

Aus der Universitätsfrauenklinik Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Hans Georg Bender

Intrazelluläre Mobilität und Funktion des
CapG-Proteins:
eine Analyse anhand lebender neoplastischer
und nichtneoplastischer Brustepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Malte Renz

2008

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg, Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans Georg Bender

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Georg Hartwig

Die hier vorgestellten experimentellen Arbeiten wurden ausgeführt in der Abteilung Professor Dr. Jörg Langowski, Biophysik der Makromoleküle, am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg.

Zusammenfassung

Das CapG-Protein, ein Aktin-bindendes Protein der Gelsolinfamilie, wird in Mammakarzinomen, insbesondere in metastasierenden Mammakarzinomen, überexprimiert. Es ist bekannt, daß das CapG-Protein an der Kontrolle der Aktin-basierten Motilität nichtmuskulärer Zellen beteiligt ist. Seine verstärkte Expression soll eine Steigerung der Motilität benigner Zellen bedingen. Somit ist zu erwarten, daß in malignen Zellen, in denen das CapG-Protein überexprimiert ist, Motilität, Invasivität und Metastasierung in besonderem Maße gefördert werden.

In dieser Arbeit gelang es nun, durch die Fluoreszenzmarkierung des CapG-Proteins die Dynamik zellulärer Prozesse wie Migration und Invasivität zur Anschauung zu bringen und die Kinetik der intrazellulären Verteilung des CapG-Proteins zu analysieren. Unterschiede der intrazellulären Mobilität des CapG-Proteins zwischen nichtneoplastischen und neoplastischen Brustepithelzellen konnten dargestellt, Korrelationen gesteigerter Tumorzellbeweglichkeit und beschleunigter intrazellulärer CapG-Mobilität aufgezeigt und ein kausaler Zusammenhang zwischen CapG-Expression und -Verteilung auf der einen und Invasivität und Metastasierung auf der anderen Seite wahrscheinlich gemacht werden, so daß eine Differenzierung von Tumorzellen durch die Kinetikanalyse einzelner lebender Zellen möglich erscheint.

Abstract

The CapG protein, a Gelsolin related actin-binding protein, is overexpressed in breast cancer, especially in metastasizing breast cancer. The CapG protein is known to be involved in the control of motility of non-muscle cells. Its increased expression is described to trigger an increase in cell motility of benign cells. Thus it can be expected that in cancer cells, which overexpress the CapG protein, motility, invasiveness and metastasizing are especially promoted.

In this work it was achieved via fluorescence labeling of the CapG protein to visualize the dynamics of cellular processes as migration and invasiveness and to analyze the kinetics of the intracellular distribution of the CapG protein. Differences of the intracellular mobility of CapG between non-neoplastic and neoplastic breast epithelial cells could be demonstrated, correlations of increased tumor cell motility and accelerated intracellular CapG mobility revealed and a causal context of CapG expression and distribution on one hand and invasiveness and metastasizing on the other could be made probable, so that a differentiation of tumor cells applying kinetic analysis of single live cells seems to be possible.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	15
1.1	Untersuchungen an lebenden Zellen	15
2	CapG-Monographie	17
2.1	Molekulare Charakterisierung	18
2.2	Interaktion mit F-Aktin	18
2.3	Interaktion mit G-Aktin	19
2.4	Interaktion mit Phosphoinositiden	20
2.5	Posttranslationale Modifikationen	20
2.6	Expression in humanen Zelltypen und Geweben	21
2.7	Lokalisation im Zytoplasma der Zelle	21
2.8	Lokalisation im Zellkern der Zelle	22
2.9	Funktion im Zytoplasma der Zelle	23
2.9.1	Modelle Aktin-basierter Zellbewegung	24
2.9.2	Zusammenwirken verschiedener Aktin-bindender Proteine	26
2.9.3	Membransignalkaskaden und Aktinzytoskelett	26
2.10	Funktion im Zellkern der Zelle	27
2.11	Funktion in Tumorzellen	29
3	Methoden	31
3.1	Auswahl der Zelllinien und Zellkultur	31
3.2	Konstruierte Vektoren	32
3.3	Transfektionen	32
3.4	CapG-knockdown	33
3.5	Invasionsassay	33
3.6	Dekonvolution und dreidimensionale Rekonstruktion	33
3.7	Total Internal Fluorescence Reflection	34
3.8	Fluorescence Correlation Spectroscopy	36
3.8.1	Experimenteller Aufbau	38
3.8.2	Auswertung der Daten	41

Amplitude der ACF	42
Zerfallsform der ACF	44
3.8.3 Fehlerquellen	49
3.9 Fluorescence Recovery after Photobleaching	50
3.9.1 Experimenteller Aufbau	51
3.9.2 Auswertung der Bilderreihen	53
Kinetikparameter der Fluoreszenzäquilibration	54
3.9.3 Fehlerquellen	56
3.10 Vergleich FRAP und FCS	58
4 Ergebnisse	61
4.1 Lokalisation des CapG-Proteins in der lebenden Zelle	61
4.2 Funktionalität des CapG-eGFP in der lebenden Zelle	69
4.2.1 Invasivitätsstudien	69
CapG-knockdown	70
4.3 Dynamik zellulärer Prozesse lebender Zellen	73
4.3.1 Gesamtzelldynamik der Invasivität	73
4.3.2 Submembranäre Dynamik der Migration	76
4.4 Dynamik des CapG-Proteins in lebenden Zellen	81
4.4.1 Dynamik einzelner CapG-Proteine: FCS	82
Assoziationsgrad des CapG-eGFP in lebenden Zellen	94
4.4.2 Dynamik ganzer CapG-Populationen: FRAP	98
Vergleich der CapG-Mobilität in normalen und tumorösen Zellen	98
Mechanismen intrazellulärer CapG-Mobilität	105
5 Diskussion	114
A Materialliste	121
B Liste der verwendeten Primer	123
C alphabetisches Literaturverzeichnis	124

Abbildungsverzeichnis

2.1	immunhistochemische Darstellung des CapG-Proteins	22
2.2	NH_2 -terminale Aminosäuresequenzen Gelsolin-verwandter Proteine	23
3.1	Objektivmethode der TIRF-Mikroskopie	35
3.2	Schemazeichnung des konfokalen Strahlengangs	38
3.3	Prinzip der Lochblende	39
3.4	konfokales Detektionsvolumen	39
3.5	Prinzip des Punktscannens	40
3.6	Fluoreszenzfluktuationen und abgeleitete Autokorrelation . . .	43
3.7	schematische Herleitung der Autokorrelation	45
3.8	Beiträge fluoreszierender Spezies unterschiedlicher Dynamik zur Autokorrelationsfunktion	47
3.9	Triplettanteil an der Autokorrelation	49
3.10	schematische Darstellung einer FRAP-Kurve	54
4.1	Lokalisation des CapG-eGFP in lebenden nichtneoplastischen und neoplastischen Brustepithelzellen	62
4.2	CapG und Gelsolin in lebenden neoplastischen Brustepithelzellen	63
4.3	CapG und Aktin in lebenden neoplastischen Brustepithelzellen	64
4.4	immunhistochemische Darstellung von CapG und Aktin	65
4.5	CapG und Aktin in lebenden MDA-MB-231; Schichtaufnahmen	66
4.6	CapG und Aktin in lebenden MDA-MB-231; Detailaufnahmen	67
4.7	CapG und Aktin in lebenden MDA-MB-231; Detailaufnahmen	68
4.8	Invasionsassay: Vergleich nativer und CapG-eGFP stabil exprimierende MDA-MB-231	71
4.9	Rückgang der Fluoreszenz der MDA-MB-231 nach CapG-knock-down	71
4.10	Rückgang der Invasivität der MDA-MB-231 nach CapG-knock-down	72
4.11	Formwandel der MDA-MB-231 im Invasionsassay	73

4.12	Schemazeichnung des epithelial-mesenchymalen Übergangs . . .	74
4.13	dreidimensionale Rekonstruktion des Formwandels im Invasi- onsassay	75
4.14	Zeitverlauf des Formwandels im Invasionsassay	76
4.15	Schichtbilder des Formwandels im Invasionsassay	76
4.16	Vergleich von Epifluoreszenz- und TIRF-Aufnahmen	77
4.17	TIRF-Aufnahme CapG-eGFP exprimierender MDA-MB-231 . . .	78
4.18	Kolokalisation von CapG und Aktin bzw. Gelsolin in der TIRF- Mikroskopie	79
4.19	TIRF-Zeitrafferaufnahmen der Zellretraktion (CapG und Aktin)	80
4.20	TIRF-Zeitrafferaufnahmen der Chemotaxis (nur CapG)	81
4.21	Autokorrelation von <i>Alexa488</i> in wässriger Lösung	82
4.22	Residuen und χ^2 -Werte des eGFP-Fit	85
4.23	normierte Autokorrelationen von eGFP in Zytoplasma und Zellkern	86
4.24	Diffusionszeiten des eGFP mit einer und mit zwei nichtstrah- lenden Komponenten	88
4.25	Autokorrelation des CapG-eGFP in Zytoplasma und Zellkern .	89
4.26	normierte Autokorrelationen von eGFP und CapG-eGFP . . .	90
4.27	Fitresiduen und χ^2 -Werte der CapG-eGFP-Autokorrelation im Zytoplasma	91
4.28	Fitresiduen und χ^2 -Werte der CapG-eGFP-Autokorrelation im Zellkern	91
4.29	normierte Autokorrelationen von eGFP und CapG-eGFP bei 1 kW/cm^2	95
4.30	CP-Kurven des CapG-eGFP in Zytoplasma und Zellkern	96
4.31	Bilder vor und nach Bleichen des Zytoplasmas und Zellkerns .	97
4.32	Schichtaufnahmen nach Bleichen des Zellkerns	98
4.33	FRAP-Bilder nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepi- thelzellen	99
4.34	Recovery-Profile nichtneoplastischer und neoplastischer Brust- epithelzellen	101
4.35	Mittelwertkurven der recovery-Profile	102
4.36	Untergruppen nichtneoplastischer und neoplastischer Brust- epithelzellen	103
4.37	Verstärkungen gegen recovery-Rate	105
4.38	Hemmung der Fluoreszenzaufnahme im Zellkern durch meta- bolische Depletion	106
4.39	Östrogenstimulation des Zellkernimports der MDA-MB-231 . .	108
4.40	Recovery-Profile einzelner Zellen vor und nach Östrogenstimu- lation	108

4.41	Recovery-Profile einzelner Zellen vor und nach EGF-Applikation: Beispiele starker Stimulation	111
4.42	Recovery-Profile einzelner Zellen vor und nach EGF-Applikation: Beispiele schwacher Stimulation	111
4.43	Langzeitbeobachtung des recovery-Prozesses einzelner Zellen nach EGF-Applikation	113
4.44	Langzeitbeobachtung des recovery-Prozesses einzelner Zellen nach $E_2\beta$ -Applikation	113

Tabellenverzeichnis

2.1	Ergebnisse der Expressionsanalysen klinischer Tumorproben und entsprechender Normalgewebe	17
4.1	Literaturwerte des eGFP-Diffusionskoeffizienten in Zytoplasma und Zellkern	87
4.2	FCS-Daten der langsam diffundierenden Komponente des CapG-eGFP in Zytoplasma und Zellkern neoplastischer Brustepithelzellen	93
4.3	FRAP-Daten nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepithelzellen	100
4.4	FRAP-Daten der MCF-12A- und MDA-MB-231-Untergruppen	104

Kapitel 1

Einleitung und Zielsetzung

1.1 Untersuchungen an lebenden Zellen

Die vorliegende Arbeit stellt Untersuchungen an lebenden Zellen in den Mittelpunkt. Es handelt sich um normale und tumoröse Zellen, an denen die Dynamik zellulärer Vorgänge sichtbar gemacht und die Kinetik makromolekularer Abläufe analysiert wurde. Ziel der Untersuchungen war es, Mechanismen der Beweglichkeitssteigerung von Tumorzellen besser zu verstehen und Methoden zu erarbeiten, die eine Differenzierung von Tumorzellen hinsichtlich ihrer Invasivität und letztlich ihrer Metastasierungsfähigkeit ermöglichen.

In der auf Seite 74 gezeigten Modifikation eines Invasionsassays wird die Verformung einer Zelle bei der Passage einer 8 μm großen Basalmembranpore sichtbar gemacht. Ein grundlegender Mechanismus dieser Verformung als Voraussetzung für Invasivität und Metastasierung ist die Modulierung des Zellskeletts, vor allem des Aktingerüsts. Für die Modulierung des Aktingerüsts verantwortlich sind die sogenannten Aktin-bindenden Proteine. Ein Aktin-bindendes Protein, das CapG-Protein, wird in Mammakarzinomen und insbesondere in metastasierenden Mammakarzinomen überexprimiert.

Als Modellsystem der hier beschriebenen Untersuchungen dienten eine hochinvasive, metastasierende Mammakarzinomzelllinie, die CapG besonders stark exprimiert, die MDA-MB-231, und eine nichtneoplastische, dem normalen Brustepithel ähnliche Zelllinie, die normale Expressionslevel von CapG zeigt, die MCF-12A. So sollte versucht werden, neben dem unterschiedlichen Expressionslevel unterschiedliche Dynamiken zellulärer Prozesse und unterschiedliche Kinetiken makromolekularer Abläufe festzumachen.

Kapitel 2

CapG-Monographie

Im Rahmen des Deutschen Humanen Genomprojekts veröffentlichte das „Gynecological Cancer Consortium“ 29 Gene, die in Mamma- und Ovarialkarzinomen höher bzw. niedriger exprimiert sind als in entsprechendem Normalgewebe. Das bioinformatische Screening von mRNA-Datenbanken des NIH und der Firma Incyte wurde durch die Laboranalyse der cDNA- (Cancer Profiling Array, CPA) und mRNA-Level (RT-PCR) tatsächlicher klinischer Tumorproben und entsprechender Normalgewebe bestätigt.

Die Daten der CapG-Analyse invasiv duktaler Mammakarzinome sind folgende:

	CPA ($n = 50$)	RT-PCR ($n = 24$)
MammaCa	31% ↑	54% ↑

Tabelle 2.1: Ergebnisse der Expressionsanalysen klinischer Tumorproben und entsprechender Normalgewebe [1]

Das Protein wurde als überexprimiert (↑) bezeichnet, wenn mindestens 20% des Tumorgewebes das Protein doppelt so stark exprimieren wie das entsprechende Normalgewebe [1]. Insbesondere in metastasierenden Mammakarzinomen scheint das CapG-Protein überexprimiert zu sein (Niederacher, unpublizierte Daten).

Das CapG-Protein wird zu der Gelsolinfamilie der Aktin-bindenden Proteine gezählt. Es wurde auch als MCP, macrophage capping protein, als mbh-1, myc-basic-motif-homolog-1, und gCap39 bezeichnet. Im folgenden soll zunächst zusammengefaßt werden, was über den molekularen Aufbau des CapG-Proteins, seine physiko-chemischen Eigenschaften und die Lokalisation, Funktion und Interaktionspartner in der Zelle bekannt ist.

2.1 Molekulare Charakterisierung

Das CapG-Protein wurde als macrophage capping protein 1986 erstmals aus dem Zytoplasma von Kaninchenalveolarmakrophagen isoliert [2]. Hier liegt es in hoher Konzentration vor; es macht etwa 1,6 - 1,8% des gesamten zytoplasmatischen Proteins aus.

Aus der elektrophoretischen Wanderung im SDS-Polyacrylamidgel wurde das Molekulargewicht auf etwa 41 kDa geschätzt; die später durchgeführte Sequenzierung ermöglichte eine genauere Vorhersage des MW auf 38386 Da [3]. Ergebnisse von Gelfiltration und elektrophoretischer Wanderung des Kaninchenmakrophagenlysats [2], von Immunopräzipitation des Mausfibroblastenlysats [4] und analytischer Ultrazentrifugation des rekombinanten Proteins [5] sind mit einem monomeren Zustand des Proteins vereinbar. Der ermittelte Stokes-Radius des Proteins beträgt 3,0 nm [2].

1992 wurde das humane CapG sequenziert, der open reading frame ergibt 348 Aminosäuren [3]. Das CAPG-Gen ist auf dem proximalen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert [6]. Es scheint hoch konserviert zu sein [7]. Der Sequenzvergleich mit den anderen Mitgliedern der Gelsolinfamilie zeigt einen ähnlichen Aufbau sich wiederholender Subdomänen. Es handelt sich um 30 - 50 [4] bzw. wie an anderer Stelle angegeben 125 - 150 [8] Aminosäuren lange, etwa 12 kDa große homologe Sequenzwiederholungen. Das namensgebende Protein Gelsolin besteht aus sechs solcher Wiederholungen, das CapG-Protein selbst nur aus drei. Die Sequenz des CapG zeigt eine 49%-ige Identität mit der NH_2 -terminalen Hälfte des Gelsolin [7].

Eine kristallographische Charakterisierung des nativen CapG-Proteins gibt es nicht; allein die Kristallographie einer CapG-Mutante, des CapG-sev, ist bisher gelungen [5]. Sie bestätigte den Aufbau aus drei homologen Domänen: S1 - S3.

2.2 Interaktion mit F-Aktin

Die Interaktion mit filamentärem Aktin wurde in vitro im Pyrenyl- (bzw. Prodan-) Aktin-Fluoreszenzassay intensiv untersucht.

G-Aktin wird hierbei mit Pyren (bzw. Prodan) am Cys 374 markiert. Polymerisiertes markiertes Aktin fluoresziert stärker als depolymerisiertes markiertes Aktin. Bei verschiedenen Konzentrationsverhältnissen von G- zu F-Aktin und unterschiedlichen Pufferbedingungen kann die Dynamik der Aktinpolymerisation und -depolymerisation und das Verhalten von F-Aktin im steady state an der Fluoreszenzzu- bzw. -abnahme beobachtet werden. Es zeigte sich, daß das CapG-Protein sowohl die Aktinpolymerisation als auch

die Aktindepolymerisation verlangsamt und bei Untersuchungen von F-Aktin im steady state den G-Aktinpool und vermutlich auch den Anteil kurzer Aktinoligomere erhöht [2].

Diese Beobachtungen werden funktionell so gedeutet, daß das CapG-Protein wie das Gelsolin den Aktinfilamenten an den schnell wachsenden Plusenden (sog. barbed ends) eine Proteinkappe aufsetzt und so die Aktinfilamente vor weiterer Polymerisation bzw. Depolymerisation bewahrt. Von diesem Phänomen leitet sich auch der Name des CapG-Proteins ab: den Aktinfilamenten eine Kappe (**cap**) aufsetzen wie **G**elsolin [6].

Anders als Gelsolin schneidet das CapG-Protein die Filamente nicht: Die Depolymerisation des F-Aktin wird durch CapG verlangsamt, durch Gelsolin aber beschleunigt; der Schneide-Assay nach Walsh bestätigte dies unterschiedliche Verhalten von Gelsolin und CapG [2]. Inzwischen sind die Aminosäuren identifiziert, die es dem Gelsolin ermöglichen, Aktinfilamente zu schneiden, die aber dem CapG fehlen [4].

Die Affinität des CapG-Proteins zu den Plusenden der Aktinfilamente ist geringer als die des Gelsolin. Die Dissoziationskonstante des CapG liegt im Bereich nanomolarer Konzentrationen (K_D etwa 50 - 100 nM), die K_D des Gelsolin hingegen im Bereich pikomolarer Konzentrationen [2].

Das CapG-Protein wird wie Gelsolin durch mikromolare Ca^{2+} -Konzentrationen aktiviert und - anders als Gelsolin - durch das Absinken der Ca^{2+} -Konzentration in den nanomolaren Bereich wieder inaktiviert [2]. Das Protein besitzt zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen unterschiedlicher Affinität [9]. Die entscheidende, höher affine Bindestelle befindet sich in der S1-Domäne und ist einem Ca^{2+} -Ion gut zugänglich. Durch die Ca^{2+} -Bindung entfaltet sich die inaktive, globuläre Konformation des CapG-Proteins: Die S1-Domäne faltet sich von den eng verbundenen Domänen S2 und S3 ab, Aktinbindungsstellen werden offengelegt. Das Gelsolin hingegen bildet mit Aktin eine intermolekulare Bindungsstelle, in der das Ca^{2+} -Ion wie gefangen ist. Diese im Vergleich zu Gelsolin relativ lockere Ca^{2+} -Bindung des CapG-Proteins mag die molekulare Grundlage der raschen Reversibilität der Ca^{2+} -getriggerten CapG - F-Aktinbindung sein.

2.3 Interaktion mit G-Aktin

Das CapG-Protein bindet Ca^{2+} -abhängig auch globuläres Aktin. Die Angaben zur Dissoziationskonstanten schwanken zwischen 25 nM und 250 nM, die K_D liegt also ungefähr in demselben Konzentrationsbereich wie die K_D der F-Aktinbindung. Die Stöchiometrie der Bindungsreaktion wird mit 1:1 angegeben [9, 10]. Doch erscheint es nach Mutationsanalysen möglich, daß

das CapG-Protein mehrere G-Aktinbindungsstellen unterschiedlicher Affinität besitzt [5]. In Kompetitionsuntersuchungen verdrängt die GS 1-Domäne des Gelsolin das CapG aus seiner G-Aktinbindung. Diese beiden Proteine binden also unterschiedlich stark an dieselbe Subdomäne des G-Aktin [10].

Von der kristallographischen Struktur der CapG-Mutante CapG-sev ausgehend wurde die CapG - G-Aktinbindung simuliert [5].

2.4 Interaktion mit Phosphoinositiden

Ein weiterer Mechanismus der Inaktivierung und Dissoziation des CapG-Proteins aus der Aktinbindung ist die Anlagerung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2)-Molekülen an das CapG-Protein. Eine Bindestelle bindet zwei PIP_2 -Moleküle. Die Bindung von PIP_2 ist wohl spezifisch, andere Phosphoinositide inaktivieren CapG nicht. Das CapG-Protein dissoziiert auch dann von F-Aktin, wenn die Ca^{2+} -Konzentration unverändert hoch ist. Um eine solche Dissoziation zu erreichen, ist allerdings ein molares Verhältnis von PIP_2 zu CapG von 29:1 erforderlich (die nötige Menge PIP_2 , um Gelsolin zu inaktivieren, ist noch größer). Steigt jedoch gleichzeitig die Ca^{2+} -Konzentration, erhöht sich die Affinität des CapG zum PIP_2 um das Vierfache (K_D etwa 8,4 versus 32 μ M mit und ohne Ca^{2+}) [7].

2.5 Posttranslationale Modifikationen

Schon in einer der ersten Untersuchungen zum CapG-Protein wurden eine O- und eine N-Glykosylierung des Proteins ausgeschlossen [3].

Doch scheint das CapG-Protein unterschiedlich stark an verschiedenen Aminosäureresten phosphoryliert zu werden. In der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigten sich neben dem Hauptspot mit dem Isoelektrischen Punkt 6.7, zwei kleinere, stärker azide Spots mit einem IP von 6.5, die etwa 25% des gesamten CapG-Proteins in Mausmakrophagen ausmachen und die unter Phosphatasebehandlung verschwinden. Bei der Fraktionierung des CapG-Proteins aus benignen Nierenzellen des Hundes ergab sich, daß 37% des CapG im Zellkern und 0% in der löslichen zytoplasmatischen Fraktion phosphoryliert sind. Damit korreliert die Phosphorylierung des Proteins offenbar mit einer bevorzugten Kompartimentierung im Zellkern. Die Inkubation mit einem Phosphataseinhibitor (okadaic acid) zeitigte zwar eine verstärkte Phosphorylierung, aber keine verstärkte Lokalisation im Zellkern, vielmehr nahm die phosphorylierte Fraktion des CapG gleichmäßig in Zellkern und Zytoplasma zu [11].

Andere In-vitro-Experimente legen eine membranassoziierte Nicht-Rezeptor-Kinase ($pp^{60c-src}$) als eine mögliche Verantwortliche der Phosphorylierung des CapG nahe [12].

2.6 Expression in humanen Zelltypen und Geweben

Das CapG-Protein wird zwar ubiquitär exprimiert, der Grad der Expression ist aber in den verschiedenen Zelltypen und Geweben nicht einheitlich. So ist beispielsweise gemäß einer neueren Northern-Analyse der mRNA-Level des CapG in Magen-, Lungen- und Nierengewebe höher als in den anderen untersuchten Geweben [13].

Die höchste bisher beschriebene Konzentration findet sich in Makrophagen und in dendritischen Zellen, wo das CapG-Protein etwa 1,6 - 1,8% des Gesamtproteins im Zytoplasma ausmacht [2] und damit in 12-fachem molaren Überschuß zu Gelsolin vorliegt [14]. In neutrophilen Granulozyten stellt das CapG-Protein etwa 0,5% des zytoplasmatischen Gesamtproteins [15] und in Fibroblasten - hier ist es zu Gelsolin in etwa äquimolar - nur ungefähr 0,04% [14]. In Thrombozyten, in denen die Gelsolinspiegel sehr hoch sind, fehlt das CapG-Protein ganz [16].

Die CapG-Konzentration in Makrophagen wird auf 12 - 13 μM geschätzt. Die Konzentration des F-Aktin ist in ruhenden Makrophagen $\sim 0,28 \mu\text{M}$ und in aktivierten $\sim 0,66 \mu\text{M}$. Legt man einen basalen Ca^{2+} -Spiegel von etwa 400 nM zugrunde, sind nahezu 20% des CapG-Proteins, also 2,4 μM in der Lage, den Plusenden der Aktinfilamente eine Kappe aufzusetzen: Das sind 5 - 10 mal mehr CapG-Moleküle als nötig wären, das tatsächlich vorhandene filamentäre Aktin mit Proteinkappen zu versehen [9].

2.7 Lokalisation im Zytoplasma der Zelle

Die indirekte Immunfluoreszenz zeigt das CapG-Protein in murinen und in humanen Fibroblasten diffus zytoplasmatisch und nukleär lokalisiert [4]. Es wird berichtet, daß die Verteilung und Kompartimentierung des CapG-eGFP-Fusionsproteins in fixierten humanen embryonalen Nierenzellen und in fixierten Nierenzellen des Hundes mit der Verteilung des endogenen Proteins, die die Immunfluoreszenzfärbung wiedergibt, identisch ist [8].

Gelsolin hingegen ist nicht im Zellkern lokalisiert, und die Verteilung im Zytoplasma wird als diffus und leicht filamentös geschildert, so daß man auch im mikroskopischen Bild eine Assoziation zu F-Aktin ahnen kann [4].

Die biochemische Fraktionierung des CapG in der Zelle bestätigt die beschriebene Verteilung des Proteins: In Mausfibroblasten sind 12 - 22% des gesamten CapG-Proteins im Zellkern [11] lokalisiert, in Endothelzellen 37% [17].

Die Untersuchung der Endothelzellen schlüsselt die weiteren Fraktionen des CapG wie folgt auf: 18% sind löslich im Zytoplasma, 16% sind an das Aktinzytoskelett, 28% an Membranen assoziiert. Auch in Mausfibroblasten, so wird berichtet, ohne genauere Daten zu nennen, sei das Protein vor allem im Zellkern und membranassoziiert zu finden [17].

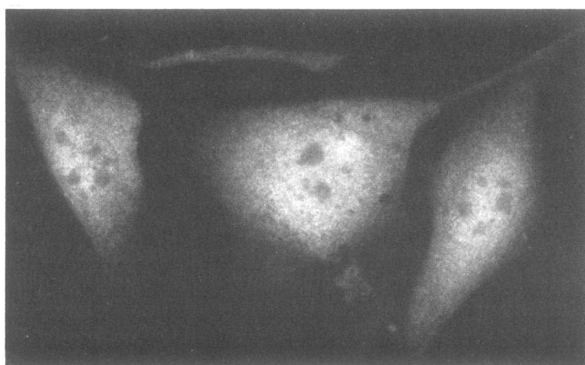


Abbildung 2.1: immunhistochemische Darstellung des CapG-Proteins in Mausfibroblasten [4]: Es ist nukleär und diffus zytoplasmatisch lokalisiert.

2.8 Lokalisation im Zellkern der Zelle

Das CapG-Protein weist kein typisches nuclear localization signal (NLS) auf [18], vielmehr sind wohl mehrere Regionen unterschiedlicher Subdomänen für den Zellkernimport des Proteins verantwortlich [19]. So werden einige positive Aminosäuren in der PIP_2 -Bindungsregion [18] bzw. die Aminosäuren 134 - 147 [4] als mögliche Entsprechungen des klassischen NLS vorgeschlagen.

Energie in Form von GTP und ATP und weitere zytoplasmatische Substanzen wie vor allem das Transportprotein Importin- β sind offenbar für den Zellkernimport des CapG-Proteins unabdingbar [18].

Eine nukleäre Exportsequenz, insbesondere die entscheidenden Leucine, $Leu^{17/21/27}$, die anderen Proteinen der Gelsolinfamilie eigen sind, fehlen dem CapG-Protein. So kann es als einziges Protein dieser Familie im Zellkern akkumulieren. Die Fluoreszenzintensität des CapG-eGFP in Nierenzellen des

Hundes, humanen embryonalen Nierenzellen und in Mausfibroblasten ist im Zellkern etwa 1,4-fach stärker als im Zytoplasma, woraus man bezogen auf Zellkern- und Zytoplasmavolumen eine Akkumulation des Proteins im Zellkern ableiten kann [8].

		10		20		30
FragminP	1-MQKQKEYN	IADSN	IANI	GTET	LEKKVK	LEAS
Severin	1-MIKNRKLD	ITSTNVAG	IGTD	LDDKKCR	LDAA	
CapG	1-					MYTAIP
				L17	L21	L27

Abbildung 2.2: Vergleich der NH₂-terminalen Aminosäuresequenzen Aktinbindender Proteine der Gelsolinfamilie [8]: Für den nukleären Export wichtige Leucine (*Leu*^{17/21/27}) fehlen dem CapG.

2.9 Funktion im Zytoplasma der Zelle

Die Funktion des CapG-Proteins im Zytoplasma scheint gut bekannt zu sein: Es blockiert dort, reguliert durch die intrazelluläre Ca^{2+} - und PIP_2 -Konzentration, die schnell wachsenden Enden der Aktinfilamente („capping“) und ist so an der Kontrolle der Aktin-vermittelten Zellmobilität und Membranbeweglichkeit (Phagozytose und „ruffling“) nichtmuskulärer Zellen beteiligt [20]. Einige Autoren sprechen gar von der etablierten Rolle des CapG-Proteins bei der physiologischen Mobilität benigner Zellen [21]. Diese Aussagen stützen sich auf knockout- und Überexpressionsstudien.

Besonders Makrophagen, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen von Mäusen, deren CAPG-Gen ausgeschaltet wurde, sind in ihrem Verhalten verändert:

- Bei Makrophagen ist die sog. Membrankräuselung, das „ruffling“, vermindert. Dies wird insbesondere bei der Stimulation mit M-CSF auffällig, die normalerweise die Membrankräuselung verstärkt. Die Phagozytose der Freßzellen ist reduziert, die IgG-vermittelte stärker als die Komplement-medierte. Auch die chemisch induzierten Vesikel, das „vesicle rocketing“, die angetrieben von polymerisierendem Aktin durch das Zytoplasma flottieren, sind langsamer und die Aktinraketen kürzer oder nicht vorhanden [16].

- Die Phagozytosefähigkeit der neutrophilen Granulozyten ist erregerabhängig beeinträchtigt: Bei Listerien ist sie um die Hälfte reduziert, bei Salmonellen bleibt sie hingegen unverändert. Die Polarisierung der Zelle als Ausrichtung auf einen chemotaktischen Reiz ist abgeschwächt und die Durchschnittsgeschwindigkeit der ausgelösten gerichteten Bewegung um die Hälfte herabgesetzt.
- Auch in dendritischen Zellen sind weniger Membrankräuselungen zu beobachten; auch hier wird dies besonders deutlich bei Stimulation der Zellen mit GM-CSF. Die gerichtete Motilität ist vermindert [15].

Die gerichtete Bewegung CapG stabil überexprimierender Mausfibroblastenklone ist gegenüber dem Wildtyp in Chemotaxis- und Wundheilungsassays gesteigert. Je stärker das CapG exprimiert wird, umso deutlicher nimmt die gerichtete Bewegung zu. Es wurden Fibroblastenklone untersucht, die das CapG-Protein 1,3 - 1,8-fach überexprimierten. Die ungerichtete Beweglichkeit hingegen bleibt unverändert. Bei Stimulation mit PDGF entstehen in den überexprimierenden Zellen mehr dorsale Kräuselungen, die IP_3 - und Ca^{2+} -Konzentrationen im Zytoplasma sind erhöht [22].

Die transiente Überexpression des CapG-Proteins in bovinen Endothelzellen zeitigt ebenfalls eine verstärkte Migrationsfähigkeit [17].

Auch die Überexpression des CapG-eGFP-Fusionsproteins triggert eine verstärkte Motilität. Ein Zuwachs der Motilität wurde beobachtet bei Nierenzellen des Hundes, die CapG-eGFP stabil exprimierten (Expressionsgrad von CapG-eGFP im Verhältnis zum endogenem CapG etwa 0,77 - 1,2), und bei humanen embryonalen Nierenzellen, die das Fusionsprotein transient exprimierten. Die genannten Zellen wanderten in einer Kollagen-I-Suspension und in Hühnerherzfragmenten weiter als nichttransfizierte Zellen [18].

Die hier beschriebenen Studien deuten also auf einen Zusammenhang zwischen dem Expressionsgrad des CapG-Proteins und dem Ausmaß der Bewegungsfähigkeit benigner Zellen. Je mehr CapG in der Zelle exprimiert wird, desto größer scheint die Beweglichkeit einer benignen Zelle, und je weniger exprimiert wird, desto stärker ist sie eingeschränkt.

2.9.1 Modelle Aktin-basierter Zellbewegung

Das im Zellkortex unmittelbar unter der Plasmamembran gelegene Aktinnetzwerk ist für das Vorstülpen der Plasmamembran und damit für die Bewegung einer Zelle von wesentlicher Bedeutung. Die regulierte Polymerisation dieses Aktinnetzes drückt die Plasmamembran nach außen. Über die Rolle des hydrostatischen bzw. osmotischen Drucks, der durch die Acto-Myosin

bedingte Retraktion des Zellendes im führenden Zellteil entsteht und der Protrusionen der Zelle begünstigt, ist noch wenig bekannt.

Es gibt verschiedene Modelle, die diese Aktin-basierten Protrusionen als Voraussetzung für die Zellbewegung nichtmuskulärer Zellen beschreiben:

Blattähnliche flache Zytoplasmaausziehungen, Lamellipodien genannt, bilden die Grundlage des einen Modells. Sie besitzen ein orthogonal vernetztes Aktinmaschenwerk, das weitgehend parallel zum Untergrund ausgerichtet ist. Die Polymerisation neuer Aktinfilamente, die seitlich aus vorbestehenden Filamenten abzweigen, wird durch die Arp2/3-Komplexe begünstigt [23]. Wichtig ist, daß diese verzweigten Aktinfilamente unmittelbar nach ihrem Entstehen mit einer Kappe versehen werden, ihre weitere Polymerisation so verhindert wird und stattdessen neue, kurze Aktinfilamente aus vorbestehenden seitlich hervorsprossen, damit das fein verzweigte Aktinnetzwerk aus kurzen Aktinfilamenten gewissermaßen auf breiter Front wächst und so die treibende Kraft für das Verschieben der Zelle bildet. Lamellipodien bilden die Grundlage der Bewegung von Fischkeratinozyten.

Spitze fadenförmige Ausziehungen der Plasmamembran, Filopodien, sind die Basis eines anderen Modells. Sie bestehen aus einem Kern langer, gebündelter Aktinfilamente. Diese entstehen aus dem vorbestehenden Aktinnetzwerk, wenn einzelne Filamente gegen die beschriebenen Zyklen von Polymerisationshemmung und seitlichem Aussprossen geschützt werden, sich verlängern können und zu größeren Aktinfilamentbündeln zusammengefaßt werden. Dies kann beispielsweise geschehen, wenn bei der Stimulation durch Agonisten lokal die PIP_2 -Konzentration steigt, das CapG von den Plusenden der Aktinfilamente dissoziiert und so die rasche Polymerisation der Aktinfilamente erlaubt. Filopodien bilden die Grundlage der Bewegung dendritischer Zellen.

Über Pseudopodien, stoppelige, mit einem Gel aus Aktinfilamenten gefüllte Gebilde, ist wenig bekannt [24, 25].

In den beiden hier näher beschriebenen Modellen ist die Anzahl freier Plusenden, die Startpunkte weiterer Aktinpolymerisation sind, von zentraler Bedeutung: Sie können neu gebildet werden, sei es durch Arp2/3 aus verzweigten Aktinstrukturen oder durch Formine aus unverzweigten. Sie können durch Zerschneiden vorbestehender Filamente entstehen oder auch durch das aktive Entfernen von „capping“-Proteinen freigelegt werden [26].

2.9.2 Zusammenwirken verschiedener Aktin-bindender Proteine

Es gibt wohl eine ganze Reihe von Proteinen in ein- und demselben Zelltyp, die in der Lage sind, sich den Plusenden der Aktinfilamente als Proteinkappen aufzusetzen. Neben CapG und Gelsolin sind bisher das capping protein (CP) und das CapZ bekannt. Das CP hat eine besonders hohe Affinität zu den „barbed ends“ des F-Aktin ($K_D = 0,1 - 1,0$ nM) und reichert sich besonders in Lamellipodien an. CapZ ist ein Heterodimer, dessen Aktinaffinität nicht durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration variiert wird. Beide Proteine sind nicht mit dem CapG verwandt. Durch unterschiedlichen Expressionsgrad, unterschiedliche lokale Konzentration, Regulation und Affinität zu Aktin dienen die verschiedenen „capping“-Proteine offenbar der Feinregulation des Aktinzytoskeletts.

Andere Aktin-bindende Proteine nehmen durchaus Einfluß auf die Funktion der „capping“-Proteine. So kann das CapG durch einige Proteine dieser großen Gruppe aus seiner Aktinbindung verdrängt werden: Ena/VASP-Proteine und hohe Konzentrationen von Profilin haben beispielsweise solch eine „anticapping“-Funktion. Profilin nutzt die ungeschützten Plusenden der Aktinfilamente, um deren Depolymerisation zu beschleunigen [27]; das VASP-Protein hingegen fördert die Polymerisation der Aktinfilamente [28]. Die verschiedenen Proteine mit „anticapping“-Funktion regulieren die „capping“-Proteine auf unterschiedliche Weise: So inhibiert VASP CapG, Gelsolin und CP, vermutlich indem es durch Assoziation an die Aktinfilamente die Plusenden vor den Proteinkappen schützt. CARMIL hingegen antagonisiert CapG und Gelsolin nicht, wohl aber CP, wahrscheinlich indem es das CP selbst bindet [26].

Insgesamt erscheint das Zusammenspiel der verschiedenen Aktin-bindenden Proteine sehr komplex. Nur wenig ist bisher bekannt.

2.9.3 Membransignalkaskaden und Aktinzytoskelett

Das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) macht etwa 1% der Plasmamembranlipide aus. In Endothelzellen sind ca. 28% des CapG-Proteins membranassoziiert [17]. Die Affinität des CapG-Proteins zu PIP_2 könnte die molekulare Entsprechung dieser Membranbindung sein [29].

Darüberhinaus beeinflusst die Assoziation des CapG-Proteins an PIP_2 offenbar den Phosphoinositidstoffwechsel. Isoformen der Phospholipase C (PLC) hydrolysieren PIP_2 zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG): Durch IP_3 wird Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt, es werden wie auch durch DAG weitere Signalkaskaden angestoßen. Diese

Isoformen der Phospholipase C können durch Substratbindung vom CapG differenziert moduliert und die Zellantwort auf die Stimulation unterschiedlicher Agonisten kann so fein gestuft variiert werden. Beispielsweise wird die PDGF-Wirkung vermittelt durch die $PLC\gamma$ verstärkt [22, 30], wohingegen die Bradykininwirkung, die die $PLC\beta$ mediiert, abgeschwächt wird [30], - jeweils gemessen anhand der zytoplasmatischen IP_3 - und Ca^{2+} -Spiegel.

Auch vorgeschaltete Kinasen wie die PI_3-K , die Phosphoinositide phosphorylieren, also z.B. PIP_2 zu PIP_3 , werden in ihrer Aktivität durch Ca^{2+} -abhängige Substratsequestration moduliert [31], d.h. CapG bindet PIP_2 und entzieht es damit der enzymatischen Reaktion. Daß auf der anderen Seite die Affinität des CapG-Proteins zu Aktin sinkt, wenn es PIP_2 gebunden hat, daß hier also auch die Phosphoinositide durchaus die Dynamik des Aktinzytoskeletts modifizieren, wurde bereits weiter oben referiert (s. 2.4).

Insgesamt scheint dieses Zusammenspiel von CapG und PIP_2 ein Beispiel zu sein für die Verbindung und gegenseitige Beeinflussung von extrazellulären Signalen und Aktinzytoskelett. Dies könnte speziell bei der gerichteten Bewegung, der Chemotaxis, von Bedeutung sein. Auf einen chemotaktischen Reiz hin wird eine starke Polarisation des PIP_2 , des PIP_3 und der PI_3-K im Zytoplasma beschrieben [32], es kommt zu einer Akkumulation an der sich vorschiebenden Zellfront. Die lokalen Konzentrationsunterschiede der genannten Substanzen könnten Aktinzytoskelett und Signalkaskaden in den verschiedenen Zytoplasmabereichen einer Zelle differenziert variieren.

2.10 Funktion im Zellkern der Zelle

Die Funktion, die das CapG-Protein im Zellkern wahrnimmt, ist unbekannt. Es gibt wenige experimentelle Daten und einige Hypothesen dazu.

Die Sequenz des CapG-Proteins weist Übereinstimmungen mit Sequenzen einer Gruppe DNA-bindender Proteine auf, der „basic helix-loop-helix“-Familie. Dazu gehört auch das c-myc-Onkogen. Die Suche nach potentiellen Interaktionspartnern für dieses myc-Onkogen mit einem degenerierten Primer ergab 1991 die cDNA des CapG, daher wurde es damals myc-basic-motif-homolog-1, mbh-1, genannt [4]. Der Beweis, daß CapG tatsächlich an die DNA bindet, konnte bisher nicht erbracht werden. Im Gal4-Reporter-Assay wurde eine Transaktivierungsaktivität des CapG-Proteins ausgeschlossen, wohingegen das Protein in demselben Assay die durch VP16 induzierte Transaktivierung unterdrückt [18].

Viele Studien brachten den Nachweis, daß Kern-Aktin mit drei Kernkomplexen assoziiert, die in die Genexpression involviert sind: mit Chromatinremodeling-Komplexen [33, 34, 35], mit Ribonukleoproteinen [36, 37] und den

drei RNA-Polymerasen [38, 39, 40]. Das CapG-Protein könnte als nukleäres Aktin-bindendes Protein wichtig sein, die Polymerisation des Kern-Aktins zu verhindern und es in globulärer oder kurzer, oligomerer Form zu halten. So hätte CapG indirekten Einfluß auf die Regulation der Genexpression.

