
**CHARAKTERISIERUNG REKOMBINANTER
KATHEPSIN B-FLUORESZENZPROTEIN-CHIMÄREN
IN LUNGENTUMORZELLEN**

MÖGLICHKEITEN NEUER FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHER VERFAHREN

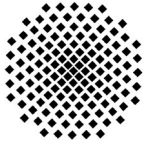
Von der Fakultät Geo- und Biowissenschaften der Universität Stuttgart
genehmigte Abhandlung zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Felix Bestvater
aus Gagarin

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Mitberichter: Apl. Prof. Dr. Eberhard Spiess
Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juli 2005

**Institut für Zellbiologie und Immunologie
Universität Stuttgart**

2005



Universität Stuttgart
Biologisches Institut
Pfaffenwaldring 57
D-70550 Stuttgart



DKFZ
Biomed. Strukturanalyse
Im Neuenheimer Feld 280
D-69120 Heidelberg

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Heidelberg, den 31.03.2005

Der unentwegte Drang zur Innovation, das Gefühl, nichts auf der Welt sei gut genug und müsse kontinuierlich verbessert werden, ist eine Krankheit.

Erwin Chargaff

(Frankfurter Allgemeine Zeitung v. 02.06.2001)

KOOPERATIONEN

Die praktischen Tätigkeiten wurden in den Abteilungen „Biomedizinische Strukturanalyse“ und „Biochemie der Zelle“ am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt. Die vorliegende Dissertationsschrift wird dem Institut für „Zellbiologie und Immunologie“ der Universität Stuttgart vorgelegt.

Teile dieser Arbeit entstanden in Zusammenarbeit mit ...

- ... Thomas Feurer, Gregor Stobrawa & Martin Hacker (Institut für Optik und Quantenelektronik, Friedrich-Schiller-Universität Jena; Zwei-Photonen-Spektren; §3.7.3)
- ... Helmut Acker, Torsten Porwol & Christof Wotzlaw (Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund; Zwei-Photonen-Mikroskopie; §3.7.3)
- ... Tobias A. Knoch (DKFZ; Konversionsexperimente; §4.1.3)
- ... Bernd Werle & Anja Stremmer (Thoraxklinik Heidelberg gGmbH, Heidelberg; Ermittlung enzymatischer Aktivitäten; §3.5.5; *in situ*-Hybridisierung; §3.6.7)
- ... Andreas Hunziker (DKFZ; DNA-Sequenzierung; §3.4.12)
- ... Angel Alonso & Gergana Dobрева (DKFZ; Alternative Transfektion; §3.6.3)
- ... Michael Stöhr & Klaus Hexel (DKFZ; FACS-Messungen; §3.6.9)
- ... Karsten Richter (DKFZ) & Jens Rietdorf (EMBL, Heidelberg; LSM; §3.7.2)

Die jeweiligen Arbeitsbeiträge sowie anderenorts veröffentlichte Teilergebnisse sind an den entsprechenden Textstellen aufgeführt. Allen Beteiligten sei an dieser Stelle ein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit ausgesprochen.

DANKSAGUNG

Mein Dank gebührt ...

- ... vor allen Dingen Prof. Eberhard Spiess, der mich mit Rat und Tat durch die Promotionszeit gelotst hat. Ohne seine Unterstützung in allen Fragen, seine praktische Hilfe und sein verständnisvolles Entgegenkommen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.
- ... Prof. Klaus Pfizenmaier für die intensive Fernbetreuung und die konstruktiven Vorschläge während der „Journal Club“-Seminare. Elvira Haas und Angelika Hausser danke ich für die Mitteilung der Seminartermine, ohne die ich mehr als nur einen Termin versäumt hätte.
- ... Prof. Dietrich Werner für die freundliche Aufnahme als Dauergast in seiner Abteilung. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre stete Hilfsbereitschaft.
- ... Claudia Müller und Anna Heckel-Pompey für die praktische Unterstützung im Laboralltag.
- ... Kollegen und Kooperationspartnern für die Überlassung von Arbeitsmaterialien: Gergana Dobрева (DKFZ), Birgit Krahlting (DKFZ), Jens Rietdorf (EMBL, Heidelberg), Thomas Kietzmann (Universität Göttingen), Tobias Knoch (DKFZ), Jörg Uhlmann (DKFZ) und Kathrin Müntener (Universität Zürich, Schweiz).
- ... Thomas Weidemann und Malte Wachsmuth (DKFZ) für ihre Expertise bezüglich der Interpretation von Photobleichexperimenten.
- ... Shirley Gil-Parrado für die fruchtbare Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Calpaine.
- ... schließlich meiner Freundin Christina, meiner Familie und meinen Freunden für den Rückenwind, den ich von ihnen allen erhalten habe.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN	IX
1 ZUSAMMENFASSUNG	
1.1 ABSTRACT	1
1.1.1 <i>Methodical aspects of the investigation of living cells</i>	1
1.1.2 <i>The cysteine peptidase cathepsin B</i>	5
1.2 KURZFASSUNG	12
2 EINLEITUNG	
2.1 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	15
2.2 KATHEPSIN B	16
2.2.1 <i>Enzymatische Klassifizierung</i>	16
2.2.2 <i>Zymogenaktivierung und Sekretion</i>	17
2.2.3 <i>Struktur und Reaktionsmechanismus</i>	19
2.2.4 <i>Enzymatische Aktivität</i>	20
2.2.5 <i>Substrate und Inhibitoren</i>	20
2.2.6 <i>Physiologische Bedeutung</i>	23
2.2.7 <i>Alternative Spleißvarianten</i>	26
2.3 INTRAZELLULÄRER PROTEINTRANSPORT	28
2.3.1 <i>ER-adressierte Transportwege</i>	28
2.3.2 <i>Mitochondriale Adressierung</i>	30
2.3.3 <i>Nukleozytoplasmatische Transportmechanismen</i>	31
2.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	32
3 MATERIAL UND METHODEN	
3.1 COMPUTERANWENDUNGEN UND GERÄTE	33
3.2 MATERIALIEN	34
3.2.1 <i>Chemikalien und biologische Reagenzien</i>	35
3.2.2 <i>Reagenzien-Sätze (Kits)</i>	37
3.2.3 <i>Komplexe Lösungen</i>	37
3.2.4 <i>Antikörper und abiotische Fluoreszenzmarker</i>	40
3.2.5 <i>Antibiotika</i>	42
3.2.6 <i>Plasmide und Vektoren</i>	42
3.2.7 <i>Oligonukleotide</i>	44
3.3 MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN	45
3.3.1 <i>Bakterienstämme und Anzucht</i>	45
3.3.2 <i>Transformation kompetenter Zellen</i>	46

3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.4.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	47
3.4.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	47
3.4.3	<i>Präparation von Nukleinsäuren</i>	48
3.4.4	<i>Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</i>	49
3.4.5	<i>DNA-Reinigung</i>	49
3.4.6	<i>Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren</i>	50
3.4.7	<i>Ortspezifische Mutagenese</i>	51
3.4.8	<i>Identifizierung rekombinanter Vektorkonstrukte</i>	52
3.4.9	<i>Vektorkonstruktion</i>	53
3.4.10	<i>DNA-Fragmentierung als Apoptosenachweis</i>	56
3.4.11	<i>Herstellung von RNA-Sonden durch in vitro-Transkription</i>	56
3.4.12	<i>DNA-Sequenzierung</i>	56
3.5	PROTEIN-ANALYTIK	57
3.5.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	57
3.5.2	<i>Western-Transfer-Analyse</i>	57
3.5.3	<i>Gewinnung von Zellhomogenaten</i>	58
3.5.4	<i>Bestimmung von Proteinkonzentrationen</i>	59
3.5.5	<i>Ermittlung enzymatischer Aktivitäten</i>	59
3.5.6	<i>pH-Titration von Fluoreszenzproteinen</i>	60
3.6	ZELLKULTUR	61
3.6.1	<i>Zelllinien</i>	61
3.6.2	<i>Kultivierung eukaryotischer Zellen</i>	61
3.6.3	<i>Transfektionsmethoden</i>	63
3.6.4	<i>Selektion und Gewinnung von Zellklonen</i>	64
3.6.5	<i>Zellfixierung und Herstellung von Dauerpräparaten</i>	64
3.6.6	<i>Kernisolierung</i>	64
3.6.7	<i>Zytochemische Charakterisierung</i>	65
3.6.8	<i>Inhibition zellulärer Transportmechanismen</i>	66
3.6.9	<i>Zelltod-Untersuchungen</i>	66
3.7	FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN	67
3.7.1	<i>Digitale Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie</i>	67
3.7.2	<i>Laser-Scanning-Mikroskopie</i>	68
3.7.3	<i>Zwei-Photonen-Mikroskopie</i>	68
3.7.4	<i>Rechnergestützte lichtmikroskopische Methoden</i>	72
4	ERGEBNISSE	
4.1	ASPEKTE DER LEBENDZELLBEOBACHTUNG	74
4.1.1	<i>Zellvitalität</i>	74
4.1.2	<i>Fluoreszenzproteine</i>	76
4.1.3	<i>Simultane Kotransfektion</i>	80
4.1.4	<i>Zwei-Photonen-Mikroskopie</i>	86

4.2	IN VIVO-CHARAKTERISIERUNG VON KATHEPSIN B	93
4.2.1	<i>Klonierung des Vollängenprodukts</i>	93
4.2.2	<i>Expression und posttranslationale Prozessierung</i>	94
4.2.3	<i>Wachstum und Morphologie transfizierter Zellen</i>	97
4.2.4	<i>Intrazellulärer Transport</i>	99
4.2.5	<i>Enzymatische Kathepsin B-Aktivität</i>	106
4.2.6	<i>Rekombinante Kathepsin B-Inhibitoren</i>	109
4.2.7	<i>Endogenes Kathepsin K und Kathepsin L</i>	112
4.2.8	<i>Kathepsin B-Enzymaktivität im Zellkern</i>	113
4.3	TRUNKIERTE KATHEPSIN B-FORMEN UND ZELLTOD	114
4.3.1	<i>Expression, Prozessierung und Enzymaktivität</i>	114
4.3.2	<i>Nativ trunkiertes Kathepsin B</i>	116
4.3.3	<i>Intrazelluläre Lokalisation der Einzelkettenform</i>	117
4.3.4	<i>Nukleoplasmatische Bindung</i>	121
4.3.5	<i>Mutationsanalyse und Lokalisationsstudien</i>	123
4.3.6	<i>Kernimportmechanismen</i>	129
4.3.7	<i>Kathepsin B-induzierter Zelltod</i>	131
5	DISKUSSION	
5.1	METHODIK	134
5.1.1	<i>Erhalt der Zellvitalität</i>	135
5.1.2	<i>Das grünfluoreszierende Protein als Lebendzellmarker</i>	137
5.1.3	<i>Genetische Konversion bei simultaner Kotransfektion</i>	140
5.1.4	<i>Grundlegende Versuche zur Zwei-Photonen-Spektroskopie</i>	142
5.2	KATHEPSIN B-STUDIEN	145
5.2.1	<i>Rekombinantes Kathepsin B in Tumorzellen als Modellsystem</i>	145
5.2.2	<i>Nukleoplasmatisches trunkiertes Kathepsin B und Zelltod</i>	152
	ANHANG	
A:	<i>Das Grünfluoreszierende Protein</i>	158
B:	<i>Klassifizierung der Fluoreszenzmikroskopie</i>	161
C:	<i>Fluoreszenzmikroskopische Techniken</i>	164
D:	<i>In vitro-Transkription</i>	167
E:	<i>Homologievergleich von Säuger-Kathepsinen</i>	168
F:	<i>Sequenzierung genetischer Konvertanten</i>	172
G:	<i>Auswertung der Photobleichkinetiken</i>	173
H:	<i>OpenLab-Automationen</i>	174
	LITERATURVERZEICHNIS	176
	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	190

ABKÜRZUNGEN

— A —

AK	Antikörper
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AP	Alkalische Phosphatase
avGFP	<i>Aequoria victoria</i> GFP

— B —

BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz
BFA	Brefeldin A
Brij 35	Polyoxyethylenlaurylether
BSA	<i>bovine serum albumin</i>

— C —

C'	carboxyterminal (vgl. N')
CA-074	<i>N</i> -(1-3- <i>trans</i> -Propylcarbamoyloxiran-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-prolin
CB	Kathepsin B, <i>cathepsin B</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CV	Cresylviolett

— D —

DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMEM	Dulbecco-modifiziertes Minimalmedium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DsRed	rot fluoreszierendes Protein von <i>Discosoma spec.</i>

— E —

E-64	<i>N</i> -[<i>N</i> -(1-3- <i>trans</i> -Carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatin
EBFP	<i>enhanced blue fluorescent protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	<i>enhanced cyan fluorescent protein</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>

— F —

FA	Formamid
FLIP	<i>fluorescence loss in photobleaching</i>
FLM	<i>full-length message</i> , unreife Form eines Proteins
FP	Fluoreszenzprotein
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

— G —

GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GKN	Glukose-Kalium-Natrium-Phosphatpuffer

— H —

HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -ethan-2-sulfonsäure
HC	<i>heavy chain</i> , schwere Kette (vgl. LC)

— I —

IPTG	Isopropylthiogalaktosid
-------------	-------------------------

— L —

<i>lacZ</i>	β -Galaktosidase-Gen
LB	Luria-Bertani (Medium)
LC	<i>light chain</i> , leichte Kette (vgl. HC)
LCLC	<i>large cell lung carcinoma</i> , Großzelliges Lungenkarzinom
LSM	Laser-Scanning-Mikroskopie

— M —

4MBNA	4-Methoxy- β -Naphtylamid
MTS	<i>mitochondrial targeting signal</i>

— N —

N'	aminoterminal (vgl. C')
NBT	<i>p</i> -Nitrotetrazoliumblauschwarz
NES	<i>nuclear export signal</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NPC	<i>nuclear pore complex</i>
NRS	<i>nuclear retention signal</i>

— O —

OPE	<i>one-photon excitation</i>
------------	------------------------------

— P —

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	„Protein Data Bank“
PFA	Paraformaldehyd
PI	<i>propidium iodide</i>
PSF	<i>point spread function</i>

— R —

RT	Raumtemperatur
RRR	<i>recombination/repair/replication</i>

— S —

SC	<i>single chain</i> , Einzelkettenform
S/N	<i>signal-to-noise</i> , Signal-Rausch
StB	Stefin B (Cystatin B)

— T —

TBE	Tris-Borat-EDTA (Puffer)
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TED	Trypsin-EDTA (Puffer)
TPE	<i>two-photon excitation</i>
TPM	<i>two-photon microscopy</i>

— U —

ü.N.	über Nacht
-------------	------------

— W —

WFM	Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie
------------	----------------------------------

— X —

X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
--------------	---

— Z —

Z-	$\hat{=}$ Cbz = Benzyloxycarbonyl-
-----------	------------------------------------

1 ZUSAMMENFASSUNG

1.1 ABSTRACT

1.1.1 Methodical aspects of the investigation of living cells

Genetic conversions caused by simultaneous cotransfection

Introduction. The green fluorescent protein (GFP) and several other fluorescent proteins (FP) have become important *in vivo* markers in the life sciences. Their different spectral properties make them suitable for multicolour labelling experiments. To perform such experiments one has to apply the fluorescent protein constructs to the living cells. Multiple transfection of DNA can be achieved in a successive or a simultaneous way which is the more convenient and efficient method. However, in the latter case the highly similar DNA-sequences of the fluorescent proteins could form rearrangements by homologous recombination.

The present study demonstrates that under specific conditions simultaneous transfection of different fluorescent protein-chimeras can lead to a considerable amount of conversions concerning their fluorescence properties.

Results. Vectors encoding the histone H2A tagged with the enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and the full-length message (FLM) of the cysteine peptidase cathepsin B (CB) tagged with the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) were cotransfected into human tumour cells. Besides the expected cyan emission in the nucleus (H2A) and the yellow signals in the reticular and vesicular cell compartments (CB(FLM)) also signals with the reversed localization were observed by fluorescence microscopy in stably transfected cell populations.

For further investigation of the effect the transfection protocol was varied, the plasmids were manipulated, and different transfection mediators as well as various cell lines were used. Control experiments with individual transfection of the constructs did not change the fluorescence properties, just as little as supertransfection of a stable *H2A-ECFP* clone with *CB(FLM)-EYFP* did. Applying the plasmids separately in a consecutive manner extracellular preannealing of the DNA was minimized and less conversion was achieved. Expanding the time interval between the applications of the individual plasmids also sufficiently reduced the phenomenon from an hour onwards. Washing the culture before the second transfection did not affect the conversion. Cotransfection of H2A-ECFP in combination with a promoterless vector encoding just the enhanced green fluorescent protein (EGFP) revealed a considerable

conversion rate, too. This facilitates the detection of conversion events by reducing the signal background. The results illustrate that the changes are neither affected by the associated protein, the GFP variant, the promoter nor the vector. It is known that strand breaks enhance homologous recombination and genomic integration of DNA. Thus, the vectors were linearized and melted to force heteroduplex formation before transfection. Particularly the latter approach increased the conversion. The results strongly suggest that extracellular preannealing supports the process while the conversion itself must take place inside the cell, presumably because of recombination/repair/replication (RRR) activities. Simultaneous transfection of the less similar *H2A-DsRed1* and *CB(FLM)-ECFP* homologue chimeras did not reveal any convertants. Different cell lines exhibited a comparable conversion phenomenon while different transfection methods resulted in transitions at different rates.

To prove the exchange of the fluorescent protein sequences at the molecular level, isolated cell clones with converted fluorescence were used to extract the genomic DNA and to analyse the recombined sequences by PCR. The amplified H2A-FP sequence revealed a complete transition of the nucleotide polymorphisms from the ECFP to the EYFP sequence.

The conversion rates were quantified by digital microscopy and image processing, which suits this approach more than FACS analysis: Microscopy does not only allow to directly control the transitions, but also permits setting a threshold which takes the signal intensity and the area into account and which is necessary for unambiguous object detection. An algorithm was developed which facilitates interactive and objective evaluation of the specimen. The change of EYFP to ECFP forms is hard to evaluate because of low sensitivity and the diffuse localization of the CB(FLM) signal. Thus, only unidirectional transition was taken into account by the algorithm. Assumed that conversion is a bi-directional process and that the frequency of occurrence is the same for both constructs a correction for the total number of convertants was proposed. Transfected populations were enriched for expressing cells by gentamycine. Cells were seeded on Petri dishes, recorded and evaluated by quantitative fluorescence microscopy. Conversion in a standard double transfection experiment appeared in up to 8 % of stably transfected cells. Manipulations of DNA, which favour the annealing, increased it to ~26 %.

Discussion. Modifications of the DNA are known to occur during transfection, intracellular transport and chromosomal integration and are likely to influence the interpretation of results. This study proves that the change of fluorescence properties in cotransfection is a significant event and that it is caused by RRR processes. Experiments were evaluated by quantitative microscopy using an image-analysing algorithm, which discriminated not only for signal intensity but also for area/location. The observations are relevant for the interpretation of transfection experiments with similar nucleotide sequences, irrespective of whether the tags or the genes of interest bear a similarity.

Commercially available systems containing multiple fluorescent protein sequences bear the risk of potential conversion concerning intra- or intermolecular interaction. Misleading results caused by conversion can be overcome either by using delayed transfection protocols or by low sequence similarities of the constructs.

The conversion approach provides easy exchange of fluorescence or of other protein properties, the creation of libraries or *in vivo* assembly of DNA constructs. For fluorescence exchange, this strategy, which works much faster than cloning the gene into a vector system and expressing it in cells, was already utilized successfully. A further application could imply the investigation of RRR properties in the unstable tumour genomes, as it is known that recombination appears more frequently in transformed or damaged cells. One of the essential steps in the conversion mechanism is the preannealing of the DNA, which is likely to be affected by the transfection conditions. However, the final conversion is accomplished by intracellular recombination, which implies active RRR machinery. The probability for chromosomal insertion of converted constructs is presumably higher for DNA containing double-strand breaks than for intact (and thus non-converted) plasmids. Use of optimised vectors containing multiple fluorescent protein sequences and integrated non-homologous calibration markers would allow a more direct, reproducible and quantifiable approach.

Two-photon spectroscopy of dyes relevant for cell imaging

Introduction. With the development of femtosecond oscillators, non-linear microscopy based on two-photon excitation (TPE) is becoming a versatile tool in biomedical research. Many reasons favour the use of two-photon microscopy (TPM) towards the wide-field microscopy as well as one-photon confocal laser scanning microscopy, which are both based on one-photon excitation (OPE) and thus limited in spatial resolution. The high photon density required for the near-simultaneous absorption of two photons is only achieved at the beam focus, which limits the illumination to a femtoliter volume and thus improves the axial resolution. Furthermore, longer excitation wavelengths imply better penetration of the specimen and lower impact on cells and fluorochromes. TPM still lacks knowledge of fluorescence spectra for relevant fluorochromes, which may differ from the one-photon data.

Since tuning the laser-power can be used for optimal excitation of individual fluorochromes, it was aimed at extending knowledge on two-photon absorption and emission data of fluorochromes frequently used in cell biology. The feasibility of the TPE approach was demonstrated by recording images of a multiplex-labelled specimen by 860 nm excitation in four different channels. The restriction for technical/financial reasons to a single excitation wavelength emphasizes the need of experimental determination of the two-photon absorption spectra but also for future efforts in TPM development.

Results. Spectral data were recorded from over 30 fluorochromes used for direct organelle staining, antibody labelling and monitoring of biochemical or physiological processes and the corresponding absorption and emission maxima were compiled. In most cases the TPE absorption data differed from the expected values derived from the twofold OPE data and a blue-shift for the TPE values was observed. The comparison of TPE vs. OPE emission maxima revealed heterogeneous results. As predicted from theory, there were mostly no or only less significant differences, which are not likely to be attributed to TPE specific effects, but in the cases of BODIPY TR a considerable difference was found. Both propidium iodide (PI) and aminomethyl coumarin (AMC) exhibited biphasic TPE emission spectra. In the case of AMC the lower maximum of the PI spectrum corresponded to the OPE maximum, but the main TPE maximum at 657 nm was located within the trailing slope of the OPE spectrum. The OPE local maximum of free PI at 515 nm was not represented in the TPE spectrum. The TPE maximum of BODIPY TR coincided with a local OPE maximum. Summarised, almost all of the emission spectra exhibited a more or less strong red-shift.

For the microscopical imaging, a Ti:sapphire laser tuneable between 720 nm and 910 nm and pumped by an Ar⁺ ion laser was used in combination with a digital widefield fluorescence microscope. In consideration of an optimal power exploitation of the laser, a single excitation wavelength of 860 nm was used for a wide range of fluorochromes. In spite of partially low fluorescence yields of the 860 nm excitation (< 1%–37.7 % of the respective fluorochrome absorption maxima) visualization of multiple labels was possible. Cells stably expressing the histone H2A tagged by ECFP were seeded onto a collagen gel matrix and supertransfected with tubulin–EGFP. The mitochondria were stained with MitoTracker Red CMX and the cell nuclei with the DNA marker Hoechst 33342. Optical sectioning in four channels resulted in image stacks with a smallest physical volume of 0.0227 μm^3 . Fluorescence intensity was highest for MitoTracker Red and lowest for Hoechst. The fluorescence intensity of EGFP was ~3-fold higher than that of ECFP, which did obviously compensate the lower absorption.

Discussion. Blue-shifts of TPE absorption peaks were reported previously. This can be attributed to parity selection rules that favour induction of excitations to higher energy levels in TPE. The blue-shift could be of benefit in TPM as it allows the use of widely available near infrared lasers and suggests the application of a single wavelength for excitation of several fluorophores with distinct emission characteristics. No differences were found in the emission spectra generated by OPE and TPE for the reported fluorochromes. Most of the general predications were confirmed. In certain cases, a considerable red-shift was found beside a tendency that the shifted TPE maxima correspond to side maxima of the OPE spectra.

The 3D reconstruction of the TPM recording gave a complex impression of the distribution of the four fluorochromes, revealing the fractal shape of the nucleus with partial but not complete overlap of the labelled histone and the DNA. In spite of the thorough selection of

acquisition parameters, a slight photobleaching of the fluorochrome but no apparent photo-damage of the cells was observed. Although the general distribution and the spatial relationship of the mitochondrial and microtubular networks were apparent, they could not be resolved in detail. Suboptimal conditions due to single-wavelength limitations call for future efforts in the TPM development.

1.1.2 The cysteine peptidase cathepsin B

Intracellular transport, secretion, and inhibition of human cathepsin B in tumour cells

Introduction. The lysosomal cysteine peptidase cathepsin B (CB) does not only play a part in protein degradation but it does also function as a key enzyme in cardinal processes of homeostasis and cell demise. CB is implicated in a number of apoptotic pathways and in pathologic processes as arthritis or tumour progression by facilitating invasion and metastasis. Although CB is expressed in nearly all mammalian organs and cells, expression levels may however vary considerably between individual tissue and cell types. Observation of elevated CB activity levels, enhanced secretion and membrane association in tumours suggest a possible involvement of CB in tumour progression.

The objective of this study was to elucidate the intracellular localization of CB, its distinct transport pathways in living cells. An attempt was undertaken to inhibit the CB specific activity in lung carcinoma cells by the use of a recombinant protein derived from the native CB “anti-peptidase” Stefin B (StB).

Results. The full-length message (FLM) of *CB* was inserted into eukaryotic expression vectors, tagged with different fluorescent proteins (FPs) and used for transfection of several cell types, particularly human lung tumour cells. Transfection resulted in overexpression of variable intensities leading to retarded growth, reduced cell adhesion and increasing loss of contact inhibition (foci formation). Expression of the recombinant protein was demonstrated on the transcriptional level by *in situ* hybridisation. Western blot experiments revealed a typical processing of the CB(FLM) fusion protein in permanently expressing cells but not in transiently transfected ones. With regard to this situation, constitutively expressing clones were selected and characterized in terms of morphology, growth kinetics, processing, intracellular distribution, and enzymatic activity.

Expressing cells were observed by fluorescence microscopy combined with digital image processing. CB(FLM)–FP chimera which contain the signal peptide showed the typical CB(FLM) distribution allocated in the reticular compartment (ER/Golgi network) and in perinuclear vesicles. Concerning two-dimensional cell assemblies, fluorescence accumulated especially at the border of the monolayer, very similar to the phenomenon as observed at the

invasive edge of a tumour. Other cell types than LCLC-103H exhibited quantitative but not qualitative differences concerning their expression pattern. Compared to fluorescent protein-tagged constructs with an ER-retention signal and such which consisted only of the signal peptide and the N-terminal propeptide, the CB(FLM)-FP signal accumulated to a higher amount in the Golgi network and within the vesicles indicating the further sorting of the entire enzyme according to the regular mannose-6- P targeting mechanism. The trafficking of CB from ER into the Golgi was investigated by the transport inhibitors brefeldine A (BFA) and tunicamycin. BFA-treated LCLC-103H cells revealed strong vesiculation. Simultaneously, transiently expressed CB(FLM)-FP was enriched in the ER. This fact provides evidence for the interruption of transport from the ER to the Golgi. The application of tunicamycin also resulted in accumulation of the fluorescence signal within the ER in comparison to the Golgi thus supporting the idea of an early inhibition of transport within the TGN. No fraction of the recombinant CB did colocalize with mitochondria as could be expected from literature and theoretical considerations. Release of cytochrome C from the mitochondria and activation of caspases by CB is thought to influence apoptotic processes.

The overexpressing cells were characterized in respect to their CB specific activity. *In vivo* activity monitored by fluorescence microscopy, revealed hot spots within the Golgi apparatus that corresponded to the fluorescent protein signals of the fusion protein as well as within the surrounding vesicles. Enzymatic CB activity was higher in the Golgi compared with the analogous GFP-signals, which confirms the posttranslational processing results: a part of the fluorescent protein-tag is supposed to be cleft off and therefore will not be sorted further. As it was demonstrated by spectroscopic *in vitro* assays, the cell extracts and supernatants of constitutively CB(FLM)-FP expressing cells contained ~25-fold increased levels of CB activity compared with control cells. Overexpression of a protein in general did not affect the proteolytic activity of the cells. As nuclear localization and activity of CB is described in literature as being involved in apoptotic processes, isolated nuclei were investigated in the same way as the cells. Although neither recombinant CB(FLM) nor CB specific activity were found inside the nucleus, enzymatically active forms of CB(FLM)-FP were detected in the nuclear envelope. The spectroscopic *in vitro* assay revealed a 138-fold elevated activity compared with control nuclei. The possible regulation of other intrinsic cysteine peptidases by the recombinant CB(FLM)-FP was investigated in transfected LCLC-103H cells. Both model peptidases, cathepsin K (CK) and cathepsin L (CL) occurred to be upregulated as evaluated by enzymatic *in vitro*-assays using specific inhibitors. The enzymatic activity level of CK was ~7-fold as high in a cell clone with elevated CB activity (~30-fold) compared to the control. The enzymatic activity of CL could not be well separated from the CK activity due to cross-reactions but seemed also to be slightly elevated.

Inhibition of CB is a central basic approach for the suppression of tumour progression. Here, an artificial CB specific inhibitor derived from the endogeneous StB, and modified variants thereof were used to reduce intrinsic and extrinsic CB activity. In order to increase the probability of enzyme–inhibitor interaction of the two binding partners that are localized to distinct subcellular compartments, the chimeric *FP–StB* gene was tagged by the N-terminal prepro-sequence of *CB*. Targeting of the inhibitor to the same compartments did not result in a more efficient suppression of the intracellular CB activity in comparison to the cytoplasmic StB–FP. No results are available for the extracellular inhibition. Most effective was the inhibition by EGFP–StB, which reduced activity to 45 % in non-transfected LCLC–103H cells and to 69 % in cells overexpressing the recombinant CB. In contrast to the cytoplasmic distribution of StB–FP, the chimeric CB(PREPRO)–FP–StB was localized mainly in the Golgi and in hotspots adjacent to the extracellular side of the plasma membrane.

Discussion. It is now well known that CB possesses multiple functionality that surpasses the restricted role of digesting other proteins for their disposal. In many exceptional physiological states (*e.g.* in tumours) elevated levels of expression and enzymatic activity are assumed to contribute to the cellular malfunction. The proteolytic activity of CB is tightly connected with its correct posttranslational processing. Incomplete cleavage of the recombinant fusion protein CB(FLM)–FP during transient transfection is likely to be artificial due to a higher amount of the expressed protein which could be limited in its processing by other auxiliary factors. Experimental data resulting from posttranslational processing studies and *in vivo* enzymatic activity assays as well as literature review suggest increased constitutive CB secretion bypassing the Golgi apparatus due to alternative sorting mechanisms. The secretion of the peptidase could be responsible for the incomplete processing as already shown for other peptidases. Misinterpretation of results evolving from this “artificial* situation” was circumvented by selection of appropriate cell clones with a constitutively high expression not affecting the regular posttranslational processing of the peptidase. The N-terminal fluorescent protein-tag was not cleft off for the most part of the chimeric protein. This is relevant for the interpretation of the microscopical studies.

Overexpression of the recombinant CB did hardly affect cell morphology and vitality. However, cell adhesion was reduced and formation of cellular nodules similar to the foci in tumour tissues was observed. The high proteolytic and therefore possibly cytotoxic potential of the overexpressed peptidase is obviously buffered either by vesiculation or by secretion into the extracellular medium. Lower cell adhesion could be due to the proteolysis of extracellular matrix components like collagen, laminin, and fibronectin.

* Since overexpression of CB appears frequently in transformed tissues, the designation “artificial” might be misleading in this context.

The observed intracellular distribution of the chimeric CB in LCLC–103H cells and other cell types is typical for the native CB and comparable to other studies. Accumulation in the Golgi and in acidic as well as other not determined vesicles went ahead with the sorting scheme by the mannose-6- P dependent pathway. On the other hand, plasma membrane associated and secreted CB suggests the alternative trafficking by constitutive secretion, mainly of its pro-form. Comparisons of the entire CB with the prepro-sequence confirm this notion. Since glycosylation is required for the mannose-6- P dependent pathway from the ER to the lysosomes, the further going transport of the CB(FLM)–FP construct can be explained by the presence of additional glycosylation sites within the sequence which was absent in the prepro-fragment. Inhibition of transport from the ER to Golgi by brefeldine A and from Golgi to vesicles by tunicamycin reveals that not only constitutively but also transiently expressed extrinsic CB is partly transported to the Golgi. This does also correspond to the results from fluorescence microscopy. Thus, no qualitative deviation to the natural sorting of lysosomal peptidases was observed for the extrinsic CB. The CB(FLM)–FP fluorescence signals were neither found in mitochondria nor in the cell nucleus as suggested by other studies. However, this distribution pattern is mostly associated with apoptosis, which was not observed or induced in the cells overexpressing the FLM of CB. Observation of lysosomal proteins like CB using GFP is complicated by (i) the posttranslational cleavage of the molecule, which allows only the tracking of that part which is adjacent to the flag and by (ii) the “acidic gap”, which refers to the pH sensitivity (quenching of fluorescence) of GFP-derivatives in acidic milieu. However, results of the Western Blot analysis and of counterstaining cells with a lysosomal marker do not suggest that these effects were predominant.

The spatial separation of CB and its natural antagonist StB to different intracellular compartments (ER or cytoplasm, respectively) impedes its efficient inhibition *in vivo*. The site of interaction remains unclear so far. Targeting of recombinant StB to the Golgi using a CB prepro-fragment did not enhance the inhibition in comparison to a cytoplasmic StB variant. It is unclear, whether the lower inhibitory capacity of the chimeric inhibitor is because of the high levels of its secretion or due to steric hindrance. The latter might be caused either by the additional prepro-tag or by misfolding of the polypeptide within the differing reticular–vesicular microenvironment. Prior to decide whether this combinatory approach is more efficient than the use of cytoplasmic inhibitors, it is therefore necessary to optimise further the stability and the affinity constant of the inhibitor.

Nuclear artificially truncated cathepsin B contributes to cell death

Introduction. Splicing variants of *CB* primary transcripts skipping exons 2 and 3 give rise to the truncated expression product Δ^{51} CB. Unlike the entire CB enzyme which contains pre-(signal), pro-, and two functional domains, Δ^{51} CB lacks the signal peptide and parts of the propeptide and is thus unable to follow the regular CB processing and sorting pathway. It is

addressed to the mitochondria through an activated N-terminal targeting signal instead. Δ^{51} CB is supposed to be enzymatically inactive because of conformational changes. Nevertheless, elevated levels of Δ^{51} CB were found in tumours and in arthritic tissues. Mitochondrial association of Δ^{51} CB is supposed to cause nuclear fragmentation and cell death. Besides this, lysosomal release of functional CB that is devoid of the mitochondrial targeting signal could trigger apoptosis. CB was also detected in association with the nucleus but not in the nuclei itself. These findings point out a specific role of Δ^{51} CB in malignancies and cell death besides those, for which the lysosomal canonical CB forms are responsible.

In this study, such “aberrant” CB forms were investigated by artificial CB–GFP chimeras covering various sequence parts in respect to their enzymatic activity, their localization in different cell types, and the effects on the cell viability. Nuclear targeting and nuclear mobility were observed by advanced light microscopic techniques. A link to cell death was established for the artificially truncated polypeptides generated from incomplete messages.

Results. Recombinant CB mutants were produced from an established full-length cDNA and tagged by distinct GFP variants. Unlike the intrinsic CB, the artificial single chain CB(SC)–FP chimera was not cleaved and did not reveal regular CB enzymatic activity during transient overexpression in large lung carcinoma cells (LCLC–103H). The same was observed for a deletion mutant, which was 21 amino acids shorter than the naturally truncated Δ^{51} CB and which evolved from an internal translation origin 7 residues upstream the CB(SC) sequence.

The natural CB forms CB(FLM) and Δ^{51} CB labelled by GFP were transfected in LCLC–103H cells. CB(FLM) was found predominantly in reticular and vesicular compartments. Δ^{51} CB appeared mainly in the mitochondria and to a lower degree in the nucleus. A number of established cell lines and freshly isolated endothelial cells were also transfected with CB(SC)–FP. Different from the natural CB forms, the artificially truncated CB(SC) localized in the cytoplasm, in granules, in the nucleoplasm, and in the midbody matrix of mitotic cells. The nucleoli revealed a speckled staining pattern. Qualitative differences among the cell types were not evident, except of the endothelial cells, which were devoid of nuclear CB(SC).

The nuclear accumulation of truncated CB suggests the presence of an intrinsic nuclear targeting mechanism. Computational analysis did not reveal any common nuclear localization signal within the CB sequence. A possible impact of the fluorescent protein tag on the localization was excluded by constructs containing a myc-epitope (myc-CB(SC)–FP and myc-CB(SC)). The nuclear mobility of GFP-tagged CB(SC) was studied by *in vivo* photobleaching experiments (continuous irradiation and fluorescence recovery after photobleaching) and automated image processing routines. The mobile EGFP and a tightly binding histone GFP chimera (H2A–EGFP) were used as limiting controls. A GFP-tagged transcription initiation factor (TIF1A–EGFP) was selected as further control with a mobile (nucleoplasm) and an immobile (nucleoli) fraction. In both experiments, CB(SC) constructs showed an intermediate

behaviour in respect to the controls. Their immobile fractions were very low and mobility appeared to be retarded in the nucleoplasm.

The genetic sequence of *CB* was subjected to mutational analysis in order to unravel the intramolecular region, which is responsible for the nuclear targeting. Differential localization of functional domains and of globular subunits thereof as well as of several other deletion mutants led to the conclusion that exclusively the heavy chain must bear the nuclear localization patch. The light chain did not show any distinct signal distribution. Unlike the N-terminal subunit of the *CB* heavy chain, the C-terminal domain was highly enriched in the nucleoplasm, in cytoplasmic granules, and in the midbody matrix. This sequence part was further reduced equidistantly towards its C-terminus. With lower fragment size, the constructs were located more and more homogeneously within the cytoplasm and the nucleus, the typical granules no longer appeared and the midbody matrix was stained less. The shortest fragment (52 residues) was almost as diffuse as EGFP. The results suggest that a region within the C-terminal sequence N²²⁸–D³³³ has a great impact on the nuclear localization of *CB*(*SC*) and that an epitope is generated by a spatial arrangement of the respective, yet not defined residues. Passive transport of truncated *CB* into the cell nucleus combined with retention of the molecule due to affinity to nuclear components was excluded by introduction of a 84 kDa (FP–*CB*(*SC*)–FP) construct, which is well above the diffusion limit and nevertheless was accumulated in the nucleus. Therefore, the underlying mechanism must depend on an active transport and a retention mechanism depending on the structure of the *CB*(*SC*) polypeptide.

Some of the artificial *CB* constructs exhibited cytotoxic activity and provoked cell death. This was heralded by disorder of the intracellular organization followed by collapse of the Golgi and the nucleus, and by detaching and rounding up of the cells. Mortality rates for transfected populations were quantified by propidium iodide (PI) staining and FACS analysis (mock-transfected and EGFP: <20%; *CB*(*FLM*)–EGFP: ~43%; *CB*(*SC*)–EGFP: ~78%). A well-defined evidence of apoptosis as documented by disintegration of the plasma membrane (Annexin V/PI assay) or DNA fragmentation (DNA ladder) could not be produced.

Discussion. Natural Δ^{51} *CB* is expressed as an entire 35 kDa polypeptide. This corresponds to the findings of the present study in respect to further truncated artificial *CB* constructs – all of them remained intact and were not cleaved posttranslationally. They did also not exhibit any *CB* specific enzymatic activity. Δ^{51} *CB* studies from others suggest the same lack of activity. Recently, a splicing variant of cathepsin L (CL) without a signal peptide was reported, which exhibited a specific, so far unknown cleaving activity at an atypical site – in the nucleus. This study shows that neither the completeness of the sequence nor the *CB* specific enzymatic activity is relevant to the observed nuclear accumulation and induction of cell death.

Different studies demonstrate that native Δ^{51} *CB* is associated with the cytoplasmic side of plasma membrane structures and that its remnant part of the N-terminal propeptide is able to

target Δ^{51} CB to the mitochondria. CB was also found associated with the cell nuclei of normal tissues, tumours, and apoptotic cells, but until now there are almost no indications to potential transport mechanisms or a specific function. However, all these studies miss a thorough scrutiny for the exact nuclear localization.

The mitochondrial localization of the naturally truncated Δ^{51} CB was confirmed in this study. The artificially truncated CB–GFP chimaeras used were expressed cytoplasmically and were enriched in granular structures that were not lysosomes. They were also proved in the nucleoplasm of several cell types. It was confirmed, that N-terminally truncated constructs with lower size than Δ^{51} CB–FP lose their ability of mitochondrial targeting. The fluorescent protein tag did not affect the localization of the chimeric constructs. The localization of artificially truncated CB within discrete regions of the nucleoli may ask for a specific role of native CB in transcriptional processes. This consideration is not far-fetched, since also the recently found truncated CL turned out to be a regulator of the transcription factor CDP/Cux. The intramolecular location of the possible nuclear targeting signal was confined to the C-terminal part of the CB heavy chain by mutational analysis. The findings do not support the existence of a linear signal sequence; rather a composed signal patch is likely.

How does truncated CB enter the nucleus? Passive transport across the nuclear pore complex was ruled out with high probability by constructs with a molecular mass of ~84 kDa. Nuclear disintegration, like at the end of the mitotic prophase, might favour a passive transport mechanism across a disrupted nuclear envelope. The affinity of the polypeptide to nuclear compounds might retain it within the nucleus as proved by a qualitative photo-bleaching approach. The results suggest that truncated CB is not subjected to free diffusion but is largely in an associated state.

Targeting of native Δ^{51} CB to the mitochondria is supposed to cause nuclear fragmentation and cell death. The present study proves that cell death associated with CB is not necessarily triggered by its regular enzymatic activity but alternatively by a yet unknown activity profile. Cell death could be provoked by a nuclear fraction of Δ^{51} CB only. Cytoplasmic mature CB resulting from lysosomal damage might also be able to enter the cell nucleus. Its potential function in the nucleus remains unclear. Here, a hierarchy of targeting signals depending on their strength and availability is postulated for the CB molecule. This implies other possible transport mechanisms besides the usual trafficking via the mannose-6- P pathway.

1.2 KURZFASSUNG

Genetische Konversion bei Kotransfektion. Verschiedene GFP-Varianten mit einer hohen Sequenzidentität werden häufig für Mehrfachmarkierungen *in vivo* eingesetzt. Die simultane Kotransfektion derart markierter Chimärgene kann zu einer Konversion des Fluorochroms führen und damit die Interpretation von Experimenten nachhaltig beeinträchtigen. Unter Standard-Transfektionsbedingungen ergaben ~8 %, bei deren Variation bis zu 26 % der permanent exprimierenden Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzeigenschaften veränderte Fusionsproteine. Konversion fand in unterschiedlichem Ausmaß in allen untersuchten Zelltypen und unabhängig von den Transfektionsbedingungen statt. Die Ergebnisse belegen, daß dieses Phänomen auf homologe Rekombination ähnlicher Nukleotidsequenzen zurückzuführen ist. Sukzessive Transfektion und die Verwendung von Fluoreszenzproteingenen mit niedriger Sequenzidentität verhinderten die Rekombination. Die praktische Umsetzung der Ergebnisse ermöglicht einen gezielten Austausch von Nukleotidsequenzen, die Herstellung rekombinanter Klonbibliotheken oder eine *in vivo*-Konstruktion von DNA-Fusionsgenen. Die genaue und reproduzierbare Quantifizierung der Konversionsraten gestattet zudem weitergehende Untersuchungen von Rekombinations- sowie Reparatur-Prozessen (z.B. in transformierten Zellen) und kann damit ihrer Typisierung dienen.

Zwei-Photonen-Fluoreszenzspektren. Inhärente optische Schnitte, geringes Photobleichen außerhalb der Fokusebene, niedrige Strahlenschäden und bessere Probenpenetration machen die Zwei-Photonen-Mikroskopie zu einer attraktiven Methode für die biomedizinische Forschung. Das Ziel dieser Studie war es, dem bestehenden Mangel an vorhandenen Zwei-Photonen-Absorptions- und Emissionsspektren zellbiologisch relevanter Fluorochrome abzuhelpfen. DNA-Farbstoffe, Antikörper-gekoppelte und organell-spezifische Fluoreszenzfarbstoffe sowie Zellextrakte verschiedener GFP-Varianten wurden mit einem Ti:Saphir-Laser bei 580–1150 nm angeregt und die Emission bei 280–700 nm erfaßt. Die meisten Fluorochrome zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Zwei-Photonen- und den Ein-Photonen-Emissionsspektren. Dagegen waren die Absorptionsmaxima der breiteren und differenzierteren Zwei-Photonen-Kurven (unter Berücksichtigung der doppelten Wellenlänge) meist um wenige Nanometer bis hin zu weitläufig abweichenden Spektralverläufen blau-verschoben. Die Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit solcher Messungen. Die Fluoreszenzintensität der GFP-Varianten war bei beiden Anregungsarten pH-abhängig und hatte ihre maximale Emission im Alkalischen. Trotz einer unvollständigen Regenerierung der Fluoreszenz nach Behandlung im sauren pH-Bereich blieb das Spektralprofil unverändert. Zwei-Photonen-Mikroskopie in Verbindung mit der 3D-Rekonstruktion wurde erfolgreich eingesetzt, um unterschiedlich markierte subzelluläre Strukturen *in vivo* simultan darzustellen und so einen Einblick in die räumlichen Zusammenhänge zu gewinnen.

***In vivo*-Charakterisierung von Kathepsin B (CB).** Die Cysteinpeptidase CB spielt im Zellstoffwechsel aber auch bei malignen und apoptotischen Prozessen eine wichtige Rolle. Erhöhte Expression, Enzymaktivität, Sekretion und Membranassoziation von CB gehen mit solchen pathologischen Zuständen einher und werden deshalb als mögliche therapeutische Ansatzpunkte ins Auge gefaßt. Dies setzt eine genaue Kenntnis der Lokalisation des Enzyms voraus. Die Entstehung und Verteilung von CB wurden in Lungentumorzellen mit Hilfe mikroskopischer sowie bildgebender Verfahren unter Verwendung rekombinanter CB-Konstrukte und Fluoreszenzproteine (FP) untersucht. Das CB-FP-Fusionsprotein wurde in konstitutiv, nicht aber in transient exprimierenden Zellen vollständig prozessiert. Es lokalisierte erwartungsgemäß in retikulären und vesikulären Kompartimenten sowie in Assoziation mit der Plasmamembran. Verschiedene Zelltypen wiesen quantitative, aber keine qualitativen Unterschiede in ihrer Signalverteilung auf. Im Vergleich zu einem Referenzkonstrukt, welches lediglich die Signalsequenz sowie die N-terminale Pro-Region von CB enthielt, wurde das Vollängenprodukt stärker im Golgi-Apparat und in Vesikeln angereichert. Dieses enthält eine zusätzliche Glykosylierungsstelle und wird offensichtlich effektiver über den Mannose-6- P -Mechanismus sortiert. Der mikroskopische Nachweis von CB-FP in den Lysosomen könnte durch die mögliche Löschung der FP-Fluoreszenz bei niedrigem pH erschwert sein. Dagegen sprechen allerdings Alkalisierungsversuche *in vivo*, die nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenz ergaben. Der Transport des rekombinanten Enzyms von ER zu Golgi und weiter zu den Vesikeln wurde durch die Transportinhibitoren Brefeldin A und Tunicamycin unterbunden. Dies spricht für eine reguläre Sortierung via Mannose-6- P -Weg. *In vivo*-Versuche haben ergeben, daß die CB-Enzymaktivität in transient exprimierenden Mischpopulationen nicht signifikant erhöht war. Dagegen waren konstitutiv exprimierende Zellen stärker enzymatisch aktiv – jedoch ohne nennenswerte Auswirkungen auf die Zellen. Die Zellklone zeigten eine höhere Kolo-kalisation zwischen dem enzymatisch umgesetzten Fluoreszenzsubstrat und dem FP-Marker, wobei die Aktivität stärker in den Vesikeln sowie im Golgi-Bereich angesiedelt war. CB soll unter bestimmten (pathologischen) Umständen enzymatische Aktivität im Zellkern zeigen und Apoptose induzieren können. Eigene *in vivo*-Untersuchungen weisen zwar eine Enzymaktivität in der Kernmembran nach, jedoch nicht im Nukleoplasma. Fluorometrische Aktivitätsmessungen an Homogenaten von Zellklonen mit konstitutiver Expression ergaben in den Zellextrakten, den Zellkulturüberständen sowie an isolierten Zellkernen eine gegenüber dem Wildtyp stark erhöhte CB-Aktivität. Ein neuartiger Ansatz zur Inhibition der CB-Enzymaktivität wurde mit Hilfe rekombinanter Stefin B-Inhibitoren (StB) unternommen. Unterschiedlich FP-markierte StB-Konstrukte kolo-kalisierten nicht mit dem rekombinanten CB, hemmten jedoch die CB-Enzymaktivität unterschiedlich stark. Die Adressierung des Inhibitors in das ER und in den Golgi durch eine vorgeschaltete ER-Zielsequenz und die CB-eigene Pro-Region ergab keine stärkere Inhibition des Enzyms.

Die Überexpression des CB führte zu einer geringen Erhöhung der Enzymaktivitäten von endogenem Kathepsin K und L. Dies kann entweder auf eine mögliche Koregulation mit CB oder durch eine generelle Hochregulierung degradierender Peptidasen aufgrund eines erhöhten Proteinpegels zurückgeführt werden. Die Verwendung FP-markierter rekombinanter CB-Konstrukte eignet sich trotz gewisser Risiken wie Überexpression oder Fluoreszenz-auslöschung als *in vivo*-Modell zur allgemeinen Charakterisierung dieser Peptidase. Die Ergebnisse sprechen für zwei bekannte Transportmechanismen in Abhängigkeit vom Expressionsniveau: (i) die Mannose-6- P -Sortierung bei geringer Expression und (ii) die konstitutive Sekretion im Falle hoher Expression. Genaue Kenntnisse des Aufenthaltsortes erlauben eine gezielte Inhibierung von CB, setzen aber eine Optimierung der verwendeten rekombinanten Inhibitoren voraus.

Nukleäres trunkiertes CB und Zelltod. Spleißvarianten der humanen CB-Primärtranskripte führen zu einem Translationsprodukt, dem Signalpeptid und Teile des N-terminalen Pro-Peptids fehlen. Dieses nativ trunkierte Δ^{51} CB kann deshalb nicht regulär prozessiert und sortiert werden. Stattdessen wird es über eine aktivierte N-terminale Zielsequenz in die Mitochondrien geleitet. Obwohl Δ^{51} CB vermutlich keine typische CB-Enzymaktivität besitzt, könnte es unabhängig von der Funktion des regulären Enzyms eine Rolle bei Malignität spielen und Zelltod verursachen. Neben Δ^{51} CB kann auch reifes CB als Folge beschädigter Lysosomen zytoplasmatisch auftreten. Solche „aberranten“ CB-Formen wurden mit Hilfe künstlicher CB-FP-Mutanten im Hinblick auf ihre Enzymaktivität, ihre Lokalisation in verschiedenen Zelltypen und die Auswirkungen auf die Zellvitalität hin untersucht. Ein dem natürlichen Δ^{51} CB entsprechendes FP-Konstrukt wurde überwiegend in Mitochondrien, z.T. aber auch im Zellkern nachgewiesen. Die künstlich trunkierte CB-Einzelkettenform wurde nicht zum Heterodimer prozessiert und zeigte keine reguläre CB-Enzymaktivität während transienter Expression in Lungentumorzellen. Sie kam im Zytoplasma, im Zellkern sowie in der Midbody-Matrix mitotischer Zellen vor. Mikroskopische Studien wiesen mobile und immobile nukleäre Fraktionen nach. Die Anreicherung von künstlich trunkiertem CB im Zellkern führte zu dessen Auflösung und zu Zelltod. Es ist anzunehmen, daß diese Phänomene nicht über die reguläre CB-Enzymaktivität, sondern über ein noch unbekanntes Aktivitätsprofil ausgelöst werden. Zytoplasmatisches CB könnte in der Lage sein, in den Zellkern zu gelangen. Die Molekülregion, welche den Kernimport vermittelt, ist gemäß einer Mutationsanalyse ein zusammengesetztes Signal innerhalb der schweren Kette des CB. Die Ergebnisse legen nahe, daß CB neben dem Signalpeptid und der mitochondrialen Zielsequenz weitere Signale enthält, die für seine differenzierte Adressierung in den Zellkern, in Vesikel oder in andere Organellen verantwortlich sind. Hier wird eine Hierarchie von Zielsignalen im CB-Molekül postuliert, die durch ihre Verfügbarkeit und Stärke bestimmt wird. Diese These schließt alternative Transportmechanismen neben dem üblichen Mannose-6- P -Weg ein.

2 EINLEITUNG

Zahlreiche Untersuchungen in der jüngsten Zeit weisen der Cysteinpeptidase Kathepsin B (CB) eine wichtige Rolle als Kettenglied in Aktivierungskaskaden der Tumorigenese und Tumorprogression zu. Es wird auch immer deutlicher, daß diese Peptidase nicht nur bloße katabolische Funktionen bei der Entsorgung von Proteinen ausübt, sondern auch in Regulationskaskaden, z.B. bei der Apoptose, eingreift (Review: SALVESEN 2001). An beiden Vorgängen könnten selten vorkommende und daher bislang in ihrer Bedeutung unterschätzte Spleißvarianten beteiligt sein, die auch „abnormalen“ Prozessierungs- und Sortierungswegen folgen. Neue Techniken der Molekular- und Zellbiologie erlauben es nun, solche Transportvorgänge in lebenden Zellen zu untersuchen. Diese Arbeit befaßt sich deshalb mit Grundlagen der Lebendzell-Mikroskopie und untersucht damit wesentliche Aspekte der intrazellulären Lokalisierung von natürlichen und synthetischen Formen von CB. Moderne lichtoptische Techniken werden insoweit hier abgehandelt, als sie in der Arbeit Verwendung fanden oder sogar vorangebracht worden sind.

2.1 FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE

Dank seiner rasanten Weiterentwicklung gehört das Grünfluoreszierende Protein (GFP) mittlerweile zum Standardrepertoire der molekular- und zellbiologischen Techniken. Eine ausführliche Einführung in die Thematik erhält man bei CHALFIE & KAIN (1998) sowie im Anhang (S.158). Die experimentelle Phase dieser Arbeit wurde begleitet und geprägt von einer allgemeinen kontinuierlichen Optimierung und Erprobung der zahlreichen GFP-Varianten und der hierfür benötigten experimentellen Voraussetzungen. Somit ist es gleichermaßen Werkzeug und Untersuchungsobjekt. Die GFP-Studien umfassen solche Aspekte wie spektrale Eigenschaften bei Zwei-Photonen-Anregung, mögliche Fehllokalisierung und Zytotoxizität, Artefaktbildung bei simultaner Kotransfektion verschiedener GFP-Varianten und Einflüsse des Mikromilieus auf deren Fluoreszenzeigenschaften.

Die Optimierung von Fluoreszenzproteinen und anderen Vitalfarbstoffen geht mit der Entwicklung geeigneter Filterkombinationen und Visualisierungstechniken einher. Neben den bereits als klassisch zu bezeichnenden fluoreszenzmikroskopischen Methoden wie Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie (WFM) und Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) gewinnen neue Ansätze wie die Zwei-Photonen-Mikroskopie (*two-photon microscopy*, TPM) zunehmend an Bedeutung. Die verschiedenen Mikroskopsysteme werden im Anhang (S.161) detailliert beschrieben. Trotz der relativen Neuartigkeit sowohl von TPM als auch von Fluoreszenz-

proteinen nimmt die Anzahl der Arbeiten, die diese Techniken miteinander zu verbinden suchen, beständig zu (Review: PISTON *et al.* 1999, PATTERSON *et al.* 2000, PATTERSON & PISTON 2000). Einen wesentlichen Nachteil der TPM stellen die mangelnden Kenntnisse von Zwei-Photonen-Absorptionsspektren dar, die von ihren analogen Ein-Photonen-Spektren abweichen können. Ein Versuch, diesem Nachteil gerecht zu werden, wird in dieser Arbeit durch die Generierung von Zwei-Photonen-Spektren für zahlreiche zellbiologisch relevante Fluorochrome unternommen.

Fluoreszenzmikroskopische Techniken ermöglichen in Verbindung mit digitaler Bildverarbeitung Einblicke in intrazelluläre Vorgänge, die über den „Blick durch das Okular“ weit hinausgehen. Dekonvolutionsverfahren führen zu einer enormen Verbesserung von Kontrast und Auflösung, 3D-Bildrekonstruktionen und Zeitserien verdeutlichen mehrdimensionale Zusammenhänge, Energietransfer zwischen verschiedenen Fluorochromen kann Auskunft über die Wechselwirkung zweier Proteine erteilen und schließlich geben Photobleichkinetiken Informationen über das Diffusions- und Bindungsverhalten von Molekülen (Anhang, S.164).

2.2 KATHEPSIN B

2.2.1 Enzymatische Klassifizierung

Proteolytische Enzyme* werden vereinfacht ihrem katalytischen Mechanismus nach in Serin-, Threonin-, Cystein- (bzw. Thiol-), Aspartat- sowie Metallopeptidasen unterteilt (Review: RAWLINGS & BARRETT 2000). Die Kathepsine† bilden eine heterogene Gruppe ubiquitär vorkommender lysosomaler Enzyme aus verschiedenen Peptidasefamilien (Abb. 2.1, unten). *Kathepsin B* (CB; EC 3.4.22.1) ist wie die meisten anderen Kathepsine eine Cysteinpeptidase aus Klan CA, Familie C1 (RAWLINGS & BARRETT 2000). Dieser setzt sich zusammen aus pflanzlichen Peptidasen wie dem Papain (EC 3.4.22.2), den Cysteinpeptidasen mancher Parasiten sowie den lysosomalen Peptidasen tierischer Zellen. Unter den 20–35 kDa großen Cysteinpeptidasen (Review: CHAPMAN *et al.* 1997) finden sich 11 bisher bekannt gewordene humane Kathepsine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X); die meisten von ihnen sind reine Endopeptidasen, einige wenige wie CB fungieren dagegen auch als Dipeptidyl-Carboxypeptidasen (ARONSON & BARRETT 1978).

* Peptidasen, auch als Proteasen oder Proteinasen bezeichnet

† Der Begriff „Kathepsin“ hat seinen Ursprung im Griechischen (*kathapsein* – verdauen, zerkothen) und wurde im Jahre 1929 von WILLSTÄTTER und BAUMANN geprägt.

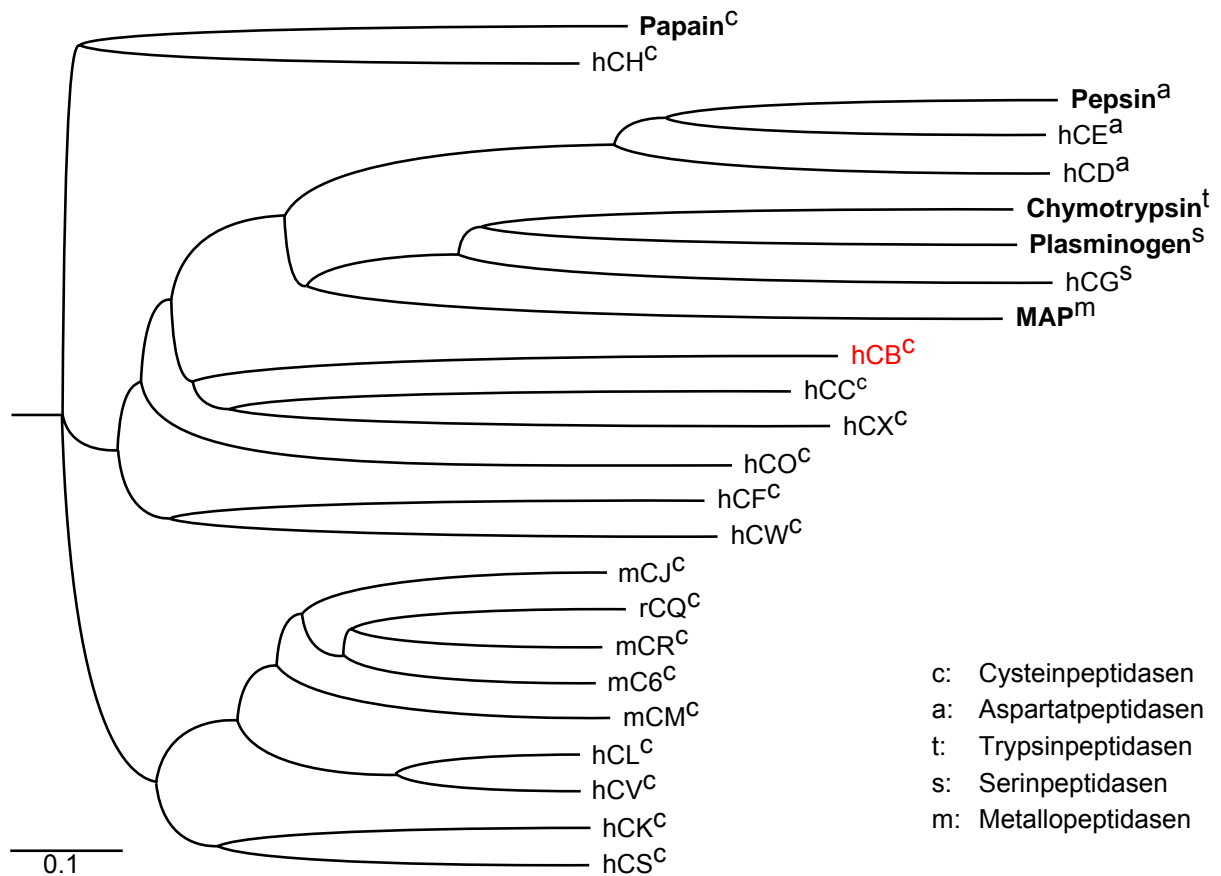


Abb. 2.1 Phylogenetischer Baum. Herkunft von Säuger-Kathepsinen und typischen Vertretern der verschiedenen Peptidase-Familien basierend auf einem Homologievergleich der Aminosäuresequenzen. Es wurden jeweils die kompletten Zymogene verglichen, exakte Aussagen über die Verwandtschaftsbeziehungen sind nur über eine Betrachtung der aktiven Regionen der modular aufgebauten Enzyme möglich (Anhang, S.168). Das Dendrogramm gibt den aktuellen Wissensstand in der Kathepsin-Klassifizierung wieder. Im Verlauf der letzten Jahre wurden viele neue Kathepsine entdeckt, was einige Unklarheiten bezüglich ihrer Nomenklatur nach sich zog: Kathepsin A wird offiziell als *lysosomal protective protein precursor* bezeichnet und wurde hier nicht berücksichtigt; einige Kathepsine führen in der Literatur z.T. widersprüchliche Mehrfachbezeichnungen, so z.B. Kathepsin X (Z, P), K (O, X, O2), V (U, L2) und J (P, C). Die Aminosäuresequenzen wurden der Datenbank „SWISS-PROT“ entnommen, mit Hilfe des Programms „MultAlin“ analysiert und mit dem Programm „Phylodendron“ visualisiert. Der Balken spiegelt den Grad der Identität/Divergenz wider.

2.2.2 Zymogenaktivierung und Sekretion

Lysosomale Kathepsine werden als Zymogen* an den membrangebundenen Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert und nach der Adressierung in das ER und den Golgi-Apparat über limitierte Proteolyse sowie Glykosylierung in die reife (*mature*), aktive Form überführt (prozessiert). Die Domänenstruktur von CB wird in Abb. 2.2 (unten) erläutert, auf die Transportmechanismen wird in §2.3.1 detailliert eingegangen.

* komplette, ungeschnittene Präpro-Form eines Enzyms

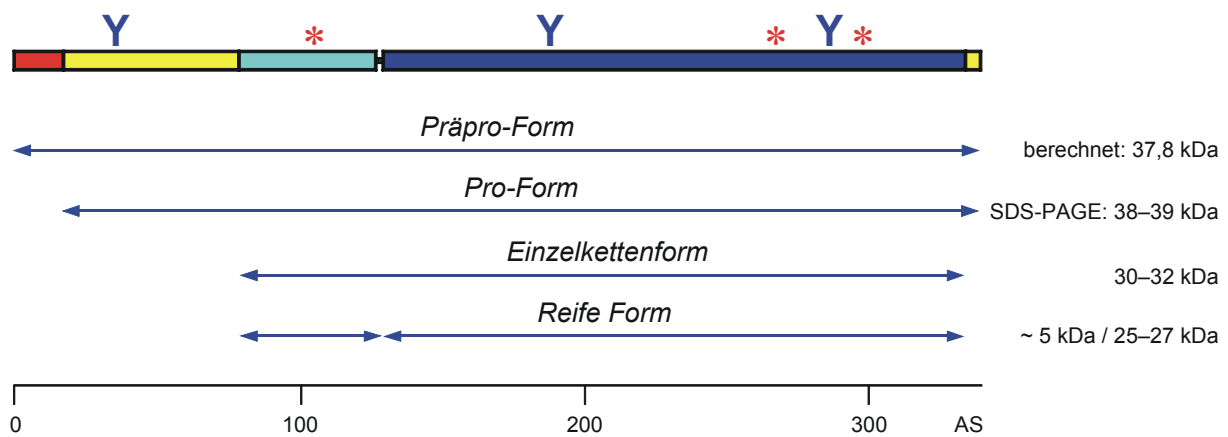


Abb. 2.2 Zymogenstruktur von CB (schematisch). Die 339 AS lange komplette Präpro-Form (*full-length message*, FLM) enthält das Signalpeptid (AS 1–17), welches nach Eintritt in das ER abgespalten wird und somit dem Pro-CB fehlt. Die proteolytische Abspaltung des N- (AS 18–79) sowie des C-terminalen Pro-Peptids (AS 334–339) führt zu der Einzelkettenform (*single chain form*, SC), die durch einen weiteren Prozessierungsschritt (AS Δ 127,128) in eine leichte (AS 80–126) und eine schwere Kette (AS 129–333) des reifen CB-Enzyms (*mature message*) überführt wird. Für Positionsangaben gilt die CB(FLM)-Nomenklatur. [*]: an der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligte Aminosäuren, [Y]: potentielle Glykosylierungsstellen. Die Molekülmasse des prozessierten CB variiert mit seinem Glykosylierungsgrad (\sim 1 kDa/Glykosylierung).

Das CB-Signalpeptid wird im ER-Lumen durch andere Kathepsine wie CD und CL oder über einen *intermolekularen* autokatalytischen Mechanismus (ROWAN *et al.* 1992, ROZMAN *et al.* 1999) abgespalten. Auch die unvollständig prozessierten Pro-Enzyme weisen eine geringe katalytische Aktivität und die Fähigkeit zur Autoaktivierung auf (MASON *et al.* 1987, MCQUENEY *et al.* 1997, ROZMAN *et al.* 1999). Das Pro-CB wird durch mehrere proteolytische Schritte im sauren Milieu der späten Endosomen und der Lysosomen (\sim pH 5,0) hydrolysiert (KOMINAMI *et al.* 1988, NISHIMURA *et al.* 1988). Das N-terminale Pro-Peptid vermittelt als Chaperon die korrekte Faltung von CB und seine spezifische Aktivität (MÜNTENER *et al.* 2005). Es ist verantwortlich für die richtige Adressierung von CB (HANEWINKEL *et al.* 1987, CUOZZO *et al.* 1995) und zudem in der Lage, das aktive Enzym spezifisch zu inhibieren (FOX *et al.* 1992, Review: CYGLER & MORT 1997; S.21). Eine zusätzliche posttranslationale Modifizierung stellt die *N*-Glykosylierung an 2–3 möglichen Kohlenhydratbindungsstellen dar, welche für die Adressierung (*trafficking, targeting*) der lysosomalen Enzyme über den Mannose-6- P -Weg (S.29) verantwortlich ist. Die Glykosylierung des Propeptids ist jedoch nicht essentiell für die korrekte Faltung von CB (MÜNTENER *et al.* 2005). Nicht-glykolysiertes CL wird dagegen nicht hydrolysiert und komplett als Pro-Form sezerniert (NISHIMURA *et al.* 1988). CB wird von normalen Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Osteoklasten sowie von malignen (transformierten) Zellen unter Standardkultivierungsbedingungen und unter Stimulation (S.29) sezerniert oder findet sich in Assoziation mit der Plasmamembran wieder (SLOANE *et al.* 1994). Bei den Sekretionsformen handelt es sich neben der reifen Form hauptsächlich um das Pro-CB (ROWAN *et al.* 1992) sowie einige trunkierte Formen (§2.2.7), die anders als das reife CB bei neutralem pH stabil sind.

2.2.3 Struktur und Reaktionsmechanismus

Die Cysteinpeptidasen sind aus zwei Domänen aufgebaut, die als L- und R-Domänen* bezeichnet werden (Abb. 2.3). Die L-Domäne mit der zentralen α -Helix wird von der R-Domäne mit ihrer β -Tonnenstruktur durch einen Spalt getrennt, welcher für die Substratbindung verantwortlich ist (*cleavage cleft, binding cleft, active site cleft*). Das aktive Zentrum besteht aus Cys²⁹ und His^{199†}, die in der aktiven Form beide geladen sind und ein Ionenpaar bilden. Während Cys²⁹ den nukleophilen Angriff vermittelt, fungiert His¹⁹⁹ als Protonendonator. Das polare Asn²⁹⁸ stabilisiert vermutlich die korrekte Tautomerform des Histidins.

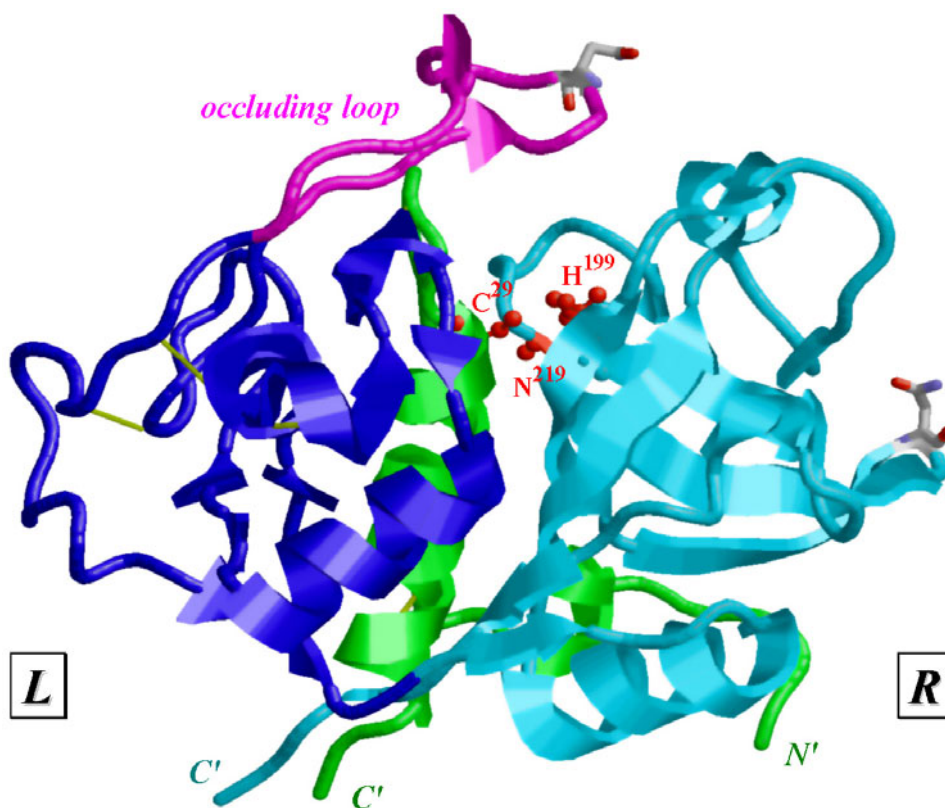


Abb. 2.3 Konformation des CB-Moleküls. Schematische Darstellung der Raumstruktur als Bandendiagramm des α -Kohlenstoffgerüsts in der Standardansicht. Zu sehen ist die reife Form von CB. Diese besteht aus einer schweren (*heavy chain*, HC; zyanblau und dunkelblau) sowie einer leichten Kette (*light chain*, LC; grün), die über 6 Cysteinbrücken (gelb) miteinander kovalent verbunden sind. Der von den beiden globulären Domänen L (HC_N) und R (HC_C) umschlossene Substratbindungsspalt birgt das aktive Zentrum in sich, das aus den Aminosäuren Cys²⁹, His¹⁹⁹ und Asn²¹⁹ gebildet wird (Kugel-Stab-Darstellung in rot). Die 20 AS lange Verschlusschleife (*occluding loop*; pink) der L-Domäne vermittelt die CB-spezifische Peptidylpeptidase-Aktivität. Die zwei potentiellen Glykosylierungsstellen (Asn¹¹³, Asn²¹⁰) sind als Stabmodell dargestellt, ebenso die gelbgrün markierten Disulfidbrücken. Die Visualisierung der kristallographischen Daten von hCB (PDB-Id: *Ihuc*, MMDB-Id: 1268; MUSIL *et al.* 1991) erfolgte mit dem Programm „RasMol“.

* L bzw. R steht für „links“ bzw. „rechts“ und bezieht sich auf die Position in der Standardansicht des Moleküls.

† jeweils CB(SC)-Nomenklatur

Das reife CB setzt sich aus einer leichten und einer schweren Kette zusammen (Abb. 2.3, oben). Das Polypeptidsubstrat bindet an CB entlang des Spaltes und wird durch die Endopeptidase-Aktivität von CB (FOSANG *et al.* 1992) hydrolysiert. Als Substrat bevorzugt CB Gly, Arg sowie hydrophobe Aminosäuren, die zwei Seitenreste* in Richtung des N-Terminus von der Spaltungsstelle entfernt liegen (HASNAIN *et al.* 1992). Die Fähigkeit zur Peptidyl-dipeptidase-Aktivität (ARONSON & BARRETT 1978) erhält das Enzym aufgrund einer unter den Kathepsinen einzigartigen Verschlusschleife (*occluding loop*; MUSIL *et al.* 1991), die das Substrat am vollständigen „Durchfädeln“ hindert. Dabei wird vermutlich das negativ geladene Carboxylat des C-Terminus von den positiv geladenen His¹¹⁰ und His¹¹¹ stabilisiert (FOSANG *et al.* 1992). Strukturelle Unterschiede zwischen den Kathepsinen wirken sich auf deren Substratspezifität und den Inhibitionsmechanismus aus (§2.2.5). Wird z.B. die Verschlusschleife von CB genetisch deletiert, so verliert das rekombinante CB die Exopeptidase-Aktivität und erhält eine höhere Bindungsaffinität gegenüber dem natürlichen Cysteinpeptidase-Inhibitor Cystatin C (ILLY *et al.* 1997). ILLY *et al.* postulieren, daß die Endopeptidase-Aktivität von CB ein evolutionäres Überbleibsel sei und daß seine Hauptfunktion im Lysosom hauptsächlich in der neuerworbenen Exopeptidase-Aktivität liege.

2.2.4 Enzymatische Aktivität

Die meisten Cysteinpeptidasen sind unter neutralen und basischen Bedingungen relativ instabil. Dies ist auf irreversible Veränderungen ihrer Tertiärstruktur zurückzuführen und bietet den umliegenden Zellen und Geweben in pathologischen Situationen einen potentiellen Schutz vor freigesetzten lysosomalen Enzymen. Die höchste Enzymaktivität erreichen die Kathepsine bei niedrigem pH, was für eine Anpassung an das saure Milieu der Lysosomen spricht. Während des lysosomalen Reifungsprozesses kann der pH in intakten Zellen jedoch bis auf 3,8 absinken und Enzyme wie CB irreversibel denaturieren (TURK *et al.* 2000). Seine optimale enzymatische Aktivität erreicht CB bei ~pH 6,0.

2.2.5 Substrate und Inhibitoren

Ein breites Spektrum natürlicher Substrate deutet auf eine Vielfalt möglicher physiologischer Funktionen von CB hin (§2.2.6). Für die Bestimmung enzymatischer Aktivitäten und für Bindungsstudien werden synthetische Substratanaloga verwendet. Insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung neuer medizinischer Werkzeuge zur Bekämpfung Peptidase-assoziiierter Krankheitsbilder kommt der Erforschung spezifischer Inhibitoren eine besondere Rolle zu.

* P₂, Nomenklatur nach SCHECHTER & BERGER 1967

Natürliche Substrate. Einige Proteine werden durch die Peptidyl-dipeptidase-Aktivität des CB vom C-Terminus her hydrolysiert, die Spezifität der Endopeptidase-Aktivität bleibt aber weitgehend unklar. Einige ausgewählte Beispiele für nachgewiesene Substratumsetzung *in vitro* sowie *in vivo* sind die Degradation von Actin, Fibrinogen, Fibronectin, Glucagon, Histonen, Insulin, Laminin, Osteocalcin, Parathyroid-Hormon sowie die Prozessierung und Aktivierung von Pro-Kathepsin D, Pro-Elastase, Pro-Kollagenase, Pro-Insulin, Pro-Renin, Pro-Plasminogen-Aktivator, Trypsinogen sowie Thyroglobulin-Vorläufern.

Synthetische Substrate. Zwischen den künstlichen und den natürlichen Substraten von CB gibt es nur wenig Übereinstimmung, jedoch zeigt sich auch hier eine breite Substratspezifität. CB spaltet verschiedene Substrate in Anwesenheit thiolhaltiger Gruppen bei ~pH 6,0. Selektive Substrate von CB, welche sich in ihrer Spezifität von anderen lysosomalen Cystein-peptidasen abgrenzen lassen, enthalten eine Arg-Arg-Sequenz (RR). Allerdings kann diese Aminosäureabfolge auch von anderen Peptidasen hydrolysiert werden, weswegen deren Beteiligung bei Aktivitätsmessungen z.B. durch spezifische Inhibitoren ausgeschlossen werden muß. Hierfür eignen sich die künstlichen Inhibitoren mehr als die natürlichen, da diese trotz unterschiedlicher Affinitäten gegenüber verschiedenen Kathepsinen keines von ihnen spezifisch blockieren können. Für Aktivitätstests werden künstliche Dipeptidylsubstrate verwendet, die an einen Benzyloxycarbonyl-Rest (Z-) sowie an eine fluorogene Fluchtgruppe gekoppelt sind (z.B. 7-Amido-4-Methylcoumarin, *AMC*; Cresylviolett, *CV*; 4-Methoxy- β -Naphthylamid, *4M β NA*) (SMITH & VAN FRANK 1975, BARRETT & KIRSCHKE 1981, LEYTUS *et al.* 1983, MARKS & BERG 1987, ROTHE *et al.* 1992, ASSFALG-MACHLEIDT *et al.* 1992, Review: SMITH *et al.* 1992, VAN NOORDEN *et al.* 1997, MELO *et al.* 2001; §3.5.5). Hierzu gehören auch die in dieser Arbeit verwendeten Substrate (Z-Arg-Arg)₂CV, Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC sowie Z-Gly-Pro-Arg-AMC.

Natürliche Inhibitoren. Die endogenen Substratinhibitoren der Cysteinpeptidasen bilden die Superfamilie der Cystatine und lassen sich grob in 3 Familien unterteilen: (i) Stefine, (ii) Cystatine und (iii) Kininogene (Review: BARRETT 1986, TURK & BODE 1991, CALCINS & SLOANE 1995, KOS & LAH 1998). Daneben gibt es andere natürlich vorkommende Wirkstoffe, die inhibitorisch aktiv sind.

(i) Stefine sind ~100 AS (11 kDa) große, einkettige, nicht-glykosylierte Proteine ohne Disulfidbrücken, die gegenüber alkalischen pH-Werten und Hitze extrem stabil sind. Ihr häufiges Vorkommen in Epithelien und Leukozyten legt die Vermutung nahe, daß sie primär eine Verteidigung gegen Cysteinpeptidasen darstellen, welche von invadierenden Mikroorganismen sezerniert werden. Zu der Gruppe der Stefine gehören Stefin A und B (TURK *et al.* 1986), welche die Kathepsine B, H und L inhibieren. Die Verwendung von Stefin B zur Unterdrückung CB-spezifischer Enzymaktivität bildet einen Teilaspekt dieser Arbeit.

(ii) Die mit ~115 AS (13 kDa) etwas größeren Cystatine besitzen 2 Disulfidschleifen nahe dem C-Terminus, sind jedoch wie die Stefine (meist) nicht glykosyliert. Cystatine kommen in relativ hohen Konzentrationen in Tränenflüssigkeit, in Speichel und Plasma, nicht aber in Geweben vor. Eine mögliche Funktion ist die Regulierung der Aktivität eigener und fremder Cysteinpeptidasen. Zu den Cystatinen gehört das zuallererst detailliert untersuchte Huhn-Cystatin (ANASTASI *et al.* 1983) sowie Cystatin C (Review: REED 2000). Cystatin C ist der universellste und stärkste Hemmstoff aller Cysteinpeptidasen, inklusive der lysosomalen.

(iii) Die komplex aufgebauten Plasma-Kininogene setzen sich aus 3 funktionell sowie strukturell verschiedenen Cystatin-Sequenzen zusammen und enthalten sowohl Disulfidbrücken als auch Kohlenhydratgruppen. Man unterscheidet niedrigmolekulare (50–68 kDa) von hochmolekularen (88–114 kDa) Formen. Die Kininogene sind zirkulierende multifunktionelle Proteine, die in der Leber synthetisiert und an das Blutplasma abgegeben werden. Sie inhibieren nicht nur Peptidasen, sondern stellen auch Vorstufen der vasoaktiven Kinine dar und sind an der Gerinnungskaskade beteiligt (SHARIAT-MADAR 1999). Die Kininogene hemmen Cathepsin L am stärksten, H weniger und B kaum.

Einen weiteren, bei pH 6,0 schwach bindenden natürlichen Inhibitor von CB stellt das eigene N-terminale Pro-Peptid dar (§2.2.2). Dieses stabilisiert das CB und kann es bei Dissoziation aktivieren (MACH *et al.* 1994).

Neben physiologischen Hemmstoffen gibt es auch solche Cysteinpeptidase-Inhibitoren, die aus Mikroorganismen (Pilzen, Actiniden) isoliert wurden. Der Epoxid-Inhibitor E-64* aus dem Schimmelpilz *Aspergillus japonicus* ist ein irreversibler Inhibitor der Cysteinpeptidasen Kathepsin B, H und L, der Serinpeptidasen nicht inhibiert. Der Inhibitionsmechanismus besteht in einer äquimolaren Thioether-Bindung mit dem Thiol des aktiven Cysteins.

Synthetische Inhibitoren. Viele der künstlichen Inhibitoren von Cysteinpeptidasen wurden von natürlichen Inhibitoren (z.B. E-64) abgeleitet, die von Mikroorganismen gebildet werden (s. oben). Wegen ihrer geringen Membranpermeabilität und Toxizität blieb eine medizinische Verwendung bisher ausgeschlossen. Will man die intrinsische CB-Enzymaktivität bestimmen, müssen Kreuzaktivitäten verwandter Enzyme (CL, CK) ausgeschlossen werden. Hierzu können CB-spezifische Inhibitoren wie CA-074† (MURATA *et al.* 1991) verwendet werden, welches eine effektive Unterscheidung zwischen den funktionell ähnlichen CB und CL ermöglicht.

