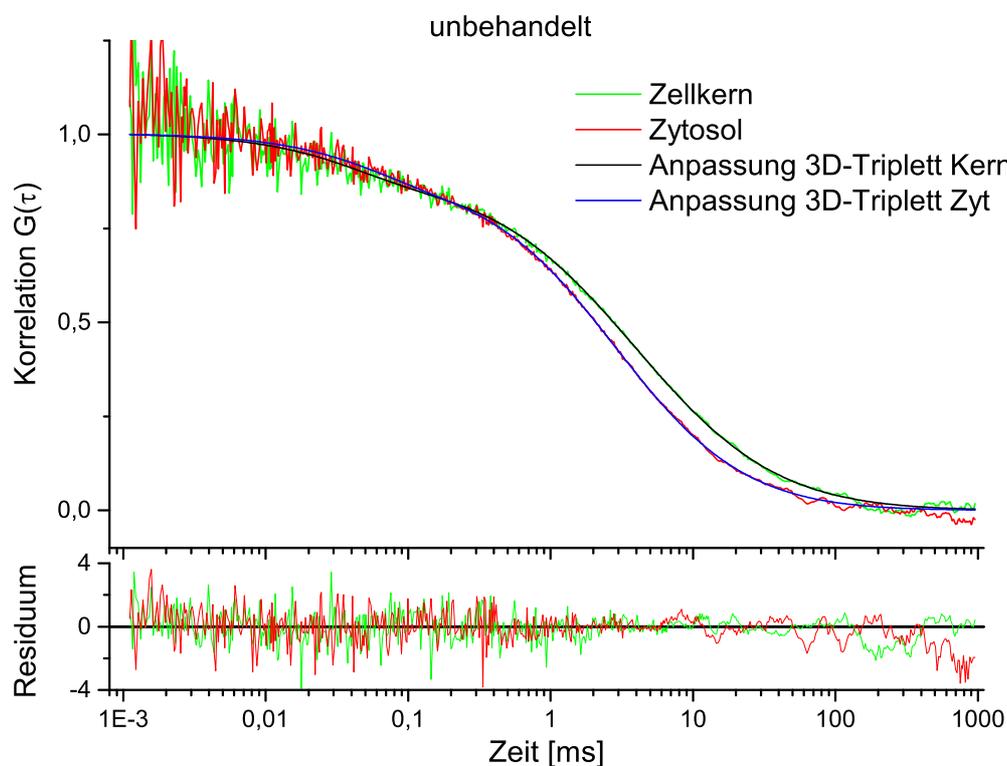
#### Vergleich von Zellkern und Zytosol unterschiedlich behandelter Zellen

Die FCS Spuren wurden immer für 60 Sekunden aufgenommen. So konnte sichergestellt werden, dass genug Photonen für die Korrelationen gesammelt wurden. Sowohl für die Korrelation der aufgenommenen Intensitätsspur, als auch die Anpassung der Korrelation an ein Modell für dreidimensionale Diffusion, welches Dunkelzustände durch Triplettübergänge und auch anomale Diffusion berücksichtigt, wurde die kommerziell erhältliche Software Symphotime der Firma PicoQuant verwendet.

In jeder Zelle wurde immer jeweils eine FCS Messung im Zytosol und Zellkern durchgeführt. So kann der Diffusionskoeffizient im Zytosol mit dem im Zellkern in derselben Zelle direkt verglichen werden. Die FCS-Messungen werden an auf drei unterschiedliche Art und Weisen behandelten Zellen aufgenommen. Zunächst werden sie unbehandelt gelassen, d.h. vor und während der Messungen in Medium mit Serum inkubiert. Dies spiegelt in den Messungen die Diffusion des STAT5b wider, während alle Vorgänge in der Zelle ihren normalen Lauf nehmen. D.h. durch die im Medium vorhandenen Wachstumsfaktoren werden alle Signalwege gleichermaßen stimuliert. Ist im Inkubationsmedium kein Serum vorhanden fallen die Zellen in einen sogenannten Ruhezustand, sie werden gehungert. Werden die Zellen vor den Messungen für mindestens drei Stunden und auch während den Messungen gehungert, ist die Diffusion des Proteins für Zellen zu sehen, in denen die Zellen keinerlei Aktivierungen mehr

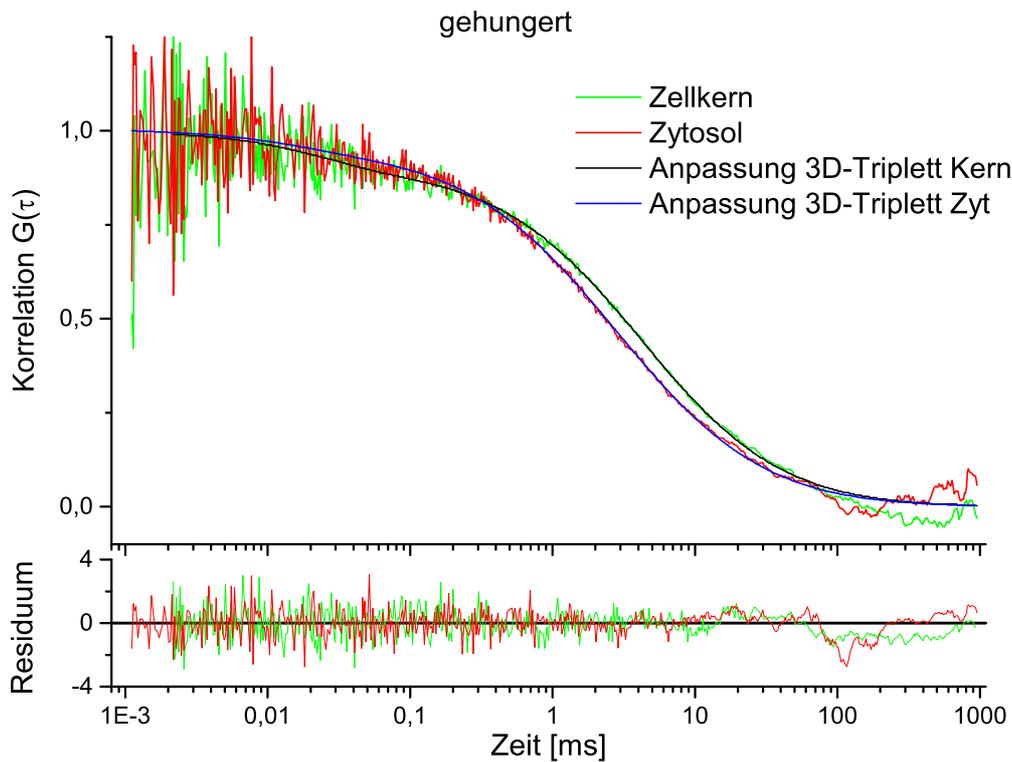
erfahren. Für die dritte Art der Behandlung werden die Zellen aus diesem Zustand heraus mit 20 U/ml Epo für 30 min stimuliert. So wird nach dem hungern ausschließlich der untersuchte JAK/STAT Signalweg aktiviert und die Diffusion von STAT5b zeigt den aktivierten Signalweg.

In Abbildung 2.16 sind die Korrelationskurven je einer Messung im Zellkern und im Zytosol mit der jeweiligen Anpassung, repräsentativ für unbehandelte Zelle gezeigt. Die Korrelation (grün) und die Anpassung (dunkelgrün) für die Messung im Zellkern weist eine längere Diffusionszeit als die Messung im Zytosol (Korrelation rot; Anpassung dunkelrot) auf. Bis auf zwei von 41 Zellen, zeigen alle eine schnellere Diffusion im Zytosol.



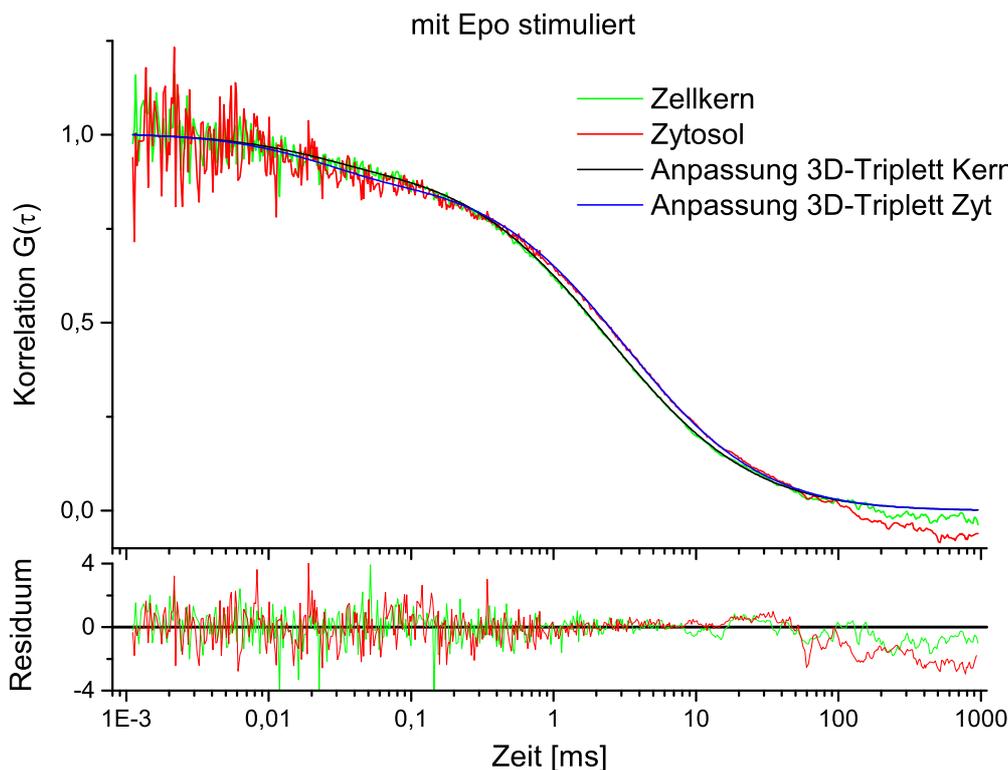
**Abbildung 2.16:** Korrelationskurven und Anpassungen der FCS Messungen einer unbehandelten Zelle für den Zellkern (grün und dunkelgrün) und das Zytosol (rot und dunkelrot) mit den jeweiligen Residuen.

Die Messungen für gehungerte Zellen (Abbildung 2.17) zeigen das gleiche Verhalten wie unbehandelte, die Diffusion ist im Zellkern langsamer als im Zytosol. Nur eine der 26 Zellen zeigt eine schnellere Diffusion im Zellkern. Allerdings sind die mittleren Diffusionskoeffizienten sowohl im Zellkern als auch im Zytosol gegenüber denen der unbehandelten Zellen größer (Tabelle 2.3).



**Abbildung 2.17:** Korrelationskurven und Anpassung der FCS Messungen einer in DMEM ohne Serum inkubierten Zelle für den Zellkern (grün und dunkelgrün) und das Zytosol (rot und dunkelrot) mit den jeweiligen Residuen.

Für die FCS Messungen der stimulierten Zellen ändert sich das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten zwischen dem Zellkern und dem Zytosol. In Abbildung 2.18 sind die Korrelationskurven (Zellkern grün; Zytosol rot) mit den jeweiligen Anpassungen (Zellkern dunkelgrün; Zytosol dunkelrot) einer Beispielzelle gezeigt, in der die Diffusion im Zellkern schneller ist als im Zytosol.



**Abbildung 2.18:** Korrelationskurven und Anpassungen der FCS Messungen einer mit Epo stimulierten Zelle für den Zellkern (grün und dunkelgrün) und das Zytosol (rot und dunkelrot) mit den jeweiligen Residuen.

In allen FCS Messungen weisen die Korrelation für lange Zeiten ab ca. 100 Abweichungen von 0 auf Diese sind typisch für Messungen in lebende Zellen.

Der Wert  $\alpha$  für die anomale Diffusion wurde für die Anpassungen an die Korrelation offen gehalten und variierte zwischen 0,5 und 0,8.

Diffusionskoeffizient [ $\mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ]	NIH3T3 Maus Fibroblasten		
	Unbehandelt (41)	In DMEM ohne Serum inkubiert (26)	Mit Epo stimuliert (45)
Zellkern	$3,17 \pm 0,22$	$3,97 \pm 0,25$	$4,39 \pm 0,54$
Zytosol	$4,97 \pm 0,24$	$5,43 \pm 0,22$	$3,69 \pm 0,18$

**Tabelle 2.3:** Mittelwert mit Standardfehler der Diffusionskoeffizienten für unbehandelte, in DMEM ohne Serum inkubierte und mit Epo stimulierten NIH3T3 Zellen, jeweils im Zytosol und Zellkern. In Klammern die Anzahl der gemessenen Zellen.

Betrachtet man die gemittelten Werte für die Diffusion in Tabelle 2.3 fällt auf, dass der Unterschied der Diffusionskoeffizienten zwischen dem Zytosol und dem Zellkern mit  $\Delta D = 1,80 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$  in unbehandelten und mit  $\Delta D = 1,46 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$  in gehungerten Zellen nicht groß ist. Innerhalb des Standardfehlers, wie in Tabelle 2.3. angegeben, unterscheidet sich die Diffusion dennoch, sowohl zwischen dem Zytosol und dem Zellkern als auch zwischen unbehandelten und in gehungerten Zellen. Für stimulierte Zellen wird der Unterschied der Diffusion zwischen dem Zytosol und dem Zellkern mit  $\Delta D = 0,70 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$  geringer und die Standardfehler überschneiden sich. Allerdings ist ein maßgeblicher Unterschied zu bemerken, der mittlere Diffusionskoeffizient für das Zytosol nimmt deutlich ab und unterscheidet sich sehr von dem in unbehandelten und gehungerten Zellen. Damit ist er langsamer als der Diffusionskoeffizient für den Zellkern, in dem er gegenüber denen in unbehandelten und in gehungerten Zellen leicht zunimmt. Der Vergleich des Zytosols mit dem Zellkern für stimulierte Zellen zeigt eine Umkehrung der Diffusionskoeffizienten.

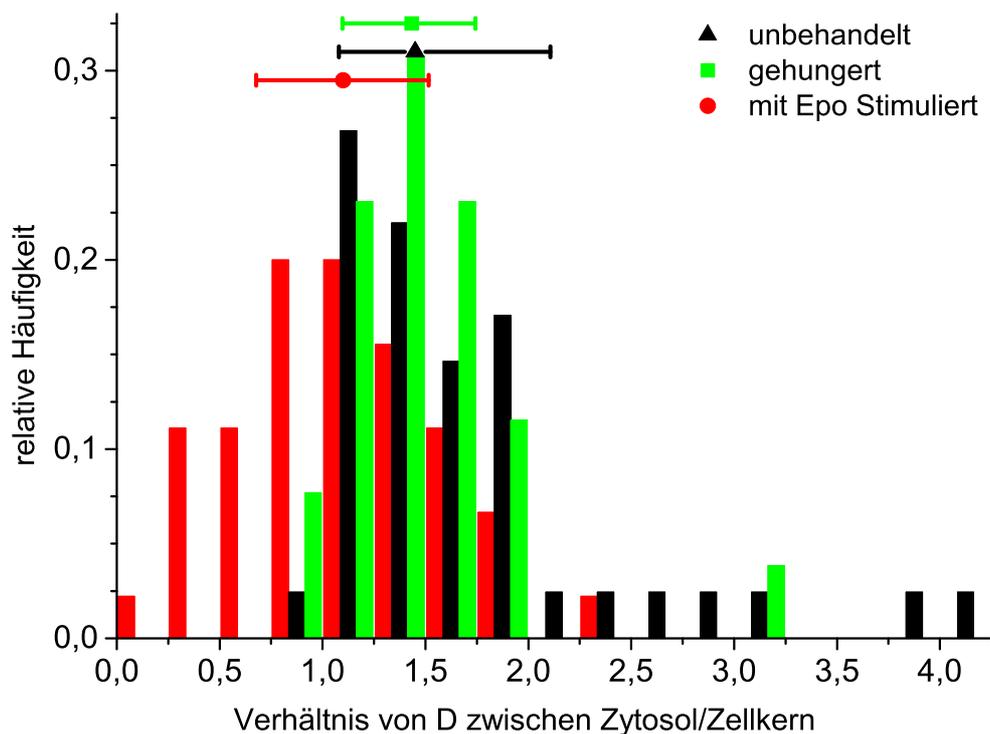
Anhand einer Vielzahl von Einzel-Zell-Messungen konnte gezeigt werden, dass sich die Diffusion des Proteins STAT5b in verschiedenen Regionen der Zelle als auch unterschiedlich behandelte Zellen unterscheidet. Im Zytosol lässt sich erkennen, dass die Diffusion für das STAT5b in gehungerten, entsprechend nicht stimulierten Zelle am höchsten ist. Hier ist die Gesamtzahl der Proteine aufgrund des Ruhezustands geringer als in unbehandelten Zellen. Die in den Anpassungen berücksichtigte anomale Diffusion zeigt die hohe Teilchendichte im Zytosol. Diese wird für gehungerte Zellen geringer und damit die Diffusion von STAT5b schneller. In unbehandelten Zellen ist auch der JAK/STAT Signalweg teilweise aktiviert und es liegt neben dem Monomer auch dimerisiertes STAT5b vor, wodurch die mittlere Diffusion langsamer ist. Im Falle der stimulierten Zellen dimerisiert STAT5b, was sich im langsamsten der drei mittleren Diffusionskoeffizienten widerspiegelt. Die Diffusion im Zellkern verhält sich für gehungerte gegenüber unbehandelte Zellen vergleichbar mit der im Zytosol. Die schnellere Diffusion im Zellkern der stimulierten Zellen kann mit der Bindung des Dimers an die DNA zusammenhängen.

Im nächsten Kapitel wird eine Darstellung der Messergebnisse gewählt, welche das Diffusionsverhalten des Proteins deutlicher wiedergibt.

Histogramm unbehandelter, in DMEM ohne Serum inkubierter und mit Epo stimulierter Zellen

Um das Diffusionsverhalten des Proteins unterschiedlich behandelte Zellen deutlicher zu machen, wurden die Daten in einem Histogramm aufgetragen, welches die Häufigkeit der Zellen über das Verhältnis der Diffusion zwischen dem Zytosol und dem Zellkern zeigt.

Im Histogramm ist zu sehen, dass für unbehandelte Zellen der Diffusionskoeffizient  $D$  – bis auf eine Ausnahme – im Zytosol immer größer als im Zellkern ist (schwarze Balken in Abbildung 2.19). Der Median der Verteilung des Verhältnisses von  $D$  zwischen Zytosol und Zellkern beträgt  $1,45 \pm 0,51$ . Auch für gehungerte Zellen – bis auf zwei Ausnahmen – ist die Diffusion im Zytosol schneller als im Zellkern (grüne Balken in Abbildung 2.19), hier beträgt der Median der Verteilung  $1,43 \pm 0,32$ . In stimulierten Zellen hingegen kehrt sich das Verhältnis zwischen Zytosol und Zellkern teilweise um. Hier zeigt sich in 20 von 45 Zellen ein höherer Diffusionskoeffizient im Zellkern. Der Median der Verteilung liegt bei  $1,1 \pm 0,42$ .



**Abbildung 2.19:** Das Histogramm gibt die Verteilung vom Verhältnis der Diffusion zwischen Zytosol und Zellkern der unterschiedlich behandelten Zellen an. Mit Epo stimulierte Zellen (rot) zeigen eine Verteilung vom Verhältnis des Diffusionskoeffizienten Zytosol/Zellkern um den Wert 1. Für gehungerte (grün) und unbehandelte (schwarz) Zellen ist das Verhältnis des Diffusionskoeffizienten Zytosol/Zellkern prinzipiell größer 1.

Die Fehler um den Median der Verteilung, wurden so berechnet, dass der Interquartilbereich 68% beträgt – entsprechend 1 Sigma bei einer Gauß-Verteilung. Da der Fehler nicht gleich

verteilt ist, ist davon auszugehen, dass die Verteilung nicht Gauß-förmig ist. Am deutlichsten ist dies bei der Verteilung vom Verhältnis des Diffusionskoeffizienten bei unbehandelten Zellen zu sehen, in der er für größere Verhältnisse höher ist.

Eine statistische Möglichkeit, um zu zeigen ob die Verteilungen der unterschiedlich behandelten Zellen verschieden sind, ist der studentische t-Test. Bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 sind die Verteilungen der unbehandelten und in DMEM ohne Serum inkubierten NIH3T3 Zellen von den mit Epo stimulierten Zellen jeweils unterschiedlich. Die unbehandelten und in DMEM ohne Serum inkubierten Zellen unterscheiden sich bei dem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 0,05 nicht voneinander. In Tabelle 2.4 sind die Werte der t-Teststatistik aufgeführt.

<b>Signifikanzniveau <math>\alpha = 0,05</math></b>	<b>t-Statistik</b>	<b>Wahrsch. &gt;  t </b>	<b>Trennschärfe</b>
Verhältnis von D zwischen unbehandelten und in DMEM ohne Serum inkubierten Zellen	1,46	0,14	0,30
Verhältnis von D zwischen mit Epo stimulierten und in DMEM ohne Serum inkubierten Zellen	3,45	9,50E-4	0,92
Verhältnis von D zwischen mit Epo stimulierten und unbehandelten Zellen	4,68	1,05E-5	0,99

**Tabelle 2.4:** Studentischer t-Test für das Verhältnis des Diffusionskoeffizienten D zwischen dem Zytosol und dem Zellkern für die unterschiedlich behandelten Zellen untereinander.

Die Verteilung des Verhältnisses zwischen Zytosol und Zellkern ist für unbehandelte Zellen am höchsten. Das zeigt, dass sich die Zellen in ihrem normalen Ablauf in unterschiedlichen Stadien befinden, die Zell-Zell Heterogenität entsprechend hoch ist. Die gehungerten Zellen befinden sich alle im Ruhezustand. Diese Synchronisierung aller Zellen im gleichen Zustand ist in der Schmalen Verteilung des Verhältnisses zu erkennen. Die teilweise Umkehr der Verhältnisse der Diffusionskoeffizienten für stimulierte Zellen zeigt, dass sich die Diffusionen sowohl im Zytosol als auch im Zellkern signifikant verändern. Die Bildung des STAT5b-Dimers und die Bindungen und Wechselwirkungen des Dimers mit der DNA im Zellkern sind vermutlich die Ursachen dafür.

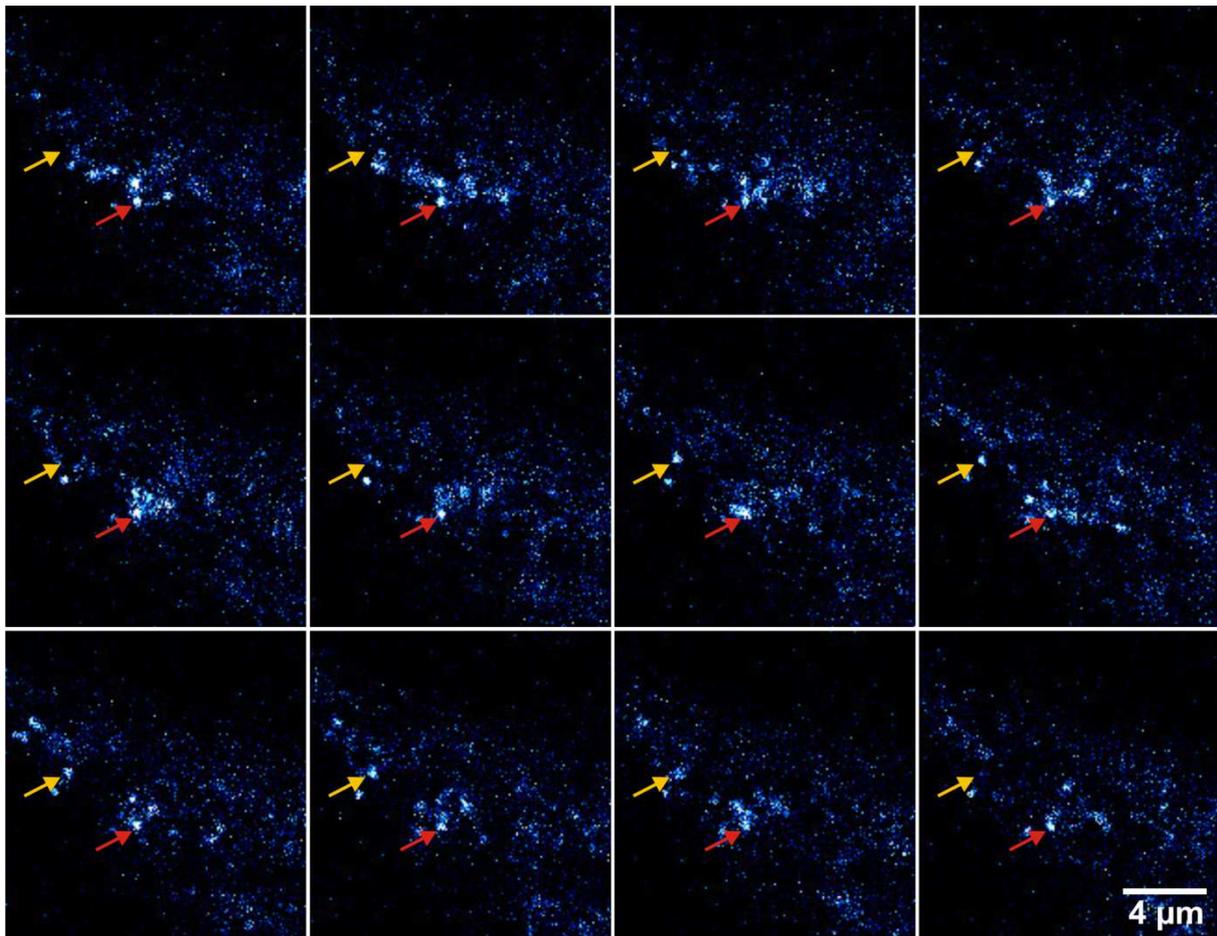
Prinzipiell kann über die Darstellung der Verhältnisse der Diffusionskoeffizienten zwischen Zytosol und Zellkern der unterschiedlich behandelten Zellen gezeigt werden, dass der Unterschied der stimulierten gegenüber den unbehandelten und gehungerten Zellen sehr deutlich ist.