Es wurde beschrieben, daß im Zellkern lokalisiertes phosphoryliertes CapG die nukleäre PI_3 -Kinase in Ratten- und Mausfibroblasten durch Substratsequestration, also durch PIP_2 -Bindung hemmt. Die PI_3 -Kinase phosphoryliert PIP_2 , PIP und $PtdIns$ und generiert so mögliche second messenger, die indirekt oder direkt die DNA-Synthese regulieren [31].

Auch eine Interaktion mit Steroidrezeptoren ist möglich [19]. Für CapG selbst ist bisher solch eine Interaktion nicht bekannt, aber für einige andere Proteine aus der Gruppe der Gelsolin-verwandten Aktin-bindenden Proteine: Gelsolin selbst beispielsweise moduliert die Transkriptionsaktivität von $PPAR-\gamma$ und bei Stimulation mit dem entsprechenden Liganden auch die des Glukokortikoid- und des Androgenrezeptors [41]. Supervillin assoziiert mit dem Androgenrezeptor und verstärkt dessen Transkriptionsaktivität. Es wird berichtet, Monomere des β -Aktin förderten diesen Effekt [42, 43]. Flightless I, ein Vertreter der Gelsolinfamilie, der zunächst in *Drosophila* entdeckt wurde, ist Teil des Ko-Aktivator Komplexes des Östrogen- und des Thyroidrezeptors. Außerdem bindet es an Chromatin-remodeling-Komplexe und könnte so diese Komplexe an DNA-Regionen proximal der Steroidrezeptor gebundenen rekrutieren und damit die Aktivität dieser Rezeptoren unterstützen [44].

Ohne Genaueres über die Interaktionspartner des CapG-Proteins im Zellkern oder dessen Funktion dort zu wissen, deutet sich doch nach neueren Untersuchungen an, daß gerade der Anteil des CapG-Proteins, der im Zellkern lokalisiert ist, für die Beweglichkeit bzw. für die Zunahme der Beweglichkeit einer gutartigen Zelle wichtig ist:

- Scherkräften ausgesetzte Endothelzellen zeigen eine gesteigerte Migrationsfähigkeit und exprimieren vermehrt CapG: Das Aktin-assoziierte CapG im Zytoplasma verdoppelt sich innerhalb von 2 Stunden, wohingegen sich das im Zellkern lokalisierte CapG vervierfacht, allerdings erst innerhalb von 24 Stunden [17].
- Die induzierte Überexpression des CapG-eGFP-Fusionsproteins in Zytoplasma und Zellkern führt in Nierenzellen des Hundes und in humanen embryonalen Nierenzellen zu verstärkter Motilität. Die Überexpression des Proteins allein im Zytoplasma - durch Anhängen einer nukleären Exportsequenz - ändert dahingegen die Motilität dieser Zellen nicht. Die transiente Kotransfektion humaner embryonaler Nierenzellen mit CapG und dominant negativen Mutanten verschiedener

upstream-Effektoren und die Behandlung mit entsprechenden Inhibitoren eröffneten, daß die CapG getriggerte verstärkte Motilität RhoA, Cdc 42, Ras, die PI_3 -Kinase und auch die MAP-Kinase benötigen könnte und daß die eventuell transkriptionregulierende Funktion des CapG-Proteins möglicherweise durch die MAP- und die PI_3 -Kinase kontrolliert wird. Tatsächliche Interaktionspartner des CapG im Zellkern konnten jedoch nicht identifiziert werden [18].

2.11 Funktion in Tumorzellen

Neben diesen Befunden, daß das CapG an der Kontrolle der Zellmobilität gutartiger Zellen beteiligt ist und speziell der Zellkernanteil des CapG für den Zugewinn an Migrationsfähigkeit dieser Zelltypen verantwortlich zu scheit, mehren sich die Hinweise, daß dem CapG-Protein auch in verschiedenen Karzinomentitäten entscheidende Bedeutung zukommt: Es scheint in karzinomatösen Geweben eine Motilität, Invasivität und Metastasierung fördernde Wirkung zu haben. Im Rahmen der angeführten Untersuchungen des „Gynecological Cancer Consortium“ wurde auch eine Überexpression des CapG-Proteins in serösen und muzinösen Ovarialkarzinomen beschrieben [1].

Auch in Pankreaskarzinomen wird von einer Überexpression des Proteins berichtet. Bei dieser Tumorentität korreliert die Intensität der immunhistochemischen Färbung des CapG-Proteins im Zellkern wohl mit der Tumorgroße. Weitere Korrelationen zwischen immunhistochemischer CapG-Färbung und etablierten prognostischen Parametern wie Tumorgrading, Nodalstatus und Invasion der Gefäße und Nervenscheiden wurden nicht gefunden. Da allerdings alle Patienten von fortgeschrittenen, bereits disseminierten Stadien betroffen waren, ist es schwer, einen möglichen Beitrag des CapG-Proteins zu frühen Stufen der Invasivität aus dieser Studie abzuleiten. Der experimentelle knockdown des CapG-Proteins verminderte die Motilität verschiedener Pankreaskarzinomzelllinien [21].

Es gibt Berichte, das CapG-Protein werde auch in okulären Melanomen [45] und in Glioblastomen [46] überexprimiert.

Transfektionen einer humanen Fibrosarkomzelllinie mit dominant negativen AP-1-Konstrukten zeitigte eine verminderte Expression von CapG und Gelsolin und reduzierte die gerichtete Bewegung, die Chemo- und Haptotaxis, dieser Zellen [47].

Von einigen Lungen- und Magenkarzinomzelllinien und einer Melanomzelllinie wurde allerdings berichtet, sie würden im Gegensatz zum entsprechenden Normalgewebe kein CapG-Protein mehr exprimieren [13].

Der angenommene allgemeine Zusammenhang zwischen CapG-Expression und Motilität benigner Zellen und eventuell Invasivität und Metastasierungsfähigkeit maligner Zellen wie auch im speziellen die Tatsache, daß das CapG-Protein in Mammakarzinomen überexprimiert wird, waren Anlaß und Ausgangspunkt der hier vorgestellten Arbeit.

Kapitel 3

Methoden

3.1 Auswahl der Zelllinien und Zellkultur

Als zelluläres Modellsystem der Kinetikanalyse des CapG-eGFP-Fusionsproteins dienten eine hochinvasive, metastasierende Mammakarzinomzelllinie, die MDA-MB-231, und eine nichtneoplastische, dem normalen Brustepithel ähnliche Zelllinie, die MCF-12A. MDA-MB-231 und MCF-12A sind als etablierte Zelllinien bei ATCC zu beziehen.

Die MDA-MB-231 wurden 1973 aus einer pleuralen Metastase eines wenig differenzierten Adenokarzinoms (G III) einer 51-jährigen Patientin gewonnen [48, 49].

Die Zellen exprimieren Rezeptoren des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Sie sind tumorigen in immundefizienten Nacktmäusen und in ALS (Anti-Lymphozytenserum) behandelten BALB/c-Mäusen [50]. Die MDA-MB-231 zeigen die höchste CapG-Expression der bisher untersuchten Brustkrebszelllinien (Niederacher, unpublizierte Daten).

Um aus den Daten dieser Arbeit tatsächlich Aussagen über metastasierungsfähige Brustkrebszellen ableiten zu können, um also die Heterogenität der Zellpopulation eines Primärtumors zu umgehen, wurde eine Karzinomzelllinie gewählt, die aus einer Metastase gewonnen und die somit durch den Metastasierungsprozeß gleichsam klonal selektioniert worden war.

Die MDA-MB-231 wuchsen in phenolrotfreiem DMEM-Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum und 1% Glutaminsäure.

Die MCF-12A wurden 1986 aus einer Mammareduktionsplastik einer 60-jährigen Patientin isoliert. Die histopathologische Untersuchung des Brustgewebes ergab eine fibrozystische Erkrankung mit umschriebenen Arealen intraduktaler Hyperplasie. Die Zellen sind in immundefizienten Nacktmäusen nicht tumorigen. Sie zeigen eine typische luminal epitheliale Morphologie [51].

Die MCF-12A wuchsen in phenolrotfreiem RPMI-Medium unter Zusatz von 5% fetalem Pferdeserum, EGF in einer Endkonzentration von 20 ng/ml, Insulin in einer Endkonzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Hydrocortison in einer Endkonzentration von 500 ng/ml und Cholera toxin in einer Endkonzentration von 100 ng/ml.

Beide Zelllinien wuchsen bei 37°C in 5%-iger CO_2 -Atmosphäre. Bei Konfluenz wurden sie in Medium 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt umgesetzt. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Zellen 2 Tage zuvor in Deckglaskammern von Nunc gesät, etwa 25000 Zellen in 0,3 ml Medium pro Kammer.

3.2 Konstruierte Vektoren

Die cDNA des humanen CapG wurde mit den Oligonukleotidprimern CapG EcoRI fwd und CapG SacII rev amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SacII geschnitten und in die Multiple Cloning Site der Vektoren pSVeGFP und pSVmRFP ligiert.

Auf die gleiche Art mit entsprechenden Primern (s. Anhang B) wurden die cDNA des humanen β -Aktin und des humanen zytoplasmatischen Gelsolin in die MCS des pEGFP-/mRFP-Vektors bzw. des pSVeGFP-/mRFP-Vektors kloniert. Die erhaltenen Konstrukte wurden sequenziert.

3.3 Transfektionen

Die MDA-MB-231 wurden transient und stabil mit TransFectin™ von BioRad transfiziert, die MCF-12A transient mit Lipofectamin™ 2000 von Invitrogen und stabil mit FuGene® HD von Roche Diagnostics. Das Herstellerprotokoll wurde jeweils leicht optimiert. Folgende stabil exprimierende Zelllinien konnten unter Neomycin/G418-Selektionsdruck etabliert werden:

- MDA-MB-231
 - CapG-eGFP
 - CapG-mRFP
 - eGFP-Aktin

- MCF-12A
 - CapG-eGFP
 - CapG-mCherry

3.4 CapG-knockdown

CapG-eGFP stabil exprimierende Klone der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 wurden mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert. Als Transfektionsmedium diente HiPerFect™ der Firma Qiagen, es wurde gemäß der Herstelleranleitung verwendet. Die effektive siRNA-Konzentration in 2 ml Zellkulturmedium betrug 2,5 bzw. 5 nM. 72h nach der Transfektion wurden Invasionsstudien durchgeführt.

Die drei verwendeten siRNA-Moleküle (s. Anhang B) waren gegen drei Domänen des humanen CapG gerichtet, den Sequenzpositionen 355 - 373, 621 - 639 and 759 - 777 der kodierenden Sequenz des CapG entsprechend.

Bei jedem Experiment wurden CapG-eGFP stabil exprimierende Zellen desselben MDA-MB-231-Klons, die nicht mit siRNA behandelt waren, als Kontrolle mitgeführt.

3.5 Invasionsassay

Um einen Anhalt für das metastatische Potential der Brustkrebszelllinie zu erhalten, wurden in den BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers die Brustkrebszellen gezählt, die nach 16 - 18h die rekonstruierte Basalmembran 8 μm großer Poren durchwandert hatten.

Dieser Invasionsassay wurde bei einer Vielzahl Tumorzellen erfolgreich verwendet - bei Zelllinien und bei Primärkulturen. Beispiele sind in den Referenzen zu finden [52, 53, 54]. Die BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chambers bestehen aus Falcon Cell Culture Inserts, die eine PET-Membran mit 8 μm großen Poren und einer dünnen Schicht Matrigel-Basalmembran-Matrix tragen, und den BD Falcon™ TC Companion Plates. Die Matrigel-Matrix ist eine Basalmembranpräparation aus einem Maussarkom. Sie enthält Laminin, Kollagen IV, Heparansulfat, Proteoglykan, Entactin und Wachstumsfaktoren.

Die Invasionskammern wurden der Anleitung des Herstellers gemäß benutzt. Um die gewanderten Zellen besser zählen zu können, wurden die Einsätze fixiert und mit Toluidinblau gefärbt.

3.6 Dekonvolution und dreidimensionale Rekonstruktion

Damit die Dynamik der Zellverformung bei der Passage einer 8 μm großen Pore sichtbar gemacht werden konnte, wurden in bestimmten Zeitabständen

Schnittbilder (Z-Stapel) lebender Brustkrebszellen aufgenommen. Die Brustkrebszellen exprimierten das Fusionsprotein CapG-eGFP stabil. Nach 7, 9 und 11h wurden verschiedene Ansätze des Invasionsassays bei 37°C mit dem konfokalen Mikroskop C1Si von Nikon beobachtet.

Da der Abstand der Einsätze mit der rekonstituierten Basalmembran zum Boden der vorgefertigten Companion Plates größer ist als der Arbeitsbereich des Objektivs (Plan Fluor 20 x/ 0.75, Wasserimmersion), mußten diese Einsätze in ein Labtec der Firma Nunc umgesetzt werden. Damit sie nicht direkt auf den Labtecboden aufsetzten und durchgewanderte Zellen quetschten, dienten flache, desinfizierte Plastikringe als Abstandshalter. Das umgebende Medium wurde mit Hepes auf physiologischen pH gepuffert.

Die Dekonvolution der aufgenommenen Z-Stapel mit Hilfe des Programms Huygens[®] Essential verbesserte die Qualität dieser Bilder und ermöglichte eine gute dreidimensionale Rekonstruktion der wandernden Zellen.

Ziel der Dekonvolution ist es, Verzerrungen und Unschärfen eines Bildes rechnerisch zu beseitigen. Einzelne Punkte, die kleiner sind als das optische System aufzulösen vermag, werden ausgebreitet und verzerrt wiedergegeben. Diese Eigenschaft kann mit der dreidimensionalen point spread function (PSF) charakterisierend beschrieben werden. Im mikroskopischen Bild wird nun jeder Punkt eines dreidimensionalen Objekts durch die dreidimensionale PSF ersetzt; und schließlich werden all diese PSFs zum endgültigen Bild aufsummiert, das Bild wird konvolviert. Gelingt es, die PSF zu bestimmen, kann anhand der inversen respektive komplementären Funktion das erhaltene Bild dekonvolviert, der beschriebene Prozeß also umgekehrt und das Bild nachträglich verbessert werden. Tatsächlich ist es nicht möglich, die wahre PSF eines optischen Systems zu ermitteln, sie kann lediglich approximiert werden. Bei der Dekonvolution eines Bildes werden iterative Algorithmen verwendet, um unrealistische Lösungen zu vermeiden [55].

3.7 Total Internal Fluorescence Reflection

Total Internal Fluorescence Reflection (TIRF) dient der selektiven Anregung fluoreszierender Moleküle an Oberflächen. Die TIRF-Mikroskopie nutzt die Totalreflexion schräg einfallenden Lichts an der Kontaktfläche zweier Medien unterschiedlicher Refraktivität und das dabei entstehende evaneszente elektromagnetische Feld [56].

Trifft ein Lichtstrahl aus einem transparenten Medium hoher Refraktivität (beispielsweise Glas) auf ein transparentes Medium niedriger Refraktivität (beispielsweise Wasser), wird er in Abhängigkeit des Einfallswinkels an der Grenzfläche der beiden Medien gebrochen oder total reflektiert. Zur To-

totalreflexion kommt es nur, wenn der Lichtstrahl in einem ausreichend großen Winkel auf die Grenzfläche zu einem Medium niedrigerer Refraktivität trifft. Das einfallende Licht wird zwar an der Grenzfläche zum Medium niedrigerer Refraktivität total reflektiert, erzeugt aber in diesem Medium ein elektromagnetisches Feld. Dies ist das sogenannte evaneszente Feld. Es hat die gleiche Wellenlänge wie das einfallende Licht. Seine Intensität nimmt jedoch mit zunehmender Entfernung zur Grenzfläche exponentiell ab. Das Feld verschwindet, es ist evaneszent.

Die Energie dieses Feldes ist nur innerhalb eines schmalen Streifens, etwa 100 nm, nahe der Grenzfläche groß genug, um Fluorophore zur Fluoreszenz anzuregen. Diese selektive Anregung nur der oberflächennahen Fluorophore ist der grundlegende Unterschied zu einem anderen optischen Schnittverfahren, der konfokalen Mikroskopie. Bei der konfokalen Mikroskopie werden die Fluorophore in der gesamten axialen Ausdehnung der Probe angeregt, die emittierte Fluoreszenz allerdings nur aus einem umschriebenen Bereich detektiert. Bei der TIRF-Mikroskopie gilt also das Prinzip der selektiven Anregung, bei der konfokalen Mikroskopie das der selektiven Detektion. Bei dem Vergleich dieser beiden optischen Techniken ist hervorzuheben, daß die Tiefenausdehnung des optischen Schnitts bei TIRF nur etwa 100 nm beträgt, bei der konfokalen Mikroskopie dagegen mindestens 600 nm. Zudem ist die TIRF-Mikroskopie bei Anwendungen überlegen, die eine begrenzte Anregung günstig erscheinen lassen, so z.B. bei lichtempfindlichen Zellen. Allerdings ist die TIRF-M auf die Visualisierung oberflächennaher Bereiche beschränkt.

Es gibt zwei technische Umsetzungen der TIRF-Mikroskopie: Das evaneszente Feld wird mit Hilfe eines Prismas erzeugt oder mit einem Objektiv hoher numerischer Apertur.

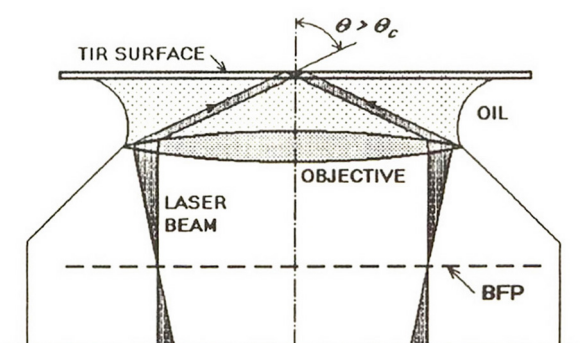


Abbildung 3.1: Objektivmethode der TIRF-Mikroskopie: Strahlengang des lateralisierten Lasers (dunkelgrau); modifiziert nach [56]

Verschiedene Varianten der Prismenmethode sind möglich. Die meisten jedoch schränken die Zugänglichkeit der Probe ein. Außerdem ist das Prisma bei invertierten Mikroskopen meist auf der Seite der Probe angebracht, die dem Objektiv gegenüberliegt, wodurch die Signalqualität der emittierten Fluoreszenz durch das gesamte überlagernde Probenvolumen beeinträchtigt wird. Positioniert man das Prisma zwischen Objektiv und Probe, entstehen Probleme aus dem begrenzten Arbeitsbereich hochauflösender Objektive.

Bei der Objektivmethode wird der Lichtstrahl lateralisiert durch das Objektiv geführt. Wichtig ist es, Objektive hoher numerischer Apertur zu nutzen ($NA > 1.33$), die den parallelen in der Peripherie des Objektivs geführten Lichtstrahl im nötigen kritischen Winkel (θ_c) auf die Grenzfläche projizieren können.

Für die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten TIRF-Aufnahmen wurde ein TIRF-Mikroskop von Nikon mit einem TIRF-PlanApoVC-Objektiv (60 x/1.45, Ölimmersion) genutzt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit der Hamamatsu Kamera ORCA AG detektiert. Seltener wurde die CCD-Kamera von Nikon, die DS-1 QM, verwendet. Bei dem gewählten Aufbau war eine Kombination von TIRF-M und Weitfeldbeleuchtung möglich. Die untersuchten lebenden Zellen wurden in hepesgepuffertem Medium bei 37°C inkubiert.

3.8 Fluorescence Correlation Spectroscopy

Die Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) analysiert Intensitätsfluktuationen eines Fluoreszenzsignals.

Diese Intensitätsfluktuationen sind typischerweise durch Änderungen der Anzahl fluoreszierender Moleküle im Detektionsvolumen bedingt. Die Anzahl fluoreszierender Moleküle im Detektionsvolumen kann sich durch Diffusion und durch photochemische oder photophysikalische Reaktionen der entsprechenden Moleküle ändern.

Im thermodynamischen Gleichgewicht und bei einem offenen Detektionsvolumen zeigen die Fluoreszenzfluktuationen stochastische Variationen in Größe und Dauer, das heißt sie schwanken um ein Mittel, welches durch das umgebende Medium und seine Thermodynamik bestimmt wird. Der stochastische Charakter der Fluoreszenzfluktuationen macht eine statistische Auswertung einer großen Zahl individueller Fluktuationen erforderlich, um charakteristische Parameter der Dynamik zugrundeliegender molekularer Prozesse wie Diffusions- und Reaktionskonstanten zu erhalten. Dazu wird meist die Autokorrelation benutzt. Ein Fluoreszenzsignal kann zeitlich und räumlich korreliert werden. Hier wurde es nur zeitlich korreliert. Die Autokorrelationsfunktion gibt somit ein Maß für den zeitabhängigen Zerfall einer

Fluktuation auf den entsprechenden Gleichgewichtswert. Damit gehört die FCS in die Gruppe der Korrelationsspektroskopien, die die Information stochastischer Variationen eines Signals im thermodynamischen Gleichgewicht analysieren.

Fluoreszenzsignale und deren Fluktuationen wurden erstmals Anfang der 70er Jahre als Indikatoren chemischer Reaktionen genutzt [57], die früheren Fluktuationsindikatoren wie der dynamischen Lichtstreuung nicht zugänglich waren. Die ersten FCS-Untersuchungen entstanden, um die Dynamik denaturierender DNA zu verstehen.

Relativ große Detektionsvolumina beeinträchtigten die Qualität der ersten FCS-Messungen [58, 59]: Je größer das Detektionsvolumen, desto größer ist die Strecke, die ein fluoreszierendes Molekül zurücklegen muß, und umso länger wird das detektierte Fluktuationssignal. Da für die statistische Auswertung die Detektion vieler solcher (langen) Signale nötig ist, um einen statistisch validen Wert zu erhalten, betrug die FCS-Meßzeiten bis zu einer halben Stunde. Das setzt eine hohe Stabilität des untersuchten Systems voraus. Zellmessungen waren unmöglich.

Die Dynamik molekularer Prozesse auch an und in lebenden Zellen bestimmen zu können, war Motivation, die der FCS theoretisch und auch experimentell verwandte Fluorescence Photobleaching Recovery (FPR) bzw. Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) zu entwickeln. Hierbei werden nicht spontane, stochastische Intensitätsänderungen durch einzelne fluoreszierende Moleküle im thermodynamischen Gleichgewicht betrachtet; vielmehr wird die Gleichgewichtsverteilung fluoreszierender Moleküle gestört und anschließend die Umverteilung der generierten Populationen fluoreszierender und nicht mehr fluoreszierender Moleküle registriert, bis sich eine neue Gleichgewichtsverteilung eingestellt hat. Es muß also nicht eine Vielzahl einzelner Fluktuationen registriert werden, sondern die einmalige Beobachtung einer solchen Umverteilung verschiedener Populationen reicht, um Transport- und Reaktionskonstanten als charakterisierende Kinetikparameter abzuleiten. Die Meßzeit, die ein FRAP-Experiment erforderte, erlaubte auch die Betrachtung instabiler Systeme wie eben lebender Zellen.

Durch die Integration der FCS in konfokale Mikroskope [60] konnten die Detektionsvolumina und damit auch die erforderlichen Meßzeiten und das Untergrundsignal reduziert werden. Parallel dazu wurden stabilere Lasersysteme, Objektive hoher numerischer Apertur, selektivere bandpass-Filter, sensitivere Detektoren (Lawinphotodioden, APD) und effizientere Korrelatorsysteme entwickelt: So wurden auch FCS-Messungen in lebenden Zellen möglich.

3.8.1 Experimenteller Aufbau

Für die FCS-Messungen in lebenden Zellen wurde das in der Abteilung gebaute Fluoreszenzfluktuationsmikroskop benutzt. Dies ist ein inverses Mikroskop, ein Olympus IX-70, das um eine FCS-Detektionseinheit, konfokalen Strahlengang und eine Scanning-Einheit am seitlichen Ausgang modular erweitert wurde [61, 62, 63].

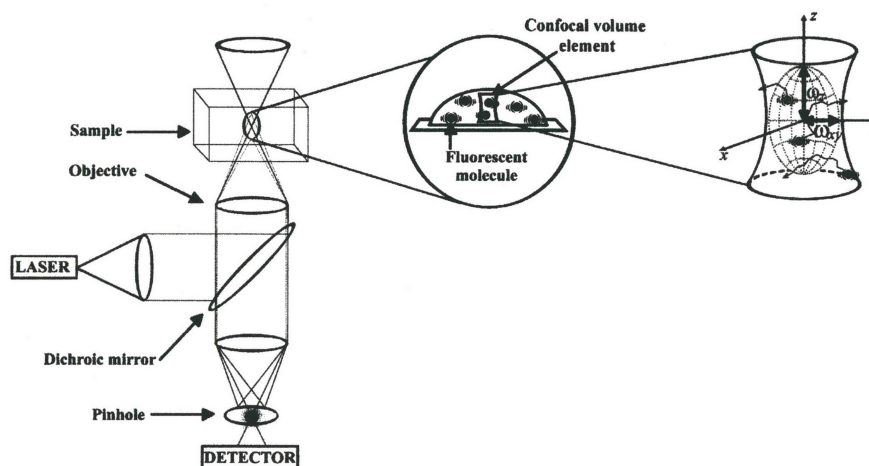


Abbildung 3.2: Schemazeichnung des konfokalen Strahlengangs; modifiziert nach [64]

Das Laserlicht wird über eine Glasfaser in das FCS-Modul eingekoppelt. Durch einen Kollimator wird es parallelisiert und mit einer konvexen Linse in die Bildebene des Mikroskops fokussiert. Diese nahezu punktförmige Lichtquelle wird im Objekt abgebildet und regt dort Fluoreszenz an. Das Objektiv hoher numerischer Apertur (UplanApo 60x/ 1.2, Wasserimmersion) bündelt das einfallende Licht zusätzlich, es entsteht ein diffraktionslimitierter Punkt.

Das Fluoreszenzlicht aus dem Fokus des Anregungslichts wird in die Bildebene zurückprojiziert. Da Lichtquelle und Detektor nicht an derselben Stelle angeordnet sein können, wird über einen dichroitischen Strahlteiler eine zweite Bildebene erzeugt. Der Dichroit funktioniert als wellenlängenabhängiger Strahlteiler, er reflektiert das Laserlicht, läßt aber das längerwellige, rotversetzte Fluoreszenzlicht passieren. In der zweiten Bildebene ist eine Lochblende positioniert, die Streulicht und Fluoreszenzlicht, das nicht aus dem Fokus des Anregungslichts stammt, ausblendet und damit die Auflösung vor allem in axialer Richtung verbessert.

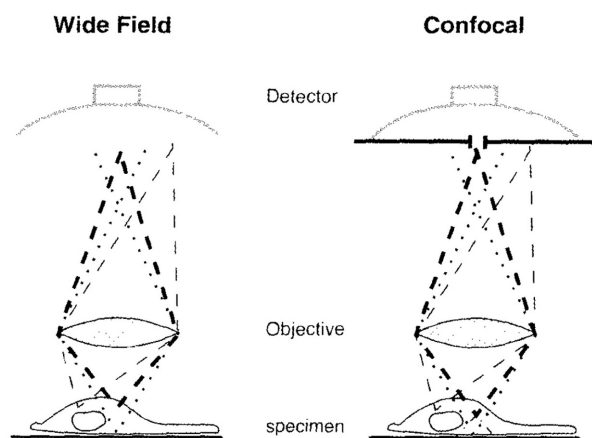


Abbildung 3.3: Prinzip der Lochblende in konfokalen Mikroskopen im Vergleich mit Weitfeldbeleuchtung: Streulicht und Fluoreszenzlicht, das nicht aus dem Fokus stammt, werden ausgeblendet; modifiziert nach [55].

Die Strahltaile des einfallenden Laserlichts und die Lochblende definieren das ellipsoide konfokale Detektionsvolumen, das typischerweise kleiner als ein Femtoliter ist.

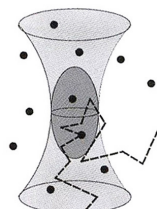


Abbildung 3.4: konfokales Detektionsvolumen (dunkelgrau), das durch die Strahltaile des einfallenden Laserlichts und die Lochblende definiert wird; modifiziert nach [65]

Zwischen Lochblende und Detektor befindet sich ein bandpass-Filter, der im Strahlengang reflektiertes Licht und gestreutes Anregungslicht unterdrückt. Das emittierte Licht kann mit einer Linse auf den Detektor, eine Lawinenphotodiode (SPCM-AQR-13, Perkin-Elmer), fokussiert werden. Dieser ist in der Lage, einzelne Photonen zu detektieren, und wandelt sie in elektrische Pulse um.

Zwischen FCS-Modul und seitlichen Ausgang des Mikroskops wurde ein Spiegelscanner eingebaut. Er führt mit galvanometrisch betriebenen Spiegeln

das punktförmige Licht über die Probe und macht es möglich, das Anregungslicht bis auf 25 nm genau zu positionieren. Mit Schrittmotoren kann auch der Probentisch bewegt werden.

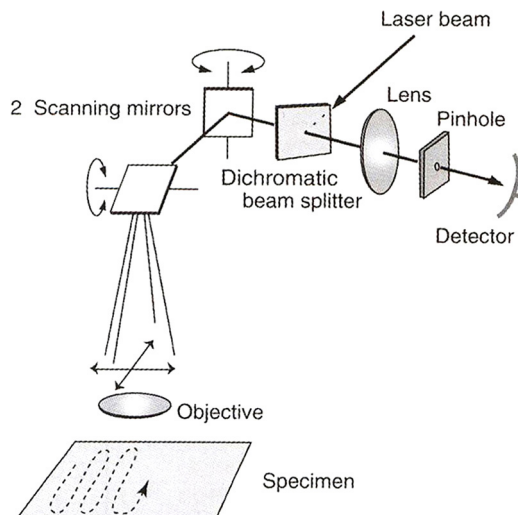


Abbildung 3.5: Prinzip des Punktscannens mit einem Spiegelscanner; modifiziert nach [55]

Die Autokorrelationen werden mit einem Echtzeit-Korrelator (ALV 5000, ALV-Laser GmbH) ausgeführt. Dieser Korrelator zählt die vom Detektor gelieferten Photonenimpulse über bestimmte Zeitintervalle, t_s . Nach gegebenen Verzögerungszeiten τ_{kt_s} die Vielfache von t_s sind, zählt er erneut Photonenimpulse. Die momentanen (n_i) und die verzögerten Zählraten (n_{i-k}) werden multipliziert, ihre Produkte aufsummiert. Dieser Prozeß des Multiplizierens von Zählraten und Summierens entsprechender Produkte wird für viele Zeitintervalle, $t_s \geq 200$ nsec, und Verzögerungszeiten gleichzeitig ausgeführt. Damit wird die Korrelationsfunktion berechnet.

$$c(k) = \sum_{i=1}^M n_i n_{i-k} \quad (3.1)$$

Die errechneten Autokorrelationen werden normalisiert und in Echtzeit wiedergegeben, $G(\tau)$. Nach der Messung kann eine Liste von Verzögerungszeiten, τ , und den dazugehörigen Meßwerten $G(\tau)$ als ASCII-File gespeichert werden.

Die Produkte der Zählraten, die durch längere Verzögerungsintervalle getrennt sind, sind kleiner als die Produkte derer, die kürzere Verzögerungsintervalle

tervallen trennen: Der errechnete $G(\tau)$ -Wert wird für längere Verzögerungsintervalle kleiner. Wird die Autokorrelation für die Analyse translationaler Diffusion genutzt, bedeutet dies, die Position eines jeden fluoreszierenden Moleküls korreliert mit sich selbst über die Zeit zunehmend schlechter, die emittierte Fluoreszenzintensität wird sich selbst immer unähnlicher, da sich das Molekül immer weiter von seiner ursprünglichen Position wegbewegt.

Mit dem beschriebenen Aufbau wurden FCS-Analysen in lebenden Zellen ausgeführt. Die transient transfizierte Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) wurden bei 37°C in 5%-iger CO_2 -Atmosphäre gemessen.

3.8.2 Auswertung der Daten

Die grundlegenden Daten der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie sind über die Zeit gemessene Fluoreszenzintensitäten, $F(t)$. Diese sind proportional der Anzahl fluoreszierender Moleküle im Detektionsvolumen:

$$F(t) \propto N \quad (3.2)$$

Die Autokorrelationsfunktion (ACF) der Fluoreszenzintensitäten ist definiert als

$$C(\tau) = \langle F(t)F(t + \tau) \rangle \quad (3.3)$$

und wird als Produkt der Zählraten von Photonenimpulsen verschiedener Verzögerungsintervalle vom Korrelator errechnet (s. Gl. 3.1).

Die Intensitätsfluktuationen zum Zeitpunkt t , $\delta F(t)$, sind die Abweichungen von der mittleren Fluoreszenzintensität, $\langle F(t) \rangle$:

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (3.4)$$

Die beobachteten Intensitätsfluktuationen zum Zeitpunkt t können mit den Intensitätsfluktuationen zum Zeitpunkt $t + \tau$ korreliert werden. Die Autokorrelationsfunktion der Fluktuationen der Fluoreszenzintensität lautet entsprechend¹:

$$C(\tau) = \langle F(t) \rangle^2 + \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle \quad (3.5)$$

Um diese Funktion unabhängig vom jeweiligen instrumentellen Aufbau zu machen, wird sie normalisiert:

$$g(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.6)$$

¹Diese Form der ACF ergibt sich aus Gl. 3.3, setzt man $F(t) = \langle F(t) \rangle + \delta F(t)$ bzw. $F(t + \tau) = \langle F(t) \rangle + \delta F(t + \tau)$. Löst man Gleichung 3.3 dann auf, erhält man: $\langle F(t) \rangle^2 + \langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle + \langle F(t) \rangle^2 \cdot [\langle \delta F(t) \rangle + \langle \delta F(t + \tau) \rangle]$, wobei per def. $\langle \delta F(t) \rangle = \langle \delta F(t + \tau) \rangle = 0$. Damit erhält man Gl. 3.5.

Für weitere Analysen wird $g(\tau)$ gegen verschiedene Verzögerungszeiten τ in einem Koordinatensystem aufgetragen.

In einem molekularen System, das rein zufälligen Intensitätsfluktuationen unterliegt, werden die Werte von $g(\tau)$ um Eins streuen, die detektierten Intensitätsfluktuationen sind unkorreliert. Sind aber die Intensitätsfluktuationen nicht rein zufällig verteilt, sondern stochastische Fluktuationen um ein Mittel, das durch die makroskopischen Eigenschaften des untersuchten Systems bedingt ist, ergibt sich für $g(\tau)$ ein maximaler Wert, bei $\tau \rightarrow 0$, der kontinuierlich auf Eins abfällt, wenn die Verzögerungszeiten sehr lang werden, $\tau \rightarrow \infty$.

Meist wird nur der sogenannte nicht-uniforme Teil der ACF betrachtet:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.7)$$

bei dem der maximale Wert für $G(\tau)$ bei $\tau \rightarrow 0$ auf $G(\tau)=0$ für lange Korrelationszeiten fällt. Der maximale Wert der ACF, ihre Amplitude, und ihr Abfall auf Null, also die Form ihres Zerfalls, liefern wesentliche Informationen der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie.

Amplitude der ACF

Für kleine Detektionsvolumina, die im freien Austausch mit dem umgebenden, unendlich gedachten Medium stehen, wird eine Poisson-Verteilung fluoreszierender Moleküle angenommen². Aus Gleichung 3.7 folgt, daß der maximale Wert für $\tau \rightarrow 0$ gleich der normierten Varianz des Fluoreszenzsignals ist:

$$G(0) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t + 0) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} = \frac{\langle [\delta F(t)]^2 \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (3.8)$$

Die Varianz ist das Quadrat der Standardabweichung, $\sigma^2 F(t) = \langle (F(t) - \langle F(t) \rangle)^2 \rangle = \langle [\delta F(t)]^2 \rangle$, und bei einer Poisson-Verteilung proportional dem Erwartungswert dieser Verteilung, also

$$\sigma^2 F(t) \propto \langle F(t) \rangle \quad (3.9)$$

$$\text{und da } \langle F(t) \rangle \propto N, \text{ ist somit } \sigma^2 F(t) \propto N \quad (3.10)$$

Unter diesen Voraussetzungen ergibt sich aus Gleichung 3.8, daß

$$G(0) \propto 1/N \quad (3.11)$$

²Wenn sich Phänomene 0, 1, 2, 3, ... mal in gegebener Zeit oder gegebenem Raum ereignen, sie also diskret sind, und wenn die Wahrscheinlichkeit, daß sie stattfinden, in Zeit oder Raum konstant ist, können diese Phänomene mit einer Poisson-Verteilung beschrieben werden.

Der limitierende maximale Wert von $G(\tau)$ bei $\tau \rightarrow 0$ ist damit umgekehrt proportional der Anzahl unabhängig voneinander diffundierender, fluoreszierender Teilchen im Fokusvolumen.

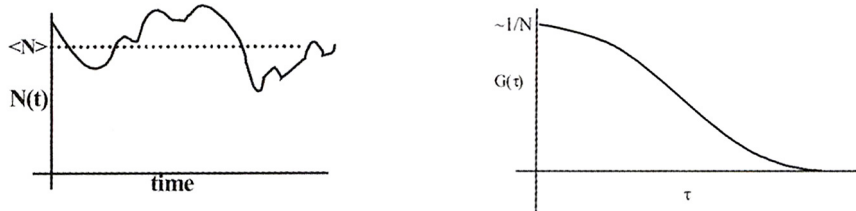


Abbildung 3.6: Fluoreszenzfluktuationen und abgeleitete Autokorrelationsfunktion; modifiziert nach [65]

Diese Anzahl Fluorophore im Fokusvolumen wird durch die mittlere Konzentration der untersuchten Fluorophorlösung $\langle C \rangle$ und die Größe des effektiven Detektionsvolumens V_{eff} bestimmt.

$$\langle N \rangle = \langle C \rangle \cdot V_{eff} \quad (3.12)$$

Bei konstanter Fluoreszenz und einer kleinen Anzahl Fluorophore in einem kleinen System bedingen einzelne Fluorophore große Fluoreszenzänderungen relativ zu der über die Zeit gemittelten Fluoreszenzintensität. Da die FCS den Informationsgehalt gerade solcher Fluktuationen nutzt, sollten niedrig konzentrierte Proben ($<1 \mu\text{M}$) gemessen werden. Je höher konzentriert eine Fluorophorlösung ist, desto geringer werden die durch einzelne Fluorophormoleküle ausgelösten Fluktuationen relativ zur durchschnittlichen Fluoreszenzintensität. Das Fluktuationssignal des einzelnen Fluorophors geht im Rauschen der Gesamtlösung unter. Außerdem verliert die Grundvoraussetzung der statistischen Auswertung der Fluoreszenzfluktuationen ihre Gültigkeit: Nehmen die gelösten Fluorophore wie im Fall einer stark konzentrierten Lösung einen signifikanten Anteil am Gesamtvolumen ein, können die registrierten Anzahlfluktuationen nicht mehr durch eine Poisson-Verteilung beschrieben werden.

Auf der anderen Seite führt auch eine zu niedrig konzentrierte Fluorophorlösung ($<50 \text{ fM}$) zu Schwierigkeiten, das spezifische Fluktuationssignal gegen das Untergrundrauschen abzugrenzen. Die Auswahl geeigneter konzentrierter Proben (also in etwa $>50 \text{ fM}$ und $<1 \mu\text{M}$), dies sind i. allg. schwach fluoreszierende Zellen, erscheint damit grundlegend für valide FCS-Messungen.

Wie in Gleichung 3.2 angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität, $\langle F(t) \rangle$, proportional der Anzahl fluoreszierender Moleküle im Detektionsvolumen. Ein weiterer Parameter, die mittlere molekulare Helligkeit der Fluorophore ψ , bestimmt diesen Zusammenhang genauer. Die mittlere molekulare Helligkeit ist Ausdruck der Fluorophoreigenschaften (beispielsweise der Fluoreszenzlebensdauer und der Quantenausbeute) und des instrumentellen Aufbaus. Sie wird in Photonen pro Molekül und Sekunde angegeben (cpms).

$$\langle F(t) \rangle = \psi \langle N \rangle = \psi \langle C \rangle V \quad (3.13)$$

Mit Hilfe der molekularen Helligkeit und der Amplitude der ACF sind Aussagen über den Assoziationsgrad n fluoreszierender Moleküle möglich: Verbinden sich beispielsweise Monomere zu Dimeren, halbiert sich die Anzahl unabhängig diffundierender Teilchen; damit sinkt die Amplitude der ACF um die Hälfte, und die molekulare Helligkeit verdoppelt sich. Vergleicht man also die mittleren molekularen Helligkeiten des freien, monomer angenommenen eGFP und eines Fusionsproteins unbekannter Assoziationseigenschaft unter denselben experimentellen Bedingungen, bekommt man einen Anhalt für den Assoziationsgrad des untersuchten Fusionsproteins:

$$n = \frac{\langle F_{sample} \rangle}{\langle N_{sample} \rangle} \bigg/ \frac{\langle F_{ref} \rangle}{\langle N_{ref} \rangle} \quad (3.14)$$

Die detektierte Photonenzahl pro Molekül und Sekunde bestimmt wesentlich die Qualität des registrierten Fluoreszenzsignals. Ziel einer FCS-Messung muß es sein, ein möglichst eindeutiges Signal zu detektieren, also viele Photonen von wenigen Fluorophoren zu erhalten, und darüberhinaus möglichst viele solcher eindeutigen Signale zu sammeln, also über eine große Zeitspanne zu messen. Folgender Zusammenhang definiert das Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SNR):

$$SNR = \psi \sqrt{T} \quad (3.15)$$

Kann die detektierte Photonenzahl pro Molekül verdoppelt werden, ist folglich nur ein Viertel der Meßzeit nötig, um die gleiche Qualität des Signals zu erhalten.

Zerfallsform der ACF

Die Form der ACF spiegelt die Dynamik des beobachteten fluktuierenden Systems wider: Verschwindet ein fluoreszierendes Molekül schnell aus dem Fokus - durch Diffusion oder chemische Reaktion -, wird es als schmaler spike detektiert, bleibt es hingegen längere Zeit im Fokus, wird es als breites

Signal registriert. Vergleicht man die beiden Signale mit sich selbst, ist das breite Signal über längere Zeit sich selbst ähnlich. Die resultierende ACF fällt langsamer ab als die des schmalen spikes. Aus dem Zerfall der ACF lassen sich so charakteristische Diffusions- bzw. Reaktionszeiten ableiten.