* N-[N-(L-3-*trans*-Carboxyoxiran-2-carbonyl)-L-leucyl]-agmatin

† N-(L-3-*trans*-Propylcarbomoyloxiran-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-prolin

2.2.6 Physiologische Bedeutung

Die Frage, ob CB für den Organismus essentiell sei oder nicht, kann nur indirekt beantwortet werden. Die funktionell eng verwandten Kathepsine B und L kommen in hoher Konzentration (1 mM) in den Lysosomen vor, weswegen man zunächst ihre primäre Aufgabe in der nicht-selektiven partiellen Degradation intrazellulärer sowie endosomal aufgenommener extrazellulärer Proteine vor dem Ubiquitin-dirigierten Abbau sah. Die beiden Kathepsine sind jedoch auch außerhalb der Lysosomen enzymatisch aktiv und können endosomal (AUTHIER *et al.* 1995) sowie extrazellulär Proteine degradieren oder prozessieren und unter bestimmten Bedingungen pathologische Zustände auslösen. Wie *knockout*-Experimente an Mäusen belegen, ist weder CB noch CL für sich allein betrachtet für den Organismus lebenswichtig ($CB^{-/-}$: DEUSSING *et al.* 1998, $CL^{-/-}$: ROTH *et al.* 2000), allerdings haben sich Doppel-Mangelmutanten ($CB^{-/-}/CL^{-/-}$) als letal erwiesen (Review: REINHECKEL *et al.* 2001, EBERT *et al.* 2002). Dies zeigt deutlich, daß CB eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und im Stoffwechsel einnimmt. Zu seinen Funktionen gehören die Degradation von Basallamina und extrazellulärer Matrix, MHC Klasse II-gesteuerte Antigenpräsentierung, post-translationale Prozessierung und (In-)Aktivierung von Zymogenen und Pro-Hormonen, Beteiligung an der Knochenresorption sowie Schutz von zytotoxischen Lymphozyten vor Selbstzerstörung (BALAJI *et al.* 2002). Cysteinpeptidasen werden in Zusammenhang gebracht mit Krankheiten wie Diarrhöe (WARD *et al.* 1997), rheumatoide Arthritis und Osteoarthritis (MORT *et al.* 1984, 1998; BAICI *et al.* 1988, 1995), Alzheimer (CATALDO *et al.* 1990), Mucopolidose (*I-cell disease*; HANEWINKEL *et al.* 1987), Multiple Sklerose (BEVER *et al.* 1995) und Muskeldystrophie (KOMINAMI *et al.* 1987, TAKEDA *et al.* 1992). Ihre Beteiligung an Krebs und Apoptose soll im Folgenden einer näheren Betrachtung unterzogen werden.

Krebs. Die Entwicklung maligner Tumoren ist charakterisiert durch (i) die neoplastische Transformation und Proliferation des Primärtumors, (ii) die Tumordinvasion sowie (iii) die Metastasierung. Metastasenbildung setzt Angiogenese und Invasion voraus, die sich in drei Schritten vollzieht: (i) Adhäsion, (ii) lokale Proteolyse und (iii) Migration von Tumorzellen (Reviews: KOHN 1991, COMPAGNI & CHRISTOFORI 2000). Invadierende Tumorzellen müssen natürliche Barrieren überwinden. Hierzu zählen die extrazelluläre Matrix (Review: STETLER-STEVENSON *et al.* 1993) sowie die Basalmembran, die eine Grenze zwischen Epithelium und Bindegewebe darstellt und Kollagen Typ IV, Glykoproteine (Laminin, Fibronectin, Entaktin), Strukturproteine wie Elastin sowie saure Proteoglykane (Heparansulfat) enthält. Die Tumorzelle lagert sich an die Basalmembran an und löst sie durch Enzyme auf, welche entweder die Tumorzelle selbst oder die von ihr stimulierten umliegenden Zellen sezernieren. Oft werden solche Enzyme, darunter auch das CB, am Rand eines invadierenden Zellverband-Fortsatzes (*leading edge*) angereichert. Es folgt die Translokation der Tumorzelle, die nun unter bestimmten Umständen (ONUIGBO 1975, VIADANA & AU 1975; vgl. *seed*

and soil-Theorie, Review: FIDLER *et al.* 2002) in der Lage ist, an entfernten Orten neue Tochtergeschwulste zu bilden.

CB und andere Cysteinpeptidasen werden häufig mit Malignität in Verbindung gebracht (POOLE & WILLIAMS 1968, SLOANE *et al.* 1981, Review: BERQUIN & SLOANE 1996). Der tumorigene Effekt kann auf einem abgeänderten Regulationsmechanismus von (i) Transkription, (ii) RNA-Reifung, (iii) Translation und Glykosylierung, (iv) Prozessierung und Adressierung sowie (v) Inhibierung beruhen. Für die Beteiligung von CB an der Tumorprogression sprechen folgende, allerdings indirekte, Befunde: Erhöhte mRNA- und Proteinpegel sowie CB-Aktivitätswerte wurden in humanen Tumoren verschiedener Herkunft wie Kolonkarzinom, Brustkrebs, Magenkrebs sowie Lungentumoren (KREPELA *et al.* 1990, OZEKI *et al.* 1993, SUKOH *et al.* 1994, WERLE *et al.* 1999) detektiert. Bei Lungentumoren wird auch eine Korrelation zwischen einer erhöhten CB-Aktivität und schlechter Überlebensprognose festgestellt (EBERT *et al.* 1994, SUKOH *et al.* 1994, Review: KOS *et al.* 2000). Ein weiteres Indiz für die Tumorigenität von CB ist eine erhöhte Sekretion von überwiegend Pro-CB sowie trankierten CB-Formen in Tumoren und Kulturüberständen von Tumorzelllinien (MORT & RECKLIES 1986, MACIEWICZ *et al.* 1989, MACIEWICZ & WOTTON 1991, HEIDTMANN *et al.* 1993). Eine vom „regulären“ Enzym abweichende zytosolische CB-Variante sowie eine Erhöhung der CB-Sekretion können auf alternative Spleißprozesse zurückgeführt werden (§2.2.7). Das Spleißprodukt ist außerhalb des lysosomalen Milieus bei neutralem pH stabil und könnte auf diese Weise zur Neoplasie beitragen. Vermutlich besitzt es *in vivo* keine CB-typische Enzymaktivität (§2.2.7). Das reguläre Enzym zeigt dagegen neben dem typischen Maximum bei pH 6,0 noch 2 weitere Nebenmaxima bei pH 4,5–5,5 und bei physiologischem pH von 7,0–7,5 (WERLE *et al.* 1997). GUINEC *et al.* (1993) konnten demonstrieren, daß CB neben CH und CL in der Lage ist, Kollagen IV, Laminin und Fibronectin unter neutralen pH-Bedingungen abzubauen.

Neben intrazellulärem CB könnte auch das sezernierte bzw. Plasmamembran-assoziierte CB an Tumorinvasion und Metastasenbildung beteiligt sein (SZPADERSKA & FRANKFATER 2001, Review: CAVALLO-MEDVED & SLOANE 2003, PODGORSKI & SLOANE 2003, ROSHY *et al.* 2003). Dafür spricht die Beobachtung höchster CB-Aktivitäten an den Rändern primär invasiv wachsender Tumoren (*invasive edges*) und der Nachweis von membrangebundenem CB in bestimmten Tumoren (SLOANE *et al.* 1994). Membrangebundene Ektopeptidasen besitzen nicht nur proteolytische Funktion (Review: SEDO *et al.* 1996); für CB wird zum einen eine proteolytische Funktion, d.h. Degradation von Basalmembranen und extrazellulärer Matrix in Aktivierungskaskaden und zum anderen eine vermittelnde Funktion postuliert, die sich u.a. in der Aktivierung anderer Peptidasen wie Kollagenasen und Gelatinasen aus dem endogenen Fibronectin (GUINEC *et al.* 1993), äußert. WEISS *et al.* (1990) haben CB an der Grenzfläche zwischen Tumoren und gesundem Gewebe nachgewiesen. In einem Vergleich

zwischen einer invasiven und einer nicht-invasiven Zelllinie zeigte sich, daß in nicht-invasiven Zellen das hauptsächlich lysosomal und in der Pro-Form vorliegende CB das umliegende Laminin nicht angriff, während die invasiven Zellen Plasmamembran-gebundenes reifes Enzym enthielten, welches zur Zerstörung des umliegenden Laminins führte.

Da endogene Inhibitoren die enzymatische Aktivität der Cysteinpeptidasen regulieren, kann auch ein verschobenes Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor zur Invasivität des Tumors beitragen.

Apoptose. Als Apoptose bezeichnet man eine morphologisch distinkte Form des „programmierten Zelltods“, welcher eine wichtige Rolle während der Entwicklung, Differenzierung und Homöostase von Geweben zukommt (Review: STELLER *et al.* 1995). Apoptose ist durch morphologische Kriterien gekennzeichnet wie Chromatin-Kondensation, Kern- und DNA-Fragmentierung, *membrane-blebbing** und Änderungen der Membransymmetrie, Umstrukturierung des Zytoskeletts und Zellschrumpfung. Sie kann aufgrund dieser Merkmale von der Nekrose unterschieden werden. Je nach Zelltyp, Differenzierungszustand der Zelle sowie zellulärem Kontext können unterschiedliche Signale (z.B. Röntgenstrahlen, Glukokortikoide, Zytostatika, Entzug von Wachstumsfaktoren oder Verlust der Zelladhäsion) Apoptose auslösen. Apoptose läuft nach einem genetisch festgelegten Programm ab und hat zum Ziel, beschädigte, infizierte, überflüssig gewordene oder potentiell gefährliche Zellen gezielt durch Selbstzerstörung zu entfernen. Allerdings kann eine fehlerhafte Aktivierung des Programms zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose führen und eine Reihe pathologischer Zustände auslösen, zu denen Krebs, neurodegenerative Erkrankungen, AIDS, Autoimmunerkrankungen und virale Infektionen zählen (Review: STELLER *et al.* 1995). An der Regulation der Apoptose beteiligte intrinsische Moleküle sind vor allem pro- und anti-apoptotische Proteine der *bcl-2*-Familie, Caspasen, Apoptose-spezifische Peptidasen und deren Substrate sowie mit diesen Proteinen assoziierte und interagierende Moleküle (Review: KONOPLEVA 1999). Die Aufklärung der apoptotischen Prozesse bietet Ansatzpunkte für mögliche Therapien von Krankheiten, deren Ursache auf die Fehlregulationen der Apoptose zurückzuführen sind.

Bereits 1993 wurden lysosomale Cysteinpeptidasen im Zusammenhang mit der neuronalen Apoptose erwähnt (Review: NIXON & CATALDO 1993). Zahlreiche Studien ergaben, daß CB hierbei eine zentrale Rolle in verschiedenen apoptotischen Aktivierungskaskaden zukommt (ROBERTS *et al.* 1997, VANCOMPENOLLE *et al.* 1998, GUICCIARDI *et al.* 2000, Review: SALVESEN 2001, FOGHSGAARD *et al.* 2001, 2002, WERNEBURG *et al.* 2002, YUAN *et al.* 2002, CANBAY *et al.* 2003, HENTZE *et al.* 2003, LIU *et al.* 2003, MADGE *et al.* 2003, MICHALLET *et al.* 2003).

* Abschnüren von Zellmaterial durch „Blasenbildung“

2.2.7 *Alternative Spleißvarianten*

Das humane *CB*-Gen befindet sich unter dem Einfluß eines regulierbaren Promotors (YAN *et al.* 2000, 2003) und besteht aus 12 oder 14 Exons (GONG *et al.* 1993, BERQUIN *et al.* 1995), von denen einige nicht-codierende Regionen repräsentieren (Abb. 2.4, unten). Alternatives Spleißen der Primärtranskripte (hnRNA) in den 5'- und 3'-UTRs (*untranslated regions*) stellt einen möglichen Mechanismus für erhöhte CB-Sekretion dar (GONG *et al.* 1993, CAO *et al.* 1994, BERQUIN *et al.* 1995, RESCHELEIT *et al.* 1996; §2.2.2). Die Regulation des Spleißprozesses bleibt unklar; alle Spleißvarianten könnten gleichzeitig exprimiert werden (BERARDI *et al.* 2001). Sie lassen sich in zwei Subpopulationen unterteilen, welche zwei unterschiedliche Translationsprodukte codieren (GONG *et al.* 1993, BERQUIN *et al.* 1995, MEHTANI *et al.* 1998, BERARDI *et al.* 2001). *CB*-Transkripte, denen Exon 2 fehlt (*CB(-2)*), wirken sich nicht auf translatierte Regionen aus. Sie treten gehäuft in einer Reihe humaner Tumoren auf. Manche Tumorarten (MEHTANI *et al.* 1998) und arthritische Gewebe (BERARDI *et al.* 2001) enthalten darüber hinaus Transkripte, denen zusätzlich Exon 3 fehlt (*CB(-2,3)*). Dieses codiert das Signalpeptid sowie Teile des Aktivierungspropeptids*. Die Deletion führt zu einer bis zu 8-fach höheren Expression gegenüber der kompletten mRNA (GONG *et al.* 1993). *CB(-2,3)* wird an einem internen Met⁵² translatiert und führt zu einem nativ trunkierten 32 kD-Expressionsprodukt ($\Delta^{51}\text{CB}^\dagger$). Aktuelle Arbeiten belegen, daß N-terminale Deletionen des Propeptids von mehr als 22 AS eine korrekte Faltung und somit eine reguläre CB-Enzymaktivität wie im Falle von $\Delta^{51}\text{CB}^\ddagger$ verhindern (MÜNTENER *et al.* 2004, 2005). $\Delta^{51}\text{CB}$ besitzt eine erhöhte Stabilität; Ursache hierfür könnten fehlende Bereiche in der Pro-Region sein (MEHTANI *et al.* 1998). Die ersten 20 Seitenreste von $\Delta^{51}\text{CB}$ codieren ein mitochondriales Zielsignal (*mitochondrial targeting signal*, MTS; MÜNTENER *et al.* 2004). Kürzlich wurde auch eine Form von Cathepsin L ohne Pro-Peptid entdeckt, welche Kernlokalisation und eine spezifische Spaltungsaktivität aufwies (GOULET *et al.* 2004).

Obwohl extralysosomales CB zunächst als atypisch galt, sind dessen extrazelluläres sowie membranassoziertes Auftreten bereits gut dokumentiert (STROHMAIER *et al.* 1997, CAVALLO-MEDVED & SLOANE 2003). Extralysosomales CB wird mit Apoptose in Verbindung gebracht (YUAN *et al.* 2002, MICHALLET *et al.* 2003). Es ist unklar, ob dies einer bestimmten Fraktion von CB zugeordnet werden kann. Immuno- und Enzymzytochemische (PIETRAS & ROBERTS 1981, SPIESS *et al.* 1994) sowie biochemische (PIZZORNO 2001, RICCIO *et al.* 2001, LIU *et al.* 2003) Versuche belegen, daß endogenes CB mit dem Zellkern assoziiert vorkommt. MEHTANI *et al.* (1998) fanden $\Delta^{51}\text{CB}$ in Assoziation mit der zytoplasmatischen Seite der Kernmembran.

* ein weiterer Beleg für den modularen Aufbau der Kathepsine (Anhang, S.168)

† die in der Originalliteratur verwendete Nomenklatur wurde übernommen

‡ $\Delta^{51}\text{CB}$ fehlen die ersten 34 Seitenreste des N-terminalen Propeptids

Eine Kernfraktion von CB könnte im Zusammenhang mit Zelltod stehen (ROBERTS *et al.* 1997, FAUBION *et al.* 1999, ROBERTS *et al.* 1999, WERNEBURG *et al.* 2002, CANBAY *et al.* 2003). Es bleibt unklar, ob diese Fraktion das aus den Lysosomen freigesetzte reife CB oder das trunkeerte Δ^{51} CB widerspiegelt. Detektionsmethoden, die auf polyklonalen Antikörpern basieren, sind nicht imstande zwischen unterschiedlichen CB-Varianten zu unterscheiden. Genausowenig können biochemische Enzymaktivitätsmessungen zwischen der Innen- und der Außenseite von Zellorganellen differenzieren. Deswegen sind die oben erwähnten Studien kritisch zu betrachten. Beide Einschränkungen lassen sich durch Lebendzellmikroskopie und genetisch markierte Proben umgehen. Fluoreszenzprotein-markiertes Δ^{51} CB wird in den Mitochondrien angereichert und verursacht Kernfragmentierung und Zelltod (MÜNTENER *et al.* 2003). Allerdings wurde hier Δ^{51} CB selbst nicht im Zellkern nachgewiesen.

Die Studien legen nahe, daß nativ trunkeertes Δ^{51} CB bei Malignität und Zelltod eine eigene Funktion ausübt – parallel zu denen Prozessen, für die aus Lysosomen freigesetzte CB-Formen zuständig sind. Dies stellt einen weiteren Teilaspekt der vorliegenden Arbeit dar.

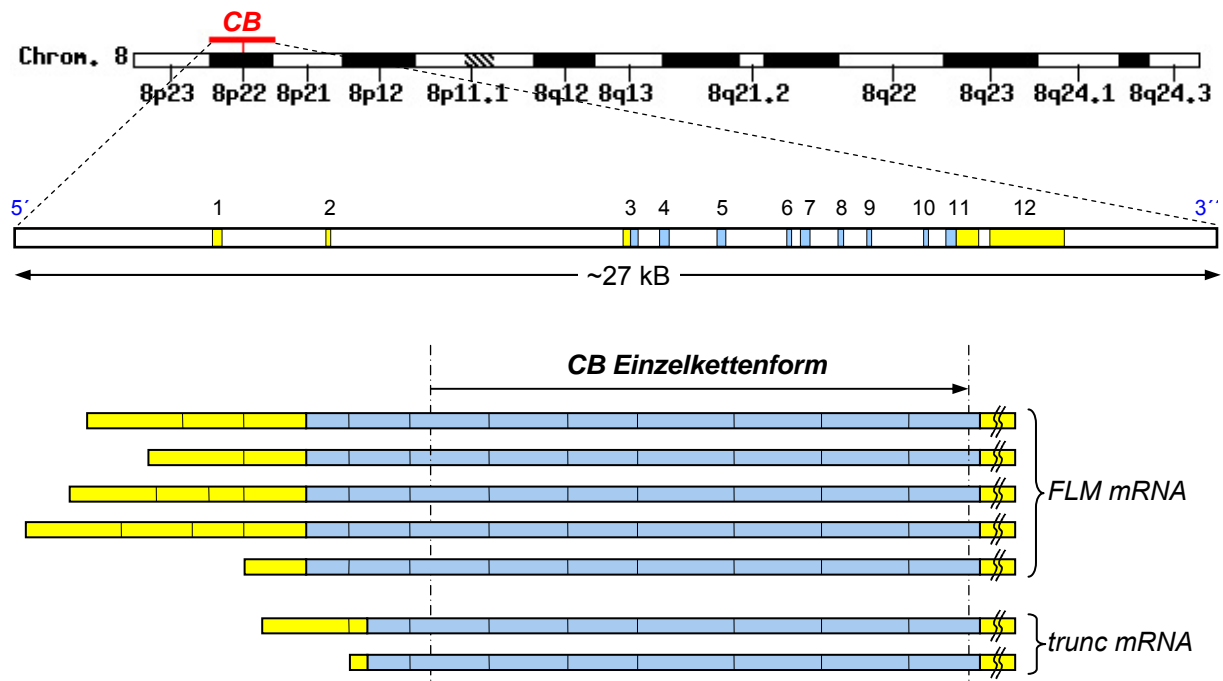


Abb. 2.4 Das hCB-Gen: Lokalisation, Organisation und Transkription. Chromosomale Lokalisation (Quelle: NCBI*/NIH†) mit der Exon-Intronstruktur des hCB-Gens (oben, abgewandelt nach GONG *et al.* 1993) und alternative Spleißvarianten der hCB-Primärtranskripte (unten, abgewandelt nach BERQUIN & SLOANE 1996). hCB liegt auf Chromosom 8p22–p23.1 als Einzelkopie vor. Nicht-codierende Exons (5'-UTR und 3'-UTR) sind gelb, translatierte CB-Bereiche blau unterlegt. Die obere Transkriptpopulation (CB(-2)) codiert die komplette CB-Sequenz (CB(FLM)), die untere Population (CB(-2,3)) führt zu dem trunkeerten Translationsprodukt Δ^{51} CB, dem die komplette ER-Signalsequenz sowie ein Teil der N-terminalen Pro-Region fehlen.

* „The National Center for Biotechnology Information“

† „National Institute of Health“

2.3 INTRAZELLULÄRER PROTEINTRANSPORT

Proteine besitzen intrinsische Signale, die ihren Transport und ihre Lokalisation in der Zelle bestimmen (BLOBEL & DOBBERSTEIN 1975). Manche Erbkrankheiten wie z.B. die Primäre Hyperoxaluria („Nierensteine“), die Hypercholesterolemie oder die Cystische Fibrose beruhen auf Translokationsdefekten, die wiederum auf fehlgeleiteten Transport zurückzuführen sind. Man unterscheidet zwischen linearen und zusammengesetzten Signalen (*signal patches*); die letzteren sind nur aus dem räumlichen Kontext, d.h. aus der Proteinkonformation ersichtlich. Eine Sonderstellung unter den Transportmechanismen nimmt der zuerst untersuchte ER-Signalsequenz-abhängige Proteintransport ein. In der Zwischenzeit wurde eine Vielzahl von Transportsignalen für verschiedenste Organellen und Zellkompartimente wie Zellkern, Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxysomen, Membranen usw. entdeckt. Im Zusammenhang mit der untersuchten CB-Lokalisation sollen hier der ER-adressierte, der mitochondriale und der nukleo-zytoplasmatisch vermittelte Transport (Reviews: JANS *et al.* 2000, YONEDA 2000, IMAMOTO 2000, KISELEVA *et al.* 2000) näher betrachtet werden.

2.3.1 ER-adressierte Transportwege

ER-Signalsequenzen. Translokation von Proteinen in das ER-Lumen wird über N-terminale ER-Signalsequenzen (Prä-Peptid, Signalpeptid; CHANG *et al.* 1978) vermittelt. Während der zytosolischen Proteintranslation wird das Signalpeptid von einem Signalerkennungspartikel (*signal recognition particle*, SRP) gebunden und über einen SRP-Rezeptor (*docking protein*) am rER kotranslational in das ER eingefädelt. Das Signalpeptid wird durch membran-gebundene Signalpeptidasen abgespalten und das Protein in das ER-Lumen freigegeben. Signalpeptide können auch nach ihrer Abspaltung physiologische Funktion besitzen.

Signalsequenzen bestehen aus einer 6–15 AS langen hydrophoben Kernsequenz und variablen polaren Flanken. Variationen in der Aminosäuren-Zusammensetzung von Signalsequenzen wirken sich auf den späteren Zielort der Proteine (ER-Lumen, Plasmamembran) und ihre mögliche Membraninsertion (C- oder N-Terminus) aus. Proteine können im ER modifiziert (Disulfid-Brückenbildung, Glykosylierung, limitierte Proteolyse) und weiter in den Golgi-Apparat transportiert werden.

Sekretionsmechanismen. Der Golgi-Komplex kontrolliert den Transport von Proteinen, die für (i) die Sekretion, (ii) die Integration in die Plasmamembran oder für (iii) die Adressierung in die Lysosomen bestimmt sind. Die letzteren müssen wegen potentiell destruktiver Effekte sortiert und von den verbleibenden Bestandteilen abgetrennt werden. Der lysosomale Weg wird im nächsten Abschnitt erläutert. Bei den sekretorischen Pfaden wird zwischen der konstitutiven und der regulierten Sekretion unterschieden (Abb. 2.5, unten).

(i) Die konstitutive Exozytose ist ein Prozeß, durch welchen neu synthetisierte Proteine und Lipide vom ER über Vesikel zur Zelloberfläche befördert werden. Hier werden diese zu Bestandteilen der Plasmamembran oder sie werden in den extrazellulären Raum sezerniert. Obwohl dieser Prozeß konstitutiv erfolgt, kann er durch Wachstumsfaktoren verstärkt werden.

(ii) Spezialisierte (z.B. endokrine) Zellen besitzen zusätzlich einen oder mehrere regulierte Sekretionsmechanismen. Die regulierte Sekretion benötigt einen Stimulus oder Trigger, welcher entweder die Synthese oder die Freigabe (*release*) steuert (Reviews: BLAZQUEZ & SHENNAN 2000, GLOMBIK & GERDES 2000).

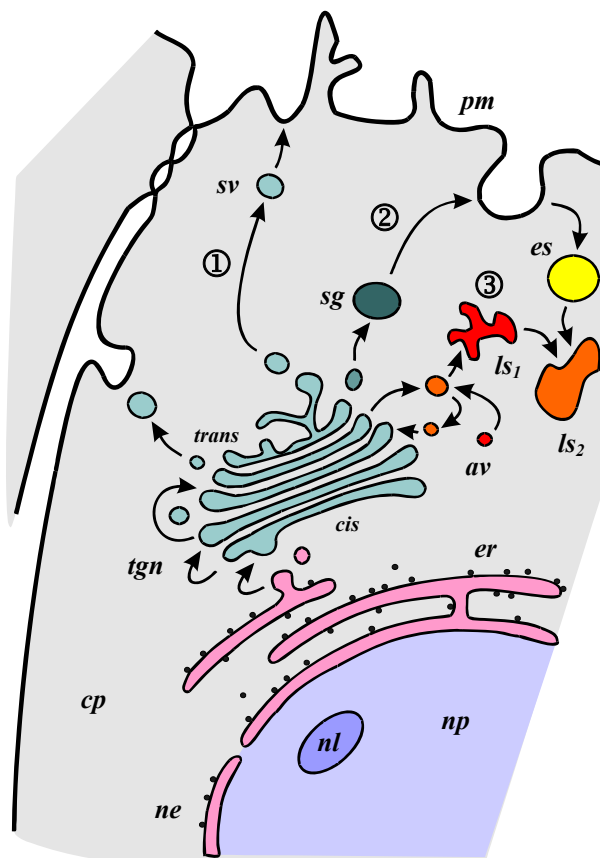


Abb. 2.5 Intrazellulärer CB-Transport. Mögliche Sortiermechanismen sekretorischer und vesikulärer Proteine in einer epithelialen Zelle: ① konstitutive Sekretion, ② regulierte Sekretion, ③ lysosomaler Weg. Der letztere gilt als *der* reguläre CB-Transportweg, wobei andere Sortiermechanismen nicht ausgeschlossen werden. *cp*: Zytoplasma, *er*: (rauhes) ER, *tgn*: Golgi-Apparat (*cis*- und *trans*-Seiten) mit Trans-Golgi-Netzwerk, *np*: Nukleoplasma, *nl*: Nukleolus, *ne*: Kernmembran (*nuclear envelope*), *sg*: sekretorische Granulen, *pm*: Plasmamembran, *es*: Endosomen, *av*: saure (sortierende) Vesikel, *ls₁*: primäre Lysosomen, *ls₂*: sekundäre Lysosomen.

Der Mannose-6- P -Weg. Die Adressierung vesikulärer, sekretorischer sowie membrangebundener Proteine von den Übergangselementen (*transition elements*) des ER in den Golgi-Apparat geschieht in erster Linie über den Mannose-6- P -Weg und soll hier exemplarisch an dem Haupttransportweg von CB erläutert werden. CB wird durch das autokatalytische oder Fremdpeptidase-vermittelte (CD, Pepsin) Entfernen des Pro-Peptids aktiviert und die Oligosaccharide werden getrimmt. Danach wird der sog. Mannose-6- P -Weg eingeschlagen. Die *N*-Glykosylierung beginnt im ER und wird im Golgi-Apparat weiter modifiziert. Die bei der Glykosylierung zusammengefügt Oligosaccharide enthalten Mannose-6- P -Gruppen, die an Mannose-6- P -Rezeptoren im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) binden können und zusammen mit diesen nach Fusion mit sortierenden Vesikeln (pH 5,0) zunächst zu primären Lysosomen,

durch weitere Fusion mit Endosomen schließlich zu sekundären Lysosomen heranreifen. Während dieses Reifungsprozesses werden Kathepsine und andere Glykoproteine vom Rezeptor getrennt, welcher später im Golgi-Apparat zurückgewonnen wird. Es gibt jedoch auch eine Rezeptor-unabhängige Form der Kathepsine, die an die Plasmamembran gebunden ist und sezerniert werden kann. In welcher Weise die in den Lysosomen gespeicherten Vorstufen der Kathepsine aktiviert werden, ist im Detail noch unbekannt. Man hat jedoch gefunden, daß Pro-Formen von CB, CH und CL im sauren Milieu autoaktiviert werden (§2.2.2). CD, eine Aspartylpeptidase, funktioniert außerdem als Konversionsenzym für diese Cysteinpeptidasen (NISHIMURA *et al.* 1988, VAN DER STAPPEN *et al.* 1996).

Da Mannose-6- P -Rezeptoren hauptsächlich für den Transport lysosomaler Enzyme verantwortlich sind, könnten Änderungen in diesem Mechanismus eine erhöhte Sekretion von CB bewirken. Mittlerweile sind andere Pro-Kathepsin-bindende Rezeptoren bekannt, die auf Mannose-6- P -unabhängige Stoffwechselwege hindeuten (SLOANE *et al.* 1994). Die Sekretion von CB kann z.B. mit Hilfe von 12(S)-HETE (HONN *et al.* 1994, ULBRICHT *et al.* 1997), TNF- α sowie IL-1 (HUET *et al.* 1993), Östrogen (PIETRAS *et al.* 1981) oder Cerulein, ein Cholecystinin-Analogon (TOOZE *et al.* 1991) stimuliert werden. Diese Tatsachen sprechen für eine Vielfalt möglicher Regulationsmechanismen des CB-Transports.

2.3.2 *Mitochondriale Adressierung*

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen, die im Rahmen der Zellatmung unter Sauerstoff-Verbrauch ATP herstellen. Mitochondriale Proteine werden überwiegend durch die nukleäre DNA codiert und nach ihrer Synthese im Zytosol in die Mitochondrien importiert. Die mitochondrialen Zielsignale (*mitochondrial targeting signal*, MTS) sind meist N-terminale Prä-Sequenzen, die reich an Ala, Leu, Arg und Ser sind und wenig saure Seitenreste enthalten. Sie sind z.T. in der Lage α -Helices zu bilden. An den Erkennungsmechanismen* von MTS sind viele verschiedene Proteintypen beteiligt (Reviews: KÖHLER *et al.* 1999, WIEDEMANN *et al.* 2004). Chaperone vermitteln unter Energieverbrauch die Translokation der „gestreckten“ Proteinsubstrate. Vergleichbar den ER-Signalpeptiden werden MTS nach der Penetration der beiden Mitochondrienmembranen von einer spezifischen Peptidase an der inneren Membran abgespalten.

In einer neueren Studie haben MÜNTENER *et al.* (2004) ein MTS am N-terminalen Ende des trunkierten $\Delta^{51}\text{CB}$ nachgewiesen, welches sich über einen Bereich von 20 AS erstreckt und das $\Delta^{51}\text{CB}$ effektiv in die Mitochondrien befördert (§2.2.7).

* Die Translokations-Maschinerie der äußeren Membran wird als TOM-Komplex (*translocator outer membrane*) und die der inneren als TIM-Komplex (*translocator inner membrane*) bezeichnet.

2.3.3 Nukleozytoplasmatische Transportmechanismen

Transkriptionsfaktoren, ribosomale Proteine, Histone, Polymerasen und andere Kernproteine werden im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in den Zellkern transportiert, wo sie ihre eigentliche physiologische Funktion ausüben. Hierzu müssen sie die Kernmembran (*nuclear envelope*) als eine natürliche Diffusionsbarriere überwinden. Dies geschieht über eine „offene“ Verbindung (*gate*), die als Kernporenkomplex (*nuclear pore complex*, NPC) bezeichnet wird. Dabei gelangen Moleküle mit einem bis zu 26–28 nm großen Durchmesser durch den ~9 nm großen geöffneten Kanal des hochflexiblen NPC. Dieser läßt sowohl passiven Transport durch Diffusion als auch aktiven Transport unter Energieverbrauch zu.

Transportmechanismen. In der Zwischenzeit ist eine Vielzahl molekularer Mechanismen für den Import, Export sowie den bidirektionalen Transport beschrieben worden (Review: BAYLISS *et al.* 2000). Für den aktiven Import in den Zellkern benötigt das Substratprotein (*cargo*) ein Kernlokalisierungssignal (*nuclear localization signal*, NLS^{*}), welches meist die basischen Aminosäuren Arg und Lys enthält, jedoch keiner strengen Konsensussequenz folgt. Analog dazu wird für den Export ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES[†]) benötigt, häufig reich an Leu. Substratproteine ohne eigene Transportsignale können mit einem signaltragenden Trägerprotein (*carrier*) kotransportiert werden. Manche Stoffe wie hnRNP A1 (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*; RNA-Export), sind in der Lage, mit Hilfe sogenannter *shuttling*-Proteine zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleoplasma hin- und herzu pendeln (NLS ≡ NES).

Aktiver Transport. Der aktive Transport ist gekennzeichnet durch (i) spezifische Transportsignale, (ii) sättigbare Rezeptoren und (iii) Energieverbrauch. Makromoleküle werden gemäß ihrer Größe und Beschaffenheit sowie dem Transportmechanismus unterschiedlich schnell[‡] durch den NPC befördert. Darüber hinaus ermöglicht der aktive Transport den Austausch von vergleichsweise großen Molekülen wie den DNA- und RNA-Polymerasen mit Molekulargewichten von mehr als 100–200 kDa. Aktiver Transport kann durch Weizenkeimagglutinin (*wheat germ agglutinin*; WGA), welches Nukleoporine blockiert, inhibiert werden (YONEDA *et al.* 1987). Die kleine GTPase Ran spielt eine wichtige Rolle im Zerfall (*disassembly*) und der Translokation von *carrier-cargo*-Komplexen. Bis dato am besten untersucht ist der Kern-Proteinimport mittels des Kernlokalisierungssignals aus dem großen T-Antigen von SV40 (KALDERON *et al.* 1984, GOLDFARB *et al.* 1986, HODEL *et al.* 2001). Solche „klassischen“ NLS-Sequenzen sind aus einem (*monopartite*) oder zwei (*bipartite*) Clustern aufgebaut

* ein prototypisches NLS-Protein ist z.B. das Nukleoplasmin

† ein Beispiel hierfür ist der Proteinkinase A-Inhibitor, PKI

‡ während ~100 Histonmoleküle pro Pore und Minute in den Zellkern gelangen können, werden lediglich 3 Ribosomen in der selben Zeit exportiert

(ROBBINS *et al.* 1991). Der NLS-abhängige Importmechanismus umfaßt mehrere Schritte, an denen zahlreiche Faktoren wie Importin α und β , die GTPase Ran und andere beteiligt sind und deren asymmetrische Konzentrationsverteilung, insbesondere von RanGTP, bestimmend ist für die Richtung des Transports (Reviews: GÖRLICH 1997, YONEDA 1999).

Passiver Transport. Diffusionsversuche in Zellen mit injizierten Farbstoffen führen in Abhängigkeit von der Molekülgröße zu unterschiedlichen Äquilibrierungszeiten (KEMINER *et al.* 1999, RIBBECK & GÖRLICH 2001). Danach diffundieren Moleküle kleiner als 5 kDa durch freie Diffusion in den Zellkern, ebenso können Moleküle zwischen 5–50 kDa in den Zellkern hineindiffundieren, jedoch mit stark abnehmender Rate. Passiv diffundierende Moleküle größer als ~50–60 kDa bleiben gänzlich vom Zellkern ausgeschlossen.

Kernaffinität. Unabhängig von der Art des Transports kann es zu einer Anhäufung des entsprechenden Moleküls im Zellkern durch einen Kern-Rückhalte Mechanismus (*nuclear retention signal*, NRS) kommen. Dieser kann vielfältiger Natur sein und kommt durch Bindung an bestimmte Kernkomponenten zustande.

2.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Kathepsin B (CB) ist eine Cysteinpeptidase, welcher bei der Invasion von Tumorzellen sowie der Metastasierung eine wichtige Rolle zukommt. Darauf lassen Untersuchungen schließen, die eine erhöhte CB-Aktivität sowie eine gesteigerte CB-Sekretion und Membranassoziation in Tumoren zeigen. Darüber hinaus scheint kernassoziiertes CB in den Aktivierungskaskaden der Apoptose eine Bedeutung zu haben. In allen diesen Fällen können „aberrante“ CB-Proteine (z.B. Spleißvarianten) bzw. Variationen in der Lokalisation sowie in den Transportwegen von CB für solche Effekte mitverantwortlich sein. Die ursprüngliche Vermutung, bei CB handele es sich um eine rein lysosomal vorliegende Peptidase, muß daher im Hinblick auf dessen Funktionsvielfalt revidiert werden.

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit richtet sich auf die Untersuchung der intrazellulären Lokalisation rekombinanter CB-Konstrukte und deren Verteilung in lebenden Zellen. Dabei sollen überwiegend lichtmikroskopische Verfahren in Verbindung mit bildgebenden Techniken unter Verwendung autofluoreszierender Proteine zur Geltung kommen. Darüber hinaus sollen alternative spektroskopische Ansätze wie z.B. die Zwei-Photonen-Mikroskopie hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten erprobt und die Grundlagen für ihre Anwendung erweitert werden. Hierbei sollen nicht nur die Vorteile dieser neuartigen Methoden erläutert, sondern auch deren Limitationen und die Ursachen für potentielle Artefakte aufgedeckt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 COMPUTERANWENDUNGEN UND GERÄTE

Die verwendeten Computerprogramme und Geräte sind in Tab. 3.1 und Tab. 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.1 Liste der benutzten Computeranwendungen.

Datenbanksuche, Homologievergleiche	GCG-Programmpaket ClustalW MultAlin GeneBee Phylo dendron Macaw v 2.0.5 PSORT v 6.4	© Digital Equipment Corp. © EBI, United Kingdom © F. CORPET (INRA, France) © Belozersky Institute of Physico-chemical Biology, Moscow State University, Russia © D.G. GILBERT, Indiana University, USA © G. SCHULER; NCBI; Bethesda, Maryland, USA © K. NAKAI, University of Tokyo, Japan
Klonierung, Strukturdarstellung	Clone Manager v 4.01 RasMol Windows v 2.6 PyMOL™ v 0.97 Swiss-Pdb Viewer v 2.5	© Scientific & Educational Software © R. SAYLE © DeLano Sci. LLC, San Carlo, California, USA) © Geneva Biomedical Research Institute, Schweiz
Datenauswertung	SigmaPlot	© Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA
Bildakquisition, Bildverarbeitung	OpenLab bis v 3.0 Scion Image v 4.0.2 Amira™ v 2.2 EZ 2000 v 2.1.4 Huygens2 Appl. Visual. System	© Improvision; London, United Kingdom © Scion Corporation; Las Vegas, Nevada, USA © Indeed – Visual Concepts; Berlin © Coord, Niederlande © Scientific Volume Imaging; PS Hilversum, NL © AVS Waltham, Mass., USA
Aktivitätsmessung	FluoroCount 96 v 3.16 EPICS® Profile Analyzer	© Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden © Coulter Corp., Hialeah, FL, USA

Tab. 3.2 Verwendete Geräte.

Zentrifugation	5417 C (Tischzentrifuge) Minifuge RF (Kühlzentrifuge) J2-21 (Ultrazentrifuge) JA-17, JA-20, JS-13.1 (Rotoren)	Eppendorf; Hamburg Heraeus; Hanau Beckman; Unterschleissheim-Lohhof Beckman; Unterschleissheim-Lohhof
Gelektrophorese, Western-Blot	GNA-100 (Elektrophorese-Apparatur) ECPS 3000/150 (Netzgerät) Acrylamid-Gelkammern E.A.S.Y. RH-3 (Gelphoto-Apparatur)	Pharmacia & Upjohn; Erlangen Biometra Herolab; Wiesloch Mitsubishi; Tokyo, Japan
Meßgeräte	U-1100 Spectrophotometer Suprasil® Quarzküvetten (104F QS) E500 (Digitaler pH-Meter) Universal. U 4100-OD 2.2 (Waage) PE 1600 (Tischwaage) Lumineszenzspektrometer LS50 B	Hitachi; Tokyo, Japan Hellma; Müllheim Metrohm; Herisau Sartorius; Göttingen Mettler; Gießen Perkin Elmer; Offenbach

Heizen, Kühlen, Mischen	MiniCycler™ MJ Research (PCR) B 5061 EC/CO ₂ (Brutschrank) B15 (+37 °C Brutkammer) POC-Kammer MA6 (Wärmethermostat) Heizschrank Thermostat 5320 (Heizblock) +4 °C Kühlschrank C21085 (-85 °C Tiefkühltruhe) RT-406 (Inkubations-Schüttler) MR 80 (Magnet-/Heizrührer) REAX 2000 (Rüttler) KL-2 (Taumelschüttler) Labsonic 1510 (Homogenisator)	Biozym Diagnostik; Hess. Oldendorf Heraeus; Hanau Heraeus; Hanau PeCon GmbH; Erbach Lauda; Lauda-Königshofen Memmert Eppendorf; Hamburg Liebherr New Brunswick Scientific; Edison, USA Infors; Bottmingen Heidolph; Schwabach bei Nürnberg Heidolph; Schwabach bei Nürnberg Johanna Otto; Hechingen B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Zellkultur	SG-600 (Sterilbank) Lab-Tek® Chamber Slide™ System Neubauer Zählkammer 25 cm ² Zellkulturflaschen 75 cm ² Zellkulturflaschen Kryoröhrchen	The Baker Company; Sanford, USA NUNC; Wiesbaden Brand Gläser, Wertheim Falcon; New Jersey, USA Falcon; New Jersey, USA Nalgene; Rochester, USA
Mikroskopie, Bildwiedergabe	<u>Mikroskope</u> : Axiovert S100 TV; TE300 mit Scaneinheit PCM2000 Piezo-Motor <u>Objektive</u> : 10×/0,30 Luft; 20×/0,40 Luft; 40×/0,60 Luft; 40×/1,30 Öl; 40×/1,20 W; 63×/1,25 Öl; 63×/1,40 Öl 60×/1,2 Plan Apo Wasser (LSM) 60×/1,2 Plan Apo DIC H (TPE) <u>Exitationsfilter</u> : 436/10 (CFP); 515/10 (YFP); 490/20 (GFP); 385/30 (BFP) <u>Dualband-Emissionsfilter</u> : 470/30 (ECFP)–550/40 (EYFP) <u>Dualband-Strahlenteiler</u> : 475/565; F33-007 Strahlenteiler 460 DCLP; F32-535 Sperrfilter D535/30; F86-004 Dualband-Filter (ECFP/EYFP) <u>CCD-Kamera</u> : C4742–95 <u>Ti:Saphir-Laser (TPM)</u> : Mira 900–F	Zeiss; Oberkochen; Nikon; Düsseldorf PI Physik Instrumente; Karlsruhe Zeiss; Oberkochen Olympus, Tokyo, Japan Nikon; Düsseldorf Chroma; Brattleboro, VT, USA Chroma; Brattleboro, VT, USA Chroma; Brattleboro, VT, USA Hamamatsu; Hamamatsu, Japan Coherent; Santa Clara, CA, USA

3.2 MATERIALIEN

Im Folgenden werden verwendete Reagenzien (Tab. 3.3, S.35) und Reagenzien-Sätze (Tab. 3.4, S.37) aufgelistet. Medien und komplexe Lösungen wurden wie in §3.2.3 beschrieben hergestellt und – soweit nicht anders vermerkt – aliquotiert und autoklaviert. In der Western-Blot-Analyse sowie in der Zytochemie verwendete Primär- und Sekundärantikörper werden in Tab. 3.5 (S.40), abiotische Fluoreszenzmarker in Tab. 3.6 (S.41) aufgeführt. Für die Selektion von Bakterien und Zellen wurden die in der Tab. 3.7 (S.42) beschriebenen Antibiotika eingesetzt. Originalplasmide werden in Tab. 3.8 (S.43), die für die Amplifikation der cDNA eingesetzten Oligonukleotide in Tab. 3.9 (S.44) zusammengefaßt.

3.2.1 Chemikalien und biologische Reagenzien

Tab. 3.3 Verwendete Reagenzien.

Bakterienanzucht, Transformation	Bacto [®] -Trypton, Bacto [®] -Hefeextrakt D-Glucose IPTG, X-Gal RbCl, MnCl ₂ , CaCl ₂ , KAc	Difco; Detroit, USA Merck; Darmstadt Stratagene; Heidelberg Merck; Darmstadt
Antibiotika (Tab. 3.7, S.42)	Amphotericin B Carbenicillin Chloramphenicol Doxycyclin-Hydrochlorid Kanamycin Penicillin/Streptomycin Gentamycin (G418 Sulphat)	Biochrom; Berlin AGS GmbH; Heidelberg AGS GmbH; Heidelberg Sigma-Aldrich; Deisenhofen Sigma-Aldrich; Deisenhofen Biochrom; Berlin Calbiochem
Präparation und Nachweis von Nukleinsäuren	Ethanol, Isopropanol, <i>n</i> -Butanol p.A. NaOH (1 <i>N</i>) Qualex Gold [™] Agarose Ethidiumbromid (1 %, 10 mg/ml) Propidiumjodid (PI)	Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt HYBAID-AGS, Heidelberg Roth; Karlsruhe Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Präparation und Nachweis von Proteinen	Harnstoff β -Mercaptoethanol Ammoniumpersulfat (APS) TEMED Methanol p.A. Eisessig Borsäure EDTA-2 Na · 2 H ₂ O Formamid deionisiert SERVA Blue R Bromphenolblau rotiphorese [®] Gel30 (30 % AA) TRIZMA [®] BASE (Tris) HCl (1 <i>N</i>) SDS Glycin p.a. Glyzerin p.a. (~87 %) Tween [®] 20 Triton [®] X-100 Natriumazid (NaN ₃) Nitrocellulose-Membran (BA85) Ponceau-Rot S NBT/BCIP Dimethylformamid (DMF) BCA-Protein-Assay	Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt Serva; Heidelberg Serva; Heidelberg Riedel-de Haën, Hannover Merck; Darmstadt Fluka; Buchs, Schweiz Roche Diagnostics; Mannheim Fluka; Buchs, Schweiz Serva; Heidelberg Merck; Darmstadt Roth; Karlsruhe Sigma-Aldrich; Deisenhofen Merck; Darmstadt Serva; Heidelberg Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt Serva; Heidelberg Merck; Darmstadt Schleicher & Schuell; Dassel Sigma-Aldrich; Deisenhofen Roth; Karlsruhe Merck; Darmstadt Pierce; Rockford, USA
Längen- und Größenstandards	GeneRuler [™] 100 bp Ladder Plus Prestained Protein Standard	MBI Fermentas Life Technologies; Karlsruhe
Zytochemie	Paraformaldehyd Xylol Mowiol Siliconlösung 3,3'-Diaminobenzidin, Peroxid-Puffer	Fluka; Buchs, Schweiz Merck; Darmstadt Calbiochem; Schwalbach Serva; Heidelberg Roche Diagnostics; Mannheim

Zellkultur, Transfektion	DMEM RPMI 1640 Fötale Kälberserum L-Glutamin (200 mM) Kälberserumalbumin (FraktionV) HEPES 3-[N-morpholino] propansulfonsäure $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 p.a. Dimethylsulfoxid (DMSO) Mowiol 4-88 Kollagen G Trypanblau Atraktolysid Brefeldin A (BFA) Carbonylcyanid- <i>m</i> -chlorophenyl- hydrazon (CCCP) Nigericin FuGENE 6™ Lipofectin LipofectAMINE PLUS™ Reagent Gibco Plus Superfect	Biochrom; Berlin Biochrom; Berlin Biochrom; Berlin Biochrom; Berlin Sigma-Aldrich; Deisenhofen Serva; Heidelberg Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt Merck; Darmstadt Calbiochem; Frankfurt Biochrom; Berlin Biochrom; Berlin Sigma-Aldrich; Deisenhofen Sigma-Aldrich; Deisenhofen Sigma-Aldrich; Deisenhofen Sigma-Aldrich; Deisenhofen Roche Diagnostics; Mannheim Life Technologies; Karlsruhe Life Technologies; Karlsruhe Life Technologies; Karlsruhe Life Technologies; Karlsruhe
Aktivitätsbestimmung, Substrate, Inhibitoren	Brij 35 Z-Arg-Arg-AMC Z-Phe-Arg-AMC Z-Gly-Pro-Arg-AMC Z-Arg-Arg-4MβNA (Z-Arg-Arg) ₂ CV E-64 CA-074	Serva; Heidelberg Bachem; Heidelberg Bachem; Heidelberg Bachem; Heidelberg Bachem; Heidelberg van Noorden; Amsterdam; NL Sigma-Aldrich; Deisenhofen Bachem; Heidelberg
<i>In situ</i>-Hybridisierung	Diethylpyrocarbonat (DEPC, $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) tRNA, Bäckerhefe Triethanolamin Dextransulfat Na-Salz 20× SSC (NaCl/NaCitrat-Lsg.), pH 7,0 Acetanhydrid Blocking reagent (BMB) Ficoll® Typ 400 2 % DMDCS/TCE (Silanisierung) Maleinsäure 1,4-Dithiothreit (DTT)	Sigma-Aldrich; Deisenhofen Roche Diagnostics; Mannheim Fluka; Buchs, Schweiz Fluka; Buchs, Schweiz Roche Diagnostics; Mannheim Sigma-Aldrich; Deisenhofen Roche Diagnostics; Mannheim Sigma-Aldrich; Deisenhofen Sigma-Aldrich; Deisenhofen Fluka; Buchs, Schweiz Sigma-Aldrich; Deisenhofen Roth, Karlsruhe
Enzyme	Restriktionsenzyme T4-DNA-Ligase T4-DNA-Polymerase CIP (<i>calf intestinal phosphatase</i>) T7-RNA-Polymerase (20 U/μl) Sp6-RNA-Polymerase (20 U/μl) Trypsin 250 RNase A (100 μg/ml) DNase I, RNase-frei (Rinderpankreas)	MBI Fermentas; St.Leon-Rot Roche Diagnostics; Mannheim Pharmacia & Upjohn; Erlangen MBI Fermentas; St.Leon-Rot Roche Diagnostics; Mannheim Roche Diagnostics; Mannheim Roche Diagnostics; Mannheim Roche Diagnostics; Mannheim Difco; Detroit, USA Roche Diagnostics; Mannheim Roche Diagnostics; Mannheim

3.2.2 Reagenzien-Sätze (Kits)

Tab. 3.4 Verwendete Kits.

Kitbezeichnung	Methode/Funktion	Hersteller
Advantage [®] cDNA PCR Kit	Amplifikation von cDNA	CLONTECH; Heidelberg
Advantage [®] Genomic PCR Kit	Amplifikation genomischer DNA	CLONTECH; Heidelberg
QIAquick [™] PCR Purification Kit	DNA-Reinigung	QIAGEN; Hilden
QIAquick [™] Gel Extraction Kit	DNA-Reinigung	QIAGEN; Hilden
QIAprep [®] Spin Miniprep, Midiprep Maxiprep Kit	Präparation von Plasmid-DNA	QIAGEN; Hilden
Ready-To-Go [™] T4 DNA Ligase Kit	DNA-Ligation	Pharmacia; Erlangen
Eukaryotic TOPO TA Cloning [®] Kit	Klonierung	Invitrogen; NV Leek, NL
DIG [*] RNA Labeling Kit (SP6/T7)	<i>in vitro</i> -Transkription	Roche Diagnostics; Mannheim
Transfection Reagent Kit	Transfektion	Gibco BRL
Bio-Rad Protein Assay	Proteinbestimmung	BioRad; München
Annexin V-FLUOS Staining Kit	Bestimmung früher Apoptose	Roche Diagnostics; Mannheim
Apoptotic DNA-Ladder Kit	Bestimmung später Apoptose	Roche Diagnostics; Mannheim

3.2.3 Komplexe Lösungen

Molekularbiologie

<u>TE(-RNase A)</u> (pH 8,0)	<u>TE 0.1</u> (pH 8,0)
1,210 g Tris (10 mM)	6,050 g Tris (10 mM)
0,372 g EDTA (1 mM)	0,186 g EDTA (0,1 mM)
ad 1 l RNase A (optional; 100 µg ml ⁻¹)	ad 5 l H ₂ O
ad 1 l H ₂ O	
<u>10× TBE</u> (pH 8,3)	<u>Auftragspuffer</u> (pH 7,0)
108,000 g Tris (0,89 M)	2,400 g Harnstoff (4 M)
55,000 g Borsäure (0,89 M)	5,000 g Saccharose (50 % w/v)
9,300 g EDTA-2 Na • 2 H ₂ O (25 mM)	0,186 g EDTA (50 mM)
ad 1 l H ₂ O	0,010 g Bromphenolblau (0,1 % w/v)
	ad 10 ml H ₂ O

Proteinexpression

<u>Expressionspuffer B</u> (pH 8,0)	<u>Expressionspuffer C</u> (pH 6,3)
240,240 g Harnstoff (8 M)	240,240 g Harnstoff (8 M)
6,900 g NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O (0,1 M)	6,900 g NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O (0,1 M)
5 ml 1 M Tris-Stammlösung (0,01 M)	5 ml 1 M Tris-Stammlösung (0,01 M)
ad 500 ml H ₂ O	ad 500 ml H ₂ O

* Digoxigenin, ein Steroid pflanzlichen Ursprungs aus der Gattung *Digitalis* (Fingerhut).

MikrobiologieTransformationspuffer A (pH 8,0 exakt!)

0,740 g	CaCl ₂ • 2 H ₂ O (50 mM)
0,120 g	Tris (10 mM)
ad 100 ml	H ₂ O

sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern

Transformationspuffer B

1,470 g	CaCl ₂ • 2 H ₂ O (100 mM)
0,120 g	Tris (10 mM)
ad 100 ml	H ₂ O

sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern; vor Gebrauch 85 ml der Lösung mit 15 ml Glycerin versetzen

2× LB-Medium (pH 7,5)

20,000 g	Bacto [®] -Trypton (2 % w/v)
10,000 g	Bacto [®] -Hefeextrakt (1 % w/v)
20,000 g	NaCl
4,000 g	MgSO ₄ • 7 H ₂ O
2,400 g	Tris (20 mM)
ad 1 l	H ₂ O

für Agarplatten 1,5 % w/v (15 g l⁻¹) Agar Agar und evtl. Antibiotika zu 1× LB-Medium hinzufügenSOB-Medium (pH 7,5)

20,000 g	Bacto [®] -Trypton (2 % w/v)
5,000 g	Bacto [®] -Hefeextrakt (0,5 % w/v)
10 ml	1 M NaCl-Stammlsg. (10 mM)
2,5 ml	1 M KCl-Stammlsg. (2,5 mM)
ad 1 l	H ₂ O

autoklavieren und vor Gebrauch Mg²⁺ zugeben:

1 ml	2 M Mg ²⁺ -Stammlsg. (20 mM)
ad 100 ml	SOB-Medium; sterilfiltrieren

3 % Agar-Medium

7,500 g	Bacto [®] -Agar
ad 250 ml	H ₂ O

SOC-Medium

1 ml	2 M Glucose-Stammlsg. (20 mM)
ad 100 ml	SOB-Medium

SDS-PAGEStammlsg. I (Acrylamidlösung; ROTH Gel30)

30,000 g	Acrylamid (30 % w/v)
0,800 g	N,N'-Methylenbisacrylamid (0,8 % w/v)
ad 100 ml	H ₂ O

1× Laemmli-Probenpuffer (pH 6,8)

0,760 g	Tris (63 mM)
2,000 g	SDS (2 %)
10,000 g	Glycerin (10 % ± 8 ml)
0,005 g	Bromphenolblau (0,005 %)
ad 100 ml	H ₂ O

Stammlsg. II (Trennpuffer) (pH 8,8)

45,500 g	Tris (750 mM)
1,000 g	SDS
ad 500 ml	H ₂ O

Färbelösung:

500 ml	H ₂ O
500 ml	Methanol
1,000 g	Coomassie Brillant Blau G250

Stammlsg. III (Sammelpuffer) (pH 6,8)

3,080 g	Tris (254 mM)
0,200 g	SDS
ad 100 ml	H ₂ O

Entfärbelösung:

500 ml	H ₂ O
500 ml	Methanol
100 ml	Eisessig

Stammlsg. IV (4× Laufpuffer) (pH 8,3)

24,200 g	Tris (100 mM)
115,400 g	Glycin
8,000 g	SDS (0,4 % w/v)
ad 2 l	H ₂ O

Aufbewahrungslösung:

900 ml	H ₂ O
75 ml	Methanol
50 ml	Eisessig

vor Gebrauch 400 ml Stammlsg. IV + 1,2 l H₂O

Zellkultur

Hanks' Balanced Salt Solution (pH 6,95 exakt!)

50 mM Hepes
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄

Schwellpuffer (pH 7,0)

10 mM KCl
1,5 mM MgCl₂

Glc-K⁺-Na⁺-Phosphatpuffer (GKN) (pH 7,2)

8,000 g NaCl
0,300 g KCl
0,073 g Na₂HPO₄
0,020 g KH₂PO₄
2,000 g D-Glucose
ad 1 l H₂O

Kollagenmatrix

80 % (v/v) Kollagen G
(90 % Typ I, 10 % Typ III)
10 % (v/v) NaCl (7,5 %)
10 % (v/v) NaOH (0,2 N)
/ Hepes (200 mM), pH 12,0

Lösungen sterilfiltrieren und vor Gebrauch mischen

RPMI-Vollmedium

Fötales Kälberserum (10 % v/v)
L-Glutamin (4 mM)
ad 250 ml RPMI 1640 Kulturmedium

bei +4 °C ~2 Wo lagerungsfähig

Trypsin-EDTA-Puffer (TED) (pH 6,8)

1,400 g Trypsin
0,700 g EDTA-2 Na
ad 1 l 1× GKN

sterilfiltrieren, 6–8 Wo. bei +4 °C haltbar

Aktivitätsbestimmung

Substrat-Stammlösungen

je 10 mM Z-Arg-Arg-AMC in DMSO
Z-Phe-Arg-AMC in H₂O
Z-Gly-Pro-Arg-AMC
in 50 % EtOH, 0,1 % DMSO

bei +4 °C aufbewahren

Inhibitor-Stammlösungen

10 mM CA-074 bzw. E-64 in DMSO
vor Gebrauch 1:50 in H₂O verdünnen
in 0,1 % v/v Brij 35/H₂O bei +4 °C aufbewahren

Z-Arg-Arg-4MβNA

4× Reaktionspuffer (pH 6,2)

400 mM NH₄-Acetat
0,4 mM EDTA-2 Na
0,5 mM β-Mercaptoethanol

Z-Arg-Arg-AMC

Reaktionspuffer (pH 6,0)

12 mM Na₂HPO₄
88 mM KH₂PO₄
1,33 mM EDTA-2 Na

vor Gebrauch 2,7 mM L-Cystein zugeben

Homogenisierungspuffer (pH 5,0)

50 mM Na-Acetat
100 mM NaCl
4 mM EDTA-2 Na
0,1 % v/v Triton X-100

Western-Blot

Waschpuffer

0,9 ml Tween 20
ad 1 l 1× PBS/NaN₃

AP-Waschpuffer (pH 9,6)

10 ml 1 M Tris-HCl (10 mM)
30 ml 5 M NaCl (150 mM)
ad 1 l H₂O

Transferpuffer (pH 8,3–8,4)
 43,500 g Glycin
 9,000 g Tris
 ad 2,9 ml H₂O
 725 ml Methanol p.A. (20 % v/v)

Ponceau-Rot S-Färbelösung
 0,500 g Ponceau S (0,5 % w/v)
 1 ml Eisessig
 Ponceau S in Eisessig lösen
 ad 100 ml H₂O

Blockierungslösung
 25,000 g BSA (5 % w/v)
 0,45 ml Tween 20 (0,1 % v/v)
 50,000 mg NaN₃ (0,01 % w/v)
 ad 500 ml 1× PBS

AK-Inkubationslösung
 15,000 g BSA (3 % w/v)
 0,45 ml Tween 20 (0,1 % v/v)
 0,050 g NaN₃ (0,01 % w/v)
 ad 500 ml 1× PBS

AP-Puffer (pH 9,6)
 100 ml 1 M Tris-HCl (100 mM)
 20 ml 5 M NaCl (100 mM)
 5 ml 1 M MgCl₂ · 6 H₂O
 ad 1 l H₂O

Substrat-Lösung
 9 ml AP-Puffer
 1 ml NBT-Lsg. (5 mg ml⁻¹ DMF)
 100 µl BCIP-Lsg. (1 mg ml⁻¹ AP-Puffer)
 frisch Ansetzen und im Dunkeln aufbewahren

3.2.4 Antikörper und abiotische Fluoreszenzmarker

Tab. 3.5 Antikörper (AK) für Western-Blot (WB) und Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM). Die CB-Primärantikörper richten sich gegen humanes Protein, die Sekundärantikörper wurden zur Detektion der Primärantikörper verwendet. HC: *heavy chain*; LC: *light chain*.

AK-Bezeichnung Antigen	Wirt	1. AK	2. AK	Sonde	Verdünnung (WB / IFM)		Referenz/ Bezugsquelle
α-CB	Schaf	×		–	1:250 1:1000	1:50	BioAss, Herrsching
α-Pro-CB	Kan.	×		–	–	1:50	Dianova, Hamburg
α-GFP-IgG (polyklonal)	Kan	×		–	1:2000	–	Clontech, Heidelb.
α-GFP-IgG2a (monoklonal)	Maus	×		–	1:2000	–	Quantum Biotech.
α-Schaf-IgG (HC+LC)	Kan.		×	AP	10 ⁻⁴	–	Dianova, Hamburg
α-Schaf-IgG (HC+LC)	Esel		×	DTAF	–	1:50	Dianova, Hamburg
α-Schaf-IgG (HC+LC)	Esel		×	Cy3	–	1:200	Dianova, Hamburg
α-Maus-IgG (HC+LC)	Esel		×	AP	10 ⁻⁴	–	Dianova, Hamburg
α-Kaninchen-IgG (HC+LC)	Esel		×	AP	10 ⁻⁴	–	Dianova, Hamburg
α-Kaninchen-IgG (HC+LC)	Ziege		×	Peroxidase	1:5000	–	Biorad, München
α-Kaninchen-IgG (HC+LC)	Ziege		×	Cy2	–	1:50	Biotrend, Köln
α-Kaninchen-IgG (HC+LC)	Ziege		×	Liss.-Rhod.	–	1:100	Dianova, Hamburg
α-Kaninchen-IgG (HC+LC)	Ziege		×	Cy3	–	1:200	Dianova, Hamburg
α-Huhn-IgY (IgG) (HC+LC)	Kan.		×	AP	1:5000	–	Dianova, Hamburg
α-Maus-IgG (HC+LC)	Esel		×	Cy2	–	1:50	Biotrend, Köln
α-myc	Maus	×		–	–	1:1	J. Uhlmann, DKFZ
α-Maus-IgG	Esel		×	Texas Red	–	1:200	J. Uhlmann, DKFZ

Tab. 3.6 Abiotische Fluoreszenzmarker und ihre spektralen Charakteristiken

Fluorochrom	Absorption (nm)	Emission* (nm)	Quelle†	Spezifität / Verwendung
Acridin Orange	— ‡	— ‡	Se (10665)	Nukleinsäuren
Alexa Fluor 488	491	515 ¹	MP (A-11001)	AK-Konjugate
Alexa Fluor 546	553	569 ¹	MP (A-11003)	AK-Konjugate
Alexa Fluor 594	594	610 ¹	MP (A-10239)	AK-Konjugate
Aminomethylcoumarin (AMC) Methylcoumarin	346 359	443 ² 447 ²	Ba (I-1050)	reaktive Fluchtgruppe (<i>leaving group</i>) / AK-Konjugate
BODIPY FL [§]	505	511 ¹	MP (D-3521)	divers, z.B. AK-Konjugate
BODIPY TR [§]	589	617 ¹	MP (D-7540)	divers, z.B. AK-Konjugate
Cy2-IgG	489	506 ¹	Ro	AK-Konjugate
Cy3-IgG	558	583 ¹	Di	AK-Konjugate
DAPI	358	461 ²	Si (D-9542)	Nukleinsäuren
ER-Tracker blue/white	374	575 ¹	MP (E-12353)	Endoplasmatisches Retikulum
F-DTAF-IgG	492	520 ¹	Di	AK-Konjugate
FITC-IgG	490/495	525/519 ²	Di	AK-Konjugate
H ₂ DCFDA [§]	500	530 ¹	MP (D-399)	divers, z.B. Zellorganell-Marker
Hoechst 33342	352	461 ²	Fl	Nukleinsäuren
Lissamin Rhodamin-IgG	575/570	595/590 ²	Di	AK-Konjugate
LysoTracker Red	577	590 ¹	MP (L-7528)	Lysosomen, saure Kompartimente
LysoTracker Yellow	534	551 ¹	MP (L-7527)	Lysosomen, saure Kompartimente
MitoTracker Red CMX	579	599 ¹	MP (M-7513)	Mitochondrien
Phen-Green FL	492	517 ¹	MP (P-6763)	Schwermetallindikator
Propidiumjodid	536	617 ²	Si (P-4170)	Nukleinsäuren
Quinacrin	423	503 ²	Si (Q-3251)	Nukleinsäuren, saure Kompartimente
RedX-IgG	575	600 ¹	Di	AK-Konjugate
Rhodamin 123	507	529–534 ¹	MP (R-302)	divers, z.B. AK-Konjugate
SNARF-1	515/575	575/650 ¹	MP (S-3057)	physiologischer pH-Indikator
Texas Red-IgG	596/589	615/615 ¹	Di	AK-Konjugate
Texas Red-Phalloidin	577	620 ¹	MP (T-7471)	AK-Konjugate

* Daten von: ¹ Lieferant; ² "Current Protocols in Cell Biology"; ³ <http://facs.scripps.edu/spectra>

† **Ba**: Bachem, Heidelberg; **Di**: Dianova, Hamburg; **Fl**: Fluka, Buchs, Schweiz;

MP: Molecular Probes, Eugene, OR, USA; **Ro**: Rockland, Gilbertville, USA; **Se**: Serva, Heidelberg;

Si: Sigma-Aldrich, Deisenhofen

‡ pures Acridin Orange hat ausgedehnte Excitations- und Emissionsspektren

§ DMSO als Lösungsmittel

3.2.5 Antibiotika

Tab. 3.7 **Verwendete Antibiotika.** In H₂O bzw. HEPES angesetzte Stammlösungen wurden sterilfiltriert. Plasmide mit Antibiotika-Resistenzen werden in Tab. 3.8 (S.43) aufgelistet.

Antibiotikum	Lagerung	Stockkonz. (mg ml ⁻¹)	Endkonz. (µg ml ⁻¹)
Kanamycin	+4 °C / H ₂ O	25	25 (1:1000)
Tetracyclin	-20 °C / 50 % EtOH/H ₂ O	12,5	12,5 (1:1000)
Carbenicillin	-20 °C / 50 % EtOH/H ₂ O	50	50 (1:1000)
Chloramphenicol	-20 °C / MetOH v EtOH	30	30 (1:1000)
Amphotericin B	-20 °C	250	250 (1:1000)
Gentamycin (G418) 662 µg mg ⁻¹	-20 °C / 100 mM HEPES pH 7,3	80	800 (1:100) Selektion 400 (1:200) Supression

3.2.6 Plasmide und Vektoren

Bakterielle Plasmide sind autoreplizierende, zirkulär geschlossene, extrachromosomale DNA-Moleküle. Vektoren sind von natürlich vorkommenden Plasmiden abgeleitet und sind in der Lage, Fremd-DNA als Insert aufzunehmen und in einen Wirtsorganismus zu übertragen.

Für die Produktion rekombinanter Proteine in Zellen wurde standardmäßig der Mammalia-Expressionsvektor pcDNA3 (Stratagene; Abb. 3.1) verwendet. In dieser Arbeit verwendete DNA-Konstrukte sind von den in Tab. 3.8 (S.43) aufgeführten Plasmiden und Vektoren abgeleitet.

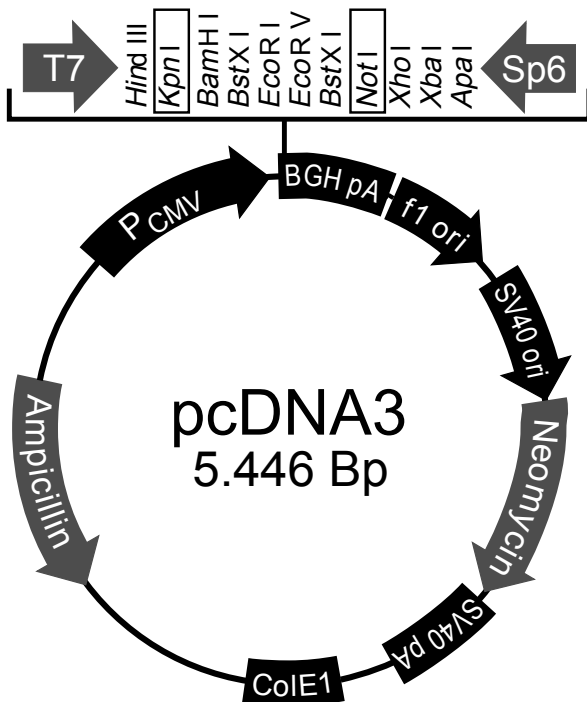


Abb. 3.1 **Der pcDNA3-Vektor.** Das Phagmid pcDNA3[®] von Stratagene[®] wurde als genereller Klonierungs-, Sequenzier- und Expressionsvektor für die chimären DNA-Konstrukte sowie als Transkriptionsvektor verwendet. Die cDNA wurde meist über die *KpnI/NotI*-Schnittstellen in den Polylinker (*multiple cloning site*, MCS) kloniert (§3.4.9). Dieser wird von zwei viralen RNA-Polymerase-Promotoren (T7 und Sp6) flankiert, die eine strangspezifische *in vitro*-Amplifizierung des Inserts in Form markierter RNA-Sonden („Riboprobe“) ermöglichen (§3.4.11). Universalprimer gegen die beiden Promotoren wurden verwendet, um die Inserts mittels Sequenzierung zu überprüfen (§3.4.12). Die Translation der Klonierungskassette befindet sich unter dem Einfluß eines unmittelbar frühen CMV-Promotors (P_{CMV}). Ampicillin- und Neomycin-Resistenzmarker ermöglichen pro- sowie eukaryotische Selektion (§3.4.8).

Tab. 3.8 Plasmide und Vektoren. Aufgeführt sind kommerziell erhältliche Originalplasmide, hiervon abgeleitete Vektoren mit organellspezifischen Fluoreszenz-Markern sowie extern hergestellte DNA-Konstrukte. Als Selektionsmarker dienen Resistenzgene gegen Ampicillin (Ap^R), Neomycin (Neo^R) und Kanamycin (Kan^R).

Vektor	Marker	Herkunft	Bemerkung
pT7T3D-Pac[CB]	Ap ^R	Pharmacia	komplette CDS des hCB (§3.4.9)
pBS [®] S/K(+)[EGFP]	Ap ^R , lacZ	Stratagene [®]	urspr. Klonierungsvektor mit EGFP
pcDNA3 (3.1)	Ap ^R , Neo ^R	Stratagene [®]	Expressionsvektor, <i>in vitro</i> -Transkription
pcDNA3.1/V5/His-TOPO	Ap ^R , Neo ^R	Invitrogen	TOPO-Klonierungsstelle
pEGFP-1	Kan ^R , Neo ^R	Clontech	promotorloser EGFP-Vektor
pQBI50f	Ap ^R , Neo ^R	Quantum Biotech.	sgBFP
pcDNA3-EBFP pcDNA3-EGFP	Ap ^R , Neo ^R	eigene Klonierung	eukaryotische Expression von Fluoreszenzprotein-Chimären (CMV-Promotor)
pSVHIII-ECFP pSVHIII-EYFP	Kan ^R , Neo ^R	Knoch [‡]	eukaryotische Expression von Fluoreszenzprotein-Chimären (SV40-Promotor)
pDsRed1-N1	Kan ^R , Neo ^R	Clontech	DsRed
pSVHIII-H2A.1-EGFP/ EYFP/ ECFP/ DsRed	Kan ^R , Neo ^R	Knoch [‡]	Histon hH2A.1 (Acc# X83549); Kernlokalisierungssignal
pEGFP-TIFIA	Kan ^R , Neo ^R	Dobrova [§]	Transkriptionsinitiationsfaktor I, TIFIA-EGFP; Kernlokalisierung, Nukleolen
pEGFP-Δ ⁵¹ CB	Kan ^R , Neo ^R	Müntener ^{**}	alternative Spleißvariante von CB (Δ ⁵¹ CB); enthält mitochondriales Lokalisierungssignal
pECFP-Mem	Kan ^R , Neo ^R	Clontech	Membran-Lokalisierungssignal (Neuromodulin)
pEGFP-Tub	Kan ^R , Neo ^R	Clontech	Tubulin-Lokalisierungssignal (α-Tubulin)
pECFP-Mito pEYFP-Mito pDsRed-Mito*	Kan ^R , Neo ^R	Clontech Kietzmann*	mitochondriales Lokalisierungssignal (Zytochrom C Oxidase-Untereinheit VIII); pDsRed-Mito aus pECFP-Mito
pCMV/myc/ER pCMV/myc/ER/GFP	Ap ^R , Neo ^R	Invitrogen	ER-Lokalisierungssignal; myc-AK-Epitop; GFP als ER-Marker
pEF/myc/ER pEF/EYFP/myc/ER	Ap ^R , Neo ^R	Invitrogen Rietdorf [†]	ER-Lokalisierungssignal; myc-AK-Epitop; EYFP aus pEYFP-N1 (Clontech)
pECFP-ER pDsRed-ER	Kan ^R , Neo ^R	Clontech Kietzmann*	ER-Lokalisierungssignal (Calreticulin); pDsRed-ER aus pECFP-ER
pECFP-Golgi pDsRed-Golgi*	Kan ^R , Neo ^R	Clontech Kietzmann*	(transmediales) Golgi-Lokalisierungssignal (h-β-1,4-Galactosyltransferase); pDsRed-Golgi aus pECFP-Golgi

* Thomas Kietzmann, Universität Göttingen. † Jens Rietdorf, EMBL, Heidelberg. ‡ Tobias A. Knoch, DKFZ. § Gergana Dobrova, DKFZ. ** Kathrin Müntener, Universität Zürich, Schweiz

3.2.7 Oligonukleotide

Tab. 3.9 Oligonukleotide (Primer). Neben Orientierung (vorwärts, fd; rückwärts, rv) und Oligonukleotidlänge (N) sind die eingeführten Restriktions-Schnittstellen, die Sequenzabfolge in 5'→3' Orientierung sowie der Hersteller (Pharmacia Biotech, Freiburg; Wolfgang Weinig, DKFZ) aufgeführt. Erkennungssequenzen der Restriktions-Schnittstellen werden von Schrägstrichen flankiert, die eigentliche Schnittstelle ist durch ein Einschaltungszeichen (^) hervorgehoben. Start- (ATg), Stop-Codons (TAA) sowie Mutationen (Konversionen; Punktdeletionen, °; Sequenzdeletionen, Δ) sind durch Fettschrift hervorgehoben. Ein oder zwei Guanine wurden den Sequenzen vorangestellt um die Effizienz des Restriktionsverdau zu erhöhen.

Bezeichnung	« »	N	Restr.	Oligonukleotidsequenz	
CB(PRE)	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg TggCAgCTCTgggCCTCCC	‡‡
CB(PREPRO)	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/CTTCAggTCCTCggTAAACATA	‡‡
CB(PREPRO) [†]	fd	30	<i>NheI</i>	gg/g^CTAgC/ ATg TggCAgCTCTgggCCTCCC	§§
CB(PREPRO) [†]	rv	30	<i>AgeI</i>	gg/A^CCggT/gCCTTCAggTCCTCggTAAACA	§§
CB(PRE)	fd	30	<i>SacII</i>	gg/CCgC^gg/ ATg TggCAgCTCTgggCCTCCC	§§
CB(SC)	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg CTgCCTgCAAgCTTCgATg	‡‡
CB(<i>myc</i> -SC)	fd	65	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg gAgCAgAAgCTgATCTCCg AggAggACCTgCTgCCTgCAAgCTTCgATgCACgg	§§
CB(SC)	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/ATCggTgCgTggAATTCCAgCC	‡‡
CB(SC-STOP)	rv	33	<i>NotI</i>	g/gC^ggCCgC/ TTA ATCggTgCgTggAATTCCAgC	§§
CB([ΔC ^{PRO}]SC)	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/gATCTTTTCCCgTACTgATCg	‡‡
CB(LC)	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/ATTggTgTggATgCAgATgCgg	‡‡
CB(HC)	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg gTCAgCgTggAgCTgTCgg	‡‡
CB(HC _N)	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/ATTgTATCCgTAgTgCTTgTCC	§§
CB(HC _C)	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg AATTCCTACAgCgTCTCCA	§§
CB(HC _{C1})	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg gAgATCTACAAAAACggCC	§§
CB(HC _{C2})	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg gTgTATTcggACTTCCTgC	§§
CB(HC _{C3})	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg CAACACgTCACCggAgAgA	§§
CB(HC _{C4})	fd	30	<i>KpnI</i>	gg/ggTAC^C/ ATg CgCATCCTgggCTggggAg	§§
CB([E ²⁷³ L]SC) [*]	fd	35	–	CCAACACgTCACCggA CTg ATgATgggTggCCATg	§§
CB([E ²⁷³ L]SC) [*]	rv	35	–	CATggCCACCCATCAT CAg TCCggTgACgTgTTgg	§§
CB([ΔE ²⁷³]SC) ^{*‡}	fd	35	–	ACCAACACgTCACCggA °ATgATgggTggCCATgCC	§§
CB([ΔE ²⁷³]SC) ^{*‡}	rv	35	–	ggCATggCCACCCATCAT °TCCggTgACgTgTTggT	§§
CB([ΔQ ²⁶⁸ -G ²⁷⁷]SC) [*]	fd	36	–	TACAAgTCAggAgTgTAC Δ ATgCCATCCgCATCCTg	§§
CB([ΔQ ²⁶⁸ -G ²⁷⁷]SC) [*]	rv	36	–	CAggATgCggATggCATg Δ gTACACTCCTgACTTgTA	§§
CB([ΔL ⁸⁰ -L ²⁸³]SC) ^{*§}	rv	30	<i>Sall</i>	gg/g^TCgAC/CAggATgCggATggCATggCCA	§§
avGFP-Varianten	fd	30	<i>KpnI</i>	g/ggTAC^C/ ATg gTgAgCAAgggCgAggAgCT	§§
avGFP-Varianten	rv	30	<i>KpnI</i>	g/ggTAC^C/CTTgTACAgCTCgTCCATgCCgA	§§
avGFP-Varianten	rv	30	<i>NotI</i>	g/gC^ggCCgC/ TTA CTTgTACAgCTCgTCCAT	‡‡
H2A	fd		<i>EcoRI</i>	CgAATTCTg/ ATg TCgggACgCggCAAg	§§
GFP-3.9 ^{**}	fd	25	–	ATCTCATgCTggAgTTCTTCgCCCA	§§
1.9-4.0 ^{††}	rv	25	–	gACAAACCACAActAgAATgCAgTg	§§

* Für Aminosäurepositionen gilt die CB(FLM)-Nomenklatur. † CB-Präpro-Primer für die Golgi-Adressierung von StB (THIELE *et al.* 1988). ‡ Basenabfolge GAG bzw. CTG deletiert. § Konstrukt CB([ΔL⁸⁰-L²⁸³]SC). ** Basenposition: 3928. †† Basen 1924-4033. ‡‡ Quelle: Pharmacia. §§ Quelle: DKFZ.

3.3 MIKROBIOLOGISCHE TECHNIKEN

3.3.1 Bakterienstämme und Anzucht

Bakterienstämme. Als Rezipienten für die Plasmid-DNA während der Transformation wurden die in Tab. 3.10 aufgeführten *E. coli*-Stämme verwendet.

Tab. 3.10 *E. coli*-Stämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft	Bemerkung
XL1-Blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac[F' proAB, lacI^qZM15, Tn 10(<i>tet</i>^r)]</i>	Stratagene [®] ; Heidelberg	kompetente Zellen; blau-weiß-Selekt.
HB101	<i>F⁻, leuB6, proA2, recA13, thi-1, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20, supE44, hsdS20</i>	ATCC#33694	kompetente Zellen
HB103	<i>F⁻, leuB6, proA2, recA13, thi-1, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, rpsL20, supE44, hsdS20</i>	ATCC#3694	kompetente Zellen

Anzucht. Die Kultivierung von *E. coli* für Transformation (§3.3.2) und Plasmidpräparation (§3.4.3) erfolgte in LB-, SOC-Flüssigkulturmedium oder auf Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika (§3.2.5).

Für eine Vorkultur wurden 3–5 ml Medium mit einer Einzelkolonie eines Ausstrichs angeimpft und ü.N. bei +37 °C unter Schütteln (~175 UpM) inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur pelletiert (Miniprep) oder zur Gewinnung einer größeren Bakterienmenge (Midiprep, Maxiprep) zum Animpfen von 50–200 ml Flüssigmedium mit $1/100$ – $1/1000$ Vol der Übernachtskultur verwendet und erneut wie oben beschrieben ü.N. inkubiert. Bei Erreichen der gewünschten Bakteriendichte (für Plasmidpräparation am folgenden Tag) wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 6 kUpM abzentrifugiert und das Pellet weiterverarbeitet oder bei –20 °C zwischengelagert.

Lagerung. Einzelklon-Kolonien von *E. coli* lassen sich bei +4 °C monatelang auf Agarplatten lagern. Für längere Aufbewahrung wurden Glycerinkulturen angelegt; dazu wurden 2 ml 1× Gefriermedium (LB/Glycerin, Endkonz. 15 % v/v) mit einer Bakterienkolonie angeimpft, im +37 °C–Schüttler ü.N. inkubiert und am folgenden Tag bei –70 °C eingefroren und gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Bakteriensuspensionen. Bakterienkonzentrationen von Flüssigkulturen wurden analog zur Absorptionsmessung der DNA (§3.4.2) photometrisch ermittelt, indem die optische Dichte (OD) bei 550–600 nm gemessen wurde. Dabei gilt in Abhängigkeit von der verwendeten Kultur folgender empirischer Zusammenhang:

- $1 OD_{600} \cong 5 \times 10^8 Z$

3.3.2 Transformation kompetenter Zellen

Die Transformation dient dem dauerhaften Einbringen von Fremd-DNA in einen aufnahmebereiten prokaryotischen Wirtsorganismus. Zur Transformation befähigte kompetente Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode (DAGERT & EHRLICH 1979) gewonnen und mit einer modifizierten Methode nach HANAHAH (1983) transformiert.

Gewinnung kompetenter Zellen. 100 ml 1× LB-Medium wurden mit 1 ml einer *E. coli* HB103-Vorkultur angeimpft und bei +37 °C nach 1–2 h bis zu einer OD₅₅₀ von ~0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 20 min auf Eis gekühlt und in einer Kühlzentrifuge (+4 °C) 5 min bei 2 kUpM in Zentrifugen-Röhrchen (Falcon) pelletiert. Das Bakteriensediment wurde auf Eis vorsichtig in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer A resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis und einem erneuten Zentrifugationsschritt (5 min; 2 kUpM; +4 °C) wurde das Pellet mit 2,8 ml eiskaltem Transformationspuffer B (15 % Glycerin) versetzt und resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde zu 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70 °C bis zu ihrer Verwendung in der Transformation aufbewahrt.

Transformation. Tiefgefrorene kompetente *E. coli*-Glycerinkulturen wurden 10 min auf Eis aufgetaut, mit maximal 10 µl eines Ligationsansatzes ($\hat{=}$ ~0,05 µg Plasmid-DNA) vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden einem 90 s langem Hitzeschock bei +42 °C ausgesetzt und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurde die Bakteriensuspension 30 min bei +37 °C und 130 UpM geschüttelt. Bei der anschließenden blau/weiß-Selektion wurden optional je 200 µl Transformationsansatz 50 µl IPTG (0,1 M in H₂O; –20 °C) und 50 µl X-Gal (2 % w/v in DMSO; –20 °C) zupipettiert, auf LB_{Carb}-Platten ausplattiert, unter der Sterilbank getrocknet und ü.N. bei +37 °C inkubiert.

