
Theoretische und experimentelle Methoden zur Verbesserung der Unterscheidbarkeit alternativer Modelle der Proteinrekrutierung

Theoretical and experimental methods to increase the discriminability of
alternative protein recruitment models

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation von Laurin Lengert aus Frankfurt a.M.

Tag der Einreichung: 18.11.14, Tag der Prüfung: 18.12.14

Darmstadt 2015 — D 17

1. Gutachten: Prof. Dr. Barbara Drossel

2. Gutachten: Prof. Dr. M. Cristina Cardoso



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Physik
Institut für Festkörperphysik

Theoretische und experimentelle Methoden zur Verbesserung der Unterscheidbarkeit alternativer Modelle der Proteinrekrutierung

Theoretical and experimental methods to increase the discriminability of alternative protein recruitment models

Genehmigte Dissertation von Laurin Lengert aus Frankfurt a.M.

1. Gutachten: Prof. Dr. Barbara Drossel

2. Gutachten: Prof. Dr. M. Cristina Cardoso

Tag der Einreichung: 18.11.14

Tag der Prüfung: 18.12.14

Darmstadt 2015 — D 17

Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Alle Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Darmstadt, den 12. Februar 2015

(Laurin Lengert)

Die Möglichkeit zur fluoreszenten Markierung von Proteinen ist eine der herausragendsten Entwicklungen der Biologie in den letzten Jahrzehnten. Hierdurch ist es möglich, zuvor ungeahnte Einblicke in die fundamentalen Abläufe des Lebens, etwa der Zellvermehrung, der DNA-Reparatur und der Kommunikation mit anderen Zellen, zu gewinnen. Um aus den Daten von Experimenten mit fluoreszierenden Proteinen die chemischen Ratenkonstanten und weiterführende Informationen zu gewinnen, werden standardmäßig mathematische Modelle verwendet. Für ein gegebenes Experiment bieten sich dabei zumeist mehrere miteinander konkurrierende Modelle an. Um in einer derartigen Untersuchung letztlich zu aussagekräftigen Ergebnissen zu gelangen, ist es entscheidend, dass zwischen den Modellen anhand ihrer Fähigkeit zur Reproduktion der Daten unterschieden werden kann. Allerdings ist diese Unterscheidbarkeit häufig aufgrund der mangelnden Spezifität der experimentellen Daten oder der zu hohen Anpassungsfähigkeit der Modelle an die Daten nicht gegeben.

Da die Unterscheidbarkeit zwischen alternativen Modellen derart bedeutend für den Erkenntnisgewinn aus einer Untersuchung ist, befasst sich diese Arbeit daher mit verschiedenen, sowohl theoretischen als auch experimentellen Methoden, mit denen die Unterscheidbarkeit zwischen Modellen erhöht werden kann. Dabei werden solche Modelle untersucht, die der Beschreibung der Proteinrekrutierung innerhalb einer Zelle nach einem auslösenden Ereignis, wie etwa nach DNA-Schäden erzeugender Bestrahlung mit einem Laser, dienen.

Im ersten Teil wird auf rein theoretischer Basis eine Methode entwickelt, die auf dem Vergleich spezifischer Merkmale von Proteinrekrutierungskurven aufbaut. Diese Methode soll unter anderem Experimentatoren dabei helfen, anhand ihnen vorliegender experimenteller Daten eine Vorauswahl der zur Datenanalyse verwendeten Modelle zu treffen und hierdurch den Arbeitsaufwand der Datenanalyse zu reduzieren. Zusätzlich können die Erkenntnisse aus dem ersten Teil auch bei der Planung eines Experiments sehr hilfreich sein, da sie Aufschluss darüber geben, welche Zeitfenster während der Proteinrekrutierung für die Identifizierung oder den Ausschluss eines bestimmten Modells ausschlaggebend sind.

Im zweiten Teil der Arbeit wird eine Methode vorgestellt, die auf der Verwendung von FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Proteinrekrutierung basiert. FRAP ist eine Standardmethode, die unter anderem der Untersuchung der chemischen Ratenkonstanten der Proteine dient. In der hier vorgestellten Weiterentwicklung der FRAP-Methode werden zwei Laser verwendet, wobei der erste Laser der Erzeugung von DNA-Schäden dient und der Zweite dem Bleichen der fluoreszierenden Proteine. Dies führt zu einer deutlichen Verbesserung der Unterscheidbarkeit der Modelle. Zum anderen ist es dank dieser Methode auch möglich, Prozesse zu untersuchen, während deren Dauer sich die chemischen Ratenkonstanten der Proteine ändern. Hierdurch unterscheidet sich die hier vorgestellte Methode wesentlich von klassischen FRAP-Analysen und ermöglicht damit die Untersuchung von noch unerforschten, aus wissenschaftlicher Sicht sehr interessanten Abläufen.

Der dritte Teil dieser Arbeit untersucht auf rein theoretischer Basis den Einfluss des zeitlichen Abstandes zwischen der Bestrahlung zur Erzeugung von DNA-Schäden und der Verwendung des zweiten Lasers zum Bleichen der Proteine. Diese Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass eine Kombination verschiedener zeitlicher Abstände die Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle deutlich verbessert.

Die für zukünftige Experimente entscheidende Botschaft dieser Arbeit besteht zusammenfassend in der Aussage, dass die Durchführung von FRAP-Experimenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Proteinrekrutierungskurve die Unterscheidbarkeit zwischen alternativen Modellen und damit die Wahrscheinlichkeit für aussagekräftige Ergebnisse wesentlich erhöht.

The use of fluorescently labeled proteins is one of the most exciting advances of biology during the past decades. It enables previously unimagined insights into the fundamental processes of life itself like cell proliferation, DNA repair and intercellular communication. In order to extract the chemical rate constants and further informations from experiments with fluorescent proteins usually mathematical models are used. For a given experiment often several competing models are apposite. For attaining meaningful results in such a study the discriminability between the models with regard to their ability to reproduce the data is vital. However, often the models are indiscriminable due to the data lacking in specificity or the models adaptability to the data.

Since the discriminability between alternative models is of such importance for the insights gained from an investigation this thesis deals with theoretical and experimental methods which help improving the discriminability between models. The models used will describe the protein recruitment in a cell following a triggering event, such as DNA damage induced by laser irradiation.

In the first part a purely theoretical method will be introduced, which is based on the comparison of specific features of theoretical protein recruitment curves. Among other things, this method is meant to help experimentalists preselecting a model used for data analysis depending on the experimental data thereby reducing the effort of data analysis. Additionally, the insights of this thesis can serve the planning of an experiment, since they give indication of the time frames during protein recruitment that are of crucial importance for the identification or the exclusion of a given model.

In the second part of this thesis a method is presented that relies on the use of FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) at different time points during the recruitment phase. FRAP is a standard method used, inter alia, for measuring the chemical rate constants of the proteins. In the method introduced in this thesis two lasers are used with the first laser inducing DNA lesions and the second laser bleaching the fluorescent proteins. Due to this procedure the discriminability between the models is greatly enhanced. Additionally, this method allows to investigate processes during which the chemical rate constants of the proteins change over time, a situation to which classical FRAP analysis is not applicable. Hence, this advantage enables researching yet unexplored processes of great scientific interest.

In the third part the influence of the time point at which the recruited proteins are bleached on the discriminability between the models is investigated. It is shown that a combination of different time points remarkably improves the model's discriminability.

For future experiments the most important insight of this work is that conducting FRAP at different time points during the protein recruitment phase greatly enhances the discriminability between alternative models thereby increasing the probability of meaningful results.

1	Einleitung	7
2	Hintergrundwissen	10
2.1	Zellen, DNA und Proteine	10
2.2	Zellzyklus	11
2.3	DNA-Reparatur	11
2.4	Transfektion	13
2.5	Fluoreszierende Proteine	13
3	Untersuchung spezieller Merkmale von Proteinrekrutierungskurven im Zusammenhang mit den zugrundeliegenden Prozessen	14
3.1	Methoden	15
3.2	Ergebnisse	17
3.2.1	Ein-Protein-ein-Substrat-Modell	17
3.2.2	Zwei-Proteine-ein-Substrat-Modelle	22
3.2.3	Protein <i>A</i> beeinflusst die Assoziationsratenkonstante von Protein <i>B</i>	23
3.2.3.1	Protein <i>A</i> erhöht die Assoziationsratenkonstante von <i>B</i> . .	24
3.2.3.2	Protein <i>A</i> verringert die Assoziationsratenkonstante von <i>B</i>	27
3.2.3.3	Protein <i>A</i> beeinflusst die Assoziationsratenkonstante von <i>B</i> (Dissoziation ist relevant)	27
3.2.3.4	Protein <i>A</i> und <i>B</i> beeinflussen die Assoziationsratenkonstante des jeweils anderen Proteins	31
3.2.4	Protein <i>A</i> beeinflusst die Dissoziationsratenkonstante von <i>B</i>	33
3.2.4.1	Protein <i>A</i> verringert die Dissoziationsratenkonstante von <i>B</i>	35
3.2.4.2	Protein <i>A</i> erhöht die Dissoziationsratenkonstante von <i>B</i> . .	36
3.3	Diskussion	39
4	FRAP während der Rekrutierungsphase	42
4.1	Materialien und Methoden	43
4.1.1	Zell Kultur	43
4.1.2	Experimenteller Aufbau	43
4.1.3	Daten-Analyse	44
4.1.4	Kontrollexperimente	46
4.1.5	Theoretische Modelle	49
4.1.6	Kreuzvalidierung	56
4.2	Ergebnisse	57
4.2.1	Mikrobestrahlungsexperimente	57
4.2.1.1	Zwei-DNA-Schadensarten-Modell	58
4.2.1.2	Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante	60
4.2.1.3	Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine	62
4.2.2	FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente	64
4.2.2.1	Zwei-DNA-Schadensarten-Modell	64
4.2.2.2	Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante	68

4.2.2.3	Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine	69
4.3	Diskussion	70
5	Einfluss des FRAP-Zeitpunkts	74
5.1	Methode	74
5.2	Ergebnisse	76
5.2.1	Daten des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante . .	77
5.2.2	Daten des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells	82
5.3	Diskussion	85
6	Fazit und Ausblick	88
7	Danksagung	91
8	Appendix	94

If you try and take a cat apart to see how it works, the first thing you have on your hands is a nonworking cat.

(Douglas Adams)

Die moderne Biologie erlaubt fundamentale Einblicke in die zahlreichen in lebenden Zellen ablaufenden Prozesse, die etwa dem Zellüberleben, der Vermehrung oder der Kommunikation mit der Umgebung dienen. Entscheidend hierfür ist die fluoreszente Markierung von Proteinen (Day and Davidson, 2009). Dies ist eine faszinierende Methode, da hierdurch Zellen im Zustand des Lebens untersucht werden können. Wir erhalten damit quasi einen unvergesslichen Einblick in das Innenleben von Douglas Adams Katze, ohne diese in Mitleidenschaft zu ziehen - abgesehen von der auf die Fluoreszenz folgenden Irritation.

Dank der fluoreszenten Markierung von Proteinen ist es möglich, die räumliche Verteilung und damit in gewissem Sinne das Verhalten der markierten Proteine nahezu in Echtzeit zu beobachten. Hierdurch sind daher Untersuchungen der in lebenden Zellen ablaufenden Prozesse zugänglich geworden, die in diesem Umfang und Detailgrad vorher nicht denkbar waren. Besonders spannende Prozesse hierbei sind beispielsweise die ständig aktive DNA-Reparatur (je nach Zellart mehrere Zehntausend Schäden pro Zelle und Tag (Bernstein et al., 2013)) sowie die zur Zellteilung notwendige DNA-Replikation. Die Erforschung und das weitestmögliche Verständnis dieser beiden Prozesse ist natürlich bereits aus einem philosophischen Interesse an der unfassbaren Existenz des Lebens heraus an sich von Bedeutung. Darüber hinaus basiert aber auch eines der wichtigsten Forschungsgebiete der heutigen Zeit, die Krebsforschung, auf eben diesen beiden Prozessen.

Eine besonders nützliche Methode, die auf der fluoreszenten Markierung von Proteinen aufbaut, ist FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching). Mithilfe von FRAP können etwa Informationen über die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante der beobachteten Proteine erlangt werden, wodurch wiederum das Zusammenspiel zwischen verschiedenen Proteinen noch näher beleuchtet werden kann.

Die zahlreichen in lebenden Zellen ablaufenden Prozesse können dank der fluoreszenten Markierung von Proteinen also so untersucht werden, dass man das Innenleben der Zellen in Aktion direkt vor Augen hat: Wie die Zellen Schäden der DNA reparieren, wie sie sich teilen und miteinander kommunizieren kann durch die Markierung verschiedener Proteine in aufregender Weise sichtbar gemacht werden. Das Verfahren gewinnt daher möglicherweise eine ähnlich große Bedeutung für die Wissenschaft wie die Erfindung des Mikroskops.

Um aus den Daten von Experimenten mit fluoreszent markierten Proteinen die entscheidenden Größen wie etwa die chemischen Ratenkonstanten zu ermitteln, wird im Allgemeinen entweder ein phänomenologisch-deskriptiver Ansatz oder ein mechanistischer Ansatz gewählt. Im ersten Fall werden mathematische Funktionen (z.B. monoexponentielle Funktionen) an die experimentellen Daten gefittet (Jakob et al., 2005; Tobias et al., 2010; Jakob et al., 2011; Strickland et al., 2012), die erfahrungsmäßig zum Beschreiben der Daten geeignet sind. Der mechanistische Ansatz zielt dagegen darauf ab, bestimmte, für das beobachtete Experiment als entscheidend angenommene Prozesse mithilfe mathematischer Ausdrücke abzubilden, etwa unter Verwendung von Differentialgleichungen (Phair and Misteli, 2001; Lipniackia et al., 2004; Darzacq et al., 2007; Berro et al., 2010; Luijsterburg et al., 2010; Li and Cucinotta, 2011). Letztendlich ergeben sich auch mit diesem Ansatz mathematische Formeln, die an die Daten gefittet werden. Die besondere

Bedeutung des mechanistischen Ansatzes liegt allerdings darin, dass die Ergebnisse einer Untersuchung häufig direkt mit bestimmten Bestandteilen des verwendeten Modells in Zusammenhang gebracht werden können. Beispielsweise kann sich zeigen, dass eine spezielle chemische Reaktion ausschlaggebend für den zeitlichen Verlauf der Konzentration eines bestimmten Proteins ist.

Außer der Frage, ob in einer Untersuchung ein mechanistischer oder phänomenologischer Ansatz gewählt wird, ist zu entscheiden, wie viele Modelle untersucht und miteinander verglichen werden sollen. Jedes Modell kann im Prinzip beliebig erweitert und hierdurch beliebig komplex werden. Dementsprechend ist die Anzahl der theoretisch verwendbaren Modelle unbegrenzt. Praktisch gesehen ist es natürlich sinnvoller, nur ein Modell oder eine kleine Anzahl qualitativ unterschiedlicher Modelle zu verwenden. Bei Untersuchungen, in denen nur ein theoretisches Modell berücksichtigt wird, sind die möglichen Aussagen recht begrenzt: Häufig besteht die wesentliche Erkenntnis einer solchen Untersuchung lediglich in der Antwort, ob das Modell die Daten reproduzieren kann oder nicht. Häufig sind daher solche Untersuchungen interessanter, in denen verschiedene alternative Modelle berücksichtigt werden. Denn diese können in vergleichende Aussagen münden: Etwa, dass sich von den untersuchten Modellen eines am ehesten zur Erklärung eines bestimmten Phänomens eignet. Gerade bei Phänomenen der Zellbiologie, in denen eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse zur Erzeugung des Phänomens beitragen, kann eine solch vergleichende Untersuchung wesentlich dazu beitragen, diejenigen Prozesse herauszufiltern, die am entscheidendsten zum beobachteten Phänomen beitragen.

Werden Modelle verwendet, die möglichst detailgetreu alle zugrundeliegenden Prozesse abbilden, so kann die Komplexität solcher Modelle und die hohe Anzahl an freien Parametern häufig dazu führen, dass mehrere alternative Modelle die Daten ähnlich gut reproduzieren. Dementsprechend ist es in solchen Fällen schwierig, eindeutige Aussagen zu treffen. Es ist daher zweckdienlich, möglichst einfache Modelle mit einer minimalen Anzahl an freien Parametern zu verwenden. Natürlich ist es auch bei solch einfachen Modellen möglich, dass mehrere Modelle zur Reproduktion eines Datensatzes ähnlich gut geeignet sind. Die vorliegende Arbeit zielt daher darauf ab, Methoden vorzustellen und zu untersuchen, mit deren Hilfe die Unterscheidbarkeit alternativer Modelle hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Reproduktion von Daten erhöht wird und die damit zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

Diese Arbeit konzentriert sich auf Modelle, die der Beschreibung der Proteinkonzentrationen innerhalb einer Zelle nach einem auslösenden Ereignis dienen. Die entsprechenden Experimente werden mithilfe von fluoreszent markierten Proteinen in lebenden Zellen durchgeführt (Day and Davidson, 2009). Das auslösende Ereignis kann beispielsweise in der Bestrahlung der Zelle bestehen. Führt diese Bestrahlung zu DNA-Schäden, so löst dies im Normalfall eine Reihe von Reparaturmechanismen in der Zelle aus. Ein wichtiger Bestandteil dieser Mechanismen ist die Rekrutierung von Reparaturproteinen an die beschädigte DNA. Dies wiederum führt zu einer Änderung der räumlichen Verteilung dieser Proteine, insbesondere nimmt die lokale Proteinkonzentration in der bestrahlten Region über einen gewissen Zeitraum hinweg zu. Dieser Prozess wird im Folgenden als Proteinrekrutierung bezeichnet. Die hier verwendeten Methoden sind aber nicht auf Untersuchungen der DNA-Reparatur begrenzt. Ein sehr aktuelles Forschungsgebiet sind etwa TULIPs¹ (Strickland et al., 2012). Dies sind flexibel einsetzbare, lichtinduzierbare Proteine. Durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann die Funktion dieser Proteine unterdrückt werden (Toettcher and Lim, 2011). Ebenso können sie dazu gebracht werden, dass sie sich an bestimmte Proteine anlagern oder bestimmte zelluläre Signalwe-

¹ tunable, light-controlled interacting protein

ge auslösen (Strickland et al., 2012). Die Erkenntnisse dieser Arbeit sind allgemein auf Situationen anwendbar, in denen sich die Konzentrationen der Proteine als Antwort auf ein bestimmtes Ereignis (beispielsweise DNA-Schäden oder TULIPs) ändert.

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt auf theoretischer Basis² allgemeine Merkmale von Proteinrekrutierungskurven, die sogar ohne das Fitten der Daten Aussagen darüber erlauben, welche Bestandteile ein Modell zur Reproduktion der Daten benötigt. Die Erkenntnisse aus dem ersten Teil sollen unter anderem dabei helfen, ohne die Notwendigkeit von aufwendigen Auswertungen eine Vorauswahl der zur Beschreibung experimenteller Daten denkbaren Modelle zu treffen. Es wird sich allerdings zeigen, dass in bestimmten Situationen mehrere alternative Modelle einen gegebenen Datensatz ähnlich gut beschreiben. In diesen Fällen werden Experimente vorgeschlagen, mit deren Hilfe besser zwischen den alternativen Modellen unterschieden werden kann.

Sollte es trotz Anwendung der Erkenntnisse des ersten Teils nicht möglich sein, zwischen alternativen Modellen zu unterscheiden, so bietet sich die im zweiten Teil der Arbeit vorgestellte experimentelle Methode an. Diese zielt auf die gesteigerte Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle ab und basiert auf der FRAP-Methode. Hierbei werden zwei Laser verwendet, wobei der erste Laser der Erzeugung von DNA-Schäden dient und der Zweite dem Bleichen der fluoreszierenden Proteine. Mithilfe dieses Bleichens soll untersucht werden, wie schnell die an die DNA gebundenen Reparaturproteine ausgetauscht werden. Entscheidend hierbei ist, in welchem zeitlichen Abstand diese beiden Laser eingesetzt werden. Es wird sich zeigen, dass die aus der Verwendung des zweiten Lasers resultierenden Informationen erheblich zur Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle beitragen und letztlich zum Ausschluss von zwei der drei untersuchten Modelle führen. Darüber hinaus dient die im zweiten Teil vorgestellte Methode auch der Untersuchung, ob sich die chemischen Ratenkonstanten eines Proteins mit der Zeit ändern. Gründe hierfür können etwa posttranslationale Modifikationen³ sein. Durch die Möglichkeit einer derartigen Untersuchung unterscheidet sich diese Methode wesentlich von klassischen FRAP-Methoden.

Der dritte Teil dieser Arbeit untersucht auf rein theoretischer Basis den Einfluss des zeitlichen Abstandes zwischen der Bestrahlung zur Erzeugung von DNA-Schäden und der Verwendung des zweiten Lasers zum Bleichen der Proteine. Diese Untersuchung kommt zu dem Schluss, dass eine Kombination verschiedener zeitlicher Abstände zu den aussagekräftigsten Ergebnissen führt, also am ehesten den Ausschluss eines Modells ermöglicht.

Zusammenfassend werden in dieser Arbeit also sowohl theoretische als auch experimentelle Methoden vorgestellt, mit deren Hilfe die Unterscheidbarkeit alternativer Proteinrekrutierungsmodelle erhöht werden kann. Für zukünftige Experimente ist hierbei vor allem die Erkenntnis nützlich, dass die Verwendung von zwei Lasern zum Erzeugen der DNA-Schäden und zum Bleichen der fluoreszierenden Proteine die Unterscheidbarkeit der Modelle begünstigt. Insbesondere sind solche Experimente zu empfehlen, bei denen eine Kombination von verschiedenen zeitlichen Abständen zwischen dem Einsatz des ersten und dem des zweiten Lasers verwendet wird.

² Hiermit ist gemeint, dass die Lösungen der Differentialgleichungen verschiedener mechanistischer Modelle untersucht und miteinander verglichen werden.

³ Als posttranslationale Modifikation wird eine Gruppe von Modifikationen bezeichnet, die nach der Proteinsynthese stattfinden können.

2 Hintergrundwissen

2.1 Zellen, DNA und Proteine

Eine Zelle ist die kleinste lebende Einheit eines Organismus; wobei als Organismus sowohl Einzeller als auch Vielzeller verstanden werden. In Vielzellern differenzieren sich die Zellen, um der ihnen zukommenden Aufgabe in der Arbeitsteilung gerecht zu werden, und verlieren hierdurch die Fähigkeit, für sich alleine zu existieren. Die verschiedenen Arten von Zellen, die momentan auf unserem Planeten vorhanden sind, reichen bis in mehrere Zehnmillionen (Alberts et al., 2007). Allen gemeinsam sind aber folgende Eigenschaften, die gemeinhin als Definition für Leben (zumindest in ähnlicher Formulierung) verstanden werden:

1. Fähigkeit zur Vermehrung durch Zellteilung,
2. Reizbarkeit bzw. Fähigkeit zur Kommunikation mit der Umwelt,
3. Befähigung zur Bewegung,
4. das Vorhandensein eines eigenen Stoffwechsels,
5. Wachstum und Anpassungsfähigkeit.

Ein Bestandteil der Zelle, der für die soeben genannten Eigenschaften entscheidend ist, besteht in der DNA (englisch für deoxyribonucleic acid). Die DNA ist quasi die Bibliothek der Zelle und enthält die zur Zellentwicklung und für ihre Funktion notwendigen Informationen. Die DNA ist aus den vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) sowie Thymin (T) aufgebaut, wobei die Information durch die Abfolge dieser Basen kodiert ist. Bei sogenannten Eukaryoten (Zellen mit Zellkern) befindet sich die DNA im Zellkern, der durch eine Doppelmembran vom umgebenden Zytoplasma abgegrenzt ist. Bei Prokaryoten (Zellen ohne Zellkern) dagegen befindet sich die DNA frei im Zytoplasma. Sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten liegt die DNA als Doppelstrang aus komplementären Basensequenzen vor. Dies hat den bedeutenden Vorteil, dass, falls eine Seite des Doppelstrangs beschädigt wird, die Information auf dem komplementären zweiten Strang noch vorhanden ist und damit der beschädigte Strang zumeist ohne Informationsverlust wiederhergestellt werden kann. Der Prozess dieser Wiederherstellung wird als DNA-Reparatur bezeichnet.

Die DNA ist zwar als Informationsspeicher für die Zelle unerlässlich, für die oben genannten Merkmale ist es allerdings auch entscheidend, dass die Zelle über Arbeitseinheiten verfügt. Der Großteil der Operationen, die in einer Zelle anfallen, darunter auch die DNA-Reparatur, werden von sogenannten Proteinen durchgeführt. Diese sind aus Ketten von Aminosäuren aufgebaut, wobei das „Rezept“ für diese Kette in der DNA gespeichert ist. Die Neubildung von Proteinen wird als Proteinbiosynthese bezeichnet. Im ersten Schritt der Proteinbiosynthese muss die DNA zunächst ausgelesen werden und eine Abschrift der DNA verfasst werden. Diese Abschrift wird als mRNA bezeichnet (messenger ribonucleic acid) und der entsprechende Prozess heißt Transkription. Die mRNA besteht bis auf eine Ausnahme aus denselben Basen wie die DNA (Thymin wird durch Uracil (U) ersetzt). Bei Eukaryoten erfolgt die Transkription im Zellkern und bei Prokaryoten zwangsläufig im Zytoplasma.

Im zweiten Schritt der Proteinbiosynthese, der Translation, wird die auf der mRNA gespeicherte Abfolge von Basen in eine Abfolge von Aminosäuren übersetzt. Hierbei kodieren jeweils drei aufeinanderfolgende Basen eine Aminosäure. Durch die Abfolge von Aminosäuren ist allerdings lediglich die Primärstruktur des Proteins definiert. Für die spezifische Funktion eines Proteins ist letztlich auch die räumliche Struktur, also die Faltung der Aminosäurekette (Tertiärstruktur) entscheidend. Der genaue Ablauf dieser Faltung ist noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

Nach der Translation kann die Funktion des Proteins noch durch so genannte posttranslationale Modifikationen, etwa das Hinzufügen einer Azetylgruppe (Acetylierung) oder das Hinzufügen einer Phosphatgruppe (Phosphorylierung), verändert werden. Durch diese Modifikationen werden etwa der Aufbau und die räumliche Struktur eines Proteins, also auch seine Eigenschaften, verändert.

2.2 Zellzyklus

Unter dem Zellzyklus wird eine Reihe von Ereignissen verstanden, die letztendlich zur Zellteilung und damit der Entstehung von zwei Tochterzellen führen. Der Zellzyklus wird in folgende Phasen unterteilt:

1. G1-Phase (Gap 1): In dieser Phase nimmt die Größe der Zelle zu, während sie mRNA und Proteine als Vorbereitung für die folgende Phase synthetisiert.
2. S-Phase (Synthese): Die DNA wird verdoppelt. Anschließend existieren zwei DNA-Doppelstränge mit demselben Informationsgehalt (Schwesterchromatide).
3. G2-Phase (Gap 2): Die Größe der Zelle nimmt erneut zu und es werden Proteine zur Vorbereitung für die anschließende Phase synthetisiert.
4. M-Phase (Mitosis): In dieser Phase findet die Zellteilung statt.

Zusätzlich zu den oben genannten Phasen unterscheidet man noch die G0-Phase (Gap 0). Hiermit wird eine Ruhephase bezeichnet, in der die Zelle weder eine Zellteilung durchführt, noch Vorbereitungen hierfür trifft. Grund für den Übergang in die G0-Phase können unter anderem Stressfaktoren (z.B. Nahrungsmangel) sein. Einige Zellen verbleiben dauerhaft in der G0-Phase, wie beispielsweise ausdifferenzierte Nervenzellen.

2.3 DNA-Reparatur

Je nach Zellart entstehen pro Zelle und pro Tag mehrere Zehntausend DNA-Schäden (Bernstein et al., 2013). Die Auslöser dieser Schäden können sowohl extern (etwa Strahlung) als auch intern sein. Ein Beispiel für einen internen Auslöser sind Sauerstoffradikale, die zu oxidativen Schäden führen und letztlich ihren Ursprung im normalen Stoffwechselfvorgang der Zelle finden. Das Zustandekommen von Schäden ist demnach unvermeidlich. Für die Integrität der Zelle ist es daher unerlässlich, dass sie über DNA-Reparatur-Mechanismen verfügt, die die Reparatur der verschiedenen Arten von Schäden ermöglichen. Mitunter die bedeutendsten DNA-Reparatur-Mechanismen für Einzelstrangschäden (SSB für single-strand break) sind:

-
-
1. Basenexzisionsreparatur (BER): Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der Fehler in Form von oxidierten, alkylierten oder deaminierten Basen behebt. Tatsächlich kann dieser Mechanismus in zwei verschiedenen Formen auftreten. Das in dieser Arbeit verwendete Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen) dient im sogenannten long-patch BER als Ladeplattform. Es bildet einen homotrimerischen⁴ Ring um die DNA und ermöglicht anderen Proteinen, wie etwa FEN1 und Ligase I, die Interaktion mit der DNA. Im zweiten Reparaturweg, dem short-patch BER, kommt dagegen XRCC1 (X-ray cross complementing factor 1) als Ladeplattform im Zusammenspiel mit Ligase III eine bedeutende Rolle zu (Mortusewicz and Leonhardt, 2007).
 2. Nukleotidexzisionsreparatur (NER): Hierbei handelt es sich um einen Reparatur-Mechanismus für besonders „sperrige“, die Doppelhelixstruktur der DNA störende Schadensstellen. Auch in diesem Reparaturweg dient PCNA als Ladeplattform für weitere Proteine.
 3. Basenfehlpaarungsreparatur (MMR für mismatch repair): Ein Reparaturweg, der vor allem Fehler während der DNA-Replikation korrigiert.

Besonders gravierende Schäden liegen dann vor, wenn beide Stränge der DNA beschädigt sind. Dies wird als Doppelstrangbruch (DSB) bezeichnet. Die verheerende Wirkung von Doppelstrangbrüchen liegt in der Möglichkeit, dass bei mehreren gleichzeitig auftretenden Doppelstrangbrüchen die verbleibenden Bruchstücke teilweise fehlerhaft zusammengefügt werden. Wenn etwa ein Doppelstrang ursprünglich aus den fiktiven Teilstücken A und B bestand und der andere Doppelstrang aus den fiktiven Teilstücken C und D, kann ein gleichzeitiger Doppelstrangbruch dazu führen, dass nach der fehlerhaften Reparatur ein Doppelstrang aus A und C sowie der andere Doppelstrang aus B und D zusammengesetzt ist. Eine solche Änderung ist ein Beispiel für eine Translokation, die zusammen mit anderen Mutationen ähnlicher Art zur Gruppe der Chromosomenmutation zählt. Hierbei handelt es sich um schwerwiegende Mutationen, die im schlimmsten Fall zur Entstehung von Krebszellen und Erbkrankheiten führen.

Die Reparaturwege für Doppelstrangbrüche sind unter anderem:

1. Homologe Rekombination (homologous recombination): Die HR kann nur während der S- und der G2-Phase durchgeführt werden, da nur in diesen beiden Phasen des Zellzyklus ein homologes Schwesterchromatid existiert. Da auf dem Schwesterchromatid dieselbe Information gespeichert ist, die ursprünglich auf dem nun beschädigten Doppelstrang gespeichert war, kann der Doppelstrangbruch im besten Fall ohne Informationsverlust repariert werden.
2. Nicht-homologe Endverknüpfung (non-homologous end joining): Dieser Reparaturweg findet vor allem während der G1-Phase Anwendung, in der kein homologes Schwesterchromatid existiert. Durch diesen Mechanismus werden die Enden der Bruchstücke direkt miteinander verbunden. Sofern beim Doppelstrangbruch keine Basen verloren gegangen sind, kann dies zur Wiederherstellung der ursprünglichen Information führen. Allerdings ist es ebenso möglich, dass die Reparatur fehlerhaft verläuft und damit etwa die zuvor erwähnten Translokationen verursacht werden.

Ein im späteren Verlauf interessanter Aspekt der DNA-Reparatur ist, dass es durch das Zusammenspiel von verschiedenen Proteinen zur Entstehung von sogenannten Multiproteinkomplexen kommen kann, die aus verschiedenartigen Proteinen zusammengesetzt sind.

⁴ Homotrimerisch bedeutet: aus drei gleichartigen Untereinheiten aufgebaut.

Außerdem wird von Bedeutung sein, dass PCNA in der Reparatur von verschiedenen Arten von DNA-Schäden involviert ist.

2.4 Transfektion

Unter Transfektion wird die Einbringung von Fremd-DNA oder RNA in einen Organismus verstanden. Die Transfektion kann dabei stabil oder transient sein. Bei der stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA in das Genom des transfizierten Organismus eingebaut und wird damit bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitervererbt. Bei der transienten Transfektion wird die Fremd-DNA mithilfe von sogenannten Plasmiden oder auch RNA-Konstrukten in den Organismus eingebracht. Diese werden im Fall der transienten Transfektion allerdings nicht in das Genom des Organismus integriert und gehen daher im Laufe der Zeit (zumeist mehrere Tage) aufgrund der Zellteilung und anderer Faktoren verloren.

2.5 Fluoreszierende Proteine

Bereits 1962 wurde von Osamu Shimomura ein Protein der Qualle *Aequorea victoria* beschrieben, das durch Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura et al., 1962). Nach und nach wurden weitere Proteine entdeckt, die über andere Fluoreszenzeigenschaften verfügen. Die Bedeutung dieser Entdeckungen liegt darin, dass andere Proteine mit diesen fluoreszierenden Proteinen markiert werden können. Hierzu wird der entsprechende Organismus mit Fremd-DNA transfiziert, woraufhin er das Protein von Interesse in der fluoreszent markierten Version synthetisiert. Im Normalfall erfolgt allerdings weiterhin die Synthese von den natürlich vorkommenden, nicht fluoreszierenden Proteinen (Diese werden im Folgenden als endogene Proteine bezeichnet). Die endogenen Proteine sind damit genauso wie die fluoreszierenden Proteine an den in einem Experiment untersuchten Prozessen beteiligt, sind aber unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht sichtbar.

Inwiefern die fluoreszente Markierung die Eigenschaften des markierten Proteins verändert, ist Gegenstand der aktuellen Forschung. Soweit dem Autor bekannt liegen keine Anzeichen dafür vor, dass die fluoreszente Markierung einen wesentlichen Einfluss auf die Eigenschaften des markierten Proteins hat. Dennoch ist dies nicht auszuschließen, weshalb im Späteren auch ein Model untersucht wird, dass auf der Annahme unterschiedlicher Eigenschaften zwischen fluoreszenten und endogenen Proteinen basiert.

3 Untersuchung spezieller Merkmale von Proteinrekrutierungskurven im Zusammenhang mit den zugrundeliegenden Prozessen

Die Methode, Proteine fluoreszent zu markieren, ermöglicht es, die Verteilung und Dynamik von Proteinen innerhalb lebender Zellen zu messen (Day and Davidson, 2009). Als fluoreszent markierte Proteine werden hier Proteine verstanden, die mit einem fluoreszierendem Protein fusioniert wurden. Mithilfe der Gentechnik werden Zellen derart manipuliert, dass sie das zu untersuchende Protein in einer fluoreszent markierten Variante synthetisieren. Anschließend wird das Fluoreszenz-Signal der Zelle mit einem Fluoreszenz-Mikroskop gemessen. Eine Besonderheit dieser Methode liegt darin, dass die Zellen hierfür nicht fixiert⁵ werden müssen und die Methode damit die Untersuchung der in lebenden Zellen ablaufenden Prozesse erlaubt. Da die Intensität des Fluoreszenz-Signals proportional zur Konzentration der markierten Proteine ist, spiegelt die zeitliche und räumliche Änderung des Fluoreszenz-Signals die Änderung der Proteinkonzentration wider. Durch den Vergleich des Signals aus einer auf bestimmte Weise behandelten Region (etwa durch Bestrahlung), mit einer unbehandelten Region ist es möglich, die Antwort der Zelle auf diese Behandlung zu messen, also etwa die relative Änderung der Proteinkonzentration aufgrund der Rekrutierung der Reparaturproteine an die beschädigte DNA. Beispiele hierfür sind die Untersuchung des DNA-Reparaturprozesses nach der Erzeugung eines Schadens (Tobias et al., 2010) oder die Signaltransduktion infolge Licht-induzierter Interaktionen (Strickland et al., 2012).

Werden zwei oder mehr verschiedene Proteinspezies markiert, so können aus den Rekrutierungskurven Informationen über die Interaktionen zwischen den Proteinspezies erhalten werden, sofern die Konzentrationen der verschiedenen Spezies gleichzeitig gemessen werden.

Um aus den experimentellen Rekrutierungskurven die entscheidenden Informationen zu extrahieren, bedarf es eines theoretischen Modells. Im Folgenden werden hierzu verschiedene mechanistische Modelle verwendet. Derartige Modelle zielen gemeinhin darauf ab, die chemischen Ratenkonstanten zu ermitteln, diejenigen Proteine und Reaktionen zu identifizieren, die für den beobachteten Prozess (hier also die DNA-Reparatur) von entscheidender Bedeutung sind sowie Beweise für den Ablauf von Prozessen zu finden, die nicht direkt messbar sind. Häufig wird in mechanistischen Modellen die Diffusion der Proteine nicht explizit berücksichtigt. Dies ist dann eine gute Näherung, wenn die Rekrutierung der Proteine auf einer deutlich längeren Zeitskala geschieht als deren Diffusion, sodass die Proteinkonzentration innerhalb der bestrahlten Region nie erschöpft ist.

Um die in Zellen ablaufenden Prozesse möglichst detailgetreu wiederzugeben, enthalten mechanistische Modelle zumeist eine große Anzahl an Proteinspezies und mindestens das Dreifache dieser Zahl an freien Parametern (Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante sowie Anfangskonzentration für jede Proteinspezies). Aus dieser großen Zahl an freien Parametern folgt, dass mithilfe derartiger Modelle die Daten selbst dann gut gefittet, also reproduziert werden können, wenn das Modell unzulässig⁶ ist. Die Tatsache, dass ein solches Modell die Daten gut reproduziert, lässt daher nicht zwangsläufig den Schluss zu, dass das Modell die in der Natur ablaufenden Prozesse tatsächlich abbildet. Ein derartiges Modell ist demnach nur dann nützlich, wenn es durch die Verwendung anderer Methoden zusätzlich bestätigt wird oder die miteinander konkurrierenden Modelle qualitativ so un-

⁵ konserviert

⁶ Unzulässig in dem Sinne, dass das Modell durch nachfolgende Experimente oder anderweitige Informationen falsifiziert wird.

terschiedlich sind, dass trotz der großen Anzahl an Fit-Parametern nur eines von ihnen die Daten gut reproduzieren kann. Auch Mueller et al. (Mueller et al., 2010) betonen, dass verschiedene Modelle häufig ähnlich gut zur Beschreibung experimenteller Daten geeignet sind und Friedland et al. (Friedland et al., 2010) kommen etwa zu dem Schluss, dass die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von Ku70/80 und DNA-PKcs⁷ nicht zweifelsfrei aus den Daten gewonnen werden können.

In der vorliegenden Arbeit werden daher möglichst einfache Proteinrekrutierungsmodelle mit einer geringen Anzahl an freien Parametern verwendet und es wird davon ausgegangen, dass der Satz an Reaktionen, die die Rekrutierung des beobachteten Proteins beeinflussen, unbekannt ist. Es wird zudem durch den systematischen Vergleich verschiedener mechanistischer Modelle untersucht, welche Informationen aus Proteinrekrutierungskurven gewonnen werden können. Die Modelle berücksichtigen bis zu drei chemische Spezies, um die Anzahl der freien Parameter gering zu halten und dennoch Situationen beschreiben zu können, in denen eine Proteinspezies durch eine andere beeinflusst wird. Ein solcher Fall liegt etwa vor, wenn ein Protein als Ladeplattform für andere Proteine fungiert oder wenn zur Durchführung einer bestimmten Aufgabe das Vorhandensein von mehreren Proteinen am DNA-Schaden nötig ist.

In diesem ersten Teil der Arbeit wird gezeigt, dass die Art der Interaktion zwischen den Spezies häufig anhand der Kurvenform der Rekrutierungskurven abgeschätzt werden kann. Außerdem werden allgemeine Aussagen darüber getroffen, in welchen Situationen die Unterscheidung zwischen den verschiedenen theoretischen Modellen aufgrund experimenteller Daten möglich ist und unter welchen Bedingungen die Modelle ununterscheidbar sind. Schließlich wird gezeigt, dass in vielen Fällen, in denen die Modelle zunächst ununterscheidbar waren, die Durchführung von Experimenten bei verschiedenen Proteinkonzentrationen die Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle deutlich erhöht.

3.1 Methoden

Die in diesem ersten Teil der Arbeit verwendeten Modelle bestehen aus zwei bis drei chemischen Spezies. Eine dieser Spezies ist ein Substrat, etwa ein Einzelstrangbruch in der DNA, und die anderen Spezies sind Proteine, die an dieses Substrat binden können. Wir nehmen an, dass die Beziehungen zwischen den Spezies aus Elementarreaktionen aufgebaut sind:



und



In diesen Reaktionsgleichungen steht P für ein einzelnes Protein, S für ein Substrat und SP für ein Protein, das an das Substrat gebunden ist (also beispielsweise ein Reparaturprotein, das an eine DNA-Schadensstelle gebunden ist). Weiterhin wird mit $k_{S+P \rightarrow SP}$ die Reaktionskonstante⁸ der Hinreaktion (Assoziation) bezeichnet und mit $k_{SP \rightarrow S+P}$ die

⁷ Beide Proteine sind in der nicht-homologen Endverknüpfung, also einem Prozess zur Reparatur von Doppelstrangschäden, beteiligt.

⁸ In der Literatur wird als Synonym häufig auch der Begriff Geschwindigkeitskonstante verwendet.

Reaktionskonstante der Rückreaktion (Dissoziation). Aufgrund der Annahme, dass die Rekrutierung der Proteine auf einer längeren Zeitskala geschieht als deren Diffusion, wird zur Vereinfachung des Modells die Diffusion nicht berücksichtigt. Unter der Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten der obigen Reaktionsgleichungen proportional zu den beteiligten Konzentrationen sind⁹, können diese Gleichungen in folgendes System von Differentialgleichungen für die Konzentrationen der chemischen Spezies übersetzt werden:

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}[P][S] - k_{SP \rightarrow S+P}[SP]. \quad (3)$$

Eine Beschreibung anhand eines solch deterministischen Modells ist dann zulässig, wenn die Konzentrationen der chemischen Spezies in dem modellierten Volumen so hoch sind, dass die stochastische Natur der zugrundeliegenden chemischen Prozesse vernachlässigbar ist. Andernfalls können solch deterministische Modelle wie die hier diskutierten aber immer noch als Näherung sinnvoll und nützlich sein. Modelle mit mehr als zwei chemischen Spezies sind im Allgemeinen nicht analytisch lösbar. Allerdings gibt es für bestimmte Spezialfälle durchaus analytische Lösungen. Insbesondere gilt dies für die Situation, in der mindestens eine der chemischen Spezies quasi konstant ist. Dies ist beispielsweise der Fall, wenn die Konzentration der betrachteten Reparaturproteine wesentlich höher ist als die Konzentration der DNA-Schäden. Im Folgenden wird immer dann die quasi konstant Approximation (QKA) auf eine Proteinspezies X angewendet, wenn die Konzentration der frei diffundierenden Proteine $[X]$ während der Dauer des gesamten Rekrutierungsprozesses nahe dem Startwert $[X_0]$ ist und immer deutlich über der Konzentration der gebundenen Proteine $[SX]$ liegt. Es muss also $\frac{[X]}{[X_0]} \approx 1$ und $\frac{[SX]}{[X_0]} \ll 1$ gelten.

Die QKA kann im obigen Fall angewendet werden, falls $[P_0] \gg [S_0]$ gilt. Ist zusätzlich noch die Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P} = 0$, führt dies zu:

$$[P](t) = [P_0], \quad (4)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[SP]}{dt} = -k_{S+P \rightarrow SP}^* [S] \quad (5)$$

mit $k_{S+P \rightarrow SP}^* = k_{S+P \rightarrow SP}[P_0]$.

Die meisten der im Späteren diskutierten Modelle bestehen aus zwei Proteinspezies und einem Substrat. Nach Anwendung der QKA auf beide Proteinspezies setzt sich das Modell nur noch aus linearen Differentialgleichungen zusammen, die analytisch lösbar sind.

