

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Thomas Weidemann
aus Pfullendorf

Thema

Quantitative Untersuchung der Verteilung, Mobilität und Bindung von fluoreszenzmarkierten Histonen *in vitro* und *in vivo* mit Fluoreszenzfluktationsmikroskopie

Gutachter: Prof. Dr. Jörg Langowski
Prof. Dr. Jeremy C. Smith

Quantitative Untersuchung der Verteilung, Mobilität und Bindung von fluoreszenzmarkierten Histonen *in vitro* und *in vivo* mit Fluoreszenzfluktationsmikroskopie

Der Bindungszustand von Histonen an DNA *in vitro* und *in vivo* sowie ihre Verteilung und Mobilität in der Zelle werden mit Hilfe von Fluoreszenz untersucht. Dazu werden Histonproteine sowohl synthetisch mit organischen Farbstoffen konjugiert als auch die Fusionsproteine von H2B und H1 mit EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) in HeLa-Zellen exprimiert. Die Messungen erfolgen mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und kontinuierlichem Bleichen der Fluoreszenz (CP) im gleichen optischen Aufbau, dem Fluoreszenzfluktationsmikroskop (FFM). Ein theoretischer Formalismus für FCS wird auf zwei Anwendungsbereiche erweitert: Erstens die allgemeine Analyse bimolekularer Bindungsreaktionen über Zwei-Farben-FCS und zweitens die Bestimmung von Anzahl und Fluoreszenzausbeute der gebundenen Farbstoffe mit Ein-Farben-FCS. Die Theorie wird im Experiment an isolierten, markierten Nukleosomenketten angewendet. Bei sehr niedriger Ionenstärke kann zwischen den Nukleosomen ein geringfügiger Austausch der Histone nachgewiesen werden. In lebenden Zellen wird die Verteilung und Mobilität einer H2B-EYFP-exprimierenden Zelllinie untersucht. Es wird ein Ansatz aufgezeigt, wie über FCS-Messungen im Cytoplasma die im konfokalen Bild aufgezeichneten Intensitäten in absolute Konzentrationen von Fluorophoren umgerechnet werden können. Über Bleichmessungen wird ein Reservoir von frei diffundierendem H2B-EYFP von den in der Chromatinfiber immobilisierten Komponenten diskriminiert. Über eine *in vitro* bestimmte Einbaurrate der Fusionsproteine in die Nukleosomen können aus den konfokalen Bildern Nukleosomendichtekarten für HeLa-Zellkerne erstellt werden. Eine statistische Auswertung der Konzentrationen erfolgt mit Histogrammen und ergibt mittlere Nukleosomendichten in der Interphase zwischen 110 und 140 μM , während in mitotischen Chromosomen Maximalwerte bis zu 450 μM gemessen werden. Verschiedene Kondensationszustände des Chromatins werden diskutiert. Im Vergleich zu H2B-EYBP ist die Bindung von H1-EYFP dynamisch. Über kontinuierliches Bleichen (CP) wird die mittlere Aufenthaltsdauer von H1 an seinen Bindungsstellen mit 16 ± 4 s bestimmt.

Quantitative investigation of distribution, mobility, and binding of fluorescently labeled histones *in vitro* and *in vivo* with fluorescence fluctuation microscopy

The binding state of histones to DNA *in vitro* and *in vivo* and their distribution and mobility in the cell are investigated with fluorescence. For this purpose histone proteins are conjugated synthetically with organic dyes and fusion proteins of H2B and H1 with EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) are expressed in HeLa-cells. The methods used are fluorescence correlation spectroscopy (FCS), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and continuous fluorescence photobleaching (CP) in the same optical setup, the fluorescence fluctuation microscope (FFM). A theoretical framework for FCS is extended for two cases: a general analysis of bimolecular binding reactions with two-colour FCS and the determination of the number of bound dyes and their fluorescence yield with one-colour FCS. The theory is used for studying isolated nucleosomes *in vitro*. The results show that a small fraction of histones exchanges between the nucleosome chains at very low ionic strength. In living cells, the distribution and mobility of H2B-EYFP is characterised in detail. With FCS, concentration and brightness of nascent molecules are measured in the cytoplasm. A procedure is presented with which intensity values of confocal images can be converted into absolute concentrations of fluorophores. With CP, a mobile pool of fluorescent H2B-EYFP in the nucleoplasm can be distinguished from an immobilised fraction assembled into chromatin. Together with the fraction of EYFP-tagged nucleosomes determined *in vitro*, this allows to transform confocal images into nucleosome density maps. A histogram analysis of the nucleosome densities shows mean values between 110 and 140 μM in interphase and maximum values of 450 μM in mitotic chromosomes. Different states of condensation are discussed. Compared to H2B-EYFP the binding of H1-EYFP is dynamic. By means of continuous photobleaching (CP) a residence time of 16 ± 4 s for H1 at its binding sites in chromatin is determined.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1 Fragestellung	1
2 Chromatin	3
2.1 Chromatin als Substanz	3
2.2 Die Architektur des Nukleosoms	4
2.3 Die Funktion der Histonschwänze	9
2.3.1 Postranslationale Modifikationen	9
2.3.2 Strukturbildung höherer Ordnung	11
2.3.3 Histone als schaltbare Bindungsstellen	12
2.4 Die Stabilität des Nukleosoms	13
2.5 Die 30 nm-Fiber und Chromatinstrukturen höherer Ordnung	15
2.6 Chromosomen im zellulären Kontext	18
3 Methodischer Schwerpunkt: FCS	21
3.1 Einleitung	21
3.2 Technische Realisierung von Zwei-Farben-FCS	25
3.3 Theoretische Grundlagen der FCS	27
3.3.1 Das Fluoreszenzsignal	27
3.3.2 Korrelation einer Spezies	28
3.3.3 Korrelationsfunktionen im Ein-Farben-Aufbau	28
3.3.4 Korrelationsfunktion im Zwei-Farben-Aufbau	31
3.3.5 Korrelationen mehrerer Spezies	32
3.3.6 Einfluß von Fluoreszenzlöschung	33
3.3.7 Korrektur des Untergrund-Signals	34
3.3.8 Allgemeines zu Anregung und Detektion im Zwei-Kanal-System	35
3.4 Statistische Verteilung von Fluorophoren	36
3.5 Charakterisierung einer synthetischen Markierung mit Autokorrelation	38

3.6	Charakterisierung eines Bindungsgleichgewichts mit Kreuzkorrelation	40
3.6.1	Das Verhältnis von Kreuz und Autokorrelationsamplitude, RatioG	40
3.6.2	Instrumentelle Randbedingungen	42
3.6.3	Klassifizierung verschiedener Bindungsreaktionen	43
3.7	Quantitative konfokale Mikroskopie	46
3.8	Bleichen als Maß für intrazelluläre Mobilität	49
4	Synthetisch markierte Nukleosomen in vitro	51
4.1	Markierung der Histone am Nukleosom	51
4.2	Zwei-Farben-FCS an einem zweifarbig markierten Standard	54
4.2.1	Markierung und Aufreinigung	55
4.2.2	Zwei-Farben-FCS	56
4.3	Salzabhängiger Histonaustausch	62
4.4	Charakterisierung einer Markierung mit Ein-Farben-FCS	66
4.4.1	Auswahl der Farbstoffe	66
4.4.2	Unterschußmarkierung	68
4.4.3	Aufreinigung mit Gelfiltration	71
5	Autofluoreszierendes Chromatin	75
5.1	Einleitung	75
5.2	Charakterisierung von H2B-EYFP-haltigem Chromatin in vitro	77
5.2.1	Etablierung von H2B-EYFP-exprimierenden Zellen	77
5.2.2	Nukleosomen der transformierten Zelllinie sind in größeren Abständen auf der DNA lokalisiert als bei nicht-transformierten Zellen.	78
5.2.3	Quantifizierung von H2B-EYFP auf Gelen	80
5.2.4	Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie	82
5.2.5	Diffusion der fluoreszierenden Oligonukleosomen	84
5.2.6	Fluktuationsamplituden der Oligonukleosomen	86
5.2.7	Diskussion	88
5.3	Verteilung und Mobilität von H2B-EYFP <i>in vivo</i>	89
5.3.1	Mobilität und Helligkeit von H2B-EYFP im Cytoplasma	89
5.3.2	Eine mobile Fraktion von Histonen diffundiert relativ schnell im Nukleoplasma	92
5.3.3	Räumliche Verteilung absoluter Nukleosomenkonzentrationen	94
5.3.4	Histogramme der Nukleosomendichten in der Interphase	94
5.3.5	Histogramm der Nukleosomendichte in der Anaphase	96
5.3.6	Diskussion	98
5.4	Austausch von H1-EYFP <i>in vivo</i>	102

6	Material und Methoden	105
6.1	Verbrauchsmaterial	105-106
6.2	Geräte	107
6.3	Gele	107
6.3.1	Agarosegele	107
6.3.2	Polyacrylamidgele	107
6.3.3	Western-Blots	108
6.4	Präparation von Chromatin	109
6.4.1	Isolation intakter Kerne	109
6.4.2	Isolation von Nukleosomenketten	109
6.4.3	Markierung mit aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen	110
6.5	Zellkultur	110
6.6	Fluorimeter	110
6.7	Absorptionsspektroskopie	110
6.8	FFM	110
7	Zusammenfassung	113
	Anhang	117
	Zu Kapitel 3: statistische Momente	117
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Literaturverzeichnis	121
	Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

1 Fragestellung

1.1	Modulare räumliche Struktur des Genoms	1
-----	--	---

2 Chromatin

2.1	Nomenklatur des Nukleosoms	4
2.2	Lineare Anordnung der Sekundärstrukturen der Core-Histone	5
2.3	Symmetrie des Nukleosoms	7
2.4	Anordnung der Histonschwänze	8
2.5	Darstellung der 30 nm-Fiber	16
2.6	Chromatindarstellung mit TEM	18
2.7	Zellkerne in der Interphase	19

3 Methodischer Schwerpunkt: FCS

3.1	Ein-Farben-FCS	21
3.2	Autokorrelation	22
3.3	Zwei-Farben-FCS	23
3.4	Kreuzkorrelation	24
3.5	Schematischer Aufbau des FFM	26
3.6	Fokusgeometrie	30
3.7	Kreuzkorrelationsfunktionen bei zweifarbiger Anregung	31
3.8	Statistische Verteilung von Fluorophoren am Komplex	37
3.9	Korrektur bei Fluoreszenzlöschung einer Spezies	40
3.10	Bindungskurven	46
3.11	Kalibrierung der konfokalen Fluoreszenzbilder	48

4 Synthetisch markierte Nukleosomen in vitro

4.1	Saccharosegradient	52
4.2	Markierungsreaktion über Succinimidylester	53
4.3	Darstellung der Nukleosomen auf Gelen	54
4.4	Strukturformeln von Texas Red und Bodipy-Fluoreszein	55

4.5	Absorptionsspektren: Variation der Farbstoffkonzentration	56
4.6	Korrelationsfunktionen von markierten Oligonukleosomen	57
4.7	Auswertung von FCS-Messungen einer zweifarbigen Markierungsreihe	59
4.8	Adsorption	61
4.9	Auto- und Kreuzkorrelationsamplituden eines Austauschexperiments	63
4.10	Histonaustausch	64
4.11	Strukturformeln von Alexa 568, Rhodamin Green und 6C-Fluoreszein	67
4.12	Übersprechen	68
4.13	Darstellung der Mononukleosomen mit PAGE	69
4.14	Ein-Farben-FCS einer unvollständig aufgereinigten Markierung	70
4.15	Absorptionsspektren der Markierungsansätze	71
4.16	Elutionsprofil einer Gelfiltration	72
4.17	Flußdiagramm	73

5 Autofluoreszierendes Chromatin

5.1	Plasmidkarte (H2B-EYFP)	78
5.2	Saccharosegradient	79
5.3	SDS-PAGE	80
5.4	Quantifizierung von H2B-EYFP auf Gelen	81
5.5	Normalisierte Fluoreszenz	82
5.6	Spektroskopische Messungen an EYFP-markierten Trinukleosomen	83
5.7	Nicht-strahlende Zustände von EYFP	84
5.8	Diffusionskoeffizienten von EYFP-markierten Oligonukleosomen	86
5.9	Einbaurate	87
5.10	Modellstruktur	88
5.11	FCS an H2B-EYFP im Cytoplasma	90
5.12	Verteilung von H2B-EYFP im Zellkern	93
5.13	Nukleosomendichtekarte	95
5.14	Histogramme der Nukleosomendichten	97
5.15	Chromosomen in der Anaphase	98
5.16	Kernlamina	100
5.17	TEM-Aufnahme einer HeLa-Zelle	101
5.18	H1-EYFP exprimierende Zelllinie	103
5.19	Bleichkurve im Nukleolus	104

Tabellenverzeichnis

2 Chromatin

- 2.1 Massenverhältnis von Chromatinkomponenten gegenüber der DNA 3
- 2.2 Posttranslationale Modifikationen der Histone. 10

3 Methodischer Schwerpunkt: FCS

- 3.1 Einteilung möglicher Bindungsreaktionen im Zwei-Farben-Ansatz. 44

4 Synthetisch markierte Nukleosomen *in vitro*

- 4.1 Anzahl und Positionen der Lysine in den Histonen 52
- 4.2 Relative Anteile und Diffusionszeiten der Korrelationskurven in Abb. 4.6. 58
- 4.3 Adsorption verschiedener Farbstoffe 66
- 4.4 Diffusionszeiten freier Farbstoffe beider Kanäle aus Abb. 4.12 68
- 4.5 Korrektur der Fluoreszenzlöschung für Kurven in Abb. 4.14 70

5 Autofluoreszierendes Chromatin

- 5.1 Progression im Zellzyklus 77
- 5.2 Charakteristische Konzentrationen in Interphasekernen von HeLa-Zellen 95

6 Material und biochemische Methoden

- 6.1 Verbrauchsmaterialien 105-106
- 6.2 Großgeräte. 107

1234567

Fragestellung

Die Evolution der Eukaryonten vor über 2 Milliarden Jahren war von einer starken Zunahme der Genomgröße begleitet. Zum Vergleich: Das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) enthält in Form eines einzigen ringförmigen Moleküls 4.7 Millionen Basenpaare (Bp) doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid, DNA), in welcher ca. 3000 Gene codiert sind. Im haploiden Genom einer menschlichen Zelle sind ca. 35000 Gene auf drei Milliarden Bp verteilt – gegenüber *E. coli* eine über tausendfache Zunahme des DNA-Gehalts bei einer nur zehnfachen Anzahl der Gene. Das Genom liegt im eukaryontischen Zellkern als lineare DNA vor, welche während der Kernteilung als distinkte Chromosomen mikroskopisch sichtbar wird. Chromosomen enthalten beim Menschen zwischen 50 und 250 Millionen Bp, und die entsprechenden DNA-Fäden sind ausgestreckt zwischen 1.7 und 8.5 cm lang. Im Vergleich zu einem typischen Durchmesser eines Zellkerns von 10 μm wird deutlich, daß neben einer effektiven Kompaktierung auch die kontrollierte Segregation dieser langen Moleküle eine geordnete, räumliche Organisation erfordert. Wie ist diese realisiert? Auf mindestens vier Größenbereichen lassen sich über den Zellzyklus hinweg stabile, strukturelle Einheiten beschreiben: die Nukleosomenstruktur, die 30 nm-Fiber, subchromosomale Domänen und Chromosomenterritorien (Abb. 1.1).

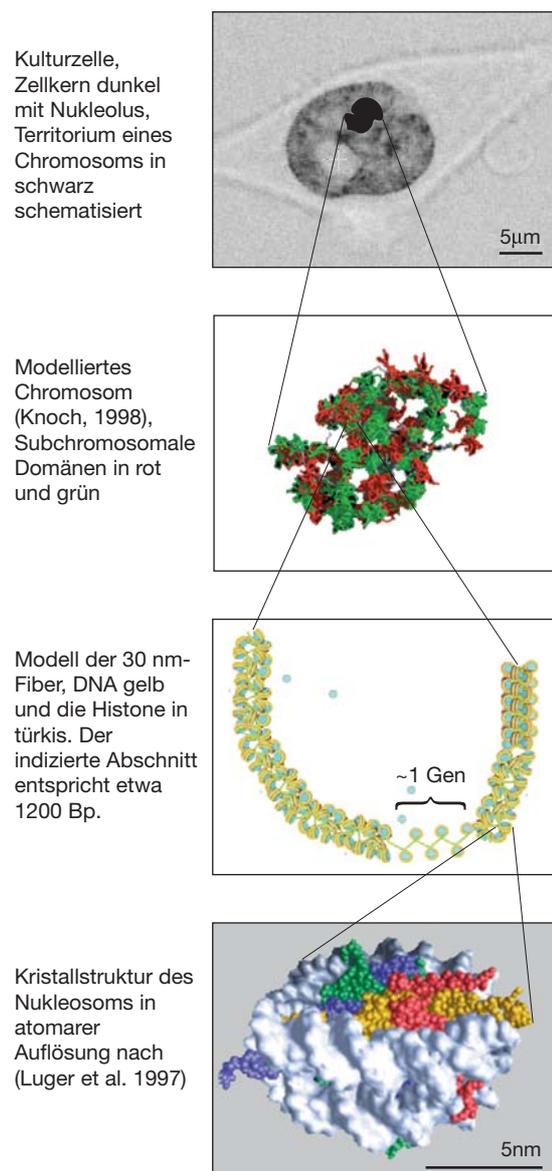


Abbildung 1.1
Modulare räumliche Struktur des Genoms.

Kompaktierung und hohe Ordnung erscheint als eine Grundvoraussetzung für eine stabile genetische Vererbung und die Evolution komplexerer Organismen. Aber die Stabilität des Genoms spiegelt sich nur teilweise in seiner modularen strukturellen Anordnung im physikalischen Raum, sondern erscheint auch als Netzwerk von präzisen, hochdynamischen molekularen Prozessen an der DNA. Ein gutes Beispiel liefern die Reparaturmechanismen. Für Säuger wurde abgeschätzt, daß allein durch thermisch bedingte Hydrolyse einige Tausend Purinbasen pro Tag und Zelle freigesetzt werden. Die Folge wäre eine Mutationsrate, die etwa tausendfach höher liegt als diejenige, welche tatsächlich bei Eukaryonten realisiert ist ($\sim 10^{-9}$ Bp pro Zellzyklus). Der lokale DNA-Schaden wird an jeder möglichen Stelle im Genom von Reparaturenzymen erkannt und das entsprechende Basenpaar regeneriert. Die Effizienz dieser Mechanismen ist an die Lebensdauer der Zellen angepaßt, die für ausdifferenzierte somatischen Zellen oder Keimzellen viele Tage bis zu Monate betragen kann. Reparaturmechanismen erfordern daher, daß *alle* DNA-Abschnitte permanent für lösliche Proteinkomponenten im Zellkern zumindest temporär zugänglich sind. Die molekularen Reparaturmechanismen an der DNA müssen mit der Nukleosomenstruktur und Kompaktierung höherer Ordnung kompatibel sein.

Die Struktur des Chromatins spielt auch eine entscheidende Rolle für die Genregulation. Eine breite Vielfalt von Transkriptionsfaktoren binden in verschiedenen Phasen der Zelle sequenzspezifisch an die DNA, doch sind die entsprechenden Bindungsstellen nicht immer zugänglich. Es wurden in den letzten Jahren eine ganze Reihe modular aufgebauter Enzymkomplexe beschrieben, die unter Konversion chemischer Energie Chromatinabschnitte biochemisch und strukturell modifizieren und die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren lokal regulieren. Dabei spielt die Mobilität der Histonoktamere an der DNA eine entscheidende Rolle. Die Mechanismen, mit denen Nukleosomen entlang der DNA verschoben werden, sind Gegenstand aktueller Diskussion. Dagegen scheint die Nukleosomenstruktur beim prozessiven Vorgang der Transkription und der Replikation selbst zumindest temporär aufgelöst zu werden. In beiden Fällen bewegen sich DNA-Moleküle und große molekulare Maschinerien über viele tausend Bp in engem Kontakt relativ zueinander. In wie weit sich die Histone dabei von der DNA lösen oder nur verlagert werden, ist kontrovers.

Über die Beobachtung fluoreszenzmarkierter Histone sind in dieser Arbeit zunächst Nukleosomenketten in freier Lösung analysiert worden. Der Bindungszustand der Histone wurde mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) quantifiziert. FCS erlaubt die Messung fluoreszierender Teilchen bis in pikomolare Konzentrationen, ein Bereich, der mit anderen spektroskopischen Methoden aufgrund geringerer Sensitivität oft nicht zugänglich ist. Es wurde ein Verfahren etabliert, mit dem die Austauschkinetik von Histonen zwischen verschiedenen Chromatinfragmenten *in vitro* verfolgt werden kann. Ein weiterer attraktiver Vorteil der FCS ist das kleine Beobachtungsvolumen (Dimensionen im μm -Bereich), das es erlaubt, auch in lebenden Zellen zu messen. Dies ermöglicht die Beobachtung von autofluoreszierenden Histonkonstrukten *in vivo*. Die Verteilung von verschiedenen YFP-Histonfusionsproteinen in der Zelle, ihr Transport in den Kern sowie ihre Verteilung und Mobilität im Zellkern werden hier mit einer Kombination von FCS und Laserscanning-Mikroskopie quantitativ analysiert.

1234567

Chromatin

2.1 Chromatin als Substanz

DNA wird funktionell und räumlich durch Proteine organisiert, und die resultierende funktionelle Einheit bezeichnet man im weiteren Sinne als Chromatin. Chromatin verdankt seine Bezeichnung der leichten Anfärbbarkeit von Kernmaterial mit basischen Farbstoffen, die schon in einer frühen Phase der Mikroskopie festgestellt wurde (Flemming 1882). Später erfolgte eine begriffliche Einengung auf den Nukleoproteinkomplex isolierter, mitotischer Chromosomen (aber eine derartige Definition bildet einen Spezialfall). Umfangreichere Untersuchungen stammen aus den 70er Jahren: Zellkerne und Chromatin wurden sukzessive durch Lyse der sie umgebenden Membranen isoliert. Die nukleosomalen Histone wurden aufgrund ihrer Häufigkeit den anderen nuklearen Nicht-Histon-Proteinen (nonhistone-chromosomal proteins, NHCP) gegenübergestellt. Diese Art der Definition ist zwar uneinheitlich und hängt von den Details der jeweiligen Präparation ab, gibt aber eine Vorstellung davon, daß sehr viel verschiedene Proteine mit einer chromosomalen DNA assoziiert sind. Zu den NHCPs gehören Komponenten aller grundlegenden molekulargenetischen Prozesse wie Replikation, Transkription und Reparatur, aber auch des Kernskeletts, z.B. Lamine und Topoisomerasen. Zur Veranschaulichung werden in Tab. 2.1 die Massenverhältnisse von Histonen, NHCPs und RNA für isolierte Zellkerne einiger Organismen beispielhaft angegeben (van Holde 1989, S. 70).

Tabelle 2.1 Massenverhältnis von Chromatinkomponenten gegenüber der DNA

Organismus	Gewebe	Histone	NHCPs	RNA
Fruchtfliege	Embryo	0.79	1.2	0.06
Huhn	Erythrocyten	1.02	0.36	<0.01
Mensch	HeLa-Zellen ^a	1.08	0.7	0.05

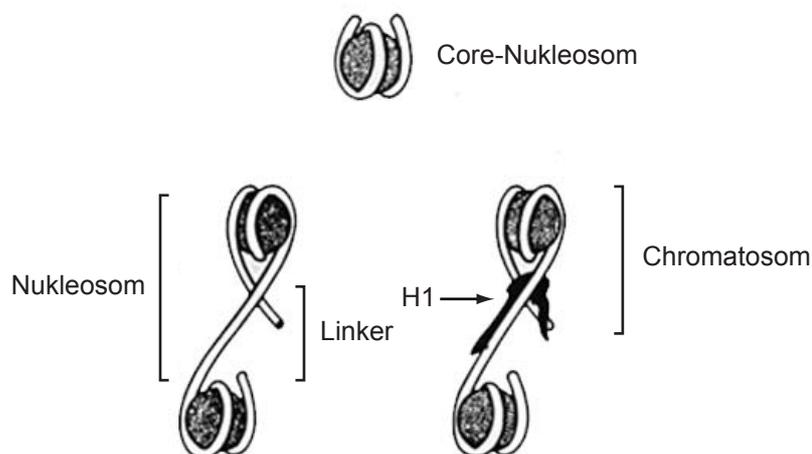
^a. Mit „HeLa-Zellen“ ist eine menschliche, epitheloide Tumor-Zelllinie bezeichnet

Das Gewichtsverhältnis von Histonen zu nackter DNA liegt strukturbedingt ungefähr bei 1. Dagegen variiert der Anteil der NHCPs und hängt vor allem von der transkriptionellen Aktivität des Gewebes ab. Zum Beispiel ist in Hühner-Erythrocyten bis auf wenige Gene wie Hämoglobin ein Großteil des Genoms reprimiert und der Anteil der NHCPs demnach gering. Wie das Beispiel der Fruchtfliege zeigt, kann der Anteil der NHCPs aber auch relativ groß werden, allerdings zeichnen sich diese Zellkerne durch eine sehr niedrige Chromatindichte aus. In erster Näherung besteht der funktionelle eukaryontische Zellkern zu einem Teil aus DNA und zu etwa zwei Teilen aus Protein. Zusätzlich existiert noch ein kleiner Anteil an RNA, und alle polymeren Substanzklassen zusammengenommen ergeben eine Struktur mit einer Dichte von etwa 1.35 g cm^{-1} (Kleinig und Sitte, 1986).

2.2 Die Architektur des Nukleosoms

Die DNA eukaryontischer Zellen bildet in regelmäßigen Abständen kompakte, aufspiralisierte Einheiten. Dabei sind 146 Bp der DNA etwa 1.8fach in Form einer linkshändigen Superhelix um einen Proteinkern gewunden, einem Oktamer aus je zwei Individuen kleiner basischer Proteine der Histonklassen H3 und H4 sowie H2A und H2B. Der zylinderförmige Gesamtkomplex hat einen Durchmesser von 11 nm und eine Höhe von 5.5 nm und wird als „Core“-Nukleosom bezeichnet (*engl.* core: Kern). Zwei benachbarte Core-Nukleosomen werden von einem DNA-Abschnitt konstanter Länge verbunden, der „Linker“-DNA (*engl.* linker: Verbindungsstück), die in nativem Zustand von den Linker-Histonen H1 oder H5, aber auch von anderen kleinen basischen Proteinen, z.B. HMG-Proteinen (high mobility group, HMG), gebunden wird. Die gesamte genomische Wiederholungslänge (repeat length, RL) von etwa 200 Bp konstituiert zusammen mit dem Histonoktamer das Nukleosom, mit einem Massenverhältnis DNA zu Protein von etwa 1:1. Linker-Histone und Nukleosomen sind in lebenden Zellen etwa stöchiometrisch vorhanden. Da H1 außerdem im Öffnungsbereich der Superhelix bindet, was eine stabilisierende Funktion nahelegt, wurde für diese Einheit der Begriff Chromatosom eingeführt (Simpson, 1978). Eine Übersicht über die Nomenklatur gibt Abb. 2.1.

Abbildung 2.1 Definition der Struktureinheiten auf der Ebene der Nukleosomen (Wolffe 1995, S. 34). Die DNA ist als helles Band, das Oktamer dunkel gefärbt.



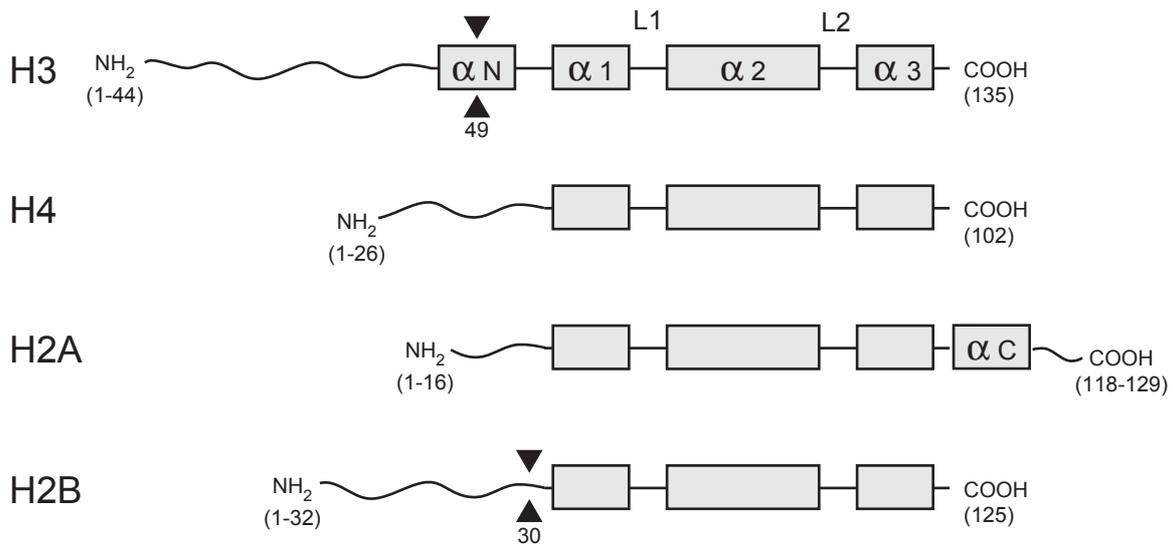


Abbildung 2.2 Lineare Anordnung der Sekundärstrukturen von Core-Histonen. Drei homologisierbare α -Helices (Boxen) sind vom Amino-Ende her durchnummeriert (1, 2 und 3) und durch L1, L2 verbunden und bilden die Grundstruktur der Heterodimere. α N und α C, zwei kleinere α -Helices, interagieren mit der DNA. In Klammern stehen C-terminal die Gesamtlänge der Kette oder als Intervall die Positionen der Aminosäuren, welche nach (Luger et al., 1997) in den Histonschwänzen lokalisiert sind. Schwarze Dreiecke markieren die Positionen, an denen die N-Termini von H3 und H2B zwischen den DNA-Strängen hindurchtreten; Längenverhältnisse entsprechen in etwa der linearen Kettenlänge.

Die Struktur der Core-Nukleosomen wurde mit Hilfe von Röntgenkristallographie im atomaren Detail aufgelöst (Luger et al., 1997). Abb. 2.2 zeigt in linearer Anordnung Sekundärstrukturen aller vier Core-Histone, die sich anhand von drei alphahelikalen Domänen homologisieren lassen: einer zentralen längeren ($\alpha 2$) und zwei kürzeren α -Helices ($\alpha 1$ und $\alpha 3$), die durch kurze flexible Verbindungsschlaufen L1 und L2 (*engl.* loops: Schlaufe) verbunden sind. $\alpha 1$ und $\alpha 3$ stehen an beiden Seiten von $\alpha 2$ quer und bilden so eine klammerförmige Struktur. Je zwei „Histon-Klammern“ umfassen sich antiparallel und bilden im Nukleosom zwei Kombinationen von Heterodimeren: H2A-H2B und H3-H4, die wie Streben in der medialen Ebene des Nukleosoms angeordnet sind (Abb. 2.3). Das Nukleosom enthält eine zweizählige Symmetrieachse (Achse 1 in Abb. 2.3), so daß eine Drehung um 180° die Strukturen aufeinander abbildet. Im Bereich der Öffnung der Superhelix ist das zylinderförmige Histonoktamer seitlich von nur einem DNA-Strang begrenzt, über etwa 65° , während sonst zwei Windungen streng parallel geführt werden. Die Heterodimere kommen in der Aufsicht beiderseits der Symmetrieachse 1 vor, sind aber senkrecht dazu sortiert: die H3-H4-Dimere sind schwerpunktmäßig „vorne“, an der der Linker-DNA zugewandten, und die H2A-H2B-Dimere „hinten“, an der abgewandten Seite lokalisiert.

Jedes Heterodimer bindet leicht überlappende Abschnitte von 32-34 Bp und bewirkt eine Krümmung von etwa 140° . Insgesamt organisieren die vier Heterodimere damit 121 Bp DNA durch direkte Wechselwirkungen. Fünf Arten von Bindungen lassen sich aus der Kristallstruktur ablei-

ten: (1.) Durch die Polarität der α -Helices generierte positive Ladungszentren fixieren verschiedene Phosphatgruppen; (2.) Wasserstoffbrücken bestehen zwischen dem Stickstoffatom der Peptidbindung und den Phosphatgruppen; (3.) alle 14 exponierten kleinen Furchen des Phosphat-Zucker-Rückgrats werden durch einen basischen Argininrest ausgefüllt; (4.) vielfältige nichtpolare Wechselwirkungen mit Desoxyribosegruppen und (5.) Wasserstoffbrücken und Salzbrücken zwischen Phosphaten der DNA mit Amino- und Hydroxygruppen der Aminosäurereste.

Etwa 28% der Masse des Histonoktamers befindet sich in N- und C-terminalen Domänen, die wie molekulare Schwänze zu allen Seiten vom Nukleosom abgehen. Der Sequenzbereich der Histonchwänze ist in der Literatur nicht eindeutig definiert. Hier soll der Notation von (Luger et al., 1997) gefolgt werden (Abb. 2.2); dabei ist zu beachten, daß der proximale Teil der dort definierten Abschnitte durchaus noch mit der DNA wechselwirkt und zur Stabilität des Nukleosoms beiträgt. Dagegen stehen die distalen Bereiche als flexible, ungeordnete Ketten von dem durch die DNA gebildeten, flachen Zylinder ab oder liegen an, jedenfalls konnte ihre Position nicht im Kristall bestimmt werden.

Wie Abb. 2.4 illustriert, folgt die Topologie der Austrittsbereiche dieser Aminosäureketten einer hohen Symmetrie, was verschiedene Funktionsbereiche nahelegt. Insgesamt ragen zehn endständige Histonodomänen aus dem kompakten Kern: acht N-terminale Domänen aller vier Core-Histone sowie die C-Termini von H2A. Entgegen der Heterodimerisierung erschließt sich hier die Anordnung über Kreuz: N-Termini von H3 und H2B haben analoge Funktion und treten in der Medialebene des flachen Zylinders durch kleine Kanäle aus dem Inneren des Nukleosoms heraus (Abb. 2.4 a). Die Kanäle bestehen aus zwei vis-a-vis orientierten, kleinen Furchen der parallel verlaufenden DNA-Stränge, wodurch die DNA wie eine Kette auf einem Zahnrad positioniert ist. H3 markiert dabei im Öffnungsbereich die Stellen, an denen die beiden DNA-Stränge beginnen sich voneinander zu entfernen, während H2B spiegelsymmetrisch dazu „hinten“ das Nukleosom verläßt.

Die zwei H2A-Moleküle durchziehen das gesamte Nukleosom in enger Nachbarschaft zur zweizähligen Symmetrieachse 1 (Abb. 2.3 a), wobei sich die C-terminalen Enden am Nukleosom „vorne“ und die N-terminalen „hinten“ befinden (Abb. 2.4 b). In der Seitenansicht wird deutlich, daß die Schwänze des Peptids das Nukleosom jeweils auf der gleichen Seite verlassen; daher ist H2A das einzige Histon, das ohne Öffnung der superhelikalen Struktur entfernter erscheint. Die Anordnung von H2A läßt eine stabilisierende Funktion vermuten, da sich die beide Moleküle wie Klammern von beiden Seiten auf die Stirnfläche des Nukleosoms legen. Ebenso entfernen sich die N-Termini von H4 seitlich von der Stirnfläche des Proteinoktamers, doch besteht bei diesen Domänen eine geringere Wechselwirkung mit der nukleosomalen DNA.

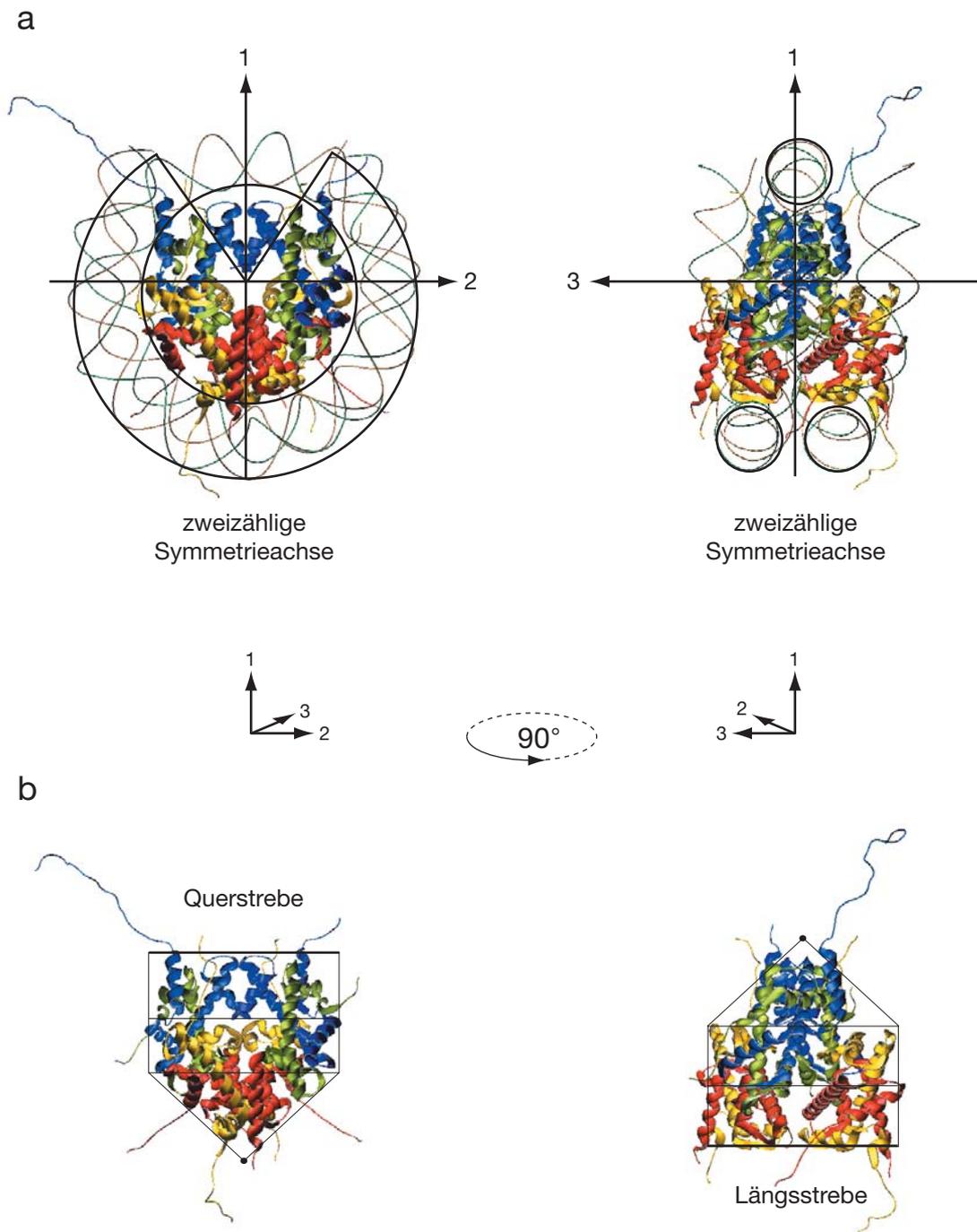


Abbildung 2.3 Symmetrie des Nucleosoms. Die Struktur (<http://www.rcsb.org/pdb/>, PDB ID: 1AOI) wurde mit Swisspdb-viewer (<http://www.expasy.ch/spdbv/>) als Bändermodell in zwei um 90° gegeneinander verdrehten Perspektiven dargestellt; **(a)** mit und **(b)** ohne das zugehörige DNA-Fragment. Die Farben entsprechen der Originalpublikation: H3 blau, H4 grün, H2A gelb, H2B rot, DNA-Einzelstränge braun und oliv. **(a)** Symmetrieachsen 1, 2 und 3 sind mit gleicher Länge und symmetrisch dargestellt, um einen Größenvergleich mit dem Auge zu ermöglichen. Der Verlauf der DNA sowie der Öffnungswinkel sind schematisch mit schwarzen Linien abstrahiert. **(b)** Der Proteinkern selbst ist nicht radiärsymmetrisch, sondern parallel zu den Achsen 3 und 2 abgeflacht. Wie man beim gedrehten Modell sieht, bilden sich dadurch zwei giebelartige Streben senkrecht zur Symmetrieachse 1, die das Nucleosom, „vorne“ als Querstrebe und „hinten“ als Längsstrebe, stabilisieren.

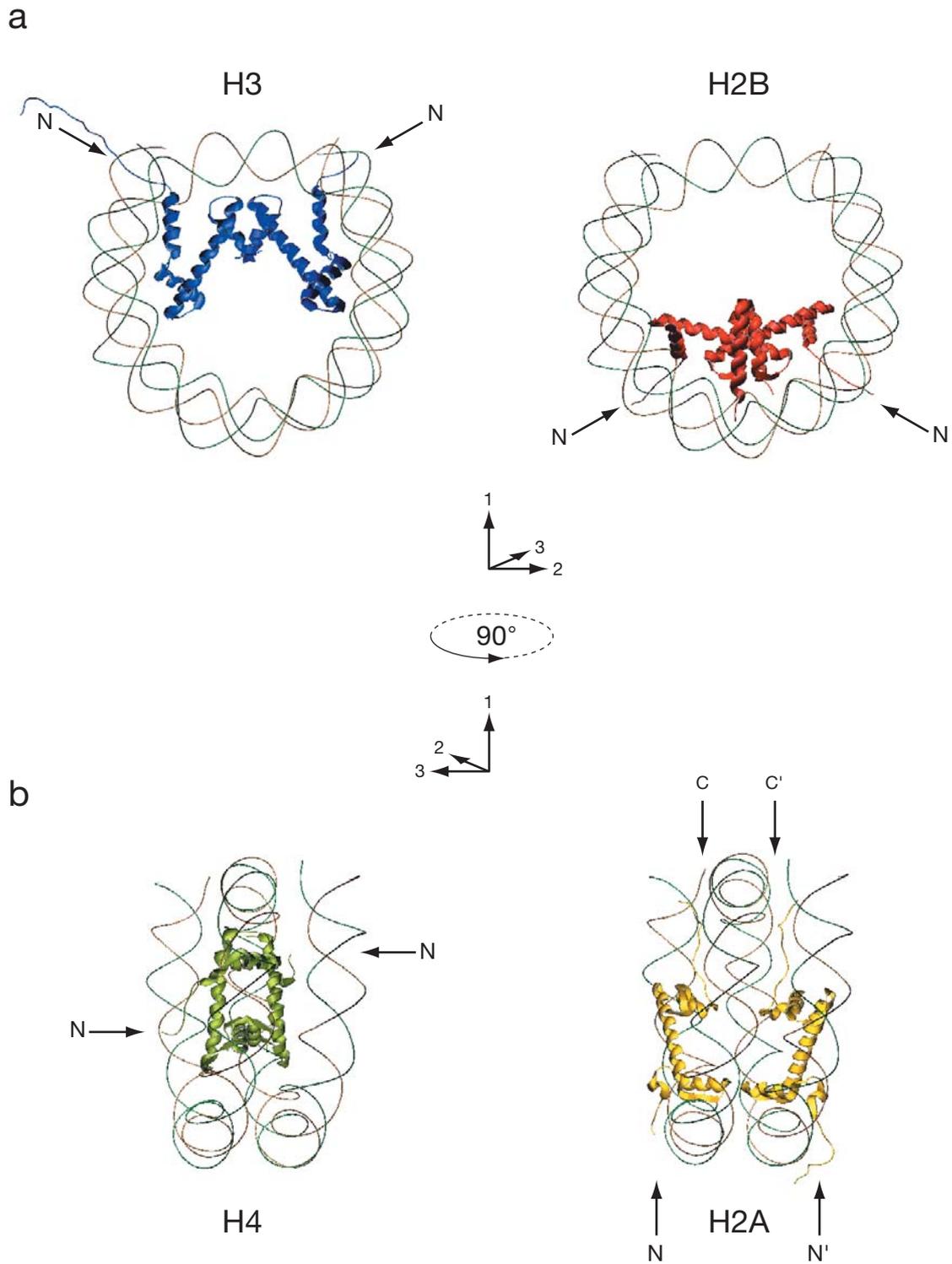


Abbildung 2.4 Anordnung der Histonschwänze.

(a) Aufsicht. N-Termini von H3 und H2B treten spiegelsymmetrisch zu Achse 2 zwischen den zwei DNA-Strängen hindurch und definieren damit die Medialebene des Nucleosoms.

(b) Seitenansicht. Die N-Termini von H4 stehen von der Stirnfläche des Zylinders ab. H2A besitzt als einziges Core-Histon auch C-terminale Schwänze, die „vorne“ im Öffnungsbereich des Nucleosoms lokalisiert sind.

2.3 Die Funktion der Histonschwänze

Obwohl die distalen Histonschwänze die Architektur des Nukleosomenkerns nicht wesentlich bestimmen, ist deren Sequenz und Länge evolutionär hoch konserviert. Die N-Termini von H3 und H4 unterscheiden sich von der Hefe bis zum Mensch in nur einer einzigen Substitution (Smith und Andresson, 1983). Diese Tatsache wird vielleicht verständlicher angesichts der enormen funktionellen Verdichtung, die es bedeutet, daß diese kleinen Proteine an fast alle wesentlichen zellulären Prozesse direkt oder indirekt ankoppeln. Die Funktion der Histonschwänze läßt sich in drei große interdependente Bereiche einteilen: posttranslationale Modifikation der Seitenketten, Strukturbildung des Chromatins höherer Ordnung, vor allem der 30 nm-Fiber, sowie Bildung einer Plattform für vielfältige Faktoren, welche die molekularen Prozesse an der DNA (Replikation, Transkription, Regulation der Superhelizität usw.), aber auch an der nukleosomalen Kette (Remodellierung, chromosomale Kondensation, usw.) bewerkstelligen und regulieren. Zusätzlich enthalten diese Domänen Abschnitte, welche die Biosynthese, den Transport und die Degradation, also den Umsatz der einzelnen Histone selbst organisieren.

2.3.1 Postrtranslationale Modifikationen

Die Seitenketten der Histonschwänze tragen eine Reihe funktioneller Gruppen, die in der Zelle gezielt orts- und zeitabhängig enzymatisch modifiziert werden. Prominent wurde in der Literatur der letzten Jahre die Acetylierung spezifisch positionierter Lysine über aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA) (Strahl und Allis, 2000; Struhl, 1998). Für diese Arbeit ist die Anzahl der freien Aminogruppen relevant, da sich diese durch eine chemische Austauschreaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen kovalent verknüpfen lassen. Es wurde aber auch Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung und die kovalente Verknüpfung von Ubiquitin beschrieben. Die Vielfalt der Modifikationen und ihre Korrelation zu molekularen und zellulären Mechanismen, wird in einem Standardwerk der Chromatinforschung als „barock“ bezeichnet (van Holde 1989, S. 111); einen groben Überblick gibt Tab. 2.2 in Anlehnung an (van Holde, 1989, S. 112) und dient als Ordnungsschema für einige funktionale Zusammenhänge.

(1.) *Acetylierung* erfolgt sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern, aber an verschiedenen Aminogruppen. Bei der Biosynthese werden H2A, H4 und H1 *in statu nascendi* an den N-Termini mit einer Acetylgruppe versehen. Diese Modifikation spielt eine Rolle für den aktiven Transport und die Reassemblierung von Nukleosomen während der Replikation in *Tetrahymena* (Allis et al., 1985). Dagegen steht die spezifische Acetylierung von ϵ -Aminogruppen der Lysine in den Histonschwänzen aller Core-Histone in engem Zusammenhang mit der Regulation der Polymerase II-abhängigen Transkription (Struhl, 1998). In den letzten Jahren wurde für viele schon bekannte Transkriptionsfaktoren eine Transacetylierungsaktivität nachgewiesen (z.B. TFIID, p300/CBP). Da bei Acetylierung positive Ladungen entfernt werden, gilt als Arbeitshypothese, daß internukleosomale Bindungen destabilisiert und die kompakte Chromatinfiber in eine offenere, für Transkriptionsfaktoren zugängliche Konformation überführt wird (siehe Kap. 2.3.2). Die Tatsache, daß nicht alle N-terminalen Lysine acetyliert werden und diese auch nur in bestimmten hochkon-

servierten Kombinationen, läßt eine tieferliegende Schicht von Komplexität vermuten; manche Autoren diskutieren daher einen Histon-Code (Strahl und Allis, 2000), welcher verschiedene Zustände der Chromatinfiber lokal definiert.

Tabelle 2.2 Posttranslationale Modifikationen der Histone

Modifikation	Chemische Gruppe	Akzeptorengruppen des Proteins
Acetylierung	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\bar{\text{N}}\text{H}-\text{R}$	ϵ -Aminogruppe der Lysine oder α -Aminogruppe N-terminaler Serine
Methylierung	$\text{CH}_3-\bar{\text{N}}\text{H}-\text{R}$	ϵ -Aminogruppe der Lysine vielleicht (Histidin, Arginin, Glutamin- und Asparaginsäure)
Phosphorylierung	$\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{P}}(\bar{\text{O}})(\bar{\text{O}})-\bar{\text{O}}-\text{R}$	OH-Guppe der Serine OH-Guppe der Threonine vielleicht (Lysin und Arginin)
ADP-Ribosylierung bzw. Polymere davon ^a	$(\text{ADP-Rib})_{n,m}-\bar{\text{O}}-\text{R}$	C-Termini δ -Carboxygruppe der Glutaminsäuren vielleicht (Arginin)
C-terminale Addition von Ubiquitin	$\text{Ubiquitin}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\bar{\text{N}}\text{H}-\text{R}$	ϵ -Aminogruppe der Lysine

^a. die Indices n,m sollen auf mögliche Verzweigung der Poly-ADP-Riboseketten hinweisen

(2.) *Methylierung* erfolgt auch an ϵ -Aminogruppen der Lysine. Es werden dabei mono-, di- und trimethylierte Derivate gebildet. Analog zur Acetylierung erfolgt die Methylierung an einigen ausgewählten Lysinen an H3 und H4, nicht oder nur in geringem Maße an H2A und H2B. Im Gegensatz zu Acetylierung scheint es sich dabei aber um einen nicht-lokalen Prozeß zu handeln, das heißt methylierte Histone sind über den ganzen Kern gleichverteilt. Der Einfluß auf die Funktion und Struktur von Chromatin ist nicht bekannt.

(3.) *Phosphorylierung* von H2A ist wahrscheinlich mit Transkription verknüpft und daher auf lokale Abschnitte im Genom begrenzt, während die Phosphorylierung von H1 und H3 mit dem Zellzyklus variiert. Wie oben dargestellt (Kap. 2.2), ragen die N-Termini von H3 im Öffnungsbereich der superhelikalen DNA des Nukleosoms heraus, auch wurde eine Wechselwirkung dieser Domänen mit der Linker-DNA beschrieben (Leuba et al., 1998a). H3 liegt lediglich während der Mitose phosphoryliert vor, und H1 wird kurz vor der Mitose extensiv mit Phosphaten beladen

(bis zu sechs). Die gemeinsame Wechselwirkung von H1 und H3 mit der Linker-DNA am Nukleosom sowie die synchrone Phosphorylierung läßt daher auf eine gemeinsame Funktion bei der Chromosomenkondensation schließen.

(4.) *ADP-Ribosylierung* kann bei allen Histonklassen nachgewiesen werden. Die Aktivität der entsprechenden Enzyme setzt die Anwesenheit von NAD⁺ als Substrat und eine nukleosomale Umgebung voraus. *In vitro* können sehr lange Ketten erzeugt werden, die im Schnitt alle 20 bis 30 Monomere eine Verzweigung aufweisen. Interessanterweise wurde über isolierte Poly-(ADP-Ribose)-Fragmente berichtet, an denen zwei Histone H1 kovalent verknüpft waren, und dieser Befund verweist auf die Möglichkeit, Chromatinfibern im Zellkern quervernetzt zu stabilisieren (Wong et al., 1984). In die gleiche Richtung weisen Experimente, die den Einbau von ADP-Ribose mit Einzelstrangbrüchen an der DNA korrelieren. Möglicherweise steht diese Art der Modifikation im Zusammenhang mit Mechanismen der DNA-Reparatur. Der Anteil der so modifizierten Histone liegt normalerweise unter 1%.

(5.) *Ubiquitin* ist ein kleines Peptid von 37 Aminosäuren, das eine weitverbreitete Rolle bei der Degradation cytoplasmatischer Proteine spielt. Aus Kernen wurden kovalente Konjugate von Ubiquitin mit H2A (10-20% der Gesamtmenge an H2A) und zu einem geringen Anteil auch mit H2B (1%) isoliert. Dabei ist das Peptid mit seinem Carboxy-Ende an die ϵ -Aminogruppe von Lysin 119 verknüpft (uH2A). Man konnte zeigen, daß uH2A in transkriptionsaktiven Bereichen des Chromatins angereichert ist, z.B. jedes zweite Nukleosom im hsp70-Lokus (Levinger und Varshavsky, 1982). Andererseits gibt es experimentelle Hinweise, daß der Umsatz von Ubiquitin wesentlich höher sein kann als der von uH2A selbst (Wu und Bonner, 1981). Die Funktion dieser Modifikation bleibt also unklar.

2.3.2 Strukturbildung höherer Ordnung

30-40% der Histonschwänze bestehen aus den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin. Da diese bei physiologischem pH positive Ladungen tragen, besteht die Möglichkeit einer Wechselwirkung mit negativen Ladungen des Phosphat-Zucker-Rückgrats der DNA (diskutiert in van Holde 1989, S. 261). Einigen Aufschluß liefert der experimentelle Vergleich von nativen mit trypsinisierten Nukleosomen. Trypsin spaltet bei moderater Anwendung an allen vier Core-Histonen etwa 20 N- und einige C-terminale Aminosäuren hydrolytisch ab. Das Entfernen der Histonschwänze, und damit 40-50% der positiven Ladung, hat aber auf die Konformation der Core-Nukleosomen überraschend geringe Auswirkungen. Trypsinierte und native Core-Nukleosomen zeigen nahezu identische CD-Spektren (circular dichroism, CD) und hydrodynamische Eigenschaften in Lösungen zwischen 200 und 600 mM NaCl. Dagegen zeigen Schmelzkurven, daß die Histonschwänze die thermische Stabilität beeinflussen, was mit einer Bindung an die DNA in Verbindung gebracht wurde (Ausio et al., 1989). Diese und andere Ergebnisse lassen sich interpretieren wenn man annimmt, daß die Bindung der Histonschwänze an der DNA relativ schwach und reversibel an variablen Positionen erfolgt. Rückschlüsse auf die funktionale Chromatin-Fiber sind daher sehr unsicher (Fletcher und Hansen, 1996).

Weitergehende Aussagen erlaubt das Studium von isolierten Nukleosomenketten in freier Lösung mit analytischer Ultrazentrifugation. Aus dem Sedimentationsverhalten läßt sich das Molekulargewicht und der Sedimentationskoeffizient einer Spezies gewinnen, welche ein Maß für die Kompaktheit der Komplexe in Lösung darstellt. Sedimentationskoeffizienten wurden für nukleosomale 12mere in Abhängigkeit von ein- und zweiwertigen Ionen gemessen (Garcia-Ramirez et al., 1992; Schwarz und Hansen, 1994). 12mere sind eine interessante Einheit, da man bei einer Massenbelegung der 30 nm-Fiber von sechs Nukleosomen pro 11 nm (bzw. pro Solenoidwindung siehe: Finch und Klug, 1976) annehmen kann, daß direkte Wechselwirkungen einer N-terminalen Domäne nicht weiter als über 12 Nukleosomen entlang der Fiber hinausreicht. Erhöht man den Salzgehalt der Lösung, werden zunehmend freie negative Ladungen der Linker-DNA abgeschirmt und die Nukleosomenkette kompaktiert sich. Für ein vollständig besetztes 12mer wurden drei Grenzfälle herausgearbeitet, die bei entsprechender Ionenstärke miteinander im Gleichgewicht stehen: die ~30 S-, die ~40 S- und die ~55 S-Konformation. Bis etwa 50 mM NaCl erfolgt eine rasche Kompaktierung des 12mers zum ~30 S-Partikel, unabhängig vom Grad der Trypsinierung. Der Übergang zur ~40 S-Konformation kann mit einwertigen Kationen wie Na⁺ oder K⁺ erreicht werden, wird aber durch Trypsinierung effektiv verhindert. Dabei war es auch ausreichend, wenn nur eine Sorte Heterodimer, entweder H2-H2B oder H3-H4, trypsiniert in die Nukleosomenkette integriert wurde (Tse und Hansen, 1997).

Erst ~55 S-Partikel entsprechen der vollen Kompaktierung, wie sie für die 30 nm-Fiber angenommen wird. Eine solche Verdichtung läßt sich aber nicht durch einwertige, sondern nur durch Zugabe von zweiwertigen Ionen, z.B. Mg²⁺ oder Ca²⁺, erreichen (Schwarz et al., 1996). Bei sehr hohen Konzentrationen zweiwertiger Ionen von einigen mM setzt schließlich Aggregation der Nukleosomenketten ein. Trypsinierung der Histonschwänze vermindert beides, nicht nur internukleosomale Wechselwirkungen auf der gleichen Kette *in cis*, sondern verhindert auch Aggregation *in trans*, und es gilt als evident, daß die Histonschwänze maßgeblich an der Strukturbildung der Chromatinfiber beteiligt sind. Die eingangs erwähnte Tatsache, daß nicht nur die Sequenz sondern auch die Länge der Histonschwänze bei Eukaryonten konserviert wurde, läßt auf eine dezidierte Anordnung und Funktion in der physiologischen Chromatin-Fiber schließen, diese ist aber noch unzureichend bestimmt. Interessanterweise kompensiert partielle Acetylierung, die etwa 10% der positiven Ladungen neutralisiert, die Wirkung einer vollständigen Trypsinierung aller Histonschwänze (Tse et al., 1998), und dieses Ergebnis unterstützt die Ansicht, daß die Konformation der Fiber über Acetylierung effektiv reguliert werden kann.