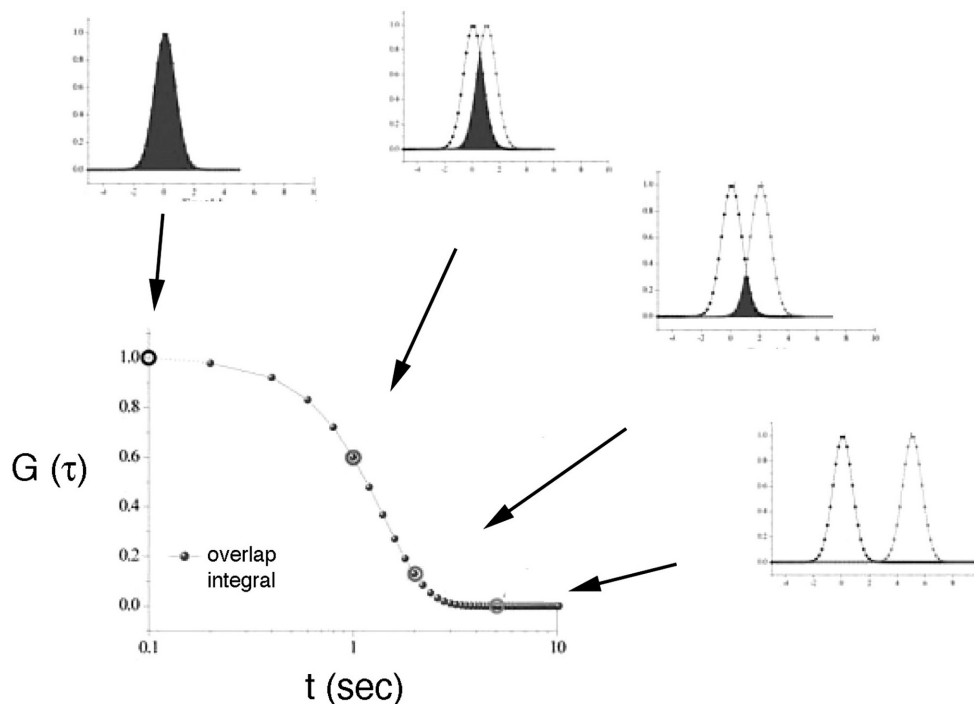


Abbildung 3.7: Beispiel eines Signals, das über die Zeit sich selbst immer unähnlicher wird, und einer aus dem Überlappintegral ermittelten Autokorrelation; modifiziert nach [66]

Um tatsächlich quantitative Aussagen über Diffusions- und Reaktionszeiten machen zu können, gilt es, eine theoretische Beschreibung zu wählen, die den experimentellen Aufbau und das untersuchte System am besten wiedergibt, eine entsprechend gewählte theoretische Funktion dann an die experimentell ermittelten Autokorrelationen anzupassen und so charakteristische Parameter quantitativ abzuleiten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten vor allem Diffusionsprozesse in der lebenden Zelle untersucht werden. Beispiele verschiedener molekularer Prozesse unterschiedlicher biologischer Systeme sind in diesem Zusammenhang freie sowie anomale Diffusion und aktiver Transport im Zytoplasma oder auf der Zellmembran.

Das einfachste theoretische Modell beschreibt freie, dreidimensionale Diffusion einer einzelnen fluoreszierenden Spezies detektiert in einem Volumen, das ungefähr einem Rotationsellipsoid entspricht und in dem die Intensität des Anregungslichts gaussförmig verteilt ist [67]:

$$G_D(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D \kappa^2}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (3.16)$$

wobei τ_D , die Diffusionszeit, als mittlere Aufenthaltsdauer des Fluorophors im effektiven Detektionsvolumen den charakteristischen Zerfall der Autokorrelation angibt und durch

$$\tau_D = \frac{w^2}{4D} \quad (3.17)$$

mit dem Diffusionskoeffizienten verknüpft ist, der nicht vom jeweiligen instrumentellen Aufbau abhängt. Die Geometrie des Detektionsvolumens wird hier mit w , der horizontalen Halbachse bzw. dem effektiven Radius des Laserstrahls, und mit dem Strukturfaktor κ berücksichtigt. κ beschreibt das Verhältnis der vertikalen zur horizontalen Halbachse, $\kappa = z_0/w_0$.

Die tatsächlichen Abmessungen des Detektionsvolumens genau zu bestimmen, ist kaum möglich, sie können lediglich approximiert werden. Es gibt zwei Möglichkeiten mit der FCS selbst, das effektive Detektionsvolumen annähernd zu schätzen: anhand der Konzentration einer Fluorophorlösung oder anhand des Diffusionskoeffizienten des verwendeten Fluorophors.

So kann gemäß Gleichung 3.12 aus der ermittelten Teilchenzahl einer Fluorophorlösung bekannter Konzentration eine annähernde Schätzung des effektiven Detektionsvolumens gelingen. Die Halbachsen sind dann wie folgt zu berechnen³:

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0 \quad (3.18)$$

Oder aber die horizontale Halbachse w wird entsprechend Gleichung 3.17 aus der Diffusionszeit eines Fluorophors, dessen Diffusionskoeffizient bekannt ist, errechnet, was allerdings voraussetzt, daß der Diffusionskoeffizient des Fluorophors beispielsweise durch Mikrofluidikstudien charakterisiert wurde. Dies ist nur bei wenigen Fluorophoren der Fall.

Eine FCS-unabhängige Bestimmung des Detektionsvolumens ist ebenfalls schwierig. Möglich ist die Messung des Intensitätsprofils des Anregungslichts mit einem Scanning-Nahfeldmikroskop (SNOM).

Da nun die tatsächlichen Abmessungen des Detektionsvolumens meist nicht ermittelbar sind, kann auch der Diffusionskoeffizient einer Substanz

³Das so bestimmte effektive Detektionsvolumen ist bis auf einen Faktor $\sim 1,33$ gleich dem Volumen eines Rotationsellipsoids. Dieser Faktor $\sim 1,33$ ergibt sich aus dem Vergleich mit der Formel $V = \frac{4}{3}\pi \cdot \omega^2 \cdot z$, die das Volumen eines Rotationsellipsoids beschreibt.

nicht absolut, sondern nur relativ bestimmt werden: Die Diffusionszeiten der untersuchten Substanz und die Diffusionszeiten einer Eichsubstanz, deren Diffusionskoeffizient bekannt ist, werden mit demselben Aufbau gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Als Kalibrierungssubstanz diente bei diesen Messungen *Alexa488* in 68 nM, wässriger Lösung.

Der Diffusionskoeffizient ist proportional der Geschwindigkeit diffundierender Teilchen, die von der Temperatur (absolute Temperatur, T) und der Viskosität des Mediums (η) und von der Größe der Teilchen (hydrodynamischer Radius, R) gemäß der Stokes-Einstein'schen Gleichung abhängt:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R} \quad (3.19)$$

Wenn das untersuchte Molekül von globulärer Gestalt ist, kann sein Molekulargewicht aus FCS-Messungen grob geschätzt werden, da dann R proportional der dritten Wurzel des Molekulargewichts ist. Dieser Zusammenhang bedeutet aber auch, daß der Diffusionskoeffizient erst dann deutlich - also z.B. um Faktor Zwei - differiert, wenn sich das Molekulargewicht um den Faktor Acht ändert. Die Schätzung des Molekulargewichts anhand des Diffusionskoeffizienten ist somit nur sehr ungenau.

Die ACF setzt sich aus Beiträgen fluoreszierender Spezies unterschiedlicher Dynamik zusammen, sie ist gleichsam die Summe dieser Beiträge. Das macht es möglich, aus der ACF unterschiedliche Kinetikprozesse abzuleiten, verschieden schnell reagierende oder verschieden schnell diffundierende Moleküle.

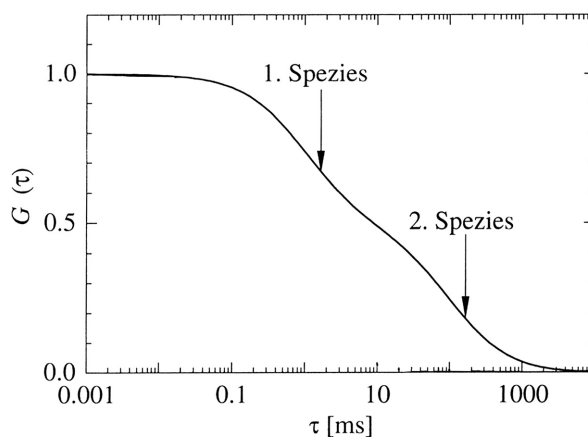


Abbildung 3.8: Beispiel für Beiträge fluoreszierender Spezies unterschiedlicher Dynamik zur Autokorrelationsfunktion; modifiziert nach [63]

Unter idealen Bedingungen, d.h. bei gleich großen Fraktionen und einer molekularen Helligkeit von 15 kHz/Teilchen, gelingt es, zwei verschieden schnell diffundierende Spezies zu trennen, wenn deren Diffusionszeiten um den Faktor 1,6 differieren. Wenn die Fraktion der langsam diffundierenden Komponente nur 10% ausmacht und die molekulare Helligkeit nur 1 kHz/Teilchen beträgt, Bedingungen also, die bei der zellulären Messung des CapG-Proteins eher zu erwarten sind, sind nur die Diffusionszeiten als unterschiedlich aufzulösen, die sich um mindestens den Faktor 8 unterscheiden [68].

Der Modellfunktion, die in dieser Arbeit verwendet wurde, liegt eine dreidimensionale Diffusion von zwei nicht wechselwirkenden Spezies in einem homogenen, isotropen Medium zugrunde. Außerdem wird in jedem Fall ein nichtstrahlender Zustand des Fluorophors, der sogenannte Triplettzustand, berücksichtigt; gegebenenfalls werden zwei nichtstrahlende Komponenten betrachtet.

$$G_{th}(\tau) = \frac{1}{N} \left(1 + \beta e^{-\tau/\Theta} \right) \left((1 - \rho_2 - \rho_3) F_1(\tau) + \rho_2 F_2(\tau) + \rho_3 F_3(\tau) \right) \quad (3.20)$$

Hierbei sind gemäß Gleichung 3.16 die Beiträge der einzelnen Spezies, $F_i(\tau)$:

$$F_i(\tau) = \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i} \right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_i \kappa^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (3.21)$$

N^{-1} ist der Kehrwert der mittleren Teilchenzahl im Beobachtungsvolumen, β und Θ sind Triplettamplitude und -zeit, ρ_2 und ρ_3 die Anteile der zweiten und dritten Komponente an der Korrelationsfunktion, t_1 , t_2 und t_3 die charakteristischen Zeiten der einzelnen Komponenten und κ der Strukturfaktor.

Zur Anpassung der theoretischen Funktion an die experimentell ermittelten Autokorrelationen wurde ein in der Abteilung entwickeltes Programm genutzt. Der verwendete Fitalgorithmus versucht, die Parameter so anzupassen, daß

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\frac{G_{th}(\tau_i) - G_{ex}(\tau_i)}{\sigma_i} \right)^2 \quad (3.22)$$

minimal wird. χ^2 beschreibt als Residuum die Genauigkeit der Anpassung. Alle Parameter können aber auch unabhängig voneinander fixiert werden.

Da der Strukturfaktor κ durch unzureichende Statistik, langsam diffundierende Anteile wie Staub oder Aggregate leicht falsch geschätzt werden kann, wird er typischerweise in Kalibrierungsmessungen einer bekannten Fluorophorlösung bestimmt und für Messungen von Lösungen unbekannter Zusammensetzung auf dem ermittelten Wert fixiert gehalten. Bei optimaler konfokaler Justage und einem Objektiv hoher numerischer Apertur liegt der Wert

von κ bei 4 - 6, d.h. das Detektionsvolumen ist in der Axialebene 4 - 6-mal größer als in der x-y-Ebene.

3.8.3 Fehlerquellen

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie analysiert Intensitätsfluktuationen; damit allerdings auch die Fluktuationen, die durch Instabilitäten des experimentellen Aufbaus hervorgerufen werden: Schwankungen der Laserleistung, Bewegungen der Zelle, Diskontinuitäten in der Fluoreszenzemission des Fluorophors. Es gilt also, diese interferierenden Fluktuationen auszuschließen bzw. in ihren Eigenschaften zu kennen, um sie von diffusionsbedingten trennen zu können. Da die modernen Lasersysteme weitgehend stabil sind, soll nur auf Zellbewegungen und Fluorophoreigenschaften eingegangen werden.

Vor und nach jeder FCS-Messung wurde ein Bild der untersuchten Zelle aufgenommen. FCS-Daten von Zellen, die sich deutlich bewegt hatten, wurden verworfen. Auch Daten, die auf größere Zytoplasmaströme hinwiesen, ohne deutliche Veränderungen der Zellposition zu zeigen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Die wichtigste photophysikalische Eigenschaft, die den quasikontinuierlichen Strom emittierter Photonen unterbricht, ist der intensitätsabhängige Übergang des Fluorophors vom fluoreszierenden Singulett in den nichtfluoreszierenden Triplettzustand [69].

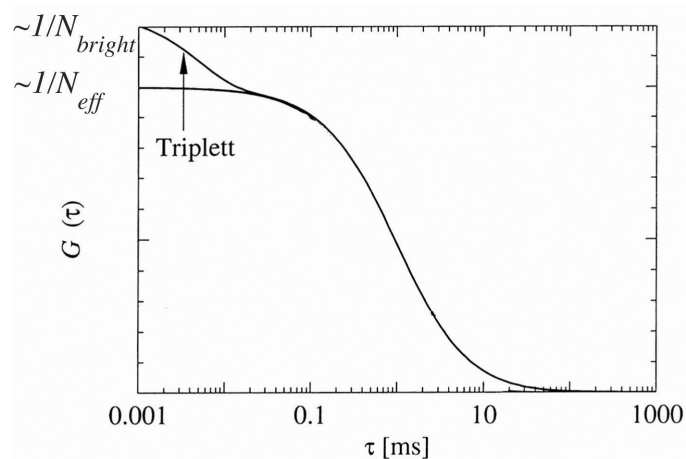


Abbildung 3.9: Beitrag der Triplettpopulation zur Autokorrelationsfunktion: Um in diesem Fall die tatsächliche Anzahl unabhängig voneinander diffundierender Teilchen im Fokus (N_{eff}) zu erhalten, muß man den Triplettanteil von der Gesamtamplitude ($1/N_{bright}$) abziehen (modifiziert nach [63, 70]).

Diese Übergänge des Fluorophors eGFP bewegen sich in einem Zeitrahmen von etwa 5 - 70 μsec und können damit gut von diffusionsbedingten Komponenten der ACF dieses autofluoreszierenden Proteins differenziert werden. Eine Festlegung auf einen genauen Wert der eGFP-Triplettzeit ist allerdings nach Literaturangaben schwer vorzunehmen. So zitieren van Hulst et al. [71] die Arbeit von Visser et al. [72], die GFP-Triplettlebensdauer liege typischerweise zwischen 5 und 25 μsec . Bei diesen Angaben handelt es sich um Messungen einer Variante des GFP in wässriger Lösung bei verschiedenen Laserintensitäten. Je niedriger die gewählte Laserintensität, desto länger die gemessene Triplettlebensdauer und desto geringer der Triplettanteil an der ACF; die niedrigste, gemessene Laserintensitätsdichte war mit $6 \text{ kW}/\text{cm}^2$ doppelt so stark wie die hier gebrauchte Intensitätsdichte. Damit wäre von einer Triplettzeit von über 25 μsec auszugehen. Für die GFP-Variante YFP gibt es tatsächlich Angaben von 30 μsec [73]. Für eGFP nennen Wachsmuth et al. eine Triplettzeit von $9 \pm 1 \mu\text{sec}$ [74], Brock et al. hingegen 68 μsec [75]. In dieser Arbeit wurden Triplettzeiten von 20 und 30 μsec in die Auswertung einbezogen und die Fitergebnisse verglichen.

Übergänge zwischen fluoreszierenden und dunklen Fluorophorzuständen im Bereich einiger hundert Mikrosekunden sind weit schwieriger von diffusionsbedingten Komponenten der ACF zu differenzieren. Es scheint in diesem Zeitrahmen pH- und lichtinduzierte Übergänge zu geben. Die Zerfallszeiten pH-induzierter Übergänge des eGFP werden mit 300 - 340 μsec bei physiologischem pH angegeben [76]. Diese sind durch externe Protonierung der chromophoren Gruppe des Fluoreszenzproteins bedingt. Durch interne Protonenumlagerung hervorgerufene dunkle Zustände des eGFP scheinen durch die Intensität des Anregungslichts veränderbar. Die Zeitkonstante dieses Übergangs liegt bei $340 \pm 50 \mu\text{sec}$ [77, 78]. Der zugrundeliegende Prozeß ist allerdings wenig charakterisiert.

3.9 Fluorescence Recovery after Photobleaching

Die Technik der Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) wurde Mitte der 70er Jahre als eine Bleich-Technik vorgestellt, die es ermöglicht, die Dynamik fluoreszierender Moleküle auf der Plasmamembran der lebenden Zelle zu beobachten [79].

Bei dieser Bleich-Technik wird die Gleichgewichtsverteilung fluoreszierender Moleküle gestört und beobachtet, wie sich diese über die Zeit wiederinstellt: Mit hoher Laserintensität werden fluoreszierende Moleküle einer um-

schriebenen Region gebleicht und so räumlich getrennte Populationen fluoreszierender und nicht mehr fluoreszierender Moleküle geschaffen. Anschließend werden Verteilung und Austausch der gebleichten und der noch fluoreszierenden Moleküle durch Scannen der Probe mit niedriger Laserintensität sichtbar gemacht.

Obwohl schon 1976 die theoretischen und experimentellen Grundlagen der FRAP-Technik [80] entwickelt worden waren, erlangte diese Technik erst in den 90er Jahren weitere Verbreitung [81, 82, 83]. Dies ist vor allem begründet durch die Implementierung der FRAP-Technik in kommerzielle Laserscanningmikroskope, die Entdeckung und Optimierung fluoreszierender Markerproteine und die verbesserten Möglichkeiten der Datenverarbeitung:

- Die akusto-optischen Filter (AOTF) der konfokalen Laserscanningmikroskope (CLSM) ermöglichen das Modulieren der Laserintensität bis zum Eintausendfachen in jedem einzelnen Pixel innerhalb von Mikrosekunden und damit das Bleichen beliebig geformter Regionen und das rasche Umschalten zwischen Bleichscan und Bildaufnahme.
- Die gezielte Mutagenese des grün fluoreszierenden Proteins ergab eine stabile, bei niedriger Laserleistung nur wenig bleichende Variante hoher Quantenausbeute, die durch hohe Laserleistung nahezu irreversibel gebleicht werden kann (eGFP).
- Die wachsende Rechengeschwindigkeit und die vergrößerte Speicherkapazität erlauben die Bearbeitung großer Datenmengen, wie sie bei der Aufnahme ganzer Bilderserien entstehen.

3.9.1 Experimenteller Aufbau

Alle FRAP-Experimente dieser Arbeit wurden im Nikon Imaging Center der Universität Heidelberg an einem konfokalen Laserscanningmikroskop, dem C1Si, durchgeführt.

Objektivwahl

Es wurde ein Ölimmersionsobjektiv hoher Transmission und geringer Autofluoreszenz benutzt, das auf sphärische Aberration korrigiert ist, das Plan Fluor 40 x 1.3 NA. Vorteile einer relativ hohen numerischen Apertur sind höhere Detektionseffizienz und Auflösung; da ein Objektiv hoher numerischer Apertur den Laserstrahl besser fokussiert, wird das Bleichen außerhalb des Fokus, vor allem in der z-Achse, minimiert: Für dünnere Zellen (6 - 8 μm) oder Regionen geringer axialer Ausdehnung ist daher eine hohe numerische

Apertur zu wählen, für dickere Zellen, z.B. abgerundete mitotische Zellen, eher eine niedrigere numerische Apertur.

Bildaufnahme

Die untersuchten Zellen wurden mit 384 x 176 Pixeln vollständig abgebildet. Die gewählte Pixelgröße betrug 280 nm, die Pixelzeit 2,4 μ sec. Der AOTF wurde so eingestellt, daß das Scannen zur Bildaufnahme mit nur 0,1% der Laserintensität ausgeführt wurde. Bleichen allein durch die Bildaufnahme konnte ausgeschlossen werden. Vor dem Bleichscan wurden 10 Bilder aufgenommen, die keinen Fluoreszenzverlust der untersuchten Zellen erkennen ließen.

Die Lochblende des konfokalen Aufbaus wurde weit geöffnet - die von der Software angegebene Position „large“ entspricht nach Herstellerangaben etwa 102,6 μ m - und damit auf die Konfokalität des mikroskopischen Aufbaus bewußt verzichtet. So ist es nämlich möglich, mehr Signal aus der Tiefenausdehnung (z-Achse) der Probe zu detektieren. Je mehr Signal von der Probe gesammelt werden kann, desto besser ist die Abgrenzung gegen unspezifisches Hintergrundrauschen. Darüberhinaus kann man bei geöffneter Lochblende sicher sein, Signal aus der ganzen Ausdehnung des Zellkerns zu erhalten, und läuft nicht Gefahr, den gesamten Zellkern als ausgebleicht anzusehen, obwohl doch nur eine schmale Ebene in der z-Achse gebleicht ist.

Die computergestützte Verstärkung des detektierten Signals wurde so gewählt, daß maximal einige wenige Pixel Sättigung zeigten.

Mit den genannten Einstellungen konnten Aufnahmen mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gemacht werden, die es zudem erlaubten, einen großen Bereich von Signalintensitäten abzubilden. Ein Mitteln der Aufnahmen war nicht nötig.

Bleichscan

Die region of interest (ROI) wurde so gewählt, daß der Bleichscan den Zellkern homogen ausbleichte, die Laserintensität dabei mit 100% maximal gestellt. Der Zoomfaktor, der die Vergrößerung zwischen einfachem Bilderscan und Bleichscan angibt, war bei den einzelnen Zellen in etwa gleich, um auch damit die Laserintensität, der die entsprechenden Regionen ausgesetzt waren, in etwa gleich zu halten. (Die Laserintensität steigt mit dem Quadrat des Zoomfaktors, da sich mit größerem Zoom die Verweildauer des Lasers im jeweiligen Pixel verlängert.)

Um die relative Fluoreszenzintensität des Zellkerns auf etwa 20% zu reduzieren, waren unter den genannten Bedingungen bei den hochinvasiven Zellen

nur 8 Scaniterationen maximaler Intensität nötig, bei den nichtneoplastischen Zellen hingegen 16 solcher Iterationen.

Anschließend wurde alle 10 sec ein Bild mit 0,1% der Laserleistung aufgenommen, die Umverteilung der Fluoreszenz in den Zellen mit insgesamt 80 Bildern über 13 Minuten und 20 Sekunden verfolgt.

3.9.2 Auswertung der Bilderreihen

Die Bilder wurden im ics-Datenformat (16 bit) gespeichert und mit dem Programm ImageJ (NIH) ausgewertet. Für die quantitative Auswertung der Bilder wurden Regionen im Zellkern, Zytoplasma und extrazelluläres Medium festgelegt, die Fluoreszenzintensitäten in jedem Pixel integriert und als mittlerer Grauwert zu jedem Zeitpunkt bestimmt.

Der mittlere Grauwert einer jeden ROI enthält immer auch Hintergrundfluoreszenz bedingt beispielsweise durch umgebendes Medium, Objektträger und Objektiv. Daher muß die Hintergrundfluoreszenz, die im extrazellulären Medium bestimmt wird, von den ermittelten Intensitäten des Zellkerns und Zytoplasmas zu allen Zeitpunkten abgezogen werden.

Der mittlere Grauwert sollte nun proportional der Fluorophorkonzentration sein, und Intensitätsänderungen sollten die Bewegung der fluoreszierenden Moleküle zwischen gebleichter und ungebleichter Region widerspiegeln. Allerdings können auch die Bildaufnahme, Schwankungen der Laserleistung und Reversibilität des Bleichens zu Änderungen der ermittelten Intensität führen. Diese betreffen die gebleichten und die fluoreszierenden Bereiche der Zelle gleichermaßen; man kann daher die ermittelten Werte um diese Änderungen korrigieren, indem man die Intensität des Zellkerns zu jedem Zeitpunkt in Verhältnis zu der Gesamtzellintensität setzt.

Um verschiedene Experimente miteinander vergleichen zu können, müssen die Daten normalisiert werden. In diesem Fall wurden die Daten auf die relative Anfangsintensität normalisiert, die relativen Fluoreszenzintensitäten im Zellkern also wie folgt berechnet [84]:

$$F(t) = \frac{Roi(t) - BG(t)}{Tot(t) - BG(t)} \cdot \frac{Tot(t_0) - BG(t_0)}{Roi(t_0) - BG(t_0)}, \quad (3.23)$$

wobei $Roi(t)$, $Tot(t)$ und $BG(t)$ die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten des Zellkerns, des Zytoplasmas und des extrazellulären Hintergrunds zum Zeitpunkt t sind. Werden die ermittelten Werte der relativen Fluoreszenzintensität im Zellkern gegen die Zeit aufgetragen, erhält man das recovery-Profil jeder einzelnen Zelle. Durch Mitteln der Fluoreszenzintensitäten zu jedem Zeitpunkt können Mittelwertkurven berechnet werden.

Kinetikparameter der Fluoreszenzäquilibrierung

Die experimentell ermittelte, normalisierte Fluoreszenzintensität $F(t)$ kann mit folgender allgemeinen einfachen Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$F(t) = 1 - (a - b(1 - e^{-\lambda t})), \quad (3.24)$$

wobei a den Anteil der relativen Fluoreszenzintensität beschreibt, der gebleicht wird, b den Anteil, der über die Zeit t wiedergewonnen wird, und λ die Rate der Fluoreszenzerholung. Der Kehrwert von λ ist die recovery-Zeit τ , also die Zeit, die vergeht bis $2/3$ der anfänglichen relativen Fluoreszenzintensität wiedererlangt sind - sei es durch Transport des Fluoreszenzproteins in den Zellkern oder durch Export des nicht mehr fluoreszierenden Fusionsproteins aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Der Anteil dieser beiden Prozesse an der Fluoreszenzerholung läßt sich durch den genannten FRAP-Ansatz nicht bestimmen; lediglich der Netto-Import des fluoreszierenden Proteins in den Zellkern kann ermittelt werden.

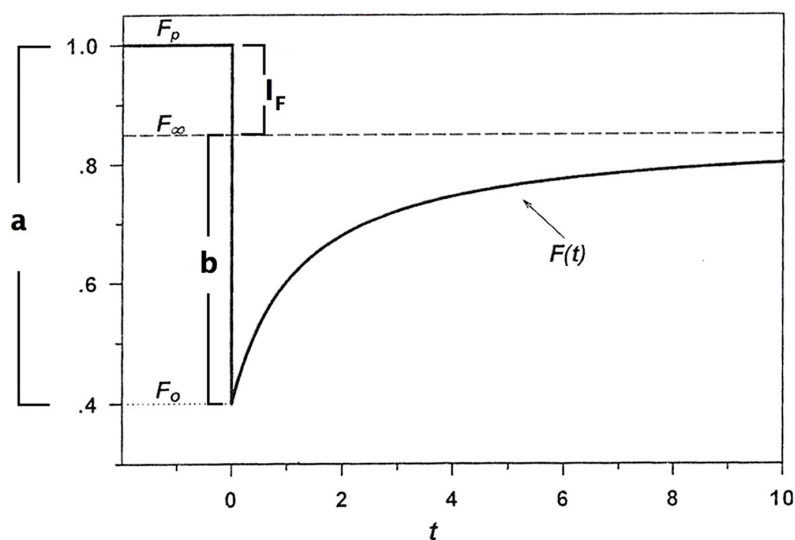


Abbildung 3.10: idealisierte FRAP-Kurve: a Anteil der relativen Fluoreszenzintensität, der gebleicht wird; b Anteil, der sich über die Zeit erholt; I_F die in der Zeitskala des Experiments immobilisierte Komponente; F_P die Anfangsintensität der Fluoreszenz; F_0 die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Bleichen; F_∞ die Fluoreszenzintensität, die endgültig erreicht wird; $F(t)$ die Funktion, die die Fluoreszenzerholung beschreibt; modifiziert nach [85]

Ist die relative Fluoreszenzintensität auf das Ausgangsverhältnis normalisiert, läßt sich aus den Parametern a und b die immobile bzw. nur sehr langsam austauschende Fraktion des Fusionsproteins in dem jeweilig untersuchten Kompartiment bestimmen:

$$I_F = a - b \quad (3.25)$$

Das ist also der Anteil des fluoreszierenden Fusionsproteins, der durch Austausch zwischen den untersuchten Kompartimenten in der Zeitskala des Experiments nicht oder nur sehr langsam ersetzt wird. Verwendet man nichtnormalisierte Daten, kann man die mobile Komponente M_F wie folgt berechnen:

$$M_F = \frac{F(\infty) - F(0)}{F(P) - F(0)} \quad (3.26)$$

wobei $F(\infty)$ die endgültig erreichte Fluoreszenzintensität ist, $F(0)$ die Fluoreszenzintensität unmittelbar nach dem Bleichen und $F(P)$ die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen. Die immobile Komponente ist dann folglich:

$$I_F = 1 - M_F \quad (3.27)$$

Oft wird aus den recovery-Profilen der Diffusionskoeffizient D bzw. - bei der FRAP-gestützten Betrachtung biologischer Substanzen in biologischen Systemen präziser - der scheinbare oder effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} berechnet⁴. Dazu müssen theoretische Diffusionsmodelle definiert werden, die die experimentellen Bedingungen, also beispielsweise die Geometrie der untersuchten Region, und das betrachtete biologische System, also beispielsweise aktive oder passive Transportprozesse, in der gewählten mathematischen Formulierung berücksichtigen und so geeignet sind, die experimentellen Daten zu beschreiben.

Die ursprünglich von Axelrod et al. [80] entwickelte photobleaching-Theorie beschreibt die zweidimensionale Diffusion eines fluoreszierenden Moleküls in einen etwa $10 \mu m^2$ großen, gebleichten Punkt hinein, ein Gauss'sches Intensitätsprofil des Lasers vorausgesetzt.

Lippincott-Schwartz et al. bleichten einen schmalen Streifen, um die Diffusion von Proteinen in dem zweidimensionalen Membrannetzwerk des Endoplasmatischen Retikulums zu bestimmen. Die Parameter einer theoretischen

⁴Da die Diffusionseigenschaften einer biologischen Substanz in einem biologischen System nicht nur durch ihre Größe, die Temperatur und Viskosität des umgebenden Mediums bestimmt, sondern stark durch vielfältige Bindungen an verschiedene Interaktionspartner beeinflusst werden und da die Technik der FRAP weniger sensitiv als die FCS ist, transiente Bindungen und freie Diffusion zeitlich aufzulösen, scheint es richtiger, in diesem Zusammenhang von einem scheinbaren oder effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} zu sprechen.

Funktion, die eindimensionale Diffusion beschreibt, wurden an die experimentellen Daten angepaßt. Computersimulationen konnten zeigen, daß die Anpassung an den ersten Teil der Kurve eine gute Annäherung des Diffusionskoeffizienten ergibt [86, 87]. Diese Methode wurde von Houtsmuller et al. auch für die Beschreibung dreidimensionaler Diffusion im Zellkern benutzt, wobei es jedoch aufgrund der unregelmäßigen Struktur des Zellkerns durchaus möglich ist, daß der tatsächliche Wert des Diffusionskoeffizienten vom ermittelten etwas abweicht [88].

Da es im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie darauf ankam, zwei verschiedene Zellsysteme zu vergleichen, ohne absolute Werte des Zellkernimports in Form eines Transportkoeffizienten zu ermitteln, wurde darauf verzichtet, D_{eff} zu bestimmen. Die registrierten recovery-Profile wurden anhand Gleichung 3.24 rein phänomenologisch beschrieben.

3.9.3 Fehlerquellen

Das Bleichen der Fluorophore soll idealerweise vollständig, irreversibel und augenblicklich sein:

- vollständig, damit der Kontrast zwischen gebleichter und fluoreszierender Region maximal ist und Änderungen der Fluoreszenz gut zu detektieren sind,
- irreversibel, damit die detektierte Fluoreszenzzunahme tatsächlich auch durch Umverteilung fluoreszierender Moleküle in die zuvor gebleichte Region bedingt ist,
- und augenblicklich, damit nicht schon während des Bleichens fluoreszierende Moleküle aus dem Fokus diffundieren und so um die gebleichte Region eine Korona vermindelter Fluoreszenz entsteht.

Reversible dunkle Zustände des eGFP

Reversible dunkle Zustände des verwendeten Fluoreszenzproteins können Anlaß zu Fehlinterpretationen von FRAP-Daten sein. Hierbei gewinnen bereits gebleichte Fluorophore die Fähigkeit zu fluoreszieren nach einiger Zeit wieder. Die Fluoreszenzerholung in der region of interest wird dadurch beschleunigt und die aus der Geschwindigkeit der Fluoreszenzzunahme abgeleitete Mobilität fluoreszierender Proteine überschätzt.

Unter den autofluoreszierenden Markerproteinen ist die Mutante des enhanced green fluorescent protein, eGFP (F64L/S65T), wohl die am besten geeignete.

Der weit überwiegende Teil des Proteins wird durch hohe Laserintensität irreversibel gebleicht. Da die photophysikalischen Grundlagen des Bleichens autofluoreszierender Proteine nicht vollständig bekannt sind, ist auch die Charakterisierung der genannten Reversibilität nicht erschöpfend: Der Vorgang des Bleichens wird mit dem Übergang des fluoreszierenden Moleküls vom angeregten Singulettzustand in einen angeregten Triplettzustand in Verbindung gebracht. Es ist nun möglich, daß einige Fluorophore innerhalb von Mikrosekunden wieder in den Singulettzustand übergehen, damit also wieder in der Lage sind zu fluoreszieren. Auch von anderen triplettunabhängigen dunklen Zuständen wird berichtet. Diese sollen Relaxationszeiten im Bereich einiger hundert Mikrosekunden haben [76, 77, 78].

Da allerdings die Fluoreszenzzunahme in den vorgestellten Experimenten über einen deutlich längeren Zeitraum beobachtet wurde, ist die Fluoreszenzzunahme durch rasch reversible dunkle Zustände des Fluorophors gut von der Fluoreszenzzunahme durch Umverteilung fluoreszierender Proteine zu trennen. Derartige reversible dunkle Zustände des Fluorophors tragen lediglich im erstem Bild nach Bleichen zur Fluoreszenzerholung bei.

Problematischer sind Fluktuationen zwischen dunklen und fluoreszierenden Zuständen, die Sekunden dauern [71, 89]. Es wird davon berichtet, daß die Anzahl der Proteine in diesen dunklen Zuständen von der Scan- bzw. Belichtungsfrequenz abhängt [84]. Um den Anteil dieser dunklen Zustände konstant zu halten, wurde die Scan- bzw. Belichtungsfrequenz während des Beobachtungszeitraums dieser FRAP-Experimente nicht variiert: Alle 10 sec wurde ein Bild aufgenommen.

Endliche Zeit des Bleichvorgangs

Allein das Modulieren der Laserintensität, das Öffnen und Schließen der Shutter braucht Zeit. Je länger der Vorgang des Bleichens dauert und je schneller sich die untersuchten Proteine bewegen, desto mehr gebleichte Proteine können schon während des Bleichens die ROI verlassen und umso größer wird die Korona verminderter Fluoreszenz um die region of interest. Mit größerer Korona nimmt auch die Strecke zu, die noch fluoreszierende Proteine zurücklegen müssen, um in die ROI zu gelangen: Die gemessene recovery-Zeit nimmt zu, der effektive Diffusionskoeffizient wird unterschätzt [90]. Axelrod et al. gaben eine Zeitgrenze für den Bleichvorgang an: Die zum Bleichen benötigte Zeit solle weniger als 10% der recovery-Zeit betragen [80].

Da in den vorgestellten Untersuchungen die Kernhülle eine deutliche Diffusionsbarriere darstellt und die beobachteten recovery-Prozesse mehrere hundert Sekunden dauern, dürfte die zum Bleichen benötigte Zeit keine Fehlerquelle darstellen.

Phototoxizität und lokale Erwärmung

Obwohl viele Untersuchungen zu belegen suchen, daß die hohe Laserintensität während des Bleichens keine oder zu vernachlässigende Effekte auf lebende Zellen hat, ist die Möglichkeit der Phototoxizität nicht ausgeschlossen. Die autofluoreszierenden Proteine haben gegenüber chemischen Fluorophoren den Vorteil, daß sich die drei chromophoren Aminosäuren abgeschirmt in einer faßförmigen Struktur befinden. Mögliche Radikale werden davon abgefangen.

Die lokale Erwärmung beträgt weniger als $0,5^{\circ}\text{C}$ und ist damit wohl zu vernachlässigen [91].

3.10 Vergleich FRAP und FCS

Die hier verwendeten Techniken zur Kinetikanalyse fluoreszierender Proteine in lebenden Zellen, FCS und FRAP, sind in Theorie und experimenteller Durchführung durchaus ähnlich; und wo sie sich unterscheiden wie beispielsweise in ihrer zeitlichen Auflösung, ist ihre Information komplementär zu nutzen. Im folgenden soll dies näher beschrieben werden.

In beiden Techniken wird die Anzahl der Moleküle, die durch eigene Fluoreszenz oder die ihres Fluorophormarkers spezifiziert sind, in einem definierten Beobachtungsvolumen als Funktion der Zeit gemessen. Beide Techniken nutzen damit die Selektivität und Sensitivität der Fluoreszenzspektroskopie. Beide sind Methoden, Raten einfacher Transportprozesse oder Raten chemischer Reaktionen, die an Transportprozesse gekoppelt sind, zu bestimmen. Grundlage ist das Postulat Onsagers, die Regression mikroskopischer, spontaner Fluktuationen zurück zum Äquilibrium werde durch dieselben phänomenologischen Gesetze bedingt wie die Regression makroskopisch erzeugter Auslenkungen zum Äquilibrium [92]. Die in der FCS detektierten Fluktuationen, die durch einzelne Fluorophormoleküle hervorgerufen werden, werden oft mikroskopisch genannt und die bei FRAP registrierten Bewegungen ganzer Molekülpopulationen als makroskopisch abgegrenzt. Die Rückkehr makroskopisch ausgelenkter Systeme zum Gleichgewicht wird durch klassische Transportkoeffizienten oder Reaktionskonstanten deterministisch bedingt, wohingegen die mikroskopischen Fluktuationen um einen Mittelwert rein probabilistisch mit diesen verknüpft sind. Dies erfordert eine statistische Auswertung vieler einzelner Fluktuationen, wohingegen die Aufzeichnung eines einzelnen recovery-Prozesses prinzipiell genügt [93].

Werden beide Techniken genutzt, um Informationen über die Dynamik des betrachteten Systems zu erhalten und beispielsweise den Diffusionskoeff-

fizienten zu bestimmen, sind auch die verwendeten theoretischen Formulierungen ähnlich. Bei FRAP ist allerdings anders als bei der FCS die initiale Störung des Äquilibriums zu berücksichtigen. Eine detaillierte Beschreibung findet sich bei Petersen et al. [93].

Sind beide Techniken hinsichtlich ihrer Dynamikinformation äquivalent, enthalten beide darüberhinaus jedoch auch eine Mengeninformaton, die sich aus der Amplitude der registrierten Prozesse ergibt und die in beiden Techniken differiert: Die FCS gibt Aufschluß über die Anzahl unabhängig diffundierender Teilchen und deren Assoziationsgrad, FRAP quantifiziert den mobilen Anteil fluoreszierender Moleküle bzw. den in der Zeitskala des Experiments immobilisierten Teil.

Der grundlegende Unterschied beider Techniken, die nötige initiale Störung der Gleichgewichtsverteilung fluoreszierender Moleküle bei der FRAP-Technik, beinhaltet auch den experimentellen Nachteil dieser Technik. Es ist nicht ausgeschlossen, daß die hohe Laserintensität des Bleichens letztlich unbekannt photochemische Prozesse auslöst und die Eigenschaften der Zelle so verändert werden. (Dennoch ist es wichtig herauszustellen, daß durch das initiale Bleichen lediglich die Fluoreszenzverteilung, nicht aber der steady state zellulärer Proteine gestört wird.)

Für FRAP-Messungen sind höhere Fluoreszenzintensitäten, damit also höhere Fluorophorkonzentrationen erforderlich als bei der FCS. Die größere Menge exprimierter Fusionsproteine könnte die untersuchten Zellen stärker belasten und dadurch zelluläre Abläufe verändern, somit also ein weiterer Nachteil der FRAP gegenüber der FCS sein. Wohingegen die größere Sensitivität der FCS auch Grund von Fehlinterpretationen sein kann (s. 3.8.3).

In der zeitlichen Auflösung ergänzen sich die beiden experimentellen Ansätze: Die FCS ist besonders geeignet für schnelle dynamische Prozesse. Aussagen über Dynamiken im Nanosekundenbereich sind theoretisch möglich, in dieser Arbeit wurden allerdings nur die Informationen im Mikro- und Millisekundenbereich genutzt. FRAP-Messungen hingegen sind gut zur Charakterisierung langsamer dynamischer Prozesse. Hiermit wurden Kinetiken im Sekunden- bis Minutenbereich bestimmt.

Kapitel 4

Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen bildgebenden Methoden und der Techniken der Kinetikanalyse dargestellt. Die eigenen Befunde werden jeweils direkt in Bezug gesetzt zu den Daten der Literatur. Dies geschieht in der Absicht, bei der Vielzahl der Einzelergebnisse die Verständlichkeit des Dargestellten zu gewährleisten und es dem Leser zu erleichtern, die Relevanz der gewählten Methodiken und der damit erhobenen Ergebnisse abzuschätzen.

4.1 Lokalisation des CapG-Proteins in der lebenden Zelle

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Verteilung des CapG-Proteins erstmals in der lebenden Zelle.

Um das CapG-Protein sichtbar zu machen, wurde die cDNA des humanen CapG am 3'-Ende mit der cDNA des autofluoreszierenden eGFP (enhanced green fluorescent protein) gekoppelt. Die mit diesem DNA-Konstrukt transfizierten Zellen exprimieren in der Folge neben dem zelleigenen CapG das CapG-eGFP-Fusionsprotein.

Das CapG-eGFP-Fusionsprotein verteilt sich diffus im Zytoplasma und im Zellkern (Abb. 4.1). Die beobachtete Verteilung in der lebenden Zelle stimmt gut mit der berichteten Lokalisation des CapG in fixierten Zellen überein [4, 8]. Soweit also lichtmikroskopisch beurteilbar, beeinträchtigt die eGFP-Markierung die Lokalisation des CapG-Proteins in der Zelle nicht, und das Fusionsprotein verteilt sich wie das endogene Protein.

Dies kann Hinweis sein, daß die Fusion des relativ kleinen CapG-Proteins (39 kDa) mit dem nahezu gleich großen, autofluoreszierenden Protein eGFP (27 kDa) die Eigenschaften des CapG nicht allzu sehr verändert. Wichtig

ist allerdings, das CapG-Protein C-terminal mit einem autofluoreszierenden Protein zu koppeln, nicht N-terminal. Die N-terminale Markierung – so wird berichtet – zeitigt eine deutliche Fehllokalisierung des Proteins: Es reichert sich dann nicht mehr im Zellkern an [94]. Der Grund dieser Fehllokalisierung ist nicht bekannt. Viele Proteine haben zwar N-terminal Signalsequenzen, die die richtige Verteilung des Proteins in der Zelle gewährleisten und die ein N-terminal angehängtes Fluoreszenzprotein funktionell beeinträchtigen könnte, doch ist bei dem CapG-Protein die Zellkernimport entscheidende Aminosäuresequenz noch nicht identifiziert [4, 18, 19]. Bisher konnten bei den Mitgliedern der Gelsolinproteinfamilie N-terminal nur Aminosäurereste bestimmt werden, die den Export entsprechender Proteine aus dem Zellkern in das Zytoplasma sichern. Diese aber fehlen dem CapG [8].