Um die Kurven verschiedener Parameterwerte miteinander vergleichen zu können, wurden die Kurven auf ihren Gleichgewichtswert normiert. Dies ist auch dadurch motiviert, dass in realen Experimenten häufig die absoluten Konzentrationen nicht bekannt sind und daher nur relative Änderungen der Proteinkonzentrationen ausgewertet werden können. Damit ergibt sich für Gleichung (5) folgende Lösung:

$$[S](t)/S_0 = e^{-k_{S+P \rightarrow SP}^* t}, \quad (6)$$

$$[SP](t)/S_0 = 1 - e^{-k_{S+P \rightarrow SP}^* t}. \quad (7)$$

In diesem Fall hat das System also nur einen freien Parameter $k_{S+P \rightarrow SP}^* = k_{S+P \rightarrow SP}P_0$.

Im Folgenden wird zunächst die Situation diskutiert, in der nur eine Proteinspezies an das Substrat bindet (beziehungsweise alle anderen real vorkommenden Proteine für die Interaktion des simulierten Proteins nur eine vernachlässigbare Rolle spielen). Anschließend werden Modelle diskutiert, die das Verhalten von zwei an dasselbe Substrat bindenden Proteinspezies beschreiben.

⁹ Siehe Massenwirkungsgesetz.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Ein-Protein-ein-Substrat-Modell

Das einfachste Modell eines Rekrutierungsprozesses umfasst eine Proteinspezies, ein Substrat, eine chemische Reaktion zur Beschreibung der Bindung des Proteins an das Substrat sowie zur Beschreibung der Dissoziation vom Substrat entsprechend den Gleichungen (86) bis (3). Dieses Modell ist analytisch auch ohne die QKA lösbar. Zunächst wird die Lösung für den Fall mit vernachlässigbarer Dissoziationsratenkonstante hergeleitet und anschließend die allgemeine Lösung.

Für $k_{SP \rightarrow S+P} = 0$ ergibt sich:

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}[P][S]. \quad (8)$$

Um dieses System von Differentialgleichungen zu lösen, benötigen wir folgende Gleichung, die beschreibt, dass die Gesamtanzahl der Teilchen im System erhalten ist (die Teilchen können zwar ihren Bindungszustand ändern, sie sind nach dieser Änderung aber immer noch im System vorhanden):

$$[SP] = P_0 - [P] = S_0 - [S]. \quad (9)$$

Mit dieser Gleichung kann die Differentialgleichung für die Konzentration der Substrate umgeschrieben werden in:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{S+P \rightarrow SP}([S] + P_0 - S_0)[S]. \quad (10)$$

Anschließend wird die Methode Separation der Variablen angewendet:

$$\frac{d[S]}{[S]([S] + P_0 - S_0)} = -k_{S+P \rightarrow SP} dt. \quad (11)$$

Aus der Literatur ist bekannt (Bronstein and Semendjajew, 1989):

$$\int \frac{dx}{x(ax+b)} = -\frac{1}{b} \ln \left| \frac{ax+b}{x} \right| + c \quad (12)$$

wobei c die Integrationskonstante ist.

Mithilfe von Gleichung (12) kann Gleichung (11) integriert werden mit folgenden Ergebnis:

$$-\frac{1}{P_0 - S_0} \ln \left| \frac{[S] + P_0 - S_0}{[S]} \right| = -k_{S+P \rightarrow SP} t - c \quad (13)$$

Umformen von Gleichung (9) ergibt: $[S] + P_0 - S_0 = [P] \geq 0$. Daher ist es möglich, Gleichung (13) ohne Betragsstriche zu schreiben:

$$\ln \frac{[S] + P_0 - S_0}{[S]} = (k_{S+P \rightarrow SP} t + c)(P_0 - S_0) \quad (14)$$

Umstellen dieser Gleichung nach $[S]$ und eine geeignete Wahl der Integrationskonstante ($[S](t=0) = S_0$ muss erfüllt sein) ergibt die Lösung für $[S]$:

$$\frac{[S]}{S_0} = \frac{1 - \frac{S_0}{P_0}}{e^{(1 - \frac{S_0}{P_0})k_{S+P \rightarrow SP}^* t} - \frac{S_0}{P_0}} \quad (15)$$

Aus Gleichung (9) folgt nun auch die Lösung für $[SP]$:

$$\frac{[SP](t)}{S_0} = 1 - \frac{1 - \frac{S_0}{P_0}}{e^{(1 - \frac{S_0}{P_0})k_{S+P \rightarrow SP}^* t} - \frac{S_0}{P_0}}. \quad (16)$$

Für den allgemeinen Fall, dass die Dissoziation nicht vernachlässigbar ist, muss das in Gleichung (3) dargestellte System aus Differentialgleichungen gelöst werden. Hierzu werden zunächst dieselben Schritte angewendet wie zur Herleitung von Gleichung (16) (Verwenden der Teilchenerhaltung und Separation der Variablen). Dies führt zu:

$$\frac{d[S]}{[S]^2 + (P_0 - S_0 + \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}})S - \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}}S_0} = -k_{S+P \rightarrow SP} dt \quad (17)$$

In der Literatur ist folgende Formel zum Integrieren derartiger Gleichungen zu finden (Bronstein and Semendjajew, 1989):

$$\int \frac{dx}{ax^2 + bx + r} = \frac{1}{\sqrt{b^2 - 4ar}} \ln \left| \frac{2ax + b - \sqrt{b^2 - 4ar}}{2ax + b + \sqrt{b^2 - 4ar}} \right| + c, \quad (18)$$

mit der Integrationskonstante c . Dies ermöglicht die Integration von Gleichung (17) und ergibt:

$$\frac{1}{\sqrt{b^2 - 4r}} \ln \left| \frac{2[S] + b - \sqrt{b^2 - 4r}}{2[S] + b + \sqrt{b^2 - 4r}} \right| = -k_{S+P \rightarrow SP} t - c, \quad (19)$$

mit:

$$b = P_0 - S_0 + \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}}, \quad (20)$$

$$r = -\frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}} S_0. \quad (21)$$

Um zu erkennen, auf welche Weise die Betragsstriche in obiger Gleichung wirken (entweder sie haben keine Wirkung oder sie kehren das Vorzeichen um), wird zunächst untersucht, ob $2[S] + b - \sqrt{b^2 - 4r}$ negativ ist.

Im ersten Schritt wird berechnet, welche Werte $[S]$ annehmen kann. Das Maximum ist offensichtlich der Startwert S_0 und das Minimum entspricht dem Grenzwert $\lim_{t \rightarrow \infty} [S](t) = S^*$. Dieser Grenzwert ergibt sich daraus, dass die Dissoziationsrate $k_{S+P \rightarrow SP}[P^*][S^*]$ und die Assoziationsrate $k_{SP \rightarrow S+P}[SP^*]$ im Gleichgewicht sind (hier stehen S^* , P^* und SP^* für die Konzentrationen, die sich in diesem Gleichgewicht eingestellt haben). Es muss also folgende Gleichung erfüllt sein:

$$\frac{dS^*}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}[P^*][S^*] - k_{SP \rightarrow S+P}[SP^*] = 0 \quad (22)$$

Aus der Teilchenerhaltung (Gleichung (9)) folgt $P^* = S^* + P_0 - S_0$ und $SP^* = S_0 - S^*$. Einsetzen in Gleichung (22) ergibt eine quadratische Gleichung in S^* , deren Lösung gegeben ist durch:

$$S^* = -\frac{P_0 - S_0 + \frac{k_{S+P \rightarrow SP}}{k_{SP \rightarrow S+P}}}{2} + \sqrt{\frac{(P_0 - S_0 + \frac{k_{S+P \rightarrow SP}}{k_{SP \rightarrow S+P}})^2}{4} + \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}} S_0} \quad (23)$$

Da in diesem Modell für $t = 0$ s noch keine Proteine an ein Substrat gebunden sind ($SP(t=0) = 0$), ist der Wert von $\frac{d[S]}{dt}$ niemals positiv. Daher wird $[S]$ monoton abfallen von S_0 auf S^* . Dementsprechend sind die möglichen Werte für $[S]$ gegeben durch:

$$S_0 \geq [S] \geq S^* \quad (24)$$

Damit gilt also folgende Abschätzung:

$$2[S] + b - \sqrt{b^2 - 4r} \geq 2S^* + b - \sqrt{b^2 - 4r} = 0. \quad (25)$$

Die Betragsfunktion in Gleichung (19) hat also keine Auswirkung, weshalb die Gleichung auch geschrieben werden kann als:

$$\frac{1}{\sqrt{b^2 - 4r}} \ln \frac{2[S] + b - \sqrt{b^2 - 4r}}{2[S] + b + \sqrt{b^2 - 4r}} = -k_{S+P \rightarrow SP} t - c, \quad (26)$$

Umstellen dieser Gleichung nach $[S]$ und die Verwendung von $[SP] = S_0 - [S]$ ergibt die allgemeine Lösung dieses Modells:

$$\frac{[SP](t)}{S_0} = 1 - \frac{-e^{(-\frac{S_0}{P_0} k_{S+P \rightarrow SP}^* t + q_3) q_2} (q_2 + q_1) + q_1 - q_2}{2(e^{(-\frac{S_0}{P_0} k_{S+P \rightarrow SP}^* t + q_3) q_2} - 1)} \quad (27)$$

mit

$$q_1 = \frac{P_0}{S_0} \left(1 + \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}^*} \right) - 1, \quad (28)$$

$$q_2 = \sqrt{(q_1)^2 + \frac{4P_0 k_{SP \rightarrow S+P}}{S_0 k_{S+P \rightarrow SP}^*}}, \quad (29)$$

$$q_3 = \frac{1}{q_2} \ln \frac{2 + q_1 - q_2}{2 + q_1 + q_2}. \quad (30)$$

Das Maximum dieser Funktion SP^* entspricht dem Grenzwert $\lim_{t \rightarrow \infty} [SP](t)$ und ist gegeben durch:

$$\frac{[SP^*]}{S_0} = \frac{q_1}{2} + 1 - \sqrt{\left(\frac{q_1}{2} + 1\right)^2 - \frac{P_0}{S_0}}. \quad (31)$$

Für den Fall, dass die QKA anwendbar ist, vereinfacht sich die Lösung zu:

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}^* [S] - k_{SP \rightarrow S+P} [SP] \quad (32)$$

mit $k_{S+P \rightarrow SP}^* = k_{S+P \rightarrow SP}[P_0]$ und

$$\frac{[SP](t)}{SP^*} = 1 - e^{-(k_{S+P \rightarrow SP}^* + k_{SP \rightarrow S+P})t} \quad (33)$$

mit $SP^* = \frac{S_0}{1 + \frac{k_{SP \rightarrow S+P}}{k_{S+P \rightarrow SP}^*}}$. Interessanterweise enthält diese Lösung die zwei Ratenkonstanten nur als Summe $k^{\text{eff}} = k_{S+P \rightarrow SP}[P_0] + k_{SP \rightarrow S+P}$. Falls die Proteinkonzentration also wesentlich höher als die Substratkonzentration ist, kann aufgrund der auf das Maximum normierten Kurven nicht darauf geschlossen werden, ob Dissoziation eine Rolle spielt oder nicht. Ein Fit der Daten würde in diesem Fall nur den Wert von k^{eff} liefern, nicht aber den Wert der einzelnen Ratenkonstanten $k_{S+P \rightarrow SP}$ und $k_{SP \rightarrow S+P}$.

Zusätzlich ergibt sich aus Gleichung (33), dass eine Erhöhung der Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}$ einen ähnlichen Effekt hat wie die Erhöhung von $k_{S+P \rightarrow SP}^*$. Auch wenn dies auf den ersten Blick gegen die Intuition erscheinen mag, so liegt der Grund für diesen Effekt darin, dass die Erhöhung von $k_{SP \rightarrow S+P}$ den Wert des absoluten Maximums (also ohne Normierung) senkt, gleichzeitig aber nur eine geringe Wirkung auf die anfängliche Steigung der nicht normierten Kurve hat, da der Wert von $[SP](t)$ in der Anfangsphase sehr gering bzw. am Startpunkt sogar gleich Null ist. Beides führt dazu, dass eine Erhöhung der Dissoziationsratenkonstante eine Zunahme der Steigung der normierten Kurve bewirkt.

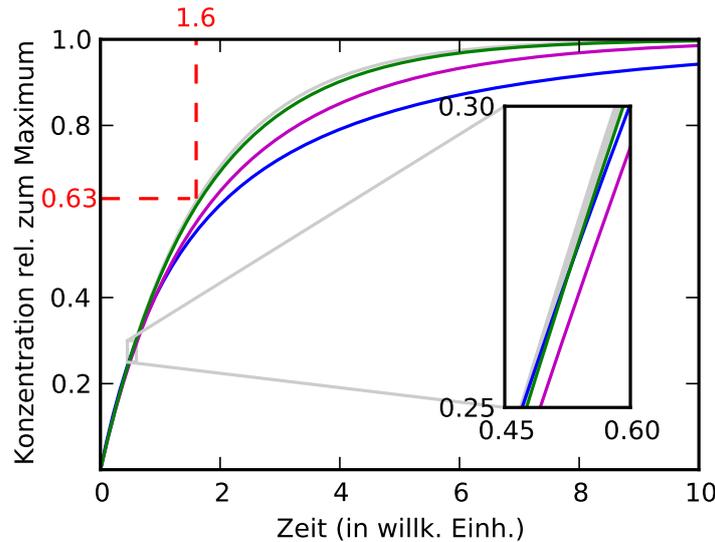


Abbildung 1: Dargestellt ist die Wirkung einer Variation von S_0 im Modell mit einem Protein, einem Substrat und nicht vernachlässigbarer Dissoziationsratenkonstante. Farbige Kurven: Exakte analytische Lösung (Gleichung (27)) normiert auf SP^* (Gleichung (31)) mit $P_0 = 6 \cdot 10^3$, $k_{S+P \rightarrow SP} = 10^{-4}$, $k_{SP \rightarrow S+P} = 10^{-2}$. Der Wert von S_0 nimmt von der untersten Kurve (blau, $S_0 = 6 \cdot 10^3$) bis zur obersten Kurve (grün, $S_0 = 500$) ab. Graue Kurve: QKA Lösung (Gleichung (33)) mit $k_{S+P \rightarrow SP}^* = 0.6$ und $k_{SP \rightarrow S+P} = 10^{-2}$. Der Ausschnitt zeigt den Bereich, in dem die blaue Kurve die grüne Kurve schneidet, mit einer 15-fachen Vergrößerung. Die roten gestrichelten Linien dienen zur Parameterabschätzung entsprechend der Beschreibung im Haupttext.

Abbildung 1 zeigt die normierten Rekrutierungskurven dieses Modells für verschiedene Werte von S_0 . Eine Besonderheit dieses Modells ist, dass die Rekrutierungskurven

verschiedener Parameterwerte sich gegenseitig schneiden können (siehe vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 1). Dies ist unmöglich, falls die Dissoziationsratenkonstante gleich Null ist. Zusätzlich kann man erkennen, dass mit abnehmendem S_0 die Kurven gegen die aus der QKA resultierende Lösung (graue Kurve in Abbildung 1) konvergieren.

Schließlich wird in Abbildung 1 auch demonstriert, wie man den Parameter k^{eff} anhand der Kurven ablesen kann: Zuerst wird ein beliebiger Punkt auf der Kurve gewählt, etwa der Startpunkt bei $t = 0$ s. Dann muss die Differenz dieses Funktionswertes (also Null) zur Asymptote (deren Wert bei 1 liegt) bestimmt werden. Anschließend wird ein zweiter Funktionswert gewählt, dessen Differenz zur Asymptote um den Faktor $\frac{1}{e} \approx 0.37$ kleiner als die vorige Differenz ist. In dem hier betrachteten Fall entspricht das also dem Punkt mit dem Funktionswert 0.63. Das Zeitintervall zwischen den beiden auf diese Art gewählten Punkten gibt nun das Inverse der Ratenkonstante an. In diesem Fall ist das Zeitintervall 1.6 s und damit erhalten wir näherungsweise: $k_{S+P \rightarrow SP}^* + k_{SP \rightarrow S+P} \approx \frac{1}{1.6} \approx 0.63$.

Zusammenfassend sind die Kurven dieses Ein-Protein-ein-Substrat-Modells also monoexponentiell, falls die QKA anwendbar ist. Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten können in diesem Fall nicht separat voneinander bestimmt werden. Es ist lediglich möglich, den Wert der Summe $k_{S+P \rightarrow SP}^* + k_{SP \rightarrow S+P}$ aus dem Fit der normierten Kurve zu gewinnen. Wenn die QKA nicht zutrifft, sind die Kurven nicht monoexponentiell und zum Fitten der Daten sollte Gleichung (16) (vernachlässigbare Dis.) oder (27) (nicht vernachlässigbare Dis.) verwendet werden. Im Fall einer vernachlässigbaren Dissoziationsratenkonstante können aus derartigen Fits die Parameter $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ und S_0/P_0 abgelesen werden und im Fall einer nicht vernachlässigbaren Dissoziationsratenkonstante die Parameter $k_{S+P \rightarrow SP}^*$, S_0/P_0 und $k_{SP \rightarrow S+P}/k_{S+P \rightarrow SP}^*$.

Aufgrund der Einfachheit der möglichen Kurvenformen wird häufig ein Fit von Gleichung (16) (vernachlässigbare Dis.) auch dann verhältnismäßig gut ausfallen (also eine geringe Abweichung zu den experimentellen Daten haben), wenn der Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}/k_{S+P \rightarrow SP}^*$ in der Realität gar nicht klein ist, also die Dissoziation nicht vernachlässigbar ist. In diesem Fall könnte man also aufgrund des erfolgreichen Fits fälschlicherweise zu dem Schluss gelangen, dass die Dissoziation vernachlässigbar ist. Solange also keine zusätzlichen Informationen über die Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}$ vorliegen (etwa durch FRAP-Experimente, wie sie ihm späteren Teil dieser Arbeit vorgestellt werden) oder über die absoluten Konzentrationen, ist es nicht möglich, den Wert von $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ aus derartigen Rekrutierungskurven zu extrahieren. Allerdings wird ein Fit von Gleichung (16) die obere Grenze für $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ angeben. Unter der Annahme, dass die Dissoziationsratenkonstante nicht größer als $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ ist, kann man zusätzlich davon ausgehen, dass der reale Wert von $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ irgendwo zwischen dieser oberen Grenze und deren Hälfte liegt. Daher kann zumindest die Größenordnung des Parameters $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ abgeschätzt werden. Beispielsweise ergab die Parameterabschätzung der grauen Rekrutierungskurve in Abbildung 1 einen Wert von $k_{S+P \rightarrow SP}^* + k_{SP \rightarrow S+P} \approx 0.63$. Hieraus folgt also $k_{S+P \rightarrow SP}^* \leq 0.63$. Wenn es zusätzlich noch Hinweise darauf gibt, dass im Gleichgewicht mindestens die Hälfte der Substrate ein Protein an sich binden, führt dies zu $k_{S+P \rightarrow SP}^* \geq k_{SP \rightarrow S+P}$. Damit ist also der höchste Wert für $k_{SP \rightarrow S+P}$ und der niedrigste Wert für $k_{S+P \rightarrow SP}^*$ gegeben durch: $k_{SP \rightarrow S+P} = k_{S+P \rightarrow SP}^* = 0.63/2$.

Immer dann, wenn ein solches Ein-Protein-ein-Substrat-Modell beim Fitten der experimentellen Daten versagt, ist dies ein Hinweis darauf, dass zusätzliche Proteine im Rekrutierungsprozess beteiligt sind und die Rekrutierung des betrachteten Proteins beeinflussen. Typischerweise führt dies zu Rekrutierungskurven mit komplizierterem Kurvenverlauf als den in diesem Abschnitt diskutierten Kurven. Um zu verstehen, auf welche Weise ein zusätzliches Protein die Dynamik des beobachteten Proteins beeinflussen kann und wie sich

dies in den Kurvenformen bemerkbar macht, werden im nächsten Abschnitt verschiedene Modelle mit zwei chemischen Spezies und einem Substrat diskutiert. Die zweite chemische Spezies muss hierbei nicht zwangsläufig ein weiteres Protein sein, es könnte sich auch allgemein um eine beliebige Molekülart handeln, die einen Einfluss auf die Ratenkonstanten des beobachteten Proteins hat.

3.2.2 Zwei-Proteine-ein-Substrat-Modelle

In diesem Abschnitt werden verschiedene Modelle diskutiert, die zwei Proteinspezies A und B sowie ein Substrat S berücksichtigen. Der Einfluss eines zusätzlichen Proteins kann sich auf die Assoziations- und die Dissoziationsratenkonstante des beobachteten Proteins erstrecken und diese Ratenkonstanten sowohl erhöhen als auch herabsetzen. Die analytische Lösung des vollen Modells (ohne QKA) ist sehr komplex und beinhaltet hypergeometrische Reihen. Daher beschränkt sich diese Arbeit auf die Fälle, in denen die QKA anwendbar ist, was im Übrigen auf die meisten Rekrutierungs-Experimente (einschließlich der im zweiten Teil dieser Arbeit untersuchten Experimente) zutrifft. Die QKA bedeutet hier also, dass $[A_0] \gg [S_0]$ und $[B_0] \gg [S_0]$ gilt (die beiden Proteinspezies liegen in deutlich höherer Konzentration vor als die DNA-Schäden).

Mit $[SA]$ bzw. $[SB]$ wird die Konzentration von an das Substrat gebundenem A bzw. B bezeichnet und $[SAB]$ steht für die Konzentration des Komplexes, in dem sowohl A als auch B gemeinsam an das Substrat gebunden sind. $[S]$ ist abermals die Konzentration von ungebundenem Substrat. $k_{S+A \rightarrow SA}$ ($k_{S+B \rightarrow SB}$) gibt die Assoziationsratenkonstante von A (B) an für den Fall, dass B (A) nicht bereits an das Substrat gebunden ist, wohingegen $k_{SB+A \rightarrow SAB}$ ($k_{SA+B \rightarrow SAB}$) für die Assoziationsratenkonstante steht, falls B (A) bereits an das Substrat gebunden ist. Die entsprechenden Dissoziationsratenkonstanten sind durch $k_{SA \rightarrow S+A}$, $k_{SAB \rightarrow SB+A}$, $k_{SB \rightarrow S+B}$ und $k_{SAB \rightarrow SA+B}$ gegeben.

Das Modell besteht aus folgendem System von Differentialgleichungen:

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S] + k_{SB \rightarrow S+B}[SB] + k_{SA \rightarrow S+A}[SA], \quad (34)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] + k_{SAB \rightarrow SA+B}[SAB] - (k_{SA \rightarrow S+A} + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*)[SA], \quad (35)$$

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] + k_{SAB \rightarrow SB+A}[SAB] - (k_{SB+A \rightarrow SAB}^* + k_{SB \rightarrow S+B})[SB], \quad (36)$$

$$\frac{d[SAB]}{dt} = k_{SB+A \rightarrow SAB}^*[SB] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA] - (k_{SAB \rightarrow SB+A} + k_{SAB \rightarrow SA+B})[SAB] \quad (37)$$

mit $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{S+A \rightarrow SA}A_0$, $k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}A_0$, $k_{S+B \rightarrow SB}^* = k_{S+B \rightarrow SB}B_0$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = k_{SA+B \rightarrow SAB}B_0$. Die Summe all dieser Gleichungen ist gleich Null, da die Gesamtkonzentration von gebundenem und ungebundenem Substrat sich nicht ändern kann (entspricht der zuvor erwähnten Teilchenerhaltung).

Zur besseren Verständlichkeit werden im Folgenden bestimmte Versionen dieses Modells (in denen etwa nur eine der Raten durch das zweite Protein beeinflusst wird) einzeln besprochen. Durch Kombination der sich hieraus ergebenden Erkenntnisse geben diese jedoch auch über den allgemeinen Fall (Beide Raten werden gleichzeitig beeinflusst) Aufschluss.

Im ersten Schritt werden Modelle diskutiert, in denen alle Dissoziationsratenkonstanten ($k_{SA \rightarrow S+A}$, $k_{SAB \rightarrow SB+A}$, $k_{SB \rightarrow S+B}$ und $k_{SAB \rightarrow SA+B}$) als vernachlässigbar angenommen werden und in denen die Assoziationsratenkonstante von mindestens einer Proteinspezies durch eine andere Spezies beeinflusst wird ($k_{S+B \rightarrow SB} \neq k_{SA+B \rightarrow SAB}$). Dem schließt sich die Untersuchung über solche Fälle an, in denen die Dissoziationsratenkonstanten nicht vernachlässigbar sind und in denen die Assoziationsratenkonstanten unbeeinflusst durch die jeweils andere Proteinspezies sind ($k_{S+A \rightarrow SA} = k_{SB+A \rightarrow SAB}$ und $k_{S+B \rightarrow SB} = k_{SA+B \rightarrow SAB}$).

3.2.3 Protein A beeinflusst die Assoziationsratenkonstante von Protein B

Häufig geschieht die Assoziation eines Proteins auf einer kürzeren Zeitskala als dessen Dissoziation. Wenn die Rekrutierungskurven auf einer Zeitskala analysiert werden, auf der die Dissoziation nicht relevant ist, können die Dissoziationsratenkonstanten $k_{SA \rightarrow S+A}$, $k_{SAB \rightarrow SB+A}$, $k_{SB \rightarrow S+B}$ und $k_{SAB \rightarrow SA+B}$ gleich Null gesetzt werden. Zusätzlich wird in diesem und den folgenden Modellen davon ausgegangen, dass die QKA anwendbar ist und dass die Assoziationsratenkonstante des Proteins A unabhängig vom Bindungszustand des Proteins B ist ($k_{S+A \rightarrow SA} = k_{SB+A \rightarrow SAB}$). Demgegenüber wird die Assoziationsratenkonstante von Protein B als beeinflusst von der Gegenwart der Proteine A angenommen ($k_{S+B \rightarrow SB} \neq k_{SA+B \rightarrow SAB}$). Wie im weiteren Verlauf gezeigt wird, kann der allgemeine Fall, in dem die Proteine gegenseitig ihre Assoziationsratenkonstanten beeinflussen, aus dem hier diskutierten Spezialfall abgeleitet werden. Die Differentialgleichungen dieses Modells sind gegeben durch:

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S], \quad (38)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA], \quad (39)$$

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] - k_{S+A \rightarrow SA}^*[SB], \quad (40)$$

$$\frac{d[SAB]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[SB] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA]. \quad (41)$$

Die Lösung für $[S](t)$ ist trivial:

$$[S](t) = S_0 e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}. \quad (42)$$

Hiermit kann Gleichung (40) umgeschrieben werden in:

$$\frac{d[SB]}{dt} = -k_{S+A \rightarrow SA}^*[SB] + k_{S+B \rightarrow SB}^* S_0 e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}. \quad (43)$$

Dies ist eine inhomogene, lineare, gewöhnliche Differentialgleichung, die mithilfe der Standardmethode Variation der Konstanten gelöst werden kann, um $[SB](t)$ zu erhalten:

$$[SB](t) = S_0 (1 - e^{-k_{S+B \rightarrow SB}^* t}) e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}. \quad (44)$$

Mithilfe derselben Schritte kann auch Gleichung (39) gelöst werden:

$$[SA](t) = \frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*} (-e^{-(k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{S+A \rightarrow SA}^*)t} + e^{-k_{SA+B \rightarrow SAB}^* t}). \quad (45)$$

Nach Einsetzen von $[SB](t)$ und $[SA](t)$ in Gleichung (41) muss nur noch deren rechte Seite integriert werden. Daraus ergibt sich:

$$[SAB](t) = S_0 \left(1 - e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} - [SA](t) \right). \quad (46)$$

Da Protein A in diesem Modell nicht beeinflusst wird, entspricht die Rekrutierungskurve von A derjenigen aus dem bereits diskutierten Ein-Protein-ein-Substrat-Modell. Für den Spezialfall $k_{S+B \rightarrow SB}^* \gg k_{S+A \rightarrow SA}^*$, in dem die Rekrutierung von B näherungsweise abgeschlossen ist, bevor $[SA]$ überhaupt in nennenswertem Umfang aufgebaut wurde, entspricht auch die Rekrutierungskurve von B derjenigen aus dem Ein-Protein-ein-Substrat-Modell. Dementsprechend macht sich in diesem Fall die Beeinflussung durch das Protein A nicht in den Rekrutierungskurven von B bemerkbar. In allen anderen Fällen ($k_{SA+B \rightarrow SAB}^* > k_{S+B \rightarrow SB}^*$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* < k_{S+B \rightarrow SB}^*$), in denen A entweder die Assoziationsratenkonstante herauf- oder herabsetzt, wirkt sich diese Beeinflussung auf die Form der Rekrutierungskurven von B aus. Aufgrund der qualitativ unterschiedlichen Wirkung auf die Kurvenform werden diese beiden Fälle allerdings getrennt voneinander diskutiert.

3.2.3.1 Protein A erhöht die Assoziationsratenkonstante von B

In diesem Abschnitt wird der Fall $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* > k_{S+B \rightarrow SB}^*$ analysiert, in dem also die Assoziationsratenkonstante von B durch Protein A erhöht wird. Abbildung 2 zeigt, dass bei geeigneter Wahl der Parameter, wie etwa bei der blauen und violetten Kurve, die Rekrutierungskurve von B (also die Gesamtkonzentration von gebundenem Protein B : $[SB](t) + [SAB](t)$) eine positive zweite Ableitung aufweist. Die Steigung der Rekrutierungskurve nimmt also in der Anfangsphase zu. Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen die zweite Ableitung der Rekrutierungskurve positiv ist, muss die Ableitung von $\left(\frac{d[SB]}{dt} + \frac{d[SAB]}{dt} \right)$ gebildet werden:

$$\begin{aligned} \frac{d\left(\frac{d[SB]}{dt} + \frac{d[SAB]}{dt}\right)}{dt} &= \frac{d(k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA])}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^* \frac{d[S]}{dt} + k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \frac{d[SA]}{dt} \\ &= -k_{S+B \rightarrow SB}^* (k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^* (k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA]) \end{aligned} \quad (47)$$

Da wir uns nur für die Anfangssteigung interessieren, können wir die Startwerte $[S] = S_0$ und $[SA] = 0$ einsetzen und erhalten:

$$\frac{d\left(\frac{d[SB]}{dt} + \frac{d[SAB]}{dt}\right)}{dt} = -k_{S+B \rightarrow SB}^* (k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*) S_0 + k_{SA+B \rightarrow SAB}^* k_{S+A \rightarrow SA}^* S_0 \quad (48)$$

Durch Umformen ergibt sich hieraus, dass die zweite Ableitung der Rekrutierungskurve dann positiv ist, falls gilt:

$$\frac{k_{SA+B \rightarrow SAB}^*}{k_{S+B \rightarrow SB}^*} > \frac{k_{S+B \rightarrow SB}^*}{k_{S+A \rightarrow SA}^*} + 1 \quad (49)$$

Unter realen Bedingungen kann die anfängliche Zunahme der Steigung jedoch durch die Streuung der experimentellen Daten verdeckt werden. Je größer die linke Seite von Gleichung (49) im Vergleich zur rechten Seite ist, desto eher kann diese Eigenschaft der Kurve trotz des Rauschens erkennbar sein.

Auch im Fall, dass keine nach oben gerichtete Krümmung der Kurve sichtbar ist (wie etwa in der grünen Kurve in Abbildung 2A), ist die Steigung der Kurve aufgrund der

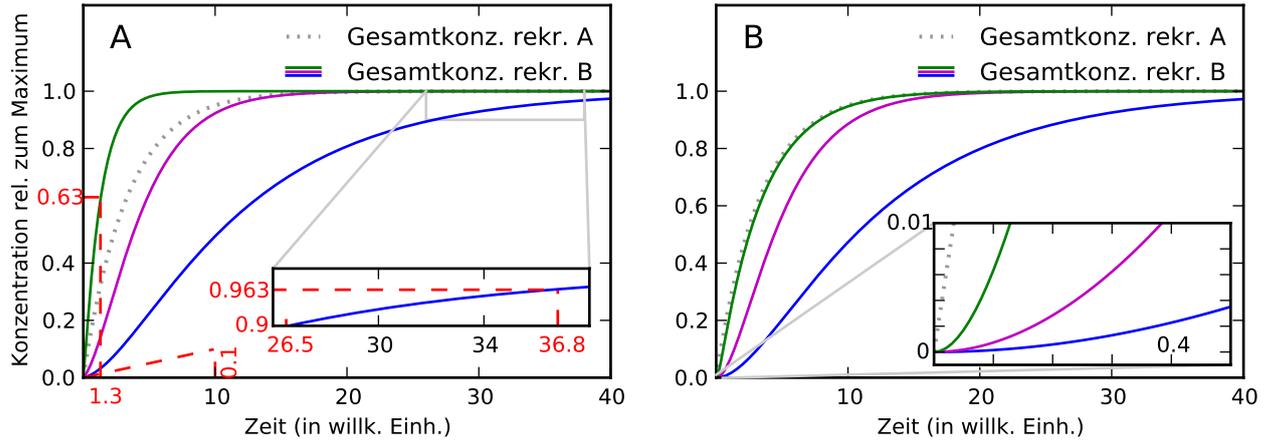


Abbildung 2: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Assoziationsratenkonstante von B erhöht. $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0.1, 0.5, 5$ von der untersten zur obersten durchgezogenen Kurve. A) $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.1 k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$. Die durchgezogenen Kurven stehen für die normierten Rekrutierungskurven von Protein B , die gepunktete Kurve für die Rekrutierungskurve von A und die roten, gestrichelten Kurven werden zur Abschätzung der Ordnung der Parameter verwendet. Diese Abschätzung führt zu: $k_{S+B \rightarrow SB}^* \approx \frac{1}{1.3} \approx 0.77$ für die steilste Kurve, sowie $k_{S+B \rightarrow SB}^* \approx 10^{-2}$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \approx \frac{1}{36.8-26.5} \approx 0.097$ für die unterste Kurve. Abhängig von der Wahl der Parameter zeigen die Kurven eine Zunahme der Anfangssteigung. B) Bis auf $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$ wurden dieselben Parameter wie in A) verwendet. Die Kurven zeigen immer eine Zunahme der Anfangssteigung, wodurch dieser Fall von der Situation $k_{S+B \rightarrow SB}^* > 0$ unterschieden werden kann. Zusätzlich führt im Fall $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$ eine Erhöhung von B_0 dazu, dass sich die Rekrutierungskurven von B denjenigen von A annähern und im Grenzfall für beliebig hohes B_0 sogar gleichen. Dies ist nicht der Fall, solange $k_{S+B \rightarrow SB}^* > 0$ gilt.

Beeinflussung durch das zweite Protein steiler als im Fall einer Exponentialfunktion mit Exponenten k_{S+B}^* . Der Spezialfall $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$, in dem Protein B also nicht ohne A binden kann) ist durch eine Anfangssteigung von Null charakterisiert (siehe Abbildung 2B). Im realen Experiment mag die zeitliche Auflösung zu gering oder das Rauschen zu groß sein, um diese Eigenschaft der Kurve zu erkennen. Wenn allerdings mehrere Experimente zu verschiedenen Werten von B_0 (der Gesamtkonzentration des beobachteten Proteins) durchgeführt werden, ist es möglich, den Fall $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$ auch dadurch zu identifizieren, dass mit zunehmendem B_0 die Rekrutierungskurven von B asymptotisch gegen die Rekrutierungskurve von A gehen:

$$\lim_{k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \rightarrow \infty} [SAB](t) = S_0(1 - e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}) \quad (50)$$

Der Grund hierfür ist, dass in diesem Fall Protein B eben nicht ohne die Anwesenheit von A binden kann und die Rekrutierungskurve von B damit nur der Rekrutierungskurve von A folgen kann bzw. im Extremfall von unendlich hohem B_0 der Kurve von A entspricht (siehe Abbildung 2B). Demgegenüber kann die Rekrutierungskurve von B mit zunehmendem B_0 beliebig steil werden, falls $k_{S+B \rightarrow SB}^* > 0$ gilt, da die Rekrutierung von B dann

auch ohne die Anwesenheit von A stattfinden kann (siehe Abbildung 2A). Falls das beeinflussende Protein nicht bekannt ist und damit dessen Rekrutierungskurve nicht gemessen werden kann, so hilft dieses Kriterium dennoch, die zwei Fälle zu unterscheiden: Gilt $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$, dann werden sich die Rekrutierungskurven von B ab einem bestimmten Wert von B_0 kaum noch ändern, sollte B_0 weiter erhöht werden. Im Fall $k_{S+B \rightarrow SB}^* > 0$ führt eine Erhöhung von B_0 dagegen immer zu einer Zunahme der Anfangssteigung der Rekrutierungskurve von B , unabhängig davon, ob B_0 bereits sehr hoch ist. Wenn das Protein A unbekannt ist, kann es natürlich sein, dass die natürliche Schwankung von A_0 dazu führt, dass die Rekrutierungskurven von A von Experiment zu Experiment unterschiedlich sind. Dies erschwert die Anwendung des soeben beschriebenen Kriteriums. Allerdings hilft auch hierbei das Wissen, dass im Falle von $k_{S+B \rightarrow SB}^* > 0$ die Rekrutierung von B bei einer Zunahme von B_0 auf einer beliebig kurzen Zeitskala stattfinden kann. Demgegenüber ist die Zeitskala, auf der die Rekrutierung von B im Fall $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0$ stattfindet, durch die Rekrutierung von A begrenzt.

Die Parameter $k_{S+B \rightarrow SB}^*$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$ können über die Betrachtung der frühen und der späten Rekrutierungsphase abgeschätzt werden. Die Kurvenform ist in diesen Phasen hauptsächlich durch den Wert von $k_{S+B \rightarrow SB}^*$ bzw. $k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$ bestimmt. Die Anfangssteigung der Rekrutierungskurve von B ist identisch mit $k_{S+B \rightarrow SB}^*$ (da zu diesem Zeitpunkt Protein A noch gar nicht gebunden ist) und sollte zumindest grob anhand realer Rekrutierungsdaten abgeschätzt werden können. Falls $k_{S+B \rightarrow SB}^* > k_{S+A \rightarrow SA}^*$ gilt, kann alternativ auch der Zeitpunkt ermittelt werden, an dem die normierte Rekrutierungskurve den Wert $1 - 1/e \sim 0.63$ erreicht. Dieser Zeitpunkt ist eine grobe Näherung von $1/k_{S+B \rightarrow SB}^*$ zur Abschätzung der Größenordnung dieses Parameters. Je kleiner $k_{S+A \rightarrow SA}^*$ im Vergleich zu $k_{S+B \rightarrow SB}^*$ ist, desto genauer ist diese Abschätzung. Die anhand der grünen Kurve in Abbildung 2A durchgeführte Abschätzung führt etwa zu $k_{S+B \rightarrow SB}^* \approx \frac{1}{1.3} \approx 0.77$, wohingegen der tatsächlich in dieser Simulation verwendete Wert für diese Kurve bei $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.5$ lag. Die Abweichung kommt gerade dadurch zustande, dass Protein A die Assoziationsratenkonstante heraufsetzt und die Kurve hierdurch steiler wird.

Falls das Protein B langsamer rekrutiert wird als A , kann der Wert von $k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$ aus der späten Phase der Rekrutierung abgeschätzt werden: Hierzu muss gemessen werden, in welchem Zeitintervall die Differenz zur Asymptote, die den Wert 1 annimmt, auf $1/e \sim 37\%$ der Differenz zu Beginn dieses Zeitintervalls gefallen ist. Im vergrößert dargestellten Ausschnitt in Abbildung 2A ergibt sich etwa folgendes: Zunächst wird der Punkt ausgewählt, an dem die Kurve den Funktionswert 0.9 zum Zeitpunkt $t = 26.5$ s aufweist. Die Differenz zur Asymptote ist an dieser Stelle $1 - 0.9 = 0.1$. Nun muss derjenige Zeitpunkt gefunden werden, an dem die Differenz von Asymptote und Kurve $0.37 \cdot 0.1 = 0.037$ entspricht, also den Wert $1 - 0.037 = 0.963$ annimmt. Der entsprechende Zeitpunkt ist $t = 36.8$ s. Damit ergibt sich die Abschätzung $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \approx \frac{1}{36.8 - 26.5} \approx 0.097$, wohingegen in dieser Simulation tatsächlich der Wert $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0.1$ verwendet wurde. Die Abschätzung ist also sehr gut, da zu diesem Zeitpunkt die Rekrutierung von A fast komplett abgeschlossen ist (graue, gepunktete Kurve in Abbildung 2A) und die Rekrutierungskurve von B ab diesem Zeitpunkt sehr gut durch eine monoexponentielle Funktion mit dem Parameter $k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$ genähert werden kann.

Ein Beispiel für reale Daten, die eine positive zweite Ableitung zu Beginn der Rekrutierungsphase zeigen, sind die Kurven von 53BP1, die von Tobias et al. (Tobias et al., 2010) gemessen wurden. Tatsächlich ist auch bekannt, dass die Bindung von 53BP1 von anderen Proteinen abhängt, so wie es in dem hier vorgestellten Modell beschrieben wird.

Im Allgemeinen wird sich eine Zunahme der Anfangssteigung dann zeigen, wenn das gemessene Protein mit deutlich höherer Rate bindet, sobald ein anderes Protein bereits am

Substrat gebunden ist. Alternativ könnte die Beeinflussung der Assoziationsratenkonstante auch durch eine Modifikation der DNA zustande kommen, etwa einer Phosphorylierung. Es ist daher entscheidend, darauf zu achten, ob die Rekrutierungskurven eine Zunahme der Anfangssteigung zeigen. Dies ist immerhin ein Indikator für die Beeinflussung des beobachteten Proteins und kann damit zu wertvollen Erkenntnissen führen.

3.2.3.2 Protein A verringert die Assoziationsratenkonstante von B

In diesem Abschnitt wird der Fall $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* < k_{S+B \rightarrow SB}^*$ diskutiert, in dem Protein A einen verringernden Einfluss auf die Assoziationsratenkonstante von B hat. Abbildung 3A zeigt typische Rekrutierungskurven für diese Situation. Nachdem die Konzentration von gebundenem A hoch ist, wird die Rekrutierung von B deutlich verlangsamt (violette Kurve bei etwa $t = 5$ s) und die Steigung der Rekrutierungskurve von B nimmt dementsprechend deutlich schneller ab (violette Kurve bei etwa $t = 5$ s) als dies in einer monoexponentiellen Funktion mit ähnlicher Anfangssteigung möglich wäre (graue durchgezogene Kurve). Auch ein Drei-Parameter-Fit des Ein-Protein-ein-Substrat-Modells mit Dissoziation (Gleichung (27)) schlägt fehl (der entsprechende Fit ist der Übersichtlichkeit wegen nicht dargestellt). Der Grund hierfür ist folgender: Die Krümmung in der Rekrutierungskurve von B wird dadurch hervorgerufen, dass die Konzentration von gebundenem A so gut wie gesättigt ist und nicht, wie im Fall der Ein-Protein-ein-Substrat-Modelle, durch die Entleerung der Bindungsstellen für B . In den Ein-Protein-ein-Substrat Modellen erfolgt die Krümmung der Rekrutierungskurve nämlich aufgrund der Tatsache, dass die Konzentration von S gegen Null geht. Dies ist in dem hier betrachteten Modell nicht der Fall. Der starke Abfall der Steigung der Rekrutierungskurve (im weiteren Knick genannt) kann in diesem Modell durchaus auch dann stattfinden, wenn die Konzentration von gebundenem B ($[SB](t) + [SAB](t)$) noch weit von der Sättigung entfernt ist.

Ein interessanter Spezialfall ist durch $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$ gegeben (Abbildung 3B). Hier verhindert Protein A die Assoziation von B und die Konzentration von gebundenem B kann beschrieben werden durch:

$$[SB](t) + [SAB](t) = S_0 \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{k_{S+A \rightarrow SA}^*}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}}\right) e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}. \quad (51)$$

Entsprechend dieser Gleichung ist die Rekrutierungskurve von B monoexponentiell. Daher können die Kurven in diesem Fall nicht von denjenigen der Ein-Protein-ein-Substrat-Modelle unterschieden werden und man könnte fälschlicherweise zu dem Schluss kommen, dass Protein B unbeeinflusst ist. Sollte allerdings auch die Konzentration von A bekannt sein (etwa ein Protein, von dem man vermutet, dass es B beeinflusst), ist eine Unterscheidung dieser Fälle möglich: Falls B durch Protein A blockiert wird ($k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$), führt eine Erhöhung von A_0 zu einer Verringerung des absoluten Maximums der Rekrutierungskurve von B (siehe Abbildung 4). Im anderen Fall, in dem B also unbeeinflusst durch A ist, sollte es keinen Zusammenhang zwischen dem Wert von A_0 und dem Wert des absoluten Maximums der Rekrutierungskurven von B geben. Besteht also der Verdacht, dass ein bestimmtes Protein ein anderes Protein blockiert, kann dieser Test zur Überprüfung verwendet werden.