## **2.5 Messungen der Bindung des STAT5b an der apikalen Zellmembran mittels “Variable-Angle-TIRF”**

Eine genaue Beobachtung der Bindungen des STAT5b an der apikalen Zellmembran innerhalb der Zelle bei Aktivierung des EpoR durch Zugabe von Epo liefert Informationen über den JAK/STAT Signalweg.

Hier stellt sich die Frage: Ab wann reagiert die Zelle bzw. STAT5b auf Epo und in was für einer Form? Die folgenden Untersuchungen sollen die zeitliche Reaktion nach der Zugabe von Epo und das Verhalten von STAT5b an der Zellmembran bzw. die Wechselwirkung des Proteins mit dem EpoR in der Zellmembran verdeutlichen.

Mittels TIRF in der beschriebenen modifizierten Variante („Variable Angle TIRF“ Kapitel 4.8) kann die Fluoreszenz einzelner mit TMR-Star markierten STAT5b-Proteine beobachtet werden. Es wurden Videos der lebenden Zellen mit 1000-2000 Einzelbildern bei Belichtungszeiten von jeweils 50 ms aufgenommen. Zur Anregung wurde die Laserintensität mit 500  $\mu$ W auf einem geringen Level gehalten, um die Phototoxizität für die Zellen möglichst gering zu halten. Die im Zytosol diffundierenden Proteine, die keine Wechselwirkung mit der Membran zeigen sind unter den gegebenen Aufnahmebedingungen (Kapitel 4.9) zu schnell, um genügend Photonen auf einen Pixel des EM-CCD Chip abzugeben. Demensprechend wird durch nicht interagierendes STAT5b nur eine geringe Hintergrundfluoreszenz erzeugt. Markierte STAT5b-Proteine, die mit Rezeptoren, wie dem EpoR oder auf eine andere Art und Weise mit der Membran wechselwirken, haben eine längere Verweildauer an derselben Stelle. So werden genügend Photonen für die Pixel abgegeben, um ein Signal zu erzeugen, welches sich vom Hintergrund unterscheidet.

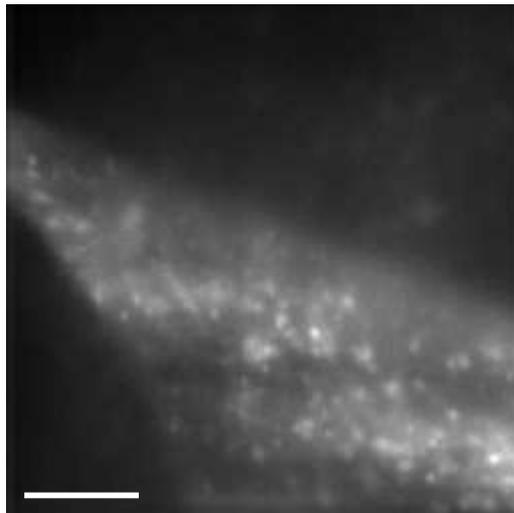


**Abbildung 2.20:** Eine Sequenz von 12 zufällig gewählten Einzelbildern aus dem Video dessen Summenbild in Abb. 2.23 dargestellt ist. Mit dem roten Pfeil gekennzeichnet ist ein TMR-Star markiertes Protein über alle 12 Bilder hinweg an derselben Stelle zu erkennen. Die mit dem gelben Pfeil gekennzeichnete Stelle zeigt ein markiertes Protein welches nur zwischen Bild 7 – 11 zu sehen ist. Weitere einzelne Spots sind zu erkennen.

In Abbildung 2.20 sind exemplarisch 12 zufällig gewählte Einzelbilder eines Videos von 1000 Bildern gezeigt, in denen man die Fluoreszenz einzelner TMR-Star markierter STAT5b Proteine erkennt. Der rote Pfeil kennzeichnet ein Molekül, welches über die gesamten 12 Bilder hinweg an derselben Stelle sitzt. Während der gelbe Pfeil eine Stelle kennzeichnet an der das Molekül erst im 7. Bild auftaucht, bis zum 11. Bild verweilt und im 12. nicht mehr zu sehen ist. Neben den durch die Pfeile gekennzeichneten Spots sind noch weitere einzelne fluoreszenzmarkierte Proteine zu sehen.

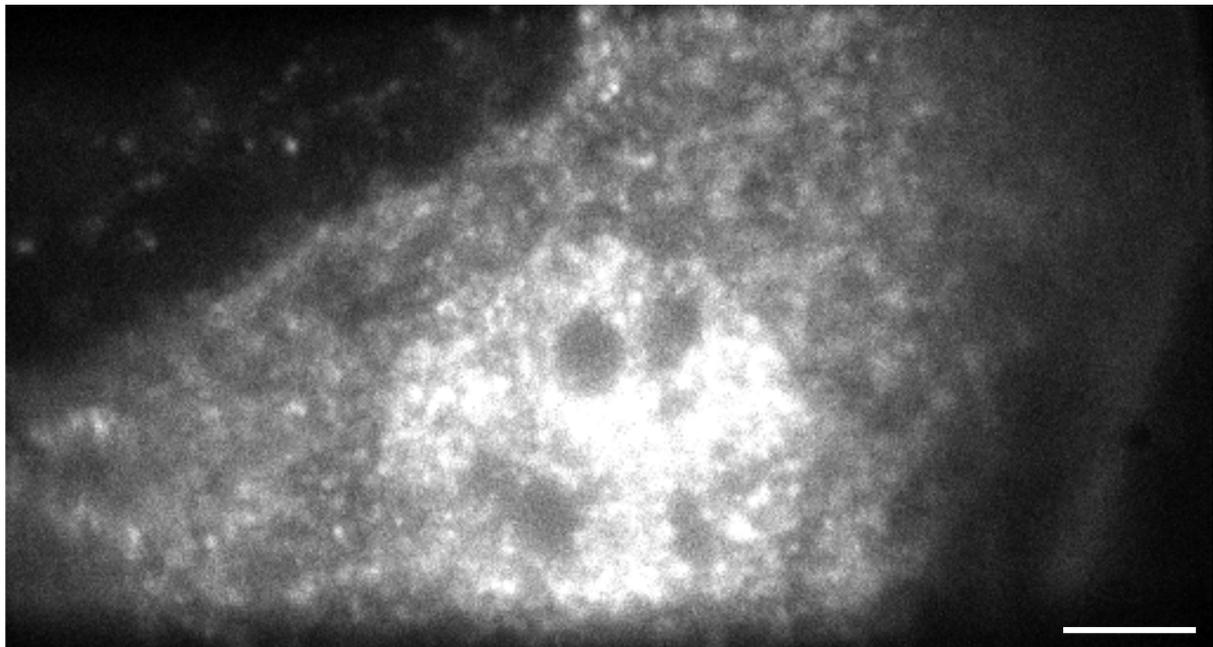
In den Einzelbildern ist der Ausschnitt der gemessenen Zelle nur schemenhaft zu erkennen. Werden jedoch alle Einzelbilder eines Videos aufsummiert so entsteht das in Abbildung 2.21 gezeigt Summenbild. In diesem ist der Ausschnitt der Zelle gut vom Hintergrund zu unterscheiden. Innerhalb der Zelle sind, neben dem Hintergrund durch die schnell

diffundierenden Fusionsproteine, intensivere Spots zu erkennen. Sie zeigen Stellen, an denen die Proteine entweder häufiger auftauchen oder sich länger aufhalten.



**Abbildung 2.21:** Das Summenbild eines Videos über 1000 Einzelbilder. Neben den klaren Umrisen der Zelle sind intensivere Spots innerhalb zu erkennen. Maßstabsbalken beträgt 5  $\mu\text{m}$ .

Für die Aufnahmen wurden nur zytosolische Bereiche der Zelle gewählt, um ausschließlich Interaktionen des Proteins mit der Zellmembran zu detektieren. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben bindet das nach Phosphorylierung dimerisierte STAT5b im Zellkern an das Zielgen. Diese Bindung im Zellkern darf nicht mit der an der Membran verwechselt werden.



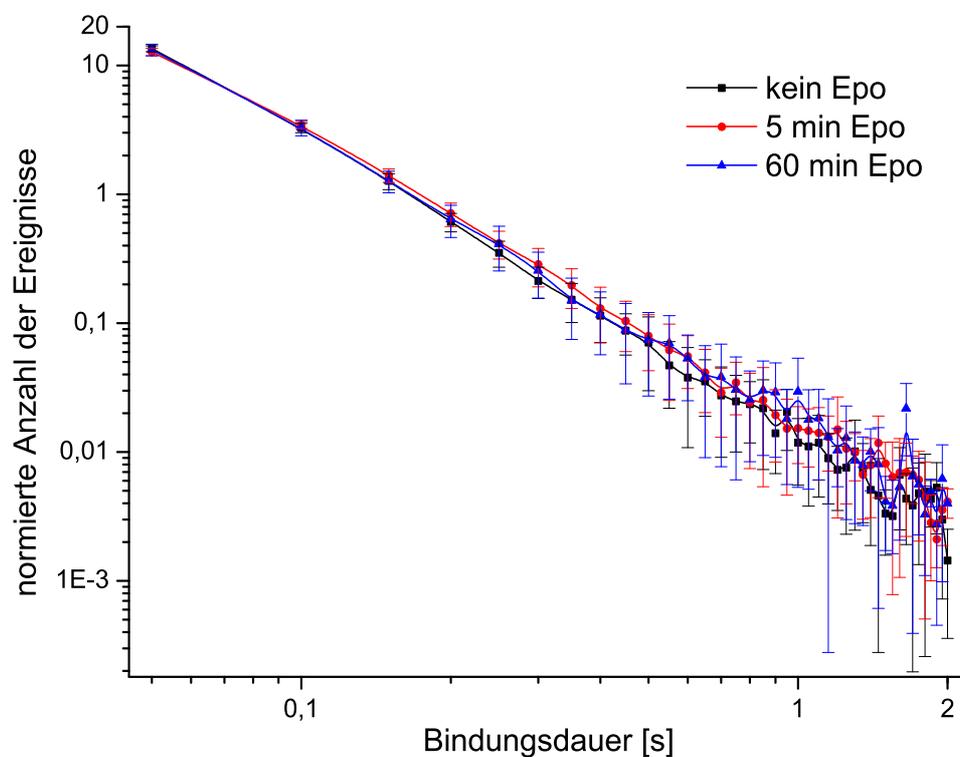
**Abbildung 2.22:** Aufnahme einer NIH3T3 Zelle mit TMR-Star markiertem STAT5b-SNAP nach 46 Minuten Epo-Stimulierung mit einer Belichtungszeit von 0,5 Sekunden. Maßstabsbalken beträgt 5  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 2.22 ist eine Einzelaufnahme mit einer längeren Belichtungszeit von 0,5 Sekunden zu sehen, die verdeutlicht, dass das Zytosol vom Zellkern gut zu unterscheiden ist. Die Aufnahme wurde 46 Minuten nach Stimulation mit Epo gemacht. Das Protein ist zu diesem Zeitpunkt schon deutlich sichtbar im Zellkern akkumuliert.

Es werden Videos aufgenommen ohne Zugabe von Epo und zu den Zeitpunkten von 5 und 60 Minuten nach Epo-Zugabe. So soll untersucht werden, ob sich die Bindungszeit des Proteins an den EpoR in Relation zur Epo-Zugabe ändert.

Die Analyse erfolgt mit einem in Matlab geschriebenen Programm (Kapitel 4.10). Abbildung 2.23 zeigt die Abhängigkeit der Anzahl der Ereignisse, normiert auf die Wahrscheinlichkeitsdichte gegen die Bindungsdauer doppelt-logarithmisch aufgetragen. Es wurden 3 Zeitpunkte nach Epo-Stimulierung gewählt, unstimuliert (schwarz), 5 (rot) und 60 (blau) Minuten. Die Werte für die Anzahl der Ereignisse stimmen innerhalb der Standardabweichung für die jeweiligen Bindungszeiten überein. Weiterhin ist zu sehen, dass die Kurve linear abnimmt und nur 1,4% für 60 Minuten, 0,9% für 5 Minuten und 0,8% ohne Epo-Stimulierung der Ereignisse haben eine Bindungsdauer über einer Sekunde.

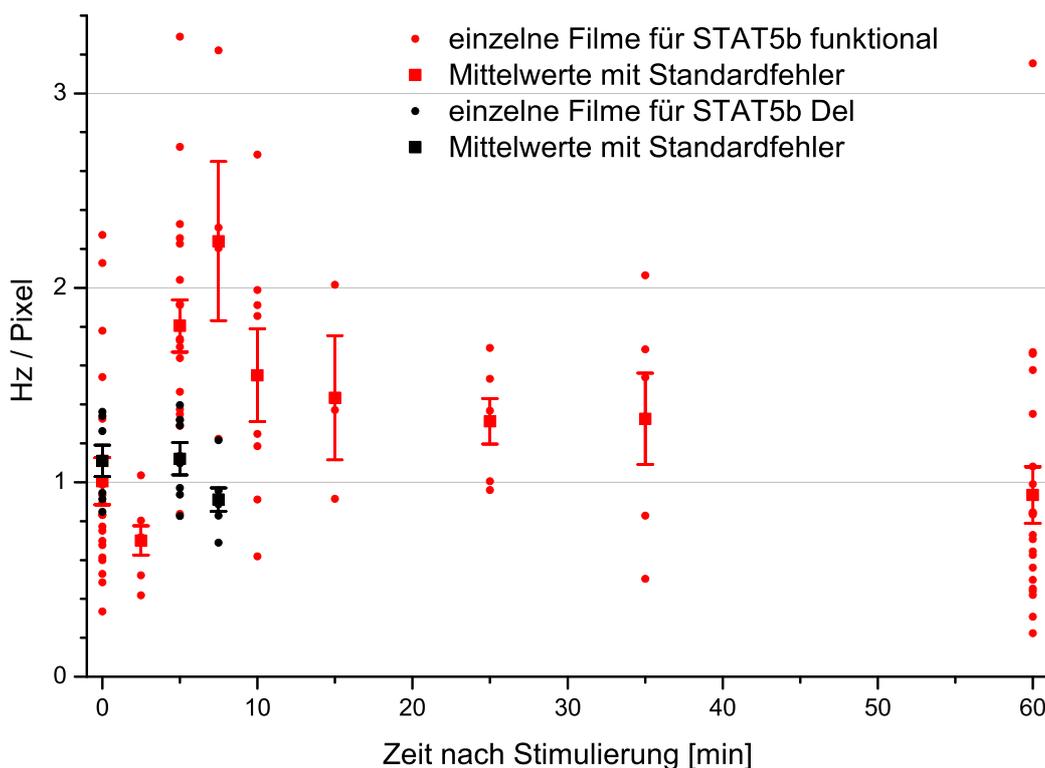
Ein Unterschied in der Bindungsdauer in Relation zur Epo-Stimulierung ist nicht zu erkennen. Des weitern konnte keine Kinetik der Bindungsdauer für keinen der Zeitpunkte ohne oder mit Epo-Stimulierung bestimmt werden.



**Abbildung 2.23:** Auftragung der mittleren Anzahl der Ereignisse über 24 Videos ohne Epo, 23 für 5 Minuten und 21 für 60 Minuten Epo-Stimulierung gegen die Bindungsdauer.

Die linear Abhängigkeit der Bindungsdauern im doppelt-logarithmisch aufgetragenen Graphen zeigt, viele verschiedene Wechselwirkungen des Proteins mit der apikalen Zellmembran mit unterschiedlichen Zeitkonstanten. Oder unspezifische Wechselwirkungen des STAT5b mit der Zellmembran die über alle Bindungszeiten verteilt sind.

Betrachtet man die gesamte Aktivität, d.h. das Auftreten eines markierten Proteins an der apikalen Membran, erkennt man eine Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Epo-Stimulierung (Abbildung 2.24). Hierfür wurden Videos aufgenommen, einmal ohne und zu 8 Zeitpunkten bis einschließlich 60 Minuten nach Epo Zugabe.



**Abbildung 2.24:** Die Aktivität des Proteins STAT5b-SNAP-TMR-Star an der apikalen Membran der NIH3T3 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Epo-Stimulierung.

Das funktionale STAT5b (rot), das nach Epo-Stimulierung am Epo-Rezeptor bindet, zeigt 5 Minuten nach Stimulierung einen Anstieg der Aktivität auf das 1,8 fache des Werts ohne Stimulierung. Nach 7,5 Minuten ist mit 2,2 Hz pro Pixel das Maximum der Aktivität erreicht. Von hier an nimmt die Aktivität wieder ab, bis sie nach 60 Minuten mit 0,9 Hz pro Pixel etwa bei ihrem Anfangswert liegt.

Für die Deletions-Mutante (Del; schwarz) des STAT5b, eine nicht funktionale Mutante deren SH2 Domäne nicht am Rezeptor bindet, wurden Messungen bis 7,5 Minuten nach Zugabe von Epo durchgeführt. Für diesen Zeitpunkt ist, im Gegensatz zum funktionalen Protein, kein

Anstieg der Aktivität zu beobachten. Weiterhin ist zu sehen, dass die Einzelmessungen (kleine runde Punkte) eine hohe Fluktuation aufweisen.

In Tabelle 2.5 sind die Mittelwerte mit Standardfehler und die Anzahl der Videos für das funktionale Protein und der Deletions-Mutante zu den jeweiligen Zeitpunkten ohne und nach Epo-Stimulierung aufgeführt.

Zeit [min]	STAT5b funktional Aktivität [Hz/Pixel]	STAT5b Del Aktivität [Hz/Pixel]
0	1,005 ± 0,054 (20)	1,110 ± 0,080 (7)
2,5	0,701 ± 0,074 (7)	
5	1,803 ± 0,135 (19)	1,120 ± 0,082 (7)
7,5	2,239 ± 0,408 (4)	0,910 ± 0,060 (7)
10	1,550 ± 0,239 (8)	
15	1,434 ± 0,319 (3)	
25	1,313 ± 0,117 (6)	
35	1,326 ± 0,234 (6)	
60	0,934 ± 0,145 (21)	

**Tabelle 2.5:** Die Mittelwerte mit den Standardfehlern der Aktivität des STAT5b-SNAP-TMR-Star zu den Zeitpunkten nach und ohne Epo-Stimulierung für das funktionale Protein und die Del-Mutante. In Klammern die Anzahl der analysierten Videos für die jeweiligen Stimulationszeitpunkte.

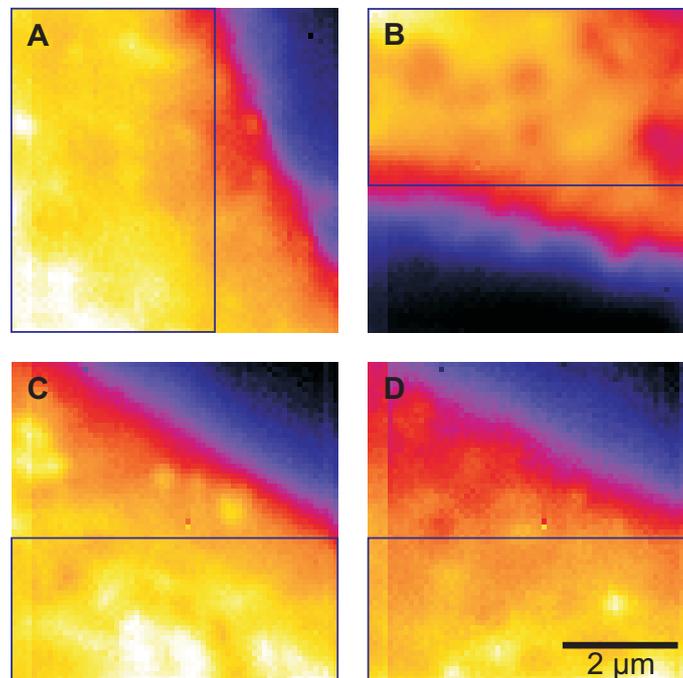
Die Stimulation mit Epo führt zunächst zu einem Anstieg der Aktivität des STAT5b mit der apikalen Zellmembran. Die Gründe hierfür können sein, eine erhöhte Bindungsrate der Proteine mit dem aktivierten EpoR oder eine vermehrte Rekrutierung von EpoR an die Zellmembran und die dadurch gesteigerte Bindungsmöglichkeit. Der Rückgang der Aktivität nach 60 Minuten auf den Anfangswert zeigt, dass vermutlich eine Rückkopplungsschleife aufgrund der Stimulierung des Signalwegs aktiviert wird. Die Deletions-Mutante hingegen weist keinen Anstieg bis zu dem Zeitpunkt der maximalen Aktivität für das funktionale STAT5b bei 7,5 Minuten auf. Das zur Bindung unfähige Protein wird nicht phosphoryliert und kann den Signalweg entsprechend nicht aktivieren.

Auffallend ist auch die hohe Streuung der Aktivitäten für die jeweiligen Stimulationszeitpunkte. Dies spiegelt die Heterogenität der Zellen untereinander wider.

## 2.6 Bildkorrelation von Videos unterschiedlich behandelter Zellen

Eine weitere Methode, um Informationen über die Diffusion des Proteins in Interaktion mit dem Epo Rezeptor zu erhalten, ist die Korrelation der einzelnen Bilder eines TIRF Videos miteinander (engl. „Image Total Internal Reflection-FCS“ – ImTIR-FCS). Die Videos wurden am selben TIRF-Aufbau mittels der „VA“-Methode, wie für die Bindungsanalyse aufgenommen. Für die Anwendung von ImTIR-FCS muss die Belichtungszeit für die einzelnen Bilder eines Videos auf ein Minimum reduziert werden. Die minimale Belichtungszeit für die verwendete EM-CCD Kamera liegt bei einer Bildgröße von 64 x 64 Pixel bei knapp 5 ms. Sie wurde für die Messungen immer auf 5 ms gesetzt. Um bei dieser kurzen Belichtungszeit genügend Signal pro Pixel zu bekommen, wurde die Laserintensität zur Anregung auf 2 mW eingestellt. Im Folgenden wird gezeigt, ob unter diesen Bedingungen Aufnahmen und deren Analyse möglich sind.

Untersucht wurde die Diffusion der beiden Fusionsproteine STAT5b-SNAP funktional und der Deletions-Mutante jeweils ohne und nach 5 Minuten Epo-Stimulierung. Die Videos bestehen aus einer Bildfolge von 5000 Einzelaufnahmen. In Abbildung 2.25 sind die Summenbilder aller 5000 Einzelaufnahmen der 4 Videos gezeigt.