2.3.3 Histone als schaltbare Bindungsstellen

Die Chromatinfiber im Zellkern ist biochemisch nicht homogen, sondern weist Modifikationen auf. Diese Modifikationen bilden die Grundlage für die lokale Anreicherung von enzymatischen Faktoren, welche ihrerseits sukzessive das Chromatin verändern und die grundlegenden molekulargenetischen Prozesse an der DNA steuern. In der Literatur ist dabei immer wieder von der „Rekrutierung“ verschiedener Faktoren an bestimmten genomischen Loci zu lesen, was bedeutet, daß in verschiedenen Phasen Bindungsstellen geschaffen oder weggenommen werden oder deren

Affinität statistisch reguliert wird; ein Thema, daß in den letzten Jahren durch die Beobachtung von autofluoreszierenden GFP-Fusionsproteinen *in vivo* quantitativ zugänglich wurde. Für die Initiation dieser Prozesse spielen die Histonschwänze eine wichtige Rolle.

Konkrete Beispiele liefert der Bereich Transkription. Für die Transkription vieler Gene ist eine vorausgehende „Remodellierung“ des Chromatins erforderlich (Gregory und Horz, 1998; Imbalzano, 1998; Kornberg und Lorch, 1999). Große Proteinkomplexe (chromatin remodeling machines, CRMs) erkennen Nukleosomenketten als Substrat und verändern diese unter Verbrauch von ATP biochemisch und strukturell. Viele CRMs verschieben Nukleosomen auf der DNA und ermöglichen DNA-Sequenzen, z.B. Promotoren für Transkriptionsfaktoren zu exponieren. Dieser Mechanismus reicht aber nicht aus, um epigenetische Effekte zu erklären, denn es handelt sich um keinen lokal schaltbaren Mechanismus. Da die DNA-Sequenz unveränderlich ist, liegt es nahe zu vermuten, daß die Histonschwänze regulierbare Ansatzstellen für verschiedene Klassen von chromatinaktiven Proteinen darstellen. Die Rolle der Histonschwänze wurde für SWI/SNF und NURF beschrieben (Georgel et al., 1997; Logie et al., 1999). Für ISWI, eine modulare Untereinheit, die sich in einer Reihe von CRMs wiederfindet (NURF, CHRAC, ACF), konnte spezifisch gezeigt werden, daß die Anwesenheit der N-Termini von H4 für die ATPase-Aktivität als auch für die Funktion von CHRAC essentiell ist (Clapier et al., 2001). Der N-Terminus von H4 ist auch Ansatzstelle für die dauerhafte Komplexbildung mit genetischen Repressor-Proteinen SIR3, SIR4 und TUP1 (Edmondson et al., 1998; Hecht et al., 1995), die mit dem Reifungsprozeß in Hefezellen einhergeht und als ein klassisches Beispiel für die entwicklungsabhängige Abschaltung von Genen gilt (Silencing). Es ist wahrscheinlich, daß Histone während der Transkription und Replikation temporär vom DNA Molekül entfernt werden. In diesem Zusammenhang wurden kompetitive Histon-Bindungsproteine (histone carriers) postuliert und die Histonschwänze von H2A und H3 als Erkennungs- und Bindungsdomänen diskutiert (Hansen et al., 1998). Im Zusammenhang mit Replikation sind solche Histon-Träger bereits beschrieben, z.B. Nap-1 aus Hefe, für dessen Funktion bei der nukleosomalen Assemblierung die Histonschwänze eine entscheidende Rolle spielen (McQuibban et al., 1998).

2.4 Die Stabilität des Nukleosoms

Kristallstrukturen und abbildende Verfahren wie Elektronenmikroskopie oder Rasterkraftmikroskopie (siehe Abb. 2.5) suggerieren ein vereinfachtes Bild des Nukleosoms als stabile globuläre Struktur; doch ist dies unzureichend. Das Nukleosom bezieht seine Stabilität in Lösung aus der Verbindung von zwei in sich höchst instabilen Einheiten: einem ungewöhnlich stark gekrümmten DNA-Fragment und einem unter physiologischen Bedingungen instabilen Histonoktamer. Biophysikalische Messungen an isolierten Nukleosomenketten *in vitro* der letzten drei Jahrzehnte liefern wertvolle Informationen über die physikochemischen Bedingungen, unter denen nukleosomale Komplexe stabil sind. Die Frage, ob und wann der Komplex sich in einer Gleichgewichtssituation von Bindung und Dissoziation befindet, die den Austausch einzelner Histone zwischen verschiedenen DNA-Abschnitten zur Folge hätte, ist in der Literatur allerdings weit weniger gut beantwortet.

Wie bei jeder Komplexbildung gilt für Nukleosomen das Massenwirkungsgesetz. Der Konzentrationsbereich, in dem sich ein Gleichgewicht auf die eine oder die andere Seite verschieben läßt, hängt von den Lösungseigenschaften wie pH, Temperatur und dem Salzgehalt ab. Die polyelektrolytischen Eigenschaften der DNA bedingen vor allem eine starke Abhängigkeit der Stabilität von der Ionenstärke, sowie der Art und Valenz der Kationen. Nach Widom (Widom, 1999) überlagern sich hier zwei antagonistische Effekte: Auf der einen Seite wird bei hoher Ionenstärke die Bindungsaffinität zwischen Histonen und der DNA vermindert. Dies ist eine ganz allgemeine Eigenschaft von Protein-DNA-Wechselwirkungen; für eine theoretische Beschreibung siehe (Record et al., 1998). Auf der anderen Seite bewirkt der Übergang zu niedrigen Salzkonzentrationen unterhalb von 10 mM eine Vergrößerung der dynamischen Persistenzlänge von DNA (sie wird steifer) und führt zu einem kleineren Betrag der Bindungsenthalpie im Nukleosomen (Baumann et al., 1997; Hagerman, 1988). Als Resultante beider Abhängigkeiten ergibt sich eine maximale Stabilität nukleosomaler Komplexe etwa im Bereich physiologischer Konzentrationen einwertiger Ionen (Widom, 1999), doch ist eine solche Vereinfachung fraglich. Der Einfluß zweiwertiger Ionen ist wegen der Aggregationsfähigkeit zu höheren Einheiten in dieses einfache Schema nicht integriert. Auch wird der entropische Beitrag zur Bindung nicht quantitativ berücksichtigt, und manche Autoren argumentieren auf der Basis von Computersimulationen in die entgegengesetzte Richtung (Anselmi et al., 1999).

In Übereinstimmung mit dem Massenwirkungsgesetz läßt sich experimentell leicht zeigen, daß eine Verdünnung isolierter Nukleosomen in den nanomolaren Bereich zu einer Dissoziation von Histonkomponenten führt (Godde und Wolffe, 1995; Yager et al., 1989) und (Royer et al., 1992). Dieser Vorgang scheint zwar in einem engen Konzentrationsbereich reversibel, aber die Reassoziationsreaktion ist hoch kooperativ (Yager et al., 1989). Deshalb ist es sehr schwer, Zwischenprodukte des Gleichgewichts zu detektieren. Zweitens erfolgt die Reassoziationsreaktion nicht mehr zwangsläufig in nukleosomaler Stöchiometrie, sondern in einer Verteilung von Histon-DNA-Komplexen unterschiedlicher Zusammensetzung. Ungebundene Histone in freier Lösung tendieren ihrerseits dazu, selbst zu aggregieren oder an noch intakten Nukleosomenketten „von außen“ zu binden (Gallego et al., 1995; Voordouw und Eisenberg, 1978). Mehrere Problemfelder erschweren daher eine saubere Charakterisierung dieser Phänomene. Die Meßergebnisse sind davon abhängig, wie die Nukleosomenketten gewonnen werden. Natives Chromatin zeigt je nach Präparationsmethode und Herkunftsgewebe, aber auch durch die kerntypische Heterogenität selbst, eine breite Verteilung nukleosomaler Komplexe mit unterschiedlichen Eigenschaften. Zweitens – und dieser Punkt betrifft einen Großteil der Experimente – ist der Einfluß der Methode auf die nukleosomale Stabilität eine schwer einschätzbare Größe. Wechselwirkungen der Histone mit festen Phasen, Gelen oder Gefäßwänden können die Ergebnisse beträchtlich verfälschen.

Wenn bei höheren Konzentrationen nackte DNA mit einer äquivalenten Menge von Core-Histonen gemischt wird, so erhält man ebenfalls Nukleosomen sowie eine Verteilung andersartiger Histon-DNA-Komplexe (Daban und Guasch, 1980; Daban und Cantor, 1982). Als eine mögliche Erklärung dient die Vorstellung, daß die Assoziationskinetik im Vergleich zur Dissoziation sehr schnell ist und daher viele Komplexe in kinetischen „Sackgassen“ so effektiv gefangen werden,

daß innerhalb experimentell sinnvoller Zeitspannen keine Umordnung zu einer Nukleosomenstruktur stattfinden kann. Diese Sackgassen werden bei der gängigen Methode der Rekonstitution durch Salzdialyse vermieden. Hier wird die DNA mit Histonen in etwa 2 M NaCl gemischt und die Salzkonzentration über mehrere Stunden kontinuierlich gesenkt. Die Bindung zwischen Histonen und der DNA wird dadurch verlangsamt, und das System hat Zeit, sich bei jedem Assoziationsschritt zu äquilibrieren, d.h. den kinetischen Sackgassen zu entkommen.

Für die Genregulation spielt die Nukleosomenmobilität *in cis* eine wichtige Rolle. Es fällt auf, daß die meisten charakterisierten CRMs Abstände zwischen den Nukleosomen regulieren oder deren Mobilität erhöhen (NURF, CHRAC, ACF, SWI/SNF), seltener aber die Fähigkeit besitzen, Histonoktamere *in trans* auf andere DNA-Abschnitte zu transferieren (RSC, siehe (Lorch et al., 1999)). In die gleiche Richtung weisen *in vitro*-Experimente, bei denen durch immobilisierte rekonstituierte Nukleosomenketten transkribiert wird. Histone scheinen sich dabei nur sehr kurz vom DNA-Strang, nicht aber vom Chromatinsegment als Ganzes zu lösen, was möglicherweise mit Schlaufenbildung erklärt werden kann (Clark und Felsenfeld, 1992; Schiessel et al., 2001; Studitsky et al., 1994). Techniken, die in diesen Bereich auf neue Weise vorstoßen, werden gerade etabliert: z.B. Einzelmolekültechniken, mit denen die Aktivität von Polymerasen an einer immobilisierten DNA mechanisch vermessen werden (Kinetiken, Kräfte). Mit dem gleichen Ansatz lassen sich möglicherweise auch Wechselwirkungen und Bindungen in Chromatinfibern oder einzelnen Nukleosomen, aber auch ihr Einfluß auf prozessive enzymatische Aktivitäten an der DNA bestimmen. Aus zellbiologischer Sicht hat in den letzten Jahren vor allem die *in vivo*-Beobachtung von fluoreszierenden Histon-Fusionsproteinen mit FRAP (fluorescence recovery after photo-bleaching) zum Verständnis von Beweglichkeit und Austausch der Histone im Zellkern beigetragen (Kimura und Cook, 2001; Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000).

2.5 Die 30 nm-Fiber und Chromatinstrukturen höherer Ordnung

Die Nukleosomen treten aufgrund von Wechselwirkungen der Histone zur nächsthöheren Struktureinheit, der 30 nm-Fiber, zusammen. Der Pfad der DNA innerhalb der Fiber und ihre verschiedenen Konformationen sind Gegenstand umfangreicher Kontroversen, die für diese Arbeit von untergeordneter Bedeutung sind (Bednar et al., 1998; Rydberg et al., 1998; van Holde und Zlatanova, 1996; Zlatanova et al., 1998). Drei Aspekte sollen hier zu Bewußtsein gebracht werden: (1.) An der Chromatinfiber vollziehen sich abschnittsweise ganz unterschiedliche Prozesse. Man unterscheidet transkriptionsaktive von reprimierten Bereichen, Heterochromatin von Euchromatin, codierende von nicht codierenden, centromerische von pericentrischen und diese von telomerischen Bereichen usw. All diese Begriffe beziehen sich entweder auf eine bestimmte Topologie oder funktionelle Aktivität des Chromatins, und sie können auch überlappen. (2.) Trotz der abschnittweisen Heterogenität ist der Durchmesser der Chromatinfiber wahrscheinlich relativ konstant, was mit der Regulation einer konstanten Linker-Länge in kausalem Zusammenhang steht. Wood-

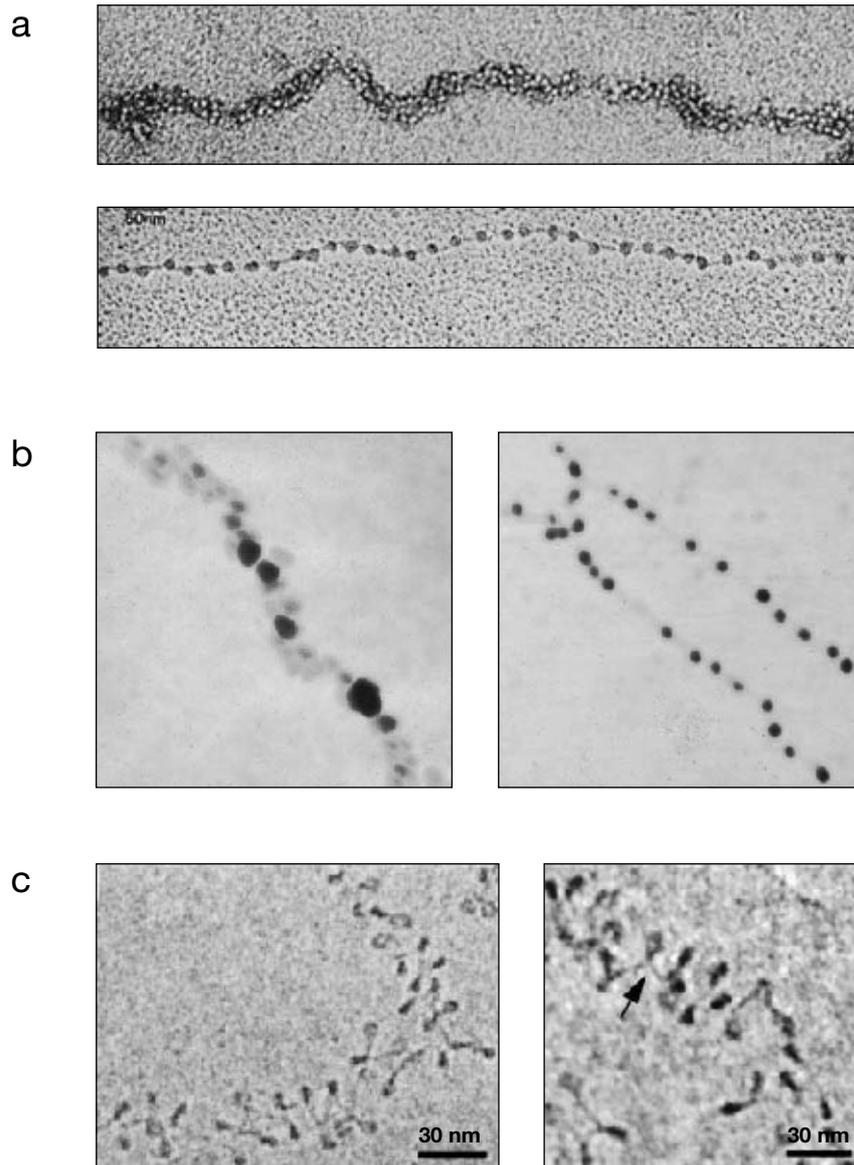


Abbildung 2.5 Darstellung der 30 nm-Fiber.

(a) TEM-Bilder isolierter Chromatinfibern unterschiedlicher Konformation: oben die als „nativ“ bezeichnete Fiber und unten die ausgestreckte „Perlenkettenstruktur“ nach (Alberts et al., 1994, S. 369). Der Kontrast wird durch Schwermetallbedampfung der fixierten und adsorbierten Probe erzeugt.

(b) AFM-Bilder isolierter Chromatinfibern aus Hühnererythrocyten, links mit Linker-Histonen (H1/H5), rechts ohne Linker-Histone (Leuba et al., 1998b). Die Fläche der Bilder entspricht 500 x 500 nm.

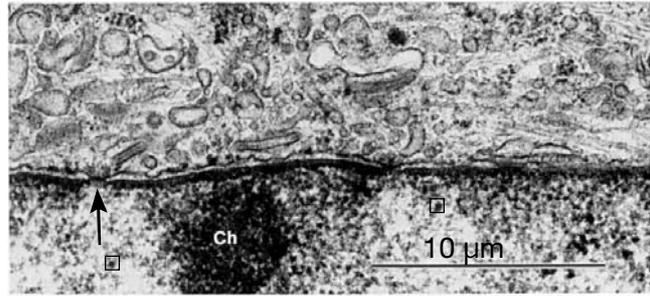
(c) Darstellung isolierter und gelöster Chromatinfragmente aus Hühnererythrocyten mit EC-M (Bednar et al., 1998). Die Lösung wird durch sehr schnelle Temperaturabsenkung vitrifiziert und die Komplexe in ihrer Konformation eingefroren. Ein niedriger Salzgehalt von 5 mM einwertiger Ionen bewirkt die offene Struktur der Fiber.

cock und Mitarbeiter (Woodcock, 1994) argumentieren sogar, daß die Breite der Chromatinfiber mit der Linker-Länge nicht variiert, untersuchten experimentell aber nur eine Variationsbreite von 20 Bp. Tritt man noch einen Schritt zurück, so fällt auf, daß die Wiederholungslängen der Nukleosomen (146 Bp + Linker-Länge) im Vergleich zwischen den unterschiedlichen Geweben aber auch zwischen den Organismen mit 200 ± 60 Bp nicht sehr stark variieren. Darüberhinaus ist die Linker-Länge in ein und demselben Zelltyp hochregelmäßig, und dieser Befund korreliert mit der großen Anzahl von CRMs, die diesen Zustand enzymatisch sicherstellen. Zusammen mit der Tatsache, daß die DNA fast vollständig mit Nukleosomen besetzt ist, verweist die streng regulierte Linker-Länge auf die Bedeutung der 30 nm-Fiber als ein grundlegendes eukaryontisches Motiv. (3.) Die Packungsdichte der Nukleosomen in der Fiber variiert ebenfalls abschnittsweise, weist aber einen Maximalwert auf. Die maximale Packungsdichte wurde mit Neutronenstreuung in Kombination mit Scanning-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM), aber auch mit Lichtstreuung gemessen (Campbell, 1978; Gerchman und Ramakrishnan, 1987) und liegt bei einer Anordnung von 5–6 Nukleosomen in einer Ebene senkrecht zur Fiberachse.

Übergeordnete Strukturbildung der Nukleosomenkette wurde zunächst an fragmentiertem, isoliertem Chromatin untersucht. Durch Spreitung von Chromatin auf einer Oberfläche kann die Chromatinfiber wie auch die gestreckte Perlenkettenstruktur im Elektronenmikroskop dargestellt werden (siehe Abb. 2.5 a). Da die Fixierung und Spreitung der Fiber einiges Potential für Artefakte birgt, besteht in der Kryo-Elektronenmikroskopie (EC-M) eine substantielle Weiterentwicklung (Bednar et al., 1995): Isolierte Fibern werden in flüssigem Ethan bei etwa -170°C schockgefroren und mit TEM abgebildet (Abb. 2.5 c). Es konnte die Zickzack-Geometrie einer offenen und geschlosseneren Konformationen bei unterschiedlichem Salzgehalt beschrieben werden. Ein grundsätzlicher Nachteil der Elektronenmikroskopie besteht darin, daß die Probe nicht *in situ* manipuliert und beobachtet werden kann. Dynamische Eigenschaften der Fiber sind nicht zugänglich. Einen neuen Ansatz bietet hier die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscopy, AFM). Mit AFM kann ein an einer Oberfläche adsorbiertes Molekül mit einer feinen Nadel mechanisch abgetastet und in flächiger Projektion abgebildet werden. Die laterale Auflösung liegt bei wenigen Nanometern. Chromatinfibern wurden so bereits erfolgreich visualisiert (Leuba et al., 1998b), und es konnte ebenfalls der Unterschied zwischen einer offeneren und einer geschlosseneren Konformation festgestellt werden (Abb. 2.5 b). Das Prinzip der Methode erlaubt die Untersuchung von Übergängen verschiedener Konformationen der Fiber unter verschiedenen Pufferbedingungen, aber auch unter Einwirkung enzymatischer Aktivität.

Eine mikroskopische Darstellung der 30 nm-Fiber in ihrem natürlichen Kontext ist schwierig. Klassische Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) von Zellkernen löst einzelne 30 nm-Fibern nicht auf (siehe Abb. 2.6). Die Chromosomen sind zu dicht gepackt, und bei der Fixierung werden nicht nur die Fibern selbst, sondern diese auch untereinander quervernetzt, so daß Chromatin im Bild in mehr oder weniger inhomogene Verteilung erscheint. Statt dessen konnte mit TEM *in situ* eine globuläre supranukleosomale Einheit beschrieben werden (Zentgraf und Franke, 1984). TEM-Bilder von Zellkernen motivieren die Begriffsbildung von dichtem Hetero- und weniger dichtem Euchromatin, die im Dünnschnitt mit dem Auge als zwei distinkte Zustände in

Abbildung 2.6 Chromatindarstellung mit TEM. Glutaraldehyd-fixierter Ultradünnschnitt einer Epithelzelle der Maus. Hetero- und Euchromatin ist unterscheidbar. Obwohl auch in weniger dichten Kernbereichen eine „klumpige“ Struktur in der Größenordnung von 30 nm zu sehen ist (kleine Quadrate), legen diese Bilder keine Fiberstruktur nahe. Der Pfeil deutet auf eine Kernpore. (Kleinig und Sitte, 1986, S. 231).



Erscheinung treten (Abb. 2.7). Heterochromatin ist häufig mit der Kernhülle oder den Nukleoli assoziiert, ein Befund, der auch lichtmikroskopisch schon lange bekannt ist (Kiefer 1971). Lichtmikroskopische Techniken erlauben zwar eine schonendere Fixierung oder Beobachtung lebender Zellen, sind aber auf eine Auflösung von etwa 200 nm begrenzt. Einigen Fortschritt brachten hier Methoden der Fluoreszenzmarkierung selektiver Abschnitte im Genom in Kombination mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM), doch erlauben diese Techniken zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur in Einzelfällen die Verknüpfung von Strukturparametern einer postulierten Fiber mit der Aktivität des Chromatins in lebenden Zellen (Sadoni et al., 2001; Tsukamoto et al., 2000; Verschure et al., 1999).

Zwischen 30 nm und etwa 500 nm wird eine Schleifenbildung der Chromatinfiber angenommen. Motivierend für diese Vorstellung sind ausgeprägte Überstrukturen, wie sie an meiotischen Lampenbürsten-Chromosomen, in Oozyten von Amphibien, aber auch an polytären Riesenchromosomen, in den Speicheldrüsen von Dipteren, auftreten. Inwieweit die 30 nm-Fiber in mitotischen Interphase-Zellkernen sich faltet oder zu Rosetten von mehreren Schlaufen zusammenlagert, ist noch weitgehend unbekannt. Dagegen bestehen eindeutige Evidenzen für die Ausbildung subchromosomaler Replikationseinheiten mit einem Durchmesser von 400 bis 800 nm, die über den Zellzyklus hinweg lichtmikroskopisch als zusammenhängender Bereich (subchromosomale Foki) verfolgt werden können (Zink et al., 1998).

2.6 Chromosomen im zellulären Kontext

Innerhalb der Kernmembran nehmen Chromosomen auch in der Interphase einen abgrenzbaren Raum ein, das Chromosomenterritorium; für eine Übersicht siehe (Cremer und Cremer, 2001). Die Dekondensation während der Telophase erfolgt, ohne daß sich die Chromosomen vermischen; der Bereich, in dem Chromatinfibern expandieren können, ist eingeschränkt. Dies konnte durch FISH (fluorescence in situ hybridisation, FISH) demonstriert werden (Schardin et al., 1985): Aus isolierten Chromosomen wird eine fluoreszenzmarkierte genomische Sonde hergestellt und auf fixierte, permeabilisierte Zellen appliziert. Die fluoreszierenden Oligonucleotide binden bei geeigneter Behandlung an komplementäre DNA-Sequenzen *in situ*, so daß bestimmte Chromosomen selektiv angefärbt werden. Form und Lage der Chromosomen wird dann mikroskopiert.

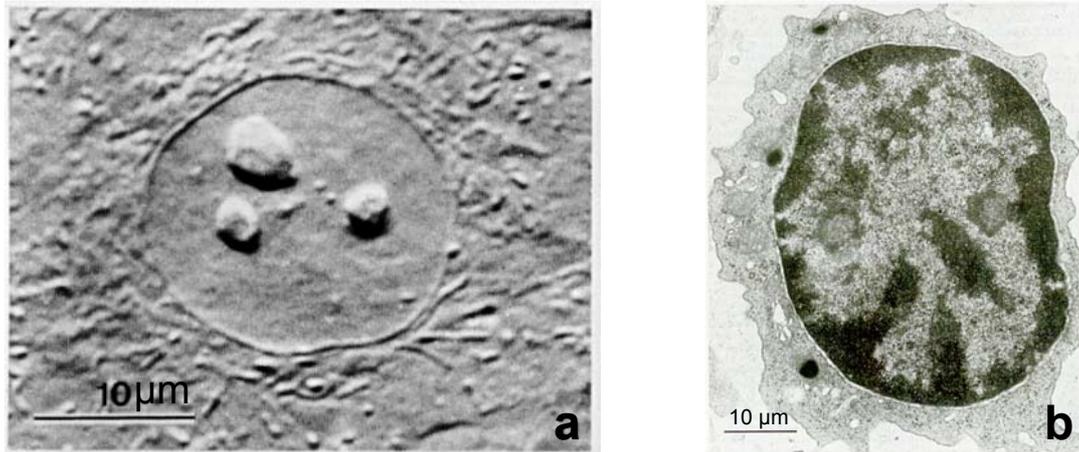


Abbildung 2.7 Zellkerne in der Interphase.

(a) Zellkern einer lebenden epitheloiden menschlichen Zelle in der Interphase. Aufnahme mit Differenzial-Interferenzkontrast nach Nomarski: die Nukleoli treten deutlich hervor, aber das Chromatin erscheint homogen.

(b) TEM-Dünnschnitt eines Lymphocyten aus dem Blut der Maus. Es läßt sich membranassoziiertes dichtes Heterochromatin und weniger dichtes Euchromatin differenzieren (Kleinig und Sitte, 1986, S. 158, bzw. S. 418).

Diese Technik läßt sich auch mit mehreren Farben durchführen; man spricht von „chromosome painting“. Die Überlappungsbereiche zwischen den Territorien sind gering und wurde, z.B. für zwei benachbarte menschliche Chromosomen (3 und 6), in der Interphase beispielhaft mit 4% quantifiziert (Münkel et al., 1999).

Kompartimentierung des Genoms ist ein genuin eukaryontisches Merkmal. Die Lipid-Doppelmembran, welche den Kern umgibt, steht mit dem endoplasmatischen Reticulum (ER) in Kontinuität und wird während der Metaphase zeitweise aufgelöst. Die Komponenten der kernseitigen Membran werden dabei durch laterale Diffusion vom ER absorbiert (Ellenberg und Lippincott-Schwartz, 1999). Für die mechanische Verbindung zwischen Chromatin und der Kernmembran spielen die Lamine eine wichtige Rolle. Diese Proteine gehören zu den Intermediär-Filamenten und bilden zwischen Kernhülle und den Chromosomen eine flächiges Netzwerk von etwa 10-20 nm Dicke, die sogenannte Kernlamina (Gruenbaum et al., 2000).

Die Funktion der Kernmembran ist primär die einer Diffusionsbarriere. Transport in den Kern und aus ihm heraus erfolgt durch Kernporen, hochgeordnete, sehr große Gebilde, die sich aus über 100 verschiedenen Proteinen zusammensetzen (Fabre und Hurt, 1994). Die Kernporen enthalten wassergefüllte Kanäle von etwa 9 nm Durchmesser, durch welche freie Diffusion kleiner hydrophiler Moleküle möglich ist, erlauben aber auch den ungehinderten Durchtritt von Cytochrom C (13 kDa), verzögerten Durchtritt von Ovalbumin (40 kDa) und verhindern den Durchtritt von BSA (bovine serum albumin, BSA) (60 kDa). Transportrichtung und -raten korrelieren nur eingeschränkt mit der molekularen Größe, sie werden über unmittelbare oder mittelbare Wechselwirkungen mit Proteinen des Kernkomplexes reguliert. Ein illustratives Beispiel für die Transportleistung gibt Görlich (Görlich und Mattaj, 1996): Eine HeLa-Zelle enthält 10 Millio-

nen Ribosomen und teilt sich etwa alle 24 Stunden. Bei einer durchschnittlichen Flächendichte der Kernporen von $15 \mu\text{m}^{-2}$ (Kleinig und Sitte, 1986) wird jede Kernpore, durchschnittlich alle 20 Sekunden von einer ribosomalen Untereinheit passiert. Man beachte, daß die ribosomalen Proteinkomponenten zuvor einzeln in den Kern hineintransportiert wurden. Transportrichtung und -raten können an ein und demselben Protein mehrfach umgeschaltet werden. Für viele nuklearen Proteine konnte eine Kernlokalisierungssequenz (nuclear localisation sequence, NLS) identifiziert werden, ein kurzes Peptidsegment, das den Transport von nuklearen Proteinen in den Kern bewirkt. Histone enthalten mehrere Sequenzbereiche, die an nukleare Transportprozesse anknüpfen (Baake et al., 2001). Aufgrund ihrer kleinen Größe erscheint es daher sinnvoll, daß aktive Transportmechanismen in den Kern aber auch Hindernisse in umgekehrter Richtung etabliert wurden, um diese konstitutiven Chromatinkomponenten im Zellkern hochgradig anzureichern (Breeuwer und Goldfarb, 1990). Über die Mechanismen und die Proteinkomponenten des nuklearen Transports der Histone ist noch sehr wenig bekannt.

Methodischer Schwerpunkt: FCS

3.1 Einleitung

FCS (Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie) ist eine etablierte Methode zur Analyse frei beweglicher Moleküle in Lösung. Fluoreszierende Teilchen diffundieren durch Brownsche Molekularbewegung in und aus einem räumlich begrenzten Beobachtungsvolumen, das durch einen stark fokussierten Laserstrahl ausgeleuchtet wird (Abb. 3.1). Das von den Farbstoffen emittierte Fluoreszenzlicht wird von der gleichen Optik gesammelt und kontinuierlich detektiert; man erhält Intensitätsfluktuationen, die hydrodynamische und photophysikalische Eigenschaften der fluoreszierenden Teilchen widerspiegeln. Während die Fluktuationsamplitude von der Konzentration und Helligkeit der Teilchen abhängt, enthält ihre Frequenz typische Zeitkonstanten, die mit der Diffusionszeit der Moleküle, aber auch der charakteristischen Emissionskinetik der angeregten Fluorophore zusammenhängt. Zur Analyse wird das fluktuierende Signal zeitlich korreliert (Abb. 3.2). Physikalische Parameter können dann durch Anpassung von theoretischen Modellfunktionen an die Autokorrelationskurven extrahiert werden.

Obwohl das Konzept schon lange bekannt ist (Elson und Magde, 1974; Magde et al., 1974; Webb, 1976), haben in den letzten Jahren vor allem zwei technische Entwicklungen zu einer breiteren Anwendung geführt: der Einsatz von Objektiven mit hoher numerischer Apertur, die ein

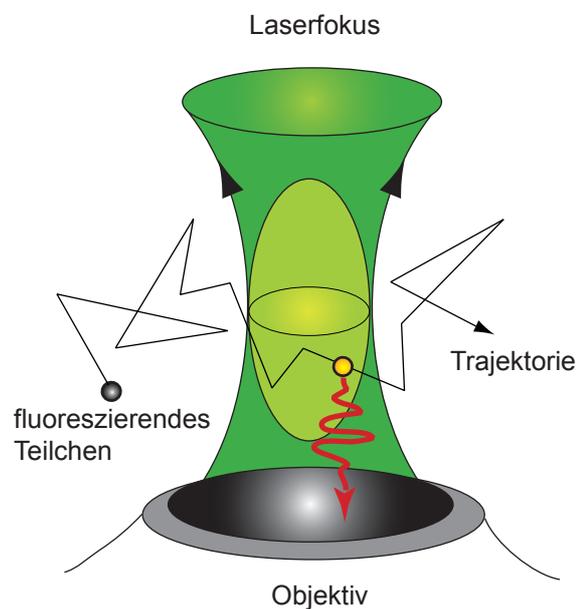


Abbildung 3.1 Diffundierende fluoreszierende Moleküle bewegen sich statistisch in einem ausgeleuchteten Raumbereich mikroskopischer Größe. Die Teilchen emittieren im beleuchteten Abschnitt ihrer Trajektorie Fluoreszenzphotonen, die über die gleiche Optik detektiert werden.

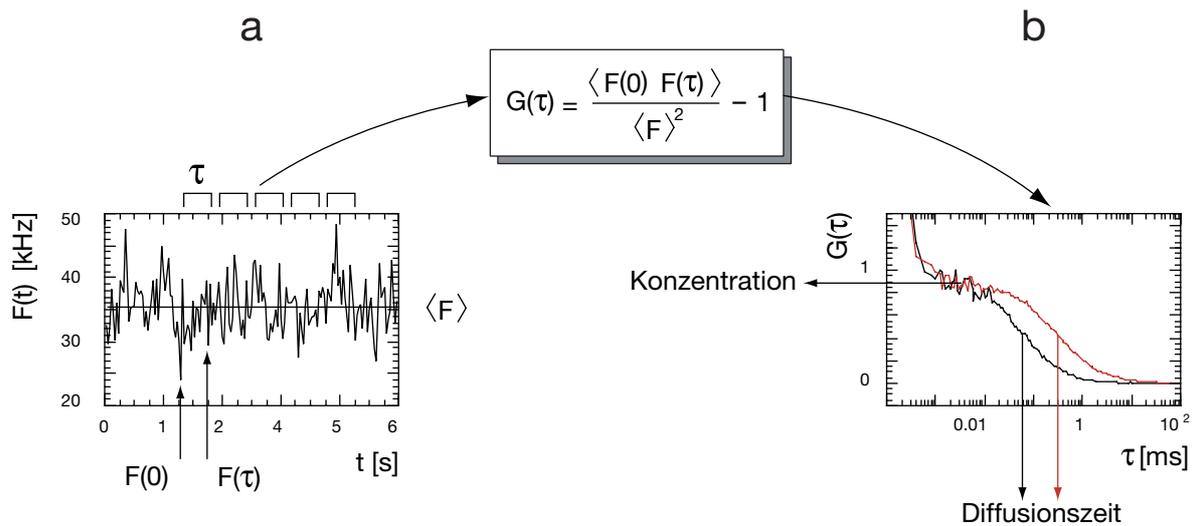


Abbildung 3.2 Autokorrelation. (a) Als Signal in der FCS werden Intensitätsfluktuationen diskret über die Zeit aufgenommen und einer Elektronik zugeführt, die alle um τ versetzten Kanäle des Zeitlaufs multipliziert und mittelt. Trägt man diese Produkte gegen den zeitlichen Versatz τ auf, so entstehen Autokorrelationskurven, wie sie in (b) dargestellt sind. In Schwarz, gemessene Kurven eines kleinen Farbstoffs (TexasRed™), und in Rot die damit markierten Mononukleosomen, deren Kurve nach rechts zu längeren Diffusionszeiten verschoben ist. Der Achsenabschnitt, die Amplitude (hier auf 1 normalisiert), hängt linear von der Konzentration ab.

beugungsbegrenzt kleines Beleuchtungsprofil erzeugen (Qian und Elson, 1991), sowie die Detektion des Signals mit Avalanche-Photodioden, die im roten Bereich eine etwa zehnfach höhere Sensitivität besitzen als gängige Photomultiplier (Rigler et al., 1993).

Die Methode profitiert von der hohen Selektivität des Fluoreszenzsignals, kombiniert mit einer hohen Sensitivität seiner Detektion in einem räumlich sehr kleinen, positionierbaren Volumen. Aufgrund der mikroskopischen Abmessung des Beobachtungsvolumens von unter einem Femtoliter (das entspricht etwa einem Volumen von $1 \times 0.3 \times 0.3 \mu\text{m}$) beobachtet man bei einer 1 nM Lösung durchschnittlich weniger als ein Teilchen. FCS gilt daher als eine Einzelmolekültechnik, denn einzelne *zeitabhängige* Zustände der Moleküle können als unterschiedliche Populationen aufgelöst werden, d.h. es wird nicht wie bei herkömmlicher Fluoreszenzspektroskopie über das ganze Ensemble gemittelt (Rigler et al., 1992). Der Zeitbereich, in dem diese Zustände aufgelöst werden können, reicht von wenigen μs bis viele Sekunden.

Biologisch noch wichtiger erscheint die Möglichkeit der Beobachtung fluoreszierender Moleküle in lebenden Zellen (Berland et al., 1995; Brock und Jovin, 1998; Schwille et al., 1999; Wachsmuth et al., 2000). FCS erfolgt nicht-invasiv und schonend für die biologische Probe, denn aufgrund der hohen Detektionsempfindlichkeit kann die Anregung der Fluorophore mit relativ niedriger Intensität erfolgen. Sowohl in ein und derselben Lösung als auch in einer einzigen Zelle kann über längere Zeiträume gemessen werden. Auch ist die Probe während des Experiments zugänglich, was eine wiederholte Manipulation erlaubt: Die Lösung kann zwischen den einzelnen Messungen, die einigen Sekunden bis Minuten dauern, bequem titriert, oder in das Kulturmedium von Zellen können Substanzen appliziert werden.

Eine wichtige Erweiterung besteht in der gleichzeitigen Anregung und Detektion in zwei spektral voneinander getrennten Kanälen (Ricka und Binkert, 1989; Schwille et al., 1997). Ein Zwei-Kanal-Aufbau ermöglicht die simultane Beobachtung verschiedenfarbig markierter Populationen von Teilchen über Autokorrelation. Wie in Abb. 3.4 dargestellt, kann nun das Signal beider Kanäle auch über Kreuz korreliert werden (Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie, FCCS). Zur Kreuzkorrelation tragen nur Teilchen bei, die in beiden Kanälen gleichzeitig ein Signal geben, d.h. die beide Farben gleichzeitig durch das Beobachtungsvolumen tragen. Die Kreuzkorrelationsamplitude ist ein Maß für den Anteil zweifarbig diffundierender Teilchen in Lösung und kann für Bindungsstudien ausgenutzt werden. Mit FCCS wurde qualitativ und quantitativ die Hybridisierung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente nachgewiesen (Kettling et al., 1998; Koltermann et al., 1998; Rigler et al., 1998). Auch konnte die Bindung eines Enhancerproteinkomplexes an zwei verschiedenfarbige DNA-Stränge quantitativ charakterisiert werden (Rippe, 2000).

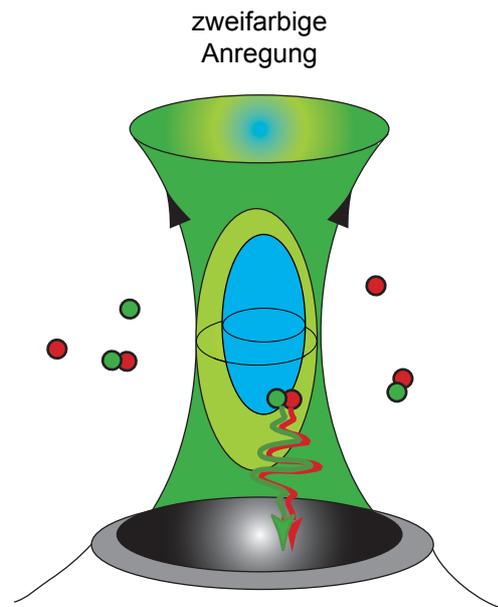


Abbildung 3.3 Zwei-Farben-FCS. Anregung verschiedener Farbstoffe mit zwei verschiedenen Laserlinien erlaubt die simultane Detektion der einzelnen Farbkanäle, wie auch eine Korrelation der Signale „über Kreuz“; dabei tragen nur Teilchen bei, die beide Sorten von Fluorophoren tragen.

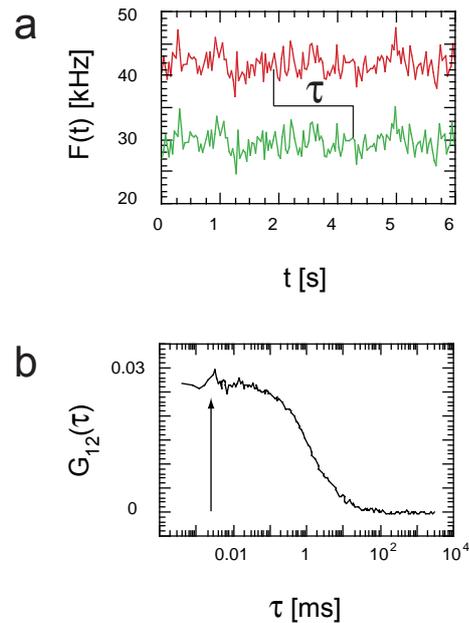
Interaktionen zwischen kleinen Liganden und Rezeptoren sind von allgemeinem Interesse in der Biochemie. Der Bindungszustand von zwei Komponenten in Lösung ist im Gleichgewicht durch die Dissoziationskonstante K_{diss} festgelegt, welche mit der freien Bindungsenergie ΔG über $K_{\text{diss}} = e^{\Delta G/RT}$ verknüpft ist. Um diese thermodynamischen Größen in freier Lösung zu bestimmen, werden traditionell molekulare Eigenschaften ausgenutzt, wie z.B. Absorption, Fluoreszenzintensität, Fluoreszenzdepolarisation und Zirkulardichroismus. Bei diesen Methoden ist es aber nicht selbstverständlich, daß sich das Signal bei fortschreitender Bindung verändert, und selbst wenn das der Fall ist, braucht man für eine Titration relativ große Mengen an Substanz. Zudem sind Dissoziationskonstanten kleiner als 10^{-8} M (relativ starke Bindungen) aufgrund technisch bedingter Nachweisgrenzen schwierig zu charakterisieren¹. Mit FCS dagegen, kann man Teilchen noch in pikomolaren Konzentrationen messen, und für viele molekularbiologische Systeme, z.B. Protein-DNA-Wechselwirkungen, liegt K_{diss} in diesem Bereich.

1. Der Konzentrationsbereich, in dem das Gleichgewicht gut meßbar ist, entspricht in etwa dem Wert von K_{diss} .

Abbildung 3.4 Kreuzkorrelation.

(a) Im dualen Aufnahmemodus werden die Intensitätsfluktuationen beider Farbkanäle simultan aufgezeichnet (farblich mit rot und grün gekennzeichnet). Dies erlaubt die Kreuzkorrelation von beiden Kanälen nach dem gleichen technischen Prinzip wie in Abb. 3.2 erläutert. Nur synchrone Intensitätspeaks beider Farben tragen zur Amplitude bei.

(b) Gemessene Kreuzkorrelationsfunktion $G_{12}(\tau)$ einer zweifarbig markierten Nukleosomenkette (4-7mere). Mischt man zwei verschiedenfarbige Populationen, so ist die Amplitude zunächst Null und wächst mit fortschreitendem Austausch der Farbstoffe, d.h. einem zunehmendem Anteil zweifarbiger Teilchen in der Lösung an (Pfeil).



Auf der anderen Seite wird die quantitative Analyse von Korrelationsamplituden durch eine Reihe physikalischer Einflüsse schnell kompliziert und erfordert vom biochemisch orientierten Anwender eine genaue Bestimmung dieser Randeffekte, siehe z.B. (Thompson, 1991; Widengren et al., 1995; Widengren und Rigler, 1998). Daher wurde in dieser Arbeit zunächst in recht allgemeiner Weise geklärt, wie sich molekulare Parameter, aber auch die technische Realisierung des Meßaufbaus auf die Korrelationsamplituden auswirken. Als Ergebnis werden hier zwei neue Methoden theoretisch beschrieben: Erstens, die Charakterisierung eines synthetischen Markierungsansatzes mit Ein-Farben-FCS und zweitens, die Analyse zweikomponentiger Bindungsreaktionen mit Zwei-Farben-FCS (Weidemann et al., 2002). Eine Grundlage für einen einheitlichen Formalismus für Auto- und Kreuzkorrelation wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Michael Tewes bereits vorgelegt (Tewes, 1998). Anwendung der Ergebnisse erfolgte mit der Fragestellung, ob zwischen isolierten Chromatinfragmenten in Lösung Histone ausgetauscht werden oder nicht.

In einem weiteren Schritt wurde methodisch auf intrazelluläre Messungen erweitert. An monoklonalen, transformierten Zelllinien wurde die Verteilung und Beweglichkeit autofluoreszierender Histon-Fusionsproteine mit FFM (Fluoreszenzfluktuationsmikroskopie, FFM) untersucht. FFM kombiniert FCS mit Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) im gleichen optischen Strahlengang. Ein solcher Aufbau wurde in Erweiterung des bestehenden FCS-Moduls im Rahmen der Doktorarbeit von Malte Wachsmuth etabliert (Wachsmuth, 2001). Ursprünglich dazu gedacht, mit hoher Ortsauflösung über FCS dynamische Eigenschaften fluoreszenzmarkierter Teilchen in der Zelle zu charakterisieren, wird hier eine Möglichkeit vorgestellt, die Intensitätsverteilungen konfokaler Bilder auf absolute Konzentrationen fluoreszenzmarkierter Teilchen zu kalibrieren. Die technische Realisierung und die theoretischen Grundlagen der Vorgehensweise werden im folgenden dargestellt.

3.2 Technische Realisierung von Zwei-Farben-FCS

Einen Überblick über die Komponenten des verwendeten Aufbaus gibt Abb. 3.5. Das Licht eines Argon-Krypton-Lasers mit den Linien 488 und 568 nm (Omnichrome 643-50YB, *Melles Griot*, Bensheim) wird über eine Monomodenfaser in das FCS-Modul eingekoppelt. Das durch einen dichroitischen Excitations-Spiegel reflektierte Strahlenbündel wurde im alten Zwei-Kanal-Aufbau von Michael Tewes direkt über den Videoeingang in das Mikroskop (IX-70, *Olympus*) eingekoppelt und in der Probe fokussiert (Tewes, 1998). Bei der Erweiterung zum FFM befindet sich zwischen FCS-Modul und Mikroskop noch eine Scaneinheit mit einem Paar ansteuerbarer Spiegel, die bei einer FCS-Messung fixiert werden (Wachsmuth, 2001). Das von der Probe emittierte längerwellige Fluoreszenzlicht wird vom Objektiv (UPlanApo60x/1.2W, *Olympus*) gesammelt, passiert in umgekehrter Richtung die optischen Elemente des Mikroskops und trifft wieder auf den dichroitischen Excitations-Spiegel. Dieser ist so gewählt, daß das Anregungslicht reflektiert und das längerwellige Fluoreszenzlicht transmittiert wird. Anregung mit zwei Linien erfordert daher zwei reflektierende und zwei transmittierende Bänder. Das Fluoreszenzlicht wird durch einen zweiten detektorseitigen dichroitischen Spiegel und Emissionsfilter in seine spektralen Anteile zerlegt. Die Lochblende wird durch Linsen auf die sensitiven Flächen der beiden Photodioden abgebildet.

Der Aufbau ist konfokal angelegt. Das Anregungslicht wird an der Austrittsöffnung der Faser durch einen Kollimator parallelisiert und durch eine Linse in einer Zwischenbildebene fokussiert. Diese Linse, ein Achromat, ist am Modul in allen drei Raumrichtungen justierbar, wodurch die Position ihres Brennpunkts, und damit des beleuchteten Volumens in der Probe relativ zum Bild der Lochblende definiert wird. Die Lochblende selbst ist hier durch die Bauweise des FCS-Moduls festgelegt. Bei idealer konfokaler Justage wird das Beleuchtungsprofil in der Lösung koaxial symmetrisch auf die Lochblende und damit auf die Detektoren abgebildet. Die Lochblende mit einem Durchmesser von 50 μm unterdrückt Streu- oder Fluoreszenzlicht, das außerhalb des beleuchteten Volumens in der Probe entsteht.

Die Fluoreszenzphotonen erzeugen am Detektor einen elektronischen Impuls mit einer Quantenausbeute von bis zu 60% bei 550 nm. Das Signal wird über Koaxialkabel einer PC-kompatiblen Korrelatorkarte (*ALV-Laser*, Langen) zugeführt und die Korrelationsfunktionen werden in Echtzeit abgespeichert. Der Verlauf der Messung kann mit einer Windows-basierten Software gesteuert und beobachtet werden. Es können die einzelnen Kanäle sowie die Meßmodi, Auto- oder Kreuzkorrelation, gewählt werden. Während der Messung werden die Intensitätsfluktuationen in kHz und die Korrelationsfunktionen der einzelnen Meßläufe angezeigt. Die Rohdaten stehen aber nicht zur Verfügung, sondern die einzelnen diskreten Zeitkanäle werden über alle Läufe gemittelt. Dagegen speichert das Programm die Korrelationsfunktionen der einzelnen Läufe sowie die gemittelte Funktion aller Läufe in einzelne Spalten eines Textdokuments.

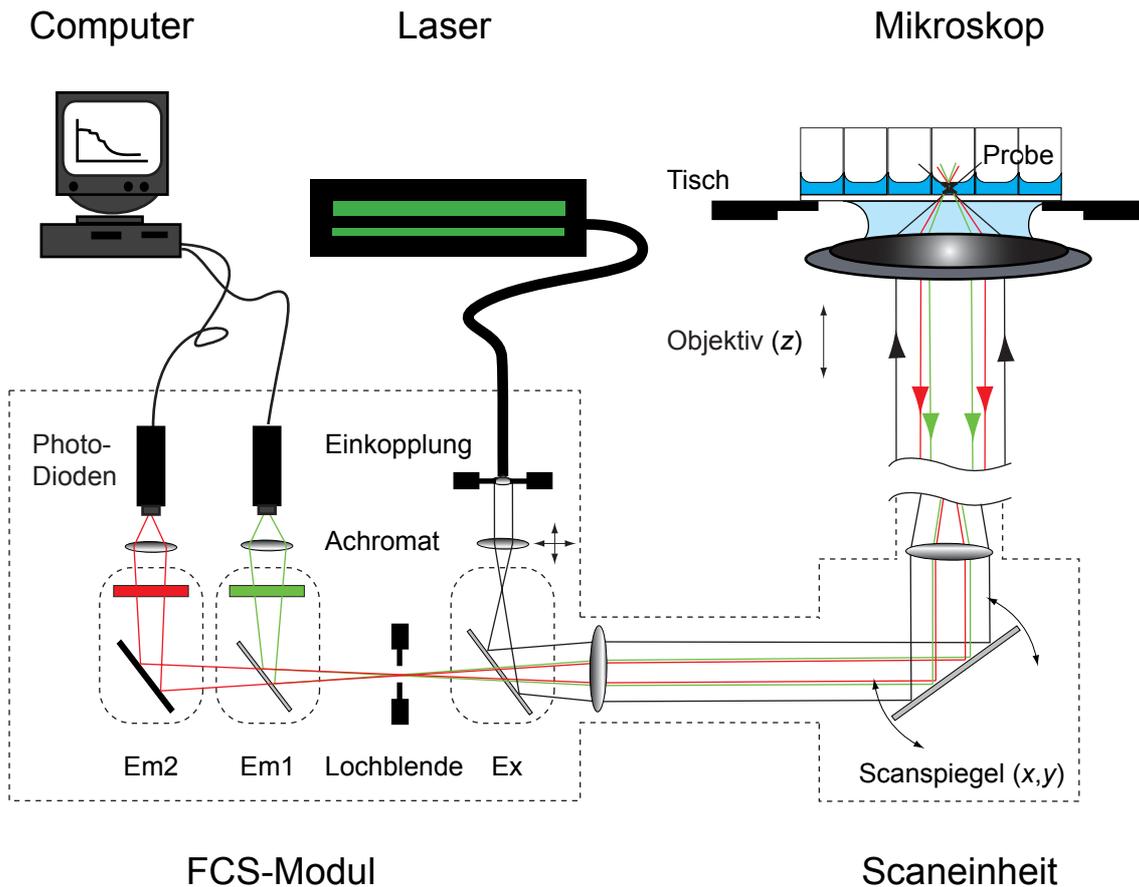


Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau des FFM. Der Strahlengang und die Komponenten sind im Text erläutert. Die Abbildung hebt Elemente hervor, die für den Anwender während des Experiments relevant sind. Anregung erfolgt über einen Laser, dessen Leistung reguliert werden kann. Am FCS-Modul sind drei Filterhalter (Em1, Em2, Ex) angedeutet, die das Gerät durch Austausch optischer Elemente auf die spektralen Eigenschaften der Fluorophore anpassen. Konfokale Justage erfolgt am Achromat durch Stellschrauben. Die Lösungen oder die Zellen werden mit einem handelsüblichen inversen Mikroskop mit Wasserimmersionsobjektiv auf einem gekammerten Deckglas beobachtet. Vom PC aus kann der Fokus in der Probe positioniert werden, transversal über die Scaneinheit (x,y) und axial über den automatischen Objektivtrieb (z). FCS oder Bildnahme erfolgt ebenfalls software-gesteuert über das Mikroskopprogramm *FFM* (Wachsmuth, 2001).

Die verwendeten Filtersätze und Strahlteiler werden in (Tewes, 1998) beschrieben. Der Wellenlängenbereich für die Detektion wird hauptsächlich durch die Emissionsfilter bestimmt, und diese wurden für alle hier beschriebenen Experimente beibehalten. Der Wellenlängenbereich, außerhalb dessen die Transmission unter 50% fällt, wird dort mit 518-540 nm für Kanal 1 und mit 612-660 nm für Kanal 2 angegeben. Dagegen wurde je nach Anforderung der Anregungsfiltersatz gewechselt, so daß wahlweise mit beiden Linien (488 nm und 568 nm) oder mit nur mit 488 nm angeregt wurde.

3.3 Theoretische Grundlagen der FCS

3.3.1 Das Fluoreszenzsignal

Die gemessene Lichtintensität eines jeden Fluoreszenzexperimentes ist das Ergebnis von Absorption, elektronischer An- und Abregung des Fluorophors in Lösung sowie der Detektion der dabei emittierten Photonen. Jeder Teilprozess dieser Abfolge wird durch charakteristische Größen der optischen Komponenten des Aufbaus und die photophysikalischen Eigenschaften der fluoreszierenden Teilchen bestimmt. Zur besseren Übersicht werden diese Abhängigkeiten hier in spektrale und räumliche Anteile aufgeteilt: Das Beleuchtungsprofil ist das Produkt von Laserleistung P_i mit den Abbildungseigenschaften des optischen Systems, der $PSF_i(\vec{r})$ (point spread function, PSF). Die $PSF_i(\vec{r})$ ist ihrerseits das Ergebnis einer Überlagerung des Strahlprofils an der Eingangsapertur des FCS-Moduls mit den Transformationseigenschaften der Mikroskopoptik. Die zwei diskreten Anregungslinien werden im folgenden mit dem Index ($i = 1, 2$) bezeichnet. Einzelne Fluorophore lassen sich anhand ihrer Extinktionskoeffizienten $\varepsilon(\lambda_{\text{ex},i})$ und Emissionsspektren $q(\lambda_{\text{em}})$ charakterisieren, wobei man letztere als die differentielle Wahrscheinlichkeit ansehen kann, ein Photon mit der Wellenlänge λ_{em} zu emittieren.