3.2.3.3 Protein A beeinflusst die Assoziationsratenkonstante von B (Dissoziation ist relevant)

Kann die Dissoziationsratenkonstante von B nicht vernachlässigt werden, sind ansonsten aber alle Bedingungen gleich denjenigen aus dem vorigen Abschnitt (QKA ist anwendbar,

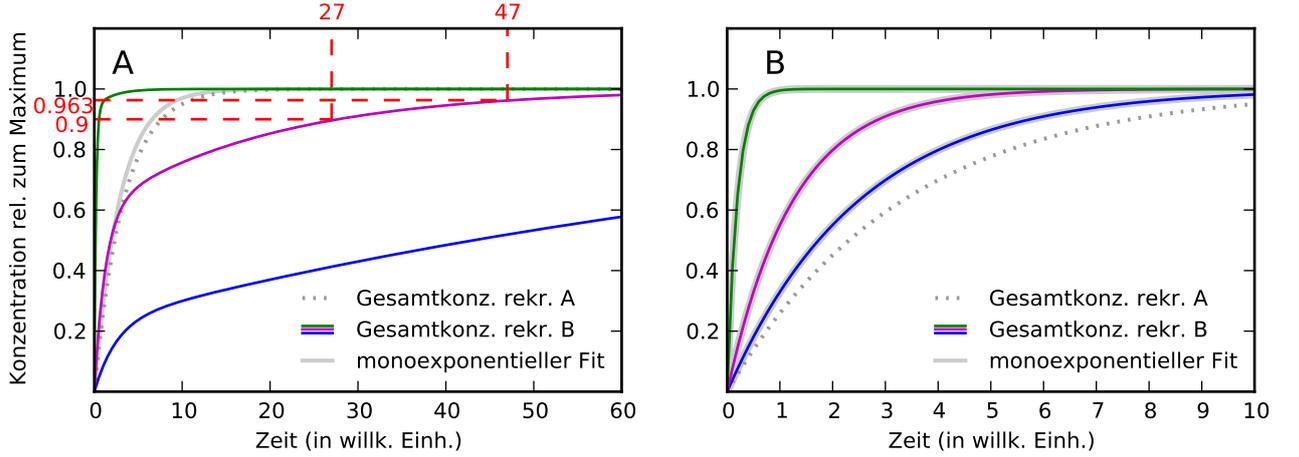


Abbildung 3: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Assoziationsratenkonstante von B verringert. $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$ und $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.1, 0.5, 5$ von der untersten zur obersten durchgezogenen Kurve. A) $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0.1 k_{S+B \rightarrow SB}^*$. Die durchgezogenen Kurven stehen für die normierten Rekrutierungskurven von Protein B , die gepunktete Kurve für die Rekrutierungskurve von A und die durchgezogene, graue Kurve ist ein monoexponentieller Fit. Die gestrichelten Linien dienen der Parameterabschätzung und führen auf: $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \approx \frac{1}{47-20} \approx 0.05$. Nachdem das gebundene A eine hohe Konzentration erreicht hat, wird die Rekrutierung von B erheblich langsamer und die Steigung der Rekrutierungskurve von B nimmt dementsprechend deutlich schneller ab (violette Kurve bei etwa $t = 5$ s), als dies in einer monoexponentiellen Funktion mit ähnlicher Anfangssteigung möglich wäre (graue durchgezogene Kurve). B) Bis auf $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$ wurden dieselben Parameter wie in A) verwendet. Die Kurven haben immer eine monoexponentielle Form.

$k_{S+A \rightarrow SA} = k_{SB+A \rightarrow SAB}$, $k_{S+B \rightarrow SB} \neq k_{SA+B \rightarrow SAB}$, $k_{SA \rightarrow S+A} = k_{SAB \rightarrow SB+A} = 0$, $k_{SB \rightarrow S+B} = k_{SAB \rightarrow SA+B} > 0$), ist das System aus Differentialgleichungen für dieses Modell gegeben durch:

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S] + k_{SB \rightarrow S+B}[SB], \quad (52)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] + k_{SB \rightarrow S+B}[SAB] - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA], \quad (53)$$

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] - (k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{SB \rightarrow S+B})[SB], \quad (54)$$

$$\frac{d[SAB]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[SB] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA] - k_{SB \rightarrow S+B}[SAB]. \quad (55)$$

Das Addieren der ersten und dritten dieser vier Gleichungen sowie das Addieren der zweiten und vierten Gleichung führt zu:

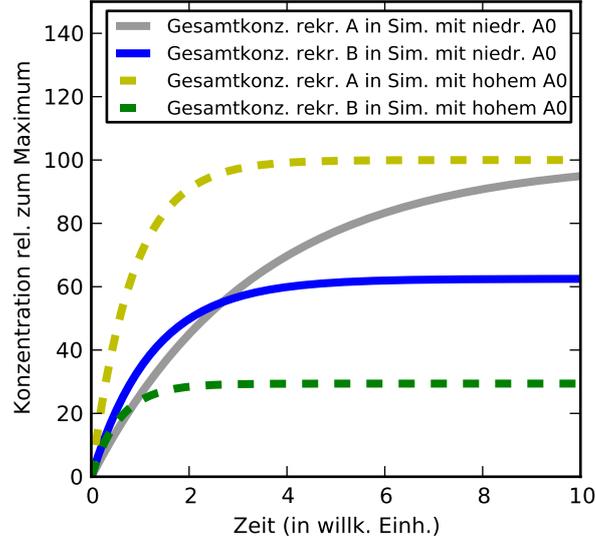


Abbildung 4: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Assoziationsratenkonstante von B verringert: Spezialfall $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$ (A blockiert B). $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$ (durchgezogene Kurven), $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 1.2$ (gestrichelte Kurven), $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.5$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$. Die Rekrutierungskurve von B im Fall mit niedrigem A_0 (durchgezogene blaue Kurve) weist ein höheres Maximum auf als die Rekrutierungskurve von B im Fall mit hohem A_0 (gestrichelte grüne Kurve). Diese Eigenschaft hilft zur Unterscheidung zwischen diesem Modell (A blockt B) und den Ein-Substrat-ein-Protein-Modellen ohne Beeinflussung.

$$\frac{d([S] + [SB])}{dt} = -k_{S+A \rightarrow SA}^*([S] + [SB]), \quad (56)$$

$$\frac{d([SA] + [SAB])}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*([S] + [SB]). \quad (57)$$

Diese Differentialgleichungen entsprechen denen aus dem Methodenteil bekannten Differentialgleichungen des Ein-Protein-ein-Substrat-Modells ohne Dissoziation (Gleichung (5)) sofern $[S]$ in Gleichung (5) mit $([S] + [SB])$ und $[SP]$ mit $([SA] + [SAB])$ ersetzt wird. Der Grund für diese Übereinstimmung liegt darin, dass die Gleichungen (56) und (57) nur noch das Verhalten von A , das in diesem Modell nicht dissoziiert, beschreiben und nicht mehr auch das Verhalten von B . Dementsprechend ergibt sich die Lösung durch Einsetzen in Gleichung (6) und (7):

$$[S](t) + [SB](t) = S_0 e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}, \quad (58)$$

$$[SA](t) + [SAB](t) = S_0 (1 - e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}). \quad (59)$$

Das Auflösen von Gleichung (58) nach $[S](t)$ und Einsetzen in Gleichung (54) ergibt:

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^* (S_0 e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} - [SB]) - (k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{SB \rightarrow S+B})[SB]. \quad (60)$$

Da in dieser Gleichung nur noch $[SB]$ als Variable auftaucht, kann diese inhomogene Differentialgleichung mithilfe der Standardmethode Variation der Konstanten gelöst werden. Dies ergibt:

$$[SB](t) = e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} \frac{S_0}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} (1 - e^{-(k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B})t}). \quad (61)$$

Dieselben Schritte führen zur Lösung für $[SA](t)$ und $[SAB](t)$: Zunächst muss Gleichung (59) nach $[SA](t)$ umgestellt werden:

$$[SA](t) = S_0(1 - e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}) - [SAB](t). \quad (62)$$

Anschließend wird $[SA](t)$ entsprechend obiger Gleichung sowie $[SB](t)$ entsprechend Gleichung (61) in Gleichung (55) eingesetzt, um eine Differentialgleichung zu erhalten, in der nur noch $[SAB](t)$ als Variable auftaucht. Diese kann wiederum mithilfe der Variation der Konstanten gelöst werden und führt zu:

$$[SAB](t) = \frac{S_0}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^*}} + \left(\frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} - S_0 k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \right) \frac{e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^* + k_{SB \rightarrow S+B} - k_{S+A \rightarrow SA}^*} - \frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} \frac{e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B})t}}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^* - k_{S+A \rightarrow SA}^* - k_{S+B \rightarrow SB}^*} + r e^{-(k_{SA+B \rightarrow SAB}^* + k_{SB \rightarrow S+B})t}, \quad (63)$$

mit:

$$r = - \left(\frac{S_0}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^*}} + \left(\frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} - S_0 k_{SA+B \rightarrow SAB}^* \right) \frac{1}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^* + k_{SB \rightarrow S+B} - k_{S+A \rightarrow SA}^*} - \frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} \frac{1}{k_{SA+B \rightarrow SAB}^* - k_{S+A \rightarrow SA}^* - k_{S+B \rightarrow SB}^*} \right). \quad (64)$$

Bis auf zwei Ausnahmen sind die Eigenschaften dieses Modells dieselben wie die des zuvor diskutierten Modells (beeinflusste Assoziationsratenkonstante ohne Berücksichtigung der Dissoziation): Wenn die Assoziationsratenkonstante von B durch A erhöht wird, kann dies bei bestimmten Parametern zu einer positiven zweiten Ableitung der Rekrutierungskurve von B führen und wenn die Assoziationsratenkonstante von B durch A herabgesetzt wird, kann dies zu einer Kurve mit Knick ähnlich den in Abbildung 3 dargestellten Kurven führen. Da diese Eigenschaften des Modells sehr ähnlich sind, werden sie hier nicht nochmals im Detail diskutiert.

Ein neu hinzugekommenes, prägnantes Merkmal der Kurven dieses Modells ist in Abbildung 5 zu sehen: Im Gegensatz zu allen vorherigen Modellen können die Kurven dieses Modells ein Maximum aufweisen, das größer als das Plateau bei der Gleichgewichtskonzentration ist. Eine Bedingung für dieses Merkmal ist, dass A nicht schneller als B rekrutiert wird. Außerdem muss $k_{S+B \rightarrow SB} > k_{SA+B \rightarrow SAB}$ und $k_{SB \rightarrow S+B} > 0$ gelten, also die Assoziationsratenkonstante muss durch A verringert werden und die Dissoziation darf nicht vernachlässigbar sein. Der Grund für diesen Overshoot (Maximum gefolgt von

Plateau) ist, dass bei etwa $t \approx \frac{2}{k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B}}$ die Assoziations- und Dissoziationsrate von B ausgeglichen sind. Die Kurve hat daher an dieser Stelle ein Maximum, an dem sie verweilen würde, wenn die Konzentration von gebundenem A nach diesem Zeitpunkt konstant wäre. Da die Konzentration von gebundenem A allerdings weiter zunimmt, wird hierdurch die Assoziationsratenkonstante von B und damit auch der Gleichgewichtswert von B herabgesetzt. Dieser Prozess findet erst dann ein Ende, wenn die Rekrutierung von A abgeschlossen ist.

Interessanterweise zeigt die Rekrutierungskurve von B mit dem niedrigsten Wert von B_0 das höchste Maximum. Dies kann dadurch erklärt werden, dass diese Kurve über die niedrigste asymptotische Konzentration bei $t = \infty$ verfügt (absoluter Wert) und die Kurven auf diesen Wert normiert wurden.

Das zweite neu hinzugekommene Merkmal dieses Modells ist, dass auch im Fall $k_{S+B \rightarrow SB} < k_{SA+B \rightarrow SAB}$ die Rekrutierungskurven von B einen Knick aufweisen können, bei dem die Steigung zu stark abfällt, um von einer monoexponentiellen Funktion gefittet zu werden (die Kurven ähneln qualitativ denen aus Abbildung 3A). Im vorigen Modell war dies nur für den Fall $k_{S+B \rightarrow SB} > k_{SA+B \rightarrow SAB}$ möglich! Der Grund, warum dieses Modell einen derartigen Knick auch für $k_{S+B \rightarrow SB} < k_{SA+B \rightarrow SAB}$ erzeugen kann, ist ähnlich wie derjenige für den Overshoot: Bei $t \approx \frac{2}{k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B}}$ sind die Assoziations- und die Dissoziationsrate von B etwa ausgeglichen. Je nach Parameterwahl ist die Rekrutierung von A an diesem Zeitpunkt aber nicht abgeschlossen, wodurch der Gleichgewichtswert von B langsam nach oben verschoben wird. Diese im Vergleich zur Rekrutierung von B langsam ablaufende Verschiebung des Gleichgewichtswerts erzeugt den Knick in der Rekrutierungskurve von B . Da im vorherigen Modell bei gegebener Wahl von $k_{S+B \rightarrow SB}$ und $k_{SA+B \rightarrow SAB}$ nur eines der Merkmale (zunehmende Steigung in der Anfangsphase oder Knick) auftauchen konnte, wohingegen in diesem Modell beide Merkmale der Kurven auftauchen können, sind die Modelle unterscheidbar. In realen Experimenten könnte dies wieder über eine Variation von B_0 getestet werden: Zeigen die Kurven bei einem geringen Wert von B_0 eine Zunahme der Steigung in der Anfangsphase, deutet dies darauf hin, dass $k_{S+B \rightarrow SB} < k_{SA+B \rightarrow SAB}$ gilt. Es ist allerdings noch unklar, ob die Dissoziation berücksichtigt werden muss oder nicht. Zeigen die Rekrutierungskurven von B bei einer Erhöhung von B_0 aber einen Knick ähnlich den in Abbildung 3A dargestellten Kurven, kann hierdurch darauf geschlossen werden, dass Dissoziation eine Rolle spielt. Immerhin wäre dies im vorherigen Modell (ohne Dissoziation) unmöglich.

3.2.3.4 Protein A und B beeinflussen die Assoziationsratenkonstante des jeweils anderen Proteins

In den vorigen Abschnitten wurden Fälle untersucht, in denen nur die Assoziationsratenkonstante von B beeinflusst wurde. In diesem Abschnitt wird dagegen die Situation behandelt, in der sowohl $k_{S+A \rightarrow SA} \neq k_{SB+A \rightarrow SAB}$ als auch $k_{S+B \rightarrow SB} \neq k_{SA+B \rightarrow SAB}$ gilt. Die Proteine beeinflussen also beide die Assoziationsratenkonstante des jeweils anderen Proteins. Es wird wieder angenommen, dass die Dissoziationsrate beider Proteine vernachlässigt werden kann ($k_{SA \rightarrow S+A} = k_{SAB \rightarrow SB+A} = k_{SB \rightarrow S+B} = k_{SAB \rightarrow SA+B} = 0$) und weiterhin die QKA anwendbar ist. Die Differentialgleichungen dieses Modells sind damit gegeben durch:

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S], \quad (65)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA], \quad (66)$$

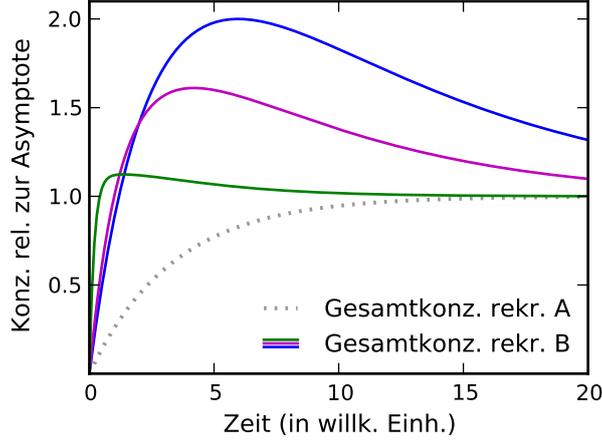


Abbildung 5: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Assoziationsratenkonstante von B verringert und in dem die Dissoziation von B relevant ist. $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$ und $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 5, 0.5, 0.1$ von der grünen zur blauen Kurve; $k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0.1 k_{S+B \rightarrow SB}^*$ und $k_{SB \rightarrow S+B} = 0.1$. Die Kurven sind auf den asymptotischen Wert bei $t = \infty$ normiert. Im Gegensatz zu den vorherigen Modellen weisen die Rekrutierungskurven dieses Modells ein Maximum auf, das höher ist als die Gleichgewichtskonzentration, falls die Rekrutierung von A langsamer stattfindet als die von B und zusätzlich $k_{S+B \rightarrow SB} > k_{SA+B \rightarrow SAB}$ sowie $k_{SB \rightarrow S+B} > 0$ gilt.

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] - k_{SB+A \rightarrow SAB}^*[SB], \quad (67)$$

$$\frac{d[SAB]}{dt} = k_{SB+A \rightarrow SAB}^*[SB] + k_{SA+B \rightarrow SAB}^*[SA]. \quad (68)$$

Die Herleitung der Lösung dieser Gleichungen erfolgt analog zur Herleitung der Gleichungen (42) bis (46): Zunächst wird die Differentialgleichung für $[S](t)$ gelöst. Nach dem Einsetzen von $[S](t)$ in die Differentialgleichungen für $[SA](t)$ und $[SB](t)$ sind die entsprechenden Gleichungen mit der Methode Variation der Konstanten lösbar. Anschließend erhält man die Lösung von $[SAB](t)$ durch Integration. Aus den soeben beschriebenen Schritten ergeben sich folgende Lösungen:

$$[S](t) = S_0 e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}, \quad (69)$$

$$[SA](t) = \frac{S_0 k_{S+A \rightarrow SA}^*}{k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* - k_{SA+B \rightarrow SAB}^*} (e^{-k_{SA+B \rightarrow SAB}^* t} - e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}), \quad (70)$$

$$[SB](t) = \frac{S_0 k_{S+B \rightarrow SB}^*}{k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* - k_{SB+A \rightarrow SAB}^*} (e^{-k_{SB+A \rightarrow SAB}^* t} - e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}), \quad (71)$$

$$[SAB](t) = S_0 \left(1 - e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t} \right) - [SA](t) - [SB](t). \quad (72)$$

Die Lösung für $[SA](t)$ und $[SB](t) + [SAB](t)$ ist identisch mit der im vorigen Abschnitt ermittelten Lösung für das Modell, in dem A nicht durch B beeinflusst wurde und in dem die Dissoziationsrate von beiden vernachlässigbar war (Gleichungen (44) bis (46)).

Dementsprechend enthält die Rekrutierungskurve von B keine Informationen darüber, ob B die Assoziationsratenkonstante von A beeinflusst oder nicht. Allerdings ist die Lösung für $[SA](t) + [SAB](t)$ in den beiden Modellen nicht identisch. Es also nur dann möglich, herauszufinden, ob die Beeinflussung gegenseitiger Natur ist, falls die Rekrutierungskurven von beiden Proteinen gemessen werden.

Ein interessanter Spezialfall ergibt sich, falls $k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$ gilt. Dies bedeutet, dass die Proteine in Konkurrenz um die Substrate stehen. In diesem Fall sind die normierten Kurven $[SA](t)/[SA](\infty)$ und $[SB](t)/[SB](\infty)$ gleich der monoexponentiellen Funktion $1 - e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)t}$. Sie sättigen demnach beide zum selben Zeitpunkt. Werden also nur die normierten Kurven betrachtet, so ist diese Situation nicht unterscheidbar von der Situation, in der die beiden Proteine gemeinsam als Komplex rekrutiert werden. Auch in dem letztgenannten Fall wären die Rekrutierungskurven identisch.

Falls die beiden Proteine in Konkurrenz um die Substrate stehen, führt eine Erhöhung der Anfangskonzentration des einen Proteins allerdings zu einer Verringerung des Sättigungswerts des anderen Proteins. Durch den Vergleich der Sättigungswerte von verschiedenen Experimenten sollte es also möglich sein, diesen Fall zu erkennen. Werden die beiden Proteine gemeinsam als Komplex rekrutiert, so sollte eine Erhöhung der Anfangskonzentration des einen Proteins keinen negativen Effekt auf die Sättigungskonzentration des anderen Proteins haben.

Zuvor wurde bereits der Fall diskutiert, in dem A die Rekrutierung von B verhindert, selbst aber unbeeinflusst von B ist. Diese Situation kann von der hier vorgestellten, in dem auch B die Rekrutierung von A verhindert, wieder durch die Durchführung von Experimenten bei unterschiedlichen Anfangskonzentrationen unterschieden werden. Falls eine Erhöhung von B_0 dazu führt, dass die Rekrutierungskurve von A früher und bei einem niedrigeren Wert sättigt, so stehen die zwei Proteine in Konkurrenz um die Substrate. Ist der Verlauf der Rekrutierungskurve von A dagegen unabhängig von B_0 , so liegt der zuvor diskutierte Fall vor, in dem nur A die Rekrutierung von B verhindert.

3.2.4 Protein A beeinflusst die Dissoziationsratenkonstante von B

Im Allgemeinen kann ein Protein nicht nur die Assoziationsratenkonstante eines anderen Proteins sondern auch dessen Dissoziationsratenkonstante beeinflussen. Daher wird in diesem Abschnitt der Fall untersucht, in dem die Dissoziation von B durch Protein A beeinflusst wird. Um den Effekt einer beeinflussten Dissoziationsratenkonstante möglichst ungestört untersuchen zu können wird angenommen, dass die Assoziationsratenkonstante von beiden Proteinen nicht durch das jeweils andere Protein beeinflusst wird. Demnach gilt $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^*$ sowie $k_{S+B \rightarrow SB}^* = k_{SA+B \rightarrow SAB}^*$. Im Gegensatz zu den vorherigen Modellen gilt $k_{SB \rightarrow S+B} > 0$ und $k_{SAB \rightarrow SA+B} \geq 0$ mit $k_{SB \rightarrow S+B} \neq k_{SAB \rightarrow SA+B}$. Es wird wie schon zuvor angenommen, dass die Dissoziationsrate von Protein A vernachlässigbar ist ($k_{SA \rightarrow S+A} = k_{SAB \rightarrow SB+A} = 0$) und dass die quasi konstant Approximation anwendbar ist. Aus den allgemeinen Differentialgleichungen (34) bis (37) ergeben sich also für dieses Modell folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{d[S]}{dt} = -(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^*)[S] + k_{SB \rightarrow S+B}[SB], \quad (73)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[S] - k_{S+B \rightarrow SB}^*[SA] + k_{SAB \rightarrow SA+B}[SAB], \quad (74)$$

$$\frac{d[SB]}{dt} = k_{S+B \rightarrow SB}^*[S] - (k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{SB \rightarrow S+B})[SB], \quad (75)$$

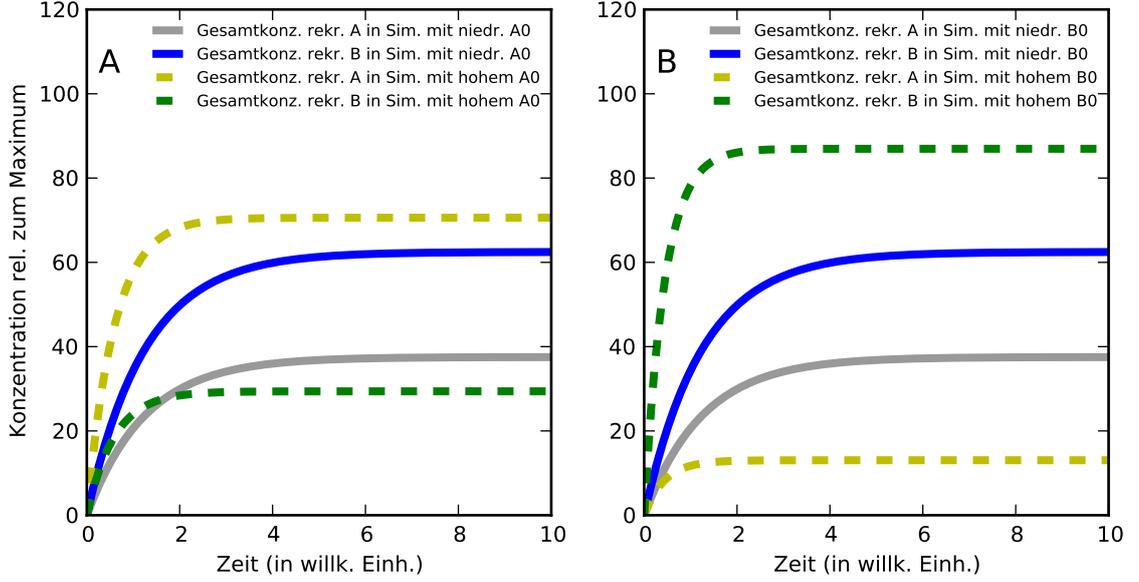


Abbildung 6: Rekrutierungskurven des Modells, in dem die Proteine sich gegenseitig beeinflussen. Spezialfall: $k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = k_{SA+B \rightarrow SAB}^* = 0$ (Die Proteine stehen in Konkurrenz um die Substrate). A) $k_{S+A \rightarrow SA}^* = 0.3$ (durchgezogene Kurven), $k_{S+A \rightarrow SA}^* = 1.2$ (gestrichelte Kurven), $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.5$ (beide Kurven). B) $k_{S+A \rightarrow SA}^* = 0.3$ (beide Kurven), $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.5$ (durchgezogene Kurven), $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 2$ (gestrichelte Kurven). Besondere Merkmale: Eine Erhöhung der Konzentration des einen Proteins führt immer zur Verringerung des Sättigungswertes des anderen Proteins. Die Rekrutierungskurven beider Proteine haben einen monoexponentiellen Verlauf und sättigen immer gleichzeitig (Im zuvor diskutierten Fall, in dem nur B durch A blockiert wird aber nicht umgekehrt, ist der Sättigungs-Zeitpunkt und -Wert von A unabhängig von der Konzentration von B).

$$\frac{d[SAB]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}^*[SB] + k_{S+B \rightarrow SB}^*[SA] - k_{SAB \rightarrow SA+B}[SAB]. \quad (76)$$

Die Herleitung der Lösung dieser Gleichungen ist analog zur Herleitung der Lösung des Modells, in dem Protein A die Assoziationsratenkonstante von B beeinflusst hat und in dem Dissoziation relevant war (Gleichung (61 bis (63)): Zunächst müssen die Gleichungen (73) und (74) addiert werden sowie die Gleichungen (75) und (76) addiert werden. Anschließend wird die bereits bekannte Lösung aus Gleichung (5) verwendet. Nach entsprechenden Umformungen und mithilfe der Methode Variation der Konstanten ergibt sich folgende Lösung:

$$[S](t) = S_0 \cdot e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} - [SB](t), \quad (77)$$

$$[SA](t) = S_0(1 - e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t}) - [SAB](t), \quad (78)$$

$$[SB](t) = e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} \cdot \frac{S_0}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} (1 - e^{-(k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B})t}), \quad (79)$$

$$\begin{aligned}
[SAB](t) = S_0 & \left(\frac{1}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} \left(\frac{e^{-k_{S+A \rightarrow SA}^* t} (k_{S+A \rightarrow SA}^* - k_{S+B \rightarrow SB}^* - k_{SB \rightarrow S+B})}{-k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SAB \rightarrow SA+B}} + \right. \right. \\
& \left. \left. \frac{k_{S+A \rightarrow SA}^* e^{-(k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B}) t}}{k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{SB \rightarrow S+B} - k_{SAB \rightarrow SA+B}} \right) + \frac{1}{1 + \frac{k_{SAB \rightarrow SA+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} + \right. \\
& \left. d \cdot e^{-(k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SAB \rightarrow SA+B}) t} \right), \tag{80}
\end{aligned}$$

mit der Konstante

$$\begin{aligned}
d = - & \left(\frac{1}{1 + \frac{k_{SB \rightarrow S+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} \left(\frac{k_{S+A \rightarrow SA}^* - k_{S+B \rightarrow SB}^* - k_{SB \rightarrow S+B}}{-k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SAB \rightarrow SA+B}} + \right. \right. \\
& \left. \left. \frac{k_{S+A \rightarrow SA}^*}{k_{S+A \rightarrow SA}^* + k_{SB \rightarrow S+B} - k_{SAB \rightarrow SA+B}} \right) + \frac{1}{1 + \frac{k_{SAB \rightarrow SA+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*}} \right). \tag{81}
\end{aligned}$$

Die Lösung für $[SB](t)$ (Gleichung (79)) kann folgendermaßen verstanden werden: Der erste Term beschreibt das exponentielle Absinken der Anzahl von Substraten, an denen A noch nicht gebunden ist. Der zweite Term ist identisch zu Gleichung (33) und beschreibt die Rekrutierung von B an Substrate, die bisher noch kein A gebunden haben. Für $t \gg \frac{1}{k_{S+A \rightarrow SA}^*}$ ist die Konzentration von $[SB](t)$ sehr gering und der Großteil von B ist zusammen mit A an das Substrat gebunden. Der Sättigungswert hierfür liegt bei $\lim_{t \rightarrow \infty} [SAB](t) = S_0 / (1 + \frac{k_{SAB \rightarrow SA+B}}{k_{S+B \rightarrow SB}^*})$ und wird durch das Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation von B bestimmt. Dieses Wert hängt nicht von der Assoziationsratenkonstante von A ab, da die Dissoziation von A als vernachlässigbar angenommen wurde. Hieraus ergibt sich, dass für große t nahezu an jedes Substrat ein Protein A gebunden ist und dementsprechend der Gleichgewichtswert für $[SAB]$ nur noch von den B zugeordneten Konstanten abhängt.

Abhängig davon, ob $k_{SB \rightarrow S+B} > k_{SAB \rightarrow SA+B}$ oder der umgekehrte Fall gilt, zeigen die Rekrutierungskurven unterschiedliche Merkmale. Diese sind allerdings nur sichtbar, wenn Protein A im Vergleich zu B langsamer rekrutiert wird. Dies entspricht der Bedingung $k_{S+A \rightarrow SA}^* < k_{S+B \rightarrow SB}^*$. Andernfalls ist die Rekrutierung von A bereits zu weit vorangeschritten, bevor die Konzentration von B nahe dem Gleichgewichtswert kommt und damit ist die Auswirkung von A auf die Dissoziationsratenkonstante von B in den Kurven kaum noch auszumachen.

3.2.4.1 Protein A verringert die Dissoziationsratenkonstante von B

Im Fall $k_{SB \rightarrow S+B} > k_{SAB \rightarrow SA+B}$, in dem die Dissoziationsratenkonstante von B durch die A verringert wird, zeigen die Kurven interessanterweise einen Knick ähnlich demjenigen im Modell, in dem A die Assoziationsratenkonstante von B verringert hat (Abbildung 7A). Die Kurven weisen diesen Knick etwa bei $t \approx \frac{2}{k_{S+B \rightarrow SB}^* + k_{SB \rightarrow S+B}}$ auf, wenn die Assoziations- und Dissoziationsrate von gebundenem B (ohne gleichzeitig gebundenes A) etwa im Gleichgewicht sind. Ab diesem Zeitpunkt steigen die Rekrutierungskurven nur noch sehr langsam dadurch an, dass der Gleichgewichtswert von B durch die noch andauernde Rekrutierung

von A und die hiermit einhergehende Verringerung der Dissoziationsrate nach oben verschoben wird. Da die Verschiebung des Gleichgewichtswerts durch A hervorgerufen wird und die Rekrutierungskurve von A einer monoexponentiellen Kurve folgt, entspricht auch der Verlauf des Gleichgewichtswerts einer monoexponentiellen Kurve. Dementsprechend führt das Anfitzen einer monoexponentiellen Funktion an den Abschnitt der Rekrutierungskurve von B nach dem Knick zu einem guten Fit (Abbildung 7A orangefarbene Kurven).

Wie bereits erwähnt, wurde ein ähnlicher Knick auch schon im Modell beobachtet, in dem die Assoziationsratenkonstante von B durch A verringert wurde. Dementsprechend kann dieses Modell die in Abbildung 7A dargestellten Rekrutierungskurven von B auch gut fitten (graue Kurven). Zur Unterscheidung dieser beiden Modelle ist also ein zusätzliches Kriterium notwendig.

Wird die Anfangskonzentration B_0 verringert (Abbildung 7A, unterste Kurve), erfolgt der Knick immer noch zu einem frühen Zeitpunkt, an dem wieder die Assoziationsrate und Dissoziationsrate von B an Substrate ohne A im Gleichgewicht sind (also B ist etwa im Gleichgewicht mit SB). Dies ist etwa bei $t \approx \frac{2}{k_{S+B}^* + k_{SB \rightarrow S+B}}$ der Fall. Aufgrund der niedrigeren Konzentration von B_0 wird A allerdings schneller rekrutiert im Vergleich zur Zeitskala, auf der sich das Gleichgewicht zwischen B und SAB einstellt. Dementsprechend folgt die Rekrutierungskurve von B nach dem Knick keinem monoexponentiellen Verlauf. Stattdessen nimmt die Steigung nach dem Knick sogar zu, da die Rekrutierung von A schneller erfolgt als die Rekrutierung von B an solche Substrate, an denen A bereits gebunden ist. Die Rekrutierungskurve weist in diesem Fall also einen Wendepunkt auf.

Da von allen hier diskutierten Modellen nur dieses einen Wendepunkt erzeugen kann, ist der Wendepunkt ein nützliches Merkmal, um zwischen diesem Modell und den anderen zu unterscheiden. Zeigt sich also in experimentellen Daten für niedrige Werte von B_0 ein Wendepunkt ähnlich wie in der untersten Kurve von Abbildung 7A, so können die anderen hier vorgestellten Modelle ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Merkmal, mit dessen Hilfe dieses Modell von demjenigen unterschieden werden kann, in dem A die Assoziationsratenkonstante von B verringert hat, ist in Abbildung 7B dargestellt. In diesen Kurven wurde der Wert von A_0 um den Faktor 1.5 bzw. 2 variiert. Die entsprechenden Rekrutierungskurven von B weisen den Knick alle am gleichen Zeitpunkt und bei derselben Konzentration auf. Wird dagegen die Konzentration von S_0 und diejenige von B_0 zusätzlich variiert (wie dies in realen Experimenten zwangsläufig der Fall wäre), so erfolgt der Knick immer noch am gleichen Zeitpunkt, aber nicht bei derselben Konzentration. In dem Modell, bei dem der Knick durch eine Verringerung der Assoziationsrate hervorgerufen wird, zeigt sich der Knick bei einer Variation von A_0 zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Der Grund hierfür ist, dass der Knick in diesem Fall nicht davon abhängt, wann B und SB im Gleichgewicht sind, sondern davon, wie schnell A rekrutiert wird. Da für dieses Kriterium nur eine geringfügige Variation von A_0 benötigt wird, könnte in realen Experimenten die natürliche Variation von A_0 für die Anwendung dieses Kriteriums genügen, selbst wenn das Protein A nicht bekannt ist.

3.2.4.2 Protein A erhöht die Dissoziationsratenkonstante von B

Im Fall $k_{SB \rightarrow S+B} < k_{SAB \rightarrow SA+B}$ weisen die Rekrutierungskurven von B einen Overshoot auf (Abbildung 8). Der Grund hierfür ist, dass wie auch schon zuvor bei etwa $t \approx \frac{2}{k_{S+B}^* + k_{SB \rightarrow S+B}}$ die Assoziation und Dissoziation von B etwa im Gleichgewicht sind. Da allerdings die Konzentration von rekrutiertem A noch weiter ansteigt, wird die Dissoziationsratenkonstante von B erhöht und damit auch der Gleichgewichtswert von

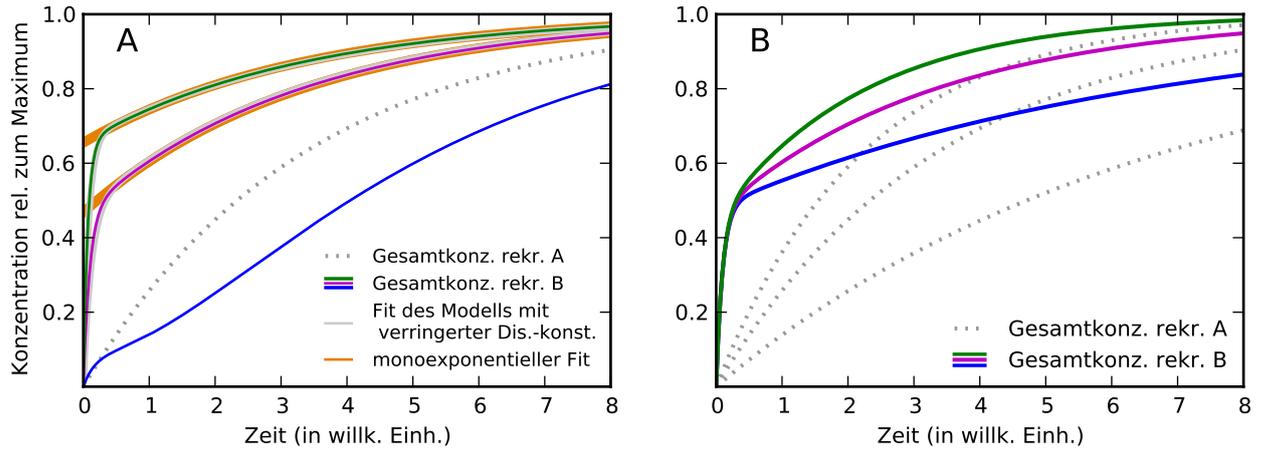


Abbildung 7: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Dissoziationsratenkonstante von B herabsetzt. A) $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$, $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 0.5, 5, 10$ von der untersten zur obersten durchgezogenen Kurve, $k_{SB \rightarrow S+B}^* = 5$, $k_{SAB \rightarrow SA+B}^* = 0$. Graue Kurven: Fits des Modells, in dem A die Assoziationsratenkonstante von B verringert. Orangefarbene Kurven: Monoexponentieller Fit mit einem Ordinatenabschnitt größer als Null. Eine Verringerung von B_0 führt zu einem neuen Merkmal: Die Kurven zeigen früh einen Knick, dem ein Abschnitt mit zunehmender Steigung folgt. Da dieses Merkmal nicht von dem Modell erzeugt werden kann, in dem die Assoziationsrate durch A verringert wird, dient es zur Unterscheidung zwischen den Modellen. B) Es wurden dieselben Parameter wie für A) verwendet außer: $k_{S+A \rightarrow SA}^* = 0.15, 0.3, 0.45$ von der untersten zur obersten Kurve und $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 5$. Trotz der Variation von A_0 zeigen alle drei Kurven den Knick zum selben Zeitpunkt.

B herabgesetzt. Ein ähnlicher Overshoot wurde bereits im Abschnitt über das Modell diskutiert, in dem A die Assoziationsrate von B verringert hat und in dem Dissoziation vernachlässigt wurde. Interessanterweise ist jenes Modell in der Lage, die in Abbildung 8 dargestellten Kurven gut zu reproduzieren (graue Kurven). Nichtsdestotrotz kann prinzipiell zwischen beiden Modellen unterschieden werden, denn das Modell, in dem A die Assoziationsrate verringert und in dem Dissoziation relevant ist, kann zwei besondere Merkmale erzeugen, den Overshoot und den Knick. Demgegenüber kann das in diesem Abschnitt diskutierte Modell mit $k_{SB \rightarrow S+B} < k_{SAB \rightarrow SA+B}$ nur den Overshoot erzeugen. Falls in experimentellen Daten also beide diese Merkmale beobachtet werden, dann spricht dies für das Modell, in dem die Assoziationsrate von B durch A verringert wird und in dem Dissoziation nicht vernachlässigbar ist.

Tabelle 1 zeigt eine grafische Zusammenfassung der bisher erworbenen Erkenntnisse. Es ist dargestellt, welche Merkmale durch ein bestimmtes Modell erzeugt werden können (die Tabelle enthält an der entsprechenden Stelle eine Eins). Unter dem vollen Modell wird dasjenige Modell verstanden, in dem es keine Einschränkung für die Beziehungen zwischen den Ratenkonstanten gibt. Dieses Modell umfasst also die Fälle, in denen nur die Assoziations- oder Dissoziationsratenkonstante beeinflusst wird, als auch den Fall, in dem beide Raten beeinflusst werden. Da alle anderen hier diskutierten Modelle Spezialfälle dieses vollen Modells sind, kann das volle Modell jedes der Merkmale erzeugen.

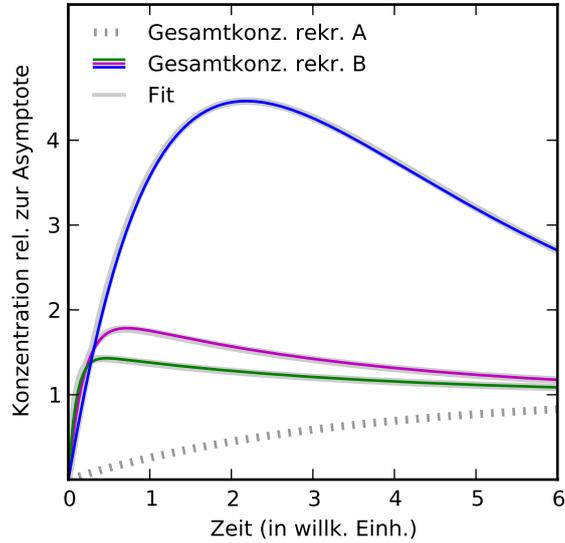


Abbildung 8: Rekrutierungskurven des Modells, in dem Protein A die Dissoziationsratenkonstante von B erhöht. $k_{S+A \rightarrow SA}^* = k_{SB+A \rightarrow SAB}^* = 0.3$, $k_{S+B \rightarrow SB}^* = 10, 5, 0.5$ von der grünen zur blauen Kurve, $k_{SB \rightarrow S+B} = 0$ und $k_{SAB \rightarrow SA+B} = 5$. Graue Kurven: Fits des Modells, in dem A die Assoziationsratenkonstante von B verringert hat und in dem die Dissoziation nicht vernachlässigbar war.

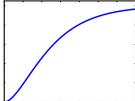
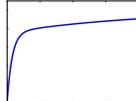
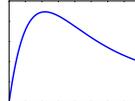
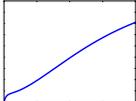
Assoziation	Dissoziation				
erhöht	nicht vorhanden	1	0	0	0
verringert	nicht vorhanden	0	1	0	0
erhöht	nicht beeinflusst	1	1	0	0
verringert	nicht beeinflusst	0	1	1	0
nicht beeinflusst	erhöht	0	0	1	0
nicht beeinflusst	verringert	1	1	0	1
volles Modell		1	1	1	1

Tabelle 1: Vergleich der Modelle anhand der jeweils möglichen speziellen Merkmale der Kurven.

3.3 Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden einfache, mechanistische Protein-Rekrutierungsmodelle auf einer rein theoretischen Basis untersucht und gezeigt, wie die Interaktion zwischen verschiedenen Proteinen anhand der Form der Rekrutierungskurven abgeleitet werden kann. Sind nur die Rekrutierungskurven eines Proteins, hier als B bezeichnet, bekannt, so ergeben sich vier Merkmale der Rekrutierungskurven, die auf eine Beeinflussung der Assoziations- oder Dissoziationsratenkonstante schließen lassen:

1. Die Steigung der Rekrutierungskurve nimmt in der Anfangsphase zu.
2. Die Rekrutierungskurve weist einen Knick auf. Die Kurve flacht an dieser Stelle schneller ab, als dies etwa bei einer monoexponentiellen Funktion möglich wäre.
3. In der Rekrutierungskurve ist ein Overshoot zu sehen, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Rekrutierungskurve nach Erreichen des Maximums wieder abfällt und anschließend ein Plateau erreicht.
4. In der Anfangsphase der Rekrutierungskurve existiert ein Wendepunkt. Die Steigung nimmt also zunächst ab und kurz darauf wieder zu.

Das zuletzt aufgezählte Merkmal ist das einzige, das nur von einem der hier diskutierten Modelle erzeugt werden kann. Es eignet sich also hervorragend, um die anderen Modelle als Erklärung für einen experimentell ermittelten Kurvenverlauf auszuschließen. Wie in Tabelle 1 zu sehen, können die anderen drei Merkmale entweder durch die Beeinflussung der Assoziationsratenkonstante, der Dissoziationsratenkonstante oder durch eine gleichzeitige Beeinflussung beider Ratenkonstanten hervorgerufen werden. Um herauszufinden, welche Art der Beeinflussung zu einem experimentell beobachteten Merkmal führt, sind zusätzliche Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von B und falls möglich auch A hilfreich.