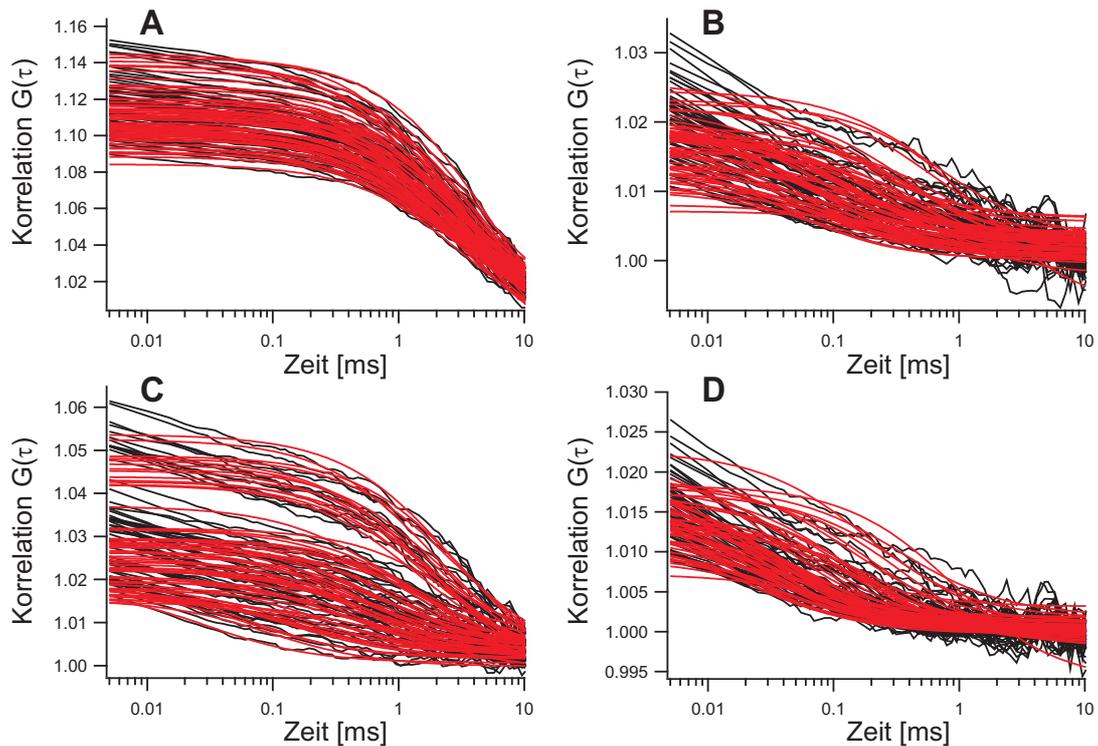


**Abbildung 2.25:** Summenbilder aller 5000 Einzelaufnahmen der Videos für die ImTIR-FCS Analyse von STAT5b-SNAP markiert mit TMR-Star in lebenden NIH3T3 Zellen. A) Funktionales Protein ohne und B) mit 5 Minuten Epo-Stimulierung. C) Die Deletions-Mutante ohne und D) mit 5 Minuten Epo-Stimulierung. Die blauen Rechtecke markieren die Fläche innerhalb der die ImTIR-FCS Analyse durchgeführt wurde.

Die Falschfarbendarstellung verdeutlicht den Verlauf innerhalb der Summenbilder. Von schwarz, außerhalb der Zelle wo keine Fluoreszenz ist, hin zu gelb und weiß, der Bereich hoher Fluoreszenz, in dem die mit TMR-Star markierten STAT5b-SNAP Proteine mit der apikalen Membran wechselwirken.

Die Rechtecke kennzeichnen den Bereich der hohen Fluoreszenz in dem die ImTIR-FCS Analysen durchgeführt wurden. Für A) ist der Bereich 40 x 64, für B) 35 x 64 und für C) und D) jeweils 64 x 29 Pixel groß.

Die Analysen wurden von Jagadish Saranka, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von T. Wohland an der NU Singapur, durchgeführt. In Abbildung 2.26 wird mit 4 unterschiedlichen Bedingungen die Korrelationen des Videos der Deletions-Mutante ohne Epo durchgeführt und gezeigt unter welchen Bedingungen es möglich ist die Videos zu analysieren. Unter den gegebenen Einstellungen (Kapitel 4.9) des TIRFM-Aufbaus wird die Fluoreszenz eines einzelnen Moleküls über mehrere Pixel abgebildet. Für die ImTIR-FCS Analyse ist es daher nötig ein Binning von 5 x 5 Pixeln zu einem Bildpunkt einzuführen. So können für die in Abbildung 2.25 durch das blaue Rechteck markierten Flächen in den jeweiligen Aufnahmen jeweils eine Vielzahl von Korrelationen vorgenommen werden (siehe Tabelle 2.6). In Abbildung 2.26 sind in den 4 Graphen die Korrelationen immer schwarz und die Anpassung an ein 2D Modell für freie Diffusion immer rot gezeichnet. Es werden alle Korrelationen der markierten Fläche für das Video in einem Graphen übereinander dargestellt. Zunächst wird in A) die Analyse des Videos aller 5000 Einzelbilder ohne Bleichkorrektur durchgeführt. Im Graph B) wird ein Vorbleichen eingeführt indem nur die letzten 3000 der 5000 Einzelbilder korreliert werden auch hier findet keine Bleichkorrektur statt. Für den Graphen C) werden wiederum alle 5000 Einzelbilder korreliert allerdings diesmal mit Bleichkorrektur. Und schließlich im Graphen D) sowohl mit Vorbleichen und Bleichkorrektur analysiert.



**Abbildung 2.26:** Korrelation des Videos Deletions-Mutante ohne Epo von 5000 Einzelbildern mit einem Binning von 5 x 5 Pixeln.

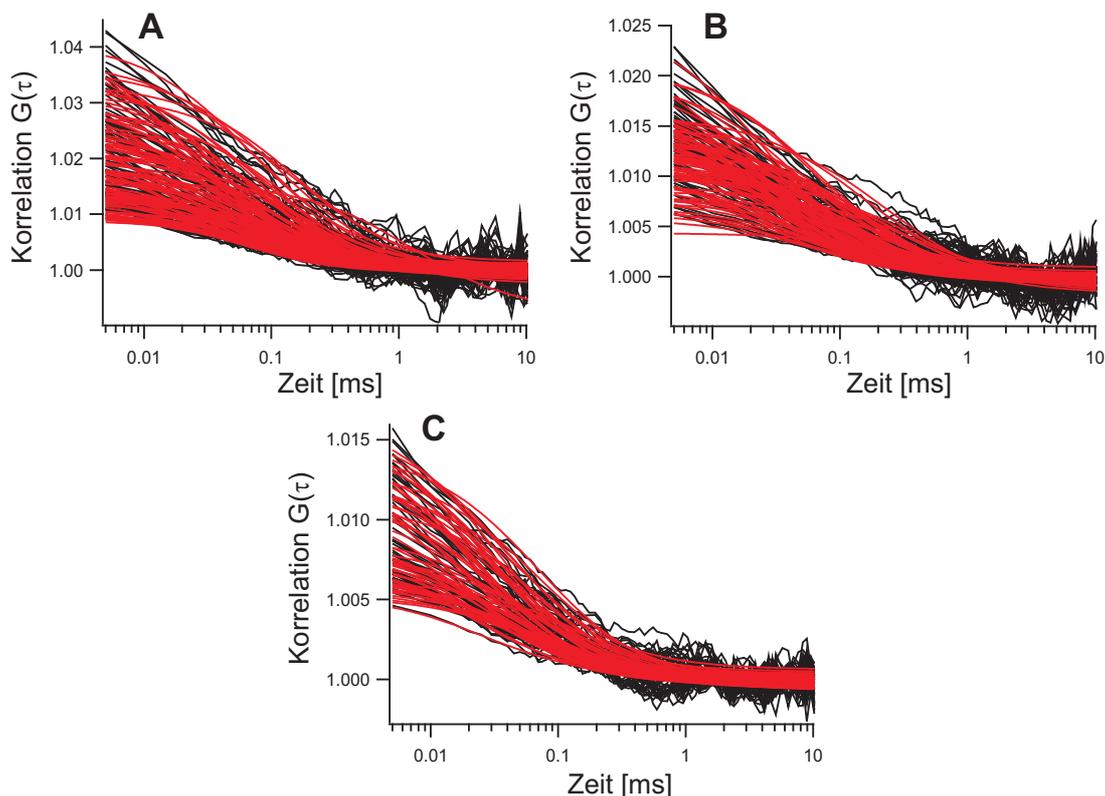
A) Alle Einzelbilder und B) die Einzelbilder von 2000 – 5000, jeweils ohne Korrektur für Fotobleichen.

C) Alle Einzelbilder und D) die Einzelbilder von 2000 – 5000, jeweils mit Korrektur für Fotobleichen.

Die schwarzen Kurven zeigen die Korrelation, die roten die jeweiligen Anpassungen dazu.

Nur mit der Variante mit Vorbleichen und Bleichkorrektur erhält man verlässliche Diffusionskoeffizienten. Ein Vorbleichen ist erforderlich, da die Hintergrundfluoreszenz in der Zelle schnell gebleicht wird und diese Bleichen zu Fehlern in der Korrelation führt. Die zusätzliche Bleichkorrektur korrigiert darüber hinaus noch das Bleichen des Farbstoffs. In Abbildung 2.27 sind die Graphen für die 3 weiteren Videos A) STAT5b-SNAP funktional ohne und B) mit 5 Minuten Epo-Stimulation und C) die Deletions-Mutante mit 5 Minuten Epo-Stimulation gezeigt. Es wurde nur noch die Analysevariante mit Vorbleichen und Bleichkorrektur für die jeweiligen Videos dargestellt.

In einigen Kurven tritt eine Abweichung der Anpassung gegenüber der Korrelation auf. Dies kann daran liegen, dass die Anpassung über das einfache 2D Modell ein Blinken nicht berücksichtigt, welches dazu führt, dass die Korrelation zu kurzen Zeiten noch mal ansteigt. Oder dass für diese Korrelationen aufgrund zu geringer Zeitauflösung der Messungen die gesamte Korrelationskurve nicht erfasst wird.



**Abbildung 2.27:** Die Korrelation der Videos A) STAT5b-SNAP funktional ohne und B) nach 5 Minuten Epo-Stimulierung und C) die Deletions-Mutante nach 5 Minuten Epo-Stimulierung. Jeweils nur die Analyse mit Vorbleichen und Bleichkorrektur. Die schwarzen Kurven zeigen die Korrelation, die roten die jeweiligen Anpassungen dazu.

In Tabelle 2.6 sind die Diffusionskoeffizienten mit Standardabweichung der verschiedenen Videos zusammengefasst.

Diffusionskoeffizient D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	Funktionales STAT5b	Del Mutante STAT5b
ohne Epo	$1,4 \pm 0,8$ (94)	$2,0 \pm 1,3$ (60)
5 min Epo	$1,5 \pm 1,0$ (82)	$2,4 \pm 1,0$ (59)

**Tabelle 2.6:** Diffusionskoeffizienten mit Standardabweichung analysiert mit ImTIR-FCS für funktionales STAT5b die Delition-Mutante jeweils ohne und nach 5 Minuten Epo-Stimulierung. In Klammern die Anzahl der Korrelationen.

Die Diffusionskoeffizienten des funktionalen STAT5b an der apikalen Membran unterscheiden sich nicht für die unstimulierte und nach 5 Minuten Stimulation gemessene Zellen. Der Wert der Diffusionskoeffizienten liegt in dem Bereich für Membrandiffusionen. Für die Deletions-Mutante gilt das gleiche wie für das funktionale Protein, die Diffusion der stimulierten Zelle unterscheidet sich innerhalb des Fehlers nicht voneinander.

Die Standardabweichungen für alle Diffusionskoeffizienten sind relativ hoch. Das lässt bei der gegebenen Anzahl an Korrelationen darauf schließen, dass sich die Diffusionskoeffizienten aus verschiedenen Wechselwirkungen des Proteins mit der Zellmembran oder dergleichen zusammensetzen. Hier können die Bindung des STAT5b an den EpoR aber auch auch andere Rezeptoren eine Rolle spielen, eine unspezifische Wechselwirkung des Proteins mit der Zellmembran ist anzunehmen und vermutlich ist die Diffusion entlang der Membran auch relevant.

Vergleicht man die Deletions-Mutante mit dem funktionalen STAT5b sind sie innerhalb der Fehler gleich aber dennoch ist für das funktionale Protein ein Trend zu langsameren Diffusionszeiten zu erkennen. Daher kann angenommen werden, dass die Bindung des funktionalen STAT5b an den EpoR aufgrund der langsameren Membrandiffusion zu den geringeren Diffusionskoeffizienten führt.

### 3 DISKUSSION

#### 3.1 FCS STAT5b-mCherry

Für die Untersuchungen der Diffusion des Transkriptionsfaktors STAT5b in lebenden Zellen mit Einzelmolekül-spektroskopischen Methoden war es notwendig das Protein spezifisch mit einem Farbstoff zu markieren. Die Verwendung eines FPs als Fusionsprotein mit STAT5b in lebenden Zellen schien zunächst eine geeignete Markierungsstrategie. Als FP wurde mCherry gewählt, da es zum Zeitpunkt der Planung der Messungen aufgrund der in der Literatur [66, 67, 129] aufgeführten Eigenschaften am ehesten den Anforderungen an Fluorophore in Bezug auf die Einzelmolekülspektroskopie (Kapitel 1.2) genügt.

Daraufhin wurde für diese Arbeit das Plasmid mit dem Fusionsprotein STAT5b-mCherry kloniert und mit dem Tet-Induktions-Sytem stabil in die NIH3T3 Maus Fibroblasten transduziert. Über das Tet-Induktions-Sytem ließ sich die Expression des Proteins mit Doxyzyklin so steuern, dass die Konzentration in dem für die Experimente erforderlichen Bereich lag (Kapitel 1.1).

Die Daten der Punkt FCS-Messungen zeigten, dass FCS-Messungen mit dem FP mCherry prinzipiell möglich sind. Bei der Anpassung der Korrelationskurven an das Modell der dreidimensionalen Diffusion mit Berücksichtigung der Anomalie  $\alpha$ , des Blinkens und der Triplett-Photophysik fällt auf, dass der Wert für  $\alpha$  mit  $0,42 \pm 0,11$  kleiner ist als typischerweise für lebende Zellen angegeben ( $0,5 < \alpha \leq 0,8$ ) [130]. Das Blinken liegt bei einer Zeit von  $619 \pm 409 \mu\text{s}$ . Die zusätzliche Berücksichtigung des Triplett-Terms bei der Anpassung ergibt einen Wert von  $0,29 \pm 0,62 \mu\text{s}$ . Da der kleinste Wert der Hardware-Korrelator-Karte für  $\tau$   $0,4 \mu\text{s}$  beträgt, ist für die Anpassung mit Berücksichtigung des Triplett nicht aussagekräftig. J. Hendrix et. al. zeigten, dass die Triplettzeit von mCherry mit wenigen Mikrosekunden auf einer Zeitskala liegt, die mit der Karte nicht auf gelöst werden kann [117]. Die Werte für den Blink-Term und die anomale Diffusion ( $\tau_B = 608 \pm 307 \mu\text{s}$  und  $\alpha = 0,42 \pm 0,11$ ) für die Anpassung ohne Berücksichtigung des Triplett-Terms stimmen innerhalb der Fehlergrenzen mit denen mit Triplett-Term überein. Damit ist für die Analyse der Diffusion von STAT5b-mCherry die Anpassung ausreichend, die einen Exponential-Term für das Blinken und die anomale Diffusion berücksichtigt. Für einzelne Punktmessungen lässt sich so lokal in der Zelle die Diffusion charakterisieren.

Das langsame Blinken auf einer Zeitskala von mehreren hundert Mikrosekunden wird durch photophysikalische Prozesse verursacht. J. Hendrix et. al. zeigten in FCS-Messungen unter anderem an mCherry in wässriger Pufferlösung, dass FPs abhängig von der Anregungslaserintensität auf einer Zeitskala  $<100 \mu\text{s}$  zusätzlich zum Triplett-Blinken blinken [117]. Der höhere Wert von  $608 \pm 307 \mu\text{s}$  für das Blinken bei Messungen in lebenden Zellen lässt sich durch das veränderte elektrochemische Potential im Zellinneren, welches die Photophysik beeinflusst, erklären. Für die Messungen an mCherry in Pufferlösung wurde für die Anpassung keine anomale Diffusion berücksichtigt. In dieser Arbeit werden die FCS-Messungen an STAT5b-mCherry in lebenden Zellen durchgeführt, daher wird für die Anpassung ein Term für anomale Diffusion zusätzlich eingesetzt. Die Berücksichtigung der anomalen Diffusion in lebende Zellen, hat in der Anpassung möglicherweise einen Einfluss auf das Blinken.

Weiterhin ist noch die geringe Photostabilität von mCherry zu beachten. In Abbildung 2.3 ist das Bleichen von mCherry zu sehen, d.h. die Fluoreszenzintensität nimmt innerhalb der Messzeit von 60 Sekunden ab. Bei der Korrelation des Signals führt dies zu einem Anheben der Korrelationskurve so dass diese nicht mehr auf Null abfällt. Dadurch wird die Bestimmung der Diffusionszeit fehlerhaft.

Um diese Problem zu beheben könnten die Aufnahmezeiten verkürzt werden. Dadurch wird die Korrelation verrauschter, aber die Artefakte durch das Bleichen fallen weg. Jonas Ries et. al. entwickelten eine Methode die es ermöglicht durch Fluoreszenzbursts aufgrund von Aggregaten oder durch Bleichen verfälschte Korrelationskurven zu sortieren, indem beeinflusste Bereiche der Fluoreszenzspuren automatisiert verworfen werden [131]. Die komplexen Diffusionsvorgänge in lebenden Zellen erfordern wie schon gezeigt erweiterte Modelle für die Anpassung an die Korrelationskurven. Je komplexer die Anpassungsmodelle werden, desto geringer ist die Information über das untersuchte System. Dennoch können über Messungen solcher komplexen und nicht idealen Systeme Informationen erhalten werden, wenn unterschiedliche Situationen im selben System verglichen werden sollen [132]. Daher wurde mit DIFIM untersucht ob es mit kurzen Aufnahmezeiten und dem vereinfachten Anpassungsmodell einer 2D Diffusion möglich ist Heterogenitäten in verschiedenen Regionen der Zelle zu zeigen.

### 3.2 DIFIM mit STAT5b-mCherry

Für DIFIM (Kapitel 1.3) ist es notwendig die Intensitätsspuren der einzelnen Pixel in dem kürzest möglichen Zeitraum aufzunehmen, damit die gesamte Messzeit so klein wie möglich ist. In der Regel ist für eine gute Korrelation eine Aufnahmezeit der Intensitätsspur von etwa 1000mal der Diffusionszeit des Fluorophors erforderlich. Die Aufnahmezeit kann durch die Erhöhung der Konzentration des Fluorophors, in diesem Fall das mit mCherry fusionierte STAT5b, verkürzt werden. So treten öfter Fluoreszenz markierte Proteine in das konfokale Volumen ein und aus, d.h. die Fluktuationen nehmen zu. Hierfür muss das Signal zu Rauschen Verhältnis des Mikroskopaufbaus sehr gut sein. Eine weitere Möglichkeit ist eine höhere Laserintensität, so dass das Fluorophor beim Durchlaufen des konfokalen Volumens mehr Photonen emittiert, was zu einem besseren Signal führt. Allerdings werden so weniger stabile Farbstoffe wie FPs schneller geblichen, außerdem wird das konfokale Volumen durch die höhere Anregungsintensität vergrößert und bei einer hohen Konzentration steigt das gesamte Signal wodurch Fluktuationen schlechter zu erkennen sind. Die hohe Farbstoffkonzentration führt auch dazu, dass die Amplitude der Korrelation sehr niedrig ist. Dies ergibt dann eine sehr flache Korrelationskurve, die bei kurzen Aufnahmezeiten von nur 100 ms sehr verrauscht ist. Damit wird auch die Anpassung sehr ungenau.

Bei STAT5b-mCherry sind in Punkt FCS-Messungen an diesem Aufbau Diffusionszeiten von ca. 10 ms gemessen worden. Damit sollte die Aufnahmezeit idealer Weise etwa 10 s betragen. So würde die Erstellung einer Diffusionskarte von nur  $4 \times 4 \mu\text{m}$  und einer Pixelweite von 100 nm mit DIFIM 266 Minuten dauern. Innerhalb diesen Zeitraum lassen sich Änderungen durch über Aktivierungen des JAK/STAT Signalwegs nicht mehr Zeitaufgelöst über die gesamte Region erfassen. Daher wird die Aufnahmezeit auf nur 100ms pro Pixel verkürzt. Allerdings ist die so resultierende Aufnahmezeit von 8 min für die gezeigte DIFIM-Messung immer noch zu hoch, um die Änderungen im Verhalten der Diffusion nach Aktivierung des Signalwegs darzustellen. Die Reaktion nach der Stimulation erfolgt etwa nach 5 – 7,5 min (Kapitel 2.5), was noch innerhalb der Aufnahmezeit einer DIFIM-Messung liegt. So kann gegebenenfalls eine Änderung innerhalb eines Ausschnitts der Diffusionskarte festgestellt werden, aber nicht die Änderungen innerhalb verschiedener Regionen wie dem Zytosol und dem Zellkern aufgrund der Stimulation. Für den Bereich des Zellkerns und des Zytosol innerhalb des gescannten Ausschnitts liegen die Diffusionszeiten zwischen 0,1 und 10 ms, allerdings heterogen verteilt. So ist kein Unterschied zwischen dem Zellkern und dem Zytosol zu erkennen. Entlang der Zellmembran liegen die Diffusionszeiten schmaler Verteilt zwischen

5 und 10 ms. Dies lässt eine Unterscheidung der Zellmembran vom inneren der Zelle zu. Zusätzlich führt das Blinken von mCherry bei der vereinfachten Anpassung über ein 2D Diffusions-Modell zu einer weiteren Ungenauigkeit.

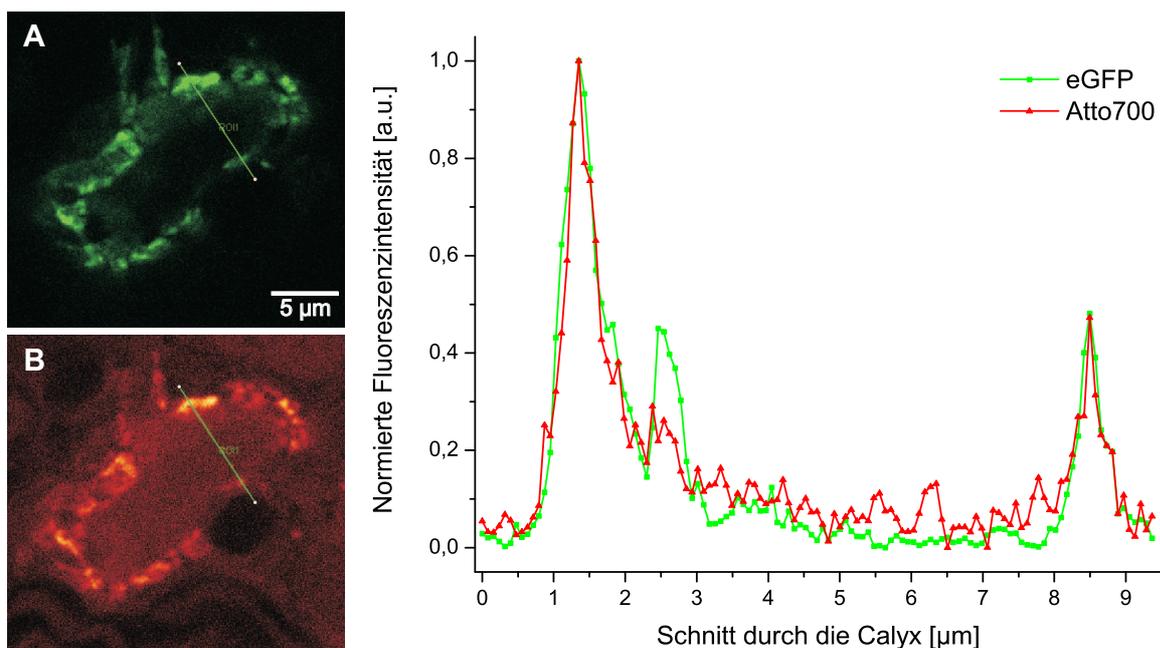
Zusammengefasst lässt sich sagen, dass DIFIM für die relativ langsamen Diffusionen innerhalb einer lebenden Zelle nicht geeignet ist um dynamische Veränderungen in der Zelle als Folge der Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs zu beobachten. Des weiteren lässt die zu geringe Photostabilität von mCherry und zusätzliche photophysikalische Artefakte wie vermehrtes Blinken nicht die notwendige hohe Laserintensität zu, um die Messzeit zu verkürzen.