Die Wahrscheinlichkeit, von einem Fluorophor am Ort \vec{r} im Probenvolumen ein Photon in Kanal j zu detektieren, wird als $GTF_j(\vec{r})$ (geometrische Transmissionsfunktion, GTF) bezeichnet. Mit $STF_j(\vec{r})$ (spektrale Transmissionsfunktion, STF) berücksichtigt man dagegen alle spektralen Eigenschaften, wie Filter, Detektoren, usw. Der Photonenfluß, der von einem einzelnen Fluorophor am Ort \vec{r} im Detektor j erzeugt wird, setzt sich aus den genannten Größen gemäß

$$f_j(\vec{r}) = \underbrace{P_i \cdot PSF_i(\vec{r}) \cdot \varepsilon(\lambda_{\text{ex},i})}_{\text{Anregung}} \cdot \underbrace{GTF_j(\vec{r}) \cdot \int q_j(\lambda_{\text{em}}) \cdot STF_j(\vec{r}) d\lambda_{\text{em}}}_{\text{Emission, Detektion}} \quad (1)$$

zusammen; dabei wird eine lineare Abhängigkeit der einzelnen Komponenten vorausgesetzt, was bei Leistungsdichten von wenigen kW cm^{-2} normalerweise gegeben ist. Zur Vereinfachung der Ausdrücke kann man die *Farbmatrix* $\sigma_{ij} = \varepsilon(\lambda_{\text{ex},i}) \cdot \int q_j(\lambda_{\text{em}}) \cdot STF_j(\vec{r}) d\lambda_{\text{em}}$ einführen. Die verbleibenden ortsabhängigen Funktionen definieren das Beobachtungsvolumen $\Psi_{ij}(\vec{r}) = PSF_i(\vec{r}) \cdot GTF_j(\vec{r})$, und ihr Produkt wird deshalb als *Detektionsfunktion* zusammengefaßt. Erfolgt die Anregung mit mehr als einer Wellenlänge wie bei Kreuzkorrelationsmessungen oder tragen die diffundierenden Partikel mehrere ($n_t = 1, 2, \dots$) oder verschiedene Sorten ($t = a, b, \dots$) von Fluorophoren, so muß über die einzelnen Laserlinien und Farbmatrizen summiert werden

$$f_j(\vec{r}) = \sum_i P_i \cdot \left(\sum_t n_t \sigma_{ij}^{(t)} \right) \cdot \Psi_{ij}(\vec{r}). \quad (2)$$

3.3.2 Korrelation einer Spezies

Betrachten wir ein Modellsystem von N gleichen, nicht-wechselwirkenden, frei diffundierenden fluoreszierenden Teilchen in einem Probenvolumen V . Die normalisierte Korrelationsfunktion der Fluoreszenzintensität $F_j(t)$ am Detektor j ist:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\langle F_k(0)F_l(\tau) \rangle}{\langle F_k \rangle \langle F_l \rangle} - 1 = \frac{\langle \delta F_k(0) \delta F_l(\tau) \rangle}{\langle F_k \rangle \langle F_l \rangle}. \quad (3)$$

$G_{kl}(\tau)$ trägt hier zwei Indizes für eine simultane Behandlung von Auto- ($k = l \Leftrightarrow kl = 11, 22$) und Kreuzkorrelation ($k \neq l \Leftrightarrow kl = 12 = 21$). Abweichungen vom Mittelwert werden durch ein δ gekennzeichnet. Die Variable τ ist die Verzögerungszeit, mit der die Signale korreliert werden, und eckige Klammern bedeuten eine Mittelung über die gesamte Meßzeit. Das Gesamtsignal $F_j(t)$ ist zu allen Zeiten die Summe der Beiträge aller fluoreszierenden Teilchen $F_j(t) = \sum_{n=1}^N f_j(\vec{r}_n(t))$ in Abhängigkeit ihrer Position relativ zum Fokus. Das Signal ist proportional zu Anzahl der Teilchen N_{ob} im Beobachtungsvolumen. Aus Gl. (3) wird dann

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\sum_n \langle \delta f_k(\vec{r}_n(0)) \cdot \delta f_l(\vec{r}_n(\tau)) \rangle}{\sum_n \langle f_k \rangle \sum_n \langle f_l \rangle} = \frac{N \langle \delta f_k(\vec{r}(0)) \delta f_l(\vec{r}(\tau)) \rangle}{N \langle f_k \rangle N \langle f_l \rangle} = \frac{1}{N} g_{kl}(\tau), \quad (4)$$

und $G_{kl}(\tau)$ kann auf die Korrelationsfunktion $g_{kl}(\tau)$ eines einzelnen Teilchens zurückgeführt werden. Gl. (3) und (4) implizieren zwei wichtige Eigenschaften von FCS: Erstens, die Amplitude ist umgekehrt proportional zur mittleren Anzahl der beobachteten Teilchen im Fokusbereich $G_{kl}(0) = 1 / \langle N_{\text{ob}} \rangle$. Dies sieht man leicht in Gl. (4), wenn man für die Fluktuation eines einzelnen Teilchens eine Poisson-Statistik voraussetzt mit der Relation $\langle \delta N^2 \rangle = \langle N \rangle$. Zweitens setzt sich die gesamte Korrelationskurve additiv aus den Korrelationskurven der einzelnen Teilchen zusammen; dieser Punkt ist wichtig für die analytische Behandlung von spektral unterschiedlichen Spezies in derselben Probe.

3.3.3 Korrelationsfunktionen im Ein-Farben-Aufbau

Um Diffusionskonstanten und Konzentrationen aus den Korrelationskurven zu gewinnen, wird ein analytischer Ausdruck an die gemessene Kurve angepaßt, der die gewünschten Parameter enthält. Die Korrelationsfunktionen für Translationsdiffusion und chemische Reaktionen basieren auf der Näherung, daß sich $\Psi_{ij}(\vec{r})$ als zwei- oder dreidimensionale Gaußfunktion beschreiben läßt. Diese Näherung konnte sowohl für eine Mikroskopoptik mit kleiner numerischer Apertur, als auch für Systeme am Beugungslimit, wie es hier realisiert ist, gerechtfertigt werden (Qian und Elson, 1991; Rigler et al., 1993). Die analytische Modellfunktion

$$G_{kl}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff},kl}} \left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-\frac{1}{2}} \quad (5)$$

gilt für freie Diffusion eines Teilchens in einem, gemessen am Fokus, unendlich großen Probenvolumen. τ_{diff} , die mittlere Aufenthaltsdauer des Teilchens im Fokus, ist über $\tau_{\text{diff}} \approx w_0^2/4D_t$ mit dem Translationsdiffusionskoeffizienten D_t verknüpft, und $\kappa = z_0/w_0$ kennzeichnet eine Verlängerung des Fokusbereichs V_{eff} entlang der optischen Achse (w_0 ist der Durchmesser und z_0 die Länge des Fokus, siehe Abb. 3.6 a).

In der experimentellen Praxis sind zusätzliche photophysikalisch bedingte Fluktuationen zu berücksichtigen.

Tripletzustände kleiner organisch-chemischer Fluorophore. Fluoreszenzphotonen entstehen durch eine schnelle Folge von Übergängen eines Elektrons zwischen einem Singulettzustand S1 und einem Grundzustand S0. Die Emission erfolgt in wenigen ns, daher kann das Signal bei typischen Aufenthaltsdauern im Fokus (μs bis ms) als ein kontinuierlicher Photonenfluß angesehen werden. Der Photonenfluß eines Fluorophors wird unterbrochen, wenn diese in einen Tripletzustand übergehen (intersystem crossing) oder der Fluorophor irreversibel gebleicht wird (siehe unten). Der quantenmechanisch „verbotene“ Singulett-Triplett-Übergang ist photoinduzierbar, und der Besetzungsgrad hängt daher von der Anregungsintensität ab. Tripletzustände haben Lebensdauern von einigen μs . Die Übergänge sind in der Korrelationskurve sichtbar, da dieser Zeitbereich mit FCS aufgelöst wird. Man erhält eine um $(1 - \Theta_1)^{-1}$ erhöhte Amplitude, die bei sehr kurzen Zeiten mit einer charakteristischen Zeitkonstante τ_{trip} abfällt. In der Modellfunktion kann dies mit einem Vorfaktor berücksichtigt werden (Widengren et al., 1995)

$$G_{jj}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff},kl}} \left(\frac{1 - \Theta_1 + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_{\text{trip}}}}{1 - \Theta_1} \right) \left(\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right). \quad (6)$$

Bei der Auswertung von Autokorrelationsmessungen mit dem Programm *Quickfit* (von M. Tewes, weiterentwickelt von M. Wachsmuth) wird der Achsenabschnitt der Korrelationsfunktion als „inverse Teilchenzahl“ ausgegeben. Zur Berücksichtigung von Amplitudenerhöhung durch Tripletanteile muß dieser Wert mit $(1 - \Theta_1)$ nach unten korrigiert werden.

Blinken autofluoreszenter Proteine. GFP-Mutanten gehen in Lösung in bis zu zwei nicht-strahlende Zustände über, ein Verhalten, das mit Blinken bezeichnet wird. Blinken entsteht durch Protonierungsgleichgewichte, die den Fluorophor in weitere Konformationen überführen. Die alternativen Konformationen besitzen verschobene Excitationsspektren und sind dann mit 488 nm nicht mehr anregbar, d.h. die Zustände erscheinen dunkel. Die entsprechenden Reaktionsraten führen zu Lebensdauern von einigen 1-100 μs und variieren stark in Abhängigkeit vom

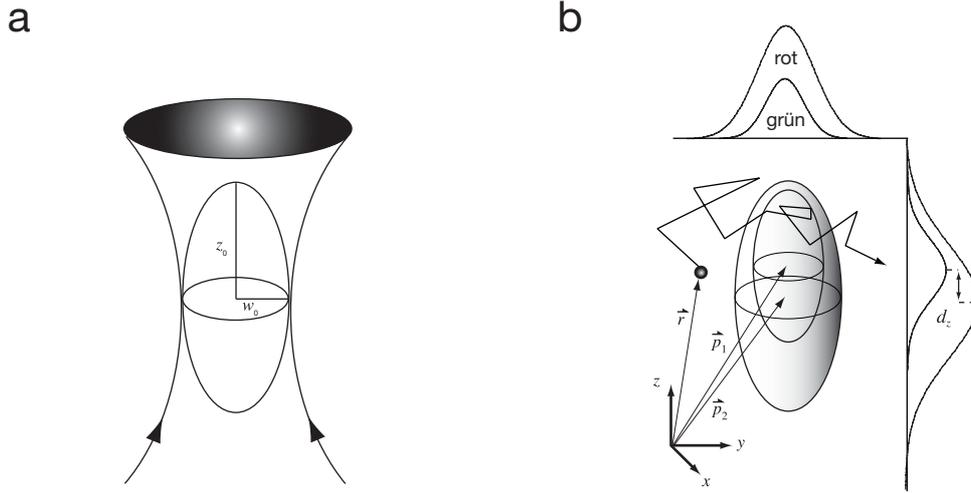


Abbildung 3.6 Fokusgeometrie.

(a) In einem konfokalen Aufbau mit hoher numerischer Apertur kann die Detektionsfunktion durch eine dreidimensionale Gaußfunktion mit $1/e^2$ -Radien w_0 transversal und z_0 axial zur optischen Achse, beschrieben werden.

(b) Die Positionen der Zentren der beiden Foki eines Zwei-Farben-Aufbaus \vec{p}_1 (grün) und \vec{p}_2 (rot) können einen chromatischen Versatz \vec{d} aufweisen, der hier exemplarisch in der z -Richtung dargestellt wurde.

pH, dem Ionengehalt der Lösung (Haupts et al., 1998), aber auch der Anregungsintensität (Schwille et al., 2000). Die Photophysik der Fluorophore ist komplex. Die Behandlung der Korrelationsfunktionen für diesen Fall ist in der Literatur nicht einheitlich. Beide oben genannten Publikationen werten die Amplituden in strenger Analogie zur Triplettbesetzung aus, lediglich in Erweiterung mit einer zusätzlichen nichtstrahlenden Komponente. Dem widerspricht ein Ergebnis von (Widengren und Rigler, 1998). Hier wurde der Einfluß chemischer Reaktionen auf die Korrelationsfunktion unter zwei Voraussetzungen abgeleitet: (1.) Diffusion des Fluorophors ist viel langsamer als die Reaktionsraten; (2.) die Diffusionszeit verändert sich nicht bei der Bindung der reagierenden Komponenten. Die Protonierung von GFP wird dabei explizit diskutiert. Als Ergebnis wird

$$G_{jj}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff},kl}} (1 - \Theta_1 + \Theta_1 e^{-\tau/\tau_1} - \Theta_2 + \Theta_2 e^{-\tau/\tau_2}) \left(\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{\text{diff}}}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{\text{diff}}}\right)^{-\frac{1}{2}} \right) \quad (7)$$

angegeben. Für $\tau = 0$ wird der Vorfaktor zu 1, d.h. der Achsenabschnitt der Korrelationsfunktion repräsentiert hier direkt die reziproke Anzahl der Fluorophore im Beobachtungsvolumen.

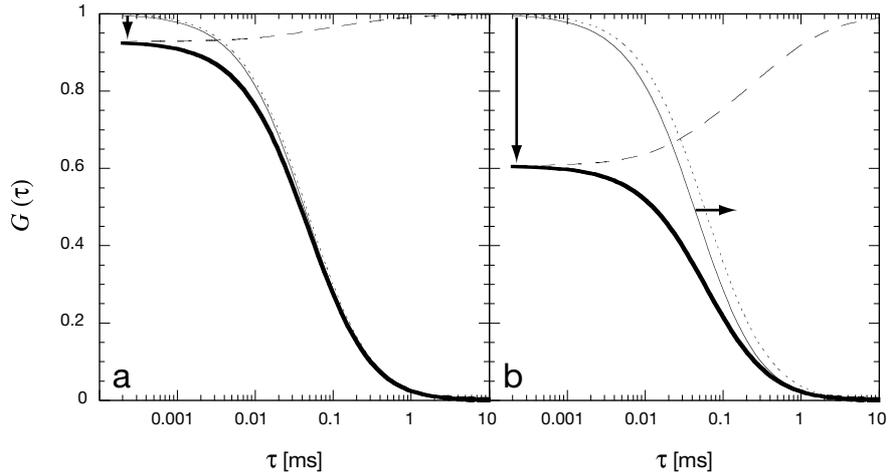


Abbildung 3.7 Kreuzkorrelationsfunktionen bei zweifarbigem Anregung. Berechnete Kurve für eine ~ 10 nM Lösung von zweifarbigem Teilchen der Größe von Fluoreszein ($D_t = 2.6 \cdot 10^{-10}$) über Gl.(5), mit $w_0 = 220$ nm und $z_0 = 660$ nm (dünne Linie). Chromatischer Versatz von $|\vec{d}_{x,y}| = 50$ nm und $|\vec{d}_z| = 100$ nm (a) und von $|\vec{d}_{x,y}| = 110$ nm und $|\vec{d}_z| = 330$ nm (b) führt zu einem τ -abhängigen Faktor (gestrichelte Linie) in Gl. (6). Die Amplitude einer gemessenen Korrelationsfunktion (fette Linie) wird reduziert (senkrechte Pfeile), und dieselbe Kurve wurde nochmals auf 1 normalisiert dargestellt (gepunktete Linie), um die Verlängerung einer scheinbaren Diffusionszeit zu visualisieren (waagrechte Pfeile), die man durch Anpassen von Gl. (5) erhält.

3.3.4 Korrelationsfunktion im Zwei-Farben-Aufbau

In einem Zwei-Farben-Aufbau müssen zusätzliche Aspekte berücksichtigt werden. Zunächst haben die Beobachtungsvolumina beider Kanäle unterschiedliche Größe. Die linearen Abmessungen sind in erster Näherung proportional zur Anregungswellenlänge, was für die hier verwendeten Laserlinien mit 488 nm und 568 nm einen Faktor von 1.58 für die Volumina ergibt. Zweitens können die Zentren der Foki axial oder transversal gegeneinander versetzt sein (Abb. 3.6), was den Detektionsbereich für zweifarbigem Teilchen reduziert. In der Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) wurde ein solcher Versatz an einem gut justierten Gerät mit 50 bis 100 nm quantifiziert; je nach Fokustiefe in der biologischen Probe ist dieser noch größer². Der Versatz liegt also in der Größenordnung der Strahltaile und ist daher nicht vernachlässigbar. Eine stringente Behandlung der Geometrie führt zu einer analytischen Korrektur der Korrelationsfunktion für ein Teilchen im Zwei-Kanal-System:

$$G_{kl}(\tau) = \frac{1}{cV_{\text{eff},kl}} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{0,\text{eff}}^2}\right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{z_{0,\text{eff}}^2}\right)^{-\frac{1}{2}} \exp\left(\frac{d_x^2 + d_y^2}{4D\tau + w_{0,\text{eff}}^2} - \frac{d_z^2}{4D\tau + z_{0,\text{eff}}^2}\right), \quad (8)$$

2. PD Dr. M. Hausmann, Kirchhoff-Institut für Physik, Heidelberg, persönliche Mitteilung

wobei $\vec{d} = \vec{p}_k - \vec{p}_l$ der Verbindungsvektor zwischen den Zentren der Foki der einzelnen Anregungslinien (\vec{p}_l, \vec{p}_k) und $w_{0,\text{eff}}^2 = (w_{0k}^2 + w_{0l}^2)/2$ und $z_{0,\text{eff}}^2 = (z_{0k}^2 + z_{0l}^2)/2$ die $1/e^2$ -Radien der Gaußprofile senkrecht und parallel zur optischen Achse definieren. Das Beobachtungsvolumen $V_{\text{eff},kl} = \pi^{3/2} w_{0k} w_{0l} (z_{0k} z_{0l})^{1/2}$ ist abgesehen von einem Faktor 1.4 das Volumen eines Rotationellipsoids, mit w_0 und z_0 als Halbachsen, der in Abb. 3.6 a als Beobachtungsvolumen dargestellt ist. Für Autokorrelation ($\vec{d} = 0$) verschwindet der exponentielle Term und die Funktion erscheint in ihrer gewohnten Gestalt. Für Kreuzkorrelation führt chromatischer Versatz zu einer deutlichen Reduktion der Amplitude und einem leicht verlangsamten Abfall der Kurve, d.h. bei Anpassung mit Gl. (5) zu einer scheinbar verlangsamten Diffusionszeit (Abb. 3.7).

3.3.5 Korrelationen mehrerer Spezies

In Lösung befindliche Teilchen können sich in ihren hydrodynamischen Eigenschaften und ihrer molekularen Helligkeit unterscheiden. Die Ein-Komponenten-Modellfunktion basiert auf der Voraussetzung, daß sich das System im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und die Teilchen untereinander nicht wechselwirken. Letzteres muß überdacht werden, wenn man chemische Reaktionen oder die Bindung zweier Komponenten mit FCS studiert. Eine reversible Assoziation der Reaktionspartner



enthält eine Einschränkung: Die mittlere Lebensdauer des Komplexes sollte deutlich länger sein als seine mittlere Aufenthaltsdauer im Beobachtungsvolumen, die Diffusionszeit ($1/k_2 \gg \tau_{\text{diff}}$). In diesem Fall wird eine Dissoziation während der Beobachtung unwahrscheinlich sein, und das gleiche gilt für die Komplexbildung. Ist diese Bedingung nicht erfüllt, wird die analytische Behandlung sehr kompliziert (Lamb et al., 2000). In Analogie zur Herleitung von Gl. (4) kann die Korrelationsfunktion einer Mischung als die mit ihren mittleren Intensitäten gewichtete Summe der einzelnen spektral unterschiedlichen Spezies ($s = 1, 2, \dots$), geschrieben werden

$$G_{kl}(\tau) = \frac{\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_k^{(s)} \tilde{F}_l^{(s)} \tilde{G}_{kl}^{(s)}(\tau)}{\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_k^{(s)} \sum_s c^{(s)} \tilde{F}_l^{(s)}} = G_{kl}(0) V_{\text{eff},kl} \sum_s \rho^{(s)} \tilde{G}_{kl}^{(s)}(\tau). \quad (10)$$

Um die Konzentrationsabhängigkeit herauszustellen, wurde hier die *charakteristische Intensität* $\tilde{F}_j^{(s)} = \langle F_k^{(s)} \rangle / c^{(s)}$ und die *charakteristische Korrelationsfunktion* $\tilde{G}_{kl}^{(s)}(\tau) = c^{(s)} G_{kl}^{(s)}(\tau)$ einer jeden Spezies eingeführt, die der molekularen Helligkeit und Korrelationsfunktion einer einmolaren 1 M = 1 mol/l Lösung entsprechen.

Da $\tilde{G}_{kl}^{(s)}(\tau)$, $\tilde{F}_k^{(s)}$ und $\tilde{F}_l^{(s)}$ durch Messung an isolierten Proben zugänglich sind, kann ein System von drei spektral unterschiedlichen Spezies durch Aufnahme von zwei Auto- und einer Kreuzkorrelation bestimmt werden, selbst wenn sich die Teilchen in ihrer Diffusionszeit nicht unterscheiden. Dies erhöht die normale Auflösung von Ein-Farben-FCS, bei der höchstens drei Komponenten anhand unterschiedlicher Diffusionszeiten diskriminiert werden können (Meseth et al., 1999). In der Praxis erfolgt die Unterscheidung verschieden schnell diffundierender Teilchen durch Anpassung der rechten Seite von Gl. (10) mit $s = 3$ an die gemessene Korrelationsfunktion. Dabei repräsentiert $\rho^{(s)}$ direkt die Konzentrationen der Subspezies, gemäß $c^{(s)} = \rho^{(s)} c$. Unterscheiden sich die drei Spezies in ihrer molekularen Helligkeit, so müssen Abweichungen berücksichtigt werden (siehe unten).

Mit Ein-Farben-FCS kann die Diffusionszeit oder die Amplitude als Observable für eine Bindungsreaktion herangezogen werden. Zwei Aspekte sind dabei limitierend: Die Diffusionszeiten hängen recht schwach von der molekularen Größe ab; für globuläre Proteine z.B. ist $\tau_{\text{diff}} \propto M^{1/3}$. Zweitens, obwohl sich die Amplitude und die Teilchenkonzentration über viele Größenordnungen linear messen läßt, spiegelt das Signal nicht nur die mittlere Anzahl der beobachteten Teilchen wieder, sondern auch Fluoreszenzlöschung, photophysikalische Übergänge in nicht-strahlende Zustände und Multimerisierung der Fluorophore; alles Prozesse, die aufgrund ihrer Nichtlinearität schwer zu quantifizieren sind. Bei einem Kreuzkorrelationsexperiment jedoch werden idealerweise Rezeptor und Ligand in unterschiedlichen Farben markiert, und die Amplitude wird bei konstanten experimentellen Bedingungen linear vom Anteil der Teilchen bestimmt, die beide Fluorophore gleichzeitig durchs Beobachtungsvolumen tragen (siehe unten).

3.3.6 Einfluß von Fluoreszenzlöschung

Die Quantenausbeute der Fluorophore wird häufig durch die lokale molekulare Umgebung beeinflusst. Wenn organische Farbstoffe mit einem Protein oder einem DNA-Fragment synthetisch verknüpft werden, wird in der Regel ein hoher Überschuß von reaktivem Farbstoff appliziert. Obwohl an Markierungsprotokolle in der Regel eine Reihe extensiver Aufreinigungsschritte angeschlossen werden, können Reste ungebundenen Farbstoffs durchaus noch detektierbar sein. Die meisten Protokolle sind nicht für die hohe Sensitivität der FCS ausgelegt. Ist der Farbstoff im gebundenen Zustand gelöscht oder verstärkt, so erhält man ein Gemisch verschieden heller Fluorophore. Fluoreszenzlöschung kann auch durch nicht-kovalente Bindung oder molekularen Austausch von markierten Untereinheiten entstehen. In allen Fällen erhält man Gemische von Spezies, die in einem definierten, nicht aber zwangsläufig ganzzahligen Verhältnis ihrer Quantenausbeute stehen.

Da in Gl. (10) die Beiträge der einzelnen Spezies mit ihren charakteristischen Intensitäten gewichtet werden, repräsentiert die Amplitude der Korrelationsfunktion nicht mehr exakt die mittlere Anzahl der Teilchen im Fokusvolumen. Bezieht man die charakteristischen Intensitäten auf einen willkürlichen Standard $\tilde{F}_j^{(s)} = \eta_j^{(s)} \tilde{F}_k^{(0)}$, z.B. den ungebundenen Farbstoff, so ist die Amplitude gegenüber einer einheitlichen Lösung gleicher Gesamtkonzentration an Fluorophor erhöht (Thompson, 1991; Widengren und Rigler, 1998).

$$G_{kl}(0) = \frac{1}{cV_{\text{eff},kl}} \frac{\sum_s c^{(s)} \eta_k^{(s)} \eta_l^{(s)}}{\left(\sum_s c^{(s)} \eta_k^{(s)}\right) \left(\sum_s c^{(s)} \eta_l^{(s)}\right)} \quad (11)$$

Fluoreszenzlöschung und -verstärkung erscheinen in einem zweikomponentigen System symmetrisch, da in FCS relative Intensitätsfluktuationen gemessen werden (siehe Gl. (3)). Fluoreszenzlöschung von weniger als 30% ($\eta > 0.7$) erhöht die Amplitude nicht mehr als 5%, unabhängig vom relativen Verhältnis der Spezies; stärkere Effekte sind allerdings nicht selten.

Können die Spezies aufgrund ihrer Diffusionszeit unterschieden werden, z.B. ein relativ kleiner ungebundener Farbstoff von einem Makromolekül, so sind die relativen Anteile $\rho^{(s)}$, die durch Anpassung der rechten Seite von Gl. (10) mit $s = 3$ gewonnen werden, ebenfalls zugunsten der helleren Komponente verschoben. Dies kann durch Normalisierung berücksichtigt werden, so daß mit

$$\rho_{\text{kor}}^{(s)} = \frac{c^{(s)}}{\sum_s c^{(s)}} = \frac{\rho^{(s)} / \eta_k^{(s)} \eta_l^{(s)}}{\sum_s \rho^{(s)} / \eta_k^{(s)} \eta_l^{(s)}} \quad (12)$$

die wirklichen Molenbrüche der einzelnen Spezies ausgedrückt werden, indiziert mit 'kor' für korrigiert.

3.3.7 Korrektur des Untergrund-Signals

Obwohl der konfokale optische Aufbau in Kombination mit der Verwendung sensitiver Photodioden eine sehr hohes Signal-zu-Rausch-Verhältnis liefert, trägt die Dunkelzählrate der Detektoren sowie mangelhaft unterdrücktes Anregungs- und Streulicht einen nicht-korrelierten Hintergrund $U(t)$ zum Gesamtsignal der Teilchen bei: $F_{j, \text{tot}}(t) = F_j(t) + U(t)$ mit $F_j(t) = \sum_s F_j^{(s)}(t)$. Gl. (10) bewirkt eine Reduktion der Amplitude der Korrelationsfunktion und daher eine Überschätzung der Teilchenkonzentration. Der Korrekturfaktor ergibt sich leicht durch Einsetzen (Koppel, 1974)

$$G_{kl}(0) = \left(1 + \frac{\langle U_k \rangle}{\langle F_k \rangle}\right)^{-1} \left(1 + \frac{\langle U_l \rangle}{\langle F_l \rangle}\right)^{-1} \frac{1}{\langle N_{\text{ob}} \rangle}. \quad (13)$$

Bei Autokorrelationsmessungen reduziert ein Hintergrund von 5% die Amplitude um weniger als 10%. Bei Kreuzkorrelation liefert die mangelhafte Überlappung der Detektionsvolumina beider Kanäle zusätzliche Anteile nicht-korrelierter Intensität, da manche der Teilchen außerhalb des gemeinsamen Beobachtungsvolumens detektiert werden. Vernachlässigt man den Versatz, so ist

dieses Volumen in erster Näherung durch die Differenz der beiden Fokusvolumina gegeben. Schätzt man diese mit $V_{\text{eff}} \propto \lambda_{\text{ex}}^3$ ab, ergeben sich für Kreuzkorrelation nur $73\% = (568^3 - 488^3) / 568^3$ der Amplitude einer Autokorrelationsmessung, und dieser Effekt wird bei chromatiscem Versatz der Foki noch verstärkt.

3.3.8 Allgemeines zu Anregung und Detektion im Zwei-Kanal-System

FCS-Messung mit zwei Anregungs- und Detektionskanälen führt durch *Übersprechen* zu zusätzlichen „kanalfremden“ Intensitätsanteilen, die nun korreliert sind. Übersprechen zwischen den Kanälen ist eine Folge unvollkommener Passung von Kanal und Fluorophor und erzeugt im Rahmen des dargestellten Formalismus Diagonalelemente in der Farbmatrix. Dies beinhaltet sowohl Anregung mit beiden Laserlinien als auch Detektion in beiden Kanälen. Diskutieren wir zuerst Implikationen für eine Lösung, die nur einen Typ von Farbstoff enthält. Auswertung von Gl. (2) mit $n_t = 1$ durch Integration über das Probenvolumen ergibt die detektorspezifische charakteristische Intensität eines Fluorophors

$$\tilde{F}_j = \sum_i P_i \sigma_{ij} \int_V \Psi_{ij}(\vec{r}) d^3\vec{r} = \sum_i \tilde{F}_{j,i}, \quad (14)$$

die sich aus den Anteilen $\tilde{F}_{j,i}$ der Anregung mit den einzelnen Linien i zusammensetzt. Da die Anregung verschiedener Teilchen statistisch unabhängig ist, darf wieder Gl. (10) angewendet werden, und man erhält einen Ausdruck für die Korrelationsfunktion einer Spezies im Zweikanalsystem:

$$\tilde{G}_{kl}(\tau) = \frac{\sum_{ii'} \tilde{F}_{k,i} \tilde{F}_{l,i'} \tilde{G}_{kl,ii'}(\tau)}{\tilde{F}_k \tilde{F}_l}. \quad (15)$$

$\tilde{G}_{kl}(\tau)$ erscheint bereits als die Summe von vier scheinbaren Subspezies in Folge aller Anregungsmodi (11, 12, 21, 22) gewichtet mit der Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens (repräsentiert in $\tilde{F}_{j,i}$). Das Beobachtungsvolumen $V_{\text{eff},kl} = \tilde{G}_{kl}(0)$ ist also eine schon gemittelte Größe. Die scheinbaren Subspezies sind als Diffusionszeiten zwar nicht auflösbar, der Effekt kann sich aber auf die Amplituden auswirken. Man beachte, daß in den $\tilde{F}_{j,i}$ durch die Farbmatrix das Absorptionsverhalten der Fluorophore mit enthalten ist, i.e. nicht nur die spektral verschiedenen Beleuchtungsprofile, sondern auch die Wirkungsquerschnitte der Moleküle bestimmen das Beobachtungsvolumen. Es erscheint daher sinnvoll, das Fokusvolumen stets mit dem gleichen Farbstoff zu eichen.

In Kreuzkorrelationsexperimenten ist es für den unerfahrenen Anwender immer wieder überraschend, daß auch ein einzelner Fluorophor bei Übersprechen deutlich korreliert. Ist das Signal-zu-

Rausch-Verhältnis ausreichend hoch, so ist die Amplitude gleich hoch wie die eines 100%ig zweifarbig markierten Standards. Die gemessenen Korrelationskurven unterscheiden sich dann nur in ihrer Verrauschtheit. Aber: Für eine typische Bindungsstudie werden zwei Populationen von Teilchen in verschiedenen Farben, z.B. rot und grün, markiert und die Reaktion durch Mischen in Gang gesetzt. Selbst wenn beide Fluorophortypen in einzelnen Messungen eine signifikante Kreuzkorrelation zeigen, ist die charakteristische Intensität, die in den „anderen“ Kanal überspricht, in der Regel gering. Einzelne Fluorophore tragen zur Kreuzkorrelationsamplitude weniger bei als zweifarbig Komplexe. Aus diesem Grund ist die Kreuzkorrelationsamplitude einer Mischung roter und grüner Fluorophore gegenüber den einzeln gemessenen Farben deutlich reduziert (eine gleiche Konzentration an Fluorophor vorausgesetzt). Setzt nun eine sukzessive Bindung von roten und grünen Teilchen ein, so werden die charakteristischen Intensitäten der kreuzkorrelierenden Teilchen im Zähler von Gl. (10) erhöht, während der Nenner, für einen gegebenen Gehalt an Fluorophoren in der Lösung, konstant bleibt.

3.4 Statistische Verteilung von Fluorophoren

Vor jeder Bindungsstudie mit FCS wird ein zu untersuchendes Substrat fluoreszenzmarkiert. Häufig jedoch ist die Anzahl der Fluorophore am Reaktionsprodukt nicht bekannt. An Proteinen, die mit chemisch reaktiven Derivaten kleiner, organischer Fluoreszenzfarbstoffe markiert werden, sind normalerweise mehrere funktionelle Gruppen reaktiv. Auch mag die Anzahl der möglichen Bindungsstellen durch posttranslationale Modifikationen eines isolierten Proteins variieren. Zudem ist eine Sättigung der Bindungsstellen oft präparativ nicht möglich, da dann auch unspezifische Bindung an weitere funktionelle Gruppen erfolgt oder die biologische Funktionalität des Proteins zerstört wird. Markiert man ein Protein mit mehreren Bindungsstellen gleicher Affinität, so erhält man gleichartig diffundierende Teilchen, an denen ganzzahlige Vielfache von Fluorophoren statistisch gebunden sind. Abb. 3.8 illustriert, daß der gleiche Formalismus auch auf Fälle anwendbar ist, bei denen homogen markierte Monomere oligomerisieren: Interferieren die Fluorophore nicht mit der Bindung, dann erzeugt vollständige Bindung von markierten und unmarkierten Monomeren eine Binomialverteilung der Fluorophore in den Komplexen. Schließlich führt die Applikation von zwei verschiedenfarbigen Fluorophoren (Monomere) am Substrat zu einer Trinomialverteilung spektraler Klassen von Markierungsprodukten (Oligomere).

Der Einfluß statistisch verteilter Farbstoffe auf die Korrelationsfunktionen wurde in (Tewes, 1998) abgeleitet. Für ein Ensemble von Molekülen (Komplexe) mit n potentiellen Bindungsstellen (Grad der Multimerisierung), ist die Wahrscheinlichkeit, n_g Fluorophore des Typs g (grün) und n_r Fluorophore des Typs r (rot) zu finden, mit

$$P(n_g, n_r) = \binom{n}{n_g} \binom{n-n_g}{n_r} p_g^{n_g} p_r^{n_r} (1-p_g-p_r)^{n-n_g-n_r} \quad (16)$$

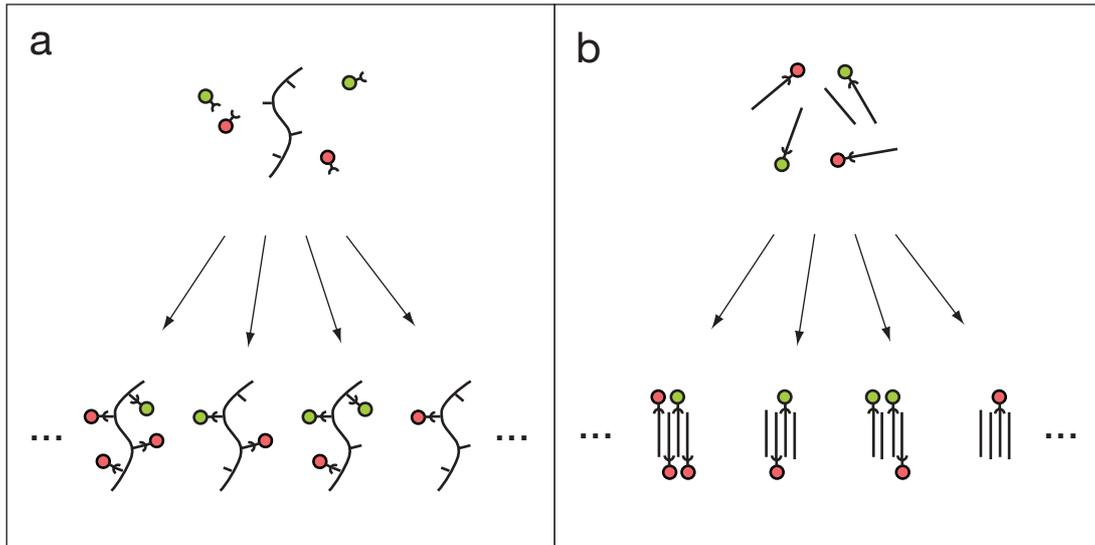


Abbildung 3.8 Statistische Verteilung von Fluorophoren am Komplex in Anlehnung an (Tewes, 1998). **(a)** Markierung eines Makromoleküls mit kleinen Farbstoffen an mehreren Bindungsstellen oder **(b)** Oligomerisierung von homogen markierten Monomeren zu Komplexen mit einer einheitlichen Stöchiometrie führt zu spektralen Klassen von Teilchen mit gleichen hydrodynamischen Eigenschaften.

gegeben. p_g und p_r bezeichnen die Wahrscheinlichkeiten, daß eine Bindungsstelle im Molekül (Komplex) den Fluorophor der entsprechenden Farbe trägt (für das Anfangsverhältnis der Monomere markiert in der entsprechenden Farbe) und $1 - p_g - p_r$ für die Wahrscheinlichkeit, daß die Bindungsstelle leer (der Monomer unmarkiert) ist.

Jede Subspezies im Sinne von Gl. (10) bildet eine Klasse, die durch eine bestimmte Kombination von n_g und n_r definiert ist. Die Konzentrationen der einzelnen Subspezies werden durch die Wahrscheinlichkeit bestimmt, ein solches Molekül zu bilden, skaliert mit der Gesamtkonzentration der Teilchen (Komplexe) in Lösung: $c^{(s)} = P(n_g, n_r) c$. Die charakteristischen Konzentrationen sind einfache Vielfache der gebundenen Fluorophore des entsprechenden Typs $\tilde{F}_j^{(s)} = n_g \tilde{F}_j^{(g)} + n_r \tilde{F}_j^{(r)}$. Benutzt man die statistischen Momente erster und zweiter Ordnung, (siehe Anhang), so läßt sich die Korrelationsfunktion ableiten

$$G_{kl}(\tau) = 1 - \frac{1}{n} + \left(\frac{p_g \tilde{F}_k^{(g)} \tilde{F}_l^{(g)} + p_r \tilde{F}_k^{(r)} \tilde{F}_l^{(r)}}{n (p_g \tilde{F}_k^{(g)} + p_r \tilde{F}_k^{(r)}) (p_g \tilde{F}_l^{(g)} + p_r \tilde{F}_l^{(r)})} \right) \frac{1}{c} \tilde{G}_{kl}(\tau). \quad (17)$$

Gl. (17) wird transparent für den Fall eines idealisierten Systems mit sauber getrennten Detektionskanälen; $\tilde{F}_l^{(g)}$ und $\tilde{F}_k^{(r)}$ werden null und man erhält für die Kreuzkorrelationsamplitude

$$G_{12}(0) = \left(1 - \frac{1}{n} \right) \frac{1}{c V_{\text{eff},12}}. \quad (18)$$

Die maximal erreichbare Amplitude des Ensembles ist reduziert, und es überrascht, daß dieses Verhalten nicht von den Markierungswahrscheinlichkeiten p_g und p_r abhängt. Zum besseren Verständnis betrachten wir eine einfache homonome Dimerisierung. Werden gleich viel rote und grüne Monomere in die Reaktion eingesetzt ($p_g = p_r$), wird die Hälfte der Dimere beide Farben tragen, ein Viertel zwei rote und das restliche Viertel zwei grüne Fluorophore. Insgesamt ist die Amplitude damit auf $1/2$ reduziert. Wird eine Sorte von Teilchen dagegen im Überschuß eingesetzt, z.B. $p_g > p_r$, so werden sich hauptsächlich grüne Dimere bilden. Gleichzeitig befinden sich aber mehr rote Teilchen in zweifarbigen Komplexen, was die Kreuzkorrelationsamplitude erhöht. Die Rechnung zeigt, daß sich die beiden antagonistischen Effekte gerade kompensieren. Diese Argumentation setzt natürlich voraus, daß das Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei beiden Kanälen ausreichend hoch ist. Mit zunehmender Anzahl an Bindungsstellen n geht die Korrelationsamplitude schließlich in die eines einheitlich zweifarbigen Dimers über, da die Wahrscheinlichkeit, einfach markierte Komplexe zu finden, sich an Null annähert.

Im Gegensatz zur Kreuzkorrelation steigt die Autokorrelationsamplitude gegenüber einem homogen markierten Standard und hängt von p_t , der Wahrscheinlichkeit einen Fluorophor des entsprechenden Typs am Molekül (Komplex) zu finden, ab:

$$G_j(0) = \left(1 - \frac{1}{n} + \frac{1}{np_t}\right) \frac{1}{cV_{\text{eff},j}}. \quad (19)$$

Für sehr kleine p_t sind immer weniger Teilchen fluoreszenzierend, und die Amplitude folgt in reziproker Weise der Konzentration an Fluorophoren. Es ist bemerkenswert, daß bei diesem Ausdruck trotz einer Verteilung von Helligkeiten die Linearität zwischen Amplitude und Gesamtkonzentration c der Teilchen erhalten bleibt.

3.5 Charakterisierung einer synthetischen Markierung mit Autokorrelation

Als eine Anwendung soll ein typisches Markierungsexperiment behandelt werden. Nehmen wir den bereits erwähnten Fall einer Bindung eines relativ kleinen organischen Farbstoffs an ein Protein mit nur einer Bindungsstelle, aber einer Fluoreszenzlöschung im gebundenen Zustand ($0 \leq \eta \leq 1$). Wenn Reste ungebundenen Farbstoffs in der Lösung verbleiben, ist die mittlere Intensität der Lösung durch Beiträge beider Teilchensorten ($s = 1, 2$) gegeben:

$$\langle F \rangle = c^{(1)} \tilde{F}^{(1)} + c^{(2)} \tilde{F}^{(2)} = (\rho_{\text{kor}}^{(1)} + \eta \rho_{\text{kor}}^{(2)}) c \tilde{F}^{(1)}, \quad (20)$$

wobei $c = c^{(1)} + c^{(2)}$ für die Gesamtkonzentration der Teilchen steht, die zunächst nicht bekannt ist. Die charakteristische Intensität des freien Farbstoffs kann separat bei gleichen Bedingungen (Anregungsintensität, Filtersatz, usw.) gemessen werden

$$\tilde{F}^{(1)} = \langle F^{(1)} \rangle / c^{(1)} = \langle F^{(1)} \rangle V_{\text{eff}} G^{(1)}(0), \quad (21)$$

was gleichzeitig die Bestimmung des Fokusvolumens erlaubt, wenn die Konzentration oder der Diffusionskoeffizient der Farbstoffs bekannt ist. Durch Anpassung einer zweikomponentigen Modellfunktion können die relativen Anteile $\rho^{(s)}$ der Amplitude $G(0)$ ermittelt werden. Vergleich der Koeffizienten auf beiden Seiten der Gl. (10) ergibt zwei zusätzliche Bedingungen

$$\frac{\rho_{\text{kor}}^{(1)}}{\langle N_{\text{ob}} \rangle (\rho_{\text{kor}}^{(1)} + \eta \rho_{\text{kor}}^{(2)})^2} = \rho^{(1)} G(0) \quad (22)$$

$$\frac{\eta^2 \rho_{\text{kor}}^{(1)}}{\langle N_{\text{ob}} \rangle (\rho_{\text{kor}}^{(1)} + \eta \rho_{\text{kor}}^{(2)})^2} = \rho^{(2)} G(0) \quad (23)$$

und das Gleichungssystem (21), (22) und (23) kann mit $R = (\langle F \rangle G(0)) / (\langle F^{(1)} \rangle G^{(1)}(0))$ gelöst werden

$$\eta = \frac{1 - \rho^{(1)}}{1/R - \rho^{(1)}} \quad (24)$$

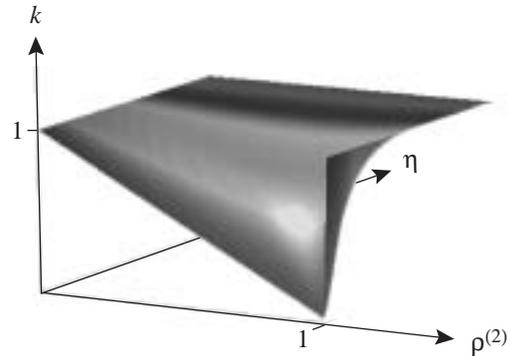
$$\rho_{\text{kor}}^{(1)} = \frac{\rho^{(1)} \rho^{(2)}}{(1/R - \rho^{(1)}) + \rho^{(1)} \rho^{(2)}} \cdot \quad (25)$$

Das Produkt von Amplitude und mittlere Rate repräsentiert für den freien Farbstoff dessen molekulare Helligkeit. Ohne Fluoreszenzlöschung ($R = 1$) reduzieren sich Gl. (24) und (25) auf $\eta = 1$ und $\rho_{\text{kor}}^{(1)} = \rho^{(1)}$ in Übereinstimmung mit der bereits dargestellten Theorie.

Ein numerisches Beispiel: Die gemessene Amplitude der Mischung sei gleich eins ($G(0) = 1$), und die Kurvenanpassung einer zweikomponentigen Funktion ergebe 30% einer schnell diffundierenden Komponente ($\rho^{(1)} = 0.3$). Nehmen wir weiter an, daß das Produkt aus Amplitude und mittlerer Rate gegenüber dem freien Farbstoff auf $R = 0.6$ reduziert ist, dann ergibt Gl. (24) eine

Abbildung 3.9 Korrektur bei Fluoreszenzlöschung einer Spezies. Die gemessene Amplitude einer Mischung von zwei unterschiedlich hellen Fluorophoren ist im Vergleich zu einer homogenen Lösung gleicher Teilchenkonzentration erhöht. k korrigiert nach Gl. (11) auf die „wahre“ Amplitude zurück. $\rho^{(2)}$ bezeichnet hier den relativen Anteil einer gelöschten Komponente mit $0 \leq \eta \leq 1$.

$$kG(0) = \frac{1}{\langle N_{\text{ob}} \rangle}$$



Fluoreszenzlöschung von etwa 50% ($\eta = 0.5$). Einsetzen in Gl. (25) liefert die wahren relativen Anteile der Spezies von 10% freiem Farbstoff ($\rho_{\text{kor}}^{(1)} = 0.1$) und 90% markiertem Protein. Fluoreszenzlöschung um η wirkt über Gl. (11) auf die Korrelationsamplitude zurück. Die Amplitude einer solchen Mischung ist gegenüber einer gleichen Konzentration einer der beiden Spezies um 12.4% erhöht ($\langle N_{\text{ob}} \rangle = 1.12$).

3.6 Charakterisierung eines Bindungsgleichgewichts mit Kreuzkorrelation

3.6.1 Das Verhältnis von Kreuz- und Autokorrelationsamplitude, *RatioG*

Oben wurde gezeigt, daß die Kreuzkorrelationsamplitude von der Konzentration der Teilchen, aber auch von den Quantenausbeuten der Fluorophore in den einzelnen Kanälen abhängt. Für eine Bestimmung von Dissoziationskonstanten muß die Gleichgewichtsreaktion über einen Konzentrationsbereich titriert werden. Da mit FCS im nanomolaren Bereich oder darunter gearbeitet wird, ist es schwierig, die Konzentrationswerte der Teilchen extern durch andere Methoden abzustützen. Daher ist es wünschenswert, die Bestimmung der Lage eines Bindungsgleichgewichts über Kreuzkorrelation intern zu kalibrieren. Das Verhältnis von Kreuz- und Autokorrelationsamplitude *RatioG_j* stellt eine adäquate Observable dar, um die Bindung verschiedenfarbiger Komplexe zu verfolgen. Gl. (10) liefert direkt

$$\text{Ratio}G_j = \frac{G_{12}(0)}{G_j(0)} = \frac{\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_1^{(s)} \tilde{F}_2^{(s)} \tilde{G}_{12}^{(s)}(0)}{\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_j^{(s)2} \tilde{G}_j^{(s)}(0)} \frac{\left(\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_j^{(s)} \right)^2}{\left(\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_1^{(s)} \right) \left(\sum_s c^{(s)} \tilde{F}_2^{(s)} \right)}. \quad (26)$$

Die charakteristischen Korrelationsfunktionen der verschiedenen Spezies sind im Kreuzkorrelationsmodus oder im Autokorrelationsmodus näherungsweise identisch und können vor die Summen gezogen werden, $\tilde{G}_{kl}^{(s)}(0) \approx \tilde{G}_{kl}(0)$. Da sie das inverse Beobachtungsvolumen repräsentieren $\tilde{G}_{kl}(0) = 1/V_{\text{eff},kl}$, erscheint der Faktor $V_{\text{eff},j}/V_{\text{eff},12}$, welcher nur von geometrischen Eigenschaften des Aufbaus abhängt, wie sie in Kap. 3.3.4 besprochen wurden. Der Rest von Gl. (26) wird durch die einzelnen Beiträge der spektralen Spezies bestimmt. An dieser Stelle erscheint es nützlich, wie auch schon für die Interpretation von G . (17), ein ideales System zu definieren, bei dem die Foki 100% überlappen ($V_{\text{eff},j}/V_{\text{eff},12} = 1$) und die Detektionskanäle optimal voneinander getrennt sind. Dies wird im Folgenden mit einem kleinen hochgestellten Kreis angezeigt, z.B. (G°). In einem idealisierten System sprechen die Detektoren nur auf die dafür ausgewählten Fluorophore an, z.B. (g)rün $\rightarrow 1$ und (r)ot $\rightarrow 2$. Die charakteristische Intensität einer Spezies ist proportional zur Anzahl der gebundenen Farbstoffe $\tilde{F}_j^{(s)} = n_t \tilde{F}^{(t)}$. Normalisierung mit Kanal 1 ergibt

$$RatioG_1^\circ = \frac{\sum_s c^{(s)} n_g^{(s)} n_r^{(s)} c_0^{(g)}}{\sum_s c^{(s)} n_g^{(s)2} c_0^{(r)}}, \quad (27)$$

mit $c_0^{(g)}$ und $c_0^{(r)}$ als Gesamtkonzentration von entsprechend roten und grünen Fluorophoren. Betrachtet man eine einfache eins-zu-eins-Wechselwirkung zwischen einfach markierten roten und grünen Monomeren ($n_t = 1$) läßt sich Gl. (27) weiter vereinfachen, und man erhält

$$RatioG_1^\circ = \frac{c^{(gr)}}{c_0^{(r)}} = \frac{c^{(gr)}}{c^{(gr)} + c^{(r)}} = \theta_2, \quad (28)$$

den relativen Anteil θ_2 an roten Fluorophoren, die sich in zweifarbigem Dimeren befinden. Hier muß beachtet werden, daß $RatioG_1$ den Anteil θ_2 der zweifarbigem Dimere mit der Gesamtzahl an „roten“ Monomere in Bezug setzt, aber mit dem „grünen“ Kanal normalisiert wurde.

Wie ist $RatioG_1^\circ$ zugänglich, da die Fokusgeometrie und Übersprechen die experimentellen Ergebnisse beeinflussen? Gl. (27) legt einen experimentellen Ansatz nahe: Das System kann kalibriert werden, indem man eine Reihe von Standards mißt, eine Mischung von freien und präparativ aneinander gekoppelte Fluorophore die in Konzentration und Stöchiometrie den markierten Produkten und Edukten einer Bindungsreaktion entsprechen. Durch Vergleich der konzentrationsabhängigen Kurven läßt sich dann die Bindungsreaktion charakterisieren (siehe auch Rippe 2000).

3.6.2 Instrumentelle Randbedingungen

Durch Übersprechen des Fluoreszenzsignals in beide Detektionskanäle wird auch eine Mischung nicht-interagierender Teilchen ein minimales Amplitudenverhältnis $RatioG_{j,\min}$ liefern. Die Lage der Grundlinie kann bei sehr langsamen Reaktionen am Anfang oder bei induzierbaren Reaktionen im voraus bestimmt werden, d.h. bevor die bindungsinduzierenden Komponenten zugegeben werden (Reaktionen vom Typ c und d in Tab. 3.1). In anderen Fällen kann man die verschieden markierten Reaktionspartner einzeln vermessen und die Grundlinie mit Hilfe von

$$RatioG_{j,\min} = \frac{F_1^{(g)} F_1^{(g)2} G_{12}^{(g)}(0) + F_1^{(r)} F_j^{(r)2} G_{12}^{(r)}(0)}{F_j^{(g)2} G_j^{(g)}(0) + F_j^{(r)2} G_j^{(r)}(0)} \frac{F_j}{F_1 F_2} \quad (29)$$

berechnen, mit $F_j = F_j^{(g)} + F_j^{(r)}$.

Auf der anderen Seite ist der Maximalwert $RatioG_{j,\max}$ durch fast alle der bereits besprochenen Effekte limitiert: die Geometrie der Detektionsfunktionen, nicht-korrelierter Hintergrund, Übersprechen und die Stöchiometrie der in Lösung befindlichen zweifarbigen Komplexe. Mit Gl. (8) kann der Einfluß der Fokusgeometrie des Aufbaus auf $RatioG_{j,\max}$ zwar explizit angegeben werden

$$\frac{\tilde{G}_{12}(0)}{\tilde{G}_j(0)} = \exp\left(-\frac{d_x^2 + d_x^2}{w_{0,\text{eff}}^2} - \frac{d_z^2}{z_{0,\text{eff}}^2}\right) \frac{V_{\text{eff},j}}{V_{\text{eff},12}}, \quad (30)$$

jedoch empfiehlt es sich aufgrund der Vielzahl der Einflüsse, das System mit einem 100% zweifarbig markierten Standard zu eichen. Ein solcher Standard besteht idealerweise aus einem Trägermolekül, z.B. ein DNA-Fragment, an das je ein Fluorophor beider Farben stabil gekoppelt wurde. Dabei ist zu beachten, daß je nach Stöchiometrie der Reaktionsprodukte, das maximal erreichbare $RatioG_{j,\max}$ noch zusätzlich reduziert sein kann (siehe unten). Die Gln. (29) und (30) spannen nun den Meßbereich auf, in dem sich $RatioG_j$ mit fortschreitender Bindung verschiedenfarbiger Komponenten gemäß

$$\theta_j = \frac{RatioG_j - RatioG_{j,\min}}{RatioG_{j,\max} - RatioG_{j,\min}} \quad (31)$$

anteilig erhöht.

3.6.3 Klassifizierung verschiedener Bindungsreaktionen

Die Verfolgung von Bindungsereignissen über Kreuzkorrelation erlaubt zwei verschiedene Markierungsstrategien: entweder können beide Komponenten markiert werden oder nur einer der beiden Reaktionspartner. Die Entscheidung für die eine oder andere Variante ist normalerweise durch die biochemischen Möglichkeiten der Fluoreszenzmarkierung bestimmt. Es sollten immer Ansätze gewählt werden, die möglichst definierte Fluorophorkonfigurationen am Substrat erzeugen, da FCS-Daten sonst nur sehr eingeschränkt aussagekräftig sind. Typische Markierungsansätze für bimolekulare Bindungsreaktionen sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Drei grundlegenden Schemata lassen sich formulieren: heteronome Bindungen, die über beide der Reaktionspartner verfolgt werden (Typ *a* und *b*), heteronome Bindungen, bei denen nur einer der beiden Reaktionspartner, dieser aber in zwei Farben verfügbar ist (Typ *c* und *d*) sowie homonome Bindungen (Typ *e* und *f*). Die folgende Diskussion soll einen Überblick darüber geben, wie sich $RatioG_j^\circ$ für diese verschiedenen Fälle mit der fortschreitenden Bindung quantitativ entwickelt. Aus diesen Gleichungen lassen sich dann die Maximalwerte $RatioG_{j,max}^\circ$ ableiten, die für den Fall einer vollständigen Komplexbildung zu erwarten sind. $RatioG_{j,max}^\circ$ ist gegenüber einem 100% zweifarbigen Standard für alle Reaktionen, außer vom Typ *a*, reduziert. Da hier im folgenden vor allem auf die Logik der Bindungsreaktionen abgehoben werden soll, wird vorausgesetzt, daß die monomeren Reaktionspartner A und B, mit denen die Reaktion in Gang gesetzt wird, homogen markiert vorliegen.

Markierung beider Reaktionspartner. Die Reaktanten A und B seien grün beziehungsweise rot markiert. Anwendung von Gl. (9) auf Gl. (27) liefert die allgemeinste Form von $RatioG_j^\circ$ für die Bindung zweier unterschiedlicher Komponenten, wobei zunächst eine beliebige Stöchiometrie zwischen Rezeptor und Ligand zugelassen wird (Typ *b*). Die Konzentrationen der spektralen Spezies $c^{(s)}$ in Gl. (27) werden hier durch die Konzentrationen der gebildeten Komplexe ersetzt; hier, wie in der Biochemie üblich, durch eckige Klammern bezeichnet. Unter der Voraussetzung von homogen markierten Monomeren entspricht die Anzahl der Fluorophore am Komplex (n_g, n_r), bis auf einen sich herauskürzenden konstanten Faktor, gerade der Anzahl der gebundenen Reaktionspartner (α, β). $RatioG_j^\circ$ ist dann die Summe der Beiträge aller möglichen Komplexe des Bindungsgleichgewichts gemäß

$$RatioG_1^\circ = \frac{\sum_{\alpha, \beta} [A_\alpha^{(g)} B_\beta^{(r)}] \alpha \beta}{\sum_{\alpha} [A_\alpha^{(g)} B_\beta^{(r)}] \alpha^2} \frac{[A_0^{(g)}]}{[B_0^{(r)}]} \quad (32)$$

In Gl. (32) wurde beispielhaft mit Kanal 1 normalisiert, der auf die grünen Reaktionspartner A ausgerichtet ist, den Rezeptoren einer einfachen Liganden-Bindung vom Typ *a*. Wie sich gleich zeigt, ist in diesem Spezialfall eine Normalisierung mit dem Farbkanal des Rezeptors günstig. Die Bindung von β Liganden an einem einzigen Rezeptormolekül ($\alpha=1$), überführt Gl. (32) in eine anschauliche Form

Interagierende Teilchen		markiert	
		eine Komponente	beide Komponenten
heteronom	Ligandenbindung	c $A + \beta B^{(g)(r)} \rightleftharpoons AB_{\beta}^{(g)(gr)(r)}$	a $A^{(g)} + \beta B^{(r)} \rightleftharpoons AB_{\beta}^{(gr)}$
	allgemeine Stöchiometrie	d $\alpha A + \beta B^{(g)(r)} \rightleftharpoons A_{\alpha} B_{\beta}^{(g)(gr)(r)}$	b $\alpha A^{(g)} + \beta B^{(r)} \rightleftharpoons A_{\alpha} B_{\beta}^{(gr)}$
homonom	Oligomerisation	e $\beta B^{(g)(r)} \rightleftharpoons B_{\beta}^{(g)(gr)(r)}$	$\alpha, \beta, \nu =$ stöchiometrische Indizes A, B = Reaktionspartner B^(g) = grün markiert B^(r) = rot markiert B^(rg) = zweifarbig markiert B^{(r)(g)} = Mischung aus rot und grün markierten \vdots
	Oligomerisation in mehreren Schritten	f $\beta B^{(g)(r)} \rightleftharpoons \beta/\nu B_{\nu}^{(g)(gr)(r)}$ $\dots \rightleftharpoons B_{\beta}^{(g)(gr)(r)}$	

Tabelle 3.1 Einteilung möglicher Bindungsreaktionen im Zwei-Farben-Ansatz. Die Versuchsansätze wurden danach klassifiziert, ob beide oder nur einer der Reaktionspartner markiert werden können. Quer dazu lässt sich unterscheiden, ob die markierten Teilchen mit sich selbst interagieren können (homonom) oder nicht (heteronom). Als Ergebnis entstehen drei grundlegende Schemata, die hier stöchiometrisch weiter untergliedert wurden.

$$RatioG_1^{\circ} = \frac{\sum_{\beta} [A_{\alpha}^{(g)} B_{\beta}^{(r)}] \beta}{[B_0^{(r)}]}, \quad (33)$$

bei der $RatioG_1^{\circ}$ direkt den relativen Anteil der gebundenen Liganden wiedergibt. Gl. (33) ist eine allgemeinere Formulierung von Gl. (28) für $\beta = 1$. Normalisiert man die Konzentration an gebundenem Ligand auf die Konzentration an Rezeptor, so kann $RatioG_j^{\circ}$ in einem einfachen Schritt mit der *Adair*-Gleichung verknüpft werden, einer sehr allgemeinen Formulierung von sukzessiven Assoziationsschritten mehrerer Komponenten im Gleichgewicht:

$$RatioG_1^{\circ} \frac{[B_0^{(r)}]}{[A_0^{(g)}]} = \frac{\sum_{\beta} \beta K^{\beta} [B_{\beta}^{(r)}]^{\beta}}{\sum_{\beta} K^{\beta} [B_{\beta}^{(r)}]^{\beta}}. \quad (34)$$

Die aufeinanderfolgenden Assoziationsschritte am Rezeptor lassen sich über die Anzahl der gebundenen Liganden β indizieren und durch eine spezifische Gleichgewichtskonstante $K^{(\beta)}$ beschreiben. Für Reaktionen dieses Typs ergibt eine vollständige Sättigung des Rezeptors $RatioG_{j,\max}^\circ = 1$ da sich im Zähler und Nenner von Gl. (33) die Gesamtkonzentration von Ligand wiederfindet. Dagegen ist $RatioG_{j,\max}^\circ$ für eine allgemeine Stöchiometrie (Typ b) gegenüber einem 100% doppeltmarkierten Standard gemäß

$$RatioG_{j,\max}^\circ = \frac{3(\alpha + 1)}{2(2\alpha + 1)} \quad (35)$$

leicht reduziert.