In den hier vorgestellten Modellen wurde angenommen, dass entweder die Assoziations- oder die Dissoziationsratenkonstante beeinflusst wird. Hierdurch war es möglich, die entsprechenden Differentialgleichungen analytisch zu lösen. Da die Assoziation und Dissoziation eines Proteins häufig auf unterschiedlichen Zeitskalen eine Rolle spielt, können die hier erworbenen Erkenntnisse auch auf komplexere Situationen angewendet werden (beispielsweise eine gleichzeitige Beeinflussung beider Ratenkonstanten). So kann die Rekrutierungskurven etwa in mehrere Abschnitte unterteilt werden: Einen Abschnitt, in dem die Dissoziation vernachlässigbar ist, und einen, in dem sie nicht vernachlässigbar ist.

Die hier vorgeschlagenen Modelle sind unter anderem anwendbar in folgenden typischen Szenarien:

1. Ein Protein benötigt zur Durchführung einer bestimmten Aufgabe ein weiteres Protein.
2. Ein Protein dient als Ladeplattform für weitere Proteine.
3. Die Eigenschaften eines Proteins werden durch posttranslationale Modifikationen verändert.

Eine Anwendung der hier dargestellten Erkenntnisse könnte etwa in der Untersuchung der Frage liegen, ob zwei Proteine jeweils einzeln an ein bestimmtes Substrat binden oder zuvor einen Komplex bilden, der anschließend an das Substrat bindet (wie im Fall von XRCC1

und dessen Kofaktor Ligase III, die beide in der Basenexzisionsreparatur involviert sind). In dem Fall, in dem beide Proteine zunächst einen Komplex bilden und anschließend gemeinsam an das Substrat binden, würde man erwarten, dass die Rekrutierungskurven im Rahmen der Messgenauigkeit identisch sind. Allerdings kann aus solch nahezu identischen Kurven im Umkehrschluss nicht ohne Weiteres gefolgert werden, dass die zwei Proteine als Komplex rekrutiert werden. Schließlich können die Rekrutierungskurven auch dann identisch sein, wenn die Proteine nacheinander rekrutiert werden und das zuletzt rekrutierte Protein über eine deutlich höhere Assoziationsrate verfügt, als das zuerst rekrutierte Protein. Um diesen Fall zu identifizieren sollten die Rekrutierungskurven in der Anfangsphase mit möglichst hoher zeitlicher Auflösung aufgenommen werden. Falls die Proteine nämlich nacheinander rekrutiert werden, sollte die Steigung der Rekrutierungskurven des zuletzt rekrutierten Proteins während der Anfangsphase zunehmen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, sind die Rekrutierungskurven auch dann identisch, wenn sich die beiden Proteine gegenseitig blockieren. Um diesen Fall auszuschließen, sollten Experimente mit verschiedenen Gesamtkonzentrationen der Proteine durchgeführt werden. Falls eine Variation der Gesamtkonzentration des einen Proteins keinen negativen Effekt auf den Sättigungswert der Rekrutierungskurven des anderen Proteins hat, ist dieses Modell unzutreffend. Alternativ können zur Klärung der Frage, ob die Proteine einzeln oder als Komplex rekrutiert werden, die hier vorgestellten Erkenntnisse auch durch weitere Untersuchungen ergänzt werden, die der Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen dienen, wie etwa Förster-Resonanzenergietransfer [citepTru01](#) oder Co-Immunpräzipitation (Selbach and Mann, 2006).

In den hier vorgestellten Modellen wurde die Dissoziation von A nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind allerdings auch dann anwendbar, wenn A nach der Modifikation von B schnell wieder dissoziiert, sofern diese Modifikation im Vergleich zur Zeitskala, auf der die Rekrutierung von B stattfindet, lange anhält.

Zum Lösen der Differentialgleichungen wurde angenommen, dass die Proteine in deutlich höherer Konzentration vorliegen als die Substrate. Sollte dies nicht zutreffen, so werden die Rekrutierungskurven Merkmale aufweisen, die qualitativ den hier vorgestellten Merkmalen ähneln. Die hier erworbenen Erkenntnisse sollten also dennoch anwendbar sein. Trifft die quasi konstante Approximation etwa nicht zu, so könnte das Modell, in dem A die Assoziationsratenkonstante von B verringert, keine Kurve reproduzieren, in der ein Knick auftaucht, an dem die Steigung schneller als eine entsprechende monoexponentielle Funktion abnimmt. Das Ergebnis wäre also dasselbe wie unter Verwendung der QKA.

Für den Großteil der hier vorgestellten Methoden zur Unterscheidung zwischen verschiedenen Modellen ist es unerheblich, ob das beeinflussende Protein A bekannt ist oder nicht. Falls die Rekrutierungskurve von A allerdings ebenfalls gemessen wurde, können die Modelle dank dieser zusätzlichen Information noch besser voneinander unterschieden werden, insbesondere wenn die Konzentration von A relativ zur Konzentration von B bekannt ist. In diesem Fall sollte ein Fit des vollen Modells (Gleichungen (34) bis (37)) Aufschluss darüber geben, welche Parameter vernachlässigbar sind und welche nicht.

Liegt dagegen keine Information über das beeinflussende Protein vor, so können durch die im Anschluss vorgestellte Methode zusätzliche Informationen aus den Rekrutierungskurven von B gewonnen und hierdurch die Unterscheidbarkeit zwischen den alternativen Modellen erhöht werden. Im folgenden Teil der Arbeit werden etwa Rekrutierungskurven mit einem Overshoot untersucht. Die in diesem ersten Teil vorgestellten Ergebnisse dienen unter anderem dazu, eine Vorauswahl der möglichen Modelle zu treffen. Von den hier diskutierten Modellen können nämlich nur dasjenige, in dem A die Assoziationsrate verringert und in dem Dissoziation nicht vernachlässigbar ist sowie das Modell, in dem A die

Dissoziationsrate erhöht, einen solchen Overshoot erzeugen. Zur weiterführenden Untersuchung, ob eines dieser Modelle tatsächlich als Erklärung des gemessenen Kurvenverlaufs herangezogen werden kann, bedarf es der im folgenden Teil vorgestellten Methode.

Wie im ersten Teil dieser Arbeit gezeigt, enthält der Verlauf von Proteinrekrutierungskurven häufig genügend Informationen, um zwischen alternativen Modellen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Reproduktion der Daten zu unterscheiden. Da allerdings auch gezeigt wurde, dass diese Information nicht in jedem Fall zur Unterscheidung der Modelle genügt, soll hier eine Methode vorgestellt werden, mit deren Hilfe der Informationsgehalt der Rekrutierungskurven und damit die Unterscheidbarkeit der Modelle gesteigert werden kann. Diese Methode basiert auf der Idee, dass durch das Bleichen der Proteine während der Rekrutierungsphase Informationen über die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante der Proteine zum Zeitpunkt des Bleichens gewonnen werden können.

Eine bereits etablierte Methode zum Bleichen der Proteine ist FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching). In FRAP-Experimenten werden die fluoreszent markierten Proteine in einer kleinen Region der Zelle mithilfe eines Lasers mit vergleichsweise hoher Leistung¹⁰ irreversibel photogeblickt. Die Dissoziation und Diffusion der gebleichten Proteine sowie die Diffusion und Assoziation der ungebleichten Proteine in der Umgebung dieser Region führt dazu, dass sich das Signal auch innerhalb der Region erholt. FRAP-Experimente geben damit Aufschluss über die mittlere Mobilität der markierten Proteine in einem kleinen Volumen und erlauben die Berechnung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante des markierten Proteins mithilfe des Fittens von mathematischen Modellen an die Daten (Carrero et al., 2003; Mueller et al., 2010; Phair et al., 2004). Falls die Diffusion der Proteine auf einer deutlich kürzeren Zeitskala geschieht als deren Assoziation und Dissoziation, können Diffusions-entkoppelte Modelle verwendet werden (Sprague and McNally, 2005).

Standardmäßig sind in FRAP-Experimenten die Konzentrationen der untersuchten Proteine im Gleichgewicht. Ihre Assoziations- und Dissoziationsrate sind also equilibriert (Carrero et al., 2003; Phair et al., 2004; Rabut et al., 2004; Sprague and McNally, 2005). Durch diesen Umstand ist die Anwendung von FRAP recht limitiert: Die Proteinkonzentrationen in lebenden Zellen sind häufig nicht im Gleichgewicht und es wäre dennoch sehr nützlich, unter diesen Umständen FRAP-Experimente und -Simulationen durchzuführen, die eben nicht auf die Gleichgewichts-Bedingung angewiesen sind. Ein Beispiel für einen externen Auslöser, der eine Änderung der Proteinkonzentration und damit ein Nicht-Gleichgewicht verursacht, ist etwa die Bestrahlung mit einem DNA-Schäden erzeugenden Laser (Mortusewicz et al., 2008), also eine Situation, wie sie schon im ersten Teil dieser Arbeit diskutiert wurde. Die Limitierung klassischer FRAP-Experimente, also die Gleichgewichtsbedingung, ist auch sofern von Bedeutung, als sie eben nicht die Analyse von Prozessen erlaubt, während deren Ablauf sich die Werte für die Ratenkonstanten ändern. Dies ist allerdings durchaus von großem wissenschaftlichen Interesse.

Um die Bedeutung des FRAP-Bleichens während der Rekrutierungsphase für die Unterscheidbarkeit der Modelle zu ermitteln, werden in dieser Arbeit zu Vergleichszwecken zunächst normale Rekrutierungskurven ohne FRAP vorgestellt und mit verschiedenen Modellen ähnlich denjenigen aus dem ersten Teil dieser Arbeit gefittet. Anschließend werden FRAP-Rekrutierungskurven analysiert, in denen die Zelle sowohl zu Beginn zum Erzeugen der DNA-Schäden bestrahlt wurde als auch zu einem späteren Zeitpunkt von einem zweiten Laser bestrahlt wurde, um die markierten Proteine zu bleichen. Die Auswertung der FRAP-Rekrutierungskurven erfolgt mit denselben Modellen wie die Auswertung

¹⁰ Die Leistung dieses Lasers ist hoch im Vergleich zum Laser, der zur Aufnahme des Fluoreszenz-Signals verwendet wird.

der normalen Rekrutierungskurven bis auf den Unterschied, dass eben das Bleichen der Proteinkonzentration berücksichtigt wird. Diese Auswertungsmethode zeichnet sich im Vergleich zu klassischen Auswertungen von FRAP-Experimenten gerade dadurch aus, dass sie nicht auf das Gleichgewicht der Proteinkonzentrationen angewiesen ist.

Die hier vorgestellten Experimente wurden in Kollaboration mit Cristina Cardoso, Britta Muster und Alexander Rapp durchgeführt. Der Autor war sowohl für die Planung, Durchführung als auch die im Folgenden vorgestellte Auswertung der Experimente zuständig.

Zum Fitten der experimentellen Daten werden verschiedene mechanistische Modelle verwendet. Es wird gezeigt, dass die zusätzliche Information aufgrund der Erholungskurven nach dem Bleichen entscheidend zur Unterscheidbarkeit der Modelle beiträgt und sogar dazu führt, dass zwei der drei vorgestellten Modelle als Erklärung für den Kurvenverlauf der experimentellen Daten ausgeschlossen werden können.

4.1 Materialien und Methoden

4.1.1 Zell Kultur

Es wurden HeLa Kyoto Zellen (Landry et al., 2013) verwendet, die stabil integriertes mCherry-PCNA (Sporbert et al., 2005) exprimierten. Die Zellen wurden in Kulturgefäßen mit Deckglasboden unter Verwendung von Blasticidin (2.5 g/ml) kultiviert.

4.1.2 Experimenteller Aufbau

Die Aufnahmen und die Bestrahlung der Zellen wurden mit einem UltraVIEW VoX spinning disc confocal system (Perkin Elmer) in einer closed live-cell microscopy chamber (ACU, Perkin Elmer) bei 37°C, mit 5% CO₂, 60% Luftfeuchtigkeit und unter Verwendung eines Nikon TI Mikroskops (Nikon) durchgeführt.

Die Bilder wurden bei 60x Objektivvergrößerung mittels eines CFI Apochromat 60x/1.45 NA Immersionsobjektivs aufgenommen. Zur Aufnahme des Fluoreszenz-Signals wurde mcherry-PCNA mit einem 561 nm Laser angeregt und das Fluoreszenz-Signals mithilfe eines 612 ± 70 nm (Halbwertsbreite) Emissionsfilters gemessen. Durch die Anregung mit dem 561 nm Laser führte jede Aufnahme zum Bleichen einer geringen Menge der mcherry-PCNA-Proteine.

Für die im späteren Verlauf gezeigten Experimente wurden nur solche Zellen verwendet, die nicht in der S-Phase waren. Diese konnten durch die sehr markante, inhomogene, räumliche Verteilung der PCNA-Proteine identifiziert und ausgeschlossen werden. In den restlichen Zellen wurde eine zuvor ausgewählte, annähernd kreisförmige Region (etwa 1 μ m Durchmesser) innerhalb des Zellkerns für 1.2 Sekunden mit dem 405 nm Laser bei 100% der Maximalleistung bestrahlt (Im Folgenden wird diese Vorgehensweise als Mikrobestrahlung oder Bestrahlung bezeichnet). Dies entspricht einer deponierten Energie von etwa 0.99 mJoule. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass dieser Laser Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie oxidative Basenschäden herbeiführt (Lan et al., 2005).

In den FRAP-Mikrobestrahlungsexperimenten wurde dieselbe Region, die zuvor bereits mit dem 561 nm Laser bestrahlt worden war, nach einem gewissen zeitlichen Abstand nochmals für eine Sekunde bestrahlt, allerdings unter Verwendung des 561 nm Lasers bei 100% der Maximalleistung (entspricht 6.7 mJoule). Diese zweite Bestrahlung wird im

Folgenden als FRAP-Bleichen oder Bleichen bezeichnet. Eine entscheidende Eigenschaft des 561 nm Lasers ist, dass die Bestrahlung mit diesem Laser zu keinen direkten DNA-Schäden führt, an die PCNA rekrutiert wird (siehe Abschnitt 4.1.4).

Vor und nach der Mikrobestrahlung sowie dem Bleichen wurden konfokale Aufnahmen der mittleren Kernebene als 16 bit Bilder in einem Abstand von 2 Sekunden (in einem Teil der Experimente auch 4 Sekunden) aufgenommen.

Die Laserenergie wurde mittels eines Laser-Leistungsmessgeräts (OPHIR) direkt nach der Objektivenebene gemessen, wobei sich der Laser in der Parkposition befand.

4.1.3 Daten-Analyse

Für die Daten-Analyse wurde die gesamte Zellkernfläche (grüner Kreis in Abb.9, die Größe dieser Fläche wird mit $NFS_{\text{Fläche}}$ bezeichnet) per Hand markiert. Das Integral der Intensität über alle Pixel dieser Fläche ergibt das Nukleus-Fluoreszenz-Signal (NFS). Außerdem wurde per Hand eine kleine Region außerhalb der Zelle markiert (blauer Kreis in Abb. 9, die Größe dieser Fläche ist mit $HS_{\text{Fläche}}$ bezeichnet), um das Hintergrundsignal zu bestimmen (HS). Schließlich wurde auch die bestrahlte Region markiert (violetter Kreis in Abb. 9, Größe dieser Fläche ist mit $SBR_{\text{Fläche}}$ bezeichnet) und hieraus das Signal der bestrahlten Region gewonnen (SBR). Das Ziel dieser Auswertung ist die Bestimmung der Konzentration von rekrutiertem PCNA innerhalb der bestrahlten Region. Das Signal innerhalb dieser Region wird jedoch hervorgerufen durch das an die DNA gebundene PCNA als auch das frei diffundierende PCNA. Daher wird eine Methode benötigt, um das Signal des frei diffundierenden PCNAs abzuschätzen. Wie im Unterkapitel 4.1.4 gezeigt wird, ist die Konzentration des frei diffundierenden PCNAs annähernd konstant (unter Berücksichtigung des Ausbleichens der Proteine). Daher wird für die spätere Auswertung das Signal des frei diffundierenden PCNAs auf einen konstanten Wert gesetzt. Als Abschätzung für diesen Wert dient das Signal aus der bestrahlten Region vor der Mikrobestrahlung (\overline{SBR}_0 , gemittelt über die vier Werte vor der Mikrobestrahlung), welches um das Hintergrundsignal korrigiert wurde. Jede Anwendung des Lasers (Bestrahlung, Photobleichung, Bildaufnahme) führt zum Ausbleichen eines Anteils der PCNA-Proteine. Daher nimmt das Fluoreszenz-Signal mit jedem aufgenommenen Bild ab, selbst wenn die Konzentration der Proteine unverändert bleibt. Um diesen Bleicheffekt zu korrigieren, wird das Zellkern-Fluoreszenz-Signal ($NFS(t)$) eines beliebigen Zeitpunkt mit dem Mittelwert vor der Bestrahlung, \overline{NFS}_0 , verglichen, wobei jeweils eine Korrektur infolge des Hintergrundsignals nötig ist. Der Bleich-Faktor $BF = (NFS(t) - HS(t) \frac{NFS_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}}) / (\overline{NFS}_0 - HS_0 \frac{NFS_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}})$ quantifiziert schließlich den Bleicheffekt und mit ihm ergibt sich das Fluoreszenz-Signal der an die DNA gebundenen PCNA-Proteine (FSRP für Fluoreszenz-Signal der rekrutierten Proteine) als:

$$FSRP = (SBR(t) - HS(t) \frac{SBR_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}}) BF - (\overline{SBR}_0 - HS_0 \frac{SBR_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}}), \quad (82)$$

Hierbei ist $\overline{SBR}_0 - HS_0 \frac{SBR_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}}$ die zuvor erwähnte Abschätzung für das Signal der frei diffundierenden PCNA-Proteine in der bestrahlten Region (korrigiert um das Hintergrundsignal). Um aus dem Fluoreszenz-Signal der gebundenen Proteine die entsprechende Konzentration zu ermitteln, wird ein Faktor ν benötigt, der das Signal in die das Signal erzeugende Proteinmenge übersetzt. Indem diese Menge durch die Größe der bestrahlten Fläche geteilt wird, kann schließlich die Konzentration der gebundenen Proteine berechnet werden. Eine grobe Bestimmung dieses Faktors ist hierbei ausreichend, da er keine Auswirkung auf die aus den Fits resultierenden Ratenkonstanten hat. Eine Änderung des

Faktors würde lediglich zu einer hierzu proportionalen Änderung aller Proteinkonzentrationen führen.

Die Daten vor der Bestrahlung zeigen, dass die Menge an fluoreszentelem PCNA in allen Zellen, die in derselben Phase des Zellzyklus sind, gleich groß ist. Mithilfe von quantitativen Western Blots wurde von Danny Nowak darüber hinaus das Verhältnis zwischen endogenem und fluoreszent markiertem PCNA gemessen. Diese Western Blots wurden mit Zell-Lysaten¹¹ der in den späteren Experimenten verwendeten Zell-Linie gemacht. Aus diesen Daten wurde von Alexander Rapp ein Verhältnis von 8.1 ± 2.7 zwischen endogenem und fluoreszierendem PCNA ermittelt (siehe Appendix Abbildung A1). Die Gesamtmenge von endogenem PCNA änderte sich in der in diesen Experimenten verwendeten Zell-Linie nicht.

Eine nützliche Information ist außerdem, dass laut Morris and Mathews (1989) insgesamt etwa $3.6 \cdot 10^5$ PCNA-Proteine in der G1 Phase vorhanden sind, wohingegen es in der G2 Phase $11.4 \cdot 10^5$ PCNA-Proteine sind. Die Zellen in den hier vorgestellten Experimenten waren entweder in der G1 oder der G2 Phase, da von vornherein die Zellen in der S-Phase anhand der charakteristischen Verteilung des PCNA (räumlich sehr inhomogen) aussortiert wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Zellen in der G1 Phase im Vergleich zur G2 Phase (etwa Faktor 1.3), wurde ermittelt, dass 81.5% der hier verwendeten Zellen in der G1 Phase waren und 18.5% der Zellen in der G2 Phase. Unter Verwendung der Ergebnisse von Morris und Mathews ergibt sich damit pro Zelle eine durchschnittliche Gesamtmenge von $(18.5 \cdot 11.4 + 81.5 \cdot 3.6) 10^3 \approx 5 \cdot 10^5$ PCNA-Proteinen. Außerdem muss beachtet werden, dass der Anteil von an Chromatin gebundenem PCNA in Zellen außerhalb der S Phase laut Morris and Mathews (1989) vernachlässigbar ist. Schließlich ergibt sich also eine durchschnittliche Menge von $5 \cdot 10^5 / 8.1$ fluoreszierenden PCNA-Proteinen pro Zelle. Im nächsten Schritt wird das mittlere Nukleus-Fluoreszenz-Signal vor der Bestrahlung ($\overline{\text{NFS}}_0$) über alle Zellen gemittelt ($\overline{\overline{\text{NFS}}}_0$). Hiermit ergibt sich der Faktor, der das Fluoreszenz-Signal in eine Proteinmenge übersetzt als:

$$\nu = \frac{500000/8.1}{\overline{\overline{\text{NFS}}}_0}. \quad (83)$$

Um die Proteinkonzentration innerhalb der bestrahlten Fläche zu bestimmen, wird die Größe eben dieser Fläche benötigt. Hierbei ist zu beachten, dass die in dieser Arbeit verwendete mathematische Beschreibung mithilfe von Differentialgleichungen implizit davon ausgeht, dass die modellierten Prozesse sich in einem gleichgroßen Volumen abspielen, sofern die Ergebnisse der verschiedenen Simulationen miteinander verglichen werden sollen (etwa wenn mehrere Kurven von verschiedenen Zellen gleichzeitig gefittet werden). Daher wird die Proteinkonzentration der gebundenen Proteine stets auf die größte der bestrahlten Flächen ($\text{SBR}_{\text{Fläche, Max}}$) bezogen. Außerdem wird angenommen, dass die Zellkerne ungefähr gleich hoch sind, weshalb der Einfachheit halber die Proteinkonzentration nur auf $\text{SBR}_{\text{Fläche, Max}}$ bezogen wird und nicht auf das entsprechende Volumen. Würde stattdessen das Volumen verwendet, müssten alle im späteren Verlauf gelisteten Konzentrationen durch die Zellkernhöhe geteilt und die Assoziationsraten mit diesem Wert multipliziert werden, wohingegen die Dissoziationsraten unverändert blieben. Hiermit ergibt sich die Konzentration der rekrutierten (und fluoreszierenden) PCNA-Proteine zu:

¹¹ Ergebnis der Lyse, bei der die Zellmembran chemisch aufgelöst wird und Protein-Protein-Interaktionen unterbunden werden. Darüber hinaus wird die Sekundär und Tertiär-Struktur der Proteine zerstört. Es liegen also die linearen Peptidketten vor.

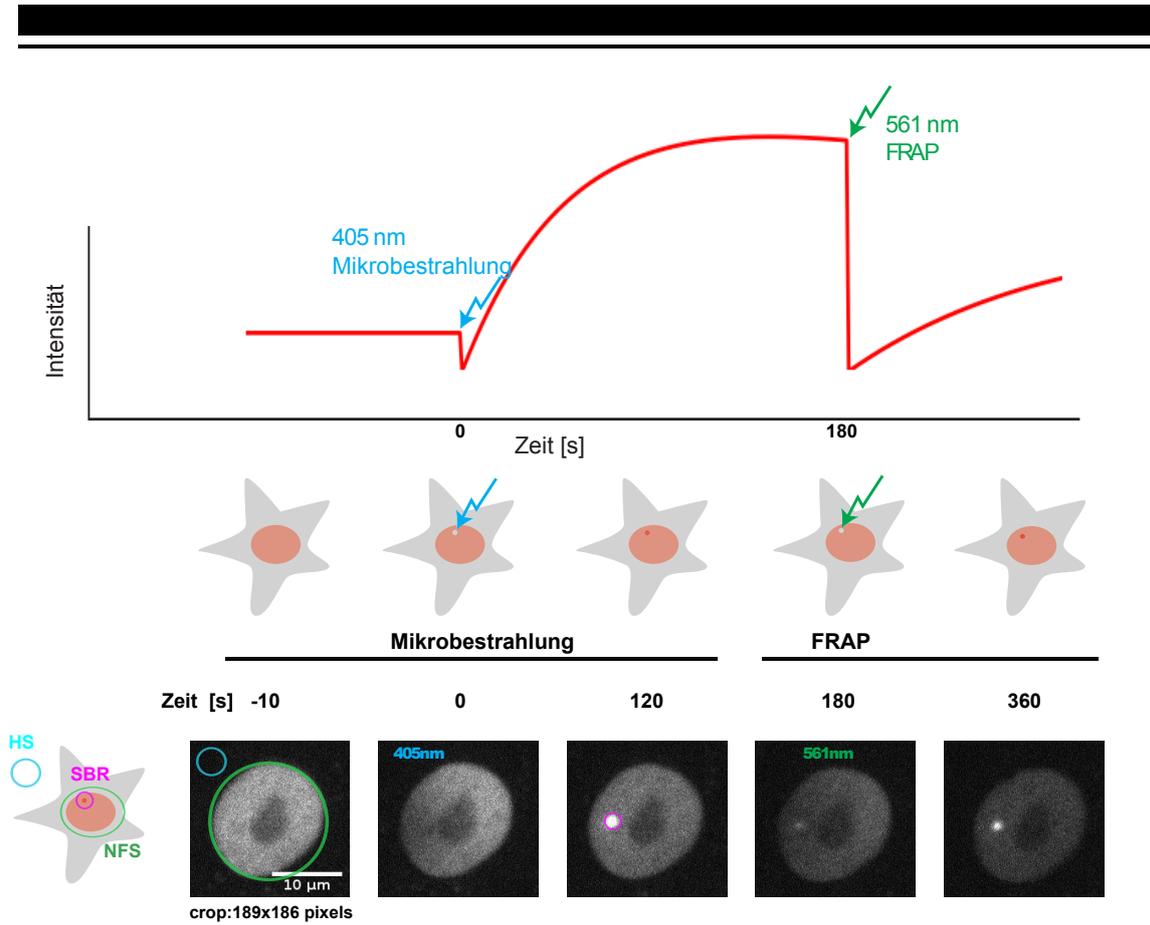


Abbildung 9: Schematische Darstellung und exemplarische Aufnahmen der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente. In der Datenauswertung wird per Hand die Fläche des Zellkerns markiert (grüner Kreis). Durch Integration des Fluoreszenz-Signals über diesen Bereich wird das Nukleus-Fluoreszenz-Signal (NFS) ermittelt. Zusätzlich wird eine kleine Region außerhalb der Zelle (blauer Kreis) zur Messung des Hintergrundsignals (HS) sowie die bestrahlte Region (violetter Kreis) zur Messung des Signals der bestrahlten Region (SBR) markiert.

$$\begin{aligned}
 \text{PCNA}_{\text{Rek}} &= \frac{\nu}{\text{SBR}_{\text{Fläche, Max}}} \text{FSRP} \\
 &= \frac{\nu}{\text{SBR}_{\text{Fläche, Max}}} \left((\text{SBR}(t) - \text{HS}(t) \frac{\text{SBR}_{\text{Fläche}}}{\text{HS}_{\text{Fläche}}})_{\text{BF}} - (\overline{\text{SBR}}_0 - \text{HS}_0 \frac{\text{SBR}_{\text{Fläche}}}{\text{HS}_{\text{Fläche}}}) \right)
 \end{aligned} \tag{84}$$

4.1.4 Kontrollexperimente

Es müssen mehrere Kontrollexperimente durchgeführt werden, um eine Reihe von für die theoretischen Modelle wichtigen Fragen über die experimentellen Bedingungen zu beantworten. Diese lauten:

1. Verursacht der 561 nm Laser¹² DNA-Schäden, an die PCNA bindet?

¹² Dies ist der Laser, mit dem das FRAP-Bleichen durchgeführt wird.

-
-
2. Wie kurz ist die Zeitskala, auf der die Diffusion des PCNA stattfindet?
 3. Ist das Bleichen der Proteine reversibel?
 4. Ändert sich die Gesamtmenge an PCNA während der Zeitspanne eines Experiments?
 5. Ändert sich die Konzentration von frei diffundierendem PCNA während eines Experiments?

Im ersten Teil der Kontrollexperimente werden die ersten beiden Fragen beantwortet. Um zu überprüfen, ob der 561 nm Laser DNA-Schäden verursacht, an die PCNA bindet, wird in vier Zellkernen das Fluoreszenz-Signal einer Region untersucht, die 0.8 Sekunden mit dem 561 nm Laser bestrahlt wurde. Der Laser war hierbei auf 100% eingestellt, was insgesamt einer Energie von 5.4 mJoule entspricht. Die Datenanalyse dieser Kontrollexperimente wird auf dieselbe Art durchgeführt, wie in den Mikrobestrahlungsexperimenten (siehe Abschnitt 4.1.3). Damit geben die resultierenden Kurven also die Konzentration der gebundenen, fluoreszierenden Proteine in der bestrahlten Region wieder. Falls der 561 nm Laser Schäden hervorruft, an die PCNA rekrutiert wird, sollte sich dies darin äußern, dass die entsprechenden Kurven kurz nach der Bestrahlung oberhalb von Null liegen. In Abbildung 10a ist ersichtlich, dass dies nicht der Fall ist. Bei $t = 0$ s fällt die Kurve unter Null, hervorgerufen durch das Bleichen, welches die Konzentration der fluoreszierenden Proteine innerhalb der bestrahlten Region so stark verringert, dass sie unterhalb des Zellkernmittelwertes für die Konzentration der fluoreszierenden Proteine sinkt. Kurz nach dem Bleichen erholen sich die Kurven und erreichen wieder den Wert Null. Die Erholung der Kurven geschieht aufgrund der Diffusion der noch ungebleichten PCNA-Proteine und vollzieht sich auf einer wesentlich kürzeren Zeitskala verglichen mit dem Rekrutierungsprozess (siehe Abschnitt 4.2). Dies rechtfertigt die Verwendung des hier vorgestellten theoretischen Modells, in dem implizit davon ausgegangen wird, dass Diffusion und Rekrutierung auf unterschiedlichen Zeitskalen stattfinden.

Einige der in Abbildung 10a dargestellten Kurven brechen früher ab als andere. Der Grund hierfür liegt darin, dass sich die entsprechenden Zellen während des Experiments zu weit von der Startposition entfernt hatten und die Auswertung der späteren Aufnahmen zu Artefakten geführt hätte.

Während der ersten acht Minuten liegen die Konzentrationen der gebundenen Proteine in der Nähe von Null. Daher kann geschlussfolgert werden, dass der 561 nm Laser keine direkten Schäden verursacht, an die PCNA rekrutiert wird.

Im zweiten Teil der Kontrollexperimente soll die dritte und vierte Frage beantwortet werden: Ist das Bleichen der Proteine reversibel und ändert sich die Gesamtmenge an PCNA während eines Experiments? Um diese Frage zu beantworten, werden dieselben Daten wie im vorigen Kontrollexperiment verwendet. Im Unterschied zur vorigen Kontrolle wird hier allerdings das Nukleus-Fluoreszenz-Signal ($NFS(t)$) ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 10b dargestellt. Zu Beginn fällt das Signal aufgrund des Bleichens deutlich ab. Während der ersten Minute sinkt das Signal noch weiter. Dies wird hervorgerufen durch die hohe Bildaufnahmerate und das hierdurch hervorgerufene zusätzliche Bleichen der Proteine. In den Experimenten wurde nach etwa einer Minute die Bildaufnahmerate herabgesetzt, weshalb die Proteine weniger gebleicht wurden und daher die Kurven während des restlichen Zeitabschnitts kaum merklich absinken. Dies zeigt also, dass sich die Gesamtmenge an PCNA während der Zeitspanne eines Experiments nicht ändert und dass das Bleichen der Proteine irreversibel ist (andernfalls müssten die Kurven wieder ansteigen). Dieses Ergebnis wird auch unterstützt durch die Erkenntnisse anderer Autoren (Sporbert et al., 2002). Beide Ergebnisse dieser Kontrollexperimente (Bleichen ist irrever-

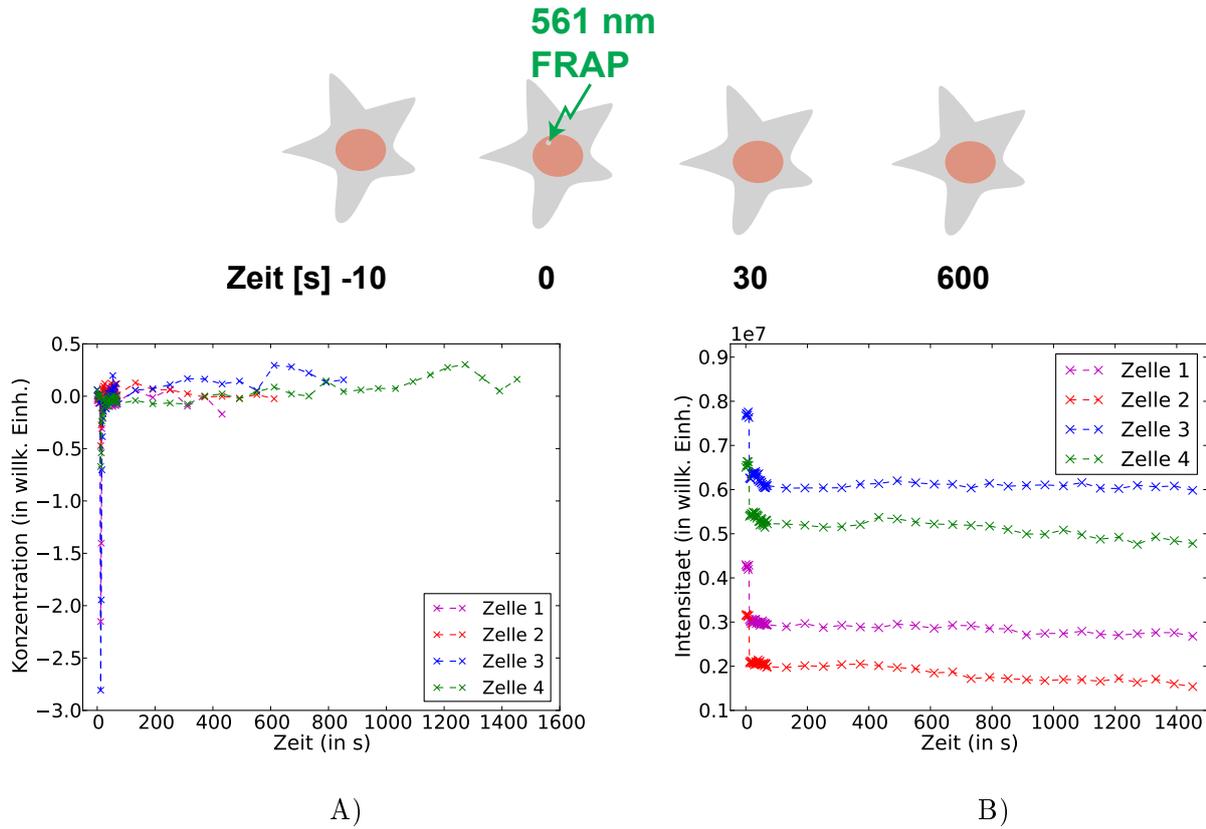


Abbildung 10: A) Konzentration der rekrutierten PCNA-Proteine nach Bestrahlung mit dem FRAP-Laser (561 nm). B) Nucleus-Fluoreszenz-Signal (NFS) der in A) gezeigten Zellen. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze.

sibel und die Gesamtmenge an PCNA ist konstant) sind wichtige Informationen für die theoretische Modellierung.

Zur Beantwortung der fünften Frage werden die Aufnahmen der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente ausgewertet, die auch im Abschnitt 4.2 verwendet werden. Anstatt jedoch das Signal aus der bestrahlten Region zu analysieren, wird eine Region im Zellkern ausgewertet, die weder mikrobestrahlt noch gebleicht wurde (außer dem unvermeidlichen Bleichen in Folge der Bildaufnahmen). Um die Konzentration der frei diffundierenden PCNA-Proteine innerhalb dieser Region zu erhalten, wird eine Variation von Gleichung (84) verwendet:

$$PCNA_{\text{frei}}(t) = \frac{\nu}{NBR_{\text{Fläche}}} \left((NBR(t) - HS(t) \frac{NBR_{\text{Fläche}}}{HS_{\text{Fläche}}}) BF \right) \quad (85)$$

Hierbei steht $NBR(t)$ für das Signal aus der nicht bestrahlten und nicht photogeblichen Region sowie $NBR_{\text{Fläche}}$ für die Fläche dieser Region. In Abbildung 11 ist $PCNA_{\text{frei}}(t)$ für die dreizehn Zellen dieses Datensatzes dargestellt. Die Änderung von $PCNA_{\text{frei}}(t)$ kurz nach dem Mikrobestrahlen und dem Bleichen resultiert daher, dass durch die Mikrobestrahlung und das FRAP-Bleichen die annähernd homogene, räumliche Verteilung von PCNA gestört wird. Ansonsten bleibt $PCNA_{\text{frei}}(t)$ näherungsweise konstant. Letzteres ist auch wieder eine wichtige Information für das später verwendete Modell.

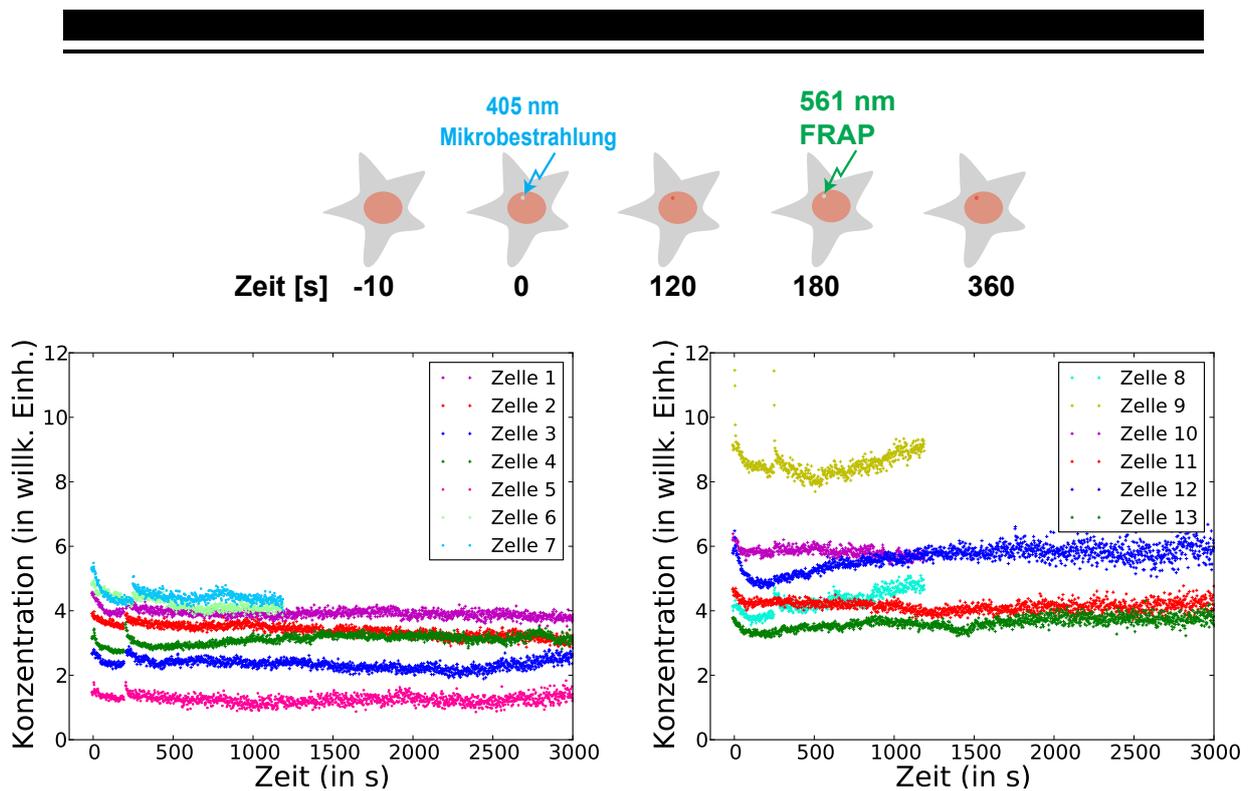


Abbildung 11: Dargestellt ist die Konzentration von PCNA in einer nicht bestrahlten Region während der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. Die Kurven der dreizehn Zellen wurden der Übersichtlichkeit halber in zwei Gruppen aufgeteilt. Gründe für die von Zelle zu Zelle unterschiedlich hohe PCNA-Konzentration sind die Unterschiede im Zellvolumen und in der Menge an markiertem PCNA. Für die weitere Auswertung sind diese Unterschiede nicht weiter von Belang. Entscheidend für die später verwendeten Modelle ist dagegen, dass in allen Zellen die PCNA-Konzentration in der hier ausgewerteten, nicht bestrahlten Region bis auf den Zeitraum kurz nach der Mikrobestrahlung und kurz nach dem FRAP-Bleichen annähernd konstant ist. Die kurzzeitige Änderung der Konzentration resultiert daher, dass durch die Mikrobestrahlung und das FRAP-Bleichen die annähernd homogene, räumliche Verteilung von PCNA gestört wird.

4.1.5 Theoretische Modelle

Um zu verstehen, welche Prozesse am entscheidendsten zu der charakteristischen PCNA-Rekrutierungskurve in den hier vorgestellten Experimenten beitragen, werden verschiedene theoretische Modelle entwickelt. Diese Modelle sind möglichst einfach gehalten, da mit genügend hoher Komplexität (Anzahl chemischer Spezies und Reaktionen) jedes Modell die experimentellen Daten gut fitten würde. Es wäre bei Modellen mit entsprechender Komplexität also nicht möglich, auf Grundlage dessen, wie gut sie die experimentellen Daten reproduzieren, zwischen ihnen zu unterscheiden oder gar ein Modell auszuschließen. Zusätzlich wird es mit steigender Komplexität eines Modells immer schwieriger, diejenigen Bestandteile des Modells herauszufiltern, deren Beitrag zum Reproduzieren der experimentellen Daten am bedeutendsten ist. Ein besonders interessantes Merkmal der hier vorgestellten Daten ist etwa der Overshoot in den PCNA-Rekrutierungskurven (siehe Abbildung 12). Unter Overshoot wird hier und im Folgenden verstanden, dass die Rekrutierung

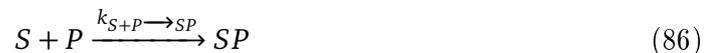
tierungskurven früh ein Maximum aufweisen und anschließend abfallen. Entscheidend ist auch, dass die Rekrutierungskurven nicht wieder auf Null abfallen, sondern bei etwa 30 Minuten ein Plateau erreichen. Mögliche Erklärungen für diesen Overshoot und das sich anschließende Plateau sind:

1. Der Laser verursacht mindestens zwei Arten von DNA-Schäden (Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen) mit unterschiedlicher PCNA-abhängiger Reparaturrate.
2. Die Dissoziationsratenkonstante von PCNA wird durch ein anderes Protein beeinflusst.
3. Die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante des natürlich vorkommenden PCNAs (welches nicht fluoresziert und damit in den Experimenten nicht sichtbar ist) unterscheiden sich von den entsprechenden Raten des künstlichen (fluoreszierenden) PCNAs.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die meisten der dort diskutierten Modelle allein durch das Vorhandensein des Overshoots ausgeschlossen werden können. Lediglich das Modell, in dem die Dissoziationsratenkonstante von einem unbekanntem Protein erhöht wurde und das Modell, in dem die Assoziationsratenkonstante von einem unbekanntem Protein verringert wurde und in dem Dissoziation nicht vernachlässigbar ist, kommen von den im ersten Teil der Arbeit diskutierten Modellen als Erklärung für den Overshoot in Frage. Von den zwei letztgenannten Modellen wurde nur das Modell, in dem die Dissoziationsratenkonstante von einem unbekanntem Protein erhöht wird, in die obige Auflistung aufgenommen, da es für die folgende Untersuchung besonders geeignet ist. Der Grund hierfür ist, dass die hier vorgestellte Methode auf dem Vergleich der FRAP-Kurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase basiert und damit besonders sensitiv für eine Änderung der Dissoziationsratenkonstante ist.