Sind die zu untersuchenden Diffusionsprozesse schneller als 1 ms, so sollte die Aufnahmezeit von 100 ms pro Pixel genügen, um eine ausreichend gute Korrelationskurve zu bekommen. Ist die zu beobachtende Veränderung in der Probe auf einer wesentlich langsameren Zeitskala als die Stimulation des JAK/STAT Signalweg, mit ca. 7,5 min im Falle dieser Arbeit, so kann der Prozess über DIFIM verfolgt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung von DIFIM ist die Verwendung eines Arrays von sehr schnellen Detektoren (CMOS-Detektoren [133]) kombiniert mit Linsenarrays. So lassen sich die Intensitätsspuren gleichzeitig von vielen Foki (32 x 32) mit einer Zeitauflösung von 119 ps pro Pixel detektieren[134].

### 3.3 Markierung von Synptophysin-SNAP mit BG-Atto700

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von T. Kuner an der Universität Heidelberg wurde das Protein Synaptophysin untersucht. Es wurde sowohl mit eGFP als auch mit dem SNAP-Tag fusioniert. Die Markierung von SNAP erfolgte über BG-Atto700, ohne anschließende Waschschrte. Durch Scans mit einem CLSM bei denen gleichzeitig das eGFP und Atto700 angeregt und detektiert werden kann gezeigt werden, dass das Fluoreszenzsignal beider Kanäle kolokalisiert ist (Abbildung 3.1). Das schlechtere Signal zu Rausch Verhältnis im Atto700 Kanal rührt daher, dass ungebundenes aber durch Guanin gelöschtes BG-Atto700 zu erhöhter Hintergrundfluoreszenz führt. In Abbildung 3.1 wird die sehr gute Übereinstimmung der Fluoreszenzintensität eines Linienprofils in den beiden Kanälen von eGFP und SNAP-Atto700 gezeigt.



**Abbildung 3.1:** Die Fluoreszenzintensität eines Linienprofils (grün) durch die Calyx. A) ist der Scan im eGFP und B) im Atto700 Kanal. Das Fluoreszenzintensitätsdiagramm – normiert auf die maximale Intensität – zeigt die sehr gute Überlagerung beider Kanäle.

### 3.4 Die Markierung des STAT5b-SNAP in NIH3T3 Maus Fibroblasten

#### Die Markierung mit verschiedenen BG-Substraten

Um die Eigenschaft des Guanins, die Farbstoffe mehr oder minder zu Löschen [69], zu nutzen, wird versucht das STAT5b-SNAP in den NIH3T3 Maus Fibroblasten mit verschiedenen BG-Substraten zu markieren. In der Aufnahme der Zelle mit dem Fusionsprotein STAT5b-mCherry zeigt die Zelle eine homogene Fluoreszenz. Bei der Markierung des Fusionsprotein STAT5b-SNAP mit den verschiedenen BG-Substraten ist zu erwarten, dass die Zellen eine vergleichbare Fluoreszenz aufweisen. Die Zellen die das Fusionsprotein STAT5b-SNAP mit 50 ng/ml Dox exprimieren zeigen sowohl mit einer hohen (5  $\mu$ M) als auch einer niedrigen (0,2  $\mu$ M) Konzentration an BG-Atto633 ein ähnliches punktförmige Fluoreszenzmuster um den Zellkern lokalisiert. Die Zellen die das Fusionsprotein nicht exprimieren und mit der hohen Konzentration an BG-Atto633 inkubiert wurden, weisen das gleiche Muster auf, wie die Zellen die das STAT5b-SNAP exprimieren und auch mit der hohen Konzentration an BG-Atto633 inkubiert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass die Markierung mit BG-Atto633 nicht spezifisch ist. Die Markierung des Fusionsproteins mit weiteren BG-Substraten (Tabelle 2.2 und Kapitel 6.1) weisen alle ein vergleichbares punktförmige Fluoreszenzmuster auf. Ist das punktförmige Muster endozytotisch aufgenommenes BG-Substrat, welches sich noch in späten Endosomen und Lysosomen befindet [135, 136], ist davon auszugehen, dass die getesteten BG-Substrate nicht Zellpermeabel sind. Weitere Möglichkeiten, wie Mikroinjektion oder Transfektion, um die Substrate in die Zellen zu bekommen sind sehr stressige Eingriffe für die Zellen. Der Großteil der Zellen überlebt solche Eingriffe nicht und bei den überlebenden ist nicht gewährleistet, ob ihr Verhalten aufgrund externer Stimuli oder durch die Eingriffe hervorgerufen wird. Für weitere Versuche wurde TMR-Star, ein Substrat das keine Löschung zeigt, verwendet. Somit lässt sich Protein-gekoppelter Farbstoff nicht von ungebundenem Substrat unterscheiden. Allerdings ist der Farbstoff zellpermeabel und kann dementsprechend zur nicht invasiven Markierung des Fusionsproteins verwendet werden.

---

## Konzentration von TMR-Star und Waschschrirte

Für die Untersuchungen der Diffusion, der Bindung und der Aktivität von STAT5b in den lebenden NIH3T3 Maus Fibroblasten ist es zunächst erforderlich die Markierung des Proteins zu optimieren.

Zunächst werden hierfür die Zellen mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen von anfangs 2,5  $\mu\text{M}$  bis schließlich 50 nM markiert. Die Markierung mit Konzentrationen von 2,5 und 1  $\mu\text{M}$ , in Zellen die das Fusionsprotein exprimieren, zeigen stark fluoreszierende Punkte im Zytosol der Zellen. Bei genauerem Betrachten überlagern diese Punkte eine homogen Fluoreszenz der gesamten Zelle. Die Markierung der Zellen die kein STAT5b-SNAP exprimieren weisen nur das punktförmige Muster auf. Dies lässt darauf schließen, dass der Farbstoff bei der endozytotischen Aufnahme solch hoher Konzentrationen, in den Vesikeln verbleibt und zu der punktförmigen Markierung führt. Die Struktur der Fluoreszenz in der Aufnahme ohne exprimiertes Protein gleicht der in den Aufnahmen mit BG-Atto633 (Kapitel 2.2) und allen weiteren BG-Substraten (Kapitel 6.1). Demnach führt die Markierung mit hohen Konzentrationen zu einem sehr hellen und unspezifischen Signal.

Die Inkubation mit Konzentrationen von 100 und 50 nM zeigt eine Markierung der Zellen die nahezu homogen ist ohne das überlagerte, intensive und punktförmige Muster. Im Zellkern ist die Fluoreszenzintensität etwas höher als im Zytosol. Das liegt daran, dass die Zellen in Medium mit Serum inkubiert sind und daher eine Stimulierung des Rezeptors stattfindet. Die Stimulierung führt zur Akkumulierung des aktivierten Proteins im Zellkern das anhand der höheren Fluoreszenz zu sehen ist.

In den Aufnahmen mit 100 und 50 nM, die unter den identischen Konditionen vorgenommen werden, ist kein erheblicher Unterschied der Fluoreszenzintensität zu sehen. Folglich ist anzunehmen, dass selbst mit 50 nM TMR-Star immer noch ein Überschuss an Farbstoff gegeben ist, um möglichst alle exprimierten STAT5b-SNAP Fusionsproteine zu markieren. Die vom Hersteller empfohlene Konzentration (2,5 $\mu\text{M}$ ) führt zu Artefakten und ist für diese Zelllinie deutlich zu hoch. Mit einer Konzentration von 50 nM wird eine homogene Markierung der Zellen erreicht und entsprechend für alle weiteren Experimente verwendet. Für die Nutzung des SNAP-Tag mit anderen Proteinen und anderen Zelllinien muss vermutlich ein entsprechendes Markierungsprotokoll ausgearbeitet werden.

Da ein Überschuss an TMR-Star eingesetzt wird, ist es notwendig zu prüfen, ob und wie sich der überschüssige Farbstoff auswaschen lässt. Dafür werden Aufnahmen nach jeweils einem und zwei Waschschrirten von Zellen gemacht, die das Protein nicht exprimieren aber mit Farbstoff inkubiert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl das Hintergrundsignal in

der Kammer als auch innerhalb den Zellen nach dem zweiten Waschschrift erheblich gegenüber einem Waschschrift abnimmt. Schon nach zwei Waschschriften entspricht das Signal etwa dem der Autofluoreszenz der Zellen. Für die weitem Experimente werden mindestens drei und maximal vier Waschschrift durchgeföhrt, da das Waschen eine Stressreaktion in den Zellen verursacht.

### Regulierung des Fusionsproteins

Für Einzelmolekül-spektroskopische Experimente muss die Konzentration an markiertem STAT5b-SNAP niedrig sein. Über das Tet-Induktions-System (Kapitel 1.1) lässt sich die Stärke der Expression steuern. Entsprechend steigt die Fluoreszenzintensität mit Erhöhung der Dox-Konzentration bis 200 ng/ml, während die Farbstoffkonzentration bei 50 nM bleibt. Wird die Dox-Konzentration auf 500 ng/ml erhöht ist kein Anstieg mehr zu beobachten. Zusätzlich sieht man auch bei Experimenten mit der höchsten Dox-Konzentration Zellen mit einer geringeren Fluoreszenz als für die Expression mit 200 ng/ml. Dies zeigt, dass sich die einzelnen Zellen nicht gleich Verhalten, sondern hinsichtlich der Expression Heterogenitäten aufweisen.

Prinzipiell ist es somit möglich die Expression bei kleiner Dox-Konzentration niedrig zu halten und damit eine geringe Konzentration an markiertem Protein und der gesamten Fluoreszenz zu erzielen.

### Spezifität der Markierung

Anhand der bisherigen Erkenntnisse bezüglich der zu verwendenden Farbstoffkonzentration, der Waschschrift und der Dox-Konzentration wurde ein direkter Vergleich mit unterschiedlich induzierten und markierten Zellen gemacht. Zellen die STAT5b-SNAP exprimieren, mit TMR-Star markiert und entsprechend gewaschen werden, zeigen die erwartete homogen Färbung. Zellen die kein Fusionsprotein exprimieren aber dennoch mit Farbstoff inkubiert und anschließend gewaschen werden zeigen nur eine geringe Fluoreszenz um den Zellkern lokalisiert. Eine vergleichbare Fluoreszenz zeigen Zellen, welche kein Protein exprimieren und auch nicht mit Farbstoff inkubiert werden. Diese Rest-Fluoreszenz ist die Autofluoreszenz der Zelle. Folglich wird das Protein bei Expression spezifisch markiert und überschüssiger Farbstoff komplett ausgewaschen.

### Funktionalität des Proteins

Um Aussagen über die Diffusions- und Bindungseigenschaften von STAT5b als Komponente des JAK/STAT Signalweg zu treffen, muss die Funktionalität des markierten Fusionsproteins bestätigt werden. Bei der Aktivierung von STAT5b durch den mit Epo stimulierten EpoRezeptor dimerisiert das Protein und kann im Zellkern an die Zielsequenz der DNA binden. Diese Bindung führt zu einer Akkumulation im Zellkern, welche in einer Zeitserie von 60 Einzelscans einer stimulierten Zelle über 60 Minuten gezeigt wird (Kapitel 2.3.4 und 6.2) und die Funktionalität des STAT5b-SNAP bescheinigt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass über die verschiedenen Untersuchungsreihen für die Farbstoffkonzentration, der Waschschrte, der Dox-Konzentration und der Funktionalität ein Markierungsprotokoll des STAT5b-SNAP in NIH3T3 Maus Fibroblasten erfolgreich etabliert wurde. Mit diesem Protokoll ist es möglich die Markierung so zu steuern, dass mit Einzelmolekül-spektroskopische Methoden Messungen am STAT5b möglich sind.

### 3.5 FCS mit TMR-Star markiertem STAT5b-SNAP

Die Diffusion des erfolgreich markierten und funktionalen STAT5b-SNAP in NIH3T3 Maus Fibroblasten wurde unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Punkt-FCS-Messungen wurden zudem in unterschiedlichen Bereichen innerhalb der Zellen vorgenommen. Über XY- und XZ-Scans kann die genaue Position des konfokalen Volumens innerhalb der Zelle gesetzt werden. So ist sichergestellt, dass die Messung entweder im Zytosol oder im Zellkern stattfindet und keine Überschneidungen des konfokalen Volumens mit der Zellmembran oder den Kernkörperchen im Zellkern erfolgen. Die Basisdiffusion des Proteins wird in unbehandelten Zellen gemessen, die in Medium mit Serum inkubiert wurden. Um alle Vorgänge der Zelle in einen sogenannten Ruhezustand zu versetzen werden sie gehungert, dies geschieht mit Medium ohne Serum. In diesem Ruhezustand wird die Diffusion von STAT5b ebenso durch FCS-Messungen charakterisiert. Die mit Epo stimulierten Zellen werden zuvor gehungert, so wird der aktivierte JAK/STAT Signalweg hervorgehoben. Die FCS-Messungen werden nach dreißigminütiger Stimulation durchgeführt.

Gegenüber den unbehandelten Zellen ( $D_{\text{Kern}} = 3,17 \pm 0,22 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ,  $D_{\text{Zyt}} = 4,97 \pm 0,24 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) weisen die gehungerten Zellen ( $D_{\text{Kern}} = 3,97 \pm 0,25 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ,  $D_{\text{Zyt}} = 5,43 \pm 0,22 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) sowohl im Zellkern ( $\Delta D = 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) als auch im Zytosol ( $\Delta D = 0,46 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) erhöhte Diffusionskoeffizienten auf. Die Ursache könnte die geringere Proteindichte innerhalb der Zelle aufgrund des Hungerns sein [137], dadurch wird die Diffusion schneller. Sowohl für die unbehandelten als auch für die gehungerten Zellen ist die Diffusion im Zytosol schneller als im Zellkern. Auch dies könnte an der höheren Dichte im Kern gegenüber dem Zytosol liegen. Im Fall der stimulierten Zellen ( $D_{\text{Kern}} = 4,39 \pm 0,54 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ,  $D_{\text{Zyt}} = 3,69 \pm 0,18 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) nimmt die Diffusion im Zytosol deutlich ab, während sie im Zellkern zu nimmt. Dies führt dazu, dass sich das Verhältnis der Diffusion zwischen dem Zellkern und dem Zytosol umkehrt. Das aktivierte STAT5b dimerisiert, dies kann ein Grund für die langsamere Diffusion im Zytosol sein. Im Zellkern bindet das aktivierte STAT5b als Dimer an die DNA. Ein Dimer welches sein Bindungsmotiv (GAS) gefunden hat, ist an dieser Stelle immobilisiert und trägt nicht mehr zu Fluktuationen der Fluoreszenzintensität bei. Somit tragen Dimere welche im Zellkern diffundieren oder entlang der DNA wandern, um ihr Bindungsmotiv zu finden zur FCS-Korrelation bei. Dies kann die Ursache für die schnellere Diffusion im Kern sein.

Der Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Werten aus der Literatur (Tabelle 3.1) zeigt, dass die in dieser Arbeit gemessenen Diffusionskoeffizienten zwischen denen liegen, die für die Diffusion in der Membran und im Zytosol gefunden wurden.

Chromophor alleine oder an Protein gebunden	Zelltyp	Membran	Zytosol	Zellkern	Ref.
mCherry-eGFP-Tandem	HeLa		* $11,9 \pm 3,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$		[138]
mCherry			* $24,9 \pm 5,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$		
eGFP			* $20,4 \pm 5,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$		
eGFP	COS-7		* $12,5 \pm 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$		[119]
eGFP				+ $8,7 \pm 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit $d_w = 2,3 \pm 0,1$	
eGFP	HeLa		* $22,6 \pm 3,7 \mu\text{m}^2/\text{s}$		[139]
AK1-eGFP			* $12,6 \pm 3,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$		
AK1 $\beta$ -eGFP			* $0,23 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$	* $13,6 \pm 4,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$	
diI-C <sub>12</sub> markierte Lipide der Membran	RBL	+ $0,8 \pm 0,06 \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,8}$			[118]
Cell Tracker Orange CMTMR	Hela		+ $25 \pm 7 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$		[121]
	EMT6		+ $40 \pm 12 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$		
	RBL		+ $30 \pm 9 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$		
Octadecyl rhodamine markierte Lipide	RBL	+ $0,8 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$			
Cy-3 über Antikörper an IgE Rezeptor	RBL	+ $0,08 \pm 0,05 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$			
GalNAc-T2-GFP	HeLa	+ $0,2 \pm \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,75}$			[122]
GalT-GFP		+ $0,08 \pm \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,55}$			
p24 $\beta$ 1-YFP		+ $0,3 \pm \mu\text{m}^2/\text{s}^{0,8}$			

\* Normale Diffusion, + Anomale Diffusion

**Tabelle 3.1:** Diffusionskoeffizienten in lebenden Zellen aus der Literatur. In verschiedenen Bereichen der Zellen gemessen. Entweder in der Zellmembran, im Zytosol oder im Zellkern.

Die in der Literatur gefundenen Diffusionskoeffizienten der FP markierten Proteine oder von Cell Tracker Orange im Zytosol liegen alle höher als die für STAT5b-SNAP-TMR-Star. Die Massen der Proteine sind  $< 50$  kDa und der Cell Tracker Orange hat ein Molekulargewicht von 554,04 Da, wechselwirkt allerdings im Zytosol unspezifisch mit Proteinen, daher ist die

Masse der bezüglich der Diffusion gemessen Aggregate mit Cell Tracker Orange nicht bekannt. STAT5b-SNAP-TMR-Star hat eine Masse von ca. 104 kDa und ist damit deutlich schwerer als die gezeigten mit FP markierten Proteine, dies führt höchst wahrscheinlich zu den geringeren Diffusionskoeffizienten. Ein Vergleich der Diffusionskoeffizienten innerhalb dieser Arbeit zeigt ebenfalls eine langsamere Diffusion des Dimers ( $3,69 \pm 0,18 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) nach Epo-Stimulierung innerhalb des Zytoplasmas, als unbehandelte ( $4,97 \pm 0,24 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) oder gehungerte ( $5,43 \pm 0,22 \mu\text{m}^2/\text{s}^\alpha$ ) Zellen.

Die einzelnen Messungen der Diffusionskoeffizienten für das Zytoplasma und den Zellkern wurden immer in derselben Zelle durchgeführt. Daher lässt sich die Diffusion innerhalb des Zytoplasmas und des Zellkerns direkt vergleichen in dem die Häufigkeiten des Verhältnisses der Diffusionskoeffizienten zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern aufgetragen werden.

Hier ist zu sehen, dass die Verteilungen und auch die Breite der Verteilungen unterschiedlich sind. Für unbehandelte ist sie breiter mit vielen Ausreißern. Die Verteilung für gehungerte Zellen ist schmaler, auch am kleineren Standardfehler zu erkennen. Vergleicht man die Verteilung für unbehandelte und gehungerte Zellen direkt miteinander, so haben sie mit  $1,45 \pm 0,51$  und  $1,43 \pm 0,32$  einen sehr ähnlichen Median. Zellen die stimuliert werden, weisen wiederum eine breitere Verteilung auf, deren Median bei  $1,1 \pm 0,42$  liegt.

Ein studentischer t-Test ergibt, dass sich die unbehandelten nicht von den gehungerten Zellen unterscheiden. Allerdings lassen sich die unbehandelten und gehungerten von den stimulierten Zellen unterscheiden.

Die teilweise Umkehrung des Verhältnisses der Diffusionskoeffizienten für stimulierte Zellen und die eindeutig trennbare Verteilung der Verhältnisse zeigt, dass sich die Diffusionseigenschaften in den verschiedenen Bereichen der Zelle aufgrund der Stimulierung ändern. Somit lassen sich bei genügend Einzel-Punkt-FCS-Messungen Veränderungen der Zellen – im Falle dieser Arbeit die Stimulierung des JAK/STAT Signalwegs anhand der Diffusion des STAT5b-Proteins – nachweisen.

### 3.6 Bindungskinetik des STAT5b mit der Membran über “VA-TIRF”

Über “Variable-Angle-TIRF” werden die Wechselwirkungen des STAT5b Proteins mit der apikalen Zellmembran untersucht. Diese Methode ermöglicht es Videos mit mehreren tausend Einzelbildern aufzunehmen, welche die Bindungen der markierten STAT5b-SNAP Proteine mit der apikalen Zellmembran zeigen. Verbleibt ein markiertes Protein über einen Zeitraum, der in etwa der Belichtungszeit eines Einzelbildes entspricht, an derselben Stelle, so wird es – innerhalb eines ausgewählten Bildausschnitts im Video – für dieses Einzelbild als ein mit der Membran interagierendes Protein gekennzeichnet. Bei der Auftragung der Summe der Ereignisse mit einer bestimmten Dauer, die ein Protein an derselben Stelle verblieb, kann, sofern diese Dauer einer Gesetzmäßigkeit unterliegt, die mittlere Zeit der Wechselwirkung bestimmt werden.

Im Fall aller Videos, sowohl denen mit unstimulierten Zellen als auch denen die 5 und auch 60 Minuten mit Epo stimuliert wurden, ist beim Auftragen der Anzahl der Ereignisse gegen deren Dauer in einem doppelt-logarithmischen Graphen eine lineare Abhängigkeit zu erkennen. Dies bedeutet, dass keine konkrete Bindungsdauer aufgrund eines bestimmten Prozesses gegeben ist, sondern unspezifische Wechselwirkungen vorherrschen, welche über die gesamten Zeitintervalle gleich verteilt sind.

Die markierten STAT5b Proteine binden nicht nur an den aktivierten EpoR, sondern können auch von anderen Rezeptoren aktiviert werden [140]. Daher ist eine Wechselwirkung mit anderen, wenn auch nicht aktivierten Rezeptoren nicht auszuschließen. Diese Wechselwirkungen könnten in den Aufnahmen der Bindung an den EpoR überlagert sein. Des weiteren ist es möglich, dass eine unspezifische Interaktion des Proteins mit der Zellmembran zu Signalen unterschiedlicher Zeiten führt, welche ebenfalls der gesuchten Bindung überlagert sind. Es ist auch keine Veränderung in der Bindungszeitenverteilung abhängig von der Stimulationsdauer zu sehen. Demnach ist mit dieser Analysevariante keine Bestimmung der Bindungsdauer von STAT5b an den EpoR möglich.

Um die Bindungen des STAT5b an den EpoR zu diskriminieren, ist eine Co-Markierung der beiden Proteine erforderlich. Werden Videos aufgenommen in denen die Markierungen gleichzeitig dargestellt sind, können ausschließlich die Wechselwirkungen in Betracht gezogen werden, bei denen eine Kolokalisation vorliegt.

Die aufgenommenen Videos lassen sich zusätzlich auf die STAT5b-Gesamtaktivität hin auswerten. Hierfür werden alle Bindungsereignisse in dem gewählten Bildausschnitt des

Videos summiert und auf die Fläche des Bildausschnitts normiert. Die durchschnittliche Frequenz der Ereignisse aufgetragen für die jeweiligen Stimulationszeiten zeigt die Bindungsaktivität von STAT5b an der apikalen Membran. Die höchste Aktivität liegt bei einer Stimulationszeit von 7,5 min vor, danach fällt sie ab um bei 60 min wieder die Frequenz des Anfangswert ohne Stimulation zu erreichen. Die Analyse der Videos von Zellen, die das STAT5b als nicht bindende Mutante exprimieren, zeigen zum Zeitpunkt der höchsten Aktivität für die funktionalen Proteine nur die gleiche Basisaktivität wie für nicht stimulierte Zellen. Die Bindungsaktivität ist abhängig von der Epo-Stimulationszeit, während sich die Bindungsdauer für unterschiedliche Stimulationszeiten nicht ändert. Die Begründung kann darin liegen, dass sich die Bindungsdauer nicht in Abhängigkeit von der Stimulation ändert, die On-Zeiten folglich gleich bleiben. Da die Aktivität aber steigt, erhöht sich entweder die Frequenz mit der STAT5b mit dem Rezeptor wechselwirkt, das bedeutet die Off-Zeiten werden kürzer oder es werden mehr Rezeptoren aus dem intrazellulären Pool an die Zellmembran rekrutiert. Becker et al konnten zeigen, dass die Menge an phosphorylierten EpoR von der Ligandenkonzentration und der Stimulationszeit abhängig ist [141]. Die höchste Phosphorylierung wurde für eine Stimulationszeit von 7,5 min bestimmt. Dies deckt sich sehr gut mit der in dieser Arbeit gefundenen höchsten Aktivität des Proteins bei 7,5 min.