Markierung von nur einem der Reaktionspartner. Die Liganden B seien entweder grün oder rot markiert und bilden bei der Bindung zwei-, aber auch einfarbige Komplexe. Aufgrund der Symmetrie des Problems muß der Kanal, mit dem die Kreuzkorrelation normalisiert wird, nicht mehr spezifiziert werden. Die entstehende Verteilung der Fluorophore am Komplex ist nun sowohl eine Funktion der Anzahl der Bindungsstellen $n = \beta$ als auch von p_t , dem Anteil der Monomere in Lösung, die einen Fluorophor des entsprechenden Typs t tragen. Der Formalismus zur Behandlung von statistischer Assoziation wurde in Abschnitt 3.4 behandelt. Man findet

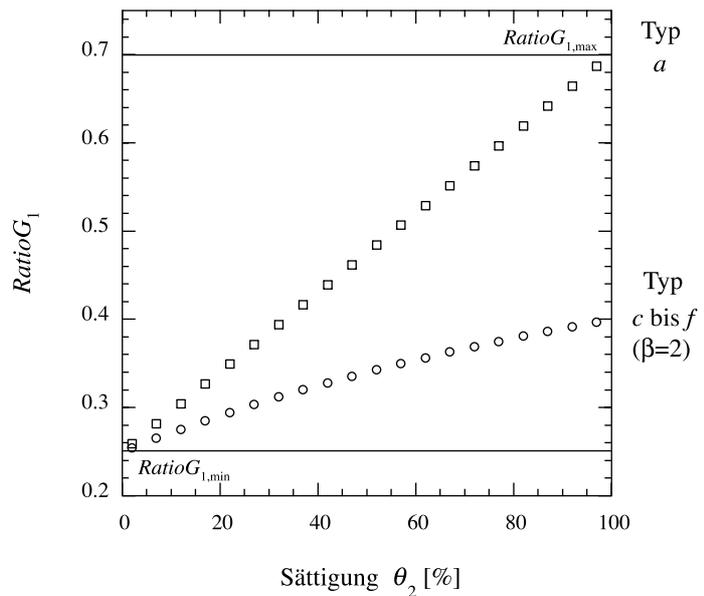
$$RatioG_1^\circ = \frac{\sum_{\beta} [B_{\beta}^{(g)(gr)(r)}] \beta(\beta - 1)}{\sum_{\beta} [B_{\beta}^{(g)(gr)(r)}] (\beta(\beta - 1) + 1/p_t)}, \quad (36)$$

worin die entstehenden Komplexe in β Klassen sortiert wurden, entsprechend der Anzahl ihrer gebundenen Liganden. Die Anzahl der gebundenen Liganden entspricht der Anzahl der Bindungsstellen für die verschiedenfarbigen Monomere, und diese sind jeder Klasse binomial oder im Falle von unvollständiger Markierung trinomial verteilt. Der Ausdruck ist für alle Reaktionen vom Typ c bis fg gültig, da vermeintlich unmarkierte Komponenten A kein Signal geben. Jedoch unterscheiden sich die Reaktionen in ihrer Konzentrationsabhängigkeit, wenn das Gleichgewicht auf die eine oder andere Seite verschoben wird. Gl. (36) kann als eine Basis dienen, um verschiedene Mechanismen durch Vergleich von numerisch simulierten mit gemessenen Titrationskurven zu unterscheiden.

Sowohl für homonome Oligomerisierungen (Typ e und f) als auch für heteronome Bindungen, bei denen nur ein Reaktant markiert wurde, kann der Maximalwert $RatioG_{j,\max}^\circ$ für vollständige Bindung direkt unter Verwendung von Gln. (18) und (19) notiert werden

Abbildung 3.10 Bindungskurven.

$RatioG_{1,max}$ wurde für eine beispielhafte Fokusgeometrie gemäß Abb. 3.7 a berechnet; zusätzlich wurde 20% Überschrechen in den roten (2) und 5% in den grünen (1) Kanal berücksichtigt. Für heteronome Bindung (Typ a), steigt $RatioG_1$ linear mit Anteil gebundener Liganden $\Theta_2 = c^{(gr)}/c_0^{(r)}$ (Quadrate). Eine homonome Dimerisierung ist ein Spezialfall der Reaktionen vom Typ c bis f mit $\beta = 2$ (Kreise). Zunehmende Bindung wurde mit $\theta_2 = (c^{(gr)} + 2c^{(gg)})/c_0^{(r)}$ parametrisiert. $RatioG_{max}$ beträgt dann nur 1/3 im Vergleich zu einer vollständigen heteronomen Dimerisierung und stellt für diese Methode den ungünstigsten Fall dar.



$$RatioG_{j,max}^{\circ} = \frac{\beta - 1}{\beta - 1 + 1/p_t} \quad (37)$$

In Abb. 3.10 wurden einige Titrationskurven für typische Parameter aus der experimentellen Praxis simuliert. Während zunehmende Sättigung einer heteronomen Rezeptor-Liganden-Bindung (Typ a) zu einem linearen Anstieg von $RatioG$ innerhalb des vom Gerät spezifizierten Meßbereichs führt, ist dieser für Reaktionen vom Typ c bis f drastisch reduziert. Für eine einfache homonome Dimerisierung gleicher Anteile von grün und rot markierten Monomeren ($\beta = 2$ und $p_t = 1/2$), ist $RatioG_{j,max}^{\circ}$, verglichen mit einem vollständig doppelt markierten Standard, auf ein Drittel reduziert, und auch die Linearität geht verloren. Die zusätzliche Reduktion des Meßbereichs ist durch das Auftreten einfarbiger Komplexe bedingt und wirkt sich für eine Dimerisierung am stärksten aus. Für Komplexe höherer Ordnung wird dann der Meßbereich wieder größer.

3.7 Quantitative konfokale Mikroskopie

Fluoreszierende Teilchen können an jeder beliebigen Stelle einer Probenlösung beobachtet werden. Über den beweglichen Tisch, den Objektivtrieb und den Scanspiegel (siehe Abb. 3.5) kann das Beobachtungsvolumen mit hoher Präzision (lateral 25 nm) im dreidimensionalen Raum positioniert werden. Dies, in Kombination mit den sehr kleinen Abmessungen des Fokus, bietet eine

Möglichkeit, die Beweglichkeit und Verteilung von fluoreszierenden Teilchen in lebenden Zellen, in ihrer natürlichen Umgebung zu studieren.

Der instrumentelle Aufbau ermöglicht zum bestehenden Zeitpunkt drei experimentelle Modi der Datenaufnahme:

- (1.) FCS an beliebiger Stelle über einen beliebigen Zeitraum
- (2.) Aufnahme der Intensität an einer Position über einen beliebigen Zeitraum
- (3.) Aufnahme der Intensität beim Abtasten eines beliebigen Raumbereichs (Scanning)

Während der 2. Modus (Zeitlauf der Intensität) über die Korrelatorkarte möglich ist (man wählt nur einen Lauf und liest die abgespeicherte Intensität aus dem Textdokument), wird die Intensität beim Abtasten eines Raumbereichs über eine separate Elektronik in den grünen Kanal eines RGB-Bildes abgespeichert. Der Scanprozeß erfolgt „im Vorbeistreifen“ (on the fly), d.h. das Beobachtungsvolumen bewegt sich mit einer konstanten Geschwindigkeit durch die Probe. Die Anzahl der Zählereignisse an den Avalanchedioden wird dann in definierten Zeitintervallen abgespeichert. Der Anwender kann die Bildauflösung über den Pixelabstand (PD = pixel distance) sowie die mittlere Aufenthaltsdauer des Laserfokus an jedem Bildpunkt über die Pixelzeit (PT = pixel time) mit der Mikroskopsoftware einstellen.

Abb. 3.11 zeigt eine HeLa-Zelle, die das fluoreszierende Histon H2A-EYFP exprimiert. Wie später gezeigt werden wird, integrieren diese Zellen das Histonkonstrukt in ihr Chromatin und akkumulieren dadurch im Zellkern eine stark sichtbare Fluoreszenz. Um sich zu orientieren, wird vor jeder Messserie zunächst ein Übersichtsbild der ausgewählten Zelle aufgenommen. Für das Übersichtsbild (oben links) wird zusätzliches Weißlicht der Mikroskoplampe eingestrahlt. Man erhält ein hybrides Durch- und Fluoreszenzbild, bei dem einerseits der cytoplasmatische Saum aber auch der stark fluoreszierende Zellkern sichtbar wird. Alle Bilder sind hier als Negativ dargestellt, so daß die Schwärzung im Bild einer zunehmenden Intensität des Fluoreszenzsignals entspricht. Obwohl in der Übersicht das Cytoplasma gegenüber dem Kulturmedium keinen Kontrast gibt, sind dort fluoreszierende Proteine detektierbar. Dies kann in reinen Fluoreszenzbildern mit zunehmender Pixelzeit visualisiert werden (Abb. 3.11 a, rechts). Bei einer Pixelzeit von etwa 1 ms wird hier der Kontrast zum umgebenden Medium deutlich; die Fluoreszenz des Kerns ist dabei aber längst in der Sättigung.

Ein zentraler Schritt für die Kalibrierung der konfokalen Fluoreszenzbilder besteht darin, einen quantitativen Zusammenhang zwischen der gemessenen Intensität und der Anzahl der Teilchen herzustellen. Dies kann im Cytoplasma der Zellen geschehen, wo die fluoreszierenden Proteine synthetisiert werden und noch frei beweglich sind. Über FCS läßt sich die Konzentration von fluoreszierenden Histonkonstrukten direkt über den Achsenabschnitt bestimmen (siehe Kap. 3.3.3). Da die Intensität davon unabhängig gemessen wird ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Zählrate am Detektor und der mittleren Anzahl der beobachteten Teilchen $\langle N_{\text{ob}} \rangle$. Eichet man das Beobachtungsvolumen über einen Standard mit bekanntem

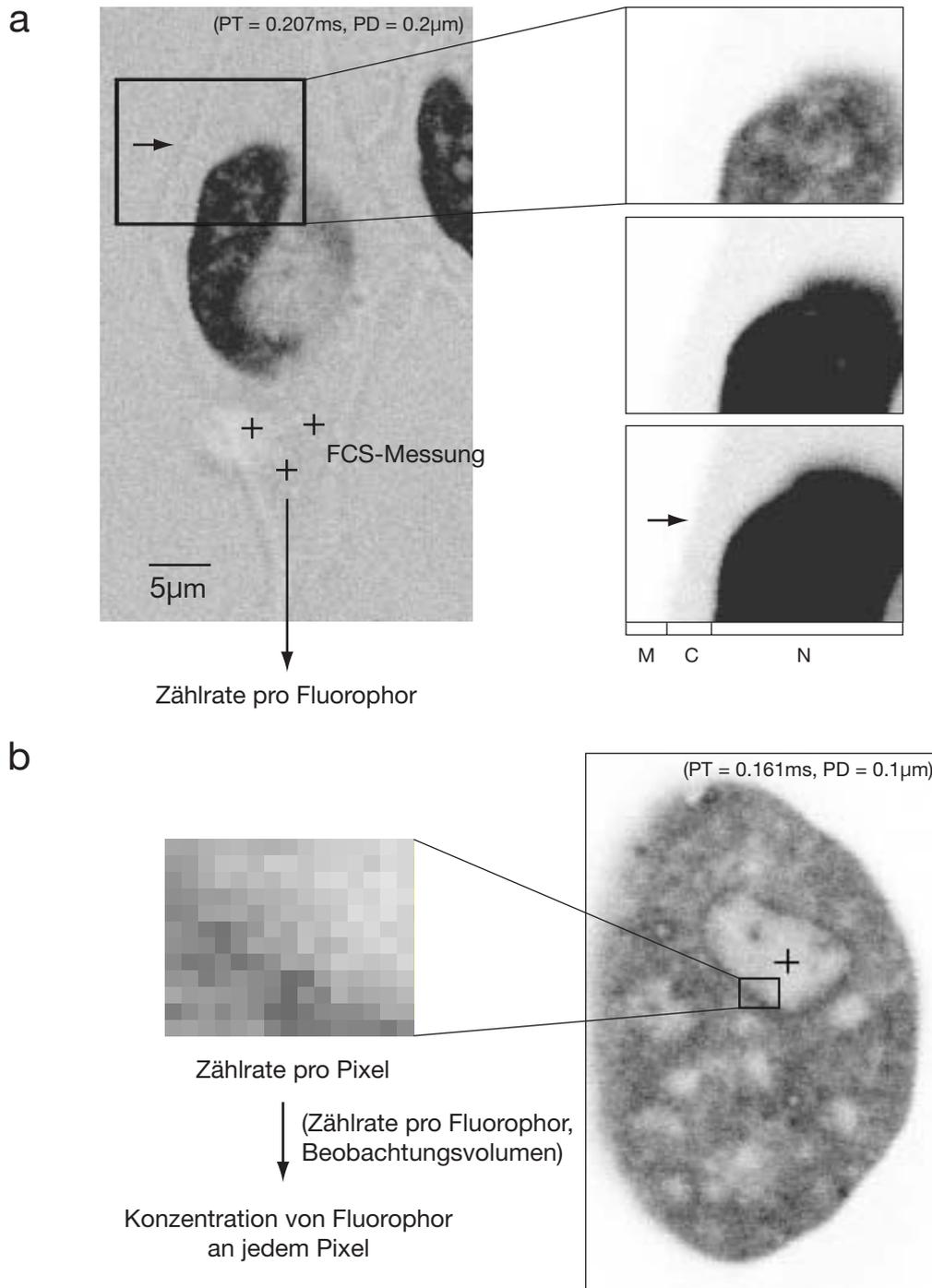


Abbildung 3.11 Kalibrierung der konfokalen Fluoreszenzbilder. **(a)** Links: Übersichtsbild einer Zelle bei $z = 3 \mu\text{m}$. Zusätzliches Weißlicht kontrastiert die Plasmamembran (Pfeil). Fluoreszierende Proteine im Cytoplasma werden in Fluoreszenzbildern erst bei längerer Aufnahmezeit sichtbar (rechts, Pfeil), erlauben aber FCS-Messungen auch bei niedrigen Laserleistungen; Medium (M), Cytoplasma (C) und Nukleus (N). **(b)** Konfokales Fluoreszenzbild des Kerns. Jedes Pixel enthält die Anzahl der Zählereignisse die beim Vorbeistreichen des Lasers detektiert wurden, hier mit zunehmenden Grauwerten dargestellt. Mit der charakteristischen Intensität der fluoreszierenden Teilchen aus FCS-Messungen im Cytoplasma lassen sich die Bilder in absolut geeichte Konzentrationsverteilungen umrechnen.

Diffusionskoeffizient, so ergibt sich die charakteristische Intensität der fluoreszierenden Proteine im Cytoplasma der Zellen $\tilde{F} = F/c$ [kHz/M]. Da die Anzahl der Zählereignisse im Bild mit einer bekannten Pixelzeit aufgenommen werden, mißt man ebenfalls eine Zählrate, die nun über die charakteristische Intensität für jedes Pixel über

$$c(x, y) = \frac{\text{Zählereignisse im Bild}(x, y)}{PT \cdot \tilde{F}} \quad (38)$$

in die absolute Konzentration an Fluorophor umgerechnet werden kann.

3.8 Bleichen als Maß für intrazelluläre Mobilität

In allen Modi können frei bewegliche und immobilisierte Moleküle zum aufgezeichneten Fluoreszenzsignal beitragen. Die längere Aufenthaltsdauer der immobilisierten Moleküle im Fokus führt zu einer erhöhten Bleichwahrscheinlichkeit der Fluorophore, was bei Bildnahme und FCS die Ergebnisse verfälschen kann. Jedoch lässt sich diese Eigenschaft ausnutzen: Bei gleichzeitigem kontinuierlichen Bleichen und Detektieren der Fluoreszenz lassen sich freie und gebundene Anteile und/oder Eigenschaften der zugehörigen Bindung bestimmen. Das Verfahren, in der Literatur unter dem Begriff CFM (continuous fluorescence microphotolysis) eingeführt (Peters et al., 1981), wird hier mit CP (continuous photo-bleaching) bezeichnet.

Unter der Annahme, daß die Bleichwahrscheinlichkeit proportional zur Anregungsintensität ist (Axelrod et al., 1976), lassen sich folgende Differentialgleichungen für den zeitlich-räumlichen Verlauf der Konzentration der freien und gebundenen Komponenten ableiten (Wachsmuth et al., 2002, in Vorbereitung):

$$\frac{\partial}{\partial t} c_{\text{diff}}(\vec{r}, t) = D \nabla^2 c_{\text{diff}}(\vec{r}, t) - \alpha PSF(\vec{r}) c_{\text{diff}}(\vec{r}, t) - k_{\text{on}} c_{\text{B}} c_{\text{diff}}(\vec{r}, t) + k_{\text{off}} c_{\text{immo}}(\vec{r}, t) \quad (39)$$

$$\frac{\partial}{\partial t} c_{\text{immo}}(\vec{r}, t) = -\alpha PSF(\vec{r}) c_{\text{immo}}(\vec{r}, t) + k_{\text{on}} c_{\text{B}} c_{\text{diff}}(\vec{r}, t) - k_{\text{off}} c_{\text{immo}}(\vec{r}, t) \quad (40)$$

Der erste Term in Gl. (39) erfaßt die Teilchendiffusion mit dem Diffusionskoeffizienten D , der zweite den Bleichprozeß im Beleuchtungsprofil $PSF(\vec{r})$ mit α als der typischen Bleichrate im Fokussmittelpunkt und die restlichen Terme den bindungsabhängigen Austausch der Moleküle zwischen gebundenen und freien Zuständen. c_{B} bezeichnet hier die Konzentration der Bindungsstellen, k_{on} und k_{off} die Bindungsraten.

Mit Hilfe einiger analytischer und numerischer Näherungen lassen sich die Differentialgleichungen lösen. Über die optischen Eigenschaften des experimentellen Aufbaus können die Konzentrationen in Beiträge zum Fluoreszenzsignal umgewandelt werden:

$$F_{\text{diff}}(t) = F_0 e^{-\beta t} \quad (41)$$

$$F_{\text{immo}}(t) = F_0 \left(\left[\underbrace{\left(1 + \frac{\alpha t}{2} + \frac{(\alpha t)^2}{6}\right)^{-1}}_{\text{ohne Austausch}} - \frac{2k_{\text{off}}/\alpha}{1 + 2k_{\text{off}}/\alpha} \left(1 + \frac{\alpha t}{2} + \frac{2(\alpha t)^2}{15}\right)^{-1} \right] e^{-k_{\text{off}} t} + \frac{2k_{\text{off}}/\alpha}{1 + 2k_{\text{off}}/\alpha} e^{-\beta t} \right) \quad (42)$$

für $k_{\text{off}} \sim \alpha$. Die freibewegliche Komponente trägt zum Signal mit einem exponentiellen Abfall bei, siehe Gl. (41), während die gebundenen Moleküle einem komplizierteren nicht-exponentiellen Verlauf folgen. Findet kein Austausch zwischen immobilisierten und freien Molekülen statt, kann die anfängliche Konzentration freier Moleküle über den exponentiellen Verlauf in einer späten Phase der Bleichkurve extrapoliert werden. Bindung an oder Dissoziation von einer immobilen Matrix während der Messung führt vorwiegend zu einem zusätzlichen Offset der Bleichkurve. Ist das Gleichgewichtsverhältnis von freien und gebundenen Molekülen bekannt, kann über Anpassung von Gl. (41) und Gl. (42) die Aufenthaltsdauer $1/k_{\text{off}}$ an der Bindungsstelle bestimmt werden.

Synthetisch markierte Nukleosomen *in vitro*

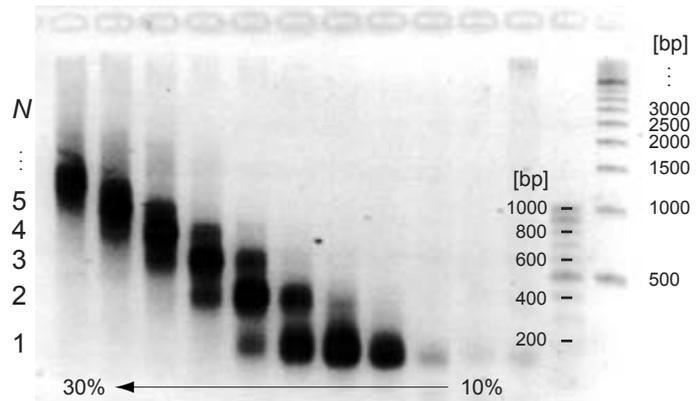
Die Motivation der folgenden Experimente besteht darin, den Austausch von Histonen zwischen unterschiedlichen Chromatinfragmenten *in trans* zu beobachten. Im hier vorgestellten Ansatz wird über FCCS der Austausch markierter Histone zwischen zwei verschiedenfarbigen Populationen von Nukleosomen verfolgt. Dazu wurden die Histone mit organischen Farbstoffen markiert und die Konjugate *in vitro* bei verschiedenen Ionenstärken beobachtet (Kap. 4.1-3). In einem zweiten Schritt wurden die Reaktionsprodukte einer synthetischen Markierung auf detailliertere Weise quantitativ analysiert. Damit konnte die Anzahl der Bindungsstellen, die Fluoreszenzausbeute sowie die Anzahl der gebundenen Fluorophore am Substrat bestimmt werden. Diese Informationen bilden eine wichtige Grundlage, um bei einer beobachteten Dissoziation oder Bindung der fluoreszierenden Histone auf absolute Teilchenzahlen zurückzuschließen (Kap. 4.4).

4.1 Markierung der Histone am Nukleosom

Chromatin wurde *in situ* in isolierten Kernen (COS 7, Hühnererythrozyten) mit Micrococcusnuklease (MNase) verdaut. Das Enzym erzeugt an der DNA Doppelstrangbrüche, vornehmlich im Linker-Bereich der Chromatinfiber. Es entsteht eine Verteilung von Chromatinfragmenten, die durch Einwirkung von Detergenzien und mechanische Agitation aus den Kernen freigesetzt werden. Das Lysat aus Chromatin und anderen Kernkomponenten wurde mit einer präparativen Ultrazentrifuge auf Saccharosegradienten aufgetrennt (Abb. 4.1). Die einzelnen Fraktionen enthalten gereinigte Nukleosomenketten unterschiedlicher Länge, die anschließend gegen Puffer dialysiert, konzentriert und im Kühlschrank über mehrere Monate gelagert wurden. Die Erfahrung zeigte, daß konzentrierte Lösungen mit über 1mg/ml nukleosomaler DNA länger intakt bleiben als verdünntere Lösungen. Wird die Probe während der Präparation mit zelleigenen Proteasen kontaminiert, so kann die Lebensdauer sich auf wenige Tage verkürzen. Der Zustand der Histone sowie der Dissoziationsgrad der nukleosomalen Komplexe wurde mit Polyacrylamidgelen, letzteres auch auf Agarosegelen kontrolliert (Abb. 4.3).

Die Markierung der Nukleosomen erfolgte mit Farbstoffderivaten, die einen Succinimidylester als reaktive Gruppe tragen. Succinimidylester reagieren in wässriger Lösung selektiv mit freien Aminogruppen der Histone (Abb. 4.2). Primäre Aminogruppen befinden sich in den Seitenresten der

Abbildung 4.1 Saccharosegradient. Größere Nukleosomenketten sedimentieren in zunehmend höheren Zuckerkonzentrationen. Die Fragmentlängen der DNA in den einzelnen Fraktionen spiegeln Vielfache der Nukleosomenwiederholungslänge wieder (hier etwa 200 Bp, für Hühnererythrocyten).



Lysine sowie den N-Termini der Polypeptidketten. Tab. 4.1 stellt die Anzahl der Lysine für die einzelnen Core-Histone in eine Übersicht (Luger et al., 1997). Deren maximale Summe beträgt für einen Histonoktamer 78. Wie in Kap. 2.3.1 ausgeführt wurde, können manche der Lysine modifiziert sein und fallen dann als Bindungsstelle weg. Finden sich beispielsweise alle hier aufgeführten Modifikationen an einem Histonoktamer, so verbleiben immer noch 52 Bindungsstellen. Möglicherweise sind aber manche der Lysine, die nach Luger *et al.* den Histonschwänzen zugeordnet sind, vor allem im proximalen Bereich der Histonschwänze aus sterischen Gründen nicht angreifbar.

Tabelle 4.1 Anzahl und Positionen der Lysine in den Histonen

Histonklasse	Lysine (core)	Lysine (tail)	acetetylierbare Positionen	sonstige Modifikationen ^a
H3	5	8	(9, 14, 18, 23)	(4, 27)
H4	5	5	(5, 8, 12, 16)	(20)
H2A	4	9	(5, 9)	(119)
H2B	7	13	(12, 20, 24)	
Σ	21	35	13	3

^a: H3 und H4 werden methyliert und H2A mit Ubiquitin verknüpft.

Das biochemische Protokoll folgt im wesentlichen den Herstellerangaben (<http://www.probes.com/handbook/>) mit folgenden Modifikationen (Weidemann, 1998). (1.) Der Markierungsansatz wurde statt mit 100-200 mM in nur 10 mM Bicarbonat gepuffert, um eine Dissoziation der Komplexe zu vermeiden. (2.) Die Proteinkonzentration, in der markiert wurde, bewegte sich zwischen 20 und 340 $\mu\text{g/ml}$ und damit zwei Größenordnungen unter den Vorgaben des Herstel-

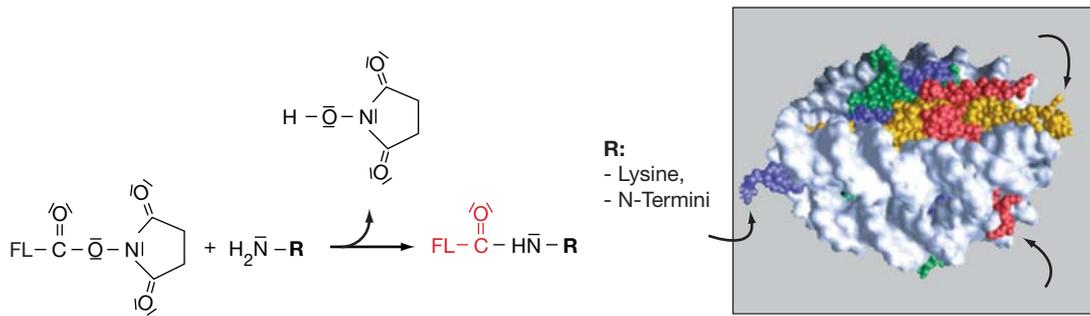


Abbildung 4.2 Markierungsreaktion über Succinimidylester nach (Haugland, 1992). Der Fluorophor (FL) ist mit einem Succinimidylester gekoppelt. Kopplung an Aminogruppen der Proteine (**R**) erfolgt kovalent durch Ausbildung einer Carboxamid-, also einer Peptidbindung. Die addierten Gruppen sind mit rot hervorgehoben. Markierung der Histone erfolgte "nativ" an Mononukleosomen, hier dargestellt nach (Luger et al., 1997).

lers. Die Konjugation erfolgt einfach durch Applizieren des Farbstoffs für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde mit einem Überschuß primärer Aminogruppen, mit Glycin oder Hydroxylamin abgesättigt und der Anteil des ungebundenen Farbstoffs im Reaktionsansatz durch Dialyse oder Gelfiltration reduziert.

Die Fluoreszenz der Proteine kann direkt auf dem SDS-Gel mit UV sichtbar gemacht werden. Wie man in Abb. 4.3 b sieht, werden die einzelnen Core-Histone nicht gleichmäßig markiert. Mit dem bloßen Auge läßt sich folgende Abstufung in der Helligkeit der Fluoreszenzbanden erkennen: H2B > H2A > H4 > H3. Da die Histone an einem intakten nukleosomalen Komplex markiert wurden, kann man annehmen, daß die inneren Lysine der Histone von Farbstoffmolekülen mit etwa 800 Da nicht markierbar sind. In der Tat folgt die abgestufte Helligkeit der Fluoreszenzbanden in etwa der Anzahl der Lysine, die in den Histonschwänzen lokalisiert sind (Spalte 3 von Tab. 4.1), mit einer interessanten Ausnahme: H3 scheint nur sehr schwach markiert zu werden, obwohl sich dort insgesamt 9 potentielle Bindungsstellen befinden. H3 müßte entsprechend seiner Lysine etwa so hell erscheinen wie H2A. Man kann vermuten, daß die N-Termini von H3 durch Wechselwirkungen mit der Linker-DNA von den reaktiven Farbstoffen abgeschirmt werden.

Dem gleichen Helligkeitsmuster folgen auch markierte Mononukleosomen, und Nukleosomenketten verschiedener Länge aus Hühnererythrocyten (nicht gezeigt). Daß die relativen Intensitäten der einzelnen markierten Histone nicht von der Anzahl der Nukleosomen abhängt, liegt an der relativ niedrigen Ionenstärke des Markierungspuffers. Wie in Kap. 2.3.2 erläutert wurde, sind die Wechselwirkungen bei niedrigem Salzgehalt von ~10 mM gering, und die Chromatinfiber kann als eine offene Kette angesehen werden. Dagegen spiegelt das gleiche Markierungsmuster von Chromatin aus COS 7-Zellen und Hühnererythrocyten die Einheitlichkeit der Nukleosomenstruktur bei eukaryontischen Zellen wieder.

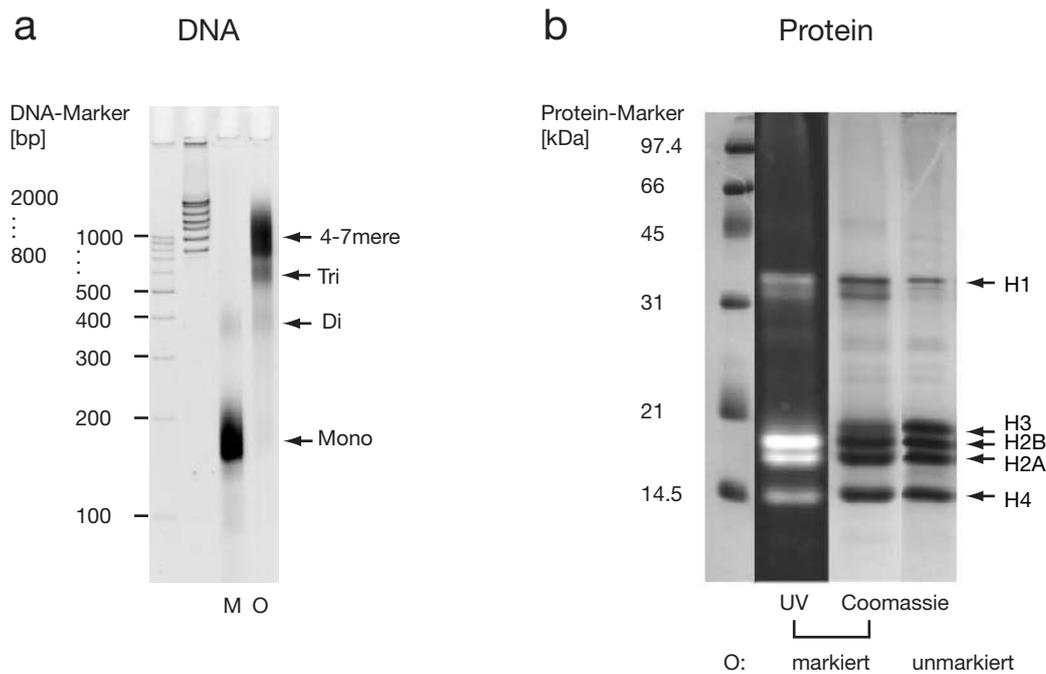


Abbildung 4.3 Darstellung der Nucleosomen auf Gelen

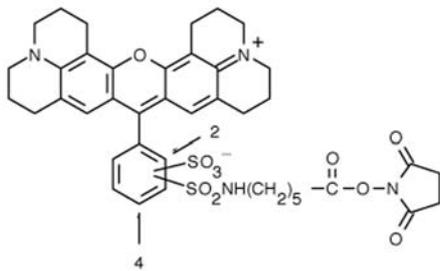
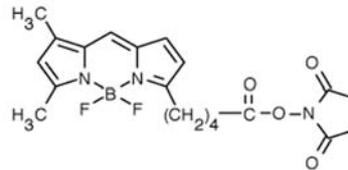
(a) 8%iges natives Polyacrylamidgel. Nucleosomale DNA einer Chromatinpräparation aus COS7-Zellen nach einer Proteinase K-Verdauung; Mononucleosomen (M) und eine Mischung von Oligonucleosomen (O).

(b) Proteinkomposition der Oligonucleosomen aus (a) über SDS-PAGE. Alle vier Core-Histone sind stöchiometrisch vorhanden, außerdem Spuren von H1. UV-Bestrahlung eines ungefärbten Gels zeigt die Fluoreszenz der Histone nach einer Markierung mit Texas Red.

4.2 Zwei-Farben-FCS an einem zweifarbig markierten Standard

Für Austauschexperimente über Kreuzkorrelation müssen zwei Populationen von Komplexen mit unterschiedlichen Farben markiert werden. Die verwendeten Fluorophore sind an die bestehenden Filtersätze des FCS-Moduls anzupassen. Das Zwei-Kanal-Modul wurde von M. Tewes mit den Farbstoffen Fluoreszein und Texas RedTM getestet. Da Fluoreszein eine relativ geringe molekulare Fluoreszenzausbeute liefert und sehr pH-sensitiv ist, wurde für den grünen Kanal ein helleres Derivat, BodipyTM-Fluoreszein (Bodipy-FL, Haugland, 1992), ausgewählt.

Wie in Kap. 3.6.2 erläutert, besteht ein wichtiger Schritt eines Kreuzkorrelationsexperiments darin, die obere Grenze des Meßbereiches durch einen zweifarbig markierten Standard festzulegen. Im folgenden wird das Ergebnis einer solchen Doppelmarkierung charakterisiert, und die Meßergebnisse mit FCS werden an die bereits abgeleitete Theorie angeschlossen. Als Substrat diente eine Chromatinprobe mit Oligonucleosomen, wie sie in Abb. 4.3 auf Gelen dargestellt ist. Das Chromatin wurde mit beiden Farbstoffen in unterschiedlichen Verhältnissen markiert. Das entspricht einer Variation der Markierungswahrscheinlichkeit p_i , um zu testen, wie die Kreuzkorrelations-

a Texas Red™-X, SE**b** Bodipy™-FL, SE**Abbildung 4.4** Strukturformeln der Farbstoffe

amplitude des Standards von der Symmetrie der Besetzung mit grünen und roten Farbstoffen abhängt.

4.2.1 Markierung und Aufreinigung

Die Nukleosomen wurden in die Reaktion mit einer Konzentration von $\sim 40 \mu\text{g/ml}$ nukleosomaler DNA eingesetzt, das entspricht einer etwa ebenso großen Proteinmenge oder etwa 300 nM Histonoktameren. Bei einem Markierungsansatz von 500 μl entspricht dies einer Menge von nur 20 μg Protein. Die Markierung erfolgte unabhängig von der Farbzusammensetzung, mit 20fachem molarem Überschuß des Farbstoffs gegenüber Histonoktameren. Dabei muß beachtet werden, daß der reaktive Farbstoff in einer inerten organischen Phase mit DMSO oder DMF verdünnt wird, um eine vorzeitige Hydrolyse der Succinimidylgruppen zu vermeiden. Die Konzentration der Oligonukleosomen wurde in allen Ansätzen konstant gehalten. Dagegen wurde das Verhältnis von Bodipy-FL : Texas Red in fünf Schritten von 30 : 70 bis 70 : 30 variiert; die verschiedenen Markierungsansätze sind in den Abbildungen von 1 bis 5 bezeichnet, wobei Probe 1 mit 70% Bodipy-FL und 30% Texas Red markiert wurde (siehe auch Abb. 4.7, Mitte). Das Absorptionsspektrum von Probe 1 ist in Abb. 4.5 mit einer dunkleren Linie hervorgehoben und zeigt einen entsprechend hohen Peak im grünen aber einen niedrigen im roten Wellenlängenbereich. Die anderen Ansätze der Reihe (die Proben 2-5) folgen dem linearen Ansatz entsprechend. Die Konzentration der DNA wurde auf diesen Spektren ebenfalls kontrolliert (nicht gezeigt) und bestätigte eine einheitliche Konzentration (Fehler unter 5%) der Oligonukleosomen über die optische Dichte bei 260 nm.

Die Absorptionsspektren nach einer Gelfiltration sind in Abb. 4.5 b zu sehen. Gelfiltration trennt die kleinen Farbstoffmoleküle von den großen nukleosomalen Komplexen über Diffusion in einem Molekularsieb. Die Maxima der Kurven geben für die ursprünglichen Markierungsansätze sowie nach der Gelfiltration in etwa das lineare Verhältnis der eingesetzten Farbstoffe wieder. Berücksichtigt man, daß sich das Probenvolumen bei dem hier durchgeführten Protokoll für die Gelfiltration verdoppelt (siehe Kap. 6.4.3), kann man anhand der Höhe der Spektren abschätzen, daß die Fluorophore in der Lösung auf 1/10 reduziert wurden. Für die asymmetrisch markierten

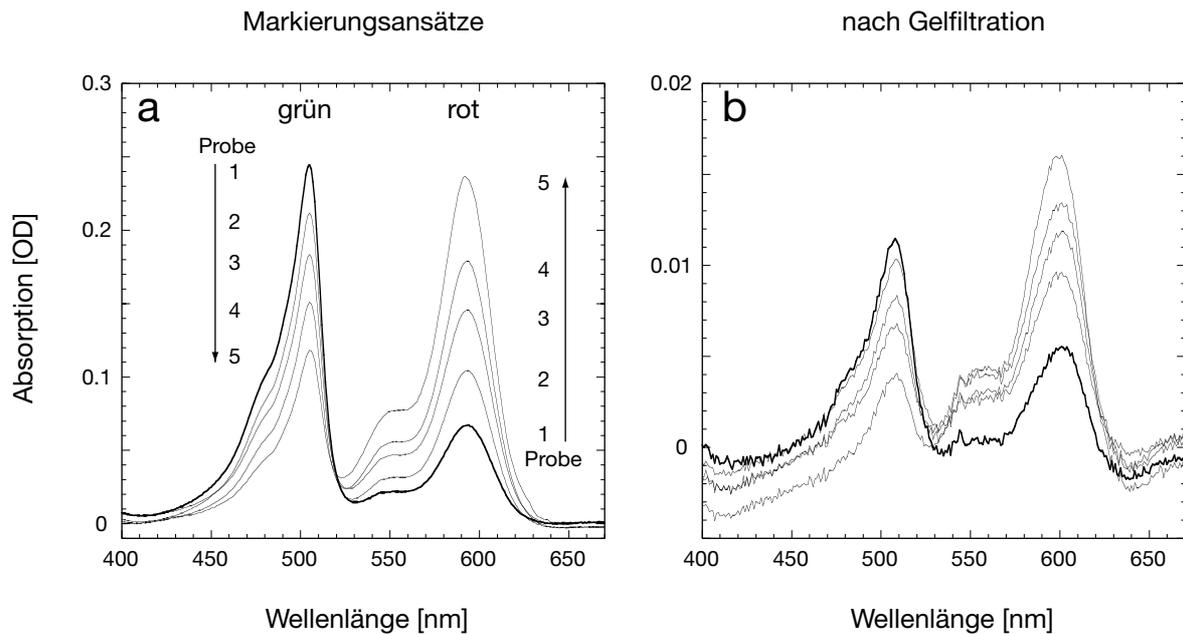


Abbildung 4.5 Absorptionsspektren: Variation der Farbstoffkonzentrationen im Markierungsansatz.
 (a) Die Markierungsansätze von Oligonukleosomen mit den eingesetzten Farbstoffen. Probe 1-5 den Peaks entsprechend. Probe 1 (30% grün und 70% rot) in fett.
 (b) Die gleichen Lösungen nach Gelfiltration.

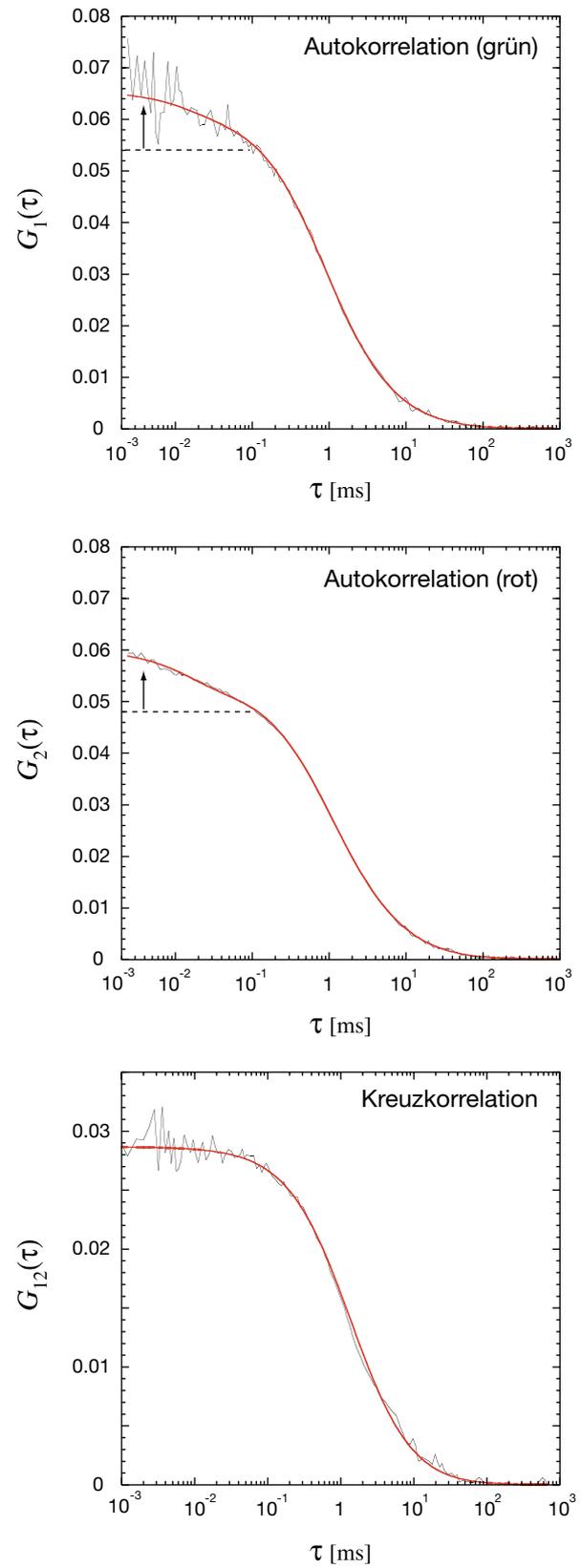
Proben bewegt sich das Spektrum bereits an der Detektionsgrenze und läßt keine sichere Bestimmung der Fluorophorkonzentrationen mehr zu. Es ist im allgemeinen sehr schwierig, absolute Fluorophorkonzentrationen aus Absorptionsspektren abzuleiten, da der Extinktionskoeffizient für verschiedene Pufferbedingungen oft nicht bekannt ist. Außerdem kennt man nicht den Anteil photooxidierter Fluorophore, die zwar absorbieren, aber keine Fluoreszenz abgeben. Die Bindungswahrscheinlichkeit von absorbierenden Farbstoffen in der Lösung kann aber abgeschätzt werden. Unter der Annahme, daß der gesamte Farbstoff nach der Gelfiltration gebunden vorliegt (siehe unten), beträgt die Bindungswahrscheinlichkeit hier etwa 1/10 für den grünen und 1/8 für den roten Farbstoff. Wieviele Fluorophore aber am Substrat deponiert werden, bleibt unbekannt. Ob es sich im rechten Schaubild von Abb. 4.5 um gebundenen oder freien Farbstoff handelt, kann in einem zweiten Schritt mit FCS gezeigt werden.

4.2.2 Zwei-Farben-FCS

Um die FCS-Apparatur zu eichen, wird vor jeder Meßserie freier Farbstoff in TE gemessen. Die Diffusionszeiten von $59.4 \pm 3 \mu\text{s}$ für Bodipy-FL und $92.5 \pm 2 \mu\text{s}$ für Texas Red ergeben die Fokussvolumina von $0.34 \pm 0.02 \text{ fl}^1$ im grünen und $0.52 \pm 0.02 \text{ fl}$ im roten Kanal. Dieser Unterschied steht im Verhältnis 1.52 (rot zu grün) und ist in guter Übereinstimmung mit dem kubischen Verhältnis der Anregungswellenlängen (siehe Kap. 3.3.4).

1. Femtoliter = 10^{-15} Liter

Abbildung 4.6 Korrelationsfunktionen der aufgereinigten zweifarbigen Nukleosomen (Probe 2). An die Autokorrelationskurven wurde eine zweikomponentige Modellfunktion (rot) mit Tripletanteilen nach Gl. (6) angepaßt. Man sieht deutlich, daß bei Kreuzkorrelation nur große zweifarbige markierte Komplexe beitragen, während freier Farbstoff sowie Tripletanteile für Autokorrelationskurven zu einer Erhöhung der Amplitude bei kurzen Korrelationszeiten führen (Pfeile). Weitere Erläuterungen im Text.



Die Korrelationskurven der zweifarbig markierten Oligonukleosomen (Probe 2) sind in Abb. 4.6 gezeigt, die Ergebnisse der Kurvenanpassung in Tab. 4.2. Etwa 90% der Amplitude kann einer einheitlich diffundierenden Komponente (1) mit einer Korrelationszeit von etwa 1 ms zugeordnet werden (Spalte 3 und 6). Dieser Wert ist gegenüber den freien Farbstoffen deutlich verlängert und korrespondiert mit der Diffusionszeit von Oligonukleosomen der vorliegenden Größe (4-7mere, siehe Gel in Abb. 4.3 a). Die Bindung der Fluorophore war also erfolgreich. Man sieht auch an den Diffusionszeiten der Komplexe, daß das Fokusvolumen im grünen Kanal kleiner ist als im roten Kanal und die Diffusionszeit der Kreuzkorrelation nochmals verlängert ist. Letzteres deutet möglicherweise auf einen relativ großen chromatischen Versatz der Foki bei dieser Messung hin (siehe Kap. 3.3.4). Eine schnelle Komponente von ungebundenem Farbstoff konnte an diese Kurven nicht angepaßt werden; dies belegt die hohe Aufreinigungseffizienz der Gelfiltration. Statt dessen erscheint eine sehr langsame Komponente (2) mit Diffusionszeiten von 7-10 ms, doch ist deren relativer Anteil mit etwa 10% gering. Möglicherweise führt eine Verteilung von Komplexen unterschiedlicher Größe (4-7mere) zu einer leichten Disproportionierung der Diffusionszeiten.

Tabelle 4.2 Relative Anteile und Diffusionszeiten der Korrelationskurven in Abb. 4.6.

Kanal	Θ_1 [%]	$\rho^{(1)}$ [%]	$\rho^{(2)}$ [%]	τ_{trip} [ms]	$\tau_{\text{diff}}^{(1)}$ [ms]	$\tau_{\text{diff}}^{(2)}$ [ms]
1	10 ± 2	94 ± 5	6 ± 5	0.01 ± 0.02	0.87 ± 0.1	9.9 ± 8.3
2	10 ± 2	88 ± 8	12 ± 1	0.01 ± 0.02	1.02 ± 0.13	7.42 ± 4.5
1×2	0	100	0	-	1.38 ± 0.05	-

Betrachten wir zunächst die Fluoreszenzintensität der zweifarbig markierten Proben 1-5 in Abb. 4.7 a. Die Ordinate gibt die mittlere Zählrate der beiden Detektionskanäle für alle Markierungsansätze wieder. Um sich die Sensitivität der FCS vor Augen zu führen, vergleiche man mit Abb. 4.5 b: Proben mit OD-Maxima unter 0.05 liefern in der FCS immer noch Intensitäten von einigen 100 kHz^2 . Der lineare Anstieg der Intensitäten spiegelt die linearen Anteilen an eingesetztem Farbstoff wieder, allerdings sind die Fluoreszenzausbeuten sehr unterschiedlich. Trotz symmetrischer Absorptionsspektren ist die Intensität des roten Kanals fast fünffach höher, was mit der erhöhten Sensitivität der Dioden in diesem Spektralbereich, aber auch mit unterschiedlicher Quantenausbeute im gebundenen Zustand zusammenhängen kann. Die strenge Linearität der Intensitäten in Kombination mit der Tatsache, daß der gesamte beobachtete Farbstoff im gebundenen Zustand vorliegt, weist darauf hin, daß die Markierungsreaktion in den vorgelegten Konzentrationen diffusionskontrolliert abläuft und damit die Markierungseffizienz linear von der Konzentration der eingesetzten Farbstoffe abhängt.

2. Der Meßbereich wird hier eher nach oben ausgeschöpft, da Dauerbetrieb mit einer Zählrate von 1 MHz oder höher die Photodioden schädigt

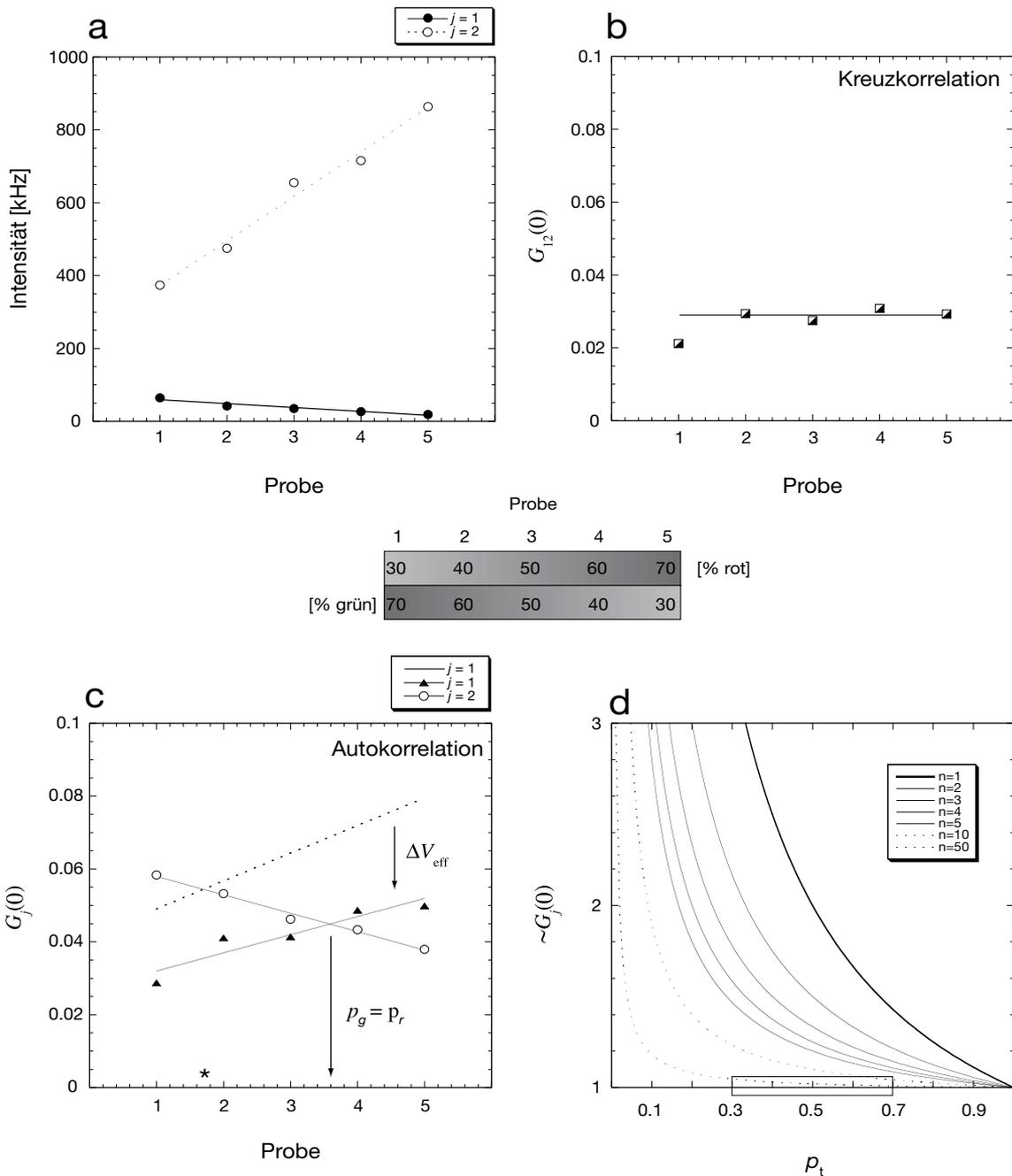


Abbildung 4.7 Auswertung von FCS-Messungen einer zweifarbigen Markierungsreihe. Die ursprüngliche Farbzusammensetzung der Markierungsreihe (Proben 1-5) ist in der Mitte der Abbildung schematisiert.

(a) Mittlere Intensität im Kanal 1 (volle Kreise) und Kanal 2 (offene Kreise).

(b) Kreuzkorrelationsamplitude.

(c) Autokorrelationsamplituden in Kanal 1 wurden mit $\Delta V_{\text{eff}} = 1.52$ korrigiert (volle Dreiecke), um mit den Amplituden in Kanal 2 (offene Kreise) zu vergleichen. Ursprüngliche Lage der Datenpunkte ist durch eine gestrichelte Linie angezeigt. Ein Stern markiert das Markierungsverhältnis für die Experimente in Kap. 4.4.

(d) Simulation von Autokorrelationsamplituden über Gl. (16) für verschiedene Anzahl von Bindungsstellen n . Für große n hängt die Amplitude näherungsweise linear von der relativen Häufigkeit p_t eines Typs von Fluorophor ab (kleiner Kasten). Weitere Erläuterungen im Text.

Der Achsenabschnitt einer Korrelationskurve ist umgekehrt proportional zur Konzentration einer homogenen Spezies. Durch die Markierung der Oligonukleosomen wurden jedoch viele Klassen von spektral unterschiedlichen Teilchen erzeugt, an denen die Fluorophore statistisch verteilt sind. Wie in Kap. 3.4 dargelegt, ist diese Verteilung durch die relative Häufigkeit p_t der Farbstoffe an den n Bindungsstellen vollständig bestimmt. Die Korrelationsamplituden der Markierungsreihe sind in den Schaubildern Abb. 4.7 b und c dargestellt. Die Kreuzkorrelationsamplitude ist für alle Ansätze im Rahmen der Konzentrationsunterschiede konstant. Dieses intuitiv überraschende Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Gl. (18), bei der die Kreuzkorrelationsamplitude nur von der Anzahl der Bindungsstellen, nicht aber von der relativen Häufigkeit der Farbstoffe am Molekül abhängt. Dagegen wird mit Gl. (19) ein reziprokes Verhalten der Autokorrelationsamplituden und p_t vorausgesagt. Dieser Zusammenhang wird im Experiment gut wiedergegeben: Die Amplitude des grünen Kanals steigt, da p_g von Probe 1 bis 5 abnimmt, für den roten Kanal gilt das entsprechend umgekehrt.

Die theoretische Abhängigkeit der Autokorrelationsamplituden von der relativen Häufigkeit der Fluorophore am Komplex wurde mit Hilfe von Gl. (19) in Abb. 4.7 d für einige Werte dargestellt. Der hyperbolische Verlauf schmiegt sich mit zunehmender Anzahl der Bindungsstellen n an die x - und y -Achse an und erzeugt über einen breiten Bereich von p_t einen annähernd linearen Zusammenhang. Eine Entwicklung der Gl. (19) um die Stelle $p_t = 1$ liefert

$$G_j(0) \cong 1 + \frac{1}{n} - \frac{p_t}{n}, \quad (19.1)$$

die Steigung einer angepaßten Geraden ist also für große p gleich dem Kehrwert der Anzahl der Bindungsstellen. Lineare Regression der Datenpunkte in Abb. 4.7 c ergab nach einer Korrektur der unterschiedlichen Fokusvolumina für beide Kanäle eine Steigung von 0.005 und damit eine mittlere Anzahl von 200 Bindungsstellen am Komplex. Mit durchschnittlich 5 Nukleosomen pro Teilchen ergibt sich die Anzahl von etwa 40 Bindungsstellen pro Nukleosom, und dieser Wert scheint realistisch.