Für alle drei der oben aufgelisteten Szenarien werden im Folgenden minimale Modelle vorgestellt. Zuvor muss betont werden, dass in dem hier vorgestellten Verfahren alle experimentellen Kurven einer Gruppe gemeinsam und mit denselben Parametern (etwa Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten) gefittet werden. Die erste Gruppe sind hierbei die vierzehn Zellen gemeint, die nur bestrahlt (also nicht photogeleicht) wurden. Die zweite Gruppe umfasst die dreizehn Zellen, die sowohl bestrahlt als auch photogeleicht wurden. Dank des gleichzeitigen Fittens aller Kurven einer Gruppe reduziert sich die Zahl der freien Parameter und damit auch der Parameterraum, der zu ähnlich guten Fits führt, erheblich.

Alle im Folgenden diskutierten Modelle bestehen aus zwei bis drei chemischen Spezies. Mindestens eine hiervon ist ein Substrat (S), wie etwa ein Einzelstrangbruch in der DNA, ein Doppelstrangbruch oder eine Basenmodifikation. Alle drei sind Schäden, die durch Bestrahlung mit dem 405 nm Laser verursacht werden können (Lan et al., 2005). Außerdem beinhaltet jedes dieser Modelle mindestens ein Protein, welches an dieses Substrat bindet (P). Es wird angenommen, dass die Beziehungen zwischen den chemischen Spezies durch Elementarreaktionen dargestellt werden können, wie beispielsweise:



und



In obigen Gleichungen steht P stellvertretend für ein PCNA-Protein, S repräsentiert eine Schadensstelle in der DNA und SP bezeichnet an einen DNA-Schaden gebundenes PCNA. Weiterhin stehen $k_{S+P \rightarrow SP}$ und $k_{SP \rightarrow S+P}$ für die Ratenkonstante der Hin- und Rückreaktion (Erstere wird im Folgenden auch Assoziationsratenkonstante und letztere Dissoziationsratenkonstante genannt). PCNA ist ein Trimer, also aufgebaut aus drei gleichartigen Untereinheiten. In den hier vorgestellten Modellen wird angenommen, dass PCNA entweder als Trimer an die DNA bindet oder dass die Trimerisation im Vergleich zur Rekrutierung des PCNA auf einer kürzeren Zeitskala stattfindet. Um das Modell möglichst einfach zu halten, wird daher nur der komplette PCNA-Trimer im Modell berücksichtigt (bezeichnet als P). Da wir wissen, dass die Diffusion von PCNA im Vergleich zur Rekrutierung auf einer kürzeren Zeitskala abläuft (siehe Abschnitt 4.1.4), enthält das Modell keine Beschreibung der Diffusion. Dies dient erneut dazu, das Modell so einfach wie möglich zu halten. Unter der Annahme der Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes können die obigen chemischen Reaktionsgleichungen in folgendes System von Differentialgleichungen für die Konzentrationen der chemischen Spezies (bezeichnet mit $[S]$, $[P]$ und $[SP]$) übersetzt werden:

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}[P][S] - k_{SP \rightarrow S+P}[SP]. \quad (88)$$

Dieses Gleichungssystem repräsentiert das Basismodell. Zur weiteren Vereinfachung wird in diesem und in den sich anschließenden Modellen davon ausgegangen, dass die Konzentration der frei diffundierenden PCNA-Proteine in der bestrahlten Region während der Dauer des Experiments annähernd konstant ist. In der Realität wird die Konzentration der frei diffundierenden PCNA-Proteine in der bestrahlten Region kurzfristig dadurch verringert, dass PCNA an den Schaden bindet. In den hier vorgestellten Modellen wird aber davon ausgegangen, dass die Gesamtmenge an PCNA-Proteinen im Vergleich zur Anzahl an DNA-Schäden hoch ist, dass die Diffusion für einen schnellen Ausgleich der Konzentration in der bestrahlten Region sorgt und dass damit die kurzfristige und geringfügige Änderung der Konzentration frei diffundierender PCNA-Proteine vernachlässigbar ist. Die Ergebnisse der Kontrollexperimente (Konzentration der frei diffundierenden PCNA-Proteine in einer unbestrahlten Region ist annähernd konstant) sprechen dafür, dass diese Vereinfachung zulässig ist. Damit reduziert sich das obige Gleichungssystem auf:

$$[P](t) = P_0, \quad (89)$$

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}P_0[S] - k_{SP \rightarrow S+P}[SP]. \quad (90)$$

Dieses Basismodell ist zu einfach, um den Overshoot aus den experimentellen Daten zu reproduzieren. Die Anfangssteigung und der Sättigungswert dieser Kurve können zwar durch eine Änderung der Parameter $k^{\text{eff}} = P_0k_{S+P \rightarrow SP} + k_{SP \rightarrow S+P}$ und S_0 (siehe Abschnitt 3.2.1) variiert werden, nicht jedoch die eigentliche Kurvenform, die monoton steigend und monoexponentiell ist (Für ein Beispiel siehe graue Kurven für Protein A in beliebiger Abbildung aus Abschnitt 3.2.2). Folglich wird eine größere Anzahl von chemischen Spezies oder chemischen Reaktionen benötigt, um den Overshoot aus den experimentellen Daten im Modell zu erzeugen.

In dieser Arbeit werden folgende Erweiterungen des Basismodells diskutiert:

1. Es wird eine chemische Reaktion hinzugefügt, die beschreibt, dass der Schaden komplett repariert wird und PCNA anschließend dissoziiert:



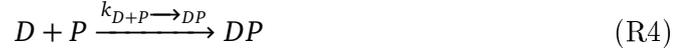
Um das Modell so einfach wie möglich zu halten, wird die Dissoziation von PCNA vor Reparatur des Schadens vernachlässigt. Hieraus ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$[P](t) = P_0, \quad (91)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{S+P \rightarrow SP} P_0 [S], \quad (92)$$

$$\frac{d[SP]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP} P_0 [S] - k_{Repair} [SP]. \quad (93)$$

2. Es wird ein zweites Substrat D hinzugefügt. Dies kann etwa ein Doppelstrangbruch sein, der während der Dauer des Experiments nicht repariert wird, von dem PCNA aber dennoch dissoziieren kann:



In dieser Erweiterung wird die Reparatur der ersten Art von DNA-Schäden (etwa Einzelstrangbrüche) auf dieselbe Art berücksichtigt wie in der zuerst angesprochenen Erweiterung des Basismodells:



Allerdings wird in diesem Modell berücksichtigt, dass PCNA dissoziieren kann (es wird also Gleichung (87) verwendet). Hieraus ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

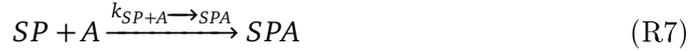
$$[P](t) = P_0, \quad (95)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{S+P \rightarrow SP} P_0 [S] + k_{SP \rightarrow S+P} [SP], \quad (96)$$

$$\frac{d[D]}{dt} = -k_{D+P \rightarrow DP} P_0 [D] + k_{SP \rightarrow D+P} [DP], \quad (97)$$

$$\frac{d[SP]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} - \frac{d[D]}{dt} - k_{Repair} [SP], \quad (98)$$

3. Eine zweite Proteinart wird hinzugefügt. Diese beeinflusst die Dissoziationsratenkonstante von PCNA, ist selbst aber unbeeinflusst von PCNA. Um das Modell so einfach wie möglich zu halten, bleibt die Dissoziation des zweiten Proteins unberücksichtigt. Eine Berücksichtigung der Dissoziation dieses Proteins hätte zudem keinen nennenswerten Einfluss auf die Ergebnisse dieser Untersuchung, da die Rekrutierungskurven des beeinflussenden Proteins sich qualitativ nicht ändern würden (Es wären immer noch monoton ansteigende, monoexponentielle Funktionen). Wiederum aus Gründen der Einfachheit des Modells wird in dieser Variante nur eine Art von DNA-Schäden berücksichtigt. Auch wenn in den Experimenten tatsächlich verschiedene Arten von DNA-Schäden die Rekrutierung von PCNA bewirken sollten, kann dieses Modell dennoch eine gute Beschreibung liefern, falls die Ratenkonstanten von PCNA für die verschiedenen Schäden ungefähr gleich sind. A steht für die zweite Proteinart und mit SPA wird ein DNA-Schaden bezeichnet, an den sowohl PCNA als auch dieses zweite Protein gebunden sind. Die Gleichungen dieses Modells lauten (zusätzlich zu den Gleichungen (86) und (87)):



Zur Vereinfachung des Modells wird angenommen, dass auch Protein A in genügend hoher Konzentration vorliegt, sodass die lokale Änderung der Konzentration in der bestrahlten Region vernachlässigbar ist. Damit ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$[P](t) = P_0, \quad (99)$$

$$[A](t) = A_0, \quad (100)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = k_{SP \rightarrow S+P}[SP] - k_{S+P \rightarrow SP}P_0[S] - k_{S+A \rightarrow SA}A_0[S], \quad (101)$$

$$\frac{d[SP]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP}P_0[S] - k_{SP \rightarrow S+P}[SP] - k_{SP+A \rightarrow SPA}A_0[SP]. \quad (102)$$

$$\frac{d[SA]}{dt} = k_{S+A \rightarrow SA}A_0[S] + k_{SPA \rightarrow SA+P}[SPA] - k_{SA+P \rightarrow SPA}P_0[SA]. \quad (103)$$

$$\frac{d[SPA]}{dt} = k_{SP+A \rightarrow SPA}A_0[SP] + k_{SA+P \rightarrow SPA}P_0[SA] - k_{SPA \rightarrow SA+P}[SPA]. \quad (104)$$

4. Die vierte Erweiterung des Basismodells baut auf der Annahme auf, dass die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten der endogenen¹³ PCNA-Proteine (welche nicht fluoreszieren und damit in den hier vorgestellten Experimenten nicht sichtbar sind) verschieden sind von den entsprechenden Raten der fluoreszierenden PCNA-Proteine. Aus der Literatur ist bekannt, dass die natürlichen PCNA-Proteine ähnlich stark an die DNA gebunden sind wie die fluoreszierenden PCNA-Proteine ((Sporbert et al., 2005), Abbildung 2). Dennoch wurde dieses Modell in die hier vorgestellte Untersuchung aufgenommen, um zum einen das Ergebnis von Sporbert et al. (2005) zu bekräftigen und zum anderen zu demonstrieren, dass die hier vorgestellte Methode tatsächlich hilft, Modelle auszuschließen. Die endogenen PCNA-Proteine werden mit E bezeichnet und es ergeben sich folgende Gleichungen (wieder zusätzlich zu den Gleichungen (86) und (87)):



Hieraus ergibt sich folgendes Gleichungssystem:

$$[P](t) = P_0, \quad (\text{105})$$

$$[E](t) = E_0, \quad (\text{106})$$

$$\frac{d[SP]}{dt} = k_{S+P \rightarrow SP} P_0 [S] - k_{SP \rightarrow S+P} [SP]. \quad (\text{107})$$

$$\frac{d[SE]}{dt} = k_{S+E \rightarrow SE} E_0 [S] - k_{SE \rightarrow S+E} [SE]. \quad (\text{108})$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[SP]}{dt} - \frac{d[SE]}{dt}. \quad (\text{109})$$

Deterministische Modelle wie die hier aufgelisteten sind dann eine gute Beschreibung der in ihnen abgebildeten Prozesse, wenn die Konzentrationen der beteiligten Spezies hoch genug sind, dass die stochastische Natur der zugrundeliegenden Prozesse vernachlässigbar ist. Dies äußert sich beispielsweise darin, dass die experimentellen Rekrutierungskurven von PCNA verhältnismäßig glatt sind (Sie haben eine geringe Streuung um den lokalen Mittelwert, etwa über jeweils fünf benachbarte Datenpunkte gemittelt). Selbst wenn die stochastische Natur der simulierten Prozesse nicht vernachlässigbar sein sollte, dienen solche deterministischen Modelle dennoch als nützliche Näherung.

Um die Differentialgleichungen der jeweiligen Modelle zu lösen, wird ein expliziter Runge-Kutta Cash-Karp Algorithmus verwendet (Cash and Karp, 1990). Da dieser Algorithmus verhältnismäßig lange Rechenzeiten benötigt, wenn die Konzentrationen der chemischen Spezies oder die Ratenkonstanten sehr hohe oder sehr niedrige Werte annehmen, werden diese Größen auf das Intervall $[e^{-25}, e^{25}]$ beschränkt. Eine Möglichkeit für eine derartige Einschränkung ist die Nutzung einer Bestrafungsfunktion, die den durch den

¹³ Endogen steht für körpereigen. Hiermit sind also die natürlich vorkommenden Proteine gemeint.

Fit-Algorithmus zu minimierenden Wert künstlich hoch setzt, wenn die Werte in den un-erlaubten Bereich rücken. Da dies aber zu unerwünschten Nebeneffekten führt, etwa dass der Fit-Algorithmus deutlich langsamer konvergiert oder an offensichtlich nicht optimalen Parametersätzen konvergiert, wird der Fit-Algorithmus mit veränderten Parametern κ_{new} durchgeführt. Hier steht κ_{new} für einen beliebigen Parameter, also eine Ratenkonstante oder eine Proteinkonzentration. Dieser neue Parameter ergibt sich aus dem ursprünglichen Parameter κ wie folgt: $\kappa_{\text{new}} = e^{25 \cdot \sin(\kappa)}$. Hierdurch wird also sichergestellt, dass die Werte für κ_{new} innerhalb des Intervalls $[e^{-25}, e^{25}]$ liegen.

Um den besten Fit eines bestimmten Modells an einen gegebenen Datensatz zu finden, wird ein Algorithmus verwendet, der auf der Covariance Matrix Adaptation Evolution Strategy (CMA-ES) (Hansen, 2006) aufbaut. Dieser evolutionäre Algorithmus basiert auf dem wiederholten Zusammenspiel von Variation und Selektion: In jeder Iteration wird unter Zuhilfenahme des zuvor erwähnten Runge-Kutta Cash-Karp Algorithmus eine Schar von Lösungen für die vorgegeben Differentialgleichungen erzeugt. Diese Lösungen werden zufällig anhand einer Verteilung generiert, die von der Elterngeneration abhängt. Anschließend werden aus dieser Schar von Lösungen diejenigen mit der höchsten Fitness¹⁴ ausgewählt. Diese Lösungen werden im nächsten Iterationsschritt als Elterngeneration verwendet. Letztendlich ergibt sich im Laufe vieler Iterationsschritte eine Lösung mit möglichst hoher Fitness. Der Startwert für die Konzentration der frei diffundierenden Proteine wird auf $P_0 = \overline{\text{SBR}}_0$ (also auf den Mittelwert des Signals aus der bestrahlten Region vor der Mikrobestrahlung) gesetzt. Ausgehend von diesem Startwert kann der Fit-Algorithmus den Wert von P_0 verändern, allerdings wird der Algorithmus dabei auf folgenden Bereich eingeschränkt:

$$0.8 \cdot \overline{\text{SBR}}_0 \leq P_0 \leq 1.2 \cdot \overline{\text{SBR}}_0. \quad (110)$$

Es wird also erlaubt, dass der Wert von P_0 um 20% vom experimentell ermittelten Wert $\overline{\text{SBR}}_0$ abweicht. Diese erlaubte Abweichung orientiert sich an den Kontrollexperimenten in Abbildung 11, in denen die Konzentration von PCNA in einer unbestrahlten und ungebleichten Region nur eine geringe Änderung während der Dauer des Experiments erfährt (ausgenommen die Bereiche kurz nach der Mikrobestrahlung und kurz nach dem Bleichen). Für die im späteren Verlauf gezeigten Resultate ist der exakte Wert dieser erlaubten Abweichung nicht entscheidend, daher genügt eine grobe Abschätzung anhand der Kontrollexperimente.

Um den Parameterraum zu reduzieren, werden stets alle Rekrutierungskurven der Zellen eines Experimentes gleichzeitig gefittet und dabei für alle Kurven dieselben Werte für die Ratenkonstanten verwendet. Da keine Daten über die Konzentration der DNA-Schäden oder die Konzentration eines anderen Proteins außer PCNA vorliegen, wird dem Fit-Algorithmus erlaubt, beliebige positive Werte für diese Konzentrationen zu wählen (wobei, wie zuvor erwähnt, vor der Übergabe dieser Parameter an den Algorithmus zum Lösen der Differentialgleichungen sichergestellt wird, dass die Parameter im Intervall $[e^{-25}, e^{25}]$ liegen). Die Startwerte für die Konzentration der DNA-Schäden S_0 sowie für die Ratenkonstanten werden auf 10^x gesetzt, wobei x eine reelle Zahl ist und zufällig zwischen 2 und -4 gezogen wird. Der Grund hierfür ist, dass Startwerte außerhalb dieses Bereiches zu Kurven mit sehr starker Abweichung zu den experimentellen Daten führen und der Fit-Algorithmus häufig an offensichtlich nicht optimalen Stellen konvergiert (die Abweichung zwischen den Modellkurven und den experimentellen Kurven ist auch nach der Konvergenz des Fit-Algorithmus immer noch sehr hoch).

¹⁴ In dieser Arbeit wird die Fitness über die Güte des Fits bestimmt. Siehe hierzu nächster Unterabschnitt.

4.1.6 Kreuzvalidierung

Als Kennzahl für die Güte eines Fits wird χ^2 verwendet:

$$\chi^2 = \sum_T \frac{(\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T] - \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Theo}}[T])^2}{\sigma^2[T]} \quad (111)$$

Die Summe geht hierbei über alle Datenpunkte. $\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T]$ ist also der T te experimentell ermittelte Wert der Konzentration von rekrutiertem PCNA und $\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Theo}}[T]$ ist der T te theoretische Wert der Konzentration von rekrutiertem PCNA. Aus welchen Termen sich die Rekrutierungskurve zusammensetzt, ist allerdings von Modell zu Modell verschieden. Für das Modell mit zwei Arten von DNA-Schäden gilt etwa: $\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Theo}}[T] = [\text{SP}][T] + [\text{DP}][T]$ (Summe von an Einzel- und Doppelstrangbrüchen gebundenes PCNA). Wohingegen für das Modell, in dem die Dissoziationsratenkonstante von PCNA von einem weiteren Protein beeinflusst wird, folgendes gilt: $\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Theo}}[T] = [\text{SP}][T] + [\text{SPA}][T]$ (Summe von rekrutiertem PCNA in Abwesenheit und Anwesenheit von A). Im Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine gilt schließlich: $\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Theo}}[T] = [\text{SP}][T]$. Im Übrigen sei darauf hingewiesen, dass der Lösungsalgorithmus für das Differentialgleichungssystem eine adaptive Schrittweite verwendet, zum Vergleich mit den experimentellen Datenpunkten werden aber nur diejenigen theoretischen Datenpunkte herausgegriffen, deren Zeitvariable mit derjenigen der experimentellen Datenpunkte übereinstimmt.

In der obigen Gleichung steht $\sigma^2[T]$ für die gleitende Varianz der experimentellen Daten. Um diese gleitende Varianz zu berechnen, muss zunächst der gleitende Mittelwert bestimmt werden. Da für eine bestimmte Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein einzelner Wert vorliegt, wird der gleitende Mittelwert über die zwei Datenpunkte vor und hinter dem entsprechenden Datenpunkt errechnet:

$$\begin{aligned} \overline{\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T]} &= \left(\sum_{i=T-2}^{i=T+2} \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[i] \right) / 5 \\ &= (\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T-2] + \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T-1] + \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T] + \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T+1] + \text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T+2]) / 5 \end{aligned} \quad (112)$$

Mit diesem gleitenden Mittelwert kann nun auch die gleitende Varianz auf ähnliche Weise ermittelt werden:

$$\sigma^2[T] = \left(\sum_{i=T-2}^{i=T+2} (\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[i] - \overline{\text{PCNA}_{\text{Rek}}^{\text{Exp}}[T]})^2 \right) / 5 \quad (113)$$

Für die Datenpunkte, in denen dieses Verfahren nicht anwendbar ist (etwa direkt vor und nach dem Bleichen), wird die Varianz der Datenpunkte vor der Mikrobestrahlung verwendet.

Kleine Werte von χ^2 kennzeichnen einen guten Fit, wohingegen große Werte von χ^2 das Merkmal eines schlechten Fits sind. Daher versucht der Fit-Algorithmus, den Wert von χ^2 zu minimieren.

Um ein zusätzliches Maß dafür zu haben, ob ein Modell die Daten gut beschreibt oder nicht, wird ein Kreuzvalidierungsverfahren angewendet. Von den 13 Kurven der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente (den 14 Kurven der Mikrobestrahlungsexperimente) werden zehn Kurven als Trainingsmenge verwendet. Der Fit-Algorithmus wird also darauf

angesetzt, den Wert von χ^2 bezogen auf diese zehn Trainingskurven und ein gegebenes Modell zu minimieren. Anschließend werden die verbliebenen Kurven des jeweiligen Experiments als Validierungsmenge verwendet: Die chemischen Ratenkonstanten des Modells werden auf die Werte gesetzt, an denen der Fit-Algorithmus nach dem Fitten der Trainingskurven konvergierte, und mit diesen fixen Werten wird χ^2 bezogen auf die Validierungskurven minimiert.

In den Validierungsfits gibt es für jede Rekrutierungskurve mindestens zwei freie Parameter, S_0 und P_0 . Letzterer ist wie zuvor erwähnt limitiert durch Gleichung (110). Im Falle des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden kommt zu diesen noch ein weiterer freier Parameter hinzu: die anfängliche Konzentration von Doppelstrangschäden D_0 . Im Falle des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante kommt als zusätzlicher freier Parameter die Konzentration des beeinflussenden Proteins A_0 hinzu.

Für ein gegebenes Modell und einen gegebenen experimentellen Datensatz wird dieses Kreuzvalidierungsverfahren vierfach angewendet, wodurch jede experimentell ermittelte Rekrutierungskurve genau ein Mal Teil der Validierungsmenge ist. Da die Gesamtzahl an Rekrutierungskurven im Falle der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente 13 war (im Falle der Mikrobestrahlungsexperimente 14), besteht die erste Validierungsmenge aus vier Kurven, die zweite Validierungsmenge aus drei Kurven (im Falle der Mikrobestrahlungsexperimente aus 4 Kurven) und die letzten beiden Validierungsmengen aus drei Kurven. Um schließlich zu bestimmen, wie gut ein Modell die Daten beschreibt, wird die Summe über χ^2 für alle Validierungskurven errechnet und dieser Wert mit den entsprechenden Werten der anderen Modelle verglichen.

4.2 Ergebnisse

In diesem Abschnitt werden die Daten der Mikrobestrahlungsexperimente sowie die Daten der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente vorgestellt. Außerdem werden zu jedem dieser Experimente die Validierungs-Fits der verschiedenen Modelle gezeigt. Schließlich wird gezeigt, dass die Kurven der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente mehr Informationen über die der Rekrutierung zugrundeliegenden Prozesse enthalten als die Kurven der Mikrobestrahlungsexperimente. Dank dieser Informationen wird es möglich sein, Modelle auszuschließen, die aufgrund der Kurven ohne FRAP nicht ausgeschlossen werden können. Zunächst werden die Rekrutierungskurven der Mikrobestrahlungsexperimente vorgestellt, um hiermit die FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente und die Wahl der Modelle zu motivieren.

4.2.1 Mikrobestrahlungsexperimente

Die Rekrutierungskurven der vierzehn Zellen aus den Mikrobestrahlungsexperimenten sind in Abbildung 12 dargestellt. Zu sehen ist die Konzentration von rekrutiertem PCNA (gepunktete Kurven) innerhalb der bestrahlten Region, so wie sie aus den experimentellen Daten ermittelt wurde (entsprechend Gleichung (84)). Bei $t = 0$ s erfolgt jeweils die Mikrobestrahlung, die zu DNA-Schäden und damit auch zur Rekrutierung von PCNA führt. Nach etwa fünf Minuten weisen die Rekrutierungskurven ein Maximum auf, nach dem sie monoton abfallen, bis sie schließlich nach etwa dreißig Minuten ein Plateau erreichen. Einige der Kurven enden früher als andere, da sich die Zellen in diesen Experimenten ab diesem Zeitpunkt zu stark bewegten und damit die Auswertung der nachfolgenden Daten

unbrauchbar war. Vor dem Erreichen des Plateaus sind die Assoziations- und Dissoziationsrate von PCNA augenscheinlich nicht im Gleichgewicht, weshalb klassische FRAP-Methoden an dieser Stelle nicht anwendbar sind. Wie noch gezeigt wird, ist die theoretische Auswertung von FRAP-Experimenten unter diesen Bedingungen aber durchaus möglich und sehr nützlich.

Zunächst werden die Kurven der Mikrobestrahlungsexperimente mithilfe des ersten der erweiterten Modelle gefittet. In diesem Modell werden lediglich zwei chemische Spezies berücksichtigt, die PCNA-Proteine und die DNA-Schäden, sowie zwei chemische Reaktionen: Das Binden von PCNA an beschädigte DNA (Gleichung (86)) und die Reparatur des Schadens mit anschließender Dissoziation von PCNA (Gleichung (R3)). Dieses Modell ist nach dem Basismodell das einfachste der hier vorgestellten. Um das Modell nicht komplizierter als nötig zu gestalten, werden die Reparatur des DNA-Schadens und die Dissoziation von PCNA zu einem Schritt zusammengefasst. Dies ist dann eine gute Näherung, wenn die Dissoziation von PCNA nach abgeschlossener Reparatur im Vergleich zur Dauer der Reparatur sehr schnell abläuft. Natürlich spielen bei der Reparatur der DNA auch andere Proteine neben PCNA eine wichtige Rolle. Wiederum aus Gründen der Einfachheit des Modells werden diese nicht berücksichtigt. Das Modell kann dennoch eine gute Näherung der tatsächlich ablaufenden Prozesse sein, wenn die Rekrutierung von PCNA der ratenlimitierende Schritt in den modellierten Prozessen ist und die weiteren Proteine keinen großen Einfluss auf die Rekrutierung und Dissoziation von PCNA haben.

Abbildung 12 zeigt den besten Fit dieses Modells unter Verwendung von χ^2 , wie im Methodenteil erläutert. In diesem Fit wurde allerdings das Kreuzvalidierungsverfahren nicht angewendet. Es wurden also alle 14 Rekrutierungskurven gleichzeitig gefittet, wobei die chemischen Ratenkonstanten freie Parameter waren (aber eben für alle 14 Kurven denselben Wert angenommen haben). Es wurde auf das Kreuzvalidierungsverfahren verzichtet, um zu überprüfen, ob die Kurven von diesem Modell überhaupt zufriedenstellend gefittet werden können.

Dieses sehr einfache Modell ist in der Lage, das Maximum in den Rekrutierungskurven und den anschließenden Abfall zu reproduzieren. Allerdings schlägt es dabei fehl, das Plateau bei etwa dreißig Minuten wiederzugeben (siehe die Kurven zu den Zellen 1-3 in Abbildung 12). Dies liegt daran, dass in diesem Modell nach genügend langer Zeit näherungsweise alle Schäden repariert worden sind und die Konzentration von rekrutiertem PCNA daher gegen Null strebt.

Dieses Ergebnis legt nahe, dass es nicht genügt, nur ein Substrat und eine Proteinspezies im Modell zu berücksichtigen, sofern der Overshoot inklusive Plateau reproduziert werden soll. Daher werden im nächsten Abschnitt drei Modelle diskutiert, die entweder zwei Substrate (etwa Einzel- und Doppelstrangbrüche) oder zwei Proteinspezies beinhalten und hierdurch in der Lage sind, den Overshoot inklusive Plateau zu reproduzieren.

4.2.1.1 Zwei-DNA-Schadensarten-Modell

Eine mögliche Erklärung für einen Overshoot mit anschließendem Plateau ist das Vorhandensein zweier Arten von DNA-Schäden, etwa Einzel- und Doppelstrangbrüche, die mit unterschiedlichen Raten repariert werden. In einem derartigen Szenario wird der Overshoot hervorgerufen durch die schnelle Reparatur der ersten Art von Schäden. Der Grund für das Plateau liegt dann darin, dass die Reparatur der zweiten Art von Schäden auf einer Zeitskala abläuft, die länger als die Dauer des Experiments ist (also im Modell nicht berücksichtigt wird).

Dieses Modell besteht aus den Gleichungen des Basismodells (Gleichung (86) und (87)), zu denen die Gleichungen (R4), (R5) und (94) hinzugefügt wurden. Um das Modell so

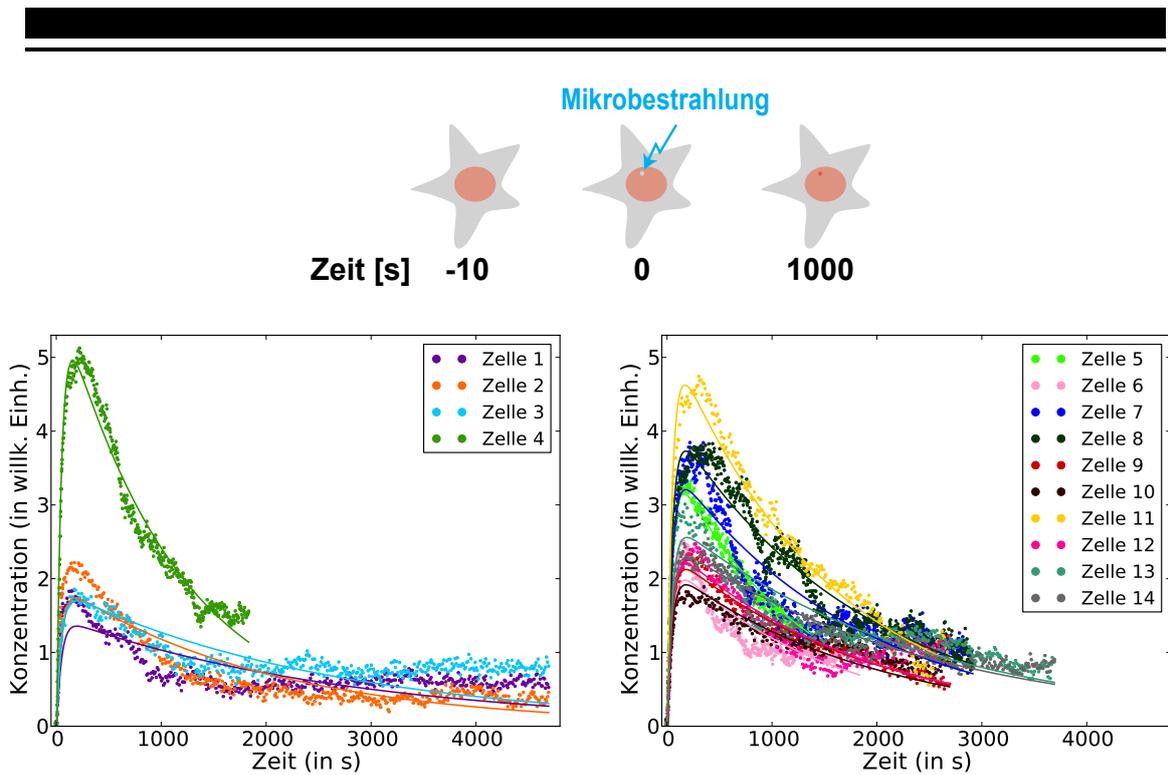


Abbildung 12: Proteinrekrutierungskurven der 14 Zellen aus den Mikrobestrahlungsexperimenten. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. Für die Fits wurde das erste der erweiterten Modelle verwendet (Es ist das einfachste Modell, das einen Overshoot erzeugen kann). Dieses berücksichtigt lediglich das Binden von PCNA an beschädigte DNA (Gleichung (86)) und die Reparatur des Schadens mit anschließender Dissoziation von PCNA (Gleichung (R3)). Zum Fitten der Daten wurde an dieser Stelle auf die Anwendung des Kreuzvalidierungsverfahrens verzichtet, es wurden also alle 14 Kurven gleichzeitig gefittet. Dennoch kann das Modell das Plateau nach dem Overshoot (siehe Zellen 1-3 bei $t > 1800$ s) nicht reproduzieren. $\chi^2 \approx 1.9 \cdot 10^5$ und die Anzahl der gefitteten Datenpunkte ist 6320.

einfach wie möglich zu halten, hängen die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante von PCNA nicht davon ab, an welche Art von DNA-Schaden das PCNA gebunden ist ($k_{S+p \rightarrow SP} = k_{D+p \rightarrow DP}$ und $k_{SP \rightarrow S+p} = k_{DP \rightarrow D+p}$). Der einzige Unterschied in den zwei Arten von DNA-Schäden liegt in diesem Modell also darin, dass die erste Art während der Dauer des Experiments repariert werden kann, wohingegen die zweite Art in dieser Zeitspanne nicht komplett repariert wird.

Auch in diesem Modell wird die Reparatur des DNA-Schadens der ersten Art und die anschließende Dissoziation von PCNA als ein Schritt zusammengefasst (entsprechend Gleichung (94)). Wie bereits erwähnt, ist dies dann eine gute Näherung, wenn die Dissoziation von PCNA nach abgeschlossener Reparatur im Vergleich zur Dauer der Reparatur sehr schnell abläuft (anders ausgedrückt: Die Dissoziationsratenkonstante nach Reparatur ist deutlich größer als die Reparaturratenkonstante). Hierbei sei darauf hingewiesen, dass die Dissoziationsratenkonstante von PCNA nach abgeschlossener Reparatur nicht gleichzusetzen ist mit der Dissoziationsratenkonstante von PCNA vor der Reparatur des Schadens. Die veränderte DNA-Struktur könnte etwa Einfluss auf die Dissoziationsratenkonstante

von PCNA haben. Daher besteht kein Widerspruch im Zusammenfassen des Reparatur-schritts und der anschließenden Dissoziation mit den noch zu diskutierenden Ergebnissen der Validierungsfits dieses Modells (in diesen ist die Reparaturratenkonstante deutlich größer als die Dissoziationsratenkonstante vor der Reparatur).

Abbildung 13 zeigt einen Validierungsfits dieses Modells bezogen auf die Experimente ohne FRAP. Die Parameterwerte sind darunter in Tabelle 2 zu finden. In diesem Validierungsfits wurden die Kurven der Zellen 5-14 als Trainingsmenge verwendet, um die Werte für die chemischen Ratenkonstanten zu ermitteln. Anschließend wurden die Kurven der Zellen 1-4 als Validierungsmenge verwendet. Die entsprechenden Ergebnisse für die Parameterwerte und χ^2 der anderen drei Validierungsfits (mit rotierender Zuteilung der Kurven in Trainings- und Validierungsmenge) sind ebenfalls in Tabelle 2 wiedergegeben. Da die Kurven dieser Validierungsfits den in Abbildung 13 dargestellten Kurven sehr ähneln, wird auf eine entsprechende zusätzliche Abbildung verzichtet.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, kann dieses Modell den Overshoot inklusive Plateau reproduzieren. Interessanterweise ist sowohl in diesem Validierungsfits als auch in den anderen drei Validierungsfits die Dissoziationsratenkonstante ($k_{SP \rightarrow S+P} \approx 1.7 \cdot 10^{-11}$) acht Größenordnungen unterhalb der Dissoziationsratenkonstante aus den Validierungsfits der im späteren Verlauf diskutierten FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente (Für alle vier Validierungsfits der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente liegt $k_{SP \rightarrow S+P}$ zwischen $4.3 \cdot 10^{-3}$ und $6.2 \cdot 10^{-3}$, siehe unterer Bereich von Tabelle 2 aus dem nächsten Abschnitt über die Experimente mit FRAP).

4.2.1.2 Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante

Eine weitere Erklärung für den Overshoot mitsamt Plateau ist, dass die Dissoziationsratenkonstante von PCNA durch ein zweites Protein, dessen Konzentration aus dem Experiment nicht bekannt ist, beeinflusst wird. Eine alternative Motivation für dieses Modell ist eine posttranslationale Modifikation des PCNA durch ein anderes Protein nach dem Binden an die Schadensstelle, etwa eine Acetylierung (Cazzalini et al., 2014). Solch eine Modifikation könnte durch die Beeinflussung der chemischen Ratenkonstanten ebenfalls zu einem Overshoot und anschließendem Plateau führen.

Dieses Modell besteht also aus PCNA, einer Art von DNA-Schäden (die auch stellvertretend für verschiedene Schadensarten stehen kann, solange die Ratenkonstanten von PCNA für die verschiedenen Arten annähernd gleich sind) und einer zweiten Proteinspezies, die mit A bezeichnet wird. Beide Proteine, PCNA und A , können an die beschädigte DNA binden. Dieses Modell setzt sich zusammen aus den chemischen Reaktionsgleichungen des Basismodells (Gleichungen (86) und (87)) und zusätzlich den Reaktionsgleichungen (R6) bis (R9). Aus Gründen der Einfachheit des Modells wird die Dissoziation von A nicht berücksichtigt. Eine Berücksichtigung der Dissoziation von A hätte darüber hinaus keinen Einfluss auf die Fit-Ergebnisse, da die Rekrutierungskurven von A sich qualitativ nicht ändern würden (Laut den Ergebnissen aus Abschnitt 3.2.1 ist im Falle der quasi konstant Approximation nur die Summe von Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante für den Konzentrationsverlauf entscheidend). Dahingegen wird die Dissoziation von PCNA in diesem Modell berücksichtigt und die entsprechende Ratenkonstante hängt davon ab, ob neben PCNA auch A an derselben Schadensstelle gebunden ist: Im Fall, dass allein PCNA an den Schaden gebunden ist (dann wird die Ratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}$ verwendet) ist die Dissoziationsratenkonstante geringer im Vergleich dazu, dass PCNA zusammen mit A an eine Schadensstelle gebunden ist (hier wird die Ratenkonstante $k_{SPA \rightarrow SA+P}$ verwendet).

In diesem Modell wird angenommen, dass die vollständige Reparatur des Schadens auf einer längeren Zeitskala stattfindet als die Dauer des Experiments, weshalb wiederum aus

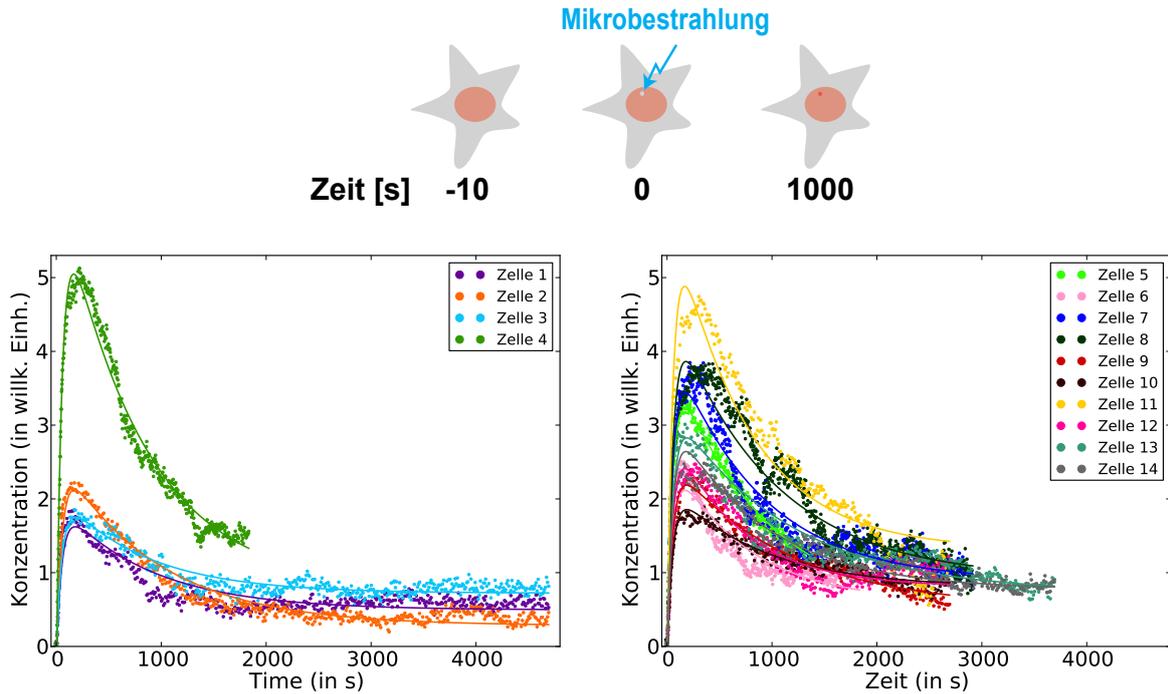


Abbildung 13: Validierungsfit des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells an die Mikrobestrahlungsexperimente. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 1 bis 4 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 2.9 \cdot 10^4$. In diesem Validierungsfit ist die Anzahl der Datenpunkte 1980 und die Parameterwerte sind in der ersten Zeile von Tabelle 2 angegeben.

Validierungsgruppe	$k_{S+p \rightarrow SP}$	$k_{SP \rightarrow S+p}$	k_{repair}	χ^2	# Datenpunkte
Mikrobestrahlungsexperimente:					
Zellen 1-4	$3.6 \cdot 10^{-5}$	$1.7 \cdot 10^{-11}$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$2.9 \cdot 10^4$	1980
Zellen 5-8	$4.3 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-11}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$	$3.7 \cdot 10^4$	2340
Zellen 9-11	$4.9 \cdot 10^{-5}$	$1.4 \cdot 10^{-11}$	$1.7 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^4$	900
Zellen 12-14	$4.4 \cdot 10^{-5}$	$1.5 \cdot 10^{-11}$	$1.6 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^4$	1100
Summe				$1.2 \cdot 10^5$	6320
FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente:					
Zellen 1-4	$3.7 \cdot 10^{-4}$	$4.3 \cdot 10^{-3}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^5$	7000
Zellen 5-7	$3.1 \cdot 10^{-4}$	$5.8 \cdot 10^{-3}$	$1.6 \cdot 10^{-3}$	$5.7 \cdot 10^4$	2950
Zellen 8-10	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$6.2 \cdot 10^{-3}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$6.7 \cdot 10^4$	1800
Zellen 11-13	$3 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^5$	4650
Summe				$3.5 \cdot 10^5$	16400

Tabelle 2: Parameterwerte der Validierungsfits des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells (sowohl für die Mikrobestrahlungsexperimente als auch die FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente). Die Zusammensetzung der jeweiligen Validationsmenge ist in der ersten Spalte angegeben. Die Trainingsmengen ergeben sich jeweils aus den übrigen Kurven.

Gründen der Einfachheit des Modells auf eine Reaktionsgleichung zur Beschreibung der vollständigen Reparatur verzichtet wurde.

Abbildung 14 zeigt einen Validierungsfit dieses Modells und die Daten der Mikrobestrahlungsexperimente. Wie schon zuvor ergeben die Kurven der Zellen 1-4 die Validierungsmenge. Die Trainingsmenge setzt sich aus den restlichen Kurven zusammen. Auch dieses Modell ist in der Lage, den Overshoot inklusive Plateau zu reproduzieren. Allerdings wird das Plateau (Kurven 1-3 bei $t > 1800$ s) schlechter gefittet als im Validierungsfit des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells. Dementsprechend ist auch der Wert von χ^2 in diesem Validierungsfit schlechter als der entsprechende Wert des Validierungsfits zum vorigen Modell ($\chi^2 \approx 4.1 \cdot 10^4$ gegenüber zuvor $\chi^2 \approx 2.9 \cdot 10^4$). Nichtsdestotrotz ist die Summe von χ^2 über die vier Validierungsfits in etwa gleich für die beiden Modelle ($\sum \chi^2 \approx 1.2 \cdot 10^5$). Daher ist es aufgrund dieser Kennzahl und der Daten der Experimente ohne FRAP nicht möglich, zwischen den beiden Modellen zu unterscheiden. Beide sind gleich gute Kandidaten zur Erklärung des beobachteten Phänomens (Overshoot mit anschließendem Plateau).

hilfreich, da dies zeigt, dass die Daten mit FRAP

4.2.1.3 Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine

In diesem Modell wird angenommen, dass die endogenen Proteine (die nicht zum Fluoreszenz-Signal beitragen) eine andere Assoziations- und Dissoziationsratenkonstante aufweisen als die fluoreszierenden Proteine. Das Modell besteht aus den Reaktionsgleichungen des Basismodells (86) und (87) sowie den Reaktionsgleichungen (R10) und (R11), mit denen die Rekrutierung der endogenen Proteine an den DNA-Schaden sowie deren Dissoziation beschrieben wird. Die Assoziationsratenkonstante der endogenen Proteine wird mit $k_{S+E \rightarrow SE}$ und ihre Dissoziationsratenkonstante mit $k_{SE \rightarrow S+E}$ bezeichnet. Wie schon im Methodenabschnitt erwähnt, wurde ermittelt, dass das Verhältnis zwischen markierten und endogenen Proteinen etwa 1 : 8.1 entspricht. Dementsprechend wurde in den Fits die Konzentration der frei diffundierenden endogenen Proteine auf folgenden Wert gesetzt: $E_0 = 8.1 \cdot P_0$.