### 3.7 Bildkorrelation der “Variable-Angel-TIRF” Aufnahmen – ImTIR-FCS

Werden die Parameter für die Aufnahme der Videos verändert und die Belichtungszeiten der Einzelbilder auf nur 5 ms zu reduziert, so ist es möglich über ImTIR-FCS [100, 142] Diffusionskoeffizienten des STAT5b zu analysieren. In den aufgenommenen Videos lässt sich nur etwa die Hälfte der 64 x 64 Pixel zur Auswertung nutzen, dennoch ist es damit unter den gegebenen Einstellungen möglich für ein Video 60 bis 90 Korrelationen zu erhalten. In den Analysen, die von J. Saranka (NU Singapore) durchgeführt wurden, wird ein Vorbleichen und eine Bleichkorrektur berücksichtigt. Diese Korrekturen sind aufgrund der hohen Anregungslaserintensität von 2 mW notwendig [143].

Es wurden Videos von Zellen unter vier verschiedenen Bedingungen aufgenommen. Zum einen NIH3T3 Zellen, die funktionales STAT5b-SNAP exprimierten. Von diesen wurde je ein Video ohne Epo Stimulierung und nach 5 min Stimulierung aufgenommen. Zum anderen von NIH3T3 Zellen, die das nicht bindende STAT5b-SNAP exprimierten. Auch hier wurde ein Video ohne Stimulierung und eines nach 5 min Stimulationszeit aufgenommen.

Die Diffusionskoeffizienten des funktionalen STAT5b ob mit ( $1,5 \pm 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) oder ohne ( $1,4 \pm 0,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) Stimulation sind nahezu gleich. Auch für die Deletions-Mutante ist der Unterschied für stimulierte ( $2,4 \pm 1,0 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) und nicht stimulierte ( $2,0 \pm 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) Zellen gering. Für beide Zellvarianten liegt der Diffusionskoeffizient über dem Bereich der für Diffusionen in der Membran gefunden wurden (Tabelle 3.1). Der große Fehler für die Diffusionskoeffizienten liegt womöglich daran, dass mehrere Komponenten zur Diffusion beitragen, gebundene und freie Proteine. Die Anpassung über das Modell für zweidimensionale Diffusion kann die Beiträge nicht unterscheiden. Die erhaltenen Diffusionswerte liegen zwischen der Diffusion im Zytosol und einer Diffusion von Transmembranproteinen. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten über diese Analyse könnten eine Mittelung dieser Werte widerspiegeln. Der Unterschied in der Diffusion zwischen dem funktionalen Protein und der Deletions-Mutante, die um 30 bis 40% schneller ist, liegt entsprechend daran, dass keine Bindung an Rezeptoren erfolgen kann.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem gegebenen Aufbau die Aufnahmen und Analysen von langsamen Diffusionsprozessen, wie sie in der Zellmembran vorkommen, möglich sind.

Auch hier würden schnellere Kameras, wie CMOS-Kameras, Untersuchungen schnellerer Prozesse ermöglichen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Die verschiedenen Modifikationen der Zelllinie und die Kultivierung der NIH3T3 Maus Fibroblasten

In dieser Arbeit werden verschiedene genetische Modifikationen des STAT5b Proteins in NIH3T3 Maus Fibroblasten verwendet. Zunächst wird das STAT5b mit mCherry fusioniert. Für weitere Experimente wird das funktionale Protein STAT5b und STAT5b, welches nicht am Rezeptor binden kann (STAT5b-del), mit dem SNAP26m fusioniert.

Die Plasmide und Zelllinien mit dem SNAP-Tag wurden von Susen Latterman in der Arbeitsgruppe von U. Klingmüller am DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg) konstruiert und freundlicherweise für eine Kooperation zur Verfügung gestellt.

#### Klonierung des Fusionsproteins STAT5b-mCherry

Im folgenden werden die nötigen Schritte für die Klonierung des Fusionsproteins STAT5b-mCherry und dessen stabile Transduktion in die NIH3T3 Maus Fibroblasten erläutert.

##### 4.1.1.1 Aufreinigung von Plasmid DNA

Plasmid DNA wird sowohl für kleine analytische als auch für große präparative Maßstäbe über *E. coli* Kulturen vervielfältigt. Für die hoch effiziente Transformation von Plasmid DNA, wird der chemisch kompetente *E. coli* Bakterienstamm Subcloning Efficiency™ DH5α™ Zellen (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Zur DNA-Isolierung im kleinen Maßstab, werden transformierte *E. coli* Zellen (4.1.1.4) von der Kulturplatte über Nacht (ü/N) bei 37°C in 1 - 5 ml LB Medium mit 100µg/ml Ampicillin inkubiert. Die Aufreinigung erfolgt über das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Vorgaben des Herstellers. Die Herstellung der Plasmid DNA im großen Maßstab erfolgt über 50 µl einer transformierte *E. coli* Kultur die in 200 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin für 16 – 18 Stunden bei 37°C inkubiert werden. Deren Aufreinigung wird mit dem JETSTAR 2.0 Maxi Kit (Genomed, Löhne, Deutschland) gemäß den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Die Konzentration der DNA Lösungen wird über die Absorption bei 260 nm am Absorptionsspektrometer (siehe 4.3.2) bestimmt.

#### 4.1.1.2 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenz wird überprüft durch den Sequenzierservice des Unternehmens MWG Biotech AG, Martinsried, Deutschland. Dafür wird 1 µg der DNA gelöst in ddH<sub>2</sub>O zur Verfügung gestellt.

#### 4.1.1.3 Vervielfältigung der DNA

Für die gezielte Vervielfältigung der DNA durch die PCR wird ein PTC-200 ThermoCycler (MJ Research, Quebec, Kanada) verwendet. Die Zyklenanzahl und –dauer sowie die Annealing-Temperatur werden entsprechend der zu erwartenden Produktlänge und den Primern gewählt. Die PCR wird in einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Die 50 µl Lösung beinhalten 50 ng DNA-Vorlage, 100 µM jeder dNTP (Life Technologies), 1 µM der Vorwärts- und Rückwärtsprimer, 10% DMSO, 2,5 Einheiten Cloned *PFU* DNA Polymerase (Stratagene) und den Puffer gemäß den Vorgaben des Herstellers,.

#### 4.1.1.4 Klonierung von DNA Fragmenten

Um spezifische DNA-Sequenzen zu erstellen, wird die Restriktion der DNA von Typ II Endonukleasen in einem Reaktionsvolumen von 20 µl, welches 0,5 – 1 µg Plasmid DNA, 5 Einheiten des Restriktionsenzym und 2 µl des 10fach Puffers nach den Vorgaben des Herstellers (New England Biolabs), durchgeführt. Die DNA Fragmente werden anschließend über ein 1%iges Agarosegel (Life Technologies) mit 100 ng/ml Ethidiumbromid aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Nach der Elution und Aufreinigung der DNA Fragmente mit dem Gel Extrahierungs-Kit Qiaex<sup>®</sup> II (Qiagen), wird der Vector und ein 2 – 3facher Überschuss der einzusetzenden DNA mit 1 µl der Quick T4 DNA Ligase (New England Biolabs) für 30 min bei Raumtemperatur ligiert und schließlich in kompetente DH5α *E. coli* Zellen transformiert. Für die Transformation werden 50 µl der kompetenten DH5α Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0,5 µg Plasmid DNA oder 5 µl des Ligationsansatzes versetzt und gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis werden die Zellen einem Hitzeschock (5 min bei 37°C) unterzogen und daraufhin wieder für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen in 1 ml LB Medium ohne Ampicillin aufgenommen und für 30 min bei 37°C gehalten.

Schließlich wird die *E. coli* Suspension abzentrifugiert, 900 µl des Überstands verworfen und die Zellen in dem Gesamtvolumen von 100 µl resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf eine TB Agarplatte gestrichen, welche ü/N bei 37°C inkubiert wird. Für die weitere Kultivierung in LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin werden einzelne Kolonien von der Platte ausgewählt.

#### 4.1.1.5 Konstruktion des Plasmids pMOWSIN-TRE-T-STAT5b-mCherry

Das Plasmid pMOWSIN-TRE-T-STAT5b-mCherry wird aus dem Plasmid pMOWSIN-TRE-T-STAT5b-eGFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Pfeifer und U. Klingmüller, DKFZ Heidelberg) erstellt. Das DNA Fragment mCherry (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Pfeifer und U. Klingmüller, DKFZ Heidelberg) wird mit den entsprechenden Primern mittels einer PCR vervielfältigt und anschließend wie auch der Vektor mit den Enzymen NdeI und PacI verdaut. Der Verdau des Plasmids und der DNA Fragments wird mit 1 µl der Quick T4 DNA Ligase ligiert.

#### 4.1.1.6 Transiente Transfektion der Phoenix eco Zellen

Die Kultivierung der Virus verpackenden Phoenix eco Zelllinie erfolgt mit DMEM, versetzt mit 10% fötalem Kälber Serum (engl. „foetal calf serum“ – FCS) und 1% Antibiotika (Penizillin 10000 U/ml und Streptomycin 10000 µg/ml – P/S). Die Selektion von stabil Gag-Pol-Env exprimierenden Phoenix eco Zellen wird über die Behandlung mit 2 µg/ml Diphtherie Toxin (Calbiochem) und 200 µg/ml Hygromycin B (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) gewährleistet. Die Phoenix eco Zellen werden mit TrypLE™ Express ohne Phenolrot (Gibco, life technologies) für 5 Minuten im Inkubator abgelöst 1:10 verdünnt, in einer 10 cm Kulturschale weiter kultiviert und nicht länger als 2 Wochen vor der Transfektion kultiviert.

Um den Virusüberstand für die darauf folgende Transduktion zu erzeugen, werden die Phoenix eco Zellen über die Kalzium-Phosphat Methode transfiziert. Die Transfektion erfolgt im kleinen Maßstab in 6-Kammer-Platten (Gibco).

Die Zellen werden 16 – 18 Stunden vor der Transfektion mit einer Dichte von  $8 \times 10^5$  Zellen pro Kammer gesetzt. Eine Mischung von 10 µg Plasmid DNA in Lösung und 12,5 µl  $\text{CaCl}_2$  (2,5 M) mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  auf 125 µl aufgefüllt werden unter vortexen zu 125 µl 2fach HBS (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,05) gegeben, um das Präzipitat zu erzeugen. Die Suspension wird zu den Zellen zugetropft. Für eine effiziente Aufnahme der

DNA werden die Zellen 6–8 Stunden in DMEM mit 25  $\mu$ M Chloroquin inkubiert. Anschließend wird das Medium durch IMDM mit 30% FCS, 1% P/S und 50  $\mu$ M  $\beta$ -Mercaptoethanol ersetzt. Nach 16–18 Stunden wird der Retrovirus enthaltende Überstand abgenommen und filtriert (0,45  $\mu$ m Filter (Millipore)). Der Überstand wird entweder direkt für die Transduktion benutzt oder kann bis zu 3 Monate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

#### 4.1.1.7 Retrovirale Transduktion

Um die NIH3T3 Maus Fibroblasten stabil zu transduzieren, werden 250  $\mu$ l des retroviralen Überstands mit 8  $\mu$ g/ml Polybrene versetzt, mit  $1 \times 10^5$  NIH3T3 Zellen gemischt und für 2 Stunden bei 340 g und  $37^{\circ}\text{C}$  in 2 ml Rundboden Mikrozentrifugen Röhren zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen für 48 Stunden im Standard-Medium kultiviert und schließlich mit 1,5  $\mu$ g/ml Puromycin als Selektionsantibiotika für das STAT5b-mCherry Plasmid weiter kultiviert.

#### Zellkultur der NIH3T3 Maus Fibroblasten

Die Zellen lagern in Kryoröhren mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml in 90% neugeborenen Kälber Serum (engl. "Newborne Calf Serum – NCS, (PAN-Biotech)) und 10% Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich) in Flüssigstickstoff in einem Kryotank. Zum Auftauen werden die Zellen in Kryolösung in 9 ml  $37^{\circ}\text{C}$  warmes DMEM (Gibco, life technologies) in ein 15 ml Röhren (Greiner Bio-One) suspendiert und mit einer Zentrifuge (Beckman Coulter Allegra X-12) für 5 min bei 1000 U/min (233 g) abzentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml DMEM + NCS (10%) resuspendiert, die Lösung in eine 10 cm Zellkulturschale (Greiner Bio-One) überführt und zur Kultivierung inkubiert. Alle Zellinkubationen finden bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 100% Luftfeuchtigkeit und 5%  $\text{CO}_2$  Atmosphäre statt. Je nach Zelllinie werden am nächsten Tag die entsprechenden Selektionsantibiotika (jeweils von PAA) hinzugegeben (Tab. 4.1).

Antibiotika	NIH3T3 Zelllinie mit den Plasmiden		
Puromycin	pMOWSIN-TRE-T-STAT5b-SNAP26m	pMOWSIN-TRE-T-del-STAT5b-SNAP26m	pMOWSIN-TRE-T-STAT5b-mCherry
G 418 Sulfat	pMOWS-HA-EpoR	pMOWS-HA-EpoR	pMOWS-HA-EpoR

**Tabelle 4.1:** Selektionsantibiotika für die Plasmide der entsprechenden Zelllinien.

#### 4.1.2.1 Kultivierung und Probenvorbereitung

Zur Zellkultivierung oder für die Probenvorbereitung werden die Zellen gesplittet. Hierfür werden die Zellen zunächst 1x mit 10 ml Phosphat Buffer Saline (PBS, Sigma-Aldrich) gewaschen, daraufhin mit 2 ml TrypLE™ Express ohne Phenolrot (Gibco, life technologies) für 5 Minuten im Inkubator von der 10 cm Kulturschale abgelöst. Anschließend wird durch Zugabe von 3 ml DMEM ohne Phenolrot (Biochrom) + NCS (10%) das TrypLE™ Express inhibiert, die Zellen werden homogen resuspendiert und mit einer Neubauer Zählkammer gezählt.

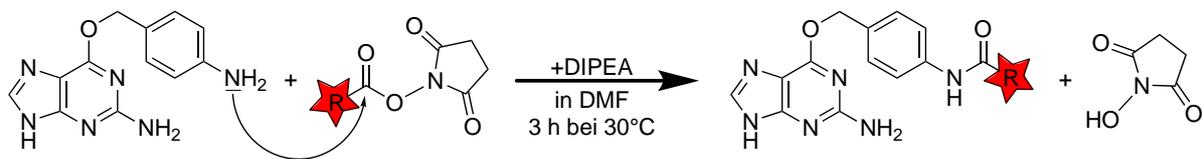
Für die Kultur der Zellen werden aus der Zellsuspension  $1 \times 10^5$  Zellen für 4 Tage und  $2 \times 10^5$  Zellen für 3 Tage Inkubation in eine 10 cm Schale gesetzt, auf 10 ml mit DMEM aufgefüllt und entsprechend Selektionsantibiotika (s. Tab. 4.1) zugegeben.

Für die Probenvorbereitung zu FCS- und DIFIM-Messungen werden, um eine geeignete Zelldichte zu erreichen,  $1 \times 10^4$  Zellen pro Kammer in eine  $\mu$ -Slide 8 well (ibidi) gesetzt. Die Kammern werden mit DMEM ohne Phenolrot und auf 200  $\mu$ l aufgefüllt. Zusätzlich wird dem Medium in einer bei den jeweiligen Experimenten aufgeführten Konzentration Doxyzyklin zur Expression des Fusionsproteins zugegeben. Zum Adhäreren werden die Zellen über Nacht inkubiert.

Die Probenvorbereitung für TIRF-Messungen erfolgen wie die zu den FCS- und DIFIM-Messungen, bis auf die Ausnahme, dass 8 Well Lab-Tek™ Kammerdeckgläser verwendet und aufgrund der geringeren Kulturoberfläche nur 7000 Zellen pro Kammer eingesetzt werden.

## 4.2 Kopplung der BG-Substrate

Die BG-Farbstoffsubstrate werden durch Umsetzung von O<sup>6</sup>-Benzylguanin-NH<sub>2</sub> (Covalys, Witterswill, Schweiz) mit Farbstoffen, aktiviert durch N-Hydroxy-Succinimid (NHS) an einer Carboxylgruppe, hergestellt. Die Farbstoffe werden bereits NHS-aktiviert vom Hersteller bezogen. Mechanistisch läuft die Reaktion nach dem S<sub>n</sub>2<sub>t</sub> ab, wobei das N-Hydroxy-succinimid durch einen nucleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des BG-NH<sub>2</sub> am Carboxyl-Sauerstoff substituiert wird (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1:** Der Reaktionsmechanismus (S<sub>n</sub>2<sub>t</sub>) des BG-NH<sub>2</sub> mit einem NHS-aktivierten Farbstoff (R).

Die Reaktion wird in DMF unter Zugabe der Hilfsbase Diisopropylethylamin (DIPEA) für ca. 3 Stunden im Schüttler unter Lichtausschluss bei 30°C durchgeführt. In einem Ansatz von 200 µl DMF wird das BG-NH<sub>2</sub> bei einer Konzentration von 1 mM vorgelegt, der Farbstoff wird im 1,2fachen Überschuss zugegeben und zum Schluss 0,1 µl DIPEA hinzugefügt.

Die Trennung des BG-Farbstoff Substrats von den nicht umgesetzten Reaktanden erfolgt über eine Reversed-Phase HPLC-Säule. Nach der Aufreinigung über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. „high performance liquid chromatography“ – HPLC) wird der BG-Farbstoff im Vakuum getrocknet, anschließend in DMF aufgenommen und die Konzentration mit einem Absorptionsspektrometer bestimmt. Die Ausbeuten der Kopplung lagen je nach Farbstoff zwischen 50 und 70%.

Folgende Substrate wurden gekoppelt:

BG-Substrat	Ausbeute	BG-Substrat	Ausbeute
BG-Atto550	67%	BG-Atto633	54%
BG-Atto620	62%	BG-Atto647N	65%
BG-AttoRho14	59%	BG-AttoOxa12	51%
BG-MR121	66%	BG-Atto700	69%

**Tabelle 4.2:** Auflistung aller gekoppelten BG-Substrate und deren Kopplungsausbeuten.

### Aufreinigung über die HPLC

Die Aufreinigung der BG-Substrate wird mit einer analytischen (Stoffmengen bis 5 nmol) HPLC-Anlage 1100 Series LC (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Zur Trennung wird eine HyperClone<sup>TM</sup> Reversed-Phase-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland) mit einer Länge von 250 mm und einem Innendurchmesser von 4,60 mm verwendet. Die Partikelgröße beträgt 5 µm und die Porengröße 120 Å.

Als Laufmittel wird eine 0,1 M Triethylammoniumacetat-Lösung (TEAA, pH 7,4, Laufmittel A) in Wasser und eine Lösung von 0,1 M TEAA in 25% Wasser und 75% Acetonitril (Laufmittel B), verwendet. Der Gradient verläuft linear von 100% A nach 100% B über eine halbe Stunde.

Während des Laufs werden die Absorptionen erstens bei 260 nm und zweitens bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximum des jeweils verwendeten Farbstoffs gemessen. Die Anregung der Emission erfolgt mit einer Wellenlänge kurz vor dem Absorptionsmaximum, während die Detektion auf das Emissionsmaximum gelegt wird.

### Bestimmung der Konzentration am Absorptionsspektrometer

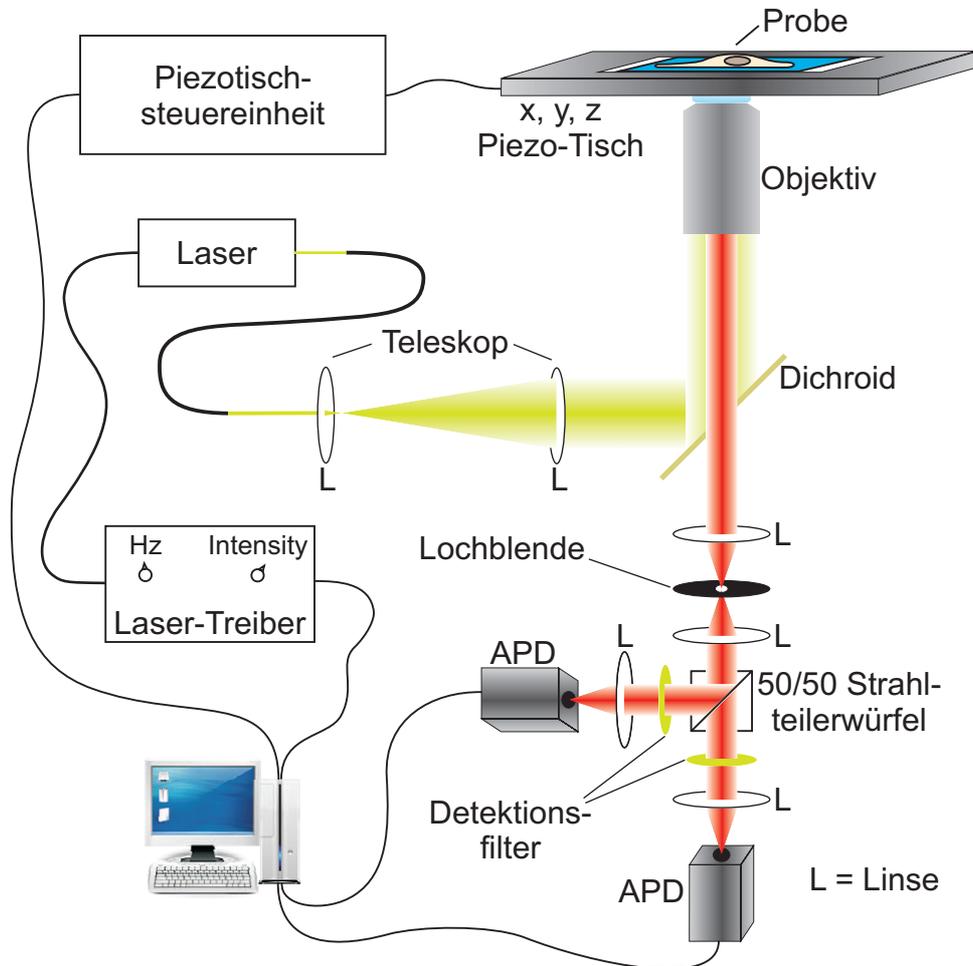
Für die Bestimmung der Absorption der gereinigten BG-Substrate wird ein Cary 500 Scan Absorptionsspektrometer (Varian, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Messung der Proben erfolgt in Suprasil-Quarzglas-Halbmikroküvetten (Hellma, Mühlheim, Deutschland). Ist der Extinktionskoeffizient bekannt, so kann über das Lambert-Beersche-Gesetz (vergl. Gleichung 2) die Konzentration  $c$  der gemessenen Probe bestimmt werden:

$$c = A/\epsilon \times d$$

Hier gibt  $A$  die Absorption, die direkt gemessen wird und  $d$  die Weglänge die das Anregungslicht in der Lösung innerhalb der Küvette zurücklegt, an.

### 4.3 Experimenteller Aufbau für die DIFIM-Messungen

Die DIFIM-Messungen wurden an einem eigenständig aufgebauten, konfokalen Aufbau durchgeführt. In Abbildung 4.2 sind die Hauptbestandteile skizziert.



**Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung des DIFIM Aufbaus.

Für die Anregung des FPs mCherry wurde als Lichtquelle ein kontinuierlich emittierender (engl. “continous wave” – cw) Diodenlaser (Cobolt Jive, Cobolt AB Solna, Schweden) mit der Wellenlänge von 561 nm und einer Ausgangsleistung von maximal 50 mW eingesetzt. Der Laserstrahl wird zunächst in eine Faser eingekoppelt. Nach dem Austreten aus der Faser wird der Strahl durch einen Anregungsfilter (560/DF40, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) geleitet, über ein sogenanntes Teleskop aufgeweitet und parallelisiert und anschließend über mehrere Spiegel in das Mikroskop (Axiovert S100 TV, Zeiss, Jena, Deutschland) eingekoppelt. Im Mikroskop wird das Anregungslaserlicht mit einem dichoritischen Spiegel (585 DRLP, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland) in das

Wasserimmersionsobjektiv (Plan-Apo, 60x, 1,2 NA, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) geleitet und über dieses in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht wird von demselben Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Spiegel vom Anregungslicht separiert. Durch eine Sammellinse wird das Fluoreszenzlicht auf eine Lochblende von 80  $\mu\text{m}$  Durchmesser fokussiert, so kann Streu- und Hintergrundlicht, das nicht aus der Fokusebene stammt, geblockt werden (Kapitel.3). Eine weitere Sammellinse kollimiert den Strahl, welcher auf einen 50/50 Strahlteilerwürfel (LINOS Photonics GmbH & Co. KG, Göttingen, Deutschland) trifft. Das so aufgeteilte Fluoreszenzlicht wird mit Linsen vor den APDs (SPCM-AQRH-14, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) auf ihre aktive Fläche von 180  $\mu\text{m}$  Durchmesser fokussiert. Zusätzlich befindet sich vor jeder APD noch ein Detektionsfilter (630/DF75, AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland). Das detektierte Fluoreszenzsignal wird an TCSPC-Karten (SPC-134, Becker&Hickl, Berlin, Deutschland) weitergeleitet. Diese verarbeiten das Signal im FIFO-Modus (engl. "First-in, First-out") und speichern die Informationen, zusammengesetzt aus Mikro- und Makrozeit und dem Detektionskanal.