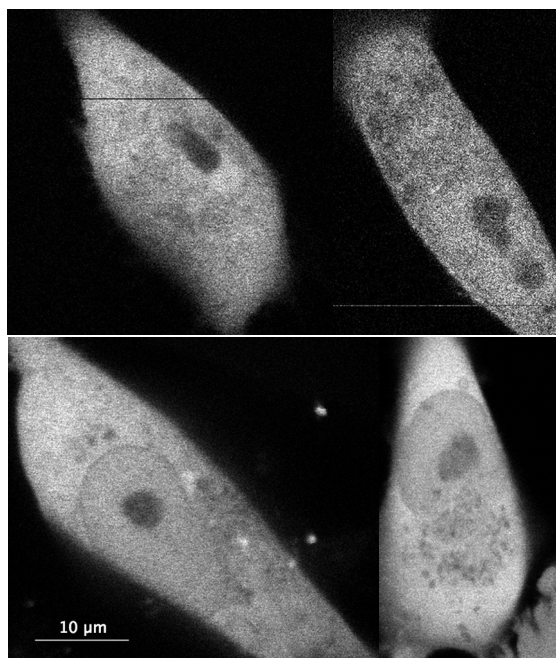


Abbildung 4.1: obere Reihe: MCF-12A-Zellen transient und stabil CapG-eGFP exprimierend; untere Reihe: MDA-MB-231-Zellen transient und stabil CapG-eGFP exprimierend

Die beiden Modellzelllinien nichtneoplastischer Brustepithelzellen und hochinvasiver, metastasierender Mammakarzinomzellen wurden mit dem CapG-eGFP-DNA-Konstrukt transient transfiziert. Unter dem Selektionsdruck des Zellgifts G418 gelang es auch, Zellen zu isolieren, die die genetische Information des Fusionsproteins und eine daran gekoppelte G418-Resistenz dauerhaft

in das zelleigene Genom integrierten und damit das Fusionsprotein stabil exprimieren.

Aus der bloßen Betrachtung der konfokalen Bilder der nichtneoplastischen Brustepithelzellen und der invasiven Mammakarzinomzellen ist kaum ein Unterschied dieser beiden Zelltypen abzuleiten. Im direkten Vergleich der beiden Zelllinien fällt lediglich auf, daß die nichtneoplastischen Zellen im Zellkern eine etwas stärkere Fluoreszenz zeigen als die neoplastischen Zellen. Das Fluoreszenzverhältnis Zellkern zu Zytoplasma scheint bei den neoplastischen Zellen ein wenig zugunsten des Zytoplasmas verschoben zu sein.

Gelsolin in der lebenden Zelle

Es heißt, das CapG-Protein akkumuliere als einziges der Gelsolin-verwandten Aktin-bindenden Proteine im Zellkern. Um diesen Unterschied der Verteilung auch in der lebenden Zelle zu bestätigen, wurde der namensgebende Vertreter dieser Proteinfamilie, das Gelsolin selbst, C-terminal mit einem autofluoreszierenden Protein markiert. Für die Untersuchungen wurde die zytoplasmatische Variante des humanen Gelsolin gewählt, nicht die sezernierte. Stabil CapG-mRFP exprimierende Zellen wurden mit Gelsolin-eGFP transient transfiziert. So war es möglich, in ein und derselben Zelle die Lokalisation der beiden Proteine *in vivo* zu betrachten.

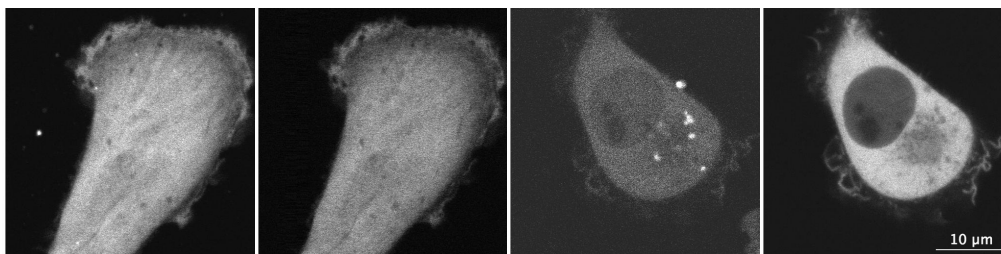


Abbildung 4.2: MDA-MB-231-Zellen stabil CapG-mRFP und transient Gelsolin-eGFP exprimierend

Es fällt schwer, Unterschiede im Verteilungsmuster des Gelsolin und des CapG im Zytoplasma auszumachen. Die zytoplasmatische Lokalisation beider Proteine scheint sehr ähnlich zu sein. Wohingegen im Zellkern deutlich weniger markiertes Gelsolin zu sehen ist als CapG. Die nukleären Importsysteme des Gelsolin sind offenbar weniger wirksam bzw. dessen Exportsysteme effizienter als entsprechende Systeme des nur halb so großen CapG. Bei beiden Proteinen, CapG und Gelsolin, gibt es kein klassisches NLS (nuclear localization signal) [18].

β -Aktin in der lebenden Zelle

Wie es die Bezeichnung der Gelsolinfamilie als Aktin-bindende Proteine anzeigt, wird das β -Aktin nichtmuskulärer Zellen als Hauptinteraktionspartner des CapG-Proteins angesehen. Auch β -Aktin wurde mit autofluoreszierenden Proteinen gekoppelt und auch in diesem Fall wurden Zelllinien, die grün markiertes Aktin stabil produzieren, isoliert.

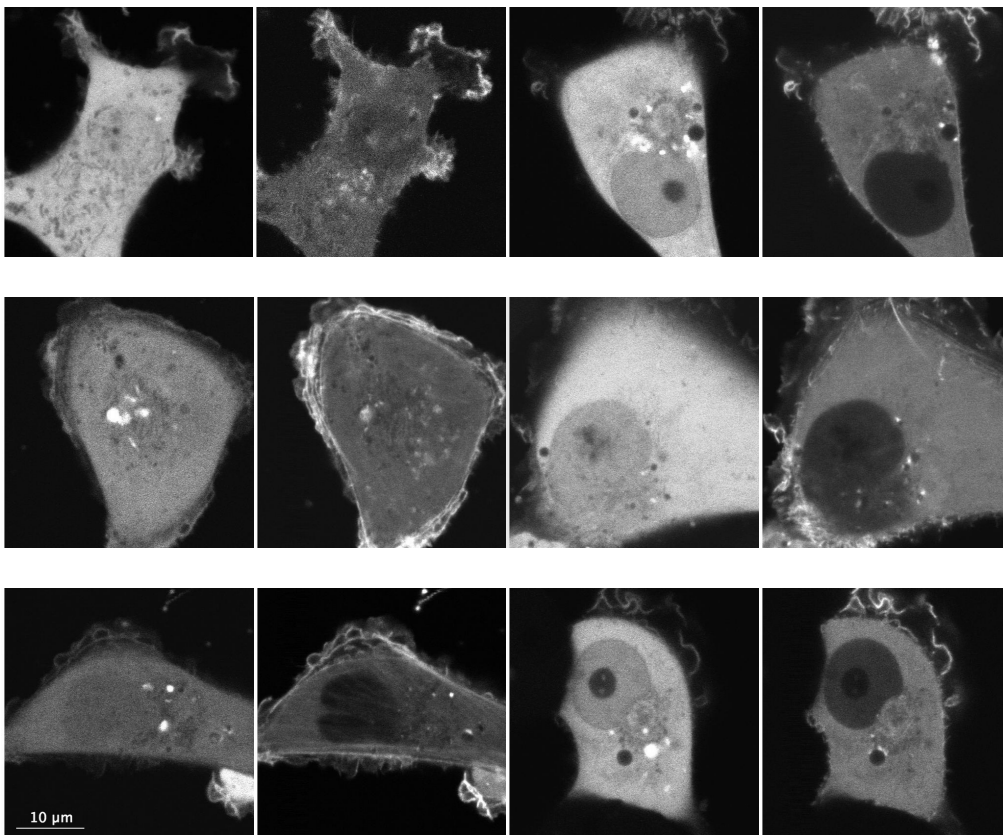


Abbildung 4.3: MDA-MB-231-Zellen stabil CapG-mRFP und transient eGFP-ACTB exprimierend

Die Abbildungen 4.3 und 4.5 geben Beispiele von Mammakarzinomzellen, die fluoreszierendes CapG und Aktin exprimieren. Ähnlich dem Gelsolin ist auch ein wenig Aktin im Zellkern zu finden. Da sich in den letzten Jahren die Nachweise nukleären β -Aktins mehren, ändert sich die klassische Auffassung zunehmend, das β -Aktin sei ein rein zytoplasmatisches Zytoskelettprotein.

Die Organisation des β -Aktin in Streßfasern erscheint in den dargestellten Beispielen in der Zellperipherie betont. Im Gesamtzytoplasma aber sind

Streßfasern relativ selten. In einer Studie von 1995 postulierten Yin et al. einen Zusammenhang zwischen der CapG-Überexpression und der abweichenden Organisation von Aktinstreßfasern [22]. Die transiente CapG-Überexpression wurde durch ein DNA-Konstrukt erzielt, das einen CMV-Promotor enthielt. So behandelte Fibroblasten exprimierten CapG etwa 25-mal stärker. Fixiert zeigten diese Zellen weniger Aktinfasern perinukleär, mehr aber in der Zellperipherie. Als Vergleich dienten nichttransfizierte Zellen.

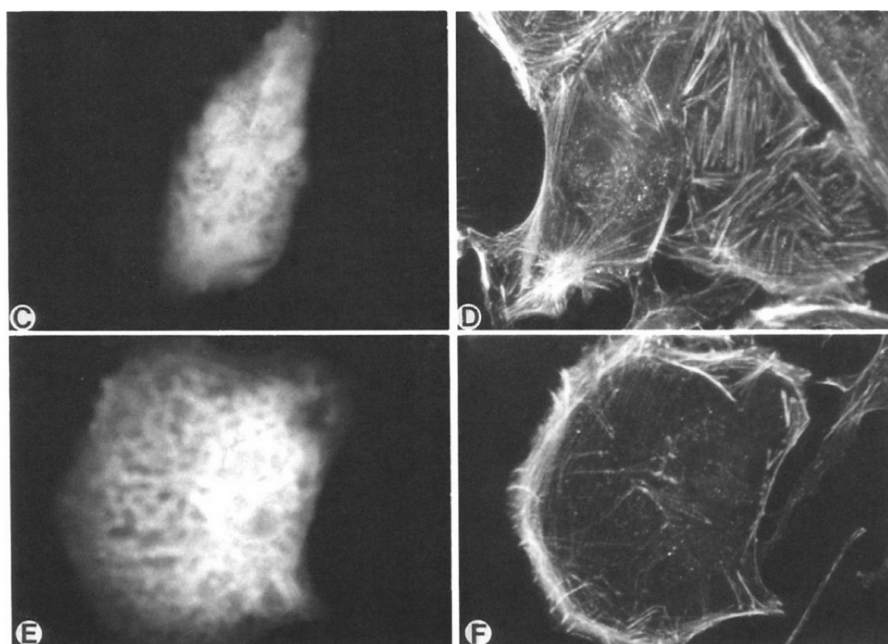


Abbildung 4.4: Mausfibroblasten CapG stark überexprimierend; Immunhistochemie: links CapG- und rechts Aktin-Phalloidin-Färbung [22]

In der Abbildung 4.5 sieht man eGFP-ACTB stabil exprimierende Mammakarzinomzellen. Eine der dargestellten Zellen ist zudem transient mit rotfluoreszierendem CapG transfiziert. Zwischen der CapG-mRFP kotransfizierten Zelle und den nur eGFP-ACTB exprimierenden Zellen ist kein deutlicher Unterschied in der Zytoskelettorganisation auszumachen. Doch fällt in beiden Zelltypen auf, daß die Zytoskelettorganisation ähnlich der von Yin et al. beschriebenen ist: Streßfasern sind in der Peripherie betont, im Gesamtzytoplasma selten. Grund dieses abweichenden Zytoskelettaufbaus könnte die konstitutive CapG-Überexpression der Mammakarzinomzellen sein; die zusätzliche Expression des CapG-Fusionsproteins ruft hingegen keine weitere augenscheinliche Änderung hervor. (Zumal in diesen Transfektionsstudien der schwächere Promotor des SV 40-Virus genutzt wurde.)

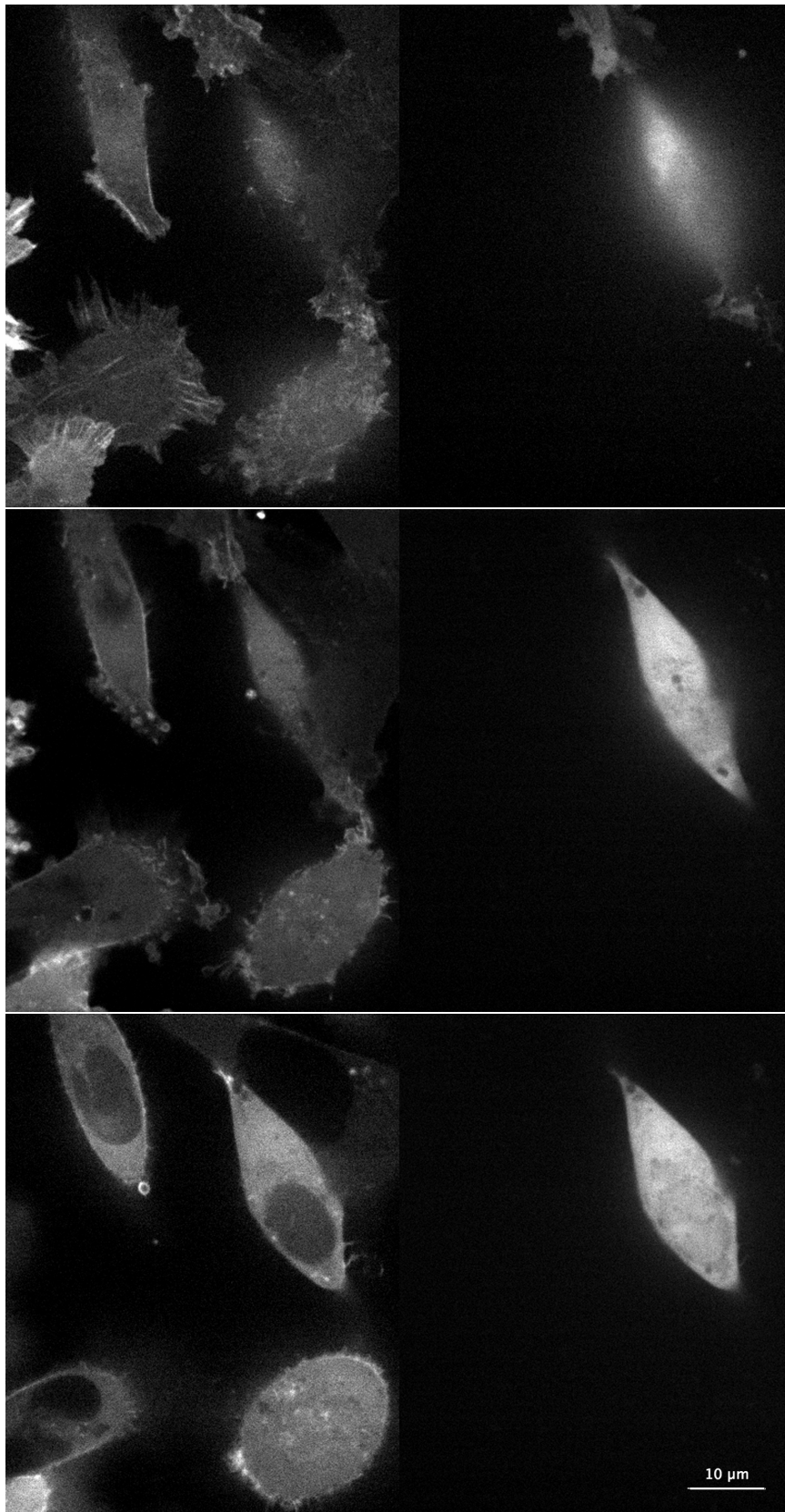


Abbildung 4.5: Z-Stapel: MDA-MB-231 GFP-ACTB stabil exprimierend transient mit CapG-mRFP transfiziert

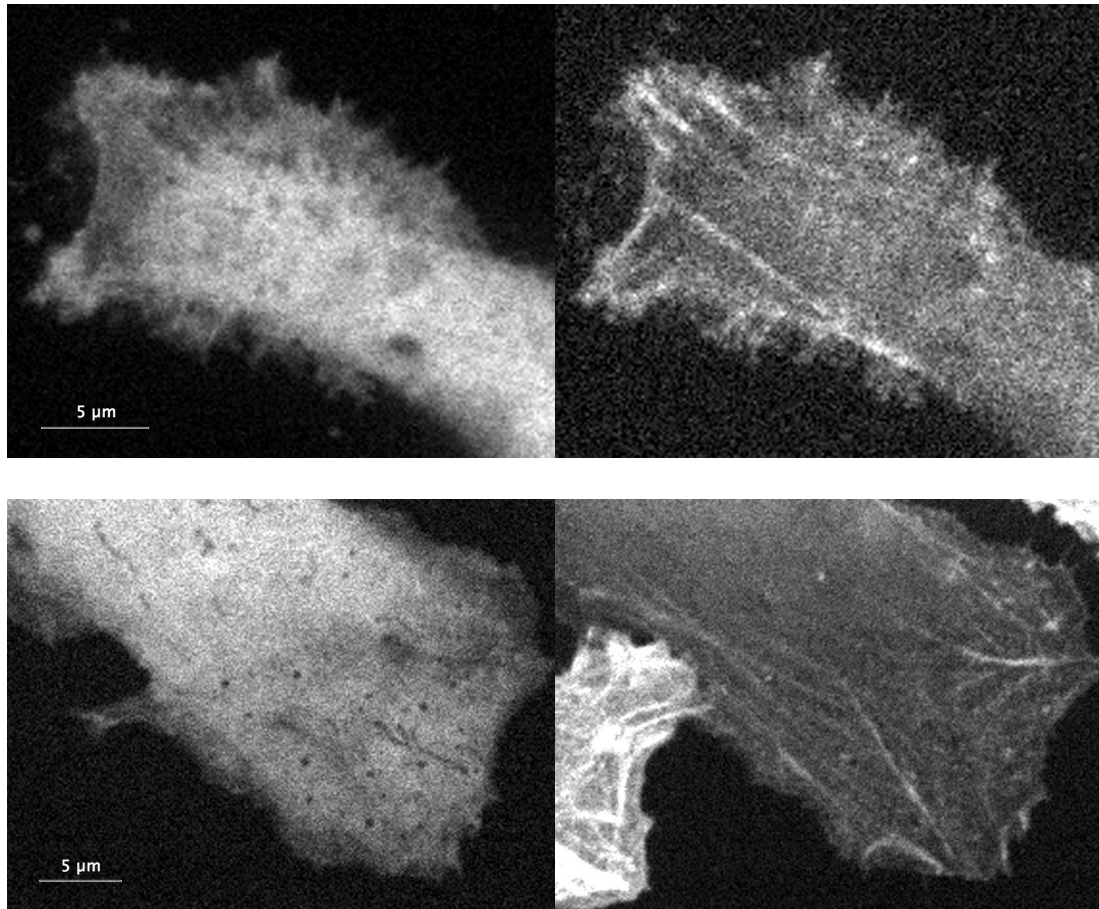


Abbildung 4.6: MDA-MB-231-Zellen (Detailaufnahmen): obere Reihe stabil CapG-eGFP und transient mRFP-ACTB exprimierend; untere Reihe transient CapG-mRFP und stabil eGFP-ACTB exprimierend

Bei genauerer Betrachtung der kotransfizierten Zellen erscheint eine Assoziation des CapG an Aktinstreiffasern selten und unregelmäßig (s. Abb. 4.6). Manchmal ist eine Kolo-kalisation in Streiffasern oder der „leading edge“ zu bemerken, meist aber scheint das CapG diffus und ohne eindeutige Assoziation zu Aktin-fasern verteilt zu sein. In Abbildung 4.7 ist sogar ein nahezu komplementäres Färbungsmuster zu erkennen.

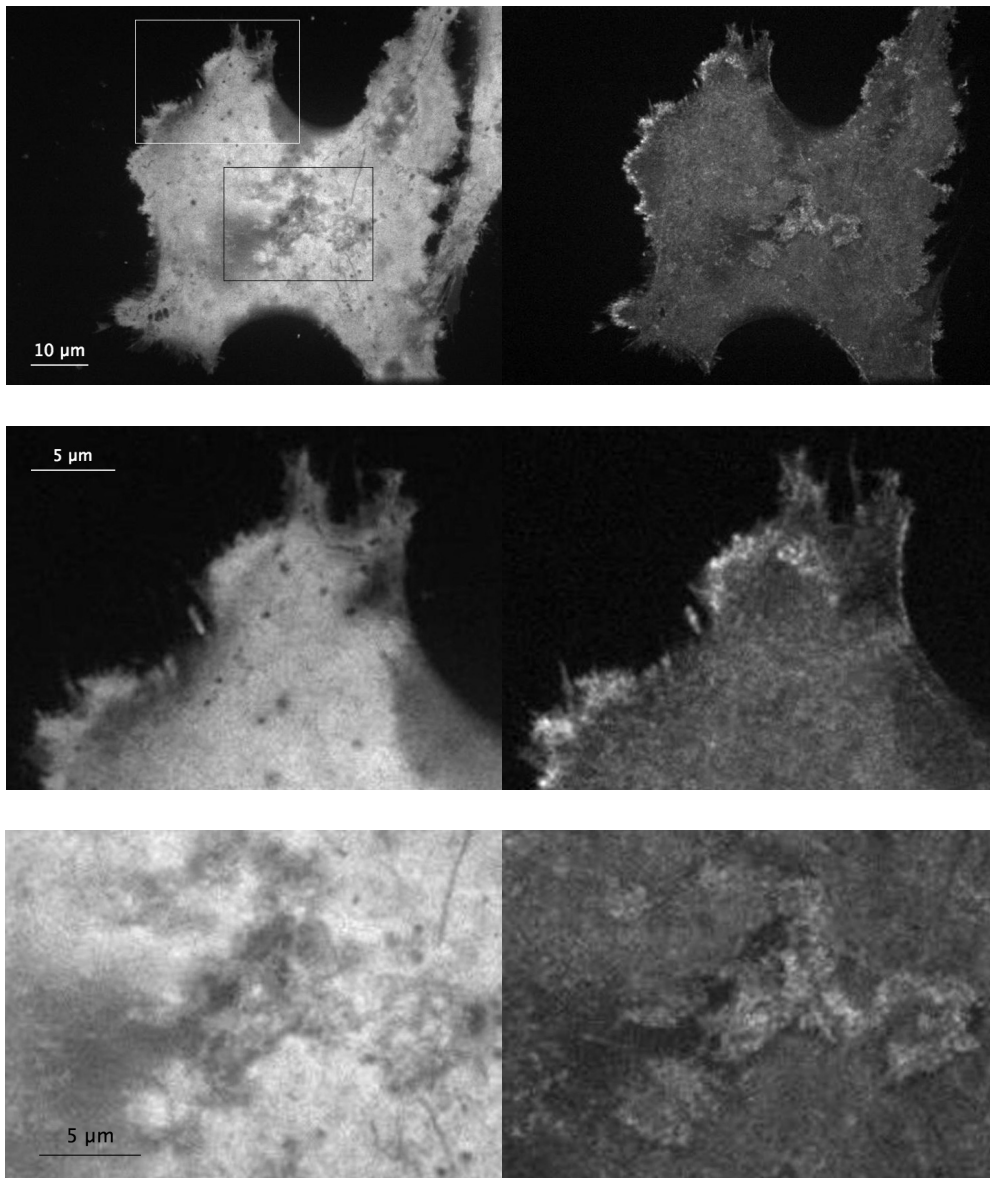


Abbildung 4.7: MDA-MB-231-Zelle: stabil CapG-eGFP und transient mRFP-ACTB exprimierend; Übersicht und zwei verschiedene Detailvergrößerungen: In der unteren Detailaufnahme ist ein nahezu komplementäres Verteilungsmuster von CapG (li) und Aktin (re) zu sehen.

4.2 Funktionalität des CapG-eGFP in der lebenden Zelle

Neben dem Vergleich der statischen Verteilung des fluoreszierenden Fusionsproteins und des endogenen Proteins können Untersuchungen der Funktion bzw. der Teilfunktionen Hinweise geben, ob die Markierung mit einem autofluoreszierenden Protein die molekularen Eigenschaften des jeweils beobachteten Proteins verändert. Geeignet wäre beispielsweise ein Vergleich des nativen und des fusionierten CapG im Pyren-Aktin-Assay (s. 2.2).

Da sich diese Arbeit aber besonders auf die Dynamik zellulärer Prozesse und die Kinetik makromolekularer Abläufe in lebenden Zellen konzentriert, wurde angestrebt, einen experimentellen Ansatz zu finden, der es ermöglicht, die Funktion des CapG-Proteins und damit auch des entsprechenden Fusionsproteins in lebenden Zellen zu bestimmen.

4.2.1 Invasivitätsstudien

Aus vielen Untersuchungen unterschiedlicher benigner Zelltypen wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression des CapG-Proteins und der Motilität entsprechender Zellen deutlich. Helen Yin, eine der Erstbeschreiber des Proteins, spricht gar von der etablierten Rolle des CapG-Proteins bei der Zellmotilität benigner Zellen [21].

Das Aktin-bindende Protein CapG hat nicht nur bloß Anteil an der Kontrolle der Aktin-basierten Zellmotilität nichtmuskulärer Zellen, vielmehr scheint der Expressionsgrad des CapG-Proteins für den Grad zellulärer Motilität entscheidend zu sein. Wird das Protein vermehrt gebildet, nimmt die Bewegungsfähigkeit benigner Zellen zu.

Über die Bedeutung des CapG bei Invasivität und Metastasierungsfähigkeit tumoröser Zellen ist dagegen wenig bekannt. Doch mehren sich die Hinweise, daß das CapG-Protein auch in malignen Zellen Motilität fördert, damit also auch an dem Zugewinn von Invasivität und Metastasierungsfähigkeit maligner Zellen beteiligt sein könnte. Bei einigen Tumorentitäten wurde von einer verstärkten Expression des CapG berichtet. Die Daten der Expressionsanalyse von Mammakarzinomen wurden referiert. Darüberhinaus ist das CapG-Protein wohl besonders stark in metastasierenden Mammakarzinomen exprimiert (Niederacher, unpublizierte Daten).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modellsystem nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepithelzelllinien ausgewählt: Die nichtneoplastischen, dem normalen Brustepithel ähnlichen Zellen (MCF-12A) zeigen normale Expressionslevel des CapG, die hochinvasiven, metastasierenden Mammakarzi-

nomzellen (MDA-MB-231) exprimieren das CapG-Protein besonders stark. Mit dem Matrigel-Invasionsassay kann man die nichtneoplastischen, nichtinvasiven Zellen von den neoplastischen, invasiven unterscheiden. Anders als in einem Migrationsassay müssen die Zellen zusätzlich eine rekonstituierte Basalmembran überwinden. Hierbei ist nicht nur die Modulierbarkeit des Zytoskeletts, der rasche Auf- und Abbau entsprechender Polymersysteme wichtig, sondern auch die Fähigkeit der Zellen, bestimmte Basalmembranbestandteile abzubauen, um sich so den Weg zu bahnen.

Grundvoraussetzung des Modellsystems ist, daß die MCF-12A als nicht-neoplastische Brustepithelzellen die Membran dieses Assays nicht, die MDA-MB-231 als hochinvasive Karzinomzellen diese Membran dagegen sehr wohl durchwandern. Dies ist bei den nativen Zelllinien gegeben.

Da nun die Invasivität als Funktion des CapG angenommen wird, galt es zunächst zu bestimmen, ob sich durch die Fusion mit einem Fluoreszenzprotein die Invasivität CapG-eGFP exprimierender Zellen ändert. Also wurde die Invasivität CapG-eGFP stabil exprimierender MCF-12A- und MDA-MB-231-Zellen analysiert.

Die MCF-12A sind, obwohl sie das CapG-eGFP-Protein exprimieren, nicht invasiv. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, in denen keine Zellen die Membran durchwanderten. Dies erscheint wichtig, da es Veröffentlichungen gibt, die eine CapG-eGFP getriggerte Invasivität benignen Zellen postulieren. Der dort gebrauchte Begriff von Invasivität bezieht sich allerdings eher auf die Fähigkeit benigner Zellen, auf Oberflächen und durch extrazelluläre Matrices zu wandern und ist daher besser als Migration zu beschreiben. Grundvoraussetzung der Invasivität und Metastasierung epithelialer Tumore ist die Fähigkeit maligner Zellen, Basalmembranen zu durchdringen.

CapG-eGFP stabil exprimierende MDA-MB-231 zeigen im Matrigel-Invasionsassay eine den nativen MDA-MB-231-Zellen vergleichbare Invasivität (s. Abb. 4.8). Die zusätzliche Expression des CapG-eGFP-Fusionsproteins scheint die Invasivität der MDA-Zellen nicht zu beeinträchtigen.

CapG-knockdown

Mit drei siRNA-Molekülen wurde die mRNA und entsprechend das CapG-Protein in CapG-eGFP stabil exprimierenden Mammakarzinomzellen reduziert. Die siRNA wurde jeweils in 2,5 nM und 5 nM Endkonzentration appliziert, eine unbehandelte Positivkontrolle mitgeführt (stabil CapG-eGFP exprimierende MDA-MB-231).

Die Effektivität dieses knockdown konnte über die abnehmende Fluoreszenzintensität der Zellen verfolgt werden. Es ergab sich eine Reduktion der

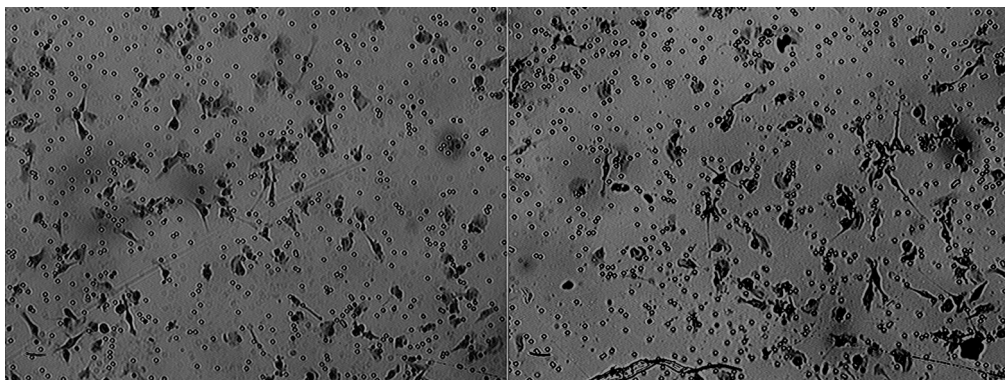


Abbildung 4.8: Vergleich der Invasivität nativer (li) und CapG-eGFP stabil exprimierender (re) MDA-MB-231-Zellen; fixierte Zellen im Matrigel-Invasionsassay; 100-fache Vergrößerung

mittleren Fluoreszenz um $84,7 \pm 1,3\%$ bei der 2,5 nM konzentrierten siRNA. Ein Unterschied zu der höher konzentrierten siRNA war nicht detektierbar.

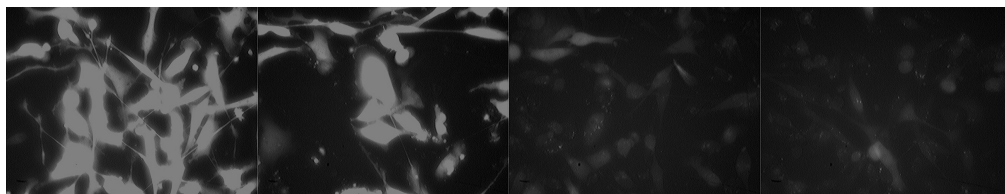


Abbildung 4.9: Rückgang der Fluoreszenz 4 Tage nach siRNA-Transfektion (Endkonzentration 2,5 nM); links unbehandelte und rechts RNAi transfizierte CapG-eGFP stabil exprimierende MDA-MB-231-Zellen; zwischen vielen schwach fluoreszenten Zellen sind wenige etwas hellere Zellen zu sehen; 400-fache Vergrößerung

Die drei Tage post transfectionem angelegten Invasionsassays ergaben 16 - 18h später folgende Ergebnisse: Mit der niedrig dosierten siRNA wurde die Anzahl der durchgewanderten Zellen um 70,8%, durch die höher dosierte um 92,7% reduziert. Der Standardfehler der Messungen betrug 2,2 bzw. 2,3. Diese Ergebnisse wurden über drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente gemittelt (s. Abb. 4.10)¹.

¹Kurz vor Abgabe dieser Arbeit veröffentlichte die Gruppe um Gettemans siRNA-Versuche, die einen Rückgang der Invasivität nativer MDA-MB-231-Zellen nach CapG-knockdown zeigten und die somit die eigenen, hier vorgestellten Ergebnisse bestätigen [95].

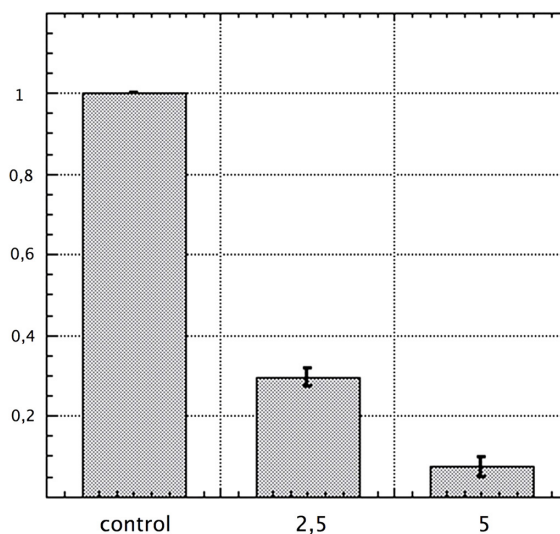


Abbildung 4.10: CapG-knockdown: Die Säulen bezeichnen Invasivität als Anzahl invadierender Zellen relativ zu den unbehandelten CapG-eGFP stabil exprimierenden MDA-MB-231-Zellen (control); 2,5: siRNA in 2,5 nM Endkonzentration; 5: siRNA in 5 nM Endkonzentration

Die Invasivität der MDA-MB-231 wird durch das CapG-eGFP-Fusionsprotein nicht verändert, wohingegen der knockdown des CapG-Proteins ihre Invasivität stark vermindert. Um einen Zusammenhang zwischen Invasivität und CapG-Expression in den betrachteten Mammakarzinomzellen endgültig nachzuweisen und um zu zeigen, daß die Markierung mit einem Fluoreszenzprotein die Funktion des CapG-Proteins nicht nachhaltig verändert, wurde ein rescue-Versuch angestrebt.

Es sollte versucht werden, die Invasivität der siRNA behandelten Zellen mit einer Mutante wiederherzustellen. Diese Mutante enthält silente Mutationen, die zum einen die Aminosäuresequenz des CapG-Proteins nicht verändern – daher silent – und die zum anderen nicht zu der siRNA passen und dem Abbau so entgehen. Die nötigen silenten Mutationen wurden in den entsprechenden Domänen des CapG-Proteins mit der site-specific Mutagenese gesetzt, die erhaltene cDNA durch Sequenzierung geprüft. Leider wurde die rescue-Variante des CapG-eGFP in den Zellen dennoch nicht gebildet. Vermutlich verhinderten Schreibfehler im Gesamtplasmid die Expression der Mutante. Daher soll die mutierte cDNA nun in einen intakten pSveGFP-Vektor kloniert werden.

4.3 Dynamik zellulärer Prozesse lebender Zellen

Da die untersuchten Zellen fluoreszierendes CapG-eGFP exprimierten, war es möglich, die Dynamik zellulärer Prozesse wie Migration und Invasion sichtbar zu machen.

4.3.1 Gesamtzellodynamik der Invasivität

Die Formveränderungen von Mammakarzinomzellen bei der Passage 8 μm großer Poren konnten dargestellt, die Dynamik dieses Formwandels konnte an lebenden Zellen über die Zeit beobachtet werden.

Die Membranen des Invasionsassays wurden aus den Einsätzen gelöst und unfixiert mikroskopiert. Beispiele sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Zellen, die die künstliche Basalmembran passiert haben, sind in diesen Aufnahmen von deutlich anderer Gestalt als die Zellen, die nicht gewandert sind. Die einen, die nicht gewandert sind, sind spindelförmig ausgebreitet mit deutlicher Zellpolarisation, wohingegen die anderen, die gewandert sind, eher abgerundet amöboid wirken und keine Zellpolarisation erkennen lassen.

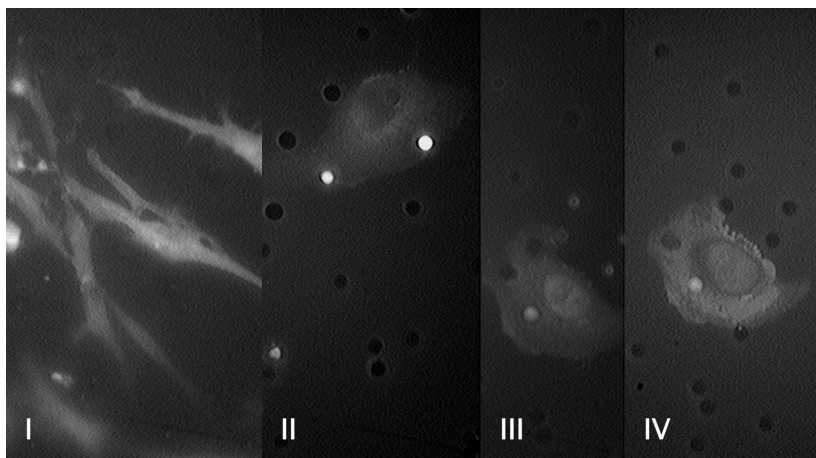


Abbildung 4.11: Invasionsassay: In Bild I nicht gewanderte, spindelförmige Zellen an der Oberseite der künstlichen Basalmembran; in Bild II - IV gewanderte, amöboid wirkende Zellen

Die Entwicklung einer normalen Epithelzelle, die im Epithelverband eingebunden Oberflächen begrenzt, hin zu einer Karzinomzelle, die in der Lage ist, sich als einzelne Zelle durch Basalmembran und extrazelluläre Matrix

zu bewegen, kann als epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT) bezeichnet werden. Entscheidend ist sicher, daß Verbindungen zu anderen Zellen im epithelialen Verband gelöst werden – durch verminderte Expression des E-Cadherin sowie durch aktives Zerreißen bestehender Zellkontakte durch kontraktile Zytoskelettelemente (Aktomyosin). Beobachtet wird aber auch eine Umstrukturierung der epithelialen Zellpolarisation: Die intrinsische Polarisation einer Zelle geht ganz oder teilweise verloren. Dem entsprechen zwei Formen zellulärer Bewegung: die amöboide und die fibroblastische.

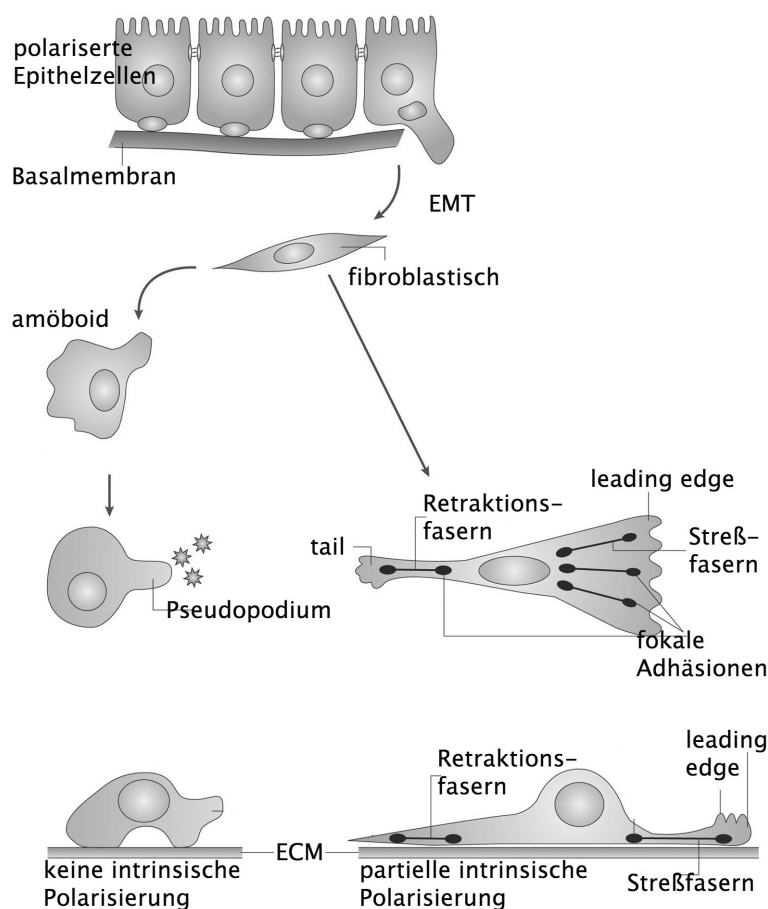


Abbildung 4.12: Schemazeichnung des epithelial-mesenchymalen Übergangs (EMT): amöboide Form der Bewegung (Zellen ohne intrinsische Polarisierung) und fibroblastische Form der Bewegung (Zellen mit partieller intrinsischer Polarisierung); modifiziert nach [95]

Die Schemazeichnung in Abb. 4.12 zeigt diese beiden Formen der Tumorzellbewegung. Die amöboide Zelle hat nur lockere Verbindungen zur extra-

zellulären Matrix, kann sich also schneller bewegen. Außerdem erlaubt es die fehlende intrinsische Ausrichtung der Zelle, besser auf chemotaktische Stimuli unterschiedlicher Richtung zu reagieren.

Die fibroblastenähnliche Zelle ist fest an die extrazelluläre Matrix gebunden. Sie ist flach ausgebreitet, zeigt eine Vorne-hinten-Ausrichtung. Ihr Zytoskelett, vor allem ihr Aktinzytoskelett, ist anders organisiert als das der amöboiden Zellen. Fokale Adhäsionen ermöglichen es, als Ankerpunkte großer Aktinfaserbündel, Zugkräfte aufzubauen, über Streß- und Retraktionsfasern wird der Zellkörper bzw. das Zellende nachgezogen.

Es wird vermutet, daß bei fortschreitender Dedifferenzierung die Karzinomzelle den amöboiden Phänotyp und das damit verbundene Bewegungsmuster annimmt. Die amöboide Form der Zellbewegung an Fasern der extrazellulären Matrix entlang konnte im Mausmodell *in vivo* dargestellt werden [96]. In einem Migrationsassay wurde die amöboide Bewegung in sehr dichtem Kollagenfasergeflecht ausgelöst [97]. Auch die hier verwendeten 8 μm großen Poren des Invasionsassays scheinen einen Formwandel karzinomatöser Zellen vom fibroblastischen zum amöboiden Typ zu triggern.