Im Vergleich zu den beiden zuvor diskutierten Modellen muss darauf hingewiesen werden, dass die Anzahl an Freiheitsgraden in diesem Modell deutlich reduziert ist. Es gibt nur einen freien Parameter pro Rekrutierungskurve, S_0 . Zusätzlich kann wie auch schon in den vorigen Modellen der Wert von P_0 variiert werden, dies ist jedoch durch Gleichung (110) eingeschränkt (P_0 darf nur um bis zu 20% vom experimentell ermittelten Wert SBR_0 abweichen). Der Fit-Algorithmus verfügt also zum Fitten der vier Kurven aus der Validierungsmenge nur über vier vollkommen freie Parameter (S_0 für jede der Kurven), wohingegen er in den zwei vorigen Modellen über jeweils acht vollkommen freie Parameter verfügt (im Modell mit zwei Arten von Schäden kam noch der Parameter D_0 für jede Kurve hinzu und im Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante kam für jede Kurve der Parameter A_0 hinzu).

Abbildung 15 zeigt die Validierungsfits dieses Modells an die Daten der Mikrobestrahlungsexperimente. Erneut besteht die Validierungsmenge aus den Kurven der Zellen 1 bis 4. Auch dieses Modell ist in der Lage, den Overshoot mitsamt Plateau zu reproduzieren. Wobei der Validierungsfit der Kurve von Zelle 2 deutlich schlechter ist als der Validierungsfit dieser Kurve in den zwei vorherigen Modellen. Auch die Summe von χ^2 über alle vier Validierungsmengen ist größer als die entsprechende Summe in den zuvor diskutierten Modellen ($\sum \chi^2 \approx 1.6 \cdot 10^5$ im Vergleich zu $\sum \chi^2 \approx 1.2 \cdot 10^5$ im Modell mit zwei Arten von Schäden sowie dem Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante). Dennoch sind

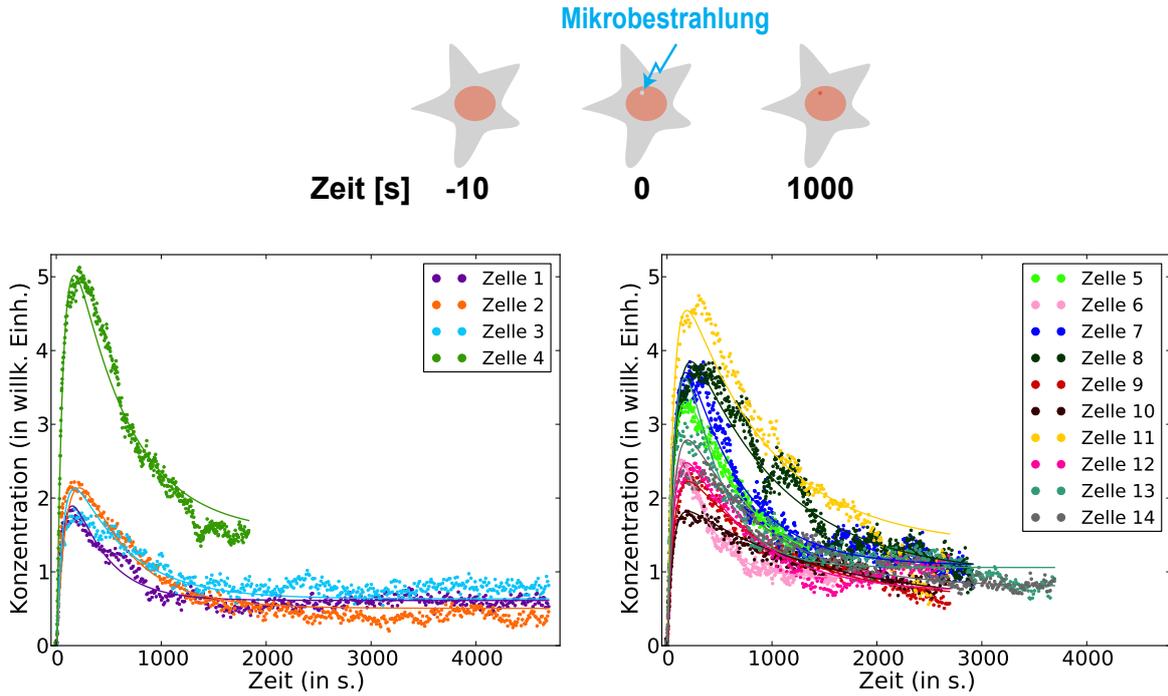


Abbildung 14: Validierungsfit des Modells, in dem die Dissoziationsratenkonstante von PCNA durch ein hypothetisch angenommenes Protein A beeinflusst wird. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 1 bis 4 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 4.1 \cdot 10^4$. In diesem Validierungsfit ist die Anzahl der Datenpunkte 1980. Die Parameterwerte sind in der ersten Zeile von Tabelle 3 angegeben.

Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}$	$k_{S+A \rightarrow SA}$	$k_{SP \rightarrow S+P}$	$k_{SPA \rightarrow SA+P}$	χ^2	# Datenpunkte
Mikrobeinstrahlungsexperimente:						
Zellen 1-4	$4.1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$4.5 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$4.1 \cdot 10^4$	1980
Zellen 5-8	$4.4 \cdot 10^{-4}$	$2.2 \cdot 10^{-6}$	$2.4 \cdot 10^{-11}$	$6.2 \cdot 10^{-2}$	$2.9 \cdot 10^4$	2340
Zellen 9-11	$4.3 \cdot 10^{-4}$	$7.1 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^{-10}$	$5.4 \cdot 10^{-2}$	$1.6 \cdot 10^4$	900
Zellen 12-14	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-10}$	$5.3 \cdot 10^{-2}$	$3.2 \cdot 10^4$	1100
Summe					$1.2 \cdot 10^5$	6320
FRAP-Mikrobeinstrahlungsexperimente:						
Zellen 1-4	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$5.2 \cdot 10^{-10}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$	3.6	$2 \cdot 10^5$	7000
Zellen 5-7	$3.7 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-10}$	$5.7 \cdot 10^{-3}$	0.14	$5 \cdot 10^4$	2950
Zellen 8-10	$4.1 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-10}$	$6.1 \cdot 10^{-3}$	0.16	$7 \cdot 10^4$	1800
Zellen 11-13	$3.3 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-10}$	$5.4 \cdot 10^{-3}$	$5.1 \cdot 10^{-2}$	$2.3 \cdot 10^5$	4650
Summe					$5.5 \cdot 10^5$	16400

Tabelle 3: Parameterwerte der Validierungsfits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante (sowohl für die Mikrobeinstrahlungsexperimente als auch die FRAP-Mikrobeinstrahlungsexperimente). Die Zusammensetzung der jeweiligen Validationsmenge ist in der ersten Spalte angegeben. Die Trainingsmengen ergaben sich jeweils aus den übrigen Kurven.

die Unterschiede in der Summe von χ^2 zwischen den Modellen nicht deutlich genug, um eines der Modelle auszuschließen. Zumal die Anzahl der Freiheitsgrade in diesem Modell nur der Hälfte der Anzahl der Freiheitsgrade der anderen beiden Modelle entspricht.

Da alle drei Modelle (zwei Arten von DNA-Schäden, beeinflusste Dissoziationsratenkonstante, verschiedene Raten zwischen endogenen und fluoreszierenden Proteinen) die Daten der Mikrobestrahlungsexperimente reproduzieren können, ist es nicht möglich zu entscheiden, welcher der drei Effekte am ehesten für den Overshoot und das anschließende Plateau verantwortlich ist.

4.2.2 FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente

Da es auf Grundlage der Mikrobestrahlungsexperimente nicht möglich ist, das am ehesten zur Erklärung des Overshoots geeignete Modell zu ermitteln, werden im folgenden weiterführende Experimente diskutiert, in denen die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Erzeugung des Schadens mit dem 561 nm Laser gebleicht wurden. Wie bereits gezeigt, erzeugt dieser Laser keine Schäden, an die PCNA bindet. Der Nutzen dieses Bleichens besteht darin, dass die Erholungskurven nach dem Bleichen zusätzliche Informationen über die Ratenkonstanten von PCNA enthalten. In diesem Abschnitt werden also die Kurven aus den FRAP-Mikrobestrahlungsexperimenten sowie die entsprechenden Fits der drei schon zuvor besprochenen Modelle diskutiert. Es wird gezeigt, dass dank der Durchführung von FRAP zu verschiedenen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase (kurz nach der Bestrahlung, nach dem Erreichen des Plateaus) zwei der drei Modelle als Erklärung für die prägnanten Merkmale der Rekrutierungskurven (Overshoot und Plateau) ausgeschlossen werden können.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten theoretischen Modelle sind bis auf eine nötige Anpassung dieselben wie im vorigen Abschnitt. Diese Anpassung besteht darin, dass im Modell das FRAP-Bleichen der Proteine berücksichtigt werden muss. Im realen Experiment wird zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Anteil der fluoreszierenden Proteine gebleicht. Da jedoch aufgrund der experimentellen Bedingungen der Fokus des zu Beginn des Experiments verwendeten Lasers (zum Erzeugen von DNA-Schäden) und der Fokus des FRAP-Lasers (zum Bleichen der fluoreszierenden Proteine) nicht exakt übereinstimmen, wurde jeweils nur ein variierender Anteil der an die DNA gebundenen Proteine gebleicht. Hinzu kommt, dass sich die Zelle in der Zeit zwischen der Bestrahlung und dem FRAP-Bleichen teilweise bewegte und hierdurch der Fokus des FRAP-Lasers nicht optimal eingestellt war. Daher wird dem Fit-Algorithmus erlaubt, zum Zeitpunkt des FRAP-Bleichens die aktuelle Konzentration der gebundenen Proteine (theoretischer Wert) um einen Faktor γ zu reduzieren, wobei γ ein freier Fit-Parameter war. Dementsprechend ist in jedem der Modelle die Anzahl der Freiheitsgrade pro Kurve um eins erhöht.

Um die FRAP-Erholungskurven zu verschiedenen Zeitpunkten zu messen, wurde der FRAP-Laser bei einem Teil der Zellen 180 Sekunden nach der Bestrahlung verwendet und bei anderen Zellen erst 1800 Sekunden nach der Bestrahlung, also nachdem die Rekrutierungskurven erfahrungsgemäß das Plateau erreicht hatten (Da die Auswertung der aufgenommenen Bilder erst im Nachhinein erfolgte, konnte während der Laufzeit des Experiments nicht überprüft werden, ob die Rekrutierungskurven tatsächlich das Plateau erreicht hatten).

4.2.2.1 Zwei-DNA-Schadensarten-Modell

Abbildung 16A zeigt die Kurven aus den FRAP-Mikrobestrahlungsexperimenten und einen Validierungsfit des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells. Die Validierungsmenge setzt

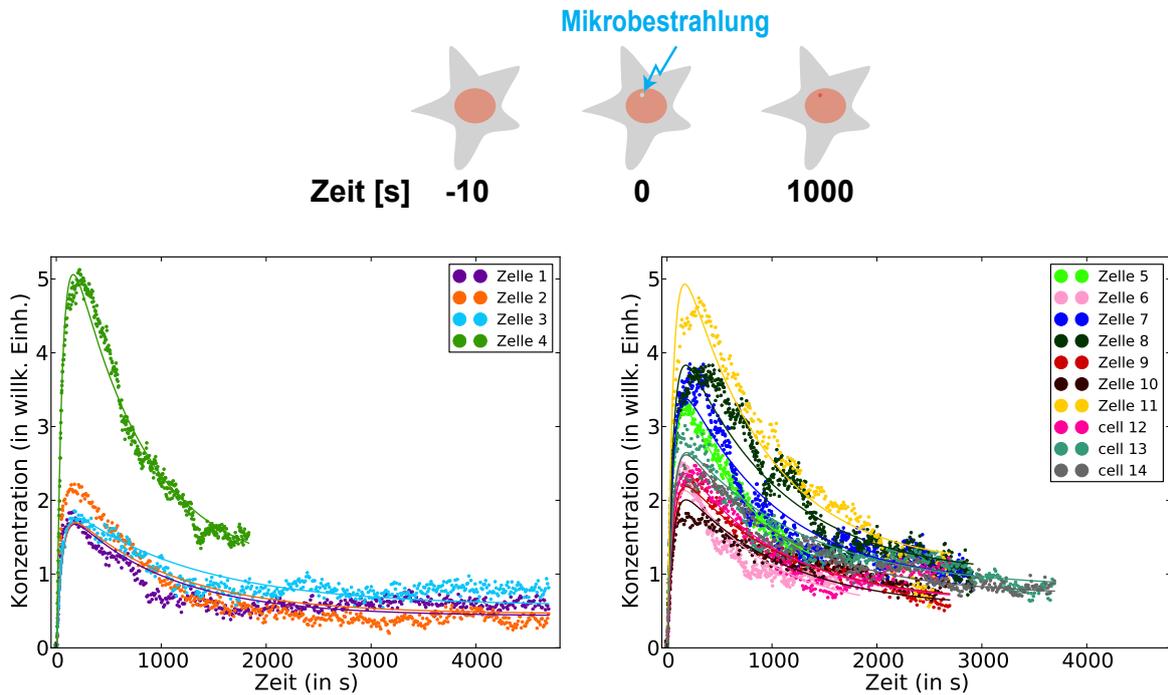


Abbildung 15: Validierungsfit des Modells mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 1 bis 4 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 5 \cdot 10^4$. In diesem Validierungsfit ist die Anzahl der Datenpunkte 1980 und die Parameterwerte sind in der ersten Zeile von Tabelle 4 angegeben.

Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}$	$k_{S+E \rightarrow SE}$	$k_{SP \rightarrow S+P}$	$k_{SE \rightarrow S+E}$	χ^2	# Datenpunkte
Mikrobeinstrahlungsexperimente:						
Zellen 1-4	$1.6 \cdot 10^{-9}$	$2.9 \cdot 10^{-5}$	$1.9 \cdot 10^{-2}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^4$	1980
Zellen 5-8	$7.2 \cdot 10^{-10}$	$3.2 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$2.6 \cdot 10^{-4}$	$4.2 \cdot 10^4$	2340
Zellen 9-11	$2.7 \cdot 10^{-10}$	$4.1 \cdot 10^{-5}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$3.2 \cdot 10^{-4}$	$3.9 \cdot 10^4$	900
Zellen 12-14	$3.3 \cdot 10^{-8}$	$5.3 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-4}$	$3.3 \cdot 10^4$	1100
Summe					$1.6 \cdot 10^5$	6320
FRAP-Mikrobeinstrahlungsexperimente:						
Zellen 1-4	$3 \cdot 10^{-3}$	$7.8 \cdot 10^{-5}$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$2.5 \cdot 10^{-5}$	$3.7 \cdot 10^5$	7000
Zellen 5-7	$2 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$2.1 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^5$	2950
Zellen 8-10	$2.6 \cdot 10^{-3}$	$9.5 \cdot 10^{-5}$	$5.6 \cdot 10^{-3}$	$2.4 \cdot 10^{-4}$	$1.8 \cdot 10^5$	1800
Zellen 11-13	$2.3 \cdot 10^{-3}$	$7.3 \cdot 10^{-5}$	$6.6 \cdot 10^{-3}$	$3.2 \cdot 10^{-4}$	$1.9 \cdot 10^5$	4650
Summe					$8.7 \cdot 10^5$	16400

Tabelle 4: Parameterwerte der Validierungsfits des Modells mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine. Die Zusammensetzung der jeweiligen Validationsmenge ist in der ersten Spalte angegeben. Die Trainingsmengen ergaben sich jeweils aus den übrigen Kurven.

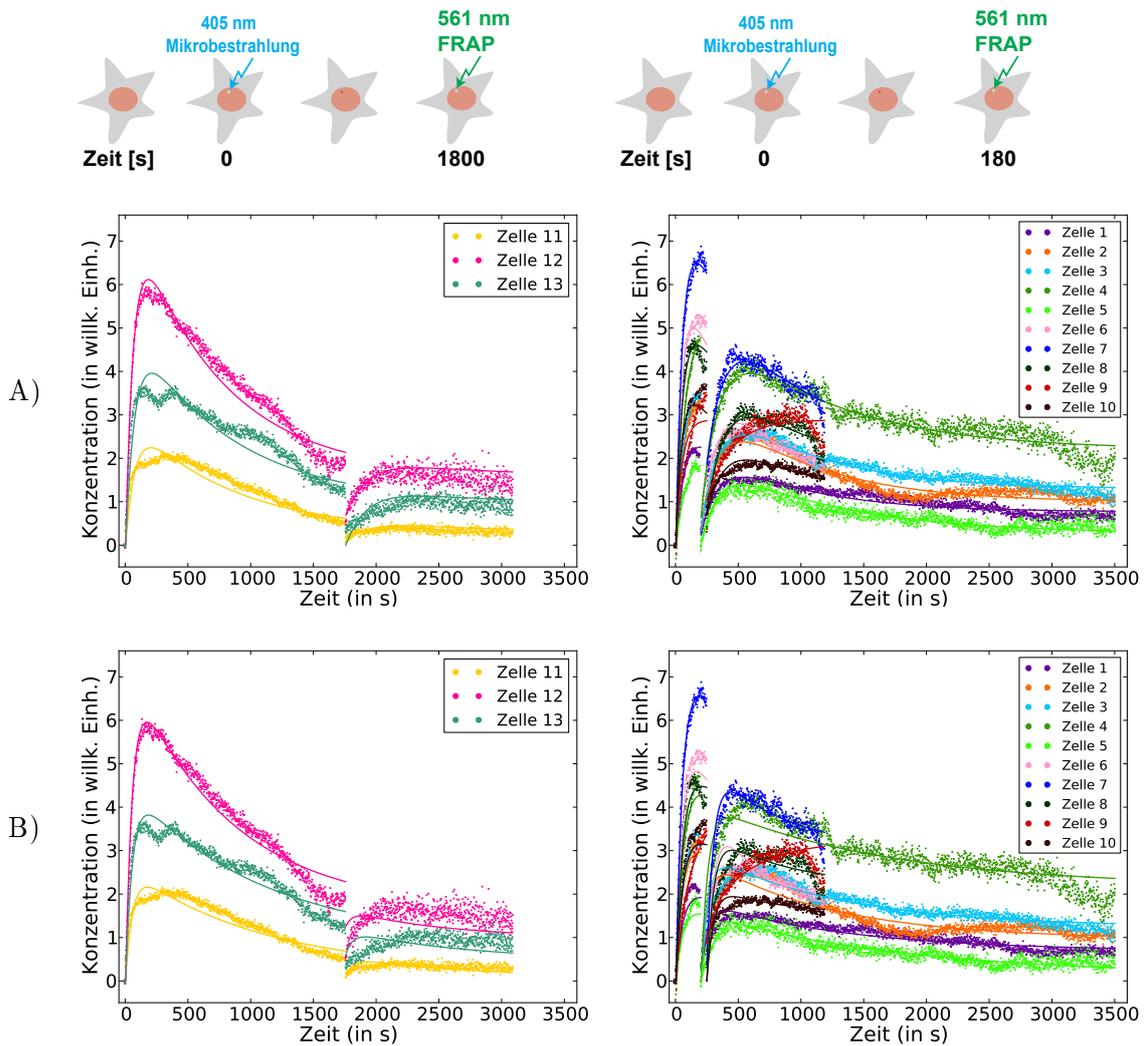


Abbildung 16: A) Validierungsfits des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells an die Daten der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente. Der experimentelle Aufbau entspricht jeweils der Skizze oberhalb der Abbildung. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 11 bis 13 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 1.2 \cdot 10^5$. In diesem Validierungsfits ist die Anzahl der Datenpunkte 4650 und die Parameterwerte sind in der vierten Zeile der unteren Hälfte von Tabelle 2 angegeben. B) Gezeigt ist ein erneuter Fit des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells an die Daten der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente. Es wurden allerdings alle 13 Zellen gleichzeitig gefittet und die Werte für die Ratenkonstanten auf die Werte der Fits dieses Modells an die Daten der Mikrobestrahlungsexperimente festgesetzt (erste Zeile von Tabelle 13). Hierdurch soll überprüft werden, ob die Fitergebnisse der Mikrobestrahlungsexperimente vereinbar sind mit den Daten der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente. Entscheidend ist, dass dieses Modell mit dieser Wahl der Parameter nicht die FRAP-Erholungskurven der Zellen 12 und 13 im Bereich um $t = 1800$ s reproduzieren kann. $\chi^2 \approx 4.4 \cdot 10^5$ und die Anzahl an gefitteten Datenpunkten ist 16400.

sich aus den Kurven der Zellen 11 bis 13 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. Die Kurven können durch dieses Modell trotz FRAP gut reproduziert werden. Die Summe von χ^2 über alle vier Validierungsmengen entspricht dem 2.9-fachen des entsprechenden Wertes für dieses Modell bezogen auf die Daten ohne FRAP ($\sum \chi^2 \approx 3.5 \cdot 10^5$ gegenüber $\sum \chi^2 \approx 1.2 \cdot 10^5$ für die Fits der Daten ohne FRAP, siehe Tabelle 2). Allerdings wird dieser Wert dadurch relativiert, dass die Anzahl an Datenpunkten der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente dem 2.6-fachen der Anzahl an Datenpunkten der Mikrobestrahlungsexperimente entspricht (16400 gegenüber 6320). Bezogen auf die Anzahl an Datenpunkten sind die Validierungsfits dieses Modells an die Kurven der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente also ähnlich gut wie die Validierungsfits dieses Modells an die Kurven der Mikrobestrahlungsexperimente. Die Parameterwerte des in Abbildung 16A) dargestellten Validierungsfits sind in der vierten Zeile der unteren Hälfte von Tabelle 13 zu finden.

Wie zuvor erwähnt ist die Dissoziationsratenkonstante ($k_{SP \rightarrow S+P}$ liegt zwischen $4.3 \cdot 10^{-3}$ und $6.2 \cdot 10^{-3}$) der Fits dieses Modells an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten viele Größenordnungen größer als die Dissoziationsratenkonstante der Fits dieses Modells an die Mikrobestrahlungsdaten ($k_{SP \rightarrow S+P}$ liegt zwischen $1.4 \cdot 10^{-11}$ und $1.7 \cdot 10^{-11}$). Dies zeigt einen der Vorteile von FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente: Mit ihnen kann getestet werden, ob die Dissoziationsratenkonstante annähernd Null ist. In diesem Fall kann die Erholung der Rekrutierungskurve nur dadurch zustande kommen, dass fluoreszierende PCNA-Proteine an zuvor noch unbesetzte Schadensstellen binden.

Um zu testen, ob eine derart geringe Dissoziationsratenkonstante wie in den Fits der Mikrobestrahlungsexperimente verträglich ist mit den FRAP-Mikrobestrahlungsdaten, wird ein erneuter Fit durchgeführt. Hierbei werden alle Kurven der FRAP-Mikrobestrahlungsexperimente gleichzeitig gefittet und die chemischen Ratenkonstanten auf die Werte gesetzt, die sich im ersten Fit der Mikrobestrahlungsexperimente ergeben haben (erste Zeile von Tabelle 2). Die chemischen Ratenkonstanten sind also keine freien Fitparameter mehr. Das Ergebnis dieses Fits ist in Abbildung 16B zu sehen. Entscheidend ist, dass der Fit an die Erholungskurven (nach dem FRAP-Bleichen bei $t = 1800$ s) der Zellen 12 und 13 misslingt. Der Grund hierfür liegt in der extrem niedrigen Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}$. Dies zeigt, dass die Mikrobestrahlungsdaten weniger Informationen über die der Reparatur zugrundeliegenden Prozesse enthalten und hierdurch die Fits dieser Daten zu unhaltbaren Ergebnissen führen können. Mit unhaltbar ist hier gemeint, dass die Ergebnisse nicht vereinbar sind mit genaueren Untersuchungen, wie etwa den hier vorgestellten FRAP-Mikrobestrahlungsexperimenten.

Um sicherzustellen, dass der umgekehrte Fall nicht ebenso zutrifft (Die Ergebnisse der Fits an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten könnten nicht vereinbar sein mit den Mikrobestrahlungsdaten), werden alle Kurven der Mikrobestrahlungsexperimente gleichzeitig gefittet und die Ratenkonstanten dabei auf die Werte gesetzt, die sich aus den Fits der FRAP-Mikrobestrahlungsdaten ergeben haben (vierte Zeile der unteren Hälfte von Tabelle 13). Das Ergebnis dieses Fits ist in Abbildung 17 zu sehen. Die Daten können gut reproduziert werden und der über alle vierzehn Kurven summierte Wert von $\chi^2 \approx 1.1 \cdot 10^5$ ist sogar geringer als die Summe von χ^2 über die vier Validierungsmengen (die zusammen ebenfalls alle vierzehn Kurven umfassen) für dieses Modell an die Mikrobestrahlungsdaten ($\sum \chi^2 \approx 1.2 \cdot 10^5$). Dies zeigt, dass die Ergebnisse der Fits an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten verträglich sind mit den Mikrobestrahlungsdaten und damit die Experimente mit FRAP zu verlässlicheren Ergebnissen führen als die Experimente ohne FRAP.

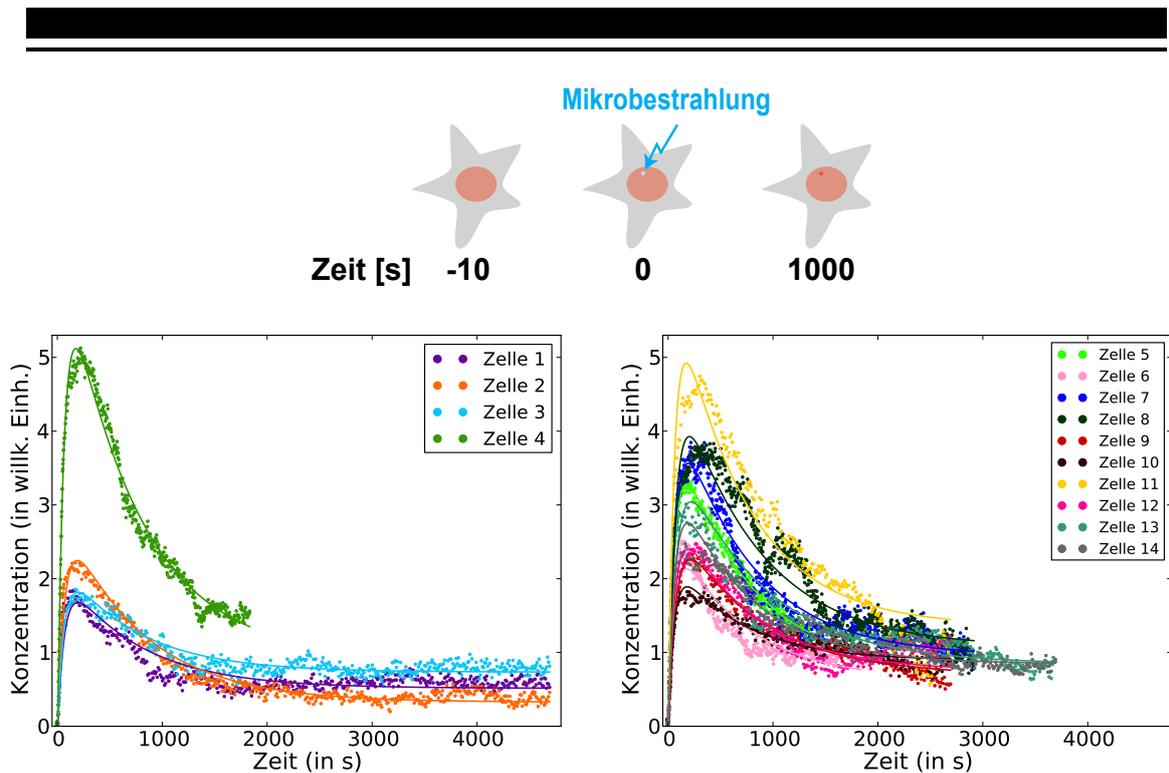


Abbildung 17: Fit des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells an die Daten der Experimente ohne FRAP. Alle 14 Kurven wurden gleichzeitig gefittet und die Werte für die Ratenkonstanten auf die Werte der Fits dieses Modells an die Daten mit FRAP festgesetzt (vierte Zeile in der unteren Hälfte von Tabelle 13), um zu testen, ob die Fitergebnisse der Daten mit FRAP kompatibel sind mit den Daten ohne FRAP. Dieser Fit zeigt, dass dies der Fall ist. Der experimentelle Aufbau entspricht der obigen Skizze. $\chi^2 \approx 1.1 \cdot 10^5$ und die Anzahl der gefitteten Datenpunkte ist 6320.

4.2.2.2 Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante

Abbildung 18 zeigt einen Validierungsfit des Modells, bei dem die Dissoziationsratenkonstante von PCNA durch ein weiteres Protein beeinflusst wird, an die FRAP-Mikrobeinstrahlungsdaten. Wie bereits im vorigen Modell setzt sich die Validierungsmenge in dem abgebildeten Fit aus den Kurven 11 bis 13 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. Es ist deutlich zu sehen, dass dieses Modell nicht in der Lage ist, die Erholungskurven der Zellen 11 bis 13 im Bereich um $t = 1800$ s zu reproduzieren. Zudem ist die Summe von χ^2 über alle vier Validierungsfits etwa 57% größer als die entsprechende Summe für das Modell mit zwei Arten von Schäden ($5.5 \cdot 10^5$ gegenüber $3.5 \cdot 10^5$). Beide Beobachtungen dienen als Indikator dafür, dieses Modell auszuschließen.

Der Grund, wieso dieses Modell die Erholungskurven der Zellen 11 bis 13 nicht reproduzieren kann, liegt darin, dass zum Erzeugen eines Overshoots in diesem Modell die Dissoziationsratenkonstante für große t deutlich höher sein muss als für kleine t . Die Erhöhung der Dissoziationsratenkonstante führt in diesem Modell nämlich gerade zum Abfall der Rekrutierungskurven nach Erreichen des Maximums. Wie die Fits in Abbildung 18 zeigen, ist aber eben diese Erhöhung der Dissoziationsratenkonstante nicht kompatibel mit den FRAP-Erholungskurven nach Erreichen des Plateaus (bei $t = 1800$ s).

Dieses Ergebnis zeigt also, dass es dank der FRAP-Mikrobeinstrahlungsdaten möglich ist, ein Modell als Erklärung für den Overshoot und das sich anschließende Plateau auszuschließen, das allein auf Grundlage der Mikrobeinstrahlungsdaten nicht auszuschließen war

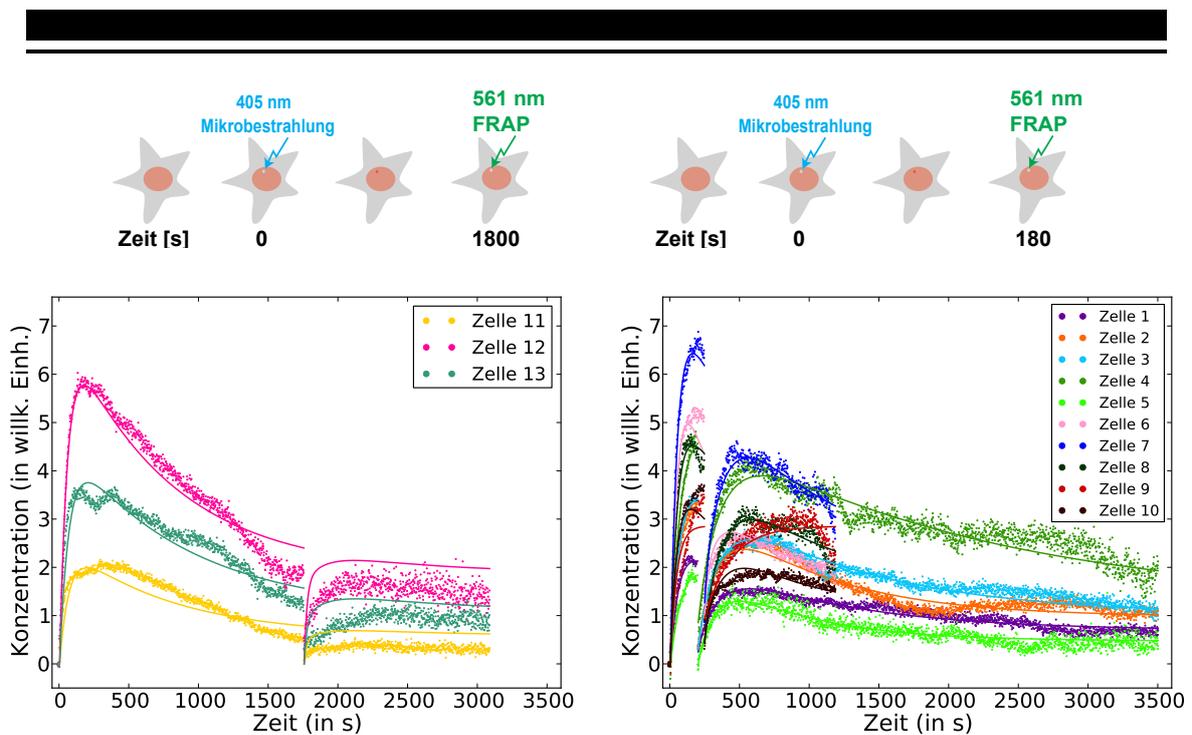


Abbildung 18: Validierungsfits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht jeweils der Skizze oberhalb der Abbildung. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 11 bis 13 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 2.3 \cdot 10^5$. In diesem Validierungsfits ist die Anzahl der Datenpunkte 4650 und die Parameterwerte sind in der vierten Zeile der unteren Hälfte von Tabelle 3 angegeben. Das Modell ist nicht in der Lage, die FRAP-Erholungskurven der Zellen 11 bis 13 bei $t = 1800$ s zu reproduzieren.

(die Summe von χ^2 über alle Validierungsfits war bei den Mikrobestrahlungsdaten für alle drei Modelle ähnlich groß).

4.2.2.3 Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine

Der Validierungsfits des Modells, in dem die endogenen Proteine über andere Ratenkonstanten im Vergleich zu den fluoreszierenden Proteinen verfügen, an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten ist in Abbildung 19A zu sehen. Erneut sind die Kurven der Zellen 11 bis 13 Bestandteil der Validierungsmenge und die restlichen Kurven gehören zur Trainingsmenge. Auch dieses Modell ist nicht in der Lage, die Erholungskurven der Zellen 11 bis 13 im Bereich um $t = 1800$ s zu reproduzieren. Die Summe von χ^2 über alle vier Validierungsmengen ist wesentlich größer als die entsprechende Summe für die anderen zwei Modelle ($8.7 \cdot 10^5$ gegenüber $5.5 \cdot 10^5$ und $3.5 \cdot 10^5$). Beide Beobachtungen sprechen dafür, auch dieses Modell als Erklärung für den prägnanten Verlauf der Rekrutierungskurven auszuschließen.

In diesem Modell wird der Overshoot dadurch erzeugt, dass die fluoreszierenden Proteine schneller an den Schaden binden als die endogenen Proteine und damit auch schneller diejenige Konzentration erreichen, bei der die Assoziations- und Dissoziationsrate annähernd in einem Fließgleichgewicht sind (dies ist etwa bei Erreichen des Maximums der

Fall). Zu diesem Zeitpunkt ist die Rekrutierung der endogenen Proteine aber noch nicht abgeschlossen (siehe Abbildung 19B). Vielmehr führt die andauernde Rekrutierung der endogenen Proteine zu einer Störung des Fließgleichgewichts der fluoreszierenden Proteine: Es dissoziieren mehr fluoreszierende Proteine als durch die Assoziation ausgeglichen werden kann, da die endogenen Proteine immer mehr Schadensstellen besetzen und damit die fluoreszierenden Proteine verdrängen. Dies führt zu einem Abfall der Konzentration der gebundenen fluoreszierenden Proteine, der so lange andauert, bis die Konzentration der endogenen Proteine ebenfalls in einem Fließgleichgewicht, also gesättigt ist. Ab diesem Zeitpunkt sind sowohl die Konzentration der fluoreszierenden als auch die Konzentration der endogenen Proteine beide in einem Fließgleichgewicht und damit ändern sich die Konzentrationen nicht mehr. Dies ist gleichbedeutend mit dem Erreichen des Plateaus in den Kurven der fluoreszierenden Proteine.

Das Reproduzieren des Overshoots und des sich anschließenden Plateaus ist in diesem Modell nur bei bestimmten Werten der Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}$ möglich. Die Wahl der Dissoziationsratenkonstante ist etwa dadurch eingeschränkt, dass bei zu hoher Dissoziationsratenkonstante der Wert des Plateaus zu gering ist und bei zu geringer Dissoziationsratenkonstante der Wert des Plateaus zu hoch ist. Der Wert der Dissoziationsratenkonstante hat außer auf den Plateauwert auch Einfluss auf die Höhe des Maximums der Kurve und auf die Erholungskurven nach dem FRAP-Bleichen. Hier liegt ein bedeutender Unterschied zum Zwei-DNA-Schadensarten-Modell, in dem nämlich der Plateauwert über die Konzentration der DNA-Schäden der zweiten Art relativ unabhängig von der FRAP-Erholungskurve und dem Maximum der Kurve an die Daten angeglichen werden kann. Bei den Mikrobestrahlungsdaten gelang es dem Fit-Algorithmus im Fall des Modells mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine offensichtlich trotz dieser Einschränkungen, passende Werte für die Dissoziationsratenkonstante zu finden. Durch das FRAP-Bleichen des Signals zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird die Dissoziationsratenkonstante aber zusätzlich eingeschränkt, sodass der Fit-Algorithmus keine Werte mehr finden kann, die sowohl die Erholungskurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten als auch den Plateauwert reproduzieren können.

Zusammenfassend ermöglichen die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten also das Ausschließen von zwei der drei hier vorgestellten Modelle, wohingegen auf Grundlage der Mikrobestrahlungsdaten keines dieser Modelle ausgeschlossen werden konnte. Außerdem wurde gezeigt, dass die Fits der Mikrobestrahlungsdaten zu Ergebnissen führen, die unter Hinzunahme der FRAP-Mikrobestrahlungsdaten nicht haltbar sind, wohingegen die aus den FRAP-Mikrobestrahlungsdaten gewonnenen Parameter verträglich mit den Mikrobestrahlungsdaten sind.

4.3 Diskussion

In den Validierungsfits der Mikrobestrahlungsdaten war die Summe von χ^2 über alle vier Validierungsfits für das Zwei-DNA-Schadensarten-Modell sowie das Modell mit beeinflusstester Dissoziationsratenkonstante $1.2 \cdot 10^5$. Für das Modell mit unterschiedlichen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine lag der entsprechende Wert bei $\sum \chi^2 \approx 1.6 \cdot 10^5$. Die Unterschiede zwischen den Fits der Modelle waren also zu gering, um eines von ihnen als Erklärung für den Overshoot und das darauf folgende Plateau auszuschließen. Hingegen konnten nach der Untersuchung der FRAP-Mikrobestrahlungsdaten die zwei letztgenannten Modelle als Erklärung für den Verlauf der Rekrutierungskur-

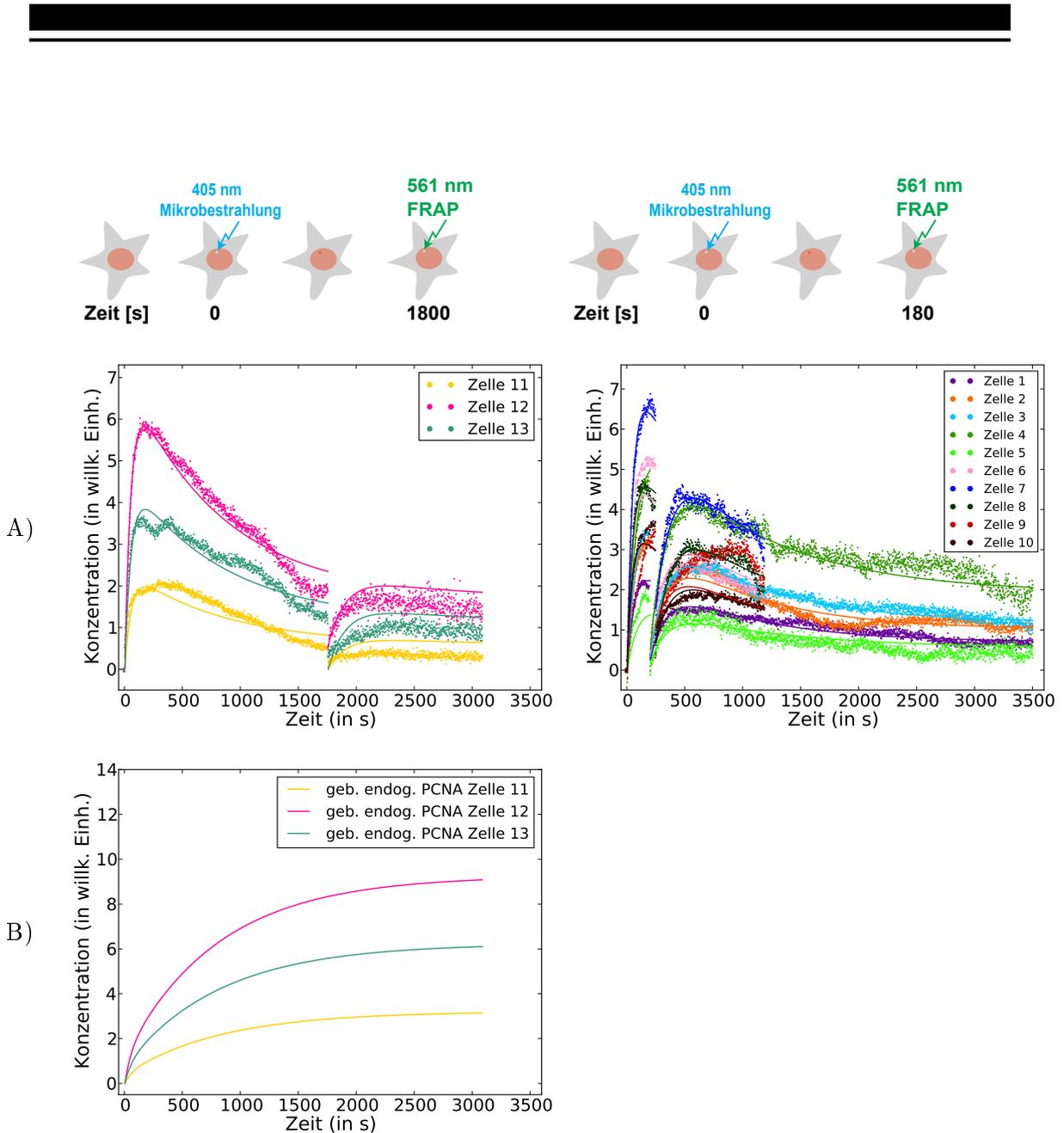


Abbildung 19: A) Validierungsfits des Modells mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine an die FRAP-Mikrobestrahlungsdaten. Die experimentellen Daten sind als Punkte dargestellt und die Fits als durchgezogene Linien derselben Farbe. Der experimentelle Aufbau entspricht jeweils der Skizze oberhalb der Abbildung. Die Validierungsmenge setzt sich aus den Kurven der Zellen 11 bis 13 zusammen und die Trainingsmenge aus den restlichen Kurven. $\chi^2 \approx 1.9 \cdot 10^5$. In diesem Validierungsfits ist die Anzahl der Datenpunkte 4650 und die Parameterwerte sind in der vierten Zeile der unteren Hälfte von Tabelle 4 angegeben. Auch dieses Modell ist nicht in der Lage, die FRAP-Erholungskurven der Zellen 11 bis 13 bei $t = 1800$ s zu reproduzieren. B) Konzentrationsverlauf der gebundenen endogenen Proteine im Modell.

ven ausgeschlossen werden. Ein Indikator hierfür waren die misslungenen Fits der späten FRAP-Erholungskurven (Bereich um $t = 1800$ s in den Kurven der Zellen 11 bis 13 in Abbildung 18 und 19). Ein weiterer Indikator war die erhöhte Diskrepanz der Summen von χ^2 über alle Validierungsfits der jeweiligen Modelle ($\sum \chi^2 \approx 3.5 \cdot 10^5$ für das Modell mit zwei Arten von Schäden, $\sum \chi^2 \approx 5.5 \cdot 10^5$ für das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante und $\sum \chi^2 \approx 8.7 \cdot 10^5$ für das Modell mit unterschiedlichen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine). Der Grund, warum die zwei letztgenannten Modelle nicht alle FRAP-Mikrobestrahlungskurven reproduzieren konnten, lag darin, dass in diesen Modellen der Plateauwert nicht unabhängig von der Dissoziationsratenkonstante und damit auch nicht unabhängig von der Form der FRAP-Erholungskurven (sowohl bei $t = 180$ s als auch bei $t = 1800$ s) gewählt werden konnte. Der Fit-Algorithmus konvergierte daher bei Parameterwerten, bei denen weder die Plateauwerte noch die FRAP-Erholungskurven bei $t = 1800$ s zufriedenstellend reproduziert wurden. Demgegenüber konnte im Zwei-DNA-Schadensarten-Modell der Plateauwert durch eine Variation von D_0 und damit unabhängig von der Dissoziationsratenkonstante verändert werden. Dies führte dazu, dass das Modell sowohl den Plateauwert als auch alle FRAP-Erholungskurven gut reproduzieren konnte.