3.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Eine ausführliche Beschreibung grundlegender molekularbiologischer Methoden findet man bei MANIATIS *et al.* (1989). Die Herstellung von rekombinanten DNA-Konstrukten wird als Klonierung bezeichnet und umfaßt im Allgemeinen folgende Schritte:

1. Primerdesign und Templatevorbereitung für die PCR (Linearisierung, §3.4.6; Reinigung, §3.4.5; Konzentrationsbestimmung, §3.4.2)
2. PCR-Amplifikation (§3.4.1); Überprüfen des PCR-Produktes auf einem Agarosegel (§3.4.4); Säulenreinigung der PCR-Produkte (§3.4.5)
3. Enzymatische Behandlung von Template und Insert (Restriktionsverdau, Kinasierung, 3'-Exonuklease-Verdau; §3.4.6); Präparatives Agarosegel (§3.4.4) und Fragmentreinigung (§3.4.5); Konzentrationsbestimmung (§3.4.2)
4. Ligation (§3.4.6) und Transformation (§3.3.2); Selektion rekombinanter Klone (§3.4.8); Amplifikation und Präparation der Plasmid-DNA (§3.4.3)

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR; MULLIS *et al.* 1986) erlaubt die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mittels sequenzspezifischer Oligonukleotid-Primer. Diese beruht auf der zyklischen Wiederholung folgender Schritte: (i) Denaturierung der dsDNA in Einzelstränge, (ii) Primer-Hybridisierung und (iii) DNA-Synthese.

Für die PCR wurden je nach Anwendung (Amplifikation genomischer oder Plasmid-DNA) verschiedene PCR-Kits (Tab. 3.4, S.37) verwendet; die PCR-Ansätze wurden nach dem jeweiligen Standardprotokoll pipettiert und mit UV-bestrahltem Mineralöl überschichtet. Als Matrize (Template) wurden 200 ng Plasmid- (§3.2.6) oder genomische DNA verwendet; Starter-Oligonukleotide (Sequenzprimer; §3.2.7) wurden 10 μM eingesetzt. Das Thermocyclerprogramm bestand aus folgenden Schritten, deren Parameter für die jeweilige Reaktion optimiert wurden:

- 1 min Denaturierung bei +94 °C
- 25–35 Zyklen:
 - 30 s Denaturierung bei +94 °C
 - 3 min Hybridisierung und DNA-Synthese bei +68 °C
- 3 min Endsynthese bei +68 °C (Reduzierung des Hintergrundsignals)

Die Amplifikations-Produkte wurden gereinigt (§3.4.5) bzw. elektrophoretisch getrennt (§3.4.4), wobei $\frac{1}{10}$ Vol des Reaktionsansatzes für ein analytisches Gel und der gesamte Ansatz für ein präparatives Gel aufgetragen wurden. Schließlich ist die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt worden (siehe unten).

3.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Abschätzen aus dem Agarosegel. Nukleinsäure-Konzentrationen lassen sich über einen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten einzelner Banden (andere Fragmente oder ein Längenstandard bekannter Konzentration, Tab. 3.3, S.35) aus dem Agarosegel (§3.4.4) abschätzen. Die Detektion erfolgt unter UV-Licht unter Verwendung des interkalierenden DNA-Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid. Dabei wird ein proportionaler Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Fragmentgröße postuliert. Die Masse eines Markerfragments ($m_{\text{Fragment}}/\mu\text{g}$) erhält man, wenn man die Fragmentgröße (l_{Fragment}/N) auf die Gesamtgröße des Standards (l_{gesamt}/N) bezieht und mit der aufgetragenen Gesamtmasse ($m_{\text{gesamt}}/\mu\text{g}$) multipliziert (Gleichung (1)).

$$(1) \quad m_{\text{Fragment}} = \frac{l_{\text{Fragment}}}{l_{\text{gesamt}}} \times m_{\text{gesamt}}$$

Photometrisch. Ermittelt man in einer Quarzküvette photometrisch die Absorption einer wäßrigen Nukleinsäurelösung bei 260 nm (OD_{260}), so läßt sich deren molare Konzentration C_n nach der folgenden empirischen Formel bestimmen:

$$(2) \quad C_n [\text{pmol } \mu\text{d}^{-1}] = \frac{OD_{260} \times 90}{x}$$

Dabei stellt x die DNA-Länge in Basen ($1 \text{ Bp} \hat{=} 660 \text{ D}$; $1 \text{ D} \hat{=} 1,66 \times 10^{-24} \text{ g}$) dar. Die Massenkonzentration C_m läßt sich analog hierzu folgendermaßen berechnen:

$$(3) \quad C_m [\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}] = OD_{260} \times f_{\text{Verd.}}$$

wobei $f_{\text{Verd.}}$ den Verdünnungsfaktor darstellt. Für die Kalkulationen wurden vereinfacht folgende Richtwerte angenommen:

- $1 OD_{260} \hat{=} 0,025 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ für einzelsträngige Oligonukleotide
- $1 OD_{260} \hat{=} 0,040 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ für ssRNA
- $1 OD_{260} \hat{=} 0,050 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ für dsDNA (Plasmide, linearisierte Fragmente)

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} (λ_{260} und λ_{280} : Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren bzw. von Proteinen) stellt dabei ein Maß für die Reinheit der DNA dar und sollte $2,0 \pm 0,2$ betragen.

3.4.3 Präparation von Nukleinsäuren

Plasmidpräparation. Die prokaryotische Plasmidisolierung für analytische (Miniprep) sowie präparative Zwecke (Midi-, Maxiprep) wurde mittels der QIAprep[®] Spin Kits (Tab. 3.4, S.37) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine modifizierte Prozedur der Plasmid-Schnellisolierung nach dem Prinzip der „Alkalischen Lyse“ (BIRNBOIM & DOLY 1979) in Kombination mit selektiver Bindung der Nukleinsäuren an ein Anionen-Austauscherharz. Während Proteine sowie hauptsächlich chromosomale DNA alkalisch denaturiert werden (SDS/NaOH), bleibt die kovalent geschlossene Plasmid-DNA im Gegensatz zur genomischen DNA aufgrund ihrer geringen Größe als Doppelstrang in Lösung und kann bei Neutralisierung (KAc) schneller renaturieren. Durch anschließende Zentrifugation wird der plasmidhaltige Überstand von den präzipitierten Zellbestandteilen abgetrennt und dann mit Ethanol oder Isopropanol gefällt.

Für die Plasmidpräparation wurden 5 ml (Miniprep) oder je nach Kopienzahl des verwendeten Vektors 25–100 ml (Midi-, Maxiprep) einer *E. coli*-Übernachtskultur eingesetzt. Die Ausbeute betrug ~20–300 μg Plasmid-DNA pro Ansatz (Mini–Maxi). Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (§3.4.2).

Präparation genomischer DNA. Für den Apoptosenachweis mit Hilfe der „DNA-Leiter“ (§3.4.10) wurde genomische DNA nach dem Standardprotokoll (Tab. 3.4, S.37) präpariert. Genomische DNA für die Konversionsversuche wurde nach der Standardmethode (MANIATIS *et al.* 1989) gewonnen.

3.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die horizontale Agarose-Gelelektrophorese erlaubt eine räumliche Auftrennung von DNA- sowie RNA-Fragmenten nach Molekülmasse (MANIATIS *et al.* 1989). Analog zur analytischen Gelelektrophorese, kann die präparative unter Verwendung größerer DNA-Auftragsmengen zur gezielten Isolierung und Reinigung bestimmter DNA- oder RNA-Fragmente angewandt werden (§3.4.5).

0,5–10 μg DNA-Lösung (analytisch–präparativ) wurden mit $\frac{1}{3}$ Vol 3 \times Auftragspuffer versetzt, je nach gewünschtem Trennbereich auf ein 0,8–2,0 %-iges Agarosegel (in 1 \times TBE mit $\sim 0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ethidiumbromid) neben einem Längenstandard aufgetragen und in 1 \times TBE-Laufpuffer in einer Gelelektrophorese-Apparatur (Tab. 3.1, S.33) aufgetrennt; die Laufdauer betrug typischerweise $\sim 1\frac{1}{2}$ h bei 100 V und 150 mA. Die Gelbilder wurden bei einer Fluoreszenzanregung von 254 nm mit Hilfe eines Transilluminators (Tab. 3.1) dokumentiert.

3.4.5 DNA-Reinigung

DNA-Präzipitation. (i) Die Isopropanol-Fällung entfernt überschüssige Salze aus DNA-Lösungen. Dazu wurden zu der Lösung 0,7 Vol Isopropanol gegeben und 20 min bei RT präzipitiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 15.000 \times g wurde das Pellet mit 5 ml 70 % v/v eiskaltem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. (ii) Die Ethanol-Fällung reinigt und konzentriert DNA und wird oft im Anschluß an die Phenolextraktion angewandt. Die DNA wurde mit $\frac{1}{10}$ Vol 2,4 M NH_4Ac sowie 3 Vol 100 % v/v EtOH (-20°C) 90 min lang bei -20°C gefällt und dann 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 μl eiskaltem 70 % v/v EtOH gewaschen und getrocknet.

Bei allen Präzipitationsmethoden sind die Fällungs- und Waschschrte in einer Kühlzentrifuge ($+4^\circ\text{C}$) bei 14 kUpM durchgeführt worden. Das DNA-Pellet wurde zuletzt in 40–50 μl H_2O oder TE-RNase A (pH 7,6) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die RNase A beseitigt RNA-Verunreinigungen; daher darf im Falle weiterer Verwendung in der *in vitro*-Transkription keine RNase A zum Ansatz zugegeben werden!

Säulchenreinigung. Die Reinigung der DNA mit Hilfe von QIAquick-Säulchen (Tab. 3.4, S.37) beruht auf dem Prinzip der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an einer Silikagel-Membran bei einer hohen Salzkonzentration. Nukleinsäuren der Größe 70 Bp–10 kBp (PCR-Produkte; cDNA-Fragmente nach Restriktionsverdau, Kinasierung und präparativer Gelelektrophorese) wurden entsprechend der Herstellerangaben von Kontaminationen (Salze, Oligos, Agarose usw.) befreit.

Die präparative Gelelektrophorese mit anschließender Säulchenreinigung (Gelextraktion) wurde verwendet, um spezifische Restriktionsfragmente zu isolieren und PCR-Matrizen sowie größere Oligos zu entfernen. Hierzu wurden im Bereich der gesuchten DNA-Banden die Ethidiumbromid-gefärbten Gelfragmente unter energieschwachem UV-Licht bei 360 nm mit einem Skalpell herausgeschnitten, die Agarose durch Erhitzen im entsprechenden Puffer solubilisiert und die DNA (max. 10 μg pro Ansatz) wie oben beschrieben eluiert.

3.4.6 Enzymatische Behandlung von Nukleinsäuren

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen (Restriktionsverdau). Aus Prokaryoten isolierte Restriktionsenzyme sind in der Lage, spezifische Sequenzen einer doppelsträngigen DNA zu erkennen und zu schneiden, wobei glatte (*blunt*) oder überhängende (*cohesive*) Enden erzeugt werden.

Für Restriktionsanalysen, Klonierungen, Vektor-Linearisierung sowie Identifizierung von Transformanten wurde die DNA nach Herstellerangaben im entsprechenden Inkubationspuffer geschnitten. Für analytische Zwecke wurden 0,3–1 μg Plasmid-DNA, für präparative Zwecke 4–10 μg und zum Screening standardmäßig $\sim 3\text{--}5 \mu\text{l}$ DNA aus der Alkalischen Lyse (§3.4.3) eingesetzt. Die Enzymmenge richtete sich nach der spezifischen Aktivität im verwendeten Puffer, der DNA-Menge sowie der Restriktionsdauer. Die Reaktion wurde nach 2 h-ü.N. bei +37 °C durch Zugabe von 1 \times DNA-Auftragspuffer gestoppt und die DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel überprüft (§3.4.4).

Analytisch:

1 μg	DNA
1 μl	10 \times Restriktionspuffer
0,5–2 U	Restriktionsenzym
2 μl	10 \times BSA-Stammlsg. (optional)
ad 20 μl	H ₂ O

Präparativ:

5–10 μg	DNA
2 μl	10 \times Restriktionspuffer
10–20 U	Restriktionsenzym
2–10 μl	10 \times BSA-Stammlsg. (optional)
ad 20–100 μl	H ₂ O

3'-Exonuklease-Verdau. Eine mögliche Methode, DNA mit kohäsiven Enden einer *blunt end*-Ligation zugänglich zu machen, besteht darin, die Überhänge mit der T4-DNA-Polymerase zu trimmen. Die T4-DNA-Polymerase besitzt 3'→5', jedoch keine 5'→3'-Exonuklease-Aktivität. Die Reaktion fand nach dem folgenden Schema statt:

T4-DNA-Polymerase-Ansatz:

~2 μg	geschnittene Vektor-DNA in EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5)
100 μM	dNTP-Mix
10 U	T4-DNA-Polymerase
5 mM	MgCl ₂
100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
2,5 μg	BSA
ad 50 μl	H ₂ O

Enzymatische Reaktion: 40 min +11–16 °C; Inaktivierung: 10 min +75 °C

Ligation von Restriktionsfragmenten. Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA (glatte wie überstehende Enden).

Die DNA wurde entsprechend der Herstellervorschrift ligiert. Linearisierte Vektor-DNA (empfohlene Konzentrationen: 0,05–0,1 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$) und Fragmente der Fremd-DNA wurden im *mola*ren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 gemischt. Als Ligationskontrolle wurde der Vektor ohne Insert ligiert. Der Reaktionsansatz wurde nach der Methode der „kalten Ligation“ bei +16 °C (30 min bei glatten Enden, 45 min bei überstehenden) inkubiert und die Reaktion durch Einfrieren des Ligationsansatzes bei –20 °C oder durch Hitzeinaktivierung (10 min bei +70 °C) abgestoppt.

Vermeiden der Eigenligation durch Kinasierung. Damit der linearisierte Vektor nicht rezirkularisiert und während der Ligation als Akzeptor-Molekül verfügbar bleibt, wurde das 5'-Ende nach der CIP-Methode (CIP: *cal*f *intest*inal *alkaline phosphatase*) dephosphoryliert. Der kinasierte Vektor kann nach wie vor mit einem nicht-kinasierten Insert ligieren und wird nach der Transformation durch Replikation „repariert“.

Grundsätzlich wurde die DNA aufgrund der Zn²⁺-Abhängigkeit des Enzyms in einem Zink-haltigen 1× CIP-Dephosphorylierungspuffer kinasiert. Alternativ dazu wurde in einigen Fällen die CIP direkt zu dem Restriktionsansatz zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei +37 °C wurde die CIP optional über präparativen Gelelektrophorese oder über Säulchenreinigung inaktiviert (§3.4.5).

<u>CIP-Ansatz:</u>		<u>10× CIP-Puffer:</u>	
0,1 μg	Vektor-DNA	10 mM	ZnCl ₂
2 μl	10× CIP-Puffer	10 mM	MgCl ₂
1 μl	CIP (1 U)	100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
ad 20 μl	H ₂ O		

3.4.7 Ortspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese (*site specific mutagenesis*) wird benutzt, um eine bestimmte Mutation (Insertion, Deletion, Konversion) zielgenau in die DNA einzuführen.

Als methodischer Ansatz wurde die Standard-PCR gewählt. Prinzipiell geht man dabei wie folgt vor: Für die einzuführende Mutation werden zwei Primer benötigt, ein Vorwärtsprimer (fd) sowie ein Rückwärtsprimer (rv), welche die Mutation mittig tragen (z.B. CB([E²⁷³L]SC) fd/rv, CB([ΔE²⁷³]SC) fd/rv, CB[ΔQ²⁶⁸-G²⁷⁷]SC) fd/rv; Tab. 3.9, S.44). Daneben finden zwei weitere Primer Verwendung, die üblicherweise der Amplifikation der gesamten DNA-Region dienen. In zwei getrennten PCR-Ansätzen werden zunächst die beiden Teilhälften der gewünschten Gesamtsequenz amplifiziert. Die ursprüngliche Matrize liegt im Vergleich dazu stark verdünnt vor, dadurch reduziert sich später die Anzahl falschpositiver Klone. In einer erneuten PCR-Reaktion werden die miteinander vermischten PCR-Produkte zusammen mit den flankierenden Primern eingesetzt. Wegen des überlappenden Bereiches der Teilsequenzen wird nun die Gesamtsequenz mit den eingebrachten Mutationen amplifiziert.

3.4.8 Identifizierung rekombinanter Vektorkonstrukte

Kolonie-Screening über Antibiotikaresistenz-Marker. In den Plasmiden (Tab. 3.8, S.43) enthaltene Resistenzgene gegen Antibiotika (z.B. β -Lactamase, *bla*, welche Resistenz gegen β -Lactamantibiotika wie Ampicillin vermittelt; Tab. 3.7, S.42) wurden zur positiven Selektion pro- und eukaryotischer Zellen verwendet. Diese Art der Selektion gibt jedoch keine Auskunft über das Vorhandensein eines (unabhängig hiervon exprimierten) Inserts.

Kolonie-Screening mittels α -Komplementation. Transformanten wurden z.T. über die blau/weiß-Selektion wie folgt ermittelt: Vektoren wie pBluescript[®] mit partiellem *lacZ*-Gen ermöglichen eine α -Komplementation, wenn sie in Zellen eingebracht werden, die eine Deletion im gleichen Gen (*lacZ*ΔM15) auf dem Fertilitätsplasmid F' besitzen. Wenn kein Insert vorliegt (religierte Vektoren), wird ein funktionales α -Peptid gebildet, welches das Genprodukt von *lacZ*ΔM15 komplementiert und mit diesem ein funktionales β -Galaktosidase-Protein bildet. Beim Ausplattieren auf IPTG/X-Gal-haltige Indikatorplatten entwickeln diese Lac⁺-Kolonien eine Blaufärbung, welche sich durch eine weitere Inkubation bei +4 °C intensivieren läßt. Unterbricht jedoch ein kloniertes Insert das *lacZ*- α -Peptid, so tritt keine Komplementation auf und die Kolonien erscheinen weiß (Insertionsinaktivierung).

Kolonie-Screening durch Fluoreszenz. Orientierung und Rasterverschiebungen von Inserts sowie insbesondere der Austausch von Fluoreszenzeigenschaften lassen sich nach einer Transfektion (§3.6.3) mikroskopisch leicht überprüfen. Diese Technik wurde überwiegend bei den Konversionsversuchen und beim Austausch von Fluoreszenzproteinen angewandt.

Konstrukt-Screening durch Restriktionsverdau. Standardmäßig wurden 6 unabhängig transformierte Bakterienkolonien gepickt und in einer Übernachtskultur vermehrt. Nach der Plasmid-Schnellisolierung (§3.4.3) mit anschließender Restriktionsanalyse (§3.4.6) wurden

die Klone mittels der Agarose-Gelelektrophorese (S.49) auf Größe und Orientierung des Inserts sowie auf Mehrfachinserts hin untersucht.

Konstrukt-Screening durch PCR. Alternativ zum Restriktionsverdau bietet die PCR (§3.4.1) eine rasche und elegante Methode zur Überprüfung von Insertorientierung, -größe und Mehrfachinserts. Sie wurde im Falle genomischer Einbauten eingesetzt und in solchen Fällen, in denen andere Methoden aufgrund fehlender oder ungeeigneter Schnittstellen limitiert sind.

Konstrukt-Screening durch Sequenzierung. Diese Methode fand nur in kritischen Fällen Verwendung, in denen eine Aussage über die Fragmentgröße allein (z.B. bei Punktmutationen) nicht möglich war und die Gefahr einer Kontamination mit dem Matrizenstrang bestand (§3.4.12).

3.4.9 Vektorkonstruktion

Kathepsin B-Konstrukte (CB). Alle CB-Expressionskonstrukte (Abb. 4.38, S.124) sind von einem Originalklon abgeleitet, der die vollständige codierende Sequenz (CDS) des humanen *CB* (isoliert aus dem Auge; Soares adult retina N2b5HR) enthielt: pT7T3D–Pac–[*NotI*]–*hCB*–[*EcoRI*] (Deutsches Ressourcenzentrum; ID: 380482, RZPD-Klon: IMAGp998C11881; Insert: 2310 Bp). Während der PCR-Amplifikation mit spezifischen *CB*-Primern (Tab. 3.9, S.44) wurden die Schnittstellen *KpnI* und *SalI* eingeführt, mit deren Hilfe eine Teilsequenz des PCR-Produkts* in einen pBluescript–*EGFP*-Vektor kloniert wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dietrich Werner, DKFZ). Ein 0,2 kBp (182 Bp exakt) großes *KpnI*-Fragment am 5'-Ende, das aus einer internen *KpnI*-Schnittstelle in der *CB*-Sequenz resultiert, fiel dabei heraus. Das verbleibende Fragment wurde mittels *KpnI/NotI* in pcDNA3 kloniert und das fehlende 0,2 kBp-Fragment wurde zusätzlich nachkloniert. Die Teilsequenzierung des pcDNA3–[*KpnI*]–*hCB*([Δ C'PRO]FLM)–[*SalI*]–*EGFP*-Vektors ergab im Vergleich zu den theoretischen *CB*-Sequenzen keinerlei Abweichungen auf der Aminosäuren-Ebene. Die vom Vollängenprodukt abgeleitete *hCB*([Δ C'PRO]FLM)-Sequenz wird im folgenden Kontext vereinfacht als *CB*(FLM) bezeichnet.

Die fragmentierten *CB*-Sequenzen für die Mutagenese wurden mit Hilfe entsprechender PCR-Primer (Tab. 3.9, S.44) aus der *CB*(FLM) gewonnen und analog hierzu kloniert. Einige Sequenzen enthielten – zumeist stille – Punktmutationen: *CB*(SC) sowie hiervon abgeleitete Konstrukte ($C^{108}C$), *CB*(HC_N) ($V^{133}L$), *CB*(SC)–C'PRO ($G^{166}D$, $D^{303}D$).

* Die Translation dieses Teilbereichs führte zu einem N-terminal trunkeierten *CB*-Fragment, $\Delta^{72}CB$.

Durch einen *Bgl*III-Einfachverdau mit anschließender Ligation wurden 33 AS der CB-Einzelkettenform (CEPGYSPTYKQDKHYGYSVSNSEKDIMAEI) eliminiert, woraus das Konstrukt CB($[\Delta C^{211}-I^{243}]SC$)–EGFP resultierte.

Die Punktmutationen zum gezielten Aminosäuren-Austausch oder zur Aminosäuren-Deletion wurden durch die ortsspezifische Mutagenese (§3.4.7) erzielt. Ein 10 AS langes myc-Epitop wurde N-terminal in einer PCR-Reaktion über einen 65 Bp langen Vorwärtsprimer eingeführt. Analog hierzu wurde mit Start- sowie Stop-Codons verfahren.

Da den PCR-Primern für die Deletionsmutanten CB(HC_{C'1-4}) die 5'-*Kpn*I-Schnittstellen fehlten, wurden sie über eine *blunt end/Not*I-Klonierung in den pcDNA3-Vektor (CB(HC_{C'1})) bzw. über eine *blunt end/blunt end*-Klonierung in den TOPO-Vektor (CB(HC_{C'2-4})) nach Standardvorschrift des Herstellers inseriert. Für die pcDNA3-Klonierung wurde der Vektor mit *Kpn*I geschnitten, das überhängende Ende mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase in einer 3'→5'-Exonukleasereaktion getrimmt (S.50), Vektor wie Insert mit *Not*I verdaut und die beiden Teilstücke ligiert. Die Kontrollsequenzierung legte bei CB(HC_{C'4}) eine spontane Mutation S²²⁰P zutage, die sich jedoch aller Wahrscheinlichkeit nach nicht wesentlich auf Faltung sowie Lokalisierung auswirken sollte.

Fluoreszenzaustausch. In den meisten Fällen sind Fluoreszenzprotein-Sequenzen genetischer Chimären ausgetauscht worden. Je nach Konstrukt wurden unterschiedliche Klonierungsstrategien verfolgt:

(i) Sequenzbereiche, die nahezu das komplette Fluoreszenzprotein codieren und alle Fluoreszenzprotein-spezifische Punktmutationen enthalten, wurden aus Donor und Rezipient mittels *Bse*I/*Bsr*GI herausgeschnitten. Die beiden Fragmente (Donor: ausgeschnittenes Insert; Rezipient: pBS-Vektor ohne Fluoreszenzproteingen) wurden durch präparative Gelelektrophorese gereinigt und miteinander rekombiniert. Daraufhin wurde die komplette Sequenz des Fusionsgens über die *Kpn*I/*Not*I-Schnittstellen aus dem Klonierungsvektor pBS in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert.

(ii) Alternativ hierzu wurde der Austausch C-terminaler Fluoreszenzprotein-Sequenzen direkt im pcDNA3-Vektor ohne den Umweg über den pBS-Vektor bewerkstelligt. Da jener jedoch eine weitere *Bse*RI-Schnittstelle in der Vektorsequenz aufweist, wurde über einen *Bse*I-Einfachverdau und Eliminierung des 1.792 Bp-Fragments nicht nur die Fluoreszenzprotein-Sequenz, sondern auch (identische) Teile des pcDNA3-Vektors ausgetauscht und die Orientierung durch Testverdau überprüft. Als Donor dienten andere pcDNA3-Vektoren mit konventionell klonierten Fluoreszenzprotein-Sequenzen.

(iii) Eine weitere Methode zum Austausch C-terminaler Fluoreszenzprotein-Sequenzen bei CB-Konstrukten, die ohne anschließende Überprüfung der Orientierung auskommt, wurde bei CB-Sequenzen mit intaktem 3'-Terminus angewandt: Über einen *Eco*RI/*Not*I-Verdau wurde

ein Fragment eliminiert und durch ein neues ersetzt, das neben der kompletten Fluoreszenzprotein-Sequenz einen kurzen 3'-CB-Bereich enthielt.

(iv) Schließlich wurden in einigen Fällen PCR-amplifizierte Fluoreszenzprotein-Sequenzen nach dem Verdau der flankierenden Restriktionsschnittstellen (*SalI/NotI*) direkt in den pcDNA3-Expressionsvektor inseriert. Aufgrund einer zusätzlichen *SalI*-Schnittstelle in der Vektorsequenz mußte auch in diesem Fall eine Dreifachligation mit anschließender Kontrolle der Orientierung erfolgen.

Stefin B-Konstrukte (StB). Der Konstruktion von StB-Derivaten wurde ein synthetisches *StB*-Gen zugrunde gelegt (THIELE *et al.* 1988), welches neben einer Codon-Optimierung eine Mutation enthielt (C³S), die eine Dimerisierung des Inhibitors verhindert (die Vektoren pcDNA3.1-*StB-EGFP* sowie pcDNA3.1-*EGFP-StB* wurden freundlicherweise von den Autoren zur Verfügung gestellt). Sowohl das N- als auch das C-terminal Fluoreszenzprotein-gekoppelte, rekombinante StB wies nach Angaben der Autoren inhibitorische Aktivität auf.

Die *EGFP*-Sequenz wurde gegen *ECFP* sowie *EYFP* wie folgt ausgetauscht: (i) Da pcDNA3.1-*StB-EGFP* außerhalb der Fluoreszenzprotein-Sequenz zwei zusätzliche *BseI*-Schnittstellen enthielt, konnte der Austausch nicht über *BseRI/BsrGI* erfolgen. Stattdessen wurden nach einem *BseRI*-Einfachverdau des Originalvektors (Fragmente: 4.379 Bp, 1.775 Bp und 254 Bp) sowie eines pcDNA3-Donors mit C-terminalem Fluoreszenzprotein die drei jeweiligen Teilsequenzen über präparative Gelelektrophorese aufgetrennt. Die beiden Gelfragmente, welche die unterschiedlichen Fluoreszenzprotein-codierenden Sequenzen enthielten, wurden vertauscht und die DNA wurde äquimolar in einer Dreierligation religiert. (ii) pcDNA3.1-*EGFP-StB* wurde mit *BseRI/BsrGI* geschnitten, wobei außer [#*BseRI*]-*EGFP*-[#*BsrGI*] drei weitere Fragmente entstanden. Ebenso geschnittene Fluoreszenzprotein-Inserts aus Donormolekülen wurden mit den restlichen Fragmenten des Rezipienten in einer Viererligation zusammengefügt und der korrekte Zusammenbau durch anschließende Testverdaus bestätigt.

Der hiervon abgeleitete Vektor pcDNA3.1-*CB(PREPRO)-EYFP-StB* zur Adressierung von FP-StB in das ER/TGN enthält zusätzlich zum *StB*-Gen die CB-Nukleotidsequenzen für das Signalpeptid sowie das N-terminale Pro-Peptid. Die Präpro-Sequenz wurde mit pcDNA3-*CB(FLMΔC'PRO)-ECFP* als Matrize mit entsprechenden Sequenzprimern (Tab. 3.9, S.44) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NheI/AgeI* in den oben beschriebenen Vektor kloniert. Zwischen Präpro und Fluoreszenzprotein kommen aufgrund einer *AgeI*-Schnittstelle 5 AS neu hinzu: APVAT. Der Austausch von *EYFP* gegen *ECFP* erfolgte wie unter „Fluoreszenzaustausch“ (oben) beschrieben.

Zellorganell-Marker. Vektoren mit Fluoreszenzprotein-Markern aus kommerzieller Quelle und hiervon abgewandelte Konstrukte aus fremder Quelle sind in Tab. 3.8 (S.43) aufgeführt.

3.4.10 DNA-Fragmentierung als Apoptosenachweis

Zu den Merkmalen spätapoptotischer Zellen gehört u.a. die Fragmentierung der DNA. Weil DNasen dabei die genomische DNA zwischen den Histonen schneiden, entsteht bei der gelelektrophoretischen Auftrennung ein typisches Fragmentmuster, die sog. „DNA-Leiter“. Die Größe der Fragmente beträgt theoretisch ein Vielfaches von ~200 Bp.

Apoptose wurde in Kontrollzellen durch Zugabe von je 5 μM Etoposid oder MG115 aus einer 25 mM Stammlösung ausgelöst. Genomische DNA wurde den Herstellerangaben gemäß isoliert, von RNasen befreit (§3.4.3) und gelelektrophoretisch analysiert (§3.4.4).

3.4.11 Herstellung von RNA-Sonden durch *in vitro*-Transkription

Die Sonden-DNA der CB-Einzelkettenform (CB(SC) mit C'-Stop-Codon) wurde wie in §3.4.9 beschrieben in den pcDNA3-Vektor kloniert, in getrennten Ansätzen an jeweils einem der beiden Insertenden mit *KpnI* bzw. *NotI* linearisiert (§3.4.6) und über die präparative Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (§3.4.5). Die Ribosonden wurden mit dem DIG RNA Labeling Kit (Tab. 3.4, S.37) entsprechend den Herstellerangaben gewonnen (Prinzip der *in vitro*-Transkription siehe Anhang, S.167). Hierbei wurden sie mit der T7- bzw. Sp6-RNA-Polymerase in jeweils entgegengesetzte Richtungen transkribiert. Die Matrizen-DNA wurde aus dem fertigen Transkript-Gemisch mit 20 U DNase I (RNase-frei) entfernt (15 min Verdau bei +37 °C) und die Reaktion mit 8 μl 0,2 N EDTA-Lösung gestoppt. Die RNA wurde mit NaCl/EtOH gefällt, 30 min bei +4 °C und 14 kUpM pelletiert und mit RNase-freiem Ethanol gewaschen (S.49). Nach kurzem Antrocknen wurde sie in 50–100 μl DEPC-H₂O 30 min bei +37 °C gelöst und zuletzt in 1 ml Hybridisierungsmix aufgenommen. Für die *in situ*-Hybridisierung wurde diese Stammlösung 1:100 verdünnt in frischem Hybridisierungsmix eingesetzt. Die Standardmarkierungsreaktion ergibt nach Herstellerangaben ~ 10 μg Ribosonde bei 1 μg eingesetzter Matrizen-DNA, dies entspricht einer Endkonzentration von ~ 100 ng ml⁻¹ in der *in situ*-Hybridisierung.

3.4.12 DNA-Sequenzierung

Nukleinsäuren wurden nach der SANGER-Methode durch Fluoreszenzdetektion unter Verwendung spezifischer Primer (Tab. 3.9, S.44) bzw. Universalprimer (z.B. gegen M13, T7-Pol.) von Andreas Hunziker (DKFZ) sequenziert (Modell 373A, BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems). Unbekannte Sequenzen wurden anschließend durch Homologiestudien (Tab. 3.1, S.33) mit vorliegenden Datenbank-Sequenzen verglichen.

3.5 PROTEIN-ANALYTIK

3.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) trennt Proteine entsprechend ihrer relativen Molekülmasse in Anwesenheit von Natriumdodecylsulphat (SDS). Die Methode der SDS-PAGE wird ausführlich von HAMES & RICKWOOD (1990) beschrieben.

Proteinproben aus Bakteriensuspensionen und Zellhomogenaten wurden reduziert und denaturiert (§3.3.1, §3.5.3), auf verschiedenformatige (Mini: 8,5 cm × 7,5 cm × 0,1 cm; Maxi: 18 cm × 16 cm × 0,15 cm) 12 %-ige SDS-Gele (Pipettierschema siehe Tab. 3.11) aufgetragen und unter folgenden Laufbedingungen aufgetrennt: Mini: 60 mA/Gel bei 200 V; Laufzeit ~45 min. Maxi: im Sammelgel bei 30 mA/80–100 V und im Trenngel bei 50 mA/180–200 V. Als Molmassenstandards wurden ungefärbte oder vorgefärbte Mischungen aus Referenzproteinen (Tab. 3.3, S.35) verwendet.

Tab. 3.11 Pipettierschema für 12 %ige Polyacrylamidgele. Herstellung der Gele erfolgte nach Standardprotokoll. Die Polymerisierung wurde durch Zugabe von 12,5 % Ammoniumpersulfat (APS) ausgelöst.

Lösungen	Sammelgel (12 %)		Trenngel (12 %)	
	Mini (2×)	Maxi	Mini (2×)	Maxi
Stock I /ml	1	2	6	12
Stock II /ml	–	–	7,5	15
Stock III /ml	3	6	–	–
H ₂ O /ml	2	4	1,5	3
APS / μ l	50	100	100	200
TEMED / μ l	10	20	10	20
Σ /ml	6,06	12,12	15,11	30,22

Coomassie-Färbung. Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen lassen sich mittels Coomassie Blue (NEUHOFF *et al.* 1988) nachweisen. Das Gel wurde nach der Elektrophorese ~1 h lang in der Färbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert, 2–3× 15 min in der Entfärbelösung gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in der Aufbewahrungslösung gelagert.

3.5.2 Western-Transfer-Analyse

Proteine lassen sich immunohistochemisch mit Hilfe einer Western-Transfer-Analyse (Western-Blot; TOWBIN *et al.* 1979) nachweisen. Hierzu werden sie zunächst auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert, mit immunospezifischen AK markiert und z.B. über eine chromogene Kopplungsreaktion nachgewiesen.

Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrocellulose. Nach der SDS-PAGE (§3.5.1) wurden die Gele 30 min und die Nitrocellulose-Membran 30 s in +4 °C kaltem Transferpuffer inkubiert und danach im Naßverfahren zwischen 6 Lagen 3× Whatmanpapier mit 1 mA cm⁻² bei +4 °C ü.N. auf die Nitrocellulose-Membran (Maschenweite 0,45 µm) übertragen.

Ponceau S-Färbung. Mit Ponceau S wird eine unspezifische, reversible Färbung aller Proteine auf der Nitrocellulose-Membran erreicht. Die auf diese Weise gefärbten Banden des Größenstandards wurden abgetrennt und nicht für die darauffolgende Immunofärbung verwendet, da hierbei die Färbung verlorengeht. Die restlichen Banden wurden mit H₂O entfärbt und der Immunofärbung unterzogen. Alternativ zur Ponceau S-Färbung wurde für die Bestimmung des Molekulargewichtes ein bereits vorgefärbter Protein-Standard im Bereich 11,9–208,6 kD verwendet.

Immunofärbung von Proteinen. Die Nitrocellulose-Membran wurde zunächst in einer Blockierungslösung (Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen) und anschließend in der AK-Inkubationslösung mit dem jeweiligen primären AK (Tab. 3.5, S.40) inkubiert (jeweils ü.N. bei +4 °C oder 2 h bei RT). Die Membran wurde 3× 5 min im Waschpuffer gereinigt und 1 h mit dem sekundären AK bei RT (Tab. 3.5) in der AK-Inkubationslösung behandelt. Für die Detektion wurde die Membran wiederholt wie oben gewaschen, 2× 5 min im AP-Waschpuffer vorinkubiert und in der NBT-BCIP-Substratlösung so lange entwickelt, bis die Banden deutlich sichtbar wurden. Die Farbreaktion wurde durch Spülen mit H₂O gestoppt und die Membran zwischen zwei Lagen 3× Whatmanpapier getrocknet.

3.5.3 Gewinnung von Zellhomogenaten

Proteine für die SDS-PAGE (§3.5.1) wurden durch Hitzaufschluß gewonnen. Für die enzymkinetischen Aktivitätsmessungen ist es dagegen unabdingbar, die native Struktur der Proteine zu erhalten. In diesem Fall fand der schonendere Ultraschallaufschluß Anwendung.

Hitzaufschluß. Das Bakterien- oder Zellpellet wurde für 5 min in 1× Laemmli-Probenpuffer mit 5 % β-Mercaptoethanol bei +95 °C aufgeköcht und danach auf das SDS-Gel aufgetragen.

Ultraschallaufschluß. ~4× 10⁷ Zellen wurden wie unter „Passagieren“ (S.62) beschrieben trypsiniert oder mit einem Schaber von der Grundfläche gelöst und in 5 ml GKN oder serumfreien Medium aufgenommen, 10 min bei 800 UpM (Minifuge RF) zentrifugiert, in je ~3 ml Expressionspuffer B / 1× PBS / GKN aufgenommen (*nicht* auf Eis!) und gepoolt. Nach 10 min Zentrifugation bei 800–900 UpM (≅ 800–900× g) wurde das Pellet in ~7 Vol %_w eiskaltem Homogenisierungspuffer aufgenommen. Hiernach wurde die Zellsuspension 4× 15 s auf Eis mit jeweils 30 s Pausen mit Hilfe eines Ultraschallerzeugers (40 W; 1/1 speed) homogenisiert und der Zellaufschluß 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellrückstände wurden über

einen weiteren Zentrifugationsschritt (13 kUpM $\hat{=}$ 39.000 \times g; +4 °C; 30 min) entfernt. Das Zell-Homogenat wurde zur Langzeitlagerung aliquotiert und bei -80 °C bis zur Messung aufbewahrt. Einbußen an enzymatischer Aktivität wurden nicht festgestellt.

3.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden kolorimetrisch mit dem Bio-Rad Protein Standardversuch (§3.2.2) nach BRADFORD (1976) bestimmt. Zu 20 μ l Proteinlösung (im Puffer) wurde 1 ml BioRad-Lösung (1:5 in PBS) pipettiert. Die Lösung wurde gemischt, 15 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 595 nm in einem Puffer-geeichten Spektrophotometer bestimmt. Die Konzentration wurde anhand einer BSA-Eichgeraden im Bereich 1–20 μ g ermittelt.

3.5.5 Ermittlung enzymatischer Aktivitäten

CB-, CK- und CL-Aktivitäten in Zellhomogenaten (§3.5.3) wurden mittels eines kontinuierlichen Aktivitätstests in Anlehnung an BARRETT (1980; CB), BARRETT & KIRSCHKE (1981; CB, CL) und BUHLING *et al.* (1999; CK), abgewandelt nach WERLE *et al.* (1997) bestimmt. Funktionsprinzip: Die künstlichen Peptidsubstrate Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC und Z-Gly-Pro-Arg-AMC (S.21) werden vom aktiven Enzym hinter der basischen Aminosäure Arg hydrolysiert und der freiwerdende Fluorophor AMC (7-Amino-4-methylcoumarin) spektralphotometrisch bestimmt (Anregung \sim 370 nm, Emission \sim 460 nm).

Für CK und CL existieren keine spezifischen Inhibitoren. Um zwischen CB, CK und CL-Aktivitäten differenzieren zu können, wurden dem Reaktionsansatz zur Unterdrückung von Kreuzaktivitäten Inhibitoren in einer Endkonzentrationen von 0,5 μ M bzw. 5 μ M hinzugefügt: E-64 zur Ermittlung der Aktivitäten von CB und CL sowie CA-074 für die CB-spezifische Hemmung (S.22). Für die Reaktionsansätze wurden verschiedene Puffer verwendet (§3.2.3).

<u>CB-Reaktionsansatz:</u>		<u>CK- und CL-Reaktionsansatz:</u>	
50,0 μ l	200 mM Acetat-Puffer pH 6,0	42,5 μ l	2 \times Acetat-Puffer pH 5,5
2,0 μ l	8 mM DTT/0,1 % w/v Brij 35	2,5 μ l	0,5 μ M Inhibitor (Endkonz.)
10,0 μ l	Protein-Verdünnung	5,0 μ l	Protein-Verdünnung
Reaktionsstart:			
50,0 μ l	Reaktionsansatz	50,0 μ l	Reaktionsansatz
50,0 μ l	Z-Arg-Arg-AMC; 10–50 μ M	50,0 μ l	Z-Gly-Pro-Arg-AMC (CK); 200 μ M bzw. Z-Phe-Arg-AMC (CL); 40 μ M

Reaktionsansätze wurden in eine 96-er Mikrotiterplatte pipettiert, 5 min bei RT gerüttelt und dann für eine Doppelbestimmung zu 2 \times 50 μ l auf 2 Kammern verteilt. Die Zugabe von jeweils 50 μ l Substrat startete die Enzymreaktion. Der Ansatz wurde erneut 45 s gerüttelt und danach sofort die Extinktion in 1 min-Abständen in einem temperierten (28 °C), mit freiem AMC geeichten Lumineszenzspektrometer (Tab. 3.1, S.33) aufgezeichnet.

Enzymaktivitäten wurden in einem Zeitfenster von 10–20 min Reaktionsdauer berechnet. Aus der Differenz der gemessenen Werte läßt sich die spezifische Enzymaktivität (A) in $\text{pmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ($\cong \mu\text{EU} \mu\text{g}^{-1}$ Gesamtprotein) (§3.5.4) nach Gleichung (4) berechnen.

$$(4) \quad A = \frac{\Delta E \times f_{\text{Std}} \times f_{\text{Verd}}}{c_{\text{Prot}} \times V_{\text{Probe}}}$$

Dabei ist ΔE die Differenz der gemessenen Extinktionen pro Minute (Mittelwerte im linearen Bereich), f_{Std} der Standardfaktor ($\cong 0,076 \mu\text{EU}$, enzymatische Einheiten), f_{Verd} der Verdünnungsfaktor, c_{Prot} [$\mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$] die Gesamtprotein-Konzentration und V_{Probe} [μl] das Probenvolumen des Zellhomogenats (§3.5.3).

Die enzymatischen Aktivitätsmessungen fanden mit Unterstützung von Bernd Werle an der Thoraxklinik Heidelberg gGmbH statt.

3.5.6 pH-Titration von Fluoreszenzproteinen

In vivo. pH-Studien wurden mittels digitaler Lebendzell-WFM an LCLC–103H-Zellklonen (EGFP, ECFP) oder an einer Zellpopulation desselben Zelltyps durchgeführt, die mit DsRed1–N1 exprimierenden Zellen angereichert war. Die Versuche wurden nach dem Protokoll von KNEEN *et al.* (1998) durchgeführt; CCCP* und Nigericin† wurden in den dort beschriebenen Konzentrationen zum Öffnen der Ionenkanäle sowie zum Ausgleichen des internen und externen pHs eingesetzt.

In vitro. Zellextrakte wurden wie in §3.5.3 beschrieben gewonnen; statt PBS wurde McIlvaine-Puffer (MCILVAINE 1921) mit entsprechendem pH verwendet. Die diskreten Fluoreszenzübergänge wurden durch Ändern des Puffers induziert: ausgehend von pH 7,8 wurde der pH durch 1 N NaOH bzw. HCl entweder stufenweise für jeweils 7,5 oder 10 min um eine pH-Einheit gesenkt oder direkt auf pH 4,0, pH 5,0 bzw. pH 6,0 gebracht. Die Rückbildung der Fluoreszenz wurde durch die Zugabe eines pH 7,8-Puffers initiiert.

* Carbonylcyanid-*m*-chlorophenylhydrazon; Protonencarrier, Protonophor

† Ionophor, welches einen neutralen (1:1) K^+/H^+ -Austausch über die Membran zuläßt.

3.6 ZELLKULTUR

3.6.1 Zelllinien

Es wurden überwiegend LCLC^{*}-103H-Zellen (BEPLER *et al.* 1988) verwendet. Dabei handelt es sich um immortalisierte Zellen, die von embryonalen humanen Lungen-Fibroblasten abgeleitet wurden. Darüber hinaus besitzen die LCLC-103H-Zellen aufgrund von Mutationen in Exon 4 (R⁷²P) sowie Exon 6 (V²¹⁶L) kein aktives p53[†]. Überexprimiertes Katschin B kann die p53-Aktivität in Säugerzellen reduzieren (HUANG *et al.* 2004). Mutationen im Codon 216 von Exon 6 kommen in vielen Tumoren vor, für die Zellen bedeutet die Abwesenheit von p53 einen Selektionsvorteil. Die p53-Analyse wurde im Labor von Frau Monica Hollstein (DKFZ) ausgeführt. Die verwendeten Zelllinien sind in Tab. 3.12 zusammengefasst.

Aus transfizierten LCLC-103H-Zellen wurden zahlreiche Zellklone generiert, die stabil folgende Konstrukte exprimierten: CB(FLM)-EGFP (Klon 001, 008, 009, 031), EGFP (Klon 103, 105), EGFP-Tubulin (Klon 204, 205), StB-EGFP, EGFP-StB, H2A-EGFP.

Tab. 3.12 Zelllinien. Die Zellen wurden entweder von DSMZ^{*} oder ATTC[†] bezogen.

Zelllinie	Spezies	Herkunft / Gewebe	Passage	DSMZ [*]	ATTC [†]
LCLC-103H	Mensch	großzelliges Lungenkarzinom	~180ff	384	CCL 5
HeLa	Mensch	epitheliales Zervixkarzinom	—	(57)	CCL 2
COS-7	Affe	Niere	—	(60)	CRL 1651
Hep-G2	Mensch	hepatozelluläres Karzinom	~25ff	180	—
HEK-293 [‡]	Mensch	embryonale Niere	—	305	—
MDCK	Hund	Nierenepithel	—	—	CCL 34
HDMEC [§]	Mensch	dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	—	—	—
Wi-38	Mensch	embryonale Lungenfibroblasten	~15ff	—	CCL 75

* „Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“

† „American Type Culture Collection“

‡ Distributor: Clonetics/BioWhittaker, Wokingham, UK; KARASEK (1989)

§ Primärzellen freundlicherweise von Birgit Krahlting (DKFZ) zur Verfügung gestellt

3.6.2 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Kultivierungsbedingungen. Die Zelllinien LCLC-103H, HeLa und COS-7 wurden in RPMI[‡]-Vollmedium (§3.2.3) bei +37 °C in einem Brutschrank unter 5 % CO₂-Begasung bei Wasserdampfsättigung kultiviert. Als Kulturgefäße wurden 25 cm²- bzw. 75 cm²-Schräghals-

* Large Cell Lung Carcinoma

† Tumor-Suppressor-Protein, das als Mediator von Zellwachstum-Arrest und Induktion von Apoptose fungiert

‡ „Roswell Park Memorial Institute“

flaschen verwendet. Alle Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Das Medium wurde mindestens 2× wöchentlich gewechselt. Im Falle mikrobieller Kontaminationen wurde optional 1× Penicillin/ Streptomycin (bei Bakterieninfektion) bzw. 1× Amphotericin B (bei Pilzinfektion) eingesetzt. Für Selektionszwecke und für die Kultivierung permanent exprimierender Zellen wurde G418 ins Medium zugegeben (§3.6.4).

Während langandauernder lichtmikroskopischer Arbeiten wurden die Zellen innerhalb eines Temperatur- und CO₂-geregelten Inkubators (Eigenbau) in POC-Kammern (PENTZ & HÖRLER 1992; Abb. 3.2, S.68) oder auf Kammer-Deckgläsern (*chambered coverglass slides*) kultiviert. Vor der Verwendung wurde die Kammer im Autoklaven 30 min bei +120 °C sterilisiert. Je nach Anwendung wurden verschiedenen Betriebsmodi (POC: *perfusion, open, close*) angewandt: Das Kulturmedium wurde in die Zellkammer durch Pipettieren bzw. über eine Spritze steril zugegeben oder mit einer konstanten Flußrate blasenfrei durchgepumpt. Die wärmebedingte Dejustierung der Optik wurde durch Vorheizen des Gesamtsystems verhindert und die Kondensation an Kammeroberflächen sowie Objektivlinse über einen warmen Luftstrom unterbunden. Unter solchen Bedingungen ließen sich die Zellen über Tage hinweg ohne Nachfokussieren beobachten.

Gelmatrix. Räumliche Zellverbände wurden unter Verwendung einer künstlichen interstitiellen Matrix gezüchtet. Hierfür wurde ein Kollagengel kurz vor der Verwendung aus den in §3.2.3 angegebenen Lösungen unter sterilen Bedingungen zusammengemischt, ~60 µl Lösung pro Ansatz in 2-Kammer-Deckgläser pipettiert und das Gel 1 h bei +37 °C im Brutschrank rekonstituiert. Jeweils ~10⁴ Zellen wurden auf das gebildete Gel ausgesät und ~2 h später (bevor sie in die Matrix einwandern konnten) transfiziert.

Passagieren. Sobald die adhärent wachsenden Zellen 100 % Konfluenz des Monolayers erreichten, wurden sie im Verhältnis 1:5–1:7 passagiert (2× wöchentlich). Für Experimente wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Kleinstquadrat 0,25 × 0,25 mm²; Tiefe 0,2 mm) ermittelt und die Zellen zu ~10⁴ Z cm⁻² eingesät. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen kurz mit vorgewärmter GKN-Lösung gespült und dann mit 1 ml TED-Lösung 1 min lang inkubiert. Die TED-Lösung wurde abgesaugt und die Zellen weitere 2 min inkubiert. Die Zellen konnten dann abgeschüttelt, in frischem Vollmedium aufgenommen und entsprechend verdünnt wieder ausgesät werden.

Kryokonservierung eukaryotischer Zellen. Zur Langzeitlagerung im Flüssigstickstoff sollten die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase (80–90 % Konfluenz) eingefroren werden. Die Zellen wurden wie beschrieben geerntet, jedoch in fötalem Kälberserum mit 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde nach 1–2 d Zwischenlagerung bei –80 ° in Flüssigstickstoff (–192 °C) aufbewahrt.

Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen. Eingefrorene Zellen wurden direkt vom flüssigen Stickstoff in ein +37 °C-Wasserbad überführt und aufgetaut, im Kultivierungsmedium aufgenommen, 3 min bei 900 UpM abzentrifugiert und in entsprechend große Kulturschalen eingesät. Nach dem Absetzen der Zellen, ~2 h später, wurde das verbleibende zellschädigende DMSO-haltige Medium durch frisches Kultivierungsmedium ersetzt.

3.6.3 Transfektionsmethoden

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen (vgl. Transformation; §3.3.2) mit Hilfe chemischer oder physikalischer Methoden (Review: COLOSIMO *et al.* 2000). Die am weitesten verbreiteten Transfektionstechniken sind die Calciumphosphat-Kopräzipitation (GRAHAM & VAN DER EB 1973), die Elektroporation (ANDREASON & EVANS 1988, SHIGEKAWA & DOWER 1988), der Gebrauch viraler Vektoren (PICCINI *et al.* 1987), kationische Liposomen-vermittelte Transfektion (FELGNER *et al.* 1987) und die Transfektion durch Lipopolyamine (REMY *et al.* 1987), Dendrimere (HAENSLER & SZOKA 1993) sowie nicht-liposomale Lipidverbindungen (UYTTERSROT *et al.* 1998).

Lipide Transfektionsagenzien. Nukleinsäuren können durch Einkapselung in kationische Liposomen oder als Dendrimer-Komplexe in Zellen übertragen werden. Liposomen sind künstliche Membranvesikel, die von den Zellen entweder über Fusion mit der Plasmamembran oder über den endozytotischen Weg aufgenommen werden.

Zellen wurden zu 10^4 Z cm^{-2} eingesät und 12–15 h später bei ~70 % Konfluenz standardmäßig mit FuGENE 6™ (Roche Molecular Biochemicals; UYTTERSROT *et al.* 1998), in den Konversionsexperimenten (§4.1.3) darüber hinaus mit DMRIE-C, CellFECTIN, Lipofectin oder GibcoPlus (Transfection Reagent Kit, Gibco BRL) den Herstellerangaben gemäß mit ~150 ng DNA transfiziert. Bei Kotransfektionen wurden gleiche Mengen an DNA appliziert.

CaPO₄-Präzipitation. Diese Methode wird hauptsächlich bei adhärennten Zellen angewendet. Die DNA–CaPO₄-Komplexe werden hierbei von den Zellen pinozytotisch aufgenommen.

Für die Konversionsexperimente (§4.1.3) wurden die LCLC–103H-Zellen in 10 cm Ø Petrischalen eingesät und bis 50 % Konfluenz vermehrt. Das Medium wurde 2 h vor der Transfektion gewechselt und die HBS-Lösung (*Hanks' balanced salt*; pH 6,95) tropfenweise im gleichen Volumen einer DNA-haltigen 2,5 M CaCl₂-Lösung unter kontinuierlichem Rütteln verdünnt (für bessere Präzipitation wurden je 1 µg gewünschter Plasmid-DNA ad 20 µg mit inerter pUC17 DNA als Carrier aufgefüllt). Nach 20 min Inkubation wurde das Transfektionsgemisch mit den Präzipitaten zu der Kultur gegeben; 16 h später wurden die Zellen gewaschen und das Kulturmedium erneuert.

Elektroporation. Bei dieser häufig angewandten physikalischen Methode werden die Zellen einem gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt, um eine lokale reversible Permeabilisierung der Plasmamembran zu erreichen; die kurzzeitige Perforation begünstigt die Aufnahme der DNA.

10^7 Z wurden geerntet, in 1 ml Zellkulturmedium suspendiert und mit je $5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA versetzt. Die Zellen wurden durch einen Elektroschock perforiert (250 V, 3,9 A, $125 \mu\text{F}$ bei RT), in Petrischalen überführt, nach 24 h gewaschen und mit frischem Medium versehen.

Nicht standardmäßig angewandte Transfektionen entstanden in Zusammenarbeit mit Angel Alonso (Elektroporation) und Gergana Dobрева (CaPO₄-Präzipitation) (beide am DKFZ).

3.6.4 Selektion und Gewinnung von Zellklonen

Antibiotika-Selektion. Permanent exprimierende Zellen wurden ~1 Wo nach Zugabe von $800 \mu\text{g ml}^{-1}$ G418 ins Kulturmedium generiert. Um eine mögliche Reversion zu verhindern, wurden sie im weiteren Verlauf einem Selektionsdruck von $400 \mu\text{g ml}^{-1}$ G418 ausgesetzt. Für die Konversionsexperimente (§4.1.3) wurden die Zellen 9 Tage lang mit G418 behandelt.

Generierung von Zellklonen. Einzelne Zellklone wurden unter dem Mikroskop selektiert, über Klonierungszylinder oder durch Abkratzen und Absaugen mit einer Pipette direkt aus der Kulturschale gewonnen, in 24-well-Kulturplatten ausgesät und stufenweise weiter expandiert.

3.6.5 Zellfixierung und Herstellung von Dauerpräparaten

Die langfristige Lagerung von Zellpräparaten und histologische sowie immunozytochemische Färbungen setzen eine Fixierung des Präparates voraus. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf den Erhalt der Fluoreszenz von Fluoreszenzproteinen erzielt man mit der PFA-Fixierung. Die Zellen wurden 30–40 min in 4 % PFA/PBS (pH 7,4) bei +4 °C fixiert und 2×5 min mit der PFA-Waschlösung (0,5 % w/v BSA; 0,1 % v/v Triton[®] X-100 in PBS) gewaschen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die fixierten Zellen in der Waschlösung bei +4 °C aufbewahrt.

Die fixierten Zellen wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (jeweils 5 min 50 %, 70 %, 98 % Ethanol) stufenweise dehydriert. Danach wurden sie mit dem Schnelleindeckmittel Mowiol überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und unter dem Abzug getrocknet.

3.6.6 Kernisolierung

Zellkerne für den enzymatischen CB-Nachweis wurden abgewandelt nach RICKWOOD *et al.* (1997) präpariert. Je 8×10^5 LCLC-103H-Zellen / 10 cm Ø Petrischale wurden in insgesamt 4 Petrischalen eingesät und nach 3 Tagen geerntet. Die trypsinisierten Zellen wurden mit GKN

bzw. PBS gewaschen und 5 min bei $800\times g$ pelletiert. Das Pellet wurde in 3 ml Schwellpuffer aufgenommen und 15 min im Eisbad inkubiert. Durch 10-maliges Auf- und Abbewegen des Pistills in einem Potterzylinder wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend 10 min bei $1.000\times g$ pelletiert. Das Pellet wurde erneut in 3 ml Schwellpuffer aufgenommen und die Suspension wie oben $5\times$ aufgeschlossen. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und das Pellet in 3 ml 2,2 M Saccharose/Schwellpuffer aufgenommen. Zuletzt wurden die zellulären Restbestandteile durch 80 min lange Ultrazentrifugation bei 25 kUpM (SW 50.1-Rotor) und $+10\text{ }^{\circ}\text{C}$ von den isolierten Zellkernen entfernt und das resultierende Pellet in $\sim 200\ \mu\text{l}$ Schwellpuffer aufgenommen. Konzentrationen für Vergleichsstudien wurden quantitativ durch Auszählen der Zellkerne ermittelt. Das Isolat ist bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $\sim 2\text{--}3$ d lang haltbar, andernfalls kann es unter Zugabe von Glycerin bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren werden.

3.6.7 Zytochemische Charakterisierung

Immunofluoreszenz. $\sim 5\times 10^5$ Z wurden 5 min bei 800 UpM ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$) zentrifugiert und das Zellpellet in kaltem PBS resuspendiert. Der Waschschrift wurde wiederholt und das Pellet auf adhäsive Objektträger (BioRad) in einer Petrischale pipettiert. Nach 30–45 min Inkubation bei RT wurde die Restflüssigkeit von den abgesetzten Zellen abpipettiert und das Material mit eiskaltem ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) Methanol 5–10 min bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dem Fixieren wurden die Zellen $4\text{--}5\times$ mit PBS bei RT gewaschen, 30 min mit PBS/1 % BSA vorinkubiert und wiederholt 5 min gewaschen. Nach Zugabe des primären AKs wurde 45 min lang bei RT inkubiert, $5\times$ mit PBS gewaschen und mit dem Sekundär-AK (im Dunkeln) 45 min bei RT inkubiert. Nach $5\times$ Waschen wurden die Tube-Slips eingedeckelt.

Lebendzellmarkierung. Neben der Verwendung von Fluoreszenzproteinen und immunozytochemischer Markierung wurden synthetische Vitalfarbstoffe eingesetzt. Kern-DNA wurde mit $2\ \mu\text{g ml}^{-1}$ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich), Lysosomen mit 50 nM LysoTracker Red (Molecular Probes), Mitochondrien mit 250 nM MitoTracker Red (Molecular Probes) und der Golgi-Apparat mit BODIPY[®] FL C5-Ceramid (Molecular Probes) markiert.

In vivo-Aktivitätsbestimmung. CB-spezifische Enzymaktivität wurde lichtmikroskopisch *in vivo* bestimmt. Das fluorogene Substrat (Z-Arg-Arg)₂CV wurde in die Kulturlösung zugegeben ($25\ \mu\text{M}$) und die enzymatische Freisetzung von CV in den folgenden 10 min in 1 min-Abständen erfaßt. Im Falle einer transienten Transfektion wurde die Aktivität mit der einer scheintransfizierten Kontrolle verglichen. Eine ortsspezifische Zuordnung der Aktivität zur lokalen Verteilung des Fluoreszenzproteins war nur bedingt zu Beginn der Meßreihe möglich, da die Diffusion des freigesetzten Farbstoffs die Ortsauflösung schnell reduziert. Für quantitative Aussagen wurden daher *in vitro*-Aktivitätsversuche (§3.5.5) herangezogen.

In situ-Hybridisierung. Die fixierten Zellen (§3.6.5) wurden mit der markierten Ribosonde (§3.4.11) hybridisiert. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Diese Versuche wurden von Anja Stremmer (Thoraxklinik Heidelberg gGmbH) im Rahmen einer Kooperation durchgeführt und die Resultate durch *in situ*-RT^{*}-PCR bestätigt (STREMMER 2001, Dissertationsschrift).

3.6.8 Inhibition zellulärer Transportmechanismen

Brefeldin A (BFA) inhibiert reversibel den ER–Golgi-Transport lysosomaler Proteine, Tunicamycin unterbindet ihren Mannose-6- P -vermittelten Weitertransport im TGN (S.29).

LCLC–103H-Zellen wurden mit *CB*(FLM)–*FP* transfiziert, am folgenden Tag mit 1 bzw. $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ BFA (Stammlösung 10 mg ml^{-1} /Ethanol) im Brutschrank inkubiert und lichtmikroskopisch in einer geschlossenen, temperierten POC-Kammer (S.61) über mehrere Stunden hinweg untersucht. Entsprechend erfolgte die Behandlung der LCLC–103H-Zellen mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tunicamycin (Stammlösung 1 mg ml^{-1} /100 mM NaOH).

3.6.9 Zelltod-Untersuchungen

Bestimmung der Mortalitätsraten. Die Plasmamembran sterbender Zellen ist perforiert, so daß der interkalierende DNA-Farbstoff Propidiumjodid (PI) die Membran durchdringen und die DNA färben kann. Lebende Zellen, die von dieser Färbung ausgeschlossen bleiben, können mittels einer FACS-Analyse quantitativ von toten Zellen unterschieden werden. Mit dieser Methode wurde die Sterblichkeit transfizierter LCLC–103H-Zellen untersucht.

Konfluent wachsende Zellen (25 cm^2 Kulturflaschen), die zuvor mit Fluoreszenzprotein-Chimären transfiziert worden waren, wurden 2–3 d später geerntet. Da der Überstand tote Zellen enthielt, wurde dieser 10 min bei 800 UpM zentrifugiert, das Pellet 3 min mit GKN gewaschen und mit den nach der Standardmethode trypsinierten adhären Zellen vereint. Zuletzt wurde die Zellsuspension mit einer PBS/PI/RNase-Lösung (9,3:0,5:0,2 v/v) gewaschen und in der gleichen Lösung im Durchflußzytometer (FACSCalibur™, Becton-Dickinson) vermessen. Die Zellkonzentration betrug $2\text{--}8 \times 10^5 \text{ Z ml}^{-1}$, das Meßvolumen $50 \mu\text{l}$. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der EGFP-Fluoreszenz im FITC-Kanal bestimmt; PI-gefärbte tote Zellen wurden im PI-Kanal erfaßt (Excitation jeweils bei 488 nm). Die Daten wurden mit dem „EPICS® Profile Analyzer“-Programm (Coulter Corp.) ausgewertet.

Die FACS-Messungen wurden von Michael Stöhr und Klaus Hexel (DKFZ) durchgeführt.

* reverse Transkription

Annexin V-Test. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, welches Bestandteil der inneren Plasmamembran ist. In einem frühen Stadium der Apoptose wird Phosphatidylserin in die äußere Membranschicht transloziert. Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin, so daß apoptotische Zellen über Fluorochrom-gekoppeltes Annexin V von nicht apoptotischen unterschieden werden können. Funktionsprinzip und Applikation werden in dem Herstellerhandbuch beschrieben (§3.2.2). Die Durchführung erfolgte den Anweisungen gemäß. Ein Gemisch aus Annexin V und PI wurde mit Phenolrot-freiem Medium verdünnt (Endkonz. $5 \mu\text{M}$) und die Zellen hiermit vorsichtig überschichtet.

3.7 FLUORESZENZSPEKTROSKOPISCHE VERFAHREN

Grundlagen der Fluoreszenzmikroskopie werden im Anhang detailliert beschrieben (S.161).

3.7.1 *Digitale Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie*

Instrumentation. Die Ausrüstung bestand aus einem Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiovert S100 TV, Zeiss) kombiniert mit einem System zur automatischen Bildakquisition sowie digitalen Bildverarbeitung (OpenLab, Improvision). Die einzelnen Komponenten sind in Abb. 3.2 (unten) sowie in Tab. 3.1 (S.33) aufgeführt.

Bildakquisition und digitale Bildverarbeitung. Bei den Aufnahmen wurde stets darauf geachtet, daß Bildbereiche mit der höchsten Intensität noch im dynamischen Bereich der Kamera lagen. Die von der Kamera gelieferten Grauwertbilder (max. Auflösung: 1000×1000 Pixel; max. Farbtiefe: 4096 Graustufen) wurden nach einer linearen Kontrastverstärkung entweder mit einer simulierten Fluorochrom-Falschfarbenpalette (*look-up table*, LUT) entsprechend der jeweiligen Emissionswellenlänge „eingefärbt“ oder sie bekamen elementare Falschfarben (rot, grün, blau) zugewiesen. Diese ergeben nach einer Kanalüberlagerung („RGB-Merge“) meist eindeutigere Resultate. Zur Bildverbesserung wurde z.T. das mitgelieferte Dekonvolutionsmodul verwendet, die Schrittweite zwischen den optischen Schnitten betrug $200\text{--}500 \mu\text{m}$, die besten Resultate wurden mit dem Wasser-Objektiv erzielt. Superpositionen von Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen wurden über die Option „Composite Merge“ erzielt. Optional wurde ein Hintergrundbild im defokussierten Zustand aufgenommen und von dem Originalbild abgezogen. Für automatisierte, v.a. zeitabhängige Abläufe wurden entsprechende Skripte in der mitgelieferten Makrosprache erstellt (Anhang, S.174). Fluoreszenzintensitäten wurden quantifiziert, indem die mittleren Grauwerte (zusammen mit anderen statistischen Parametern) über eine Schwellenwertbildung in den mit Hilfe binärer Masken detektierten Objekten (*blobs*) ermittelt wurden.

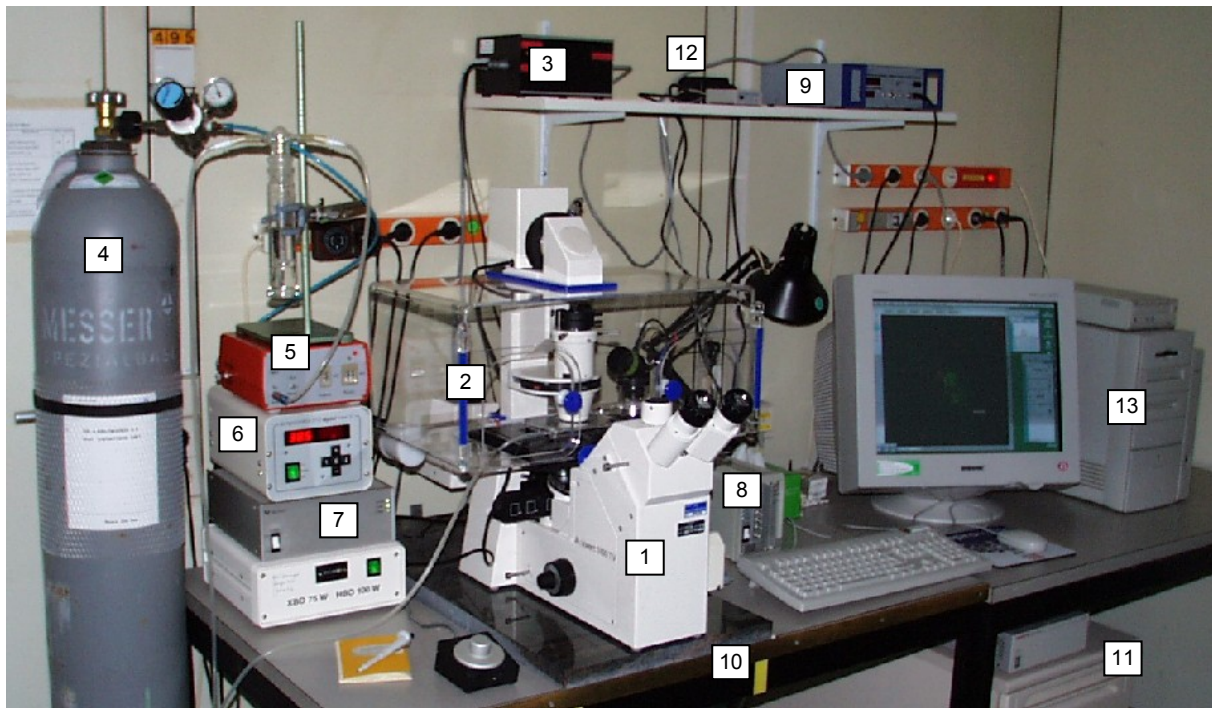


Abb. 3.2 Instrumentation für die automatisierte digitale Mikroskopie. Die wichtigsten Elemente sind: (1) Epifluoreszenz-Mikroskop (2) Inkubator mit Perfusionskammer (3) Regelungseinheit für die Inkubator-Heizung (4) 5 % CO₂-Luftflasche (5) Belüftungssteuerung (6) Temperatur-Regler für die Perfusionskammer (7) Schrittmotor-Fokus-Steuerung (8) Verschluss- (*shutter*) und Filter-Ansteuerung (9) Steuereinheit für den Piezo-Motor (10) Digitale Kamera (verdeckt) (11) Kamera-Ansteuerung (*frame grabber*) (12) Farbfilter-Steuerung (CRI) (13) Recheneinheit mit Akquisitions- und Bildverarbeitungs-Programmen sowie Optionen zur Datensicherung (ZIP, CD-ROM, ADSM)

3.7.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop entstanden mit freundlicher Unterstützung von Karsten Richter (DKFZ) und Jens Rietdorf (EMBL, Heidelberg).

3.7.3 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Instrumentation. Der Laserstrahl eines Ar⁺-Pumplasers (Verdi; 488 nm $\hat{=}$ 25 mW, 514 nm $\hat{=}$ 15 mW) wurde von einem modengekoppelten, gepulsten Ti:Saphir-Laser (Coherent Mira 900-F; λ_{EX} : 680–1100 nm, Pulsabstand: 13,2 ns, Pulsfrequenz: 76 MHz) verstärkt, von dem Dispersionskompensator (GDC) stabilisiert und in die Scaneinheit PCM2000 (Nikon) eines Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskops (TE300, Nikon) eingekoppelt. Für die Bildaufnahme wurde ein 60 \times /1,2 Wasserobjektiv (Plan Apochromat DIC H; Nikon) verwendet. Ein Piezo-Schrittmotor wurde für optische Schnitte mit einer Schrittweite von 200–500 μm benutzt. Unterschiedliche Fluoreszenzkanäle wurden sukzessive aufgenommen. Die mit einem Photomultiplier erfaßten Intensitäten wurden zuletzt mit dem „EZ2000“-Programm visualisiert.

Die TPM-Arbeiten fanden im Rahmen einer Kooperation im Labor von Helmut Acker am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund statt.

Mobilitätsstudien. Die nukleoplasmatische Diffusion von Fluoreszenzproteinchimären wurde mittels Photobleichtechniken (Anhang, S.166) in lebenden Zellen nach PHAIR & MISTELI (2000) untersucht. Neben einiger technisch bedingter Abweichungen zur Originalarbeit, wurde TPM (S.160) anstelle von LSM verwendet. Die Methodik wird exemplarisch in Abb. 3.3 (unten) erläutert. Die Anregung fand bei 860 nm statt, ein 510/20 nm-Emissionsfilter wurde für die EGFP- und ein 470/30 nm-Emissionsfilter für die kombinierte ECFP/EYFP-Detektion verwendet. Die wirksame Laserleistung betrug 5 mW; die Bestrahlung führte zu keiner sichtbaren Zellschädigung.

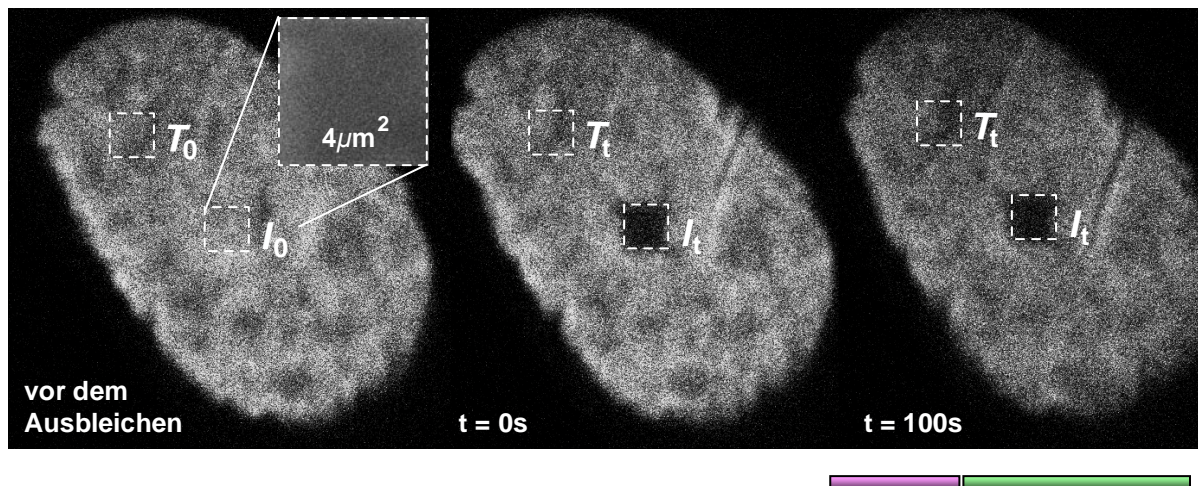


Abb. 3.3 Bestimmung der Kern-Mobilität. Der experimentelle Ansatz zur Bestimmung von Diffusion und Bindung von Fluorochromen durch Photobleichen wird am Beispiel des Fluoreszenzprotein-gekoppelten Histon-Konstruktes H2A-EGFP dargestellt. Beim kontinuierlichen Photobleichexperiment wurde eine $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ große Kernregion ununterbrochen gescannt und das durch die Bestrahlung verursachte Photobleichen in diesem Bereich simultan mitverfolgt (vergrößerter Ausschnitt links). Beim FRAP-Experiment wurde ein ebenso großer Bereich durch kontinuierliche Bestrahlung zunächst vollständig gebleicht (Mitte). Fluoreszenzintensitäten in der gebleichten ROI und in einer unbehandelten Vergleichsregion wurden daraufhin im zeitlichen Verlauf 100 s lang gemessen (erstes und letztes Bild der Zeitserie sind dargestellt) und gemäß Gleichung (5) normiert.

(i) FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*): Um die Situation vor dem Photobleichen zu erfassen, wurde eine $21,8 \times 21,8 \mu\text{m}^2$ große Kernregion im Flächenscanmodus aufgenommen (Periodendauer: $5 \mu\text{s}$). Innerhalb dieses Bereichs wurde ein kleinerer quadratischer Ausschnitt (*region of interest*, ROI) von $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ durch 10 aufeinanderfolgende Scans vollständig gebleicht (Bestrahlungsdauer: 20,33 s). Wegen fehlender Möglichkeit zur Automatisierung wurde direkt im Anschluß daran (Startverzögerung: ~ 2 s) der Ausschnitt *manuell* auf die Ausgangsauswahl zurückgesetzt und eine Zeitserie mit 50 Bildern (Gesamtdauer: 1'41''650'') aufgenommen. Durch die zusätzliche Nachbestrahlung wurden ~ 8 % der EGFP- und bis 30 % der ECFP/EYFP-Ausgangsintensität gelöscht.

Mittlere Grauwerte der aufgenommenen Bildserien wurden mittels eines Makros (Anhang, S.166) im Programm „ScionImage“ ermittelt. Die relativen Fluoreszenzintensitäten I_{rel} wurden nach Gleichung (5) normiert:

$$(5) \quad I_{rel} = \frac{I_t T_0}{I_0 T_t}$$

Dabei ist T_0 die Ausgangs-Gesamtintensität, T_t die Gesamtintensität zum Zeitpunkt t , I_0 die Intensität in der ROI vor dem Photobleichen und I_t zum entsprechenden Zeitpunkt t .

Die mobile Fluorochromfraktion F_m wurde nach Gleichung (6) berechnet:

$$(6) \quad F_m = \frac{I_\infty - I_b}{I_i - I_b}$$

Dabei ist I_∞ die Fluoreszenz in der ROI, welche nach kompletter Regenerierung ein Plateau erreicht, I_i die Intensität während des Vorbleichens und I_b die intrinsische Hintergrundfluoreszenz, welche hier vernachlässigbar gering war. Der effektive Diffusionskoeffizient D_{eff} ist umgekehrt proportional zu der charakteristischen Diffusionszeit τ_D , welche aus dem Wert zum Zeitpunkt $I_\infty/2$ ermittelt werden kann. Für einen tiefergehenden Einblick in die Berechnungen siehe AXELROD *et al.* (1976) oder SPRAGUE *et al.* (2004).

(ii) Kontinuierliche Bestrahlung (*continuous photobleaching*): Dieselben Grundparameter und Auswertemethoden wie bei FRAP wurden angewandt. Im Unterschied zum klassischen FLIP-Experiment (Anhang, S.166), wurde nicht ein Spot bestrahlt, um in einem größeren Ausschnitt das Wegdiffundieren von Farbstoff in anderen Bereichen zu registrieren, sondern es wurde lediglich das kontinuierliche Photobleichen in einem kleinen Bereich aufgezeichnet.

Eine Serie von 30 aufeinanderfolgenden Scans in einer quadratischen ROI mit $2 \mu\text{m}$ Kantenlänge wurde aufgenommen. Übersichtsaufnahmen wurden vor und nach der Serie zu Vergleichszwecken angefertigt. Die mittleren Grauwerte wurden auf ihre Ausgangswerte normiert und mit dem Programm „SigmaPlot“ gefittet.

Dekonvolution (Bildrestaurierung). Bildqualität und Auflösung der Aufnahmen wurden z.T. mittels Dekonvolutionstechniken verbessert (Anhang, S.164).

(i) WFM: Ein Schrittmotor bzw. ein Piezo-Stepper dienten dazu, Bilderstapel (typischerweise 800×800 Pixel, 5–9 Schnitte) entlang der optischen Achse im Abstand von 0,2–0,5 μm in verschiedenen (Fluoreszenz-)Kanälen aufzunehmen. Rekonstruktionen wurden mit dem Dekonvolutionsmodul des „OpenLab“-Programms berechnet.

(ii) TPM: Bilderstapel mit größerer räumlicher Tiefe (z.B. 512×512 Pixel, 60 Schnitte) wurden im Abstand von 0,5 μm mittels eines Piezo-Motors analog zu (i) aufgenommen. Das S/N-Verhältnis wurde ermittelt und die Aufnahmen nach der iterativen Maximum Likelihood-Methode (Anhang, S.164) mit dem „Huygens“-System (Tab. 3.1, S.33) auf einer SGI-Workstation restauriert. Für die Dekonvolution wurden berechnete und physikalisch gemessene PSF

(Anhang, Abb. IV, S.163) verwendet. Methodik sowie Instrumentation werden ausführlich an anderer Stelle beschrieben (PORWOL *et al.* 1999, STROHMAIER *et al.* 2000).

3D-Bildrekonstruktion. Die Bilderstapel wurden als Rohdaten bzw. wie oben beschrieben durch Dekonvolution aufbereitet und mit 2 unterschiedlichen Systemen räumlich rekonstruiert (Anhang, S.165). Die Raumdaten wurden mittels des „AVS“-Systems (Tab. 3.1) auf einer SGI-Workstation visualisiert. Ein Schwellenwert wurde benutzt, um die Bereiche mit höherer Fluoreszenzintensität darzustellen. Die Isoflächen wurden mit Hilfe des *Marching Cube*-Algorithmus (LORENSEN & CLINE 1987) berechnet und das resultierende Objekt gerendert. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe bzw. unterschiedliche Intensitäten eines Fluorochroms wurden als Isoflächen unter Verwendung von Falschfarben in einem kartesischen Koordinatensystem dargestellt. Alternativ zu dem „AVS“-System wurden die Bilderstapel analog hierzu mit dem Visualisierungssystem „Amira“ (Tab. 3.1; HIESINGER & FISCHBACH 2000) auf einem handelsüblichen PC rekonstruiert.

TPE-Spektroskopie. Die verwendeten abiotischen Fluorochrome sind in Tab. 3.6 (S.41) zusammengefaßt. Für die Messungen wurden sie in PBS oder DMSO gelöst. Ein zusätzlicher Fluoreszenzbeitrag durch die Lösungsmittel konnte unter TPE-Bedingungen ausgeschlossen werden. *avGFP*-Varianten und DsRed1 sowie das Fusionsgen H2A-ECFP (Tab. 3.8, S.43) wurden in LCLC-103H-Zellen exprimiert, durch Ultraschall aufgeschlossen (S.58), abzentrifugiert und in PBS aufgenommen.

Der experimentelle Aufbau bestand aus folgenden Einheiten (Abb. 3.4(a), unten): Ein Ti:Saphir-Laser mit 45 fs Pulslänge bei 804 nm und einer Pulsenergie von 1 mJ sowie einer Wiederholrate von 1 kHz lieferte ein Spektrum, das zusammen mit der Pulsweite mit Hilfe eines Spektrometers sowie eines Intensitäts-Autokorrelators zweiter Ordnung kontrolliert wurde. Ein optischer parametrischer Verstärker (TOPAS) wurde benutzt, um die Wellenlänge kontinuierlich zwischen 580 nm und 1150 nm einzustellen. Abb. 3.4(b) zeigt die Pulsenergie („Laserleistung“) in Abhängigkeit von der Excitationswellenlänge.

Der Output des parametrischen Verstärkers wurde durch eine Silika-Linse mit einer Brennweite von 400 mm fokussiert. Die Meßzelle wurde derart justiert, daß generiertes Weißlicht bei keiner Excitationswellenlänge in der Zelle beobachtet werden konnte. Die Intensität unmittelbar an der Probe betrug $\sim 100 \text{ GW cm}^{-2}$. Dies entspricht $\sim 1,6 \times 10^8$ Photonen cm^{-3} und ist ausreichend für TPE. Wegen einer chromatischen Aberration der fokussierenden Linse variierte der Strahldurchmesser $\pm 5,5 \%$ im spektralen Bereich 600–1200 nm in Bezug auf den Strahldurchmesser gemessen bei 900 nm. Das emittierte Licht wurde von einer multimodalen Faser senkrecht zur Richtung des Excitationsstrahls eingefangen, die mit einem Gitter-Spektrometer verbunden war. Das Spektrum im Bereich 260–720 nm wurde von einem Multikanal-Detektor mit 1024 Meßeinheiten (Pixeln) simultan aufgenommen. Die Excitationswellenlänge wurde in äquidistanten Schritten geändert und für

jeden Schritt wurden 200 einzeln aufgenommene Fluoreszenzspektren gemittelt. Um die Absorption als eine Funktion der Excitationswellenlänge zu erhalten, wurde die Fluoreszenzkurve integriert und das Resultat unter der Annahme eines Zwei-Photonen-Absorptionsprozesses durch das Quadrat der Excitationsintensität dividiert. Der TPE-Prozess wurde bestätigt, indem für einige Fluorochrome die Fluoreszenzausbeute als Funktion der Excitationsintensität gemessen wurde, wobei eine quadratische Abhängigkeit wiederholt festgestellt werden konnte.

Die Messungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Thomas Feurer am Institut für Optik and Quantenelektronik der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt.