Bei der Verwendung von gepulsten Lasern wird das Pulssignal des Laser-Treibers mit den TCSPC-Karten synchronisiert, so ist die Messung von Fluoreszenzlebensdauern und damit eine weitere Diskriminierung des Farbstoffes möglich.

Ein wesentlicher Bestandteil für die DIFIM-Messungen ist ein dreidimensional steuerbarer Probetisch. Der maximal abzutastende Bereich des Tisches beträgt 100 x 100 x 20  $\mu\text{m}$ . Er beinhaltet einen dreidimensional geschlossenen Piezo-Scanner P561.3CL (Physikal Instruments (PI), Karlsruhe, Deutschland) und wird zusammen mit einem Dreikanalverstärker E-502.00 und einer kapazitiven Sensor-Kontrolleinheit E509.C3A (jeweils PI) verwendet. Die Steuereinheit des Tisches ist über eine PCI-6713-Karte mit dem Computer verbunden. So kann die Bewegung des Tisches über das entsprechende Programm, welches zuvor in dieser Arbeitsgruppe von C. Roth und D.-P. Herten in LabView 7.0 (National Instruments, Deutschland) entwickelt wurde, mit den Signalen der TCSPC-Karten synchronisiert werden [128, 144].

Es besteht auch die Option an diesem Aufbau direkt mittels einer Hardware-Korrelator-Karte (ALV5000/E-Karte, ALV-Laser Vertrieb, Langen, Deutschland), die das Signal direkt korreliert, FCS-Messungen durchzuführen. Hierfür wird das Signal der APDs an die Karte weitergegeben. Sie verfügt über 2 Kanäle, welche die Detektion mit theoretischen Zählraten von 125 MHz ermöglicht. Durch die 2 Kanäle sind Auto- oder Kreuzkorrelationen realisierbar. Die Ansteuerung und Einstellungen der Karte erfolgt über die mitgelieferte Software (Version 1.4.9.2).

Am Mikroskop steht ein weiterer Ausgangs-Port zur Verfügung, an welchem eine CCD (engl. "Charge-Coupled-Device")-Kamera (Imager 3, Picostar, LaVision, Göttingen, Deutschland)

angebracht ist. So können zum einen Durchlichtbilder aufgenommen werden und zum anderen erlaubt die Anregung mit einer Quecksilberdampfampe (HBO 50 Short Arc Lamp, Osram, München, Deutschland) und dem Filtersatz ET Texas Red, mCherry (AHF Analystechnik, Tübingen, Deutschland) Weitfeldaufnahmen der fluoreszenzmarkierten Zellen. Angesteuert wird die CCD-Kamera mit der Software *DaVis 5.3.5*.

#### **4.4 Durchführung der FCS- und DIFIM-Messungen von Maus Fibroblasten die das Fusionsprotein STAT5b-mCherry exprimieren**

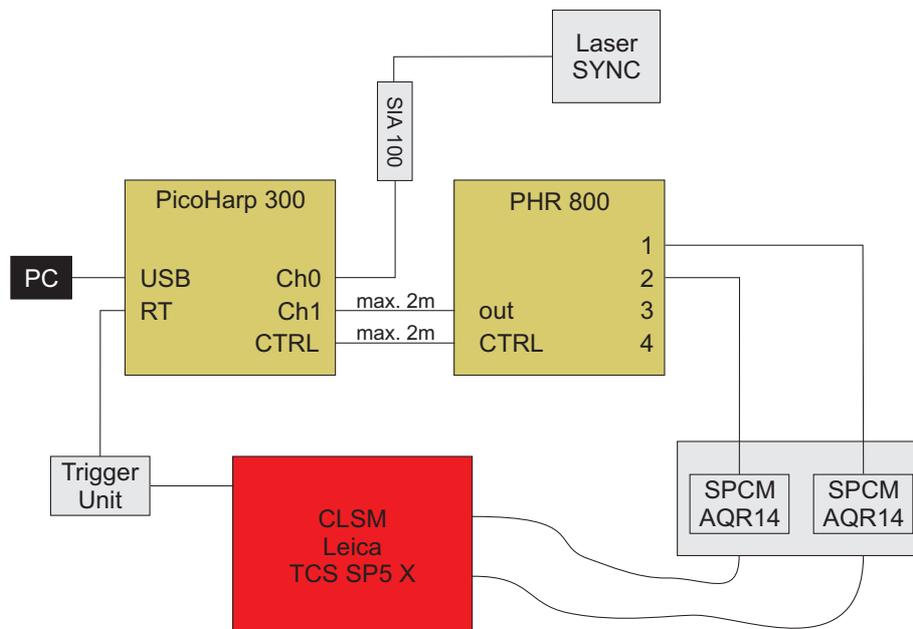
Die Zellen die über Nacht im Inkubator adhärirt sind und STAT5b-mCherry exprimiert haben werden vor den Messungen mit dem entsprechenden Medium gewaschen. Für die FCS-Messung sind die Zellen zunächst unbehandelt. Hierfür wird das Medium lediglich mit DMEM ohne Phenolrot + NCS und Zugabe von 25mM HEPES ausgetauscht. Vor der FCS-Messung wird mit der CCD Kamera sowohl eine Fluoreszenz- als auch eine Durchlichtaufnahme der Zelle gemacht. Die Belichtungszeiten werden entsprechend mit der Software *DaVis* eingestellt. Anschließend wird der Piezo-Tisch so verfahren, dass ein Bereich im zytosolischen Teil der Zelle im Laserfokus platziert ist. Der Laserfokus selbst ist in axialer Richtung so positioniert, dass er unmittelbar über der Probenrägeroberfläche liegt. Mit einem Graukeil Filterrad wird die Leistung des Lasers auf 100 $\mu$ W vor der Einkoppelung in das Objektiv eingestellt. Gemessen wird die Leistung mit einem Powermeter (Nova, Ophir-Spiricon, Ahrensburg, Deutschland) und einem angeschlossenen Photodiodensensor (PD300-3W, Ophir-Spiricon, Ahrensburg, Deutschland). In der Software für die Hardware-Korrelator-Karte wird die Korrelationszeit auf 1 min eingestellt. Die Datensätze für die aufgenommenen Korrelationen und die Intensitätsspuren werden in *Origin8.6G* (OriginLab, Northampton, USA) importiert und weiterverarbeitet. Die Anpassung der Korrelationskurven erfolgt mit unterschiedlichen Modellfunktionen (Kapitel 1.3 und 2.1.1).

Für die DIFIM-Messungen werden mit der CCD-Kamera eine Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahme vor und eine Fluoreszenzaufnahme nach dem Scan gemacht. Vor dem Scan wird die Laserleistung auf 100  $\mu$ W eingestellt und über das Okular die Zelle so in den Laserfokus platziert, dass die gescannte Region innerhalb der Zelle einen Teil des Zellkerns und des Zytosols und einen kleinen Bereich außerhalb der Zelle beinhaltet. Die Datenaufnahme und Einstellungen werden in dem in *LabView 7.0* geschriebenen Programm *DAQ-Linescann* vorgenommen. Es erstellt Fluoreszenzintensitätsaufnahmen und zeichnet die Fluoreszenzintensitätsspuren der einzelnen Pixel auf. In dem Programm lassen sich die

Distanzen, die der Piezo-Tisch in diskreten Schritten abrastert, festlegen. Typischerweise werden Schrittweiten von 50 – 100 nm gewählt. Weiterhin lassen sich die Länge und Breite der Region und auch die Verweildauer pro Pixel einstellen. Die gesamte zu scannende Region sollte eine Pixelanzahl von 5000 nicht überschreiten, da sonst die gesamte Aufnahmezeit bei Verweildauern bis zu 100 ms pro Pixel zu lange wäre. Die Auswertung wird mit dem Programm ANALinescan durchgeführt. In dieser Auswertung werden die in DAQLinscan aufgenommenen Intensitätsspuren analysiert. Es ermöglicht die Korrelation jeder Spur der einzelnen Pixel. Für die Korrelation wird ein 2D Diffusionsmodell angenommen. Es verringert den Rechenaufwand erheblich und gibt in erster Näherung einen Wert für die Diffusionszeit an, mit dem es möglich ist relative Unterschiede innerhalb eines Scans zu zeigen. Zusätzlich zu der Diffusionskarte, die für jeden Pixel eine Diffusionszeit angibt, werden entsprechend Karten für die Amplitude der Korrelation und für das reduzierte  $\chi^2$  erzeugt.

#### 4.5 Experimenteller Aufbau für die FCS-Messungen

Für die FCS-Messungen an den mit dem SNAP-Tag fusionierten Zellen wurde ein modifiziertes Leica TCS SP5 X Mikroskop (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) verwendet. In Abbildung 4.3 ist der prinzipielle Aufbau des FCS Erweiterungsset an das Mikroskop skizziert.



**Abbildung 4.3:** Die schematische Darstellung des Kompakt FLIM und FCS Erweiterungsset für konfokale Laser-Scanning Mikroskope von PicoQuant, implementiert in ein TCS SP5 X von Leica.

Das Laser-Scanning Mikroskop ist mit einem 80 MHz gepulsten Weißlicht-Laser ( WLL, SuperK Extreme, Koheras, Dänemark) als Anregungsquelle versehen, die es ermöglicht im Wellenlängenbereich von 471 bis 670 nm auf Nanometer-Genauigkeit Fluoreszenzproben anzuregen. Grundlegend entspricht der Aufbau dem eines Standard CLSM (Kapitel 1.3). Eine Ausnahme ist die Nutzung eines akusto-optischen Filter (engl. „Acousto-Optical Tunable Filter“ – AOTF), über welchen die Anregungswellenlänge gewählt wird. Er ist kontinuierlich abstimmbar und kann gleichzeitig die Laserintensität regulieren [145]. Eine weitere Modifikation besteht in dem LSM-Upgrade Kit der Firma PicoQuant, Berlin. Die Implementierung dieses Kits ermöglicht es, mit diesem Mikroskop zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (TCSPC) [146] durchzuführen. Dafür wurde das System mit einem 4-Kanal Detektor Router PHR 800 (PicoQuant) zur Signalkorrelation von bis zu vier APDs, der TCSPC-Einheit PicoHarp 300 (PicoQuant), einem Puls-Inverter „SIA100“ (PicoQuant) um das SYNC Signal des WLL weiterzugeben und zwei APDs (SPCM-AQR-14; Perkin Elmer) erweitert. Über die Software SymphoTime wurden die Daten erfasst, korreliert und die Korrelationen angepasst.

#### **4.6 Datenerfassung der SNAP-Tag modifizierten Maus Fibroblasten am TCS SP5 X**

Die über Nacht adhärenierten Zellen werden mit einer 50 nM Lösung von TMR-Star in DMEM ohne Phenolrot + NCS für 10 Minuten im Inkubator gefärbt. Je nach Messreihe wird mit den Zellen weiter verfahren. Die unbehandelten Zellen werden 3-4 mal mit Serum enthaltendem DMEM ohne Phenolrot für jeweils eine Stunde im Inkubator gewaschen. Gehungerte Zellen werden stattdessen 3-4 mal mit Serum freiem DMEM ohne Phenolrot für jeweils eine Stunde im Inkubator gewaschen. Die mit Epo aktivierten Zellen werden zunächst wie die gehungerten behandelt und anschließend noch 30 Minuten mit 20U/ml Epo im Inkubator stimuliert. Für alle verschieden vorbereiteten Zellen wird nach dem letzten Waschschrift 25 mM HEPES zum entsprechenden Inkubationsmedium zugegeben.

Die Zellen werden unmittelbar vor den Messungen aus dem Inkubator auf das Mikroskop gelegt und können dann ohne Wärmekammer für maximal 1 h beobachtet werden. Zuvor wird am Objektiv (Leica HCX PL APO 63x 1,2 W wRR CS) der Korrekturring eingestellt. Für Aufnahmen mit den PMTs wird in der Leica Software (Leica Application Suite Advanced Fluorescence – LAS AF) der entsprechende Detektions-Port eingestellt. Bei den Aufnahmen mit APDs wird das Emissionssignal am Mikroskop auf einen zusätzlichen Ausgang (X1) geleitet, an welchem das Signal mit einem eigens dafür gefertigten Filterwürfel 50:50, bzw. mit einem dichroitischen Spiegel (640/DCXR) spektral geteilt wird. Im Filterwürfel lassen sich Filter einsetzen. Für die Detektion der Emission von TMR-Star werden 582 DF/70

Bandpassfilter verwendet. Nach dem Filterwürfel wird das Signal in Glasfaserkabel eingekoppelt und auf zwei APDs fokussiert. Für die Aufnahme wird zunächst die Laserintensität am WLL selbst auf 70% reduziert, um störende Rückreflexionen zu vermeiden, die bei 100% Leistung auftreten.

Die Aufnahmen der NIH3T3 Zellen die das Fusionsprotein STAT5b-SNAP exprimieren und mit verschiedenen BG-Substraten gefärbt sind, werden von einem PMT detektiert. Bei BG-Atto633 (Kapitel 2.2) wird die Anregungswellenlänge auf 633 nm gesetzt. Die Laserintensität in der Software auf 20% eingestellt und das Detektionsfenster des PMT auf 655 – 745 nm mit einer Verstärkung von 800 V. Die Einstellungen für die Aufnahmen der weiteren BG-Substrate werden bei den jeweiligen Abbildungen in Kapitel 6.1 aufgeführt. Für die Abbildungen und FCS-Messungen der mit TMR-Star markierten NIH3T3 STAT5b-SNAP Zellen wird in der LAS AF Software die Intensität auf 20% bei der Anregungswellenlänge von 532 nm eingestellt. Weiterhin lässt sich in der Software die Lochblende einstellen. Sie wurde auf 0,75 Airy gesetzt, was 89  $\mu\text{m}$  entspricht. Für die Abbildungen wird sowohl für die PMTs als auch die APDs eine Frequenz von 100 Hz und eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel gewählt. Die FCS-Messungen werden realisiert indem in der Mikroskopsoftware die Zelle zunächst in y-z-Richtung gescannt und in diesem Scan ein Bleichpunkt (engl. „Bleachpoint“) gesetzt wird. So bleibt der Laserfokus für die FCS-Messung fixiert. Die FCS-Messung wird durchgeführt indem mit der LAS AF die Bleich-Messung gestartet und direkt anschließend mit der SymphoTime Software für 60 Sekunden die Intensitätsspur aufgenommen wird. Dies wird in derselben Zelle jeweils im Zytosol und im Zellkern ausgeführt.

Mit den für die FCS-Messung vorgenommenen Einstellungen wird mittels eines Farbstoffes mit bekanntem Diffusionskoeffizienten, welcher im Wellenlängenbereich der durchgeführten Messungen liegt, eine Konzentrationsreihe zur Kalibrierung des Detektionsvolumens erstellt. In diesem Fall wird die Kalibration mit dem Farbstoff Alexa 546 (in Dimethylformamid (DMF) gelöst) durchgeführt. Der Farbstoff wird mit PBS auf einen Konzentrationsbereich verdünnt, der zwischen 0,5 – 50 nM liegt. Mit bekanntem Diffusionskoeffizienten kann über die Gleichungen 12 und 13 die radiale Ausdehnung  $\omega_0$  und der Strukturparameter  $k$  bestimmt werden. Bei der Verwendung des Diffusionskoeffizienten von  $D = 341 \mu\text{m}^2/\text{s}$  für Alexa 546 [147] liegt die radiale Ausdehnung bei  $237 \pm 6,4 \mu\text{m}$  und der Strukturparametern  $k$  beträgt  $5,11 \pm 0,41$ .

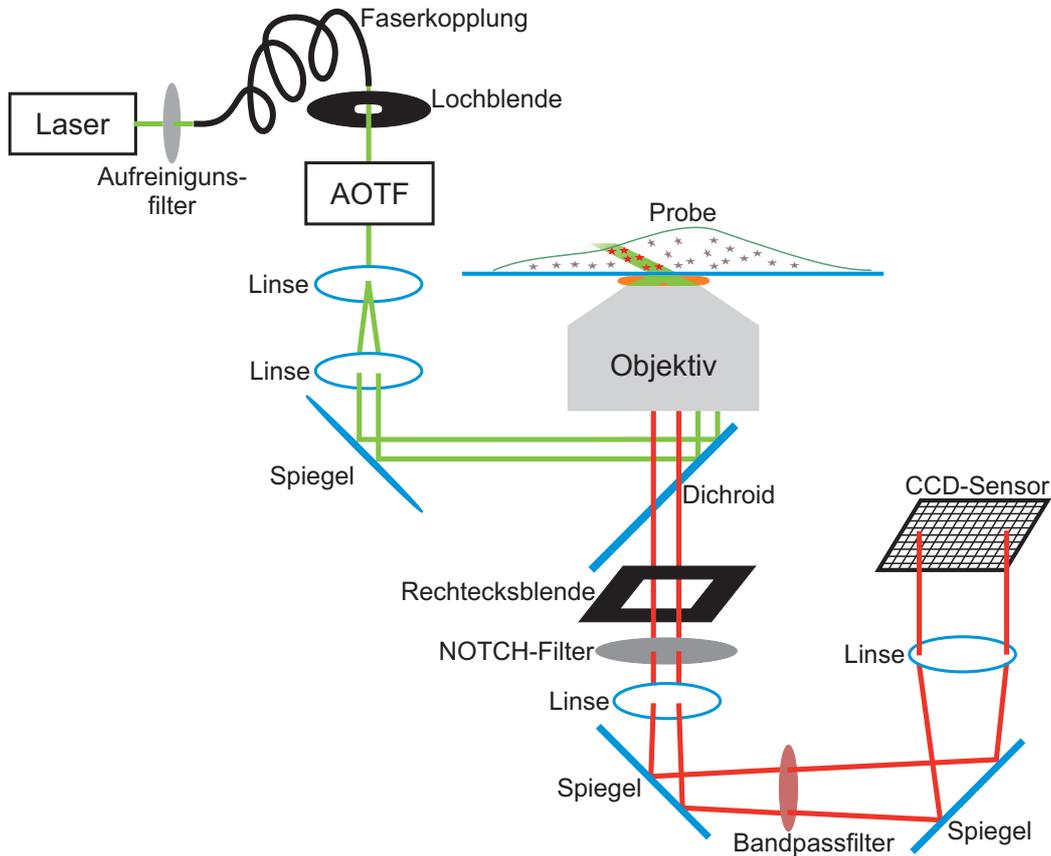
#### **4.7 Die Aufnahmen des Synaptophysins am TCS SP5 X**

Die Aufnahmen des Synaptophysins in der Calyx von Axonen innerhalb eines fixierten Hirnschnitts einer Maus werden am Leica TCS SP5 X Mikroskop durchgeführt. Synaptophysin ist ein Protein in Vesikeln innerhalb der Calyx von Neuronen. Es ist das am häufigsten vorkommende Protein in synaptischen Vesikeln, ist für ihre Biogenese erforderlich und kann an Cholesterol binden [148]. Das Synaptophysin ist mit dem FP eGFP und dem SNAP-Tag fusioniert. Der SNAP-Tag wird mit BG-Atto700 markiert, welcher zu den Farbstoffen gehört, die aufgrund des Guanin stark gelöscht werden [149]. Außerdem liegt er spektral weit entfernt vom eGFP. So entsteht bei gleichzeitiger Aufnahme keine Überlappung der Spektren. Die Markierung der fixierten und anschließend in Mowiol eingebetteten Schnitte wurde von Christian Kempf in der Arbeitsgruppe von T. Kuner am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Heidelberg mit dem im Rahmen dieser Arbeit gekoppelten Farbstoff BG-Atto700 durchgeführt.

Das eGFP wird mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Laserleistung wird über die Benutzeroberfläche der Software auf 10% gesetzt. Mit dem PMT wird die Emission in einem Fenster von 500 – 580 nm bei einer Verstärkung von 900 V detektiert. Gleichzeitig wird Atto700 mit einer Wellenlänge von 670 nm und einer Laserleistung von 30% angeregt. Die Detektion findet in einem Fenster von 715 – 800 nm bei einer Verstärkung von 800V statt.

#### 4.8 Experimenteller Aufbau für die „VA“-TIRF- Messungen

Der TIRF Aufbau, der in dieser Arbeit verwendet wird, wurde zuvor in dieser Gruppe eigenständig aufgebaut und ist vereinfacht in Abbildung 4.4 skizziert.



**Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung des eigenständig aufgebauten TIRF Mikroskops.

Durch den eigenständigen Aufbau ist es möglich die erforderlichen Modifikationen für die „VA-TIRFM“ Methode einfach durchzuführen. Zunächst wird der grüne 532 nm Anregungslaser (World Star Tech TECGL-30, Toronto, Kanada, 30mW Dauerstrich) mittels eines Aufreinigungsfilter (engl. „clean-up“ Filter z 532/10, AHF Analystechnik) von unerwünschten Nebenlinien befreit. Weitere Laserlinien, die in dem Aufbau eingebaut sind, werden der Einfachheit halber nicht aufgeführt. Nach dem Aufreinigungsfilter wird der Laser über eine Glasfaser in einen AOTF (AOTF.nC-VIS, AA Optoelectronic, Orsay Cedex, Frankreich) gekoppelt. Die Lochblende vor dem AOTF reguliert den Strahl, damit der AOTF nicht überstrahlt wird. Über eine externe Steuerung lässt sich der AOTF so einstellen, dass nur Licht der gewünschten Wellenlänge und Intensität transmittiert wird. Für die Einkopplung in

das inverse Mikroskop (Zeiss, Axiovert 200M) wird der Laserstrahl mit zwei Linsen auf den gewünschten Durchmesser aufgeweitet und mit drei Spiegeln über den dichroitischen Spiegel (Dual Line BeamSplitter z 532/633, AHF), der Licht mit der Wellenlänge von 532 und 633 nm reflektiert, in das Objektiv (Nikon NA=1,49, CFI Apochromat TIRF 100x Öl) eingekoppelt. Das verwendete Immersionsöl (Nikon) hat einen Brechungsindex von  $n=1,515$ . Der letzte Spiegel vor dem dichroitischen Spiegel lässt sich über eine Mikrometerschraube parallel verschieben, so ist es möglich den Einfallswinkel, mit dem das Anregungslicht auf die Probe trifft, zu verändern. Zwischen Weitfeld- und TIRF-Modus ist die Einkopplung stufenlos regulierbar. Entsprechend wird für die „VA“-TIRF Messungen der Spiegel so justiert, dass der Einfallswinkel wenig unter dem kritischen Winkel für TIRF (siehe Abschnitt 1.3 und Abbildung 1.11) liegt.

Das Stokes-verschobene Fluoreszenzlicht (siehe Abschnitt 1.3) der angeregten Probe wird über dasselbe Objektiv gesammelt und passiert den dichroitischen Spiegel verlustfrei. Durch das Mikroskop wird die Objektebene auf die Bildebene projiziert, in welcher sich die Rechtecksblende befindet. Anschließend wird mit Hilfe eines Notch-Filters (Triple-Notch Filter 488/532/633-640nm, AHF) unerwünschtes Streulicht des Anregungslasers – durch Reflektionen innerhalb des Mikroskops – geblockt. Mittels eines Teleskops, bestehend aus zwei Linsen, welche die Bildebene vergrößern, wird diese auf dem Sensor abgebildet. Um unspezifisches Licht wie Hintergrund-Fluoreszenz oder Wärmestrahlung auszuschließen, wird zwischen den Linsen des Teleskops ein Bandpass Filter (Sperrfilter HQ 585/60, AHF) mit einer schmalen Bandbreite, speziell auf den verwendeten Farbstoff TMR-Star (New England Biolabs) abgestimmt, eingesetzt.

Die Detektion erfolgt mittels einer CCD-Kamera mit 512 x 512 Pixeln (Andor iXon<sup>EM</sup> + 897 CCD, Andor, Dublin), deren Sensitivität durch die Sensortechnik der rückbeleuchteten Pixel erhöht wird. Zusätzlich lässt sich das Signal einzelner Photonen mit einer Elektronenvervielfachung verstärken.