In diesem Teil der Arbeit wurde unter anderem gezeigt, dass die Durchführung von FRAP kurz nach der Mikrobestrahlung experimentell möglich ist. Dies ist besonders dann nützlich, wenn die beobachteten Prozesse so langsam ablaufen, dass sie während der Dauer des Experiments kein Gleichgewicht erreichen. Zusätzlich wurde eine theoretische Methode zur Analyse von FRAP-Experimenten vorgestellt, die auch dann Verwendung findet, wenn sich die chemischen Ratenkonstanten im Laufe der Zeit ändern oder allgemein, wenn die Assoziations- und Dissoziationsraten der betrachteten Spezies nicht im Gleichgewicht sind. Hierdurch unterscheidet sich die hier vorgestellte Methode von klassischen FRAP-Analysen, die auf der Annahme eines chemischen Gleichgewichts basieren (Carrero et al., 2003; Phair et al., 2004; Rabut et al., 2004; Sprague and McNally, 2005).

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Mikrobestrahlungsdaten zu unzuverlässigen Parameterwerten führen können, also solchen, die nach der Analyse der FRAP-Mikrobestrahlungsdaten nicht mehr tragbar sind. Wohingegen die aus der Untersuchung der FRAP-Mikrobestrahlungsdaten gewonnenen Parameterwerte verträglich waren mit den Mikrobestrahlungsdaten. Beides, das Ausschließen von zwei der drei Modelle sowie die erhöhte Zuverlässigkeit der gewonnenen Parameterwerte, verdeutlicht den Nutzen des FRAP-Bleichens zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase: Sowohl die FRAP-Erholungskurven kurz nach der Bestrahlung als auch diejenigen nach Erreichen des Plateaus führen zu einer Einschränkung der möglichen Werte für die Ratenkonstanten. Diese Einschränkung führt schließlich dazu, dass manche der Modelle die Daten nicht mehr reproduzieren können und damit ausgeschlossen werden können, wie im Fall des Modells mit beeinflusster Dissoziationsrate und des Modells mit unterschiedlichen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine. Andere Modelle, wie dasjenige mit zwei Arten von Schäden, können die Daten immer noch reproduzieren, allerdings nur noch in einem eingeschränkteren Parameterbereich (im Vergleich zu den Daten ohne FRAP). Dank dieser Einschränkung des Parameterbereichs ist das FRAP-Bleichen zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase also auch dann nützlich, wenn ein Modell nicht ausgeschlossen werden kann.

Die biologische Bedeutung der hier vorgestellten Ergebnisse ist, dass der Overshoot mit dem sich anschließenden Plateau durch das Vorhandensein von mindestens zwei Arten von DNA-Schäden, etwa Einzel- und Doppelstrangbrüchen, erklärt werden kann. Von den hier vorgestellten Szenarien kann nur das Modell mit zwei Arten von Schäden alle Daten

zufriedenstellend reproduzieren. In Anbetracht der geringen Zahl an chemischen Spezies und Reaktionsgleichungen war dieses Modell verhältnismäßig einfach. Da es dennoch die hier untersuchten Rekrutierungskurven gut wiedergeben kann, besteht kein Bedarf an einem komplizierteren Modell. Weiterhin ist von biologischer Bedeutung, dass die Modifikation von PCNA oder die Beeinflussung durch ein anderes Protein als alleinige Ursache für den speziellen Verlauf der Rekrutierungskurven ausgeschlossen werden können, sofern die den hier diskutierten Modellen zugrunde liegenden Annahmen zulässig sind (Die Beziehungen zwischen den chemischen Spezies sind aus Elementarreaktionen aufgebaut, die Rekrutierung von PCNA und des beeinflussenden Proteins geschehen auf einer längeren Zeitskala als deren Diffusion, die Konzentration des frei diffundierenden PCNA ist annähernd konstant über die Dauer des Experiments).

Den Fit-Ergebnissen des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells zufolge liegt die Dissoziationsratenkonstante von PCNA $k_{SP \rightarrow S+P}$ zwischen $4.3 \cdot 10^{-3}$ und $6.2 \cdot 10^{-3}$. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen einer veröffentlichten Untersuchung zur Nukleotidexzisionsreparatur überein, in der berichtet wurde, dass k_{off} für PCNA zwischen $2 \cdot 10^{-3}$ und $5 \cdot 10^{-2}$ liegt, je nachdem in welchem Zustand sich die DNA befindet, an die das PCNA gebunden ist (Luijsterburg et al., 2010) (Die beschriebenen Zustände waren: eingeschnittene DNA, resynthetisierte DNA und rechromatisierte DNA. Alle drei sind Zwischen- oder End-Produkte der DNA-Reparatur).

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bindungsstärke der endogenen und der fluoreszent markierten Proteine an der DNA ungefähr gleich groß ist ((Sporbert et al., 2005), Abbildung 2). Mit der hier vorgestellten FRAP-Methode während der Rekrutierungsphase wurde gezeigt, dass die Annahme, die endogenen und die fluoreszierenden Proteine verfügten über unterschiedliche Ratenkonstanten, tatsächlich nicht vereinbar mit den experimentellen Daten ist. Auch wenn diese Information bereits verfügbar war, führte das Einbeziehen dieses Modells in die Untersuchung zu nützlichen Erkenntnissen und zeigte unter anderem, dass dank der hier vorgestellten Methode Modelle ausgeschlossen werden können, deren Ausschluss auf Grundlage von Mikrobestrahlungsexperimenten nicht möglich ist.

Bei den FRAP-Mikrobestrahlungsdaten zeigten sich die deutlichsten Unterschiede zwischen den Modellen in den Validierungsfits an die späten FRAP-Erholungskurven bei $t = 1800$ s. Es stellt sich daher die Frage, ob die Durchführung von FRAP-Mikrobestrahlungsexperimenten mit ausschließlich spätem FRAP genügt, um zwischen den Modellen zu unterscheiden oder, ob tatsächlich die Kombination von frühem und spätem FRAP ausschlaggebend für die Unterscheidbarkeit der Modelle ist. Diese Frage soll im dritten Teil dieser Arbeit beantwortet werden.

Nachdem im vorigen Teil dieser Arbeit gezeigt wurde, dass es experimentell möglich ist, FRAP-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase durchzuführen und dass dies dabei hilft, alternative Modelle auszuschließen, soll nun untersucht werden, wie ausschlaggebend die Variation des FRAP-Zeitpunktes ist. Es ist beispielsweise denkbar, dass die erhöhte Unterscheidbarkeit der Modelle bereits gegeben ist, wenn alle FRAP-Messungen erst nach Erreichen des Gleichgewichts durchgeführt werden. Dies ist insofern von Belang, als die späten FRAP-Messungen experimentell leichter zugänglich sind. Sollte sich stattdessen zeigen, dass die FRAP-Messungen in der frühen Rekrutierungsphase oder eine Kombination von verschiedenen FRAP-Zeitpunkten ausschlaggebend für die Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle ist, so würde dies den Mehraufwand der FRAP-Messungen während der frühen Rekrutierungsphase rechtfertigen. Um diese Fragestellung zu beantworten, werden von den zuvor verwendeten Modellen die zwei ausgewählt, die am ehesten das Zustandekommen des im zweiten Teils dieser Arbeit untersuchten Overshoots erklären können: Das Modell mit zwei Arten von DNA-Schäden sowie das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante (das dritte Modell mit verschiedenen Ratenkonstanten für endogene und fluoreszierende Proteine steht wie bereits erwähnt nicht im Einklang mit den Ergebnissen von Sporbert et al. (2005)). Um möglichst exakte Informationen über die zugrundeliegenden Daten zu erhalten, werden diese durch eine Computersimulation mithilfe eines der zwei soeben genannten Modelle erzeugt. Die Parameter werden dabei von Hand ausgewählt, um zu gewährleisten, dass die Rekrutierungskurven einen Overshoot aufweisen. Anschließend wird das jeweils andere Modell an die so erzeugten Datensätze gefittet. Hierzu wird eine Methode verwendet, die bis auf geringfügige Anpassungen der im zweiten Teil dieser Arbeit beschriebenen Validierungsmethode gleicht. Kann das jeweils andere, also falsche Modell die Daten gut fitten, so spricht dies gegen den im Datensatz vorliegenden FRAP-Zeitpunkt. Ergibt sich aus der Validierungsmethode und einem bestimmten Datensatz allerdings, dass das jeweils andere Modell verworfen werden muss, da es die Daten nicht gut fittet, so ist der in den Daten vorliegende FRAP-Zeitpunkt günstig gewählt. Letztlich kann mit dieser Vorgehensweise also festgestellt werden, welche Wahl des FRAP-Zeitpunktes am ehesten zur Identifikation des falschen Modells führt und dementsprechend die Frage beantwortet werden, ob sich der experimentelle Mehraufwand eines frühen FRAP-Zeitpunktes lohnt.

5.1 Methode

Da in diesem Teil der Arbeit keine experimentell ermittelten Kurven analysiert werden sollen, sondern aus Computersimulationen generierte Daten, unterscheiden sich die hier verwendeten Daten qualitativ von den im zweiten Teil verwendeten Daten, die aus realen Experimenten gewonnen wurden. Zum einen muss zunächst ein Modell und ein entsprechender Parametersatz ausgewählt werden, aus dem die Daten generiert werden. Es ist also bekannt, welcher Mechanismus zum Overshoot in den Daten führt und wie die exakten Werte für die Konzentrationen und Ratenkonstanten sind. Zum anderen weisen die Daten im Unterschied zu den aus realen Experimenten gewonnenen keine Streuung auf.

Zwecks der Vergleichbarkeit der Ergebnisse soll die Untersuchung in diesem Teil der Arbeit weitestmöglich analog zur im zweiten Teil vorgestellten Methode durchgeführt

werden. Allerdings wird bewusst darauf verzichtet, das untersuchte Protein mit PCNA zu identifizieren, da sich diese Untersuchung allein auf computergenerierte Daten bezieht und die verwendeten Parameter keinen Zusammenhang mit PCNA haben.

Zum Erzeugen der Daten wird in der ersten Teiluntersuchung das Modell aus dem zweiten Teil dieser Arbeit verwendet, in dem die Dissoziationsratenkonstante eines Proteins P durch ein unbekanntes Protein beeinflusst wird. Es werden vier Kurven erzeugt, für die dieselben Ratenkonstanten aber verschiedene Werte für P_0^{Daten} (Gesamtkonzentration von P), S_0^{Daten} (DNA-Schäden) und A_0^{Daten} (Gesamtkonzentration des beeinflussenden Proteins) verwendet werden. Die Parameter werden dabei so gewählt, dass in jeder der vier Kurven ein Overshoot zu sehen ist. Die Ausgabe der Datenpunkte erfolgte im Abstand von einer Sekunde.

In der ersten Teiluntersuchung wird das Modell an die Daten gefittet, in dem zwei Arten von DNA-Schäden berücksichtigt werden. In Analogie zur Validierungsmethode aus dem zweiten Teil dieser Arbeit wird im Fit-Algorithmus der Startwert für P_0^{Fit} auf den Wert gesetzt, der zur Erzeugung der Daten verwendet wurde, also $P_0^{\text{Fit}} = P_0^{\text{Daten}}$. Dies spiegelt die Tatsache wider, dass in realen Experimenten die Gesamtkonzentration des untersuchten Proteins ermittelt werden kann. Genau wie in der im zweiten Teil verwendeten Validierungsmethode verfügt auch hier der Fit-Algorithmus über die Freiheit, den Wert von P_0^{Fit} zu ändern, sofern er nicht um mehr als 20% von P_0^{Daten} abweicht. Dies wiederum entspricht der Tatsache, dass in realen Experimenten die Bestimmung von P_0 mit einer gewissen Unsicherheit behaftet ist. Die Anfangswerte für die Parameter S_0^{Fit} (Einzelsrangbrüche) und D_0^{Fit} (Doppelstrangbrüche) werden auf 10^x gesetzt, wobei x eine reelle Zahl ist und zufällig zwischen 0 und -3 gezogen wird. Während der Fit-Prozedur kann der Algorithmus diese Werte nahezu beliebig anpassen. Zum Verkürzen der Rechenzeit lautet die einzige Einschränkung, wie bereits in der vorigen Validierungsmethode, dass die Parameter im Intervall $[e^{-25}, e^{25}]$ liegen.

In der zweiten Teiluntersuchung wird dann die Rolle der Modelle vertauscht. Die Daten werden also mit dem Modell erzeugt, das zwei Arten von DNA-Schäden berücksichtigt und mit dem Modell gefittet, in dem die Dissoziationsratenkonstante beeinflusst wird. Die Anfangswerte S_0^{Fit} (DNA-Schäden) und A_0^{Fit} (Gesamtkonzentration des beeinflussenden Proteins) werden erneut auf den Wert 10^x gesetzt. Wobei x wieder zufällig zwischen 0 und -3 gewählt wird. Auch hier kann der Fit-Algorithmus die Werte beliebig anpassen, solange sie im Bereich $[e^{-25}, e^{25}]$ liegen.

Wie schon im zweiten Teil dieser Arbeit wird eine Größe zur Bestimmung der Güte des Fits benötigt. Da die in diesem Teil verwendeten Daten im Gegensatz zu den Daten aus dem zweiten Teil aber keine Streuung aufweisen, ist χ^2 hierfür ungeeignet. Stattdessen wird die Summe über die quadratischen Abweichungen (SQA) zwischen dem Fit und den gefitteten Daten berechnet:

$$\text{SQA} = \sum_T (\text{P}_{\text{Rek}}^{\text{Daten}}[T] - \text{P}_{\text{Rek}}^{\text{Fit}}[T])^2 \quad (114)$$

Die Summe geht hierbei über alle Datenpunkte. $\text{P}_{\text{Rek}}^{\text{Daten}}[T]$ ist also der T te Datenpunkt aus der zu fittenden Rekrutierungskurve. Hierbei ist noch zu beachten, dass sich die Zusammensetzung der Rekrutierungskurve je nach Modell ändert: In der ersten Teiluntersuchung werden die Daten aus dem Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante erzeugt. In diesem Fall ist die Rekrutierungskurve gegeben durch $\text{P}_{\text{Rek}}^{\text{Daten}}[T] = [\text{SP}^{\text{Daten}}][T] + [\text{SPA}^{\text{Daten}}][T]$ (Summe der Konzentration von gebundenem P in Abwesenheit von A und der Konzentration von gebundenem P in Anwesenheit von A). Für den Fit wurde in der ersten Teiluntersuchung das Zwei-DNA-Schadensarten-Modell verwendet.

Die Rekrutierungskurve des Fits ist gegeben durch $P_{\text{Rek}}^{\text{Fit}}[T] = [SP^{\text{Fit}}][T] + [DP^{\text{Fit}}][T]$ (die Summe der Konzentration von an Einzelstrangbrüche und an Doppelstrangbrüche gebundenem P). In der zweiten Teiluntersuchung werden die Daten aus dem Modell erzeugt, das zwei Arten von DNA-Schäden berücksichtigt. Dementsprechend ergibt sich $P_{\text{Rek}}^{\text{Daten}}[T] = [SP^{\text{Daten}}][T] + [DP^{\text{Daten}}][T]$. Für die Fits wird im zweiten Durchlauf das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante verwendet. Es ergibt sich in diesem Fall also $P_{\text{Rek}}^{\text{Fit}}[T] = [SP^{\text{Fit}}][T] + [SPA^{\text{Fit}}][T]$.

Bei jeder Anwendung dieses Validierungsverfahrens werden die vier Datenkurven in eine Test- und eine Validierungsgruppe eingeteilt, wobei jede Kurve genau ein Mal der Testgruppe und ein Mal der Validierungsgruppe angehört. Im ersten Schritt eines jeden Validierungsverfahrens wird die SQA der Testgruppe minimiert und im zweiten Schritt wird die SQA der Validierungsgruppe minimiert. Wobei die Ratenkonstanten im zweiten Schritt auf die Werte festgesetzt werden, die aus dem ersten Schritt resultierten.

Die sich nach dem zweiten Schritt ergebende SQA der Validierungsgruppe ist eine wesentliche Größe, anhand derer entschieden werden kann, ob ein Modell abgelehnt werden soll oder als möglicher Kandidat zur Erklärung des Overshoots bestehen bleibt. Hierbei ist vor allem der Wert der SQA eines Validierungsfits relativ zur SQA anderer Validierungsfits (etwa mit anderer Wahl des FRAP-Zeitpunktes) entscheidend. Ein besonders niedriger Wert der SQA im Vergleich zu anderen Fits lässt im Allgemeinen darauf schließen, dass das zum Fitten verwendete Modell als Erklärung für den Overshoot geeignet ist).

Neben der SQA muss natürlich auch der tatsächliche Kurvenverlauf der Daten und des Fits berücksichtigt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Daten aus realen Experimenten eine gewisse Streuung aufweisen. Entspricht daher der Abstand zwischen den Fits und den zu fittenden Rekrutierungskurven größenordnungsmäßig der in realen Experimenten zu erwartenden Streuung, so muss das entsprechende Modell als mögliche Erklärung für den Overshoot in Betracht gezogen werden. Da im Folgenden zumeist das nicht zur Erzeugung der Daten verwendete Modell an die Daten gefittet wird, würde solch eine Akzeptanz des Modells also gegen die jeweilige Wahl des FRAP-Zeitpunktes sprechen.

5.2 Ergebnisse

In der ersten Teiluntersuchung werden die Daten aus dem Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante erzeugt und mit dem Zwei-DNA-Schadensarten-Modell gefittet. Diese Untersuchung ist nochmals unterteilt in drei Telexperimente, die sich in der Wahl des FRAP-Zeitpunktes unterscheiden. Im ersten Telexperiment wird der FRAP-Zeitpunkt in allen vier Kurven sehr früh bei $t = 100$ s gewählt. Im zweiten Telexperiment wird eine Kombination von verschiedenen FRAP-Zeitpunkten gewählt: In zwei Kurven liegt der FRAP-Zeitpunkt bei $t = 100$ s und in den verbleibenden zwei Kurven bei $t = 1500$ s. Im dritten Telexperiment wird der FRAP-Zeitpunkt in allen Kurven auf $t = 1500$ s gesetzt. Die anderen Parameter, also die zur Erzeugung der vier Datenkurven verwendeten Ratenkonstanten und Konzentrationen, sind für alle drei Telexperimente gleich. Am Ende dieser Teiluntersuchung werden die Daten schließlich mit dem Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante gefittet, um sicherzustellen, dass die hier verwendete Validierungsmethode das zur Erzeugung der Daten verwendete Modell überhaupt identifizieren kann.

In der zweiten Teiluntersuchung werden die Daten mithilfe des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells erzeugt und mit dem Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante gefittet. Auch diese Teiluntersuchung besteht ihrerseits aus drei Telexperimenten, in denen die FRAP-Zeitpunkte unterschiedlich gewählt werden. Am Ende dieser zweiten Teiluntersuchung werden die Kurven wie schon in der ersten Teiluntersuchung mit demselben Modell gefittet, mit dem sie erzeugt wurden, um sicherzustellen, dass die Validierungsmethode auch hier das zur Erzeugung verwendete Modell identifizieren kann.

In beiden Untersuchungen werden die Test- und Validierungsfits immer als gestrichelte Kurven dargestellt wohingegen die zugrundeliegenden Daten immer als durchgezogene Kurven dargestellt werden.

5.2.1 Daten des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante

In Abbildung 20A und B ist das Telexperiment mit einem frühen FRAP-Zeitpunkt bei $t = 100$ s dargestellt. Die Daten wurden mit dem Modell erzeugt, in dem die Dissoziationsratenkonstante beeinflusst wird. In Abwesenheit von A gilt in dem hier verwendeten Parametersatz die Dissoziationsratenkonstante $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}} = 0$. Das Protein P kann also nicht vom DNA-Schaden dissoziieren, solange A nicht ebenfalls gebunden ist. In der Realität wäre eine solch verschwindend geringe Dissoziationsratenkonstante durchaus zweckdienlich, falls das Protein P zur Durchführung seiner Aufgabe die gleichzeitige Anwesenheit eines anderen Proteins benötigt. Für die Dissoziationsratenkonstante in Anwesenheit von A wird in diesem Datensatz $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}} = 0.06$ gewählt. In Anwesenheit von A ist die Dissoziationsratenkonstante also erhöht, weshalb sich in den Rekrutierungskurven auch ein Overshoot zeigt (siehe Abschnitt 3.2.4.2). Für reale Proteine könnte der Nutzen einer erhöhten Dissoziationsratenkonstante etwa darin liegen, dass nach dem gleichzeitigen Vorhandensein von P und A eine gewisse Aufgabe relativ schnell vollzogen werden kann. Anschließend wird P nicht mehr benötigt, weshalb eine höhere Dissoziationsratenkonstante als zuvor insgesamt von Vorteil sein kann.

Zum Fitten der Daten wird das Zwei-DNA-Schadensarten-Modell verwendet, das nur über eine Dissoziationsratenkonstante verfügt. Da in diesem Telexperiment der FRAP-Zeitpunkt in allen vier Rekrutierungskurven sehr früh liegt, gibt es für den Fit-Algorithmus keinen Zwang, die Dissoziationsratenkonstante hoch zu wählen. Stattdessen wählt er für die Fits in Abbildung 20A einen niedrigen Wert für $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 3.4 \cdot 10^{-3}$ (für b) gilt ähnliches: $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 2.7 \cdot 10^{-3}$), um die Erholungskurven nach dem FRAP gut fitten zu können. Der Fit-Algorithmus wählt also für die Dissoziationsratenkonstante einen Wert größer als Null und damit größer als das zur Erzeugung der Daten verwendete $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$. Dies ist insofern plausibel, als zum FRAP-Zeitpunkt in den Daten bereits ein gewisser Anteil von P in Anwesenheit von A gebunden ist und dementsprechend die effektive Dissoziationsratenkonstante auch zu diesem frühen Zeitpunkt schon von Null verschieden ist.

Das entscheidende Ergebnis des Telexperiments mit frühem FRAP-Zeitpunkt ist, dass die Summe der quadratischen Abstände über alle Validierungsfits mit $\sum \text{SQA} = 8.5 \cdot 10^{-3}$ im Vergleich zu den noch folgenden Telexperimenten am geringsten ist. Würden die Daten aus einem realen Experiment stammen und eine gewisse Streuung aufweisen (ähnlich der Streuung der Daten aus dem zweiten Teil dieser Arbeit), so wären dies sehr gute Fits. Dementsprechend würde dieses Modell als Erklärung für den Overshoot akzeptiert werden. Da wir jedoch wissen, dass der Overshoot in diesem Fall durch einen anderen Mechanismus hervorgerufen wird, nämlich das Vorhandensein von Zwei Arten von DNA-Schäden, folgt hieraus, dass diese frühe Wahl des FRAP-Zeitpunktes ungünstig ist. Schließlich führt diese Wahl dazu, dass ein falsches Modell als richtig akzeptiert wird.

In Abbildung 20C und D ist das zweite Telexperiment mit einer Kombination von unterschiedlichen FRAP-Zeitpunkten dargestellt. In Abbildung 20C gehören die Kurven mit frühem FRAP-Zeitpunkt zur Testgruppe (durchgezogene blaue und grüne Kurve). Dementsprechend ermittelt der Fit-Algorithmus hier eine Dissoziationsratenkonstante von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 3.4 \cdot 10^{-3}$, die ähnlich gering wie in den Fits des vorigen Telexperiments ausfällt. Diese niedrige Dissoziationsratenkonstante führt allerdings zu sehr schlechten Fits der Validierungskurven (gestrichelte rote und violette Kurve in Abbildung 20C), weshalb der Wert für $SQA = 0.23$ im Vergleich zu den vorherigen Validierungsfits auch sehr hoch ist. Die Validierungsfits misslingen, da in den zugrundeliegenden Daten zum späten FRAP-Zeitpunkt nahezu an jedes Substrat ein Protein A gebunden ist (andernfalls wären die Kurven kurz vor dem FRAP-Zeitpunkt deutlich weiter vom Gleichgewichtswert entfernt). Dementsprechend geschieht die Dissoziation aufgrund der Wahl von $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}} = 6 \cdot 10^{-2}$ in den Daten auf einer sehr kurzen Zeitskala, wodurch die Erholungskurven der Daten nach dem FRAP sehr steil ansteigen (durchgezogene rote und violette Kurve in Abbildung 20C). In den Validierungsfits ist eine derartige Steigung aber nicht möglich, da die Dissoziationsratenkonstante in den Fits der Testgruppe so niedrig gewählt wurde.

In Abbildung 20D liegt der umgekehrte Fall vor: Die Testgruppe besteht hier aus den Kurven mit spät gewählten FRAP-Zeitpunkt (durchgezogene rote und violette Kurve). Dementsprechend gelangt der Fit-Algorithmus hier zu einer verhältnismäßig hohen Dissoziationsratenkonstante von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 3.3 \cdot 10^{-2}$. Diese liegt tatsächlich in der Größenordnung der für die Daten gewählten Dissoziationsratenkonstante in Anwesenheit von A ($k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}} = 6 \cdot 10^{-2}$). Der hohe Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ führt allerdings dazu, dass die Validierungsfits nach dem frühen FRAP viel steiler ansteigen als die zugrundeliegenden Daten (gestrichelte blaue und grüne Kurve in Abbildung 20D). Auch hier ist die Summe der quadratischen Abweichungen im Vergleich zu den anderen Telexperimenten sehr groß: $SQA = 0.34$.

Zusammenfassend ist das Ergebnis dieses Telexperimentes also, dass die Validierungsfits unabhängig von der Einteilung der Kurven in Test- und Validierungsgruppe fehlschlagen. Dementsprechend kann das Modell mit zwei Arten von DNA-Schäden als Erklärung für den Overshoot ausgeschlossen werden. Die Kombination von verschiedenen FRAP-Zeitpunkten führt also tatsächlich zum Ausschluss des falschen Modells.

In Abbildung 20E und F ist das dritte Telexperiment dargestellt, in dem für alle Kurven ein später FRAP-Zeitpunkt gewählt wurde. Unabhängig von der Einteilung in Test- und Validierungsgruppe ermittelt der Fit-Algorithmus einen hohen Wert für $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 3.6 \cdot 10^{-2}$ bzw. $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 3.3 \cdot 10^{-2}$. Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie der in den Daten gewählte Wert für $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}} = 6 \cdot 10^{-2}$. Die Summe der quadratischen Abweichungen ist mit $\sum SQA = 1.2 \cdot 10^{-2}$ relativ gering und alle Validierungsfits liegen so dicht an den Daten, dass das Modell als Erklärung für den Overshoot angenommen werden muss.

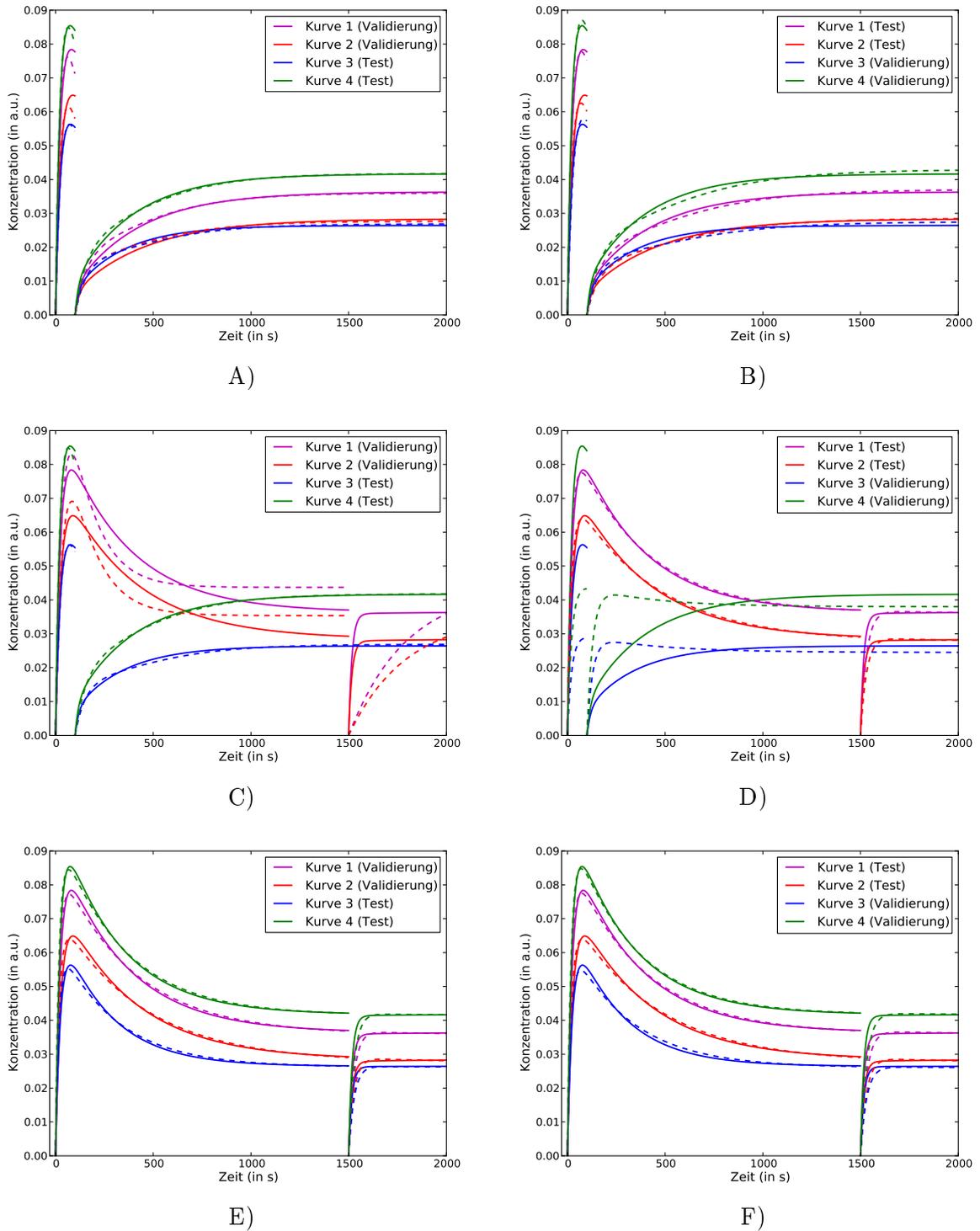


Abbildung 20: Fits des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden an die Daten des Modells mit beeinflusster Dissoziationsrate. A) und B): Früher FRAP-Zeitpunkt. C) und D): Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt. E) und F): Später FRAP-Zeitpunkt. In den links abgebildeten Fits gehören die Kurven 1 und 2 stets zur Validierungsgruppe und die Kurven 3 und 4 zur Test-Gruppe. In den rechts abgebildeten Fits ist diese Einteilung genau umgekehrt. Die Werte der Fit-Parameter sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Fit}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$	$k_{\text{repair}}^{\text{Fit}}$	SQA	# Datenpunkte
früher FRAP-Zeitpunkt					
Kurven 1+2	$2.2 \cdot 10^{-2}$	$3.4 \cdot 10^{-3}$	$9.2 \cdot 10^{-3}$	$4.6 \cdot 10^{-3}$	2000
Kurven 3+4	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$2.7 \cdot 10^{-3}$	$7.6 \cdot 10^{-3}$	$3.9 \cdot 10^{-3}$	2000
Summe				$8.5 \cdot 10^{-3}$	4000
früher und später FRAP-Zeitpunkt					
Kurven 1+2	$2.3 \cdot 10^{-2}$	$3.4 \cdot 10^{-3}$	$9.2 \cdot 10^{-3}$	0.23	2000
Kurven 3+4	$6.5 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	0.34	2000
Summe				0.57	4000
später FRAP-Zeitpunkt					
Kurven 1+2	$8.2 \cdot 10^{-3}$	$3.6 \cdot 10^{-2}$	$1.8 \cdot 10^{-2}$	$6.1 \cdot 10^{-3}$	2000
Kurven 3+4	$8.1 \cdot 10^{-3}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-3}$	2000
Summe				$1.2 \cdot 10^{-2}$	4000
Zur Erzeugung verwendete Parameter:					
Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Daten}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$	$k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Daten}}$	$k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}}$	# Datenpunkte
	$3 \cdot 10^{-2}$	0	$6 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-2}$	2000

Tabelle 5: Parameterwerte der Validierungsfits des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden. Die Daten wurden mit dem Modell erzeugt, bei dem die Dissoziationsratenkonstante von P beeinflusst wird. Die Zusammensetzung der jeweiligen Validationsmenge ist in der ersten Spalte angegeben.

Wie eingangs erwähnt soll in dieser Teiluntersuchung sichergestellt werden, dass die Validierungsmethode überhaupt in der Lage ist, das zur Erzeugung der Daten verwendete Modell als solches zu identifizieren. Daher wurden alle zuvor angesprochenen Telexperimente nochmals durchgeführt mit dem Unterschied, dass zum Fitten das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante verwendet wurde. In jedem dieser Telexperimente wurden sowohl die Test- als auch die Validierungskurven sehr gut gefittet. Daher wird nur eines dieser Telexperimente in Abbildung 21 dargestellt. Die Fits sind in leicht veränderter Farbe dargestellt, um sie überhaupt sichtbar zu machen. Der Fit-Algorithmus ermittelt einen Wert von $k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Fit}} = 3.7 \cdot 10^{-2}$ wohingegen zur Erzeugung der Daten $k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Daten}} = 3 \cdot 10^{-2}$ verwendet wurde. Die Abweichung kommt dadurch zustande, dass der Fit-Algorithmus eine Änderung von $k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Fit}}$ durch das Anpassen von P_0^{Fit} und S_0^{Fit} in allen vier Kurven kompensieren kann. Der Wert von $k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Fit}} = 8.2 \cdot 10^{-4}$ liegt eine Größenordnung unter dem zur Erzeugung verwendeten Wert $k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Daten}} = 6 \cdot 10^{-3}$. Der Grund hierfür ist, dass für den Kurvenverlauf von A lediglich das Produkt von $k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Daten}}$ und A_0^{Fit} entscheidend ist, da in diesem Modell angenommen wird, dass für A die quasi konstante Approximation gilt (siehe Abschnitt 3.1). Der Fit-Algorithmus wählt im Vergleich zu den zuvor gezeigten Fits einen sehr geringen Wert für $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 1.2 \cdot 10^{-6}$ und kommt damit von allen Fits dem Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}} = 0$ am nächsten. Der Wert für $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}} = 6 \cdot 10^{-2}$ stimmt sehr gut mit dem zur Erzeugung verwendeten Wert überein (die relative Abweichung beträgt $2.5 \cdot 10^{-5}$). Darüber hinaus ist die $SQA = 1.9 \cdot 10^{-9}$ viele Größenordnungen kleiner als die SQA der zuvor gezeigten Fits.

Bei einer anderen Wahl des FRAP-Zeitpunktes oder einer anderen Einteilung in Test- und Validierungsgruppe kommt der Fit-Algorithmus zu einem ähnlichen Ergebnis. Daher wird hier auf die Darstellung dieser Telexperimente verzichtet. Letztlich ist das Entscheidende, dass die hier vorgestellte Validierungsmethode das zur Erzeugung der Daten

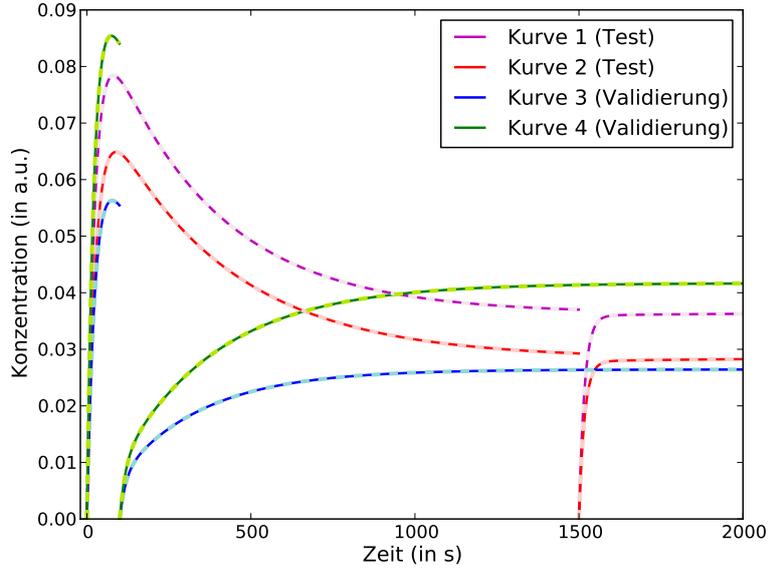


Abbildung 21: Fits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante an die Daten des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante. Die Daten sind als durchgezogene Kurven dargestellt. Die Test- und Validierungsfits sind als gestrichelte Kurven in hellem Farbton dargestellt. Diese Abbildung zeigt exemplarisch, dass die Validierungsfits sehr gut sind, falls die Daten mit demselben Modell erzeugt und gefittet werden. Für jede andere Wahl der FRAP-Zeitpunkte und Einteilung in Test- und Validierungsgruppe stimmen die Fits mit den Datenkurven ebenso gut überein wie die hier dargestellten Fits. Die verwendeten Parameter zur Erzeugung und zum Fitten der Daten sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Fit}}$	$k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Fit}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$	$k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$	SQA	# Datenpunkte
Kurven 3+4	$3.7 \cdot 10^{-2}$	$8.2 \cdot 10^{-4}$	$1.2 \cdot 10^{-6}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$1.9 \cdot 10^{-9}$	2000

Zur Erzeugung verwendete Parameter:

	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Daten}}$	$k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Daten}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$	$k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}}$		# Datenpunkte
	$3 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-3}$	0	$6 \cdot 10^{-2}$		2000

Tabelle 6: Parameterwerte der Fits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante an die Daten des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante.

verwendete Modell unabhängig von der Wahl des FRAP-Zeitpunktes als solches identifizieren kann.

Zusammenfassend hat diese Teiluntersuchung ergeben, dass allein die Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt den Ausschluss des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante erlaubte. Dagegen führte die Analyse der Kurven mit ausschließlich früher Wahl oder ausschließlich später Wahl des FRAP-Zeitpunktes zur Akzeptanz dieses Modells, obwohl die Daten tatsächlich durch das Zwei-DNA-Schadensarten-Modell erzeugt wurden.

5.2.2 Daten des Zwei-DNA-Schadensarten-Modells

In Abbildung 22A und B ist das Telexperiment mit einem frühen FRAP-Zeitpunkt bei $t = 100$ s dargestellt. Die Daten wurden mit dem Zwei-DNA-Schadensarten-Modell erzeugt. Die Dissoziationsratenkonstante ist mit $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}} = 5 \cdot 10^{-2}$ ähnlich hoch gewählt wie die Dissoziationsratenkonstante in Anwesenheit von A in der vorigen Teiluntersuchung (dort galt $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Daten}} = 6 \cdot 10^{-2}$). In der vorigen Teiluntersuchung hatte die niedrige Dissoziationsratenkonstante in Abwesenheit von A dazu geführt, dass die frühen FRAP-Erholungskurven eine geringe Steigung aufwiesen. Da das hier verwendete Zwei-DNA-Schadensarten-Modell aber lediglich über eine Dissoziationsratenkonstante verfügt, führt die hohe Wahl von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$ zu einem wesentlich steileren Anstieg der FRAP-Kurven nach dem frühen FRAP im Vergleich zu den Kurven der vorigen Teiluntersuchung (siehe Kurven in Abbildung 22A und B).

In Abbildung 22A besteht die Testgruppe aus den Kurven 3 und 4 (durchgezogene blaue und grüne Kurve). Für die Dissoziationsratenkonstante in Abwesenheit von A ermittelt der Fit-Algorithmus hier einen Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 4.8 \cdot 10^{-2}$ der erstaunlich nahe am zur Erzeugung der Daten verwendeten Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}} = 5 \cdot 10^{-2}$ liegt. Ein Grund hierfür ist vermutlich, dass keine Kurven mit spätem FRAP-Zeitpunkt vorliegen. Der Fit-Algorithmus kann dementsprechend den Wert von $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$ frei anpassen. Es ist etwa möglich, erst den Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ so anzupassen, dass die frühen FRAP-Erholungskurven gut gefittet werden und anschließend den Wert von $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$ so zu verändern, dass das Plateau ebenfalls gut gefittet wird. Bei den beiden noch folgenden Telexperimenten ist dies nicht möglich, solange die Testkurven einen späten FRAP-Zeitpunkt aufweisen, da die späten FRAP-Erholungskurven die Wahl von $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$ einschränken. Daher findet der Fit-Algorithmus nur dann einen Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$, der dem zur Erzeugung der Daten verwendeten Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$ nahezu entspricht, wenn in den Testkurven nur der frühe FRAP-Zeitpunkt gewählt wurde.

Interessanterweise gelingt es dem Fit-Algorithmus trotz dieser Wahl von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ nur mäßig, die grüne Kurve zu fitten. Die Validierungskurven können dagegen gut gefittet werden (violette und rote Kurve). Da die SQA nur anhand der Validierungsfits ermittelt wird, ergibt sich in diesem Fall daher ein im Vergleich zu den anderen Validierungsfits geringer Wert von $SQA = 3.2 \cdot 10^{-5}$.

In Abbildung 22B sind die Fits mit umgekehrter Einteilung in Test- und Validierungsgruppe gezeigt. Hier kann die grüne Kurve noch schlechter gefittet werden, da sie nun der Validierungsgruppe angehört und der Fit-Algorithmus damit über weniger freie Parameter verfügt. In diesem Fall wird der schlechte Fit der grünen Kurve in der Berechnung der SQA berücksichtigt, weshalb diese mit $SQA = 2 \cdot 10^{-4}$ vergleichsweise hoch ausfällt.

Ob dieses Modell unter realen Bedingungen aufgrund der Validierungsfits ausgeschlossen würde, hängt vermutlich davon ab, wie viele Kurven analysiert würden. Zusätzlich wäre es entscheidend, wie die Werte für die Protein- und Substratkonzentrationen in den jeweiligen Zellen wären. Lägen in einem Experiment viele Kurven mit einem Verlauf ähnlich dem der grünen Kurve in Abbildung 22A und B vor, so würde dies wohl zum Ausschluss des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante führen. In diesem Fall wäre also der frühe FRAP-Zeitpunkt zielführend. Da allerdings bei der Planung des Experiments unbekannt ist, ob die Kurven einen solchen Verlauf zeigen, ist ein aussagekräftigeres Ergebnis wünschenswert, also ein Fitergebnis, auf dessen Grundlage dieses Modell eindeutig ausgeschlossen werden kann.

In Abbildung 22C und D ist das Telexperiment mit einer Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt dargestellt. In 22C besteht die Testgruppe aus den Kurven mit frühem FRAP. Dementsprechend ermittelt der Fit-Algorithmus für die Dissoziations-

ratenkonstante denselben Wert wie auch schon im vorigen Telexperiment ($k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 4.8 \cdot 10^{-2}$). Erstaunlicherweise sind die Validierungsfits (violette und rote Kurve) trotz der Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt sehr gut und die $\text{SQA} = 10^{-4}$ fällt verhältnismäßig gering aus. Das Modell kann also allein auf Grundlage dieses Validierungsfits nicht ausgeschlossen werden. Allerdings führt die umgekehrte Einteilung in Test- und Validierungsgruppe zu sehr schlechten Validierungsfits (gestrichelte, blaue und grüne Kurve in Abbildung 22D). Der Grund hierfür liegt darin, dass der aus den Testfits ermittelte Wert für $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}} = 5.5 \cdot 10^{-3}$ zu gering ist, um den Kurvenverlauf nach dem frühen FRAP-Zeitpunkt in den Validierungskurven zu fitten.