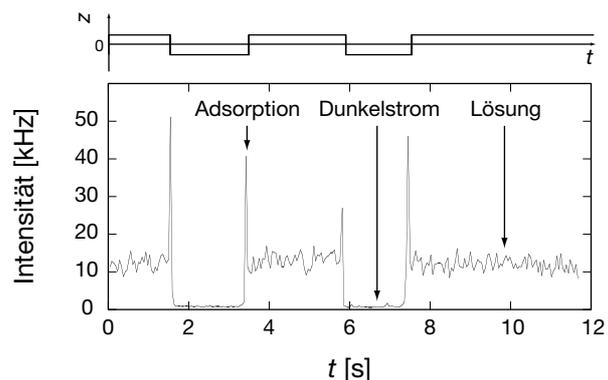
Der Schnittpunkt der Geraden liegt nicht bei Probe 3, einem symmetrischen Ansatz, sondern ist leicht zu höheren Prozenten von Texas Red (64%) und niedrigeren Prozenten von Bodipy-FL (34%) verschoben. Dabei handelt es sich hier um Volumenprozent der über Absorption eingestellten Stammlösungen; die wahre Konzentration an reaktivem Farbstoff ist nur ungenau bekannt. Da der Extinktionskoeffizient, der vom Hersteller in Methanol angegeben wird, von Bodipy-FL ($\epsilon = 87000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) um etwa 80% kleiner ist als der von Texas Red ($\epsilon = 122000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ist es wahrscheinlich, daß bei vergleichbaren Absorptionsmaxima in den Markierungsansätzen (siehe Abb. 4.5 a), die Konzentration an Bodipy-FL größer war als die von Texas Red. Damit konsistent führt eine Markierung mit weniger Volumen Stammlösung von Bodipy-FL zu einer symmetrischen Anzahl von Fluorophoren am Substrat.

Das Ergebnis der Experimente läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Markierung erfolgt unter den genannten Bedingungen diffusionskontrolliert und kann über die Konzentration der Farbstoffe gesteuert werden.
- Die Präparation eines 100% doppeltmarkierten Kreuzkorrelationsstandards muß nicht symmetrisch erfolgen, sofern beide Kanäle ausreichend Intensität zeigen.
- Ein Histonoktamer aus COS7-Zellen enthält etwa 40 Bindungsstellen für aminoreaktive Succinimidylester.
- Mit einer antisymmetrischen Konzentrationsreihe läßt sich über FCS das Markierungsverhältnis bestimmen, bei dem gleichviel rote und grüne Farbstoffe am Substrat gebunden werden.

Natürlich ist es wünschenswert, den Sättigungsgrad der Bindungsstellen aus den Ergebnissen zu extrahieren, aber die Gln. (18) und (19) sind unterbestimmt. Die Sättigung kann nur bestimmt werden, wenn die Konzentration der Fluorophore genau eingestellt oder ihre molekulare Helligkeit in den einzelnen Kanälen berücksichtigt wird. Es stellte sich heraus, daß Texas Red aber auch Bodipy-FL für eine Eichung dieser Art nicht gut geeignet sind. Beide Farbstoffe adsorbieren am Deckglas des Küvettenbodens (Abb. 4.8). Dies sieht man, wenn der Fokus während der FCS-Messung unter $z = 0$ fährt. Bevor die Intensität auf den Dunkelstrom abfällt, erhält man typische Intensitätsspeaks, deren Integral ein Maß für die Menge an adsorbiertem Farbstoff darstellt. Mißt man bei geringen Konzentrationen, kann der relative Anteil von Fluorophor, der dadurch aus der Lösung entfernt wird, signifikant sein. Konzentrationsbestimmungen über die Amplituden sind dann nicht mehr möglich. Mit diesem Phänomen geht auch die Tendenz zur Selbstaggregation einher, was die Eichung der molekularen Helligkeit mit einem „freien Farbstoff“ erschwert. Ein Lösung des Problems über Ein-Farben-FCS wird daher in Kap. 4.4 mit alternativen Farbstoffen vorgestellt.

Abbildung 4.8 Adsorption. Der Fokus wurde in z-Richtung zweimal unter das Deckglas ($z = 0$) gefahren. Die Höhe der Intensitätsspitzen ist ein Maß für die Menge an adsorbiertem Farbstoff am Küvettenboden.



4.3 Salzabhängiger Histon austausch

Die Bindung der Histone im Nukleosom ist relativ stark. Nukleosomen bleiben über einen weiten Bereich von Lösungsparametern wie pH, Ionenstärke und Temperatur (bis zu 50° C) als stabile Einheiten erhalten. Da die Wechselwirkungen vor allem elektrostatischer Natur sind, beeinflusst eine Variation der Ionenstärke ihre Stabilität. Deshalb wurden die meisten Austauschexperimente *in vitro* unter verschiedenen NaCl-Konzentrationen durchgeführt. Es konnte mit analytischer Ultrazentrifugation gezeigt werden, daß oberhalb von 600 mM NaCl die Heterodimere (H2A·H2B) quantitativ dissoziieren (Hansen et al., 1991). Die Frage, ob und bei welchem Salzgehalt Histone in einem Bindungsgleichgewicht stehen, ist nicht eindeutig beantwortet. Histon austausch *in vitro* wurde mit radioaktiv markierten Histonen nachgewiesen. Danach tauscht H1 unter physiologischen Bedingungen „sehr schnell“ in weniger als eine Stunde zwischen den Chromatinfragmenten aus (Caron und Thomas, 1981). Mit der gleichen Methode wurde etwas später gezeigt, daß H2A und H2B einer nativen Chromatinprobe unter moderatem Salzgehalt zu 30% mit exogenen radioaktiven Histonen austauschen, nicht aber H3 und H4 (Louters und Chalkley, 1984). Die Autoren experimentieren mit verschiedenen Ionenstärken und Temperaturen, machen aber über die Chromatinkonzentration im experimentellen Ansatz keine Angaben. Die Interpretation dieser Ergebnisse über eine Gleichgewichtskonstante ist daher nicht möglich.

Auf der Basis der bereits dargestellten Ergebnisse liegt es nahe, den Austausch von Histonen zwischen verschiedenfarbig markierten Oligonukleosomen über Kreuzkorrelation zu verfolgen. Zwei Populationen von Oligonukleosomen (Probe und Konzentration wie oben) wurden mit Texas Red und Bodipy-FL nach Farbe getrennt markiert. Die eingesetzten Farbstoffkonzentrationen wurden gemäß Abb. 4.6 c eingestellt, so daß die zu erwartenden Autokorrelationsamplituden beider Kanäle (ohne Korrektur des Fokusvolumens) in etwa gleich hoch zu erwarten waren (38% Texas Red und 62% Bodipy-FL). Dieses Vorgehen erleichtert die Beobachtung beider Kanäle während der Messung. Die einzelnen Ansätze wurden mit Gelfiltration von ungebundenem Farbstoff befreit und bei der Elution gleichzeitig umgepuffert. Als Elutionspuffer diente TE pH7.5, der mit vier verschiedenen Konzentrationen von NaCl (0, 10, 150 und 300 mM) versetzt war. Unmittelbar nach der Elution wurden die verschiedenfarbigen Populationen gemischt. Die Mischung, wie auch eine nach gleichem Schema zweifarbig markierte Probe von Oligonukleosomen, wurde über mehrere Stunden mit FCS/FCCS beobachtet.

Der Austausch in 0 und 300 mM wurde in einer Zeitserie beobachtet, und der in 10 und 150 mM in einer zweiten. Es wurden über mehrere Stunden abwechselnd Autokorrelations- und Kreuzkorrelationsläufe aufgenommen. Die Amplituden der Messungen sind in Abb. 4.9 a und d gegen die Zeit aufgetragen. In der ersten Meßserie ist außerdem die Kreuzkorrelationsamplitude eines zweifarbigigen Standards gleicher Konzentration dargestellt. Dieser liefert einen Maximalwert, der für einen vollständigen Austausch der Farbstoffe in der Mischungen zu erwarten wäre. Die Kreuzkorrelationsamplitude sinkt über die Meßzeit von 8 Stunden ganz leicht ab. Da die entsprechenden Autokorrelationen ebenfalls linear abfallen, verweist dieser Effekt auf eine Drift des Fokusvolumens während des Experiments.

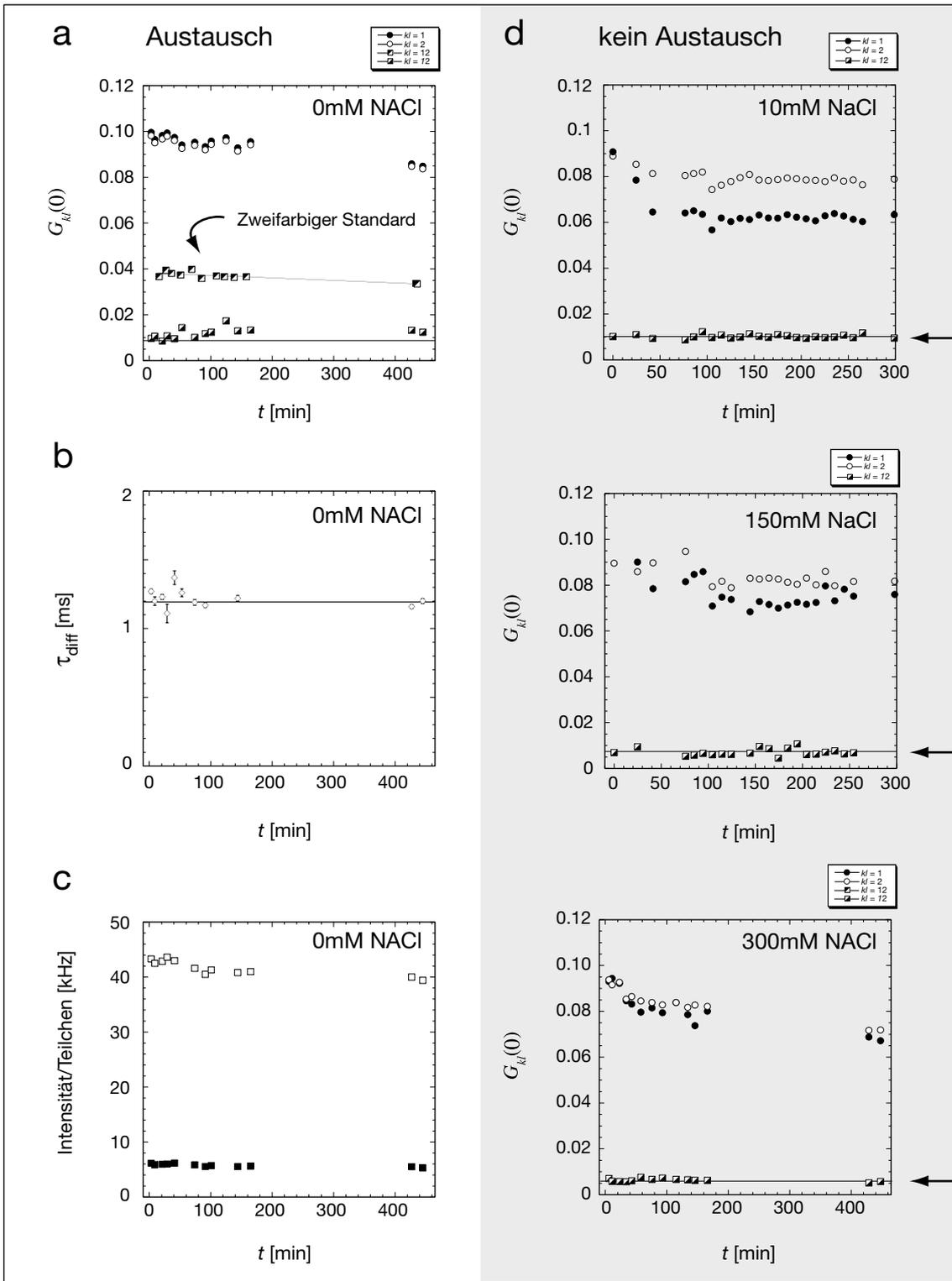
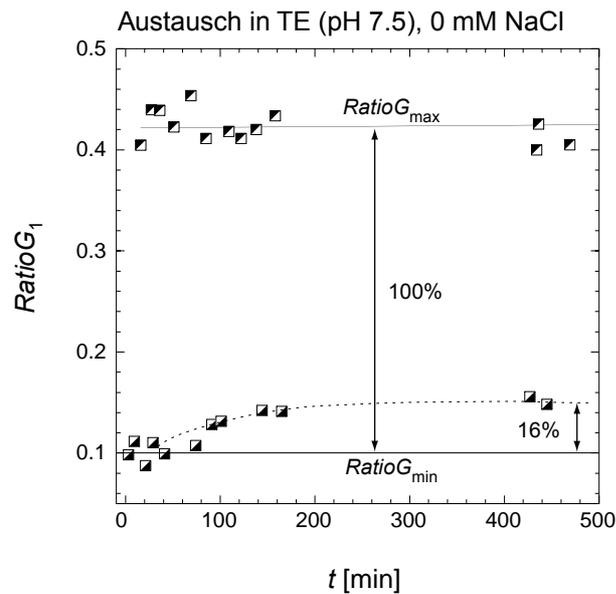


Abbildung 4.9 Auto- und Kreuzkorrelationsamplituden eines Austauschexperiments. Kanal 1 ist mit gefüllten und Kanal 2 mit offenen Symbolen dargestellt, Kreuzkorrelation mit einer Kombination von beidem. **(a)** Geringer Austausch bei 0 mM NaCl, der Anstieg gegenüber dem zweifarbigen Standard ist nur schwach (siehe auch Abb. 4.10). **(b)** Diffusionszeit und **(c)** molekulare Helligkeit der Lösung bei 0 mM NaCl. **(d)** Das Absinken der Auto-korrelationsamplitude bei konstanter Kreuzkorrelation (Pfeile), bedeutet eine zunehmende Dissoziation der markierten Histone zwischen 10 und 300 mM NaCl.

Abbildung 4.10 Histonaustausch. Das Meßfenster wird bei dieser langsamen Kinetik durch den anfänglichen Wert $RatioG_{min}$ und den Wert einer in gleichen Konzentrationen zweifarbig markierten Probe definiert $RatioG_{max}$. Der Austausch von grünen und roten Komponenten ist nach etwa zwei Stunden vollendet und betraf etwa 16% der Fluorophore.



Daß Histone von den Nukleosomenketten dissoziieren, zeigt das Absinken der Autokorrelationsamplituden. Die Kinetik scheint nach etwa einer Stunde äquilibriert und reduziert die Amplitude nur um etwa 10-20%. Die danach stabilisierte Konzentration der Teilchen ist bis zu 20 Stunden konstant. Anhand der Diffusionszeit der Teilchen von etwa 1 ms kann man davon ausgehen, daß die Oligonukleosomen (4-7mere) über die Zeit stabil bleiben. Möglicherweise ist die anfängliche Reduktion der Amplitude auch auf die Dissoziation von H1 zurückzuführen. H1 befindet sich, wie man in Abb. 4.3 b sehen kann, in geringen Mengen noch am Chromatin und wird auch mitmarkiert. Die Kinetik von etwas unter einer Stunde ist auch in Übereinstimmung mit (Caron und Thomas, 1981).

Zu Beginn der Messung liegen die Kreuzkorrelationsamplituden aller Ansätze etwa bei 0.01. Diese Grundlinie wird durch Übersprechen der Farbstoffe bestimmt. Über die Meßzeit von mehreren Stunden bleibt dieser Wert für die Proben in 10-300 mM NaCl konstant. Dies bedeutet, daß die dissoziierten Histone in Lösung bleiben und nicht wieder an die Nukleosomenketten binden; es findet kein Austausch von rot und grün markierten Histonen zwischen den Chromatinketten statt. In der Lösung mit 0 mM NaCl stellt sich dagegen sehr langsam eine leichte Erhöhung der Kreuzkorrelationsamplitude ein. Ob sich dissoziierte Histone anlagern oder ganze Nukleosomen multimerisieren, ist hier zunächst nicht ersichtlich. Beide Prozesse führen zu einer kleineren Auto- und einer größeren Kreuzkorrelationsamplitude.

Zwei Indizien sprechen für einen Austausch und gegen eine Multimerisierung: (1.) bleiben die Diffusionszeiten relativ konstant. Bei manchen Kurven mußten zwar wenige Prozent einer langsameren zweiten Komponente angepaßt werden, diese Abweichung wuchs aber nicht systematisch mit der Meßzeit. Die Unsicherheit besteht hier lediglich in der schlechten Auflösung der Diffusionszeiten. Eine Dimerisierung von 10% der Teilchen würde sich bei der Kurvenanpassung nicht

extrahieren lassen. (2.) In Abb. 4.9 c ist das Produkt aus Amplitude und mittlerer Intensität im zeitlichen Verlauf abgebildet. Das entspricht bei einer einfarbigen Lösung von Fluorophoren der Fluoreszenzausbeute pro einzeltem Teilchen. Da aufgrund der Verteilung von molekularen Helligkeiten die Amplitude nicht mehr die korrekte Teilchenkonzentration widerspiegelt, ist das Produkt hier eine dazu proportionale Größe. Multimerisierung würde diesen Wert jedoch erhöhen, was die Daten nicht bestätigen: Die Fluoreszenzausbeute der Lösung bleibt im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.

Wie in Kap. 3.6 dargestellt, ist der Quotient von Auto- und Kreuzkorrelation ein geeignetes Maß für den Anteil an zweifarbigen Komplexen in der Lösung. Abb. 4.10 zeigt die Kinetik des Austauschs über mehrere Stunden. Insgesamt tauschen nur 16% der Teilchen aus.

Wie ist dieses Ergebnis zu interpretieren? In sehr niedrigen Ionenstärken wirken zwischen den Austrittsenden der DNA starke repulsive Kräfte, da die Ladungen dieser Abschnitte nicht quantitativ von Linker-Histonen und nur schwach durch die Kationen der Lösung abgeschirmt sind. Dies führt zu einer Vergößerung des Öffnungswinkels sowie möglicherweise dazu, daß weniger Bp am Histonoktamer gebunden sind. Die Konformationsänderung bei niedrigem Salz könnte Bindungsstellen freisetzen, an die dissoziierte Histone binden. Es sei bemerkt, daß in 300 mM NaCl eine größere Menge an Histonen dissoziieren, diese aber an den Nukleosomenketten nicht wieder gebunden werden. Der Mechanismus des Austauschs bleibt hier Spekulation.

Zusammenfassung:

- Oligonukleosomen sind in freier Lösung mit einer Konzentration von etwa 150 nM Histonoktameren bei einem Salzgehalt von 10 bis 300 mM NaCl über viele Stunden stabil und zeigen keinen Austausch von Histonkomponenten.
- Geringe Mengen (~10%) von fluoreszierenden Histonen dissoziieren; dieses Verhalten ist bei 10 mM NaCl ausgeprägter als bei 300 mM.
- Bei 0 mM NaCl (aber in TE) reassoziert ein Anteil (~16%) der Histone wieder am nukleosomalen Komplex; Histone werden also zwischen den Nukleosomenketten ausgetauscht.

Der Versuchsansatz weist zwei Nachteile auf: (1.) einzelne Histonklassen können bei diesem Markierungsverfahren nicht unterschieden werden. (2.) aufgrund der unbestimmten Anzahl der Fluorophore an den Histonen geben die Amplituden nur relative Konzentrationsänderungen wieder, sind aber nicht auf absolute Teilchenzahlen geeicht. Dies erschwert die Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten. Dennoch ist das System dazu geeignet, z.B. enzymvermittelten Austausch von Histonen zwischen verschiedenen Nukleosomenketten nachzuweisen und die Kinetik im Minutenbereich aufzulösen.

4.4 Charakterisierung einer Markierung mit Ein-Farben-FCS

Die Markierung von Histonen kann auf Gelen und mit FCS semiquantitativ verifiziert werden, doch ist es für Bindungsstudien unerlässlich, die Amplituden an absolute Konzentrationen anzuschließen. Zweitens ist es aus biochemischer Sicht wünschenswert, den Sättigungsgrad der Bindungsstellen am Substrat zu kennen; ist dieser zu hoch, kann die biologische Funktion des Proteins beeinträchtigt sein. Die Analyse erfolgt in zwei Schritten: erstens die Bestimmung der Fluoreszenzlöschung des Fluorophors im gebundenen Zustand an einer Unterschlußmarkierung und zweitens die Bestimmung der Anzahl der gebundenen Fluorophore am Substrat.

4.4.1 Auswahl der Farbstoffe

Wegen der bereits diskutierten „Klebrigkeit“ von Texas Red und Bodipy-FL wurden eine ganze Reihe von Farbstoffen auf diese Eigenschaft getestet. Dazu wurden verschiedene Farbstoffe in TE pH 7.5 in der Konzentration von 1 nM gelöst und in der FCS gemessen. Bei der Messung wurde der Laserfokus wie in Abb. 4.8 dargestellt unter das Deckglas gefahren und die Höhe der Intensitätsspitzen als ein Maß für die Adsorption gewertet. Die Konzentrationen der Stammlösungen wurden über Absorptionsspektroskopie unter Bezug auf publizierte Extinktionskoeffizienten (Haugland, 1992) bestimmt. Da mit Detergenzien die Adsorption verringert werden kann, wurde

Tabelle 4.3 Adsorption verschiedener Farbstoffe

Farbstoff	# Katalog ^a	Farbe	Adsorption in TE	Adsorption in TEB	molekulare Helligkeit ^b
Fluoreszein	C-194	grün	keine	keine	1
Bodipy FL	D-6184	grün	mittel	schwach	3.3
Rh Green	R-6107	grün	schwach	keine	5.6
Alexa 488	A-10254	grün	keine	keine	6.6
Texas Red	D-6134	rot	stark	stark	-
BP-TRX	D-6116	rot	stark	stark	-
TAMRA	T-6105	rot	stark	mittel	-
ROX ^c	R-491	rot	stark	mittel	-
Alexa 568	A-10238	rot	keine	keine	-

^a. *Molecular Probes*

^b. Die molekularen Helligkeiten sind auf Fluoreszein bezogen. Keine Berücksichtigung der Triplettwahrscheinlichkeit.

^c. als Isothiocyanat, alle anderen Farbstoffe als Succinimidylester

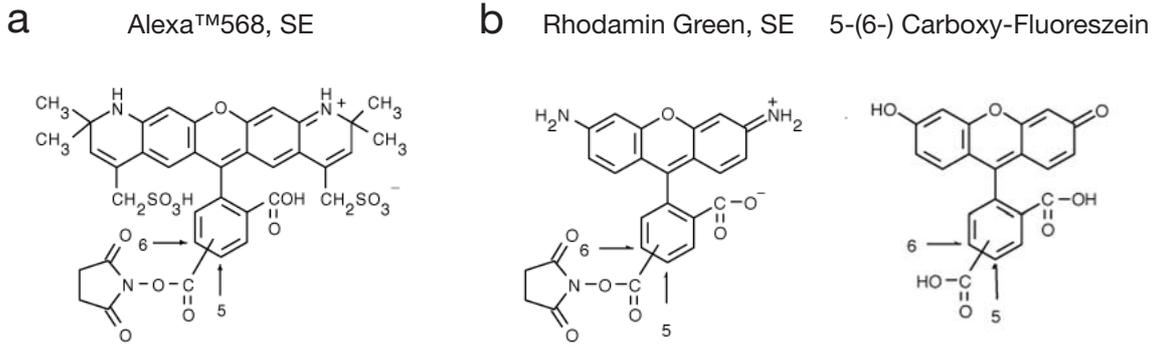


Abbildung 4.11 Nicht-klebrige Farbstoffe: **(a)** Alexa 568 für Kanal 2 und **(b)** Rh Green für Kanal 1. Mit Fluoreszein wurden die Diffusionszeiten und molekularen Fluoreszenzausbeuten geeicht.

eine Serie in TE mit 0.01% Brij-35 (TEB) gemessen. Brij-35 hat gegenüber dem gängigen Detergenz Nonidet-P40 den Vorteil, im kurzwelligen Bereich nicht zu absorbieren. Dies erlaubt die Bestimmung von Chromatinkonzentrationen über die Absorption bei 260 nm. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.3 zusammengefaßt.

Es zeigt sich, daß neben Fluoreszein noch die beiden Alexa-Farbstoffe und Rhodamin Green (Rh Green) vollständig in Lösung bleiben. Insgesamt kleben die roten Farbstoffe stärker als die grünen. Die Klebrigkeit konnte mit dem Detergenz Brij-35 zwar verringert, aber außer bei Rh Green nicht völlig verhindert werden. Da die Sensitivität im grünen Kanal limitierend ist, wurde noch die molekulare Helligkeit aus dem Produkt von Amplitude und mittlerer Intensität ermittelt und auf den entsprechenden Wert von Fluoreszein bezogen. Die grünen Farbstoffe sind nach aufsteigender Helligkeit aufgelistet. Die Fluoreszenzausbeute von Fluoreszein zu Alexa 488 unterscheidet sich um den Faktor 6 und belegt die Überlegenheit dieser neuen Verbindungen. Weitergehende Experimente wurden mit dem Fluorophorpaar Rh Green und Alex 568 durchgeführt. Die Klebrigkeit von Rh Green ist vernachlässigbar klein und die molekulare Helligkeit etwa fünfmal größer als die von Fluoreszein.

Der Diffusionskoeffizient von Fluoreszein beträgt $D_t = 2.6 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (Swaminathan et al., 1996). Um Diffusionszeiten direkt in Kanal 2 an absolute Diffusionskonstanten anschließen zu können, wurde Alexa 568 in einer Zwei-Kanal-Messung mit Fluoreszein verglichen. Abb. 4.12 zeigt, wie deutlich die Farbstoffe in den anderen Kanal übersprechen. Die Korrelationsfunktionen der Farbstoffe beider Kanäle sind vergleichbar und unterscheiden sich lediglich in ihrer Verauschtheit. Übersprechen ist also in beide Richtungen signifikant. Fokusvolumina und Untergrund verschieben etwas die Amplituden. Die Diffusionszeiten der Anpassung einer einkomponentigen Modellfunktion mit Triplettanteil sind in Tab. 4.4 aufgelistet.

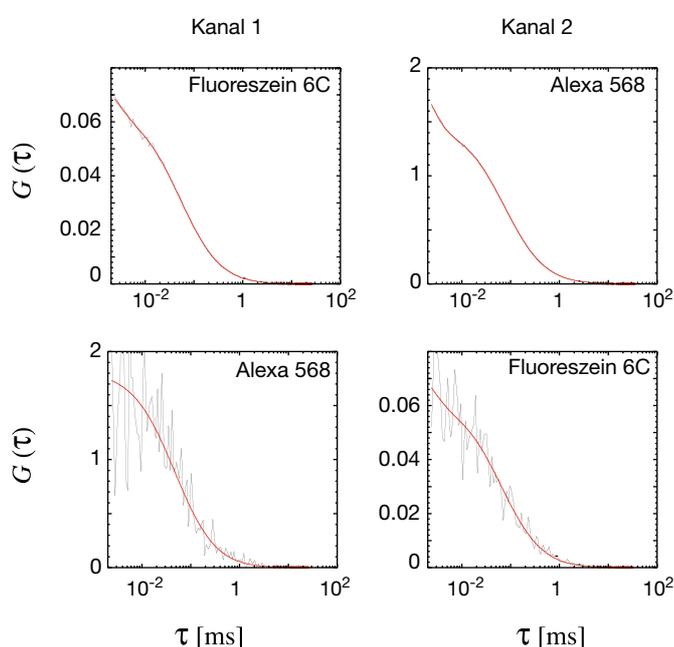
Die Diffusionszeiten beider Farbstoffe sind im Kanal 2 länger und der Unterschied entspricht im Rahmen des Meßfehlers dem Volumenverhältnis der Anregungsfoki. Aus den Diffusionszeiten in

Kanal 2 und dem Literaturwert des Diffusionskoeffizienten für Fluoreszein kann letzterer direkt über $D_1 = D_2\tau_1/\tau_2$ für Alexa 568 abgeleitet werden.

Tabelle 4.4 Diffusionszeiten freier Farbstoffe beider Kanäle aus Abb. 4.12

Farbstoff	τ_{diff} in Kanal 1 [μs]	τ_{diff} in Kanal 2 [μs]	D_t [$10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$]
Fluoreszein	52 ± 1	65 ± 14	2.6
Alexa 568	48 ± 22	75 ± 1	2.3 ± 0.5

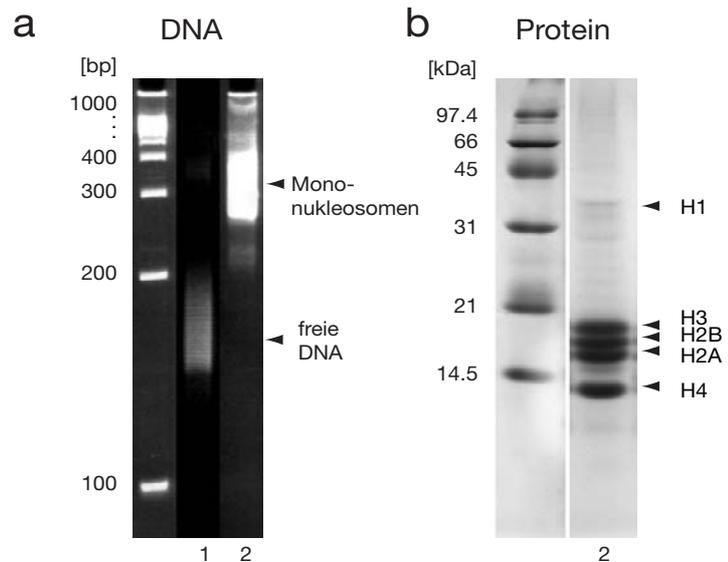
Abbildung 4.12 Korrelationsfunktionen zweier Farbstoffe im Zwei-Kanal-System. Das Signal spricht über und korreliert mit geringerer, aber signifikanter molekularer Helligkeit.



4.4.2 Unterschußmarkierung

Als Substrat wurden Mononukleosomen aus COS7-Kulturzellen eingesetzt. Mononukleosomen sind in ihrer Partikelgröße besser definiert als eine Verteilung von Oligonukleosomen, wie sie oben beschrieben wurde. Mononukleosomen wandern auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel als Komplex in das Gel. Die Färbung mit Ethidiumbromid bei nativen Nukleosomen ist etwa auf 30% verringert, aber Mengen von etwa $1 \mu\text{g}$ nukleosomaler DNA können noch gut angefärbt werden (Titration nicht gezeigt). Über native Gele kann der Dissoziationsgrad der Nukleosomen, d.h. der Anteil der freien DNA in der Probe quantifiziert werden. Dies diente als Stabilitätskriterium vor und nach bestimmten Arbeitsschritten oder bei längerer Lagerung der Nukleosomen. Abb. 4.13 zeigt die intakten Komplexe mit einem vollständigen Besatz von Core-Histonen. Die Proben enthalten kein H1. Lediglich die Bande von H3 scheint leicht durch Proteolyse verringert.

Abbildung 4.13 Darstellung von Mononukleosomen mit PAGE.
(a) Natives 8%iges Gel auf dem die nukleosomale DNA im Komplex (2) und nach Proteinase K-Verdauung (1) aufgetragen wurde.
(b) SDS-PAGE der Histone intakter Mononukleosomen (2).



Zwei Ansätze von Mononukleosomen wurden in einer Konzentration von 340 µg/ml nukleosomaler DNA, das entspricht 2.5 µM Histonoktameren, mit zehnfachem molarem Überschuss über Succinimidylester markiert. Da bei den Reaktionen nur etwa 1/10 der Farbstoffe gebunden wurden (siehe Kap. 4.2.1), kann man bei diesem Verhältnis voraussetzen, daß jedes markierte Nukleosom höchstens einen Fluorophor trägt. Die zwei Reaktionsansätze wurden anschließend gegen TE pH 7.5 mit 20 mM NaCl (TE20) dialysiert, wodurch ein Teil des ungebundenen Farbstoffs entfernt wurde. Für FCS wurde die Probe nochmals 1/100 in TEB20 verdünnt; das B steht für 0.01% Brij-35. Die Messungen erfolgten mit Zwei-Farben-Anregung. Es wurden 20 Läufe 12 s lang, d.h. 4 min gemessen.

Abb. 4.14 zeigt über die Amplituden normalisierte Korrelationsfunktionen, um einen Vergleich der Korrelationszeiten der Markierungsansätze mit freiem Farbstoff zu ermöglichen. Dieser wurde bei gleichen experimentellen Bedingungen parallel aufgenommen. Die Verlängerung der Diffusionszeit deutet auf eine gebundene Fraktion des Farbstoffs im Markierungsansatz. Im roten Markierungsansatz ist der Versatz zu längeren Zeiten weniger ausgeprägt; es scheint entweder weniger Farbstoff gebunden oder bei der Dialyse entfernt worden zu sein. Anpassung der Modellfunktion mit *Quickfit* gibt diesen Sachverhalt quantitativ wieder. Danach befinden sich in der Alexa 568-Probe nur 35% gebunden und in der Rh Green-Probe 46%. Doch die relativen Anteile der Amplituden geben bei veränderter molekularer Helligkeit nicht dem Anteil der sie repräsentierenden Moleküle wieder. Dieser Effekt wird durch Abweichungen des Produkts von Amplitude und mittlerer Intensität angezeigt. Für die Rh Green-Probe sinkt dieser Wert z.B. von 11.8 auf 7.5 kHz/„Teilchen“. Eine Anwendung der Gln. (24) und (25) liefert unter Berücksichtigung der Intensitäten die korrigierten relativen Anteile $\rho_{\text{kor}}^{(s)}$ und den Faktor η , um den sich die beiden Komponenten in ihrer Helligkeit unterscheiden.

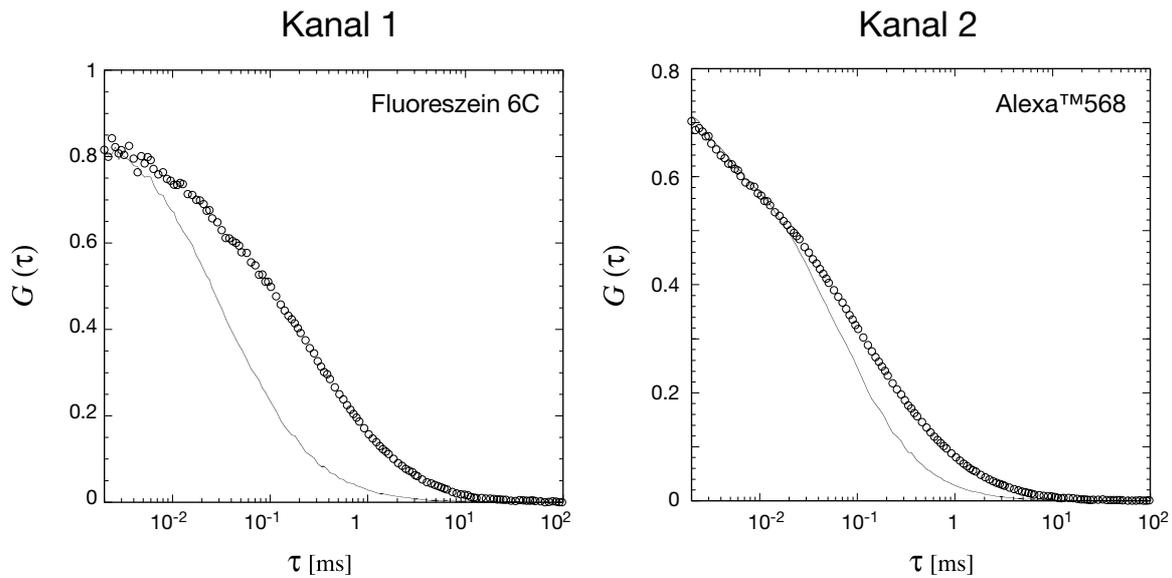


Abbildung 4.14 Ein-Farben-FCS einer unvollständig aufgereinigten Markierung. Normalisierte Korrelationskurven der Markierung (Kreise) im Vergleich mit ungebundenem freiem Farbstoff (Linie). Der Anteil des an die Mononukleosomen gebundenen Farbstoffs verschiebt die Kurve zu längeren Korrelationszeiten.

In Tab. 4.5 sind die Fitparameter und die korrigierten Werte aufgelistet. Beide Farbstoffe sind etwa um den Faktor 0.5 in ihrer Emission gelöscht. Die Korrektur bewirkt, daß sich die relativen Anteile der freien und gebundenen Alexa 568-Moleküle gerade umgekehrt verhalten wie die Amplituden: 38% der Fluorophore sind frei und 62% in einem gebundenen Zustand. Für Rh Green ist der Effekt aufgrund der größeren Löschung noch drastischer. Diese Zahlen geben wieder, daß die relativen Anteile der Amplituden zugunsten der helleren Komponente verschoben sind, da die charakteristischen Intensitäten quadratisch in die Korrelationsfunktion eingehen. Mit Hilfe von η kann unter Anwendung von Gl. (11) nun die Konzentration an diffundierenden Teilchen bestimmt werden (Tab. 4.5, letzte Spalte), die im vorliegenden Fall der Konzentration der Fluorophore selbst entspricht.

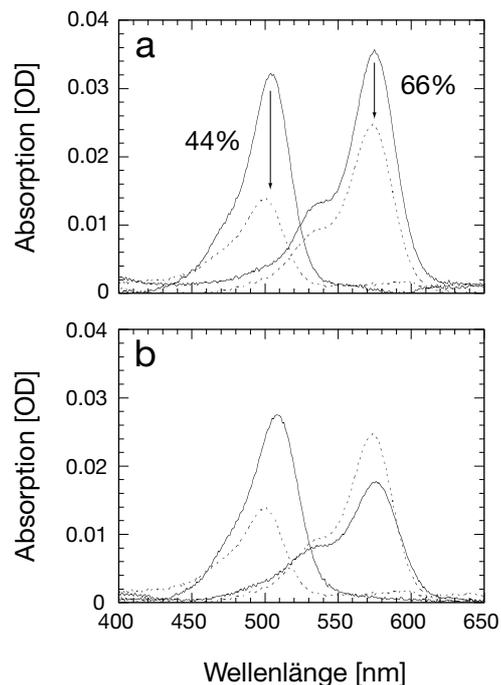
Tabelle 4.5 Korrektur der Fluoreszenzlöschung für Kurven in Abb. 4.14

Markierung	$\rho^{(1)}$	$\rho^{(2)}$	$\langle N_{\text{ob}} \rangle$	$\rho_{\text{kor}}^{(1)}$	$\rho_{\text{kor}}^{(2)}$	$\langle N_{\text{ob}} \rangle_{\text{kor}}$	η	c [nM]
Rh Green	54%	46%	1.23	18%	82%	1.43	0.44	7.3
Alexa 568	65%	35%	0.7	38%	62%	0.76	0.57	4.5

Die Konzentrationswerte wurden an den unverdünnten Markierungsansätzen durch Absorptionsspektroskopie verifiziert. Die Spektren sind in Abb. 4.15 abgebildet. Die OD-Werte entsprechen

einem Lichtweg von 1 cm. Die molaren Extinktionskoeffizienten sind bei *Molecular Probes* für Rh Green mit $\epsilon = 78\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in Methanol angegeben; für Alexa 568 wird im Markierungsprotokoll der Wert $\epsilon = 91\,300\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ notiert, aber über die Pufferbedingungen keine Angaben gemacht. Wir nehmen an, daß sich dieser Wert auch auf eine Messung in Methanol bezieht. Abb. 4.15 a macht deutlich, daß die Extinktion der Farbstoffe in TE20 gegenüber Methanol stark reduziert ist. Unter Berücksichtigung der hier quantifizierten Verringerung von ϵ wurde die Konzentration an Fluorophoren im Markierungsansatz mit Alexa 568 zu 3.2 nM und mit Rh Green zu 8.5 nM errechnet. Diese Werte sind in bemerkenswerter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der FCS (Tab. 4.5, letzte Spalte) und bestätigen die Validität der Theorie im Experiment.

Abbildung 4.15 Absorptionsspektren der Markierungsansätze.
(a) Reduktion der Extinktionskoeffizienten für freien Farbstoff in Methanol (durchgezogen) und TE20 (gestrichelt) beträgt 44% für Rh Green und 66% für Alexa 568.
(b) Markierungsansätze (durchgezogen) im Vergleich zu freiem Farbstoff in TE20 (gestrichelt).



Die gesamte Vorgehensweise der Eichung ist in Abb. 4.17 in einem Flußdiagramm nochmals zusammengefaßt.

4.4.3 Aufreinigung mit Gelfiltration

Mit der Information der molekularen Fluoreszenzausbeute der Farbstoffe im gebundenen Zustand lassen sich FCS-Daten nun auf absolute Teilchenkonzentrationen zurückführen. Als Anwendung wurde eine Markierung von Mononukleosomen durchgeführt und der Reaktionsansatz mit Gelfiltration aufgereinigt. Dies entspricht einer Vorgehensweise, wie sie bei synthetischen Markierungen häufig angewandt wird.

Mononukleosomen wurden dazu in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ nukleosomaler DNA, das entspricht 760 nM Histonoktameren, mit 20fachem molarem Überschuß über Succinimidylester

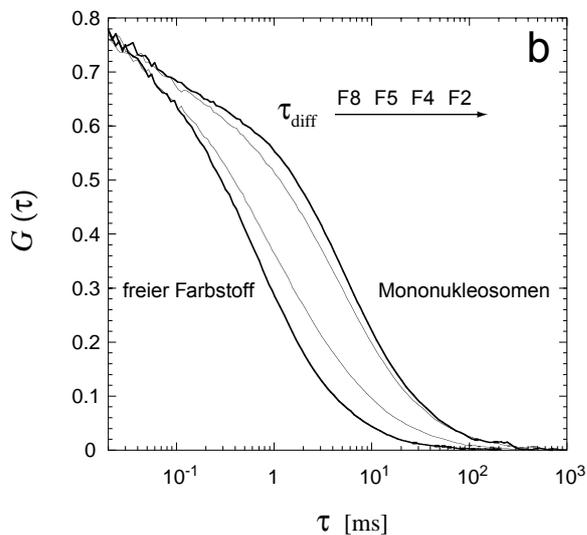
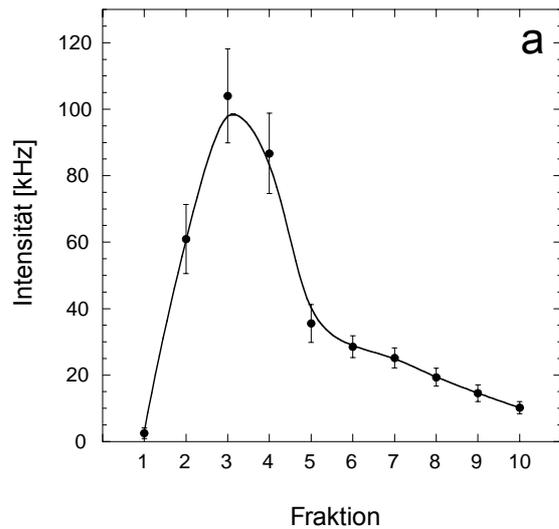
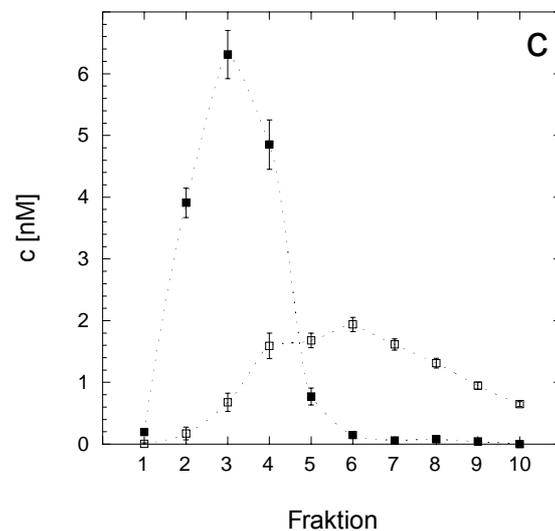


Abbildung 4.16 Elutionsprofil einer Gel-filtration.
(a) Intensität, wie man sie auch im Fluorimeter detektieren würde.
(b) Darstellung der normalisierten Korrelationskurven einzelner Fraktionen. F2 und F8 laufen parallel aber versetzt.
(c) Elutionsprofil, wie es sich aus den absoluten molaren Anteilen der gebundenen und freien Fluorophore zusammensetzt.



mit Alexa 568 markiert. Die Säule wurde in 200 μ l-Aliquots (F1-F10) eluiert; die Fraktionen F1 bis F5 entsprechen dem protokollmäßigen Elutionsvolumen von 1 ml, die Fraktionen F6 bis F10 einem sich anschließenden Waschschrift. An allen Fraktionen wurden mit FCS die molekularen Anteile von freiem und gebundenem Farbstoff bestimmt. Ein solches Profil zeigt Abb. 4.16. Die Fluoreszenzintensitäten sind in F3 maximal, also der Mitte des vorgesehenen Elutionsprofils. Da die Mononukleosomen zuerst eluiert werden, ist dies bereits ein Hinweis auf eine erfolgreiche Bindung. Erwartungsgemäß zeigen die ersten Fraktionen eine deutlich verlangsamte Diffusionszeit. In Abb. 4.16 b wird illustriert wie die Diffusionszeit mit fortschreitender Elution abnimmt. F2 und F8 repräsentieren mit ihrem parallelen Verlauf die reinen Diffusionspezies des gebundenen und freien Farbstoffs. Die Fraktionen dazwischen vermitteln zwischen den Kurven und enthalten entsprechende Mischungen.

Die Auswertung der relativen Anteile ergibt Schaubild 4.16 c. Hier ist die Zusammensetzung der einzelnen Komponenten aufgeschlüsselt. Es fällt auf, daß der Verlauf der addierten Kurve dem der

Auswertung einer Fluoreszenzmarkierung mit Ein-Farben-FCS

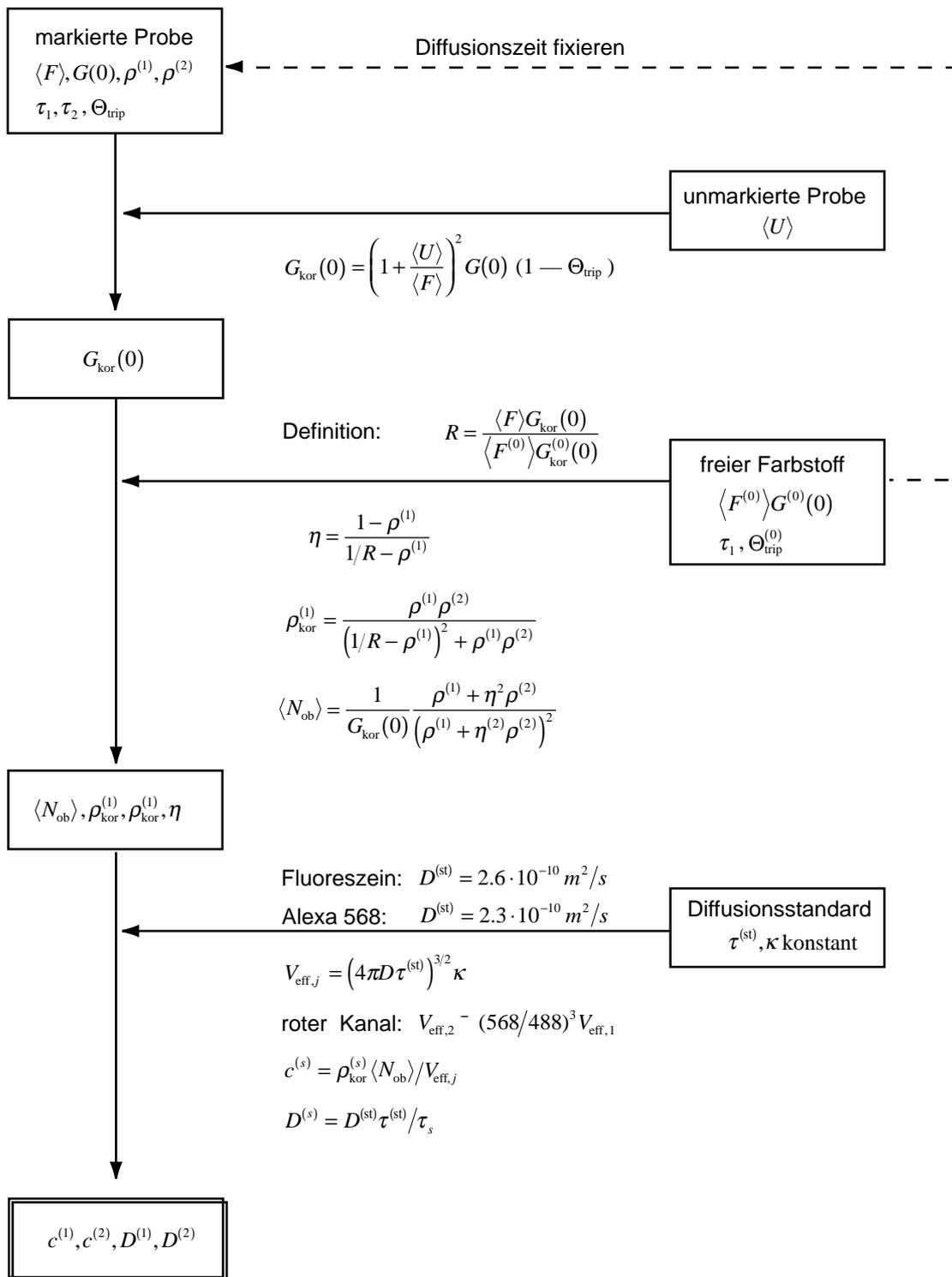


Abbildung 4.17 Flußdiagramm.

Intensität etwa entspricht. Dies ist bei einer Mischung von zwei unterschiedlich hellen Spezies keineswegs immer der Fall. Auskunft über diesen Sachverhalt gibt die Auswertung der molekularen Helligkeiten. Für jede der Fraktionen, die freien Farbstoff und Monokleosomen enthalten, kann das Verhältnis der Fluoreszenzausbeute bestimmt werden. Dieser liegt für die ersten 5 Fraktionen bei 1 ± 0.08 ; d.h. die Mononukleosomen und der freie Farbstoff sind gleich hell. Berücksichtigt man $\eta = 0.57$ für einen einzelnen Alexa 568-Fluorophor, bedeutet das, daß an den Mononukleosomen durchschnittlich 1.75 Fluorophore gebunden haben. Über die Diffusionszeit von freiem Alexa 568 kann nun auch der Diffusionskoeffizient mit $2.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ angegeben werden, und dieser befindet sich in guter Übereinstimmung mit der Literatur (Marion et al., 1985).

Autofluoreszierendes Chromatin

5.1 Einleitung

Lichtmikroskopische Darstellung von Chromatin *in situ* erfolgt traditionell über selektive Anfärbung der DNA in permeabilisierten und fixierten Zellen (Feulgen, Ethidiumbromid, Hoechst 33342, DAPI). Trotz der Fülle der hierzu erscheinenden Literatur sind quantitative Arbeiten eher die Ausnahme. Belmont und Mitarbeiter präsentierten eine Studie, in der die räumliche Verteilung von DNA in HeLa-Zellkernen digital untersucht wurde. Feulgengefärbte Zellpräparate wurden eingescannt und die Bilder statistisch ausgewertet (Belmont et al., 1984). Ausgehend von Häufigkeitsverteilungen der optischen Dichte in den Bildern konnten zwei klar unterscheidbare Zustände für Chromatin abgeleitet werden und sogar ein dritter Zustand bei niederen Konzentrationen für eine Population verhältnismäßig kleiner Kerne. Die Begriffe Eu- und Heterochromatin werden in diesem Zusammenhang, wenn auch vorsichtig, diskutiert.

In den letzten Jahren wurde auf dem Feld der Chromatinvisualisierung einiger Fortschritt erzielt, so konnte z.B. die DNA in lebenden Zellen fluoreszenzmarkiert werden (Zink et al., 1998). Mit dieser Methode gelang es, einzelne Replikationsdomänen nachzuweisen: zusammenhängende Abschnitte des Chromosoms, die in der Interphase in einem Raumbereich von 400-800 nm Durchmesser als Einheit repliziert und über den Zellzyklus hinweg lichtmikroskopisch verfolgt werden können. Auf der anderen Seite wurden die mikroskopischen Methoden ebenfalls weiterentwickelt: Konfokale Mikroskopie erlaubt die einfache Aufnahme digitaler Bilder mit einer beugungsbegrenzten räumlichen Auflösung. Eine alternative Methode zur Fluoreszenzmarkierung von Chromatin wurde von K. Sullivan und Mitarbeitern eingeführt (Kanda et al., 1998). Mit dem Ziel, Chromosomensegregation *in vivo* lichtmikroskopisch zu verfolgen, wurde ein DNA-Vektor kloniert, der für ein autofluoreszierendes Histonfusionsprotein, H2B-green fluorescent protein (H2B-GFP), codiert. Über Transfektion kann das Gen in das Zellgenom integriert werden. Es wurde eine stabile HeLa-Zelllinie selektiert, die das Konstrukt konstitutiv exprimiert. Die Autoren konnten zeigen, daß das Histonfusionsprotein in die Nukleosomenstruktur integriert wird: Die Chromosomen akkumulieren dadurch eine starke Fluoreszenz, und ihre Form und Position kann über Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

Die Funktionalität der fluoreszierenden Histonkonstrukte wurde daraufhin in einer Reihe von Publikationen unter Beweis gestellt. Techniken, die das Bleichen der Fluorophore (*engl.* Blea-

ching) bei hohen Intensitäten ausnutzen, z.B. FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) oder FLIP (fluorescence loss in photobleaching), wurden erfolgreich angewandt, um die Austauschkinetik des Linker-Histons H1, aber auch von anderen Kernproteinen, zwischen verschiedenen Kompartimenten des Interphase-Chromatins *in vivo* zu charakterisieren (Lever et al., 2000; Misteli et al., 2000; Phair und Misteli, 2000). In diesen Arbeiten dienten Zellen, die H2B-GFP exprimieren, als eine Negativkontrolle für eine vollständig immobilisierte Komponente im Zellkern. Des Weiteren wurde über Gegenfärbung der DNA gezeigt, daß die Verteilung der Histonkonstrukte mit der Verteilung der DNA in etwa übereinstimmt (Sadoni et al., 2001).

Die schnelle Rezeption dieser Methode bei funktionellen Fragestellungen im Zusammenhang mit Chromatin belegt, daß diese Art der Chromatinvisualisierung sehr hilfreich ist, um sich innerhalb des Zellkerns zu orientieren (Dey et al., 2000; Monier et al., 2000; Perche et al., 2000). Die jüngste Publikation zu diesem Thema untersuchte den Austausch einzelner Core-Histone über längere Zeiträume mit FRAP (Kimura und Cook, 2001). Für H2B-GFP konnte ein schneller Austausch einer kleinen Fraktion von 3% der Histonkonstrukte innerhalb von Minuten und ein langsamerer Austausch von 40% über mehrere Stunden beobachtet werden. Die restlichen 57% von H2B bzw. 80% von H3 und H4 scheinen über den Zellzyklus hinweg gar nicht auszutauschen. Die Autoren diskutieren diese Ergebnisse im Zusammenhang mit Transkription. Eu- und Heterochromatin wird dabei auf der Grundlage von Variationen der Fluoreszenzintensität von H2B-GFP in konfokalen Bildern diskutiert.

Der Nachteil von FRAP und FLIP besteht in dem semiquantitativen Ansatz. Die beobachteten Intensitäten können nicht auf absolute Teilchenzahlen geeicht werden. Die Konzentrationen der verschiedenen austauschenden Fraktionen sind nicht zugänglich. Das gleiche gilt für die Bildinterpretation mit CLSM. Für die kumulative Aufnahme des Signals beim Scanprozeß muß ein Schwellenwert gesetzt werden. Dies hat auf die Interpretation der zu untersuchenden Strukturen einen großen Einfluß. Mit dem technischen Konzept eines FFM kann dieses Problem gelöst werden (Kap. 3.7). Das FFM erlaubt die Messung von FCS und konfokaler Bildnahme im gleichen optischen Aufbau und daher einen direkten Vergleich der Signale. Das Prinzip des hier beschriebenen Experiments besteht darin, die Fluoreszenzausbeute der Histonfusionsproteine im Cytoplasma zu eichen, wo die Teilchen synthetisiert werden und noch frei beweglich sind. In einem zweiten Schritt wird die Verteilung und Mobilität der fluoreszierenden Histone im Zellkern durch konfokale Bildnahme, kontinuierliches Bleichen (continuous fluorescence photobleaching, CP) und FCS gemessen. HeLa-Klone, die fluoreszierende Histone stabil exprimieren, wurden in dieser Arbeitsgruppe etabliert (Knoch et al., 2000). Schwerpunktmäßig wurde hier eine Zelllinie charakterisiert, die H2B-YFP exprimiert; es wurde aber auch ein H1-EYFP exprimierender Klon mit FFM untersucht.