#### 4.9 Durchführung der Messungen am TIRF

Für die Aufnahme der Videos von lebenden Zellen wird der TIRF Aufbau folgendermaßen eingestellt:

Der grüne Anregungslaser mit der Wellenlänge 532 nm wird über den AOTF (siehe 4.8) gesteuert. Dieser wird über eine in Lab View geschriebenen Software am Rechner gesteuert. So wird die Anregungsleistung direkt vor der Einkopplung in das Mikroskop auf 500  $\mu\text{W}$  eingestellt. Das entspricht bei der gegebenen Ausleuchtung der Probe einer Leistung von ca. 30  $\text{W}/\text{cm}^2$ . In der Kamera Software Andor Solis werden folgende Einstellungen vorgenommen, der CCD-Chip wird auf  $-85^\circ\text{C}$  gekühlt, der Gain auf 300 eingestellt. Im Modus Kinetik wird der Frametransfer aktiviert und es werden 1000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 50ms aufgenommen. Die im Lab-Tek vorbereiteten Zellen werden auf den Probentisch gesetzt und über das Okular eine Region mit mehreren Zellen in der Kammer gesucht. Vor der Aufnahme wird über das live Bild der Kamera anhand einer stark fluoreszierenden Zelle die Einkopplung des Lasers eingestellt. Dies erfolgt mittels der Mikrometerschraube, mit der sich der Spiegel zur Einkopplung in das Objektiv verschieben lässt. Gleichzeitig wird das Objektiv nachgefahren, um den Z-Fokus richtig einzustellen. Die Justage wird so lange durchgeführt bis das bestmögliche Signal zu Rausch Verhältnis erzielt wird. Müssen die Zellen noch stimuliert werden ist es wichtig die Abdeckung der Lab Tek Kammern zu entfernen bevor eine geeignete Zelle zum messen gesucht wird, da beim Abnehmen der Abdeckung das Lab-Tek verrutschen kann. Auch bei der Zugabe von Epo in das Medium darf die Kammer nicht berührt werden, da sie sonst verrutscht. Sobald eine geeignete Zelle gefunden wurde, wird der Laser bis kurz vor Start der Messung abgeschaltet und jeweils nur zur Aufnahme nach den gegebenen Stimulationszeiten wieder eingeschaltet. Gegebenenfalls wird dann der Fokus noch einmal nachjustiert. Für Stimulationszeiten über 10 min bleibt das Lab-Tek bis kurz vor der Messung im Inkubator.

Für die Aufnahmen mit den die Diffusion der STAT5b Proteine im Bereich der apikalen Zellmembran über ImTIR-FCS bestimmt werden sollen, müssen folgende Parameter verändert werden:

Die Anregungsleistung wird auf 2 mW vor der Einkopplung in das Mikroskop eingestellt. Entsprechend beträgt die Leistung 120  $\text{W}/\text{cm}^2$ . Im Modus Kinetik ist weiterhin der Frametransfer aktiviert, aber es werden 5000 Bilder mit einer Belichtungszeit von 5 ms pro Bild aufgenommen.

#### 4.10 Auswertung der TIRFM Aufnahmen

Die Aufnahmen werden mit einem Programm, das dafür von meinem Kollegen Anton Kurz in MatLab (Version 7.10. R2010a, MathWorks, Ismaning, Deutschland) geschrieben wurde, ausgewertet. In dem Programm wird zunächst ein Algorithmus der die Intensitätsmaxima innerhalb der einzelnen Bilder herausfiltert ("PeakFinder" [150], angepasst für MatLab von D. Blair und E Dufresne[151]) auf die gesamte Aufnahmeserie angewandt. In dem Algorithmus wird ein Grenzwert eingegeben, der die Sensitivität bestimmt, mit dem der Filter die Intensitätsspitzen auswählt. Um zu gewährleisten, dass der richtige Grenzwert gewählt wurde, werden in der Analyse von jeder Aufnahmeserie Videos erzeugt, in welchen jeder ausgewählte Punkt gekennzeichnet ist. Aus den Aufnahmeserien wird zufällig eine kurze Abfolge von Einzelbildern mit denen der Analyse verglichen und visuell geprüft ob die Intensitätsmaxima übereinstimmen. Wenn nicht, wird ein anderer Grenzwert gesetzt und die Analyse neu gestartet. Jedes Intensitätsmaximum ist ein mit TMR-Star markiertes STAT5b Protein. Ihnen wird in jedem Bild ihre Ausdehnung und Position zugeordnet. Im weiteren wird verfolgt in wie viel aufeinander folgenden Bilder das jeweilige Protein an der selben Position verbleibt. Dies gibt das Zeitintervall des Ereignisses (einer Wechselwirkung mit der Membran oder die Bindung des Proteins an Rezeptoren wie beispielsweise EpoR) wieder. Verschiebt sich das Maximum im folgenden Bild um weniger als 4 Pixel, sowohl in x- als auch in y-Richtung, wird es als dasselbe definiert. Anschließend wird die Anzahl der Ereignisse für das jeweilige Zeitintervall gegen die Zeit aufgetragen. Da für lange Zeitintervalle für einige Zeitpunkte keine Ereignisse erfolgten wird eine Wahrscheinlichkeitsdichte über alle Ereignisdauern berechnet. Um eine Bindungskinetik berechnen zu können, wird die Anzahl der normierten Wahrscheinlichkeitsdichten gegen die Zeit aufgetragen. Für die Darstellung der Aktivität wird die Anzahl aller Ereignisse der gesamten Aufnahme innerhalb einer ausgewählten Region auf die Pixelanzahl der Region normiert und gegen die für diese Aufnahme vorgenommene Stimulationszeit aufgetragen.

---

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hanahan, D. and R.a. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
2. Rolf, M., G. Annette, and L. Anita, *Hämatologie*. 2. ed. 2004, Weinheim: Wiley-VCH.
3. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen*. 31. ed. 2011: Springer-Lehrbuch.
4. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed. 2002, New York: Garland Science.
5. Rawlings, J.S., et al., *The JAK / STAT signaling pathway The JAK / STAT Signaling Pathway*. Journal of Cell Science, 2004. **1**: p. 1281-1283.
6. Schindler, C., et al., *Interferon-Dependent Tyrosine Phosphorylation of a Latent Cytoplasmic Transcription Factor*. Science, 1992. **257**(5071): p. 809-813.
7. Aaronson, D.S. and C.M. Horvath, *A road map for those who don't know JAK-STAT*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1653-1655.
8. Levy, D.E. and J.E. Darnell, *STATs: Transcriptional control and biological impact*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(9): p. 651-662.
9. Horvath, C.M., *STAT proteins and transcriptional responses to extracellular signals*. Trends in biochemical sciences, 2000. **25**(10): p. 496-502.
10. Xu, X.A., Y.L. Sun, and T. Hoey, *Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain*. Science, 1996. **273**(5276): p. 794-797.
11. Mattaj, I.W. and L. Englmeier, *Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**: p. 265-306.
12. Reich, N.C. and L. Liu, *Tracking STAT nuclear traffic*. Nature reviews. Immunology, 2006. **6**(8): p. 602-12.
13. Zeng, R., et al., *Stat5B shuttles between cytoplasm and nucleus in a cytokine-dependent and -independent manner*. Journal of Immunology, 2002. **168**(9): p. 4567-4575.
14. Baker, S.J., S.G. Rane, and E.P. Reddy, *Hematopoietic cytokine receptor signaling*. Oncogene, 2007. **26**(47): p. 6724-6737.
15. Saharinen, P. and O. Silvennoinen, *The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-*

- inducible activation of signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(49): p. 47954-47963.
16. Saharinen, P., M. Vihinen, and I. Silvennoinen, *Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain*. Molecular Biology of the Cell, 2003. **14**(4): p. 1448-1459.
  17. Higgins, D.G., J.D. Thompson, and T.J. Gibson, *Using CLUSTAL for multiple sequence alignments*. Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis, 1996. **266**: p. 383-402.
  18. Radtke, S., et al., *The Jak1 SH2 domain does not fulfill a classical SH2 function in Jak/STAT signaling but plays a structural role for receptor interaction and up-regulation of receptor surface expression*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(27): p. 25760-25768.
  19. Pellegrini, S. and I. DusanterFourt, *The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs)*. European Journal of Biochemistry, 1997. **248**(3): p. 615-633.
  20. Haan, S., et al., *Dual role of the Jak1 FERM and kinase domains in cytokine receptor binding and in stimulation-dependent Jak activation*. Journal of Immunology, 2008. **180**(2): p. 998-1007.
  21. Chen, X.M., et al., *Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA*. Cell, 1998. **93**(5): p. 827-839.
  22. Kisseleva, T., et al., *Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges*. Gene, 2002. **285**(1-2): p. 1-24.
  23. Darnell Jr, J.E., *STATs and Gene Regulation*. Science, 1997. **277**(5332): p. 1630-1635.
  24. Schindler, C. and J.E. Darnell, *Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands - The JAK-STAT Pathway*. Annual Review of Biochemistry, 1995. **64**: p. 621-651.
  25. Khwaja, A., *The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy*. British Journal of Haematology, 2006. **134**(4): p. 366-384.
  26. Weissman, I.L., *Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution*. Cell, 2000. **100**(1): p. 157-168.
  27. Orkin, S.H. and L.I. Zon, *Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology*. Cell, 2008. **132**(4): p. 631-44.
  28. Wu, H., et al., *Generation of Committed Erythroid BFU-E and CFU-E Progenitors does not Require Erythropoietin or the Erythropoietin Receptor*. Cell, 1995. **83**(1): p. 59-67.

29. Hoffman, R., et al., *Hematology, Basic Principles and Practice*. 2 ed. 1995, New York: Churchill Livingstone.
30. Gregory, C. and A. Eaves, *Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses*. *Blood*, 1977. **49**(6): p. 855-864.
31. Klingmuller, U., *The role of tyrosine phosphorylation in proliferation and maturation of erythroid progenitor cells - Signals emanating from the erythropoietin receptor*. *European Journal of Biochemistry*, 1997. **249**(3): p. 637-647.
32. Richmond, T.D., M. Chohan, and D.L. Barber, *Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin*. *Trends in Cell Biology*, 2005. **15**(3): p. 146-155.
33. Krantz, S.B., *Erythropoietin*. *Blood*, 1991. **77**(3): p. 419-434.
34. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene*. *Blood*, 1999. **94**(6): p. 1864-1877.
35. Dandrea, A.D., H.F. Lodish, and G.G. Wong, *Expression Cloning fo the Murine Erythropoietin Receptor*. *Cell*, 1989. **57**(2): p. 277-285.
36. Barry, S.C., et al., *Roles of the N and C terminal domains of the interleukin-3 receptor alpha chain in receptor function*. *Blood*, 1997. **89**(3): p. 842-852.
37. Bazan, J.F., *Structural Design and Milecular Evolution fo a Cytokine Receptor Superfamily*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(18): p. 6934-6938.
38. Cosman, D., et al., *A new Cytokine Receptor Superfamily*. *Trends in biochemical sciences*, 1990. **15**(7): p. 265-270.
39. Huang, L.J.S., S.N. Constantinescu, and H.F. Lodish, *The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor*. *Molecular Cell*, 2001. **8**(6): p. 1327-1338.
40. Delachapelle, A., A.L. Traskelin, and E. Juvonen, *Truncated Erythropoietin Receptor Causes Dominantly Inherited Benign Human Erythrocytosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. **90**(10): p. 4495-4499.
41. Kralovics, R., et al., *A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders*. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(17): p. 1779-1790.
42. Neubauer, H., et al., *Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis*. *Cell*, 1998. **93**(3): p. 397-409.

43. Feng, J., et al., *Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y-1007 in the kinase activation loop*. *Molecular and Cellular Biology*, 1997. **17**(5): p. 2497-2501.
44. Klingmuller, U., et al., *Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(16): p. 8324-8328.
45. Matsumoto, A., et al., *CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation*. *Blood*, 1997. **89**(9): p. 3148-3154.
46. Menon, M.P., et al., *Signals for stress erythropoiesis are integrated via an erythropoietin receptor-phosphotyrosine-343-Stat5 axis*. *Journal of Clinical Investigation*, 2006. **116**(3): p. 683-694.
47. Silva, M., et al., *Erythropoietin can induce the expression of Bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. **274**(32): p. 22165-22169.
48. Socolovsky, M., et al., *Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice: A direct role for Stat5 in Bcl-X-L induction*. *Cell*, 1999. **98**(2): p. 181-191.
49. Garcon, L., et al., *Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells*. *Blood*, 2006. **108**(5): p. 1551-1554.
50. Socolovsky, M., et al., *Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3261-3273.
51. Cui, Y., et al., *Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2004. **24**(18): p. 8037-8047.
52. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. *Nature*, 2005. **438**(7068): p. 685-689.
53. Baron, U. and H. Bujard, *Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances*. *Applications of Chimeric Genes and Hybrid Proteins Pt B*, 2000. **327**: p. 401-421.
54. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight Control of Gene-Expression in Mammalian-Cells by Tetracyclin-Responsive Promoters*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992. **89**(12): p. 5547-5551.
55. Gossen, M., et al., *Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian-Cells*. *Science*, 1995. **268**(5218): p. 1766-1769.

56. Urlinger, S., et al., *Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: Novel mutations yield expanded range and sensitivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(14): p. 7963-7968.
57. Michalet, X., et al., *Microscopies and Spectroscopies*. Review Literature And Arts Of The Americas, 2003.
58. Giepmans, B.N.G., *The Fluorescent Toolbox for Assessing Protein Location and Function*. Science, 2006. **312**(5771): p. 217-224.
59. Alivisatos, A.P., *Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots*. Science, 1996. **271**(5251): p. 933-937.
60. Michalet, X., et al., *Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
61. Lord, S.J., H.L.D. Lee, and W.E. Moerner, *Single-Molecule Spectroscopy and Imaging of Biomolecules in Living Cells*. Analytical chemistry, 2010. **82**(6): p. 2192-2203.
62. Derfus, A.M., W.C.W. Chan, and S.N. Bhatia, *Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots*. Nano Letters, 2004. **4**(1): p. 11-18.
63. Hoshino, A., S. Hanada, and K. Yamamoto, *Toxicity of nanocrystal quantum dots: the relevance of surface modifications*. Archives of Toxicology, 2011. **85**(7): p. 707-720.
64. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annual Review of Biochemistry, 1998. **67**: p. 509-544.
65. Chalfie, M., et al., *Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene-Expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-805.
66. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nature Methods, 2005. **2**(12): p. 905-909.
67. Seefeldt, B., et al., *Fluorescent proteins for single-molecule fluorescence applications*. Journal of biophotonics, 2008. **1**(1): p. 74-82.
68. Jing, C.R. and V.W. Cornish, *Chemical Tags for Labeling Proteins Inside Living Cells*. Accounts of Chemical Research, 2011. **44**(9): p. 784-792.
69. Stohr, K., et al., *Quenched Substrates for Live-Cell Labeling of SNAP-Tagged Fusion Proteins with Improved Fluorescent Background*. Analytical chemistry, 2010. **82**(19): p. 8186-8193.
70. Juillerat, A., et al., *Directed Evolution of O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Efficient Labeling of Fusion Proteins with Small Molecules In Vivo*. Science, 2003. **10**(Figure 2): p. 313-317.

71. Keppler, A., et al., *A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo*. Nature biotechnology, 2003. **21**(1): p. 86-9.
72. Keppler, A., et al., *Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro*. Methods (San Diego, Calif.), 2004. **32**(4): p. 437-44.
73. Keppler, A., et al., *Fluorophores for live cell imaging of AGT fusion proteins across the visible spectrum*. BioTechniques, 2006. **41**(2): p. 167-+.
74. Gautier, A., et al., *An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells*. Chemistry & Biology, 2008. **15**(2): p. 128-136.
75. Los, G.V., et al., *HatoTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis*. ACS Chemical Biology, 2008. **3**(6): p. 373-382.
76. Pries, F., et al., *Histidine-289 is Essential for Hydrolysis of the Alkyl-Enzyme Intermediate of Haloalkanedehalogenase*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(18): p. 10405-10411.
77. Miller, L.W., et al., *Methotrexate conjugates: A molecular in vivo protein tag*. Angewandte Chemie-International Edition, 2004. **43**(13): p. 1672-1675.
78. Miller, L.W., et al., *In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag*. Nature Methods, 2005. **2**(4): p. 255-257.
79. Adams, S.R., et al., *New biarsenical Ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: Synthesis and biological applications*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(21): p. 6063-6076.
80. Guignet, E.G., R. Hovius, and H. Vogel, *Reversible site-selective labeling of membrane proteins in live cells*. Nature biotechnology, 2004. **22**(4): p. 440-444.
81. Hauser, C.T. and R.Y. Tsien, *A hexahistidine-Zn<sup>2+</sup>-dye label reveals STIM1 surface exposure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(10): p. 3693-3697.
82. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281**(5374): p. 269-272.
83. Calloway, N.T., et al., *Optimized fluorescent trimethoprim derivatives for in vivo protein labeling*. ChemBiochem, 2007. **8**(7): p. 767-774.
84. Wallace, L.A. and C.R. Matthews, *Highly divergent dihydrofolate reductases conserve complex folding mechanisms*. Journal of Molecular Biology, 2002. **315**(2): p. 193-211.
85. Pegg, A.E., *Repair of O-6-alkylguanine by alkyltransferases*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 2000. **462**(2-3): p. 83-100.

86. Gronemeyer, T., et al., *Directed evolution of O-6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling*. Protein Engineering Design & Selection, 2006. **19**(7): p. 309-316.
87. Piersig, W., *Mikroskop und Mikroskopie -Ein wichtiger Helfer auf vielen Gebieten*. 1. ed. 2009: GRIN Verlag.
88. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y.O. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. Jour Cell and Comp Physiol, 1962. **59**((3)): p. 223-239.
89. Shimomura, O., *The discovery of aequorin and green fluorescent protein*. Journal of Microscopy-Oxford, 2005. **217**: p. 3-15.
90. Klein, T., et al., *Live-cell dSTORM with SNAP-tag fusion proteins*. Nature Methods, 2011. **8**(1): p. 7-9.
91. Hein, B., et al., *Stimulated Emission Depletion Nanoscopy of Living Cells Using SNAP-Tag Fusion Proteins*. Biophysical Journal, 2010. **98**(1): p. 158-163.
92. Hell, S.W. and J. Wichmann, *Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy*. Optics Letters, 1994. **19**(11): p. 780-782.
93. Rust, M.J., M. Bates, and X.W. Zhuang, *Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)*. Nature Methods, 2006. **3**(10): p. 793-795.
94. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3 ed. 2006, New York: Springer.
95. Minsky, M., *Microscopy Aperatus*. 1957, U.S. Patent # 3013467.
96. Minsky, M., *Memoir on inventing the confocal scanning microscope*. Scanning, 1988. **10**(4): p. 128-138.
97. Murray, J.M., *Methods for Imaging Thick Specimens: Confocal Microscopy, Deconvolution, and Structured Illumination*. Cold Spring Harbour Protocols, 2011. **2011.12**: p. 1399 - 437.
98. Pawley, J.B., *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. 3. ed. 2006, New York: Springer-Verlag.
99. Goldman, R.D., J.R. Swedlow, and D.L. Spector, *Live Cell Imaging: A Laboratory Manual*. 2 ed. 2009: Cold Spring Harbor Laboratory.
100. Sankaran, J., et al., *ImFCS: A software for Imaging FCS data analysis and visualization*. Optics Express, 2010. **18**(25): p. 25468-25481.

101. Sako, Y., S. Minoguchi, and T. Yanagida, *Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(March).
102. Liu, P., S. Ahmed, and T. Wohland, *The F-techniques: advances in receptor protein studies*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2008. **19**(5): p. 181-90.
103. Ishikawa-Ankerhold, H.C., R. Ankerhold, and G.P.C. Drummen, *Advanced Fluorescence Microscopy Techniques-FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, 2012. **17**(4): p. 4047-4132.
104. Saxton, M.J. and K. Jacobson, *Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, 1997. **26**: p. 373-399.
105. Elson, E.L. and D. Magde, *Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 1-27.
106. Magde, D., E. Elson, and W.W. Webb, *Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Physical Review Letters, 1972. **29**(11): p. 705-708.
107. Magde, D., E.L. Elson, and W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization*. Biopolymers, 1974. **13**(1): p. 29-61.
108. Rigler, R., et al., *Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion*. European Biophysics Journal with Biophysics Letters, 1993. **22**(3): p. 169-175.
109. Rigler, R. and J. Widengren, *Ultrasensitive detection of single molecules by fluorescence correlation spectroscopy*. BioScience, 1990. **40**(3): p. 180-183.
110. Rieger, R., C. Rocker, and G.U. Nienhaus, *Fluctuation correlation spectroscopy for the advanced physics laboratory*. American Journal of Physics, 2005. **73**(12): p. 1129-1134.
111. Sauer, M., J. Hofkens, and J. Enderlein, *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. 1 ed. 2011: Wiley-VCH.
112. Aragon, S.R. and R. Pecora, *Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics*. The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(4): p. 1791-1803.
113. Wohland, T., R. Rigler, and H. Vogel, *The Standard Deviation in Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophysical Journal, 2001. **80**(6): p. 2987-2999.
114. Buschmann, V., et al., *Quantitative FCS : Determination of the Confocal Volume by FCS and Bead Scanning with the MicroTime 200*. 2009: Application Note, PicoQuant GmbH Berlin.

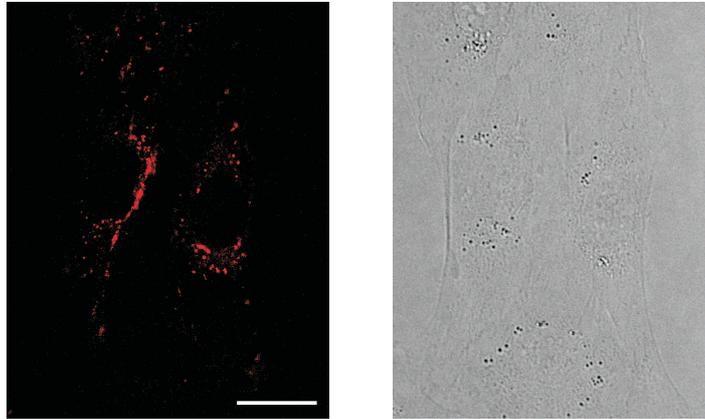
115. Widengren, J. and R. Rigler, *Review - Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces*. Cellular and Molecular Biology, 1998. **44**(5): p. 857-879.
116. Palmer, A.G. and N.L. Thompson, *Theory of sample translation in fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, 1987. **51**(2): p. 339-343.
117. Hendrix, J., et al., *Dark States in Monomeric Red Fluorescent Proteins Studied by Fluorescence Correlation and Single Molecule Spectroscopy*. Biophysical Journal, 2008. **94**(10): p. 4103-4113.
118. Schwille, P., J. Korfach, and W.W. Webb, *Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes*. Cytometry, 1999. **36**(3): p. 176-182.
119. Wachsmuth, M., W. Waldeck, and J. Langowski, *Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy*. Journal of Molecular Biology, 2000. **298**(4): p. 677-689.
120. Weiss, M., et al., *Anomalous subdiffusion is a measure for cytoplasmic crowding in living cells*. Biophysical Journal, 2004. **87**(5): p. 3518-3524.
121. Schwille, P., et al., *Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation*. Biophysical Journal, 1999. **77**(4): p. 2251-2265.
122. Weiss, M., H. Hashimoto, and T. Nilsson, *Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, 2003. **84**(6): p. 4043-4052.
123. Weissman, M., H. Schindler, and G. Feher, *Determination of molecular weights by fluctuation spectroscopy: Application to DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976. **73**(8): p. 2776-2780.
124. Petersen, N.O., et al., *Quantitation of Membrane Receptor Distributions by Image Correlation Spectroscopy: Concept and Application*. Biophysical Journal, 1993. **65**(3): p. 1135-1146.
125. Srivastava, M. and N.O. Petersen, *Image cross-correlation spectroscopy: A new experimental biophysical approach to measurement of slow diffusion of fluorescent molecules*. Methods in Cell Science, 1996. **18**(1): p. 47-54.
126. Kolin, D.L. and P.W. Wiseman, *Advances in image correlation spectroscopy: Measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2007. **49**(3): p. 141-164.