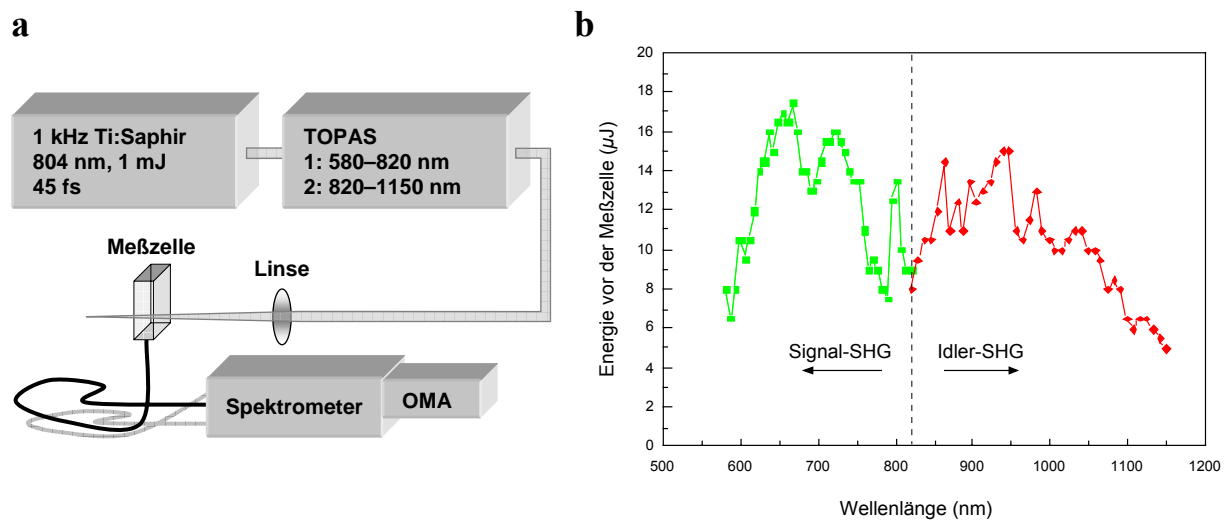


Abb. 3.4 Messen der TPE-Spektren. Experimenteller Aufbau (a): Die hochfrequenten Laserpulse des Ti:Saphir-Lasers wurden verstärkt (TOPAS), mit Hilfe eines Linsensystems auf eine Meßzelle fokussiert und die angeregte Fluoreszenz über eine multimodale Faser aufgenommen. Die Faser war an ein Gitter-Spektrometer gekoppelt, welches mit einem optischen Multikanal-Detektor (*optical multi-channel analyser*, OMA) ausgerüstet war. TPE-Laserleistung (b): Pulsenergie als Funktion der Wellenlänge für die beiden benutzten Scanbereiche. Bei der Überlagerung von Frequenzen gleicher Wellenlänge wie im Falle von TPE kommt es zur sog. Frequenzverdopplung (*second harmonic generation*, SHG). Die resultierenden Lichtstrahlen werden als Signal und Idler bezeichnet, wobei der Signalstrahl konventionsgemäß derjenige mit der höheren Frequenz ist.

3.7.4 Rechnergestützte lichtmikroskopische Methoden

Quantifizierung. Relative Fluoreszenzintensitäten lassen sich vereinfacht mit bildgebenden Verfahren ermitteln. Sieht man von Artefakten durch *out-of-focus*-Fluoreszenz, Photobleichen oder Quenchen des Fluorophors usw. ab, so kann ein linearer Zusammenhang zwischen Farbstoffkonzentration, Fluoreszenzintensität und Kameragrauwert angenommen werden. Die generelle Vorgehensweise beinhaltet: (i) Bestimmung eines Signal-Hintergrund-Schwellenwerts, (ii) Erstellung einer binären Maske aufgrund des Schwellenwertes bzw. einer ROI, (iii) Ermittlung des mittleren Grauwertes innerhalb des definierten Bereichs.

Durch homologe Rekombination verursachte Konversion von Fluoreszenzeigenschaften (§4.1.3) wurde mit Hilfe des „OpenLab“-Programms quantifiziert. Das durchschlagende Excitationslicht (*crosstalk*) der CFP-Anregung in den YFP-Kanal betrug weniger als 1 %, für den umgekehrten Fall maximal 3 %. Etwa 75 Bilder ($\sim 5 \times 10^3$ Zellen) wurden für jedes Telexperiment verarbeitet. Nach Abzug des Hintergrunds (defokussierte Bilder) wurden die intensiveren H2A-Signale (C_i, Y_i) von den schwächeren CB-Signalen (c_i, y_i) durch einen Intensitätsschwellenwert getrennt. Von den restlichen Objekten wurden Binärmasken erstellt, um deren mittleren Grauwert (i) sowie deren Fläche (a) zu ermitteln. Redundanzen wurden eliminiert, indem beide Masken mittels einer ODER-Verknüpfung miteinander verschmolzen und auf jeden Kanal einzeln angewandt wurden. Über einen Flächenschwellenwert wurden lediglich die Kernsignale (C_a, Y_a) selektiert, die geringeren CB-Signale (c_a, y_a) sowie Artefakte wurden dagegen ignoriert. Der mittlere Grauwert aller Objekte wurde benutzt, um den Intensitätsschwellenwert für die Objektbestimmung zu optimieren. Um die Konversionsrate zu ermitteln, wurden die Fehler $a^*_{i,a}$ und $b^*_{i,a}$, die während der Unterscheidung der H2A-Signalverteilungen $C_{i,a}$ und $Y_{i,a}$ von den CB-Signalverteilungen $c_{i,a}$ und $y_{i,a}$ auftauchen und die zu einem Verlust an positivem H2A-Signal führen, sowohl im CFP- als auch im YFP-Kanal als gleich angenommen (Abb. 4.8(b), S.85). Somit entspräche die Konversionsrate von H2A–ECFP nach H2A–YFP dem folgenden Term:

$$(7) \quad R_{\text{H2A}} = \frac{B_{i,a}}{(A_{i,a} + B_{i,a} - (A_{i,a} \wedge B_{i,a}))}$$

Dabei ist $A_{i,a}$ die Anzahl der H2A–ECFP exprimierenden Zellkerne, $B_{i,a}$ die Anzahl der H2A–YFP und $(A_{i,a} \wedge B_{i,a})$ die Anzahl der Zellkerne, welche beide Konstrukte enthalten. In Abb. 4.8(c) (S.85) ist ein typischer Signalanalyse-Graph dargestellt. Manuelle Überprüfung der automatisierten Prozedur anhand einer adäquaten Stichprobe brachte vergleichbare Ergebnisse. Es wurde vorausgesetzt, daß die Konversion H2A und CB gleichermaßen betrifft. Da die H2A-Signalverteilung einfacher zu bestimmen war als die vergleichsweise signalschwache und somit eher fehleranfällige Verteilung von CB, wurden lediglich die H2A-Konversionsereignisse ermittelt. Die Gesamtkonversionsrate R_o beträgt demnach

$$(8) \quad R_o = 2R_{\text{H2A}} - (R_{\text{H2A}})^2$$

Hierbei entspricht $(R_{\text{H2A}})^2$ dem Zellanteil, der eine Konversion beider Konstrukte aufweist.

Zeitaufgelöste Mikroskopie. Zeitserien in mehreren Kanälen wurden mittels automatisierter Abläufe (*automations*) innerhalb des „OpenLab“-Programms realisiert. Je nach Anwendung (intrazelluläre Enzymaktivitätsmessungen, intrazellulärer Transport, Expression, Zellzyklusuntersuchungen usw.) wurden hierbei sehr unterschiedliche Zeitskalen verwendet, mit Intervallen im Sekundenbereich bis hin zu mehrtägigen Kinetiken.

4 ERGEBNISSE

4.1 ASPEKTE DER LEBENDZELLBEOBACHTUNG

In zunehmendem Ausmaß verliert „das Reagenzglas“ an Bedeutung; immer öfter finden Untersuchungen selbst subtiler Prozesse *in situ* an lebenden Zellen oder Organen statt. Diesem Zweck dienliche mikroskopische Lebendzelluntersuchungen werden von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst. Ziel ist es, eine reproduzierbare und störungsfreie Beobachtung zu gewährleisten, die zudem geringstmögliche Einschränkungen der Zellvitalität garantieren soll. Im Fortgang der Arbeit wurden an verschiedenen Punkten Optimierungsversuche zu Einflüssen unterschiedlicher physikalischer oder physiologischer Parameter durchgeführt und damit Rahmenbedingungen zur standardisierten Durchführung der Experimente geschaffen. Diese Versuche werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt. Zwei methodische Problemkreise nehmen dabei wegen ihrer grundsätzlichen Bedeutung und Neuheit einen großen Raum ein: die genetische Konversion bei simultaner Mehrfachtransfektion sowie die Aufnahme von Zwei-Photonen-Absorptions- und Emissionsspektren.

4.1.1 Zellvitalität

Bei *in vivo*-Fluoreszenzuntersuchungen spielt die Zellvitalität eine entscheidende Rolle. Sie hängt ab von zahlreichen Umgebungsfaktoren physikalischer und biochemischer Natur (pH, Temperatur, Zusammensetzung des Nährmediums, Lichteintrag usw.) sowie von intrinsischen Faktoren, die sich auf die Physiologie und die Morphologie des verwendeten Zellsystems auswirken können.

Transfektionsagenzien. Die optimale Konzentration des Agens wird durch dessen Toxizität und die ihm zugrundeliegende Transfektionseffizienz bestimmt. Die Transfektionsprotokolle (§3.6.3) wurden an die jeweils verwendeten Zellen optimiert. Von allen getesteten Transfektionsagenzien (Tab. 3.3, S.35; Tab. 3.4, S.37) führte FuGENE 6 (S.63) im Falle der häufig verwendeten LCLC-103H-Zellen zu der höchsten relativen Überlebensrate bei höchster Transfektionsrate (~30–50 %) und wurde deswegen bevorzugt eingesetzt.

Expressionsprodukt. Nicht nur das extrinsische Protein kann den Metabolismus der Zelle beeinträchtigen, sondern auch das koexprimierte Fluoreszenzprotein. Während im Falle der *avGFP* kein signifikanter Einfluß auf die Zellvitalität festgestellt werden konnte (§4.2.3), erwies sich DsRed bei Überexpression z.T. als toxisch (§4.1.2).

Strahlenschäden (*photodamage*). Bestrahlung von Zellen führt im Durchlicht – abhängig von ihrer Spektralverteilung und Intensität – nach einer gewissen Zeit zu Zellschädigung und Zelltod. LCLC-103H-Zellen arretierten in der Mitose unter WFM-Bedingungen bereits nach wenigen Minuten bei Dauerbestrahlung mit einem 10× Objektiv sowie bei kurzzeitiger Bestrahlung (~20 ms) und Zeitintervallen von 15 s mit einem 40× Objektiv* (Abb. 4.1). Die Zeitintervalle zwischen den Aufnahmen wurden deshalb so optimiert, daß eine Langzeitbeobachtung möglich wurde. Typischerweise betragen die Zeitspannen ≥ 5 min, was für die Reparatur eventuell erzeugter Strahlenschäden ausreichend zu sein scheint. Unter diesen Bedingungen waren sowohl Hellfeldaufnahmen im unteren Millisekundenbereich als auch mehrere Fluoreszenzaufnahmen mit Belichtungszeiten ≤ 1 s möglich.

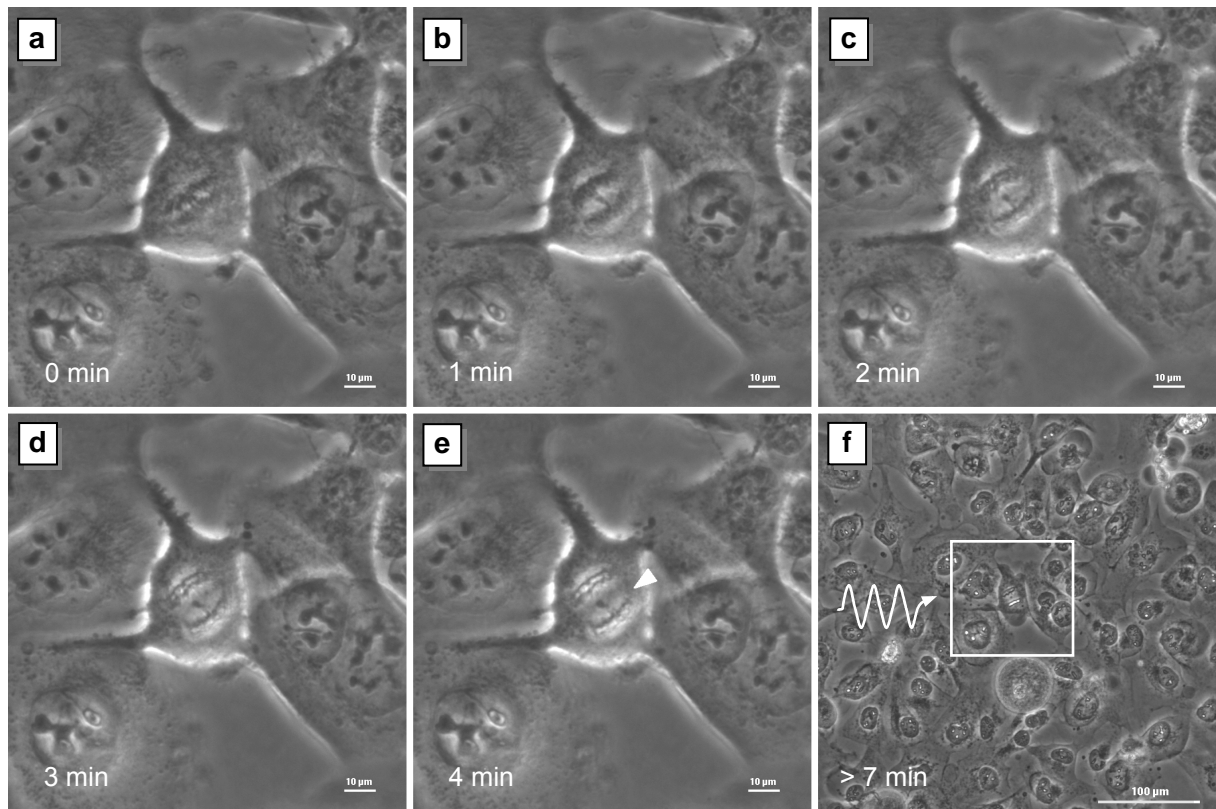


Abb. 4.1 Zellschädigung durch Bestrahlung. LCLC-103H-Zellen, die im Phasenkontrast in einem Zeitintervall von 15 s für ~20 ms mit Weißlicht bestrahlt wurden (a–e), arretierten bereits nach wenigen Minuten in der Mitose (e) und wurden irreversibel geschädigt (f; Gesamtausschnitt). Ein während der Chromosomenaufteilung in der Äquatorialebene liegende gebliebene Chromosom (e, Pfeilspitze) deutet auf eine Schädigung des Spindelapparates hin. Dagegen ließen sich die Zellen unter gleichen Bestrahlungsbedingungen bei Verwendung von 10 min-Zeitintervallen stundenlang beobachten. Die Gesamtaufnahmedauer betrug im vorliegenden Fall 7 min. a–e: Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken 10 µm. f: Obj. 10×/0,30 Luft; Größenbalken 100 µm.

* Das 40× Objektiv hatte eine ~10-fache Lichtleistung am Objekt im Vergleich zum 10× Objektiv.

Phototoxizität. Zusätzlich zu den allgemeinen Strahlenschäden und der Basistoxizität des Fluorochroms entstehen Strahlenschaden durch die Energieabsorption von Fluoreszenzproteinen (Abb. 4.2, unten). Die Bestrahlung wurde auf ein Maß reduziert, welches ein hohes S/N-Verhältnis auch bei zeitlich sowie räumlich aufgelösten Aufnahmen zuließ. Die durchschnittliche Leistung bei den TPM-Versuchen (§4.1.4) betrug bei einer Spitzenleistung von ~12 TW lediglich ~25 mW am Objekt. In WFM-Studien ergaben die oben beschriebenen Abstände von 5–10 min in Langzeitexperimenten keine Beeinträchtigungen der Zellvitalität.

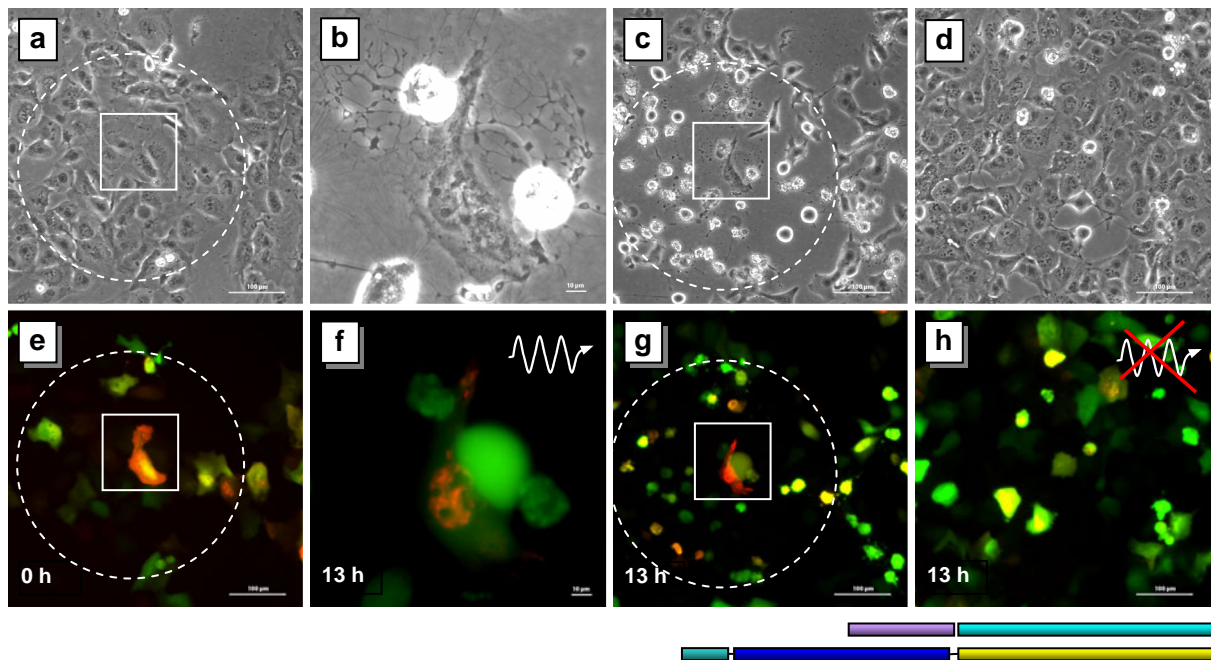


Abb. 4.2 Phototoxizität. LCLC-103H-Zellen wurden mit *CB(SC)-EYFP* (rot) und *StB-ECFP* (grün) transfiziert und 13 h lang in 20 min-Abständen im Hellfeld (a–d) sowie getrennt in beiden Fluoreszenzkanälen (e–h: Superposition) bestrahlt. Die Gesamtbestrahlung dauerte ~6 min; für die Detektion wurde ein 40×/0,60 Luftobjektiv verwendet (b,f; Größenbalken 10 μm). In der Gesamtübersicht (Obj. 10×/0,30 Luft; Größenbalken 100 μm) ist der ungefähre Bestrahlungsbereich (gestrichelter Kreis) und der Beobachtungsbereich (Quadrat) am Anfang (a,e) und am Ende der Bestrahlungsreihe (c,g) dargestellt. Während am Ende der Messung überwiegend fluoreszierende Zellen durch den Lichteintrag geschädigt waren (c,g), war in einem nicht-bestrahlten Kontrollbereich zum selben Zeitpunkt keine Zellschädigung exprimierender Zellen zu beobachten (d,h).

4.1.2 Fluoreszenzproteine

Die Bedeutung von Fluoreszenzproteinen für zellbiologische Studien wurde bereits in §2.1 dargelegt; für die Studien wurden diverse Fluoreszenzprotein-Varianten verwendet (Anhang, S.158ff). Diese sind mittlerweile hinreichend charakterisiert und z.T. weiter optimiert worden. Da sich dieser Entwicklungsprozeß in der Arbeit widerspiegelt, soll an dieser Stelle kurz auf einige beobachtete Eigenarten der Fluoreszenzproteine eingegangen werden, welche die Festlegung experimenteller Parameter beeinflusst haben.

Mehrfachmarkierungen. Das weithin verwendete EGFP hat sich aufgrund seiner herausragenden Fluoreszenzeigenschaften für Einfachmarkierungen von Anfang an bewährt. In Verbindung mit anderen Fluoreszenzproteinen war sein Einsatz dagegen nur bedingt möglich. Die simultane Markierung unterschiedlicher Zellen oder Zellkompartimente mit EGFP und EBFP war zwar generell möglich (Abb. 4.3(a)), jedoch wegen des rapiden Photobleichens von EBFP sehr problematisch. Das spektral vergleichbare sgBFP erwies sich im gegebenen Kontext als nur unwesentlich photostabiler und seine Quantenausbeute als vergleichbar zu EBFP (Abb. 4.3(b)).

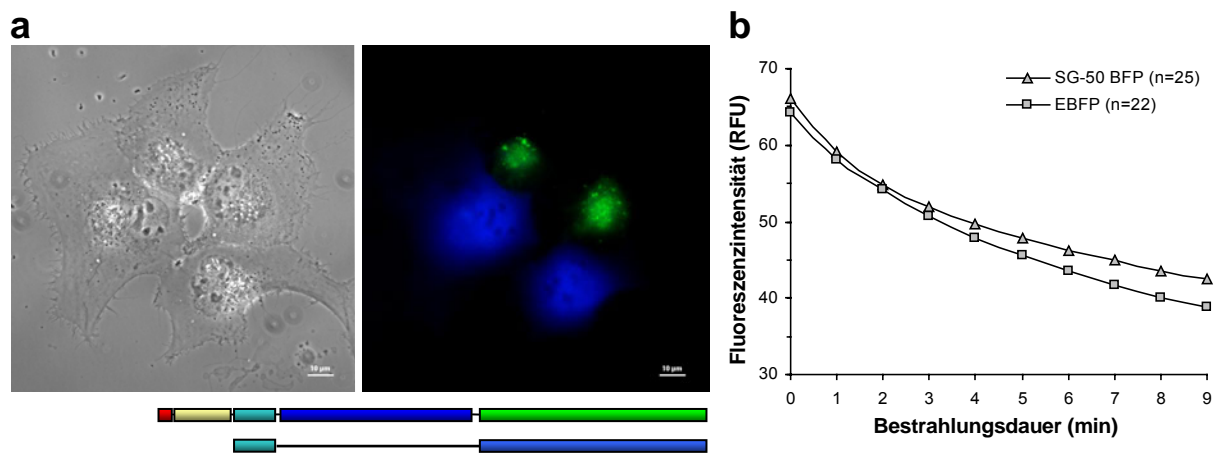


Abb. 4.3 BFP als Fluoreszenzmarker. (a) Die Simultandetektion von EBFP und EGFP ist generell möglich, wie exemplarisch an CB(LC)–EBFP/CB(FLM)–EGFP-koexprimierenden LCLC–103H-Zellen gezeigt. Allerdings eignet sich EBFP wegen geringer Fluoreszenzintensität und schnellen Photobleichens lediglich zur Unterscheidung räumlich voneinander getrennter Objekte, nicht aber von überlappenden Bereichen, z.B. im selben Zellkompartiment. Obj. 40×/1,30 Öl; Größenbalken 10 μm . (b) Die beiden blauleuchtenden *av*GFP-Homologen EBFP (Clontech) und sgBFP (Quantum Biotechnologies) zeigten bei transienter Expression in LCLC–103H-Zellen eine vergleichbare mittlere Ausgangs-Fluoreszenz sowie ein ähnliches Photobleichverhalten bei kontinuierlicher Bestrahlung. Beide DNA-Konstrukte wurden in gleicher Konzentration transfiziert und unter der Kontrolle des CMV-Promoters (EBFP: in pcDNA3-Vektor; sgBFP: in pQBI50f-Vektor) exprimiert. Die BFP-Varianten wurden in einzelnen Zellen unterschiedlich stark exprimiert, wie die mittlere relative Standardabweichung von 0,35 zum Ausgangszeitpunkt in beiden Fällen belegt.

Das leuchtintensive EYFP (S.160) in Kombination mit EGFP war wegen des geringen Abstands zwischen den beiden Emissionsmaxima von lediglich 18 nm ebenfalls ungeeignet.

Abhilfe sollte das spektral günstig im Langwelligen gelegene, intensiv leuchtende DsRed schaffen. Zudem ist seine Fluoreszenz im Gegensatz zu *av*GFP nicht pH-abhängig und somit besonders für saure Zellkompartimente geeignet. Es stellte sich jedoch heraus, daß seine zunächst unbekanntes Nachteile diesen Vorteil überwiegen. In einigen Fällen war die Markierung mit DsRed1 möglich und führte zu einer guten Unterscheidung von der ECFP- bzw. EGFP-Fluoreszenz (Abb. 4.4(a,b), unten). In anderen Fällen wurde aber eine hohe (Photo-)Toxizität festgestellt (Abb. 4.4(c)). Auch stellte sich heraus, daß bei der Selektion lediglich mit *DsRed* transfizierter Zellen das überexprimierte Protein auf diese toxisch wirkt und eine konstitutive Expression verhindert. Weiter zeigten einige der selektierten, anfänglich

homogen leuchtenden Zellen unterschiedliche Typen von Fehllokalisationen, bei denen das DsRed an Zellorganellen (Mitochondrien, ER) gebunden zu sein schien (Abb. 4.4(d)). Diese Nachteile lassen die Verwendung von DsRed als unsicher erscheinen.

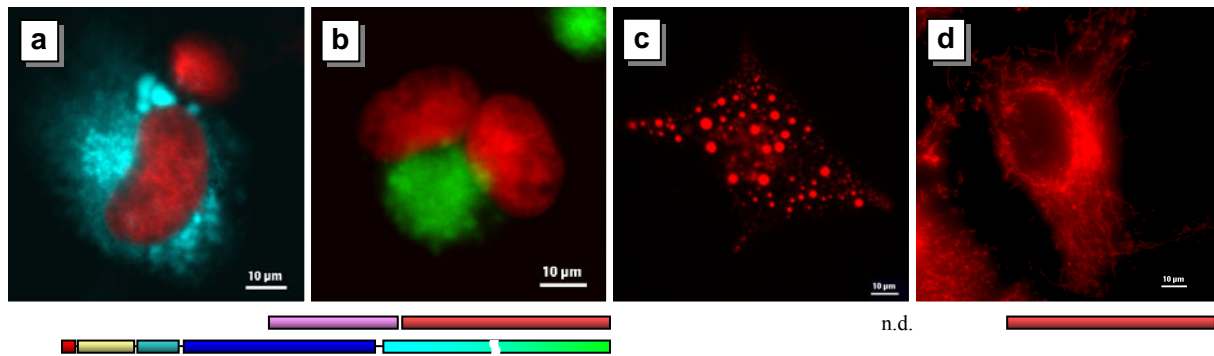


Abb. 4.4 DsRed als Fluoreszenzmarker. Die Proteinmarkierung mit DsRed1 ermöglicht angesichts des großen STOKES'schen Shifts die Diskriminierung von ECFP (a: H2A–DsRed und CB–ECFP) sowie von EGFP (b: H2A–DsRed und CB–EGFP). Allerdings wurde bei DsRed-Chimären häufig eine erhöhte (Photo-)Toxizität beobachtet, wie am Beispiel eines ER–DsRed-Konstruktes gezeigt wird (c). Im Gegensatz zu den *avGFP*-Varianten ergab das reine DsRed nicht in allen Fällen eine homogene intrazelluläre Verteilung. Insbesondere bei permanenter Expression zeigte das Fluoreszenzprotein eine toxische Wirkung auf die Zellen und führte in einigen Fällen zu einer artifiziellen Lokalisation (d). Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken 10 μm .

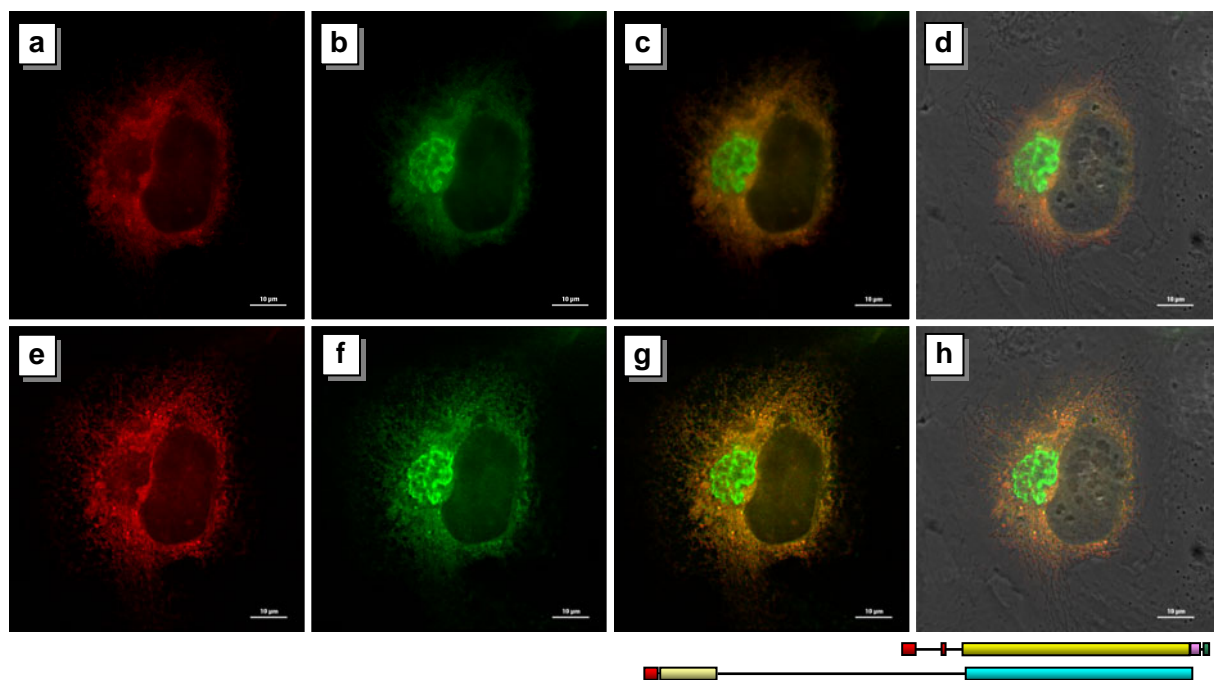


Abb. 4.5 Doppellokalisierung von ECFP- und EYFP-Konstrukten. Eine LCLC–103H-Zelle, die mit ER–*EYFP* (a) und hCB(PREPRO)–*ECFP* (b) transfiziert wurde. (Falschfarbendarstellung; rot: EYFP; grün: ECFP). Die unterschiedlichen Fluoreszenzproteine wurden mit einer geeigneten Filterkombination (Tab. 3.1, S.33) ohne weitergehende Verrechnung der Bilder voneinander unterschieden. Die hohe Photostabilität beider Konstrukte macht die Aufnahme ganzer Bilderstapel möglich; nach der Dekonvolution (a–d: Rohdaten; e–h: Dekonvolutionsdaten) treten der Golgi-Apparat sowie das feine Netzwerk des ER besonders deutlich hervor. d,h: Überlagerung von Fluoreszenzkanälen und Phasenkontrast. Obj. 63×/1,25 Öl; Größenbalken 10 μm .

Die besten Resultate wurden mit ECFP in Verbindung mit EYFP erzielt: Obwohl ECFP nur $\sim 1/5$ der Fluoreszenzintensität von EYFP erreicht (Tab. I, S.160), war dieses Fluorochrompaar nicht nur für Doppelmarkierungsexperimente (Abb. 4.5, S.78), sondern auch für FRET-Anwendungen (Abb. 4.41(c-e), S.130) geeignet. Aber auch bei dieser Kombination sind Einschränkungen hinzunehmen, denn bei einem stark ungleichen Expressionsverhältnis zwischen EYFP und ECFP zugunsten von EYFP kann ein falschpositives Ergebnis aus der geringen Absorption von EYFP im lokalen Maximum bei 440 nm für ECFP resultieren.

pH-Sensitivität. Die Fluoreszenzintensität der von *avGFP* abgeleiteten Fluoreszenzproteine ist wegen unterschiedlicher Protonierungszustände des Chromophor-Phenolats pH-abhängig (TERRY *et al.* 1995, VAN THOR *et al.* 1998, ELSLIGER *et al.* 1999). Da CB-FP-Hybride in Zellkompartimenten mit sehr unterschiedlichen pH-Werten lokalisiert sind, also möglicherweise temporär oder permanent unsichtbar werden könnten (Säure-Lücke, *acidic gap*), wurden an Fluoreszenzprotein-exprimierenden Zellen pH-Titrationsversuche durchgeführt (§3.5.6).

Die pH-Verläufe für EGFP und ECFP fielen beinahe identisch aus, der Quencheffekt trat in beiden Fällen schnell ein und führte zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität vom Maximum bei pH 7,8 bis zum Minimum bei pH 4,0 um $\sim 50\%$ (exemplarisch dargestellt für EGFP in Abb. 4.6). Der Sprung auf pH 7,8 stellte bis 90 % der Ursprungsintensität wieder her. Dies stimmt mit ähnlichen Versuchen von KNEEN *et al.* (1998) überein. Zellkulturen, die DsRed1 exprimierten, wurden in derselben Art und Weise behandelt. Der Mittelwert aus vier Experimenten ergab kein Quenchen der DsRed1-Fluoreszenz aufgrund von pH-Änderungen. Dies stimmt mit Ergebnissen überein, die an isoliertem DsRed-Protein erzielt wurden (BAIRD *et al.* 2000, HEIKAL *et al.* 2000, MIZUNO *et al.* 2001, VRZHESHCH *et al.* 2000).

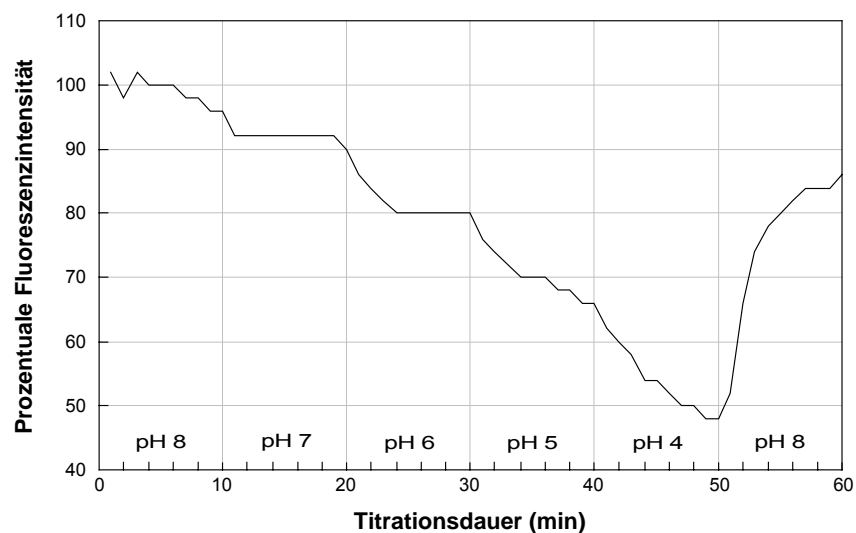


Abb. 4.6 Säure-Lücke. pH-Titration einer EGFP-exprimierenden Zellkultur. Die Fluoreszenzintensität wurde in 1 min-Abständen gemessen; nach jeweils 10 min wurde das Medium gegen eines mit anderem pH-Wert ausgetauscht. Eine nahezu identische Kurve wurde für ECFP ermittelt. Die diskreten Sprünge der Meßreihe sind auf die verschiedenen Protonierungszustände des EGFP zurückzuführen. Dagegen zeigte DsRed keine pH-Abhängigkeit. Die prozentuale Fluoreszenzintensität wurde auf den Ausgangswert normiert. pH-Werte gerundet.

4.1.3 *Simultane Kotransfektion*

Sollen lebende Zellen mit verschiedenen Fluoreszenzprotein-Konstrukten markiert werden, so können sie entweder simultan oder sequentiell mit den entsprechenden DNA-Konstrukten transfiziert werden. In der Regel wird die simultane Methode wegen ihrer Einfachheit bevorzugt. Wie die vorliegende Studie belegt, bewirkt die simultane Doppeltransfektion von Fluoreszenzprotein-Chimären häufig eine Konversion der Fluoreszenzeigenschaften. Dies wird umso offensichtlicher, je unterschiedlicher die Lokalisation der beiden Markerproteine ausfällt. Sehr wahrscheinlich findet eine Rekombination zwischen den Fluoreszenzprotein-Sequenzen oder anderen ähnlichen Nukleotidsequenzen statt. Im Folgenden wird das Auftreten dieses Phänomens unter verschiedenen experimentellen Bedingungen beleuchtet und der molekulare Nachweis der Rekombination erbracht. Zudem werden mit Hilfe bildgebender Verfahren die Signalverteilungen in den Zellen analysiert und die Konversionsraten quantitativ bestimmt.

Die Studie entstand in Zusammenarbeit mit Tobias A. Knoch (DKFZ). Wesentliche Teile dieses Kapitels wurden in abgewandelter Form publiziert (BESTVATER *et al.* 2002a; KNOCH 2002, Dissertationsschrift).

Beobachtung der Fluoreszenz-Konversion. Die Histon-GFP-Chimäre *H2A.1-ECFP* und ein *EYFP*-markiertes *CB*-Gen wurden mittels FuGENE 6 in LCLC-103H-Zellen kotransfiziert. Beide Konstrukte wiesen mit ~50 % vergleichbare Expressionsraten auf. Lichtmikroskopische Betrachtung ergab neben den zu erwartenden zyanblauen Kernsignalen (H2A) sowie gelber Emission in retikulären und vesikulären Zellkompartimenten (CB) zusätzliche Signale, bei denen die farbliche Lokalisation der beiden Konstrukte überraschend vertauscht war. Dieser Effekt trat besonders deutlich bei permanent exprimierenden Zellpopulationen hervor (Abb. 4.7, S.84; Tab. 4.1(1), S.83).

Abwandlungen des Transfektionsprotokolls. Da das beobachtete Phänomen zu Fehlinterpretationen führen kann, wurde er durch Modifikation des Transfektionsprotokolls (sukzedane Transfektion, Schmelzen der Vektor-DNA vor der Transfektion, Einsatz unterschiedlicher Transfektionsagenzien und Zelllinien) auf seine Allgemeingültigkeit hin überprüft. Kontrollexperimente, bei denen die Konstrukte einzeln mit frischpräparierter Plasmid-DNA aus bakteriellen Klonen transfiziert wurden, zeigten keinerlei Änderung der Fluoreszenzeigenschaften (Tab. 4.1(2,3)). Dies schloß eine mögliche Kontamination in den verwendeten Plasmidpräparationen von weiterer Betrachtung aus. Die Übertransfektion einer stabilen H2A-ECFP-Zelllinie mit CB-EYFP ergab ebenfalls keine Konversion (Tab. 4.1(4)). Ein denkbarer Assoziationseffekt aufgrund einer zufällig erhöhten Affinität der koexprimierten Fluoreszenzproteine konnte demzufolge ebenfalls nicht für die Konversion verantwortlich gemacht werden. Extrazelluläre Anlagerung (*preannealing*) der DNA wurde minimiert, indem

die Plasmide separat mit dem Transfektionsmediator gemischt und anschließend aufeinanderfolgend appliziert wurden. Diese Behandlung reduzierte die Konversion maßgeblich (Tab. 4.1(5)). Wurde das Zeitintervall zwischen der Applikation beider Plasmide auf eine Stunde ausgedehnt, so trat das Phänomen zwar viel seltener auf, verschwand jedoch nicht vollständig. Die Kinetik ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen 1 h und 8 h Inkubationsdauer (Tab. 4.1(6–10)); offensichtlich ist bereits eine Stunde ausreichend für eine signifikante Reduktion der Konversion (Tab. 4.1(6)). Wurde die Kultur vor der zweiten Transfektion gewaschen, so nahm der Expressionsgrad des Zweitkonstrukts zu; im Vergleich zu der nicht-gewaschenen Probe beeinträchtigte diese Prozedur jedoch nicht die Konversionsrate (Tab. 4.1(9)). Ein promotorloser Vektor, der lediglich EGFP codiert, wurde mit einem H2A–ECFP-Konstrukt kotransfiziert. Dieses Experiment führte ebenfalls zu Konversion (Tab. 4.1(13)), wobei ein promotorloser Vektor gegenüber einem exprimierenden Vektor das Hintergrundsignal reduziert und somit die Detektion von Konversionsereignissen erleichtert (Abb. 4.7(d)). Wegen potentieller genomischer Integration der Fluoreszenzprotein–Sequenz stromabwärts (*downstream*) zu anderen intrinsischen Promotoren kann das Signal jedoch nicht komplett unterdrückt werden. Die Ergebnisse machen deutlich, daß die Konversion weder durch das assoziierte Protein noch durch das Fluoreszenzprotein, den Promotor oder den Vektor beeinträchtigt wird. Es ist bekannt, daß lineare Plasmide und Strangbrüche den Effekt der homologen Rekombination sowie die Integration der DNA in ein Genom fördern (ANDERSON & ELIASON 1986, ELLIOTT *et al.* 1998, LIANG *et al.* 1998). Um die Heteroduplex-Bildung zu erleichtern, wurden die Vektoren linearisiert, bei +96 °C geschmolzen und durch langsames Abkühlen auf RT wieder renaturiert. Insbesondere in der Kombination mit dem Erhitzen nahm die Konversion erheblich zu (Tab. 4.1(11,12)). Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß ein sehr enger Kontakt oder extrazelluläres Aneinanderlagern der DNA-Stränge den Konversionsprozeß fördern, während die Konversion selbst innerhalb der Zelle stattfinden muß, vorzugsweise infolge von Rekombinations-/Reparatur-/Replikations-Aktivitäten (RRR). Um den kausalen Zusammenhang zwischen Sequenzähnlichkeit und Konversion zu zeigen, wurden die DNA-Konstrukte *H2A–DsRed* und *CB–ECFP* gemeinsam transfiziert. *DsRed* besitzt auf Nukleinsäureebene lediglich 22 % Sequenzähnlichkeit mit *ECFP* (Anhang, S.160) und eine Rekombination erscheint daher unwahrscheinlich. In der Tat ergab dieser Ansatz keine Konvertanten (Tab. 4.1(14)). Der Einfluß der Transfektionsmethode wurde mit Hilfe der Mediatoren DMRIE–C, CellFECTIN, Lipofectin, GibcoPlus sowie Kalziumphosphat untersucht, zusätzlich wurde die physikalische Transfektionsmethode der Elektroporation angewandt. Konvertanten tauchten in allen Fällen auf, jedoch in leicht unterschiedlichen Raten (Tab. 4.1(15–20)). HeLa- und COS–7-Zellen, welche oft in Transfektionsexperimenten benutzt werden, zeigten das Konversionsphänomen in gleicher Weise (Tab. 4.1(21–24)).

Sequenzanalyse. Der Austausch der Fluoreszenzprotein-Sequenzen wurde auf molekularer Ebene überprüft. Zunächst wurden Zellklone mit konvertierten Fluoreszenzeigenschaften angereichert (Abb. 4.7(b), S.84) und isoliert. Unterschiedliche Primersätze für Fluoreszenzprotein-, H2A- und Vektor-Sequenzen wurden für eine PCR-Amplifikation (Abb. 4.8(a), oben; S.85) extrahierter genomischer DNA-Bereiche eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden anschließend sequenziert (Anhang, S.172) und analysiert. Lediglich die Fluoreszenzprotein-Bereiche konnten amplifiziert werden; in Kombination mit stromaufwärts oder stromabwärts in der Vektorsequenz liegenden Primern wurden trotz mehrfacher Anläufe keine brauchbaren Resultate erzielt. Dies spricht dafür, daß die ins Genom integrierten Konstrukte mit der Fluoreszenzprotein-Sequenz enden. Im Unterschied zu den entsprechenden Kontrollen (Abb. 4.8(a), S.85; S.172) ergab die amplifizierte H2A-FP-Sequenz in den untersuchten Zellklonen einen kompletten Übergang von ECFP zu EYFP in allen 16 differierenden Basenpositionen.

Quantifizierung von Konversionsraten. Um die Austauschhäufigkeit festzustellen, wurden die Konversionsereignisse der Fluoreszenzprotein-Konstrukte bestimmt. Versuche, diese mittels FACS zu analysieren, waren nicht erfolgreich, weil die Signale weder anhand ihrer Größe noch anhand der intrazellulären Lokalisation der Fluoreszenzobjekte voneinander unterschieden werden konnten. Als Alternative hierzu bietet die Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit digitaler Bildverarbeitung die entscheidenden Vorteile: (i) Fluoreszenzübergänge können visuell direkt kontrolliert werden, (ii) Signal-Flächen-Schwellenwerte erlauben eine zuverlässige Detektion von Objekten. Ein Programmablauf aus mehreren „OpenLab“-Automationen wurde entwickelt, welcher eine interaktive objektive Evaluierung der Probe nach diesen Parametern erlaubt (Anhang, S.174).

Unter vereinfachten Bedingungen lassen sich theoretisch 15 verschiedene Expressionsmuster annehmen, von denen eines die erwünschte Expression, zwei die Expression der einzelnen Konstrukte und 12 andere weitere Konversionen repräsentieren. Abb. 4.7(c) (S.84) illustriert die Komplexität möglicher falsch-positiver Phänotypen, von denen die meisten experimentell nachgewiesen werden konnten. Die Konversion von EYFP nach CFP ist wegen geringer Sensitivität und diffuser Lokalisation von CB schwierig zu beurteilen. Daher filtert der angewandte Algorithmus entsprechend der Intensität und der Fläche, so daß lediglich Zellkerne oberhalb eines bestimmten Intensitätspegels für die Berechnung übrigbleiben (rot eingekreist in Abb. 4.7(c)). So wird lediglich die Konversion in eine Richtung erfaßt und deren Konversionsrate bestimmt (Gleichung (7), S.73). Die Kontrolle des Algorithmus durch manuelle Auszählungen der Basisexperimente ergab vergleichbare Resultate. Man muß davon ausgehen, daß Konversion einen bidirektionalen Prozeß darstellt und daß beide Konstrukte mit derselben Häufigkeit konvertieren. Gleichung (8) (S.73) beschreibt die Gesamtanzahl an Konvertanten und gibt so das volle Ausmaß an falschpositiven Expressionsmustern wieder. Für die Quantifizierung wurden die transfizierten Zellpopulationen durch eine G418-Selektion

auf exprimierende Zellen hin angereichert und eine statistisch relevante Anzahl von Zellen ($\sim 5 \times 10^3$) wurde detektiert und ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Nach einer Standard-Kotransfektion waren bis zu $\sim 8\%$ der permanent exprimierenden Zellen konvertiert (Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten). Modifizierung der DNA-Ansätze, die die Anlagerung begünstigte, erhöhte die Konversion bis $\sim 26\%$. Dieser Wert kommt nahe an den theoretischen Wert von 25% heran, welcher auf folgenden Annahmen basiert: (i) Werden die Doppelstränge zweier linearisierter Sequenzen geschmolzen und wieder hybridisiert, so entstehen vier gleichverteilte Kombinationen; (ii) RRR-Prozesse sind nicht in der Lage, zwischen den fehlgepaarten Strängen zu unterscheiden.

Tab. 4.1 Quantifizierung der Konversionsraten.

№	Konstrukt	Zelltyp	Transfektionsmethode		Konversion	
					+/-	R ₀ (%)
1	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	simultan	++	8,2
2	H2A-ECFP	LCLC [†]	FuGENE 6	einfach	-	0,0
3	CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	einfach	-	0,0
4	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	sek. Transf. einer stabilen Linie [‡]	-	1,9
5	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	getrennte Ansätze + simultan	+	$\geq 2,0$
6	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	1 ^o h Pause [‡]	+	$\sim 2,0$
7	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	2 ^o h Pause [‡]	+	$\sim 2,0$
8	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	4 ^o h Pause [‡]	+	2,0
9	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	4 ^o h Pause [‡] (ungewaschen)	+	$\sim 2,0$
10	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	8 ^o h Pause [‡]	+	$\sim 2,0$
11	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	simultan; lin.	++	6,7
12	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	FuGENE 6	simultan; lin. + 96 °C	+++	26,0
13	H2A-ECFP + EGFP (P [*])	LCLC [†]	FuGENE 6	simultan	+	$\geq 2,0$
14	H2A-DsRed + CB-ECFP	LCLC [†]	FuGENE 6	simultan	-	0,0
15	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	DMRIE-C	simultan	++	7,5
16	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	CellFECTIN	simultan	+	$\geq 2,0$
17	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	Lipofectin	simultan	++	$\geq 4,7$
18	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	GibcoPlus	simultan	+	$\geq 2,0$
19	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	CaPO ₄	simultan	+	$\sim 2,0$
20	H2A-ECFP + CB-EYFP	LCLC [†]	Elektroporation	simultan	+	$\sim 2,0$
21	H2A-ECFP	HeLa	FuGENE 6	einfach	-	0,0
22	H2A-ECFP + CB-EYFP	HeLa	FuGENE 6	simultan	++	n.q. [§]
23	H2A-ECFP	COS-7	FuGENE 6	einfach	-	0,0
24	H2A-ECFP + CB-EYFP	COS-7	FuGENE 6	simultan	++	n.q. [§]

* promotorlos; [†] LCLC-103H; [‡] konsekutiv; [§] n.q. = nicht quantifiziert

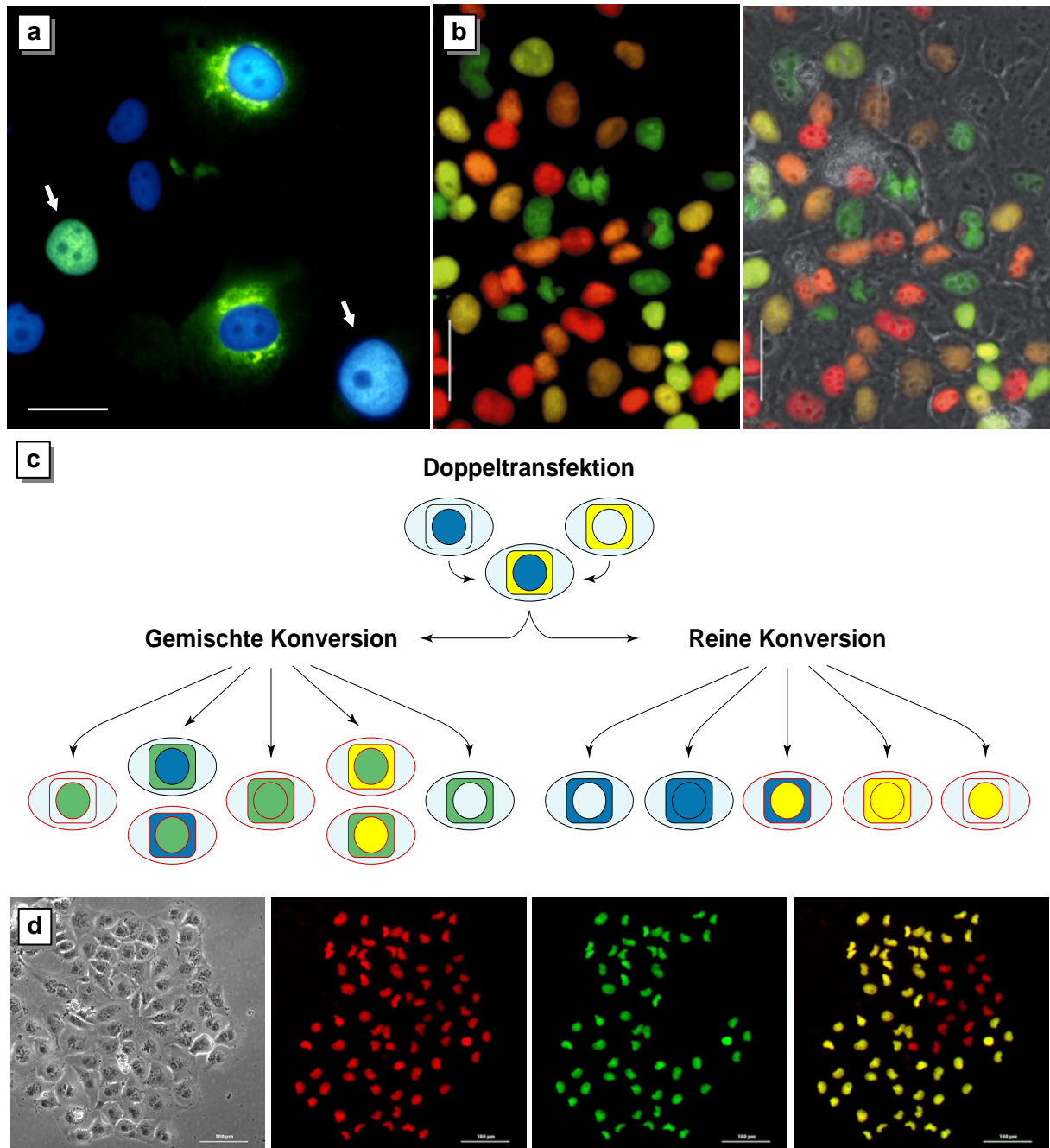


Abb. 4.7 Fluoreszenzaustausch durch simultane Kotransfektion. (a) LCLC-103H-Zellen, die mit *H2A-ECFP* und *CB-EYFP* stabil transfiziert wurden. Neben den erwarteten Expressionsmustern (zyanblaue Zellkerne und gelbes ER/Golgi) tauchen Zellen mit konvertiertem H2A-FP auf (Pfeile). (b) Mischpopulation, die auf konvertierte Zellen hin angereichert wurde (links: Überlagerung beider Fluoreszenzkanäle in Falschfarbendarstellung; rechts: zusätzliche Superposition mit der Phasenkontrastaufnahme). Zahlreiche konvertierte H2A-FP-Fluoreszenzsignale sind in den Zellkernen sichtbar (grün: CFP; rot: YFP; gelb: CFP+YFP). Obj. jeweils 20×/0,40 Luft; Größenbalken 50 μm (c) Darstellung theoretisch möglicher falsch-positiver Phänotypen; alle Möglichkeiten wurden experimentell belegt. Gemischte Konversion (grün) benötigt die Expression von beiden, sowohl dem richtigen, als auch dem konvertierten Fusionsprodukt. Die rot eingekreisten Fälle wurden benutzt, um die Konversionsrate R_{H2A} zu bestimmen. (d) Simultane Kotransfektion von H2A-ECFP (rot) mit einem promotorlosen EGFP-Vektor resultierte ebenfalls in Expression von H2A-EGFP (grün) und reduzierte den durch Zweitmarker wie CB-FP verursachten Signalhintergrund. Dargestellt sind zwei stabil transfizierte LCLC-103H-Zellklone aus einem Konversionsexperiment. Die Mischpopulation, die beide Fluoreszenzprotein-Marker beinhaltet, erscheint gelb in der Falschfarbendarstellung. Obj. 10×/0,30 Luft; Größenbalken 100 μm .

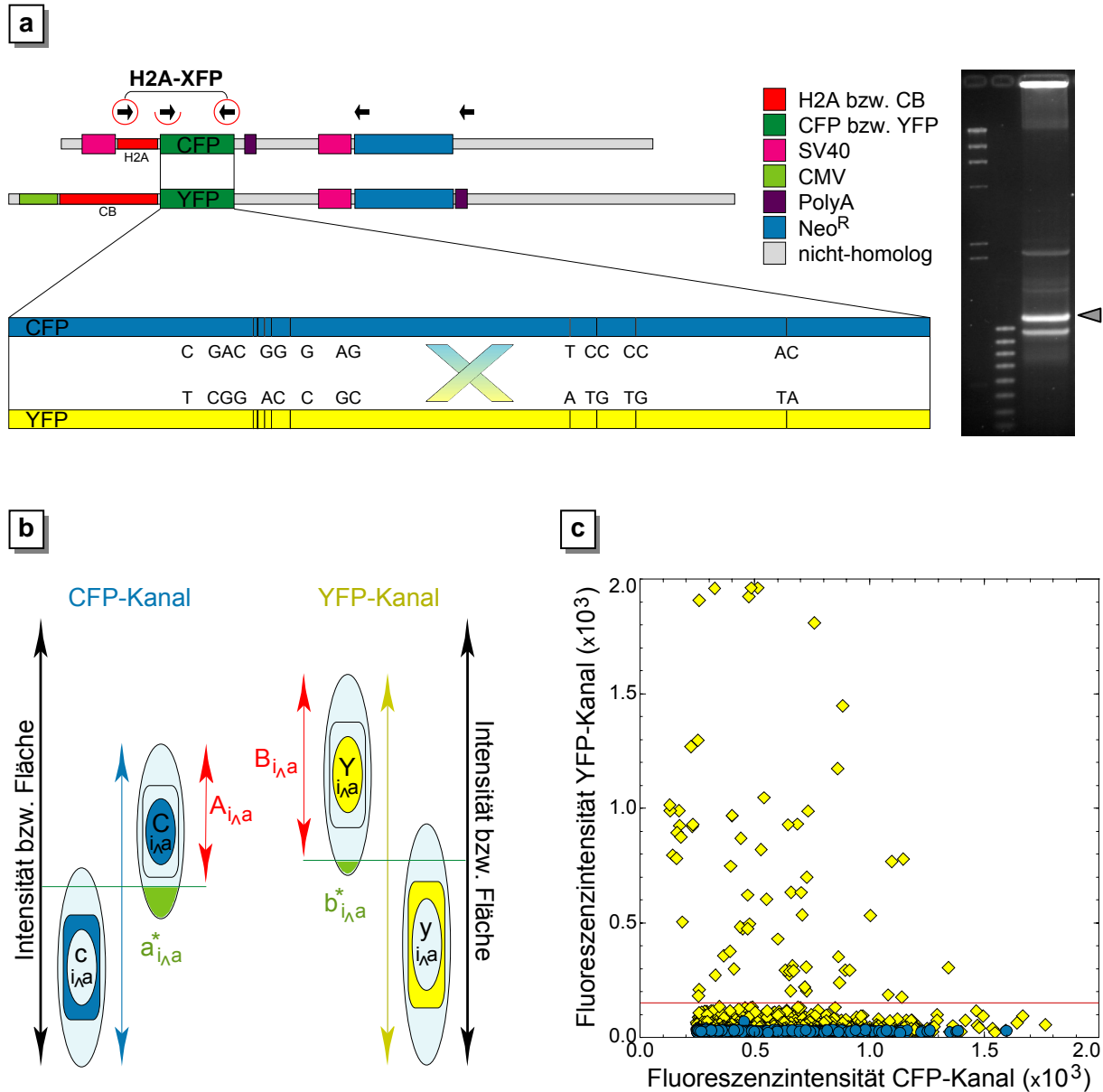


Abb. 4.8 Sequenzanalyse und Quantifizierung. (a) Der Sequenzvergleich von pSV-H2A-ECFP und pcDNA3-CB-EYFP ergibt nicht nur den 16 N-Unterschied zwischen ECFP und EYFP über einen Bereich von 718 N, sondern auch Homologien der Neo-Resistenzgene und des SV40-Promotors (Graphik links). Die Pfeile geben die Richtung von PCR-Primern an, die für die Überprüfung der Laufrichtung und der Konversion auf molekularer Ebene Verwendung fanden (eingekreiste \rightarrow). Die PCR der extrahierten genomischen DNA (Agarosebild rechts) ergab eine deutliche Bande bei 1,1 kBp (Pfeil). M₁ und M₂: Marker; P: Probe. Dies entspricht der Gesamtlänge von H2A-FP (b) Um die Konversion zu quantifizieren, wurden die Signale von H2A und CB aufgrund der unterschiedlichen Flächengröße und Intensitätsverteilung ($c_{i\lambda a}$ und $C_{i\lambda a}$; $y_{i\lambda a}$ und $Y_{i\lambda a}$) einzeln in beiden Fluoreszenzkanälen voneinander unterschieden. Die korrekte Konversionsrate ergab sich aus der Division der Anzahl konvertierter Zellkerne ($B_{i\lambda a}$) durch die Gesamtanzahl aller fluoreszierender Zellkerne ($A_{i\lambda a} + B_{i\lambda a} - (A_{i\lambda a} \wedge B_{i\lambda a})$). Dies geschieht unter der Voraussetzung, daß der Fehler der Verteilung $\alpha_{i\lambda a}^*$ and $\beta_{i\lambda a}^*$ in beiden Kanälen gleich ist. (c) Typischer Plot der Signalanalyse eines Standard-Kotransfektions-experiments von H2A-ECFP und CB-EYFP in LCLC-103H-Zellen. Wie erwartet, zeigten die meisten Zellkerne zyanblaue Fluoreszenz und eine geringe Anzahl von gelben Signalen aufgrund der nahangrenzenden Lokalisation von CB. Konvertierte Zellkerne werden durch einen Intensitätsschwellenwert (alle gelben \blacklozenge oberhalb der roten Linie) abgetrennt. Kontrollzellen mit einfacher H2A-ECFP-Expression (blaue \bullet) schlossen *crossstalk* zwischen den CFP- und YFP-Kanälen als Ursache für den Konversionseffekt aus.

4.1.4 Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die Zwei-Photonen-Mikroskopie (*two-photon microscopy*, TPM) hält aufgrund zahlreicher Vorteile zunehmend Einzug in die biomedizinische Forschung. Ein gravierender Nachteil ergab sich bislang u.a. aus dem Mangel an Zwei-Photonen-Spektren, die aufgrund der physikalischen Grundlagen (S.71) von den entsprechenden Ein-Photonen-Spektren abweichen können. Hier werden neben Zwei-Photonen-Absorptions- und Emissionsdaten für häufig in der Zellbiologie verwendete abiotische Fluorochrome, auch die Spektren für die weit verbreiteten Fluoreszenzprotein-Varianten ECFP, EGFP, EYFP und DsRed1 präsentiert. Vorzüge und Nachteile der TPE-Anwendung in der TPM werden exemplarisch an einem in mehreren Kanälen aufgenommenen und räumlich rekonstruierten Datensatz präsentiert.

Teile dieses Kapitels wurden publiziert (BESTVATER *et al.* 2002b, SPIESS *et al.* 2005).

Fluoreszenzspektren zellbiologisch relevanter Fluorochrome. TPE-Absorptions- (720–1150 nm) und Emissionsspektren (280–720 nm) wurden für eine Reihe von Fluorochromen generiert, welche als AK-Konjugate, für direkte Organellfärbung sowie für den Nachweis biochemischer oder physiologischer Prozesse in Zellstudien verwendet werden. Daneben wurden auch die *wt*GFP-Varianten EGFP, EYFP, ein rekombinantes H2A–ECFP-Konstrukt sowie DsRed1 in rohen und gereinigten Zellextrakten untersucht. Ein kompletter Rohdatensatz einer solchen Aufnahme ist exemplarisch für das EGFP in Abb. 4.9 (S.88) dargestellt. Die 3D–Oberflächenplots zeigen die Relation zwischen Absorption und Emission für jede aufgenommene Wellenlänge. Drei klar voneinander abgesetzte Absorptionsspitzen wurden gefunden, die in einem gemeinsamen Emissionsmaximum resultieren. Aus diesem Graphen lassen sich die relativen Emissionswerte für solche Excitationen ablesen, die außerhalb des Anregungsmaximums liegen. Dies ist von Interesse in Mehrfachmarkierungsexperimenten, in denen eine gemeinsame Anregungswellenlänge verwendet wird. Die aufgearbeiteten Daten, die über den Meßbereich integriert und hinsichtlich der Schwankungen in der kohärenten Laserenergie normiert wurden, sind in Abb. 4.10 (S.89) und Abb. 4.11 (S.90) dargestellt. In Tab. 4.2 (S.91) sind die korrespondierenden Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren für TPE und OPE zusammengestellt.

Die TPE-Absorptionsverläufe unterschieden sich häufig deutlich von den erwarteten, aus den zweifachen OPE-Daten abgeleiteten Werten, zum einen hinsichtlich ihrer Breite und zum anderen durch die ausgeprägteren lokalen Maxima, für die eine signifikante Verschiebung ins Kurzwellige (*blue-shift*) beobachtet wurde. Im Falle der Fluoreszenzproteine wurden neben dem Hauptabsorptionsmaximum mehrere lokale Absorptionsspitzen beobachtet.

Der Vergleich von TPE- und OPE-Emissionsmaxima der abiotischen Fluoreszenzmarker (Tab. 4.2, vgl. Tab. 3.6, S.41) ergab heterogene Ergebnisse. In 13 Fällen gab es keine signifikanten Unterschiede (± 7 nm) und 12 weitere Fluorochrome zeigten lediglich geringe Abweichungen (7–15 nm). Allerdings wurde im Falle von BODIPY TR ein gravierender

Unterschied (61 nm) gefunden. Sowohl Propidiumjodid (PI) als auch Aminomethylcoumarin (AMC) besitzen biphasische TPE-Emissionsspektren. Im Falle von PI stimmt das Nebenmaximum des TPE-Spektrums mit dem OPE-Maximum überein. Das TPE-Hauptmaximum bei 657 nm findet dagegen keine Entsprechung im zugehörigen OPE-Spektrum. Das lokale OPE-Maximum des freien PI bei 515 nm ist im TPE-Spektrum nicht vorhanden. Das TPE-Maximum von BODIPY TR fällt mit einem lokalen OPE-Maximum überein. Zusammengefasst sind beinahe alle Emissionsspektren rotverschoben. Die TPE- und OPE-Emissionsspektren der Fluoreszenzproteine ergaben keine signifikanten Unterschiede. Für beide Anregungsarten waren die globalen Absorptionsmaxima beinahe identisch. Während die OPE-Spektren eine breite Schulter in Richtung kurzer Wellenlängen aufwiesen, enthüllten die TPE-Spektren die vier Anregungszustände des GFP-Fluorophors viel präziser: (i) neutral, (ii) anionisch, (iii) zwitterionisch und (iv) instabil (WEBER *et al.* 1999; S.79). Emissionsspektren, die durch TPE erzeugt wurden, waren vergleichbar zu denen in OPE, jedoch waren die Schultern mit Ausnahme von ECFP weniger deutlich ausgeprägt. In allen Fällen zeigt die Lage der Maxima keine oder sehr geringe Abweichungen im Vergleich zu den zugehörigen OPE-Werten. Für DsRed1 wurden zwei Absorptionsspitzen gefunden mit annähernd gleich großen (1:0,96) Maxima bei 1030 nm bzw. 1120 nm. Dies steht im Kontrast zum OPE-Spektrum, welches lediglich Schultern im kurzwelligen Bereich bei 485 nm und 525 nm zeigt. Bei 950 nm (\cong 485 nm OPE-Schulter) war die TPE-Absorption mit 29 % des Maximalwertes sehr niedrig. In beiden Absorptionsmaxima erzeugte Emission war sehr ähnlich; beide Kurven zeigten Spitzen bei 589 nm und hatten ein Intensitätsverhältnis von 1:0,88. Für die 950 nm-Excitation betrug die Emission noch 62 % des Maximalwertes. Potentielle Einflüsse des Verdünnungspuffers auf die Fluoreszenzspektren konnten ausgeschlossen werden.

Zwei-Photonen-Mikroskopie. Permanent H2A-ECFP-exprimierende LCLC-103H-Zellen wurden auf eine Kollagenmatrix ausgesät und mit pEGFP-*Tub* übertransfiziert. 12 h nach der Transfektion wurden die Mitochondrien mit dem Lebendzellmarker MitoTracker Red CMX und die Zellkerne mit dem DNA-Marker Hoechst 33342 eingefärbt. Die Fluorochrome wurden bei 860 nm angeregt und nacheinander in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen detektiert. Abb. 4.12(a-d) (unten) zeigt in Form von Rohdaten ausgewählte optische Schnitte aus derselben Tiefenebene. Da lediglich eine Anregungswellenlänge für alle Fluorochrome verwendet wurde, variiert das S/N-Verhältnis sehr stark in den verschiedenen Kanälen. Die Effizienz der 860 nm-Anregung bezogen auf das Absorptionsmaximum der betreffenden Fluorochrome betrug 26,7 % für EGFP, 37,7 % im Falle von ECFP und unter 1 % für Hoechst 33342 und MitoTracker Red. Da EGFP eine \sim 3-fach höhere Intensität als ECFP besitzt, kompensiert dies offensichtlich dessen niedrigere Absorption bei 860 nm. Um einer Schädigung der Zellen durch anhaltende Bestrahlung vorzubeugen, wurde die Anzahl der Aufnahmen durch die Wahl eines geeigneten Ebenenabstands auf ein Mindestmaß reduziert.

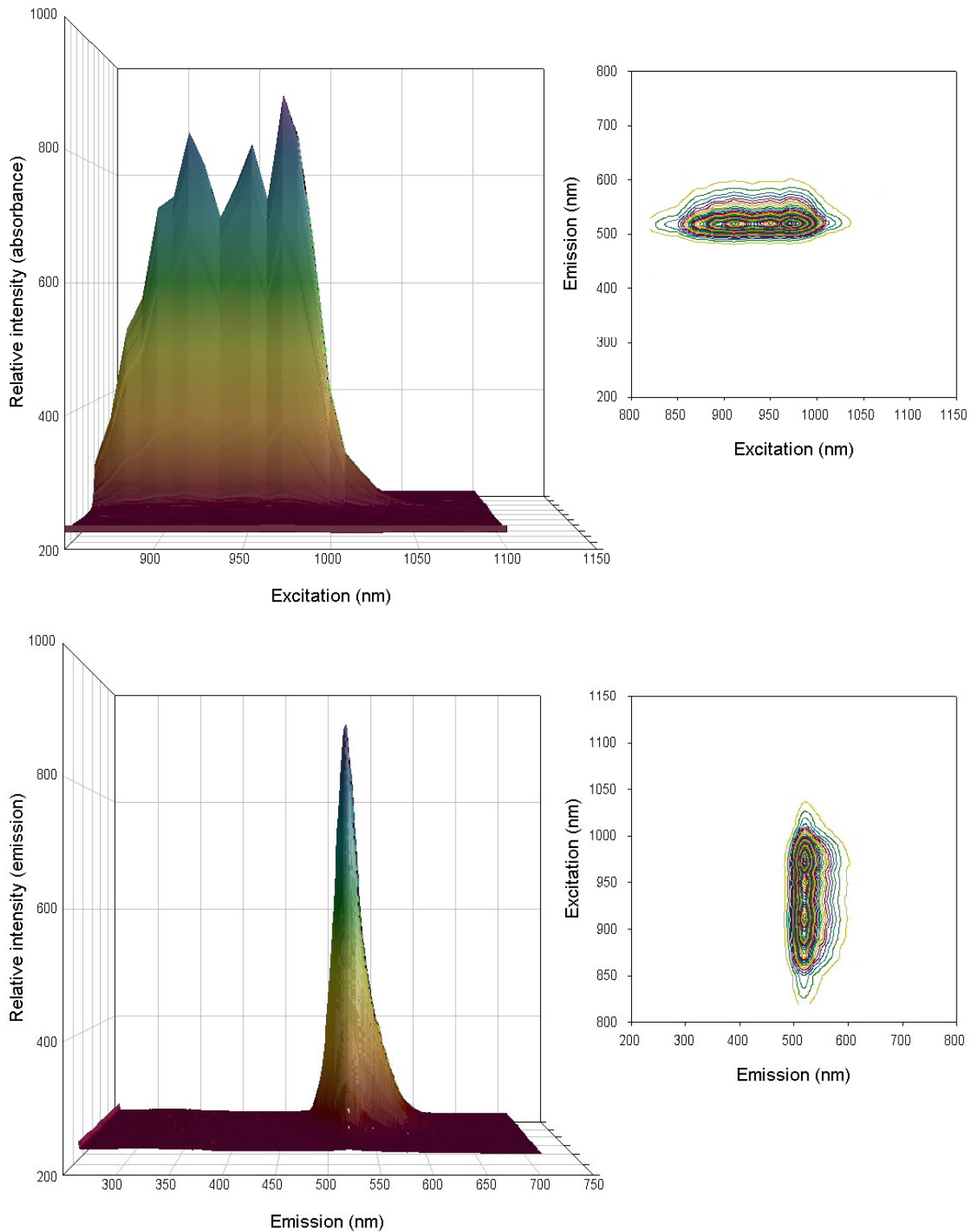


Abb. 4.9 Spektrale TPE-Rohdaten. Oberflächenrepräsentation (links) und Höhenlinienplots (rechts) der ursprünglichen TPE-Absorptions- und Emissionsdaten für EGFP, gemessen in einem LCLC-103H-Zellklon-extrakt. Die relative Fluoreszenzintensität (obere Tafel: Absorption; untere Tafel: Emission) ist als Funktion der Excitations- sowie Emissionswellenlängen dargestellt. Die Excitationswellenlänge wurde in 10 nm-Schritten erhöht, die Emissionsspektren wurden mit einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Für die weitere Auswertung wurden die kompletten Absorptionsdatensätze integriert um das S/N-Verhältnis zu verbessern und auf die Laserleistung korrigiert.

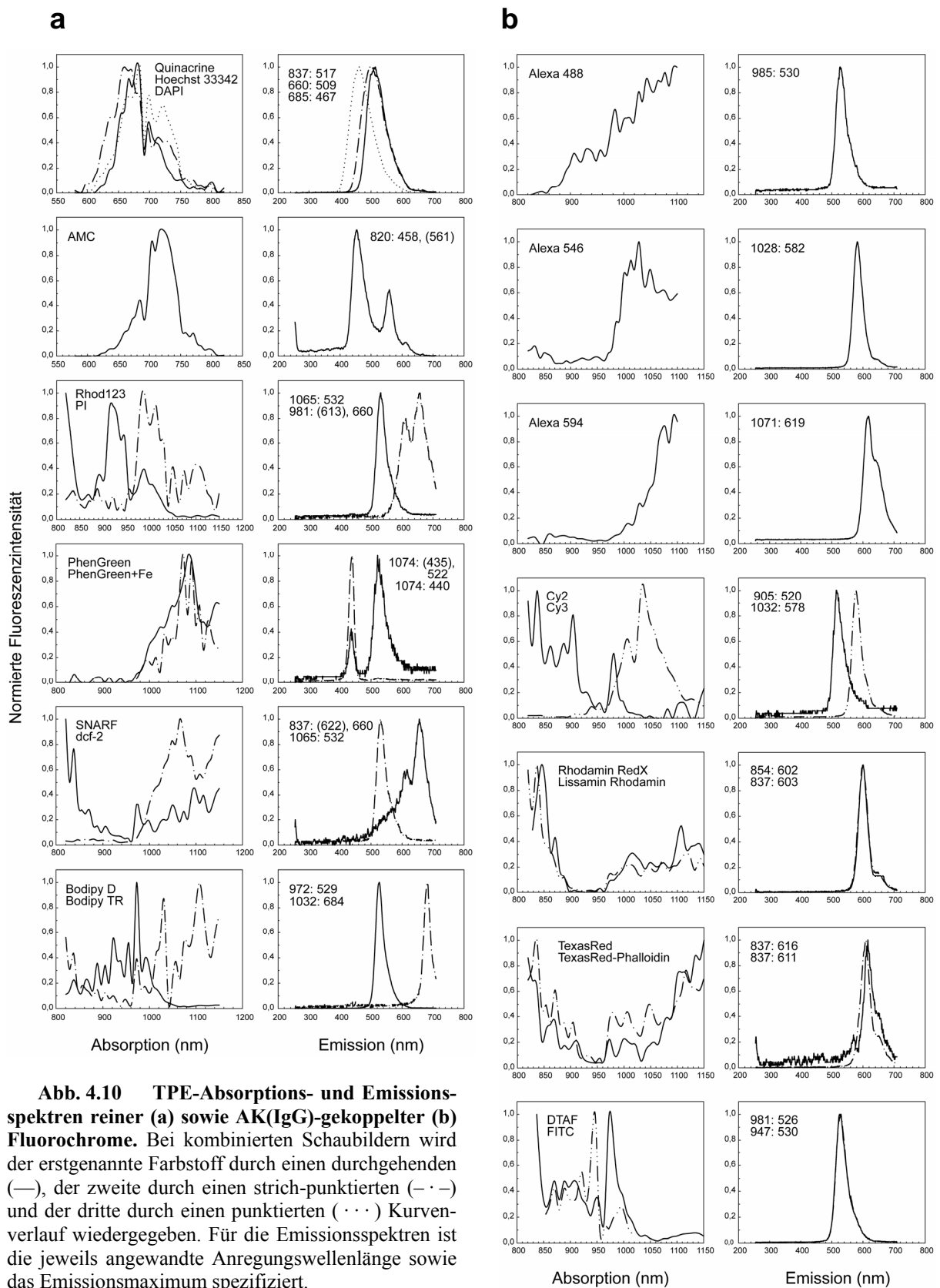


Abb. 4.10 TPE-Absorptions- und Emissionsspektren reiner (a) sowie AK(IgG)-gekoppelter (b) Fluorochrome. Bei kombinierten Schaubildern wird der erstgenannte Farbstoff durch einen durchgehenden (—), der zweite durch einen strich-punktierten (- · -) und der dritte durch einen punktierten (· · ·) Kurvenverlauf wiedergegeben. Für die Emissionsspektren ist die jeweils angewandte Anregungswellenlänge sowie das Emissionsmaximum spezifiziert.

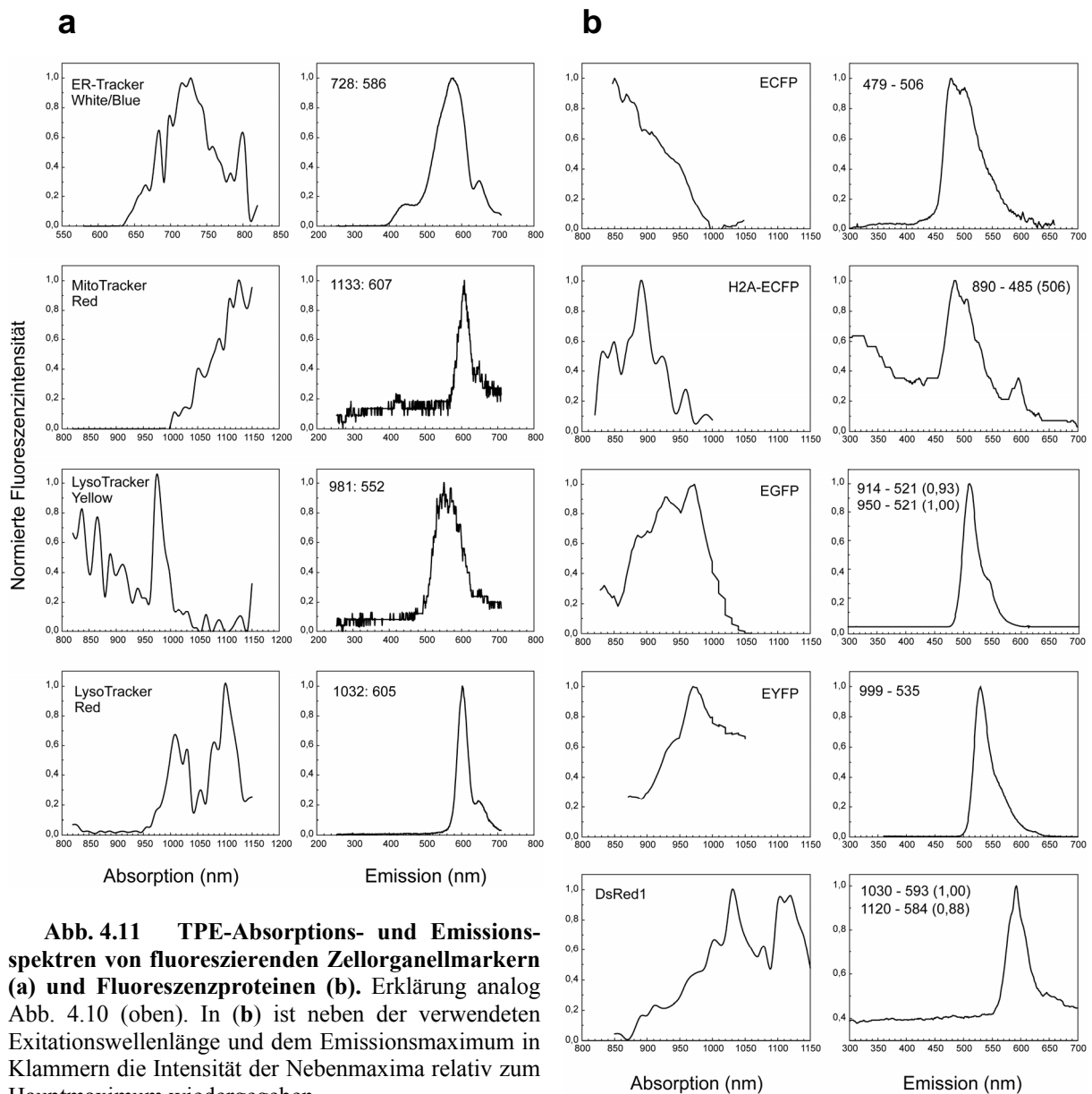


Abb. 4.11 TPE-Absorptions- und Emissionsspektren von fluoreszierenden Zellorganellmarkern (a) und Fluoreszenzproteinen (b). Erklärung analog Abb. 4.10 (oben). In (b) ist neben der verwendeten Excitationswellenlänge und dem Emissionsmaximum in Klammern die Intensität der Nebenmaxima relativ zum Hauptmaximum wiedergegeben.

Die Rohdaten wurden mit verschiedenen Systemen räumlich rekonstruiert. Jeder Bilderstapel setzte sich aus $512 \times 512 \times 64$ Voxeln zusammen ($\hat{=}$ 16 MB/Kanal), dies entspricht den physikalischen Volumenabmessungen von $108,6 \mu\text{m} \times 108,6 \mu\text{m} \times 31,5 \mu\text{m}$. Die mit dem Programm „Amira“ an einem herkömmlichen PC rekonstruierten Bilder wurden aus Rohdaten gewonnen (Abb. 4.12(e)). Die mit dem „AGS“-Programm durchgeführte Rekonstruktion basiert auf Daten, die vorher einer Dekonvolution unterzogen wurden (Abb. 4.12(f)). Für die Schwellenwertbildung wurden verschiedene Grauwertintensitäten gewählt. Die gerenderten Isoflächen sind zu Vergleichszwecken in ähnlichen Falschfarben dargestellt. Die Raumbilder geben einen komplexen Eindruck von der intrazellulären Fluorochromverteilung wieder. Bemerkenswert ist das fraktale Muster im Zellkern mit einer unvollständigen Überlappung des markierten Histons und der DNA.

Tab. 4.2 Vergleich von OPE/TPE-Absorptions- und Emissionsdaten.

Fluorochrom	TPE Absorptions-Maximum /nm	Absorptions-Shift 2× OPE → TPE /nm	TPE Emissions-Maximum bei Excitation /nm	Emissions-Shift OPE → TPE /nm
Reine Farbstoffe				
Acridin Orange	837 > 882 >> 981	—	548 (837)	—
AMC; Methylcoumarin	703 < 722 >> 863	+4	458 (820)	+11
BODIPY FL*	920 << 972	-38	526 (972)	+15
BODIPY TR*	1032 << 1108	-70	684 (1032)	+61
DAPI	685 > 697	-31	467 (685)	+6
DCF2 (H ₂ DCFDA)*	1065	+65	532 (1065)	±0
Hoechst 33342	660 > 715	-40	497 (660)	+10
Lissamin Rhodamin	837 >> 1116	-24	600 (837)	+5
PhenGreen-FL	1074	+90	435 << 522 (1074)	+5
PhenGreen-FL + Fe	1074	—	440 (1074)	—
Propidiumjodid (PI)	989 > 1015 >> 1099	-13	612 << 657 (981)	-5, +40
Quinacrin	678 (697)	-168	517 (837)	+14
Rhodamin 123	913 (1090)	-101	536 (947)	+7
SNARF-1	< 837	-200	622 << 660 (837)	+10
Organell-Marker				
ER-Tracker white/blue	728	-20	586 (728)	+11
LysoTracker Yellow	972	-104	435 << 552 (981)	±0
LysoTracker Red	1010 < 1100	—	605 (1032)	+15
MitoTracker Red	1133	-22	444 (1065) << 608 (1133)	+9
AK-Konjugate				
Alexa Fluor 488	985	+3	530 (985)	+15
Alexa Fluor 546	1028	-78	582 (1028)	+13
Alexa Fluor 594	1074	-114	619 (1074)	+9
Cy2-IgG	837 < 905 > 981	-73	520 (905)	+14
Cy3-IgG	1032	-84	578 (1032)	+5
F-DTAF-IgG	< 820; 820 > 837 > 972	-8	527 (981)	+7
FITC-IgG	947	-39	530 (947)	+5
RedX-IgG	845 >> 1108	—	602 (854)	±0
TexasRed-IgG	1108 < (> 1150)	—	616 (837)	±0
TexasRed-Phalloidin	> 1150	—	611 (837)	+9
Fluoreszenzproteine				
ECFP	890	+11	488 (890)	+11
EGFP	950	-14	521 (950)	+13
EYFP	99–1000	-14	535 (990–1000)	+8
DsRed1	1030 1120	±0	589 (1030) 589 (1120)	+6

* DMSO als Lösungsmittel

Wegen der sukzessiven Aufnahme der Bilderstapel und der (intra)zellulären Bewegungen sind exakte Aussagen über die Lokalisation mit diesem Verfahren nicht möglich. Trotz Dekonvolution auf der Basis einer physikalisch ermittelten PSF konnten das mitochondriale und das retikuläre Netzwerk nicht im Detail aufgelöst werden. Im Gegenteil, die stringente Wahl der Dekonvolutionsparameter führte zu einem weniger aufgelösten Resultat als im Falle der unbehandelten Rohdaten. Ein leichtes Photobleichen ohne offensichtlichen Photoschaden wurde festgestellt; die Zellvitalität wurde nicht nachhaltig beeinträchtigt. Weitere Beispiele für TPM finden sich an anderer Stelle dieser Arbeit (Abb. 3.3, S.69).