5.2 Charakterisierung von H2B-EYFP-haltigem Chromatin *in vitro*

5.2.1 Etablierung von H2B-EYFP-exprimierenden Zellen

Für humanes H2B codierende DNA wurde oberhalb des Leserasters für EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein, EYFP) in einen für Säugetierzellkulturen geeigneten Expressionsvektor kloniert (Abb. 5.1). Das Fusionsgen steht hier unter der Kontrolle des frühen SV 40-Promotors, der über den Zellzyklus hinweg gleichförmig aktiv ist. Durch Transfektion der Zellen und anschließende Selektion mit einem Antibiotikum in Kombination mit Verdünnungsreihen ließ sich das fusionierte Gen stabil in das Genom von HeLa-Zellen integrieren¹. Die durch dieses Verfahren isolierten, monoklonalen Zelllinien zeigten unterschiedlich stark fluoreszierende Kerne, was vermutlich mit der Anzahl der inkorporierten Gene korrespondiert. Es wurde ein weniger hell erscheinender Klon für die weiteren Untersuchungen ausgesucht (hier im folgenden als Klon *H2B-Y* bezeichnet). Expression des inkorporierten Gens führt zu einem Protein mit einer H2B-Domäne (13.9 kDa), an welche C-terminal über einen Linker von wenigen Aminosäuren eine autofluoreszierende EYFP-Domäne (27 kDa) kovalent gekoppelt ist.

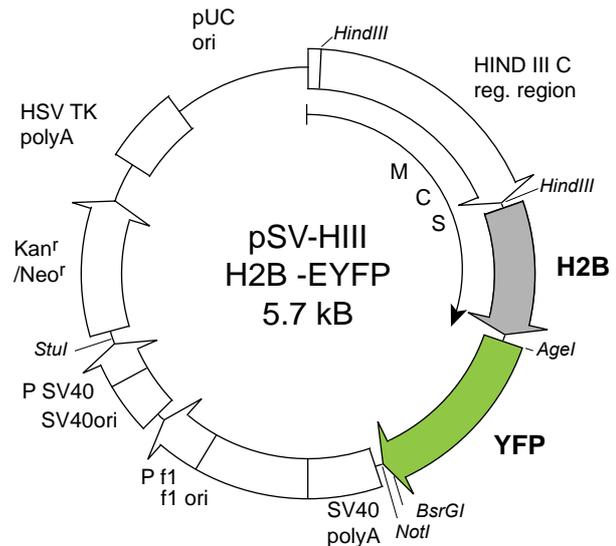
Da nicht ausgeschlossen werden konnte, daß eine Veränderung der Chromatinstruktur das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflusst, wurden die relativen Anteile der Population im Zellzyklus über Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS) bestimmt. Vor der Messung werden die Zellen mit Ethanol fixiert und die Kerne über DAPI angefärbt². Die Unterscheidung der einzelnen Zellzyklusphasen erfolgt dann über den DNA-Gehalt. Danach befanden sich 55% der Population in G1/G0, 30% in S und 15% in G2/M. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit einer nicht-fluoreszierenden HeLa-Kontrolle (*C*) (Tab. 5.1). Auch die Wachstumsrate der Zellen blieb mit 17-18 Stunden im Rahmen des Meßfehlers vergleichbar.

Tabelle 5.1 Progression im Zellzyklus

Zelllinie	FACS	Zellzählung	Zellzyklus		
	Fluoreszenz [w.E.]	Verdopplung [h]	G1/G0	S	G2/M
<i>H2B-Y</i>	34	18.2	55%	30%	13%
<i>C</i>	1	16.9	58%	25%	15%

-
1. Diese Arbeiten wurden von Tobias A. Knoch und Gabriele Müller unter der Leitung von Dr. Waldemar Waldeck (DKFZ, Abt. Genregulation und DNA-Topologie) durchgeführt.
 2. Dr. M. Stöhr (DKFZ, Abt. Zytometrie)

Abbildung 5.1 Plasmidkarte des Expressionsvektors, mit dem eine Zelllinie genetisch stabil transformiert wurde (*H2B-Y*). Für Details siehe (Knoch et al., 2000).



Näheres zur Konstruktion der Expressionsvektoren, Transfektionsverfahren sowie einer Charakterisierung der Zellpopulationen siehe (Knoch et al., 2000).

5.2.2 Nukleosomen der transformierten Zelllinie sind in größeren Abständen auf der DNA lokalisiert als bei nicht-transformierten Zellen.

Das Chromatin isolierter Kerne wurde durch MNase-Verdauung fragmentiert und das Lysat dieser Kerne in einem Saccharosegradient sedimentiert. Anschließende Fraktionierung erzeugt Aliquots mit Oligonukleosomen unterschiedlicher Größe. Die DNA der einzelnen Fraktionen wurde auf einem Agarosegel dargestellt (Abb. 5.2 a). Die Nukleosomenketten konnten hier in einem einzigen Lauf in einem Gradient von 10 bis 30% Saccharose bis zu Heptameren ($N = 7$) aufgelöst werden. Die Nukleosomen mit einheitlicher Fragmentlänge wurden vereinigt, durch Dialyse in TE20 (TE pH 7.5, 0.1 mM EDTA mit 20 mM KCl) überführt und anschließend mit Mikrokonzentratoren (*Vivascience*) eingengt. Die Nukleosomen wurden bei 8°C aufbewahrt und mit verschiedenen spektroskopischen Methoden gemessen.

Die MNase schneidet statistisch im Linkerbereich der Chromatinfiber. Dieses Verhalten wird in Abb. 5.2 c illustriert. Dort ist das Intensitätsprofil der DNA von Mononukleosomen im Agarosegel gegen die Länge der DNA-Fragmente aufgetragen. Das Konzentrationsprofil der Fragmente läßt sich gut mit einer Gaußfunktion wiedergeben, was eine statistische Aktivität der MNase an der Linker-DNA widerspiegelt. Unterhalb von 145 Bp (der Länge der DNA die direkt am Histonoktamer gebunden ist) weichen die Datenpunkte erwartungsgemäß nach unten ab.

Da für eine partielle Verdauung von Chromatin die Exonukleaseaktivität des Enzyms vernachlässigt werden kann, repräsentieren die Fragmentlängen in Abb. 5.2 a ganze Vielfache der Nukleosomenwiederholungslänge RL . Die Fragmentlängen sind in Abb. 5.2 b gegen die Anzahl der komplexierten Nukleosomen aufgetragen. Lineare Regression ergab für den transformierten Klon (*H2B-Y*) $RL = 204 \pm 3$ Bp, wohingegen die Kontrollzellen (*C*) mit $RL = 185 \pm 10$ Bp, in

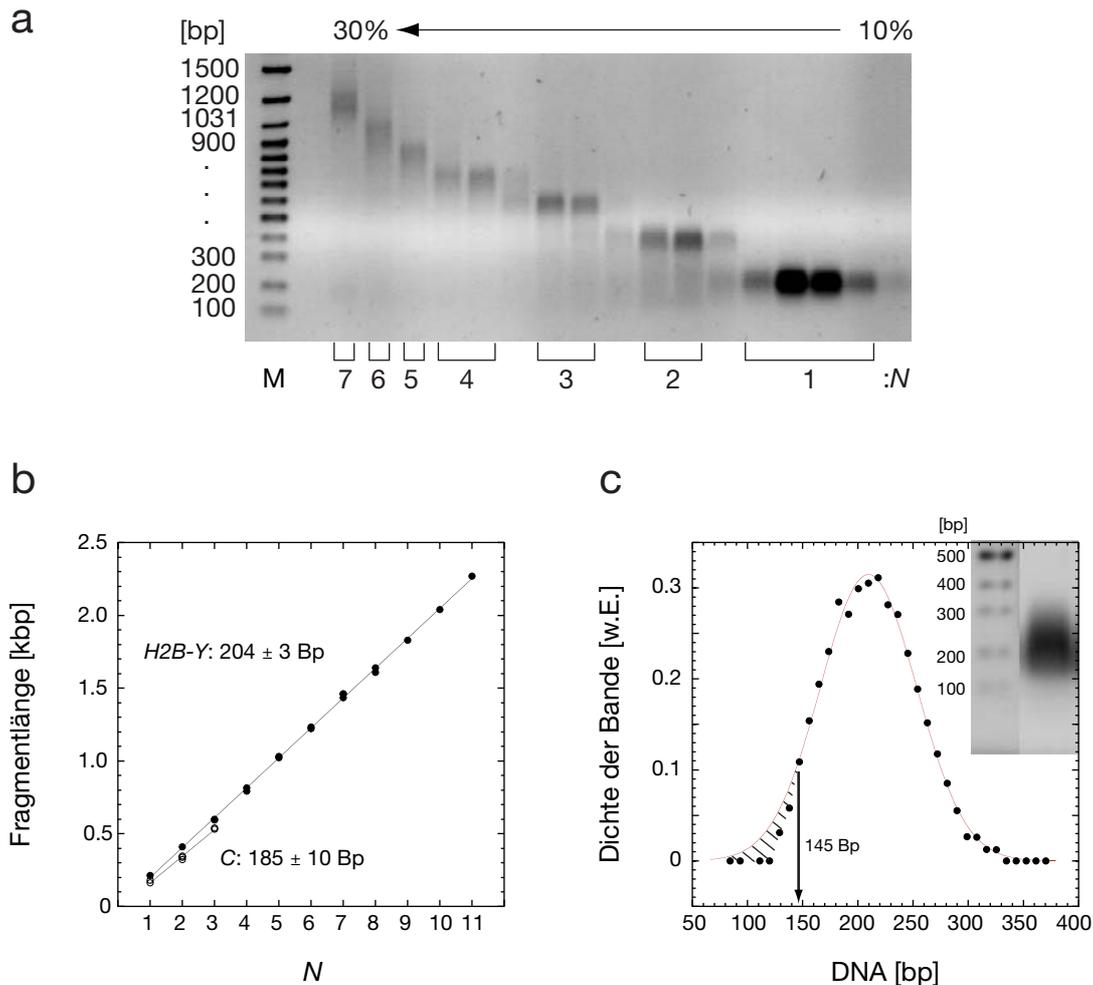


Abbildung 5.2 Saccharosegradient.

(a) Darstellung der DNA einzelner Fraktionen auf Agarosegelen. Proben mit einheitlicher Fragmentlänge, respektive einer gleichen Anzahl von Nucleosomen, wurden vereinigt (Klammern).

(b) Die Mittelwerte der Fragmentlängen steigen streng linear. Die Steigung entspricht der RL .

(c) Das Profil einer Mononucleosomenbande läßt sich mit einer Gaußfunktion anpassen (rot), mit einer Abweichung vom statistischen Verhalten unterhalb von 145 Bp.

Übereinstimmung mit der Literatur einen deutlich kleineren Wert lieferten (Compton et al., 1976; Tate und Philipson, 1979). Dieses Ergebnis ist überraschend. Eine genauere Inspektion der entsprechenden Gele in (Kanda et al., 1998) zeigt, daß auch hier die Wiederholungslängen der transformierten Zelllinie gegenüber normalen HeLa-Zellen vergrößert aussehen. Die Autoren gehen auf diesen Punkt nicht weiter ein. Eine Diskussion folgt im Zusammenhang mit der weiter unten bestimmten Einbaurate. Es sei hier aber vorausgeschickt, daß eine asymmetrische Positionierung einer kleinen Fraktion von EYFP-markierten Nucleosomen in der Chromatinfiber die Mittelwerte der Banden nicht verändert. Ein kleiner Anteil der durch die MNase erzeugten DNA-Fragmente würde bei asymmetrischer Positionierung kürzer und länger ausfallen und daher die einzelnen Banden in Abb. 5.2 a verbreitern statt verschieben.

5.2.3 Quantifizierung von H2B-EYFP auf Gelen

Der Proteingehalt des fluoreszierende Klons (*H2B-Y*) und von nicht-fluoreszierenden Kontrollzellen (*C*) wurde gelelektrophoretisch analysiert. Abb. 5.3 a zeigt ein 18%iges Polyacrylamidgel, auf dem die Proteine von lysierten Kernen einer Chromatinpräparation unter denaturierenden Bedingungen (SDS) aufgetrennt wurden. Das Lysat enthält alle Proteinkomponenten, die nicht durch vorherige Waschschrte aus den Zellkernen entfernt wurden. Die Core-Histone sind als dominante Banden etwa stöchiometrisch vorhanden, sowie zwei Subtypen von H1. Bei höheren Molekulargewichten erscheinen die Nicht-Histon-Komponenten (NHCPs) des Chromatins, die hier aber nicht näher spezifiziert wurden. Das Konstrukt, mit etwa 40 kDa, konnte zwischen diesen Banden zunächst nicht einzeln aufgelöst werden.

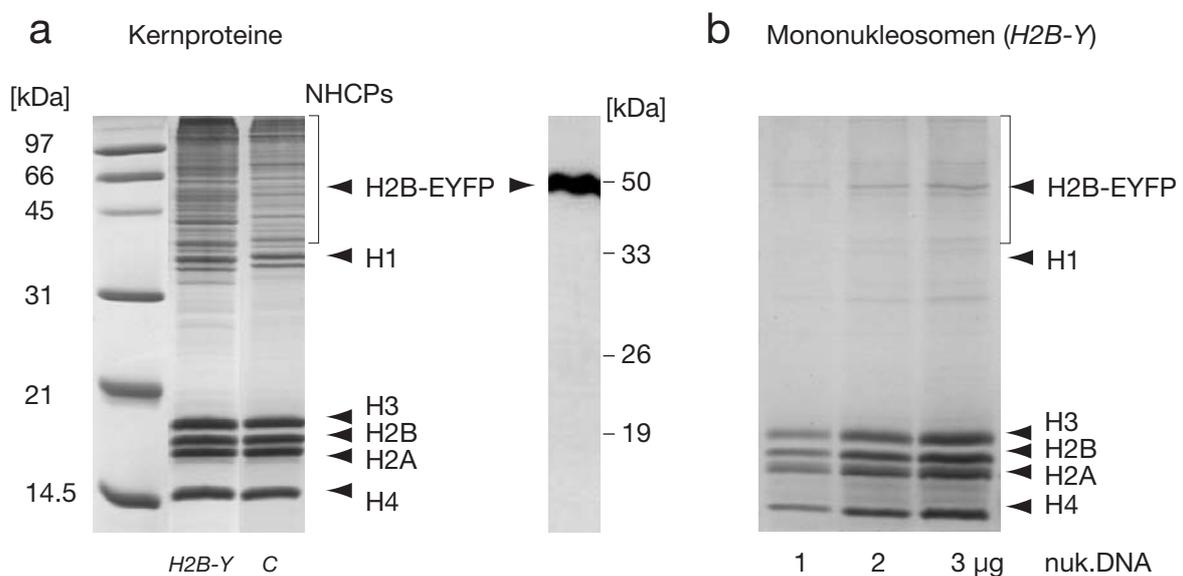


Abbildung 5.3 SDS-PAGE. Darstellung der Kernkomponenten (a) vor und (b) nach der Aufreinigung von Chromatin im Saccharosegradient. Das Konstrukt H2B-EYFP läuft auf der Höhe von vielen anderen Kernkomponenten. Seine Position wurde mit einem Antikörper gegen die YFP-Domäne detektiert; das Protein zeigt sich in Mononucleosomen (b) als schwache Doppelbande.

Die Lage von H2B-EYFP wurde mit Hilfe von Western-Blots lokalisiert. Mit einem Antikörper gegen XFP (beliebige spektrale Verwandte von GFP) konnte eine einzelne Bande etwas unterhalb von 50 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 5.3 a). Laufanomalien von Histonen sind nicht ungewöhnlich, weshalb die Abweichung um etwa 10 kDa eine Identifizierung mit H2B-EYFP nicht in Frage stellt. In Abb. 5.3 b wurden aufgereinigte Mononucleosomen unter gleichen Laufbedingungen elektrophoretisch getrennt und mit Coomassiefärbung dargestellt. Der Hintergrund der NHCPs ist hier stark minimiert. Auf der Höhe des Antikörpers erscheint mit zunehmender Proteinmenge eine schwache Doppelbande. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um zwei leicht unterschiedliche Modifikationen der EYFP-Domäne. In der Produktbeschreibung des Antikörpers

gegen GFP von *Clontech* ist vermerkt, daß je nach Transfektionsbedingungen der Zellen mit dem Originalvektor pEYFP auch eine Doppelbande detektierbar sein kann.

Ein interner quantitativer Vergleich der Banden von endogenen Histonen mit dem Konstrukt führte zu widersprüchlichen Ergebnissen. Der Bereich, in dem die Färbung der Bande auf den Gel zur Proteinmenge proportional ist, wurde hier überschritten. Für eine genauere Quantifizierung wurde ein Gel mit aufgereinigten Nukleosomen entsprechend 10 µg nukleosomaler DNA „überladen“. Dieser Wert konnte über die Absorption bei 260 nm vergleichsweise sicher bestimmt werden. Das Gel wurde mit Coomassie und anschließend mit Silber angefärbt. Silberfärbung ist etwa 10mal sensitiver als Coomassie. Die Proteinmenge von H2B-EYFP wurde über einen externen Standard kalibriert. Es stand rekombinantes H2A in ausreichender Menge zur Verfügung³, so daß dessen Konzentration ebenfalls spektroskopisch bestimmbar war. Das Ergebnis der Eichung ist in den Schaubildern in Abb. 5.4 zusammengefaßt.

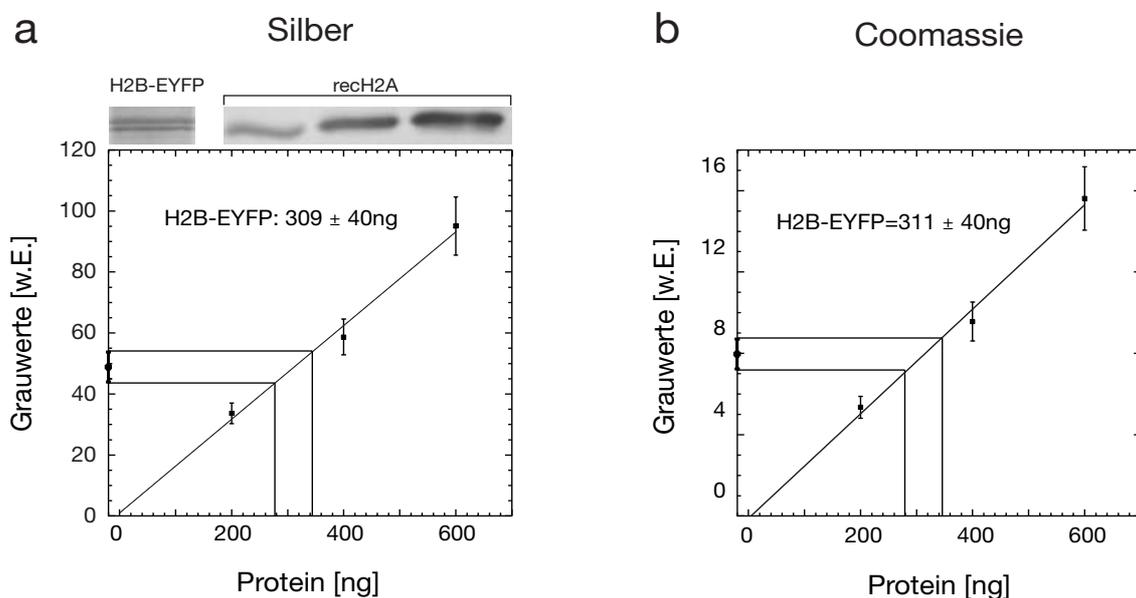


Abbildung 5.4 Quantitative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (a) Silberfärbung und (b) Coomassie. Die Menge von H2B-EYFP in Chromatin entsprechend 10 µg nukleosomaler DNA, wurde über einen linear aufgetragenen Standard aus rekombinantem H2A ermittelt.

Die Proteinmenge H2B-EYFP pro 10 µg nukleosomaler DNA beträgt 310 ± 40 ng. Trotz geringerer Sensitivität ergab die Auswertung der Banden eines mit Coomassie gefärbten Gels einen identischen Wert. Die relative Anfärbbarkeit der Histone untereinander bleibt bei Coomassie und Silberfärbung also erhalten. Berücksichtigt man die oben bestimmte Nukleosomenwiederholungslänge auf der DNA ($RL = 204 \pm 3$ Bp), so ergibt sich für den Klon *H2B-Y* eine Einbaurrate von $(5.5 \pm 1)\%$, gemessen an der Gesamtmenge von H2B, das von der Zelle in Nukleosomen assembliert wird.

3. Mit freundlicher Unterstützung von Katalin Fejes Tóth

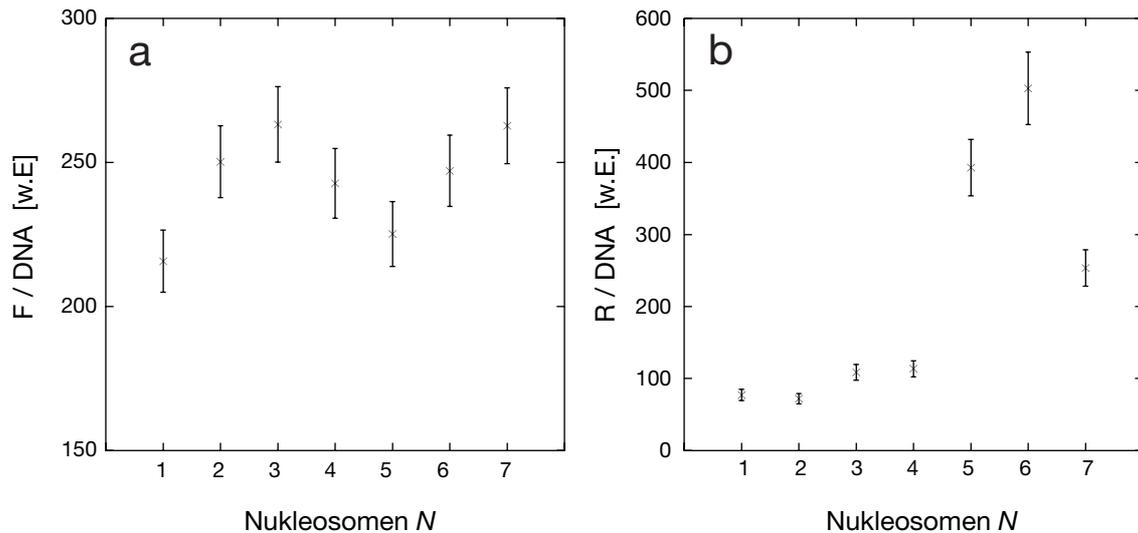


Abbildung 5.5 Normalisierte Fluoreszenz. (a) Integrale der Fluoreszenz (F) und (b) der Rayleigh-Streuung (R) wurden wie in Abb. 5.6 dargestellt bestimmt, auf den DNA-Gehalt normalisiert und gegen die Länge der untersuchten Nucleosomenketten aufgetragen.

5.2.4 Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

Von jeder Chromatinprobe wurden ohne weitere Verdünnungsschritte Absorptions- und Fluoreszenzspektren sowie Autokorrelationsfunktionen über FCS gemessen. Dieses Vorgehen erlaubt die Daten direkt miteinander in Beziehung zu setzen. Ein solcher spektroskopischer Datensatz ist für eine Probe mit Trinucleosomen in Abb. 5.6 abgebildet. Die isolierten Nucleosomen zeigen eine deutliche Fluoreszenz. Die Maxima der Anregung und der Emission entsprechen mit 514 nm und 530 nm in etwa dem Originalprotein EYFP (<http://www.clontech.com>). Die normalisierten Spektren lassen sich für alle Chromatinproben gut übereinanderlegen (nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß die molekulare Struktur des Fluorophors von der Länge der Nucleosomenketten nicht beeinflusst wird. Dagegen variiert die relative Fluoreszenzausbeute (F) pro DNA-Gehalt systematisch mit einer Periode von etwa 5 Nucleosomen (Abb. 5.5 a). Der relative Fehler wurde hier über die einzelnen Beiträge der Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie zu 5% abgeschätzt; die Variationen sind also signifikant. Wählt man das Emissionsfenster bei der Datennahme ausreichend weit, so daß über die Anregungswellenlänge gemessen wird, erhält man im Spektrum einen Beitrag von elastisch gestreutem Anregungslicht (Rayleigh-Streuung). Die Rayleigh-Streuung hängt vom Streuquerschnitt der Teilchen ab und ist ein Maß für deren Aggregationszustand. Der Rayleigh-Peak wurde mit einer Gauß-Funktion angepaßt und zu einer Zahl (R) aufintegriert (Abb. 5.5 b). Trägt man diese Größe ebenfalls, auf den DNA-Gehalt normalisiert, gegen die Anzahl der gebundenen Nucleosomen auf, so läßt sich keine Korrelation zwischen dem Aggregationszustand der Teilchen und ihrer Fluoreszenzausbeute feststellen. Die Variation scheint daher nicht auf intermolekulare Eigenschaften der Nucleosomenketten zu beruhen, ein Befund, der mit FCS (siehe nachfolgender Abschnitt) sehr viel eindeutiger bestätigt wird.

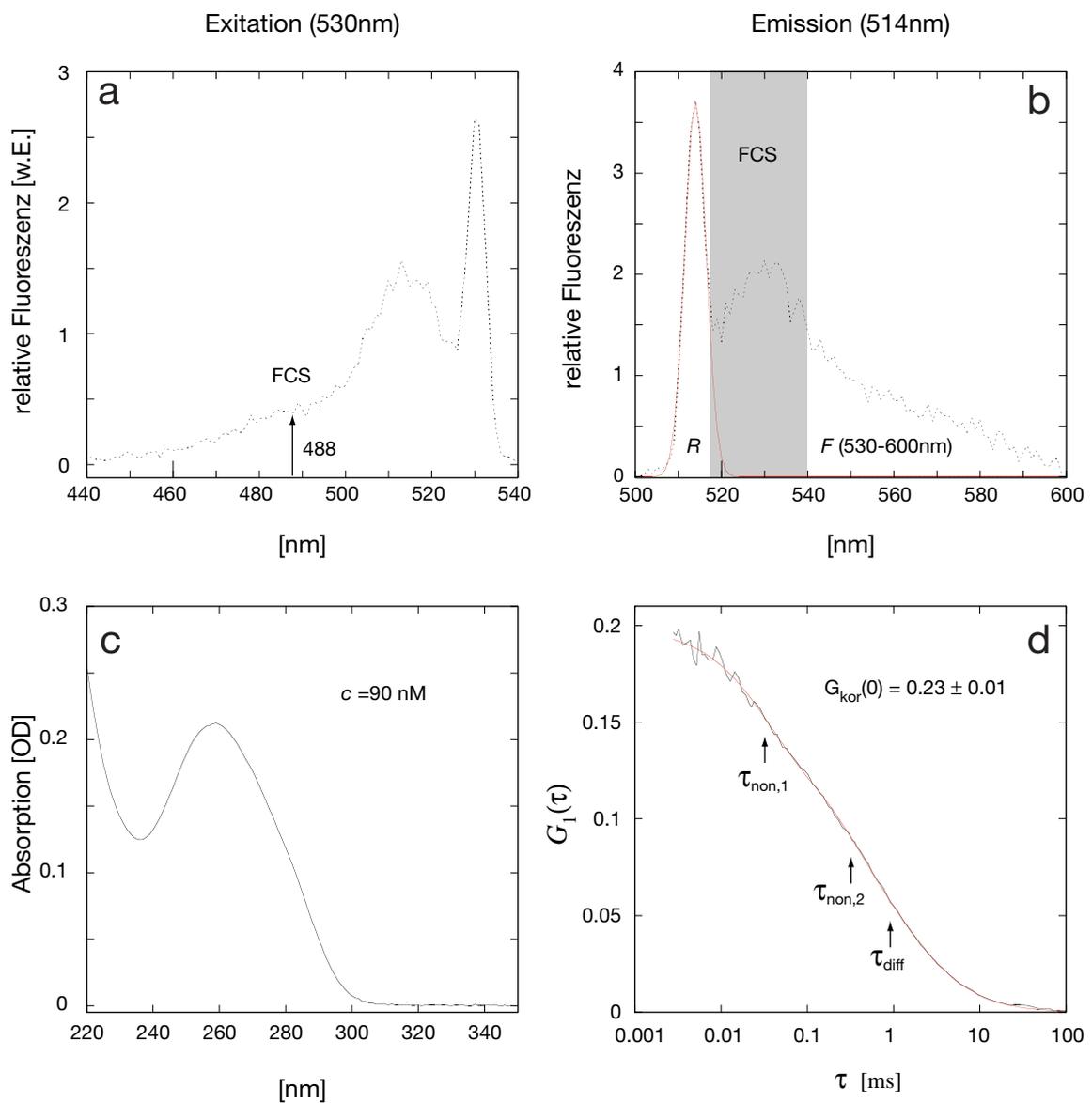


Abbildung 5.6 Spektroskopische Messungen an EYFP-markierten Trinucleosomen.

(a) und (b) Mit dem Fluorimeter gemessene Excitations- und Emissionsspektren. Im Emissionsspektrum wurde der Anteil elastisch gestreuten Anregungslichts mit einer Gaußfunktion angepaßt (rot). Das gestreute Licht (R) sowie die Fluoreszenz von 530-600 nm (F) wurden für Abb. 5.5 integriert. Der spektrale Bereich der Anregung und Detektion mit FCS ist gekennzeichnet.

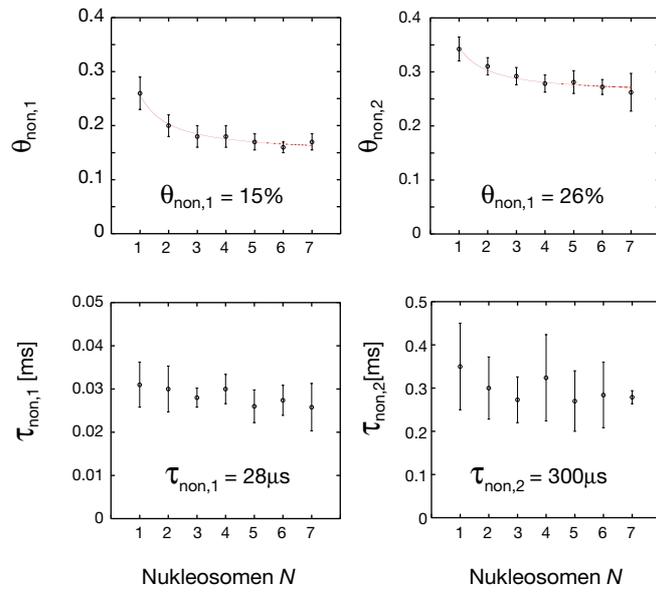
(c) Absorptionsspektrum. Die Teilchenkonzentration c kann über die Länge der DNA-Fragmente aus Abb. 5.2 bestimmt werden.

(d) Autokorrelationskurve. Anpassung einer Modellfunktion (rot) ergibt zwei Korrelationszeiten für nicht-strahlende Zustände und die Diffusionszeit der Teilchen im Fokus.

5.2.5 Diffusion der fluoreszierenden Oligonukleosomen

Bei einer Anregung mit 488 nm und den verwendeten Filtersätzen von Kanal 1 (siehe Abb. 5.5 a und b) ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von EYFP hoch. Die Kurven aller Proben sind sehr wenig verrauscht und enthalten keinerlei Aggregate (siehe Abb. 5.5 d). Im Modell der Korrelationsfunktion mußten zwei nicht-strahlende Zustände, aber nur eine diffusive Komponente berücksichtigt werden. In Abb. 5.7 sind die relativen Beiträge der nicht-strahlenden Zustände zur

Abbildung 5.7 Nichtstrahlende Zustände von EYFP. Die relativen Beiträge Θ_{non} der nichtstrahlenden Zustände zur Gesamtamplitude der Korrelationsfunktion sinken scheinbar mit zunehmender Größe der Teilchen. Die Korrelationszeiten τ_{non} bleiben dagegen konstant.



Amplitude $\Theta_{\text{non},1}$ und $\Theta_{\text{non},2}$ sowie deren Korrelationszeiten $\tau_{\text{non},1}$ und $\tau_{\text{non},2}$ für die verschiedenen Nukleosomenproben dargestellt. Die Amplituden zeigen einen systematischen Abfall mit zunehmender Teilchengröße. Dieses Verhalten ist wahrscheinlich ein Artefakt der Kurvenanpassung: $\tau_{\text{non},2}$ und τ_{diff} bewegen sich bei Mononukleosomen im gleichen Zeitbereich (Abb. 5.5 d). Diese Anteile können also nicht signifikant absepariert werden und stabilisieren sich erst mit zunehmender Diffusionszeit auf einen konstanten Wert. Der Abfall wurde qualitativ mit einer Funktion der Gestalt $y = \Theta_{\text{non}} + b/N$ angepasst, die das Verhalten der Kurve gut wiedergibt; bei b handelt es sich um einen beliebigen Parameter. Danach befinden sich im Durchschnitt 15% der Fluorophore in einem nicht-strahlenden Zustand mit einer Korrelationszeit von 28 μs und 26% der Fluorophore in einem zweiten nicht-strahlenden Zustand mit einer Korrelationszeit 300 μs .

Die Diffusionskoeffizienten von zwei unabhängigen Präparationen von Oligonukleosomen sind in Abb. 5.8 zu sehen. Die Werte nehmen wie erwartet mit zunehmender Teilchengröße ab. Zur Orientierung sind publizierte Daten dargestellt, die mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) gewonnen wurden (Marion et al., 1985). In dieser Arbeit wurden Oligonukleosomen aus Rattenleber ohne H1 isoliert und bei einem Salzgehalt von 20 mM NaCl gemessen⁴. Die Nukleosomenwiederholungslänge von Chromatin dieses Gewebes wurde mit $RL = 200 \pm 5$ Bp angegeben (van Holde,

1989, S.299), so daß die resultierenden Teilchengrößen mit denjenigen von fluoreszierenden Nukleosomen vergleichbar sind. Bei FCS wurden die Korrelationszeiten der nicht-strahlenden Zustände für die einzelnen Korrelationskurven bei der Anpassung *nicht* auf die gemittelten Werte fixiert, sonst fallen die D_t -Werte für $N < 3$ zu niedrig aus (nicht gezeigt). Für Abb. 5.8 b wurden zusätzlich kleinere Anteile von Nukleosomen mit abweichender Kettenlänge berücksichtigt. Aus dem DNA-Gehalt der Proben, wie er auf einem Agarosegel in Abb. 5.2 ersichtlich ist, können durch Bildauswertung die relativen Anteile ρ_i der Banden quantifiziert werden. Jede Bande entspricht einer DNA die N_i Nukleosomen gebunden hat. Über $N_{app} = \sum_i \rho_i N_i$ wurde dann für eine Lösung die mittlere Anzahl der Nukleosomen pro Komplex berechnet.

Die mit FCS gemessenen Werte liegen im gleichen Bereich wie die DLS-Daten. Die Kurven wurden mit einer Potenzfunktion angepaßt und fallen mit $D_t \propto M^{-0.42}$. Dies ist ein etwas schwächerer Abfall, als man es für einen globulären Komplex mit linear ansteigendem Molekulargewicht erwarten würde $D_t \propto M^{-1/3}$. In allen Kurven in Abb. 5.8 ist eine leichte Erhöhung der Diffusionskoeffizienten gegenüber der angepaßten Kurve bei $N = 5$ zu sichtbar. Dies könnte ein Hinweis auf eine relativ stärkere Kompaktierung der Komplexe für Nukleosomenketten bei $N = 5$ hinweisen. Diese Zahl korrespondiert in etwa mit der Anzahl der Nukleosomen einer Windung im „Solenoid-Modell“. Möglicherweise faltet ein Teil der Nukleosomen bei $N = 5$ zurück. Dies könnte auch mit der Modulation der Fluoreszenzintensität pro DNA in Zusammenhang stehen, da beide Präparationen periodisch mit $N = 5$ ein signifikantes Minimum aufweisen (Abb. 5.5 a).

Die D_t -Werte aus FCS-Messungen in Abb. 5.8 sind gegenüber den DLS-Daten systematisch erhöht. Dieses Ergebnis kann nicht auf das leicht unterschiedliche Molekulargewicht zurückgeführt werden, denn dieser Effekt geht in die entgegengesetzte Richtung. Fehlerquellen können sich bei FCS aus der Bestimmung des Fokusvolumens über die Diffusionszeit von Fluoreszein ergeben. Bei Fluoreszein ist der Besetzungsgrad der Tripletzustände hoch, was bei einem kleinem Fokusvolumen (guter Justierung!) die Diffusionszeiten beeinflussen kann. Es sollte bei dieser Fragestellung mit einem größeren Fokusvolumen (einem Objektiv mit einer kleineren numerischen Apertur) gearbeitet werden, um die diffusiv bedingten Anteile des Standards, aber auch der Nukleosomen, bei der Anpassung sauber aufzulösen. Andererseits können DLS-Daten auch fehlerbehaftet sein: Dort enthielten die Proben etwa 25% einer langsam diffundierenden Komponente, was auf intermolekulare Wechselwirkungen der Chromatinproben deutet, die die beobachteten Diffusionskoeffizienten absenken können.

Eine direkte Vergleichsmessung von fluoreszierenden Oligonukleosomen mit FCS und DLS könnte die Systeme aufeinander abstimmen, doch dazu waren die Probenmengen in diesem Fall nicht ausreichend. An FCS erscheint es vorteilhaft, daß Diffusionskoeffizienten im Gegensatz zur Lichtstreuung innerhalb weniger Minuten mit viel weniger Probe gemessen werden können.

4. in (Marion et al., 1985) sind Relaxationszeiten einer Korrelationsfunktion erster Ordnung angegeben. Die Autoren erhalten 2 Komponenten, wobei die schnellere (75%) mit den Nukleosomen assoziiert wird und die langsamere (25%) mit Aggregaten. D_t wurde über den Streuvektor, die Anregungswellenlänge und die Viskosität (1.334) ausgerechnet. Der Fehler wird dort mit 10% angegeben.

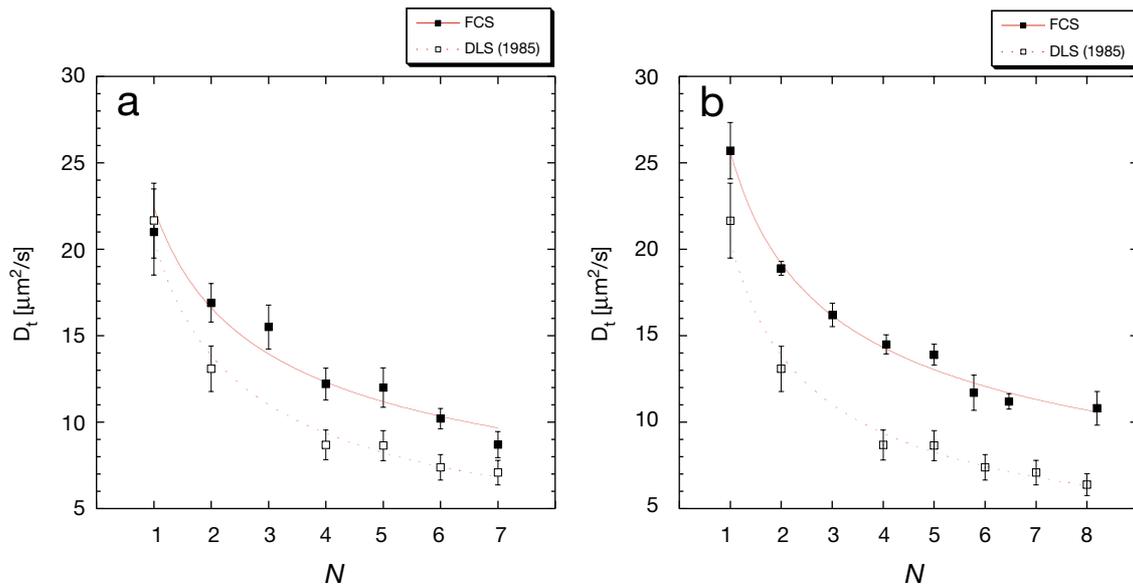


Abbildung 5.8 Diffusionskoeffizienten von EYFP-markierten Oligonukleosomen. (a) Präparation der in Abb. 5.2 a dargestellten Nukleosomen, (b) eine zweite Präparation. Zum Vergleich sind Daten gezeigt, die mit dynamischer Lichtstreuung (DLS) ermittelt wurden (Marion et al., 1985).

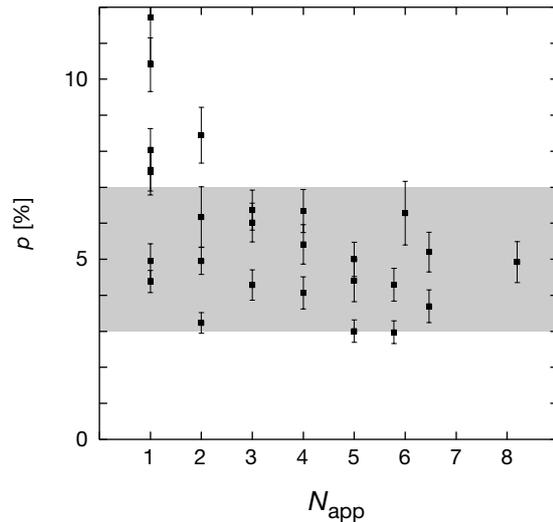
Faltungsexperimente einer Chromatinfiber unter verschiedenen Ionenstärken sind im Prinzip möglich. Da in wenigen μl noch FCS gemessen werden kann, könnten Diffusionsmessungen an längeren Nukleosomenketten bei hohen Konzentrationen erfolgen. Aussagen über längere Chromatinketten in physiologischen Konzentrationen ($\sim 0.1\text{mM}$) sind damit präparativ zugänglich, dieser interessante Ansatz konnte in dieser Arbeit aber nicht mehr weiter verfolgt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß die fluoreszierenden Oligonukleosomen wechselwirkungsfrei in der Lösung diffundieren und dies ist eine wichtige Voraussetzung für die quantitative Analyse der Fluktuationsamplituden.

5.2.6 Fluktuationsamplituden der Oligonukleosomen

Vor dem Hintergrund der bereitgestellten Theorien sollte die Anzahl der Fluorophore an den Komplexen über Ein-Farben-FCS bestimmbar sein. Die Anzahl der Bindungsstellen für H2B-EYFP wurde hier über die Länge der Nukleosomenketten präparativ definiert und beträgt gerade $2N$, da zwei H2B-Proteine pro Nukleosom eingebaut werden. Wird für Mischungen von Nukleosomenketten unterschiedlicher Länge gemittelt, so beträgt die Anzahl der Bindungsstellen $n = 2N_{\text{app}}$. Für die Einbaurrate der fluoreszierenden Histone p an einer Nukleosomenkette mit N_{app} Histonoktameren kann Gl. (19) zu

$$p = \frac{1}{2N_{\text{app}}c_{\text{T}}V_{\text{eff}}G_{\text{kor}}(0) + (2N_{\text{app}} - 1)} \quad (19.2)$$

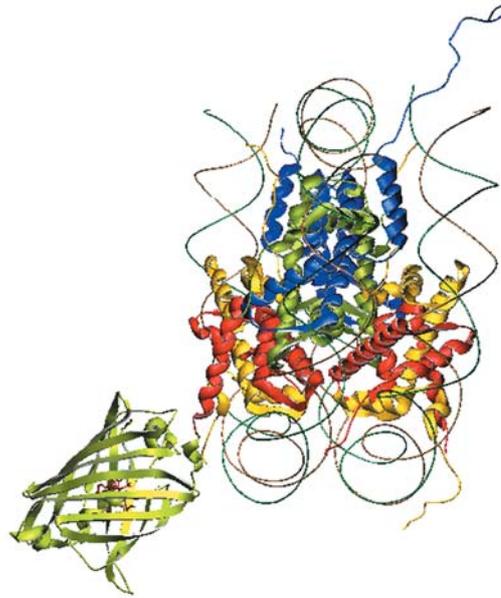
Abbildung 5.9 Einbaurate von H2B-EYFP in der Chromatinfiber. Der Vertrauensbereich wurde grau hinterlegt.



umgestellt werden. Aus Dimensionsgründen wird hier die Konzentration der Nukleosomenketten über die Avogadrozahl von Molaritäten auf Teilchenzahlen umgerechnet, $c_T = c \cdot N_A$. Man beachte, daß mit c die Gesamtkonzentration der Teilchen bezeichnet wird und nicht nur die des fluoreszierenden Anteils. Unvollständige Markierung der Teilchen wurde bei der Anwendung einer Binomialverteilung zur Ableitung von Gl. (19) schon mitberücksichtigt und setzt hier lediglich eine gleichförmige Affinität der Bindungsstellen beim Einbau von H2B-EYFP voraus. Die Konzentration c der Nukleosomenketten wurde extern über die Absorption bei 260 nm unter Berücksichtigung der Nukleosomenwiederholungslänge $RL = 204 \pm 3$ Bp bestimmt. Drei verschiedenen Messungen werden hier integriert: (1.) Agarosegele, auf denen die DNA der Nukleosomen in Länge und relativen Anteilen quantifiziert wird, (2.) Absorptionsspektren sowie (3.) Autokorrelationsamplituden der fluoreszierenden Nukleosomen. Das Beobachtungsvolumen wurde über Fluoreszein als Diffusionsstandard geeicht.

Die einzelnen Ergebnisse verschiedener Meßreihen sind in Abb. 5.9 dargestellt. Die Werte streuen etwas um einen Mittelwert von 5%. Die Ergebnisse sind unabhängig von der Länge der Oligonukleosomen, jedoch liegen für Mono- und Dinukleosomen einige Meßpunkte bei signifikant höheren Einbauraten. Diese Anomalie korrespondierte mit einer starken Streuung der Fluoreszenz der Nukleosomen im Fluorimeter (nicht gezeigt). Die Werte konnten teilweise nicht einmal für die gleichen Probenlösungen in Folge verifiziert werden, die Fluoreszenzausbeute pro DNA nahm bei den Messungen sprunghaft ab. Möglicherweise werden bei der Chromatinisolierung auch Histone von der Chromatinfiber freigesetzt, die im Gradient aufgrund des kleinen Molekulargewichts langsamer sedimentieren und dadurch die Fraktionen kleinerer Oligonukleosomen kontaminieren können (nicht gezeigt). Die Tendenz von freien Histonen, an Oberflächen zu adsorbieren, könnte das Verschwinden der Fluoreszenz erklären. Mittelt man für Nukleosomen mit $N_{app} > 5$, so erhält man eine Einbaurate von $(5 \pm 1)\%$ an fluoreszierendem H2B-EYFP in der Chromatinfiber. Dieses Ergebnis ist in bemerkenswerter Übereinstimmung mit der Quantifizierung von H2B-EYFP auf Gelen in Kap. 5.2.3. Die Fluoreszenz der EYFP-Moleküle bleibt bei der Chromatinisolierung also vollständig erhalten.

Abbildung 5.10 Modellstruktur eines EYFP-markierten Mononukleosoms auf der Basis von publizierten Kristallstrukturen (Luger et al. 1997, Omrö et al. 1996). Der N-Terminus von EYFP wurde am C-Terminus von H2B (rot) im Nukleosom positioniert.



5.2.7 Diskussion

Auf Gelen und über FCS an isolierten Nukleosomenketten wurde ermittelt, daß jedes 20. H2B in der Chromatinfiber eine EYFP-Domäne trägt. Dieser Wert ist über alle funktionellen Zustände des Chromatins und zellulären Mechanismen der Nukleosomenbildung gemittelt. Eine Binomialverteilung von H2B-EYFP an der Chromatinfiber ergibt, daß jedes 10-11te Nukleosom ein EYFP trägt und jedes 400ste Nukleosom zwei EYFPs. Legt man das klassische Solenoidmodell zugrunde, entsprechen elf Nukleosomen bei einer Massenbelegung von 5-6 Nukleosomen pro 11 nm etwa zwei Windungen der Chromatinfiber. Ein Größenvergleich von EYFP-Domäne und Nukleosom illustriert Abb. 5.10. Die Höhe des Zylinders von EYFP entspricht mit 4 nm etwa dem Durchmesser des Nukleosoms, und eine massive sterische Veränderung der Chromatinfiber ist durchaus wahrscheinlich. EYFP wurde hier der Klonierung entsprechend am C-Terminus von H2B lokalisiert. Diese Position befindet sich in der Chromatinfiber „außen“, wenn man annimmt, daß der Öffnungsbereich des Nukleosoms wie auch die Linker-DNA der Fiberachse zugewandt sind, sich also „innen“ befinden (Graziano et al., 1994). Des weiteren wurde gefunden, daß die Abstände *aller* Nukleosomen der transformierten Zelllinie vergrößert sind. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie sich die sterische Irregularität einer in die Chromatinfiber integrierten EYFP-Domäne auf die Positionierung der benachbarten Nukleosomen auswirkt. Die Massenbelegung der Core-Histone auf der DNA wird durch die verlängerte Nukleosomenwiederholungslänge auf 90% reduziert. Diese Auflockerung der Chromatinfiber überkompensiert die durchschnittliche Zunahme des Molekulargewichts der EYFP-markierten Histonoktameren, die nur etwa 1% beträgt, und der Vergleich legt nahe, daß sterische Gründe eine wichtige Rolle spielen.

Es scheint, daß die Geometrie der 30 nm-Fiber in der lebenden Zelle auf größeren Längenskalen reguliert wird, als es durch den Abstand zweier benachbarter Nukleosomen auf der DNA definiert

wird. Dies ist ein wichtiger Aspekt für mechanistische Modelle der Nukleosomenpositionierung (nucleosome phasing) für Enzymkomplexe der ISWI-Unterfamilie: NURF, CHRAC oder SWI/SNF (Hamiche et al., 1999; Varga-Weisz et al., 1997; Whitehouse et al., 1999). Diese Enzymkomplexe haben die Funktion, die Mobilität der Nukleosomen auf der DNA unter Verbrauch von ATP zu erhöhen, wobei die Energie der Chromatinfiber minimiert wird. Ob die regelmäßigen Abstände der Nukleosomen auf der DNA die tatsächliche „Geometrie“ der Chromatinfiber wiedergeben oder lediglich einen Mittelwert einer dynamischen Struktur darstellen, ist eine ungelöste Frage. Nukleosomenpositionierung auf der DNA *in vitro* ist sehr stabil mit Zeitkonstanten im Bereich von Stunden (Meersseman et al., 1992; Pennings et al., 1991). Möglicherweise ist in lebenden Zellen die Dynamik der Nukleosomenpositionierung aber sehr groß. Es könnte sein, daß sich bei der enzymatischen Verdauung des Chromatins über mehrere Minuten bei 37°C lokale Verzerrungen nicht mehr auflösen lassen, d.h. die asymmetrische Nukleosomenpositionierung wird über einen größeren Längsbereich verschmiert. Der Versuchsansatz legt ein interessantes Experiment nahe. Die Position der Nukleosomen auf der DNA könnte nach diesem Modell über ATP-Entzug eingefroren werden. Vergleicht man nach MNase-Verdauung die Fragmente von Zellen mit und ohne ATP, so sollte im einen Fall die Breite der Banden vergrößert, im anderen Fall zu größeren Wiederholungslängen verschoben sein.

5.3 Verteilung und Mobilität von H2B-EYFP *in vivo*

5.3.1 Mobilität und Helligkeit von H2B-EYFP im Cytoplasma

Die quantitative Interpretation von konfokalen Fluoreszenzbildern ist durch die Bestimmung der molekularen Helligkeit von H2B-EYFP bei einer festgelegten Beleuchtungsintensität möglich. Die Messung erfolgt im Cytoplasma, wo die fluoreszierenden Proteine synthetisiert werden und noch frei beweglich sind. Über die Fluktuationsamplitude der Korrelationsfunktion kann hier die mittlere Anzahl der Teilchen im Fokusbereich bestimmt werden. Unabhängig davon liefert die Messung auch deren mittlere Fluoreszenzintensität und damit eine direkte Relation zwischen diesen beiden Größen.

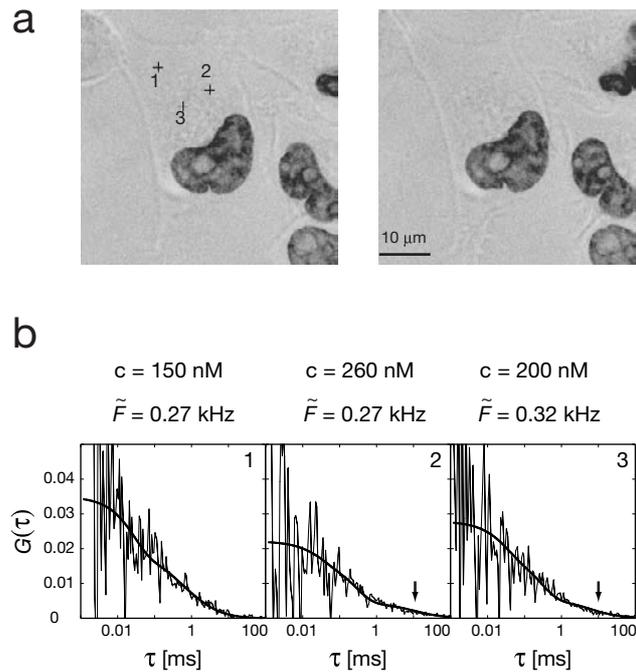
Abb. 5.11 a zeigt zwei kombinierte Durchlicht- und Fluoreszenzbilder einer HeLa-Zelle. Es sind deutlich der cytoplasmatische Saum zu erkennen sowie der dunkle Zellkern. Im Cytoplasma wurde an drei Positionen jeweils für eine Minute FCS gemessen. Das rechte Bild belegt, daß die Zelle in ihrer Form aus der FCS-Messung unverändert hervorgeht. Mißt man mit zu hoher Intensität, so kugeln sich die Zellen ab. Die Autokorrelationskurven der entsprechenden Positionen wurden in Abb. 5.11 b ausgewertet. Gegenüber Abb. 5.6 d sind diese Kurven sehr verrauscht, was an der sehr kleinen Beleuchtungsintensität liegt, mit der hier gearbeitet wird; man mißt hier eine etwa 200 nM Lösung mit einer Fluoreszenzausbeute von nur 10 kHz. Aus der Fluktuationsamplitude läßt sich bei Berücksichtigung eines autofluoreszierenden Untergrunds von etwa 1 kHz ein Konzentrationswert ermitteln. Die Werte sind positionsabhängig und erscheinen im hyalinen Ectoplasma kleiner als im granulären Endoplasma. Die Variabilität der Konzentration beträgt in

Abbildung 5.11

FCS an H2B-EYFP im Cytoplasma.

(a) Negativ eines pseudokonfokalen Bildes (PD = 0.2 μm , z = 3 μm) links vor und rechts nach der FCS-Messung.

(b) Autokorrelationskurven der angezeigten Positionen (1, 2 und 3) geben die Konzentration der Teilchen. Im granulären Plasmabereich erscheinen langzeitliche Korrelationen (Pfeil), die mit einer behinderten Diffusion erklärt werden können.



dieser Zelle 34%, wohingegen die molekulare Helligkeit mit 0.29 ± 0.03 kHz/Teilchen vergleichsweise konstant bleibt.

Insgesamt wurden 21 Zellen in mehreren Serien mit unterschiedlicher Anregungsintensität gemessen. Obwohl die Laserintensität um einem Faktor 3 variiert wurden, blieben die Konzentrationswerte stabil. Bis zu 25 kHz konnten detektiert werden, ohne daß Bleicheffekte die Intensität über einen Lauf von 10 s meßbar absinken ließen. Dies ist eine wichtige Voraussetzung zur Auswertung der Amplituden, da bei Bleichen das absinkende Signal eines Laufs mit sich selbst korreliert und die Amplitude verschiebt. Mittelung der Konzentration freier Histonsproteine im Cytoplasma der Interphase von Klon *H2B-Y* ergab 206 ± 45 nM (15 Zellen). Zwei Zellen wurden während der Metaphase gemessen, in der die Kernhülle aufgelöst ist und sich die kondensierten Chromosomen in der Äquatorialebene der Zelle anordnen. Hier betrug die Konzentration etwa 600 nM, also das Dreifache, und diese Erhöhung ist vermutlich eine Folge der Verschmelzung von Cyto- und Nukleoplasma. Die molekulare Helligkeit ist in der Meta- und Interphase gleich. Von den in der Interphase gemessenen Zellen ließ sich eine kleine Population (20%) abgrenzen, die im Cytoplasma eine auffallend niedrige Konzentration von nur 80 nM H2B-EYFP enthielten, aber deren molekulare Helligkeit gleichzeitig um etwa das Zweifache erhöht war. Die Intensität der Fluoreszenz war hier mit den anderen Zellen vergleichbar. Dieses Ergebnis spricht für eine Multimerisierung der fluoreszierenden Histone in bestimmten Phasen des Zellzyklus.

Die Korrelationskurven in Abb. 5.11 zeigen, daß die Histone im Cytoplasma frei beweglich sind. Die Kurven wurden mit einer Modellfunktion für zwei nicht-strahlende Zustände und ein bis zwei diffusiven Komponenten angepaßt. Da die Kurven sehr verrauscht waren, wurden die Korre-

lationszeiten der nicht-strahlenden Zustände auf die *in vitro* ermittelten Werte fixiert (siehe Abb. 5.7). Die Diffusionszeit der schnellen Komponente bewegte sich bei etwa 1 ms und ergab einen über alle 21 Zellen gemittelten Diffusionskoeffizienten von $7 \pm 4 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Zum Vergleich: unter der Annahme, daß die Viskosität im Cytoplasma um etwa einen Faktor 5 gegenüber Wasser erhöht ist (Wachsmuth et al., 2000), ergäbe sich für das Mononukleosom (MW $\approx 230\,000$ kDa) ein Diffusionskoeffizient⁵ von etwa $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Berücksichtigt man den Unterschied im Molekulargewicht zu H2B-EYFP (MW ≈ 40 KDa) unter der vereinfachten Annahme einer globulären Struktur, so wäre für dieses Histonsfusionsprotein $D_t \approx 9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zu erwarten. Dieser Wert wird im Rahmen des Meßfehlers gut wiedergegeben. Die Abweichung in Richtung langsamerer Diffusion könnte ein Indiz dafür sein, daß die Histone im Cytoplasma nicht als einzelne Proteine, sondern im Komplex mit anderen Komponenten diffundieren.