Ziel war es, nicht nur eine Momentaufnahme dieses Umwandlungsprozesses zu erhalten wie in Abbildung 4.11, sondern nach Möglichkeit, diesen Prozeß einzelner Zellen über die Zeit zu verfolgen. Dafür wurde der Invasionsassay modifiziert wie im Methodenteil beschrieben.

Die bessere räumliche Auflösung des konfokalen Mikroskops gab Einblick in Art und Weise der Zelle, durch Basalmembranporen zu wandern. Gerade zellkernnahe Zytoplasmaanteile schieben sich offenbar zuerst voran, um unmittelbar danach den Zellkern als größten und am wenigsten modulierbaren Teil der Zelle nachzuziehen.

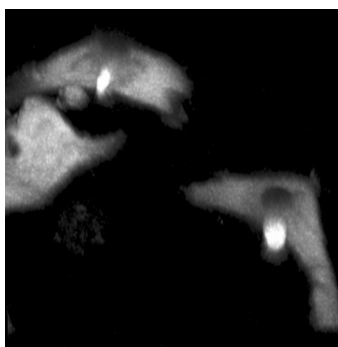


Abbildung 4.13: Invasionsassay: Die Zellen scheinen zunächst zellkernnahe Zytoplasmaanteile und den Zellkern durch die Poren der künstlichen Basalmembran zu schieben.

Ist die Zelle auf der anderen Seite der Membran angekommen, nimmt sie im Laufe der Zeit wieder eine ausgestreckte, fibroblastenähnliche Form an.

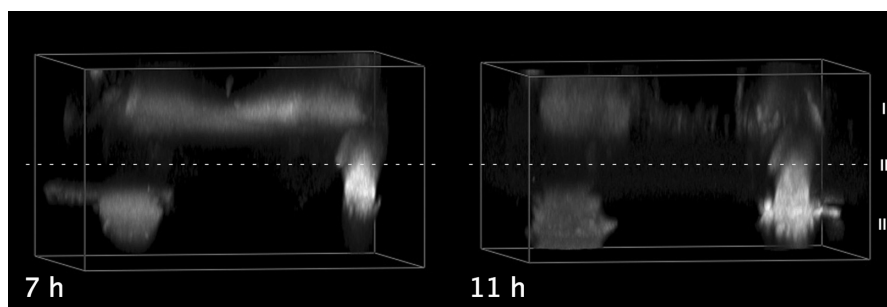


Abbildung 4.14: Zeitverlauf der Gesamtzelldynamik der Invasivität: I - nicht gewanderte Zelle an der Oberseite der künstlichen Basalmembran; II - künstliche Basalmembran und gerade durchwandernde Zelle; III - bereits durchgewanderte Zelle; dreidimensionale Rekonstruktion

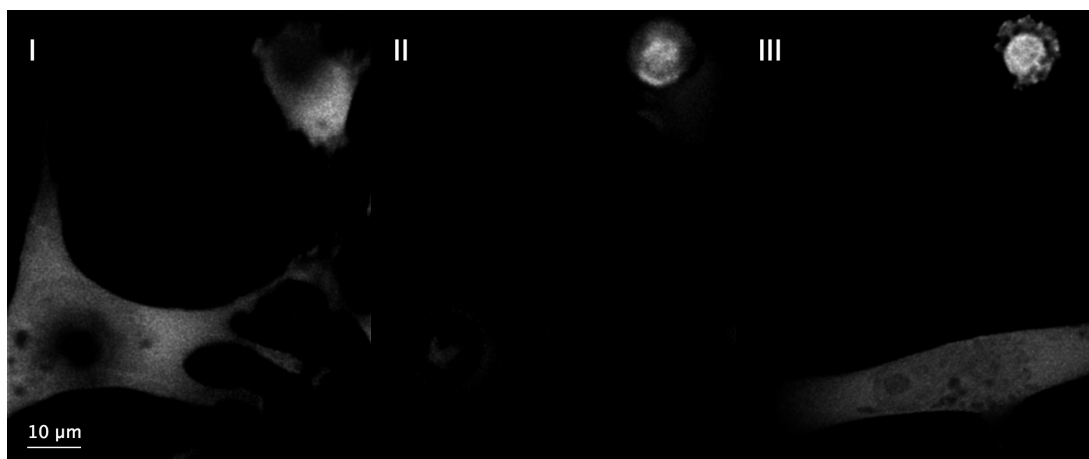


Abbildung 4.15: Dekonvolvierte Schichtbilder der oben dargestellten dreidimensionalen Rekonstruktion; Numerierung I - III entspricht obiger Bezeichnung

4.3.2 Submembranäre Dynamik der Migration

Bei der Migration adhärenter Zellen bilden die Kontaktfläche der Zelle mit dem extrazellulären Medium und unmittelbar benachbarte zytoplasmatische Bereiche den Hauptort zellulärer Dynamik und Interaktion. Hier werden

an der „leading edge“ durch kontrollierte Polymerisation einzelner Aktin-faserbündel Filopodien zum Sondieren der Umgebung ausgestreckt und durch gesteuerten Aufbau ganzer Aktinengeflechte große Teile der Plasmamembran als Lamellipodien vorgestülpt. Neue fokale Adhäsionen werden ausgebildet, die es der Zelle ermöglichen, über Streßfasern Zug auf den Zellkörper auszuüben und sich so in eine Richtung zu bewegen.

Diese Kontaktfläche der lebenden Zelle mit dem extrazellulären Medium ist der TIRF-Mikroskopie gut zugänglich. Nur fluoreszierende Moleküle in der basalen Zellmembran und unmittelbar submembranären Bereichen des Zytoplasmas werden angeregt, nicht aber die Moleküle im ganzen darüberliegenden Zellkörper. Die selektive Anregung der TIRF-Mikroskopie erscheint besonders günstig bei der Betrachtung ubiquitär zytoplasmatischer Proteine wie CapG und β -Aktin. Das Fluoreszenzsignal der Moleküle in dem schmalen Streifen von etwa 100 nm würde bei konventioneller und auch bei konfokaler Fluoreszenzmikroskopie durch das Gros zytoplasmatischer Fluorophore überstrahlt und damit der Beobachtung entgehen.

Der Abbildungsunterschied von konventioneller und TIRF-Mikroskopie wird in Abbildung 4.16 anschaulich. In Abb. 4.16 A und B ist dieselbe Zelle mit den beiden Techniken wiedergegeben.

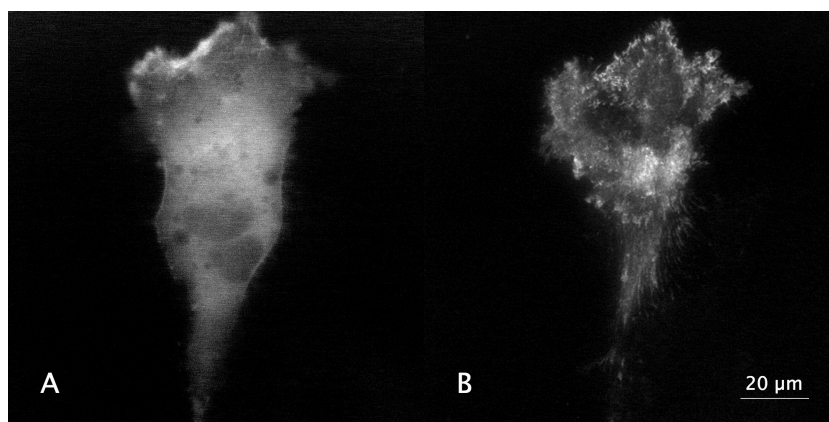


Abbildung 4.16: Abbildungsunterschied konventioneller Epifluoreszenz- und TIRF-Mikroskopie; A und B zeigen dieselbe Zelle in den genannten Techniken.

Die Intensität des evaneszenten Feldes und damit die maximale Entfernung zur Grenzfläche, in der noch Fluorophore angeregt werden können, ist durch den Einfallswinkel des Lasers θ veränderbar. Je größer dieser Winkel, desto geringer die Ausdehnung des evaneszenten Feldes. In Abbildung 4.17 ist

der gewählte Winkel nicht ganz so strikt, darüberliegende zytoplasmatische Fluorophormengen werden als weißer Schleier erahnbar.

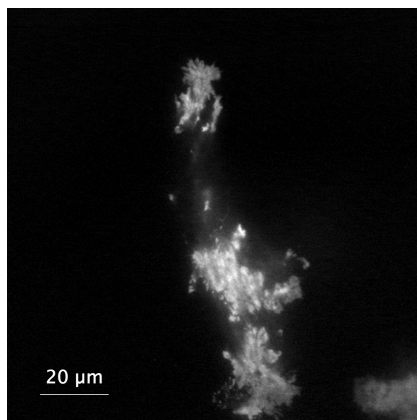


Abbildung 4.17: Beispiel eines TIRF-Bildes mit kleinerem Einfallswinkel θ : Der Zellkörper ist als weißer Schleier sichtbar.

CapG und Aktin kotransfizierte Zellen wurden untersucht. Es wurde betrachtet, ob die beiden Proteine ähnliche Verteilungsmuster haben und ob sich diese über die Zeit vergleichbar ändern.

Die Art der mikroskopisch sichtbaren Verteilung des Aktinfusionsproteins wird auffällig stark durch den Expressionsmodus bestimmt. Wird das Fusionsprotein transient transfiziert, die eingebrachte genetische Information also direkt vom Plasmid abgelesen, verteilt es sich anders als bei stabiler Expression, bei der die genetische Information in das zelleigene Genom integriert wurde. Die Expressionslevel transienter Transfektion sind in der Regel 5 bis 10-mal höher als die stabiler. In relativ kurzer Zeit (12 - 24h) wird also relativ viel neues Protein gebildet. Das Fusionsprotein wird erst nach und nach in vorhandene Bindungsstellen eingebaut und dann zunächst in die, die einem höheren Protein-turnover unterliegen. Im Fall des Aktin bedeutet dies, daß bei transienter Transfektion das Fusionsprotein vorzugsweise im Bereich der „leading edge“ angereichert, bei stabiler Transfektion hingegen auch deutlich in Streifasern eingebaut wird. Viele Aktinbündel sind dann nadelfein zu erkennen. Sie setzen an der Membran punktförmig an und verbinden sich manchmal zu den großen Knoten der Adhäsionskomplexe (Abb. 4.18).

Betrachtet man CapG transfizierte Zellen, ist ein Unterschied in der Verteilung transient und stabil exprimierten Proteins nicht so deutlich faßbar. Das CapG-eGFP scheint die betrachteten Bereiche nahezu gleichmäßig anzufüllen. Das Membranrelief der Zelle ist gut zu erkennen. Wenn Ansammlungen des CapG-eGFP Strukturen sehen lassen, bleibt unklar, ob diese durch

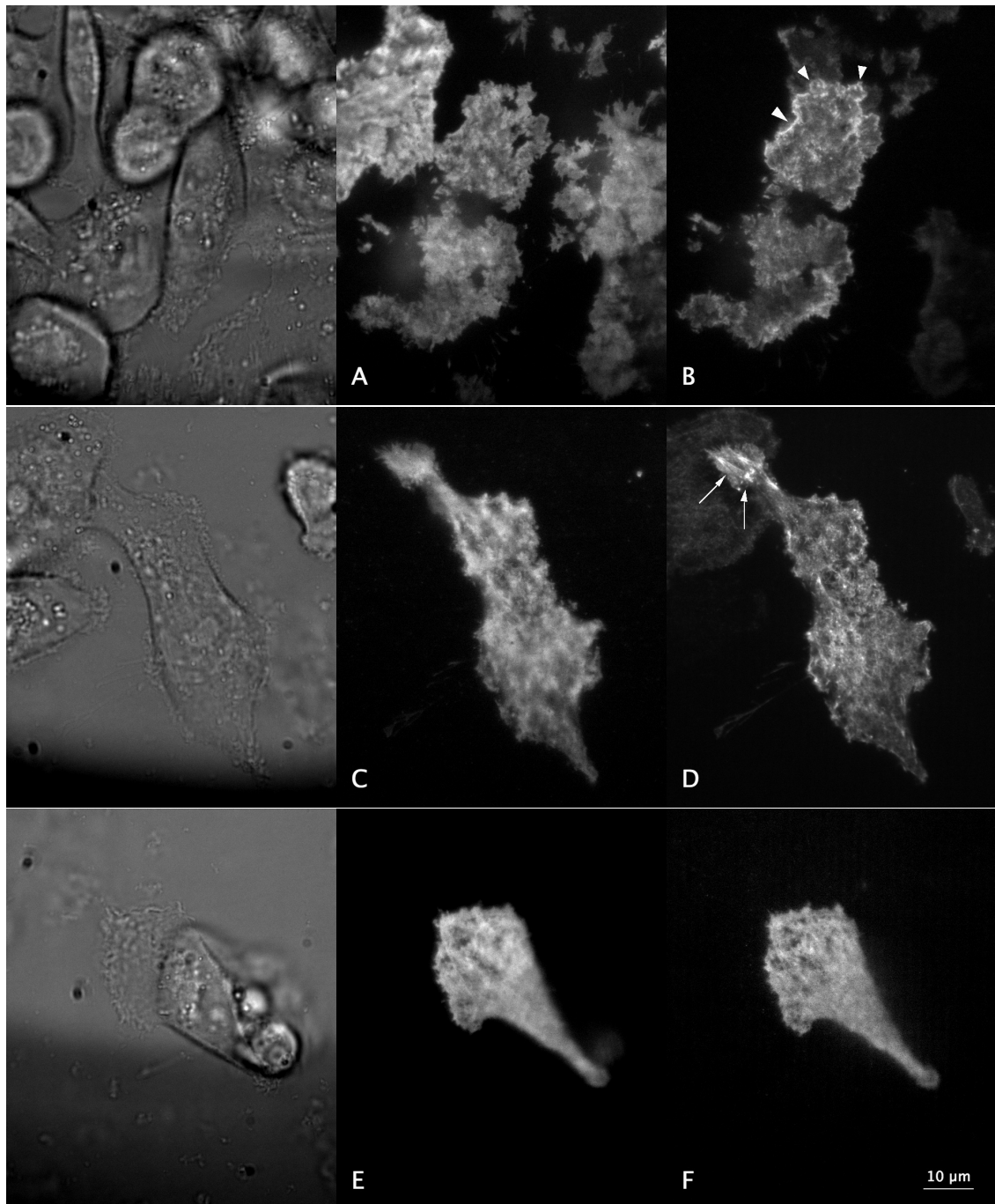


Abbildung 4.18: TIRF- und entsprechende Durchlichtaufnahmen von MDA-MB-231-Zellen: A+B: stabil CapG-eGFP und transient mRFP-ACTB exprimierend (Pfeilköpfe an „leading edge“); C+D: transient CapG-mRFP und stabil eGFP-ACTB (Pfeile an Streifasern und Adhäsionskomplexen); E+F: stabil CapG-mRFP und transient Gelsolin-eGFP

Membranverwerfungen entstehen oder ob sie wirklich submembranäre Strukturen wie Streißfasern widerspiegeln.

Da das CapG an PIP_2 binden soll, das etwa 1% der Membranlipide ausmacht, ist nicht zu sagen, ob der beschriebene Eindruck allein durch submembranäres zytoplasmatisches CapG entsteht oder auch durch membrangebundenes.

Anders als β -Aktin ist Gelsolin dem CapG offenbar in seiner submembranären Verteilung sehr ähnlich (s Abb. 4.18). Auch Gelsolin soll an membranäres PIP_2 binden.

Bei dem Versuch, die lebenden Zellen in ihrer submembranären Dynamik über längere Zeit zu beobachten, wurden die Zellen stärker durch die TIRF-Beleuchtung irritiert als angenommen. In Nunc Labtecs mit Glasboden mikroskopiert zogen sie bald ihre Zellausläufer zurück und rundeten sich ab. Damit war nur der Prozeß der Zellretraktion mit der TIRF-Mikroskopie zu beobachten (Abb. 4.19).

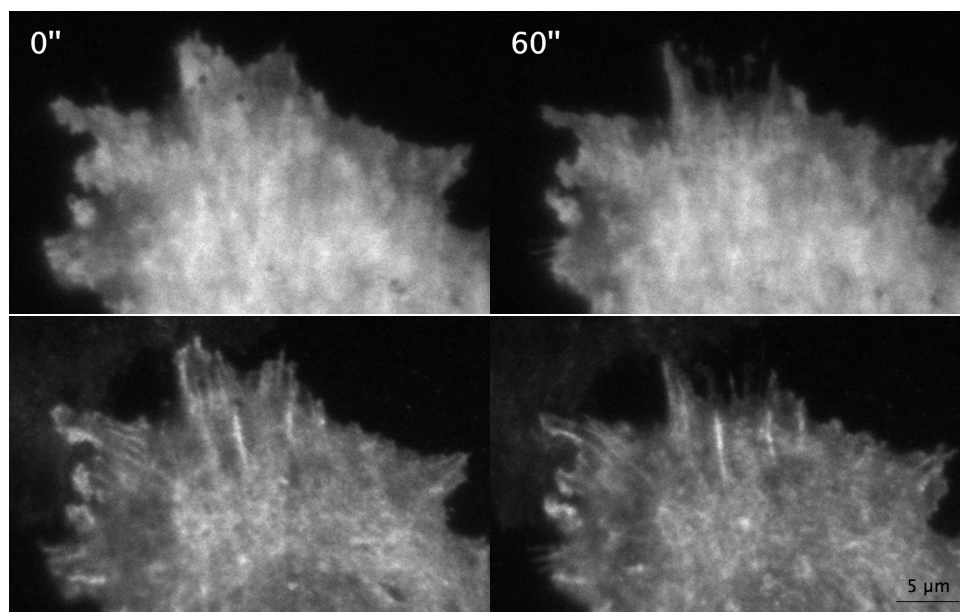


Abbildung 4.19: Zeitrafferaufnahmen der Zellretraktion; MDA-MB-231-Zelle transient CapG-mRFP und stabil eGFP-ACTB exprimierend (Detail)

Um auch die Dynamik gerichteter Bewegung sichtbar zu machen, wurden Chemotaxiskammern von ibidi in der TIRF-Mikroskopie ausprobiert. Diese Chemotaxiskammern sind aus Plastik. Dennoch sollen ihre optischen Eigenschaften wie Brechungsindex und Autofluoreszenz Glas sehr ähnlich sein.

Außerdem seien die Chemotaxiskammern geeignet, heißt es, durch einen Diffusionsgradienten gerichtete Bewegung auszulösen. Der Diffusionsgradient eines Chemoattractants beispielsweise sei in den Chemotaxiskammern über einige Stunden stabil. Als Chemoattractant wurde hier rekombinantes

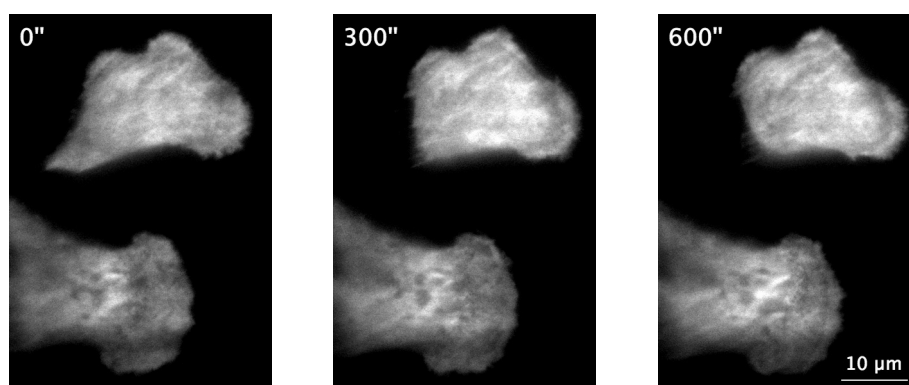


Abbildung 4.20: Zeitrafferaufnahmen der Chemotaxis: durch EGF ausgelöste gerichtete Bewegung; stabil CapG-eGFP exprimierende MDA-MB-231-Zellen

humanes EGF (epidermal growth factor) genutzt, da dies bei einigen Mammarkarzinomzelllinien chemotaktisch gerichtete Bewegung auslöst und da bekannt ist, daß die MDA-MB-231-Zellen EGF-Rezeptoren exprimieren [51]. Die MDA-MB-231-Zellen wuchsen gut in den Chemotaxiskammern an. Sie schienen in diesen Kammern weniger von dem eingestrahlt Licht irritiert zu werden. Die Abbildungen allerdings waren diffuser als in einem Nunc Labtec mit Glasboden.

Warum es nur selten gelang, tatsächlich eine gerichtete Bewegung auszulösen (s. Abb. 4.20), ist unklar: falsches Chemoattractant, instabiler Gradient, ungünstige Konzentrationsverhältnisse und schlecht gewähltes Zeitfenster sind mögliche Ursachen. Ein Prototyp einer neuen, verbesserten Chemotaxiskammer von ibidi wird getestet.

4.4 Dynamik des CapG-Proteins in lebenden Zellen

Neben der Visualisierung der Dynamik zellulärer Prozesse war es Ziel dieser Arbeit, die Kinetik makromolekularer Abläufe sichtbar zu machen. Die Fluoreszenzkorrelationspektroskopie (FCS) detektiert die Diffusion einzelner Proteine, während die Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

die Bewegungen ganzer Proteingruppen wiedergibt. Im folgenden werden Ergebnisse beider Möglichkeiten der Kinetikanalyse fluoreszenzmarkierter Proteine in der lebenden Zelle beschrieben.

4.4.1 Dynamik einzelner CapG-Proteine: FCS

Anders als die FRAP-Experimente wurden die FCS-Messungen nur mit neoplastischen Brustepithelzellen (MDA-MB-231) durchgeführt. Es galt hierbei zunächst, die experimentellen Bedingungen und die Art der Auswertung zu erarbeiten, die eine Differenzierung der Kinetik des CapG-eGFP-Proteins in den subzellulären Kompartimenten Zellkern und Zytoplasma ermöglicht und die darüberhinaus eine Abgrenzung zur intrazellulären Mobilität des inerten eGFP erlaubt.

Kalibrierungsmessungen

Um das sensitive Instrument der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie zu justieren, wurde vor jeder Meßreihe die Diffusionszeit des chemischen Farbstoffs *Alexa488* in Lösung bekannter Konzentration gemessen. Ein Beispiel einer so gewonnenen Autokorrelationskurve gibt die Abbildung 4.21.

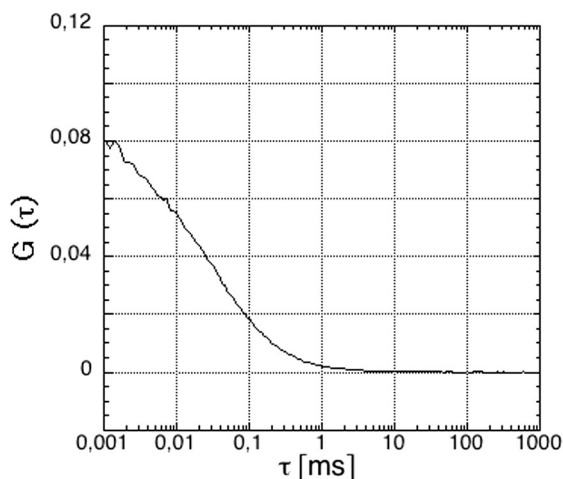


Abbildung 4.21: experimentell ermittelte Autokorrelation von *Alexa488* in 68 nM, wässriger Lösung

Aus dieser Kalibrierungsmessung ist es möglich, anhand der detektierten Teilchenzahl im Fokus oder anhand der registrierten Diffusionszeit die Größe des effektiven Detektionsvolumens zu schätzen:

- Der Schnittpunkt von Autokorrelationsfunktion und Ordinate gibt den Kehrwert der Anzahl unabhängig diffundierender Teilchen im Fokus. In diesem Fall ergibt sich also unter Berücksichtigung der Avogadro-Konstante nach Gleichung 3.12:

$$\begin{aligned} 68nM &= \frac{12,5}{V_{eff}} \\ V_{eff} &= 0,3fl \end{aligned}$$

Mit Hilfe des κ -Faktors, der das Verhältnis der Halbachsen z_0 und w_0 des Detektionsvolumens angibt und der aus der Kalibrierungsmessung auf 5,5 bestimmt wurde, können die Abmessungen des Detektionsvolumens wie folgt errechnet werden (Gl. 3.18):

$$\begin{aligned} V_{eff} &= \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot z_0 \\ 0,3fl &= \pi^{\frac{3}{2}} \cdot w_0^2 \cdot 5,5 \cdot w_0 \\ w_0 &\approx 214nm \end{aligned}$$

- Auch die gemessene Diffusionszeit und der (vermeintlich) bekannte Diffusionskoeffizient von *Alexa488* können zur annähernden Schätzung der horizontalen Halbachse w_0 genutzt werden. Allerdings sind die Angaben bezüglich des Diffusionskoeffizienten von *Alexa488* in der Literatur sehr verschieden. Sie schwanken zwischen 200 und 400 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ [63, 70, 98, 99, 100, 101]. Messungen unserer Abteilung machen einen Diffusionskoeffizienten von etwa 300 $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ wahrscheinlich. Setzt man diesen Wert in Gleichung 3.17 ein, erhält man:

$$\begin{aligned} 37\mu\text{sec} &= \frac{w_0^2}{4D} \\ w_0 &\approx 211nm \end{aligned}$$

Damit ergibt sich ein effektives Detektionsvolumen von etwa 425 nm Durchmesser in lateraler und 2,35 μm in axialer Richtung (vgl. Vukojevic et al. und Pramanik et al.: 0,5 und 2 μm [64, 102]). Bedenkt man die ungefähren Maße einer Zelle von etwa 8-10 μm Höhe und 40-50 μm Ausdehnung, bekommt man einen anschaulichen Eindruck des Beobachtungsvolumens in der lebenden Zelle.

experimentelle Bedingungen in lebenden Zellen

Die Qualität der experimentell ermittelten Autokorrelationen wird bei gegebenem optischen Aufbau durch die Dauer der Meßzeit und die Eindeutigkeit des fluktuierenden Fluoreszenzsignals bestimmt. Je länger gemessen wird, umso mehr Signale werden gesammelt und umso größer ist die Basis einer statistischen Auswertung. Je weniger Fluorophore im Fokus sind und je größer deren molekulare Helligkeit ist, desto deutlicher ist das Fluktuationssignal.

Meßzeit: Da lebende Zellen betrachtet werden, sind Zellbewegungen und Zytoplasmaströme möglich. Diese führen zu einer sehr langsamen Komponente der Autokorrelationsfunktion, die nicht durch die Dynamik des untersuchten Proteins bedingt ist. Messungen, die solche Zellbewegungen zeigten, wurden verworfen. Um diese Artefakte zu vermeiden, sollten die Meßzeiten möglichst kurz sein. Um dennoch ausreichend Fluktuationen zu sammeln, wurde die Meßzeit auf 6 mal 10 sec festgelegt.

Auswahl der Zellen: Befinden sich wenige Fluorophore im Detektionsvolumen und im umgebenden Medium, sind die detektierten Fluktuationen durch einzelne Fluorophore relativ zur mittleren Fluoreszenzintensität größer als die registrierten Fluktuationen bei der Betrachtung vieler Fluorophore. Daher wurden möglichst schwach fluoreszente Zellen für die Messungen ausgesucht.

Laserintensität: Die mittlere molekulare Helligkeit eines Fluorophors kann durch verstärkte Lasereinstrahlung gesteigert werden. Diese Möglichkeit ist allerdings durch biologische und photophysikalische Umstände begrenzt:

Die höhere Laserintensität bedeutet größeren Zellstreß durch photo-oxidative Prozesse. Außerdem verlieren die Fluorophore bei höherer Laserintensität schneller ihre Fähigkeit zu fluoreszieren. Da Bleichen wie Diffusion eine Möglichkeit des fluoreszierenden Moleküls ist, aus dem Fokusbereich zu verschwinden, führt dies zu einem rascheren Zerfall der Autokorrelationsfunktion. Die tatsächliche Diffusionszeit wird unterschätzt. Auch der Übergang des Fluorophors vom angeregten Singulett- in einen Triplettzustand wird durch steigende Lasereinstrahlung gefördert, der Triplettanteil an der Autokorrelationsfunktion also größer.

In den vorgestellten FCS-Messungen wurden zwei verschiedene Laserintensitäten gewählt. Die Ergebnisse werden im folgenden verglichen.

Die Laserleistung, die tatsächlich die Probe erreicht, wird am genauesten am Objektivausgang gemessen. Die beiden gewählten Intensitäten betragen etwa 3,2 bzw. 0,9 μW . Dies ergibt nach $0,138 \cdot P / (D_{488} \cdot \tau_D)$, wobei P die

gemessene Laserleistung und D_{al488} und τ_D Diffusionskoeffizient und -zeit von *Alexa488* sind, eine mittlere Intensitätsdichte im Detektionsvolumen von etwa 3,6 bzw. 1,0 kW/cm^2 .

Zunächst soll von den FCS-Messungen berichtet werden, die mit höherer Laserintensität ($\sim 3,6 kW/cm^2$) ausgeführt wurden.

Kinetik des freien eGFP in lebenden Zellen

Bei der relativ hohen Intensitätsdichte von $\sim 3,6 kW/cm^2$ wurde kein Bleichen des intrazellulären eGFP oder des CapG-eGFP beobachtet. Der Tripletanteil des Fluorophors ist entgegen der Theorie kleiner als bei geringer gewählter Laserleistung (s. unten). Die Zellen tolerierten diese Beleuchtung gut. Berichte anderer unterstützen diese Beobachtungen. Jankevics et al. beispielsweise benutzten für ihre Messungen von YFP-Fusionsproteinen, die photochemisch instabiler sind als GFP-Konstrukte, $\sim 3 kW/cm^2$ [103].

An die experimentell ermittelten Autokorrelationen des eGFP in Zytoplasma und Zellkern transient transfizierter MDA-MB-231-Zellen konnte gut eine Modellfunktion dreidimensionaler Diffusion angepaßt werden, die *eine nichtstrahlende* Komponente, den Tripletanteil, und nur *eine diffundierende* Komponente berücksichtigt. *Zwei diffundierende* Komponenten in den Fit einzubeziehen, ergab keine besseren Fitergebnisse (Abb. 4.22). Das inerte

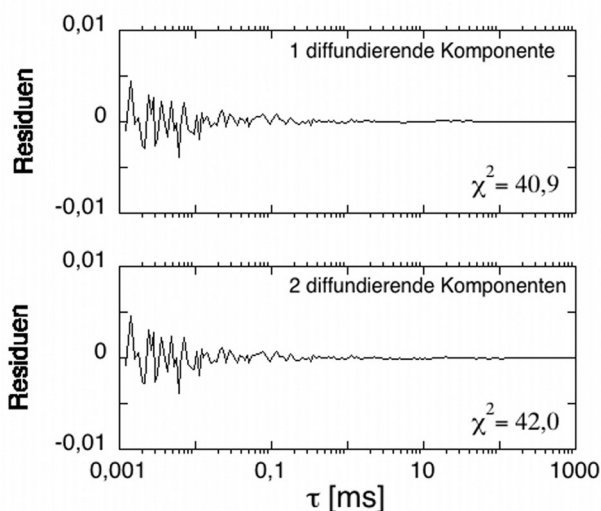


Abbildung 4.22: Residuen und χ^2 -Werte der Anpassung einer theoretischen Modellfunktion mit einer bzw. zwei diffundierenden Komponenten: Die Anpassung mit zwei diffundierenden Komponenten ergibt keine Verbesserung.

eGFP diffundiert also frei in der Zelle mit einer Geschwindigkeit, die durch seine Größe und die Temperatur und Viskosität des Zyto- bzw. Nukleoplasmas bedingt ist. Eine transiente Bindung an zelluläre Strukturen, die die Diffusion des eGFP verlangsamen und dann in der Autokorrelation als zweite langsam diffundierende Komponente erscheinen würde, ist unwahrscheinlich.

Als Tripletzeit des eGFP wurde nach Sichtung der Literaturangaben $30 \mu\text{sec}$ gewählt und in der Fit-Routine konstant gehalten. Die sich ergebenden Diffusionszeiten des freien eGFP im Zytoplasma und im Zellkern transient transfizierter MAMKARZINOMZellen sind bei gewähltem experimentellen Aufbau mit 431 ± 6 und $390 \pm 4 \mu\text{sec}$ in etwa gleich. Die Abbildung 4.23 zeigt repräsentative Autokorrelationen.

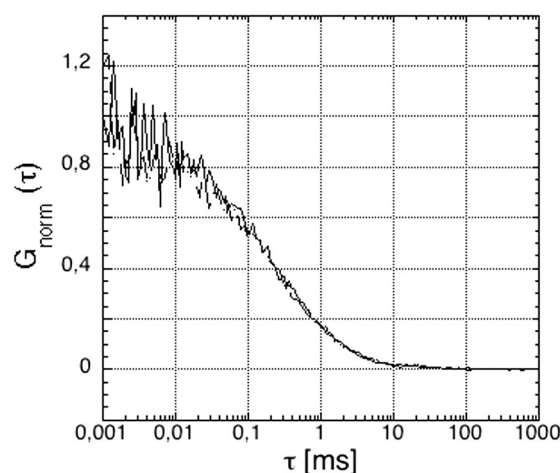


Abbildung 4.23: normierte Autokorrelationen des freien eGFP im Zytoplasma und im Zellkern transient transfizierter MDA-MB-231-Zellen: Bei diesen exemplarisch gewählten Messungen im Zytoplasma und im Zellkern derselben Zelle ist kein Unterschied der Diffusion in beiden Zellkompartimenten zu erkennen.

Die Tripletzeit auf $20 \mu\text{sec}$ zu setzen, brachte keine nennenswerten Unterschiede im Fitergebnis: 404 ± 5 im Zytoplasma und $372 \pm 4 \mu\text{sec}$ im Zellkern. Für die Auswertung der folgenden Autokorrelationen wurde daher stets als annähernde Schätzung der Tripletzeit des eGFP $30 \mu\text{sec}$ eingesetzt.

Da es schwer ist, die genauen Abmessungen des effektiven Detektionsvolumens unabhängig von der FCS zu bestimmen, werden die Diffusionskoeffi-

zienten üblicherweise nicht absolut errechnet, sondern aus dem Vergleich mit einer Kalibrierungssubstanz als relative Größen abgeleitet. Mit der gemessenen Diffusionszeit von *Alexa488* ($\sim 37 \mu\text{sec}$), dessen Diffusionskoeffizienten und den ermittelten Diffusionszeiten des freien eGFP in der Zelle können für eGFP in den beiden Zellkompartimenten Zellkern und Zytoplasma effektive Diffusionskoeffizienten errechnet werden. Wie oben berichtet wird in dieser Arbeit ein D_{al488} von $300 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ zugrunde gelegt. Es ergeben sich für den Diffusionskoeffizienten des freien eGFP im Zytoplasma und Zellkern entsprechend Gleichung 3.17 folgende Näherungen:

$$D_{eGFPimZP} \approx 25,8 \pm 0,4 \mu\text{m}^2/\text{sec}$$

$$D_{eGFPimZK} \approx 28,5 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$$

Diese Werte der eGFP-Diffusionskoeffizienten in Zytoplasma und Zellkern fügen sich gut in die Reihe berichteter Werte, wobei leider auch hier die in der Literatur gemachten Angaben keineswegs einhellig sind:

	$D_{eGFPimZP}$	$D_{eGFPimZK}$	Technik
Swaminathan et al. [104]	25	-	FRAP bei RT
Lippincott-Schwartz[81] zit.[104]	25	-	FRAP bei RT
Chen et al. [105]	$25,2 \pm 4,5$	$28,6 \pm 6,6$	FCS, 2-PE, T unklar
Houtsmuller et al. [106]	58 ± 9	-	FRAP, T unklar
Wachsmuth et al. [74]	$12,5 \pm 1,3$	$9,8 \pm 1,6$	FCS, 1-PE bei RT
Brock et al. [75, 107]	18 ± 7	31 ± 14	FCS, 1-PE bei BT
Bacia et al. [70]	30	-	FCS, 1-PE, T unklar
Hinow et al. [108]	-	$41,6 \pm 13,6$	FRAP bei RT
Sprague et al. [109]	-	15	FRAP bei BT
Diekmann (unpubl.)	$9,7 \pm 1,2$	-	FRAP, T unklar

Tabelle 4.1: Literaturwerte des Diffusionskoeffizienten von eGFP in Zellen, angegeben in $\mu\text{m}^2/\text{sec}$; RT bzw. BT bedeutet room bzw. body temperature; 1-PE bzw. 2-PE Ein- bzw. Zwei-Photonen-Anregung

Durch Protonierung bzw. Licht induzierte Alterationen der eGFP-Fluoreszenz, die als verschiedene Formen des „blinking“ gefaßt werden, wurden hier nicht berücksichtigt. Die Zeitkonstanten dieser Prozesse liegen im Bereich von 300 bis 340 μsec bzw. $340 \pm 50 \mu\text{sec}$ [76, 77, 78], sind damit also nur schwer von den gemessenen Diffusionszeiten des eGFP und auch des CapG-eGFP zu trennen². Bezieht man „blinking“ als *zweite nichtstrahlende*

²Eine Möglichkeit, die Diffusionskinetik von der photophysikalisch bedingten Kinetik des „blinking“ zu trennen, könnte sein, das Beobachtungsvolumen aufzuweiten. Fluores-

Komponente in den Fit mit ein, findet dieser keinen einheitlichen Wert für die Diffusionszeit (s. Abb. 4.24).

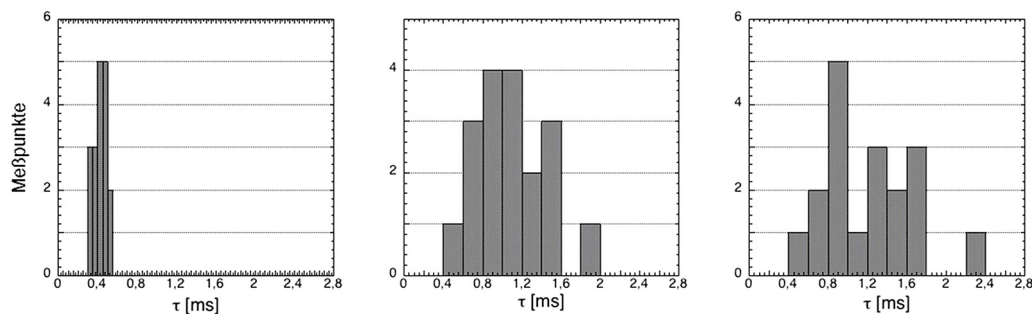


Abbildung 4.24: Verteilung der Diffusionszeiten von freiem eGFP ohne und mit „blinking“ in MDA-MB-231: I - Fitergebnisse nur einer nichtstrahlenden Komponente; Fitergebnisse bei zwei nichtstrahlenden Komponenten: II - „blinking“-Zeit: 300 μsec ; III - „blinking“-Zeit: 340 μsec

Daher wurden in dieser Arbeit ermittelte Autokorrelationen mit theoretischen Funktionen angepaßt, die nur *eine nichtstrahlende* Komponente einbeziehen. Dies erscheint als Annäherung an tatsächliche Gegebenheiten statthaft, solange die gewählten Rahmenbedingungen für alle Messungen beibehalten werden. Wie im folgenden berichtet wird, gelang es unter diesen Bedingungen gut, Unterschiede zwischen dem Diffusionsverhalten des freien eGFP und des CapG-eGFP-Fusionsprotein aufzuzeigen.

Kinetik des CapG-eGFP in lebenden Zellen

Die Kinetik des CapG-eGFP-Proteins wurde mit dem eben charakterisierten Aufbau der FCS in den Kompartimenten Zellkern und Zytoplasma transient transfizierter lebender Mammakarzinomzellen bestimmt, Messungen im Endoplasmatischen Retikulum wurden vermieden, Zellbewegungen verworfen. So ergaben sich die exemplarischen Autokorrelationsfunktionen der Abbildung 4.25.

Aus diesen Autokorrelationen läßt sich eine mittlere Teilchenzahl von etwa 35 bzw. 22 Teilchen im Fokus errechnen. Dies entspricht einer Stoffmenge

zierende Moleküle bräuchten dann länger, um durch den Fokus zu diffundieren. Die gemessenen Diffusionszeiten verlängerten sich. Die photophysikalisch bedingte Kinetik bliebe unverändert. Allerdings entstünden bei zunehmend größerem Detektionsvolumen die Probleme der Anfangszeit der FCS: längere Gesamtmeßzeiten bei instabilen lebenden Systemen und höheres Hintergrundsignal.

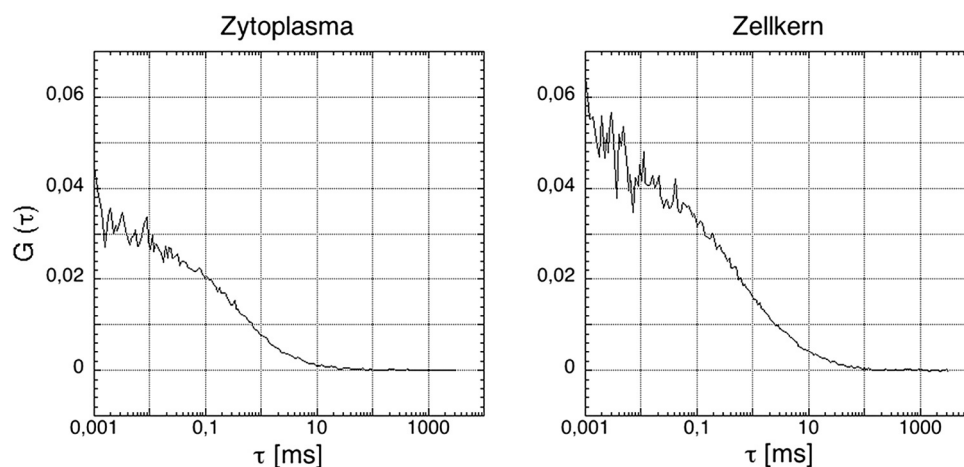


Abbildung 4.25: Vergleich exemplarischer, nicht normierter Autokorrelationen des CapG-eGFP im Zytoplasma und Zellkern derselben MDA-MB-231-Zelle

von 190 nM respektive 120 nM in den jeweilig untersuchten Kompartimenten Zytoplasma und Zellkern.

Normiert man die Autokorrelationen und vergleicht sie mit dem freien eGFP, werden die unterschiedlichen Zerfallszeiten der Funktionen anschaulich (Abb. 4.26). Da die Messungen des freien, inerten eGFP und des CapG-eGFP-Fusionsproteins in derselben Meßreihe und in demselben Zelltyp ausgeführt wurden, können die ermittelten Unterschiede dem funktionellen Proteinanteil des Fusionsproteins zugeschrieben werden.