127. Kuricheti, K.K., V. Buschmann, and K.D. Weston, *Application of fluorescence correlation spectroscopy for velocity imaging in microfluidic devices*. Applied Spectroscopy, 2004. **58**(10): p. 1180-1186.
128. Roth, C.M., et al., *Imaging diffusion in living cells using time-correlated single-photon counting*. Analytical chemistry, 2007. **79**(19): p. 7340-5.
129. Shaner, N.C., et al., *Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins*. Nature Methods, 2008. **5**(6).
130. Malchus, N. and M. Weiss, *Elucidating Anomalous Protein Diffusion in Living Cells with Fluorescence Correlation Spectroscopy-Facts and Pitfalls*. Journal of Fluorescence, 2010. **20**(1): p. 19-26.
131. Ries, J., et al., *Automated suppression of sample-related artifacts in Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Optics Express, 2010. **18**(11): p. 11073-11082.
132. Ries, J. and P. Schwille, *Fluorescence correlation spectroscopy*. Bioessays, 2012. **34**(5): p. 361-368.
133. Maruyama, Y. and E. Charbon. *An all-digital, time-gated 128X128 spad array for on-chip, filter-less fluorescence detection*. in *Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference (TRANSDUCERS), 2011 16th International*. 2011.
134. Gersbach, M., et al., *A Time-Resolved, Low-Noise Single-Photon Image Sensor Fabricated in Deep-Submicron CMOS Technology*. Ieee Journal of Solid-State Circuits, 2012. **47**(6): p. 1394-1407.
135. Puri, V., et al., *Clathrin-dependent and -independent internalization of plasma membrane sphingolipids initiates two Golgi targeting pathways*. Journal of Cell Biology, 2001. **154**(3): p. 535-547.
136. Mellman, I., *Endocytosis and molecular sorting*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 1996. **12**: p. 575-625.
137. Ando, T. and J. Skolnick, *Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo macromolecular motion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010. **107**(43): p. 18457-18462.
138. Padilla-Parra, S., et al., *Dual-Color Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy to Quantify Protein-Protein Interactions in Live Cell*. Microscopy Research and Technique, 2011. **74**(8): p. 788-793.
139. Ruan, Q.Q., et al., *Cellular characterization of adenylate kinase and its isoform: Two-photon excitation fluorescence imaging and fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical Journal, 2002. **83**(6): p. 3177-3187.

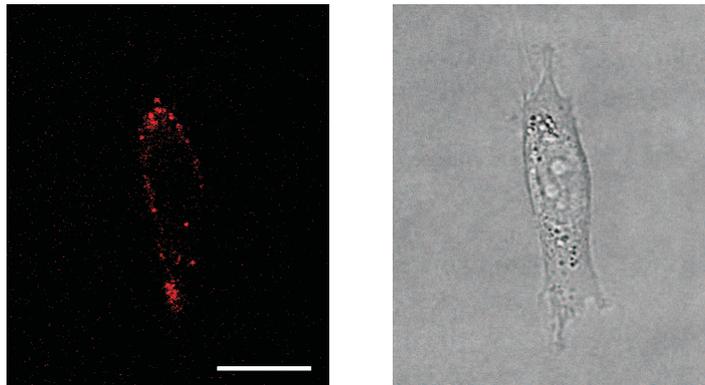
140. Ferbeyre, G. and R. Moriggl, *Biochimica et Biophysica Acta The role of Stat5 transcription factors as tumor suppressors or oncogenes*. BBA - Reviews on Cancer, 2011. **1815**(1): p. 104-114.
141. Becker, V., et al., *Covering a Broad Dynamic Range : Erythropoietin Receptor*. Science, 2010. **1404**.
142. Sankaran, J., et al., *Diffusion , Transport , and Cell Membrane Organization Investigated by Imaging Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy*. Biophysj, 2009. **97**(9): p. 2630-2639.
143. Guo, L., et al., *Molecular diffusion measurement in lipid Bilayers over wide concentration ranges: A comparative study*. Chemphyschem, 2008. **9**(5): p. 721-728.
144. Roth, C.M., *Untersuchung in lebenden Zellen mit Hilfe neuer Methoden der Einzelmolekülspektroskopie*, in *Physikalisch-chemisches Institut, Heidelberg, Dissertation*. 2006, Universität Heidelberg.
145. Jalink, K., et al., *Solving the Challenge of Fluorescence Leica TCS SP5 X: The First COMPLETELY Tunable Confocal System*. Confocal Application Letter, 2008. **29**.
146. Benda, A., et al., *TCSPC upgrade of a confocal FCS microscope*. Review of Scientific Instruments, 2005. **76**(3).
147. Petrásek, Z. and P. Schwille, *Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy*. Biophysical journal, 2008. **94**(4): p. 1437-48.
148. Thiele, C., et al., *Cholesterol binds to synaptophysin and is required for biogenesis of synaptic vesicles*. Nature Cell Biology, 2000. **2**(1): p. 42-49.
149. Stöhr, K., *Fluoreszenzgelöschte Sonden für diagnostische und analytische Anwendungen*, in *Physikalisch-chemisches Institut, Heidelberg, Dissertation*. 2008, Universität Heidelberg.
150. Crocker, J.C. and D.G. Grier, *Methods of digital video microscopy for colloidal studies*. Journal of Colloid and Interface Science, 1996. **179**(1): p. 298-310.
151. Blair, D. and E. Dufrenes. *The Matlab Particle Tracking Code Repository*. Available from: <http://physics.georgetown.edu/matlab/>.

## 6 ANHANG

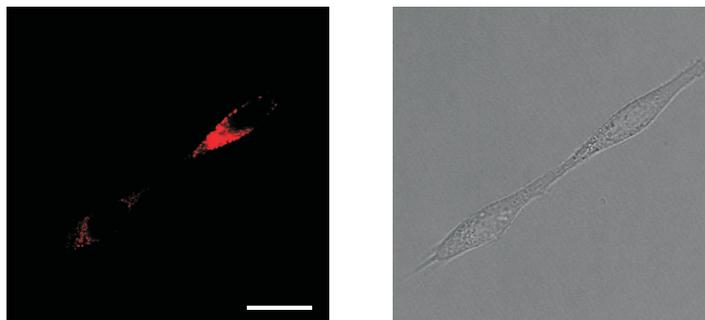
### 6.1 Markierung der NIH3T3 Maus Fibroblasten mit weiteren BG-Substraten



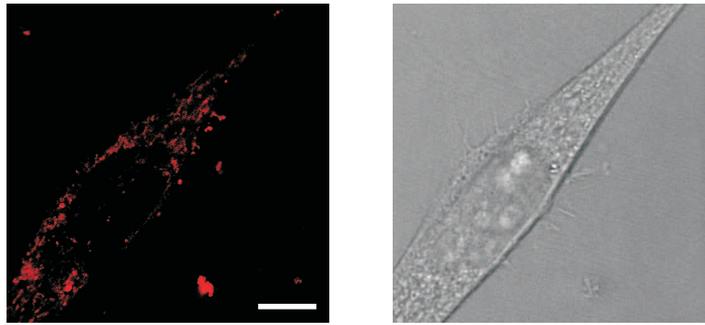
**Abbildung 6.1:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 2,5  $\mu$ M BG-MR121 markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 70% bei 631 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auch auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 650 – 750 nm bei einer Verstärkung von 800 V. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.



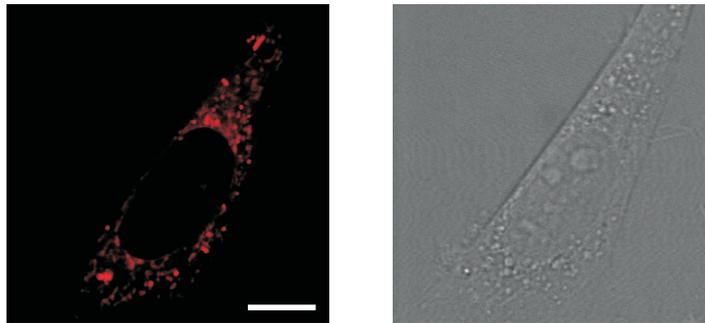
**Abbildung 6.2:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 3  $\mu$ M BG-Atto620 markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 60% bei 624 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 640 – 695 nm bei einer Verstärkung von 950 V. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.



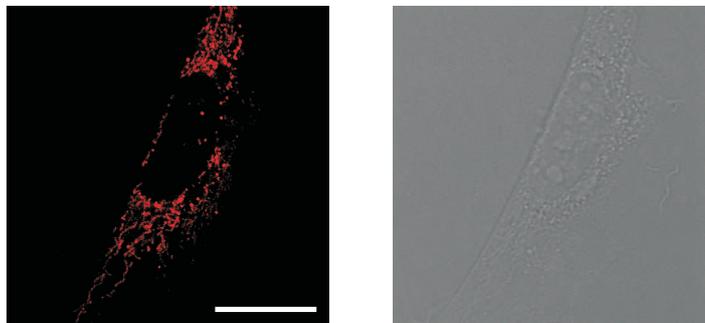
**Abbildung 6.3:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 1  $\mu$ M BG-Atto647N markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 60% bei 644 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 655 – 750 nm bei einer Verstärkung von 800 V. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.



**Abbildung 6.4:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 1  $\mu$ M BG-Atto550 markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 15% bei 554 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 574 – 644 nm bei einer Verstärkung von 667 V. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

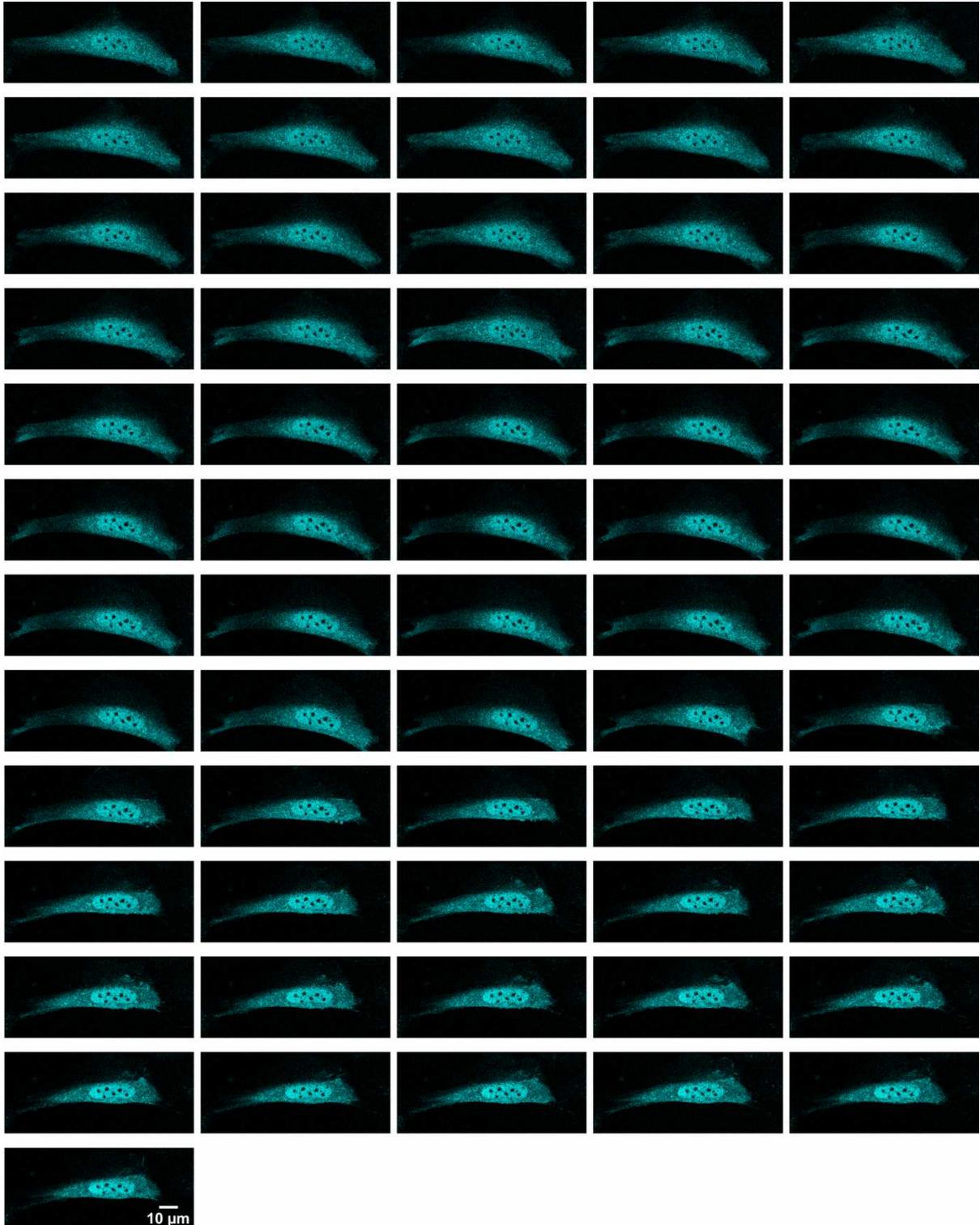


**Abbildung 6.5:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 1  $\mu$ M BG-AttoRho14 markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 15% bei 625 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 645 – 715 nm bei einer Verstärkung von 661 V. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.



**Abbildung 6.6:** NIH3T3 STAT5b-SNAP mit 20 ng/ml Dox exprimiert und mit mit 1  $\mu$ M BG-AttoOxa12 markiert. Die Anregungsleistung wurde in der Software auf 15% bei 663 nm eingestellt, wobei der Laser selbst auf 70% reguliert wurde. Das Detektionsfenster des PMT lag zwischen 695 – 765 nm bei einer Verstärkung von 970 V. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m.

## 6.2 Zeitserien der Scans stimulierter und nicht stimulierter NIH3T3 Zellen

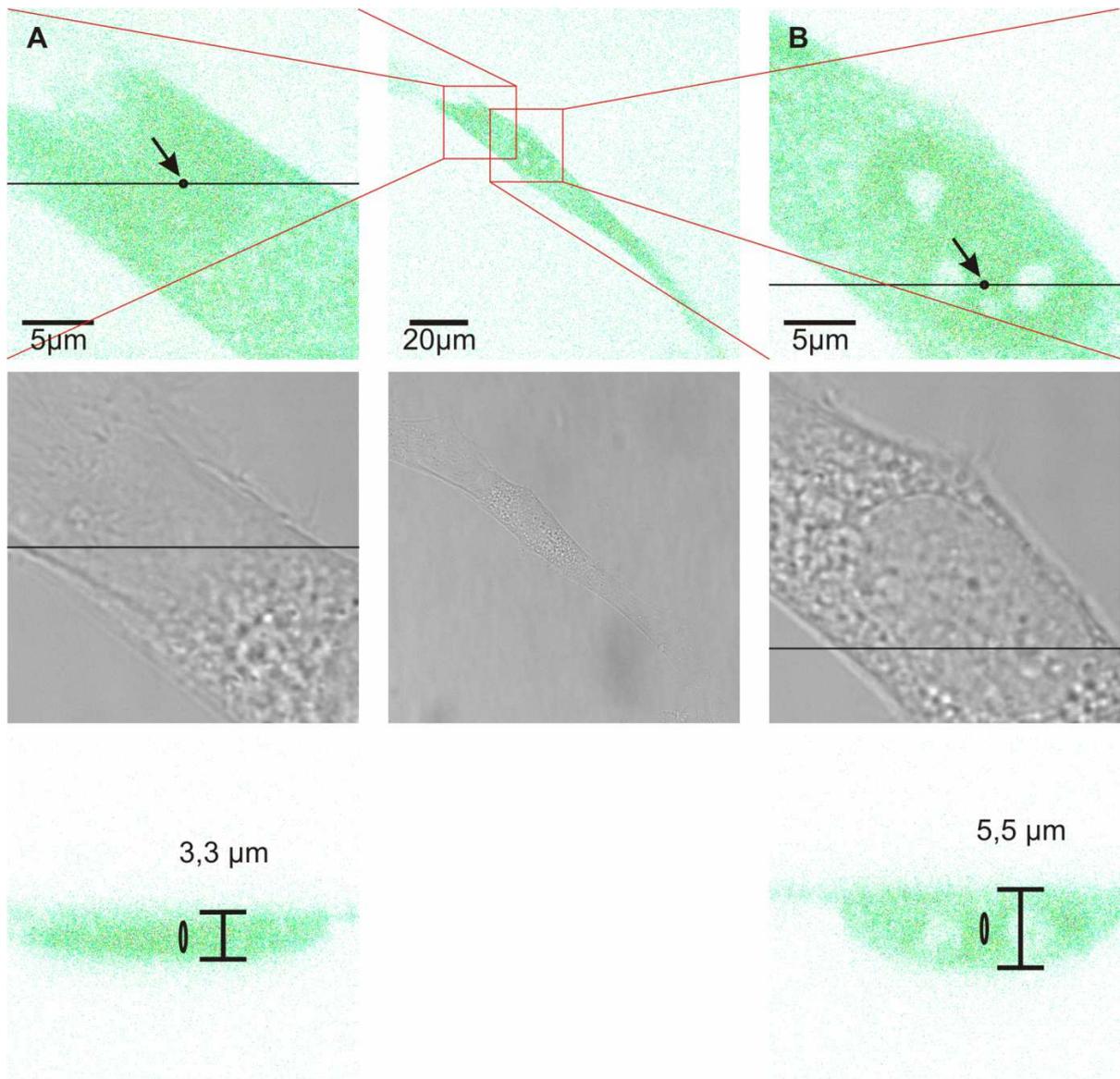


**Abbildung 6.7:** Eine Zeitserie einer NIH3T3 Zelle, welche mit 20U/ml Epo stimuliert wurde. Die Aufnahmen gingen über 60 min mit einem Scan pro Minute(von links oben nach rechts unten). STAT5b-SNAP wurde in den Zellen mit 50nM TMR-Star markiert, sie wurden gehungert und unmittelbar vor Start der Serie stimuliert. Die Scans wurden mit 200Hz, mit der Anregungswellenlänge von 532 nm und den APDs mit dem Bandpassfilter 582 DF/70 durchgeführt.



**Abbildung 6.8:** Eine Zeitserie einer NIH3T3 Zelle, welche unbehandelt ist. Die Aufnahmen gingen über 60 min mit einem Scan pro Minute (von links oben nach rechts unten). STAT5b-SNAP wurde in den Zellen mit 50nM TMR-Star markiert und blieben unbehandelt. Die Sams wurden mit 200Hz, mit der Anregungswellenlänge von 532 nm und den APDs mit dem Bandpassfilter 582 DF/70 durchgeführt.

### 6.3 XY- und XZ-Scans einer NIH3T3 Zelle zur Lokalisierung des konfokalen Volummens



**Abbildung 6.xx:** NIH3T3 Zelle die mit 20 ng/ml Dox STAT5b-SNAP exprimiert das mit 50 nM TMR-Star markiert ist.

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

APD	Avalanche Photodiode, Photolawinendioden
BG	Benzyl-Guanin
BFU-E	burst-forming-unit erythroid
CCD	Charge-Coupled-Device
CFU-E	colony-forming-unit erythroid
CFU-GEMM	colony-forming-unit granulocyte-erythroid-markrophage-megakaryocyte
CLSM	konfokale Laserscanning Mikroskopie
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1
D	Diffusionskoeffizient
DIFIM	Diffusion Imaging, bildgebende Diffusionsmikroskopie
Dox	Doxyzyklin
<i>e</i> DHFR	<i>E. Coli</i> Dihydrofolate Reduktase
Epo	Eythropoietin
EpoR	Eythropoietin Rezeptor
FCS	Fluorescence correlation microscopy, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FERM	four-point-one, Ezrin, Radexin, Moesin
FlAsH	Fluorescein Arsenical Hairpin
FP	Fluoreszenzprotein
GAS	$\gamma$ -Interferon Aktivierungsposition
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
G-Protein	GTP-bindendes Protein
hAGT	Humane O <sup>6</sup> -Alkylguanin-Transferase
HIF	Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
IC	Internal conversion, interne Konversion
IL	Interleukin
ImTIR	Imaging-Total Internal Reflection
INF- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
ISC	Inter system crossing
JAK	Januskinase
JH	JAK Homologie

---

NA	Numerische Apertur
NRR	Non radiative relaxation, strahlungslose Relaxation
PMT	Photomultiplier Tube, Photoelektronenvervielfacher
QDs	Quantendots
ReAsH	Resofurin Arsenical Hairpin
rtTa	reversibler Tet Transaktivator
SH	Sarcoma-homology
SMFS	Single Molecule Fluorescence Spectroscopy
STAT	Signal Transduktion und Aktivierung der Transkription
TAD	Transaktivierungs Domäne
TCSPC	Time-correlated single photon counting Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklinrepressor Protein
tetO	Tetrazyklin Operatorsequenz
TF	Transkriptionsfaktor
TIR	Total internal reflection, interne Totalreflektion
TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy, Interne-Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie
TMP	Trimethoprim
TMR	Tertramethylrhodamin
TRE	Tet-response-element
tTA	Tet Transaktivator
Tyk	Tyrosinkinase
VA-TRIFM	Variable Angle Interne-Totalreflektions-Fluoreszenzmikroskopie
VR	Vibrational relaxation, Schwingungsrelaxation

## 7 DANKSAGUNG

Der Dank gebührt einer Vielzahl von Personen, welche auf unterschiedlichste Weise dazu beigetragen haben diese Arbeit zu vollenden.

Zunächst und vor allem möchte ich mich bei Dr. Dirk-Peter Herten bedanken. Er gab mir die Möglichkeit ein Thema zu untersuchen das in seiner themenübergreifenden Breite verschiedenste Aspekte der Biologie und der Spektroskopie behandelt. Bei aufkommenden Problemen halfen seine Vorschläge weiter und die Diskussionen mit ihm eröffneten immer wieder neue Sichtweisen.

In der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Ursula Klingmüller waren die Gespräche und Besprechungen stets sehr informativ und die darauf folgenden Zusammenarbeiten sehr konstruktiv. Bei Andrea Pfeiffer konnte ich sehr viel über die Molekularbiologie lernen. Marcel Schilling hatte immer ein Ohr offen für auch noch so banale Fragen. Und Susen Lattermann die mir verschiedene Plasmidkonstrukte und Zelllinien in kürzester Zeit präparierte.

Den Forschungspraktikanten, die da waren: Julia Hofman, Martin Schmuck und Sandra König. Deren Einsatz zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe der Einzelmolekülspektroskopie für die fachlichen Diskussionen aber sicherlich im gleichen Maße für die immer lockere und entspannte Atmosphäre, die die Weiterarbeit erleichterte, wenn die Arbeit am stressigsten war.

Alexander Kiel, der ein besonderes Händchen für alle Mikroskopieaufbauten hatte.

Michael Schwering von dem ich so gut wie alles über die TIRF Mikroskopie lernte.

Jessica Balbo, deren Wissen über FCS bei Fragen immer weiter half.

Christina Spassova, die sich immer und jederzeit über ein Gespräch freut.

Arina Rybina, deren russische Ader mich immer zum lachen bringt oder manchmal auch zum verzweifeln.

Dominik Brox, der einem stets sofort weiter hilft.

Tanja Ehrhard, die für biologische Fragen immer die richtige Ansprechpartnerin ist.

Anne Seefeld, die mit ihrer kritischen Art dazu beigetragen hat die Arbeit zu verbessern.

Anton Kurz, dessen Beitrag im Gestalten der Auswertesoftware in MatLab eine große Hilfe bedeutete.

Alexa von Ketteler, die durch ihre immer fröhliche Stimmung die Arbeit erleichterte. Und für die Diskussionen mit ihr, die immer sehr weiterführend waren.

Kristin Grußmayer, die mich immer gleich versteht und vor allem für das Korrektur lesen der Arbeit.

Meiner Familie vor allen Dingen für die immer währende Unterstützung. Und meinem Bruder für die Korrekturen des biologischen Teils.

Zu guter Letzt und im besonderen Maße meiner Frau Anne für ihre schier unendliche Geduld mit mir, die sicherlich nötig war, um zu diesem Punkt zu gelangen. Über alle Maßen, seit nunmehr einem Jahr, meiner Tochter Emilia deren Strahlen und helles Gemüt mir immer dann weiter half, wenn die Situationen am schwierigsten waren.

**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Universität Heidelberg**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema

Einzelmolekül-spektroskopische Methoden zur Untersuchung von Dynamiken des STAT5b-Proteins  
in lebenden Maus Fibroblasten

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich bislang nicht an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt.

Titel der Arbeit: Einzelmolekül-spektroskopische Methoden zur Untersuchung von  
Dynamiken des STAT5b-Proteins in lebenden Maus Fibroblasten

Hochschule und Jahr: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 2013

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung: Inaugural-Dissertation

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich.

5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, den 10.01.2013

Ort und Datum



Unterschrift