Etwa 2/3 der Kurven enthielten eine zweite Komponente mit einer sehr langen Korrelationszeit von ~ 200 ms. Da die Amplituden und damit die Teilchenzahlen in den ein- und zweikomponentigen Korrelationskurven vergleichbar waren, kann es sich nicht um eine Aggregation handeln. Dieses Verhalten wird hier mit behinderter Diffusion in Verbindung gebracht. Die Proteine bewegen sich in der Zelle in einem System von Membranen und molekularen Netzwerken, so daß ihre Bewegung räumlich eingeschränkt wird. Für die Berücksichtigung dieser Effekte wurde eine spezielle analytische Korrelationsfunktion abgeleitet, die solche langzeitlichen Korrelationen für eine räumlich eingeschränkte Diffusion voraussagt. Es wurde gezeigt, daß dieses Verhalten adäquat mit einer zusätzlichen „diffusiven“ Komponente in einer mehrkomponentigen Modellfunktion berücksichtigt werden kann (Qian et al., 1999). In Übereinstimmung mit der Vorstellung von Diffusionsbarrieren in der Zelle erwies sich die Behinderung als positionsabhängig. Die Messungen in Abb. 5.11 zeigen, daß diese langzeitlichen Korrelationen hier im granulären Endoplasma (Positionen 2 und 3), nicht aber im hyalinen Ectoplasma (Position 1) auftreten. In manchen Experimenten wurde die Behinderung durch die Messung selbst induziert. Wurde z.B. viermal in einer Zelle gemessen, so stellen sich langzeitliche Korrelationen häufig erst an der dritten oder vierten Position ein. Die deponierte Energie oder das eingestrahlte Licht wird von der Zelle offensichtlich als Reiz perzipiert. Die Reizreaktion bewirkt eine Formveränderung der Zelle, wodurch der Zellkern häufig um mehrere μm angehoben wurde. Eine Verformung oder die Bewegung der Zellen wurde mit konfokaler Bildnahme vor und nach den Messungen stets kontrolliert.

Die Reizwirkung der Lichteinstrahlung konnte durch sehr niedrige Anregungsintensitäten minimiert werden. Diese Maßnahme ergab sich auch aus den Randbedingungen für die konfokale Bildnahme: Beim Scannen fluoreszierender Kerne war der dynamische Bereich für die Fluoreszenzintensitäten durch $8 \text{ bit} = 255$ Werte begrenzt. Um Dichteunterschiede im Chromatin maximal aufzulösen, durfte die akkumulierte Intensität eines Bildpunkts nicht in die Sättigung geraten. Vor einem Experiment wurde die Anregungsintensität so justiert, daß H2B-EYFP im Cytoplasma mit

5. Der Diffusionskoeffizient von Mononukleosomen in einer wässrigen Umgebung wurde in Kap. 4.4.3 mit $24 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bestimmt, siehe auch Abb. 5.8

einer Fluoreszenzausbeute zwischen 0.2 und 0.4 kHz/Teilchen meßbar war. Die molekulare Helligkeit wurde dann an mehreren Zellen im Cytoplasma bestimmt und der gemittelte Wert für die Auswertung der konfokalen Bilder und Bleichkurven herangezogen.

5.3.2 Eine mobile Fraktion von Histonen diffundiert relativ schnell im Nukleoplasma

Die inhärenten Kernlokalisierungssequenzen (NLS) bewirken einen gerichteten Transport der Histone in den Kern, für Details siehe (Baake et al., 2001). Innerhalb der Kernmembran existieren Histone in zwei deutlich voneinander unterscheidbaren Zuständen der Mobilität: Entweder sie werden via Nukleosomen in die relativ immobile Chromatinfiber integriert oder sie gehören zu einem Reservoir von frei beweglichen Histonen eines diffusiv zusammenhängenden Kompartiments, dem Nukleoplasma. Die frei beweglichen Histone erzeugen einen Hintergrund bei der konfokalen Bildnahme. Diffundieren sie ausreichend schnell, so ist dieser Hintergrund homogen und kann als konstanter Wert von konfokalen Bildern subtrahiert werden.

Die Konzentration einer mobilen Fraktion von H2B-EYFP im Zellkern wurde über kontinuierliche Bleichmessungen (CP) im Chromatin bestimmt (siehe Kap. 3.8).

Der Intensitätsverlauf von CP ist zweiphasig: Zunächst ist ein dramatischer Abfall der Intensität zu sehen, der durch ein fortschreitendes Ausbleichen der immobilisierten Fluorophore verursacht wird. Die Kinetik dieses Prozesses ist eine komplizierte Funktion des räumlichen Beleuchtungsprofils und der molekularen Eigenschaften und Verteilung der Fluorophore. Die Form der Kurven wurde hier nicht weiter ausgewertet und ist Gegenstand einer weitergehenden Arbeit (Wachsmuth *et al.* in Vorbereitung). Die Intensität bei $t = 0$ entspricht etwa der im Bild abgelegten Helligkeit dieses Punktes. So ist z.B. in Abb. 5.12 der immobilisierte Anteil im dunkel erscheinenden Nukleolus klein und im hell erscheinenden Chromatin entsprechend groß. Nach etwa 60 s folgt der Intensitätsverlauf einem langsamen exponentiellen Abfall, wie es durch die gute Übereinstimmung einer Exponentialfunktion (rot) und den Datenpunkten wiedergegeben wird. Dieses Verhalten ist das Ergebnis einer kontinuierlichen Photolyse von mobilen Fluorophoren im Fokus. In dieser Phase des Experiments kann die Bleichrate als konstant angenommen werden, und der exponentielle Abfall ergibt sich direkt aus dem definierten Volumen des Kerns, in welchem die fluoreszierenden Histone kontinuierlich gebleicht, d.h. dezimiert werden. Der Achsenabschnitt der Exponentialfunktion ergibt die Anfangsintensität und über die molekulare Helligkeit die Anfangskonzentration an mobilem H2B-EYFP. Ein für 17 Zellen gemittelter Wert ergab für Klon *H2B-Y* eine Konzentration $2.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$. Dies entspricht einem zehnfachen Sprung der Konzentration zwischen Cytoplasma und Kern. Bleichmessungen im Nukleolus ergaben, daß die Konzentration an mobilen Histonen um etwa 20% kleiner ist, als in Regionen hoher Nukleosomendichte der gleichen Zelle. Die Konzentration frei diffundierender Histone scheint in dieser dichten Struktur durch das hohe Ausschlußvolumen reduziert zu sein.

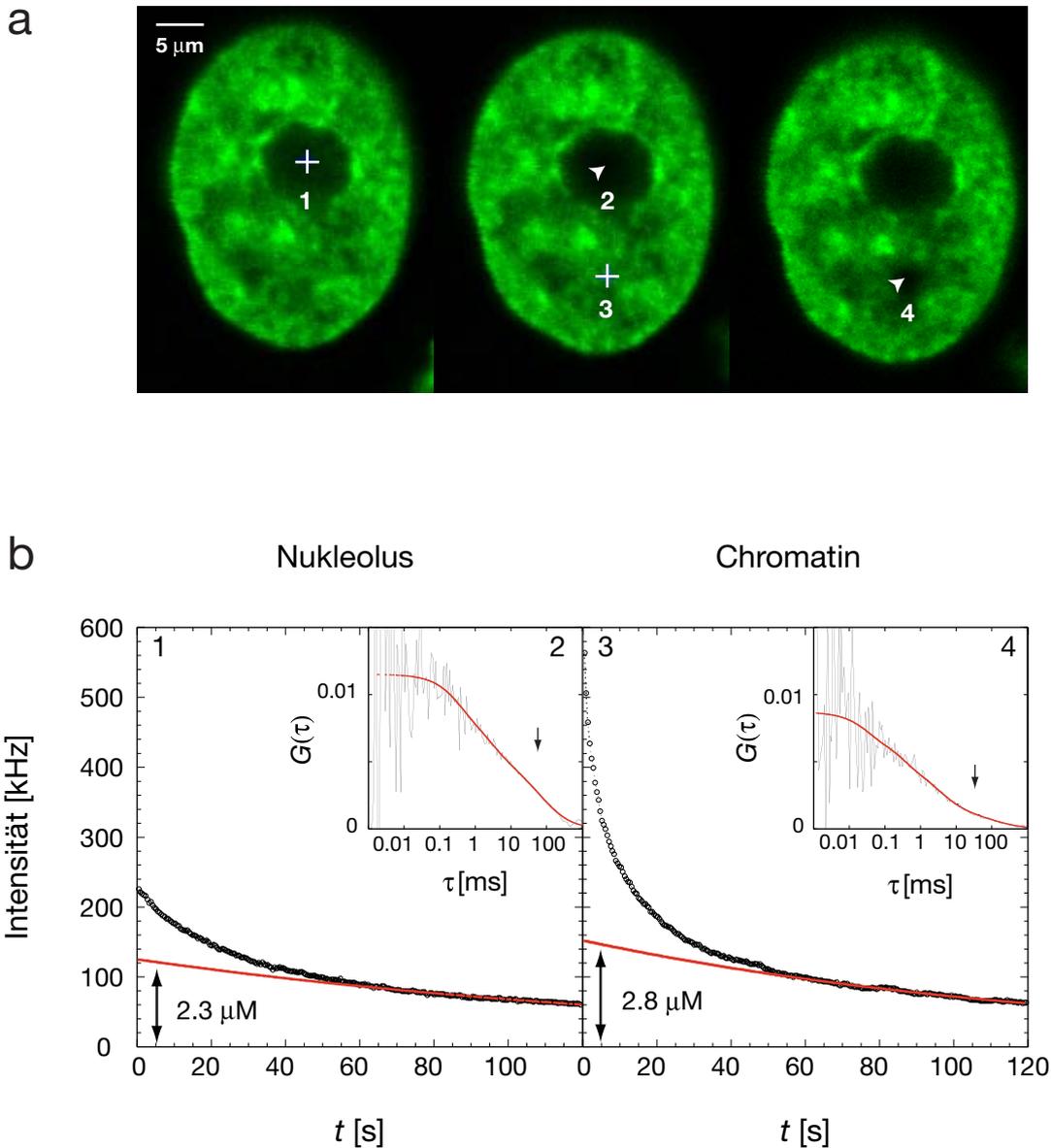


Abbildung 5.12 Verteilung von H2B-EYFP im Zellkern.

(a) Drei aufeinanderfolgende konfokale Querschnitte des Zellkerns ($PD = 0.1\mu\text{m}$, $z = 5\mu\text{m}$). CP für 120 s an Positionen 1 und 3 erzeugt im darauffolgenden Bild ein ausgebleichenes Areal (Pfeilspitzen). In den entsprechenden Bleichpunkten (Position 2 und 4) wurde für 1 min FCS gemessen.

(b) Eine Exponentialfunktion (rot) wurde an die zweite Hälfte der Meßkurven von CP (Kurven 1 und 3) angepaßt. Der Achsenabschnitt ergibt die Konzentration an mobilem H2B-EYFP im Nukleoplasma (Doppelpfeil). FCS-Messungen in ausgebleichten Arealen zeigen die Beweglichkeit der freien Histone mit Diffusionszeiten im ms-Bereich (Kurven 2 und 4). Die Diffusion ist im Chromatin sowie, besonders deutlich, im Nukleolus behindert (Pfeile).

Fortlaufendes Bleichen an verschiedenen Stellen ein und desselben Kerns reduziert die Konzentration der mobilen Fraktion von H2B-EYFP bei jeder Messung. Dieses Verhalten ist ein Hinweis auf den schnellen Austausch dieser Histone zwischen verschiedenen Regionen des Kerns. Die Mobilität dieser H2B-EYFP-Fraktion kann aber auch direkt über FCS verifiziert werden. Nach CP wurde an der gleichen Position eine Autokorrelationsfunktion aufgenommen. Bewegt sich der Kern während der Messung nicht, so erhält man Korrelationskurven mit einer schnellen Diffusionszeit von wenigen ms und damit in der gleichen Größenordnung wie im Cytoplasma. Typische Kurven sind in Abb. 5.12 b (oben rechts) abgebildet. Die Form verweist auf anomale Diffusion. Der Grad der Behinderung ist im Nukleolus besonders stark, wo der relative Beitrag der langsamen Komponente zur Amplitude etwa 60% beträgt, gegenüber einem Beitrag von 10-30% im Chromatin. Die Amplituden dieser Korrelationsfunktionen bewegen sich etwa eine Größenordnung unter denen, die typischerweise im Cytoplasma gemessen werden. Dies, zusammen mit dem Verhältnis der Intensitäten in beiden Kompartimenten, gibt ein konsistentes Bild für eine etwa zehnfache Konzentration an freiem H2B-EYFP im Kern. Dennoch erschien CP im Vergleich zu FCS als eine schonendere und stabilere Methode, um den Hintergrund freier Histone für jedes konfokales Bild einzeln zu bestimmen.

5.3.3 Räumliche Verteilung absoluter Nukleosomenkonzentrationen

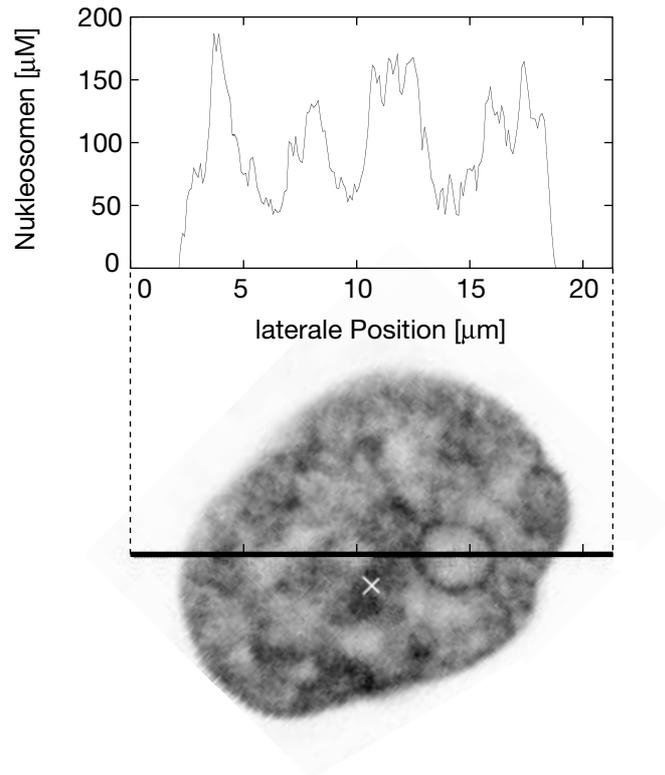
Nun kann die Intensitätsverteilung eines konfokalen Fluoreszenzbildes in absolute Konzentrationen umgewandelt werden. Mit der molekularen Zählrate, wie sie im Cytoplasma bestimmt wurde, und dem Fokusvolumen wurde das Bild in absolute Konzentrationen von H2B-EYFP umgerechnet. Subtrahiert man den Hintergrund frei beweglicher Histone als eine Grundlinie und berücksichtigt die Einbaurate $1/2p = 10$ von H2B-EYFP in die Chromatinfiber, so läßt sich das konfokale Fluoreszenzbild in eine Nukleosomendichtekarte transformieren. Ein Beispiel gibt Abb. 5.13.

Das Profil illustriert räumliche Dichteschwankungen zwischen 50 und 180 μM in Abständen von wenigen μm . Die Längenskala dieser Variationen korrespondiert mit dem Durchmesser von zusammenhängenden Regionen, die das menschliche Auge im Bild konstruiert und die Grundlage bildet, um heuristisch Eu- von Heterochromatin zu differenzieren. Man kann hier deutlich sehen, daß das Chromatin in einem dichten Saum um den Nukleolus lokalisiert ist, sowie an manchen Stellen mit der Kernlamina assoziiert. In diesem Fall wird der Nukleolus von der Bildebene wahrscheinlich nur peripher geschnitten, denn normalerweise befinden sich im Zentrum der Nukleoli keine oder nur geringe Nukleosomenkonzentrationen. Es ist bemerkenswert, daß abgesehen von den Nukleoli in keinem der untersuchten Kerne ein nukleosomenfreier Bereich detektiert werden konnte.

5.3.4 Histogramme der Nukleosomendichten in der Interphase

Jeder Bildpunkt in Abb. 5.13 repräsentiert eine definierte Nukleosomenkonzentration im Kern. Die Konzentrationswerte wurden über Histogramme statistisch ausgewertet. Für Abb. 5.14 wurden Nukleosomendichtekarten von drei ausgewählten Kernen erstellt, die in aufsteigender Dichte angeordnet sind (1, 2 und 3). Eine Integration ergab für diese Kerne mittlere Konzentrationen von

Abbildung 5.13 Nukleosomendichtekarte. 230 Grauwerte repräsentieren linear Konzentrationswerte zwischen 0 und 255 μM . Entlang der fett gezeichneten Linie wird ein exemplarisches Profil von Konzentrationen graphisch dargestellt.



110, 128 bzw. 140 μM . Die Verteilung umfaßt hier das gesamte Bild ($c > 0$), d.h. der Zellkern wurde nicht über digitale Bildverarbeitung absegmentiert. Die Ordinate hat die Dimension einer normalisierten relativen Häufigkeit der Nukleosomen im Bild. Dazu wurde mit *NIH Image* zunächst die Verteilung der Grauwerte (= Konzentration) im Bild ermittelt. Da jeder Bildpunkt einem definierten Beobachtungsvolumen entspricht, erhält man die Verteilung der Volumenelemente mit einer bestimmten Konzentration (nicht gezeigt). In einem zweiten Schritt wurde dann die absolute Anzahl der Pixel mit der Nukleosomenkonzentration selbst multipliziert, wodurch man die Anzahl der Nukleosomen erhält, die bei dieser Konzentration vorkommen ($N = c \cdot V_{\text{eff}}$). Abb. 5.14 zeigt auf die Gesamtanzahl normalisierte Verteilungen der Nukleosomenkonzentrationen im Bild.

Tabelle 5.2 Charakteristische Konzentrationen in Interphasekernen von HeLa-Zellen

Kern	Mittelwert	Rand	Gaußverteilungen	
			#	\bar{c} [μM]
1	110	12	85 \pm 31 (21%)	116 \pm 60 (79%)
2	128	16	101 \pm 36 (6%)	131 \pm 67 (94%)
3	140	38	–	143 \pm 65 (100%)

Oberhalb einer kritischen Konzentration c_{krit} ist die Masse der Nukleosomen relativ gleichmäßig, statistisch um einen Mittelwert verteilt. Die leicht asymmetrische Form der Histogramme für die Kerne 1 und 2 konnte durch eine Summe von zwei Gaußfunktionen erfaßt werden, während für den dichtesten Kern 3 eine einfache Gaußfunktion die Daten gut wiedergibt. Die relativen Anteile und Lagen der einzelnen gaußverteilten Populationen sind in Tab. 5.2 aufgeschlüsselt. Ein Großteil der Nukleosomen befinden sich in einer Population mit einem Schwerpunkt bei höheren Dichten, während ein Anteil von 21% bzw. 6% der Nukleosomen einer Population mit kleineren Konzentrationswerten, zugeordnet werden können. Unabhängig von der Gesamtdichte des Kerns lassen sich Gemeinsamkeiten feststellen: (1.) die Mittelwerte der einzelnen Gaußfunktionen der asymmetrischen Verteilungen sind in beiden Fällen (1 und 2) etwa 30 μM voneinander entfernt; (2.) Die Breite der kleineren Population beträgt unabhängig von ihrem relativen Anteil an der Gesamtmasse etwa 30 μM ; (3.) die Breite der großen Population beträgt für alle Kerne etwa 60 μM .

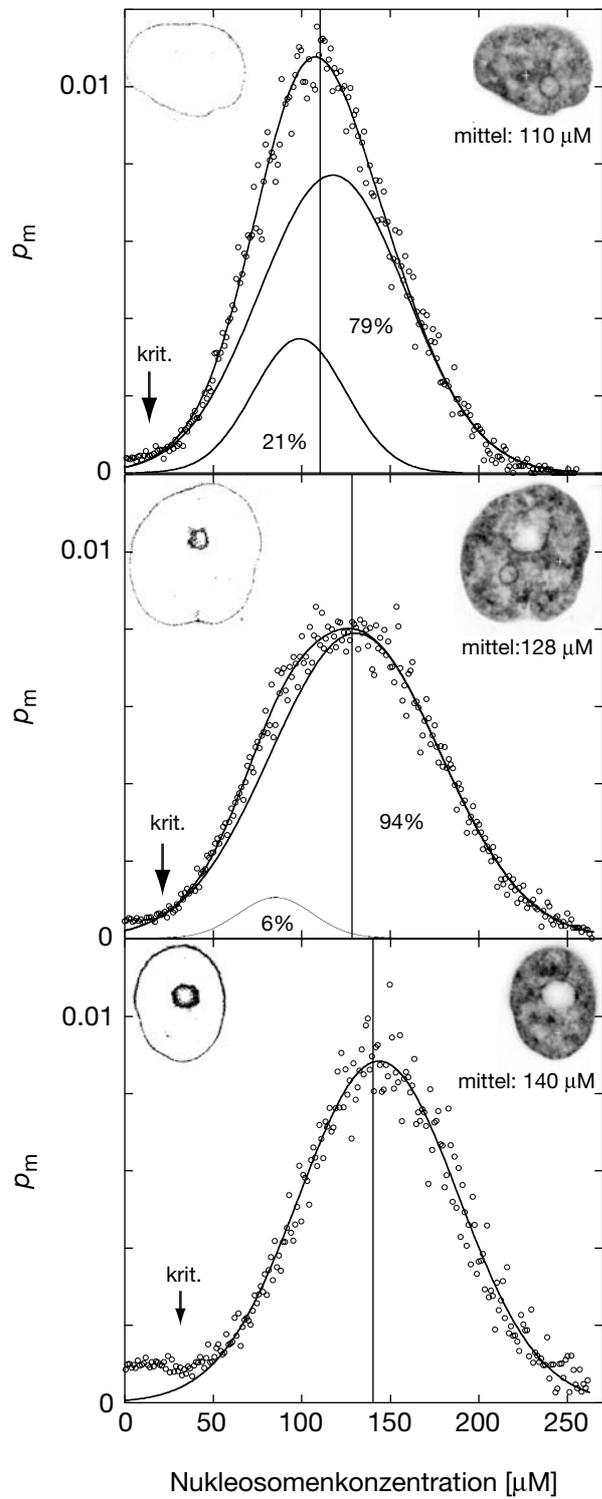
Unterhalb von c_{krit} erscheinen die Nukleosomen nicht mehr statistisch verteilt. Dieser Effekt ist für den dichtesten Kern 3 sehr ausgeprägt: hier findet man eine konstante Masse von Nukleosomen in Konzentrationen von 0 bis 38 μM . In Abb. 5.14 wurde für alle drei Kerne die Lage aller Pixel unterhalb von c_{krit} visualisiert (jeweils oben links). Die hier in schwarz gefärbten Bildpunkte bilden einen Saum um den Kern sowie um den Nukleolus, sind jedoch nur sehr selten in den chromosomalen Regionen dazwischen lokalisiert. Der äußere Rand des Kerns kann nur mit der optisch bedingten Auflösung gemessen werden, so daß eine äußere Schicht von etwa 2-3 Pixel das Histogramm um 0 μM bestimmt⁶. Da die Kontur des Randes und damit die Anzahl der Pixel radial wächst, die gemessenen Konzentrationen aber radial abnehmen, resultiert daraus eine konstante Verteilung um $c = 0$ μM , wie sie im Experiment wiedergegeben wird. Kern 1 zeigt, daß der äußere Saum, der durch diesen technisch bedingten Randeffekt entsteht, relativ dünn sein kann. Daher können die dickeren Randzonen der Kerne 2 und 3 damit nicht erklärt werden, vielmehr handelt es sich hier um eine biologische Struktur. Je größer die Dichte des Kerns, desto mächtiger erscheinen die Übergangsbereiche zwischen den inneren Regionen ($c > c_{\text{krit}}$) und den äußeren nicht-chromatinhaltigen Strukturen wie der Kernlamina oder den Nukleoli. Vermutlich ist in diesen Übergangsbereichen die statistische Expansion der Chromatinfiber durch Ausschlußvolumen anderer Strukturen behindert. Die Mächtigkeit dieser Übergangszonen scheint mit der Dichte des Kerns anzuwachsen.

5.3.5 Histogramm der Nukleosomendichte in der Anaphase

Chromatin kondensiert vor der Kernteilung zu mitotischen Chromosomen. Abb. 5.15 a zeigt ein Fluoreszenzbild eines Kerns in der Anaphase. Die Centromere der Chromosomen wurde vom Spindelapparat bereits an die Polkappen gezogen, während die Arme in Richtung der Äquatorialebene, in der sich die Chromosomen während der Metaphase angeordnet hatten, zurückragen. Ein Histogramm der Nukleosomenkonzentrationen ist in Teilabbildung b gezeigt. Die Verteilung bei

6. Alle konfokalen Fluoreszenzbilder wurden mit 2-3facher Überabtastung (Oversampling) aufgenommen, d.h., einen Pixelabstand 2-3 mal kleiner als die laterale Auflösung der Optik.

Abbildung 5.14 Histogramme der Nukleosomendichten. Drei Kerne (1, 2 und 3) sind nach aufsteigender mittlerer Dichte angeordnet. ρ_m gibt die Verteilung der Masse oder Anzahl der Nukleosomen des konfokalen Querschnitts (jeweils oben links) die sich in einer bestimmten Konzentration befinden. Die Daten wurden mit einer Summe von zwei Gaußfunktionen angepaßt (durchgezogene Linien, Integral in %). Pixel, deren Konzentration unterhalb eines Kritischen Schwellenwertes lag (krit., Pfeil) wurden in schwarz visualisiert (jeweils oben rechts).



niederen Konzentrationen ist vor allem durch die Auflösung bei der Bildnahme bestimmt. Vor allem in z -Richtung liegt diese mit $1\ \mu\text{m}$ in der Größenordnung des Durchmessers der Chromosomenarme. Das Histogramm lässt sich wie oben in drei Bereiche einteilen. Die Konzentrationen $< 100\ \mu\text{M}$ sind vor allem durch Chromosomen außerhalb der Bildebene bestimmt. Eine Reihe von Chromosomen werden aber auch zentral geschnitten, wobei auch bei diesen ein recht großer Randeffekt zu erwarten ist. Die Verteilung $> 100\ \mu\text{M}$ lässt sich hier mit zwei Gaußfunktionen anpassen, wodurch in erster Näherung der Rand von den zentralen Bereichen der Chromosomen (im Histogramm rot, im Einsatzbild schwarz) unterschieden wird. Für mitotische Chromosomen ergeben sich mit diesem Verfahren mittlere Konzentrationen von $310\ \mu\text{M}$ mit Maximalwerten bis $\sim 450\ \mu\text{M}$. Das Chromatin ist gegenüber den mittleren Dichten eines Interphasezellkerns dreifach höher kondensiert.

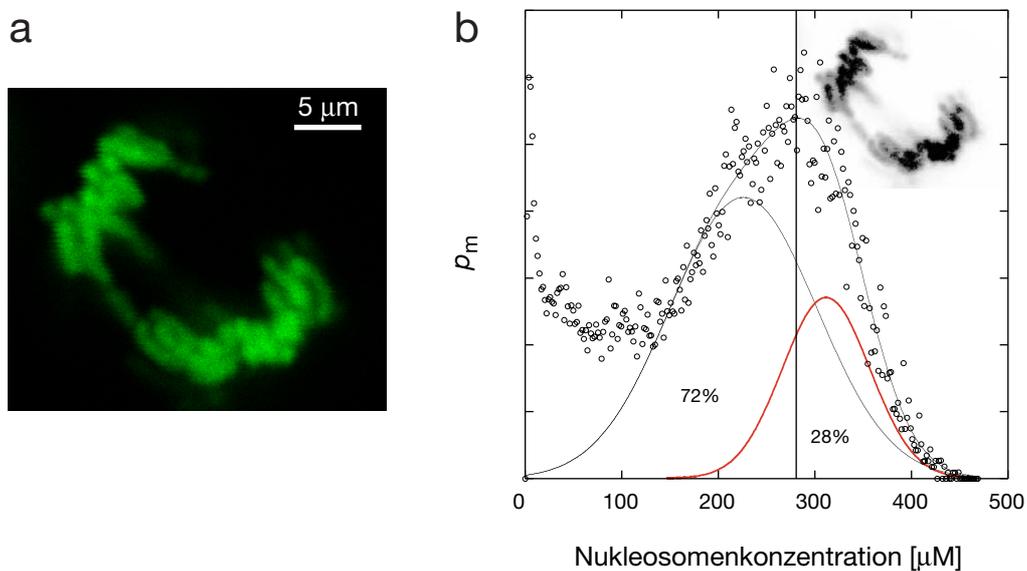


Abbildung 5.15 Chromosomen in der Anaphase.

(a) Fluoreszenzbild ($PD = 0.1\ \mu\text{m}$, $PT = 0.092\ \text{ms}$).

(b) Histogramm der absoluten Nucleosomenkonzentrationen. Die Daten $> 100\ \mu\text{M}$ wurden mit zwei Gaußfunktionen angepasst (durchgezogene Linien, dichte Verteilung in Rot), Pixel mit Konzentrationen $> 280\ \mu\text{M}$ liegen im Zentrum der Chromosomenarme (Einsatzbild).

5.3.6 Diskussion

Ein zentraler Schritt für die Quantifizierung der konfokalen Fluoreszenzbilder ist die Kalibrierung der molekularen Fluoreszenzausbeute im Cytoplasma der Zellen. Die Konzentration der fluoreszierenden Histonkonstrukte kann dort mit FCS bestimmt werden. Im Fließgleichgewicht von Biosynthese und Transport in den Kern stabilisiert sich bei den transformierten Zellen (*H2B-Y*) eine Konzentration von etwa $200 \pm 45\ \text{nM}$. Die Konzentrationen variierten zwischen den einzelnen Zellen, aber auch innerhalb einer Zelle an verschiedenen Positionen. Unabhängig davon war die molekulare Helligkeit der diffundierenden Teilchen vergleichsweise stabil; dies gilt auch für mitotische Zellen mit einer etwa dreifach höheren Konzentration an Teilchen.

Man kann annehmen, daß mit FCS einzelne H2B-EYFP-Proteine beobachtet wurden, die evtl. im Komplex mit nicht-fluoreszierenden endogenen Komponenten vorliegen. In der Literatur gibt es einige Hinweise, daß Histone in der Zelle von anderen Proteinen gebunden werden. Der Transport der Core-Histone in den Kern wurde als rezeptorvermittelter und energieabhängiger Prozeß beschrieben (Baake et al., 2001; Breeuwer und Goldfarb, 1990). Baake et al. zeigen, daß die globuläre Domäne der Histone, die kein klassisches NLS-Signal enthält, ausreicht, um ein fusioniertes Reporterprotein in den Kern zu leiten. Dieses Ergebnis führte zu der Hypothese, daß Histone als Heterodimere schon im Cytoplasma aneinander gebunden vorliegen und in Paaren oder Multimeren in den Kern transportiert werden. Zudem sind eine Reihe von Histonchaperonen isoliert und charakterisiert worden, die bei der Assemblierung von Nukleosomen an der DNA beteiligt sind: z.B. Nukleoplamin, N1/N2, NAP-1/2. NAP-1 enthält eine klassische NLS-Sequenz, bindet vorrangig H2A und H2B, und eine Funktion als Histontransporter wurde bereits vorgeschlagen (Ito et al., 1996).

Eine Ausnahme bildeten eine kleine Gruppe Zellen, bei denen die Konzentration von H2B-EYFP signifikant reduziert, aber gleichzeitig die molekulare Helligkeit um den gleichen Faktor erhöht gemessen wurde. Es könnte sein, daß bei niedrigen Konzentrationen an endogenen Histonen, z.B. in G1 oder G2, die Histontransporter mehr als ein fluoreszierendes Histon binden. Die Tatsache, daß dieser Effekt in weniger als 20% der Zellen gefunden wurde, spricht eher für eine Multimerisierung in G2 als in G1 (siehe auch Tab. 5.1). Diese Vorstellung korreliert mit der Beobachtung, daß NAP-1 in G2 im Cytoplasma akkumuliert (Ito et al., 1996), daher könnte NAP-1 für die Multimerisierung der Histone in dieser Phase des Zellzyklus verantwortlich sein.

Nach Kalibrierung der molekularen Helligkeit von H2B-EYFP für eine bestimmte Beleuchtungsintensität, wurden konfokale Fluoreszenzbilder des Zellkerns aufgenommen. Ein Hintergrund von mobilen fluoreszierenden Histonen wurde mit CP bestimmt: der Laserfokus wird im Chromatin positioniert und das Fluoreszenzsignal über die Zeit beobachtet. Das Signal fällt aufgrund der hohen Bleichrate der immobilisierten Histone in der Chromatinfiber zunächst sehr schnell ab, geht dann aber in einen exponentiellen Zerfall über, der mit einem fortlaufenden Bleichen von mobilen Histonen im Nukleoplasma identifiziert wird. Die Konzentration von mobilem H2B-EYFP im Nukleoplasma beträgt bei diesen Zellen im Mittel 2 μM , also eine etwa zehnfach höhere Konzentration als im Cytoplasma. Dieser Sprung in der Konzentration wird durch einen aktiven Transport an den Kernporen aufrechterhalten. FCS in den ausgebleichten Arealen ergab Diffusionszeiten im ms-Bereich, also in der gleichen Größenordnung wie im Cytoplasma, und bestätigt die Mobilität dieser Komponenten. Die konfokalen Bilder wurden mit 2-3facher Überabtastung aufgenommen. Über die Bleichkurven kann abgeschätzt werden, wieviel Signal eines Pixels durch Messung an einem benachbarten vorausgehenden Pixel gelöscht wurde. Mit einer typischen Pixelzeit von 160 μs beträgt der Signalverlust bei einer Zeitkonstante⁷ von $\sim 1 \text{ s } 10^{-4}$ und ist daher vernachlässigbar. Zieht man den Hintergrund der mobilen Histone vom Bild ab, erhält man Bilder mit absoluten Konzentrationen von immobilisierten Histonen, die über die Einbaurrate an der Chromatinfiber (5%), in Nukleosomendichtekarten umgerechnet wurden.

7. Die Zeit, bei der das Signal auf $1/e$ abgefallen ist; der Verlauf der Bleichkurve für immobilisierte Komponenten ist aber *nicht* exponentiell.

Die Nukleosomendichtekarten enthielten Konzentrationen zwischen 110 und 140 μM . Zum Vergleich: Ein kugelförmiger Kern mit einem Durchmesser von 10 μm erfüllt ein Volumen von etwa 500 μm^3 . Nimmt man das menschliche Genom ($2n$ Chromosomen) bestehend aus $6 \cdot 10^9$ Bp mit 200 Bp pro Nukleosom, so ergibt sich eine mittlere Nukleosomenkonzentration von 110 μM . Die gemessenen Konzentrationen liegen also in einem sinnvollen Bereich. Abweichungen von dem hier abgeschätzten Mittelwert können viele Ursachen haben. Zum einen wächst die Chromatinmenge während der S-Phase auf $4n$. Inwieweit sich das Kernvolumen dazu proportional verhält, und welche Streuung bei dieser Relation zwischen einzelnen Zellen zu erwarten ist, ist noch nicht genau bekannt. Das Kernvolumen selbst kann nur über Bildstapel entlang der z -Achse genau bestimmt werden, die mit dem bestehenden Aufbau noch nicht ausreichend schnell aufgenommen werden können. Die Chromatindichte sowie morphometrische Parameter des Zellkerns über den Zellzyklus hinweg zu studieren und in Beziehung zu setzen, wäre die konsequente Fortsetzung, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr realisiert werden.

Qualitativ können zwei Mechanismen unterschieden werden, wodurch der Raum, in dem Chromatinfibern expandieren können, eingeschränkt wird. Zum einen kann die Kernmembran ein größeres oder kleineres Volumen umfassen. Dabei stellt sich die interessante Frage, wodurch das Kernvolumen bestimmt wird: Ist die Kernmembran den Chromosomen nur „aufgelegt“, oder besteht an der Kernhülle eine mechanischer Expansionsdruck des Chromatins, der durch die Kernlamina gegenstabilisiert wird? Zweitens kann der chromosomale Raum durch dichte Strukturen innerhalb der Kernmembran eingeschränkt werden. Wie Kern 3 in Abb. 5.14 zeigt, sind die Chromatindichten im Bereich dichter Strukturen wie der Kernlamina oder den Nukleoli sehr niedrig. In den chromosomalen Regionen zwischen diesen „Übergangszonen“ bewegen sich die Konzentrationen zwischen 3 und 265 μM . Außer in den Zentren der Nukleoli konnten keine nukleosomenfreie Bereiche kartiert werden.

Auf der andern Seite korrespondieren die hohen Konzentrationen etwas unterhalb von 300 μM mit der mittleren Dichte von mitotischen Chromosomen. In Chromosomen der Anaphase wurden Nukleosomendichten um 300 μM mit Maximalwerten bis zu 450 μM gefunden. Zum Vergleich: Stapelt man die zylinderförmige 30 nm-Fiber in gestrecktem Zustand parallel, ergibt sich, mit einer Massenbelegung von sechs Nukleosomen pro 11 nm, eine Konzentration von $\sim 1\text{mM}$. Im Experiment wurde ein solcher Aggregatzustand bei hohem Druck sichtbar gemacht. Konzentrierte Lösungen von Mononukleosomen bilden in diesen Konzentrationen säulenförmige Stapel, die sich bei zunehmendem osmotischen Druck erst in flächigen Lamellen und dann in hexagonal

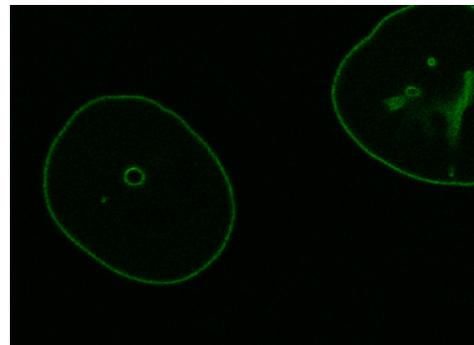


Abbildung 5.16 Anfärbung der Kernlamina über Transfektion einer menschlichen Adrenokarzinoma Zelllinie (SW13) mit einem GFP-Konstrukt von Lamin B. Die Stärke der Kernlamina korrespondiert mit der „Übergangszone“ in Abb. 5.14 (jeweils oben links). Mit freundlicher Genehmigung von Michaela Reichenzeller (DKFZ, Abt. Zellbiologie)

(dichtest) gepackten Kristallen anordnen (Leforestier und Livolant, 1997). Die maximale Kondensation von physiologischem Chromatin in der Interphase liegt also um ein Viertel, für mitotische Chromosomen um die Hälfte niedriger als dieser theoretische Grenzwert.

In Histogrammen sind die Nukleosomendichten eines Kerns relativ gleichmäßig um einen Mittelwert verteilt. Dieses Ergebnis ist heuristisch verständlich wenn man sich elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Glutaraldehyd-fixierten HeLa-Kernen ansieht (Abb. 5.17). Hetero- und Euchromatin kann hier nicht so deutlich unterschieden werden wie z.B. in Blutzellen (Abb. 2.7). Dennoch sind die Histogramme der Nukleosomenkonzentrationen *in vivo* asymmetrisch. Über die Anpassung von Gaußkurven können für Interphase-chromatin in HeLa-Zellen drei Zustände beschrieben werden: Ein Zustand sehr kleiner Konzentrationen in Übergangsbereichen zu nicht-chromosomalen Strukturen und zwei statistisch expandierende Populationen von Nukleosomen mit Mittelwerten nicht weit entfernt von der mittleren Dichte des Kerns. Während der Zustand bei kleinen Dichten vermutlich auf Ausschlußvolumina nicht-chromosomaler Strukturen zurückzuführen ist, könnten die beiden gaußverteilten Populationen zwei verschiedene Kondensationszustände der Chromatinfiber bedeuten. Es fällt auf, daß der Anteil der Nukleosomen, die der Population geringerer Dichte zugeordnet werden, nur zwischen 0 und 20% des Chromatins entsprechen. Ob diese Population sich mit transkriptions- oder replikationsaktiven Bereichen in Verbindung bringen lassen, verbleibt als eine interessante Fragestellung für weiterführende Studien.

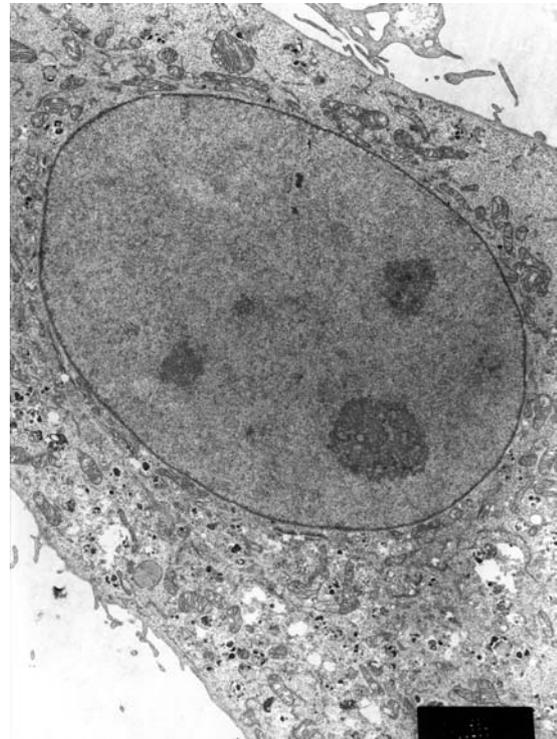


Abbildung 5.17 TEM-Aufnahme einer HeLa-Zelle (Fixierung mit 1% Glutaraldehyd, 4% Formaldehyd, Vergrößerung 10000fach). Drei Nukleoli sind angeschnitten, ansonsten erscheint das Chromatin in Längenskalen von einigen μm homogen. Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Karsten Richter (DKFZ, Abt. Molekulare Genetik)

Die Klassifikation ist in Übereinstimmung mit Belmont et al., 1984. Die Histogramme der DNA-Dichte in feulgengefärbten HeLa-Kernen enthielten drei Maxima: zwei Zustände bei mittleren Dichten sowie ein dritter Zustand bei sehr niedrigen Dichten in kleinen Kernen; ein Zustand der wahrscheinlich unserer Übergangszone entspricht, die ja auch in dichteren, also kleineren Kernen ausgeprägter ist. Mit FFM wird dieses Ergebnis bestätigt, allerdings enthielt keines der Histogramme separate Maxima. Die beiden Gaußverteilungen liegen so dicht zusammen, daß die entsprechenden Areale anhand eines Schwellenwertes nicht aufgelöst werden können. In anderen Worten, es erscheint schwierig, Eu- und Heterochromatin lediglich anhand der absoluten

Nukleosomenkonzentration in der lebenden Zelle zu unterscheiden. Die Daten unterstützen die Sichtweise von Chromatin als ein statistisch verteiltes Polymer mit einer monomeren Einheit von höherer Ordnung als ein einzelnes Nukleosom. Die genaue Regulierung der Linkerlänge könnte eine Voraussetzung darstellen, um eine solche Einheit zu bilden. Die Chromatinfiber scheint dabei in zumindest zwei unterscheidbaren Modifikationen vorzuliegen.

5.4 Austausch von H1-EYFP *in vivo*

Analog zu obigem Verfahren (Knoch et al., 2000) wurde ein Gen für das Fusionsprotein H1-EYFP stabil in das Genom einer HeLa-Zelllinie integriert (hier im folgenden mit *H1-Y* bezeichnet). Die Verteilung der Fluoreszenz in den Zellen ist der von H2B-EYFP sehr ähnlich; mit dem Auge sind die Fluoreszenzbilder der Kerne kaum unterscheidbar. Auch binden die fluoreszierenden Linkerhistone die Chromosomen bei der Chromosomenkondensation, so daß diese selektiv angefärbt werden, während im Cytoplasma, wie auch bei den H2B-EYFP-transformierten Zellen, nur wenig Fluoreszenz meßbar ist. Im Cytoplasma wurde für acht Zellen die Konzentrationen von H1-EYFP mit FCS zu 220 ± 50 nM bestimmt. Das Expressionsniveau von H1-EYFP in Klon *H1-Y* stimmt also mit dem von H2B-EYFP in Klon *H2B-Y* etwa überein.

Die im Vergleich ähnliche Fluoreszenzverteilung von H1-EYFP mit H2B-EYFP spiegelt die Tatsache wieder, daß über die Nukleosomendichte gleichzeitig die Verteilung der Bindungsstellen für H1 abgebildet wird. In Abb. 5.18 ist eine Zelle des Klons *H1-Y* dargestellt. Man sieht im Übersichtsbild den stark fluoreszierenden Kern und das im Vergleich zum Medium durchsichtige Cytoplasma. Der konfokale Schnitt wurde bei $z = 5$ mit doppelter Auflösung aufgezeichnet und eine Position für die CP- und FCS-Messungen ausgewählt. Es wurde 2 min geblichen und anschließend dreimal für 1 min FCS gemessen. Im nachfolgenden Bild ist am Meßpunkt kein definierter Bleichpunkt, sondern ein ausgeschmiert hellerer Bereich zu sehen (man vergleiche mit Abb. 5.12). Dies läßt bereits auf die höhere Beweglichkeit von H1 im Zellkern schließen. Die fluoreszierenden Moleküle diffundieren während der Messung in großer Zahl in das Fokusvolumen zurück und tauschen dort mit den dort gebundenen, ausgebleichten, fluoreszierenden und endogenen Linker-Histonen aus. Ein weiteres Indiz für Bindungsereignisse im Fokusvolumen geben die Autokorrelationskurven. Während in Abb. 5.12 nach der Bleichmessung nur noch eine schnelle, wenn auch behinderte, Diffusionskomponente der mobilen Core-Histone meßbar war, sind die Diffusionszeiten von H1 stark zu längeren Korrelationszeiten hin verschoben. Der hohe Anteil einer langsamen Komponente mit über 200 ms ist durch die temporäre Immobilisierung der Moleküle im Fokusvolumen bedingt. Auch sind die Amplituden zehnfach niedriger als bei entsprechenden Messungen in *H2B-Y*-Zellen, was bedeutet, daß das Reservoir an freiem H1-EYFP durch kontinuierlicher Dissoziation der Moleküle von der Chromatinfiber sehr groß ist.

Wird eine Mischung immobilisierter und freier Komponenten geblichen, die zwischen diesen beiden Zuständen austauschen, kann Gl. (42) angewendet werden. Um die Dissoziationsrate k_{off} zu extrahieren, muß allerdings das Gleichgewichtsverhältnis von freien und gebundenen Molekülen

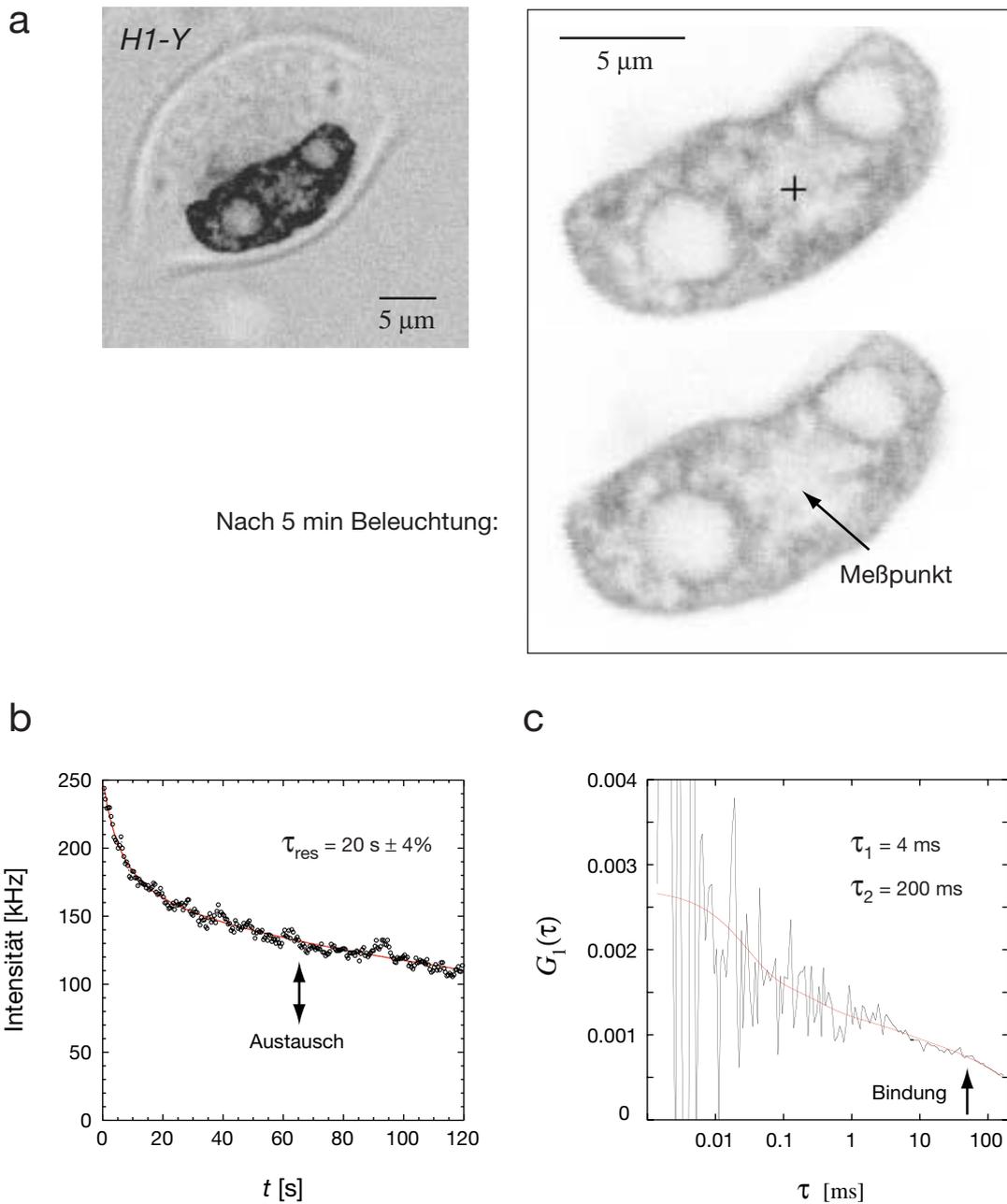


Abbildung 5.18 H1-EYFP exprimierende Zelllinie.

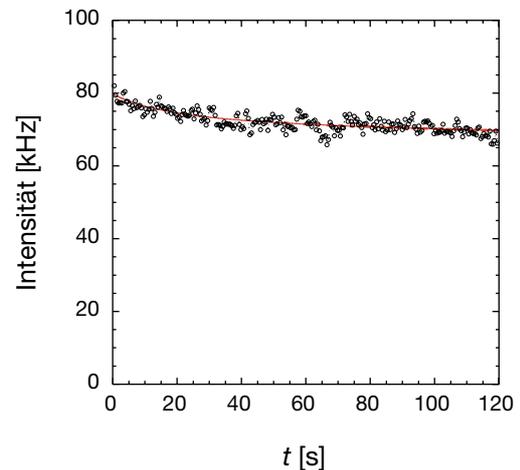
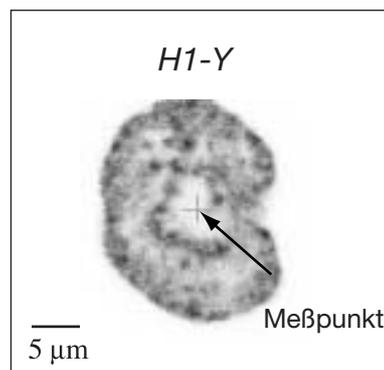
(a) Negativ eines kombinierten Durchlicht- und Fluoreszenzbildes (PT = 0.23 ms, PD = 0.2 µm) sowie zwei als Negativ dargestellte Fluoreszenzbilder (PT = 0.161 ms, PD = 0.1 µm) vor und nach den Messungen an der angezeigten Position (Kreuz).

(b) CP wurde mit Gl. (42) ausgewertet (rot). Der Austausch von H1-EYFP mit einer mittleren Aufenthaltsdauer an der Bindungsstelle τ_{res} an der Chromatinfiber führt zu einem Offset der Bleichkurve.

(c) FCS-Messung am Bleichpunkt. An die Autokorrelationsfunktion wurde eine Modellfunktion mit zwei Komponenten unterschiedlicher Diffusionszeit angepaßt (rot).

als Parameter beim Anpassen vorgegeben werden. Dazu wurde die Gesamtintensität beider Fraktionen aus dem Bild an der gemessenen Position entnommen ($F_{\text{immo}} + F_{\text{diff}}$). Die Gleichgewichtskonzentration von freiem H1-EYFP (F_{diff}) wurde über die Bildintensität in den Nukleoli abgeschätzt. Wie oben beschrieben sind die Nukleosomendichten in den Zentren der Nukleoli nahe bei Null. Erwartungsgemäß enthielten auch Bleichkurven in den Nukleoli einen sehr kleinen Anteil einer immobilisierten Komponente (Abb. 5.19). Unter der Annahme von vernachlässigbar

Abbildung 5.19
Bleichkurve im Nukleolus. Der flache Verlauf bedeutet wenig immobilisierte Fluoreszenz



wenig Bindungsstellen für H1 im zentralen Bereich der Nukleoli korrespondiert die Fluoreszenzintensität im Bild mit dem Reservoir frei beweglicher Histone. Bei diesem Verfahren wurde das Ausschlußvolumen der dichten Struktur von etwa 20% mit berücksichtigt. Auswertung für mehrere Zellen ergab, daß sich im Gleichgewicht etwa 25% der fluoreszenten H1-Moleküle in einem freien und 75% in einem gebundenen Zustand befinden. Dieser Wert wurde bei der Kurvenanpassung der Bleichkurven fixiert. Die mittlere Aufenthaltsdauer $1/k_{\text{off}} = \tau_{\text{res}}$ für H1 an den Bindungsstellen im Chromatin wurde für vier Zellen ermittelt: 16 ± 4 s. Die Anpassung erwies sich dabei als unempfindlich gegenüber Schwankungen des Gleichgewichtsverhältnisses, die aus den Bildern ermittelt wurden. Diese Dissoziationsrate liegt etwa eine Größenordnung unter dem mit FRAP ermittelten Wert (Misteli, et al., 2000). Im Gegensatz zu CP wurde bei diesen Experimenten ein Bereich des konfokalen Bildes großflächig gebleicht und die austauschbedingte Erholung des Signals über Bildnahme gemessen. Das Verhältnis von gebleichtem zu Kernvolumen war daher wesentlich größer. Damit war der Vorrat an fluoreszenten Molekülen deutlich kleiner, die zur Signalerholung beitragen konnten. Möglicherweise werden durch diese beiden Methoden zwei unterschiedlich schnelle Austauschprozesse gesehen.

1234567

Material und Methoden

6.1 Verbrauchsmaterial

Die meisten der verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Sigma* (Deisenhofen) und *Roth* (Karlsruhe) und waren von analytischer Reinheit (mindestens 99.5%). Das zum Ansetzen der Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde einer Reinstwasseranlage *Seralpur* PRO90-CN von *Seral* entnommen. Das Wasser in der Anlage durchläuft einen Aktivkohlefilter, zwei Ionenaustauscher und einen Sterilfilter. Weiteres Verbrauchsmaterial wurde von folgenden Firmen bezogen:

Tabelle 6.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Katalognummer
Agarose	<i>FMC</i> Rockland ME, USA	-
Dialyseschläuche (MWCO 14 000)	<i>Roth</i> Karlsruhe	Visking 1784.1
Kollodiumhülsen	<i>Sartorius</i> Göttingen	13202
Micrococcusnuclease	<i>Amersham Lifesciences</i> Buckinghamshire, UK	E 70196Y
Antikörper living colorsHRP	<i>Clontech Laboratories</i> Heidelberg	8369-1
Luminol (Western Blotting)	<i>New England Biolabs</i> Beverly MA, USA	-
Protein MW-Marker (14.5-96 kDa)	<i>BioRad</i> München	1610304

Tabelle 6.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Firma	Katalognummer
Protein MW-Marker (7.5-118 kDa) prestained	<i>BioRad</i> München	1610318
Nitrocellulose Blotting-Membran <i>Hybond ECL</i>	<i>Amersham Lifesciences</i> Buckinghamshire, UK	-
Film X-Omat	<i>Kodak</i>	1388966
Gel-Blotting-Papier	<i>Schleicher und Schuell</i> Dassel	GB002
DNA MW-Marker (100-1000)	<i>Hybaid-AGS</i> Heidelberg	100BP-S
DNA MW-Marker (100-10 000)	<i>Helena Bioscience</i> USA	HL0013
NAP-5 Säulen	<i>Pharmacia Biotech</i> Freiburg i. Br	52-2074-00
NP-40	<i>Boehringer</i> Mannheim	1332473
Brij-35	<i>Boehringer</i> Mannheim	-
Gekammerte Deckgläser	<i>Nunc</i> Naperville IL USA	155411
Mikrokonzentratoren Vivaspin	<i>Vivascience AG</i> Hannover	VS0211
UZ-Röhrchen UC-13.2 ml	<i>Beckmann Coulter GmbH</i> Krefeld	344059
RPMI 1640	<i>Invitrogen Life Technologies</i> Karlsruhe	-
Lipofectamin Transfection Reagent Kit	<i>Invitrogen Life Technologies</i> Karlsruhe	-
Fluoreszenzfarbstoffe	<i>Molecular Probes</i> Leiden, Niederlande	siehe Tab. 2.3

6.2 Geräte

Tabelle 6.2 Großgeräte

Funktion	Gerät	Hersteller
Absorptionsspektren	Spektralphotometer Cary-4E	<i>Varian</i> Mulgrave Australia
Fluoreszenz: Excitations- und Emissionsspektren	SLM-Aminco 8100 Fluoreszenzspektrometer	<i>SLM</i> Urbana IL, USA
Präparation des Chromatins	präparative Ultrazentrifuge L-8M	<i>Beckman</i>
FCS, FFM	Fluoreszenz- fluktuationsmikroskop (FFM)	Entwicklung in der Arbeitsgruppe am DKFZ

6.3 Gele

6.3.1 Agarosegele

Die DNA der Nukleoproteinkomplexe wurde auf 1% Agarose in 14×14 cm Flachbettgelkammern (Firma cti) in $1 \times$ TBE für 2.5 Stunden bei 130 V aufgetrennt. Anfärbung der DNA erfolgte mit Ethidiumbromid $1 \mu\text{g/ml}$ für 10-20 min in Wasser. Die Gele wurden unter UV-Beleuchtung mit einer CCD-Kamera fotografiert und digital als TIF-Bild abgespeichert (*Bio-print*). Bildauswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm *Intelligent Quantifier, IQ* (*Intelligent Systems Corporation*). $1 \times$ TBE nach (Maniatis et al., 1982).