Anders als die Autokorrelation des freien eGFP können die für CapG-eGFP experimentell ermittelten Daten nur schlecht mit einer theoretischen Funktion beschrieben werden, die von einer diffundierenden Komponente ausgeht. Das Residuum zwischen experimentellen und theoretischen Funktionen ist bei einem Zwei-Komponenten-Fit deutlich geringer. Eine theoretische Funktion, die *zwei diffundierende* Komponenten berücksichtigt, gibt also eine bessere Näherung der experimentellen Daten (Abb. 4.27 und 4.28).

Die FCS detektiert somit zwei verschieden schnell diffundierende Anteile des CapG-eGFP-Fusionsproteins: die erste schnell diffundierende Komponente beschreibt die Diffusion des weitgehend ungebundenen Proteins, die wie bei dem inerten eGFP vor allem durch seine Größe und die Temperatur und Viskosität des Zellmilieus bedingt wird; die zweite langsam diffundierende Komponente hingegen ist der Anteil des Proteins, der transient an zelluläre Bestandteile assoziiert.

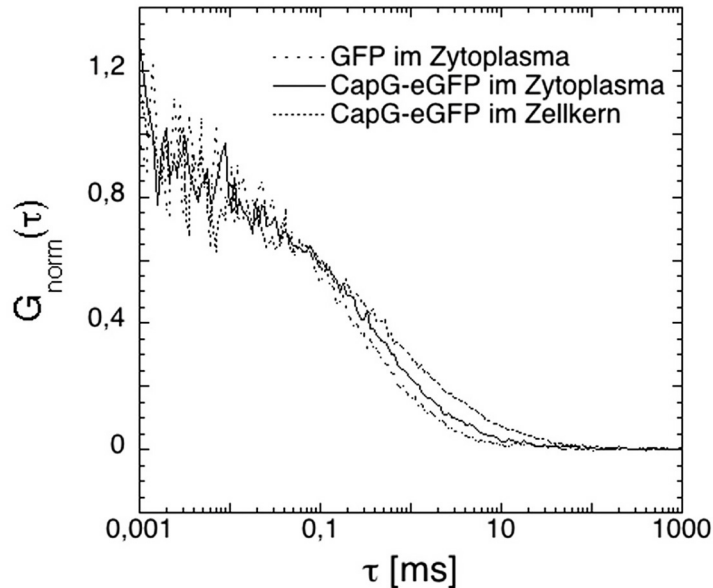


Abbildung 4.26: Vergleich der normierten Autokorrelationen von eGFP im Zytoplasma und CapG-eGFP im Zytoplasma und Zellkern (mittlere Laserleistung: $3,2 \mu\text{W}$ bzw. mittlere Intensitätsdichte: $3,6 \text{ kW/cm}^2$): Die unterschiedlichen Zerfallszeiten werden anschaulich.

Die erste diffundierende Komponente wurde aus 48 bzw. 41 Datenpunkten von 22 bzw. 23 Zellen gemittelt und ergab im Zytoplasma $\tau_{1ZP} = 465 \pm 5 \mu\text{sec}$ und im Zellkern $\tau_{1ZK} = 488 \pm 8 \mu\text{sec}$. Damit ist der Diffusionskoeffizient des CapG im Zytoplasma der Mammakarzinomzellen etwa $D = 23,9 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ und im Zellkern ungefähr $D = 22,7 \pm 0,3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$.

Nimmt man an, daß der Diffusionskoeffizient globulärer Proteine der dritten Wurzel ihres Molekulargewichts umgekehrt proportional ist, kann man aus dem Verhältnis der Molekulargewichte des freien eGFP (etwa 27 kDa) und des Fusionsproteins (etwa 66 kDa) den ungefähr zu erwartenden Diffusionskoeffizienten abschätzen. In diesem Fall würde man im Zytoplasma einen Diffusionskoeffizienten $D = 19,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ bzw. im Zellkern $D = 21,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ erwarten, also eine Diffusionszeit des CapG-eGFP von etwa 525 - 580 μsec in Zellkern und Zytoplasma. Die zu erwartende Diffusionszeit ist damit länger als die tatsächlich gemessene. Allerdings ist der

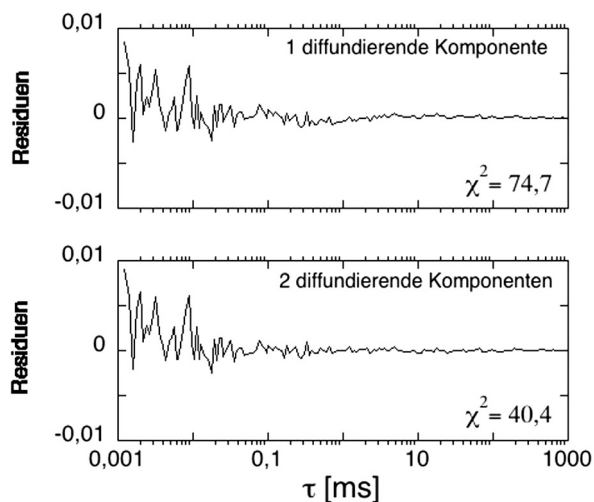


Abbildung 4.27: Residuen und χ^2 -Werte der Anpassung an eine Modellfunktion mit einer bzw. zwei diffundierenden Komponenten: Die Anpassung mit zwei diffundierenden Komponenten ergibt eine deutlich bessere Annäherung tatsächlich ermittelter CapG-eGFP-Funktionen im Zytoplasma.

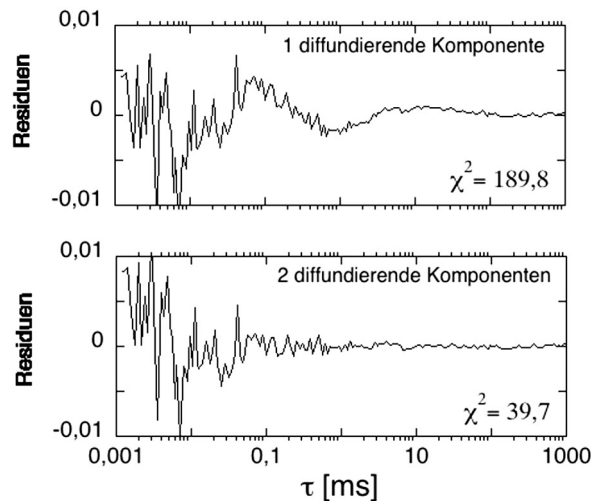


Abbildung 4.28: Residuen und χ^2 -Werte der Anpassung an eine Modellfunktion mit einer bzw. zwei diffundierenden Komponenten: Die Anpassung mit zwei diffundierenden Komponenten ergibt eine deutlich bessere Annäherung tatsächlich ermittelter CapG-eGFP-Funktionen im Zellkern.

Diffusionskoeffizient kein besonders sensitives Maß des Molekulargewichts. Um eine deutliche Änderung des Diffusionskoeffizienten um etwa den Faktor 2 zu erhalten, ist eine achtfache Differenz des Molekulargewichts nötig.³

Die zweite diffundierende Komponente des CapG-eGFP-Proteins, die sich aus dem Zerfall der Autokorrelation ergibt, ist charakterisiert durch den prozentualen Anteil des Proteins ρ_2 , der sich durch vorübergehende Assoziation an Interaktionspartner langsamer bewegt, und die Zeit τ_2 , die dieser Anteil des Proteins benötigt, durch das Beobachtungsvolumen zu diffundieren.

Bei der Betrachtung der zweiten langsam diffundierenden Komponente wurden die Meßpunkte ausgeschlossen, deren großes τ_2 durch zugrundeliegende Zellbewegung und nicht durch Proteindiffusion bedingt zu sein schien.

Korrelationszeiten über 300 bzw. 150 msec von der weiteren Auswertung auszuschließen, erscheint auch deshalb angezeigt, da bei gegebener Gesamtmeßzeit die FCS umso ungenauer wird, je länger die Korrelationszeiten diffundierender Teilchen werden. Da die FCS auf der statistischen Analyse einzelner Fluktuationen basiert, ist die Genauigkeit der FCS-Daten der Anzahl gesammelter Einzelfluktuationen proportional. Je länger also die Korrelationszeiten sind, desto weniger entsprechende Fluktuationen werden in einem Meßlauf detektiert und umso ungenauer wird die Korrelationszeit bestimmt. Als grobe Schätzung der Standardabweichung verschiedener Korrelationszeiten kann $N^{-1/2}$ dienen, wobei $N = T_R/\tau_d$. T_R ist die Gesamtmeßzeit, τ_d die Korrelationszeit⁴.

So ergibt sich bei 800 msec Korrelationszeit und einer Gesamtmeßzeit von 60 sec eine Standardabweichung von

$$\sqrt{800/60000} \approx 12\%, \quad (4.1)$$

bei einer Korrelationszeit von 150 msec und gleicher Gesamtmeßzeit hingegen nur

$$\sqrt{150/60000} \approx 5\% \quad (4.2)$$

Neben der Anzahl gesammelter Einzelfluktuationen haben die Eindeutigkeit des Signals, die molekulare Helligkeit, und die Größe der betrachteten Fraktion langsam diffundierender Teilchen Einfluß auf die Meßgenauigkeit.

³Zudem mögen bei der verwendeten Fitroutine langsamere Anteile der ersten Komponente der zweiten zugerechnet werden, was die erste schneller erscheinen läßt.

⁴Diese Möglichkeit, die Standardabweichung abzuschätzen, wird in einer frühen Arbeit von Koppel genannt [110, 111], der seinen Berechnungen eine einheitliche Beleuchtung und große Fluorophormengen zugrundelegte. Qian et al. erweiterten diese Arbeit und gaben die Berechnung der Standardabweichung für ein Gauss'sches Intensitätsprofil und eine kleine Anzahl Fluorophore an [112]. Weitere Arbeiten zur statistischen Genauigkeit von FCS-Messungen werden in den Referenzen genannt: [113, 114, 115].

Die Ergebnisse der langsam diffundierenden Komponente des CapG-eGFP sind:

bei $\tau_2 < 300$ msec

	Zytoplasma ($n = 40$)	Zellkern ($n = 34$)
ρ_2	$5,0 \pm 0,6$	$10,4 \pm 2,1$
τ_2	$84,0 \pm 12,1$ msec	$68,1 \pm 13,3$ msec

bei $\tau_2 < 150$ msec

	Zytoplasma ($n = 32$)	Zellkern ($n = 29$)
ρ_2	$5,6 \pm 0,8$	$11,6 \pm 2,4$
τ_2	$54,3 \pm 8,5$ msec	$41,0 \pm 7,3$ msec

In beiden Zellkompartimenten gibt es also langsam diffundierende Proteinanteile. Im Zellkern ist dieser Anteil mit 10 - 11% größer als im Zytoplasma (etwa 5,3%). Fixiert man τ_1 auf den entsprechenden Mittelwert, also $\tau_{1ZP} = 465$ μ sec und $\tau_{1ZK} = 488$ μ sec, ergibt sich:

bei τ_1 fixiert und $\tau_2 < 300$ msec

	Zytoplasma ($n = 43$)	Zellkern ($n = 35$)
ρ_2	$4,7 \pm 0,5$	$11,0 \pm 1,9$
τ_2	$80,0 \pm 11,3$ msec	$50,7 \pm 11,9$ msec

bei τ_1 fixiert und $\tau_2 < 150$ msec

	Zytoplasma ($n = 32$)	Zellkern ($n = 31$)
ρ_2	$5,3 \pm 0,6$	$12,0 \pm 1,3$
τ_2	$44,8 \pm 7,0$ msec	$29,0 \pm 5,6$ msec

Tabelle 4.2: die langsam diffundierende Komponente des CapG-eGFP

Diese Methode der Datenanalyse macht den Unterschied der Diffusion des CapG-eGFP in den beiden Zellkompartimenten deutlicher. Die langsam diffundierende Komponente ist im Zellkern größer (11,0 - 12,0% versus 4,7 - 5,3%) und schneller (51 versus 80 μ sec) als im Zytoplasma. Im Zellkern scheint also mehr CapG-eGFP vorübergehend an Interaktionspartner gebunden und dadurch ein größerer Teil des CapG-eGFP in seiner Diffusion verlangsamt zu sein. Doch sind die im Zellkern entstehenden Komplexe kleiner oder in ihrer Assoziation vorübergehender als die im Zytoplasma entstehenden, was in einer geringeren Zeitkonstante der zweiten diffundierenden

Komponente des CapG-eGFP im Zellkern resultiert.

Assoziationsgrad des CapG-eGFP in lebenden Zellen

Aus dem Vergleich der mittleren molekularen Helligkeit des freien eGFP und des CapG-eGFP-Fusionsproteins kann man den Assoziationsgrad des Fusionsproteins n im Zellkern und im Zytoplasma bestimmen:

$$\begin{aligned} \frac{\langle F_{eGFP} \rangle}{\langle N_{eGFP} \rangle} &= (2,0 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{ cpsm} \\ \frac{\langle F_{CapG-eGFP} \rangle}{\langle N_{CapG-eGFP} \rangle} &= (1,9 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{ cpsm} \quad \text{im Zytoplasma bzw.} \\ &= (1,8 \pm 0,04) \cdot 10^3 \text{ cpsm} \quad \text{im Zellkern} \end{aligned}$$

Demnach liegt das CapG-eGFP-Protein im allgemeinen als Monomer vor sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma. Eine genauere Bestimmung des Assoziationsstatus ist nur mit der Methode der PCH, des photon counting histogram, möglich.

FCS-Messungen mit niedriger Laserleistung

Einige Messungen wurden mit einer Laserleistung von etwa 900 nW durchgeführt entsprechend einer mittleren Intensitätsdichte von $\sim 1 \text{ kW/cm}^2$. Die Laserleistung wurde damit so eingestellt, wie von Wachsmuth et al. berichtet [72]. Die mittlere molekulare Helligkeit des eGFP und des CapG-eGFP liegt dann bei 0,55 kHz pro Teilchen - auch dies entspricht oben genannten Berichten [73]. Die Kalibrierungsmessungen mit *Alexa488* waren den Messungen mit höherer Laserintensität in etwa vergleichbar: $\tau_{al488} = 44 \mu\text{sec}$ und $1/N = 0,0815$ und $\kappa = 5$.

Repräsentative normierte Autokorrelationskurven von freiem eGFP im Zytoplasma, CapG-eGFP im Zellkern und Zytoplasma werden gezeigt.

Die Auswertung dieser Daten bringt kaum differierende Diffusionszeiten des freien eGFP und der schnell diffundierenden Komponente des CapG-eGFP. Auch in der Analyse der zweiten Komponente des CapG-eGFP ist mit diesem experimentellen Aufbau kein Unterschied in Fraktion und Zeit zwischen Zytoplasma und Zellkern detektierbar.

	τ_D bzw. τ_1
eGFP	$541 \pm 22 \mu\text{sec}$
CapG-eGFP _{ZP}	$526 \pm 16 \mu\text{sec}$
CapG-eGFP _{ZK}	$560 \pm 22 \mu\text{sec}$

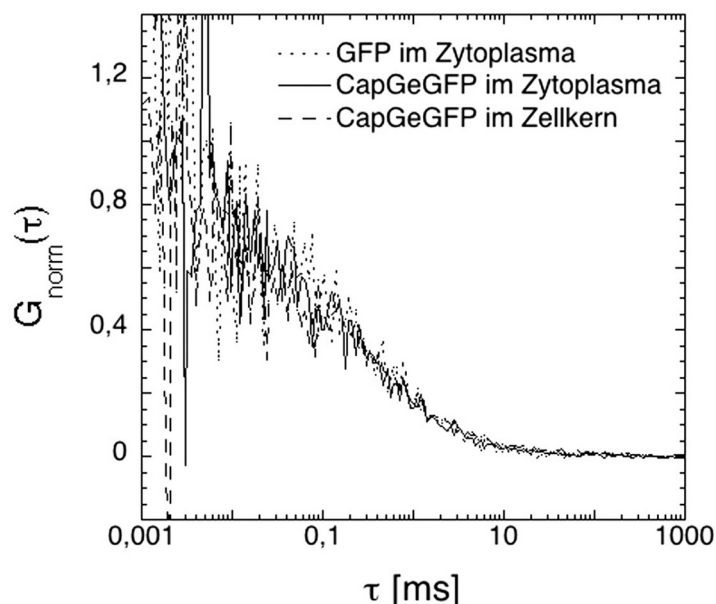


Abbildung 4.29: Vergleich der normierten Autokorrelationen von eGFP im Zytoplasma und CapG-eGFP im Zytoplasma und Zellkern (mittlere Laserleistung: $0,9 \mu\text{W}$ bzw. mittlere Intensitätsdichte: $1 \text{ kW}/\text{cm}^2$): Die unterschiedlichen Zerfallszeiten sind nicht zu trennen.

Wenn τ_1 auf den entsprechenden Mittelwert fixiert wird und $\tau_2 < 300$ msec, erhält man folgende Werte der langsam diffundierenden Komponente des CapG-eGFP:

	Zytoplasma ($n = 26$)	Zellkern ($n = 30$)
ρ_2	$7,7 \pm 1,5$	$5,4 \pm 0,7$
τ_2	$75,3 \pm 18,2 \text{ msec}$	$98,3 \pm 14,0 \text{ msec}$

Der Tripletanteil des CapG-eGFP ist bei der Meßreihe mit niedriger Laserintensität mit $\sim 33\%$ größer als bei der Meßreihe mit höherer Laserintensität ($\sim 20\%$), obwohl man erwartet hätte, daß der Tripletanteil mit steigender Laserstärke zunimmt. Es ist möglich, daß die Tripletfraktion durch die Fit-Routine überschätzt wird, da die Autokorrelationen gerade in ihrem Anfangsteil stark verrauscht sind. Ein schlechtes Signal-zu-Rausch-Verhältnis könnte auch Grund dafür sein, daß verschiedene Mobilitäten des Fusions-

proteins mit geringerer Laserintensität nicht diskriminierbar waren, die bei höherer Laserintensität durchaus zu unterscheiden sind. Meseth et al. gaben an, daß gerade im Bereich kurzer Korrelationszeiten die Meßgenauigkeit der FCS stark von der molekularen Helligkeit abhängt. Erst bei Korrelationszeiten >100 msec ist die Standardabweichung unabhängig von der Signalintensität. Die einzig mögliche Art, den experimentellen Fehler dann (also bei Korrelationszeiten >100 msec) zu reduzieren, besteht darin, die Gesamtmeßzeit zu verlängern [68].

Continuous Photobleaching

Eine Variante der Kinetikanalyse fluoreszierender Moleküle ist das kontinuierliche Bleichen (CP). Mit geringer Laserintensität wird über einen längeren Zeitraum ein Punkt in der Zelle beleuchtet und simultan der Abfall der Fluoreszenz detektiert. Diese Experimente wurden anders als die übrigen Kinetikanalysen bei Raumtemperatur durchgeführt.

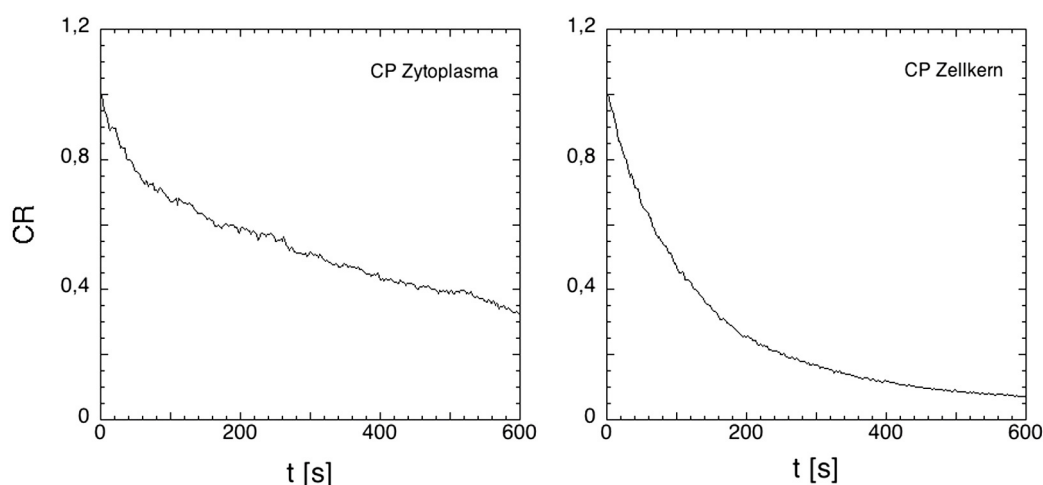


Abbildung 4.30: Vergleich des Fluoreszenzzerfalls bei kontinuierlichem Bleichen im Zytoplasma und im Zellkern lebender Mammakarzinomzellen

Ohne auf die Möglichkeiten weiterer Auswertung des beobachteten biexponentiellen Fluoreszenzzerfalls einzugehen, sollen hier lediglich zwei exemplarische normierte Kurven gezeigt werden: eine aus dem Zellkern und eine aus dem Zytoplasma transient transfizierter MDA-MB-231.

Die Fluoreszenz wird bei derselben Laserintensität und in derselben Zelle schneller und stärker im Zellkern gebleicht als im Zytoplasma. Außerdem zeigt die Zerfallskurve des Zellkerns einen glatten Verlauf, wohingegen im

Zytoplasma immer wieder kleine spikes den Gesamtverlauf überlagern. Es scheinen im Zytoplasma immer wieder Ansammlungen von fluoreszierendem Protein in den Fokus zu flottieren. Dies können kurze, verzweigte Aktinfilamente sein, die an ihren Verzweigungsenden CapG binden. Es gibt Hinweise, daß solche kurzen Aktinfilamente im Zytoplasma bestehen, die am Ort stärkerer Aktinpolymerisation in größere Aktinnetze eingebaut werden [27]. Dies können aber auch diffundierende vesikuläre Strukturen sein, die größere Mengen CapG eventuell über eine PIP_2 -Bindung enthalten.

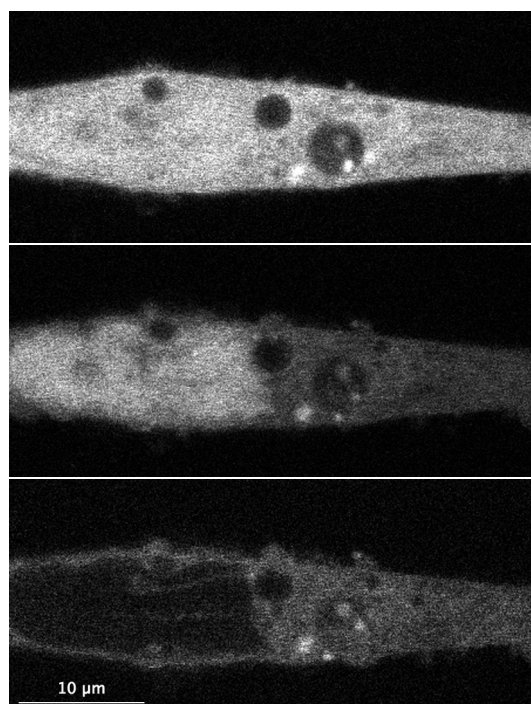


Abbildung 4.31: Bilder vor und nach Bleichen des Zytoplasmas und des Zellkerns einer transient transfizierten MDA-MB-231-Zelle

Werden Bildern vor und nach dem Bleichen aufgenommen, sieht man beide Kompartimente homogen entfärbt, obwohl nur in einem Punkt gebleicht wurde. Zudem fällt auf, daß das jeweils nichtgebleichte Kompartiment seine Fluoreszenz weitgehend bewahrt.

Zellkern und Zytoplasma transient transfizierter Mammakarzinomzellen scheinen für das CapG-eGFP-Fusionsprotein weitgehend getrennte Diffusionsräume zu sein, die verschiedene Mobilitätseigenschaften des Proteins zeigen. Über mehrere Sekunden betrachtet, diffundiert das Protein im Zellkern offenbar rascher als im Zytoplasma.

Die Bindungseigenschaften des Proteins im Zellkern der lebenden Zelle und den Austausch mit dem Zytoplasma näher zu charakterisieren, war Ziel anschließender FRAP-Messungen.

4.4.2 Dynamik ganzer CapG-Populationen: FRAP

Da es in der Literatur Hinweise gibt, daß gerade die Zellkernfraktion des CapG-Proteins entscheidend für den Zugewinn an Motilität einer Zelle sein könnte, wurden die FRAP-Experimente dieser Arbeit auf die Mobilität des CapG-eGFP-Fusionsproteins innerhalb des Zellkerns und den Austausch des Proteins zwischen den Kompartimenten Zellkern und Zytoplasma fokussiert. Die FRAP-Ergebnisse neoplastischer und nichtneoplastischer Brustepithelzellen wurden verglichen.

Vergleich der CapG-Mobilität in normalen und tumorösen Zellen

Die Zellkerne invasiver, metastasierender Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231) und normaler Brustepithelzellen (MCF-12A) wurden mit hoher Laserintensität gebleicht und die folgenden Änderungen der Fluoreszenzintensitäten in der lebenden Zelle über die Zeit beobachtet. So konnte der Austausch fluoreszierender CapG-eGFP-Proteine zwischen den Kompartimenten Zellkern und Zytoplasma über die Zeit sichtbar gemacht werden.

Schichtaufnahmen (Z-Stapel) zeigen, daß unter den gewählten Bedingungen des Bleichens die Zellkerne der untersuchten Zellen tatsächlich ihre Fluoreszenz homogen verloren (Abb. 4.32).

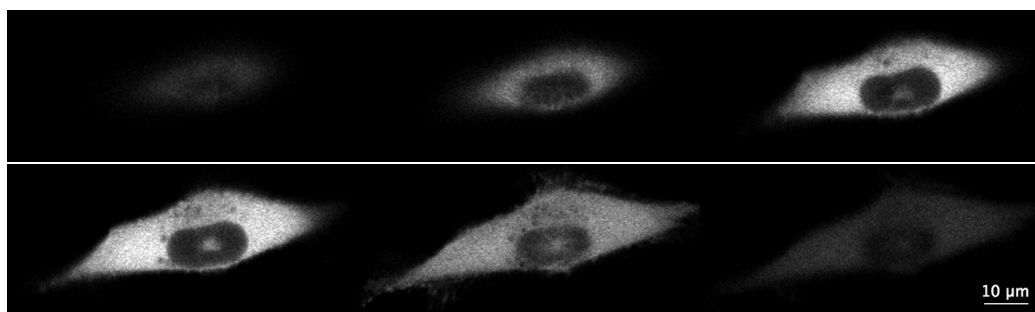


Abbildung 4.32: Z-Stapel einer CapG-eGFP stabil exprimierenden MDA-MB-231-Zelle: Die Fluoreszenzintensität war nach dem Bleichen tatsächlich im gesamten Zellkern reduziert.

Abbildung 4.33 gibt Beispiele der Fluoreszenzerholung der Zellkerne neoplastischer und nichtneoplastischer Zellen. Schon bei Betrachten dieser Ab-

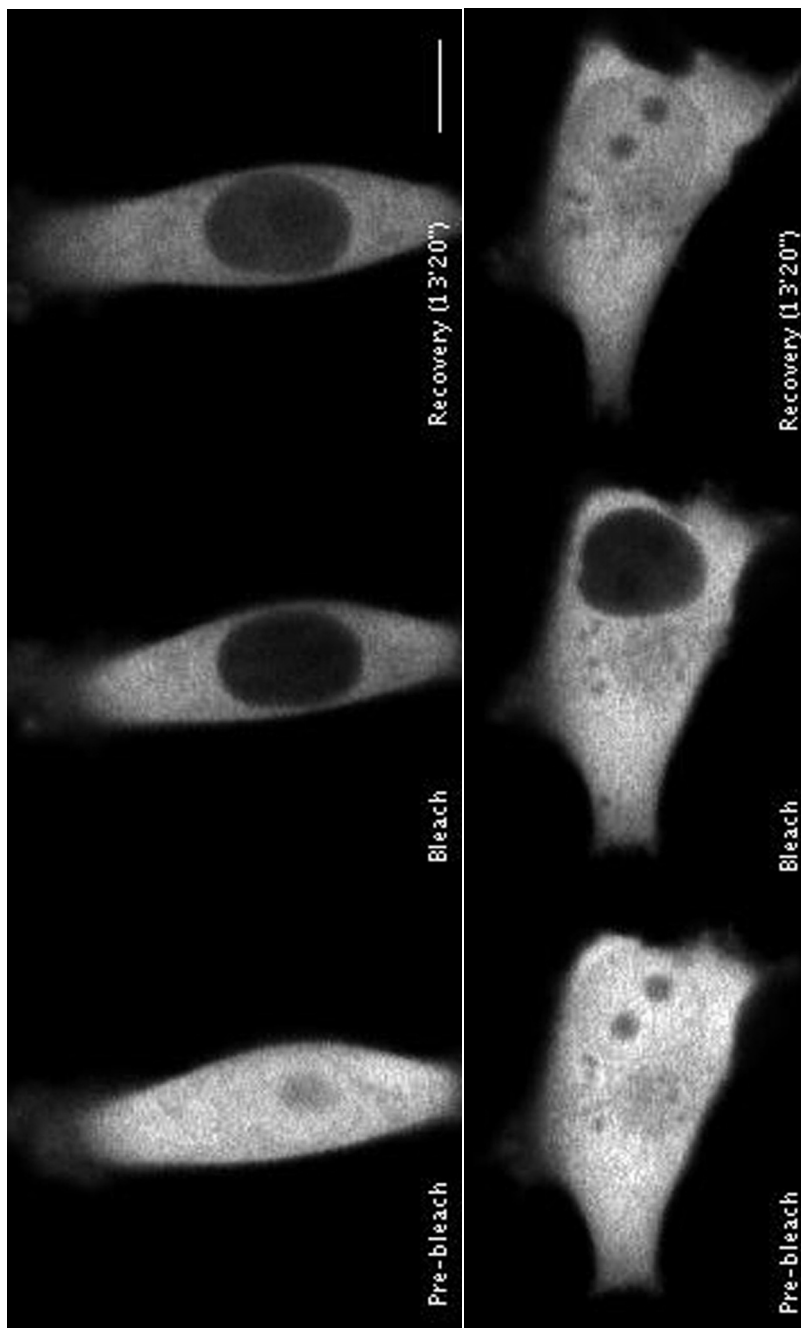


Abbildung 4.33: Beispiele der FRAP-Messungen nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepithelzellen: obere Reihe: Bilder einer nichtneoplastischen MCF-12A-Zelle vor und unmittelbar nach dem Bleichen und am Ende des Beobachtungszeitraums (13min 20sec); untere Reihe: Bilder einer neoplastischen MDA-MB-231-Zelle vor und unmittelbar nach dem Bleichen und am Ende des Beobachtungszeitraums (13min 20sec); Skalierungsbalken: 10 μm

bildungen werden Unterschiede im Transport zwischen den Kompartimenten Zytoplasma und Zellkern beider Zelltypen offensichtlich.

Die Fluoreszenzintensitäten von Zellkern, Zytoplasma und extrazellulärem Hintergrund 20 nichtneoplastischer und 28 neoplastischer Brustepithelzellen wurden bestimmt, korrigiert und normalisiert wie im Methodenteil angegeben. Trägt man die relativen Fluoreszenzintensitäten gegen die Zeit auf, erhält man die recovery-Profile der einzelnen Zellen (Abb. 4.34). Mittelwertkurven wurden berechnet.

Kinetikparameter differenzieren normale und tumoröse Zellen

Wird eine einfache Exponentialfunktion den Mittelwertkurven beider Zelltypen angepaßt, lassen sich charakteristische Kinetikparameter des Zellkernimports nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepithelzellen bestimmen.

$$F(t) = 1 - (a - b(1 - e^{-\lambda t})), \quad (4.3)$$

wobei a den Anteil der relativen Fluoreszenzintensität beschreibt, der gebleicht wird, b den Anteil, der sich über die Zeit t erholt, und λ die Rate der Fluoreszenzerholung. Der Kehrwert von λ beschreibt die recovery-Zeit τ , also die Zeit, die vergeht bis 2/3 der anfänglichen relativen Fluoreszenzintensität wiedergewonnen sind. Die Werte beider Zelltypen sind im einzelnen:

	MCF-12A ($n = 20$)	MDA-MB-231 ($n = 28$)
a	$0,770 \pm 0,001$	$0,783 \pm 0,001$
b	$0,553 \pm 0,046$	$0,757 \pm 0,006$
λ	$(0,576 \pm 0,064) \cdot 10^{-3} \text{sec}^{-1}$	$(1,37 \pm 0,020) \cdot 10^{-3} \text{sec}^{-1}$

Aus den Fraktionen a und b kann man nach $I_F = a - b$ die immobilisierte Fraktion des CapG-eGFP-Proteins im Zellkern des jeweiligen Zelltyps berechnen und aus $1/\lambda$ die recovery-Zeit τ als Maß des Nettotransports aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

	MCF-12A ($n = 20$)	MDA-MB-231 ($n = 28$)
I_F	$30,8 \pm 6\%$	$3,3 \pm 1\%$
τ	$1736 \pm 193 \text{sec}$	$730 \pm 11 \text{sec}$

Tabelle 4.3: FRAP-Daten nichtneoplastischer und neoplastischer Brustepithelzellen

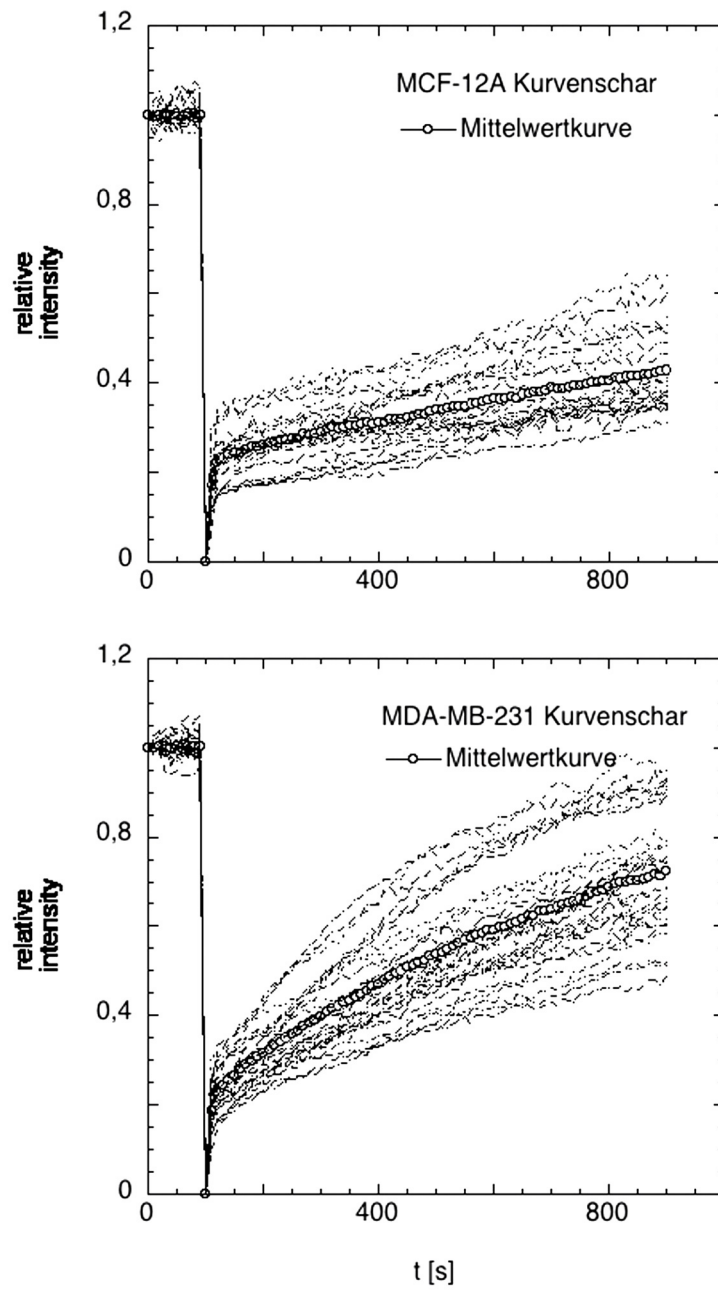


Abbildung 4.34: Kurvenscharen der recovery-Profile nichtneoplastischer (MCF-12A) und neoplastischer Zellen (MDA-MB-231) mit entsprechenden Mittelwertkurven

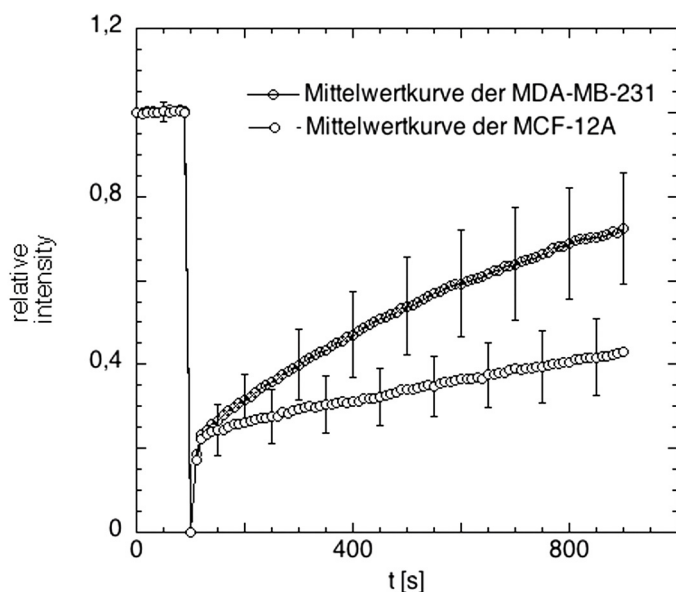


Abbildung 4.35: Vergleich der Mittelwertkurven der untersuchten MCF-12A und MDA-MB-231; als Fehlerbalken sind die jeweiligen Standardabweichungen angegeben

Damit unterscheiden sich normale Brustepithelzellen und Mammakarzinomzellen sowohl in der Importgeschwindigkeit des CapG-eGFP in den Zellkern (1740 versus 730 sec) als auch in dem immobilisierten Anteil des Proteins im Zellkern (31 versus 3%) deutlich. Das CapG-eGFP-Protein scheint in den karzinomatösen Zellen schneller in den Zellkern transportiert zu werden und hier weit weniger immobilisiert zu sein als in den entsprechenden normalen Zellen.

I_F und τ : unabhängig differenzierende Parameter

Wie die Kurvenscharen anschaulich machen, ist die Geschwindigkeit des Zellkernimports verschiedener Zellen ein und desselben Zelltyps durchaus unterschiedlich. Es gibt schneller und langsamer importierende normale und karzinomatöse Zellen. Um festzustellen, ob die immobilisierte Fraktion sich dementsprechend ändert oder ob sie vielmehr ein unabhängig differenzierender Parameter ist, wurden die betrachteten Zellen in zwei gleich große Untergruppen geteilt: Aus den untersuchten Zellen beider Zelltypen wurde je eine Gruppe mit relativ langsamem und relativ schnellem Import gebildet. Anhalt dieser Einteilung war die am Ende des Beobachtungszeitraums erreich-

te Fluoreszenzintensität im Zellkern. So entstanden zwei Gruppen der normalen Brustepithelzellen (Endintensität jeweils $< 0,4$ MCF_{slow} bzw. $> 0,4$ MCF_{fast}) und zwei Gruppen der Karzinomzellen (Endintensität jeweils $< 0,7$ MDA_{slow} bzw. $> 0,7$ MDA_{fast}).

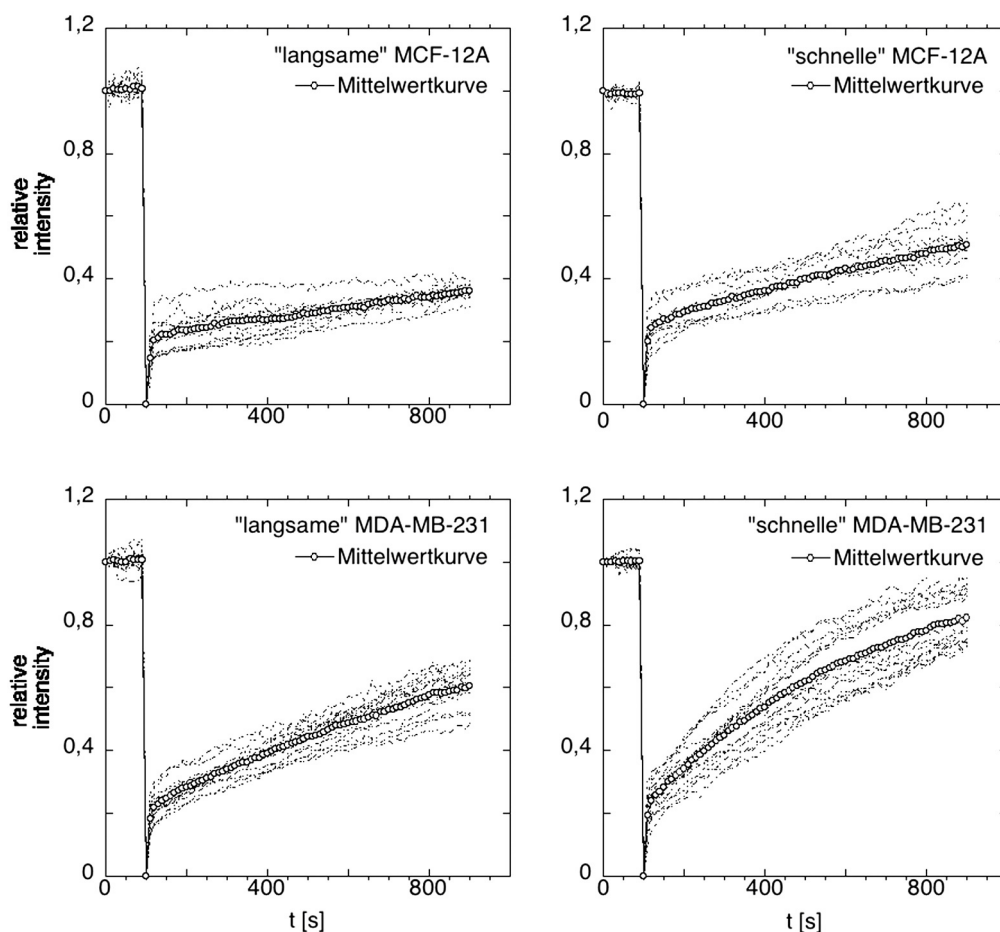


Abbildung 4.36: Kurvenscharen und entsprechende Mittelwertkurven der Untergruppen der untersuchten MCF-12A- und MDA-MB-231-Zellen

Die Gruppe der Karzinomzellen mit dem relativ langsamen Zellkernimport und die Gruppe der normalen Brustepithelzellen mit dem relativ schnellen Import wurden verglichen. Wie erwartet nähern sich die Erholzeiten der Fluoreszenz einander an ($\tau_{MCF_{fast}} = 1230$ versus $\tau_{MDA_{slow}} = 1135$ sec). Die immobilen Fraktionen der beiden Zelltypen bleiben jedoch nahezu unverändert ($I_{F(MCF_{fast})} = 28\%$ versus $I_{F(MDA_{slow})} = 1,5\%$). Die im Zellkern immobilisierte Fraktion neoplastischer und nichtneoplastischer Zellen diffe-

renziert die beiden Zelltypen also stabil und unabhängig von der Erholzeit. Die Daten im einzelnen:

	MCF-12A _{>0,4} ($n = 9$)	MDA-MB-231 _{<0,7} ($n = 13$)
I_F	$28,2 \pm 3,5\%$	$1,4 \pm 4\%$
τ	$1227 \pm 81\text{sec}$	$1134 \pm 71\text{sec}$

Tabelle 4.4: FRAP-Daten der MCF-12A- und MDA-MB-231-Untergruppen

Da die Konzentrationen des endogenen CapG-Proteins in den betrachteten Zelltypen konstitutiv stark verschieden sind - das CapG-Protein ist in den MDA-MB-231 stark überexprimiert -, liegt die Vermutung nahe, die beobachteten Unterschiede in der Importgeschwindigkeit des CapG-eGFP seien lediglich konzentrationsbedingt. Der Expressionsgrad, also die Konzentration des fluoreszierenden Fusionsproteins bestimmt die registrierte Fluoreszenzintensität. CapG-eGFP stark exprimierende Zellen werden hell leuchten, schwächer exprimierende Zellen werden dunkler sein. Da die computergestützte Verstärkung des detektierten Signals stets so eingestellt wurde, daß gerade einige wenige Pixel Sättigung zeigten, kann die Verstärkung als Maß des Expressionslevels dienen. Je höher die Verstärkung, desto schwächer leuchtete die Zelle und umso weniger Fusionsprotein wurde in der Zelle gebildet und umgekehrt. In den Graphiken der Abbildung 4.37 ist für beide Zelltypen die Verstärkung gegen die im Beobachtungszeitraum erreichte Fluoreszenzintensität aufgetragen.