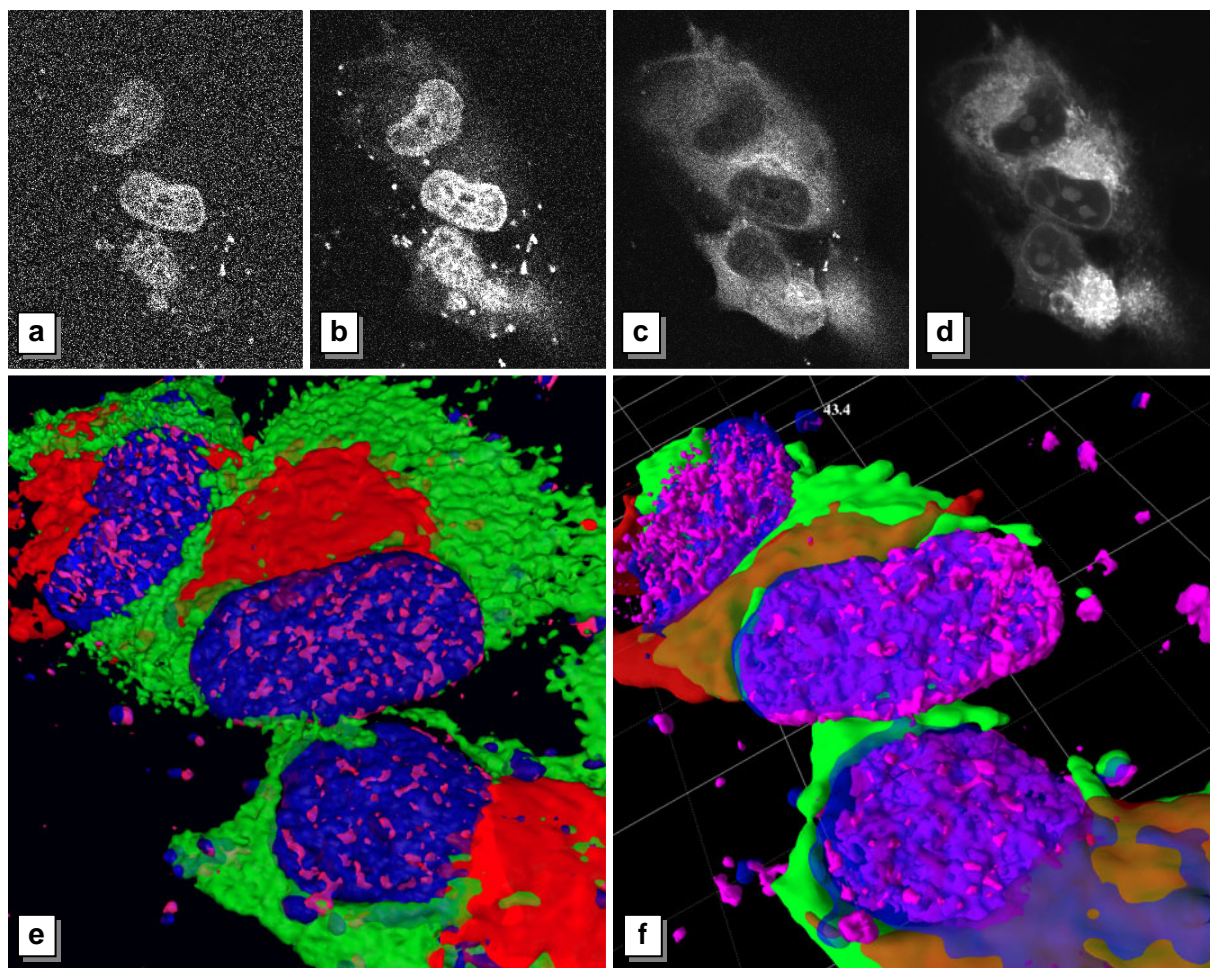


Abb. 4.12 3D-Rekonstruktion. Räumliche Darstellung von vier verschiedenen Fluoreszenzmarkern in lebenden LCLC-103H-Zellen auf einer Kollagen-Matrix: (i) pink: Zellkern-DNA angefärbt mit Hoechst 33342, (ii) blau: mit H2A-ECFP markierte Kernhistone, (iii) grün: Microtubuli, visualisiert durch EGFP-Tub, (iv) rot: Mitochondrien, markiert mit MitoTracker Red. Die Rohdaten wurden durch TPM (Obj. 60×/1,2 Wasser) bei einer Anregungswellenlänge von 860 nm mit einer 5 mW Grund-Laserleistung gewonnen. Die Fluoreszenz wurde bei verschiedenen Emissionswellenlängen detektiert. Die kleinste physikalische Volumeneinheit betrug $0,213 \mu\text{m} \times 0,213 \mu\text{m} \times 0,500 \mu\text{m}$ ($= 0,0227 \mu\text{m}^3$). (a–d) repräsentieren Fluoreszenz-Rohdaten aus derselben Schnittenebene: (a) Hoechst 33342 (440/10 nm), (b) ECFP (470/30 nm), (c) EGFP (510/20 nm) und (d) MitoTracker Red (620/60 nm). Rohdaten (e) sowie durch Dekonvolution aufgearbeitete Daten (f) wurden mit unterschiedlichen Programmen rekonstruiert. Die subjektive Wahl von Prozessierungsparametern spiegelt sich in der Signalverteilung wider: durch eine rigorose Anwendung von Dekonvolutionsmethoden können Details „weggerechnet“ werden (s. Microtubuli) und suggerieren dem Betrachter eine gänzlich andere Lokalisation.

4.2 *IN VIVO*-CHARAKTERISIERUNG VON KATHEPSIN B

Dieses Kapitel beschäftigt sich damit, wie CB in Zellen sortiert wird, inwieweit es in das extrazelluläre Medium sezerniert wird bzw. in Assoziation mit der Plasmamembran verbleibt, welche enzymatische Aktivität es innerhalb und außerhalb der Zellen entwickelt und auf welche Art und Weise es inhibiert werden kann. Für diese Fragestellung wurde ein rekombinantes Fusionskonstrukt zwischen CB und EGFP hergestellt und auf seine Expression und Prozessierung hin kontrolliert. Die intrazelluläre Expression wurde auf Transkriptionsebene mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung untersucht und die Adressierung von CB-FP-Varianten sowie hiervon abgeleiteter Konstrukte lichtmikroskopisch bestimmt. Neben dem Einfluß der Fusionsprodukte auf das Zellverhalten wurde deren enzymatische Aktivität extra- und intrazellulär erfaßt. Ein neuartiger Inhibierungsansatz wurde getestet, bei dem synthetische Inhibitoren natürlichen Ursprungs sowie ein genetisch modifizierter Inhibitor zum Einsatz kamen.

4.2.1 Klonierung des Vollängenprodukts

Als Edukt für die Mutagenese und alle weiteren Studien diene eine bereits bekannte humane *CB*-cDNA-Sequenz, welche wie in §3.4.9 beschrieben nach einer PCR-Amplifikation in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Abb. 3.1, S.42) kloniert wurde. Das Fusionsgen besteht aus der kompletten *CB*-Sequenz ohne die codierende Region für das C-terminale Pro-Peptid (Vollängenprodukt, *full-length message*; CB(FLM); Abb. 2.2, S.18) sowie aus dem *EGFP*-Gen (Abb. 4.13). Das Pro-Peptid wurde entfernt, um ein mögliches Abspalten des C-terminalen Fluoreszenzproteins an dieser potentiellen Spaltungsstelle des CB zu verhindern.

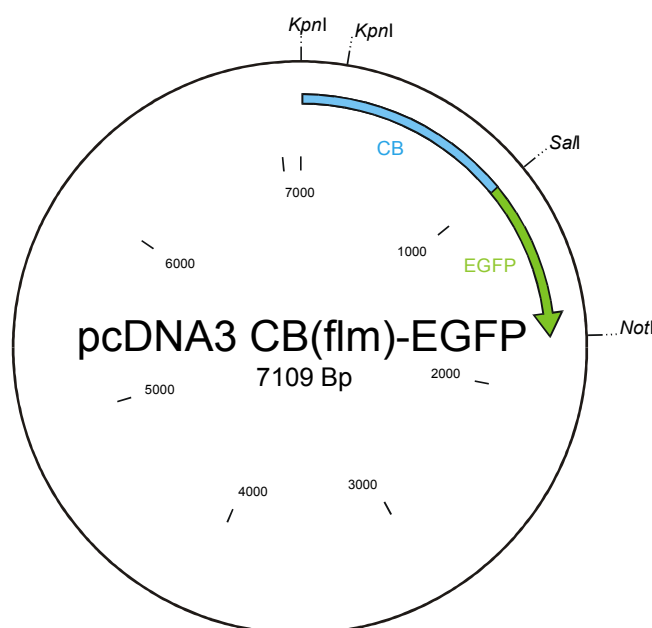


Abb. 4.13 Klonierung der *hCB*-cDNA. Das offene Leseraster (*open reading frame*) des pcDNA3-Inserts beginnt mit dem ersten Start-Codon des *CB* und endet mit dem Stop-Codon des *EGFP*. Sequenzabschnitte im Promotorbereich von *CB*, welche die Transkription des Fusionsgens beeinflussen könnten, wurden weggelassen. Die Transkription steht unter der Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden CMV-Promotors. Die Sequenz, die das C-terminale Pro-Peptid des *CB* codiert, wurde eliminiert, um ein mögliches intra- bzw. inter-molekulares Abspalten des Fluoreszenzmarkers zu verhindern.

4.2.2 Expression und posttranslationale Prozessierung

mRNA-Expression. Die Transkription der rekombinanten *CB*-Konstrukte wurde in LCLC-103H-Zellen mittels der *in situ*-Hybridisierung (S.66) überprüft. Dazu wurden von einem *CB*-codierenden Transkriptionsvektor Digoxigenin-markierte RNA-Sonden (*sense*- und *α-sense*) hergestellt (§3.4.11; Anhang, S.167) und gegen nicht-transfizierte LCLC-103H-Zellen sowie permanent exprimierende *CB*(FLM)-*EGFP*-Zellklone hybridisiert.

Wie die Intensitätsverteilung des Präzipitats belegt, war die *CB*-spezifische Transkription in den permanent exprimierenden Zellen gegenüber der intrinsischen *CB*-mRNA der nicht-transfizierten Kontrolle stark (~3-fach) erhöht (Abb. 4.14(a,b), unten). Als Negativkontrollen wurden Zellen ohne markierte Hybridisierungssonde (Abb. 4.14(c,d)), mit *sense*- statt *α-sense*-Sonde (Abb. 4.14(e,f)) sowie ohne Primär-AK (Abb. 4.14(g,h)) verwendet. Erwartungsgemäß wiesen die Kontrollzellen keine Signale auf.

Prozessierung. Die posttranslationale Prozessierung des rekombinanten Fusionsproteins wurden mittels Immunoblot analysiert. LCLC-103H-Zellen wurden mit *CB*(FLM)-*EGFP* bzw. *CB*(SC)-*EGFP* (Einzelkettenform* des *CB*; Abb. 2.2, S.18) transfiziert, bei Erreichen der maximalen Expressionsrate (~24 h nach der Transfektion) mit Ultraschall aufgeschlossen und nach einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Entsprechend wurde mit konstitutiv exprimierenden Zellklonen verfahren; die Prozessierung von *CB* wurde hier mit einer Tubulin-Expressionskontrolle (*EGFP*-Tub) verglichen.

Im Falle der transienten Expression (Abb. 4.15(a), S.96) läßt die Größe der *CB*(FLM)-*EGFP*-Proteinbande (74 kDa) auf ein vollständiges und daher ungeschnittenes Produkt schließen. Auch die Einzelkettenform von *CB* führte mit 62 kDa Gesamtgröße nicht zu dem regulären Spaltprodukt. Im Gegensatz dazu wurde bei permanenter Expression (Abb. 4.15(b)) das Fusionsprodukt *CB*(FLM)-*EGFP* in Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Werten (*CB*(FLM): 37,8 kDa) und den auf SDS-PAGE basierenden Literaturwerten (Pro-Form: 38 kDa; Einzelkettenform: 30 kDa; schwere Kette: 25 kDa; leichte Kette: ~5 kDa) prozessiert†. Natives *CB* liegt in Zellen als ein Gemisch verschiedener Prozessierungsstufen vor, das hauptsächlich aus den teilaktiven Einzel- und Doppelkettenformen besteht. Diese bilden unterschiedlich glykosylierte Isoformen aus (vgl. Abb. 4.15(b)). Auf eine exakte Identifizierung der Proteinfragmente durch Ansequenzieren wurde verzichtet. Vollständig abgespaltenes Fluoreszenzprotein wurde nicht nachgewiesen, die größte Fraktion blieb an das rekombinante *CB* gekoppelt. Eine eindeutige Erklärung für die fehlende analoge *α*-*CB*-Färbung dieser Proteinfragmente konnte nicht erbracht werden. Möglicherweise kommt es aufgrund des GFP-Markers zu einer sterischen Behinderung der Antikörper-Kopplung.

* Künstlich trunkierte *CB*-Konstrukte wie das *CB*(SC)-*EGFP* werden gesondert behandelt (§4.3, S.114).

† Daher wurden von den meisten Konstrukten Zellklone hergestellt und daraus permanente Zelllinien abgeleitet.

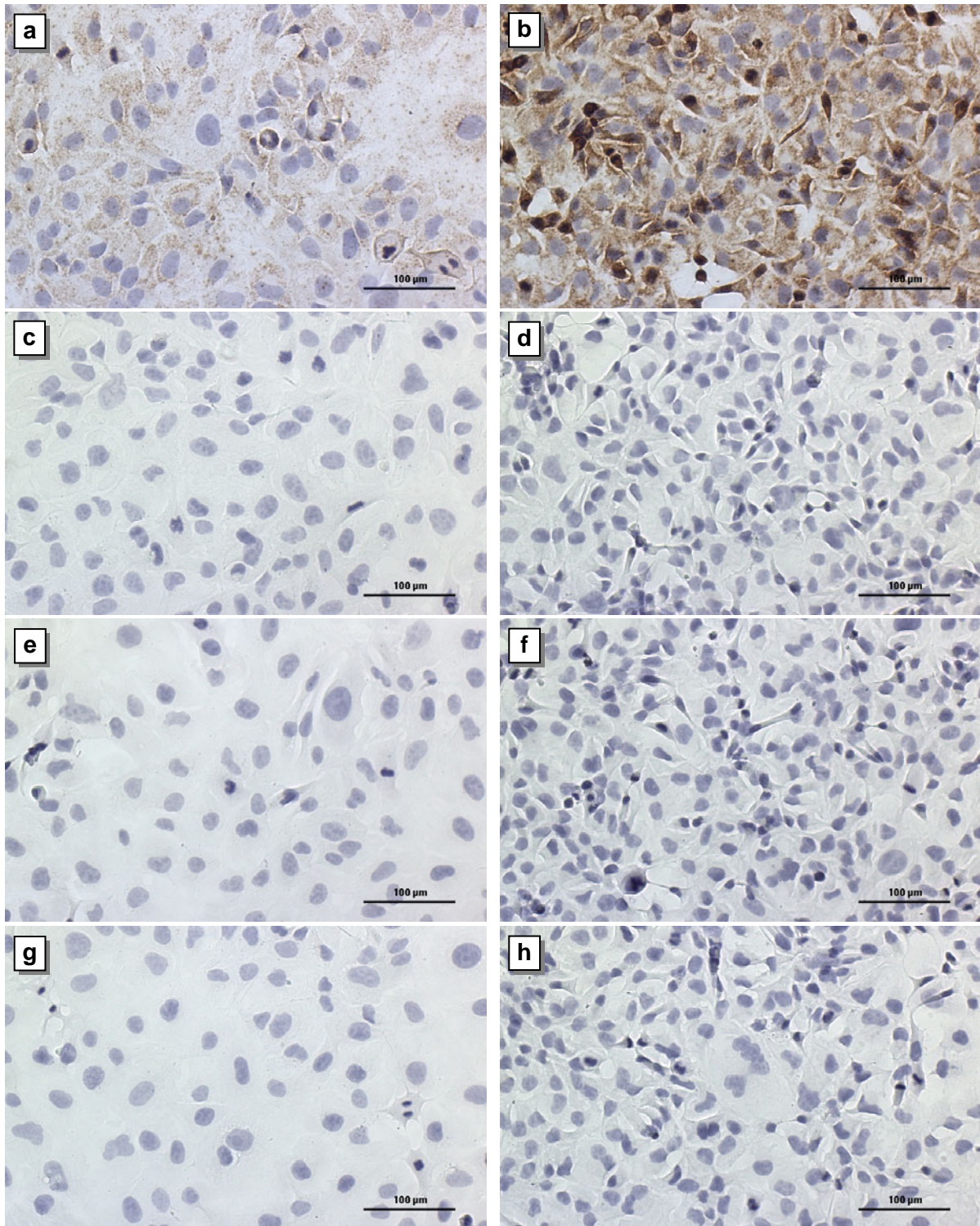


Abb. 4.14 CB-Transkriptionsnachweis durch *in situ*-Hybridisierung. *CB*-mRNA wurde durch die Hybridisierung mit einer Peroxidase-markierten „Ribosonde“ in LCLC-103H-Kontrollzellen (links) sowie in dem permanent CB(FLM)-EGFP exprimierenden Klon 001 (rechts) nachgewiesen. Dabei wurde das Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) zu einem braunfarbenen Präzipitat umgesetzt. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxilin gegengefärbt. Die *CB*-spezifische Transkription mit der α -sense-Hybridisierungssonde war beim rekombinanten Zellklon (b) gegenüber der unbehandelten Kontrolle (a) signifikant (~ 3 -fach) erhöht. Alle drei Negativkontrollen wiesen wegen der hohen Stringenz der Hybridisierungsprozedur einen vernachlässigbar geringen Signalpegel auf. (c,d) Sondenkontrolle: fehlende Hybridisierungssonde. (e,f) Hybridisierungskontrolle: sense- statt α -sense-Sonde. (g,h) AK-Kontrolle: fehlender Primär-AK. Für die Farbaufnahmen wurde ein ansteuerbarer Flüssigkristall-Farbfiler (CRI) verwendet. WFM; Obj. 10 \times /0,30 Luft; Größenbalken 100 μ m.

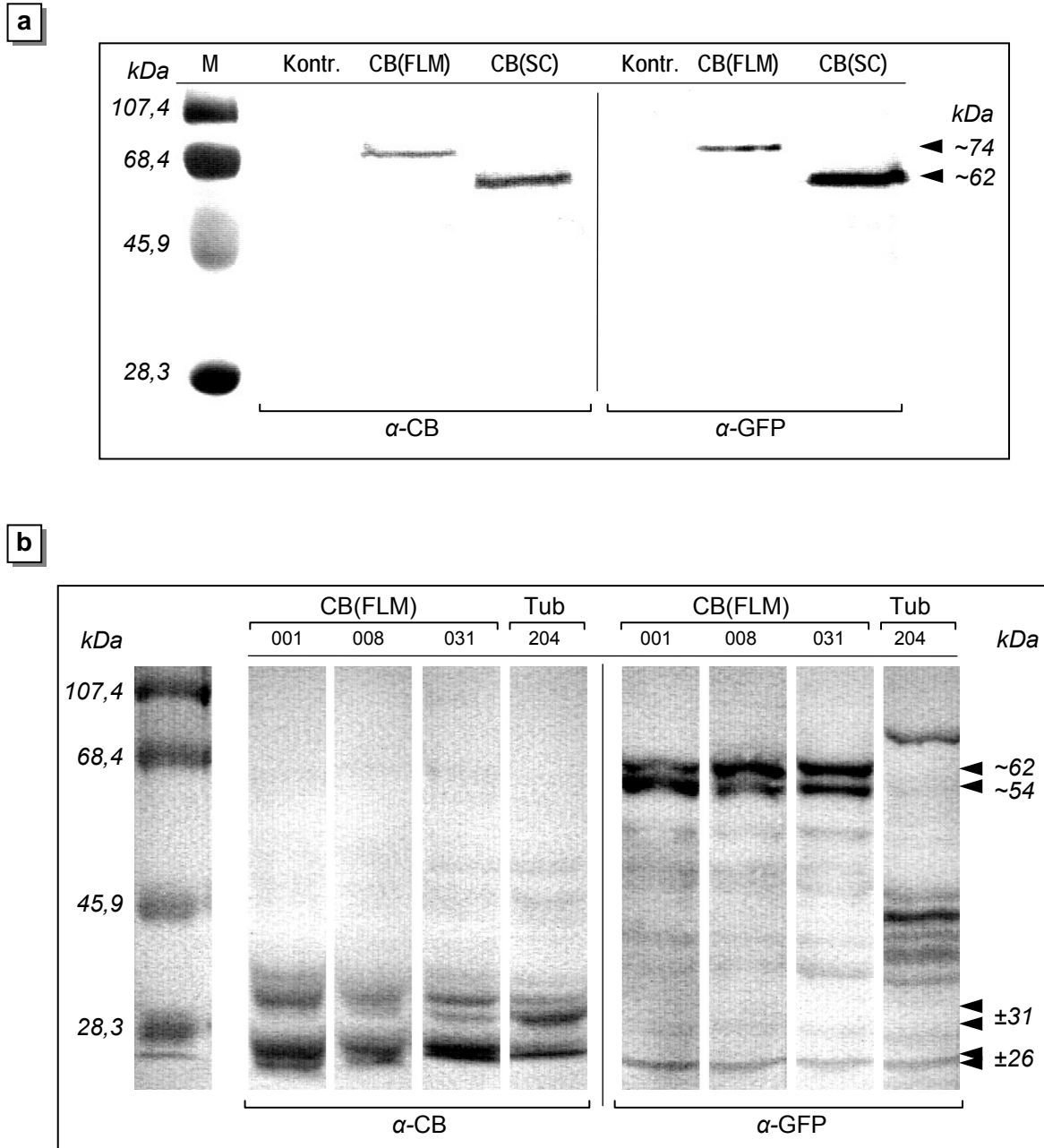


Abb. 4.15 CB-Prozessierung. (a) *Transient* CB(FLM)-FP und CB(SC)-FP exprimierende LCLC-103H-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mittels Western-Blot analysiert. Einzelbanden im Bereich von ~74 kDa (CB(FLM)-FP) sowie ~62 kDa (CB(SC)-FP) belegen, daß keines der beiden Expressionsprodukte signifikant prozessiert wurde. Geht man von intakten Fusionsproteinen aus, so entsprechen die Resultate den theoretischen Überlegungen. Im Gegensatz zur transienten Expression zeigen *permanent* exprimierende CB(FLM)-EGFP-Zellklone (b; LCLC103H-Klon 001, 008, 031) eine korrekte Prozessierung des CB. Ein EGFP-Tubulin-Zellklon (Klon 204) wurde als Kontrolle, die lediglich intrinsisches CB exprimiert, mit aufgetragen. Bei allen CB(FLM)-Zellklonen sind lediglich im Bereich um ±26 und ±31 kDa Proteinbanden mit Nebenbanden zu sehen, die den theoretischen Werten der CB-Einzelkettenform bzw. der schweren Kette entsprechen. Der Vergleich mit der EGFP-Tubulin-Kontrolle ergibt ähnliche Bandenintensitäten und läßt bei gleicher aufgetragener Proteinmenge auf keinen zusätzlichen Beitrag des rekombinanten CB zum endogenen schließen. Die Nebenbanden entsprechen unterschiedlich glykosylierten Isoformen des CB. Die Hauptbanden in der α-GFP-Färbung bei ~62 kDa und ~54 kDa repräsentieren mit hoher Wahrscheinlichkeit die Pro- bzw. die Einzelkettenform von CB(FLM)-EGFP. Ein analoger Vergleich zur transienten CB(SC)-EGFP-Expression war nicht möglich, da die stark toxische Wirkung von CB(SC) auf die Zellen die Gewinnung konstitutiv exprimierender Zellklone nicht zuließ (S.131).

4.2.3 Wachstum und Morphologie transfizierter Zellen

Die Überexpression einer Peptidase kann einen erheblichen Eingriff in den Metabolismus der Zelle bedeuten. Hier wurde untersucht, inwieweit eine transiente bzw. konstitutive Expression von rekombinantem CB(FLM)–FP Einfluß auf das Zellwachstum ausübt.

Transiente Expression. LCLC–103H-Zellen wurden zu $0,5 \times 10^5$ Z/Ansatz in 6-well-Kulturplatten eingesät und am folgenden Tag mittels FuGENE 6 jeweils mit CB(FLM)–EGFP sowie zwei weiteren Fluoreszenzprotein-Konstrukten (EYFP bzw. CB(SC)–EGFP) transfiziert. Das Zellwachstum wurde daraufhin in den folgenden beiden Tagen erfaßt (Abb. 4.16). Die scheintransfizierte LCLC–103H-Kontrolle wurde analog zu den anderen Ansätzen lediglich mit dem Transfektionsagens behandelt.

In den ersten 16 h nach der Transfektion ging in allen Ansätzen die Zellzahl um $\sim 1/3$ – $2/3$ zurück. Dies läßt sich auf die Toxizität des Transfektionsagens zurückführen. Während sich die Kontrollzellen im weiteren Zeitverlauf schnell erholten und in exponentielles Wachstum übergingen, kam es in den Transfektionsansätzen nach einem steilen Anstieg zu einem abrupten Abfall 48 h nach der Transfektion. Die Abnahme der Zellzahl erfolgte somit unmittelbar nach einer beobachteten maximalen Proteinexpression sowie Fluoreszenz bei ~ 30 h. Zwischen den Zellzahlen der verschiedenen Transfektionsansätze waren tendenzielle, jedoch keine eindeutig signifikanten Unterschiede erkennbar.

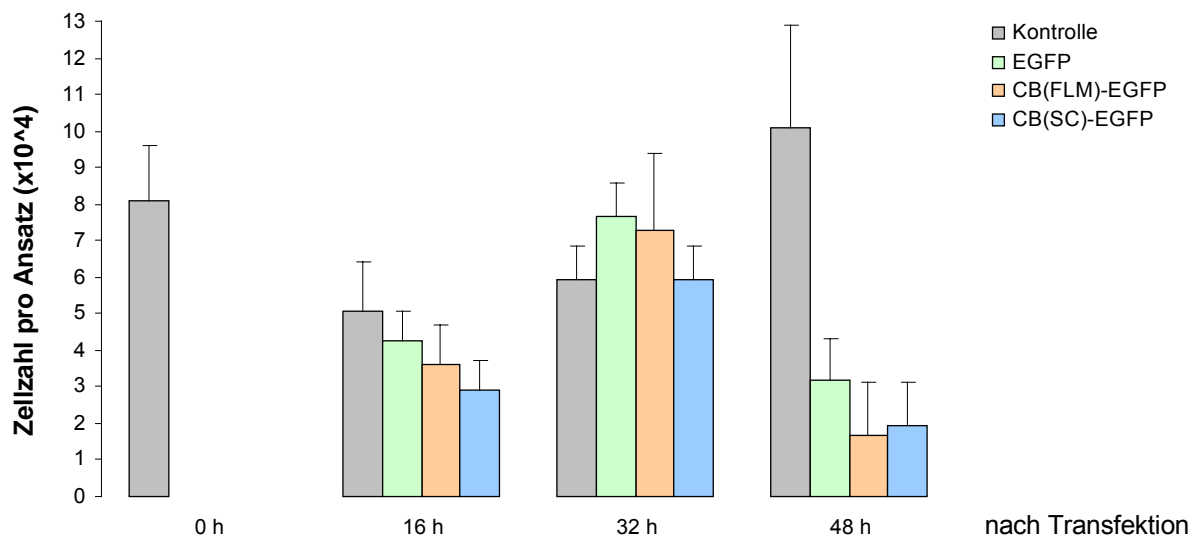


Abb. 4.16 Wachstumsverlauf transient exprimierender LCLC–103H-Zellen. Die toxische Wirkung des Transfektionsagens beeinträchtigte in den ersten 16 h nach der Transfektion das Zellwachstum aller Zellen gleichermaßen. Während sich die Gesamtzellzahl in den Transfektionsansätzen in den folgenden 16 h nahezu verdoppelte, zeigten die scheintransfizierten Kontrollzellen eine sehr geringe Wachstumsrate. Etwa 48 h nach der Transfektion sank die Anzahl der Zellen in den Transfektionsansätzen rapide ab, während sie in der Kontrolle weiter zunahm. Da es zwischen den verschiedenen Konstrukten keine wesentlichen Unterschiede im Wachstumsverlauf gab, geht die Abnahme der Zellzahl hauptsächlich auf die Überexpression des extrinsischen Proteins zurück. Jeder Balken repräsentiert 2 unabhängige Zellkulturansätze mit jeweils 3 Messungen.

Konstitutive Expression. Es wurde untersucht, welchen Einfluß die permanente Expression und die damit verbundene Überexpression der rekombinanten Proteine auf das Zellwachstum ausüben. Für verschiedene Zellklone mit unterschiedlich hohen Expressionsraten (CB(FLM)–EGFP: 001, 008, 009, 031; EGFP: 103, 105; EGFP–Tub: 205) wurde eine Wachstumskinetik aufgenommen (Abb. 4.17).

Permanent überexprimierende CB-Zellklone zeigten gegenüber der Kontrolle einen leicht verzögerten Verlauf und eine geringere maximale Zelldichte bei Ende des Experiments nach 5 d. Lediglich bei EGFP–Tub wurde ein signifikanter Einfluß des überexprimierten Produkts auf das Wachstumsverhalten beobachtet. Die in diesem Fall registrierten Schwankungen der Zellzahl könnten mit dessen Implikation im Zellzyklus zusammenhängen; das Phänomen wurde jedoch nicht weiter untersucht.

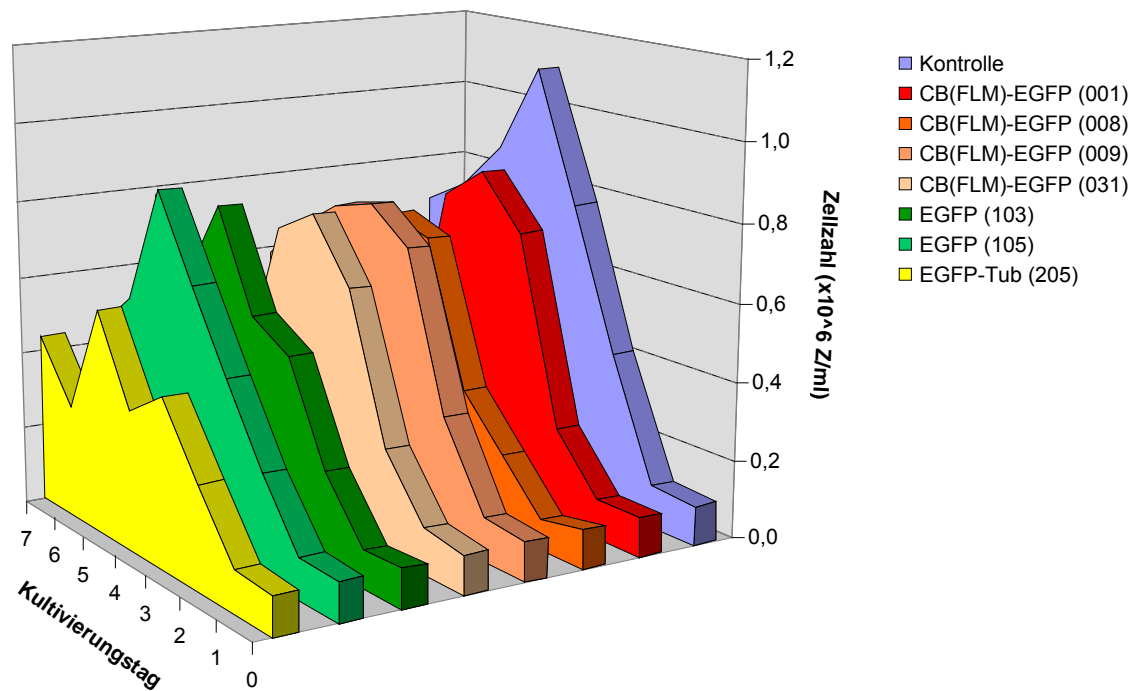


Abb. 4.17 Wachstumskurven konstitutiv überexprimierender Zellklone. Von jedem Zellklon wurden mehrere Parallelkulturen angesetzt und jeweils 2 davon täglich ausgewertet. Gegenüber der nicht-transfizierten Kontrolle (LCLC–103H), erschien das Wachstum der permanent exprimierenden Kulturen leicht retardiert (EGFP-Zellklone 103, 105 und EGFP–Tub-Zellklon 205), wobei in sämtlichen Fällen die Zellzahlen unter dem Maximalwert der Kontrolle blieben. Jeweils drei Messungen in zwei unabhängigen Parallelkulturen.

Zellmorphologie. Gegenüber den nicht-transfizierten Kontrollzellen sowie anderen Zellklonen zeichneten sich die CB(FLM)–FP exprimierenden Zellen durch eine stechapfelförmige Morphologie und eine geringere Adhäsionsfähigkeit aus. Darüber hinaus bildeten die CB–überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den gleichmäßig als Monolayer wachsenden Kontrollzellen Zellaggregate, welche morphologisch den mikroskopischen invasiven Tumorfoci (*foci, nodules*) ähneln.

4.2.4 Intrazellulärer Transport

Die intrazelluläre Verteilung des CB wird im Wesentlichen durch das N-terminale Signalpeptid bestimmt, welches das im Zytosol synthetisierte Zymogen in das ER adressiert. Glykosylierung von CB führt zu einer weiteren Sortierung gemäß dem Mannose-6- P -Weg, wobei alternative Sortierungsmechanismen nicht auszuschließen sind (§2.3.1). Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden folgende Fluoreszenzprotein-markierte Konstrukte hergestellt: (i) das CB-Vollängenprodukt CB(FLM)* und (ii) das hiervon abgeleitete Präpro-Fragment CB(PREPRO)[†] sowie (iii) ein ER-Fluoreszenzmarker[‡] (ER).

Als Standard-Zellsystem für die Lokalisationsstudien dienten LCLC–103H-Zellen (§3.6.1), die sich wegen ihrer klaren Morphologie (abgeflachte Zellen) und ihrer Größe in besonderem Maße für mikroskopische Untersuchungen eignen. Darüber hinaus wurden weitere Zelllinien (Tab. 3.12, S.61) auf CB-Expression hin untersucht. Die Zellen wurden im Falle transienter Expression ~15–30 h nach der Transfektion untersucht. Durch Überexpression entstehende Artefakte, die während der transienten Expression auftreten können (S.94), wurden durch die Verwendung konstitutiv exprimierender Zellklone vermieden.

Fluoreszenzprotein-Kontrolle. Alle von *avGFP* abgeleiteten Fluoreszenzproteine, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, zeigten bei transienter sowie permanenter Expression in allen untersuchten Zelltypen eine homogene Signalverteilung des Fluoreszenzproteins in Zellkern und Zytoplasma; lediglich Kern- und Plasmamembran, Golgi-Apparat sowie die Nukleolen blieben frei von Fluoreszenz (Abb. 4.18, unten). Abweichend hiervon wies das homologe Fluoreszenzprotein DsRed (S.160) in einigen Fällen eine differenzierte Verteilung auf (Abb. 4.4, S.78), deren Entstehung ungeklärt bleibt.

Unterschiedliche Zelltypen. Folgende transformierte Zelllinien wurden mit *CB(FLM)–EGFP* transfiziert: HDMEC, Hep–G2, LCLC–103H (Abb. 4.19, unten) sowie COS–7 und MDCK (Abb. 4.21, S.102). Wesentliche Unterschiede in der *CB(FLM)*-Signalverteilung wurden nicht festgestellt. In allen Fällen wurde das fluoreszierende Expressionsprodukt in retikuläre und vesikuläre Kompartimente geleitet und fand sich in geringem Maße im Zytoplasma wieder. Im Gegensatz zu den LCLC–103H-Zellen, die eine überwiegend retikuläre Lokalisation des Fluoreszenzprotein-Signals in ER, Golgi und Kernmembran zeigten, wurde das fluoreszierende Produkt in den HDMEC- und den Hep–G2-Zellen verstärkt in perinukleären Vesikeln angereichert. Die Anzahl der fluoreszierenden Vesikel war in den HDMEC-Zellen geringer als in den Hep–G2-Zellen. Auch im Falle von COS–7- und MDCK-Zellen wurde eine intensive vesikuläre Signalanhäufung beobachtet.

* Vollängenprodukt *ohne* C-terminales Pro-Peptid

[†] codiert das Signalpeptid und die N-terminale Proregion

[‡] enthält die konservierte Aminosäuren-Sequenz KDEL, die als Retentionssignal für das ER fungiert

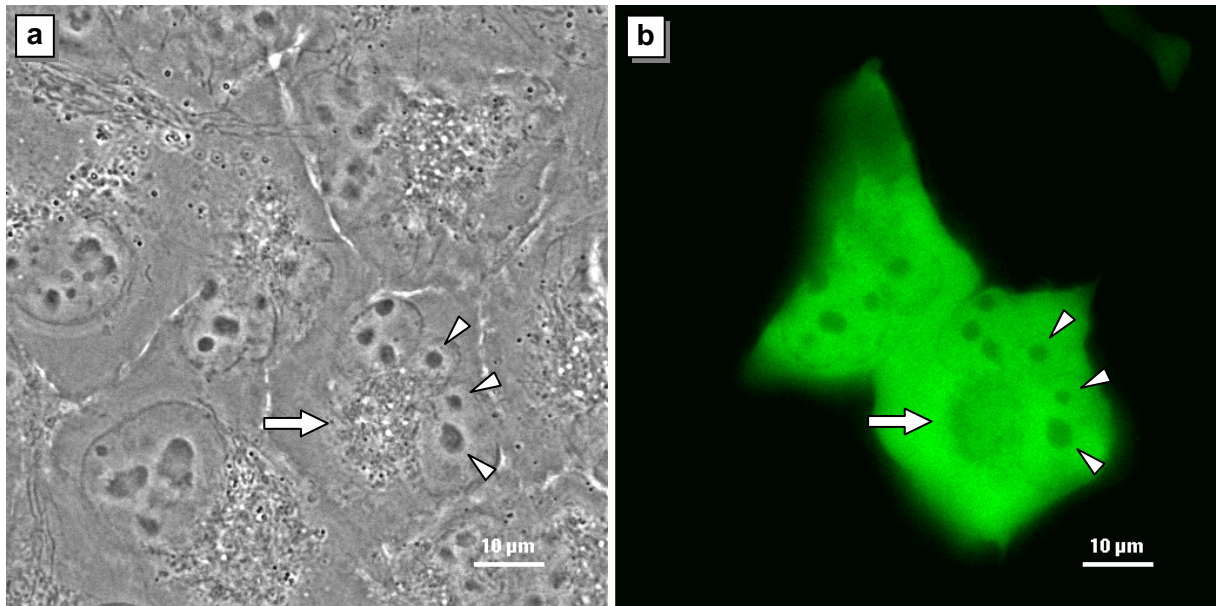


Abb. 4.18 Fluoreszenzprotein-Kontrolle. In LCLC-103H-Zellen exprimiertes EGFP wurde homogen im Zyto- und Nukleoplasma verteilt (**a**: Phasenkontrast; **b**: Fluoreszenzbild nach der Dekonvolution). Lediglich der Golgi-Apparat (Pfeil), die Nukleolen (Pfeilspitzen) sowie die feinen Strukturen der Plasma- und Kernmembran (mit den für diesen Zelltyp charakteristischen Einstülpungen) waren frei von Signal. Obj. 40×/1,30 Öl.

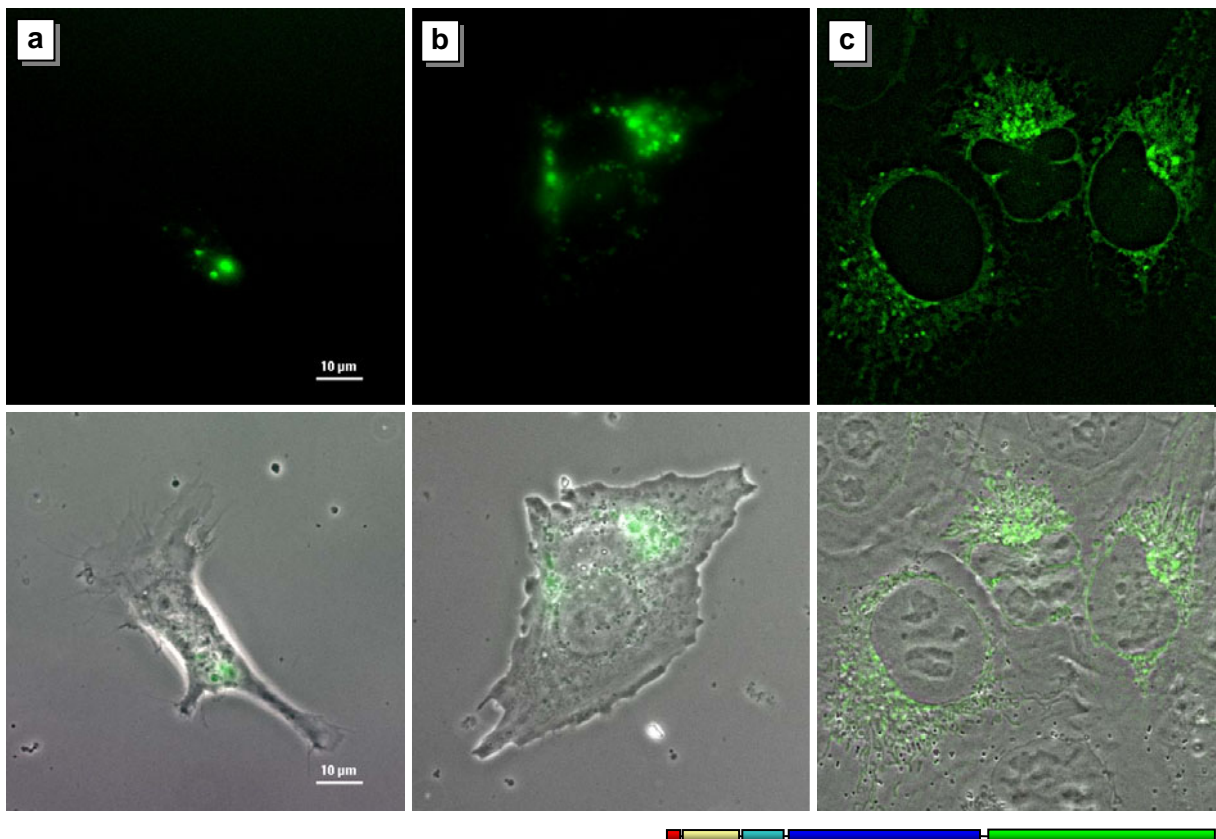


Abb. 4.19 Lokalisation von rekombinantem CB(FLM) in unterschiedlichen Zelltypen. Transient CB(FLM)-EGFP überexprimierende HDMEC- (**a**) und Hep-G2-Zellen (**b**) zeigten eine perinukleär vesikuläre Fluoreszenz. Dagegen zeichneten sich LCLC-103H-Zellen (**c**) durch eine ausgeprägte retikuläre Verteilung aus, die ER, Kernmembran und Golgi-Apparat umfaßte. Eine vergleichbare Signalverteilung wurde auch in COS-7- (Abb. 4.20(j,l)) und MDCK-Zellen (Abb. 4.20(k,m)) beobachtet. Obj. 40×/1,30 Öl; (**c**) nach Dekonvolution.

Sortierung und Transport. Die intrazelluläre Verteilung von CB(FLM)–FP wurde zunächst in LCLC–103H-Zellen mit verschiedenen Organellmarkern untersucht. Die Gegenfärbung transient überexprimierender Zellen mit BODIPY FL-Golgi ergab eine hohe Kollokalisierung im Golgi-Bereich (Abb. 4.20(a,b)). Ein ähnliches Resultat wurde im Falle einer transienten CB(PREPRO)–FP-Expression beobachtet (Abb. 4.20(c,d)). Beide Konstrukte wurden darüber hinaus in perinukleären Vesikeln akkumuliert.

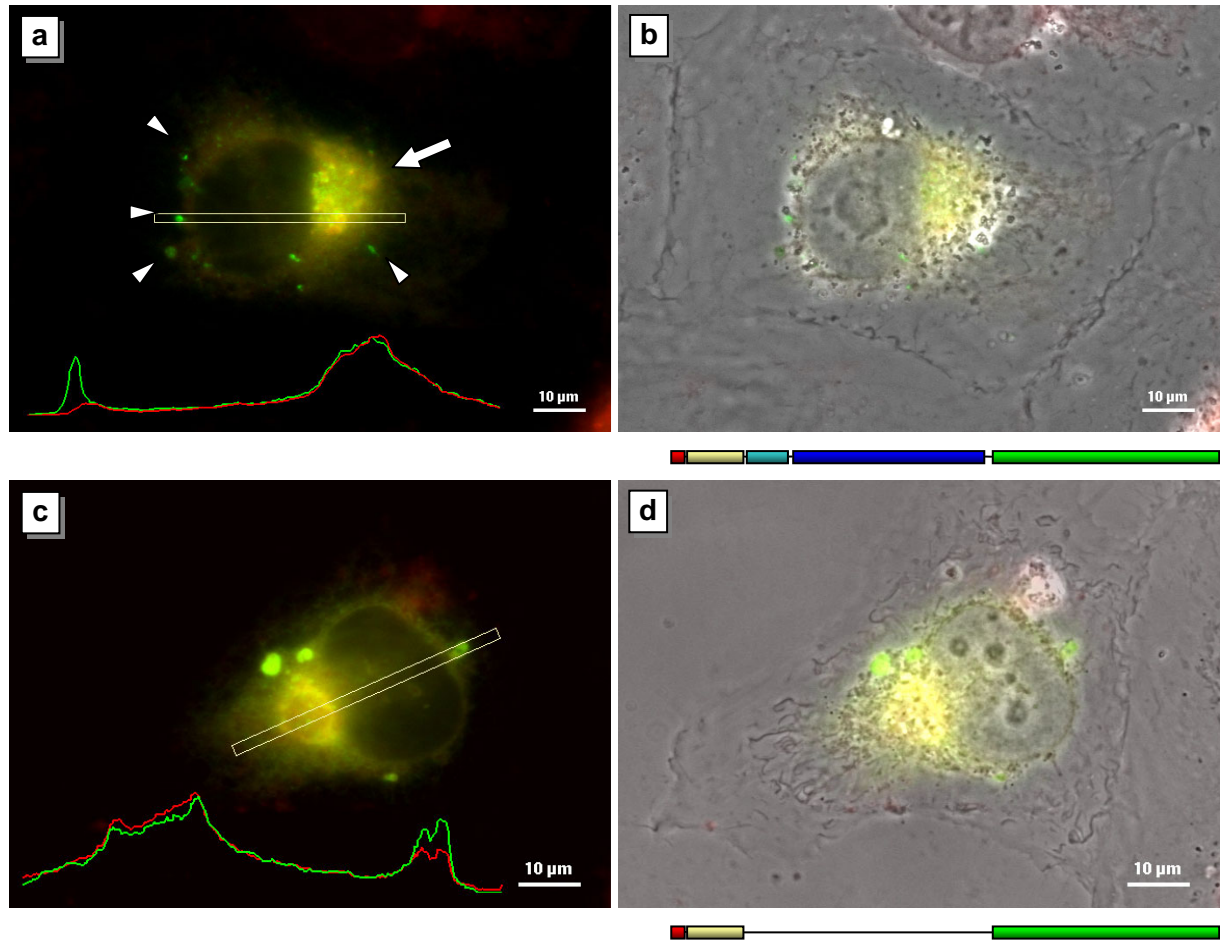


Abb. 4.20 Lokalisation von rekombinantem CB. LCLC–103H-Zellen wurden mit *CB(FLM)–EGFP* (a) bzw. *CB(PREPRO)–EGFP* (c) transfiziert (grün) und nach 48 h mit einem BODIPY FL-Golgi-Marker (rot) gegengefärbt. Beide Konstrukte zeigten eine enge Korrelation in ER und Golgi. Dabei wurde *CB(FLM)–EGFP* (a) in höherem Maße als *CB(PREPRO)–EGFP* (c) im Golgi-Apparat (Pfeile) sowie zusätzlich in perinukleären Vesikeln (Pfeilspitzen) angereichert. Schnittprofile durch die Zellen (gelber Rahmen) verdeutlichen die relativen Mengenverhältnisse (grüne Kurve: EGFP-Signal; rote Kurve: Golgi-Marker). Obj. 40×/1,30 Öl.

In einem weiteren Transfektionsexperiment wurden die beiden CB-Konstrukte sowie ein Fluoreszenzprotein-markierter ER-Marker in unterschiedlichen Kombinationen koexprimiert und ihre differentielle Lokalisation bestimmt. Im Vergleich zum *CB(PREPRO)*-Konstrukt zeigte *CB(FLM)–FP* zusätzlich zur retikulären eine intensivere vesikuläre Verteilung und wurde stärker im Golgi-Apparat angereichert (Abb. 4.21(g–i), S.102).

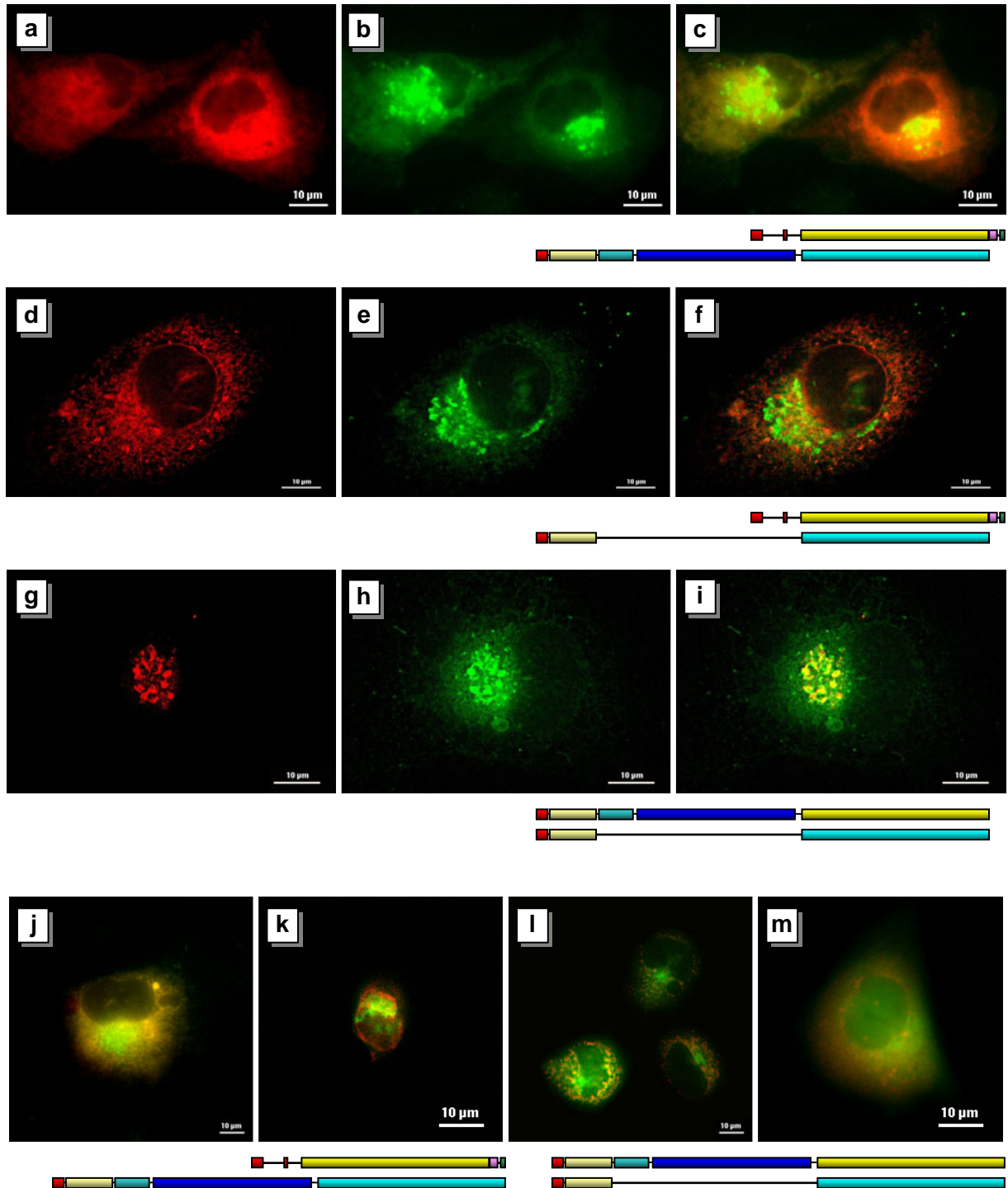


Abb. 4.21 Signalsequenz-abhängige CB-Sortierung. Unterschiedlich markierte Fluoreszenzprotein-Konstrukte (CB(FLM), CB(PREPRO), ER; rot: EYFP; grün: ECFP) wurden transient in LCLC-103H-Zellen exprimiert (a-i). Während ER-EYFP (a,d) aufgrund eines Retentionssignals im ER verblieb, wurden beide CB-Konstrukte (b: CB(FLM)-ECFP; e: CB(PREPRO)-ECFP) teilweise in den Golgi-Apparat weitergeleitet (c,f: Überlagerung). In einem direkten Vergleich von CB(FLM)-FP (g) und CB(PREPRO)-FP (h) wurde CB(FLM) noch stärker als CB(PREPRO) im Golgi/TGN angereichert (i: Überlagerung; siehe auch Abb. 4.5, S.78). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Zelllinien wie COS-7 (j,l) und MDCK (k,m) erzielt: Hier wurde CB(FLM)-FP gegenüber ER-FP (j,k) sowie gegenüber CB(PREPRO)-FP (l,m) ebenfalls stärker im Golgi-Apparat sowie in Vesikeln angereichert. Obj. 40×/0,60 Luft (a-c; j-m), 63×/1,25 Öl (d-i; nach Dekonvolution); Größenbalken 10 μm.

CB und Mitochondrien. In der Literatur häufen sich Hinweise auf eine Interaktion zwischen CB und den Mitochondrien, insbesondere bei apoptotischen Vorgängen (S.25), die auf einen möglichen Import in die Mitochondrien oder eine Assoziation mit den Mitochondrien schließen lassen. Für das nativ trunkierte Δ^{51} CB wurde ein solches mitochondriales Zielsignal beschrieben (§2.2.7). Die Untersuchung von rekombinantem Vollängenprodukt konnte unter Standard-Kultivierungsbedingungen nicht in einem derartigen Zusammenhang nachgewiesen werden, wie Gegenfärbungen transient bzw. konstitutiv CB(FLM)–EGFP exprimierender LCLC–103H-Zellen mit mitochondrialen Markern (MitoTracker Red; DsRed–Mito.) deutlich machen (Abb. 4.22).

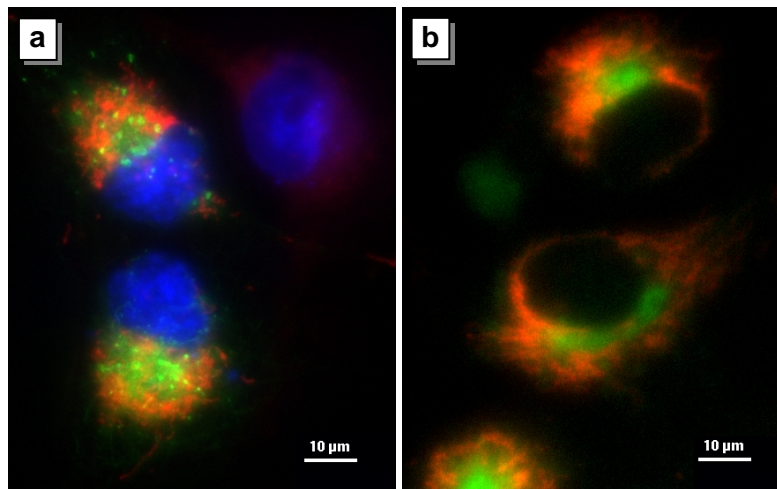


Abb. 4.22 Lokalisation von CB(FLM)–FP und Mitochondrien. Transient CB(FLM)–EGFP (grün) exprimierende LCLC–103H-Zellen wurden mit MitoTracker Red (rot) und Hoechst 33342 (blau) gegengefärbt (a). Ein LCLC–103H-Zellklon mit konstitutiver CB(FLM)–EGFP-Expression (grün) wurde mit DsRed–Mito (rot) übertransfiziert (b). In beiden Fällen war keinerlei Kollokalisierung zwischen CB(FLM)–EGFP und Mitochondrien-Markern zu sehen. Obj. 40×/1,30 Öl (a) bzw. 40×/0,60 Luft (b).

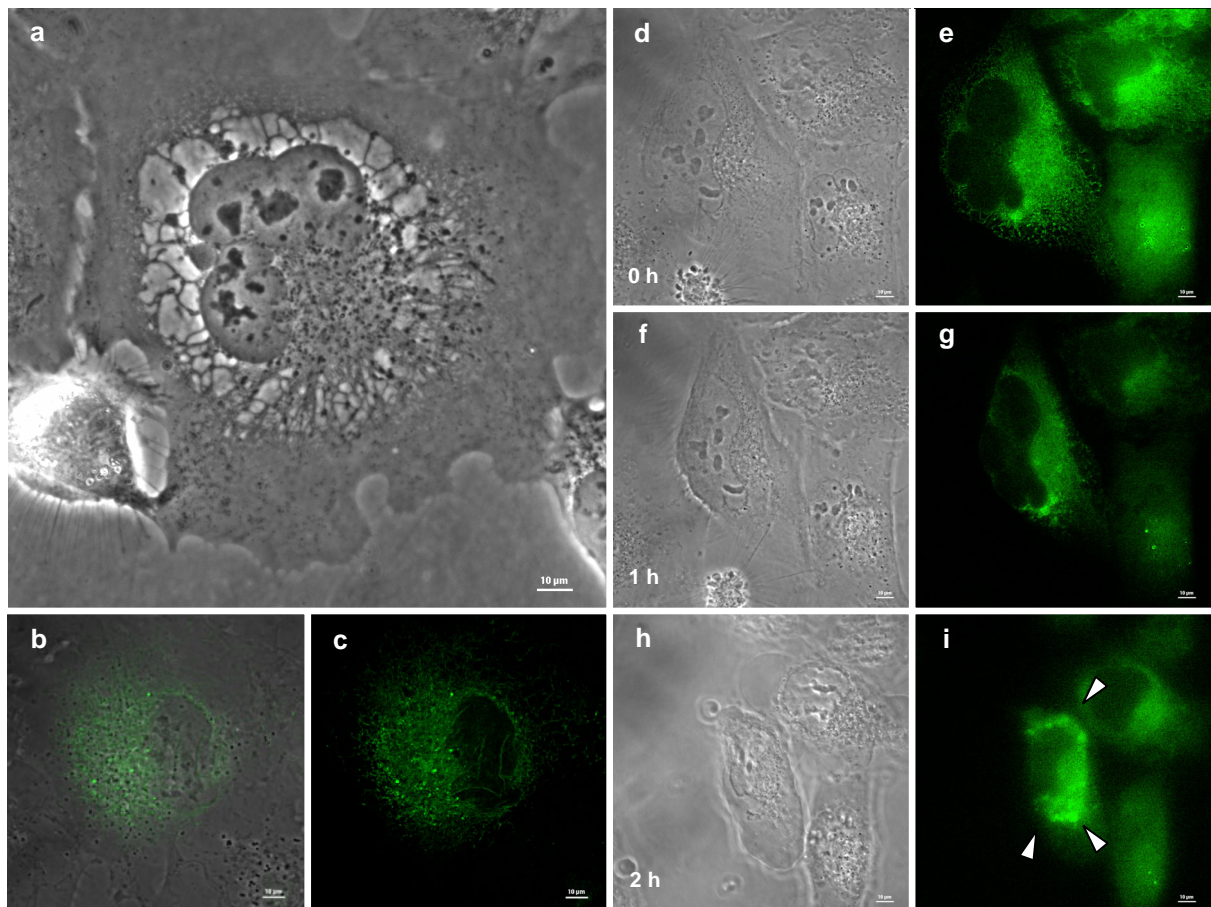
ER–Golgi-Transport. Die Adressierung des rekombinanten CB von ER zu Golgi wurde mit Hilfe von Brefeldin A* (BFA) und Tunicamycin† untersucht, die auf verschiedenen Ebenen den lysosomalen Transportweg inhibieren.

Transient CB(FLM)–FP exprimierende LCLC–103H-Zellen wurden mit BFA behandelt und neben nicht-transfzierten sowie unbehandelten transfzierten Kontrollzellen lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 4.23, unten). Mit zunehmender Einwirkungsdauer wurde in den BFA-behandelten Zellen eine Vesikulierung der retikulären Zellkompartimente (Golgi, ER, Kernmembran) festgestellt (Abb. 4.23(a)). Im Gegensatz zu der unbehandelten Expressionskontrolle (Abb. 4.23(b,c)), nahm in BFA-behandelten Zellen die Konzentration an CB(FLM)–FP im ER zu (Abb. 4.23(d–i)) aber die stark vakuolisierten Zellen starben ab.

* Brefeldin A, ein Metabolit aus *Eupenicillium brefeldianum*, blockiert spezifisch und reversibel den Proteintransport vom ER in den Golgi-Apparat und ist zudem in der Lage, die Sekretion, die Vesikelbildung, die Endozytose sowie andere zelluläre Prozesse zu blockieren. Der Effekt wird häufig begleitet von verschiedenen morphologischen Veränderungen wie dem sichtbaren Kollaps der Golgi-Zisternenstapel.

† Tunicamycin ist ein Nukleosidantibiotikum aus *Streptomyces lysosuperificus*, das in eukaryotischen Zellen die N-Glykosylierung inhibiert und somit den Transport via Mannose-6-Ⓢ-Weg (S.29) unterbindet.

Brefeldin A



Tunicamycin

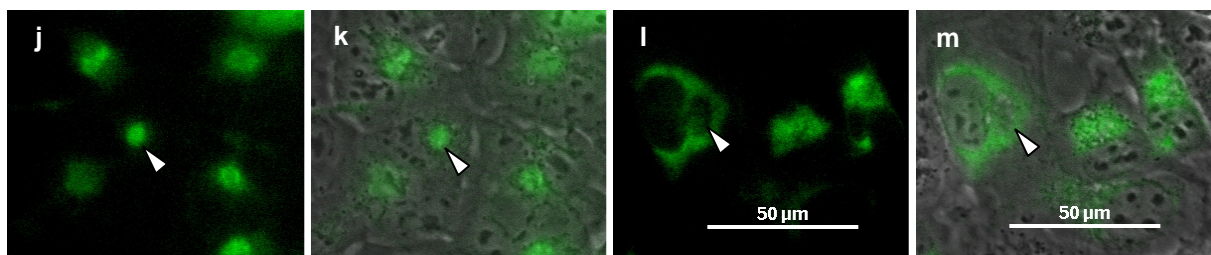


Abb. 4.23 CB-Transport. BFA-Behandlung ($9 \text{ h}; 1 \mu\text{g ml}^{-1}$) der nicht-transfizierten LCLC-103H-Kontrolle führte zu vollständiger Vesikulierung des perinukleären retikulären Netzwerks (**a**). Im Gegensatz zur unbehandelten, transient CB(FLM)-EGFP exprimierenden Kontrolle (**b**: Überlagerung Phasenkontrast und Fluoreszenz; **c**: Fluoreszenz), zeigten die mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ BFA behandelten LCLC-103H-Zellen $\sim 3 \text{ h}$ später eine starke Retraktion und starben am Ende der 2 h-Kinetik ab (**d-i**; Phasenkontrast- mit zugehörigen Fluoreszenzbildern). Das Fluoreszenzprotein-Signal wurde im vakuolisierenden ER angereichert (**i**; spitze Pfeile). Mit $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ Tunicamycin behandelte CB(FLM)-EGFP exprimierende LCLC-103H-Zellen (**l,m**) zeigten im Vergleich zur unbehandelten Expressionskontrolle (**j,k**) eine Erhöhung des Signals im ER, während der Golgi-Apparat (spitze Pfeile) frei blieb (**j,l**: Fluoreszenzbilder; **k,m**: Überlagerung mit den entsprechenden Phasenkontrastbildern). Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einer geschlossenen POC-Kammer. Größenbalken kurz: $10 \mu\text{m}$ (Obj. $40\times/1,30 \text{ Öl}$), lang: $50 \mu\text{m}$ (Obj. $20\times/0,40 \text{ Luft}$); (**b,c**; **e,g,i**) nach Dekonvolution.

Tunicamycin wurde analog zu BFA appliziert. Trotz starker Expression blieb der Golgi-Apparat in den behandelten LCLC-103H-Zellen meist leer (Abb. 4.23(l,m)); stattdessen stieg im Vergleich zur Expressionskontrolle (Abb. 4.23(j,k)) der Anteil an rekombinantem Protein im ER signifikant an. Die Zellen erholten sich trotz mehrmaligen Waschens und Mediumwechsels nicht von der Tunicamycin-Behandlung; eine Zunahme des Fluoreszenzprotein-Signals im Golgi wurde ebenfalls nicht beobachtet.

Assoziation mit der Plasmamembran. Tumoren bilden häufig einen invadierenden Fortsatz (*leading edge*) aus, an dessen Rand eine erhöhte Enzymansammlung, darunter von CB, beobachtet wird. Dieses Phänomen ließ sich an konstitutiv exprimierenden CB(FLM)-EGFP-Zellklonen klar demonstrieren (Abb. 4.24). Am äußeren Rand des Zellverbandes findet sich ein deutlich höheres Fluoreszenzsignal als an der Plasmamembran zwischen den einzelnen Zellen im Verband.

Säure-Lücke (*acidic gap*). Der lichtmikroskopische Nachweis von extrinsischem CB(FLM)-FP in den Lysosomen ist aus folgenden Gründen problematisch: Zum einen ist trotz des fehlenden C-terminalen Pro-Peptids eine pH-abhängige Abspaltung bzw. eine mögliche Degradation von Fluoreszenzprotein grundsätzlich nicht auszuschließen. Zum anderen ist im Falle der Fluoreszenzproteine bekannt, daß in sauren Kompartimenten ein pH-abhängiger Abfall der Fluoreszenz (pH-Quenchen) stattfindet, welcher bei ~pH 4 im Minimum ist (Abb. 4.6, oben). Da der pH in den Lysosomen bis ~3,8 absinken kann, ist hier mit einer Reduktion der Fluoreszenz zu rechnen.

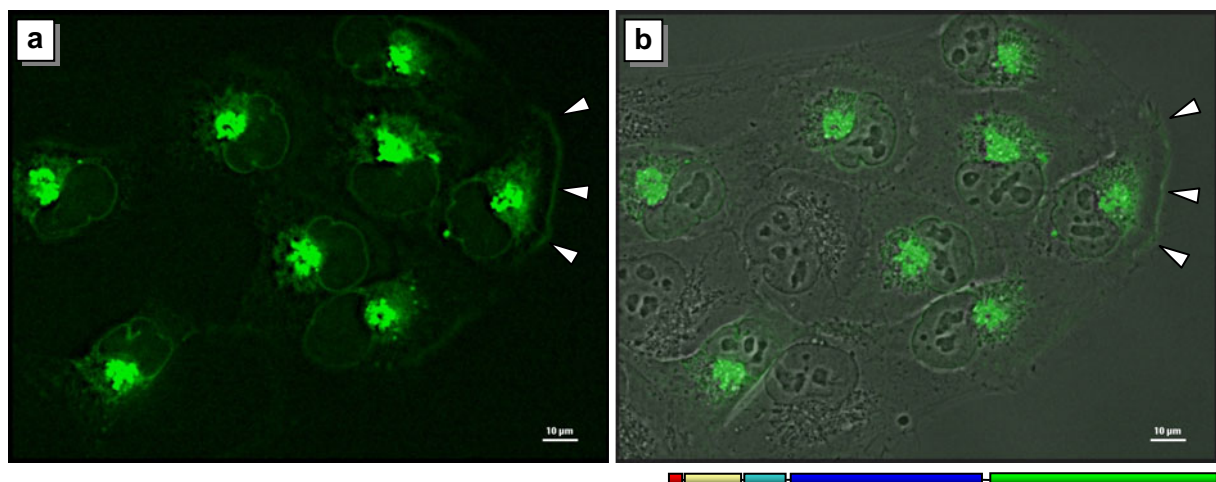


Abb. 4.24 *Leading edge.* Konstitutiv überexprimiertes rekombinantes CB(FLM)-EGFP (LCLC-103H-Zellklon 001) lokalisierte in ER, Golgi, TGN, Vesikeln, perinukleärer Membran sowie an der Plasmamembran. Fluoreszenz fand sich auch am Rand des Zellverbandes (Pfeilspitzen). (a) Fluoreszenzbild nach Dekonvolution. (b) Überlagerung von Fluoreszenzbild und Phasenkontrastbild. Obj. 40×/1,30 Öl; Größenbalken: 10 μ m.

Da bei Alkalisierung der sauren Zell-Kompartimente die Fluoreszenz wieder zunehmen müßte, wurden die Zellen mit Ammoniumchlorid bzw. Chloroquin behandelt. Typische Nebeneffekte wie Aufblähen der retikulären sowie vesikulären Kompartimente zeigten, daß eine Alkalisierung stattfand. Die Zunahme der Fluoreszenz war jedoch gering (~10 %); zusätzlich auftretende Vesikel wurden nicht beobachtet. Dies zeigt, daß das Fluoreszenzsignal zumindest ein Abbild einer bestimmten Lysosomenfraktion wiedergibt, es allerdings nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine andere Fraktion wegen einer irreversiblen Schädigung der Fluoreszenzeigenschaften tatsächlich einer Beobachtung entgeht.

4.2.5 *Enzymatische Kathepsin B-Aktivität*

Die CB-spezifische Enzymaktivität wurde sowohl lichtmikroskopisch in lebenden Zellen als auch fluorometrisch an Zellhomogenaten und Überständen von Zellkulturen gemessen.

Enzymaktivität *in situ*. Das CB-spezifische Substrat (Z-Arg-Arg)₂CV wurde transient CB(FLM)-EGFP exprimierenden LCLC-103H-Zellen sowie konstitutiv exprimierenden Zellklonen zugegeben und die freiwerdende CV-Fluoreszenz in lebenden Zellen gemessen. Unterschiede in der Prozessierung (§4.2.2) spiegelten sich auch in der Aktivität wider.

Die transiente Expression ergab im Bereich der Fluoreszenzprotein-Expression eine hohe enzymatische Aktivität, eine 100 %-ige Signalüberlappung wurde jedoch nicht beobachtet. Während das EGFP überwiegend im ER, jedoch kaum im Golgi-Apparat nachzuweisen war, entwickelten die Zellen im Bereich des Golgi-Apparats die höchste vesikuläre Aktivität (Abb. 4.25(a), unten).

Gegenüber den nicht-transfizierten Kontrollzellen zeigten die transfizierten Zellen keine signifikant erhöhte CB-Aktivität (Abb. 4.25(b-d)), so daß der Beitrag der transienten Expression zur Gesamtaktivität vernachlässigbar ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Proteinanalysen, die für eine unvollständige Prozessierung des Zymogens während der transienten Expression sprechen (Abb. 4.15(a), S.96).

Im Gegensatz zu transient exprimierenden Zellen waren bei konstitutiv exprimierenden LCLC-103H-Zellklonen (Abb. 4.25(e-j)) sowohl das Fluoreszenzprotein-Signal als auch die durch enzymatische Aktivität entstandene Fluoreszenz hauptsächlich auf den Golgi-Apparat fokussiert. Allerdings wies die CV-Aufnahme gegenüber dem Fluoreszenzprotein-Signal eine eher vesikuläre Verteilung auf.

Enzymaktivität in Zellextrakten. Genauere quantitative Aussagen über die enzymatische CB-Aktivität erhält man durch fluorometrische Bestimmungen an Zellhomogenaten und Zellkulturüberständen.

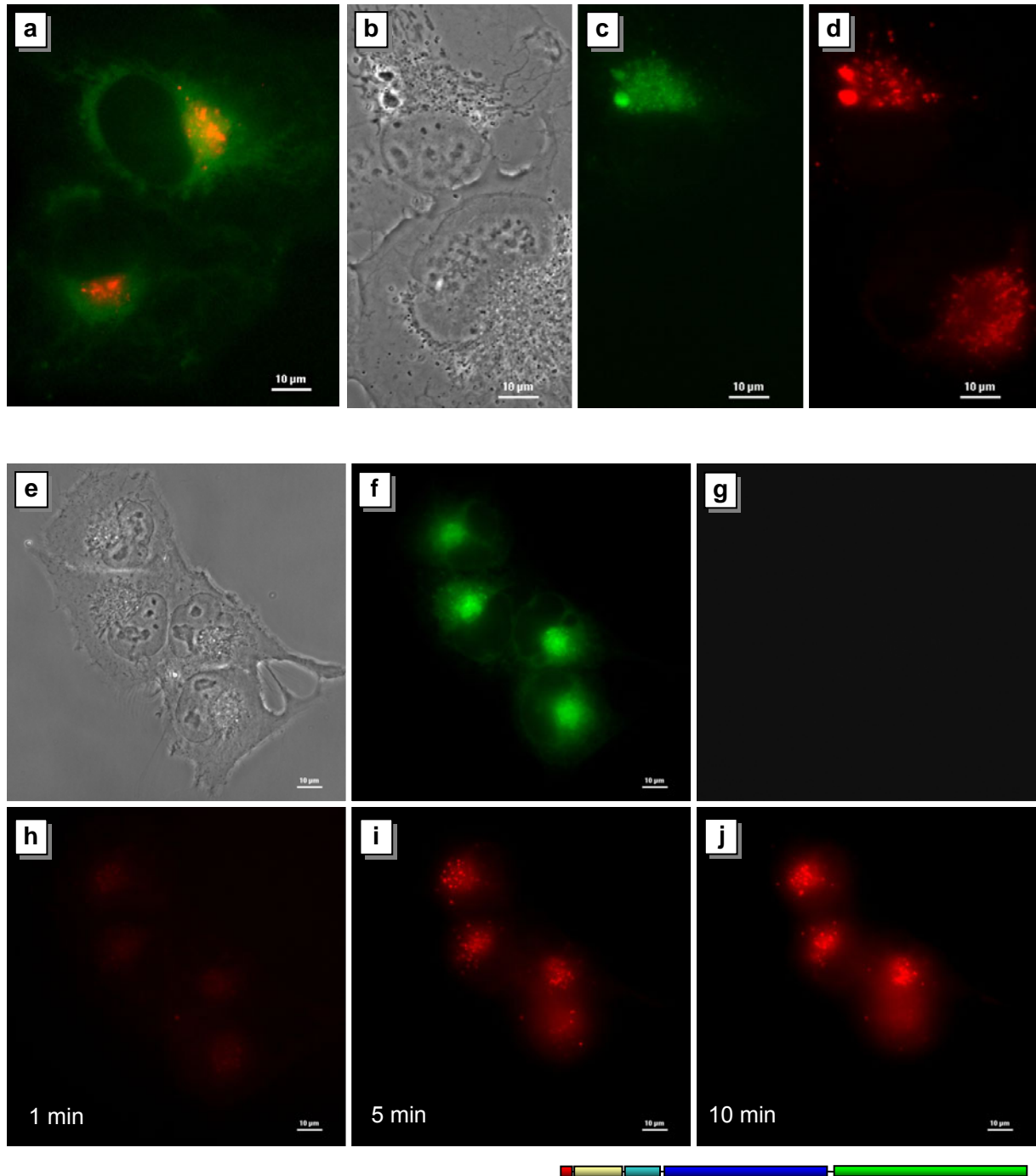


Abb. 4.25 Intrazelluläre enzymatische CB-Aktivität. LCLC-103H-Zellen mit transienter (a–d) bzw. permanenter (e–j) CB(FLM)–EGFP-Expression. *Transient*: Während das Fluoreszenzprotein-Signal (grün) überwiegend im ER zu finden war, fand die höchste Enzymaktivität, sichtbar gemacht durch die aufkommende Fluoreszenz der freigesetzten Fluchtgruppe CV (rot), hauptsächlich im Golgi statt (a; 5 min Reaktionsdauer). Transfizierte Zellen unterschieden sich in ihrer CV-Intensität nicht von den Kontrollzellen (b: Phasenkontrast; c: CB(FLM)–EGFP; d: CV-Detektion nach 3 min Reaktionsdauer). *Permanent* (Klon 001): Die Enzymreaktion wurde in 1 min-Abständen erfaßt (e: Phasenkontrast; f: CB(FLM)–EGFP-Expression; g: vor Substratzugabe; h–j: ausgewählte Zeitpunkte der Reaktionskinetik). Bereits nach ~10 min wurde das Substrat fast vollständig umgesetzt (j). Trotz einer starken Diffusion des freigesetzten CV gab es eine hohe Übereinstimmung zwischen Aktivitätsort und der Fluoreszenzprotein-Lokalisation. Die Verteilung des Aktivitätssignals erschien eher vesikulär, was auf eine mögliche Abschwächung des Fluoreszenzprotein-Signals in den Lysosomen hindeuten könnte (siehe Text). Die Umgebungstemperatur betrug +20 °C. Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken: 10 µm.

Zellen verschiedener konstitutiv CB(FLM)–EGFP exprimierender LCLC–103H-Zellklone wurden expandiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. In den Zellextrakten wurden durch einen spektroskopischen Enzymtest mit fluorogenen Substraten die Enzymaktivitäten bestimmt und auf die Gesamt-Proteinkonzentration nach Gleichung (4) (S.60) bezogen. Bei Kontrollmessungen mit reinem AMC und EGFP-haltigen Zellextrakten wurden weder konzentrationsbedingte Fluoreszenzauslöschung im verwendeten Meßbereich noch denkbare FRET-Effekte zwischen den beiden Fluorochromen beobachtet.

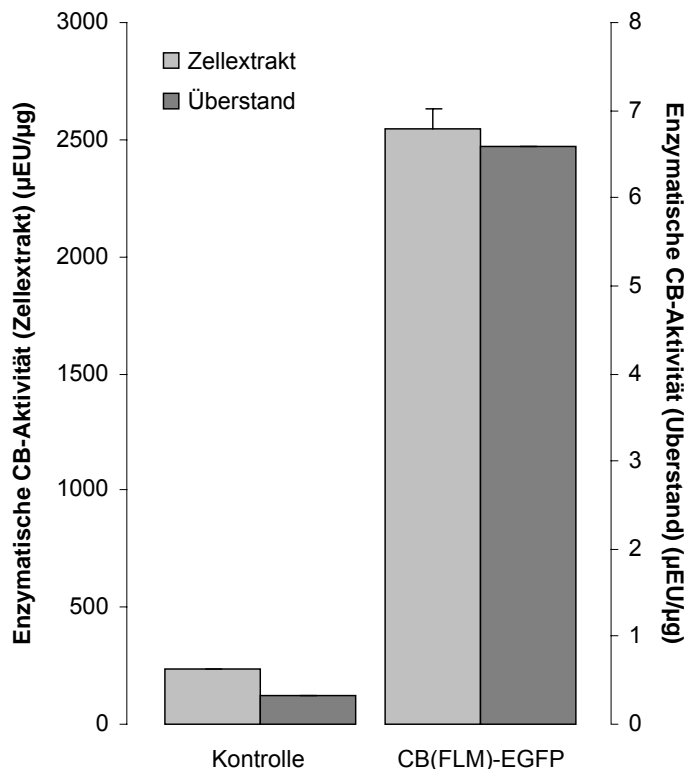


Abb. 4.26 Enzymatische Aktivität und Sekretion von CB. Der konstitutiv CB(FLM)–FP exprimierende LCLC–103H-Zellklon 001 entwickelte sowohl in den Zellextrakten (linke Größenskala) als auch im Zellkulturüberstand (rechte Größenskala) eine vielfach erhöhte enzymatische Gesamtaktivität. Die gemessene absolute Aktivität in den Zellextrakten lag hierbei wesentlich höher als in den entsprechenden Zellkulturüberständen. Dies ist auf einen höheren CB-Anteil am Gesamtprotein im Überstand im Verhältnis zum Gesamtprotein in der Zellfraktion zurückzuführen. Im Zellextrakt von Klon 001 wurde eine ~11-fach so hohe CB-Enzymaktivität wie in den Kontrollzellen festgestellt, im Zellkulturüberstand war die Enzymaktivität um den Faktor 20 erhöht. Das unterschiedliche Verhältnis der intrazur extrazellulären CB-Aktivität könnte in einer (partiell) konstitutiven Sekretion von überexprimiertem CB ins Medium begründet liegen. Als CB-Substrat wurde Z-Arg-Arg-AMC verwendet. (n = 3).

Die CB(FLM)–EGFP-Zellklone zeigten gegenüber der Kontrolle eine bis ~25-fach erhöhte CB-spezifische Enzymaktivität (Abb. 4.26; Abb. 4.27). Die Aktivität war im Zellextrakt wie im Zellkulturüberstand gleichermaßen erhöht (Abb. 4.26). Dabei ist jedoch zu beachten, daß sich die ermittelte enzymatische Aktivität jeweils auf das Gesamtprotein im Extrakt bzw. im Überstand und nicht auf die Menge an CB bezieht, dessen Anteil in den beiden Fraktionen variieren kann. Trotz hoher proteolytischer Aktivität waren bei konstitutiv exprimierenden Zellen keine Anzeichen von Zytotoxizität erkennbar (§4.2.3).

Eine denkbare Induktion oder Regulation der endogenen CB-Expression durch das extrinsische Produkt, verbunden mit einer erhöhten Enzymaktivität, konnte mit Hilfe weiterer permanent exprimierender Zellklone (EGFP, EGFP–Tub, CB(SC)–EGFP* und StB–EGFP)

* Wegen der dargestellten Zytotoxizität von CB(SC)–EGFP waren diese Zellklone sehr schwach exprimierend mit einer atypischen Signalverteilung, die möglicherweise auf einen fehlerhaften Einbau des Konstrukts in die genomische DNA hinweist. Bei diesen Klonen ist lediglich der Einbau der Antibiotika-Resistenz sichergestellt.

ausgeschlossen werden (Abb. 4.27). Als einziges Konstrukt führte CB(FLM)–EGFP zu einer stark erhöhten enzymatischen Aktivität, die von Zellklon zu Zellklon zwar stark variierte, jedoch von keinem der Fremdklone erreicht wurde. Diese hatten in den meisten Fällen eine CB-Aktivität vergleichbar der Basisaktivität der LCLC–103H-Kontrolle.