6.3.2 Polyacrylamidgele

Die Histone wurden in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) elektrophoretisch getrennt. Zwischen dem 5%igen Sammelgel (ca. 2 cm der Laufstrecke) und dem 18%igen Trenngel (ca. 5 cm) bestand ein pH-Sprung von 6.8 auf 9. Für die Elektrophorese und Gelvorbereitung wurde eine Minigelapparatur von *BioRad* verwendet ($8.2 \times 5.5 \times 0.075$ cm). Trenngel: 4 ml 18% Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 29:1) in 250 mM Tris pH 9, 40 μl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 40 μl 10% SDS + 4 μl TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin) zum Polymerisieren. Sammelgel: 2 ml 5% Polyacrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 37.5:1) in 125 mM Tris pH 6.8, 20 μl 10% Ammoniumpersulfat (APS), 20 μl 10% SDS + 2 μl TEMED. Beim Gießen wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet. Die Gele wurden mindestens eine Stunde höchstens über Nacht auspolymerisiert. Die

Histone, respektive die Nukleosomen, wurden in einem SDS-Ladepuffer aufgenommen, 15 min bei 50°C erhitzt und geladen. Die Auftrennung erfolgte in 1 × SDS Laufpuffer bei 150 V konstant für 115 min bei Raumtemperatur. Das Gel wurde entweder für 15 min in Coomassie oder mit Silber nach (Wray et al., 1981) gefärbt (siehe unten). SDS-Ladepuffer, SDS-Laufpuffer und die Coomassiefärbelösung wurden nach (Maniatis et al., 1982) angesetzt.

Für Silberfärbung wurde das Gel 2-3 Stunden in 50% Methanol geschwenkt (mehrmals wechseln). In einem Standzylinder wurden 0.8 g Silbernitrat (AgNO_3) in 4 ml H_2O gelöst (Lösung A) und 21 ml 0.36% NaOH mit 1.4 ml 14.8 M NH_4OH (25% Ammoniak) versetzt (Lösung B). Lösung A wurden unter Rühren tropfenweise zu Lösung B zugegeben (es entsteht kurzfristig ein brauner Niederschlag) und mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt (Lösung C). Das Gel schwenkte 15 min in Lösung C, anschließend wurde es 5 min in H_2O gelegt. Als Entwickler wurden 500 μl 1% Zitronensäure und 50 μl 37% Formaldehyd in 100 ml H_2O gelöst. Der Entwicklungsvorgang sollte beobachtet werden, da schnell eine Überfärbung eintritt. Nach etwa 5-10 min wurde der Entwickler dekantiert und die Reaktion mit 50% Methanol und 10% Essigsäure abgestoppt.

Eine Darstellung der nativen nukleosomalen Komplexe oder der freien nukleosomalen DNA in Abb. 4.3 und 4.13, erfolgte mit nativen 8%igen Polyacrylamidgelen. Zur Darstellung der nukleosomalen DNA wurden die Nukleosomen vor der Elektrophorese 1 Stunde mit Proteinase K (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) bei 37°C verdaut. Für ein Gel mit den Dimensionen (20 × 20 × 0.1 cm) wurden 50 ml angesetzt: 10 ml Polyacrylamid (37.5:1), 34 ml H_2O , 5 ml 10 × TBE, 1 ml 10% (w/v) APS + 15 μl TEMED. Die Nukleosomen wurden in einem nicht-denaturierenden Ladepuffer (6 × LB: 40% (w/v) Saccharose, 0.25 (w/v) Bromphenolblau, 50 mM EDTA) aufgenommen, geladen. Auftrennung erfolgte mit 200 V in 1 × TBE über 3 Stunden bei Raumtemperatur. Die freie DNA, aber auch die Nukleosomen wurden mit Ethidiumbromid 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für 5 min in Wasser unter UV sichtbar gemacht.

6.3.3 Western-Blots

Kernproteine oder Histone wurden mit SDS-PAGE nach dem oben genannten Protokoll elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde zunächst 10-20 min in Transferpuffer (25 mM Tris HCl, 0.2 M Glycin, 20% Methanol) geschwenkt. Die Nitrocellulose-Membran (*Hybond ECL*, *Amersham*) (8.2 × 5.5 cm) wurde mit Wasser benetzt und ebenfalls in TBST 10 min geschwenkt. Auf die Anodenseite der Blotting-Kassette (*Transfer 180*, *ABL Scientific*) wurden drei zurechtgeschnittene Gel-Blotting-Papiere mit Transferpuffer befeuchtet, dann die Membran, das Gel und nochmals dreimal Gel-Blotting-Papier aufeinander gestapelt. Bei jeder Schicht wurden mit einer Pasteurpipette die Luftblasen entfernt (rollen). Blotten erfolgte für 1 Stunde bei 225 mA. Die Membran wurde dreimal für 5 min in 1 × TBST (10 × TBST: 24,2 g Tris, 80 g NaCl, auf 1 l pH 7.6; vor der Verwendung auf 0.1% Tween-20 eingestellt) gewaschen und anschließend eine Stunde in Blockpuffer (1 × TBST + 5% (w/v) Milchpulver) geschwenkt. Nach drei Waschschritten mit 1 × TBST für je 5 min wurde der Antikörper appliziert: Dazu wurde die Membran mit 5 ml einer 1:1000-Verdünnung der Stammlösung des Antikörpers (1 × TBST, 5% BSA) für eine Stunde in einer Folie eingeschweißt inkubiert. Der Antikörper kann mehrmals wieder verwendet

werden (Aufbewahrung bei -20°C). Die Membran wurde daraufhin mehrfach in Blockpuffer und Transferpuffer (mindestens dreimal für je 5 min) gewaschen und über eine chemilumineszente Lösung entwickelt. Dazu wurden je 250 μl einer Luminol- und Peroxid-Lösung (*New England Biolabs*, Beverly MA, USA) in 10 ml Wasser vorverdünnt, auf der Membran verteilt und 1 min geschwenkt. Nach Dekantieren der Lösung wurde die Membran in eine Kassette gelegt, mit Kimwipes abgetupft und den darauffolgenden Minuten ein Kodak-Film (X-Omat, *Kodak*) in der Dunkelkammer belichtet und entwickelt (CURIX HT-330U, *Agfa*).

6.4 Präparation von Chromatin

6.4.1 Isolation intakter Kerne

Petrischalen (Durchmesser 15 cm) mit konfluent gewachsenen Zellen (HeLa oder *H2B-Y*) wurden einmal in 10 ml isotonischem Tris gewaschen (25 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl, 0.3 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4) und zweimal in 5 ml isotonischem HEPES-Puffer (50 mM HEPES, 220 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (1,4-Dithiothreitol), pH 8). Dazu wurden die Zellen im Kaltraum mit den Lösungen geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Schaber von den Petrischalen gelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, die Lösung mit isotonischem HEPES auf 10 ml aufgefüllt und eine Endkonzentration von 0.25% Nonidet P 40 eingestellt. Die Lyse der Plasmamembran erfolgte auf einem Vortex-Gerät. Es wurde viermal in Folge 30 s geschüttelt, jeweils mit 90 s Ruhezeit auf Eis. Die aufgebrochenen Zellen wurden bei 100 rpm bei 4°C (Heraeus, Variofuge K) pelletiert; zu starke Umdrehungszahlen führen zu einer Verklumpung der Kerne. Schließlich wurden die Kerne vorsichtig in RSB (10 mM Tris/HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl, pH 7.4) resuspendiert. Die Kerne konnten in 50% Glycerin mehrere Monate bei -80°C gelagert werden. Die DNA-Konzentration wurde nach (Lawson et al., 1980) bestimmt.

6.4.2 Isolation von Nukleosomenketten

Kerne entsprechend 2 mg DNA wurden vor der Präparation gegen 500 ml RSB für 2-3 Stunden im Kaltraum dialysiert (Visking). Wurden die Kerne frisch präpariert, entfällt dieser Schritt. Dann können die Kerne gleich in 50 ml RSB aufgenommen, geschwenkt und für 5 min bei 1500 rpm abzentrifugiert werden. Das weiche Pellet wurde in 10 ml RSB aufgelöst und mit MNase der Aktivität 1.5 u/ml bei 37°C im Wasserbad in Anwesenheit von 1 mM CaCl verdaut. Die MNase dringt durch die Kernporen ein und schneidet das Chromatin *in situ*. Über die Dauer der Verdauung kann die Länge der Nukleosomenketten eingestellt werden. Dies muß für jede Stammlösung von MNase erneut durchgeführt werden. Die MNase kann in 50% Glycerin bei -20°C für viele Monate gelagert werden. Für Gradienten mit Nukleosomenverteilungen wie in Abb. 5.2 wurde 10 min verdaut. Für Mononukleosomen reichen 20-30 min, für Oligonukleosomen entsprechend 5 min oder kürzer. Die Reaktion wurde mit 5 mM EGTA gestoppt, die Kerne wurde nochmals pelletiert und in 250 μl 0.2 mM EDTA resuspendiert um für 10 min hypertonisches Schwellen

der Kerne auf Eis zu bewirken. Die Kernmembran wird mit 1% Nonidet P40 durch 90 s Schütteln auf einem Vortex-Gerät vollständig lysiert.

200 µl des Lysats wurden auf einen Saccharosegradient geladen. Über das Volumen der geladenen Probe kann die Trennschärfe bei der Sedimentation reguliert werden. Die Gradienten wurden vor der Präparation hergestellt und im Kühlschrank gelagert: In ein 13 ml-Röhrchen wurde ein Kissen von 1 ml 70%iger Saccharose pipettiert und mit einem Gradientenmischer ein linear anwachsendes Mischungsverhältnis von 30%iger und 10%iger Saccharoselösung (100 mM NaCl) überschichtet. Die Chromatinproben wurden dann im Gradient mit einer präparativen Ultrazentrifuge (*Beckman* L-8M, Rotor SW-41) für 15h bei 40 000 rpm sedimentiert. Der Gradient wurde sequentiell in 500 µl-Aliquots von hohen zu niederen Zuckerkonzentrationen fraktioniert (F1-F20). Zur Darstellung der Fragmentlängen, wurden 10 µl von jeder Fraktion mit 50 µg/ml Proteinase K verdaut und die DNA mit 1%igen Agarosegelen dargestellt. Fraktionen mit einheitlichen DNA-Fragmentlängen wurden vereinigt, gegen TE20 (10 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM KCl) dialysiert und eingeeengt (Vivaspin 500, PSE-Membran). Die Nukleosomenketten wurden über mehrere Wochen im Kühlschrank bei 8°C gelagert.

6.4.3 Markierung mit aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoffen

Die lyophilisierten Farbstoffe wurden nach Herstellerangaben in DMSO (Dimethylsulfoxid) oder DMF (Dimethylformamid) in Konzentrationen von ~100 µM aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt. Die Markierung der Nukleosomen erfolgte in den angegebenen Konzentrationen (Kap. 3) in 500 µl-Ansätzen in einem Eppendorf-Gefäß. Der Farbstoff und die Nukleosomen wurden in 10 mM Bicarbonat, 1 mM EDTA, pH 8.4 gemischt und die Reaktion für eine Stunde bei Raumtemperatur vollzogen. Der freie Farbstoff wurde anschließend mit Kollodiumhülsen (*Sartorius*) über Dialyse oder über Gelfiltration (NAP-5, *Pharmacia Biotech*) entfernt. NAP-5-Säulen (Durchmesser 0.9 cm, Höhe 2.8 cm) sind Gelfiltrationssäulen mit einer Füllung aus Sephadex G-25. Für eine Aufreinigung der Nukleosomen wurde die Säule mit etwa 10 ml Puffer äquilibriert, 500 µl geladen und mit 1 ml Puffer in beliebigen Fraktionen eluiert.

6.5 Zellkultur

Adhärente HeLa-Zellen (ATCC CCL 2) wuchsen in phenolrotfreiem RPMI mit 10% fötalem Kälberserum bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂. Für die Passagen (alle 2-3 Tage oder bei Konfluenz) wurden die Zellen mit einer Lösung von Trypsin/EDTA, je 0.125% (w/v), von der Gewebekulturflasche gelöst und 1:20 und 1:40 in Medium verdünnt neu angesetzt. Zählung der Wachstumskurven erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Transfektion mit den Expressionsvektoren erfolgte mit Lipofectamin nach einem Protokoll des Herstellers.

Die Zellen wurden in der Regel ein Tag vor der FFM-Messungen auf den gekammerten Deckgläsern angesetzt. Die Deckgläser (*Nunc*), mit denen die mikroskopischen Messungen durchgeführt wurden, sind über aufgeklebte Kunststoffächer in Kammern aufgeteilt. Es kann in 1-, 2-, 4- oder

8-kammrigen Küvetten gemessen werden. Eine konfluent gewachsene Gewebekulturflasche (*Falcon*, 25 cm²) enthält etwa 200 000 Zellen/cm³. Die Zellen müssen so verdünnt werden, daß beim Ansetzen der Kammern etwa 100 000 Zellen auf die Gesamtfläche verteilt werden; bei geringeren Dichten wachsen die Zellen nicht gut an. Messungen können dann innerhalb der folgenden 48 Stunden durchgeführt werden, wobei sich die Zellen zu späteren Zeitpunkten weniger bewegen.

6.6 Fluorimeter

Für Fluoreszenzspektroskopie stand das Fluoreszenzspektralphotometer SLM-Aminco 8100 (*SLM*, Urbana IL, USA) zur Verfügung. Die OD der Proben im Absorptionsmaximum des Farbstoffs lag bei allen Messungen unter 0.03. Der Meßraum wurde mit Wasserzirkulation auf 20°C temperiert. Als Lichtquelle diente eine 150 W Xenon-Lampe, mit der über Monochromatoren und Blenden (Schlitzweite 4 mm), eine dreifenstrige Quarzküvette (50 µl, 3 mm, *Hellma*, Müllheim) beleuchtet wurde. Die Messungen erfolgten gegen eine interne Referenz mit einer Vorspannung von 1000 V (Probe und Referenz) an den Photomultipliern mit einer zehnfachen Verstärkung des Signals (Probe : Referenz = 10:1). Alle Spektren wurden auf die wellenlängenabhängige Charakteristik des Instruments und für Beiträge des Puffers korrigiert. Eine Integration des Signals erfolgte an den Daten mit dem Programm *Kaleidagraph* (*Synergy Software*).

6.7 Absorptionsspektroskopie

Absorption wurden mit dem Spektralphotometer Cary 4E (*Varian*, Mulgrave, Australia) gemessen. Mit diesem Gerät können Spektren in einem Wellenlängenbereich von 220 bis 750 nm mit einem Fehler von 0.001 OD aufgenommen werden. Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen über die Absorption bei 260 nm wurde mit 1 OD = 50 µg/ml gerechnet. Bei hohen Nukleosomenkonzentrationen konnte bei manchen Messungen ein flacher Anstieg der OD oberhalb von 400 nm gesehen werden, was nicht mit Absorption, sondern durch elastisch gestreutes Licht verursacht werden kann (Rayleigh-Streuung). Bei diesen Kurven wurde in einem Wellenlängenbereich in dem keine Absorption der DNA mehr zu erwarten ist (> 400 nm), eine Funktion $A(\lambda) = k/\lambda^4 + A_0$ mit k und A_0 als beliebige Parameter angepasst und von dem gemessenen Absorptionsspektrum subtrahiert. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit Quarzküvetten (*Hellma*), deren Lichtweg (3 mm oder 1 cm) über das Lambert-Beersche Gesetz berücksichtigt wurde.

6.8 FFM

Der experimentelle Aufbau des FFM sowie der theoretische Hintergrund zur Analyse von Korrelationsfunktionen wurde ausführlich in Kap. 3 beschrieben. Für alle Experimente in Kap. 4 wurde

mit den Wellenlängen 488 nm und 568 nm, für Messungen in Kap. 5 (EYFP-Konstrukte) nur mit 488 nm angeregt. Alle Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Zellen wurden nie länger als 2-3 Stunden beobachtet, um Artefakte durch ungünstige Wachstumsbedingungen auszuschließen.

FCS in freier Lösung wurde mit einer Fokustiefe von 50 μm in z -Richtung gemessen. Die Position des Deckglases kann vor der Messung festgestellt werden, indem die Reflexionen des Anregungslichts über das Okular beim Durchfahren des z -Bereichs beobachtet werden. Die Koordinaten im Mikroskopprogramm können dann an der Grenzfläche zwischen Probe und Deckglas zurückgesetzt werden, was eine relative Orientierung in z -Richtung erlaubt. Die vom Korrelator ausgegebenen Textdateien wurden mit einem im Labor entwickelten Programm ausgewertet (*Quickfit*). Die Gln. (5) und (7) können interaktiv über einen Marquadt-Levenberg-Algorithmus an die gemessenen Kurven angepaßt werden. Verschiedene Modellfunktionen können damit ausgewählt, Parameter als Startwerte vorgegeben oder bei der Anpassung fixiert werden. Über einen iterativen Prozeß kann der Anwender die Abweichung einer Modellfunktion von der Meßkurve minimieren und die Fitfunktion, sowie die Parameter über Textdateien exportieren.

Für die quantitative Auswertung konfokaler Bilder, Linienprofile und Histogramme wurden *NIH Image V1.61* (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) sowie *Photoshop 4.0* und *Illustrator 8.0* von *Adobe* verwendet.

1234567

Zusammenfassung

Der Komplex aus Histonen und DNA, das Nukleosom, bildet die erste Kompaktierungsstufe eukaryontischer Genome, auf der alle höheren Strukturen aufbauen. Die Nukleosomen spielen für zahlreiche molekulare Prozesse an der DNA eine zentrale Rolle. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit Bindungszustand und Mobilität der Histone und die Stabilität der Nukleosomen *in vitro* und *in vivo* sowie die räumliche Verteilung der Nukleosomen in der lebenden Zelle untersucht. Die Verwendung fluoreszenzbasierter Methoden erforderte eine entsprechende Markierung der Histone, die mit zwei Techniken vorgenommen wurde: die synthetische Konjugation kleiner organischer Farbstoffe an Aminogruppen der Histone und die Konstruktion von autofluoreszierenden Histonfusionproteinen mit Techniken der DNA-Rekombination.

Die Beobachtung der fluoreszierenden Histone erfolgte mit einer Kombination von Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) und kontinuierlichem Bleichen der Fluoreszenz (CP) im gleichen optischen Aufbau, dem Fluoreszenzfluktuationmikroskop (FFM). Mit FCS können über eine Autokorrelationsanalyse der diffusionsbedingten Intensitätsfluktuationen die Konzentration und der Diffusionskoeffizient freibeweglicher Moleküle in Lösung bestimmt werden. In einem Zwei-Farben-Aufbau kann die Anregung und Detektion gleichzeitig in zwei spektral voneinander getrennten Kanälen erfolgen, so daß bindungsbedingte Korrelationen verschiedenfarbiger Teilchen beobachtet werden können. In beiden Aufbauten können Bindungsereignisse von fluoreszenzmarkierten Teilchen in der Lösung quantitativ verfolgt werden: im Ein-Farben-Aufbau über eine Verlängerung der Diffusionszeit, im Zwei-Farben-Aufbau über eine Erhöhung der Kreuzkorrelationsamplitude. Aufgrund der kleinen Abmessung des Fokusvolumens (Dimensionen im μm -Bereich) kann auch in lebenden Zellen gemessen werden. Mit Hilfe konfokaler Bildnahme und zugehöriger Software kann der Laserfokus vom Anwender mit hoher Präzision in der Probe positioniert werden. Über FCS-Messungen der fluoreszierenden Teilchen in einem freibeweglichen Zustand können die molekulare Fluoreszenzausbeute einzelner Fluorophore bestimmt und die im konfokalen Bild aufgezeichneten Intensitäten in absolute Konzentrationen von Fluorophoren umgerechnet werden. Die Mobilität der abgebildeten Moleküle kann dann in einem weiteren Schritt mit CP untersucht werden. Bleicht und detektiert man gleichzeitig die Fluoreszenz an einer Position, so werden zunächst die immobilisierten fluoreszierenden Teilchen ausgebleicht, während die Bleichwahrscheinlichkeit freibeweglicher Fluorophore geringer ist: Bleichkurven sind also zweiphasig, und unterschiedlich bewegliche Fraktionen der abgebildeten Fluorophore können unterschieden werden.

Verschiedene instrumentelle Randbedingungen, aber auch die biologische Heterogenität der markierten Proben führen zu einer Reihe von Randeffekten, die eine Interpretation von Korrelationskurven schnell kompliziert werden läßt. Daher wurde zunächst in allgemeiner Weise geklärt, wie sich molekulare Parameter, aber auch die technische Realisierung des Meßaufbaus auf die Korrelationsfunktionen auswirken. Ein bereits bestehender theoretischer Formalismus wurde auf zwei Anwendungsbereiche erweitert: (1.) Die allgemeine Analyse bimolekularer Bindungsreaktionen über Zwei-Farben-FCS – der Formalismus erlaubt die Bestimmung der Anzahl der gebundenen Liganden, der Dissoziationskonstanten und die Unterscheidung verschiedener Reaktionsmechanismen. (2.) Die Charakterisierung einer synthetischen Markierung mit Ein-Farben-FCS – sofern sich der reaktive Farbstoff und das zu markierende Substrat in ihrer Diffusionszeit hinreichend unterscheiden, können die Anzahl der Bindungsstellen, die Anzahl der gebundenen Fluorophore sowie eine Änderung der Fluoreszenzausbeute im gebundenen Zustand bestimmt werden.

Im Experiment wurden mit Texas Red (rot) und Bodipy FL (grün) markierte Nukleosomenketten in freier Lösung mit Zwei-Farben-FCS untersucht. Über eine gleichzeitige Markierung mit beiden Farbstoffen, aber in unterschiedlichen Verhältnissen, konnte gezeigt werden, daß die Reaktion diffusionskontrolliert abläuft, so daß die Sättigung der Bindungsstellen über die Konzentration der Farbstoffe eingestellt werden kann. Die Anzahl der Bindungsstellen für aminoreaktive Farbstoffe am Nukleosom beträgt etwa 40. Oligonukleosomen (4-7mere) sind in freier Lösung mit einer Nukleosomenkonzentration von etwa 150 nM bei einem Salzgehalt von 0 bis 300 mM NaCl über viele Stunden stabil. Geringe Mengen (~10%) von fluoreszierenden Histonen dissoziieren, dieses Verhalten ist bei 300 mM NaCl ausgeprägter als bei 10 mM. Austausch von Histonen konnte nur bei 0 mM NaCl in TE beobachtet werden. Hier bindet ein Teil der Histone (~16%) wieder an die Nukleosomenketten. Um welche Histonklassen es sich dabei handelt, kann nicht entschieden werden, da bei diesem Markierungsverfahren an allen Histonen Fluoreszenz gebunden wird. Eine genaue Analyse der Markierungsprodukte wurde durch die Tendenz zur unspezifischen Adsorption und Aggregation ("Klebrigkeit") dieser Farbstoffe erschwert. Daher wurden in einer zweiten Meßserie Mononukleosomen über Succinimidylester der Farbstoffe Alexa 568 und Rhodamin Green markiert. Das oben genannte Konzept der Charakterisierung eines markierten Substrats über Ein-Farben-FCS wird hier im Experiment angewendet: Beide Farbstoffe sind im gebundenen Zustand etwa um 50% gelöscht. Bei einem weiteren Markierungsansatz wurde dann die mittlere Anzahl der gebundenen Fluorophore bestimmt und als Anwendung eine Gelfiltration in absoluten Konzentrationen evaluiert.

Die Fluoreszenzmarkierung von Histonen mit autofluoreszierenden Proteindomänen ermöglicht es, die Mobilität und Verteilung in ihrer natürlichen Umgebung zu studieren. Dazu wurde eine Zelllinie etabliert, die konstitutiv das Fusionsprotein H2B-EYFP exprimiert. Lichtmikroskopisch sind diese Zellen von normalen HeLa-Zellen nicht unterscheidbar, zeigen jedoch bei Fluoreszenzanregung stark fluoreszierende Kerne. Die Histone werden sehr effektiv in den Zellkern transportiert und in funktionales Chromatin integriert.

Nukleosomenketten unterschiedlicher Länge wurden aus den fluoreszierenden Kernen biochemisch isoliert. Eine Quantifizierung der Fragmentlängen der nukleosomalen DNA ergab eine

signifikant vergrößerte Wiederholungslänge der Nukleosomen auf der genomischen DNA (203 ± 4 Bp) verglichen mit nicht-fluoreszierenden HeLa-Zellen (185 ± 10 Bp). Per Western-Blot wurde das Histonkonstrukt identifiziert und auf Polyacrylamidgelen über Proteinfärbung dargestellt. Die fluoreszierenden Nukleosomenketten wurden in freier Lösung mit Ein-Farben-FCS untersucht: Unter der Annahme, daß H2B-EYFP statistisch in die Nukleosomen eingebaut wird, erhält man bei präparierten Nukleosomenketten eine definierte Anzahl von Fluorophoren am Komplex und damit eine definierte Erhöhung der Amplitude mit FCS. Messungen an Mono- bis Heptameren ergaben in Übereinstimmung mit Proteinmengen auf Gelen, daß 5% der in die Nukleosomen der Zelle integrierten H2B-Domänen mit einem fluoreszierenden EYFP fusioniert sind. Dies bedeutet, daß an der Chromatinfiber etwa jedes zehnte Nukleosom eine EYFP-Domäne trägt.

Die fluoreszierenden Histonkonstrukte diffundieren mit etwa $7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ frei im Cytoplasma. Die Konzentrationen zeigen für diesen Klon einige Variation um 200 nM. Es besteht dabei ein Konzentrationsgradient von peripheren Bereichen des Cytoplasmas zu höheren Konzentrationen in Kernnähe. Daraus kann man schließen, daß der Konzentrationsgradient möglicherweise eine entsprechende Verteilung von membrangebundenen Bindungsstellen widerspiegelt. Dieses Bild wird auch durch eine zunehmende Behinderung der freien Diffusion in Kernnähe unterstützt. Die beobachteten Teilchen zeigten eine einheitliche molekulare Helligkeit unabhängig von ihrer Konzentration, d.h. die fluoreszierenden Histone diffundieren wahrscheinlich im Komplex mit endogenen Proteinen, Histonen und/oder Histonchaperonen wie z.B. NAP-1. Jedoch war in 20% der Zellen die molekulare Helligkeit auf etwa das zweifache erhöht bei einer gleichzeitig halbierten Konzentration, was auf eine Multimerisierung der fluoreszierenden Histonkonstrukte in bestimmten Phasen des Zellzyklus hinweist. Die Konzentration an frei diffundierendem H2B-EYFP ist im Nukleoplasma etwa zehnfach erhöht, was auf unidirektionalen Transport der Histone zurückgeführt werden könnte. Aber auch im Kern variieren die Konzentrationen zwischen verschiedenen Bereichen: so wurden im Nukleolus um 20% niedrigere Werte gefunden als in Bereichen mit hoher Nukleosomendichte, und dieses Verhalten könnte mit einem hohen Ausschlußvolumen dieser dichten Struktur in Zusammenhang stehen. Dafür sprechen auch FCS-Messungen in Bleichpunkten, die im Nukleolus eine deutlich stärkere Behinderung der freien Diffusion anzeigen als im Chromatin.

Quantitativ ausgewertete Nukleosomendichtekarten von Kernen in der Interphase ergeben mittlere Konzentrationen zwischen 110 und 140 μM . In den Kernen schwanken die Konzentrationswerte der Nukleosomen zwischen 50 und 200 μM auf Längenskalen von etwa 1 μm . In Histogrammen sind die Nukleosomenkonzentrationen gleichmäßig um den Mittelwert verteilt. In dichten, nicht-chromosomalen Strukturen wie den Nukleoli und der Kernlamina wird die statistische Expansion der Chromatinfiber eingeschränkt, und diese Bereiche bestimmen den Verlauf der Histogramme bei niedrigen Konzentrationen. In keinem der Kerne wurden je zwei separate Maxima einer höheren oder niedrigeren Dichte gemessen, die direkt mit Hetero- oder Euchromatin assoziiert werden könnten, jedoch ist die Form der Histogramme für die meisten Kerne leicht zu niedrigen Konzentrationswerten verkippt. Der Verlauf bei höheren Konzentrationen kann mit

einer oder der Summe von zwei Gaußfunktionen wiedergegeben werden, wobei die Nukleosomen dabei nicht gleichmäßig auf beide Populationen verteilt sind: die Gaußverteilung bei niedrigen Dichten umfaßt in allen Fällen weniger als 20% der Nukleosomen. Die Breite der beiden Gaußverteilungen ist unabhängig von der mittleren Dichte des Kerns mit 30 μM für die Population bei kleineren Dichten und 60 μM bei höheren Dichten konstant. Dies könnte mit zwei unterschiedlichen Kondensationszuständen der Chromatinfiber in der Interphase korrespondieren. Chromosomen in der Anaphase zeigten eine dreifach höhere Konzentration als Chromatin in der Interphase mit einem Mittelwert von etwa 300 μM und Maximalwerten bis zu 450 μM .

CLSM und CP in H2B-EYFP-haltigem Chromatin zeigen, daß die Proteine über viele Minuten bis Stunden stabil in die Nukleosomenstruktur eingebaut bleiben. Daher wurde zum Vergleich eine Zelllinie untersucht, die ein Fusionsprotein aus dem Linker-Histon H1 und EYFP exprimiert. Die Verteilung der Fluoreszenz im Kern entsprach der von H2B-EYFP-exprimierenden Zellen, ein erwartetes Ergebnis, da die Nukleosomendichte für die Linker-Histone die Verteilung der Bindungsstellen am Chromatin widerspiegelt. Messungen im Cytoplasma bestätigten ein vergleichbares Expressionsniveau der Histonkonstrukte in beiden Zelllinien. Die Bindung von H1 ist sehr dynamisch, eine quantitative Auswertung der Bleichkurven ergab eine mittlere Aufenthaltsdauer von 16 ± 4 s.

Die Kenntnis absoluter Konzentrationen von Bindungsstellen und der Dissoziationsraten von Liganden ist ein wichtiger Schritt zur Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten biologischer Wechselwirkungen in ihrer natürlichen Umgebung, der lebenden Zelle.

Anhang

Zu Kapitel 3: statistische Momente

Das i -te Moment einer Trinomialverteilung $P(n_a, n_b)$ wird durch die i -te Ableitung der zugehörigen Erzeugendensfunktion $(p_a + p_b + p_c)^n$ generiert:

Erstes Moment:

$$\begin{aligned}\frac{\partial}{\partial p_a}(p_a + p_b + p_c)^n &= \sum_{n_a+n_b}^n \binom{n}{n_a} \binom{n-n_a}{n_b} p_a^{n_a} p_b^{n_b} p_c^{n-n_a-n_b} \\ n \underbrace{(p_a + p_b + p_c)}^{n-1} &= \sum_{n_a+n_b}^n \binom{n}{n_a} \binom{n-n_a}{n_b} n_a p_a^{n_a-1} p_b^{n_b} p_c^{n-n_a-n_b} \\ np_a &= \sum_{n_a+n_b=0}^n n_a P(n_a, n_b)\end{aligned}\tag{A1}$$

Die zweiten Momente in Analogie:

$$n(n-1)p_a p_b = \sum_{n_a+n_b=0}^n n_a P(n_a, n_b)\tag{A2}$$

$$n(n-1)p_a^2 + np_a = \sum_{n_a+n_b=0}^n n_a^2 P(n_a, n_b)\tag{A3}$$

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AFM	Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CD	circular dichroism
CLSM	confocal laser scanning microscopy
CP	continuous photobleaching
CRM	chromatin remodeling machine
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindole
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DLS	dynamische Lichtstreuung
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	DNS (desoxyribonucleic acid)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EC-M	cryo electron microscopy
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraacetat
EYFP	enhanced yellow fluorescent protein
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCCS	fluorescence cross correlation spectroscopy
FCS	fluorescence correlation spectroscopy
FFM	Fluoreszenzfluktuationsmikroskop
FISH	fluorescence in situ hybridisation
fl	Femtoliter

FLIP	fluorescence loss in photo-bleaching
FRAP	fluorescence recovery after photo-bleaching
GFP	green fluorescent protein
Gl.	Gleichung
GTF	geometrische Transmissionsfunktion
HMG	high mobility group (protein)
Kap.	Kapitel
M	Mol/Liter
MNase	Micrococcusnuklease
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off
NHCP	non-histone-chromosomal protein
NLS	nuclear localisation sequence
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PD	pixel distance
PDB	protein data bank
PSF	point spread function
PT	pixel time
RGB-Bild	Bild im Rot-Grün-Blau-Farbraum
RL	repeat length
RNA	ribonucleic acid
RSB	resuspending buffer
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	Succinimidylester
STEM	scanning transmission electron microscopy
STF	spektrale Transmissionsfunktion
Tab.	Tabelle
TE20	10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 20 mM KCL, pH 7.5
TEM	transmission electron microscopy
TEMED	N, N, N', N', -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
(w/v)	weight per volume
XFP	X-beliebige spektrale Variante von GFP
YFP	yellow fluorescent protein

Literaturverzeichnis

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1994. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London.
- Allis, C. D., L. G. Chicoine, R. Richman, and I. G. Schulman. 1985. Deposition-related histone acetylation in micronuclei of conjugating Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:8048-8052.
- Anselmi, C., G. Bocchinfuso, P. DeSantis, M. Savino, and A. Scipioni. 1999. Dual role of DNA intrinsic curvature and flexibility in determining nucleosome stability. *J Mol Biol*. 286:1293-1301.
- Ausio, J., F. Dong, and K. E. van Holde. 1989. Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol*. 206:451-463.
- Axelrod, D., D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb. 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J*. 16:1055-1069.
- Baake, M., D. Doenecke, and W. Albig. 2001. Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones. *J Cell Biochem*. 81:333-346.
- Baumann, C. G., S. B. Smith, V. A. Bloomfield, and C. Bustamante. 1997. Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:6185-6190.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, J. Dubochet, and C. L. Woodcock. 1995. Chromatin conformation and salt-induced compaction: Three-dimensional structural information from cryoelectron microscopy. *The Journal of Cell Biology*. 131:1365-1376.
- Bednar, J., R. A. Horowitz, S. A. Grigoryev, L. M. Carruthers, J. C. Hansen, A. J. Koster, and C. L. Woodcock. 1998. Nucleosomes, linker DNA, and linker histone form a unique structural motif that directs the higher-order folding and compaction of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95:14173-14178.
- Belmont, A., F. M. Kendall, and C. Nicolini. 1984. Three-dimensional intranuclear DNA organization in situ: three states of condensation and their redistribution as a function of nuclear size near the G1-S border in HeLa S-3 cells. *J Cell Sci*. 65:123-138.

- Berland, K. M., P. T. So, and E. Gratton. 1995. Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment. *Biophys. J.* 68:694-701.
- Breeuwer, M., and D. S. Goldfarb. 1990. Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell.* 60:999-1008.
- Brock, R., and T. M. Jovin. 1998. Fluorescence correlation microscopy (FCM) - Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) taken into the cell. *Cell. Mol. Biol.* 44:847-856.
- Campbell, A. M. 1978. Conformational Variation in Superhelical DNA. *Biochem. J.* 171:281-283.
- Caron, F., and J. O. Thomas. 1981. Exchange of histone H1 between segments of chromatin. *J Mol Biol.* 146:513-537.
- Clapier, C. R., G. Langst, D. F. Corona, P. B. Becker, and K. P. Nightingale. 2001. Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol.* 21:875-883.
- Clark, D. J., and G. Felsenfeld. 1992. A nucleosome core is transferred out of the path of a transcribing polymerase. *Cell.* 71:11-22.
- Compton, J. L., M. Bellard, and P. Chambon. 1976. Biochemical evidence of variability in the DNA repeat length in the chromatin of higher eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:4382-4386.
- Cremer, T., and C. Cremer. 2001. Chromosome Territories, Nuclear Architecture and Gene Regulation in Mammalian Cells. *Nature Reviews Genetics.* 2:292-301.
- Daban, J. R., and C. R. Cantor. 1982. Role of histone pairs H2A,H2B and H3,H4 in the self-assembly of nucleosome core particles. *J Mol Biol.* 156:771-789.
- Daban, J. R., and M. D. Guasch. 1980. Exposed hydrophobic regions in histone oligomers studied by fluorescence. *Biochim Biophys Acta.* 625:237-247.
- Dey, A., J. Ellenberg, A. Farina, A. E. Coleman, T. Maruyama, S. Sciortino, J. Lippincott-Schwartz, and K. Ozato. 2000. A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol.* 20:6537-6549.
- Edmondson, D. G., W. Zhang, A. Watson, W. Xu, J. R. Bone, Y. Yu, D. Stillman, and S. Y. Roth. 1998. In vivo functions of histone acetylation/deacetylation in Tup1p repression and Gcn5p activation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 63:459-468.
- Ellenberg, J., and J. Lippincott-Schwartz. 1999. Dynamics and mobility of nuclear envelope proteins in interphase and mitotic cells revealed by green fluorescent protein chimeras. *Methods.* 19:362-372.
- Elson, E. L., and D. Magde. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers.* 13:1-27.
- Fabre, E., and E. C. Hurt. 1994. Nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol.* 6:335-342.

- Finch, J. T., and A. Klug. 1976. Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 73:1897-1901.
- Flemming, W. 1882. Zellsubstanz, Kern- und Zelltheilung.
- Fletcher, T. M., and J. C. Hansen. 1996. The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 6:149-188.
- Gallego, F., X. Fernandez-Busquets, and J. R. Daban. 1995. Mechanism of nucleosome dissociation produced by transcription elongation in a short chromatin template. *Biochemistry*. 34:6711-6719.
- Garcia-Ramirez, M., F. Dong, and J. Ausio. 1992. Role of the histone "tails" in the folding of oligonucleosomes depleted of histone H1. *The Journal of Biological Chemistry*. 267:19587-19595.
- Georgel, P. T., T. Tsukiyama, and C. Wu. 1997. Role of histone tails in nucleosome remodeling by Drosophila NURF. *Embo J*. 16:4717-4726.
- Gerchman, S. E., and V. Ramakrishnan. 1987. Chromatin higher-order structure studied by neutron scattering and scanning transmission electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 84:7802-7806.
- Godde, J. S., and A. P. Wolffe. 1995. Disruption of reconstituted nucleosomes. The effect of particle concentration, MgCl₂ and KCl concentration, the histone tails, and temperature. *J Biol Chem*. 270:27399-27402.
- Görlich, D., and I. W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science*. 271:1513-1518.
- Graziano, V., S. E. Gerchman, D. K. Schneider, and V. Ramakrishnan. 1994. Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament. *Nature*. 368:351-354.
- Gregory, P. D., and W. Horz. 1998. Chromatin and transcription--how transcription factors battle with a repressive chromatin environment. *Eur J Biochem*. 251:9-18.
- Gruenbaum, Y., K. L. Wilson, A. Harel, M. Goldberg, and M. Cohen. 2000. Review: nuclear lamins--structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol*. 129:313-323.
- Hagerman, P. J. 1988. Flexibility of DNA. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*. 17:265-286.
- Hamiche, A., R. Sandaltzopoulos, D. A. Gdula, and C. Wu. 1999. ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. *Cell*. 97:833-842.
- Hansen, J. C., C. Tse, and A. P. Wolffe. 1998. Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry*. 37:17637-17641.
- Hansen, J. C., K. E. van Holde, and D. Lohr. 1991. The mechanism of nucleosome assembly onto oligomers of the sea urchin 5 S DNA positioning sequence. *J Biol Chem*. 266:4276-4282.

- Haugland, R. P. 1992. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. Molecular Probes, Eugene, USA.
- Haupts, U., S. Maiti, P. Schwille, and W. W. Webb. 1998. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95:13573-13578.
- Hecht, A., T. Laroche, S. Strahl-Bolsinger, S. M. Gasser, and M. Grunstein. 1995. Histone H3 and H4 N-Termini Interact with SIR3 and SIR4 Proteins: A Molecular Model for the Formation of Heterochromatin in Yeast. *Cell.* 80:583-592.
- Imbalzano, A. N. 1998. Energy-dependent chromatin remodelers: complex complexes and their components. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 8:225-255.
- Ito, T., M. Bulger, R. Kobayashi, and J. T. Kadonaga. 1996. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP- facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol Cell Biol.* 16:3112-3124.
- Kanda, T., K. F. Sullivan, and G. M. Wahl. 1998. Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells. *Curr. Biol.* 8:377-385.
- Kettling, U., A. Koltermann, P. Schwille, and M. Eigen. 1998. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross- correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 95:1416-1420.
- Kimura, H., and P. R. Cook. 2001. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* 153:1341-1353.
- Kleinig, H., and P. Sitte. 1986. Zellbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Knoch, T. A., 1998. Dreidimensionale Organisation von Chromosomen-Domänen in Simulation und Experiment. Diplomarbeit. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Knoch, T. A., W. Waldeck, G. Müller, A. Alonso, and J. Langowski. 2000. DNA-Sequenz und Verfahren zur in vivo Markierung und Analyse von DNA/Chromatin in Zellen. In Deutsche Patentanmeldung 100 13 204.9, Germany.
- Koltermann, A., U. Kettling, J. Bieschke, T. Winkler, and M. Eigen. 1998. Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high throughput screening for enzyme activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 95:1421-1426.
- Koppel, D. 1974. Statistical accuracy in fluorescence correlation spectroscopy. *Phys. Rev. A.* 10:1938-1945.
- Kornberg, R. D., and Y. Lorch. 1999. Chromatin-modifying and -remodeling complexes. *Curr Opin Genet Dev.* 9:148-151.
- Lamb, D. C., A. Schenk, C. Rocker, C. Scalfi-Happ, and G. U. Nienhaus. 2000. Sensitivity enhancement in fluorescence correlation spectroscopy of multiple species using time-gated detection. *Biophys J.* 79:1129-1138.

- Lawson, G. M., M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1980. Deoxyribonuclease I sensitivity of the nontranscribed sequences flanking the 5' and 3' ends of the ovomucoid gene and the ovalbumin and its related X and Y genes in hen oviduct nuclei. *Biochemistry*. 19:4403-4441.
- Leforestier, A., and F. Livolant. 1997. Liquid crystalline ordering of nucleosome core particles under macromolecular crowding conditions: evidence for a discotic columnar hexagonal phase. *Biophys J*. 73:1771-1776.
- Leuba, S. H., C. Bustamante, K. van Holde, and J. Zlatanova. 1998a. Linker histone tails and N-tails of histone H3 are redundant: scanning force microscopy studies of reconstituted fibers. *Biophys J*. 74:2830-2839.
- Leuba, S. H., C. Bustamante, J. Zlatanova, and K. van Holde. 1998b. Contributions of linker histones and histone H3 to chromatin structure: scanning force microscopy studies on trypsinized fibers. *Biophys J*. 74:2823-2829.
- Lever, M. A., J. P. Th'ng, X. Sun, and M. J. Hendzel. 2000. Rapid exchange of histone H1.1 on chromatin in living human cells. *Nature*. 408:873-876.
- Levinger, L., and A. Varshavsky. 1982. Selective arrangement of ubiquitinated and D1 protein-containing nucleosomes within the *Drosophila* genome. *Cell*. 28:375-385.
- Logie, C., C. Tse, J. C. Hansen, and C. L. Peterson. 1999. The core histone N-terminal domains are required for multiple rounds of catalytic chromatin remodeling by the SWI/SNF and RSC complexes. *Biochemistry*. 38:2514-2522.
- Lorch, Y., M. Zhang, and R. D. Kornberg. 1999. Histone octamer transfer by a chromatin-remodeling complex. *Cell*. 96:389-392.
- Louters, L., and R. Chalkley. 1984. In vitro exchange of nucleosomal histones H2a and H2b. *Biochemistry*. 23:547-552.
- Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, and T. J. Richmond. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 389:251-260.
- Magde, D., E. L. Elson, and W. W. Webb. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*. 13:29-61.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Marion, C., C. Hesse-Bezot, P. Bezot, M. J. Marion, B. Roux, and J. C. Bernengo. 1985. The effect of histone H1 on the compaction of oligonucleosomes. A quasielastic light scattering study. *Biophys Chem*. 22:53-64.
- McQuibban, G. A., C. N. Commisso-Cappelli, and P. N. Lewis. 1998. Assembly, remodeling, and histone binding capabilities of yeast nucleosome assembly protein 1. *J Biol Chem*. 273:6582-6590.
- Meersseman, G., S. Pennings, and E. M. Bradbury. 1992. Mobile nucleosomes--a general behavior. *Embo J*. 11:2951-2959.

- Meseth, U., T. Wohland, R. Rigler, and H. Vogel. 1999. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophysical Journal*. 76:1619-1631.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin, and D. T. Brown. 2000. Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*. 408:877-881.
- Monier, K., J. C. Armas, S. Etteldorf, P. Ghazal, and K. F. Sullivan. 2000. Annexation of the interchromosomal space during viral infection. *Nat Cell Biol*. 2:661-665.
- Münkel, C., R. Eils, D. Zink, S. Dietzel, T. Cremer, and J. Langowski. 1999. Compartmentalization of interphase chromosomes observed in simulation and experiment. *Journal of Molecular Biology*. 285:1053-1065.
- Pennings, S., G. Meersseman, and E. M. Bradbury. 1991. Mobility of positioned nucleosomes on 5 S rDNA. *J Mol Biol*. 220:101-110.
- Perche, P. Y., C. Vourc'h, L. Konecny, C. Souchier, M. Robert-Nicoud, S. Dimitrov, and S. Khochbin. 2000. Higher concentrations of histone macroH2A in the Barr body are correlated with higher nucleosome density. *Curr Biol*. 10:1531-1534.
- Peters, R., A. Brünger, and K. Schulten. 1981. Continuous fluorescence microphotolysis: A sensitive method for study of diffusion processes in single cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 78:962-966.
- Phair, R. D., and T. Misteli. 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*. 404:604-609.
- Qian, H., and E. L. Elson. 1991. Analysis of Confocal Laser-Microscope Optics for 3-D Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Appl. Opt.* 30:1185-1195.
- Qian, H., G. M. Raymond, and J. B. Bassingthwaight. 1999. Stochastic fractal behavior in concentration fluctuation and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Chemistry*. 80:1-5.
- Record, M. T., Jr., W. Zhang, and C. F. Anderson. 1998. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Adv Protein Chem*. 51:281-353.
- Ricka, J., and T. Binkert. 1989. Direct measurement of a distinct correlation function by fluorescence cross correlation. *Phys. Rev. A*. 39:2646-2652.
- Rigler, R., Z. Foldes-Papp, F. J. Meyer-Almes, C. Sammet, M. Volcker, and A. Schnetz. 1998. Fluorescence cross-correlation: a new concept for polymerase chain reaction. *J. Biotechnol*. 63:97-109.
- Rigler, R., Ü. Mets, J. Widengren, and P. Kask. 1993. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*. 22:169-175.

- Rigler, R., J. Widengren, and Ü. Mets. 1992. Interaction and kinetics of single molecules as observed by fluorescence correlation spectroscopy. Springer, Berlin.
- Rippe, K. 2000. Simultaneous binding of two DNA duplexes to the NtrC-enhancer complex studied by two-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochemistry*. 39:2131-2139.
- Royer, C. A., T. Ropp, and S. F. Scarlata. 1992. Solution studies of the interactions between the histone core proteins and DNA using fluorescence spectroscopy. *Biophys Chem*. 43:197-211.
- Rydberg, B., W. R. Holley, I. S. Mian, and A. Chatterjee. 1998. Chromatin Conformation in Living Cells: Support for a Zig-Zag Model of the 30 nm Chromatin Fiber. *J Mol Biol*. 284:71-84.
- Sadoni, N., K. F. Sullivan, P. Weinzierl, E. H. Stelzer, and D. Zink. 2001. Large-scale chromatin fibers of living cells display a discontinuous functional organization. *Chromosoma*. 110:39-51.
- Schardin, M., T. Cremer, H. D. Hager, and M. Lang. 1985. Specific staining of human chromosomes in Chinese hamster x man hybrid cell lines demonstrates interphase chromosome territories. *Hum. Genet*. 71:281-287.
- Schiessel, H., J. Widom, R. F. Bruinsma, and W. M. Gelbart. 2001. Polymer Reptation and Nucleosome Repositioning. *Phys Rev Lett*. 86:4414-4417.
- Schwarz, P. M., A. Felthauer, T. M. Fletcher, and J. C. Hansen. 1996. Reversible oligonucleosome self-association: dependence on divalent cations and core histone tail domains. *Biochemistry*. 35:4009-4015.
- Schwarz, P. M., and J. C. Hansen. 1994. Formation and stability of higher order chromatin structures. Contributions of the histone octamer. *J Biol Chem*. 269:16284-16289.
- Schwille, P., U. Haupts, S. Maiti, and W. W. Webb. 1999. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J*. 77:2251-2265.
- Schwille, P., S. Kummer, A. A. Heikal, W. E. Moerner, and W. W. Webb. 2000. Fluorescence correlation spectroscopy reveals fast optical excitation- driven intramolecular dynamics of yellow fluorescent proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 97:151-156.
- Schwille, P., F. J. Meyer-Almes, and R. Rigler. 1997. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophysical Journal*. 72:1878-1886.
- Simpson, R. T. 1978. Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry*. 17:5524-5531.
- Smith, M. M., and O. S. Andresson. 1983. DNA sequences of yeast H3 and H4 histone genes from two non-allelic gene sets encode identical H3 and H4 proteins. *J Mol Biol*. 169:663-690.
- Strahl, B. D., and C. D. Allis. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 403:41-45.

- Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development*. 12:599-606.
- Studitsky, V. M., D. J. Clark, and G. Felsenfeld. 1994. A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template. *Cell*. 76:371-382.
- Swaminathan, R., S. Bicknese, N. Periasamy, and A. S. Verkman. 1996. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: translational diffusion of a small fluorescent solute measured by total internal reflection-fluorescence photobleaching recovery. *Biophys. J.* 71:1140-1151.
- Tate, V. E., and L. Philipson. 1979. Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. *Nucleic Acids Res.* 6:2769-2785.
- Tewes, M. 1998. Aufbau eines Experiments zur Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie, Erweiterung der theoretischen Grundlagen und biologische Anwendungen. PhD Thesis. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Thompson, N. L. 1991. Fluorescence Correlation Spectroscopy. *In* Topics in Fluorescence Spectroscopy. J. R. Lakowicz, editor. Plenum Press, New York. 337-378.
- Tse, C., and J. C. Hansen. 1997. Hybrid trypsinized nucleosomal arrays: identification of multiple functional roles of the H2A/H2B and H3/H4 N-termini in chromatin fiber compaction. *Biochemistry*. 36:11381-11388.
- Tse, C., T. Sera, A. P. Wolffe, and J. C. Hansen. 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Molecular and Cellular Biology*. 18:4629-4638.
- Tsukamoto, T., N. Hashiguchi, S. M. Janicki, T. Tumber, A. S. Belmont, and D. L. Spector. 2000. Visualization of gene activity in living cells. *Nat. Cell Biol.* 2:871-878.
- van Holde, K., and J. Zlatanova. 1996. What determines the folding of the chromatin fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 93:10548-10555.
- van Holde, K. E. 1989. Chromatin. Springer, Heidelberg.
- Varga-Weisz, P. D., M. Wilm, E. Bonte, K. Dumas, M. Mann, and P. B. Becker. 1997. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II [published erratum appears in *Nature* 1997 Oct 30;389(6654):1003]. *Nature*. 388:598-602.
- Verschure, P. J., I. van Der Kraan, E. M. Manders, and R. van Driel. 1999. Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories. *J Cell Biol.* 147:13-24.
- Voordouw, G., and H. Eisenberg. 1978. Binding of additional histones to chromatin core particles. *Nature*. 273:446-448.
- Wachsmuth, M. 2001. Fluoreszenzfluktuationmikroskopie: Entwicklung eines Prototyps, Theorie und Messung der Beweglichkeit von Biomolekülen im Zellkern. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg.

- Wachsmuth, M., W. Waldeck, and J. Langowski. 2000. Anomalous diffusion of fluorescent probes inside living cell nuclei investigated by spatially-resolved fluorescence correlation spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 298:677-689.
- Webb, W. W. 1976. Applications of fluorescence correlation spectroscopy. *Q Rev Biophys.* 9:49-68.
- Weidemann, T. 1998. Untersuchungen zum Histon austausch in Chromatin mit Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Diploma Thesis. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Weidemann, T., Wachsmuth, M., Tewes, M., Rippe, K., and J. Langowski. 2002. Analysis of Ligand Binding by Two-Colour Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. *Single Mol.* 3:49-61.
- Whitehouse, I., A. Flaus, B. R. Cairns, M. F. White, J. L. Workman, and T. Owen-Hughes. 1999. Nucleosome mobilization catalysed by the yeast SWI/SNF complex. *Nature.* 400:784-787.
- Widengren, J., Ü. Mets, and R. Rigler. 1995. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Triplet States in Solution: A Theoretical and Experimental Study. *J. Phys. Chem.* 99:13368-13379.
- Widengren, J., and R. Rigler. 1998. Fluorescence correlation spectroscopy as a tool to investigate chemical reactions in solutions and on cell surfaces. *Cell. Mol. Biol.* 44:857-879.
- Widom, J. 1999. Equilibrium and dynamic nucleosome stability. *Methods Mol Biol.* 119:61-77.
- Wolffe, A. 1995. Chromatin: Structure and Function. Academic Press, London.
- Wong, M., J. Allan, and M. Smulson. 1984. The mechanism of histone H1 cross-linking by poly(ADP-ribosylation). Reconstitution with peptide domains. *J Biol Chem.* 259:7963-7969.
- Woodcock, C. L. 1994. Chromatin fibers observed in situ in frozen hydrated sections. Native fiber diameter is not correlated with nucleosome repeat length. *J Cell Biol.* 125:11-19.
- Wray, W., T. Boulikas, V. P. Wray, and R. Hancock. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 118:197-203.
- Wu, R. S., and W. M. Bonner. 1981. Separation of basal histone synthesis from S-phase histone synthesis in dividing cells. *Cell.* 27:321-330.
- Yager, T. D., C. T. McMurray, and K. E. van Holde. 1989. Salt-induced release of DNA from nucleosome core particles. *Biochemistry.* 28:2271-2281.
- Zentgraf, H., and W. W. Franke. 1984. Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes. *J Cell Biol.* 99:272-286.
- Zink, D., T. Cremer, R. Saffrich, R. Fischer, M. F. Trendelenburg, W. Ansorge, and E. H. Stelzer. 1998. Structure and dynamics of human interphase chromosome territories in vivo. *Hum Genet.* 102:241-251.

Zlatanova, J., S. H. Leuba, and K. van Holde. 1998. Chromatin fiber structure: morphology, molecular determinants, structural transitions. *Biophys J.* 74:2554-2566.

Danksagung

Ich danke Jörg Langowski für die stets freundliche und offene Betreuung und die Gelegenheit, am interessanten wissenschaftlichen Leben dieser Arbeitsgruppe teilzuhaben,

Jeremy Smith für die kurzentschlossene Begutachtung der Arbeit,

Malte Wachsmuth für Spaziergänge an der Charles Street, brillante Gespräche und eine außergewöhnliche Zusammenarbeit,

Tobias A. Knoch für nicht-alltägliche Inspirationen,

Katalin Tóth für die gute Betreuung in der Spektroskopie,

Waldemar Waldeck für Hilfestellungen, nicht nur bei den Chromatinpräparationen,

Karsten Rippe für humorvolle Einblicke in das Wissenschaftlerdasein und gute fachliche Gespräche sowie

Nathalie Brun für viele hilfreiche Tips im Laboralltag.

Großer Dank gilt Markus Göker und Gerald Weidemann für ihren Einsatz bei der Fertigstellung der Arbeit.

Des weiteren danke ich herzlich allen früheren und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Bemühungen und ihren Humor: Alexandra Schulz, Erika Stolte, Felix Kipert, Filip Lankas, Gabriele Müller, Gero Wedemann, Jan Lubitzki, Karsten Rippe, Maiwen Coudron, Malte Busiek, Markus Hammermann, Michael Tewes, Nina Baudendistel, Norbert Mücke, Katalin Fejes-Tóth, Konstantin Klenin und Sabine Vogel.

Diese Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg von September 1998 bis April 2002 in der Abteilung Biophysik der Makromoleküle unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Langowski durchgeführt.

„Eine Doktorarbeit wird im Leben eines Doktoranden schrittweise zu einem Absolutum und erweitert den Bannkreis ihrer Aufmerksamkeit: Anfänglich entschuldigt man sich noch, daß man schon wieder auf dieses Thema zu sprechen kommt, später wird es zur Selbsterhaltung. Daß man aber durchhält, trotzdem noch ein Mensch unter Menschen bleibt, weitermacht, Hoffnung und Vertrauen schöpft und trotz ungewissem Ende eine glücklich zu nennende Zeit verlebt, verdanke ich vielen Personen, von denen ich hier einige namentlich nennen möchte: Edina Kis, Markus Göker, Frank Hirth, Lars Baumbusch, Malte Wachsmuth, Felix Bestvater, Gabi Kollender, Karoline Hering, Tobias A. Knoch, Katja Mast, Carsten Steinkamp und der HÖ-Kreis sowie meine Familie.“