Wie der Abbildung 4.37 zu entnehmen, ist keine Korrelation zwischen Expressionsgrad des CapG-eGFP und der Importgeschwindigkeit aus dem Zytoplasma in den Zellkern zu erkennen. Der Zellkernimport scheint demzufolge nicht bloß durch unterschiedliche Konzentrationen des CapG-eGFP-Proteins bedingt zu sein. Darüberhinaus sieht man, daß viele der untersuchten Zellen beider Zelltypen das CapG-eGFP-Fusionsprotein in etwa gleich stark exprimieren (Verstärkungsbereich 75 bis 105), obwohl das endogene CapG verschieden stark gebildet wird.

Im allgemeinen wird man bei den beschriebenen intrazellulären Transportprozessen zwischen Zellkompartimenten von Prozessen 1. Ordnung ausgehen. Diese Prozesse sind, soweit sie nicht gesättigt sind, von der Konzentration des zu transportierenden Stoffes unabhängig und werden durch die jeweilige Transportrate charakterisiert.

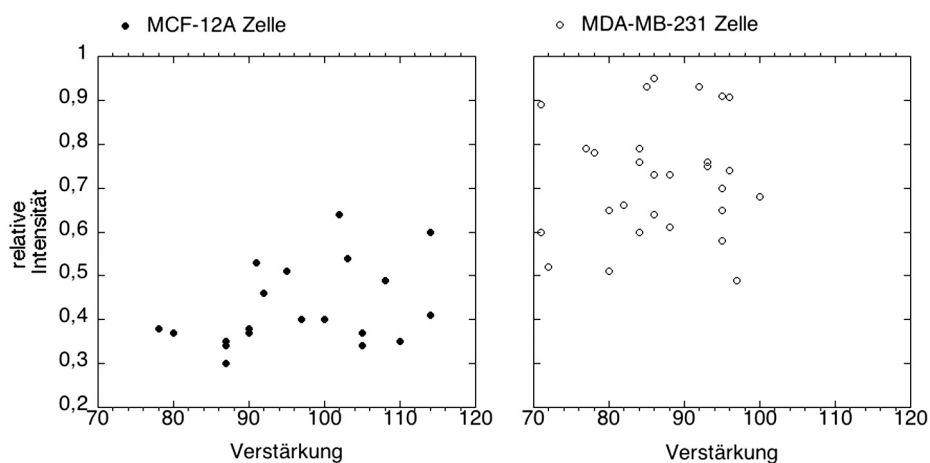


Abbildung 4.37: Die Verstärkungen der untersuchten MCF-12A- und MDA-MB-231-Zellen gegen die jeweils am Ende des Beobachtungszeitraums erreichte Fluoreszenzintensität aufgetragen: Es ist bei beiden Zelltypen keine Korrelation dieser Parameter zu erkennen.

Mechanismen intrazellulärer CapG-Mobilität

Neben der phänomenologischen Beschreibung der Kinetik des Zellkernimports und der Mobilität des CapG-Proteins innerhalb des Zellkerns galt es nun, Umstände zu definieren, die genannte Mobilitätseigenschaften beeinflussen und modifizieren, um so ein genaueres Bild zugrundeliegender Mechanismen der CapG-Dynamik in der lebenden Zelle zu erhalten. Es wurde versucht, die Mobilität des CapG mit unterschiedlichen Substanzen zu variieren, den Zellkernimport also abzuschwächen oder gar zu beschleunigen.

Die folgenden Untersuchungen wurden nur mit neoplastischen Brustepithelzellen (MDA-MB-231) durchgeführt.

Zellkernimport des CapG-eGFP ist energieabhängig

In-vitro-Versuche legen nahe, der Zellkernimport des CapG-eGFP-Fusionsproteins sei energieabhängig, er verbrauche ATP und GTP [18]. Ein aktiver Transportprozeß stünde auch in guter Übereinstimmung mit der Größe des Proteins. Ab einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa wird ein rein passiver Transport durch die Kernhülle ineffizient [18].

Um nun in lebenden Zellen nachzuweisen, daß der Zellkernimport des CapG-eGFP tatsächlich Energie benötigt, wurde die intrazelluläre Mobilität des Fusionsproteins mit Hilfe von FRAP charakterisiert, die Energiespeicher

der betrachteten Zellen wurden - gemäß der Beschreibung von Shav-Tal et al. [116] - mit 10 mM Na-azid und 6 mM 2-Deoxy-glukose metabolisch total entleert und die sich ergebenden Unterschiede in der Dynamik des Fusions-proteins erneut mit FRAP analysiert.

Das Vorgehen im einzelnen: Der Zellkernimport einer MDA-MB-231-Zelle wurde wie oben beschrieben gemessen, anschließend Na-azid und 2-Deoxy-glukose appliziert und der Import in derselben Zelle 10 - 15 min nach Applikation erneut registriert. Dann wurde das Medium ausgewaschen und durch frisches ersetzt, 2 Stunden später der Transport abschließend in derselben Zelle bestimmt. Dieses Experiment wurde an drei Zellen durchgeführt, Mittelwertkurven wurden berechnet und sind in Abbildung 4.38 dargestellt.

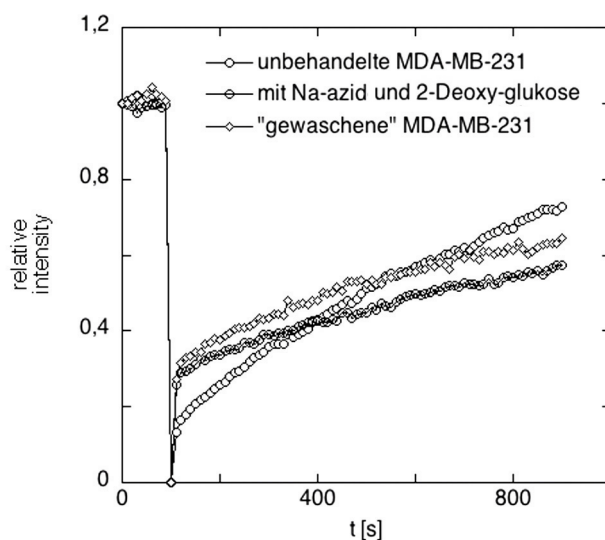


Abbildung 4.38: Hemmung der Fluoreszenzaufnahme im Zellkern durch Na-azid und 2-Deoxy-glukose: Mittelwertkurven vor, 15 min nach Na-azid-Applikation und 2 h nach Austausch des Mediums

Die Hemmung des Zellkernimports durch Na-azid und 2-Deoxy-glukose erscheint deutlich. Die Steigung der recovery-Kurve wird nach metabolischer Depletion flacher. Ersetzt man das Zellkulturmedium, kann dieselbe Zelle 2 Stunden später noch vital untersucht werden. Eine kurzfristige Na-azid-Behandlung treibt die untersuchten Zellen also nicht zwangsläufig in die Apoptose. Vielmehr gelingt es ihnen, ihre Energiespeicher nach Austausch

des Mediums wieder zu füllen und sich, wenn auch nur langsam, wieder zu erholen. Der detektierte Zellkernimport des CapG-eGFP nimmt langsam wieder zu, erkennbar am etwas steileren Anstieg der recovery-Kurve 2 Stunden nach Mediumwechsel.

Der beschriebene FRAP-Ansatz ermöglicht so auch in der lebenden Zelle die Untersuchung energieabhängiger Transportprozesse. Die gezeigten Ergebnisse machen wahrscheinlich, daß der Zellkernimport des CapG-eGFP tatsächlich Energie benötigt.

Östrogen stimuliert den Zellkernimport des CapG-eGFP

Es wird berichtet, unter Androgenstimulation komme es zu einer vorübergehenden Kolo-kalisation des Androgenrezeptors und des Gelsolin im und um den Zellkern fibroblastenähnlicher Affennierenzellen. Dies wurde mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen gezeigt [42]. In Analogie zu einem Aktin-bindenden Protein, das nicht zur Gelsolinfamilie gehört, dem FilaminA [117], wurde vermutet, Gelsolin binde kurze Zeit an den Androgenrezeptor und erleichtere dessen Transport in den Zellkern. An anderer Stelle wurde bereits der gemeinsame Zellkerntransport von Typ I Steroidrezeptoren (Östrogen-, Androgen- und Glukokortikoidrezeptoren) und Aktin-bindenden Proteinen als möglicher allgemeiner Transportmechanismus postuliert. Die zytosolischen Steroidrezeptoren könnten, nachdem sie durch die Ligandenbindung dimerisierten, mit Aktin-bindenden Proteinen assoziieren und diese huckepack in den Zellkern transportieren [41].

Um zu prüfen, ob die Östrogenstimulation den Zellkernimport des CapG-eGFP in Mammakarzinomzellen verstärkt, ob hier also durch Östrogene eine ähnliche Umverteilung hervorgerufen wird wie im Falle des Gelsolin durch Androgene, wurde die CapG-eGFP-Mobilität in einzelnen MDA-MB-231-Zellen vor und nach Stimulation mit Östradiol- β analysiert: Der Nettoimport des CapG-eGFP in den Zellkern wurde in einer unstimulierten Zelle anhand der Fluoreszenzerholung gemessen, anschließend dem Zellmedium Östradiol- β in Sättigungsdosis ($\sim 50 - 70$ nM Endkonzentration) zugesetzt, dann der Zellkern derselben Zelle 8 Minuten nach Stimulation erneut gebleicht und die Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität des Zellkerns registriert. So wurden 20 MDA-MB-231-Zellen untersucht. Die Abbildung 4.39 stellt die Mittelwertkurven dar.

Eine Zunahme der Fluoreszenzerholung ist an der Zunahme der Steigung der Mittelwertkurve deutlich abzulesen. Offensichtlich stimuliert die Zugabe von Östradiol- β den Zellkernimport des CapG-eGFP in den untersuchten Mammakarzinomzellen stark.

Die immobilisierte Komponente des CapG im Zellkern läßt sich aus diesen

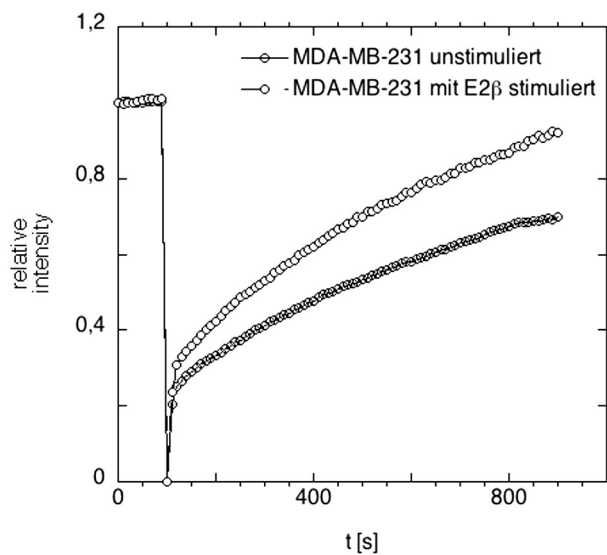


Abbildung 4.39: Östrogenstimulation des Zellkernimports: Mittelwertkurven von 20 MDA-MB-231-Zellen vor und nach Stimulation mit Östradiol- β

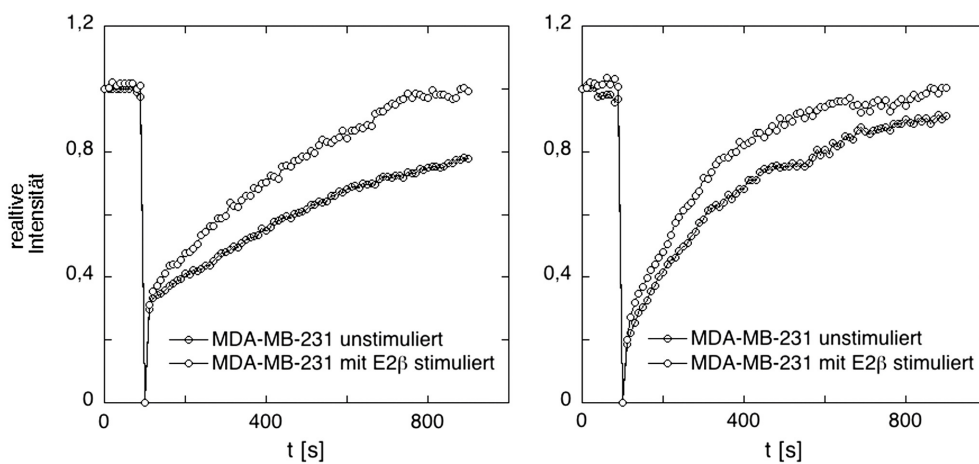


Abbildung 4.40: Recovery-Profile einzelner Zellen vor und nach Stimulation mit Östradiol β : Beispiele verschieden starker Stimulierung

Mittelwertkurven leider nicht berechnen, da die relative Fluoreszenzintensität nach Stimulation oftmals über die Ausgangsintensität hinausging. Ob die Zellen nach Stimulation tatsächlich mehr CapG-eGFP in den Zellkern aufnahmen oder ob der recovery-Prozeß der unstimulierten Aufnahme zum Zeitpunkt der Stimulation nur noch nicht vollständig abgeschlossen war, läßt sich aus diesen Experimenten nicht eindeutig klären.

Um die Kinetik des stimulierten CapG-Zellkernimports einzelner Zellen zu zeigen, sollen zwei exemplarische Einzelzellkurven abgebildet werden (Abb. 4.40). Die Fluoreszenzzunahme scheint in den dargestellten Zellen verschieden stark stimuliert zu werden. Bei der Zelle, die initial langsamer CapG-eGFP in den Zellkern aufnahm, ist die Stimulation deutlicher als bei der Zelle, die auch schon vor der Stimulation das Fusionsprotein rasch in den Zellkern importierte. Dies kann durch biologische Varianz bedingt sein oder aber ein Hinweis auf Sättigung des vorliegenden Transportprozesses.

Wenn diese Untersuchungen auch zeigen, daß Östradiol- β den Zellkernimport des CapG-eGFP deutlich stimuliert, bleibt doch fraglich, ob dem tatsächlich eine vermehrte Assoziation von Östrogenrezeptor und CapG im Zytoplasma und ein beschleunigter Huckepack-Transport in den Zellkern zugrundeliegt. Zumal die untersuchten MDA-MB-231-Zellen nur in sehr geringem Maße Östrogenrezeptoren exprimieren, damit also nur wenige potentielle Carriermoleküle dem CapG-Ko-Transport zur Verfügung stünden und dieser nur wenig steigerbar sein dürfte.

Neben der Möglichkeit eines Ko-Transports von Östrogenrezeptor und CapG wäre es beispielsweise auch durchaus denkbar, daß durch die Stimulation des Östrogenrezeptors Signalkaskaden angestoßen werden, die eine intrazelluläre Umverteilung des CapG-Proteins begünstigen.

Die zellulären Wirkungen der Östrogene werden in zellkern- und membraninitiierte eingeteilt. Die zellkerninitiierte Primärantwort wird nach etwa 30 Minuten wirksam und beinhaltet die direkte Aktivierung einer kleinen Anzahl spezifischer Gene. Die Proteinprodukte dieser Gene aktivieren wiederum andere Gene. Dies ist die verzögerte, zellkerninitiierte Sekundärantwort [118]. Membraninitiierte zelluläre Wirkungen sind hingegen innerhalb einiger Sekunden nachweisbar: beispielsweise als Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} , cAMP und IP_3 . Diese Wirkungen der Östrogene werden durch membranäre Östrogenrezeptoren ausgelöst.

Die membranären Östrogenrezeptoren sind entweder selbst transmembranäre Moleküle oder über Ankerproteine membranassoziiert. Da die Östrogenrezeptoren keine intrinsische Kinaseaktivität besitzen, wird angenommen, sie seien zentraler Teil eines membranären Signalkomplexes, der in der Lage ist, viele verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden zu aktivieren. Mögliche Moleküle dieser Komplexe sind u.a. G-Proteine (wie $G_{\alpha i}$), das Hitze-

schock Protein 90 (HSP90), Kaveolin-1, Matrixmetalloproteinasen (MMP) und c-Src. Beispiele nachgeschalteter Signalkaskaden sind die MAP-Kinase, der PI_3 -K/Akt-Signalweg, G-Protein-gekoppelte second messenger Systeme und die Aktivierung des EGF-Rezeptors [119, 120].

Aus diesen Beispielen sind als mögliche Mediatoren des beschleunigten CapG-Zellkernimports die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src und die PI_3 -Kinase hervorzuheben. Eine der c-Src-Kinasen wurde als mögliche Verantwortliche der CapG-Phosphorylierung beschrieben [12]. Eine verstärkte Phosphorylierung des CapG-Proteins könnte mit der bevorzugten Kompartimentierung im Zellkern einhergehen [11]. Die andere genannte Kinase, die PI_3 -K, generiert unter anderem PIP_2 , welches an CapG gebunden dessen Affinität zu β -Aktin vermindert und so CapG-Moleküle aus dem membranahen Aktinnetzwerk freisetzt und einer intrazellulären Umverteilung zugunsten des Zellkerns zugänglich macht. Außerdem soll PIP_2 die Phosphorylierungsaktivität der Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-Src stark fördern [12], wodurch die Signalwege der c-Src und der PI_3 -K miteinander verknüpft sein könnten.

In weiteren FRAP-Experimenten mit nicht-membrangängigem $E_2\beta$, selektiven Inhibitoren einzelner Signalwege und Brustepithelzellen, die den Östrogenrezeptor stark exprimieren, mag eine weitere funktionelle Charakterisierung des östrogenstimulierten CapG-Transports gelingen.

EGF stimuliert den Zellkernimport des CapG-eGFP

Da eine nachgeschaltete Signalkaskade des stimulierten membranassoziierten Östrogenrezeptors die Aktivierung des EGF-Rezeptors einschließt [119, 121] und da nach neueren Berichten eine gegenseitige Beeinflussung von Östrogen- und EGF-Rezeptoren durchaus möglich ist [122, 123], wurde versucht, den Zellkernimport des CapG-eGFP auch mit humanem EGF zu stimulieren. So sollte der Mechanismus des CapG-Zellkernimports weitergehend charakterisiert werden.

Die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen des humanen rekombinanten EGF auf den CapG-Transport von Mammakarzinomzellen wurde getestet, der Zellkernimport des CapG-eGFP in derselben MDA-MB-231-Zelle vor und nach EGF-Applikation mit FRAP bestimmt.

Die Stimulation der Mammakarzinomzellen mit EGF in einer Endkonzentration von etwa 20 - 120 ng/ml zeigte so gut wie keine Wirkung, wohingegen EGF in einer Endkonzentration von nahezu 200 ng/ml bei zwei der untersuchten vier MDA-MB-231-Zellen nach 8 min den Zellkernimport deutlich steigerte (Abb. 4.41). Die anderen beiden MDA-MB-231-Zellen wurden hingegen nur schwach bis gar nicht stimuliert (Abb. 4.42).

Sicher sind Messungen einer größeren Anzahl Zellen erforderlich. Doch

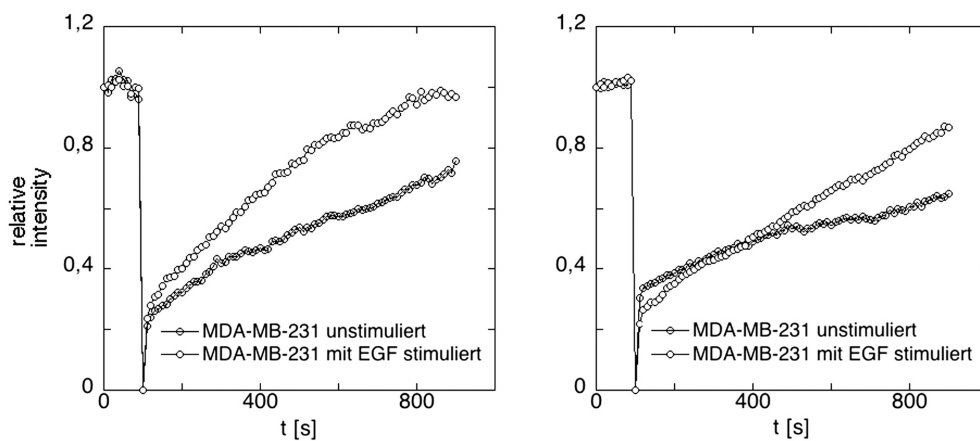


Abbildung 4.41: Recovery-Profile einzelner Zellen vor und 8 Minuten nach EGF-Applikation: Beispiele starker Stimulation

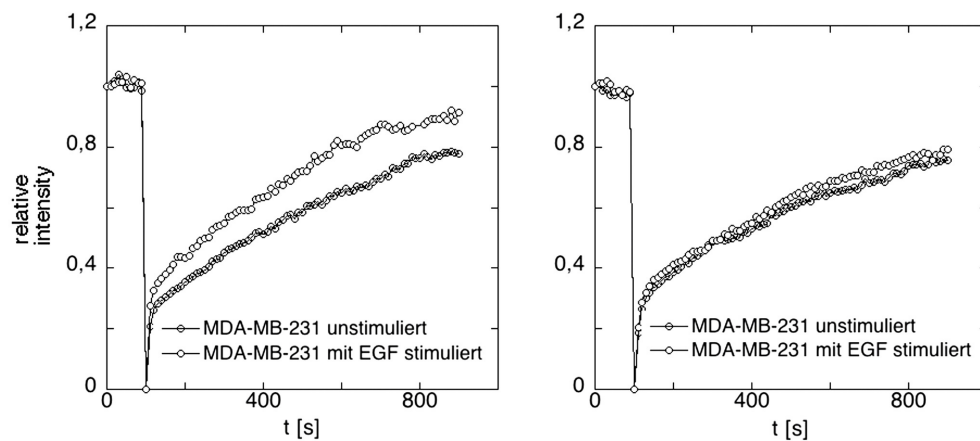


Abbildung 4.42: Recovery-Profile einzelner Zellen vor und 8 Minuten nach EGF-Applikation: Beispiele schwacher Stimulation

können die hier gezeigten Daten einen ersten Hinweis geben, daß der epidermale Wachstumsfaktor tatsächlich die intrazelluläre Verteilung des CapG beeinflusst. Darüberhinaus scheint es möglich, aus dem Vergleich mit der dokumentierten Östrogenstimulation Unterschiede der jeweils zugrundeliegenden Mechanismen abzuleiten. Die Stimulation des CapG-Zellkernimports scheint durch EGF weniger sicher auslösbar als durch $E_2\beta$. Beobachtungen des weiteren Zeitverlaufs nach EGF- respektive Östrogenstimulation mögen Vermutungen über unterschiedliche Stimulationsmechanismen außerdem stützen. Bei den Zellen, die durch EGF nach 8 Minuten eine deutliche Steigerung des Zellkernimports zeigten, nimmt dieser Import nach 30 Minuten weiter zu, um dann auch nach 52 Minuten stabil stimuliert zu bleiben. Bei östrogenstimulierten Zellen ist dahingegen bereits nach 30 Minuten keine weitere oder kaum eine weitere Steigerung des CapG-Transports festzustellen (s. Abb. 4.43 und 4.44).

Durch den hier beschriebenen FRAP-Ansatz war es möglich, die intrazelluläre Mobilität des CapG-eGFP zu charakterisieren. Es gelang, Unterschiede der CapG-Mobilität in normalen und tumorösen Brustepithelzellen *in vivo* aufzuzeigen. Zudem konnte die CapG-Kinetik in lebenden Zellen durch verschiedene Agenzien modifiziert und zugrundeliegende Mechanismen konnten so eingegrenzt werden.

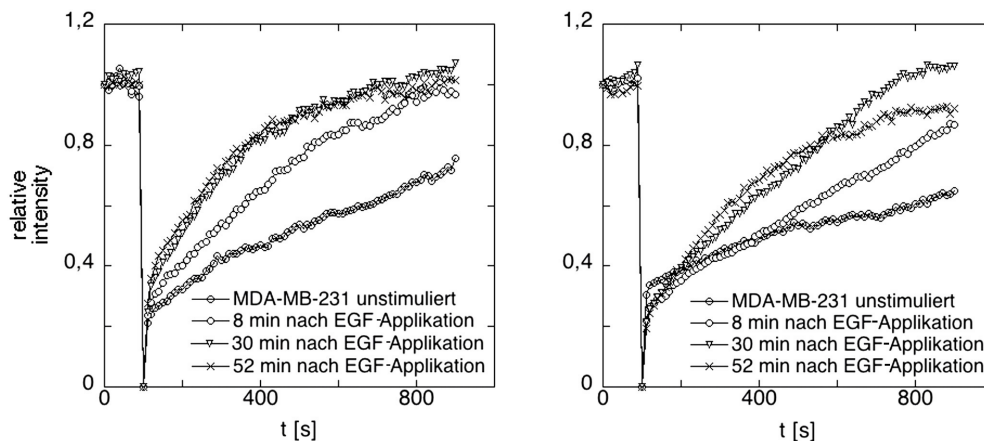


Abbildung 4.43: Beobachtung des recovery-Prozesses einzelner Zellen 8, 30 und 52 Minuten nach EGF-Applikation: Der Zellkernimport des CapG-eGFP nimmt nach 30 Minuten noch deutlich zu.

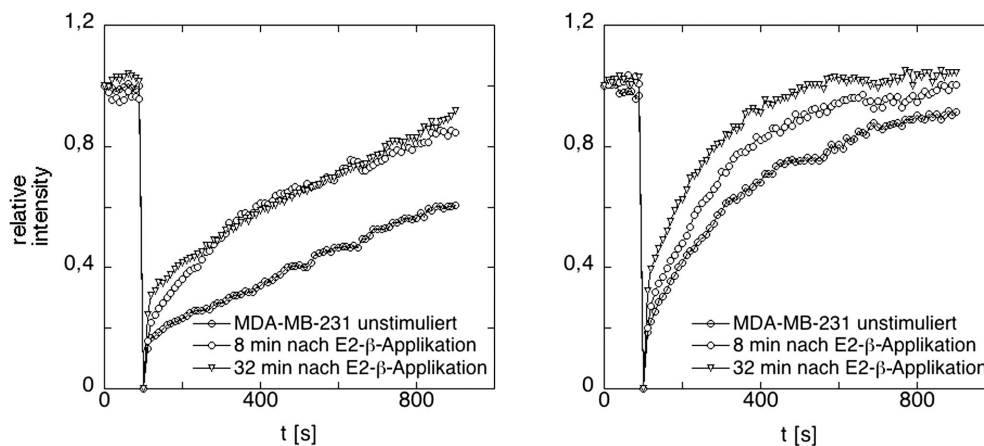


Abbildung 4.44: Beobachtung des recovery-Prozesses einzelner Zellen 8 und 30 Minuten nach $E_2\beta$ -Applikation: Der Zellkernimport des CapG-eGFP nimmt nach 30 Minuten nicht bzw. kaum noch zu.

Kapitel 5

Diskussion

Die vorliegende Arbeit stellt Untersuchungen an lebenden Zellen in den Mittelpunkt. Normale und tumoröse Brustepithelzellen sollten betrachtet werden.

Durch die Fluoreszenzmarkierung eines zelleigenen Proteins gelang es, die Dynamik zellulärer Prozesse sichtbar zu machen und die Kinetik makromolekularer Abläufe zu analysieren. Unterschiede der intrazellulären Mobilität dieses fluoreszenzmarkierten zelleigenen Proteins in neoplastischen und in nichtneoplastischen Brustepithelzellen konnten aufgezeigt werden, so daß eine Differenzierung normaler und entarteter Zellen anhand der Kinetikanalyse eines zelleigenen Proteins *in vivo* möglich erscheint.

Das untersuchte Modellsystem

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde in dieser Arbeit das CapG-Protein, ein Aktin-bindendes Protein der Gelsolinfamilie, gewählt; als zelluläres Modellsystem diente eine nichtneoplastische, dem normalen Brustepithel ähnliche Zelllinie, die MCF-12A, und eine neoplastische, hochinvasive und stark metastasierende Mammakarzinomzelllinie, die MDA-MB-231.

Anlaß, das CapG-Protein in der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, waren Expressionsanalysen, die CapG in invasiv duktalem Mammakarzinomen und insbesondere in metastasierenden Mammakarzinomen überexprimiert zeigen, und Berichte der Literatur, das CapG-Protein sei als Gelsolinverwandtes Aktin-bindendes Protein an der Modulierung des Zytoskeletts und damit an der *Beweglichkeitssteuerung* nichtmuskulärer Zellen beteiligt, seine verstärkte Expression stehe ursächlich in Zusammenhang mit der *Beweglichkeitszunahme* benigner Zellen und fördere eventuell auch bei malignen Zellen Motilität, Invasivität und Metastasierung. Als möglicher Mechanismus

dieser motilitätsfördernden Wirkung ist eine verstärkte Modulierbarkeit des Zellskeletts anzunehmen und damit eine bessere Verformbarkeit der ganzen Zelle als Voraussetzung, sich aus dem epithelialen Verband zu lösen und durch Basalmembranporen und Geflechte extrazellulärer Matrix zu schlüpfen.

Das zelluläre System wurde gewählt, da die MCF-12A, wenn auch immortalisiert, dem normalen Brustepithel sehr ähnlich sind und die MDA-MB-231 nahezu modellhaft für metastasierungsfähige Brustkrebszellen zu sein scheinen: Die MDA-MB-231-Zellen wurden ursprünglich aus einer pleuralen Metastase eines niedrig differenzierten Adenokarzinoms der Mamma isoliert. Durch den Metastasierungsprozeß werden Karzinomzellen klonal selektiert. Die Heterogenität, die Primärtumore kennzeichnet, stellt wohl kein Charakteristikum metastasierter Zellen dar. Als Hinweise, daß die MDA-MB-231 auch als Zelllinie ihre Fähigkeit, invasiv zu wachsen und zu metastasieren, nicht verloren haben, können folgende Beobachtungen dienen: Die MDA-MB-231 bilden in immundefizienten Nacktmäusen und in ALS (Anti-Lymphozytenserum) behandelten BALB/c-Mäusen Geschwulste; sie zeigen im Matrigel-Invasionsassay hohe Invasivität. In den MDA-MB-231 wurden die höchsten Expressionslevel des CapG-Proteins der bisher untersuchten Mammakarzinomzelllinien detektiert.

Da also die gewählten Zelllinien als modellhaft gelten können, scheint es möglich zu sein, registrierte Unterschiede in Verteilung und Kinetik des CapG-Proteins als kennzeichnend für normale und hoch metastasierende Brustepithelzellen anzunehmen und Korrelationen zwischen Malignität, Invasivität und Metastasierungsfähigkeit und definierten kinetischen Eigenschaften des CapG-Proteins abzuleiten.

Fluoreszenzmarkierung des CapG-Proteins

Voraussetzung, das CapG-Protein und eventuelle Interaktionspartner in der lebenden Zelle sichtbar machen und die Kinetik dieser Proteine analysieren zu können, ist die spezifische Kopplung mit autofluoreszierenden Proteinen. Dazu wird die genetische Information entsprechender Proteine fusioniert. Mit diesen DNA-Konstrukten transfizierte Zellen exprimieren neben dem zelleigenen das fluoreszenzmarkierte Protein.

Es bleibt in jedem Fall zu prüfen, ob solch eine Kopplung die Funktion des jeweils untersuchten Proteins verändert. Hierbei kann die Lokalisation des Proteins in der Zelle einen ersten Anhalt geben; außerdem sollten bekannte Teilfunktionen des Proteins *in vitro* oder *in vivo* getestet werden.

Die beobachtete Lokalisation des CapG-eGFP-Fusionsproteins in der lebenden Zelle paßt gut zu Berichten von Lokalisationsstudien fixierter Zellen, biochemischen Fraktionierungen und Analysen eventueller Transportsequen-

zen des Proteins. Das CapG-eGFP ist diffus im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert.

Da die Zielsetzung dieser Arbeit die Lebendzellanalyse war, wurde als Funktionstest nicht ein In-vitro-, sondern ein In-vivo-Assay gewählt, der Matrigel-Invasionsassay. Die Anwendung des Invasionsassays im Rahmen dieser Arbeit gründet auf der Annahme, CapG-Expressionslevel und Invasivität und Metastasierungsfähigkeit von Brustkrebszellen seien kausal miteinander verknüpft. Die Zellen, die eine künstliche Basalmembran durchwanderten, wurden gezählt. So konnte bestätigt werden, daß die Modellvorstellung einer nichtneoplastischen und nichtinvasiven Zelllinie und einer neoplastischen, invasiven und stark metastasierenden Zelllinie auch dann gilt, wenn beide Zelltypen das CapG-eGFP-Fusionsprotein exprimieren: CapG-eGFP exprimierende wie native MCF-12A waren in diesem Assay nicht invasiv¹, CapG-eGFP exprimierende MDA-MB-231 hingegen wurden in ihrer Invasivität nicht beeinträchtigt, sie waren den nativen MDA-MB-231 vergleichbar invasiv.

Der durchgeführte CapG-knockdown in den Mammakarzinomzellen macht tatsächlich einen kausalen Zusammenhang von CapG-Expressionslevel und Invasivität und letztlich Metastasierungsfähigkeit wahrscheinlich. Wurden CapG-eGFP exprimierende MDA-MB-231 mit siRNA gegen CapG behandelt, wanderten nur noch einige wenige Zellen durch die künstliche Basalmembran des Invasionsassays.

Lokalisationsstudien

CapG-eGFP exprimierende Zellen wurden mit unterschiedlichen mikroskopischen Verfahren verschiedener Auflösungsfähigkeit betrachtet. Mit einzelnen Aufnahmen wurde die statische Lokalisation des Proteins in der lebenden Zelle zu einem Zeitpunkt sichtbar gemacht, mit Zeitrafferaufnahmen die dynamische Verteilung über die Zeit.

Kolokalisationsstudien

Durch entsprechend andersfarbige Fluoreszenzmarkierung konnten das humane β -Aktin, der angenommene Hauptinteraktionspartner des CapG, und der namensgebende Vertreter dieser Gruppe Aktin-bindender Proteine, das Gelsolin, in derselben lebenden Zelle beobachtet werden wie das CapG selbst.

¹Diese Beobachtung erscheint wichtig, da es Berichte gibt, CapG-eGFP triggere Invasivität benigner Zellen. In den dort geschilderten Beobachtungen wird allerdings eher eine vermehrte Motilität und weniger eine eigentliche Invasivität, also ein Durchdringen von Basalmembranen, beschrieben.

Da aber die Auflösung derartiger Kollokalisationsstudien, die auf mikroskopischen Bildern basieren, auf etwa 200 nm begrenzt ist, ist auch die Aussagekraft solcher Untersuchungen nur sehr eingeschränkt.

Eine Kollokalisierung des CapG und des β -Aktin ist so nur sehr schwer nachzuweisen, eine Assoziation des CapG mit Strebfasern oder auch eine Akkumulation in der „leading edge“ nur unsicher. Das CapG scheint viel diffuser im Zytoplasma verteilt zu sein. Dies weist auf die Möglichkeit, das CapG assoziiere weniger mit den strukturbildenden Aktinanteilen, sondern eher mit diffusiblen monomeren oder kurzen, oligomeren Aktinmolekülen oder aber darüberhinaus mit noch ganz anderen Interaktionspartnern.

Studien gesamtzellulärer Dynamik

Da das CapG als ubiquitäres zytoplasmatisches und nukleäres Protein fluoreszenzmarkiert nahezu die gesamte Zelle einfärbt, konnten Motilitätsprozesse wie Migration und Invasivität gut zur Anschauung gebracht werden. Die Wandlung des Phänotyps karzinomatöser Zellen während des Invasionsprozesses von fibroblastenähnlichen Zellen zu amöboid erscheinenden, und die anschließende erneute Polarisierung zur fibroblastenähnlichen Zelle waren gut zu beobachten.

Dieser Wandel von der epithelial polarisierten Zelle hin zu der fibroblastenähnlichen, noch zum Teil polarisierten neoplastischen Zelle bis zur vollständig unpolarisierten hochmotilen und -aggressiven Karzinomzelle wird theoretisch als epithelial-mesenchymaler Übergang gefaßt. Der amöboide Fortbewegungstyp von Brustkrebszellen wurde bisher *in vitro* induziert durch Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren und dichtes Kollagenetzwerk bzw. *in vivo* im Mausmodell beschrieben.

Kinetikanalyse

Mit spektroskopischen Techniken gelang es, die Dynamik des CapG-eGFP im Zytoplasma und im Zellkern lebender Karzinomzellen in Zeitskalen verschiedener Größenordnungen, d.h. von Mikrosekunden bis zu mehreren Minuten, zu charakterisieren. Die Kinetik des Zellkernimports und der im Zellkern immobilisierte Anteil des Proteins wurden darüberhinaus in neoplastischen und nichtneoplastischen Zellen verglichen. Deutliche Unterschiede konnten aufgezeigt werden.

Das CapG-eGFP liegt in der Zelle offenbar monomer vor, ein Teil ist frei diffusibel. Die Geschwindigkeit der Diffusion dieses CapG-Anteils wird vor allem durch seine molekulare Größe und die Temperatur und Viskosität des umgebenden Zellmilieus bestimmt. Die gemessene Diffusionszeit entspricht

in etwa dem, was aus dem Vergleich mit dem Molekulargewicht und der beobachteten Diffusionszeit des inerten eGFP zu erwarten ist.

Ein anderer Teil des Proteins ist in den beiden Zellkompartimenten Zellkern und Zytoplasma in seiner Diffusion um etwa den Faktor 100 verlangsamt. Dieser Teil benötigt etwa 100 msec um in der Zelle eine Strecke von einem Mikrometer zurückzulegen. Die Ursache dieser verminderten Mobilität kann aus der Analyse der Kinetik nur vermutet werden. Das Protein könnte beispielsweise vorübergehend an mobile oder weitgehend immobile Interaktionspartner binden - wie etwa an Aktin in unterschiedlich stark polymerisierter Form. Diese relativ langsam diffundierende Proteinfraktion ist hinsichtlich Diffusionsgeschwindigkeit und prozentualem Anteil im Zellkern und im Zytoplasma verschieden: Im Zellkern zeigt sich ein größerer Anteil des Proteins in der Diffusion verlangsamt, dieser bewegt sich jedoch etwas schneller als die entsprechende Proteinfraktion im Zytoplasma. Das deutet auf eine unterschiedliche Art vorübergehender Bindung des CapG-eGFP bzw. auf unterschiedliche Interaktionspartner im Zytoplasma und im Zellkern.

Das CapG-eGFP scheint im Zellkern karzinomatöser Brustepithelzellen, nahezu ausschließlich transient in der Größenordnung von Millisekunden an Interaktionspartner gebunden zu sein. Der Anteil des Proteins, der über mehrere Sekunden bis Minuten im Zellkern immobilisiert ist, ist vernachlässigbar klein: Wird im Zellkern ein diffraktionslimitierter Punkt von etwa $0,5 \mu\text{m}$ im lateralen Durchmesser beleuchtet, ist innerhalb einiger Sekunden der gesamte Zellkern homogen entfärbt. Das Fusionsprotein des Zellkerns bewegt sich innerhalb dieser Zeit durch den Fokus und wird gebleicht. Betrachtet man anschließend die Aufnahme des fluoreszierenden Proteins aus dem Zytoplasma, zeigt sich die Erholung der Fluoreszenz im Zellkern innerhalb von Minuten homogen und nahezu vollständig.

Innerhalb des Kompartiments Zellkern bewegt sich das Protein also ziemlich rasch. Wenig bis gar nichts des CapG-eGFP ist hier dauerhaft immobilisiert. Die Zellkernhülle jedoch stellt eine deutliche Diffusionsbarriere zwischen den beiden Kompartimenten Zellkern und Zytoplasma dar. Der Transport des CapG-eGFP-Proteins aus dem Zytoplasma in den Zellkern dauert viele hundert Sekunden.

Ein allgemeines Modell der Zellkernarchitektur hilft, die detektierte rasche Verteilung des CapG-eGFP innerhalb des Zellkerns von Brustkrebszellen biologisch sinnvoll einzuordnen. Dieses Modell postuliert, die funktionelle Zellkernarchitektur gründe auf Diffusionsprozessen. Ein Zusammentreffen interagierender Proteine sei durch Diffusion, Affinität und Konzentration bedingt. So hat ein sich schnell bewegendes Protein eine höhere Chance, Interaktionspartner zu treffen und nachgeschaltete molekulare Abläufe in Gang zu bringen.

Über Funktion und Interaktionspartner des CapG-Proteins im Zellkern ist allerdings wenig bekannt. Ein möglicher Interaktionspartner auch im Zellkern ist das β -Aktin nichtmuskulärer Zellen. Es mehren sich die Berichte, daß dieses ursprünglich rein zytoplasmatisch geglaubte Zytoskelettprotein auch im Zellkern lokalisiert ist und eine wichtige Rolle bei Transkriptionsprozessen übernimmt. Entsprechend wird nun häufig auch von *nukleären* Aktin-bindenden Proteinen gesprochen. Es ist möglich, daß dem CapG als einzigem Aktin-bindenden Protein der Gelsolinfamilie, das im Zellkern akkumuliert, dabei besondere Bedeutung zukommt. Offen ist, ob die nukleären Aktin-bindenden Proteine im Zellkern überwiegend mit β -Aktin interagieren oder ob hier andere Interaktionspartner wichtiger sind.

CapG-Mobilität in nichtneoplastischen und in neoplastischen Brustepithelzellen

Der Zellkernimport und die im Zellkern immobilisierte Fraktion des CapG-eGFP wurden in nichtneoplastischen und neoplastischen Brustepithelzellen verglichen. Deutliche Unterschiede konnten aufgezeigt werden. Das CapG-eGFP wird in den neoplastischen Zellen sehr viel schneller in den Zellkern transportiert und ist dort weit weniger immobilisiert als in den nichtneoplastischen Zellen.