Die in Abbildung 22D) dargestellten Testfits an die Kurven mit spätem FRAP-Zeitpunkt (gestrichelte violette und rote Kurve) weisen darüber hinaus noch ein interessantes Merkmal auf: Die FRAP-Erholungskurve knickt¹⁵ kurz nach dem FRAP-Zeitpunkt ab. Der Grund hierfür liegt darin, dass $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ deutlich geringer gewählt wird als $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$. Da zum FRAP-Zeitpunkt noch ein geringer Teil von P ohne A an das Substrat gebunden ist, findet die Dissoziation daher auf zwei Zeitskalen statt: Die schnelle Dissoziation erfolgt aufgrund der Proteine P , die in Anwesenheit von A gebunden sind und die langsame Dissoziation erfolgt aufgrund der Proteine P , die ohne A an das Substrat gebunden sind. Demgegenüber konnte in den zuvor diskutierten Kurven aus den Abbildungen 22A), B) und C) dieser Knick nicht beobachtet werden, da in diesen Fits die Werte für $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ und $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$ näher beieinander lagen. Dies wiederum folgte aus den Testkurven mit frühem FRAP-Zeitpunkt, die den Fit-Algorithmus zu einem höheren Wert von $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ führten. Der erwähnte Knick ist insofern von Belang, als er ein besonderes Merkmal der FRAP-Erholungskurven des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante ist. Das Zwei-DNA-Schadensarten-Modell kann diesen Knick dagegen nicht erzeugen, da die Dissoziation nur mit einer Konstante beschrieben wird.

Das entscheidende Ergebnis dieses Telexperiments ist, dass die Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt zum Ausschluss des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante führt. Allerdings spielt hierfür die Einteilung in Test- und Validierungsgruppe eine bedeutende Rolle, weshalb bei Anwendung dieser Validierungsmethode auf reale Daten sichergestellt sein sollte, dass jede Kurve mindestens ein Mal Teil der Validierungsgruppe ist.

Abbildung 22E und F zeigen das Telexperiment mit ausschließlich spätem FRAP-Zeitpunkt. Die Fits zeigen nach dem späten FRAP-Zeitpunkt einen ähnlichen Knick wie die Testfits in Abbildung 22D. Auch hier wird der Knick dadurch hervorgerufen, dass $k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$ deutlich geringer gewählt wird als $k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$. Darüber hinaus liegen die Validierungsfits alle dicht an den Daten und die Summe der quadratischen Abstände fällt im Vergleich zu den anderen Telexperimenten gering aus ($\text{SQA} = 3.6 \cdot 10^{-5}$ und $\text{SQA} = 7.3 \cdot 10^{-5}$). Dementsprechend kann das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante auf Grundlage dieser Validierungsfits nicht ausgeschlossen werden und die Wahl des rein späten FRAP-Zeitpunktes erweist sich damit als ungünstig.

¹⁵ Hiermit ist wie schon im ersten Teil der Arbeit gemeint, dass die Steigung der Kurve an der entsprechenden Stelle zu stark abfällt, als dass die Kurve von einer monoexponentiellen Funktion gefittet werden könnte.

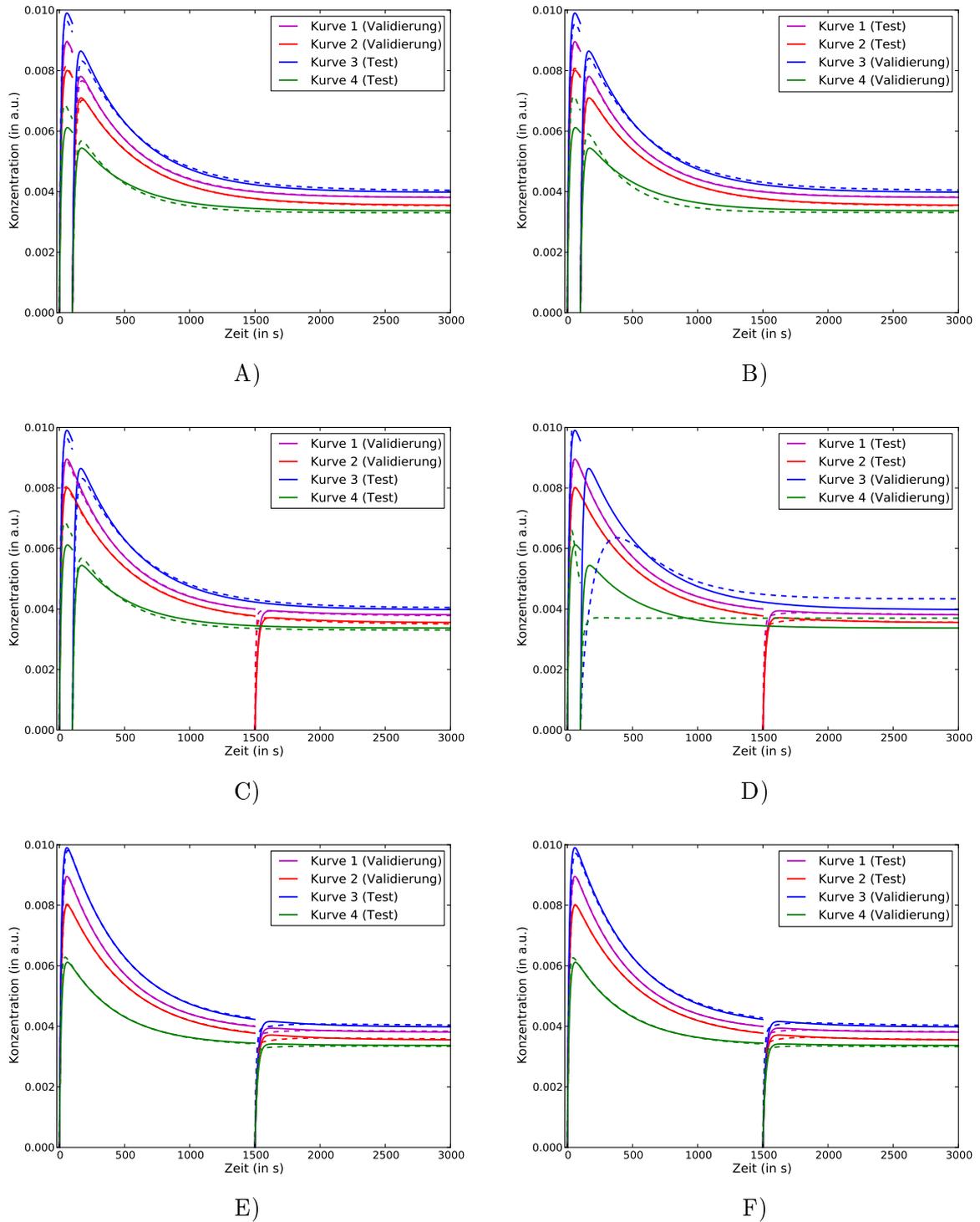


Abbildung 22: Fits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsrate an die Daten des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden. A) und B): Früher FRAP-Zeitpunkt. C) und D): Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt. E) und F): Später FRAP-Zeitpunkt. In den links abgebildeten Fits gehören die Kurven 1 und 2 stets zur Validierungsgruppe und die Kurven 3 und 4 zur Test-Gruppe. In den rechts abgebildeten Fits ist diese Einteilung genau umgekehrt. Die Werte der Fit-Parameter sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Validierungsgruppe	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Fit}}$	$k_{S+A \rightarrow SA}^{\text{Fit}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Fit}}$	$k_{SPA \rightarrow SA+P}^{\text{Fit}}$	SQA	# Datenpunkte
früher FRAP-Zeitpunkt						
Kurven 1+2	$3 \cdot 10^{-2}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-2}$	0.17	$3.2 \cdot 10^{-5}$	3000
Kurven 3+4	$1.1 \cdot 10^{-2}$	$2.4 \cdot 10^{-3}$	$5.8 \cdot 10^{-2}$	0.16	$2 \cdot 10^{-4}$	3000
Summe					$2.3 \cdot 10^{-4}$	6000
früher und später FRAP-Zeitpunkt						
Kurven 1+2	$3 \cdot 10^{-2}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$	$4.8 \cdot 10^{-2}$	0.17	10^{-4}	3000
Kurven 3+4	$4.8 \cdot 10^{-2}$	0.16	$5.5 \cdot 10^{-3}$	0.11	$0.39 \cdot 10^{-3}$	3000
Summe					$0.41 \cdot 10^{-3}$	6000
später FRAP-Zeitpunkt						
Kurven 1+2	$5.6 \cdot 10^{-2}$	0.99	$2.5 \cdot 10^{-3}$	0.1	$3.6 \cdot 10^{-5}$	3000
Kurven 3+4	$5.5 \cdot 10^{-2}$	$2.2 \cdot 10^{-3}$	$5.5 \cdot 10^{-3}$	0.1	$7.3 \cdot 10^{-5}$	3000
Summe					10^{-4}	6000
Zur Erzeugung verwendete Parameter:						
	$k_{S+P \rightarrow SP}^{\text{Daten}}$	$k_{SP \rightarrow S+P}^{\text{Daten}}$	$k_{\text{repair}}^{\text{Daten}}$			# Datenpunkte
	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$			3000

Tabelle 7: Parameterwerte der Validierungsfits des Modells mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante. Die Daten wurden mit dem Modell erzeugt, das zwei Arten von DNA-Schäden berücksichtigt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Validationsmenge ist in der ersten Spalte angegeben.

Auch in dieser Teiluntersuchung soll sichergestellt werden, dass die Validierungsmethode das zur Erzeugung der Daten verwendete Modell als solches erkennt. Tatsächlich zeigt sich wie schon in der ersten Teiluntersuchung, dass sowohl die Test- als auch die Validierungsfits sehr gut mit den Daten übereinstimmen, falls zum Fitten das Modell mit zwei Arten von DNA-Schäden verwendet wird. Exemplarisch ist in Abbildung 23 eines dieser Teilerperimente dargestellt, in dem eine Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt gewählt wurde. Der Fit-Algorithmus wählt für alle Ratenkonstanten nahezu dieselben Werte, wie die zur Erzeugung der Daten verwendeten Werte (siehe Tabelle 8) und die $SQA = 1.2 \cdot 10^{-14}$ ist bei weitem die niedrigste SQA im Vergleich zu allen bisherigen Fits. Die hier vorgestellte Validierungsmethode ist demnach erneut in der Lage, das zur Erzeugung der Daten verwendete Modell zu identifizieren.

Zusammenfassend bestätigt diese zweite Teiluntersuchung, dass eine Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt zielführend in dem Sinne ist, dass das Modell mit beeinflusster Dissoziationsratenkonstante verworfen wird. Dies ist insofern sinnvoll, als in dieser Teiluntersuchung bekannt ist, dass der Overshoot durch das Vorhandensein von zwei Arten von DNA-Schäden erzeugt wird.

5.3 Diskussion

Es wurde gezeigt, dass die Wahl des FRAP-Zeitpunktes einen entscheidenden Einfluss auf die Unterscheidbarkeit der Modelle hat: Wurden die Daten mit demselben Modell gefittet, mit dem sie erzeugt wurden, so hat die hier vorgestellte Validierungsmethode unabhängig von der Wahl des FRAP-Zeitpunktes zur Akzeptanz des Modells geführt. Wurden die Daten dagegen mit dem jeweils anderen Modell gefittet, führte die hier verwendete Va-

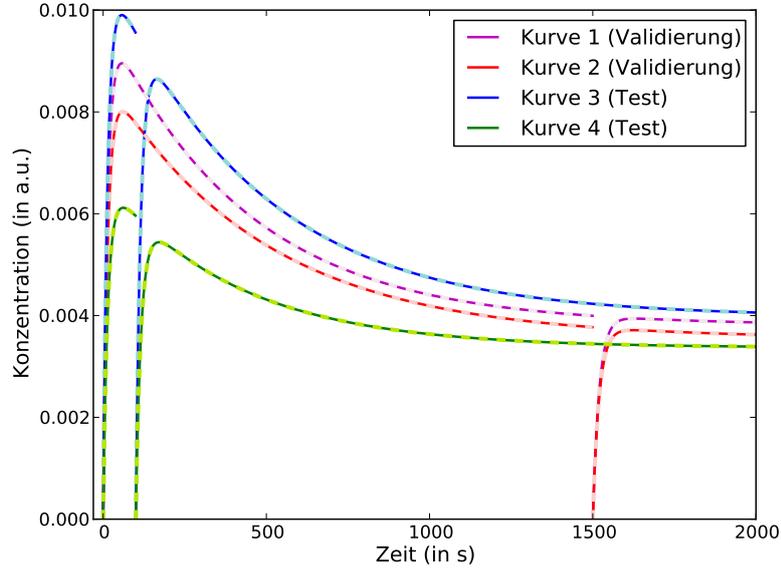


Abbildung 23: Fits des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden an die Daten des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden. Die Daten sind als durchgezogene Kurven dargestellt. Die Test- und Validierungsfits sind als gestrichelte Kurven in hellem Farbton dargestellt. Diese Abbildung zeigt exemplarisch, dass die Validierungsfits sehr gut sind, falls die Daten mit demselben Modell erzeugt und gefittet werden. Für jede andere Wahl der FRAP-Zeitpunkte und Einteilung in Test- und Validierungsgruppe stimmen die Fits mit den Datenkurven ebenso gut überein wie die hier dargestellten Fits. Die verwendeten Parameter zur Erzeugung und zum Fitten der Daten sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Validierungsgruppe	$k_{S+p \rightarrow SP}^{\text{Daten}}$	$k_{SP \rightarrow S+p}^{\text{Daten}}$	$k_{\text{repair}}^{\text{Daten}}$	SQA	# Datenpunkte
Kurven 3+4	$4.8 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$	$1.2 \cdot 10^{-14}$	3000

Zur Erzeugung verwendete Parameter:

	$k_{S+p \rightarrow SP}^{\text{Daten}}$	$k_{SP \rightarrow S+p}^{\text{Daten}}$	$k_{\text{repair}}^{\text{Daten}}$		# Datenpunkte
	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^{-2}$		3000

Tabelle 8: Parameterwerte der Fits des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden an die Daten des Modells mit zwei Arten von DNA-Schäden.

lidierungsmethode nur dann zum Ausschluss des Modells, falls in den zugrundeliegenden Kurven eine Kombination von frühem und spätem FRAP-Zeitpunkt vorlag. Wiesen die Datenkurven nur den frühen oder nur den späten FRAP-Zeitpunkt auf, so wurde das Modell bis auf eine Ausnahme akzeptiert, obwohl es nicht das zur Erzeugung der Daten verwendete Modell gewesen war. Die einzige Ausnahme war das in Abbildung 7A und B dargestellte Teilexperiment, in dem nur der frühe FRAP-Zeitpunkt gewählt wurde und der Fit der grünen Kurve so misslungen war, dass das Modell wohl auch im Fall von realen Daten abgelehnt worden wäre. Letztlich hat sich aber gezeigt, dass die Unterscheidbarkeit der Modelle bei einer Kombination von verschiedenen FRAP-Zeitpunkten am größten ist.

Bei der Planung eines Experimentes sollte daher die Durchführung von Experimenten mit unterschiedlichem FRAP-Zeitpunkt in Erwägung gezogen werden. Hierbei ist der späte FRAP-Zeitpunkt bevorzugt so zu wählen, dass die Kurven etwa in der Sättigung sind oder ein Plateau erreicht haben. Schließlich deutet dies darauf hin, dass sich die Assoziations- und Dissoziationsraten des Proteins nicht mehr ändern. Der frühe FRAP-Zeitpunkt sollte dagegen in den Bereich gelegt werden, der daraufhin untersucht werden soll, ob die Dissoziationsratenkonstante einen anderen Wert aufweist als nach Erreichen des Gleichgewichts zwischen Assoziations- und Dissoziationsrate. Im Fall des Overshoots also etwa in die Nähe des Maximums. Sinnvoll ist sicherlich auch die Verwendung von mehr als zwei FRAP-Zeitpunkten.

Die hier vorgestellte Methode ist nicht beschränkt auf Fälle, in denen die Dissoziationsratenkonstante sich ändert. Auch in dem Fall, dass sich die Assoziationsratenkonstante während der Rekrutierungsphase ändert, sollte eine Variation des FRAP-Zeitpunktes die Unterscheidbarkeit der Modelle erhöhen. Selbst wenn sich in den untersuchten Modellen keine Ratenkonstante ändert, ist die Kombination von unterschiedlichen FRAP-Zeitpunkten sinnvoll, da die FRAP-Erholungskurven durch die in ihnen enthaltenen Informationen den Fit-Algorithmus in der Wahl der Parameter einschränken. Dies wiederum sollte die Unterscheidbarkeit der Modelle unabhängig davon erhöhen, ob in einem der Modelle die Änderung einer Ratenkonstante berücksichtigt wird oder nicht.

Eine mehrfache Variation des FRAP-Zeitpunktes ist besonders dann sinnvoll, wenn der konkrete Verdacht auf eine Änderung der Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten von mehreren Proteinen während der Rekrutierungsphase besteht. Ein Grund hierfür könnte etwa sein, dass mehrere Proteine einen Komplex bilden, der über andere Ratenkonstanten verfügt als die beteiligten Proteine ohne Zusammenschluss.

In diesem Teil der Arbeit wurden die verwendeten Daten durch Computersimulationen generiert. Dies hatte den entscheidenden Vorteil, dass sich die verschiedenen Teilexperimente allein in der Wahl des FRAP-Zeitpunktes unterscheiden. In Experimenten mit lebenden Zellen ist die Abhängigkeit von den Rahmenbedingungen, wie etwa Druck, Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Alter der Zelllinie und exakte Position im Zellzyklus so komplex, dass eine gewisse Variation der Proteinkonzentration von Zelle zu Zelle unvermeidbar ist. Zusätzlich variiert in realen Experimenten die Konzentration an erzeugten DNA-Schäden. Aus diesen Gründen würden die Kurven aus einem Teilexperiment sich also nicht nur in der Wahl des FRAP-Zeitpunktes von den Kurven eines anderen Teilexperimentes unterscheiden. Es könnte demnach nie sichergestellt sein, dass allein die unterschiedliche Wahl des FRAP-Zeitpunktes die erhöhte Unterscheidbarkeit der Modelle herbeiführt. Da der Unterschied in den computergenerierten Kurven der hier vorgestellten Untersuchung einzig in der Wahl des FRAP-Zeitpunktes lag, muss die erhöhte Unterscheidbarkeit der Modelle hierin begründet liegen. Die eingangs gestellte Frage, ob der erhöhte experimentelle Mehraufwand eines frühen FRAP-Zeitpunktes gerechtfertigt ist, kann also in Hinblick auf die erhöhte Unterscheidbarkeit der Modelle eindeutig positiv beantwortet werden.

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Untersuchung von Methoden, mit deren Hilfe die Unterscheidbarkeit alternativer Modelle hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Reproduktion und Deutung experimenteller Daten erhöht werden kann und die damit zu aussagekräftigeren Ergebnissen führen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde zunächst untersucht, inwiefern einige Modelle bereits auf Grundlage der Form der Proteinrekrutierungskurven ausgeschlossen werden können. In diesem Zusammenhang wurden folgende Merkmale der Proteinrekrutierungskurven identifiziert, die in engem Zusammenhang mit den der Proteinrekrutierung zugrundeliegenden Prozessen stehen:

1. Die Steigung der Rekrutierungskurve nimmt in der Anfangsphase zu.
2. Die Rekrutierungskurve weist einen Knick auf. Die Kurve flacht an dieser Stelle schneller ab, als dies etwa bei einer monoexponentiellen Funktion möglich wäre.
3. In der Rekrutierungskurve ist ein Overshoot zu sehen, der dadurch gekennzeichnet ist, dass die Rekrutierungskurve nach Erreichen des Maximums wieder abfällt und anschließend ein Plateau erreicht.
4. In der Anfangsphase der Rekrutierungskurve existiert ein Wendepunkt. Die Steigung nimmt also zunächst ab und kurz darauf wieder zu.

Diese Erkenntnisse sollen Experimentatoren unter anderem dabei helfen, anhand ihnen vorliegender experimenteller Daten eine Vorauswahl der zur Datenanalyse verwendeten Modelle zu treffen. Außerdem können diese Erkenntnisse bereits bei der Planung eines Experiments sehr hilfreich sein: Besteht etwa Grund zur Annahme, dass zwei Proteine nacheinander rekrutiert werden, so ist laut den Ergebnissen des ersten Teils das besondere Merkmal der Kurven, dass die Steigung der Rekrutierungskurve des zweiten Proteins zu Beginn zunimmt. Bei der Planung des Experiments sollte also berücksichtigt werden, dass die Aufnahmen des Fluoreszenz-Signals des zweiten Proteins kurz nach der Mikrobestrahlung mit hoher zeitlicher Auflösung erfolgen sollten, um die Zunahme der Anfangssteigung erkennen zu können. Wird dagegen vermutet, dass die Proteine miteinander in Konkurrenz um die Substrate stehen, ergibt sich aus dem ersten Teil dieser Arbeit, dass die Rekrutierungskurven beider Proteine monoexponentiell sein müssten und der Zeitpunkt, an dem beide Kurven sättigen, sollte gleich sein. Die Experimente sollten demnach so geplant werden, dass die Dauer der Experimente lang genug ist und die zeitliche Auflösung in der Nähe der Sättigung hoch genug ist, um dieses Merkmal erkennen zu können. Auch in anderen Fällen sollten die Erkenntnisse des ersten Teils dabei helfen, die Rahmenbedingungen eines Experiments, wie Dauer, zeitliche Auflösung und falls möglich eine Variation der Proteinkonzentration, festzulegen.

Die Erkenntnisse aus dem ersten Teil können zudem in komplizierteren Untersuchungen Anwendung finden. Beispielsweise tritt der Knick, wie im dritten Teil gezeigt, in FRAP-Erholungskurven auf und ist auch hier ein Indiz dafür, dass mehrere Dissoziationsratenkonstanten von Bedeutung für das untersuchte Protein sind. Denkbar ist auch die Anwendung auf sehr komplexe Modelle mit einer hohen Anzahl an Freiheitsgraden, wenn diese Modelle aus Untereinheiten bestehen, die ähnlich aufgebaut sind wie die im ersten Teil untersuchten Modelle. So könnte ein Modell, bei dem das beobachtete Protein erst nach einem anderen Protein rekrutiert wird und zusätzlich die Dissoziationsratenkonstante

des beobachteten Proteins durch ein drittes Protein beeinflusst wird, zu einer Kombination der oben aufgelisteten Merkmale innerhalb einer einzigen Rekrutierungskurve führen: der anfänglichen Zunahme der Anfangssteigung und dem Overshoot.

Im zweiten Teil wurde unter anderem gezeigt, dass die Durchführung von FRAP kurz nach der DNA-Schäden erzeugenden Bestrahlung experimentell möglich ist. Dies ist besonders dann nützlich, wenn die beobachteten Prozesse so langsam ablaufen, dass sie während der Dauer des Experiments kein Gleichgewicht erreichen. Zusätzlich wurde eine theoretische Methode zur Analyse von FRAP-Experimenten vorgestellt, die auch dann Verwendung findet, wenn die Assoziations- und Dissoziationsraten der betrachteten Spezies nicht im Gleichgewicht sind, etwa wenn sich die Ratenkonstanten im Lauf der Zeit ändern. Hierdurch unterscheidet sich die hier vorgestellte Methode von klassischen FRAP-Analysen, die auf der Annahme eines chemischen Gleichgewichts basieren (Carrero et al., 2003; Phair et al., 2004; Rabut et al., 2004; Sprague and McNally, 2005), und erlaubt die Untersuchung von bisher unerforschten Prozessen.

Die erhöhte Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle wurde im zweiten Teil dieser Arbeit durch die Kombination zweier Methoden, der Mikrobestrahlung und FRAP, erreicht. FRAP-Experimente während der Rekrutierungsphase sind besonders dann wichtig, wenn sich die für das Protein wirksamen Ratenkonstanten während der Rekrutierungsphase ändern. Mögliche Gründe hierfür sind posttranslationale Modifikationen eines Proteins und die Entstehung eines Multiprotein-Komplexes an der beschädigten DNA, der aus sich gegenseitig beeinflussenden Proteinen aufgebaut ist.

Im Allgemeinen wird die Form einer FRAP-Erholungskurve maßgeblich durch die Dissoziationsratenkonstante bestimmt, wohingegen der anfängliche Anstieg der Rekrutierungskurve vor allem von der Assoziationsratenkonstante abhängt. Konzentrationsverläufe wie die im zweiten Teil vorgestellten, die durch eine Kombination von Mikrobestrahlung und FRAP-Bleichen verursacht werden, sind sowohl sensitiv für die Assoziations- als auch die Dissoziationsratenkonstante, da sich die Phasen der Rekrutierung und der Erholung vom FRAP-Bleichen überlagern. Das erschwert die Analyse derartiger Experimente im Vergleich zu Mikrobestrahlungsexperimenten ohne FRAP. Dies wird allerdings durch den Vorteil ausgeglichen, dass die Dissoziationsratenkonstanten zu verschiedenen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase miteinander verglichen werden können und so getestet werden kann, ob eine unveränderliche Dissoziationsratenkonstante mit den experimentellen Daten vereinbar ist. Hierdurch können nicht nur einige Modelle ausgeschlossen werden, sondern auch verlässlichere Werte für die Dissoziationsratenkonstante angegeben werden.

In der gesamten Arbeit wurden möglichst einfache Modelle verwendet, da mit genügend hoher Komplexität die meisten Modelle jeden Datensatz reproduzieren können. Dementsprechend wird es mit zunehmend komplexeren Modellen immer schwieriger, zwischen ihnen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Reproduktion der Daten zu unterscheiden. Außerdem verschleiert die Komplexität eines Modells häufig diejenigen Bestandteile des Modells, die ausschlaggebend für die Reproduzierbarkeit der Daten sind. Nichtsdestotrotz kann die im zweiten Teil vorgestellte FRAP-Mikrobestrahlungs-Methode auch auf komplexere Modelle erweitert werden. Es wäre beispielsweise möglich, Experimente auszuwerten, in denen die Diffusion auf derselben Zeitskala wie die Rekrutierung stattfindet, indem die hier vorgestellte Methode mit Modellen kombiniert wird, die Diffusion berücksichtigen (Crank, 1975; Soumpasis, 1983). Die FRAP-Mikrobestrahlungs-Methode wäre sicherlich auch aufschlussreich, falls die Komplexität der verwendeten Modelle zwangsläufig dadurch erhöht wird, dass in den zugrundeliegenden Experimenten mehrere Proteine gleichzeitig markiert werden. Denkbar ist etwa eine Markierung von PCNA, FEN1 und Ligase 1. Diese Proteine sind alle in einem speziellen DNA-Reparaturweg (long-patch base excision repair)

involviert. Eine Anwendung der FRAP-Mikrobestrahlungs-Methode in einer derartigen Untersuchung könnte helfen, alternative Modelle auszuschließen und die Parameterwerte genauer zu bestimmen. Weitere mögliche Experimente, die komplexere Modelle erfordern, sind solche, in denen gezielt das Heterochromatin (dicht gepackte DNA) oder Euchromatin (weniger dicht gepackte DNA) bestrahlt wird. Wobei die Sichtbarmachung des Heterochromatin über bestimmte Marker erfolgen kann. Gerade wenn die Komplexität der Modelle wie in den soeben vorgeschlagenen Untersuchungen zunimmt, sollte sich das Durchführen von FRAP während der Rekrutierungsphase als besonders nützlich erweisen: Der Zunahme des Parameterraumes infolge der Komplexität des Modells kann mit der Einschränkung der möglichen Parameterwerte dank der FRAP-Experimente entgegengewirkt werden.

Auf rein theoretischer Basis könnten zukünftige Untersuchungen die Frage klären, ob eine Variation der Proteinkonzentration ähnlich wie im ersten Teil dieser Arbeit in Kombination mit der FRAP-Mikrobestrahlungs-Methode die Unterscheidbarkeit der alternativen Modelle noch zusätzlich verbessert. Außerdem könnte untersucht werden, inwiefern eine Variation der Schadenskonzentration (im Experiment realisierbar durch die Bestrahlung mit unterschiedlicher Leistung) Auswirkungen auf die Unterscheidbarkeit der Modelle hat. Eine interessante Fragestellung für theoretische Untersuchungen könnte auch lauten, ob die Durchführung des FRAP-Bleichens zu drei oder mehr verschiedenen Zeitpunkten (im Vergleich zu den zwei verschiedenen Zeitpunkten hier in der Arbeit) die Unterscheidbarkeit der Modelle weiter steigert.

In allen hier vorgestellten Modellen wurde angenommen, dass die Konzentration der DNA-Schäden unbekannt ist. Falls durch bestimmte Marker die Konzentration der DNA-Schäden absolut oder relativ zu anderen bestrahlten Zellen ermittelt werden kann, sollte diese Information in Kombination mit den Erkenntnissen aus dem ersten Teil und insbesondere der FRAP-Mikrobestrahlungs-Methode in vielen Fällen zu einer hohen Unterscheidbarkeit der Modelle führen.

Schließlich kann die hier vorgestellte Methode auch verwendet werden, um weniger komplexe Situationen auszuwerten. Denkbar ist etwa die Verwendung eines Lasers, der weniger Klassen von DNA-Schäden hervorruft. Falls es in Zukunft möglich sein sollte, nur eine bestimmte Art von Schäden zu erzeugen, könnte die Durchführung von FRAP zu verschiedenen Zeitpunkten während der Rekrutierungsphase noch genauere Auskunft darüber geben, ob sich die Ratenkonstanten der beteiligten Proteine während der Rekrutierungsphase ändern.

Darüber hinaus ist die hier vorgestellte Methode nicht beschränkt auf Mikrobestrahlungsexperimente. Die Durchführung von FRAP-Experimenten zu unterschiedlichen Zeitpunkten sollte auch in vielen anderen Situationen, in denen sich die Proteinkonzentrationen als Antwort auf ein bestimmtes Ereignis ändern, sehr aufschlussreich sein. Etwa bei Untersuchungen der bereits erwähnten TULIPs¹⁶ (Strickland et al., 2012).

Letztlich ist für die Planung zukünftiger Experimente vor allem die Erkenntnis entscheidend, dass eine Variation des zeitlichen Abstandes zwischen Mikrobestrahlung und FRAP-Bleichen zu den aussagekräftigsten Ergebnissen führt und wir hoffentlich mit derartigen und ähnlichen Experimenten irgendwann einmal das faszinierende Innenleben von Douglas Adams „Katze“ aus dem einleitenden Zitat begreifen können.

¹⁶ tunable, light-controlled interacting protein

7 Danksagung

Mein größter Dank gilt Barbara Drossel für die hervorragende Betreuung, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die spannende Zeit in ihrer Arbeitsgruppe. Von Herzen möchte ich auch meiner Familie inklusive meiner Freundin Jenny Sterzing für die wertvolle Unterstützung im letzten Jahr danken. Cristina Cardoso, Alexander Rapp und Britta Muster möchte ich ebenfalls sehr danken für die fruchtbare Zusammenarbeit und die sehr informativen und unterhaltsamen Konversationen. Ich danke den jetzigen sowie den ehemaligen Mitgliedern von Barbara Drossels Arbeitsgruppe, vor allem Daniel Löb, Christopher Priester, Lotta Heckmann und Michael Harrach für die kollegiale Stimmung und die anregenden Diskussionen. Schließlich möchte ich mich bei allen bedanken, die Fehler in diesem Text korrigiert und Verbesserungsvorschläge zu dieser Arbeit oder den zugrundeliegenden Artikeln beigesteuert haben: Barbara Drossel, Cristina Cardoso, Alexander Rapp, Wolfgang Lengert, Nicor Lengert, Christopher Priester, Daniel Löb und Britta Muster.

Literatur

- B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2007.
- C. Bernstein, A.R. Prasad, V. Nfonsam, and H. Bernstein. DNA damage, DNA repair and cancer. *New Research Directions in DNA Repair*, Prof. Clark Chen (Ed.), ISBN 978-953-51-1114-6, InTech, 2013.
- Julien Berro, Vladimir Sirotkin, and Thomas D. Pollard. Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: Disassembly requires release of actin filament fragments. *Molecular Biology of the Cell*, 21:2905–2915, 2010.
- I.N. Bronstein and K.A. Semendjajew. *Taschenbuch der Mathematik*. Verlag Harri Deutsch, 1989.
- G. Carrero, D. McDonald, E. Crawford, G. de Vries, and M.J. Hendzel. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods*, 29:14–28, 2003.
- J.R. Cash and A.H. Karp. A variable order runge-kutta method for initial value problems with rapidly varying right-hand sides. *ACM Transactions on Mathematical Software*, 16:201–222, 1990.
- O. Sommatris Cazzalini, S., M. Tillhon, I. Dutto, A. Bachi, A. Rapp, T. Nardo, A.I. Scovassi, D. Necchi, M.C. Cardoso, L.A. Stivala, and E. Prospero. CBP and p300 acetylate PCNA to link its degradation with nucleotide excision repair synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 42:8433–8448, 2014.
- J. Crank. *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, 1975.
- Xavier Darzacq, Yaron Shav-Tal, Valeria de Turris, Yehuda Brody, Shailesh M. Shenoy, Robert D. Phair, and Robert H. Singer. In vivo dynamics of RNA polymerase ii transcription. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14:796–806, 2007.

-
-
- R.N. Day and M.W. Davidson. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem. Soc. Rev.*, 38:2887–2921, 2009.
- W Friedland, P Jacob, and P Kundrat. Stochastic simulation of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining based on track structure calculations. *Radiation Research*, 173:677–688, 2010.
- N. Hansen. The CMA evolution strategy: a comparing review. In J.A. Lozano, P. Laranaga, I. Inza, and E. Bengoetxea, editors, *Towards a new evolutionary computation. Advances on estimation of distribution algorithms.*, pages 75–102. Springer, 2006.
- B. Jakob, J. H. Rudolph, N. Gueven, M. F. Lavin, and G. Taucher-Scholz. Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. *Radiation Research*, 163:681–690, 2005.
- Burkhard Jakob, Jorn Splinter, Sandro Conrad, Kay-Obbe Voss, Daniele Zink, Marco Durante, Markus Lobrich, and Gisela Taucher-Scholz. DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone h2ax phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Research*, 39:6489–6499, 2011.
- L. Lan, S. Nakajima, K. Komatsu, A. Nussenzweig, A. Shimamoto, J. Oshima, and A. Yasui. Accumulation of werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *Journal of Cell Science*, 118:4153–4162, 2005.
- J.J. Landry, P.T. Pyl, T. Rausch, T. Zichner, M.M. Tekkedil, A.M. Stütz, A. Jauch, R.S. Aiyar, G. Pau, N. Delhomme, J. Gagneur, J.O. Korbel, W. Huber, and L.M. Steinmetz. The genomic and transcriptomic landscape of a hela cell line. *G3*, 3:1213–1224, 2013.
- Y. Li and F.A. Cucinotta. Modeling non-homologous end joining. *Journal of Theoretical Biology*, 283:122–135, 2011.
- Tomasz Lipniackia, Pawel Paszekb, Allan R. Brasierd, Bruce Luxonc, and Marek Kimmelb. Mathematical model of NF-kB regulatory module. *Journal of Theoretical Biology*, 228:195–215, 2004.
- Martijn S. Luijsterburg, Gesa von Bornstaedt, Audrey M. Gourdin, Antonio Z. Politi, Martijn J. Moné, Daniël O. Warmerdam, Joachim Goedhart, Wim Vermeulen, Roel van Driel, , and Thomas Höfer. Stochastic and reversible assembly of a multiprotein DNA repair complex ensures accurate target site recognition and efficient repair. *The Journal of Cell Biology*, 189:445–463, 2010.
- G.F. Morris and M.B. Mathews. Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:13856–13864, 1989.
- O. Mortusewicz and H. Leonhardt. XRCC1 and PCNA are loading platforms with distinct kinetic properties and different capacities to respond to multiple DNA lesions. *BMC Molecular Biology*, 8:81, 2007.
- O. Mortusewicz, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. Spatiotemporal dynamics of regulatory protein recruitment at DNA damage sites. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104:1562–1569, 2008.
- F. Mueller, D Mazza, T.J. Stasevich, and J.G. McNally. FRAP and kinetic modeling in the analysis of nuclear protein dynamics: what do we really know? *Current Opinion in Cell Biology*, 22:403–411, 2010.

-
-
- R. D. Phair, P. Scaffidi, C. Elbi, J. Vecerová, A. Dey, K. Ozato, D.T. Brown, G. Hager, B. Bustin, and T. Misteli. Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: Three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol.*, 24:6393–6402, 2004.
- Robert D. Phair and Tom Misteli. Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2:898–907, 2001.
- G. Rabut, V. Doye, and J. Ellenberg. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nature Cell Biology*, 6:1114–1121, 2004.
- M Selbach and M Mann. Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nature Methods*, 3:981 – 983, 2006.
- O. Shimomura, J. Johnson, and Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, aequorea. *J Cell Comp Physiol.*, 59:223–239, 1962.
- D.M. Soumpasis. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophysical Journal*, 41:95–97, 1983.
- A. Sporbert, A. Gahl, R. Ankerhold, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. DNA polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Molecular Cell*, 10:1355–1365, 2002.
- A. Sporbert, P. Domaing, H. Leonhardt, and M.C. Cardoso. PCNA acts as a stationary loading platform for transiently interacting okazaki fragment maturation proteins. *Nucleic Acids Res*, 33:3521–3528, 2005.
- B.L. Sprague and J.G. McNally. FRAP analysis of binding: proper and fitting. *Trends Cell Biol*, 15:84–91, 2005.
- Devin Strickland, Yuan Lin, Elizabeth Wagner, C. Matthew Hope, Josiah Zayner, Chloe Antoniou, Tobin R. Sosnick, Eric L. Weiss, and Michael Glotzer. TULIPs: tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology. *Nature Methods*, 9:379–384, 2012.
- F. Tobias, M. Durante, G. Taucher-Scholz, and B. Jakob. Spatiotemporal analysis of DNA repair using charged particle radiation. *Mutation Research*, 704:54–60, 2010.
- Orion D Weiner Toettcher, J E Christopher A Voigt and Wendell A Lim. The promise of optogenetics in cell biology: interrogating molecular circuits in space and time. *Nature Methods*, 8:35–38, 2011.
- K Truong and M Ikura. The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current Opinion in Structural Biology*, 11:573–578, 2001.

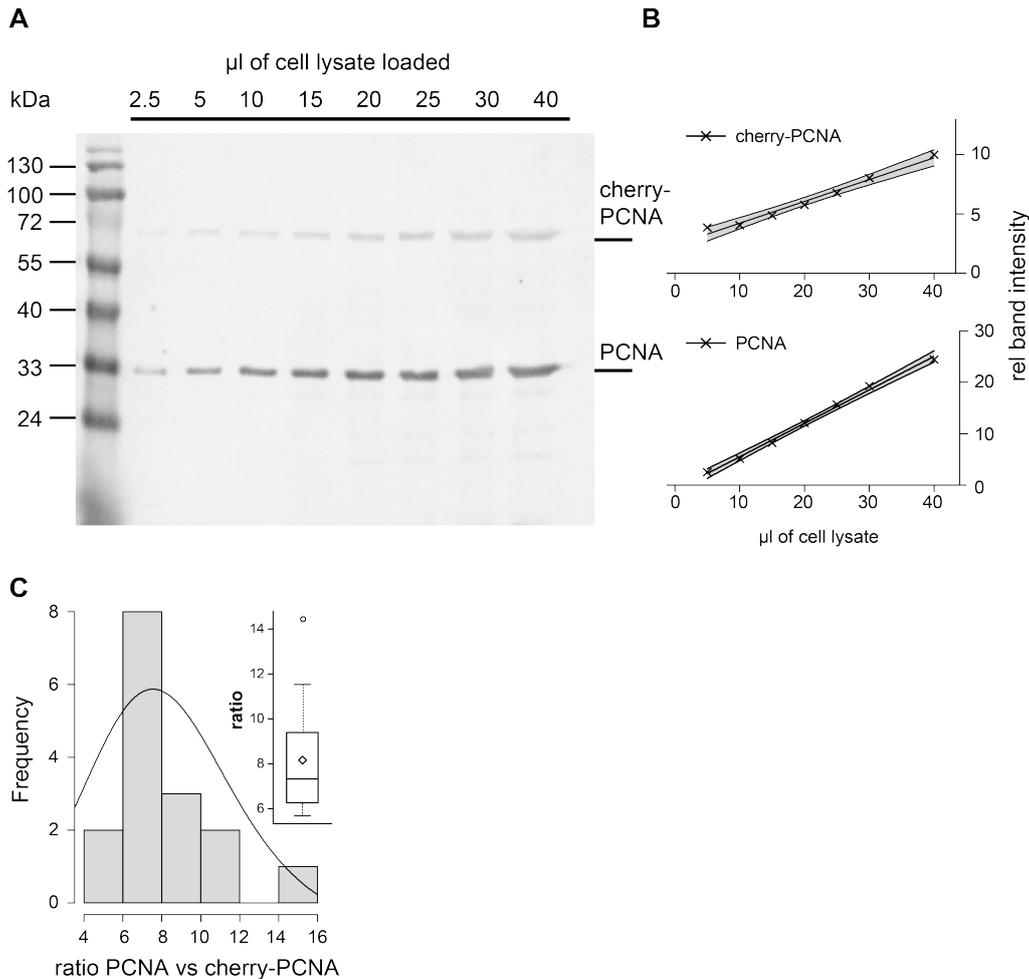


Abbildung A1: Bestimmung des Verhältnisses zwischen endogenem und fluoreszent markiertem PCNA. A) Quantitative Western Blots; obere Banden: fluoreszent markiertes PCNA; untere Banden: endogenes PCNA. Es wurden unterschiedliche Mengen an Zell-Lysat verwendet. B) Um nur solche Banden auszuwerten, die im linearen Detektionsbereich lagen, wurde die Band-Intensität über der Lysat-Menge aufgetragen und zur weiteren Bestimmung des Verhältnisses nur die Bänder im 95%-Konfidenzintervall verwendet. C) Histogramm der Verhältnisse zwischen endogenem PCNA und fluoreszent markiertem PCNA. Das Inset zeigt die Verteilung als Boxplot. Das Verhältnis ergab sich aus 16 Banden-Paaren aus 3 Western Blots zu 8.1 ± 2.7 . Die Experimente wurden von Danny Nowak und die Daten-Analyse von Alexander Rapp durchgeführt.

Lebenslauf

- 04.2011 - 12.2014 Interdisziplinäre Promotion in Physik und Biologie an der TU Darmstadt, Arbeitsgruppe Theorie komplexer Systeme, Prof. Barbara Drossel
- 04.2009 - 04.2011 Studium und Abschluss im Master of Science, Physik, TU Darmstadt. Titel der Master-Thesis: „Koexistenz von massenselektiven Räubern unter Berücksichtigung der Beute-Ontogenese“
- 10.2005 - 04.2009 Studium und Abschluss im Bachelor of Science, Physik, TU Darmstadt. Titel der Bachelor-Thesis: „Modellierung von Phänologie-Effekten in einfachen Nahrungsnetzwerken“
- 09.2004 - 05.2005 Zivildienst
- 09.1995 - 06.2004 Besuch der Martin-Luther-Schule Rimbach (staatliches Gymnasium) mit Abschluss Abitur

Lehrtätigkeit

- 04.2014 - 09.2014 Einführung in die Theoretische Physik (Physikalische Begriffsbildungen)
- 04.2012 - 09.2012 Theoretische Physik IV: Statistische Physik
- 08.2009 - 05.2010 Vertretungskraft an der Lichtenbergschule Darmstadt (Gymnasium) für Wahlpflichtunterricht Physik
- 04.2008 - 09.2008 Mathematik II für Maschinenbauer

Sprachkenntnisse

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (fließend in Wort und Schrift)
- Französisch (gute Kenntnisse)
- Italienisch (Grundkenntnisse)
- Japanisch (Grundkenntnisse)

Publikationen

- Laurin Lengert und Barbara Drossel. Deducing underlying mechanisms from protein recruitment data. PLOS ONE 8, e66590, 2013

in Vorbereitung:

Laurin Lengert, Barbara Drossel, Cristina Cardoso, Britta Muster, Danny Nowak und Alexander Rapp. FRAP during protein recruitment.

Konferenzbeiträge

GBS 2013, Darmstadt, Deducing underlying mechanisms from protein recruitment data. Laurin Lengert und Barbara Drossel

DPG Tagung 2013, Regensburg, Deducing underlying mechanisms from protein recruitment data. Laurin Lengert und Barbara Drossel

DPG Tagung 2012, Berlin, Models of Base Excision Repair. Laurin Lengert und Barbara Drossel

System Biology 2011, Stockholm, Modelling protein recruitment data. Laurin Lengert und Barbara Drossel

DPG Tagung 2011, Dresden, Coexistence of mass-selective predators feeding on a growing prey. Laurin Lengert, Christian Guill und Barbara Drossel

DPG Tagung 2010, Regensburg, Coexistence and phenology of mass-selective predators. Laurin Lengert, Christian Guill und Barbara Drossel