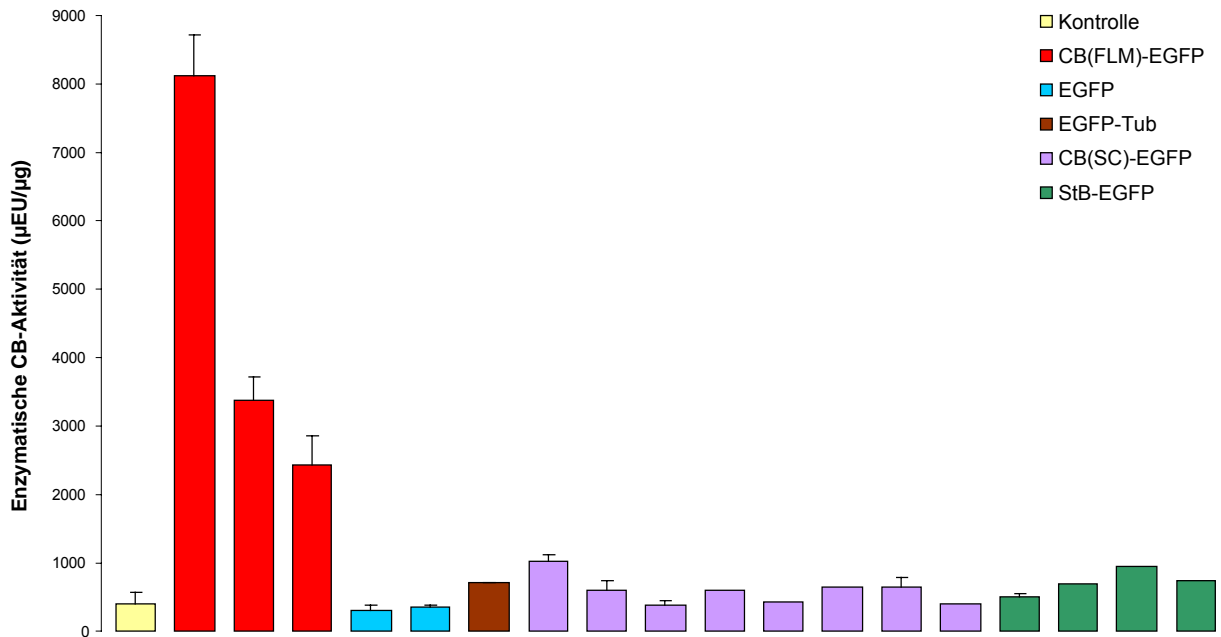


Abb. 4.27 CB-Aktivität in verschiedenen LCLC–103H-Zellklonextrakten. Konstitutiv exprimierende CB- (CB(FLM)–EGFP, CB(SC)–EGFP) und weitere Zellklone (EGFP, EGFP–Tub, StB–EGFP) sowie eine LCLC–103H-Ausgangszellpopulation als Kontrolle wurden analog Abb. 4.26 (oben) auf CB-Enzymaktivität hin untersucht. Lediglich in den 3 CB(FLM)–EGFP-Zellklonen (001,008,031) war die enzymatische Aktivität 6–20-fach erhöht. Einzelne Zellklone erreichten unabhängig vom überexprimierten Produkt lediglich maximal das 2,5-fache der Kontrollwerte. Jeder Balken repräsentiert jeweils einen Zellklon (n = 3; Fehlerbalken: Standardabw.).

4.2.6 Rekombinante Kathepsin B-Inhibitoren

Cystatine, zu denen auch das untersuchte Stefin B (StB) zählt, sind natürliche Inhibitoren von CB und anderen Cysteineptidasen (S.21). Ihr Einfluß auf die CB-Aktivität wurde mit Hilfe synthetischer *StB*-Gene (S.55) analysiert. Um die natürliche Barriere zwischen (endogenem) StB sowie CB zu überbrücken und auf diese Weise die Wechselwirkung zwischen den beiden Molekülen zu erhöhen, wurde ein Ansatz gewählt, bei dem ein modifiziertes StB in dasselbe Kompartiment wie das CB – d.h. in das endoplasmatische Retikulum – adressiert wurde.

Synthetisches StB. Für die Untersuchungen wurde ein synthetisches *StB*-Gen mit optimierter Codon-Nutzung und einer Mutation zur Inhibition der Dimerisierung verwendet, das in Form zweier verschiedener Fluoreszenzprotein-Konstrukte (StB–EGFP und EGFP–StB) vorlag. Für Simultandektionen wurden jeweils ECFP- und EYFP-Varianten hiervon hergestellt.

Nach Transfektion in LCLC-103H-Zellen wurden beide StB-Konstrukte gleichermaßen zytoplasmatisch exprimiert (Abb. 4.28(a)) und führten zu einer homogenen Signalverteilung vergleichbar der Fluoreszenzprotein-Kontrolle (Abb. 4.18, S.100). Die Kotransfektion mit CB(FLM)- sowie CB(SC)-Konstrukten ergab keinerlei Kolokalisation (Abb. 4.28(b,c)).

Modifiziertes StB. Die Präpro-Region (CB(PREPRO)) des CB (vgl. §4.2.4), die ihrerseits als natürlicher CB-Inhibitor wirken kann (S.21), wurde an das 5'-Ende der FP-StB-Sequenz kloniert (S.55). Die resultierende Chimäre wurde ebenfalls transient sowie permanent in LCLC-103H-Zellen exprimiert.

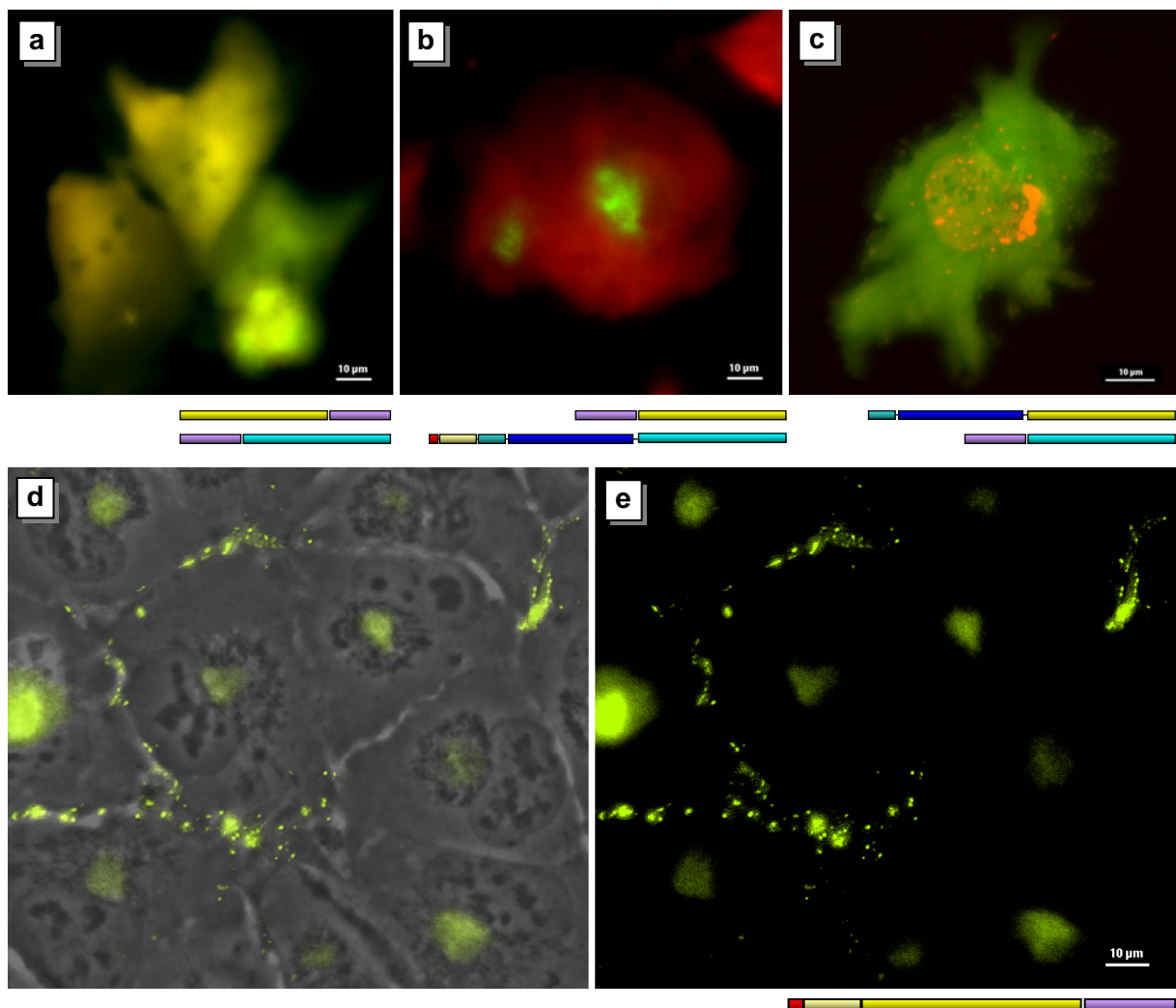


Abb. 4.28 Intrazelluläre Lokalisation von rekombinantem StB. Transient exprimiertes StB zeigte unabhängig von der Position des Fluoreszenzprotein-Markers die gleiche diffuse Signalverteilung in LCLC-103H-Zellen (a: EYFP-StB / StB-ECFP). Weder im Falle einer Koexpression mit dem CB-Vollängenprodukt (b: StB-EYFP / CB(FLM)-ECFP) noch mit der weiter unten ausführlich behandelten CB-Einzelkettenform (c: CB(SC)-EYFP / StB-ECFP) wurden eine mögliche Assoziation oder Kolokalisation beobachtet. Dagegen wurde transient wie permanent exprimiertes CB(PREPRO)-EYFP-StB entsprechend anderen CB(PREPRO)-tragenden Konstrukten in das ER und danach in den Golgi-Apparat geleitet (d,e). Zudem fand es sich in Vesikeln sowie an diskreten Stellen in Assoziation mit der Plasmamembran wieder. Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken: 10 μm.

Erwartungsgemäß fand sich das Expressionsprodukt vergleichbar CB(FLM) im ER, in der perinukleären Membran, angereichert im Golgi-Apparat sowie in Vesikeln wieder; darüber hinaus war eine sehr intensive, punktuelle Signalanhäufung in/an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 4.28(d,e)). Dies spricht dafür, daß dieses Konstrukt in das extrazelluläre Medium sezerniert wird.

In vitro-Aktivitätsmessungen. Enzymatische CB-Aktivität wurde in normalen LCLC-103H-Zellen und in den transgenen Zellen des stark überexprimierenden Klon 001 bestimmt, die gleichermaßen mit diversen *StB*-Konstrukten übertransfiziert worden waren (Abb. 4.29).

Die CB-Aktivität im CB(FLM)-EGFP-Zellklon war gegenüber der LCLC-103H-Kontrolle 12-fach erhöht (vgl. Abb. 4.26, S.108). Insgesamt verhielten sich die mit den Inhibitorgenen transfizierten normalen Zellen anders als der überexprimierende Zellklon. Während die Enzymaktivität im Falle von LCLC-103H bei allen drei *StB*-Konstrukten im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert wurde (*StB*-EGFP: 58 %, EGFP-*StB*: 45 %, CB(PREPRO)-EGFP-*StB*: 64 %), konnte die Aktivität des CB(FLM)-Zellklons lediglich mittels EGFP-*StB* gesenkt werden (69 % der CB(FLM)-Kontrolle).

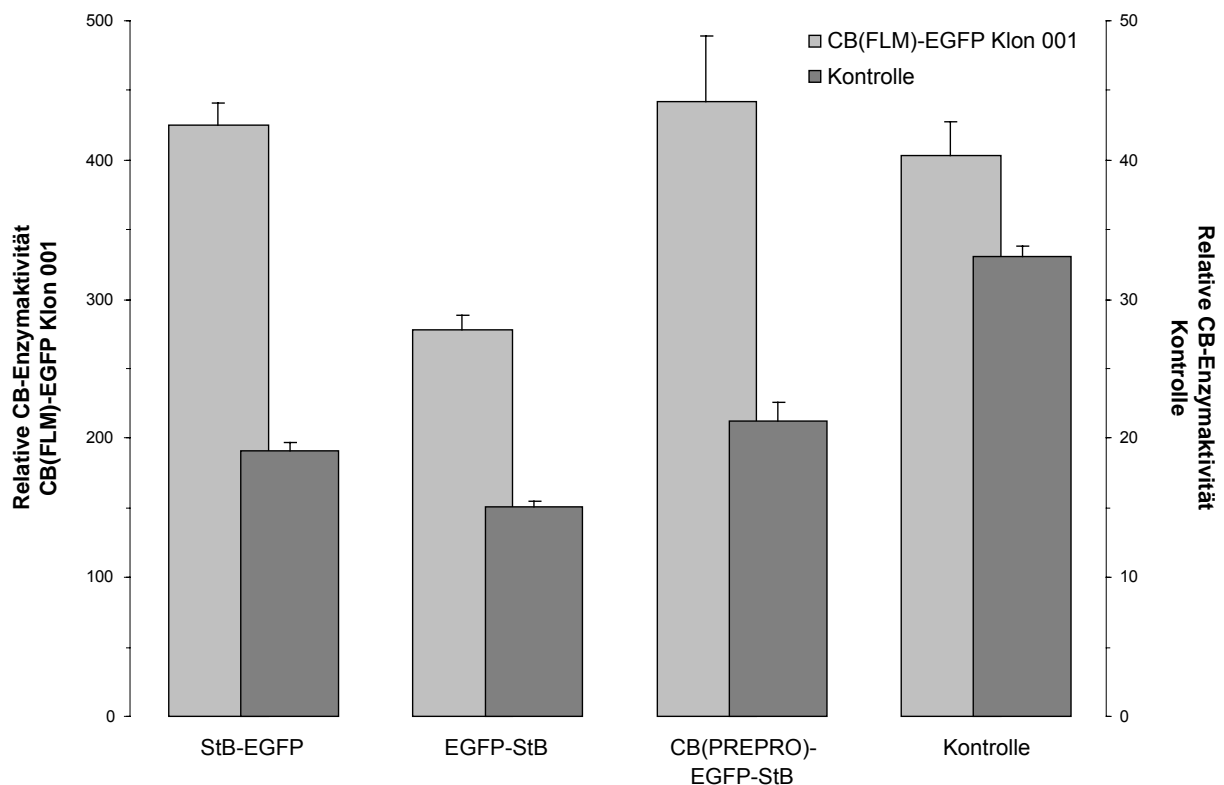


Abb. 4.29 Inhibition der CB-Aktivität durch rekombinantes *StB*. Der Einfluß von EGFP-*StB*, *StB*-EGFP und CB(PREPRO)-EGFP-*StB* auf die enzymatische CB-Aktivität in LCLC-103H-Zellhomogenaten wurde spektroskopisch analog Abb. 4.26 (S.108) und Abb. 4.27 (S.109) untersucht. Wegen stark unterschiedlicher Enzymaktivitäten im CB-Zellklon 001 und den transient exprimierenden LCLC-103H-Zellen wurden zwei verschiedene Größenskalen verwendet. Während bei den LCLC-103H-Zellen alle *StB*-Konstrukte zu einer Reduktion der CB-Aktivität führten, konnte eine Reduktion im Falle der CB(FLM)-Zellklone lediglich mit EGFP-*StB* erreicht werden. Fehlerbalken: Standardabweichung (jeweils 3 Messungen in 2 Parallelansätzen).

4.2.7 Endogenes Kathepsin K und Kathepsin L

Im Zusammenhang mit der erhöhten Enzymaktivität des rekombinanten CB stellt sich die Frage, ob aufgrund der Überexpression des rekombinanten CB weitere Cysteinpeptidasen in ihrer Expression und damit enzymatischer Aktivität hochreguliert werden. Deshalb wurden in Zellextrakten von nicht-transfizierten LCLC-103H-Zellen sowie solchen des konstitutiv CB-überexprimierenden CB(FLM)-EGFP-Zellklons (001) die enzymatischen Aktivitäten von Kathepsin K (CK) und Kathepsin L (CL) bestimmt.

Die mittels Z-Gly-Pro-Arg-AMC ermittelte Enzymaktivität ist die Summe der CK- und der CB-Beiträge (Abb. 4.30(a)). Sie war beim CB-FP-Zellklon ~25-fach stärker ausgeprägt als bei der nicht-transfizierten LCLC-103H-Kontrolle (vgl. Abb. 4.26, S.108; Abb. 4.27, S.109). Um auf den CK-Anteil zurückzuschließen, wurde CB durch Zugabe von CA-074 gehemmt. Dies reduzierte die Aktivität im CB-FP-Zellklon auf ~4 % und in der Kontrolle auf ~20 % der jeweiligen Gesamtwerte. Unter Berücksichtigung der Inhibition aller Cysteinpeptidasen mittels E-64 ergibt sich daher in der Kontrolle ein Verhältnis CB zu CK von ~5:1 und im CB-FP-Zellklon von ~24:1. Während die reine CB-Aktivität bei CB-Überexpression im CB-FP-Zellklon ~30-fach so hoch war, stieg die reine CK-Aktivität auf das 7-fache ihres Kontrollwertes. Damit ist eine Hochregulation von CK-Aktivität als Folge der CB-Überexpression wahrscheinlich, auch wenn die Zunahme im Vergleich zu CB gering ist.

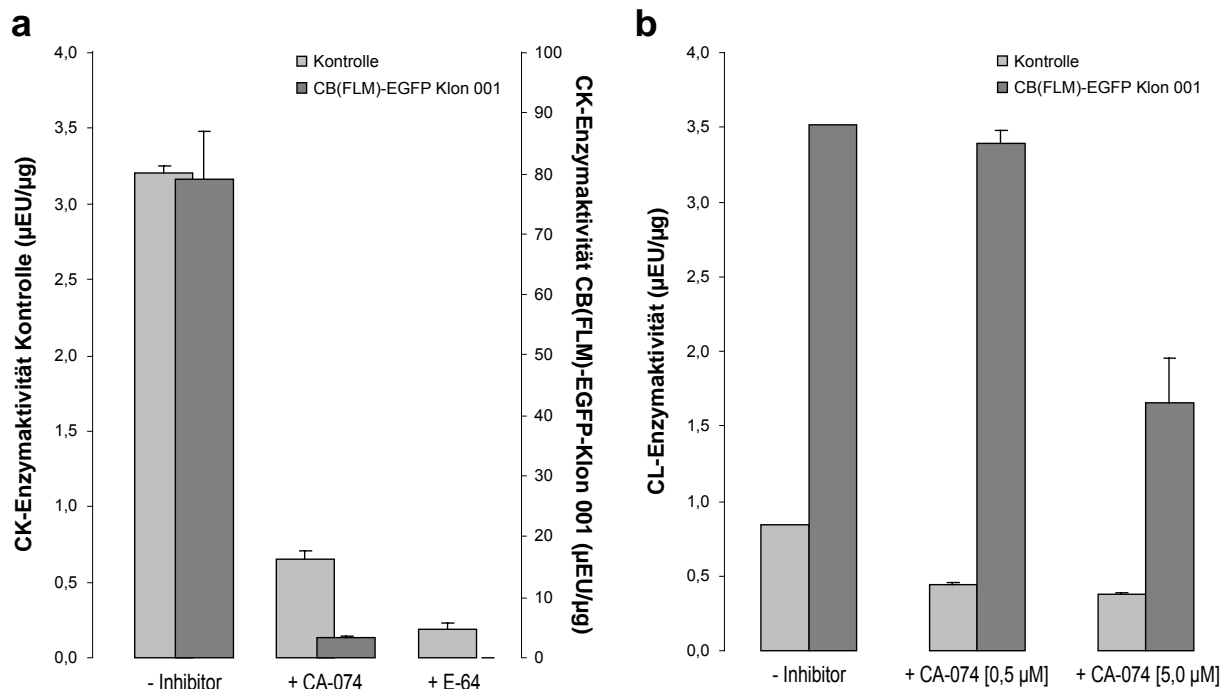


Abb. 4.30 CK- und CL-Enzymaktivität in LCLC-103H-Zellhomogenaten. CK-Aktivität (a) wurde mit Z-Gly-Pro-Arg-AMC (CB, CK; 5 µM) in Kombination mit den spezifischen Inhibitoren CA-074 (CB-ähnlich; 0,5 µM) und E-64 (Cysteinpeptidasen; 5 µM) zur Vermeidung von Kreuzreaktionen ermittelt. Für die Bestimmung der CL-ähnlichen Aktivität (b) wurde neben dem gering stringenten Substrat Z-Phe-Arg-AMC (CB, CK, CL; 40 µM) wiederum CA-074 (0,5 bzw. 5 µM) eingesetzt. Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

Die Messung der CL-ähnlichen Enzymaktivität mit Z-Phe-Arg-AMC in Abwesenheit spezifischer Inhibitoren schließt die Aktivitäten von CB und CK mit ein (Abb. 4.30(b)). Durch Zugabe von zunehmender Menge an CA-074 wurde die Enzymaktivität im Falle des überexprimierenden Zellklons immer weiter gedrückt, während die Aktivität der Kontrolle konstant auf den halben Betrag des Ausgangswertes reduziert wurde. Der Aktivitätsüberschuß im CB-FP-Zellklon läßt sich auf einen Überschuß von CB zurückführen. Das Verhältnis von CB zu CL in LCLC-103H-Zellen betrug somit ~9:1. Die Summenaktivität von CK und CL betrug im CB-FP-Zellklon somit das 4,4-fache der Kontrollaktivität in LCLC-103H-Zellen. Dies deutet auf eine Hochregulation von CL hin.

4.2.8 *Kathepsin B-Enzymaktivität im Zellkern*

Das Vorkommen von CB in der perinukleären Membran wird im folgenden Kapitel unter dem Gesichtspunkt der CB-spezifischen Enzymaktivität betrachtet. Hierzu wurden Zellkerne zellrückstandsfrei aus unbehandelten und CB-FP exprimierenden LCLC-103H-Zellen präpariert (§3.6.6) und fluoreszenzmikroskopisch sowie spektroskopisch auf enzymatische CB-Aktivität hin untersucht.

Mikroskopischer Assay. Die Enzymreaktion wurde mit Hilfe des fluorogenen CB-Substrats Z-Arg-Arg-4M β NA nachgewiesen. Nicht nur rekombinantes, sondern auch endogenes CB kam an den isolierten Zellkernen vor und zeigte enzymatische Aktivität (Abb. 4.31(a), unten). Wegen einer starken spektralen Überlappung von umgesetztem Substrat und EGFP war eine Diskriminierung zwischen dem Reaktionsprodukt des intrinsischen CB und dem fluoreszenzmarkierten rekombinanten CB in transfizierten Zellen nicht möglich. Zwar fand sich im Nukleoplasma selbst keine CB-spezifische Aktivität, dagegen granulär verteilt in der perinukleären Membran. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Lokalisationsstudien des rekombinanten CB-FP (§4.2.4), welches nicht nur in das ER adressiert wird, sondern sich darüber hinaus auch in der benachbarten und mit dem ER verbundenen Kernmembran wiederfindet (Abb. 4.19(c), S.100).

Fluorometrische Bestimmung. Für die analog §4.2.5 durchgeführten spektroskopischen Tests wurde Z-Arg-Arg-AMC als fluorogenes Substrat verwendet. Im konstitutiv CB(FLM)-EGFP exprimierenden LCLC-103H-Zellklon 001 lag die kernassoziierte enzymatische CB-Aktivität zwei Zehnerpotenzen höher als bei der nicht-transfizierten Kontrolle (Abb. 4.31(b), unten). Dies geht einher mit den Messungen der intrazellulären CB-Gesamtaktivität (Abb. 4.26, S.108). Die beiden Inhibitoren E-64 und CA-074 wurden zur Unterdrückung von Kreuzaktivitäten in einer Endkonzentration von jeweils 0,5 μ M hinzugefügt um die Spezifität des Nachweises zu demonstrieren.

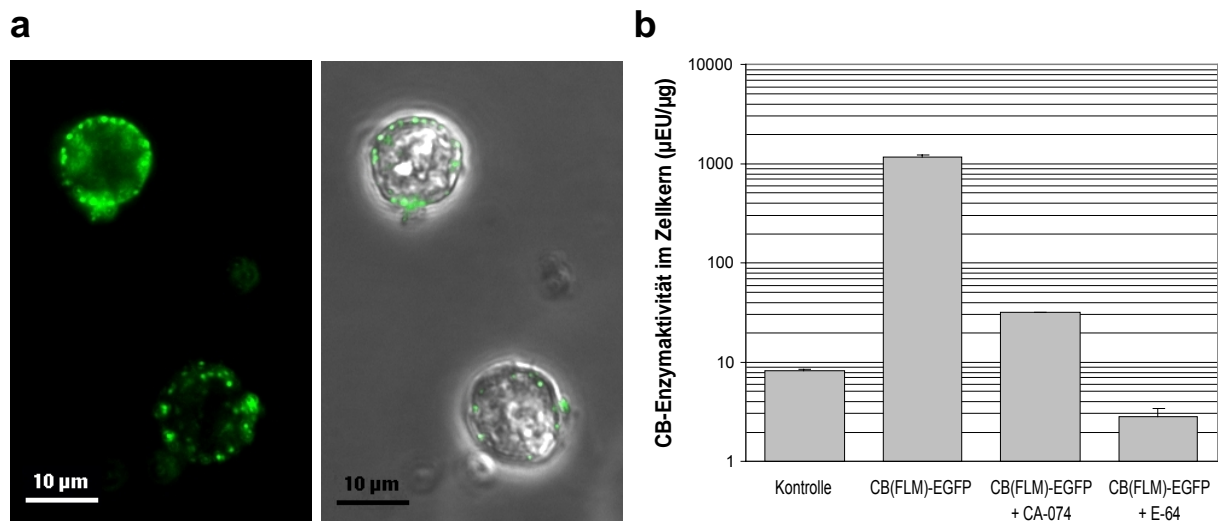


Abb. 4.31 Enzymatische CB-Aktivität im Zellkern. **a:** Präparierte Zellkerne aus der unbehandelten LCLC-103H-Kontrolle zeigten nach Applikation des CB-spezifischen Substrats Z-Arg-Arg-4MβNA eine punktuelle enzymatische Reaktion des endogenen CB im Bereich der Kernmembran, nicht aber im Nukleoplasma. (links: Fluoreszenz; rechts: Überlagerung Phasenkontrast/Fluoreszenz). Obj. 40×/0,60 Luft. **b:** Der konstitutiv CB(FLM)-EGFP exprimierende Zellklon 001 ergab gegenüber der Kontrolle eine ~138-fach höhere enzymatische Aktivität. Diese wurde unter der Zugabe des explizit CB-inhibierenden CA-074 auf 2,7 % des Ausgangswertes und mit dem minder stringenten E-64 (CB, CL) auf ~0,2 % gedrückt (Inhibitoren je 0,5 µM). Fehlerbalken: Standardabweichung (n = 3).

4.3 TRUNKIERTE KATHEPSIN B-FORMEN UND ZELLTOD

Zytoplasmatische Varianten von CB ohne ER-Signalpeptid spielen eine eigene Rolle bei Apoptose und Krebsentstehung (§2.2.7). Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, wie endogenes CB im Zytoplasma vorkommen kann: (i) als reifes Enzym, das aus beschädigten Lysosomen freigesetzt wird (KESSEL *et al.* 2000, FELDSTEIN *et al.* 2004, GUICCIARDI *et al.* 2004, ERDAL *et al.* 2004) und (ii) als trunkiertes Δ⁵¹CB, welches von alternativer hnRNA-Prozessierung herrührt (§2.2.7). Dem letzteren fehlen die komplette Signalsequenz sowie ein Teil des N-terminalen Pro-Peptids. Um das Verhalten solcher „aberranter“ CB-Formen zu beschreiben, wurden diverse Mutationsvarianten hergestellt und auf ihre Lokalisation, ihre enzymatische Aktivität und ihre Auswirkung auf die Zellvitalität hin untersucht. Diese Studie wurde in abgewandelter Form anderenorts veröffentlicht (BESTVATER *et al.* 2005).

4.3.1 Expression, Prozessierung und Enzymaktivität

Klonierung. Künstlich trunkierte CB-Konstrukte wie Δ⁷²CB oder die CB-Einzelkettenform, CB(SC), wurden in Analogie zu der CB(FLM)-Sequenz (§4.2.1) aus dem pT7T3D-Vektor mit kompletter hCB-cDNA (Tab. 3.8, S.43; S.53) über PCR gewonnen, zunächst in pBS S/K(+) und anschließend zusammen mit dem Fluoreszenzproteingen in pcDNA3 subkloniert. Die

CB(SC)-Sequenz diente als Matrize (*template*) für alle weiteren Mutationsvarianten, für deren Herstellung unterschiedliche Klonierungsstrategien angewandt wurden (Tab. 4.3, S.127). Δ^{72} CB resultierte aus einer intrinsischen *KpnI*-Restriktionsstelle (S.53) und ergab ein fluoreszierendes Expressionsprodukt. Dies setzt eine reguläre Leseraster-Translation voraus und läßt einen alternativen Translationsursprung sieben Seitenreste vor dem ersten Codon von CB(SC) auf Position M⁷³ erwarten. Die Deletion betraf das ER-Signalpeptid sowie weite Teile der N-terminalen Pro-Region. Von allen verwendeten Konstrukten kommt Δ^{72} CB dem natürlich vorkommenden, um 21 AS längeren Δ^{51} CB (§2.2.7) am nächsten. Einen wesentlichen Unterschied stellt aber das fehlende N-terminale mitochondriale Targetingsignal (MTS) dar.

Prozessierung. Die beiden künstlich trunkierten Schlüsselkonstrukte CB(SC)-EGFP und Δ^{72} CB-EGFP wurden in LCLC-103H-Zellen transient exprimiert und im Hinblick auf ihre posttranslationale Prozessierung mittels Western-Blot analysiert (Abb. 4.32).

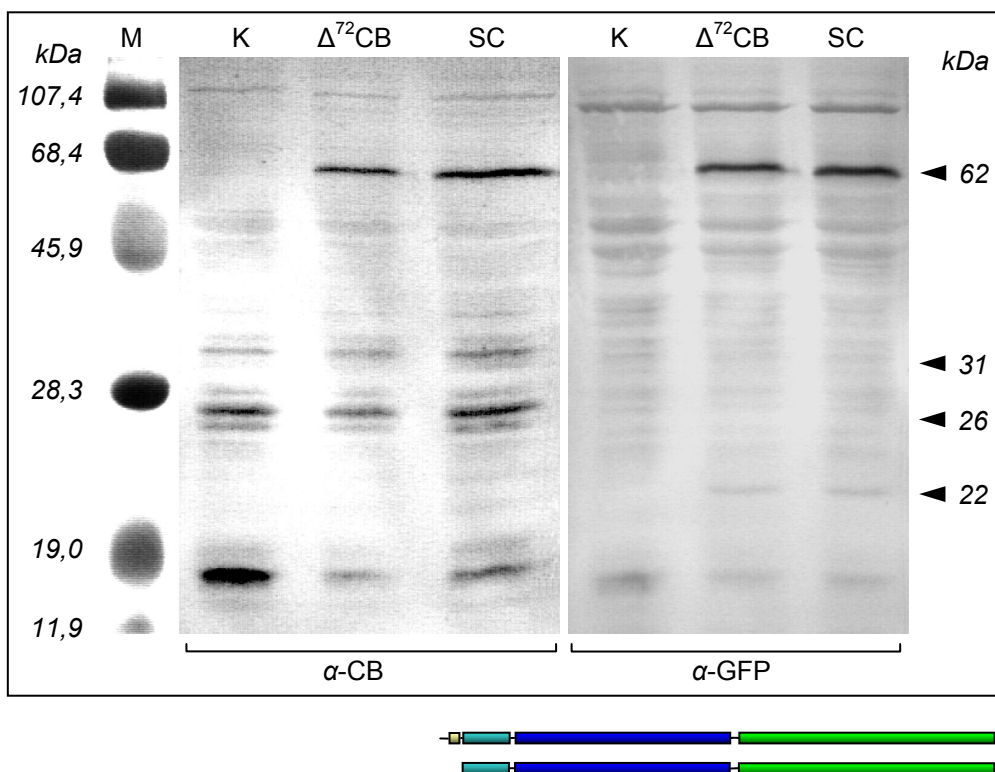


Abb. 4.32 Posttranslationale Prozessierung von endogenem CB sowie transient überexprimiertem Δ^{72} CB-EGFP und CB(SC)-EGFP in LCLC-103H-Zellen. Links: α -CB-AK; rechts: α -GFP-AK. In allen Fällen sind intrinsische CB-Formen bei ~31 kDa (Einzelkettenform) und ~26 kDa (schwere Kette) mit potentiellen Isoformen (schwächere angrenzende Banden) sowie unspezifische niedermolekulare Proteinbanden (Degradationsprodukt?) im CB-Immunoblot zu sehen. Darüber hinaus weisen die Proteinextrakte aus den transfizierten Zellen im Gegensatz zur nicht-transfizierten Kontrolle (K) zusätzliche intensive Banden im Bereich von ~62 kDa (komplettes ungeschnittenes Fusionsprotein; α -CB, α -GFP) sowie weniger intensive Banden bei ~22 kDa (α -GFP) auf. Die 62 kDa-Bande von Δ^{72} CB-EGFP verläuft geringfügig höher als die von CB(SC)-EGFP. Dies ist auf den Einfluß der zusätzlichen 6 AS zurückzuführen, die durch den früheren Translationsstart hinzukommen. Die schwachen 22 kDa-Banden deuten darauf hin, daß ein geringfügiger Anteil der EGFP-Markierung von den Fusionsproteinen entfernt wurde.

In beiden Fällen sind leichte und schwere Kette (LC bzw. HC) durch zwei Seitenreste miteinander verbunden, die *in vivo* während der Zymogenprozessierung herausgespalten werden (Abb. 2.2, S.18). Anders als ihr intrinsischer Gegenspieler, wurden die beiden ~62 kDa großen Δ^{72} CB–EGFP und CB(SC)–EGFP nicht gespalten, da sonst Signalzunahmen an den entsprechenden Stellen im Western-Blot zu sehen wären. Nur ein kleiner Anteil des C-terminalen Fluoreszenzproteins wurde abgespalten: Ein potentiell Degradationsprodukt wurde bei ~22 kDa identifiziert, jedoch in sehr geringer Menge. Diese hohe Stabilität der Konstrukte ist von Bedeutung für die weiteren Studien. Endogenes CB zeigte in allen Extrakten ein typisches Bandenmuster, welches hauptsächlich die Einzel- und die schwere Ketten-Form repräsentiert; sein Expressionsniveau wurde durch die Überexpression des rekombinanten Produkts nicht beeinträchtigt.

Enzymatische Aktivität. *In vivo*- und *in vitro*-Studien haben keine Zunahme der regulären CB-Enzymaktivität während transients Überexpression von CB(SC)-Varianten ergeben. Demnach sind diese Konstrukte in typischer Weise enzymatisch inaktiv.

4.3.2 Nativ trunkiertes Kathepsin B

Die transiente Expression des Fluoreszenzprotein-markierten alternativen Spleißprodukts Δ^{51} CB (MÜNTENER *et al* 2003, 2004) in LCLC–103H-Zellen ergab eine intensive Färbung der Mitochondrien und eine geringere Fluoreszenz in den Zellkernen, wobei die Nukleolen nicht markiert wurden (Abb. 4.33).

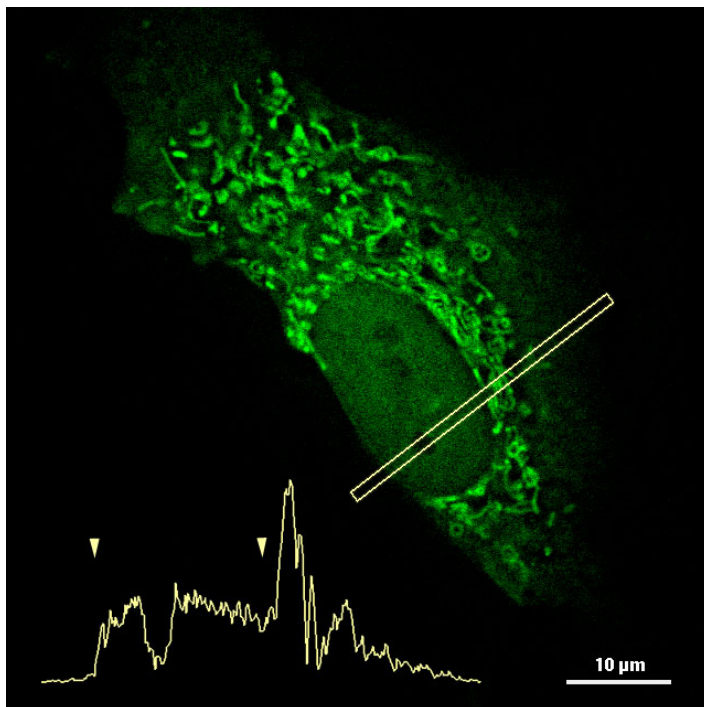


Abb. 4.33 Lokalisation von Δ^{51} CB. LCLC–103H-Zellen mit transienter Δ^{51} CB–EGFP-Expression zeigten eine intensive mitochondriale Verteilung des Fluoreszenzsignals, welche auf die MTS in den ersten 20 AS von Δ^{51} CB zurückgeht. Neben einem sehr niedrigen zytoplasmatischen Hintergrund fand sich auch im Nukleoplasma ein Signalpegel, der ~40 % der mitochondrialen Fluoreszenzintensität ausmachte. Nukleolen blieben dabei ausgespart. Ein Profilschnitt durch die Zelle verdeutlicht die Intensitätsverhältnisse. Die Pfeilspitzen markieren die Kernbegrenzungen. Der Intensitätsabfall im Kernbereich ist auf einen angeschnittenen Nukleolus zurückzuführen. Das dargestellte Dekonvolutionsbild basiert auf 23 Schnittebenen, die im Abstand von 200 nm aufgenommen wurden. WFM, Obj. 63×/1,4 Öl.

4.3.3 Intrazelluläre Lokalisation der Einzelkettenform

Lebendzellnachweis. Neben den als Standardzellsystem verwendeten LCLC-103H-Zellen wurden eine Reihe etablierter Zelllinien sowie frisch isolierte Endothelzellen (Tab. 3.12, S.61) mit der rekombinanten Einzelkettenform transfiziert und transient exprimiert. Die Verteilung der Δ^{72} CB-Form wird zusammen mit anderen Mutanten von CB in einem späteren Kapitel (§4.3.5, S.123) behandelt. Pures EGFP, welches keine Zielsequenzen enthält, wurde als Lokalisations-Kontrolle verwendet (Abb. 4.18, S.100).

In allen Fällen lokalisierte CB(SC)-FP signifikant anders als die von natürlichen CB-Formen abgeleiteten Fusionsproteine CB(FLM)-FP und Δ^{51} CB-FP. Wie erwartet, tauchte es zunächst im Zytoplasma, nicht jedoch im ER, im Golgi oder in sauren Vesikeln von LCLC-103H-Zellen auf. Im späteren Verlauf wurde es in perinukleären Granulen angereichert (Abb. 4.34(a,b), unten). Auffallend war eine von homogen bis heterogen reichende nukleäre Verteilung. Die Nukleolen zeigten ein gesprenkeltes Signalmuster (Abb. 4.34(f,g)) oder wurden gänzlich ausgespart (Abb. 4.35(a,b; Pfeilspitzen), S.119). Fluoreszenz kam während der Mitose auch in der Midbody-Matrix* vor (Abb. 4.34(c-f)).

Andere Zelltypen zeigten in den meisten Fällen (HeLa, Hep-G2, Wi-38) eine den LCLC-103H-Zellen vergleichbare Lokalisation (Abb. 4.35). Überwiegend homogen war dagegen die Signalverteilung in den COS-7-Zellen (Abb. 4.35(k,l)). Die signifikantesten Abweichungen wurden bei den primären endothelialen HDMEC-Zellen beobachtet (Abb. 4.35(g,h)). Diese enthielten zwar ebenfalls intensive punktuelle Signale im Zytoplasma, die Zellkerne blieben dagegen komplett ausgespart. Mit Ausnahme der HDMEC-Zellen zeigte somit keiner der untersuchten Zelltypen prinzipielle qualitative Unterschiede. Fehlende Kernfluoreszenz im Falle der Endothelzellen könnte auf einem verzögerten oder funktionsgestörten Transportmechanismus beruhen.

Immunozytochemischer Nachweis. Um einen möglichen Einfluß des Fluoreszenzproteins auf die Lokalisation der Einzelkettenform auszuschließen und deren Integrität für den Fall einer Degradation oder Prozessierung zu prüfen, wurden zwei weitere Konstrukte hergestellt†: (i) myc-CB(SC)-FP, das zusätzlich zum C-terminalen Fluoreszenzprotein ein N-terminales myc-AK-Epitop (EQKLISEEDL) enthält sowie (ii) myc-CB(SC), das lediglich myc-markiert ist. Der Nachweis erfolgte immunozytochemisch mit α -myc- und α -GFP-AK an fixierten LCLC-103H-Zellen.

* Das Midbody, auch Fleming-Körper oder Teilungsbrücke genannt, ist ein persistentes Überbleibsel des Spindelapparats mitotischer Tochterzellen, welches Kernmaterial und andere Stoffe enthält. Die Midbody-Matrix bildet lediglich den scheiben- bzw. ringförmigen Teil des gesamten Midbody.

† Ein weiteres Konstrukt, das ebenfalls Aussagen über Markierungsposition und Molekülintegrität erlaubt, war das mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen markierte FP-CB(SC)-FP. Dieses wird zu einem späteren Zeitpunkt in einem anderen Kontext behandelt (4.3.6, S.129).

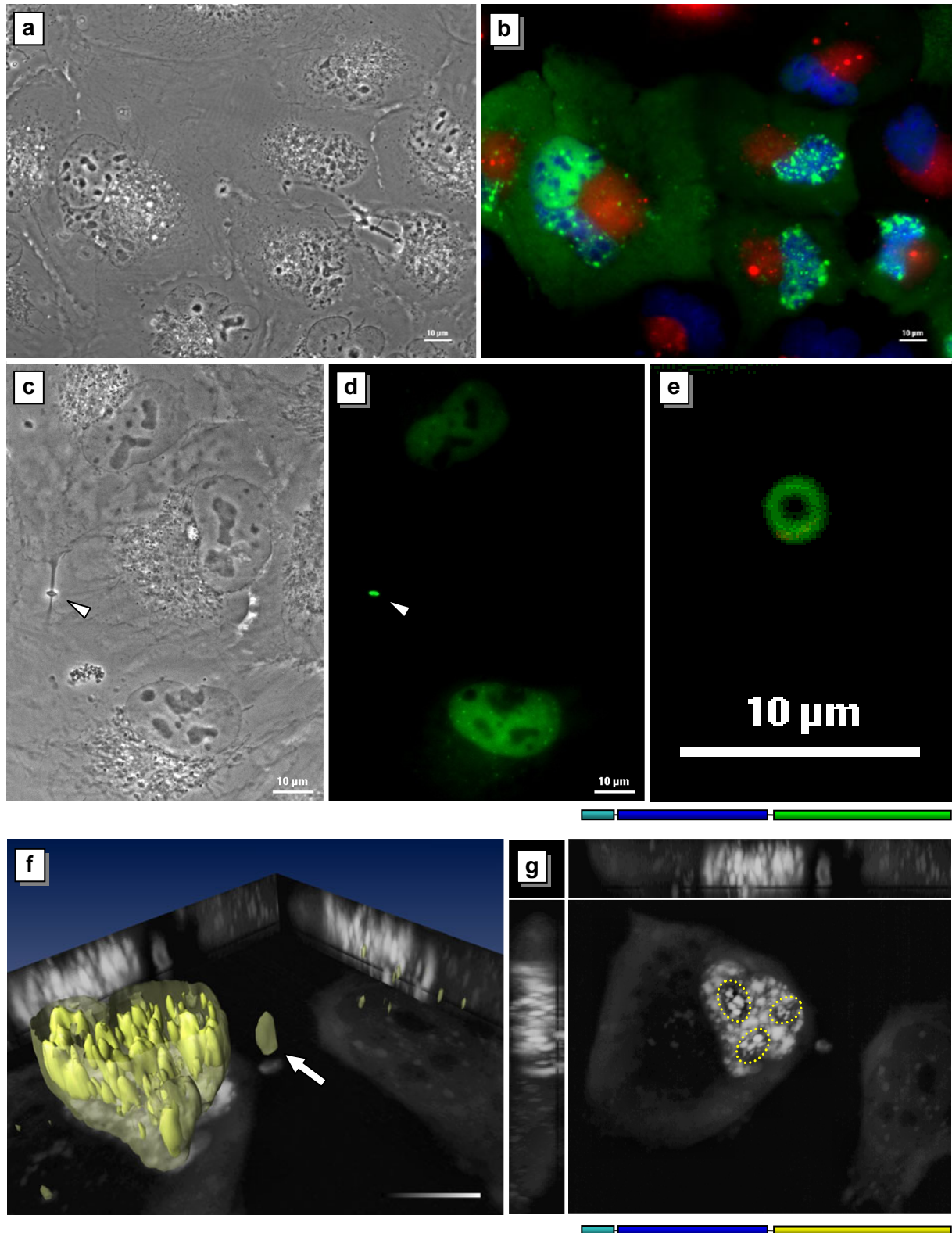


Abb. 4.34 Lokalisation der CB-Einzelkettenform in LCLC-103H-Zellen. (a,b) Transient CB(SC)-EGFP (grün) exprimierende Zellen wurden mit Hoechst 33342 (blau) und LysoTracker Red (rot) gegengefärbt. EGFP-Fluoreszenz kam diffus im Zytoplasma vor und wurde in Granulen sowie im Zellkern angereichert. Die Nukleolen blieben zum großen Teil ausgespart, wie durch die DNA-Färbung angedeutet wird. Die retikuläre und vesikuläre Färbung des lysosomalen Markers im Bereich der Kernbucht überlappte nicht mit den EGFP-Signalen. Während der Zellteilung tauchte CB(SC)-EGFP auch in der ringförmigen Midbody-Matrix auf (c,d: Pfeilspitzen; e: vergrößerte Darstellung). (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Eine 3D-Rekonstruktion (f) und orthogonale Projektionen (g) der CB(SC)-EYFP-Expression verdeutlichen die Morphologie und die räumliche Lage der Granulen im Nukleoplasma und innerhalb der Nukleolen (gestrichelte Begrenzungen in g) sowie des Midbody (f, Pfeil). WFM (a-e): Obj. 40×/1,30 Öl. (a-d) und 63×/1,25 Öl (e). Größenbalken 10 µm. LSM (f,g): Isoflächen verschiedener Intensitäten geben die diskreten Begrenzungen von Zellkern, Midbody (transparent) und Granulen (opak) wieder. Obj. 63×/1,32 Öl; Ex.: 488 nm, Em.: 500–550 nm (FITC-Filter); Ausschnitt: 72 × 59 × 11 µm³ (≅ 464 × 380 × 25 Voxel). Die räumliche Rekonstruktion erfolgte mit dem Programm „Amira“.

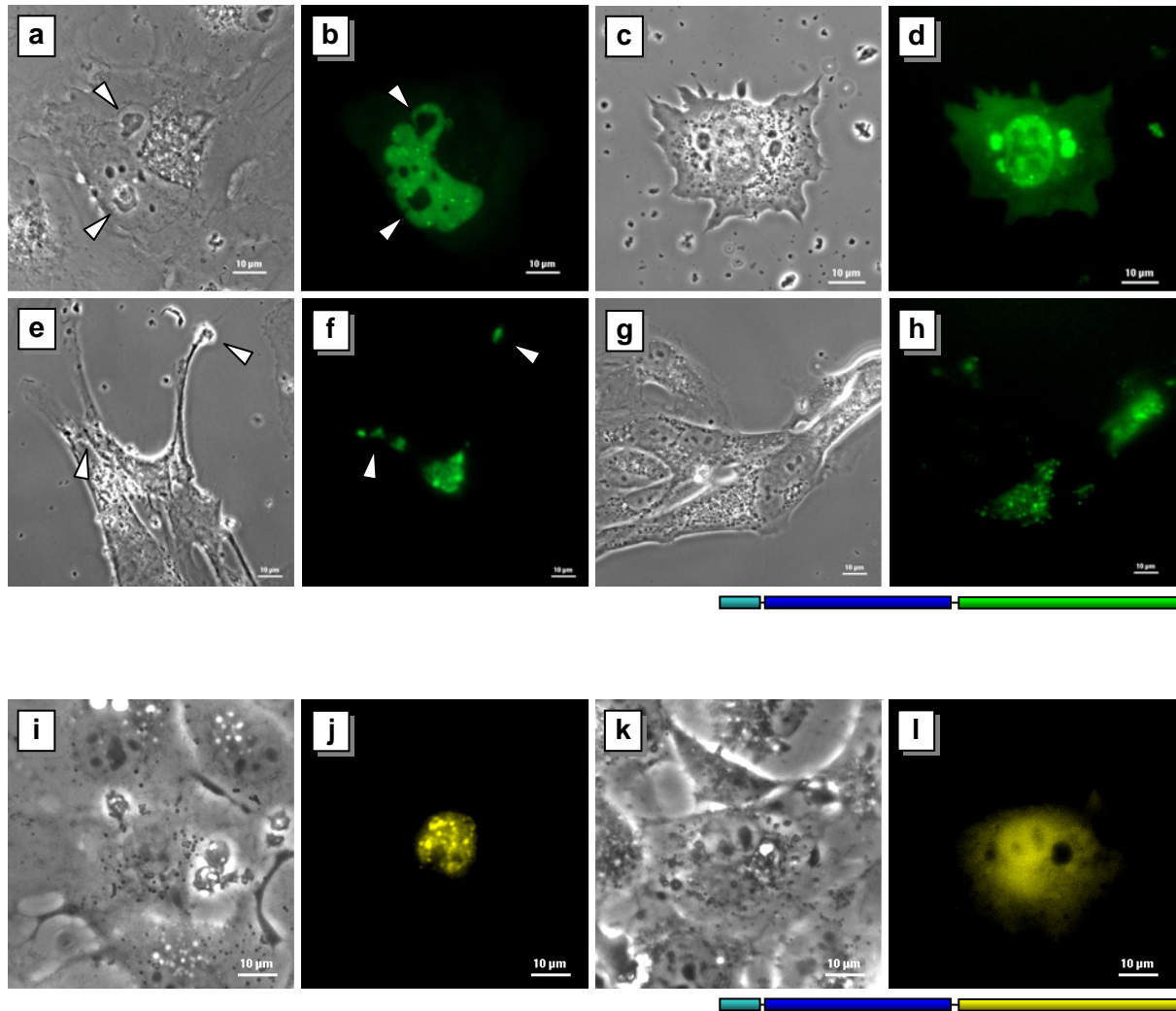


Abb. 4.35 Lokalisation der CB-Einzelkettenform in verschiedenen Zelltypen. Transiente Expression von CB(SC)-FP in anderen Zelllinien als LCLC-103H (a,b) fiel ähnlich aus: Hep-G2-Hepatozyten produzierten eine höhere Anzahl perinukleärer Vesikel (c,d). Wi-38-Fibroblasten zeigten vesikuläre Strukturen auch in peripheren Zellregionen wie den Pseudopodien, allerdings geringere Anhäufungen im Zellkern. (e,f, Pfeilspitzen). Endotheliale HDMEC-Zellen hatten gering intensive, punktuelle Signale im Zytoplasma, der Zellkern war aber kaum betroffen (g,h). Eine stark kernbezogene Signalverteilung war in MDCK-Zellen zu finden (i,j). Die Lokalisation in den COS-7-Zellen war homogener im Zytoplasma, ohne besondere Anhäufungen und mit geringen Signalen im Zellkern (k,l). Obj. 40×/1,30 Öl; Größenbalken 10 µm.

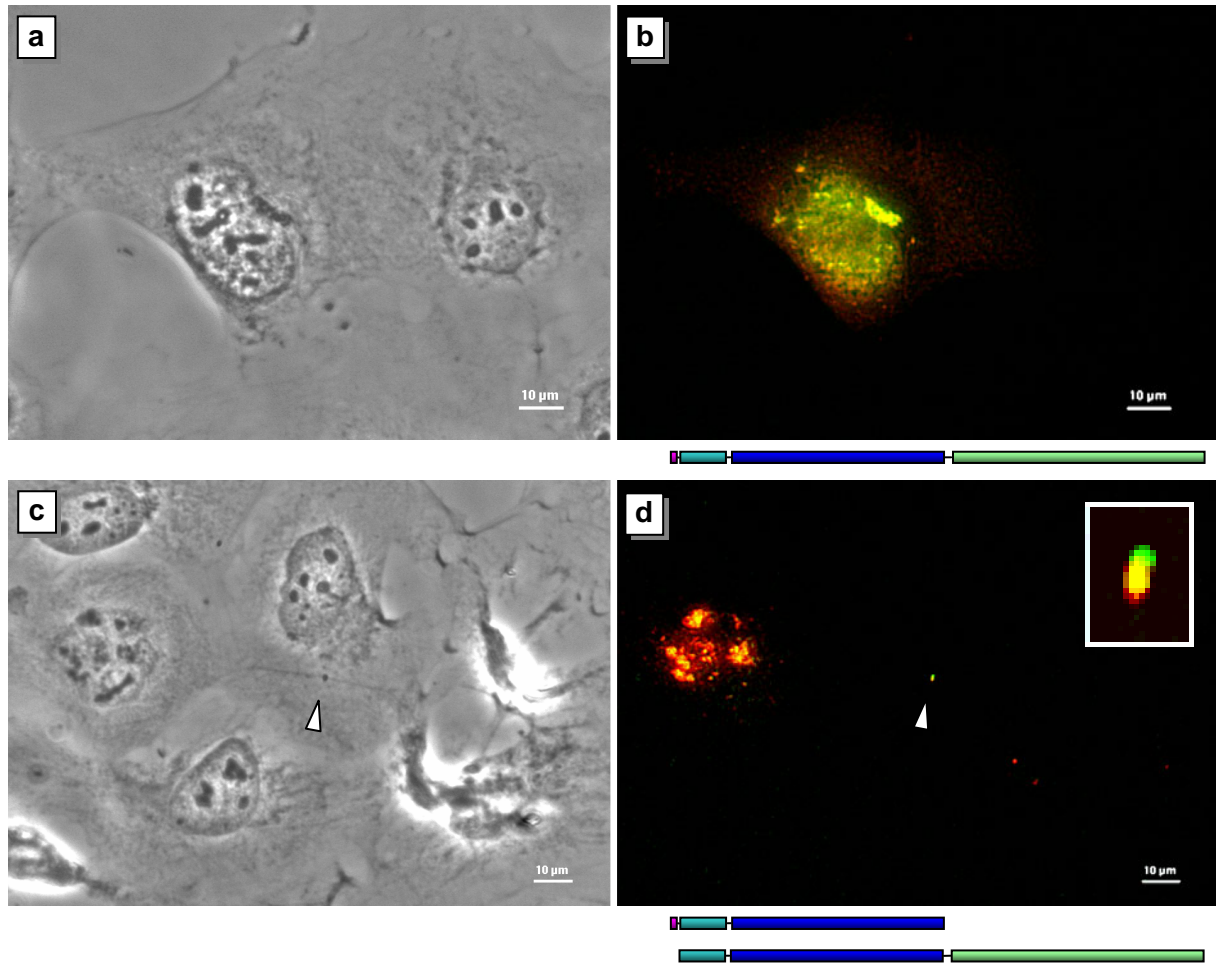


Abb. 4.36 Immunocytochemischer Nachweis der CB-Einzelkettenform. Die Prozessierung von rekombinantem CB(SC) sowie ein möglicher Einfluß des Fluoreszenzprotein-Markers auf die Lokalisation der Chimäre wurden durch die Verwendung eines zusätzlichen N-terminalen myc-Epitops überprüft. Transient *myc-CB(SC)-EGFP* exprimierende LCLC-103H-Zellen wurden mit Aceton/Methanol fixiert und mit spezifischen AK gegen myc und GFP gefärbt. Beide AK ergaben eine enge Kolokalisation (a). Die mit *myc-CB(SC)* sowie *CB(SC)-EGFP* transfizierten und Ethanol/Aceton-fixierten Zellen führten ebenfalls zu einer weitgehenden Kolokalisation (b). In beiden Fällen wurden überwiegend Zellkern, Vesikel und die Midbody-Matrix gefärbt (c,d: Pfeilspitzen; vergrößerter Ausschnitt in d). Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken 10 μm.

Das beidseitig markierte *myc-CB(SC)-EGFP* ergab eine weitgehende Signalüberlappung beider AK-Konjugate (Abb. 4.36(a,b), oben). Auch *myc-CB(SC)* kolokalisierte mit *CB(SC)-EGFP* im Zellkern, in den zytoplasmatischen Granulen sowie in der Midbody-Matrix (Abb. 4.36(c,d)). Die etwas intensivere Färbung des ER durch α -myc-AK-Konjugate könnte auf unspezifischen Hintergrund oder auf nicht komplett exprimiertes/gefaltetes Fluoreszenzprotein zurückzuführen sein. Kontrollen ohne Primär- oder Sekundär-AK ergaben allerdings einen sehr geringen Hintergrund. Die Ergebnisse belegen, daß weder Art noch Größe oder Position des Markers einen signifikanten Einfluß auf die Lokalisation von CB(SC) ausübten. Zusätzlich ist die Prozessierung der CB-Einzelkettenform in leichte und schwere Ketten unter transienten Expressionsbedingungen wegen der Signalüberlappung unwahrscheinlich. Dies belegen auch Western-Blot-Analysen (S.115) sowie FRET-Versuche (§4.3.6).

4.3.4 Nukleoplasmatische Bindung

Die Mobilität von Fluoreszenzprotein-markiertem CB(SC) wurde mittels zweier Photobleichexperimente *in vivo* untersucht. TPM wurde angewandt, um die Fluoreszenzauslöschung durch kontinuierliche Bestrahlung oder durch FRAP zu messen. Weil TPM geringere Schäden bei Fluorochromen und Zellen verursacht, kann die effektive Beobachtungszeit verlängert werden. Zu Vergleichszwecken wurden EGFP sowie zwei EGFP-Chimären als Kontrollen eingesetzt: der ribosomale Transkriptionsinitiationsfaktor TIF1A und das Histon H2A. Ihre Diffusions- und Bindungscharakteristiken können von ihrer bekannten Lokalisation und ihren funktionellen Eigenschaften abgeleitet werden. Alle Kontrollen erscheinen im Zellkern und repräsentieren unterschiedliche Typen von Kernbindung: EGFP diffundiert frei und besitzt keinerlei Bindungskapazität. Der Transkriptionsfaktor hat eine mobile (Nukleoplasma) und eine immobile (Nukleolen) Fraktion. Histone werden im Zellkern fest gebunden. Es wurden konstitutiv (H2A–EGFP*) oder transient (restliche Konstrukte) exprimierende LCLC–103H-Zellen untersucht. Die erfaßten Serienbilder wurden bezüglich ihrer Fluoreszenzintensität mit Hilfe automatisierter Bildverarbeitungsroutinen ausgewertet (Anhang, S.166).

Kontinuierliche Bestrahlung. Eine ausgewählte Kernregion (ROI) wurde durch Scannen wiederholt bestrahlt, simultan als Bilderserie aufgenommen und der Intensitätsschwund über die Zeit ausgewertet (Abb. 4.37(a), unten). Der Abfall des EGFP-Verlaufs war erwartungsgemäß gering, nach 1 min Bestrahlung sank die Ausgangsintensität kontinuierlich um lediglich 10 %, was auf fehlende immobile Fraktion hindeutet. Die Bleichcharakteristiken von TIF1A–EGFP zeigten eine intensive Auslöschung der Fluoreszenz auf ein Drittel des Ausgangswertes. Im Gegensatz dazu besitzt der H2A–EGFP-Verlauf einen extrem steilen anfänglichen Abfall – innerhalb der ersten ~10 s ist das Gleichgewicht erreicht. Dieser Befund legt nahe, daß das Gros des Fluoreszenzprotein-markierten Histons immobil und daß die mobile Reserve gering ist. Die Graphen beider CB(SC)-Konstrukte (CB(SC)–EGFP und ECFP–CB(SC)–EYFP) zeigen zu Beginn einen starken Abfall und liegen zwischen den beiden Kontrollkonstrukten EGFP und H2A–EGFP. Daraus resultiert, daß sie nicht komplett der freien Diffusion unterliegen, sondern zu einem geringen Teil gebunden sind.

FRAP. Die Regenerierung der Fluoreszenz nach vorangehendem vollständigen Photobleichen innerhalb einer Kern-ROI wurden analog zu dem kontinuierlichen Bestrahlungsexperiment durchgeführt (Abb. 4.37(b), unten). Rückdiffusion von Fluorochrom in die gebleichte Zone wurde kontinuierlich registriert. Kleinere Laufzeitunterschiede zu Beginn der Messungen sind prozedurbedingt. Die Regenerierung sowohl der EGFP- als auch der TIF1A–EGFP-Intensität war innerhalb von Millisekunden abgeschlossen. Während nur mobiles EGFP beobachtet

* Fluoreszenzprotein-Konvertant wie in §4.1.3 (S.80) beschrieben

wurde, gab es einen sehr geringen (~3 %) Anteil an immobilisiertem TIF1A-EGFP, wie durch dessen niedrigeres Plateau angedeutet. Im Gegensatz dazu wurde die Fluoreszenz der fest gebundenen Histon-GFP-Chimäre kaum wiederhergestellt. Ein Anteil von >60 % wurde als immobile Fraktion identifiziert. Auch bei diesem zweiten Experiment zeigten beide CB(SC)-Varianten ein intermediäres Verhalten in Bezug auf die Kontrollen. Das Ergebnis unterstützt die These ihrer Bindung an Kernkomponenten. Die immobilisierten Fraktionen waren gering und die Diffusion erschien verzögert in beiden Fällen. Trotz der höheren Molekülmasse bewegte sich das doppelt markierte CB(SC) schneller als die einfach markierte Variante. Hierfür könnten Konformationsänderungen im CB-Protein verantwortlich sein, die auf das zusätzliche N-terminale Fluoreszenzprotein zurückgehen und die Affinitätscharakteristiken beeinflussen könnten. Weiterhin ist das unterschiedliche Photobleichverhalten der hier verwendeten Marker EGFP und ECFP/EYFP zu beachten, das die Ergebnisse beeinträchtigen könnte.

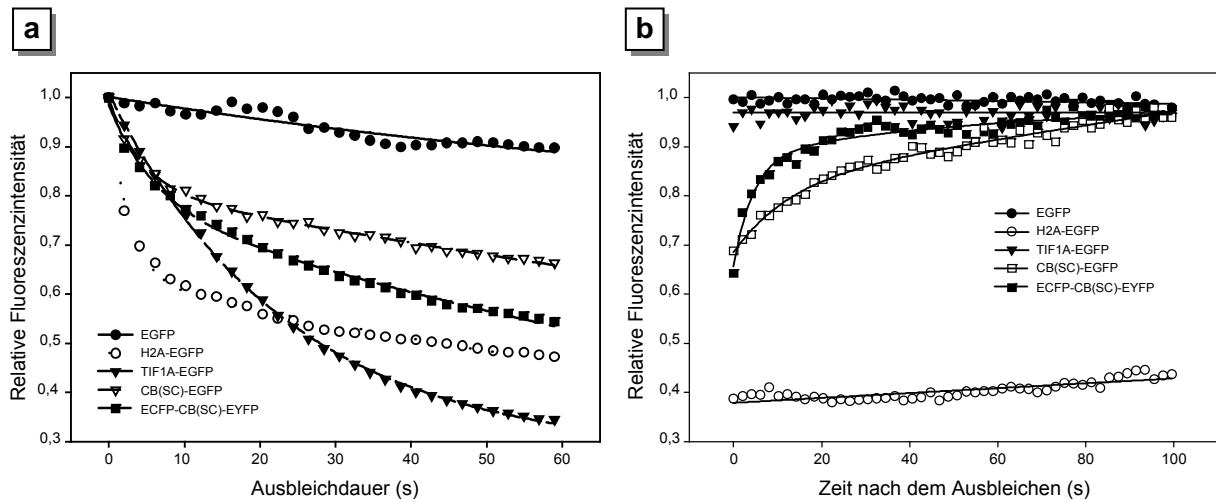


Abb. 4.37 Kerndiffusion und Bindung von rekombinantem CB(SC). Fluoreszenz wurde durch TPM innerhalb distinkter Kernregionen ausgelöscht und Diffusions- sowie Bindungscharakteristiken Fluoreszenzprotein-markierter Konstrukte wurden bestimmt. (a) Kontinuierliche Bestrahlung von CB(SC)-EGFP, ECFP-CB(SC)-EYFP sowie der Kontrollproteine EGFP, H2A-EGFP und TIF1A-EGFP ($n = 2$ oder 3), dargestellt als Funktion der Zeit. Die Anpassungsfunktion setzt sich aus zwei Teiltermen zusammen, die das Photobleichen der gebundenen und der ungebundenen Komponente beschreiben. Während die Graphen für EGFP und TIF1A-EGFP auf freie Diffusion hinweisen, existiert die H2A-EGFP-Population überwiegend im gebundenen Zustand. Beide CB(SC)-Konstrukte zeigen ein intermediäres Verhalten, was dafür spricht, daß sowohl gebundene als auch mobile Fraktionen vorkommen. (b) Die FRAP-Kurven derselben Zusammenstellung an Fusionsproteinen bekräftigen die Ergebnisse aus (a).

Beide experimentellen Ansätze stimmen in ihren Ergebnissen überein; sie belegen im Hinblick auf die Kontrollmoleküle frühere Studien an vergleichbaren Kernproteinen (PHAIR & MISTELI 2000, WACHSMUTH *et al.* 2003). Bezüglich der CB(SC)-Chimären läßt sich sagen, daß eine erschwerte Diffusion im Zellkern vorliegt, welche wahrscheinlich auf eine erhöhte Affinität zu Kernkomponenten zurückzuführen ist.

4.3.5 Mutationsanalyse und Lokalisationsstudien

Die Kernanreicherung von CB(SC) hat für Zellen drastische Konsequenzen, wie im nächsten Kapitel (§4.3.6) gezeigt werden soll. Der Frage, welcher molekulare Bereich von CB an der Kernlokalisierung beteiligt sei und um welche Signalart es sich dabei handele (linear, zusammengesetzt), wurde mit einer Mutagenese nachgegangen. Für eine Vergleichsstudie wurden unterschiedlich markierte* CB-Mutanten hergestellt. Diese wurden in LCLC-103H-Zellen transient exprimiert und ihre Lokalisation mittels WFM untersucht. Alle CB-Konstrukte sind in Abb. 4.38 (S.124) schematisch wiedergegeben; Abb. 4.33 (S.116) und Abb. 4.39 (S.125) illustrieren die intrazelluläre Verteilung der wichtigsten Konstrukte, die Ergebnisse der Lokalisationsstudie sind in Tab. 4.3 (S.127) zusammengefaßt.

Ein Konstrukt, welches das natürlich vorkommende trunke CB codiert (Δ^{51} CB; #2), lokalisierte überwiegend in Mitochondrien und in geringeren Mengen im Zellkern (Abb. 4.33, S.116). Zwei Konstrukte wurden unter Verwendung gegebener Schnittstellen hergestellt: (i) Eine *KpnI*-Deletion führte zu einem gegenüber CB(SC) (#5-10[†]) um 7 AS längeren Konstrukt mit Teilen des N-terminalen Pro-Peptids (Δ^{72} CB; #3,4; S.114). (ii) Der *BglII*-Mutante (#11) fehlte ein 33 AS langer Bereich ($\Delta C^{211-243\ddagger}$), der eine potentielle Disulfidbrücke enthält und im intakten Protein die beiden globulären Domänen der schweren Kette miteinander verbindet. Beide Mutanten lokalisierten identisch zu CB(SC) (Abb. 4.39(a,b), S.125). Die Deletion des C-terminalen Pro-Peptids bei Δ^{72} CB (vgl. #3 und #4) hatte wie im Falle von CB(SC) (#5,6) keinerlei Einfluß auf die Signalverteilung. Dies wurde auch von anderen beobachtet (MÜNTENER *et al.* 2003). Daraus läßt sich schließen, daß die Chimären an dieser Stelle nicht prozessiert wurden und die Lokalisationsergebnisse damit verläßlich sind.

Da insbesondere im Falle zusammengesetzter Signale die Konformation eine wesentliche Rolle spielt, wurden Proteinbereiche, die im natürlichen Polypeptid eine globuläre Struktur haben, für die Fragmentierung ausgewählt. Es wird angenommen, daß die Faltung mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zu einer dem endogenen Protein entsprechenden Konformation führen sollte (Abb. 4.40(a), S.128). Es wurden zwei Fluoreszenzprotein-markierte Konstrukte hergestellt, welche der schweren (HC) sowie der leichten (LC) Kette von CB entsprechen (Abb. 2.2, S.18; Abb. 2.3, S.19).

Während beide CB(LC)-Varianten (#12,13) eine diffus homogene Verteilung ähnlich dem reinen *avGFP*-Marker aufwiesen (Abb. 4.39(d); vgl. Abb. 4.3(a), S.77 und Abb. 4.18, S.100), wurde das einfach markierte CB(HC) (#14) identisch zu CB(SC) im Zytoplasma, im Nukleoplasma, in Granulen sowie in der Midbody-Matrix angereichert (Abb. 4.39(d)).

* Verwendung fanden von *avGFP* abgeleitete Fluoreszenzproteine (EGFP, EYFP, ECFP und EBFP) sowie indirekte Marker wie *myc*. Anzahl und Ort der Markierung wurden ebenfalls variiert.

[†] die Nummerierung der Konstrukte folgt derjenigen in Abb. 4.38 bzw. Tab. 4.3

[‡] FLM-Aminosäuren-Nomenklatur

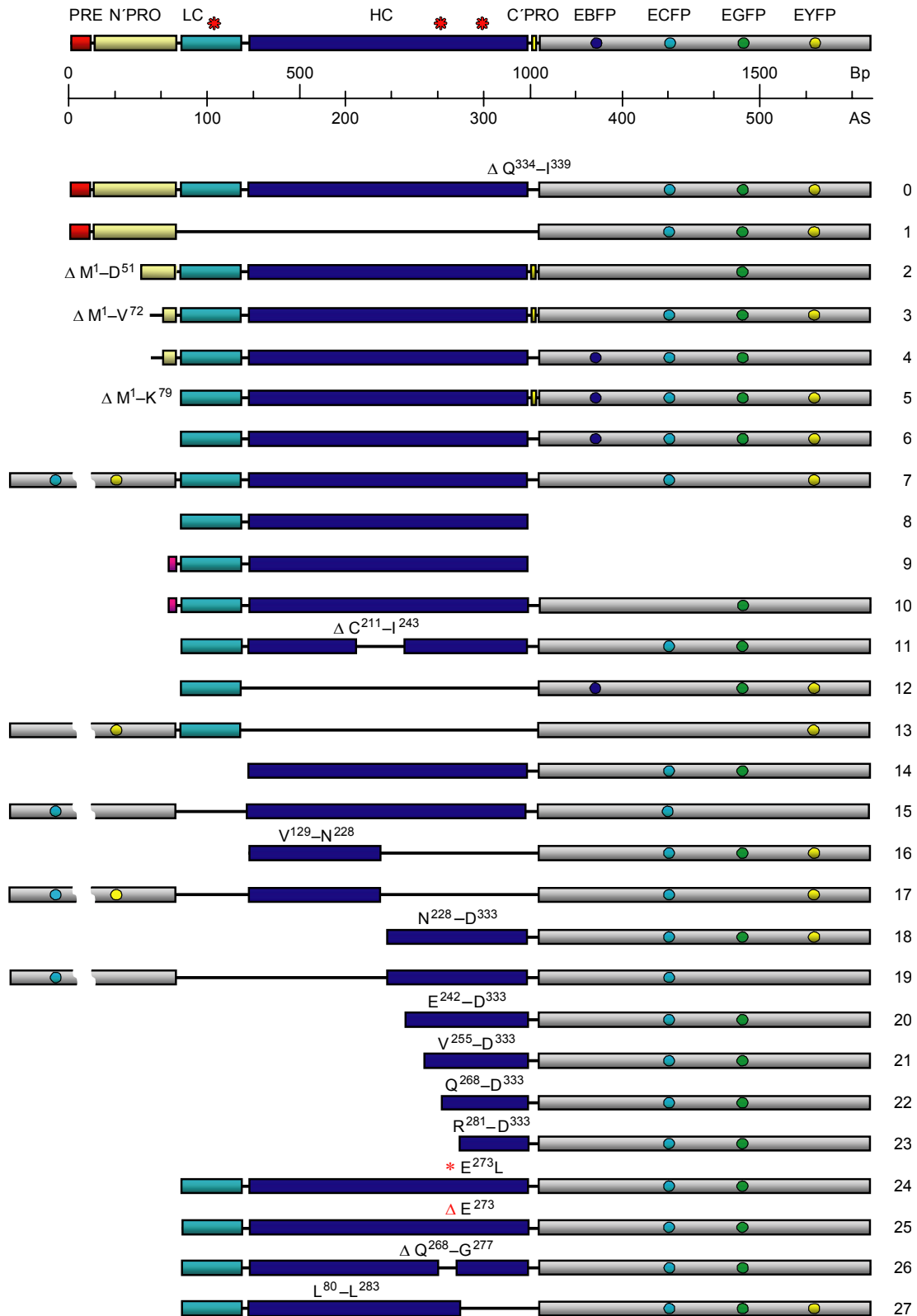


Abb. 4.38 Mutagenese. Schematische Übersicht der CB-Konstrukte, die ausgehend von der kompletten CB(FLM)-FP-Sequenz (#0) hergestellt wurden. Deletierte Bereiche werden durch Linien repräsentiert, welche exprimierte Regionen (Balken) verbinden. Die N-terminalen Fluoreszenzproteine sind verkürzt dargestellt. Farbige ausgefüllte Kreise innerhalb der Fluoreszenzprotein-Sequenz (grau) symbolisieren die verschiedenen Fluoreszenzvarianten. Die Nummerierung erfolgt analog Tab. 4.3 (S.127). HC: schwere Kette; LC: leichte Kette; Δ: Deletion; *: Aminosäure des aktiven Zentrums (oben) oder Aminosäure-Austausch (#24).

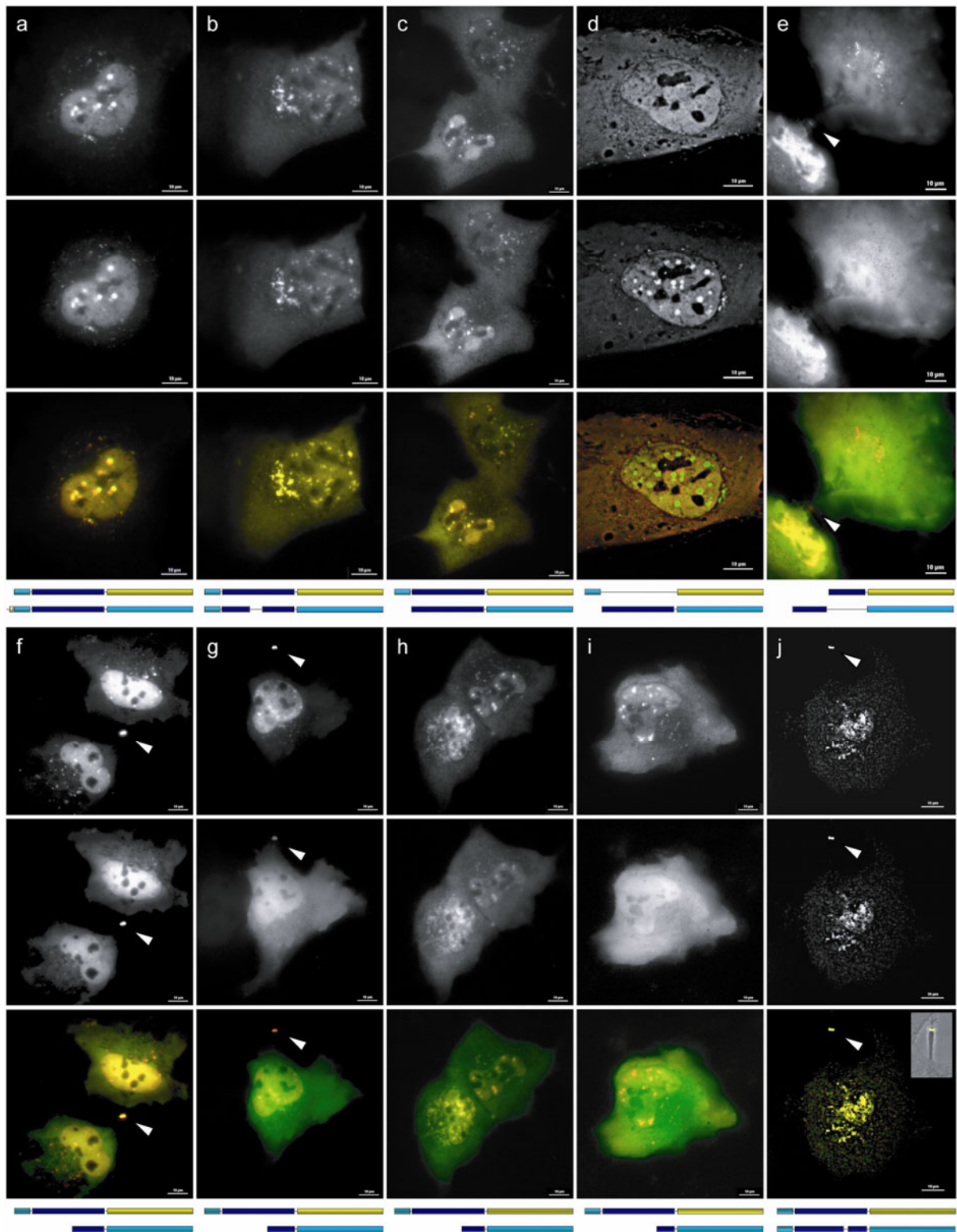


Abb. 4.39 Transiente Expression mutierter CB-FP-Chimären in LCLC-103H-Zellen. Dargestellt sind jeweils die individuelle Expression (oben: EYFP-markiert; unten: ECFP-markiert) und eine Falschfarbenüberlagerung beider Fluoreszenzkanäle (EYFP: rot; ECFP: grün). Da die Art des C-terminalen Fluoreszenzproteins keinen signifikanten Einfluß auf die Lokalisation hatte, werden die Konstrukte im folgenden in einer allgemeinen Form wiedergegeben. Kotransfektion von $[\Delta C'PRO]\Delta^{72}CB$ (a) bzw. $CB([\Delta C^{211}-I^{243}]SC)$ (b) mit $CB(SC)$ führte zu einer vollständigen Kolokalisation. Auch die Signale der schweren Kette überlappten noch weitgehend mit denen der Einzelkettenform (c). (Fortsetzung auf der nächsten Seite)

Verglichen mit der schweren Kette war die leichte Kette homogen in der Zelle verteilt (**d**). Im Gegensatz zu CB(HC_N) exprimierte CB(HC_C) diskret im Bereich des Golgi und im Zytoplasma und färbte die Midbody-Matrix (**e**). Transiente Koexpression von CB(SC) und dessen zunehmend verkürzter C-terminaler Fragmente (**f–j**) führte zu abnehmender Kernfluoreszenz mit sinkender Fragmentgröße. Bereits im Falle von CB(HC_{C1}) (**f**) war die Tendenz zur Granulenbildung stark reduziert und die Agglomerate verschwanden komplett im Falle der CB(HC_{C4})-Transfektion (**i**). Das Letztere zeigte eine komplett homogene Signalverteilung ohne jegliche Anhäufung im Zellkern, den Granulen oder der Midbody-Matrix. Die Eliminierung von 9 Seitenresten im C-terminalen Teil von CB ($\Delta Q^{268}-G^{277}$) hatte keinen signifikanten Einfluß auf die Lokalisation; das Konstrukt kolokalisierte immer noch mit CB(SC) (**j**, eingeblendet ist eine Midbody-Matrix als Überlagerungsbild des Fluoreszenzkanals und des entsprechenden Phasenkontrastbildes). **a–c** und **g–i**: WFM; λ_{Ex} (ECFP): 430 nm, λ_{Ex} (EYFP): 500 nm; Obj. 60×/1,2 Plan Apo H₂O; **d–f**, **j**: WFM, z.T. nach Dekonvolution (**d,j**); Obj. 63×/1,25 Öl (**d,f,j**); Obj. 40×/0,60 Luft (**e**); Größenbalken 10 μm .

Dies läßt den Schluß zu, daß ein Zielsignal tatsächlich existiert und daß ausschließlich die schwere Kette für die Kernlokalisierung verantwortlich ist. Die beidseitige Markierung mit Fluoreszenzproteinen führte in einigen Fällen (z.B. #13,15) zu einer Erhöhung des zytoplasmatischen Hintergrundsignals und zu einer weniger differenzierten Signalverteilung.

Um den gesuchten Bereich weiter einzuschränken, wurde die Sequenz der schweren Kette in die ähnlich großen Teilbereiche CB(HC_N) (V¹²⁹–N²²⁸; #16,17) und CB(HC_C) (N²²⁸–D³³³; #18,19) unterteilt, die im reifen Protein ebenfalls globuläre Domänen codieren (Abb. 4.40, S.128). CB(HC_N) kam im Zytoplasma und in geringen Mengen im Zellkern vor (Abb. 4.39(e)). Dagegen wurde CB(HC_C) in höherem Maße im Nukleoplasma (inklusive Granulen), in zytoplasmatischen Granulen und in der Midbody-Matrix angereichert (Abb. 4.39(e)).

Konsequenterweise wurde der CB(HC_C)-Bereich äquidistant in Richtung des C-Terminus weiter reduziert und es entstanden die Konstrukte CB(HC_{C1}) (E²⁴²–D³³³; #20), CB(HC_{C2}) (V²⁵⁵–D³³³; #21), CB(HC_{C3}) (Q²⁶⁸–D³³³; #22) und CB(HC_{C4}) (R²⁸¹–D³³³; #23) (Abb. 4.40(b), S.128). Mit abnehmender Fragmentgröße lokalisierten die Konstrukte zunehmend homogener im Zytoplasma und im Zellkern, die typische Granulenbildung verschwand und weniger Signal wurde in der Midbody-Matrix angereichert (Abb. 4.39(f–i)). Schließlich erschien das lediglich 52 Seitenreste lange CB(HC_{C4})-Fragment fast ebenso diffus wie reines EGFP. Eine erhöhte Expression ging bei den drei längeren Konstrukten häufig mit Zelltod einher.

Die im reifen CB sehr exponierte und sterisch flexible Aminosäure E²⁷³ (Abb. 4.40(b)) führte zu der Frage, ob sie eventuell in den Kernlokalisationsprozeß involviert sei. Diesem Verdacht wurde mit gezielten Punktmutationen (§3.4.7) nachgegangen: Bei CB([E²⁷³L]SC) (#24) wurde die saure und polare Glutaminsäure durch das vergleichbar große neutrale und unpolare Leucin ausgetauscht, bei CB([ΔE^{273}]SC) (#25) wurde sie komplett eliminiert. Zudem wurden bei CB([$\Delta Q^{268}-G^{277}$]SC) (#26) die umgebenden Seitenreste, die im nativen Molekül eine Schleife bilden, vollständig deletiert. Weder die Punktmutationen noch die Deletion von $\Delta Q^{268}-G^{277}$ beidseitig von E²⁷³ hatten einen signifikanten Einfluß auf die Lokalisation (Abb. 4.39(j)). Dagegen führte die Eliminierung des angrenzenden C-terminalen Bereichs im Falle von CB([$\Delta L^{80}-L^{283}$]SC) (#27) zu einer beträchtlichen Abnahme des Kernsignals und der Granulenbildung.

Tab. 4.3 Intrazelluläre Lokalisation mutierter CB-Konstrukte in LCLC-103H-Zellen. *cp*: Zytoplasma, *er*: Endoplasmatisches Retikulum, *nc*: Kernmembran, *ga*: Golgi-Apparat mit Trans-Golgi-Netzwerk, *pv*: perinukleäre Vesikel, *pm*: Plasmamembran, *np*: Nukleoplasma, *nl*: Nukleolus, *mm*: Mitochondrien, *mi*: Mitochondrien, *gr*: zytoplasmatische und nukleäre Granulen; vgl. Abb. 2.5, S.29.