Da die beiden untersuchten Brustepithelzelllinien modellhaft ausgewählt wurden und da verschiedene Berichte gerade dem Zellkernanteil des CapG besondere Bedeutung für den Motilitätszugewinn benigner Zellen und für die gesteigerte Aggressivität maligner Zellen beimessen, mag es möglich sein, die gefundenen Kinetikunterschiede als kennzeichnend für normale und tumoröse Brustepithelzellen anzunehmen, Korrelationen abzuleiten und einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Grad intrazellulärer CapG-Mobilität auf der einen und der Invasivität und der Metastasierungsfähigkeit der untersuchten Tumorzellen auf der anderen Seite zu vermuten. Ob die genannten Korrelationen tatsächlich auch in anderen Zelltypen gelten, werden weitere Untersuchungen zeigen.

Mechanismen gesteigerter CapG-Mobilität

Die Methoden der Kinetikanalyse wurden genutzt, Umstände zu definieren, die die intrazelluläre Mobilität des CapG-eGFP-Proteins in Mammakarzinomzellen modifizieren.

Durch metabolische Depletion der Zelle wird der Zellkernimport verlangsamt und durch Wiederauffüllen der Energiespeicher erneut beschleunigt. Die dargestellte Energieabhängigkeit des CapG-eGFP-Transports läßt sich gut

mit der Größe des Proteins, die einen rein passiven Prozeß unwahrscheinlich macht, und mit publizierten In-vitro-Experimenten vereinbaren.

Östradiol- β und auch der humane epidermale Wachstumsfaktor beschleunigen den Zellkernimport des CapG-eGFP in Mammakarzinomzellen. Unterschiede in der Dynamik der Importbeschleunigung zeichnen sich ab, so daß distinkte Mechanismen der Stimulation anzunehmen sind. Diese Mechanismen weiter zu charakterisieren und zu klären, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Stimulation intrazellulärer CapG-Mobilität durch diese beiden Substanzen und der Aggressivität der untersuchten Brustkrebszellen besteht und ob es auf diese Weise gar gelingt, einzelne besonders aggressive Zellen innerhalb eines heterogenen Tumorverbands zu erkennen, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es, einen kausalen Zusammenhang zwischen CapG-Expression und gesteigerter Motilität auch für Karzinomzellen bzw. speziell für Mammakarzinomzellen wahrscheinlich zu machen. Durch die Fluoreszenzmarkierung des CapG-Proteins in Mammakarzinomzellen konnten zelluläre Mechanismen gesteigerter Beweglichkeit wie Chemotaxis und Invasivität zur Anschauung gebracht werden. Darüberhinaus war es möglich, die intrazelluläre Dynamik des CapG-Proteins sichtbar zu machen und zugrundeliegende Mechanismen zu umreißen. Unterschiede der intrazellulären CapG-Mobilität in modellhaft gewählten nichtneoplastischen und neoplastischen Brustepithelzelllinien konnten beschrieben werden, so daß eine Differenzierung von Tumorzellen hinsichtlich ihrer Invasivität und letztlich ihrer Metastasierungsfähigkeit anhand der Kinetikanalyse des CapG-Proteins in einzelnen lebenden Zellen möglich erscheint.

Ob sich die Kinetikanalyse des CapG-Proteins tatsächlich etablieren wird, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Beispiel zu liefern, daß solch eine Kinetikanalyse lebender Tumorzellen prinzipiell möglich ist und daß diese tatsächlich auch signifikante Unterschiede gegenüber entsprechenden normalen Zellen detektiert.

Anhang A

Materialliste

Produkt	Firma
DNA-MW-Marker; 1 kbp	Fermentas GmbH
DNA-MW-Marker; 100 bp	Fermentas GmbH
NucleoSpin [®] Extract und Plasmid	Macherey-Nagel
Nucleobond [®] AX	Macherey-Nagel
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH und Biolabs Inc.
CapG human, FLC	onkologisches Labor der Universitäts- frauenklinik Düsseldorf
Gelsolin human, FLC	RZPD
β -Aktin human, FLC	
mCherry	Tsien Lab
pSVeGFP	Clontech
pSVmRFP	Clontech
pEGFP	Clontech
QuikChange [®] Multi, Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
XL10-Gold [®] Ultracompetent Cells	Stratagene
MCF-12A (CRL-10782)	ATCC
MDA-MB-231 (HTB-26)	ATCC
RPMI 1640 ohne Phenolrot	GIBCO
fetales Pferdeserum	GIBCO
Hydrocortison	Sigma
Insulin, bovin	Sigma
EGF, rekombinant	Sigma
Choleratoxin (<i>Vibrio cholerae</i>)	Sigma
DMEM ohne Phenolrot	GIBCO

Produkt	Firma
fetales Kälberserum	GIBCO
Glutaminsäure	
Hepes	Sigma
TransFectin™	Biorad
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen
FuGene® HD	Roche Diagnostics
HiPerFect™	Qiagen
BD BioCoat™ Matrigel™ Invasion Chamber	BD Biosciences
Toluidinblau	Sigma
17β-Östradiol	Calbiochem
Na-azid	Merck
2-Deoxy-glukose	Sigma
Silencer® predesigned siRNA	Ambion
gekammerte Deckgläser	Nunc
μ-Slide I, ibiTreat	ibidi
BioDocAnalyzer	Biometra
T3-Thermocycler	Biometra
Fluoreszenzfluktuationsmikroskop	Abteilung Prof. Dr. Langowski
Nikon C1Si	Nikon Imaging Center
Nikon TIRF-Mikroskop	Nikon Imaging Center
Perkin Elmer Ultra-View, Spinning-disc Mikroskop	Nikon Imaging Center
Olympus CK40	Abteilung Prof. Dr. Langowski
TOKAI HIT 37° chamber	Tokai
Zeiss LSM	Abteilung Prof. Dr. Damjanovich, Debrecen
ImageJ	NIH
Kaleidagraph®	Synergy Software
Huygens® Essential	Scientific Volume Imaging
QuickFit	Abteilung Prof. Dr. Langowski

Anhang B

Liste der verwendeten Primer

Primernamen	Sequenz
CapG fwd EcoRI	TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC GGC
CapG rev SacII	TAA TAA CCG CGG TTT CCA GTC CTT GAA AAA TT
mCherry fwd AgeI	A AAT TAA CCG GTA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG
mCherry rev NotI	TA AAT AGC GGC CGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT
ACTB fwd EcoRI	AAA TTA GAA TTC ATG GAT GAT GAT ATC GCC GCG CTC G
ACTB rev SacII	AT AAT CCG CGG CTA GAA GCA TTT GCG GTG GA
Gsn fwd EcoRI	AAA TTA GAA TTC ATG GTG GTG GAA CAC CCC GAG TTC CTC AAG GCA GGG AAG
Gsn rev SacII	ATA ATT CCG CGG GGC AGC CAG CTC AGC CAT GGC CCT
rescue 10291	TAC CAG GAA GGT GGT GTG GAG TCA GCA TTT CAC AAG ACC
rescue 10386	AAG GCC CAG GTG GAG ATT GTC ACT GAT GGG GAG
rescue 10473	CTG TAT AAG GTC TCT GAT GCC ACT GGA CAG ATG AAC CTG

Anhang C

alphabetisches Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Zellkern-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Genregulatorproteine. In: *Molekularbiologie der Zelle* 2004: Kapitel 15.1.9, 977-80; Zytoskelett und Zellverhalten. *ebd.*: Kapitel 16.4, 1123-40

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Canc Res* 1987: 47,3239-45

Aragon SR, Pecora R. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J Chem Phys* 1976: 64,1791-803

ATCC: Product information sheet for HTB-26, 2005; Product information sheet for CRL-10782, 2005

Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson EL, Webb WW. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 1976: 16,1055-69

Axelrod D. Cell surface heating during fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* 1977: 18,129-31

Axelrod D, Hellen EH, Fulbright RM. Total internal reflection fluorescence. In: *Topics in fluorescence spectroscopy* 1992, Ed: Lakowicz JR, vol. 3, chapter 7, 289-343

Bacia K, Schwille P. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 2003: 29(1),74-85

Bahassi EM, Karyala S, Tomlinson CR, Sartor MA, Medvedovic M, Hennigan RF. Critical regulation of genes for tumor cell migration by AP-1. *Clin Exp Met* 2004: 21,293-304

Barzik M, Kotovas TI, Higgs HN et al. Ena/Vasp proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 2005: 280(31),28653-62

Berland KM. Quantifying molecular interactions with fluorescence correlation spectroscopy. In: *Molecular Imaging: FRET microscopy and spectroscopy* 2005, Ed: Periasamy A, Day RN. chapter: 15,272-83

Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004: 5,410-5

Blessing CA, Urginova GT, Goodson HV. Actin and ARPs: action in the nucleus. *Trends Cell Biol* 2004: 14,435-42

Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Canc Res* 1980: 40,3118-29

Brock R, Vamosi G, Vereb G, Jovin TM. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999: 96(18),10123-8

Brock R, Jovin TM. Fluorescence correlation microscopy (FCM): Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) in cell biology. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 7,132-61

Bubb MR, Yarmola EG, Gibson BG, Southwick FS. Depolymerization of actin filaments by Profilin. *J Biol Chem* 2003: 278 (27),24629-35

Cailleau R, Young R, Oliv M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974: 53(3),661-73

Carrero G, McDonald D, Crawford E, deVries G, Hendzel M. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods* 2003: 29,14-28

Chen Y, Müller JD, Ruan QQ, Gratton E. Molecular brightness characterization of eGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J* 2002: 82,133-44

Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003: 3(12),921-30

Dabiri GA, Young CL., Rosenblom J, Southwick FS. Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. *J Biol Chem* 1992: 267(23),16545-52

Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E et al. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J Pathol* 2005: 205,21-8

De Corte V, Gettemans J, Vandekerckhove J. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates $PP^{60c-src}$ catalyzed phosphorylation of Gelsolin and related actin-binding proteins. *FEBS Letters* 1997: 401,191-6

De Corte V, Van Impe K, Bruyneel E et al. Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci* 2004: 117,5283-92

De Ganck A, Hubert T, Van Impe K et al. A monopartite nuclear localization sequence regulates nuclear targeting of the actin binding protein myopodin. *FEBS Letters* 2005: 579,6673-80

Doeven MK, Folgering JHA, Krasnikov V, Geertsma ER, Bogaart G, Poolman B. Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 2005: 88,1134-42

Dohadwala M, Luo J, Zhu L et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J Biol Chem* 2000: 276,20809-12

Edidin M, Zagyansky Y, Lardner TJ. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 1975: 191,466-8,

Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: Targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 1997: 138,1193-206

Elson EL, Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopol* 1974, 13,1-27

Enderlein J, Gregor I, Patra D, Fitter J. Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluorescence* 2005: 15(3),415-22

Falet H, Hoffmeister KM, Neujahr R et al. Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002: 99(26),16782-7

Garcia-Parajo MF, Segers-Nolten GM, Veerman JA, Greve J, van Hulst NF. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000: 97,7237-42

Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert T, Vandekerckhove J, De Corte V. Nuclear Actin-Binding Proteins as Modulators of Gene Transcription. *Traffic* 2005: 6,847-57

Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW. Dynamics of fluorescent fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998: 95(23),13573-8

Hinow P, Rogers CE, Barbieri CE, Pietenpol JA, Kenworthy AK. The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. *Biophys J* 2006: 91,330-42

Hofmann WA, Stojiljkovici L, Fuchsova B et al. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2004: 6,1094-101

Houtsmuller AB, Rademakers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoeijmakers JHJ, Vermeulen W. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 1999: 284,958-61

Houtsmuller AB, Vermeulen W. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem Cell Biol* 2001: 115,13-21

Hu P, Wu S, Hernandez N. A role for β -actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 2004: 18,3010-5

Jankevics H, Prummer M, Izewska P, Pick H, Leufgren K, Vogel H. Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochem* 2005: 44,11676-83

Jessani N, Liu Y, Humphrey M, Cravatt BF. Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Natl Acad Sci USA* 2002: 99,10335-40

Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A, Tilley L. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur Biophys J* 2002: 31,36-51

Koppel DE. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev A* 1974: 10(6),1938-45

Koppel DE, Axelrod D, Schlessinger J, Elson E, Webb WW. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys J* 1976: 16,1315-29

Langowski J, Wachsmuth M, Rippe K, Tewes M. Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation. In: *Ecole Physique et Chimie du Vivant. Energies et forces de l'interaction entre macromolecules biologique: l'aspect quantitatif* 2000: n°2, 65-77

Lal A, Lash AE, Altschul SF et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* 1999: 59(21),5403-7

Lee YH, Campbell HD, Stallcup MR. Developmentally essential protein Flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol* 2004: 24(5),2103-17

Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptor. *Steroids* 2002: 67,471-75

Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinology* 2003: 17(3),309-17

Lin KM, Wenegieme E, Lu PJ, Chen CS, Yin HL. Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J Biol Chem* 1997: 272(33),20443-50

Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kennworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001: 2(6),444-56

Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N, Patterson GH. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 2003: Suppl: S7-14

Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Yan HY, Yin HL, Chen CS. Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochem* 1998: 37,5738-45

Magde D, Elson EL, Webb WW. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev Lett* 1972: 29,705-8

Magde D, Elson EL, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopol* 1974, 13,29-61

Mejillano MR, Kojima SI, Applewhite DA, Gertler FB, Svitkina TM, Borisy GG. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery. Pivotal role of the filament barbed ends. *Cell* 2004: 118(3),363-73

Meseth U, Wohland T, Rigler R, Vogel H. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys J* 1999: 76,1619-31

Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G et al. Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res* 2005: 65(22),10585-93

Mishra VS, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Southwick FS. The human actin-regulatory protein CapG: Gene structure and chromosome location. *Genomics* 1994: 23,560-5

Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 2006: 147(12),5557-63

Murray JM. Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination methods. In: *Live cell imaging. A laboratory manual* 2005, Ed: Goldman R, Spector DL. chapter 14, 239-59

Nishimura K, Ting HJ, Harada Y et al. Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer Res* 2003: 63,4888-94

Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 2002: 71,755-81

Onoda K, Yin HL. gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei. *J Biol Chem* 1993: 268(6),4106-12

Onoda K, Yu FX, Yin HL. gCap39 is a nuclear and cytoplasmatic protein. *Cell Motil Cytoskel* 1993: 26(3),227-38

Onsager L. Reciprocal relations in irreversible processes. I. *Phys Rev* 1931: 37,405-26

Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robertson CN. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin cross linking protein filamin. *Mol Endocrinol*, 2000: 14,1618-26

Parikh SS, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Li W, Gulig PA, Southwick FS. CapG(-/-) mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG (+/+) mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2003: 71(11),6582-90

Pellieux C, Desgeorges A, Pigeon CH et al. CapG, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem* 2003: 278,29136-44

Percipalle P, Zhao J, Pope B, Weeds A, Lindberg U, Daneholt B. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol* 2001: 153,229-36

Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D et al. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res* 2002: 30,1725-34

Petersen NO, Elson EL. Measurements of diffusion and chemical kinetics by Fluorescence Photobleaching Recovery and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Methods in Enzym* 1986: 130,454-84

Petrov EP, Ohrt T, Winkler RG, Schwille P. Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. *Phys Rev Lett* 2006: 97,258101,1-4

Petrov EP, Schwille P. State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Standardization in fluorometry: State of the art and future challenges*. 2007, Ed: Resch-Genger, chapter 25

Philimonenko V, Zhao J, Iben S et al. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 2004: 6,1165-72

Pramanik A, Rigler R. FCS-analysis of ligand-receptor interactions in living cells. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 6,101-32

Prendergast GC, Ziff EB. Mbh1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization. *EMBO J* 1991: 10(4), 757-66

Pristinski D, Kozlovskaya V, Sukhishvili SA. Fluorescence correlation spectroscopy studies of diffusion of a weak polyelectrolyte in aqueous solutions. *J Chem Phys* 2005: 122,014907,1-9

Qian H. On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys Chem* 1990: 38,40-57

Qian H, Elson EL, Frieden C. Studies on the structure of actin gels using time correlation spectroscopy of fluorescent beads. *Biophys J* 1992: 63,1000-10

Rabut G, Ellenberg J. Photobleaching techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, iFRAP, and FLIP. In: *Live cell imaging. A laboratory manual* 2005, Ed: Goldman R, Spector DL. chapter 7,101-126

Revankar C, Cimino D, Sklar L, Arterburn J, Prossnitz E. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005: 307,1625-30

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 2003: 302,1704-9

Saffarian S, Elson EL. Statistical analysis of fluorescence correlation spectroscopy: The standard deviation and bias. *Biophys J* 2003: 84,2030-42

Schwille P, Kummer S, Heikal AA, Moerner WE, Webb WW: Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000: 97,151-6

Schwille P, Hausteil E. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. 2002, MPI Göttingen

Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nuclear caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 2005: 16(5),2395-413

Siggia ED, Lippincott-Schwartz J, Bekiranov S. Diffusion in inhomogeneous media: Theory and simulations applied to whole cell photobleach recovery. *Biophys J* 2000: 79,1761-70

Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular function. *Cell Mol Life Sci* 2004: 61,2614-23

Southwick S, DiNubile MJ. Rabbit alveolar macrophages contain a Ca^{2+} -sensitive, 41000-Dalton protein which reversibly blocks the barbed ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem* 1986: 261(30),14191-5

Sprague B, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 2004: 86,3474-95

Sun HQ, Kwiatkowska K, Wooten DC, Yin HL. Effects of CapG Overexpression on Agonist-induced Motility and Second Messenger Generation. *J Cell Biol* 1995: 129(1),147-56

Sun HQ, Lin KM, Yin HL. Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol* 1997: 138,811-20

Swaminathan R, Hoang CP, Verkman AS. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probes by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys J* 1997: 72,1900-7

Tanaka J, Yan Y, Choi J et al. Biomolecular mimicry in the actin cytoskeleton: Mechanisms underlying the cytotoxicity of kabiramide C and related macrolides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003: 100(24),13851-6

Tewes M: *Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenzspektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 1998

Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family capping proteins which contribute to their cell motility. *Gut* 2007: 18(3),827-38

Ting HJ, Yeh S, Nishimura K, Chang C. Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002: 99(2),661-6

Ting HJ, Hu YC, Chang C. Actin monomer enhances supervillin-modulated androgen receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Comm* 2004: 319,393-6

Urano T, Remmert K, Hammer JA. CARMIL is a potent capping protein antagonist. Identification of a conserved CARMIL domain that inhibits the activity of capping protein and uncaps capped actin filaments. *J Biol Chem* 2006: 281(15),10635-50

Van den Abbeele A, De Corte V, Van Impe K et al. Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro. *Cancer Lett* 2007: Epub ahead of print

Van Ginkel PR, Gee RL, Walker TM, Hu DN, Heizmann CM, Polans AS. The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta* 1998: 1448(2),290-7

van Hulst NF, Veerman J-A, Garcia-Parajo MF, Kuipers LK. Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics. *J Chem Phys* 2000: 112(18),7799-810

Van Impe K, DeCorte V, Eichinger L et al. The nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins. *J Biol Chem* 2003: 278(20),17945-52

Visser AJWG, Hink MA. New perspectives of fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluorescence* 1999: 9(1),81-7

Vukojevic V, Pramanik A, Yakovleva T, Rigler R, Terenius L, Bakalkin G. Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Cell Mol Life Sci* 2005: 62,535-50

Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J Mol Biol* 2000: 298,677-89

Wachsmuth M: *Fluoreszenzfluktationsmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2001

Watari A, Takaki K, Higashiyama S et al. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene* 2006: 25(56),599-606

Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy: Genesis, evolution, maturation and prognosis. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 14,305-30

Weidemann T, Wachsmuth M, Knoch T, Müller G, Waldeck W, Langowski J. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. *J Mol Bio* 2003: 334,229-40

Weiss M. Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic* 2004: 5,662-71

Widengren J, Mets U, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J Phys Chem* 1995: 99,13368-79

Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, Southwick FS. Comparisons of CapG and Gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol* 2001: 154,775-84

Wohland T, Rigler R, Vogel H. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2001: 80,2987-99

Wolf K, Mazo I, Leung H et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003: 160(2),267-77

Young CL, Feierstein A, Southwick FS. Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein. *J Biol Chem* 1994: 269(19),13997-4002

Yu FX, Johnston PA, Südhof TC, Yin HL. gCap39, a Calcium ion - and Polyphosphoinositide regulated actin capping protein. *Science* 1990: 250,1413-5

Zhang Y, Vorobiev SM, Gibson BG et al. A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO J* 2006: 25,4458-67

Literaturverzeichnis

- [1] Dahl E, Sadr-Nabavi A, Klopocki E et al. Systematic identification and molecular characterization of genes differentially expressed in breast and ovarian cancer. *J Pathol* 2005: 205,21-8
- [2] Southwick S, DiNubile MJ. Rabbit alveolar macrophages contain a Ca^{2+} -sensitive, 41000-Dalton protein which reversibly blocks the barbed ends of actin filaments but does not sever them. *J Biol Chem* 1986: 261(30),14191-5
- [3] Dabiri GA, Young CL., Rosenblom J, Southwick FS. Molecular cloning of human macrophage capping protein cDNA. *J Biol Chem* 1992: 267(23),16545-52
- [4] Prendergast GC, Ziff EB. Mbh1: a novel gelsolin/severin-related protein which binds actin in vitro and exhibits nuclear localization. *EMBO J* 1991: 10(4),757-66
- [5] Zhang Y, Vorobiev SM, Gibson BG et al. A CapG gain-of-function mutant reveals critical structural and functional determinants for actin filament severing. *EMBO J* 2006: 25,4458-67
- [6] Mishra VS, Henske EP, Kwiatkowski DJ, Southwick FS. The human actin-regulatory protein CapG: Gene structure and chromosome location. *Genomics* 1994: 23,560-5
- [7] Yu FX, Johnston PA, Südhof TC, Yin HL. gCap39, a Calcium ion - and Polyphosphoinositide regulated actin capping protein. *Science* 1990: 250,1413-5
- [8] Van Impe K, DeCorte V, Eichinger L et al. The nucleo-cytoplasmic actin-binding protein CapG lacks a nuclear export sequence present in structurally related proteins. *J Biol Chem* 2003: 278(20),17945-52
- [9] Young CL, Feierstein A, Southwick FS. Calcium regulation of actin filament capping and monomer binding by macrophage capping protein. *J Biol Chem* 1994: 269(19),13997-4002
- [10] Tanaka J, Yan Y, Choi J et al. Biomolecular mimicry in the actin cytoskeleton: Mechanisms underlying the cytotoxicity of kabiramide C and related macrolides. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003: 100(24),13851-6

- [11] Onoda K, Yin HL. gCap39 is phosphorylated. Stimulation by okadaic acid and preferential association with nuclei. *J Biol Chem* 1993: 268(6),4106-12
- [12] De Corte V, Gettemans J, Vandekerckhove J. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate specifically stimulates $PP^{60c-src}$ catalyzed phosphorylation of Gelsolin and related actin-binding proteins. *FEBS Letters* 1997: 401,191-6
- [13] Watari A, Takaki K, Higashiyama S et al. Suppression of tumorigenicity, but not anchorage independence, of human cancer cells by new candidate tumor suppressor gene CapG. *Oncogene* 2006: 25(56),599-606
- [14] Onoda K, Yu FX, Yin HL. gCap39 is a nuclear and cytoplasmatic protein. *Cell Motil Cytoskel* 1993: 26(3),227-38
- [15] Parikh SS, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Li W, Gulig PA, Southwick FS. CapG(-/-) mice have specific host defense defects that render them more susceptible than CapG (+/+) mice to *Listeria monocytogenes* infection but not to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2003: 71(11),6582-90
- [16] Witke W, Li W, Kwiatkowski DJ, Southwick FS. Comparisons of CapG and Gelsolin-null macrophages: demonstration of a unique role for CapG in receptor-mediated ruffling, phagocytosis, and vesicle rocketing. *J Cell Biol* 2001: 154,775-84
- [17] Pellieux C, Desgeorges A, Pigeon CH et al. CapG, a gelsolin family protein modulating protective effects of unidirectional shear stress. *J Biol Chem* 2003: 278,29136-44
- [18] De Corte V, Van Impe K, Bruyneel E et al. Increased importin-beta-dependent nuclear import of the actin modulating protein CapG promotes cell invasion. *J Cell Sci* 2004: 117,5283-92
- [19] Gettemans J, Van Impe K, Delanote V, Hubert T, Vandekerckhove J, De Corte V. Nuclear Actin-Binding Proteins as Modulators of Gene Transcription. *Traffic* 2005: 6,847-57
- [20] Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, Stergiopoulos N, Yin HL, Hayoz D. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular function. *Cell Mol Life Sci* 2004: 61,2614-23
- [21] Thompson CC, Ashcroft FJ, Patel S et al. Pancreatic cancer cells overexpress gelsolin family capping proteins which contribute to their cell motility. *Gut* 2007: 18(3),827-38
- [22] Sun HQ, Kwiatkowska K, Wooten DC, Yin HL. Effects of CapG Overexpression on Agonist-induced Motility and Second Messenger Generation. *J Cell Biol* 1995: 129(1),147-56

- [23] Falet H, Hoffmeister KM, Neujahr R et al. Importance of free actin filament barbed ends for Arp2/3 complex function in platelets and fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002: 99(26),16782-7
- [24] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Zytoskelett und Zellverhalten. In: *Molekularbiologie der Zelle* 2004: Kapitel 16.4,1123-40
- [25] Mejillano MR, Kojima SI, Applewhite DA, Gertler FB, Svitkina TM, Borisy GG. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery. Pivotal role of the filament barbed ends. *Cell* 2004: 118(3),363-73
- [26] Uruno T, Remmert K, Hammer JA. CARMIL is a potent capping protein antagonist. Identification of a conserved CARMIL domain that inhibits the activity of capping protein and uncaps capped actin filaments. *J Biol Chem* 2006: 281(15),10635-50
- [27] Bubb MR, Yarmola EG, Gibson BG, Southwick FS. Depolymerization of actin filaments by Profilin. *J Biol Chem* 2003: 278 (27),24629-35
- [28] Barzik M, Kotovas TI, Higgs HN et al. Ena/Vasp proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 2005: 280(31),28653-62
- [29] Lin KM, Wenegieme E, Lu PJ, Chen CS, Yin HL. Gelsolin binding to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J Biol Chem* 1997: 272(33),20443-50
- [30] Sun HQ, Lin KM, Yin HL. Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol* 1997: 138,811-20
- [31] Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Yan HY, Yin HL, Chen CS. Phosphoinositide 3-kinase in rat liver nuclei. *Biochem* 1998: 37,5738-45
- [32] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al. Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science* 2003: 302,1704-9
- [33] Olave IA, Reck-Peterson SL, Crabtree GR. Nuclear actin and actin-related proteins in chromatin remodeling. *Annu Rev Biochem* 2002: 71,755-81
- [34] Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC. Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004: 5,410-5
- [35] Blessing CA, Urganova GT, Goodson HV. Actin and ARPs: action in the nucleus. *Trends Cell Biol* 2004: 14,435-42
- [36] Percipalle P, Zhao J, Pope B, Weeds A, Lindberg U, Daneholt B. Actin bound to the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein hrp36 is associated with Balbiani ring mRNA from the gene to polysomes. *J Cell Biol* 2001: 153,229-36

- [37] Percipalle P, Jonsson A, Nashchekin D et al. Nuclear actin is associated with a specific subset of hnRNP A/B-type proteins. *Nucleic Acids Res* 2002: 30,1725-34
- [38] Hofmann WA, Stojiljkovici L, Fuchsova B et al. Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 2004: 6,1094-101
- [39] Hu P, Wu S, Hernandez N. A role for β -actin in RNA polymerase III transcription. *Genes Dev* 2004: 18,3010-5
- [40] Philimonenko V, Zhao J, Iben S et al. Nuclear actin and myosin I are required for RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* 2004: 6,1165-72
- [41] Nishimura K, Ting HJ, Harada Y et al. Modulation of androgen receptor transactivation by gelsolin: a newly identified androgen receptor coregulator. *Cancer Res* 2003: 63,4888-94
- [42] Ting HJ, Yeh S, Nishimura K, Chang C. Supervillin associates with androgen receptor and modulates its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002: 99(2),661-6
- [43] Ting HJ, Hu YC, Chang C. Actin monomer enhances supervillin-modulated androgen receptor transactivation. *Biochem Biophys Res Comm* 2004: 319,393-6
- [44] Lee YH, Campbell HD, Stallcup MR. Developmentally essential protein Flightless I is a nuclear receptor coactivator with actin binding activity. *Mol Cell Biol* 2004: 24(5),2103-17
- [45] Van Ginkel PR, Gee RL, Walker TM, Hu DN, Heizmann CM, Polans AS. The identification and differential expression of calcium-binding proteins associated with ocular melanoma. *Biochim Biophys Acta* 1998: 1448(2),290-7
- [46] Lal A, Lash AE, Altschul SF et al. A public database for gene expression in human cancers. *Cancer Res* 1999: 59(21),5403-7
- [47] Bahassi EM, Karyala S, Tomlinson CR, Sartor MA, Medvedovic M, Hennigan RF. Critical regulation of genes for tumor cell migration by AP-1. *Clin Exp Met* 2004: 21,293-304
- [48] Cailleau R, Young R, Oliv M, Reeves WJ. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974: 53(3),661-73
- [49] Brinkley BR, Beall PT, Wible LJ, Mace ML, Turner DS, Cailleau RM. Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Canc Res* 1980: 40,3118-29

- [50] *ATCC*: Product information sheet for HTB-26, 2005
- [51] *ATCC*: Product information sheet for CRL-10782, 2005
- [52] Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK et al. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Canc Res* 1987: 47,3239-45
- [53] Dohadwala M, Luo J, Zhu L et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J Biol Chem* 2000: 276,20809-12
- [54] Jessani N, Liu Y, Humphrey M, Cravatt BF. Enzyme activity profiles of the secreted and membrane proteome that depict cancer cell invasiveness. *Natl Acad Sci USA* 2002: 99,10335-40
- [55] Murray JM. Confocal microscopy, deconvolution, and structured illumination methods. In: *Live cell imaging. A laboratory manual*. 2005, Ed: Goldman R, Spector DL. chapter 14, 239-59
- [56] Axelrod D, Hellen EH, Fulbright RM. Total internal reflection fluorescence. In: *Topics in fluorescence spectroscopy* 1992, Ed: Lakowicz JR, vol. 3, chapter 7, 289-343
- [57] Magde D, Elson EL, Webb WW. Thermodynamic fluctuations in a reacting system: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev Lett* 1972: 29,705-8
- [58] Elson EL, Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopol* 1974, 13,1-27
- [59] Magde D, Elson EL, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopol* 1974, 13,29-61
- [60] Koppel DE, Axelrod D, Schlessinger J, Elson E, Webb WW. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. *Biophys J* 1976: 16,1315-29
- [61] Tewes M: *Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenzspektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg 1998
- [62] Langowski J, Wachsmuth M, Rippe K, Tewes M. Biomolecular shape and interactions determined by fluorescence correlation. In: *Ecole Physique et Chimie du Vivant. Energies et forces de l'interaction entre macromolécules biologique: l'aspect quantitatif* 2000: n°2, 65-77
- [63] Wachsmuth M: *Fluoreszenzfluktationsmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 2001

- [64] Vukojevic V, Pramanik A, Yakovleva T, Rigler R, Terenius L, Bakalkin G. Study of molecular events in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Cell Mol Life Sci* 2005: 62,535-50
- [65] Berland KM. Quantifying molecular interactions with fluorescence correlation spectroscopy. In: *Molecular Imaging: FRET microscopy and spectroscopy* 2005, Ed: Periasamy A, Day RN. chapter: 15,272-83
- [66] Schwille P, Haustein E. Fluorescence correlation spectroscopy. An introduction to its concepts and applications. 2002, MPI Göttingen
- [67] Aragon SR, Pecora R. Fluorescence correlation spectroscopy as a probe of molecular dynamics. *J Chem Phys* 1976: 64,1791-803
- [68] Meseth U, Wohland T, Rigler R, Vogel H. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys J* 1999: 76,1619-31
- [69] Widengren J, Mets U, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy of triplet states in solution: A theoretical and experimental study. *J Phys Chem* 1995: 99,13368-79
- [70] Bacia K, Schwille P. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 2003: 29(1),74-85
- [71] van Hulst NF, Veerman J-A, Garcia-Parajo MF, Kuipers LK. Analysis of individual (macro)molecules and proteins using near-field optics. *J Chem Phys* 2000: 112(18),7799-810
- [72] Visser AJWG, Hink MA. New perspectives of fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluorescence* 1999: 9(1),81-7
- [73] Weidemann T, Wachsmuth M, Knoch T, Müller G, Waldeck W, Langowski J. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. *J Mol Bio* 2003: 334,229-40
- [74] Wachsmuth M, Waldeck W, Langowski J. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J Mol Biol* 2000: 298,677-89
- [75] Brock R, Jovin TM. Fluorescence correlation microscopy (FCM): Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) in cell biology. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 7,132-61
- [76] Haupts U, Maiti S, Schwille P, Webb WW. Dynamics of fluorescent fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998: 95(23),13573-8

- [77] Schwille P, Kummer S, Heikal AA, Moerner WE, Webb WW: Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation-driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000: 97,151-6
- [78] Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy: Genesis, evolution, maturation and prognosis. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 14,305-30
- [79] Edidin M, Zagyansky Y, Lardner TJ. Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells. *Science* 1975: 191,466-8,
- [80] Axelrod D, Koppel DE, Schlessinger J, Elson EL, Webb WW. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* 1976: 16,1055-69
- [81] Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kennworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001: 2(6),444-56
- [82] Lippincott-Schwartz J, Altan-Bonnet N, Patterson GH. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* 2003: Suppl: S7-14
- [83] Carrero G, McDonald D, Crawford E, deVries G, Hendzel M. Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins. *Methods* 2003: 29,14-28
- [84] Rabut G, Ellenberg J. Photobleaching techniques to study mobility and molecular dynamics of proteins in live cells: FRAP, iFRAP, and FLIP. In: *Live cell imaging. A laboratory manual* 2005, Ed: Goldman R, Spector DL. chapter 7,101-126
- [85] Klonis N, Rug M, Harper I, Wickham M, Cowman A, Tilley L. Fluorescence photobleaching analysis for the study of cellular dynamics. *Eur Biophys J* 2002: 31,36-51
- [86] Ellenberg J, Siggia ED, Moreira JE et al. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: Targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 1997: 138,1193-206
- [87] Siggia ED, Lippincott-Schwartz J, Bekiranov S. Diffusion in inhomogeneous media: Theory and simulations applied to whole cell photobleach recovery. *Biophys J* 2000: 79,1761-70
- [88] Houtsmuller AB, Vermeulen W. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem Cell Biol* 2001: 115,13-21

- [89] Garcia-Parajo MF, Segers-Nolten GM, Veerman JA, Greve J, van Hulst NF. Real-time light-driven dynamics of the fluorescence emission in single green fluorescent protein molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000: 97,7237-42
- [90] Weiss M. Challenges and artifacts in quantitative photobleaching experiments. *Traffic* 2004: 5,662-71
- [91] Axelrod D. Cell surface heating during fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* 1977: 18,129-31
- [92] Onsager L. Reciprocal relations in irreversible processes. I. *Phys Rev* 1931: 37,405-26
- [93] Petersen NO, Elson EL. Measurements of diffusion and chemical kinetics by Fluorescence Photobleaching Recovery and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Methods in Enzym* 1986: 130,454-84
- [94] De Ganck A, Hubert T, Van Impe K et al. A monopartite nuclear localization sequence regulates nuclear targeting of the actin binding protein myopodin. *FEBS Letters* 2005: 579,6673-80
- [95] Van den Abbeele A, De Corte V, Van Impe K et al. Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion in vitro. *Cancer Lett* 2007: Epub ahead of print
- [96] Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer* 2003: 3(12),921-30
- [97] Wolf K, Mazo I, Leung H et al. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *J Cell Biol* 2003: 160(2),267-77
- [98] Petrov EP, Ohrt T, Winkler RG, Schwille P. Diffusion and segmental dynamics of double-stranded DNA. *Phys Rev Lett* 2006: 97,258101,1-4
- [99] Petrov EP, Schwille P. State of the art and novel trends in fluorescence correlation spectroscopy. In: *Standardization in fluorometry: State of the art and future challenges*. 2007, Ed: Resch-Genger, chapter 25
- [100] Doeven MK, Folgering JHA, Krasnikov V, Geertsma ER, Bogaart G, Poolman B. Distribution, lateral mobility and function of membrane proteins incorporated into giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 2005: 88,1134-42
- [101] Pristinski D, Kozlovskaya V, Sukhishvili SA. Fluorescence correlation spectroscopy studies of diffusion of a weak polyelectrolyte in aqueous solutions. *J Chem Phys* 2005: 122,014907,1-9

- [102] Pramanik A, Rigler R. FCS-analysis of ligand-receptor interactions in living cells. In: *Fluorescence correlation spectroscopy. Theory and applications* 2001, Ed: Rigler R, Elson EL. chapter: 6,101-32
- [103] Jankevics H, Prummer M, Izewska P, Pick H, Leufgren K, Vogel H. Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochem* 2005: 44,11676-83
- [104] Swaminathan R, Hoang CP, Verkman AS. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probes by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys J* 1997: 72,1900-7
- [105] Chen Y, Müller JD, Ruan QQ, Gratton E. Molecular brightness characterization of eGFP in vivo by fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophys J* 2002: 82,133-44
- [106] Houtsmuller AB, Rademakers S, Nigg AL, Hoogstraten D, Hoeijmakers JHJ, Vermeulen W. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. *Science* 1999: 284,958-61
- [107] Brock R, Vamosi G, Vereb G, Jovin TM. Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999: 96(18),10123-8
- [108] Hinow P, Rogers CE, Barbieri CE, Pietenpol JA, Kenworthy AK. The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. *Biophys J* 2006: 91,330-42
- [109] Sprague B, Pego RL, Stavreva DA, McNally JG. Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* 2004: 86,3474-95
- [110] Koppel DE. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys Rev A* 1974: 10(6),1938-45
- [111] Qian H, Elson EL, Frieden C. Studies on the structure of actin gels using time correlation spectroscopy of fluorescent beads. *Biophys J* 1992: 63,1000-10
- [112] Qian H. On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys Chem* 1990: 38,40-57
- [113] Wohland T, Rigler R, Vogel H. The standard deviation in fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 2001: 80,2987-99
- [114] Saffarian S, Elson EL. Statistical analysis of fluorescence correlation spectroscopy: The standard deviation and bias. *Biophys J* 2003: 84,2030-42

- [115] Enderlein J, Gregor I, Patra D, Fitter J. Statistical analysis of diffusion coefficient determination by fluorescence correlation spectroscopy. *J Fluorescence* 2005: 15(3),415-22
- [116] Shav-Tal Y, Blechman J, Darzacq X et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nuclear caps during transcriptional inhibition. *Mol Biol Cell* 2005: 16(5),2395-413
- [117] Ozanne DM, Brady ME, Cook S, Gaughan L, Neal DE, Robertson CN. Androgen receptor nuclear translocation is facilitated by the F-actin cross linking protein filamin. *Mol Endocrinol*, 2000: 14,1618-26
- [118] Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Zellkern-Rezeptoren sind ligandenaktivierte Genregulatorproteine. In: *Molekularbiologie der Zelle* 2004: Kapitel 15.1.9, 977-80
- [119] Moriarty K, Kim KH, Bender JR. Minireview: Estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 2006: 147(12),5557-63
- [120] Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptor. *Steroids* 2002: 67,471-75
- [121] Revankar C, Cimino D, Sklar L, Arterburn J, Prossnitz E. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005: 307,1625-30
- [122] Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinology* 2003: 17(3),309-17
- [123] Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G et al. Steroid receptor regulation of epidermal growth factor signaling through Src in breast and prostate cancer cells: steroid antagonist action. *Cancer Res* 2005: 65(22),10585-93

Danksagung

Für ihre freundliche Unterstützung dieser Arbeit möchte ich danken Herrn Professor Jörg Langowski und Frau Dr. Katalin Toth, Herrn Professor Hans Georg Bender und Herrn Dr. Dieter Niederacher, Herrn Dr. Waldemar Waldeck und Frau Gabriele Müller, Herrn Dr. György Vamosi und Frau Dr. Ulrike Engel.

Finanziell gefördert wurde diese Arbeit durch ein Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Lebenslauf

- geb. 1977 Düsseldorf
- 1996 humanistisches Abitur am Alten Gymnasium Bremen
Förderpreis der Karl-Nix-Stiftung Bremen
Zivildienst auf ökologisch arbeitendem Bauernhof in der
Wesermarsch
- seit 1997 Studium an der Kunstakademie Düsseldorf
- seit 1998 in der Klasse von Prof. Markus Lüpertz
Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
- 2001 Erstes medizinisches Staatsexamen
Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
- 2002 Meisterschüler bei Prof. Markus Lüpertz
- 2003 Akademiebrief bei Prof. Markus Lüpertz
viermonatiger Romaufenthalt, Auslandsförderung der
Studienstiftung des deutschen Volkes
- 2004 Zweites medizinisches Staatsexamen
- 2005 Drittes medizinisches Staatsexamen
Oktober: Beginn der Promotion, Promotionsförderung der
Studienstiftung des deutschen Volkes
- 2006 Approbation als Arzt
Mai und Dezember
- und 2007 Januar und November: Forschungsaufenthalte in der bio-
physikalischen Abteilung der Universität Debrecen
(Prof. Damjanovich), finanziert durch DAAD und MÖB
- 2008 Januar bis April: Gaststipendium der Akademie Schloß
Solitude Stuttgart

Zusammenfassung

Das CapG-Protein, ein Aktin-bindendes Protein der Gelsolinfamilie, wird in Mammakarzinomen, insbesondere in metastasierenden Mammakarzinomen, überexprimiert. Es ist bekannt, daß das CapG-Protein an der Kontrolle der Aktin-basierten Motilität nichtmuskulärer Zellen beteiligt ist. Seine verstärkte Expression soll eine Steigerung der Motilität benigner Zellen bedingen. Somit ist zu erwarten, daß in malignen Zellen, in denen das CapG-Protein überexprimiert ist, Motilität, Invasivität und Metastasierung in besonderem Maße gefördert werden.

In dieser Arbeit gelang es nun, durch die Fluoreszenzmarkierung des CapG-Proteins die Dynamik zellulärer Prozesse wie Migration und Invasivität zur Anschauung zu bringen und die Kinetik der intrazellulären Verteilung des CapG-Proteins zu analysieren. Unterschiede der intrazellulären Mobilität des CapG-Proteins zwischen nichtneoplastischen und neoplastischen Brustepithelzellen konnten dargestellt, Korrelationen gesteigerter Tumorzellbeweglichkeit und beschleunigter intrazellulärer CapG-Mobilität aufgezeigt und ein kausaler Zusammenhang zwischen CapG-Expression und -Verteilung auf der einen und Invasivität und Metastasierung auf der anderen Seite wahrscheinlich gemacht werden, so daß eine Differenzierung von Tumorzellen durch die Kinetikanalyse einzelner lebender Zellen möglich erscheint.



Prof. Dr. H. G. Bender