Nr	Vektor	FP†	Gen	Modifizierung	FP†	cp	er	ne	ga	pv*	pm	np	nl	mm	mi	gr
0	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔC'PRO]FLM	- C G Y	-	+	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-
1	pcDNA3	- - - - -	hCB	PREPRO	- C G Y	-	+	+	++	++	-	-	-	-	-	-
2	pEGFP	- - - - -	hCB	Δ ⁵¹ CB*	- - G -	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+++	-
3	pcDNA3	- - - - -	hCB	Δ ⁷² CB	- C G Y	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
4	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔC'PRO]Δ ⁷² CB	B C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
5	pcDNA3	- - - - -	hCB	[C'PRO]SC	B C G Y	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
6	pcDNA3	- - - - -	hCB	SC	B C G Y	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
7	pcDNA3	- C - Y	hCB	SC	- C - Y	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
8	pcDNA3	- - - - -	hCB	SC	- - - - -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
9	pcDNA3	- - - - -	hCB	myc-SC	- - - - -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
10	pcDNA3	- - - - -	hCB	myc-SC	- - G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
11	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔC ²¹¹ -J ²⁴³]SC	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
12	pcDNA3	- - - - -	hCB	LC	B - G Y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
13	pcDNA3	- - - Y	hCB	LC	- - - Y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
14	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
15	pcDNA3	- C - - -	hCB	HC	- C - - -	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
16	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _N *	- C G Y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
17	pcDNA3	- C - Y	hCB	HC _N *	- C - Y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
18	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _C *	- C G Y	+	-	-	-	-	-	++	-	++	-	++
19	pcDNA3	- C - - -	hCB	HC _C *	- C - - -	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
20	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _{C1}	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+
21	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _{C2}	- C G -	+	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+/-
22	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _{C3}	- C G -	+	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+/-
23	pcDNA3	- - - - -	hCB	HC _{C4}	- C G -	+	-	-	-	-	-	+	-	++	-	-
24	pcDNA3	- - - - -	hCB	[E ²⁷³ L]SC	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
25	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔE ²⁷³]SC	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
26	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔQ ²⁶⁸ -G ²⁷⁷]SC	- C G -	+	-	-	-	-	-	++	-	+++	-	+++
27	pcDNA3	- - - - -	hCB	[ΔL ⁸⁰ -L ²⁸³]SC	- C G Y	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

* nicht identisch mit den von CB(SC) gefärbten Vesikeln
 † B: EBFP, C: ECFP, G: EGFP, Y: EYFP
 ** Originalkonstrukt von MÜNTENER *et al.* (2004)

Die Mutationsstudie legt somit nahe, daß die Faltung der Mutanten trotz teils gravierender Größenunterschiede weitgehend konsistent verlief und daß ein Bereich innerhalb der C-terminalen Bereichs N²²⁸-D³³³ einen großen Einfluß auf die Kernlokalisierung von CB(SC) hat. Die Ergebnisse begünstigen die Annahme, daß ein Epitop durch die räumliche Anordnung der jeweiligen, noch nicht definierten Seitenresten gebildet wird, welches für die Anreicherung der künstlich trunkierten CB-Formen im Zellkern verantwortlich ist.

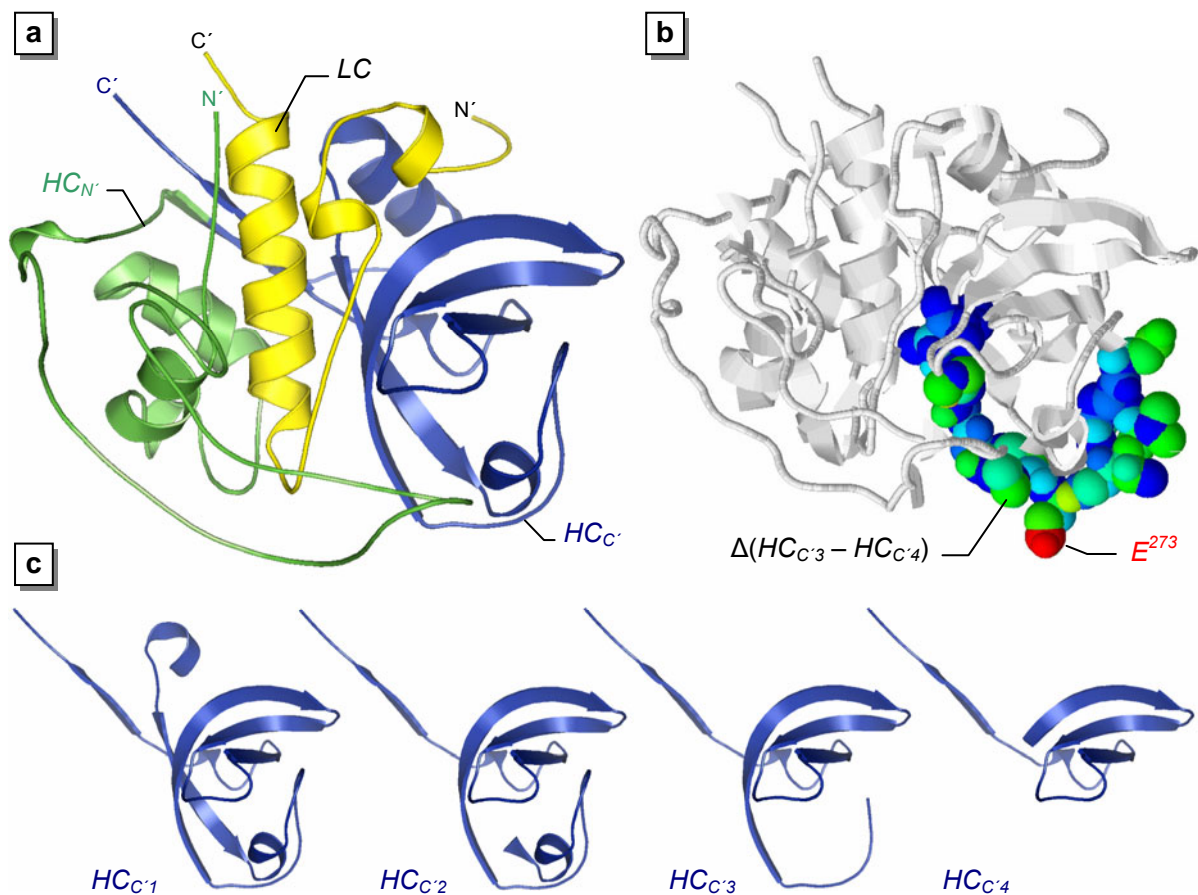


Abb. 4.40 Räumliche Repräsentation mutierter Bereiche. Um eine möglichst natürliche Faltung des Polypeptids zu erhalten, wurde die CB-Sequenz in globuläre Domänen unterteilt (a): in die leichte Kette CB(LC) (gelb), die schwere Kette CB(HC) und deren zwei Untereinheiten CB(HC_N) (grün) und CB(HC_C) (blau). Vier Fragmente entstanden aus der äquidistanten Reduktion von CB(HC_C) in Richtung des C-Terminus (b). Sie sind in derselben Konformation wie in (a) wiedergegeben. Da das kürzeste Fragment CB(HC_{C4}) keine Kernaffinität mehr aufwies, wurde der Differenzbereich von CB(HC_{C3}) und CB(HC_{C4}) ($\Delta Q^{268}-G^{281*}$; als Kalottenmodell dargestellt) genauer untersucht. Punktmutationen an der Aminosäure E²⁷³ (rot), die sich hinsichtlich ihrer herausragenden Position, der hohen Azidität und Motilität auffällig von anderen Oberflächen-Aminosäuren abhebt, hatten keine Auswirkungen auf die Lokalisation, ebensowenig die Eliminierung der umliegenden Aminosäuren ($\Delta Q^{268}-G^{277}$). Die Rekonstruktion des reifen CB erfolgte mit den Programmen „PyMol“ (a und c) und „RasMol“ (b) basierend auf Röntgenstrukturdaten (PDB-Id: *Ihuc*; vgl. Abb. 2.3, S.19).

* Positionsangaben jeweils in CB(FLM)-Nomenklatur

4.3.6 Kernimportmechanismen

Die in verschiedenen Zelltypen verbreitete Kernanhäufung von CB(SC)–FP legt die Präsenz eines möglichen nukleären Zielmechanismus nahe. Rechnergestützte Analysen („PSORT“, *prediction of protein localization sites*; Tab. 3.1, S.33) haben zwar kein bislang bekanntes sequentielles Kernlokalisierungssignal (NLS) innerhalb der CB-Sequenz ergeben, allerdings läßt sich ein räumlich zusammengesetztes Signal (*signal patch*) annehmen. Die tatsächliche Konformation von CB(SC)–FP ist nur schwer vorherzusagen. Im Gegensatz zu CB(FLM)–FP, welches kotranslational im ER gefaltet wird, wird die Struktur von CB(SC)–FP durch die Bedingungen im Zytoplasma bestimmt. Die Anhäufung des CB(SC) im Zellkern könnte auf freier Diffusion und einem NRS beruhen. Im Allgemeinen können Proteine über 60 kDa die Kernmembran nicht durch einfache Diffusion überwinden (S.32). Um die Möglichkeit einer freien Diffusion zu überprüfen, wurde CB(SC)–FP (~55 kDa) genetisch mit einem weiteren N-terminalen Fluoreszenzprotein versehen. Die theoretische Gesamtmolekülmasse der auf diese Weise hergestellten Konstrukte ECFP–CB(SC)–EYFP und EYFP–CB(SC)–ECFP (Abb. 4.38, S.124; #7) lag mit ~84 kDa weit über der Ausschlußgrenze für Diffusion.

Die Fusionsproteine wurden in LCLC–103H-Zellen transient exprimiert und mit WFM und TPM untersucht (Abb. 4.41, unten). Trotz ihrer relativ hohen Molekülmasse war die Kernlokalisierung vergleichbar derjenigen der einfach markierten Analoge. Die Integrität des Konstruktes wurde wegen der unmittelbaren Nachbarschaft der Fluorochrome in beiden Fällen über den FRET-Effekt verifiziert. FRET wäre unwahrscheinlich, wenn schwere und leichte Kette durch Prozessierung oder allgemeine Proteolyse getrennt würden. Daher stellt das FRET-Experiment einen weiteren Beweis dafür dar, daß die Einzelkettenform intakt bleibt und daß das Fusionsprotein als Ganzes in den Zellkern transportiert wird. Die Intensitätsverteilung beider Fluoreszenzkanäle war identisch, was auf gleiche Mengen von räumlich gebundenen ECFP- und EYFP-Molekülen schließen läßt. Diese Resultate belegen, daß die für die EYFP benötigte Anregungsenergie vom Energietransfer des angeregten ECFP herrührt. Da Donormoleküle nie komplett ausgelöscht werden, scheint der Energietransfer unvollständig zu sein, was unter den gegebenen experimentellen Bedingungen aber üblich ist (DANELL & PARKS 2003).

Die Doppelmarkierungsexperimente schließen also reine Diffusion als Grund der Kernlokalisierung aus und legen einen gerichteten Kerntransport bzw. ein NRS nahe, der von der Struktur des CB(SC)-Polypeptids bestimmt wird. In fortgeschrittenen Expressionsstadien wurden punktuelle Signale beobachtet, welche von den Pseudopodienspitzen in Richtung Golgi in einer gerichteten Art und Weise transportiert wurden und die die Kernmembran ohne merkliche Zeitverzögerung penetrierten.

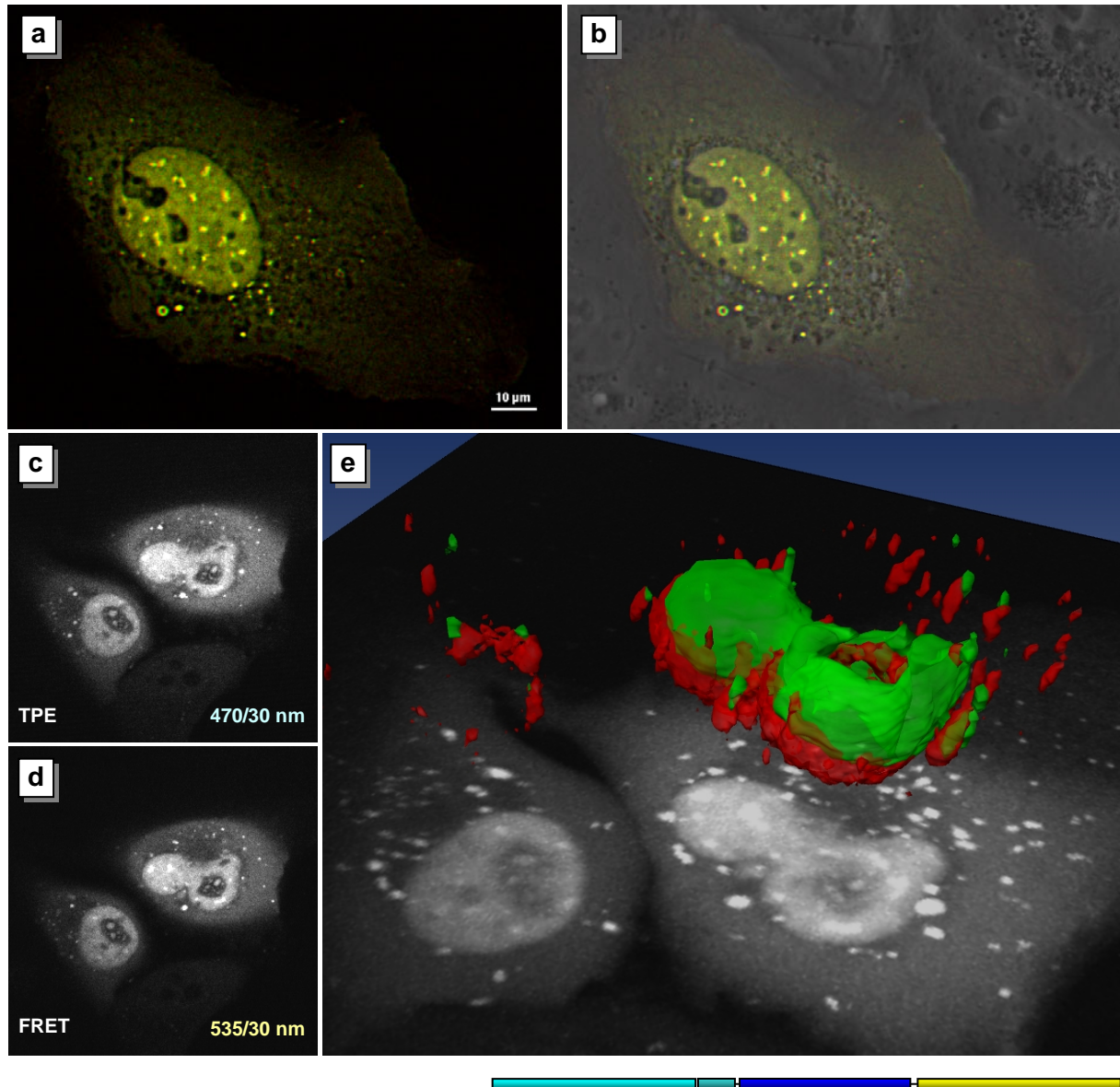


Abb. 4.41 CB(SC)-Zweifachmarkierung. Beidseitig markiertes ECFP–CB(SC)–EYFP wurde in LCLC–103H-Zellen transient exprimiert und mit WFM (**a,b**) und TPM (**c–e**) untersucht. In beiden Fällen wurde eine vollständige Überlappung von ECFP- und EYFP-Fluoreszenzsignalen beobachtet; geringfügige Verschiebungen (**e**) waren durch den zeitlichen Abstand der Aufnahmen bedingt. ECFP–CB(SC)–EYFP lokalisierte vergleichbar dem C-terminal markierten CB(SC) überwiegend im Zellkern und in (peri)nukleären Granulen. Unvollständiger Fluoreszenzübergang (FRET) wurde sowohl bei WFM wie auch bei TPM (**d**) beobachtet. Die TPE beider Fluorochrome erfolgte bei 860 nm, die jeweiligen Emissionskanäle sind in **c** und **d** eingeblendet. Einfach markierte EYFP-Konstrukte ließen sich bei dieser Wellenlänge dagegen kaum anregen. **a,b**: Obj. 40×/0,60 Luft; Größenbalken 10 μm ; nach Dekonvolution. **c–e**: Zellen wurden vor der Transfektion auf eine Kollagenmatrix ausgesät. Die räumliche Rekonstruktion (**e**) erfolgte mit dem Programm „Amira“; zur Übersicht wurde die Projektion aller optischen Schnittebenen mit abgebildet.

4.3.7 *Kathepsin B-induzierter Zelltod*

Im folgenden Kapitel wurde die Zellmortalität durch die Überexpression der rekombinanten Einzelkettenform CB(SC) sowie deren Derivate untersucht.

Transiente und permanente Expression. Zellen, die CB(SC)–FP oder andere künstlich trunkierte CB-Konstrukte mit Kernlokalisierung exprimierten, erwiesen sich als sehr kurzlebig. Anders als bei CB(FLM)–FP-transfizierten Zellen war es nicht möglich, mit Hilfe der Antibiotika-Selektion konstitutiv exprimierende Zellklone mit einer typischen Expression* aus LCLC–103H-Zellen sowie anderen Zellsystemen† zu gewinnen. Es ist daher anzunehmen, daß dieses Konstrukt die Fähigkeit besitzt, Zelltod auszulösen. Aus diesem Grund konnten CB-Konstrukte mit zytotoxischem Potential immer nur transient exprimiert werden.

Zelltod-Kinetiken. In Zeitraffer(*time-lapse*)-Experimenten wurde geprüft, ob trunkierte CB-Konstrukte zeitabhängig lokalisieren. Zudem wurde der Ablauf des Zelltods aufgezeichnet (Abb. 4.42, unten). Detektierbare Mengen an Fusionsprotein wurden frühestens 12 h nach der Transfektion in LCLC–103H-Zellen exprimiert. ~16 h nach der Transfektion war CB(SC)–EYFP homogen im Zytoplasma verteilt und wies bereits eine starke Anhäufung im Nukleoplasma auf. Im Verlauf der nächsten Stunde nahm die Fluoreszenzintensität im Zellkern weiter zu. Die intrazelluläre Organisation geriet durcheinander, Golgi-Apparat und Zellkern kollabierten, die Zellen lösten sich vom Untergrund und rundeten sich ab. Zwei Stunden später waren alle Zellen mit erhöhtem Expressionsniveau an CB(SC)–EYFP tot. Transient exprimiertes Δ^{72} CB–FP führte zu denselben Effekten, auch andere mutierte CB(SC)-Konstrukte, die im Zellkern angereichert wurden, entwickelten zytotoxisches Potential.

Nicht-transfizierte sowie lediglich das Fluoreszenzprotein exprimierende Kontrollzellen starben nicht unter denselben experimentellen Bedingungen. Allerdings wurde z.T. beobachtet, daß nicht-transfizierte Zellen bei Kontakt mit kollabierenden Zellen ebenfalls nach kurzer Zeit starben (*bystander*-Effekt).

Zellen, die mit FP–CB(HC_C)–FP (Abb. 4.38, S.124; #19) transfiziert waren, starben ebenfalls ~3–4 h nach dem sichtbaren Beginn der Expression. Hierbei wurden allerdings andere morphologische Veränderungen beobachtet: Nach initialem Zellschrumpfen bildeten die Zellen Blasen im Zytoplasma, schwellen an und platzten schließlich unter Freigabe des Zellinhalts. Ähnliches wurde für StB–FP-Konstrukte beobachtet.

Die Ergebnisse schließen phototoxische Effekte aus und legen nahe, daß der durch trunkiertes CB herbeigeführte Zelltod nach einem festen Ablaufschema verläuft und nicht lediglich auf Überexpression des rekombinanten Produkts zurückzuführen ist.

* Nur wenige Zellen überlebten die G418-Selektion. Diese zeigten eine äußerst schwache, diffuse Fluoreszenz. Die G418-Selektion bietet keine Garantie für einen korrekten genomischen Einbau des kompletten Konstrukts.

† z.B. in 2 humanen Glioblastoma-Zelllinien; persönliche Mitteilung K. Edvardsen, Universität Bergen

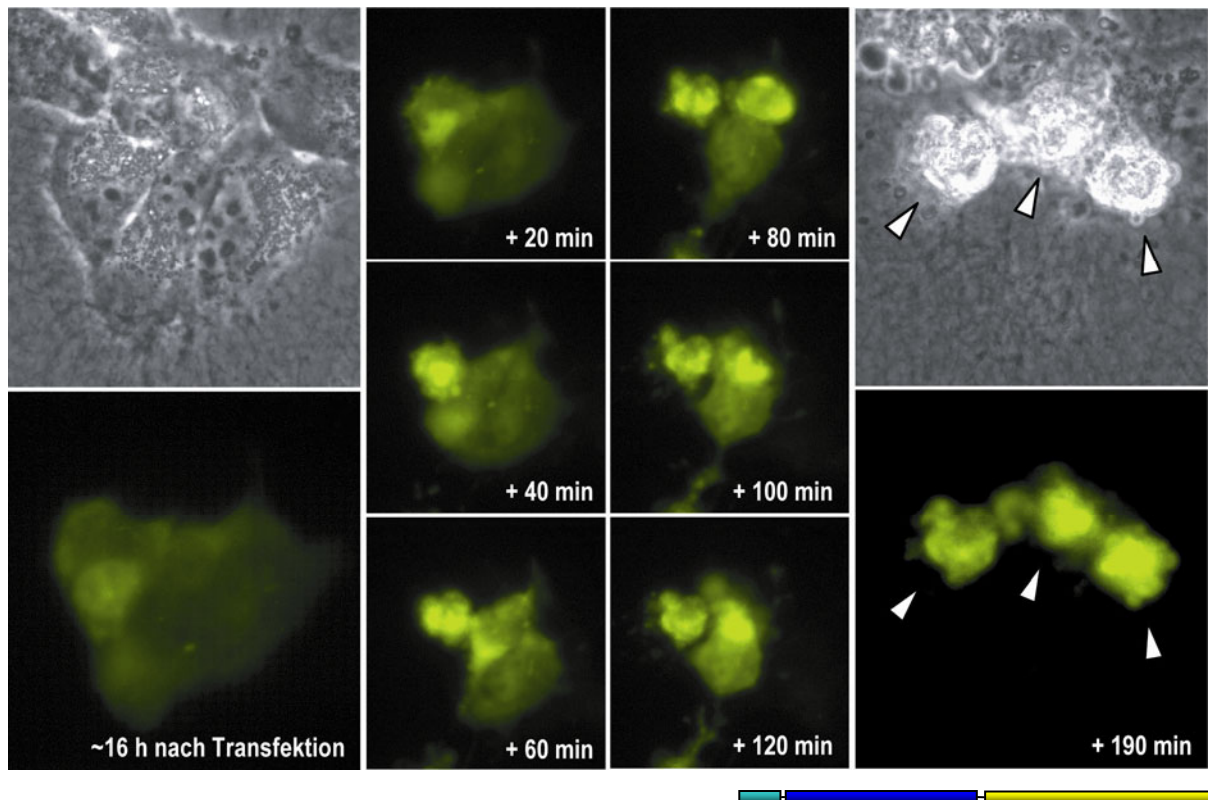


Abb. 4.42 CB(SC)-induzierter Zelltod. LCLC-103H-Zellen wurden mit *CB(SC)-EYFP* transfiziert und der zeitliche Expressionsverlauf bei den ersten Anzeichen von Fluoreszenz ~16 h nach Transfektion im 10-min-Takt erfaßt. Der Prozeß folgte stets demselben Schema: Nach einer anfänglich homogenen Verteilung des schwachen Signals in Zytoplasma und Zellkern bildeten sich in beiden Kompartimenten fluoreszierende Granulen (z.T. in den Pseudopodien) aus, die in Richtung Zellkern an der Golgi-Region vorbeiwanderten. Die Granulierung ging mit schnell zunehmender Fluoreszenzintensität im Zellkern einher. Zuletzt löste sich der Golgi-Apparat auf und die Zelle kollabierte innerhalb weniger Minuten unter Blasenbildung und heftigen Bewegungen. Ein Rest an Motilität blieb allerdings noch über einige Stunden erhalten, bis die Zelle schließlich zum Stillstand kam. Ausgewählte Bilder wurden der Zeitserie zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen um diesen Vorgang zu dokumentieren.

Quantifizierung der Mortalität. Das induzierte Zellsterben wurde durch FACS-Analyse (S.66) 16 h nach der Transfektion quantifiziert und die Mortalitätsraten von Zellpopulationen, die mit *EGFP*, *CB(FLM)-EGFP* und *CB(SC)-EGFP* transfiziert waren, wurden bestimmt (Abb. 4.43, unten). Die Mortalitätsrate der scheintransfizierten Kontrolle lag unter 20 %. Zellen, welche lediglich die *EGFP*-Kontrolle exprimierten, ergaben Mortalitätsraten von ~18 %. Im Gegensatz dazu waren ~43 % der *CB(FLM)-EGFP*-exprimierenden Zellen und ~78 % der Zellen, die mit *CB(SC)-EGFP* transfiziert wurden zu diesem Zeitpunkt tot. Die *CB(SC)-EGFP*-Population erholte sich nicht im weiteren Zeitverlauf und lediglich einige wenige Zellen mit geringem Expressionsniveau überlebten. Interessanterweise reduzierte die Koftransfektion mit rekombinantem StB die Mortalitätsrate solcher Zellen um mehr als die Hälfte des ursprünglichen Wertes.

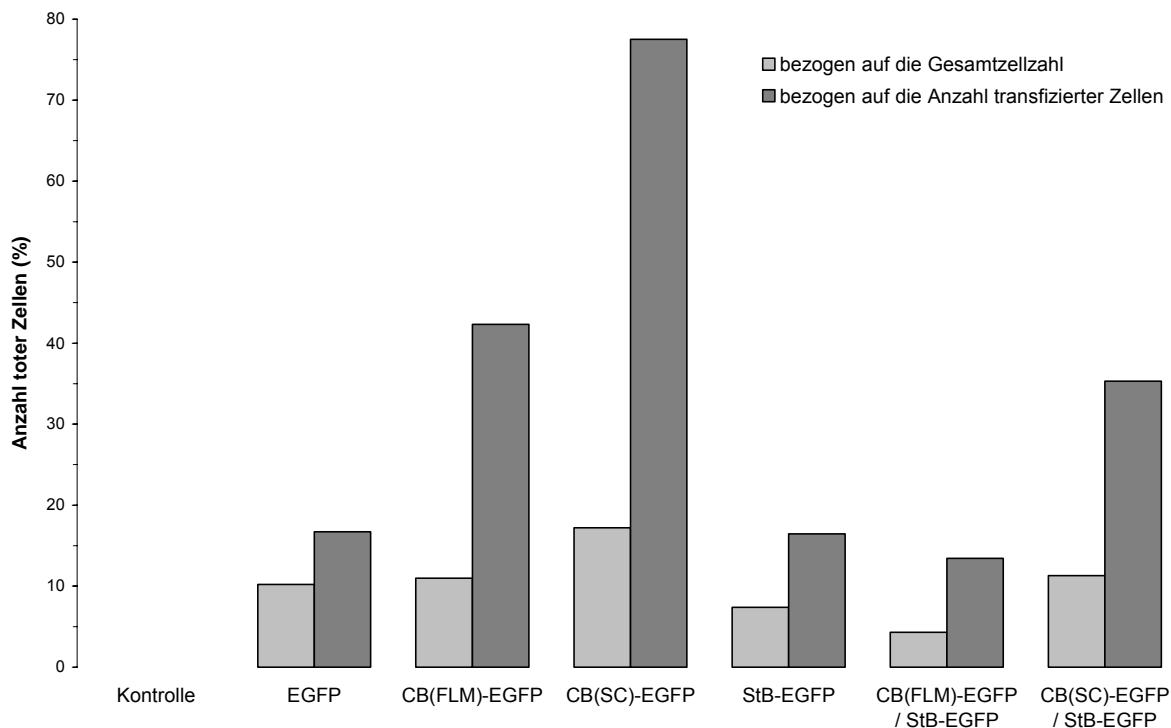


Abb. 4.43 Mortalitätsraten transient überexprimierender LCLC-103H-Zellen. Die Sterblichkeit von Zellen, die CB(SC)-EGFP und Kontrollkonstrukte (EGFP, CB(FLM)-EGFP) transient exprimierten, wurde mittels PI-Färbung und FACS analysiert. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch schwankende Transfektionsraten (22–63 %) entgegenzuwirken, wurden die absoluten Mortalitätswerte ins Verhältnis zur jeweiligen Transfektionseffizienz gesetzt. Auf die Toxizität des Transfektionsagens zurückzuführende tote Zellen und durch Autofluoreszenz verursachte Falschpositive wurden durch Abzug der Kontrollwerte mitberücksichtigt: Die Anzahl toter Zellen (PI-Kanal) lag bei ~13 % im Falle der scheintransfizierten Kontrolle, 2 % der Gesamtzellzahl waren falschpositive „Transfektanten“ (GFP-Kanal). Bei den Einfach-Transfektionen verursachten die EGFP-Kontrolle sowie der EGFP-markierte StB-Inhibitor mit ~16 % die niedrigsten Mortalitätsraten. Gegenüber dem rekombinanten CB(FLM)-EGFP erreichte die relative Toxizität beim CB(SC)-Konstrukt mit ~78 % fast den doppelten Wert. Bei den Doppeltransfektionen wurde unter Zugabe gleicher Menge an StB-EGFP-Vektor-DNA die Mortalitätsrate im Falle von CB(FLM)-EGFP auf 32 % und im Falle von CB(SC)-EGFP auf ~46 % der Einzeltransfektionswerte reduziert.

Zelltod und Apoptose. Da der morphologische Befund einen apoptotischen Prozeß nahelegt, wurden transfizierte LCLC-103H-Zellen daraufhin überprüft. Trotz der zu beobachtenden Kernfragmentierung und Membranabschnürungen konnte ein eindeutiger Nachweis der Apoptose mittels Annexin V-Test (S.67) oder DNA-Fragmentierung (§3.4.10) nicht erbracht werden. Nichtsdestoweniger sollte Apoptose nicht zugunsten der Nekrose von weiteren Überlegungen ausgeschlossen werden.

5 DISKUSSION

Krebserkrankungen sind nach Herz- und Kreislaufkrankungen die weltweit zweithäufigste Todesursache. In den Industrienationen sind dabei Männer wie Frauen überwiegend von Lungenkrebs betroffen (Review: CARR 1991). Lungentumoren werden histologisch in den kleinzelligen (SCLC) und den nicht-kleinzelligen (NSLC) Typ eingeteilt (GAZDAR 1986). Für neue therapeutische Ansätze sind Untersuchungen dieser Tumoren und daraus etablierter Zelllinien unerlässlich. Zum NSLC-Typ gehört u.a. das großzellige Lungenkarzinom und die daraus abgeleitete LCLC-103H-Zelllinie, die in dieser Arbeit als Standardsystem Verwendung fand. LCLC-Zellen besitzen im Vergleich zu SCLC-Zellen eine 5–50-fach höhere Enzymaktivität (HEIDTMANN *et al.* 1997) der Cysteinpeptidase Kathepsin B (CB).

Neben vielen anderen Proteinen mit tumorigenem Potential stellt CB ein weiteres potentiell Kandidatenmolekül dar, welches in mehrfacher Hinsicht an der Lungentumor-entwicklung beteiligt sein könnte (S.23). Zymogenprozessierung (§2.2.2), Enzymaktivität (§2.2.4) und Wirkungsort (§2.3.1) von CB spielen hierbei eine wesentliche Rolle. Die CB-Enzymaktivität ist in vielen Tumoren besonders stark ausgeprägt (S.23) und lässt sich über spezifische Inhibitoren eindämmen (§2.2.5). In dieser Arbeit wurde ein neuartiger Ansatz zur CB-Inhibierung mit Hilfe des modifizierten Cystatins Stefin B (StB) entwickelt. Natürlich vorkommenden CB-Spleißvarianten (§2.2.7) könnte eine größere Rolle zukommen als diejenige „defekter Abfallprodukte“; ihr Zelltod-induzierendes Potential stellt möglicherweise einen weiteren Regulationsmechanismus bei Tumorzellen dar.

Neben der „klassischen“ Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie (WFM) bieten weitergehende spektroskopische Techniken (§2.1) in Kombination mit digitaler Datenverarbeitung und unter Verwendung von Lebendzellmarkern eine geeignete Option zur Untersuchung der genannten Faktoren. Diese Methoden setzen optimierte Experimentbedingungen voraus und beinhalten wegen ihrer Neuartigkeit noch zahlreiche Fehlerquellen, weswegen sie an sich ebenfalls einen Untersuchungsaspekt dieser Arbeit darstellen.

5.1 METHODIK

Im Mittelpunkt der Methoden-Studie stehen grundlegende Aspekte von Techniken, die eine Beobachtung lebender Zellen ermöglichen. Insbesondere wird darin auf die Verwendung von Fluoreszenzproteinen als Lebendzellmarker und die damit verbundenen Artefakte während simultaner Kotransfektion eingegangen. Als Methodenschwerpunkt der Fluoreszenzdetektion wird die Zwei-Photonen-Spektroskopie behandelt.

5.1.1 Erhalt der Zellvitalität

Trotz einer permanenten Weiterentwicklung der methodischen Einzelkomponenten für komplexe *in vivo*-Zelluntersuchungen bleibt die simultane Erfassung möglichst vieler Parameter* (Review: ANDREWS *et al.* 2002) unter geringstmöglicher Einflußnahme auf das zu beobachtende biologische System durch eine Reihe von Faktoren limitiert. Diese umfassen neben rein technischen Aspekten aus den Bereichen der Optomechanik (Framegrabber, Detektor, Filter, Blende usw.) und der Informationstechnologie (Rechenprogramme, Speicher, Verarbeitungsgeschwindigkeit usw.) auch physiologische Gesichtspunkte (Photoschäden, Toxizität von Transfektionsagens und Fluorochromen, Kultivierungsbedingungen usw.). Die Optimierung von Teilfunktionen erfolgt häufig auf Kosten anderer Teilfunktionen (z.B. niedrige örtliche Auflösung zugunsten einer hohen zeitlichen Auflösung und umgekehrt). Da es meist nicht möglich ist, alle Funktionen unter gleichbleibender Qualität miteinander zu vereinen, ist es erforderlich, bestehende Techniken sorgfältig auszuwählen und ihre Parameter auf die jeweilige Fragestellung anzupassen.

Lebendzellmikroskopie. Stabile Kultivierungsbedingungen für die Lebendzellbeobachtung wurden in einer temperierten und CO₂-begasten POC-Kammer erreicht (S.67). Die Perfusion mit Kulturmedium ermöglichte ausgedehnte kontinuierliche Langzeituntersuchungen ($t = \sim 3$ d bei $\Delta t = \sim 20$ min in 3 Kanälen), bei kürzeren Beobachtungszeiträumen bot der Perfusionsmodus jedoch keine wesentlichen Vorteile gegenüber der geschlossenen Anordnung ohne Mediumwechsel. Bildung von Kondenswasser an optischen Bauteilen sowie Fokus-Drift infolge von Temperaturschwankungen konnten durch eine konstante Temperierung des entsprechenden Arbeitsbereichs (S.67) verhindert werden. Unerwünschte Seiteneffekte durch axiale Verschiebungen des Präparats wurden entweder durch eine manuelle Fokus-Nachjustierung oder durch optische Schnitte mit anschließender Selektion geeigneter Schärfenebenen kompensiert. Die Migration von Zellen wurde darüber hinaus durch Einbetten in eine künstliche Gelmatrix (S.62) eingedämmt.

Optische Schnitte wurden für Dekonvolution (S.164) und 3D-Bildrekonstruktion (S.165) verwendet und mit Zeitreihen (S.165) kombiniert. Die besten Ergebnisse wurden hierbei mit einem Wasserimmersionsobjektiv (40×/1,20) und optischen Schnitten im Abstand 0,2–0,5 μm erzielt. Für die Dekonvolution reichten ~ 3 benachbarte Schnittebenen zu beiden Seiten aus; weitere Schnittebenen erzielten bei dem verwendeten Dekonvolutionsalgorithmus[†] keine besseren Resultate. Die intrazelluläre Motilität von Zellorganellen erschwert insbesondere bei

* i.A. ist darunter eine orts- und zeitaufgelöste Detektion in mehreren Spektralbereichen zu verstehen. In diesem Kontext wird häufig der Begriff der „Dimension“ verwendet, d.h. zusätzlich zu den 3 Raumdimensionen kommt die zeitliche Komponente als vierte Dimension und jeder (spektrale) Kanal als eine weitere Dimension hinzu.

[†] „iterative maximale Entropie“-Algorithmus

der sequentiellen Erfassung optischer Bilderstapel in mehreren (Fluoreszenz-)Kanälen deren exakte Lokalisation (vgl. Abb. 4.12, S.92). In solchen Fällen bietet es sich daher an, zunächst innerhalb einer Fokusebene in allen Kanälen zu detektieren, anstatt komplette Bilderstapel in den einzelnen Kanälen aufzunehmen.

Die Wahl der geeigneten Instrumentation für fluoreszenzmikroskopische Lebendzelluntersuchungen (WFM, LSM, TPM) kann nicht eindeutig entschieden werden und ist in hohem Maße versuchsabhängig (Review: ANDREWS *et al.* 2002). Neben rein technischen Punkten wie Auflösung, S/N-Verhältnis, spektrale Bandbreiten usw. kann auch der finanzielle Aspekt ausschlaggebend sein (hohe Anschaffungs- sowie Wartungskosten bei TPM). Bei der Untersuchung von Präparatdicken $< \sim 30 \mu\text{m}$ bietet die Verwendung von LSM (Anhang, S.161) keine wesentlichen Vorteile gegenüber der WFM (Anhang, S.160): In Kombination mit Dekonvolutionstechniken (S.164) erreicht die WFM (i) eine der LSM vergleichbare Auflösung (SHAW & RAWLINS 1991) und (ii) ein niedrigeres Rauschen aufgrund geringerer Fluktuationen der Anregungsquelle (SWEDLOW *et al.* 2002). Im Gegensatz zu der LSM wird (iii) das Anregungslicht außerhalb der Fokusebene nicht durch die Verwendung einer Blende „vergeudet“, (iv) die biologischen Präparate bleichen in geringerem Maße aus und (v) erfahren weniger Hitze- bzw. UV-Schäden. Zudem liegen (vi) die Aufnahmezeiten bei WFM im Millisekundenbereich, während sie bei abtastenden Systemen (bei niedriger PMT-Spannung) einige Sekunden in Anspruch nehmen können. Nicht zuletzt ist (vii) die LSM auf Fluoreszenzanregung begrenzt und bietet nicht die Vielzahl der zusätzlichen Weitfeld-Beleuchtungsarten*. Es darf allerdings nicht unerwähnt bleiben, daß der unsachgemäße Einsatz von Dekonvolutionsalgorithmen zu Artefakten führen kann (MCNALLY *et al.* 1994), die sich u.a. in Streifen- oder Ringbildung sowie Strukturverzerrungen äußern. Solche Artefakte wurden hier ebenfalls beobachtet (Abb. 4.12, S.92) und können auf falsche Parameterwahl, optische Abbildungsfehler oder den Algorithmus selbst zurückgeführt werden. Die TPM besitzt im Vergleich zur LSM einige Eigenschaften, die hauptsächlich zugunsten längerer Beobachtungszeiten und tieferer Probenpenetration sprechen (Anhang, S.160). Allerdings befand sich das hier verwendete TPM-System zum experimentellen Zeitpunkt im Prototyp-Zustand, so daß vor allen Dingen die fehlende zeitnahe Modulation der Anregungswellenlänge als einschränkend empfunden wurde. Neuere kommerzielle Systeme werden jedoch diesem Nachteil gerecht.

Strahlenschäden und Phototoxizität. Energiereiche UVA-Strahlen wirken sich auf den Zellmetabolismus aus und haben vor allen Dingen Änderungen des Redoxzustandes, eine gestörte Zellteilung und DNA-Schädigungen zur Folge (KÖNIG *et al.* 1996, Review: KÖNIG 2000). Die Verwendung von langwelligem Anregungslicht (TPM) reduziert dagegen die Photobleichrate

* z.B. Hellfeld, Dunkelfeld, Phasenkontrast, Interferenzkontrast, Polarisationskontrast

des Fluorochroms im Fokus sowie den Großteil an endogener Autofluoreszenz durch NADH, Riboflavin und Flavin-Koenzyme (AUBIN 1979). Im Hinblick auf biologische Objekte erhöht es also die Beobachtungsdauer und erlaubt zudem aufgrund geringerer Rayleigh-Streuung* eine tiefere Penetration des Präparates (z.B. Gewebe). Der Gesamtenergieeintrag durch die Illumination wurde in der WFM durch die Verwendung automatischer Verschlüsse (*shutter*) zwischen Lichtquelle und Objekt, durch eine Optimierung der Belichtungszeiten und der Zeitabstände zwischen den Aufnahmen sowie der räumlichen Abstände zwischen den Schnittebenen so minimiert, daß die Zellen keine nachweisbaren Strahlenschäden nahmen (S.75). In der Praxis bedeutet dies, daß bei dem verwendeten WFM-System (S.67) Zeitintervalle von ~10–15 min zwischen den Aufnahmen eingehalten werden mußten, damit die Zellen genügend Zeit hatten, sich von der Schädigung zu erholen. Auch bei Verwendung von TPM anstelle von WFM können bei Wellenlängen zwischen 700–1000 nm und einer Pulsfrequenz von 80 MHz Spitzen-Energiedichten von 10^6 – 10^{12} W cm⁻² erreicht werden. Bereits ein Energieeintrag von 5–10 mW Grund-Laserleistung am Objekt ist ausreichend, um die Zelle nachhaltig und irreversibel zu schädigen (KÖNIG 2000, HOPT & NEHER 2001). So führte Dauerbestrahlung durch kontinuierliches Scannen zu einem Mitosearrest. TPE von NAD(P)H und Flavinen bei 670–680 nm kann ebenfalls die Zellvitalität beeinträchtigen. Demnach ist auch bei TPM eine optimale Einstellung der Serienparameter nötig.

Zusätzlich zu den genannten Strahlenschäden können bei Verwendung von Fluorochromen Schädigungen durch Phototoxizität (S.76) hinzukommen. Die Mechanismen der Phototoxizität sind nur unzulänglich bekannt; es wird angenommen, daß das Fluorochrom – der Photosensibilisator – eine reaktive Spezies bildet und besonders häufig Schädigungen im Bereich der Membranen oder der DNA hervorruft (SUGDEN 2004).

Die Bestimmung des Grades der Zellvitalität ist problematisch, da sie lediglich im äußersten Fall den Zelltod mit einbezieht und somit ein eindeutiges Entscheidungskriterium aufgrund histochemischer Nachweisverfahren (S.25) liefert. Weitere Kriterien für den allgemeinen Vitalitätszustand sind Wachstumsrate, Teilungsfähigkeit sowie Motilität der Zellen, die sich aber nur pauschal für eine Zellkultur feststellen lassen.

5.1.2 Das grünfluoreszierende Protein als Lebendzellmarker

Von *avGFP* abgeleitete Fluoreszenzproteine enthalten keine eigenen Sortierungssignale und werden ubiquitär und homogen in der Zelle verteilt. Ausnahmen bilden die durch Permeabilitätsbarrieren vom Zytoplasma getrennten Zellkompartimente wie der Golgi-Apparat, die perinukleäre Membran und die Plasmamembran sowie die Nukleolen.

* Die Streuung ist proportional zu λ^{-4} und wird daher bei längeren Wellenlängen erheblich reduziert.

Expression und Quantifizierung. Scheinbar höhere Fluoreszenzprotein-Konzentrationen im Zellkern im Falle von WFM können auf die relative Zellhöhe in der Kernregion und damit einen zusätzlichen Fluoreszenzbeitrag aus den Bereichen außerhalb der Fokusebene zurückgehen. Dies muß insbesondere bei quantitativen Messungen durch intrinsische Fluoreszenzprotein-Kontrollen mitberücksichtigt werden, da auch Dekonvolutionsalgorithmen keine endgültige Sicherheit bei der Bewältigung dieses Problems bieten.

Beim Einsatz von Fluoreszenzproteinen anstelle der seltenen, oft geringspezifischen und vergleichsweise toxischen anorganischen Vitalfarbstoffe muß zusätzlich das Transfektionsagens hinsichtlich seines Einflusses auf die Zellvitalität während der transienten Expression berücksichtigt werden (CHOI *et al.* 2004). Bei LCLC-103H-Zellen lieferte das Lipid-basierte FuGENE 6 von allen getesteten Transfektionsagenzien (§3.6.3) das beste Verhältnis von Transfektions- zu Überlebensrate. Die Expressionsrate betrug am folgenden Tag i.A. ~50 %, die maximale Expression wurde nach ~48 h erreicht. Vergleichende Transfektionsstudien (YOUNG *et al.* 2002, DJUROVIC *et al.* 2004, KIEFER *et al.* 2004) erreichen ähnliche oder geringere Transfektionsraten für FuGENE 6. Den Untersuchungen zufolge sei hauptsächlich das verwendete Zellsystem ausschlaggebend für die Wahl des optimalen Transfektionsagens.

Besonders bei intensiver und länger andauernder Bestrahlung können die Fluoreszenzproteine rapide bleichen und damit quantitative Aussagen beeinflussen; am stärksten war dieser Effekt bei blauen GFP-Varianten ausgeprägt (Abb. 4.3b, S.77). Das Photobleichen läßt sich aber auch für experimentelle Ansätze positiv nutzen, wie die nukleoplasmatischen Bindungs- und Mobilitätsstudien (§4.3.4) belegen. Die verschiedenen Mechanismen des Photobleichens sind nur unzureichend bekannt. Das Molekül im angeregten Singulett- oder Triplett-Zustand kann eine permanente strukturelle Änderung durch eine Reaktion mit einer anderen Spezies (z.B. einem Farbstoffmolekül oder Sauerstoff) eingehen. Diese Änderung reduziert häufig die Fluoreszenzfähigkeit (BERNAS *et al.* 2004). Fluoreszenzproteine eignen sich in besonderem Maße für Quantifizierungsexperimente (Review: PISTON *et al.* 1999), da abgesehen von störenden Nebeneffekten wie Quenchen oder dem zeitlichen Photobleichen der Fluorochrome, ein linearer Zusammenhang zwischen der resultierenden Lichtintensität und der markierten Proteinkonzentration besteht. Für die Reduktion möglicher Fehlerquellen sind eine auf die Fluoreszenzprotein-Spektren abgestimmte Anregungslichtquelle sowie eine passende Filterkombination entscheidend.

Simultane Mehrfachdetektion. Für die Simultandetektion mehrerer Proteine (S.77) wurden standardmäßig die *av*GFP-Varianten ECFP und EYFP (Abb. 4.5, S.78) verwendet, nicht zuletzt weil sie sich auch für FRET-Applikationen eignen (S.166; Review: TSIEN 1998). Der strahlenlose Energieübergang von ECFP nach EYFP wurde verwendet, um u.a. eine mögliche proteolytische Prozessierung von beidseitig markiertem CB(SC) nachzuweisen (Abb. 4.41, S.130). Der Einsatz von Tandem-Fluoreszenzproteinen mit einem spaltbaren, intermediären

Linker wurde zuvor mehrfach erfolgreich erprobt (Review: POLLOK & HEIM 1999). Das ins Kurzwellige verschobene EBFP, dessen Markteinführung der des EGFP folgte, konnte in Kombination mit EGFP in einigen Fällen ebenfalls für Doppellokalisierung verwendet werden (Abb. 4.3, S.77). Da es allerdings eine geringe Quantenausbeute* besitzt und sehr lichtschwach ist (Tab. I, S.160), kann das Überspringen (*cross-talk*) des EBFP-Anregungslichts zu Fluoreszenz im EGFP-Kanal führen und die Mehrfachfärbung überlappender Bereiche erschweren. Zudem sind EBFP und sgBFP[†] gleichermaßen wenig photostabil (Abb. 4.3).

Die Verwendung des im Langwelligen fluoreszierenden Anthozoen-DsRed war trotz einiger Vorteile, die dieses Fluorochrom mit sich bringt – wie hohe Quanteneffizienz und Photostabilität, geringe Streuung und Autofluoreszenz (TSIEN 1999; WILDT & DEUSCHLE 1999) sowie ein hohes S/N-Verhältnis – durch eine Reihe negativer Eigenschaften limitiert[‡]. Hierzu zählen die starke Tendenz zu Oligomerisierung und die langsame Reifung des Chromophors unter Ausbildung grünfluoreszierender Intermediate (BAIRD *et al.* 2000). Die Oligomerisierung, die für die Bildung eines funktionellen, rot fluoreszierenden Chromophors essentiell ist (SACCHETTI *et al.* 2002), kann in manchen Fällen zu einer Misinterpretation der Ergebnisse führen (RODRIGUES *et al.* 2001). Hinzu kommen die in dieser Arbeit beobachtete retikuläre Fehllokalisierung sowie die inzwischen allgemein anerkannte Phototoxizität und Zelltoxizität (Abb. 4.4, S.78). Aus diesen Gründen konnte DsRed zur Doppeldetektion mit EGFP bzw. Dreifachdetektion mit ECFP/EYFP nicht uneingeschränkt verwendet werden (§4.1.2). Weiterentwickelte DsRed-Varianten (KNOP *et al.* 2002) tragen den oben erwähnten Nachteilen Rechnung und zeichnen sich durch bessere Verträglichkeit, kürzere Faltungszeiten sowie geringere Aggregation aus. Monomerisierung von mutiertem DsRed mit beschleunigter Reifung unter Beibehaltung der roten Fluoreszenz wurde von CAMPBELL *et al.* (2002) mit mRFP1 (*monomeric red fluorescent protein*) erreicht. Vorteile könnte DsRed dagegen in solchen Fällen verschaffen, in denen mit starken pH-Änderungen – wie z.B. in den Lysosomen – zu rechnen ist (S.79).

pH-Sensitivität. Die Anregbarkeit und die Fluoreszenzausbeute von GFP hängen stark vom pH ihrer Umgebung ab (PATTERSON *et al.* 1997, WACHTER *et al.* 1998, ELSLIGER *et al.* 1999, WEBER *et al.* 1999, BAIRD *et al.* 2000, HEIKAL *et al.* 2000, REMINGTON 2000). Diese Schwankungen wurden für die intrazelluläre pH-Messung genutzt (KNEEN *et al.* 1998, LLOPIS

* Es sei nicht möglich, ein blaues oder zyanblaues Fluoreszenzprotein mit einer dem EGFP vergleichbaren Intensität herzustellen, lediglich EYFP komme in diesen Bereich, eigne sich jedoch aufgrund des geringen Unterschieds der Emissionsspektren (EGFP: 509 nm, EYFP: 527 nm) schlecht für Doppellokalisierung mit EGFP (persönl. Mitteilung John Wallenburg, Quantum Biotechnologies).

[†] sgBFP besitze eine höhere Quantenausbeute (~ 3×) im Vergleich zu EBFP, sei aber zugleich photosensitiver im UV-Bereich (363 nm-Linie von Hg-Lampen) (persönl. Mitteilung John Wallenburg, Quantum Biotechnologies).

[‡] Die Markierung mit DsRed verlaufe zudem seltener erfolgreich als die mit *avGFP*-Derivaten (persönl. Mitteilung Beat Ludin, Life Imaging Services, Reinach, Switzerland).

et al. 1998, ELSLIGER *et al.* 1999), die praktische Umsetzung ist jedoch sehr schwierig. Maximale Emission wird bei unphysiologisch hohem alkalischen pH erreicht. In Zellen begegnen uns unterschiedliche, meist neutrale oder saure pH-Bedingungen, die daher eine suboptimale GFP-Fluoreszenz bedingen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflusst der Transport von Fluoreszenzproteinen durch Organellen unterschiedlicher pH-Werte und Ionenzusammensetzung die GFP-Fluoreszenz. Die pH-Sensitivität wird mit möglichen Ladungszuständen des Chromophors erklärt, von denen der neutrale und der anionische Zustand für die Fluoreszenz von Bedeutung sind (ELSLIGER *et al.* 1999, WEBER *et al.* 1999). Allerdings läßt sich nicht ausschließen, daß auch ein extrem niedriger pH die Proteinfaltung beeinflussen und dadurch eine unvollständige Rekonstitution oder gar eine komplette Auslöschung der Fluoreszenz hervorrufen könnte. Das resultierende Fluoreszenzbild hängt somit nicht nur von der Konzentration des reifen Fluoreszenzproteins und der effektiven Umgebung ab, sondern auch vom Schicksal des GFP vor dem Erreichen des jeweiligen intrazellulären Zielorts. Daher muß ausdrücklich darauf hingewiesen werden, daß insbesondere quantitative Experimente mit besonderer Sorgfalt auszuwerten sind (Review: SACCHETTI *et al.* 2000). In dieser Hinsicht erwies sich DsRed analog früheren Untersuchungen (BAIRD *et al.* 2000) sowie eigenen Studien zufolge als weitgehend pH-stabil, wohingegen die *av*GFP bei pH 4,0 lediglich 50 % der Ausgangsintensität bei physiologischem pH aufwies (Abb. 4.6, S.79). Die Stabilität der Fluoreszenzemission von DsRed über einen solch weiten pH-Bereich ist verblüffend, stimmen doch die Fluorophor-Strukturen von DsRed und *av*GFP weitgehend überein (WALL *et al.* 2000; S.160). Beim Vergleich von OPE und TPE wurde prinzipiell kein Unterschied im pH-Quenchen festgestellt. Doch scheint es, daß die *in vivo*-Situation einen schützenden Effekt hat, da das Quenchen dort weniger deutlich ausgeprägt und die Regenerierung effektiver war.

5.1.3 Genetische Konversion bei simultaner Kotransfektion

Extrazellulär aufgenommene DNA erfährt während der Transfektion, des zytoplasmatischen Transportes in Richtung Zellkern und der chromosomalen Integration diverse Modifikationen (WAKE *et al.* 1984, COONROD *et al.* 1997), deren Mechanismen nur unzureichend bekannt sind. Verstärkte Konkatemerbildung und homologe Rekombination (ANDERSON & ELIASON 1986, STARK *et al.* 1992, HABER 1999, THACKER 1999, FLORES-ROZAS & KOLODNER 2000, KOWALCZYKOWSKI 2000) fördern zudem den Einbau der Fremd-DNA in das Genom (BISHOP 1996). Diese Faktoren können die Interpretation von Ergebnissen nachhaltig beeinflussen.

Fluoreszenzaustausch. Die häufig verwendete simultane Kotransfektion der zu ~99 % identischen Nukleotidsequenzen von *av*GFP abgeleiteter Fluoreszenzproteine ist eine Quelle für Artefakte und birgt damit gewisse Risiken in sich. Doppeltransfektion kann sukzessive oder simultan erfolgen. Sukzessive Transfektion erscheint wegen zusätzlicher Waschschr

eines höheren Materialverbrauchs und eines größeren Zeitbedarfs oft unwirtschaftlich; die Übertransfektion von Zellklonen, die bereits eines der Konstrukte exprimieren, ist aufgrund des Selektions- und Propagationsprozesses höchst zeitaufwendig. Dagegen ist die simultane Kotransfektion nicht nur die schnellere und bequemere, sondern auch die einzig mögliche Methode in zeitkritischen Experimenten (z.B. bei rasch eintretendem Zelltod). Jedoch kann in diesem Fall DNA mit hohem Ähnlichkeitsgrad epichromosomale Neuarrangements bilden.

Konversionsmechanismus. Die vorliegende Studie zeigt nun eindeutig, daß die während der Kotransfektion auftauchende Konversion der Fluoreszenzeigenschaften ein signifikantes Ereignis darstellt und durch RRR-Prozesse verursacht wird. Die Konversionsexperimente wurden durch quantitative Mikroskopie unter Verwendung bildanalytischer Algorithmen ausgewertet (S.72; Anhang, S.165). Dieser Ansatz erwies sich als zweckmäßiger im Vergleich zur FACS-Analyse, weil die Zellen nicht nur aufgrund ihrer Fluoreszenzintensität, sondern auch anhand der Fläche bzw. Lokalisation der fluoreszierenden Kompartimente voneinander unterschieden werden konnten. Die Untersuchungen sind von allgemeiner Bedeutung in Bezug auf die Interpretation von Transfektionsexperimenten, bei denen Konstrukte mit ähnlichen Nukleotidsequenzen benutzt werden. Dies ist unabhängig davon, ob die Sequenzähnlichkeit innerhalb der Reportergene oder innerhalb der markierten Gene gegeben ist.

Es ist bekannt, daß die Rekombination von Strangbrüchen abhängt, die mit einer höheren Häufigkeit in transformierten Zellen (JOHNSON *et al.* 1999, RICHARDSON & JASIN 2000) oder in solchen Zellen auftauchen, die durch Strahlung oder Chemikalien beschädigt wurden. Einer der essentiellen Schritte im Konversionsmechanismus ist die Anlagerung (*preannealing*) der DNA-Stränge zu einer Heteroduplex-Struktur. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Transfektionsbedingungen die Zusammenlagerung zwar begünstigen können, daß die eigentliche Konversion jedoch erst durch eine zellgebundene und -abhängige Aktivität, nämlich Rekombination, verursacht werden muß. Diese Aktivität setzt eine aktive DNA-RRR-Maschinerie voraus, die auch für Säugerzellen bereits gut untersucht worden ist (HABER 1999, THACKER 1999). Die Wahrscheinlichkeit für eine genomische Insertion konvertierter Sequenzen ist im Hinblick auf die RRR-Prozesse vermutlich höher bei Plasmiden mit Doppelstrangbrüchen als bei intakten (und daher nicht-konvertierten) Plasmiden. Dies muß bei der Probenvorbereitung in besonderem Maße mitberücksichtigt werden.

Fehlerquellen. Irreführende Ergebnisse aufgrund von Konversion können durch verzögerte Protokolle oder niedrige Sequenzähnlichkeiten der Reportergene umgangen werden. Da DsRed1 aus verschiedenen Gründen (S.160) für Transfektionsexperimente wenig geeignet ist, wäre eine zukünftige Weiterentwicklung der Reportergene wünschenswert. Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits mit der Optimierung des DsRed und der Klonierung neuer Fluoreszenzproteine (S.160) unternommen. Ungewollte Konversionsereignisse sind auch von

kommerziell erhältlichen Systemen zu erwarten, die mehrere Fluoreszenzprotein-Sequenzen beinhalten und somit intra- oder intermolekulare Wechselwirkungen eingehen können.

Verwendungsmöglichkeiten. Die simultane Kotransfektion birgt jedoch nicht nur die Gefahr der Fehlinterpretation in sich, sondern eröffnet zugleich neue Anwendungsmöglichkeiten (Patentoffenlegungsschriften BESTVATER *et al.* 2002c, 2000d). Mittels gezielter Konversion ist es möglich, Fluoreszenz- und andere Eigenschaften von (Fusions-)Proteinen auf einfachem Wege auszutauschen und Klonbibliotheken bzw. DNA-Konstrukte *in vivo* zu erzeugen. Für den Fall des Fluoreszenzaustausches wurde diese Strategie bereits erfolgreich eingesetzt (z.B. H2A-EGFP; §4.1.3). Der *in vivo*-Fluoreszenzaustausch läßt sich erheblich schneller bewerkstelligen als mittels der konventionellen Methoden, bei denen das Gen in ein Vektorsystem kloniert und anschließend in Zellen exprimiert wird. Eine weitere Anwendung könnte die Untersuchung der RRR-Eigenschaften besonders in den instabilen Genomen transformierter Zellen sein. Optimierte Vektoren mit mehreren Fluoreszenzprotein-Sequenzen sowie internen heterologen Kalibrier-Reportergenen könnten direkte, reproduzierbare und quantifizierbare Konversionsmessungen ermöglichen. Ein ähnlicher Versuchsansatz zur Untersuchung diverser Tumorzelllinien durch homologe Rekombination von Fluoreszenzprotein-Sequenzen wurde auch von SLEBOS & TAYLOR (2001) in einer unabhängigen Studie unternommen.

5.1.4 Grundlegende Versuche zur Zwei-Photonen-Spektroskopie

Mit der Einführung zuverlässiger Femtosekunden-Oszillatoren (DENK *et al.* 1995, DENK & SVOBODA 1997) entwickelte sich die Zwei-Photonen-Mikroskopie (TPM) rasch zu einem möglichen und vielseitigen Werkzeug in vielen Bereichen der biomedizinischen Forschung (PISTON 1999, WILLIAMS *et al.* 2001, GRATTON *et al.* 2001, BROWN *et al.* 2001). Wesentliche Aspekte der TPM (§3.7.3) basieren zum einen auf der lokal stark begrenzten Excitation und zum anderen auf der Verwendungsmöglichkeit langwelligeren Anregungslichts. Einen Gesamt-einblick in die daraus resultierenden Vorteile und weitreichende Anwendungsmöglichkeiten sowie in die technischen Details erhält man in einschlägiger Literatur (WILLIAMS *et al.* 1994, DENK *et al.* 1995, CENTOZE & WHITE 1998, PERIASAMY *et al.* 1999, PISTON 1999, KÖNIG 2000, PATTERSON & PISTON 2000, WILLIAMS *et al.* 2001).

Zwei-Photonen-Fluoreszenzspektren. Im Gegensatz zu OPE kann bei TPE die Anregungswellenlänge so justiert werden, daß verschiedene Fluorochrome bzw. unterschiedliche lokale Maxima desselben Fluorochroms gezielt angeregt werden können. Dies setzt aber voraus, daß das exakte Profil der Absorptionsspektren bekannt ist. Trotz der rasch zunehmenden TPM-Anwendungen in der Biomedizin war die Kenntnis an Zwei-Photonen-Spektren ein Mangel, der von Anbeginn an kritisiert wurde (SMITH 1986, WILLIAMS *et al.* 1994, XU & WEBB 1996). Es bestanden Spektren für eine kleine Auswahl an synthetischen Fluorochromen (BIRGE 1986,

XU & WEBB 1996, XU *et al.* 1996, MALAK *et al.* 1997, FISHER *et al.* 1998, ALBOTA *et al.* 1998, GRATTON *et al.* 2001). Da die Datengenerierung aufwendig ist, wurde sie bislang nicht systematisch betrieben. Auch für bestimmte Fluoreszenzproteine wurden bereits TPE-Spektren aufgenommen oder gewisse spektrale Eigenschaften untersucht (XIA *et al.* 1999, HEIKAL *et al.* 2000). Es ist praktisch nicht möglich, verlässliche Zwei-Photonen-Absorptionsspektren ausgehend von den entsprechenden Ein-Photonen-Daten abzuleiten, da ihnen verschiedene Paritätsauswahlregeln* (*parity selection rules*) sowie unterschiedliche Effekte der Vibrationskopplung (*vibronic coupling*) zugrunde liegen (XU *et al.* 1996). Grundsätzlich finden effiziente photophysikalische Reaktionen auch vom ersten angeregten Singulett-Zustand aus statt. Dieses als KASHAS Regel bekannte physikalische Phänomen sagt für beide Anregungsarten, TPE wie OPE, theoretisch ähnliche Emissionscharakteristiken voraus (S.71; Anhang, S.160). In der Praxis wurden jedoch Abweichungen von dieser Regel festgestellt und zumeist eine Blauverschiebung von TPE- gegenüber den OPE-Spektren beobachtet (XU *et al.* 1996, ALBOTA *et al.* 1998). Die Autoren führen dies auf Paritätsauswahlregeln zurück, welche die Induktion von Excitationen auf höhere Energieniveaus in TPE begünstigen. Dies führe zu einer Übereinstimmung lokaler TPE-Maxima mit Seitenspitzen von OPE-Spektren. Nach Auffassung beider Autoren sei die Blauverschiebung von Vorteil in der TPM, da sie die Verwendung gebräuchlicher nah-infraroter Laser erlaube. Zudem sehen sie die Möglichkeit, mehrere Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionscharakteristiken mit einer einzelnen Wellenlänge anregen zu können.

In dieser Studie (§4.1.4) wurden Zwei-Photonen-Absorptions- sowie Emissionsspektren zahlreicher biologisch relevanter Fluorochrome, darunter einem Satz von Fluoreszenzproteinen, generiert und die spektralen Charakteristiken mit denen in der OPE verglichen. In einer früheren Studie haben XU & WEBB (1996) keine Unterschiede in den Emissionsspektren von OPE und TPE für die von ihnen untersuchten Fluorochrome (Fluorescein, DiI, Rhodamin B und Lucifer Yellow) gefunden. Die meisten der hier untersuchten Fluorochrome bestätigen ihr Ergebnis; die geringfügigen Abweichungen bis 15 nm könnten von Kalibrierungsfehlern herrühren, die durch einen kleinen, bereits vorhandenen Unterschied intensiviert worden sein könnten. Deshalb sind sie mit geringer Wahrscheinlichkeit TPE-spezifische Effekte. Doch in bestimmten Fällen wurde eine signifikante Rotverschiebung gefunden. Zudem gab es eine sichtbare Tendenz, daß TPE-Maxima auf Nebenmaxima von OPE-Spektren fielen. Dies unterstreicht die Authentizität der Messungen. Die von *wGFP* abgeleiteten Fluoreszenzproteine (*avGFP*) zeigten neben dem Hauptabsorptionsmaximum mehrere lokale Absorptions-

* Die Paritätsauswahlregeln besagen, daß nur Übergänge zwischen Gesamtzuständen verschiedener Parität erlaubt sind. Es ist daher nicht möglich, Zwei-Photonen- (gerade Parität) Excitationsspektren durch einfache Verdopplung der Wellenlängen der Ein-Photonen- (ungerade Parität) Anregungen vorherzusagen. Allerdings folgen Drei-Photonen- (gerade Parität) Excitationsspektren dem Dreifachen der OP-Spektren.

maxima. Ihre Position innerhalb des TPE-Absorptionsspektrums entsprach Schulterbereichen in den OPE-Absorptionsspektren, was darauf hindeutet, daß beide Excitationswege dieselben Anregungszustände dieser Moleküle hervorrufen. Der Reinheitsgrad des Proteinlysats kann sich unmittelbar auf dessen Emissionsspektrum auswirken. So haben Vergleichsmessungen zwischen unbehandelten Rohextrakten und reinem EGFP eine geringfügige Rotverschiebung des Emissionsmaximums beim Rohextrakt ergeben. Trotz der niedrigen Sequenzhomologie zwischen DsRed1 und den avGFP haben deren Chromophore eine ähnliche Struktur, doch das konjugierte π -System ist im Falle von DsRed stärker ausgeprägt (GROSS *et al.* 2000, WALL *et al.* 2000, YARBOROUGH *et al.* 2001). Komplikationen in der Interpretation von DsRed-Spektren kommen von zusätzlichen Beiträgen des grünleuchtenden Intermediats sowie der Tetramerisierung (S.160). Bei dem Intermediat handelt es sich vermutlich um eine unreife oder nicht vollständig gefaltete Variante des rot-emittierenden reifen Proteins (GROSS *et al.* 2000, GARCIA-PARAJO *et al.* 2001). Die aufgenommenen TPE-Spektren der 460–500 nm-Anregung zeigen trotz ausgeprägter Absorption keine signifikanten grünen Signale, welche auf dieses Intermediat zurückzuführen wären. Tetramerisierung (BAIRD *et al.* 2000, JAKOBS *et al.* 2000) bringt die Fluorophore in eine enge Nachbarschaft, welche zu einer ausgeweiteten elektronischen Koppelung (*electronic coupling*) führen könnte (WALL *et al.* 2000).

Zwei-Photonen-Mikroskopie. Die erreichbare laterale Auflösung der TPM ist geringer als die der konventionellen LSM (S.160; PISTON 1999). Die konfokale Anregung verbessert aber nicht nur die axiale Auflösung, sondern reduziert auch den *out-of-focus*-Hintergrund, die endogene Autofluoreszenz sowie das Photobleichen von benachbartem Fluorochrom und eignet sich daher im besonderen Maße für die 3D-Bildrekonstruktion (S.165). Da keine konfokale Aperturblende nötig ist, kann zudem das gesamte Einstrahlungslicht gesammelt werden. Nachteile der TPE sind die momentan hohen Kosten hochfrequenter Puls laser, der Prototyp-Charakter der verwendeten Mikroskopsysteme sowie fehlende TPE-Anregungsspektren, die in ihrem Verlauf von den analogen OPE-Spektren abweichen können.

Bei dem Entwicklungsstand der TPM zum experimentellen Zeitpunkt war es mit dem gegebenen System nicht möglich, Feineinstellungen der Excitationswellenlängen in einem für lebende Objekte angemessenen Zeitraum vorzunehmen. Trotzdem liefert die Einschränkung der TPE-Anregung auf eine einzelne Excitationswellenlänge auch bei der Visualisierung mehrerer Fluorochrome z.T. gute Ergebnisse. So verwendeten HELL *et al.* (1998) 647 nm, um mehrere kernspezifische Fluorochrome anzuregen. Im vorliegenden Fall wurde mit 860 nm ein Satz von Fluorochromen angeregt: Hoechst 33342, ECFP, EGFP und MitoTracker Red. Die höchste Fluoreszenzausbeute wurde für MitoTracker Red und die niedrigste für Hoechst 33342 erreicht. Trotz der variablen und z.T. sehr geringen Fluoreszenzausbeute war die simultane Visualisierung dieser Marker möglich. Dislokationen zwischen identischen Strukturen sind auf intrazelluläre Bewegungen der lebenden Zellen zwischen den Aufnahmen

in den einzelnen Kanälen zurückzuführen. Schnelleres Scannen kann zwar solche Artefakt-Bildung verhindern, reduziert jedoch gleichzeitig das S/N-Verhältnis. Die Limitation der z.T. sehr niedrigen Excitationseffizienz wurde bei der Betrachtung feiner Strukturen wie den Mitochondrien und den Mikrotubuli deutlich, die nicht im Detail aufgelöst werden konnten. Die Verwendung einer einzigen Wellenlänge zur Anregung mehrfach markierter Proben lieferte also suboptimale Ergebnisse; zukünftige Anstrengungen in der Laserentwicklung sollten daher eine optimale Excitation für jedes Fluorochrom sicherstellen.

5.2 KATHEPSIN B-STUDIEN

Die Wahrnehmung CB-eigener Funktionen hat sich über die letzten Jahre stark gewandelt. Kürzlich erbrachte Beweise sprechen der „lysosomalen Peptidase“ Schlüsselpositionen in Grundprozessen auch außerhalb der Lysosomen zu, wie z.B. bei der Krebsprogression (S.23) oder der Apoptose (S.25). Technische Fortschritte in der Mikroskopie und die Entwicklung stabiler chemischer und genetischer Marker für Organellen und Moleküle ermöglichen nunmehr mächtige und direkte *in vivo*-Anwendungen. Sie erlauben nicht nur die exakte Lokalisierung bestimmter Proteine, sondern auch die Untersuchung ihres intrazellulären Transports, ihrer Interaktion mit anderen Proteinen und ihrer enzymatischen Aktivitäten sowie der zellulären Antwort auf die Überexpression spezifischer Proteine.

5.2.1 Rekombinantes Kathepsin B in Tumorzellen als Modellsystem

Intrazelluläres CB wurde mit Hilfe synthetischer CB-FP-Chimären im Hinblick auf seine Expression und Prozessierung, enzymatische Aktivität sowie Verteilung und Transport der Expressionsprodukte charakterisiert.

Überexpression und Prozessierung. Grundlage vergleichender Untersuchungen zwischen endogenem und rekombinatem CB ist die korrekte Expression und die posttranslationale Prozessierung des Enzyms. Den Studien wurde ein rekombinantes hCB-Gen zugrunde gelegt, bei dem das C-terminale Pro-Peptid eliminiert worden war, um so ein mögliches Abspalten des Markers zu verhindern (§4.2.1). Da dieses Pro-Peptid *in vivo* autokatalytisch abgespalten wird, kann nahezu ausgeschlossen werden, daß das fehlende Fragment die Lokalisation des vollständig prozessierten rekombinanten CB beeinträchtigt. Diese Überlegung geht einher mit der Überzeugung anderer (MEHTANI *et al.* 1998), wonach das gering konservierte C-terminale Fragment kaum an der Sortierung von CB beteiligt sei. Dagegen könnte der Erhalt der entsprechenden Spaltstelle zu einem ungewollten Verlust des C-terminalen Markers führen.

Die Überexpression von Fluoreszenzprotein-markiertem CB wurde auf Transkriptions- sowie auf Translationsebene nachgewiesen (§4.2.2); quantitative Aussagen über die exakten Mengenverhältnisse von rekombinantem zu endogenem CB sind jedoch nicht möglich. Bezüglich Expression und Prozessierung des rekombinanten Produkts zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen transienter und konstitutiver Expression: Während der transienten Expression wurde CB-FP (i) im Schnitt stärker exprimiert als im Falle einer permanenten Expression* und (ii) im Gegensatz hierzu auch kaum posttranslational prozessiert. Der C-terminale Fluoreszenzmarker wurde in beiden Fällen nicht abgespalten. Die Unterschiede in der Prozessierung müssen auf unterschiedlichen Expressionsgraden beruhen und führen somit zu folgenden Annahmen: (i) Die posttranslationale Prozessierung von CB stellt nur z.T. einen autokatalytischen Prozeß dar, so daß die Menge anderer, daran beteiligter Peptidasen (§2.2.2) oder sonstiger Faktoren (Rezeptoren o.ä.) im Falle der transienten Überexpression limitierend ist. (ii) Lysosomale Enzyme können bei starker Überexpression unter Umgehung der regulären Prozessierung einen alternativen Transportweg einschlagen und über sekretorische Vesikel in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, wie bereits für CD (ISIDORO *et al.* 1991) und CL (TAO *et al.* 1994) gezeigt wurde. Eine solche konstitutive Sekretion (Abb. 2.5, S.29) könnte die fehlende Prozessierung teilweise erklären. Versuche, die Expression des rekombinanten CB mittels eines induzierbaren Expressionssystems (TetOn, Clontech) zu regulieren, blieben erfolglos. Allerdings wurde der Expressionsgrad über die Auswahl unterschiedlich stark konstitutiv exprimierender Zellklone „moduliert“. Hohe Expression von rekombinantem CB auf Transkriptions- und Translationsebene stellt nicht unbedingt eine artifizielle Situation dar, da sie auch *in vivo* – z.B. in Tumoren – häufig beobachtet wird (S.23). Aus der Beobachtung einer nur geringfügig beeinträchtigten Propagation über-exprimierender Zellen geht hervor, daß die Zellen mit dieser Situation gut zurechtkommen.

Zellvitalität. Die Überexpression von CB-FP hatte keinen signifikanten Einfluß auf Vitalität, Morphologie und Wachstum von LCLC-103H-Zellen (§4.2.3). Die beobachtete Abnahme der Adhäsionsfähigkeit dürfte auf die Sekretion von enzymatisch aktivem rekombinanten CB zurückzuführen sein, welches die Degradation von extrazellulären Matrixkomponenten wie Kollagen, Laminin und Fibronectin (BUCK *et al.* 1992, GUINEC *et al.* 1993) begünstigen könnte. Trotz einer ~30-fach erhöhten CB-Enzymaktivität wurde kein zytotoxischer Effekt festgestellt. Vermutlich wird das rekombinante CB teilweise konstitutiv in das extrazelluläre Medium sezerniert und verbleibt über das normale Maß hinaus in Kompartimenten (ER, Golgi, Vesikel), in denen es kein zytotoxisches Potential entwickeln kann. Überexpression von CB-FP ging mit der Bildung von Micro-Foci einher (S.98). Solche Zellaggregation kann durch transformierende Agenzien (z.B. durch Transfektion mit Onkogenen) ausgelöst werden.

* Diese Beobachtung geht auch mit lichtmikroskopischen Untersuchungen einher.

Intrazelluläre Lokalisation und Sortierung. Eine theoretische Betrachtung möglicher Sortiersignale auf der Grundlage von Aminosäuresequenzen mit dem Analyseprogramm „PSORT“ ergab folgende Aufenthaltswahrscheinlichkeiten für CB: (i) extrazellulär 37,0 %, (ii) lysosomal 19,0 %, (iii) in Peroxisomen 13,8 % und (iv) in der ER-Membran 10,0 %. Experimentelle Vergleichsanalysen ergaben entsprechend folgende Werte: (i) in der Plasmamembran sowie extrazellulär 47,8 %, (ii) im ER 13,0 %, (iii) in den Mitochondrien 13,0 %, (iv) zytoplasmatisch 8,7 %, (v) in den Vakuolen 8,7 %, (vi) im Zellkern 4,3 % und (vii) im Golgi 4,3 %. Eigene fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von permanent exprimiertem rekombinanten CB-FP in unterschiedlichen Zelltypen (§4.2.4) spiegelt diese Verteilung nur bedingt wider, entspricht jedoch weitgehend dem zu erwartenden Lokalisationsmuster einer lysosomalen Peptidase (§2.3.1): Die Lokalisation umfaßte retikuläre Kompartimente (Kernmembran, ER, Golgi), Vesikel (überwiegend azidische) sowie die Plasmamembran (PIETRAS & ROBERTS 1981, SLOANE *et al.* 1994, SINHA *et al.* 2001), welcher eine besondere Bedeutung bei Invasion und Metastasierung zukommt (S.105). Der zytoplasmatische Anteil war äußerst gering und ist möglicherweise eine Folge der Überexpression. Das Vollängenprodukt, CB(FLM)-FP, wurde im Golgi-Apparat stärker angereichert als ein kurzes Konstrukt, das lediglich das ER-Signal- sowie das N-terminale Pro-Peptid codiert, CB(PREPRO)-FP. Dies bestätigt die Annahme, daß zusätzliche Glykosylierungsstellen im Bereich der Einzelkettenform von CB(FLM)-FP (Abb. 2.2, S.18) die korrekte Sortierung und damit Prozessierung beeinflussen (S.101). Die Ergebnisse zeigen auch, daß sich CB(PREPRO)-FP aufgrund seiner geringen Größe und der spezifischen Sortierung als Organellenmarker für ER und Golgi sehr gut eignet. Vergleichsstudien mit diversen ER- und Golgi-Markern legen die Vermutung nahe, daß weniger die Position, sondern vielmehr die Anzahl funktioneller Glykosylierungsstellen für die Sortierung von CB relevant ist. Während hauptsächlich nicht-prozessiertes Pro-CB durch regulierte Exozytose sezerniert wird, kann das in die reife Form überführte CB nicht mehr sezerniert werden (KULIAWAT *et al.* 1997). Da transient exprimiertes CB(FLM) in LCLC-103H-Zellen nicht gespalten wurde, ist es wahrscheinlich, daß in solchen Fällen die beobachteten Vesikel sekretorischer Natur waren. Auch die Aktivitätsuntersuchungen *in vivo*, die eine höhere Enzymaktivität im Golgi in permanent exprimierenden Zellklonen gegenüber transient exprimierenden Zellen belegen, sprechen für eine Sekretion des CB(FLM)-FP.

Der Frage, ob das rekombinante CB vom ER in den Golgi-Apparat gelangt und von dort aus weitertransportiert wird, wurde mit Hilfe der Transportinhibitoren Brefeldin A (BFA) und Tunicamycin nachgegangen (S.103). BFA-behandelte LCLC-103H-Zellen vesikulierten stark, gleichzeitig wurde transient exprimiertes CB(FLM)-FP im ER angereichert. Dies ist ein Beleg für die Wirksamkeit der Inhibition und für den unterbrochenen Transport des rekombinanten Proteins von ER zu Golgi. Die Tunicamycin-Applikation führte ebenfalls zu einer Anreicherung des Fluoreszenzsignals im ER gegenüber dem Golgi. Dies spricht für eine

frühe Inhibition des Transportes von rekombinantem CB auf dem Mannose-6- P -Weg. Daher wird vermutlich auch transient exprimiertes CB-FP glykosyliert und korrekt in den TGN befördert. Die Ergebnisse sprechen für eine korrekte Sortierung von CB-FP in LCLC-103H-Zellen via Mannose-6- P -Weg wie sie für lysosomale Enzyme typisch ist. Dennoch dürfen alternative Sortiermechanismen beim nativen CB nicht ausgeschlossen werden.

Mitochondriale Lokalisation von CB, wie sie aufgrund disruptiver Einflüsse an den Lysosomen oder im Zusammenhang mit trunkierten CB-Transkripten registriert wird, wurde hier nicht beobachtet. Die Studien sprechen dafür, daß CB neben anderen Kathepsinen in der Lage ist, pro-apoptotische Änderungen in den Mitochondrien zu triggern (MÜNTENER *et al* 2004; S.156). Im Falle (konstitutiv) CB-FP überexprimierender LCLC-103H-Zellen waren weder lysosomale Bruchstellen (*breakage, breakdown*) infolge von Photoschäden noch ein Freisetzen von Fluoreszenz aufgrund lysosomaler Leckagen zu beobachten. Es gab keinerlei Anzeichen für eine Kolokalisation von CB-FP mit den Mitochondrien. Im Normalfall verbleibt das rekombinante CB in den retikulären/vesikulären Kompartimenten und ist somit vom Zytosol sowie den Mitochondrien isoliert. Die Frage, ob trunkiertes, zytosolisches CB an apoptotischen Vorgängen beteiligt sein könnte, wird später in §5.2.2 diskutiert.

Grundsätzlich sind bei der Detektion von Fluoreszenzprotein-markiertem CB zwei Punkte zu beachten: Zum einen wird lediglich die Fluoreszenz des Markerproteins direkt erfaßt und nicht das eigentliche Zielprotein, welches im Falle einer Prozessierung und anschließender Segregation einen anderen Sortierweg einschlagen könnte. Nimmt man die biochemischen Prozessierungsergebnisse (§4.2.2) hinzu, so läßt sich aber zumindest für die C-terminale schwere Kette von CB eine zum Fluoreszenz-Marker identische Lokalisation postulieren. Der zweite Punkt betrifft die pH-Abhängigkeit der *avGFP*-Fluoreszenz, die sich in einer starken Abnahme bei niedrigem pH (Säure-Lücke), wie er z.B. in den Lysosomen zu finden ist, äußert (S.79). Neutralisierende Alkalisierungsversuche ergaben keine signifikante Zunahme der vesikulären Fluoreszenz (S.105), so daß man auch davon ausgehen kann, daß lysosomales Fluoreszenzprotein nicht komplett durch den niedrigen pH gequenchet wird, auch wenn eine Quantifizierung des Signals in solchen Fällen nicht gewährleistet werden kann.

Enzymatische Aktivität. Im Zentrum der zahlreichen physiologischen Funktionen von CB (§2.2.6) steht dessen enzymatische Aktivität (§2.2.4; §4.2.5), deren Reaktionsmechanismus wiederum von der Konformation (§2.2.3) der Peptidase sowie von dem sie umgebenden pH-Milieu bestimmt wird. Neben einer breiten Palette an natürlichen Substraten und Inhibitoren (§2.2.5) ermöglichen synthetische Substrate die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität (§3.5.5). Mit der Zymogen-Prozessierung (§2.2.2) stellt sich auch die Frage nach der enzymatischen Aktivität aberranter CB-Proteine, die aus alternativem RNA-Spleißen (§2.2.7) hervorgehen und aufgrund eines fehlenden Signalpeptids nicht den gewohnten Mannose-6- P -Weg (§2.3.1) in die Lysosomen via ER und Golgi-Apparat einschlagen können.

Im Vergleich zur transienten Expression tritt die CB-Enzymaktivität bei konstitutiver Expression verstärkt im Golgi-Bereich auf (S.106) und bestätigt so die Hypothese eines alternativen Transports infolge von Überexpression. Analog der vorgefundenen Verteilung des rekombinanten CB wurde in den LCLC-103H-Zellen enzymatische Aktivität im ER, in der Kern- und in der Plasmamembran nachgewiesen (SPIESS *et al.* 1994). Zusammengefaßt läßt sich sagen, daß im Falle starker Überexpression, wie sie auch *in vivo* zu beobachten ist, bevorzugt der Sekretionsmechanismus gewählt wird, wobei unvollständig prozessiertes – und daher weniger aktives – Pro-CB in das extrazelluläre Medium sezerniert wird.

Für quantitative Analysen war die *in vivo*-Methode allerdings wenig geeignet: Zum einen ist die Doppellokalisierung von Substrat und GFP-markiertem Enzym wegen der ausgedehnten Anregungs- und Emissionsspektren von CV nicht möglich; zum anderen läßt sich nicht zwischen den Aktivitäten von endogenem und rekombinanten CB unterscheiden. Die Einschränkung durch potentiell pH-Quenchen läßt sich auch durch die Verwendung des weitgehend pH-insensitiven Fluoreszenzproteins DsRed (S.79) nicht umgehen, da dieses wegen anderer negativer Seiteneffekte (S.77) nur bedingt einsetzbar ist. Aktivitätsmessungen an Zellhomogenaten transfizierter LCLC-103H-Zellen (S.106) bestätigen aber die *in vivo*-Beobachtungen. Die proportionale Zunahme von extra- und intrazellulärer Enzymaktivität in konstitutiv überexprimierenden CB(FLM)-FP-Zellklonen in Bezug auf die Kontrollzellen spricht für eine regulierte und nicht eine konstitutive Sekretion des rekombinanten Enzyms, welche im Falle ungenügender Prozessierung vorliegen kann. Vereinzelt wurde eine bis 2,5-fach erhöhte Enzymaktivität in verschiedenen Kontroll-Zellklonen festgestellt. Als mögliche Ursache hierfür kommt die zufällige Selektion besonders reaktiver Zellklone aus der hinsichtlich der CB-Enzymaktivität variierenden Ausgangszellpopulation in Frage. CB(SC)-FP-Zellklone zeigten keine Enzymaktivität und liefern hiermit einen weiteren Hinweis auf die mangelnde reguläre Funktionsfähigkeit von (künstlich) trunkiertem CB. Dies steht im Einklang mit der unzureichenden Prozessierung (§4.3.1) und der als artifiziell einzustufenden Lokalisation der trunkierten CB-Konstrukte in permanent exprimierenden Zellen (S.131).

Keines der überexprimierten Kontrollkonstrukte (EGFP, EGFP-Tub, StB-EGFP) wirkte sich regulatorisch auf die intrinsische CB-Enzymaktivität aus. Wahrscheinlicher ist dagegen die gegenseitige Regulation verschiedener Peptidasen. Der Frage, ob die CB-Überexpression andere Cysteinpeptidasen regulativ beeinflusst, wurde exemplarisch anhand von CK und CL mit Hilfe enzymatischer Aktivitätsmessungen nachgegangen (§4.2.7). Diese belegen nicht nur, daß CB in LCLC-103H-Zellen gegenüber CL und CK stark überwiegt, sondern legen auch den Schluß nahe, daß verstärktes Vorkommen von CB-Aktivität eine Hochregulation der beiden anderen Cysteinpeptidasen bewirken kann, wie zumindest im Falle von CL gezeigt werden konnte. Dies läßt möglicherweise auf einen gekoppelten Regulationsmechanismus der Expression/Aktivierung der Enzymaktivität schließen. Die CK-Aktivität ist in den LCLC-

103H-Zellen sowohl bei Transfektion als auch bei der Negativkontrolle minimal. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die Überexpression eines beliebigen Proteins im Rahmen des Proteinmetabolismus eine erhöhte Präsenz abbauender Enzyme erforderlich macht und daß nicht notwendigerweise eine Koregulation CB–CL vorliegt.

Insbesondere im Zusammenhang mit dem Vorkommen künstlich trunkierter CB-Formen im Zellkern (§4.3.1) kam der Ermittlung nukleärer CB-Aktivität eine gewichtige Rolle zu. Die Lokalisierung der Enzymaktivität an Zellkernen, isoliert aus transfizierten Zellklonen, folgt der Signalverteilung des rekombinanten CB(FLM)–FP im Zellkern: Während das Kerninnere frei von jeglichem Signal blieb, erwies sich die Kernmembran nicht nur als Expressionsort sondern auch als Träger hoher enzymatischer CB-Aktivität, die sogar die durchschnittliche intra- sowie extrazelluläre Aktivität um ein Vielfaches übertraf. Das Ergebnis überrascht insofern, da in diesem Kompartiment überwiegend die unvollständig prozessierte Pro-CB-Form zu erwarten ist, welche normalerweise eine geringere enzymatische Aktivität aufweist als die reife Einzelketten- oder die Zweikettenform (MOIN *et al.* 1992). Möglicherweise ist die Konzentration an exprimierter Peptidase im ER und der perinukleären Membran gegenüber anderen Kompartimenten erhöht. Aufgrund möglicher pH-Quencheffekte in unterschiedlichen Kompartimenten läßt sich dies jedoch mit Hilfe von *avGFP* nur schwer nachweisen. Da zwischen Nukleoplasma und Kernmembran eine natürliche Diffusionsbarriere besteht und ein Übergang von CB(FLM)–FP nicht beobachtet wurde, bleibt unklar, ob und unter welchen Umständen das CB in den Zellkern gelangen und dort Reaktionen auslösen kann.

Gezielte CB-Inhibition. Die Eindämmung überschüssiger CB-spezifischer Enzymaktivität stellt einen zentralen therapeutischen Angriffspunkt in der Bekämpfung damit assoziierter Krankheitsbilder (§2.2.6) dar. Neben synthetischen Inhibitoren werden auch natürliche Inhibitoren auf ihre therapeutische Tauglichkeit hin untersucht (§2.2.5). Es ist möglich, daß fehlende Ausgewogenheit zwischen der Peptidase und ihrem endogenen Inhibitor eine Rolle bei der Progression bestimmter Lungentumoren *in vivo* spielt (HEIDTMANN *et al.* 1997). Zu den natürlichen „Anti-Peptidasen“ zählt insbesondere der Inhibitor Stefin B (StB) aus der Cystatin-Familie. Die Bindung zwischen StB und CB wurde *in vitro* (STUBBS *et al.* 1990) und *in vivo* mittels Kolokalisationsstudien untersucht (RICCIO *et al.* 2001). Diese ergaben eine zu erwartende Separierung der beiden Bindungspartner in unterschiedlichen Kompartimenten, so daß der funktionelle Zusammenhang nach wie vor nicht eindeutig geklärt werden kann. Anders als CB wurde StB sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachgewiesen (RICCIO *et al.* 2001). Dies steht im Einklang mit eigenen lichtmikroskopischen Untersuchungen (§4.2.6). Kotransfektion von CB(FLM)–FP oder CB(SC)–FP mit dem ebenfalls Fluoreszenzprotein-gekoppelten StB ergab in keinem der beiden Fälle eine Kolokalisation. Die Frage nach dem gemeinsamen Interaktionsort bleibt somit offen. Eigene FACS-Analysen an Mischpopulationen mit exprimierenden Zellen und nicht-transfizierten Kontrollzellen liefern

einen Hinweis dafür, daß der überexprimierte Inhibitor von der Zelle exozytotisch abgegeben und durch Endozytose wieder aufgenommen werden kann. Theoretisch wäre somit eine mögliche Inhibition entweder extrazellulär oder intrazellulär über die Endosomen möglich. MYERS' Arbeitsgruppe fand heraus, daß StB in den zerebralen granulären Zellen und deren Vorläuferzellen nukleoplasmatisch vorliegt (PENNACCHIO *et al.* 1998, SHANNON *et al.* 2002). Dies könnte von Bedeutung sein für die myoklonale Epilepsie, bei der fehlendes StB eine Apoptose vieler Granulenzellen bewirkt. Mitochondriales Auftreten von StB könnte auch mit einer antiapoptotischen Funktion der „anti-Protease“ korrelieren (RICCIO *et al.* 2001).

Um dem Umstand der unterschiedlichen Kompartimentierung von StB und CB gerecht zu werden und eine höhere Interaktion zwischen den beiden Molekülen zu ermöglichen, wurde ein Lösungsansatz verwendet, bei dem modifiziertes StB (S.55) in dasselbe Kompartiment wie auch das endogene CB geleitet wurde. Dazu wurde die Präpro-Sequenz von CB N-terminal an FP-StB angehängt. Neben einer zu erwartenden Anreicherung des Inhibitors im Golgi finden sich diskret verteilte Membran-assoziierte Hotspots an Zell-Zell- sowie Zell-Untergrund-Kontaktstellen. Die Sekretion analog dem Pro-CB ist nicht weiter verwunderlich, allerdings erscheint CB(PREPRO)-EGFP-StB im Gegensatz zu CB(PREPRO)-EGFP und CB(FLM)-EGFP nicht im überwiegend löslichen Zustand, sondern fest assoziiert mit nicht weiter bestimmten Zellmembrankomponenten. Es ist anzunehmen, daß hierbei StB und nicht das PREPRO-Fragment als Bindungspartner agiert. Endogenes StB wurde in Zellextrakten von Lungentumorzellen in gleicher Konzentration wie im Medium vorgefunden (HEIDTMANN *et al.* 1997). Die erfolgreiche Sekretion des modifizierten StB mittels CB-spezifischer Sortier-elemente läßt potentielle gentherapeutische Ansätze auf dieser Basis in Betracht ziehen.

Messungen der CB-Enzymaktivität an LCLC-103H-Zellhomogenaten mit sowie ohne konstitutiver CB(FLM)-EGFP-Expression in Verbindung mit transienter Überexpression von StB-EGFP, EGFP-StB und CB(PREPRO)-StB-EGFP ergeben ein differenziertes Bild. Während die Aktivität in Kontrollzellen in allen Fällen signifikant reduziert werden konnte, war dieser Effekt bei konstitutiv CB(FLM)-EGFP-exprimierenden Zellen lediglich im Falle von EGFP-StB zu beobachten. Unterschiedliche inhibitorische Wirkung von N- und C-terminal markiertem StB läßt sich durch sterische Einflüsse des Markers deuten. MACHLEIDT *et al.* (1991) haben Inhibitionskonstanten natürlicher sowie rekombinanter StB-Varianten für CB und andere Peptidasen bestimmt. Beide verwendeten Konstrukte sind danach inhibitorisch aktiv, jedoch wird CB durch das N-terminal markierte StB wirksamer inhibiert*. Obwohl die spezifische Inhibition mittels rekombinanter Inhibitoren prinzipiell funktioniert, wäre eine weitere Optimierung der Inhibitoren durch Erniedrigung der Affinitätskonstante erforderlich.

* Nach persönl. Mitteilung der Autoren betragen die pK_i -Werte für StB-EGFP ~ 9 μM , für EGFP-StB $\sim 4,5$ μM , für EGFP als Negativkontrolle $\sim 1,3$ μM und für gereinigtes StB $\sim 5,5$ μM . Die Messungen erfolgten bei pH 9.

5.2.2 Nukleoplasmatisches trunkiertes Kathepsin B und Zelltod

Normalgewebe und insbesondere Tumoren enthalten das nativ trunkierte $\Delta^{51}\text{CB}$ -Polypeptid, das sich auf alternativ gespleißte mRNA zurückführen läßt (§2.2.7) und im Gegensatz zum Vollängenprodukt primär zytoplasmatisch vorliegt. Reifes CB kann ebenfalls als Folge von Lysosomenschäden in das Zytosol gelangen (§4.3). Veränderte Expression und Lokalisation von CB findet man häufig nicht nur in transformierten und malignen, sondern auch in apoptotischen Zellen (S.25). Dies deutet auf alternative Transportwege der Peptidase hin. Ein Hauptaugenmerk dieser Arbeit war daher auf die Untersuchung solcher „mißgebildeter“ CB-Polypeptide gerichtet. Mehrere rekombinante CB-Formen wurden zu diesem Zweck mit Fluoreszenzproteinen markiert und mittels lebendzellmikroskopischer Techniken untersucht.

Trunkiertes Kathepsin B. Eng verbunden mit der potentiellen Funktion von natürlich vorkommendem $\Delta^{51}\text{CB}$ ist die Frage nach seiner posttranslationalen Prozessierung und enzymatischen Aktivität. Dem trunkierten $\Delta^{51}\text{CB}$ fehlt das komplette Signalpeptid sowie ein Teil der N-terminalen Pro-Region (Abb. 2.4, S.27). Da $\Delta^{51}\text{CB}$ auch nicht über ein alternatives ER-Translokationssignal verfügt, kann es nicht in das ER gelangen, um von dort ausgehend prozessiert und über den Mannose-6- P -Weg (S.29) weitertransportiert zu werden. Allerdings enthält das verbleibende Polypeptid ein MTS, welches im trunkierten $\Delta^{51}\text{CB}$ -Molekül aktiv wird und den überwiegenden Anteil des Expressionsprodukts in die Mitochondrien befördert (MÜNTENER *et al.* 2004). Die vorliegende Studie bestätigt diese Befunde. $\Delta^{51}\text{CB}$ wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als intaktes 35 kDa-Produkt exprimiert (MEHTANI *et al.* 1998). Die in der vorliegenden Studie verwendeten kürzeren rekombinanten CB-Konstrukte wurden während transienter Expression in LCLC-103H-Zellen ebenfalls nicht prozessiert (Abb. 4.15, S.96, Abb. 4.32, S.115) – ungeachtet ihrer Größe oder der Art ihrer Markierung. Alle Konstrukte blieben intakt und wurden nicht posttranslational gespalten. Sie entwickelten weder *in vitro* noch *in vivo* CB-spezifische Enzymaktivität (Abb. 4.27, S.109). Allerdings enthielten sie entweder einen kürzeren Teil des Pro-Peptids im Vergleich zu $\Delta^{51}\text{CB}$ oder gar kein Pro-Peptid. Frühere Annahmen eines möglicherweise enzymatisch funktionellen $\Delta^{51}\text{CB}$ (MEHTANI *et al.* 1998) wurden in jüngster Zeit in Frage gestellt (MÜNTENER *et al.* 2004, 2005). Offensichtlich ist das N-terminale Propeptid essentiell für die korrekte *in vivo*-Faltung eines reifen Enzyms mit typischer CB-Aktivität. Kürzlich wurde eine Spleißvariante von Kathepsin L (CL) ohne Signalpeptid beschrieben, welche eine spezifische Spaltungsaktivität im Zellkern entwickelte (GOULET *et al.* 2004). Daher sollte in Erwägung gezogen werden, daß trunkierte CB-Formen modifizierte Spaltungscharakteristiken haben könnten, die bislang nicht in Standardassays in Erscheinung getreten sind. Die vorliegende Studie zeigt, daß weder die Vollständigkeit der Sequenz noch die CB-spezifische Enzymaktivität entscheidend sind für die beobachtete Kernanhäufung und die Induktion von Zelltod.

Kernlokalisierung. Anders als CB(FLM), welches via ER und Golgi in die Lysosomen geleitet und teilweise in das extrazelluläre Medium sezerniert wird, wird das Zytosol-exprimierte Δ^{51} CB hauptsächlich in die Mitochondrien adressiert (MÜNTENER *et al* 2004). Eigene Experimente mit demselben Konstrukt bestätigen diese Ergebnisse. Allerdings wurde hier eine nicht zu vernachlässigende Fraktion des Expressionsprodukts auch im Nukleoplasma gefunden. Genauere Betrachtung der publizierten Daten (MÜNTENER *et al* 2004) widerspricht nicht dieser Beobachtung. Kernfluoreszenz kann nicht aus unspezifischem Abbau oder Spaltprodukten resultieren, da mit zweifach markierten Konstrukten ähnliche Ergebnisse erzielt wurden wie mit dem einfach markierten, was beweist, daß die Proteinchimären intakt blieben. Aus der vorliegenden Studie folgt die Forderung nach einem weiteren Zielsignal neben dem MTS, das CB und dessen Derivate alternativ in den Zellkern befördern könnte. Offensichtlich bestimmt eine Hierarchie unterschiedlicher Signale im CB-Molekül dessen intrazelluläre Verteilungsmuster. Das Signalpeptid und die Glykosylierungsstellen sind entscheidend für die lysosomale Zielsteuerung des Vollängenprodukts. Signalpeptid sowie derjenige Teil vom N-terminalen Propeptid, welches das MTS enthält, werden während des Reifungsprozesses entfernt. Somit könnte ein Kernadressierungssignal/NRS nach der Freigabe des Enzyms aus den Lysosomen in das Zytosol aktiviert werden. Im Falle des trunkierten Δ^{51} CB ist das MTS vorherrschend, dagegen ist für die künstlich trunkierten CB-Formen das Kernadressierungssignal charakteristisch. Zuvor wurde CB bereits in Zellkernen von Tumorzellen und Normalgewebe gefunden (PIETRAS *et al.* 1981, SINHA *et al.* 1989, SPIESS *et al.* 1994), doch bis heute gibt es kaum Hinweise auf mögliche Transportmechanismen oder eine spezifische Funktion. Besonders bei apoptotischen Prozessen wurden CB und andere CB-ähnliche Peptidasen teilweise im Zellkern gefunden (VANCOMPERNOLLE *et al.* 1998, PIZZORNO 2001). Allerdings lassen diese Studien nach wie vor eine gründliche Prüfung der Kernlokalisierung vermissen.

In der vorliegenden Studie wurden künstlich trunkierte CB-FP-Chimären verwendet, von denen Δ^{72} CB der Spleißvariante Δ^{51} CB in Bezug auf Größe am nächsten kam. Allerdings fehlte ihm die funktionelle Sequenz des Δ^{51} CB, die das N-terminale MTS codiert. Nicht nur Δ^{72} CB sondern auch das etwas kürzere CB(SC) sowie weitere beträchtlich kürzere CB-Fragmente (§4.3.5) wurden zunächst wie erwartet im Zytoplasma exprimiert. Darauf folgend wurden sie in Granulen angereichert, welche nicht mit Lysosomen oder Mitochondrien übereinstimmten, wie vielleicht vermutet werden könnte. Ferner wurden die Expressionsprodukte deutlich im Nukleoplasma verschiedener Zelltypen nachgewiesen. In einigen Fällen wurden in den Nukleolen diskrete Teilbereiche markiert, bei denen es sich möglicherweise um die dichte fibrilläre Komponente handelt. Im Gegensatz zum Zellkern, welcher sowohl durch aktiven wie auch passiven Transport erreicht werden kann, werden die Nukleolen ausschließlich durch die Interaktion mit nukleolaren Bausteinen adressiert (CARMO-FONSECA *et al.* 2000). Eine aktive Beteiligung trunkierter CB-Formen in nukleolaren Funktionen mit

einer noch nicht bekannten Spezifität ist nicht abwegig, wie das Beispiel des kürzlich entdeckten trunkierten CL (GOULET *et al.* 2004) zeigt, das als Regulator des Transkriptionsfaktors CDP/Cux wirkt. Basierend auf den neuesten Ergebnissen schlägt CHAPMAN vor, die Funktion von Kathepsinen insbesondere im Zusammenhang mit einer Kernlokalisierung neu zu überdenken (Review: CHAPMAN 2004). Immunocytochemie von myc-Epitop-markiertem CB(SC) bestätigt bis auf eine leicht erhöhte retikuläre Signalverteilung die Ergebnisse der GFP-Markierung. Zudem beweist es, daß das Fluoreszenzprotein trotz seiner relativen Größe die Affinität von CB-Polypeptiden zu den entsprechenden Bindungsstellen nicht beeinflusst.

Mutationsanalyse. Der Literatur und eigenen Computeranalysen zufolge finden sich keine Hinweise auf ein bereits bekanntes NLS (§2.3.2) im CB. Die Lokalisationsergebnisse legen nahe, daß die komplexe differentielle Verteilung des trunkierten CB von verschiedenen Zielsignalen abhängen könnte. Um den für die Kernlokalisierung des CB verantwortlichen Interaktionsbereich mit potentiell linearen oder zusammengesetzten Signal identifizieren zu können, wurde ausgehend von der Einzelkettenform eine Mutationsanalyse durchgeführt (§4.3.5). Die intrazelluläre Expression der mutierten Fluoreszenzprotein-Chimären wurde durch differentielle Lokalisation von Referenzkonstrukten analysiert. Trotz der Eliminierung weiter Sequenzbereiche, die z.T. potentiell stabilisierende Elemente wie Disulfidbrücken enthielten, wie z.B. in CB($[\Delta C^{211}-I^{243}]SC$), blieb die spezifische Lokalisation weitgehend erhalten. Die Ergebnisse der Mutagenese lassen darauf schließen, daß die leichte Kette des CB an der Sortierung nicht beteiligt ist, während die schwere Kette allein über diese Kernlokalisierung bestimmt. Der hierfür hauptsächlich verantwortliche Bereich konnte auf die C-terminale Untereinheit der schweren Kette eingegrenzt werden. Obgleich Konstrukte kleiner als das 92 AS große CB(HC_{C1}) keine eindeutigen Ergebnisse erzeugten, lokalisierte das kleinste von ihnen, das lediglich 52 AS große CB(HC_{C4}), nicht spezifisch. Die Annahme, die Kernaffinität werde beeinflusst von der Funktion der sauren und polaren Oberflächenaminosäure E²⁷³, die innerhalb des relevanten Bereichs gefunden wurde (Abb. 4.40, S.128), ließ sich durch spezifische Mutationen nicht bestätigen. Das E²⁷³ unterscheidet sich von anderen Oberflächenaminosäuren durch seine exponierte und sterisch flexible Positionierung. Das Ausschneiden des differentiellen Bereichs von CB(HC_{C3}) und CB(HC_{C4}) hatte keine Auswirkungen auf die Lokalisation. Die Deletion schloß einige benachbarte Seitenreste von CB(HC_{C4}) um die aktive Stelle H²⁷⁸ nicht mit ein, die ebenfalls eine Rolle spielen könnten. Die Ergebnisse unterstützen somit nicht das Vorhandensein einer linearen Signalsequenz. Deshalb muß ein zusammengesetztes Signal angenommen werden, welches sich aus der räumlichen Konformation des Polypeptids ergibt (§2.3). Das setzt aber auch voraus, daß sich alle Fragmente und die entsprechenden trunkierten Formen gleichartig falten. Im Gegensatz zu linearen Signalen, sind solche Signalflecken schwierig exakt zu identifizieren.

Auffällig ist das Auftauchen von CB(SC) und anderer trunkierter Konstrukte in der Midbody-Matrix. Bereits 1982 wurde die Midbody-Zusammensetzung mittels SDS-PAGE analysiert und α - sowie β -Tubulin als Hauptkomponenten (~30 % des Gesamtproteins) identifiziert (MULLINS & MCINTOSH 1982). Nach Studien von SELLITTO & KURIYAMA (1988) scheint das Midbody entweder gemeinsame molekulare Komponenten oder ein ähnliches Epitop mit Interphasenzentrosomen und Zellkernen zu teilen. Neueren Studien zufolge (SKOP *et al.* 2004) sind bis zu 417 unterschiedliche Proteine mit dieser Struktur assoziiert; 160 von ihnen kommen als Kandidaten für echte Midbody-Proteine in Betracht. Obwohl darin nur einige wenige Peptidasen und überhaupt keine Cysteinpeptidasen gefunden wurden, spricht die Assoziation von CB-Konstrukten mit dem Midbody für dessen nukleäres Vorkommen.

Das granulär-vesikuläre Vorkommen künstlich trunkierter CB-Formen konnte nicht ausreichend geklärt werden. Eine Agglomeratbildung dieses Ausmaßes auf den extrinsischen Charakter des Fluoreszenzproteins zurückzuführen, erscheint trotz einer leichten Tendenz zur Dimerisierung als unwahrscheinlich. Eine Polymerisierung von CB ist bislang unbekannt. Vorstellbar ist dagegen eine Verklumpung retikulärer oder vesikulärer Komponenten, die durch eine CB-Assoziation auf der zytosolischen Seite intrazellulärer Membranen (MEHTANI *et al.* 1998) bedingt sein könnte.

Transportmechanismen und Wechselwirkung mit der Kernmatrix. Auf welche Weise gelangt das trunkierte CB in den Zellkern? Die Ausschlußgrenze für freie Diffusion durch die Kernporen liegt bei ~60 kDa (S.32). Ein passiver Transport über den NPC wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit durch Konstrukte mit einer Molekülmasse von ~84 kDa ausgeschlossen. Eine Aufspaltung in frei diffundierende Fragmente trat nicht ein, wie immunozytochemische Untersuchungen und FRET-Analysen belegen (§4.3.6). In Zeitkinetik-Experimenten wurde ein gerichteter Transport von Granulen vom Ende der Pseudopodien in Richtung des Golgi und in den Zellkern beobachtet. Sie überquerten die Kernmembran ohne eine meßbare Verzögerung. Diese Beobachtungen lassen die Möglichkeit eines spezifischen Transportsystems (*carrier*) zu, an welches das Expressionsprodukt gekoppelt sein könnte.

Wird trunkiertes CB möglicherweise aufgrund einer spezifischen Affinität zu bestimmten Kernkomponenten (NRS) im Zellkern zurückgehalten? Ein qualitativer TPM-Photobleichansatz wurde gewählt, um die Mobilität von CB(SC)-EGFP und ECFP-CB(SC)-EYFP zu untersuchen. In diesem Zusammenhang wurde erstmalig die Eignung von TPE anstelle von OPE in solchen Bindungsstudien (S.69; Anhang, S.166) demonstriert. In der Praxis bedingen eine Anzahl von Faktoren das Photobleichen oder die Regenerierung von diffundierenden Fluorochromen: (i) die begrenzte Gesamtmenge an Fluorochrom, (ii) individuelle Photobleichcharakteristiken verschiedener Fluoreszenzproteine, (iii) strukturelle Barrieren und (unspezifische) Bindungsereignisse. Das hochmobile und frei diffundierbare EGFP (VON ARNIM *et al.* 1998) und das stark Chromatin-gebundene H2A-EGFP (MOSAMMAPARAST

et al. 2002) wurden als Grenzwertkontrollen gewählt und TIF1A–EGFP als weitere Kontrolle mit partiell mobilen sowie immobilen Fraktionen. Die Meßdaten des „kontinuierlichen Photobleichexperiments“ spiegeln überlagerte Effekte wider: (i) der steile exponentielle Intensitätsverlust innerhalb der ersten ~ 10 s beschreibt in erster Näherung das Photobleichen der immobilen Fluorochromfraktion, (ii) die darauffolgende flache Fluoreszenzabnahme läßt sich als Photobleichen des rückdiffundierenden Fluorochromanteils interpretieren. Die FRAP-Analyse ermöglicht auch Aussagen über die relative Mobilität des Fluorochroms, d.h. den effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} und die mobile Fluorochromfraktion R_m (AXELROD *et al.* 1976, Review: WHITE & STELZER 1999).

In beiden technischen Varianten des Photobleichansatzes verhielten sich die EGFP-Messungen charakteristisch für freie Diffusion (fast ausschließlich mobile Fraktion). Dagegen waren die Kurvenverläufe von H2A–EGFP typisch für überwiegend immobil vorliegende Moleküle. Somit verhielten sich beide Kontrollen wie erwartet und in Analogie zu früheren Arbeiten (PHAIR & MISTELI 2000, WACHSMUTH *et al.* 2003). Die Verläufe der CB(SC)-Graphen spiegeln einen intermediären Zustand wider und deuten auf niedrige immobile und hohe mobile Fraktionen hin, die von limitierter Diffusion im Zellkern herrühren. Daher ist anzunehmen, daß künstlich trunkiertes CB in der Lage ist, mit Komponenten der Kernmatrix zu assoziieren. Diese Kernaffinität könnte auf das natürlich vorkommende Δ^{51} CB oder auf das reife, aus beschädigten Lysosomen freigesetzte CB übertragbar sein. Chromatin als möglicher Interaktionspartner wurde nach Koexpression von CB(SC)–FP mit dem Histon-Konstrukt H2A–FP wegen fehlender Kolo-kalisation ausgeschlossen. Die relativ große mobile CB(SC)-Fraktion könnte von der Knappheit an möglichen Bindungspartnern herrühren, die im Gegensatz zum rekombinanten CB nicht überexprimiert wurden.

Zelltod. Unversehrtes Δ^{51} CB–FP wird mittels MTS in die Mitochondrien geleitet und die Zellen sterben nach beobachteter Kernfragmentierung (MÜNTENER *et al.* 2004). Beide Phänomene wurden durch eigene Studien mit demselben Konstrukt bestätigt. Mitochondriale Assoziation von CB wurde bereits früher im Zusammenhang mit dessen lysosomaler Freisetzung oder apoptotischen Prozessen registriert (VANCOMPERNOLLE *et al.* 1998, MEHTANI *et al.* 1998, GUICCIARDI *et al.* 2000, PATTERSON *et al.* 2000). CB wurde im Überstand von Atractylosid*-behandelten Mitochondrien gefunden (VANCOMPERNOLLE *et al.* 1998). Dies könnte bedeuten, daß ein Teil von CB in die Mitochondrien importiert wird oder mit den Mitochondrien assoziiert ist (PATTERSON *et al.* 2000). In zellfreien Systemen konnte gezeigt werden, daß Caspase-8 aktives CB aus gereinigten Lysosomen freisetzen kann und dieses wiederum die Zytosol-induzierte Freisetzung von Zytochrom C (mit anschließender Caspase-Aktivierung) aus den Mitochondrien erhöht (GUICCIARDI *et al.* 2000). STOCKA *et al.* (2001)

* Distel-Alkaloid, das die ATP/ADP-Translokase hemmt und so zu einem Verlust des Membranpotentials führt

postulierten, daß die Spaltung von Bid, einem Mitglied der Bcl-2-Familie, durch freigesetzte lysosomale Peptidasen (verursacht durch Leckage oder Photoschaden bei Lysosomen) die Zytochrom C-Freisetzung herbeiführt.

Entfernen des MTS wie im Falle des künstlich trunkierten Δ^{72} CB und kürzerer CB-Konstrukte resultiert in nukleärer Adressierung und Anhäufung. Es ist anzunehmen, daß die Kernadressierung bei Δ^{51} CB durch das stärkere MTS unterdrückt wird. Sowohl das über-exprimierte „natürliche“ als auch die künstlichen Konstrukte führen zur selben Konsequenz, nämlich Kernfragmentierung und Zelltod. Der Zelltod verlief nach einem strengen Schema: (i) Kernakkumulation der Fluoreszenz bei zunehmendem Expressionsniveau, (ii) Bildung zytoplasmatischer und nukleärer Agglomerationen (meist um den Golgi herum und innerhalb des Zellkerns), (iii) direkter Transport von Vesikeln in den Zellkern, (iv) Auflösung von Golgi und Zellkern gefolgt von (v) stationärer Motilität der Zelle und (vi) zellulärem Kollaps. Die möglichen Interaktionspartner der Peptidase im Zellkern konnten nicht ermittelt werden. Neben der angenommenen enzymatischen Aktivierung apoptotischer Mediatoren sind andere Mechanismen denkbar, die nicht CB-spezifische Enzymaktivität einbeziehen. Obwohl die morphologischen Aspekte sehr denen einer klassischen Apoptose gleichen, konnten weder eigene Studien (DNA-Leiter, Annexin V-Nachweis) noch die von MÜNTENER *et al.* (2004) einen Nachweis dafür erbringen, daß der induzierte Zelltod von Apoptose herrührt.

Es wurde beschrieben, daß Freigabe von reifem und aktivem CB aus den Lysosomen und Auftauchen von CB im Zellkern dem Zelltod vorausgehen können (ROBERTS *et al.* 1997). Eigene Studien an künstlich trunkierten CB-Konstrukten unterstützen diese Beobachtungen. Alle trunkierten Formen besaßen keine reguläre CB-Enzymaktivität. Eine korrekte Rückfaltung von Δ^{51} CB zu einer enzymatisch aktiven Form wurde unter *in vitro*-Bedingungen nachgewiesen (MEHTANI *et al.* 1998). Allerdings sollte auch eine alternative Spaltungsaktivität oder Funktionalität für trunkierte CB-Formen in Erwägung gezogen werden. Solche wurde kürzlich im Falle des trunkierten CL (GOULET *et al.* 2004) und möglicherweise auch CH (WAGHRAY *et al.* 2002) gefunden. Daraus ergibt sich die Frage, ob das traditionelle Verständnis bestimmter CB-Populationen in den Begriffen „normal“ und „aberrant“ nicht irreführend sei und daher überdacht werden sollte.

Überexpression. Die Bedeutung von Ergebnissen, denen Überexpression zugrunde liegt, wird häufig kontrovers diskutiert. Zwei Argumente unterstützen die Gültigkeit der erzielten Ergebnisse: (i) Im Allgemeinen schwanken die Expressionsniveaus transfizierter Zellpopulationen stark zwischen individuellen Zellen. Im Falle von CB(SC) ist die Antwort auf die Expression sehr schwerwiegend und betrifft ebenso Zellen mit offensichtlich geringfügigem Expressionsniveau. (ii) Zeitrafferaufnahmen zeigen eine Granulierung und einen gerichteten Transport von CB(SC) in die Kernregion gefolgt von einer Verschmelzung mit dem Zellkern.

ANHANG

A: Das Grünfluoreszierende Protein

wtGFP. Das bereits 1971 (MORIN & HASTINGS 1971) aus der pazifischen Qualle *Aequorea spec.* isolierte „Grünfluoreszierende Protein“ (*green fluorescent protein*, GFP) hat sich in den vergangenen Jahren zu einem der bedeutendsten Werkzeuge in der Molekular-, Entwicklungs- und Zellbiologie entwickelt. Seine Anwendung reicht vom Zelllinien-Marker und Reporter für Genexpression über Promotorstudien bis hin zur Messung biochemischer Vorgänge (z.B. Phosphorylierung), physiologischer Zustände (pH, Ca²⁺) und Protein-Protein-Interaktionen (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, FRET; S.166). Wird GFP mit kurzwelligem Licht angeregt, so strahlt es grünes Licht aus, wobei im Gegensatz zu Biolumineszenzmarkern wie der Luziferase (LORENZ *et al.* 1991) die Emission keine zusätzlichen Substrate, Kofaktoren oder ATP benötigt. In seiner natürlichen Umgebung überführt GFP durch Energietransfer* die blaue Chemilumineszenz des Ca²⁺-aktivierten Photoproteins Aequorin (SHIMOMURA *et al.* 1962) in grünes Fluoreszenzlicht (WARD *et al.* 1980).

Die molekulare Klonierung der *wtGFP*-cDNA (PRASHER *et al.* 1992) und die bakterielle Expression als funktionelles Reporter-molekül (CHALFIE *et al.* 1994) haben zu weiteren Expressionsversuchen in den verschiedensten Organismen geführt wie Hefen (KAHANA *et al.* 1995), Schleimpilzen (MOORES *et al.* 1996), Pflanzen (CASPER & HOLT 1996, EPEL *et al.* 1996), Fruchtfliege (WANG & HAZELRIGG 1994), Zebrafisch (AMSTERDAM *et al.* 1996) und Säugerzellen (LUDIN *et al.* 1996, DEGIORGI *et al.* 1996). GFP beeinträchtigt trotz seiner Molekülmasse von 27 kDa die native Funktion des Zielproteins nicht wesentlich (CUBITT *et al.* 1995, OLSON *et al.* 1995, MOORES *et al.* 1996) und eignet sich daher nahezu ideal als nicht-invasiver Proteinmarker *in vivo*, *in situ* und in Echtzeit (PRASHER *et al.* 1992, CHALFIE *et al.* 1994, INOUE & TSUJI 1994a, WANG & HAZELRIGG 1994). In der Zelle ist GFP typischerweise diffus in Zytoplasma und Zellkern lokalisiert, wobei Nukleolen und vesikuläre Organellen ausgeschlossen bleiben (Review: CUBITT *et al.* 1995).

GFP ist ein Monomer aus 238 AS (PRASHER *et al.* 1992). Die Kristallstruktur von rekombinantem *wtGFP* (ORMÖ *et al.* 1996, YANG *et al.* 1996) zeigt einen zylinderförmigen Aufbau (Abb. I(a), unten). Der aktive Fluorophor ist ein zyklisches Tripeptid (CODY *et al.* 1993), das auf einer zentralen α -Helix innerhalb der β -Kanne geschützt vorliegt. Die Bildung des Fluorophors ist sauerstoffabhängig (HEIM *et al.* 1994, DAVIS *et al.* 1995) und tritt stufenweise nach der Translation auf (INOUE & TSUJI 1994b).

* in Analogie zu FRET als Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer, BRET, bezeichnet

Schwache Fluoreszenzeigenschaften, proteolytische und photochemische Instabilität sowie extensive posttranslationale Faltungszeiten von *wtGFP* haben zu seiner systematischen Weiterentwicklung geführt, deren Resultat eine Reihe von Fluoreszenzproteinen mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften sind, die sich auch für Simultanmarkierungen eignen (HEIM *et al.* 1995, CUBITT *et al.* 1995, CORMACK *et al.* 1996). In dieser Arbeit fanden hauptsächlich von der Firma Clontech weiterentwickelte Fluoreszenzproteine Anwendung (Abb. I(b)); die wichtigsten spektralen Eigenschaften sind in Tab. I (unten) zusammengefasst.

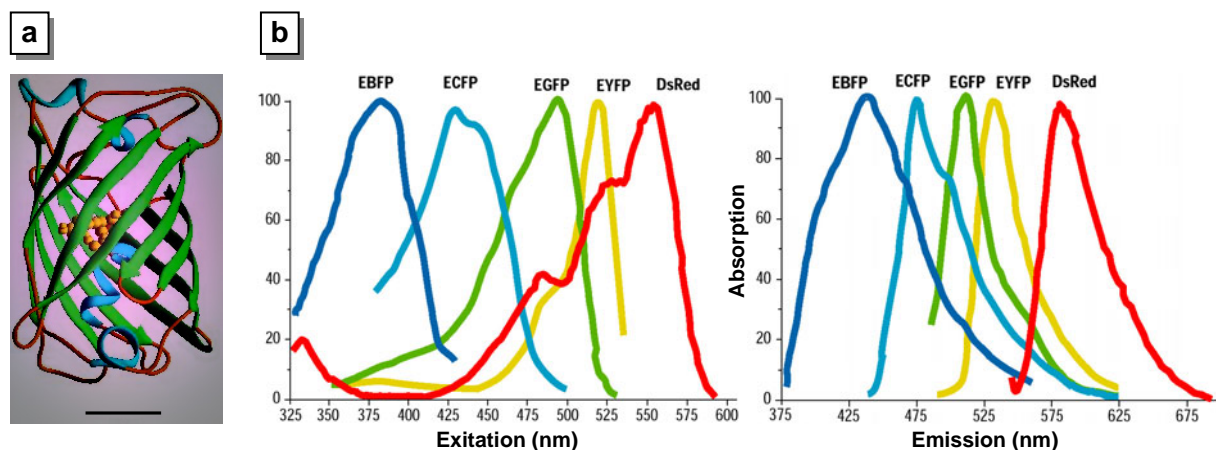


Abb. I Das Grünfluoreszierende Protein. (a) Raumstruktur von *wtGFP*. Wichtigste Merkmale sind die 11-strängige β -Kannenstruktur mit der chromophortragenden zentralen α -Helix. Balken 1 nm. Abbildung abgewandelt nach YANG *et al.* (<http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html>) (b) Normierte Fluoreszenzspektren häufig verwendeter Fluoreszenzproteine (Quelle: Clontech).

EBFP (*enhanced blue fluorescent protein*). EBFP besitzt 4 Aminosäuren-Substitutionen ($P^{64}L$, $S^{65}T$, $Y^{66}H$, $Y^{145}F$), welche die Emission von grün nach blau verschieben und die Löslichkeit des Proteins verbessern (HEIM & TSIEN 1996, CORMACK *et al.* 1996). Obgleich eine Simultandetektion von EBFP mit EGFP (unten; YANG *et al.* 1998) prinzipiell möglich ist, sprechen die geringe Quantenausbeute und schnelle Photobleichzeiten gegen den Gebrauch von EBFP.

sgBFP (*SuperGlo™ blue fluorescent protein*). Das „Autofluoreszenzprotein“^{*} sgBFP von Quantum Biotechnologies besitzt sehr ähnliche spektrale Eigenschaften wie das EBFP. Die Mutationen bewirken eine erhöhte Löslichkeit, eine effizientere Chromophorenbildung und Proteinfaltung bei +37 °C ($F^{64}L$, $V^{163}A$) sowie engere Excitations- und Emissionsmaxima ($Y^{66}H$). Grundsätzlich unterliegt sgBFP aber denselben Limitationen wie das EBFP.

* allgemeine Bezeichnung für Fluoreszenzproteine nach der Nomenklatur von Quantum Biotechnologies

ECFP (enhanced cyan fluorescent protein). Eine von 6 Aminosäuren-Substitutionen von ECFP (Y⁶⁶W) ist für die Emissionsverschiebung von grün nach zyanblau verantwortlich (HEIM & TSIEN 1996, MIYAWAKI *et al.* 1997), die restlichen 5 (P⁶⁴L, S⁶⁵T, N¹⁴⁶I, M¹⁵³T, V¹⁶³A) erhöhen Intensität und Löslichkeit. Geringeres Photobleichen und höhere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu EBFP machen ECFP zu einem geeigneten Donor in FRET-Anwendungen und ermöglichen eine Zweifachmarkierung in Verbindung mit EYFP (unten).

EGFP (enhanced green fluorescent protein). Das weithin gebräuchliche EGFP (abgeleitet von GFPmut1; CORMACK *et al.* 1996) enthält die Aminosäuren-Substitutionen P⁶⁴L und S⁶⁵T, die zu einem rotverschobenen Exitationsspektrum und zu einer 35-fach erhöhten Fluoreszenz gegenüber *wt*GFP führen.

EYFP (enhanced yellow fluorescent protein). Bei EYFP bewirken weitere Aminosäuren-Modifikationen (P⁶⁴L, S⁶⁵G, V⁶⁸L, S⁷²A, T²⁰³Y; ORMÖ *et al.* 1996) eine Verschiebung der Emission von grün nach grün-gelb. EYFP besitzt im Vergleich zu den anderen *enhanced*-Varianten die höchste Quanteneffizienz und den höchsten Extinktionskoeffizienten (Tab. I).

DsRed. Das aus der indopazifischen Seeanemone *Discosoma spec.* isolierte und kommerziell unter der Bezeichnung DsRed (Clontech) erhältliche „Rotfluoreszierende Protein“ (drFP583; MATZ *et al.* 1999, FRADKOV *et al.* 2000) ist ein strukturverwandtes Homologon zu GFP (WALL *et al.* 2000) mit 22 % Sequenzidentität. DsRed besitzt ebenso eine 11-strängige β -Kannenstruktur sowie ein ähnliches Chromophor, das durch Oxidation ein erweitertes konjugiertes π -Resonanzsystem ausbildet (WALL *et al.* 2000). Während GFP geringfügig dimerisiert, bildet DsRed stabile Tetramere (BAIRD *et al.* 2000) mit möglichem FRET-Effekt.

Alternative Fluoreszenzproteine. Die systematische Suche nach Fluoreszenzproteinen mit neuartigen spektralen Charakteristiken und ihre genetische Modifikation haben zu einer Vielzahl unterschiedlicher Fluoreszenzproteine geführt. Diese hat die Einführung einer spezifischen Nomenklatur erforderlich gemacht (LABAS *et al.* 2002), welche die historischen Bezeichnungen durch eine systematische Namensgebung ersetzt. Eine Beschreibung weiterer Anthozoen-Fluoreszenzproteine findet sich u.a. bei MIYAWAKI (2002), BOURETT *et al.* (2002) sowie ANDO *et al.* (2002).

Tab. I Spektraleigenschaften verwendeter Living Colors[®] Fluoreszenzproteine (www.clontech.com).

FP	Exitationsmax. (nm)	Emissionsmax. (nm)	Extinktionskoeff. (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Quantenausbeute (%)	Photobleichzeit (relativ)
DsRed	558	583	22.500 / 72.500 [‡]	29* / 68 [‡]	145 [‡]
EYFP	514	527	84.000	61 / 61 [‡]	35 [‡]
EGFP	489	508	55.000	60 / 60 [‡]	100 [‡]
ECFP	434	477	26.000	40 / 40 [‡]	85 [‡]
EBFP	380 / 383 [‡]	440 / 445 [‡]	31.000	18 / 25 [‡]	3 [‡]
sgBFP [‡]	387	450	—	—	—

* relativ zum EGFP; † SuperGlo[™] BFP von Quantum Biotechnologies; ‡ nach PATTERSON *et al.* 2001

B: Klassifizierung der Fluoreszenzmikroskopie

Digitale Weitfeld-Fluoreszenz-Mikroskopie. Das Prinzip der WFM wird in Abb. II(a) erläutert. Entscheidend ist hier die Art der Lichtquelle; meist handelt es sich dabei um Quecksilber-Höchstdrucklampen, welche ein Anregungsspektrum im Bereich 360–700 nm liefern. Aus diesem wird die benötigte Excitationswellenlänge über entsprechende Filterkombinationen extrahiert.

Klassische Laser-Raster-Mikroskopie. Die auch als konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM^{*}; Abb. II(b)) bezeichnete Methode beruht wie die WFM auf dem Prinzip der Ein-Photonen-Anregung (*one-photon excitation*, OPE).

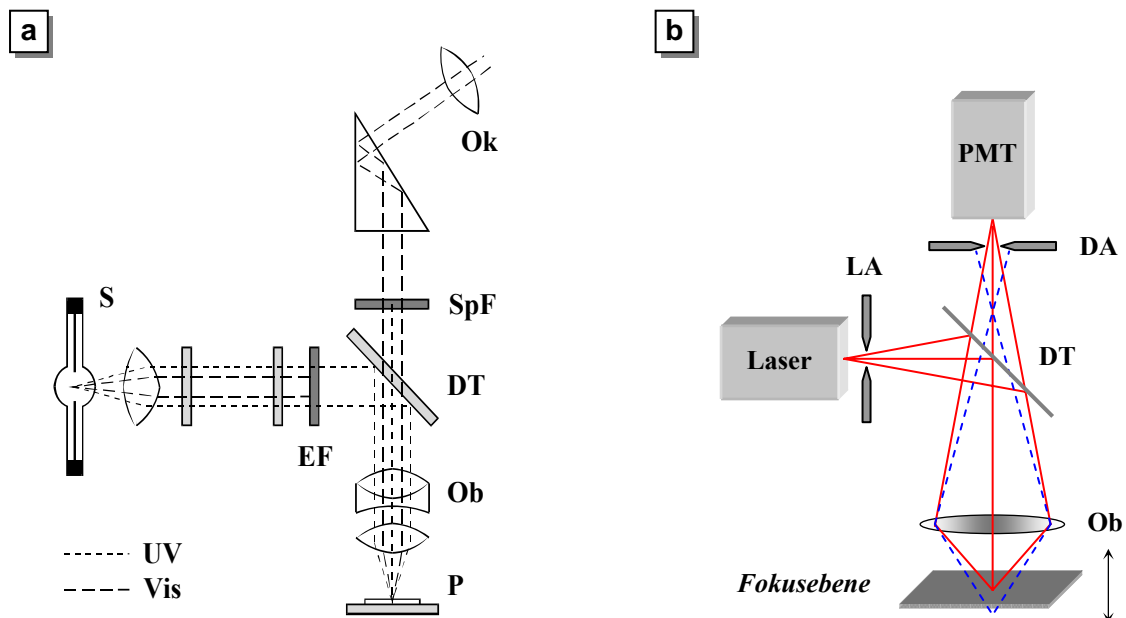


Abb. II Klassische Ein-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie. (a) WFM (Epifluoreszenzanregung). Der Brenner (S) produziert energiereiche Strahlung (UV), die über die dichroitische Teilerplatte (DT) durch das Objektiv (Ob) zum Präparat (P) geleitet wird. Der Erregerfilter (EF) läßt lediglich Licht im Absorptionsmaximum des Fluorochroms durch. Somit erfährt das Objekt eine spezifische Anregung und emittiert seinerseits längerwelliges Licht (STOKES'scher Shift). Überschüssiges Erregerlicht wird an der Teilerplatte reflektiert oder vom Sperrfilter (SpF) absorbiert und damit aus dem Strahlengang entfernt. So kann nur das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht (Vis) über das Okular (Ok) zum Auge des Beobachters gelangen. Abgeändert nach GÖKE (1988). In: *Moderne Methoden der Lichtmikroskopie*. kosmos Wissenschaft: 210–215. (b) Konfokale LSM. Ein Laserstrahl wird über die Apertur (LA), den dichroitischen Teilerspiegel (DT) und die Objektivlinse (Ob) auf das Präparat fokussiert. Das Fluoreszenzlicht gelangt über dieselbe optische Anordnung über die Detektorapertur (DA) zum Photodetektor (*photomultiplier*, PMT). Lediglich die Information aus der Fokusebene (durchgezogene Linien) wird auf dem PMT abgebildet, außerhalb der Fokusebene verlaufende Lichtstrahlen (gestrichelte Linien) werden von der konfokalen Blende geblockt. Abbildung abgewandelt nach LADIC, "Simplified optics of a LSCM" (<http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/images/optics.gif>).

* auch LSCM, CLSM; hier ist damit lediglich die auf Ein-Photonen-Anregung zurückgehende Lasermikroskopie, also OPE-LSM, gemeint – ganz im Unterschied zur Zwei-Photonen-Mikroskopie (TPM)

Anders als bei der Weitfeldanregung wird statt eines kontinuierlichen Anregungsspektrums spektral eng begrenztes Laserlicht (i.A. Argon- oder Krypton-Ionenlaser) verwendet. Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß nicht der gesamte Probenbereich simultan beleuchtet und optisch abgebildet wird. Stattdessen wird das Objekt zeilenweise abgetastet (*scanning*) und das gerasterte Bild digital wiedergegeben. Aperturblenden (*pinholes*) sorgen dafür, daß lediglich ein bestimmter Bereich im Fokus der Probe (d.h. „konfokal“) angeregt bzw. detektiert wird und nicht ein ganzer Doppelkonusbereich entlang der optischen Achse wie in der WFM. Dies hat eine höhere axiale Auflösung zur Folge und eignet sich daher gut für die 3D-Bildrekonstruktion.

Zwei-Photonen-Mikroskopie. Bereits 1931 hat MARIA GÖPPERT-MAYER vorhergesagt, daß ein Molekül mit 2 Photonen simultan interagieren könne, indem es diese im selben Quantenereignis absorbiere. Dieser als Zwei-Photonen-Anregung (*two-photon excitation*, TPE) bezeichnete Prozeß wird in Abb. III näher erläutert.

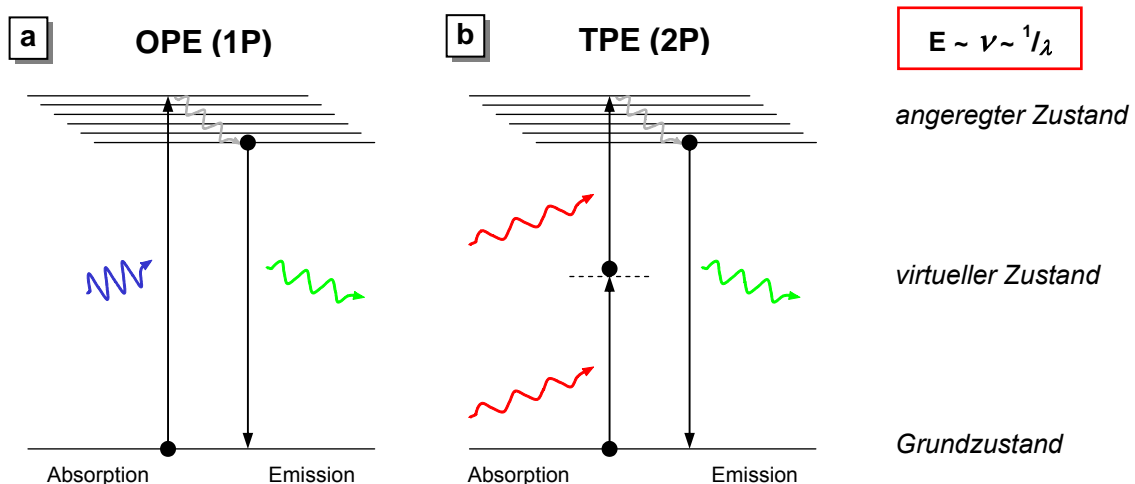


Abb. III Der Zwei-Photonen-Effekt. Der Unterschied im Anregungsprozeß zwischen OPE und TPE wird in Anlehnung an ein JABLONSKI-Diagramm erläutert. (a) In der OPE absorbiert ein Molekül (Fluorophor) ein Photon (1P) einer bestimmten Wellenlänge ($\sim 350\text{--}700\text{ nm}$) und wird dadurch vom Grundzustand auf ein energiereicheres Niveau gehoben. Ein Teil der aufgenommenen Energie geht durch strahlungslose Relaxation des Elektrons in Wärme über. Der restliche Energiebetrag wird in ein energieärmeres Photon einer längeren Wellenlänge umgesetzt (dabei gilt: $E \sim \nu \sim 1/\lambda$) und in Form von Fluoreszenzstrahlung emittiert. (b) Bei der TPE kann dieser Fluorophor durch die nah-simultane Absorption zweier Photonen (2P) von jeweils etwa dem halben Energiebetrag (und damit der doppelten Wellenlänge) über einen virtuellen Zwischenzustand in den angeregten Zustand versetzt werden. Die Emission verläuft dagegen analog zum OPE-Vorgang.

Im Gegensatz zu Weitfeldanregung und „konfokaler“ LSM, die beide auf der OPE basieren, bietet die nicht-lineare Zwei-Photonen-Mikroskopie (*two-photon microscopy*, TPM; Reviews: DENK *et al.* 1990, PISTON 1999) eine echte inhärente Konfokalität, weil die Fluoreszenzanregung auf ein sehr kleines Volumen beschränkt bleibt und außerhalb der Fokusebene befindliche Hintergrundsignale von der Betrachtung ausgeschlossen werden

(Abb. IV(a)). Die äußerst geringe Wahrscheinlichkeit für TPE setzt eine hohe Photonendichte voraus. Diese wird mit Hilfe eines hochgepulsten, modengekoppelten (*modelocked*) Ti:Saphir-Lasers mit (nah-)infrarotem Anregungsbereich erreicht. Die örtliche axiale TPE-Auflösung ist etwa um den Faktor 4 geringer als die laterale und lässt sich mit Hilfe einer als punktförmig angenommenen Fluoreszenzquelle ermitteln. Das Emissionsfeld dieser sog. Punkteantwort (*point spread function, PSF*) kann theoretisch errechnet oder mit Hilfe von Fluoreszenzperlen physikalisch gemessen werden (Abb. IV(b)). Neben der verbesserten axialen Auflösung bietet die TPE weitere Vorteile wie z.B. eine tiefere Durchdringung der Probe wegen Verwendung längerer Anregungswellenlängen, geringere Strahlenschäden sowohl bei der Probe als auch beim Fluorophor im Hinblick auf Photobleichen usw.

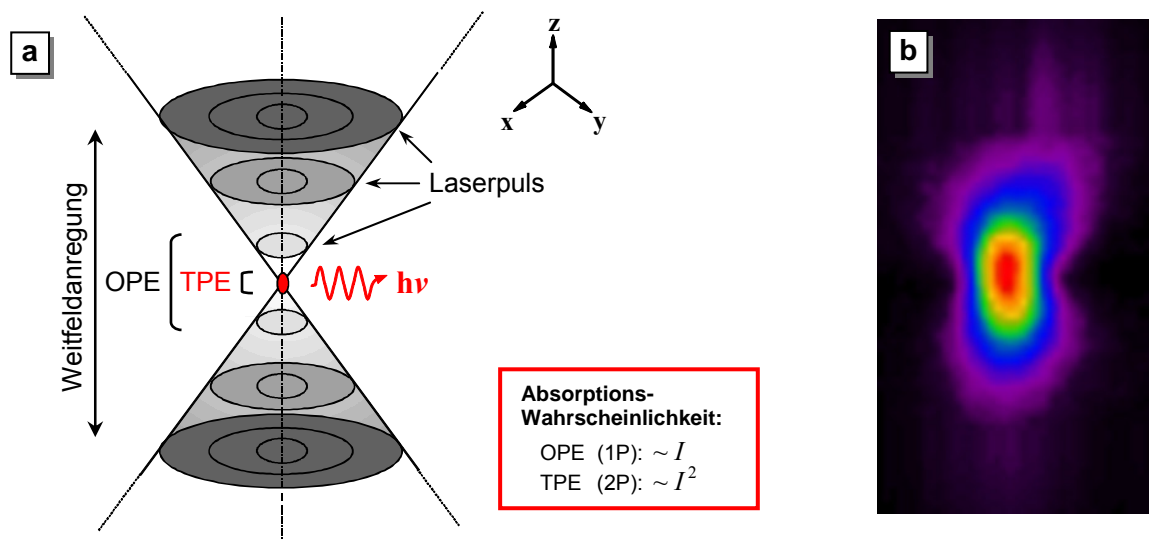


Abb. IV Zwei-Photonen-Anregung. (a) Methoden der Fluoreszenzanregung. Während der Fluorophor bei der Weitefeldanregung über den gesamten Bereich entlang der optischen Achse und bei der klassischen konfokalen Beleuchtung (OPE) innerhalb eines von der Aperturblende des LSM bestimmten Bereichs angeregt wird, ist bei der TPE die Anregung auf ein sehr kleines Volumen in der Fokusebene beschränkt. Dieser Effekt ist auf unterschiedliche Wahrscheinlichkeit für Absorption zurückzuführen, welche bei OPE proportional zu der Beleuchtungsintensität und bei TPE quadratisch dazu steigt (siehe Kasten). Die Beleuchtungsintensität nimmt dagegen mit zunehmendem Abstand vom Fokus im Quadrat ab. Da für TPE eine sehr hohe Photonendichte benötigt wird, findet der Effekt nur dort statt, wo die Absorptionswahrscheinlichkeit am höchsten ist. (b) Seitenansicht einer gemessenen PSF eines Mikrosphäroids (\varnothing 170 nm) im TPE-Modus (mit freundlicher Genehmigung von Verena Brand und Torsten Porwoll, MPI für molekulare Physiologie, Dortmund). Die Form der PSF wird durch die Optik des jeweiligen Systems bestimmt. Die Schnittebene macht den Unterschied zwischen lateraler und vertikaler Auflösung deutlich. Die physikalische Auflösung kann mit Hilfe einer rechnerischen Dekonvolution (Rückfaltung) der Objektkoordinaten verbessert werden.

C: Fluoreszenzmikroskopische Techniken

Neben optomechanischen Entwicklungen in der Fluoreszenzmikroskopie gibt es eine Reihe methodischer Ansätze, die aufgrund der rasanten Entwicklung in der Digitaltechnik mittlerweile realisierbar geworden sind.

Dekonvolution. Eine punktförmige Lichtquelle erscheint im Mikroskop nur in der Fokusebene annähernd punktuell, außerhalb des Fokus wird sie als kreisförmige Scheibe wahrgenommen. Dieser Effekt läßt sich auf die PSF zurückführen, die jedem optischen System innewohnt und die optische Abbildung eines physikalischen Objekts bedingt (Abb. IV(b), oben). Ein Fluoreszenzobjekt kann als Ansammlung vieler punktförmiger Lichtquellen betrachtet werden und damit als eine räumliche Überlagerung (Superposition) vieler PSF (Abb. V(b)). Die optische Abbildung eines realen Objektes ist mathematisch betrachtet ein Faltungsprozeß (Konvolution). Für den Umkehrvorgang, die *Dekonvolution* (Abb. V(a); Review: BOCCACCI & BERTERO 2002) werden Rechenmodelle herangezogen, die eine Rückprojektion der Intensitätsverteilungen auf ihre Ursprungsquellen bewirken und in der digitalen Bildverarbeitung der Verbesserung der Auflösung und des Kontrastes dienen.

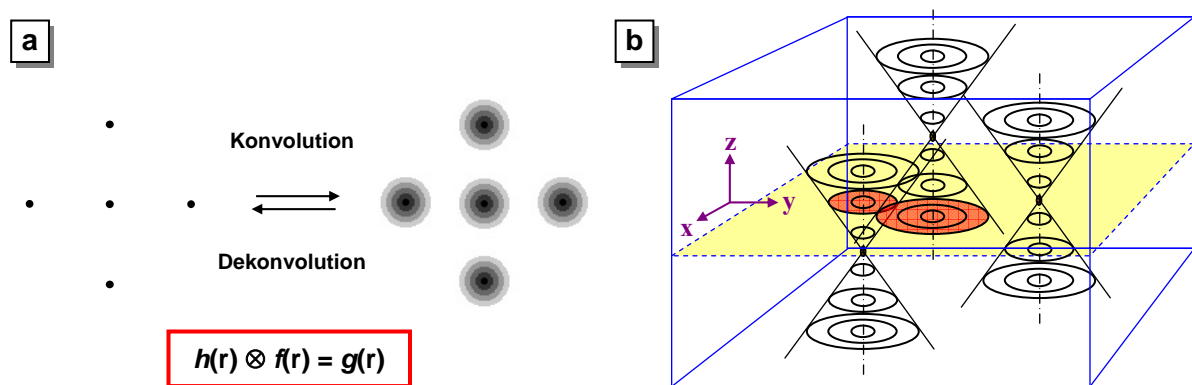


Abb. V Dekonvolution. Zweidimensionale (a) und räumliche (b) Darstellung von Punkteantworten (PSF). (a) Der mathematische Ausdruck für die Abbildung eines Ursprungspunktes auf eine zugehörige Punkteanordnung heißt Faltung (Konvolution), der umgekehrte Vorgang wird entsprechend als Rückfaltung (Dekonvolution) bezeichnet. Der mathematische Zusammenhang ist in dem Schaukasten darunter dargestellt: Die Bildfunktion $g(r)$ ist das Resultat der Konvolution (\otimes) der PSF $h(r)$ und der Objektfunktion $f(r)$. Das als optische Transferfunktion bezeichnete Originalbild erhält man durch eine FOURIER-Transformation des Konvolutionstermes in einen Multiplikationsterm. Die Objektfunktion resultiert schließlich aus der inversen FOURIER-Transformation der optischen Transferfunktion. Ein wesentliches Problem stellt dabei das signalabhängige (POISSON-Verteilung des Lichts) sowie das signalunabhängige (Optik) Rauschen dar, welches die Berechnung erschwert. (b) Eine komplexe fluoreszierende Probe ist aus vielen einzelnen punktförmigen Lichtquellen unterschiedlicher Intensität zusammengesetzt. Dies entspricht einer räumlichen Superposition mehrerer PSF. Eine Weitfeld-PSF besitzt eine Doppelkonusform mit einer zentralen punktförmigen Lichtquelle und konzentrischen Defraktionsringen. Die als Schnittfläche dargestellte Fokusebene enthält die Information aller darüber- sowie darunterliegenden Lichtquellen als Superposition von Kreisflächen, lediglich Lichtquellen in der Fokusebene erscheinen annähernd punktförmig.

Wird mit einem linearen optischen System ein Bilderstapel (*image stack*) bestehend aus optischen Schnitten (*optical sections*) in definiertem Abstand voneinander aufgenommen, so läßt sich daraus ein Schnittebenenbild generieren, dessen Bildinformation auf die konfokal liegenden Lichtquellen reduziert ist und welches nahezu keine *out-of-focus*-Information (*haze*, *blurr*) mehr enthält. Einfache Dekonvolutionsalgorithmen gehen von einem Einzelbild oder von der Methode des nächsten Nachbarn (*nearest neighbour*) aus, darüber hinaus gibt es komplexere Ansätze wie z.B. die *constrained iterative*-Methode, die eine höhere Anzahl von Nachbarschnitten in die Berechnungen einbezieht und folgende Schritte beinhaltet:

1. An einem fokussierten Volumenobjekt wird eine Konvolution mit der PSF durchgeführt, um das ursprünglich erhaltene Volumenobjekt zu erzeugen.
2. Das ursprüngliche und das berechnete Volumenobjekt werden miteinander verglichen.
3. Das berechnete Volumenobjekt wird entsprechend der Fehlerdifferenz korrigiert.
4. Die Prozedur wird wiederholt bis die Differenz zwischen den beiden Objekten minimal ist.

3D–Bildrekonstruktion. Die lichtmikroskopische Abbildung stellt eine zweidimensionale Projektion eines Präparatausschnittes dar mit einer charakteristischen, von dem verwendeten System abhängigen Schichtdicke. Räumliche Information über das betrachtete Objekt erhält man, indem dieses entlang der optischen Achse in mehrere Schnitte zerlegt wird. Dies läßt sich mechanisch mit Hilfe eines Mikrotoms bewerkstelligen oder auf optischem Wege mit Hilfe von Schrittmotoren bzw. Piezoelementen. Aus dem resultierenden Bilderstapel kann mit Hilfe geeigneter Rechenprogramme eine dreidimensionale Rekonstruktion erstellt werden. Hierzu können entweder Rohdaten oder durch Dekonvolution aufgearbeitete Daten herangezogen werden. Im einfachsten Fall wird es sich dabei um eine räumliche Projektion der Lichtintensitäten handeln, fortgeschrittene Ansätze zerlegen das Objekt in Isoflächen gleicher Intensitäten (Flächen-Rendern^{*}) oder in massive Raumteile, die aus winzigen Volumeneinheiten, den Voxeln, aufgebaut sind (Volumen-Rendern).

Zeitaufgelöste Mikroskopie. Mikroskopische Bilder lebender Zellen liefern lediglich Momentaufnahmen und erfassen nicht die komplette Dynamik von Prozessen. Abhilfe hierfür bietet eine statistische Betrachtung vieler Objekte, die jedoch keine individuelle Betrachtung der Einzelobjekte zuläßt. Dagegen geben Zeitserien (*time lapse*) einen Einblick in die Mechanismen der Zellmotilität und der intrazellulären Transportvorgänge (Review: PADDOCK 2001). Hierfür mußten allerdings spezifische Vitalfarbstoffe entwickelt werden. Bezüglich der nicht-invasiven Proteinmarkierung kommt dabei GFP-Varianten die entscheidende Rolle zu. In Kombination mit der 3D–Rekonstruktion wird der zusätzliche Zeitparameter häufig als „vierte Dimension“ beschrieben (THOMAS & WHITE 1998).

^{*} Verfahren zur Darstellung realistisch erscheinender 3D–Modelle. Dabei werden die Flächen eines CAD-Drahtmodells mit einer Oberflächenstruktur versehen.

FRET. Neben verschiedenen biochemischen und biophysikalischen Ansätzen, die Aussagen über Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen*, bietet die mikroskopische Technik des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) die Möglichkeit, *in vivo*-Aussagen über die Interaktion zwischen fluorochrommarkierten Proteinen treffen zu können (MITRA *et al.* 1996, Review: POLLOK & HEIM 1999). Bei FRET handelt es sich um eine distanzabhängige Interaktion zwischen den elektronischen Anregungszuständen zweier Fluorochrome, bei dem die Excitation von einem Donor-Molekül auf ein Akzeptor-Molekül ohne Energieverlust (d.h. ohne Photonenemission) übertragen wird. Die Effizienz zweier Moleküle miteinander über FRET zu interagieren, nimmt mit dem Abstand rapide ab (STRYER & HAUGLAND 1967; modifizierte FÖRSTER-Gleichung (9)).

$$(9) \quad \text{Effizienz} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}$$

Der Molekülabstand R , bei welchem der Energietransfer zu 50 % stattfindet, wird dabei durch den sog. FÖRSTER-Radius R_0 definiert; seine Größe ist abhängig von den spektralen Eigenschaften von Donor und Akzeptor.

FRET setzt voraus: (i) eine enge räumliche Nähe des Donor/Akzeptor-Paares (typischerweise 10–100 Å), (ii) das Absorptionsspektrum des Akzeptors muß mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen und (iii) die Dipol-Orientierung von Donor und Akzeptor sollte annähernd parallel sein.

CP/FLIP/FRAP. Photobleichtechniken (*photobleaching, fading*) wie die des *continuous photobleaching* (CP), *fluorescence loss in photobleaching* (FLIP) oder *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) machen sich die Instabilität der Fluoreszenz der meisten Fluorochrome zunutze und liefern Informationen über die Dynamik, welche der Gleichgewichts-Verteilung von Fluorochromen zugrunde liegt. Das Fluorochrom wird durch intensive Bestrahlung innerhalb einer kleinen Region gebleicht. Dabei wird das Fluorochrom nicht zerstört, sondern photochemisch irreversibel modifiziert, so daß es nicht weiter fluoresziert (TSIEN & WAGGONER 1995). Anschließend wird der Austausch zwischen der gebleichten und der nicht-gebleichten Fluorochrom-Population gemessen. Fluoreszenzmarkierte Proteine können somit unter Berücksichtigung des zusätzlichen Molekulargewichtes hinsichtlich ihrer intrazellulären Verteilungsdynamik untersucht werden (Review: WHITE & STELZER 1999).

* Hierzu zählen solche Methoden wie *yeast-two-hybrid*, Phagendisplay, Ko-Immunopräzipitation, *biomolecular interaction analysis-mass spectrometry*: BIA-MS, Oberflächenplasmonresonanz und andere.

D: *In vitro*-Transkription

Für den Nachweis der CB-Expression auf Transkriptionsebene (S.94) wurden markierte Hybridisierungssonden verwendet, die durch *in vitro*-Transkription (Abb. VI) hergestellt worden waren (§3.4.11).

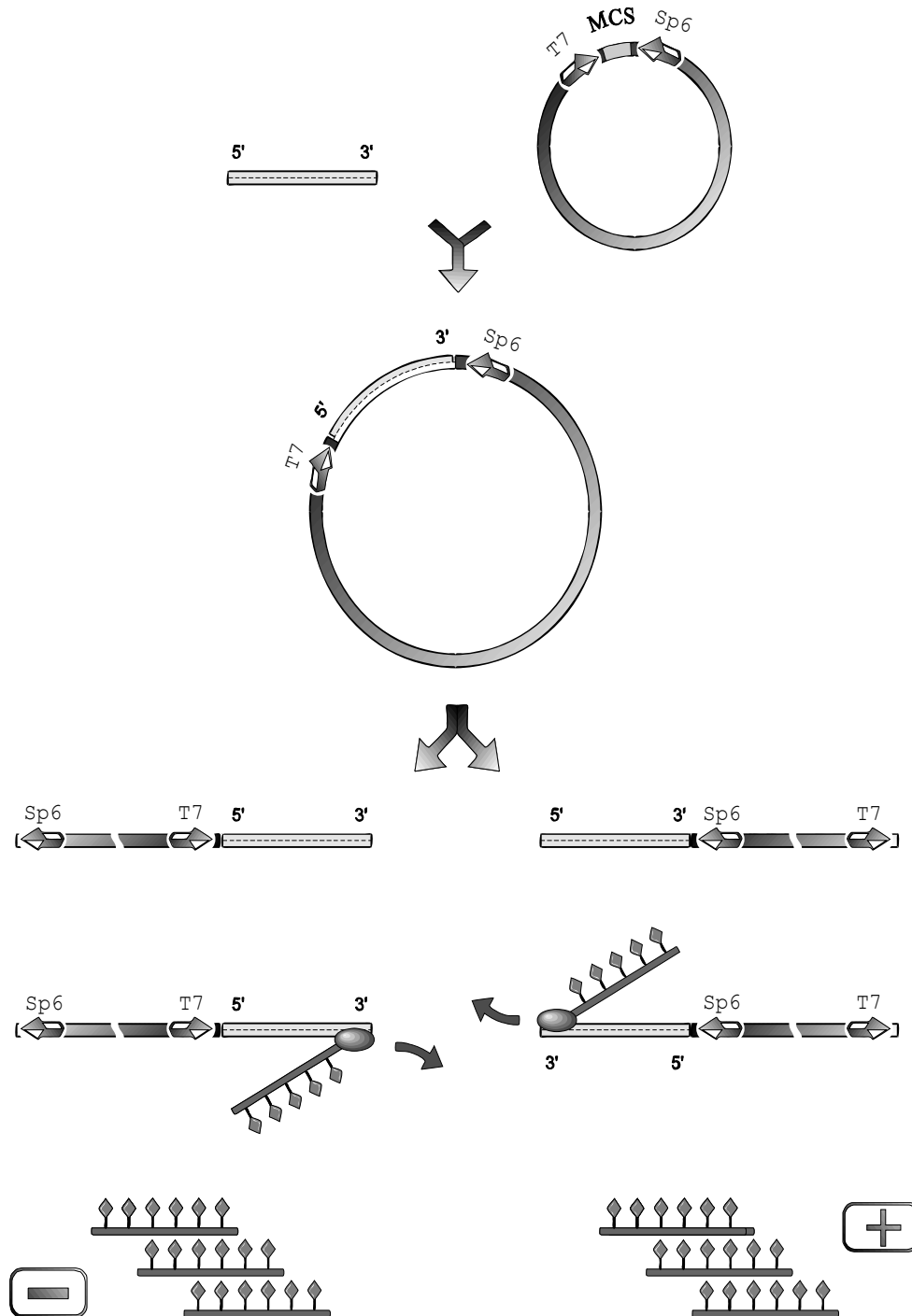


Abb. VI *In vitro*-Transkription. Nach der Klonierung des Inserts in einen speziellen Transkriptionsvektor wird dieser jeweils an einem der beiden Insertenden linearisiert. Die sense(-) bzw. α -sense(+)-Hybridisierungssonden werden dann durch RNA-Polymerasen amplifiziert und hierbei gleichzeitig markiert.

E: Homologievergleich von Säuger-Kathepsinen

Ein Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von Säugerkathepsinen (Abb. 2.1, S.17) zeigt, daß es sich bei den Kathepsin-Zymogenen um modular aufgebaute Mosaikproteine (Chimären) handelt, die neben Domänen gemeinsamen Ursprungs – vor allen Dingen in der stark konservierten Peptidaseeinheit* – nur geringe Identität in den angrenzenden Regionen besitzen (Abb. VII, unten). Starke Differenzen zwischen den einzelnen Signalsequenzen (Tab. II) und Pro-Peptiden in den Nicht-Peptidasedomänen deuten auf einen anderen evolutionären Ursprung hin und können Ähnlichkeit mit anderen Proteingruppen aufweisen (Rawlings & Barrett 1999).

Tab. II Signalsequenzen der Kathepsine. Das Signalpeptid wird effektiv abgespalten, wenn sich in der Position -1 (rot) eine Aminosäure mit kurzem Seitenrest und in der Position -3 (blau) keine geladene Aminosäure befindet. Demnach müßten theoretisch *alle* aufgelisteten Kathepsine gut prozessiert werden können. Alle aufgelisteten Sequenzen mit Ausnahme des Papain-Signals sind Humansequenzen.

Cysteinpeptidasen (C1A)	
<i>Papain (Carica Papaya)</i>	MAMIPSISKLLFVAICLF
Kathepsin B	MWQLWASLCCLLVLANA
Kathepsin H	MWATLPLLCAWLLGVPVCGA
Kathepsin K	MWGLKVLLLPVVSFA
Kathepsin L	MNPTLILAAFCGLIASA
Kathepsin O	MDVRALPWLPLLWLLCRGGDA
Kathepsin S	MKRLVCVLLVCSSAVA
Kathepsin V	MNLSLVLA AFCGLIASA
Kathepsin F	MAPWLQLLSLLGLLPGAVA
Kathepsin C	MGAGPSLLLAALLLLSGDGAVRC
Kathepsin W	MALTAHPSCLLALLVAGLAQG
Kathepsin X	MARRGPGWRPLLLLVLLAGAAQG
Aspartatpeptidasen (A1)	
<i>Pepsin A</i>	MKWLLLLGLVALSEC
Kathepsin D	MQPSSLLPLALCLLAAPA
Kathepsin E	MKTLLLLLLVLELGEA
Serinpeptidasen (S1)	
<i>Chymotrypsin</i>	MAFLWLLSCWALLGTTFG
Kathepsin G	MQPLLLLLLAFLLPTGAEA
Metallopeptidasen (M14A)	
<i>Carboxypeptidase A</i>	MRGLLVLSVLLGAVFG

* Konsensussequenz im reifen Enzym einer Peptidasefamilie

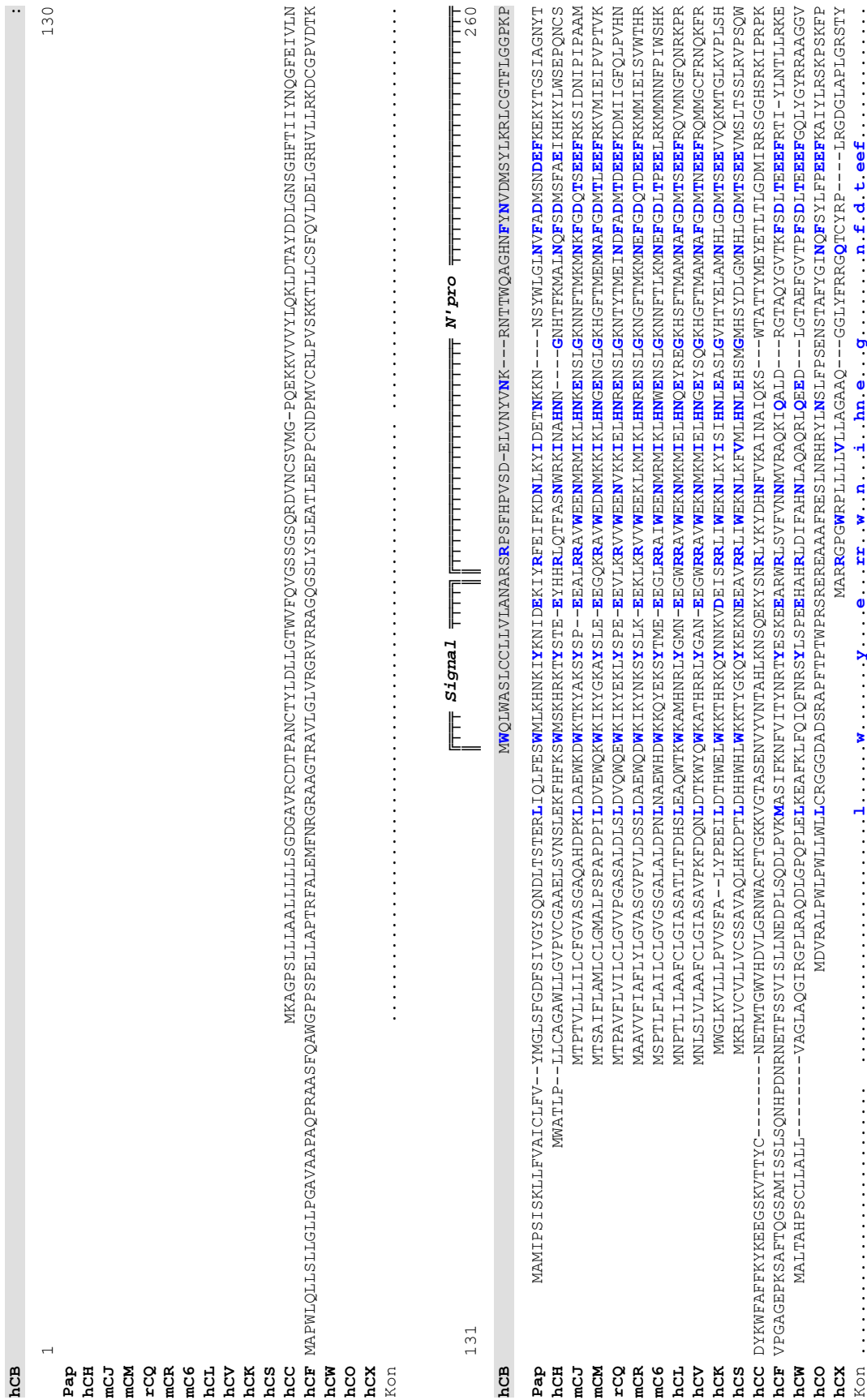
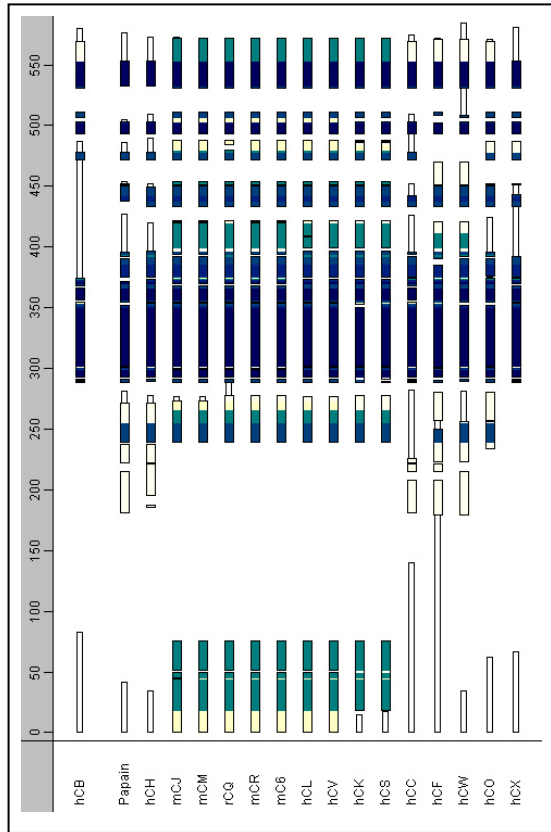
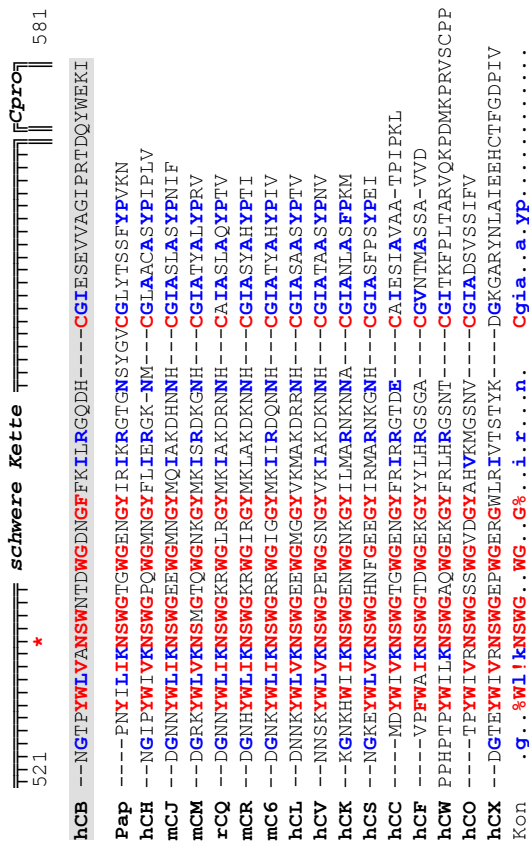


Abb. VII Homologievergleich der Kathepsin-Sequenzen. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

261 leichte Kette schwere Kette \$ 390
 hCB PQRVMTEDLK---EQWPOCPTI**KEIRDQSSCS**WAFGA**VEALS**DRICIHNAHVS**VEVSAEDLLITCCGSMCGD-GCNGG**YPAE**ANNFWTRKGLVSGGLYESHVGCGRPY**S
 Pap TTLSLSEVVLN---DGDVNI**PEYVDWRQK**-A--**VTPYKN**---**QGCSC**WAFSA**AVTIEGIIKI**--**RTGNLNEYSEQLLDCDRR**---SY**GCNGG**P**WSALQ**LVAOY---**GIHYRNTY**PYE
 hCJ ATKSNYL^{RGT}---**GPYPPSVDWRKGNF**--**VSPYKN**---**QGCSC**WAFSA**TTGAL**ESATAI--**ATGNL**SLAE**QQLVDC**QADF--**NNYCGGG**LP**SQAF**E**YILNK**---**GLMGEDT**Y**PYQ**
 mCJ TDPHAQNHVS---**IGLDPDKDREEG**-Y--**VTPYKN**---**QGCSC**WAFSA**AAAGQ**QWFM--**KTGNL**PL**SVQNLDCS**KT**V-GNKQ**QS**GT**A**HQAF**FWL**KNK**---**GLEAEAT**Y**PYE**
 mCM KGSVQKRLS---**VNLPKFTINWKR**G-Y--**VTPYQT**---**QGR**CNS**WAFS**VT**GALE**QW**FR**--**KTGQL**PL**SVQNLVDCSR**PQ--**GNWGYL**GN**TLYL**ALH**YVM**ENG---**GLESEAT**Y**PYE**
 rCQ TEKRLWRALGSEFFPNSWNRD**ALP**KE**VDR**W**REG**-Y--**VTRVRK**---**QGCSS**WAF**PEVT**GA**LE**Q**WFK**--**KTGKL**PL**SVQNLIDCS**KPQ--**GNR**CG**LW**NT**YNA**FQ**V**VL**HNG**---**GLEAEAT**Y**PYE**
 mCR EGKSMKREAG---**SILPKFVDWRK**KG-Y--**VTPYRR**---**QGD**CA**WAF**VT**GA**EA**QAIW**--**QTGKL**PL**SVQNLVDCS**KPQ--**GNNG**CG**LGG**DT**YNA**FQ**V**VL**HNG**---**GLESEAT**Y**PYE**
 mC6 KKKLIRKAVG---**DVLPKFDWRK**KG-Y--**VTPYRR**---**QGCNS**WAF**AVNG**AL**EQWFK**--**KTGRL**PL**SVQNLVDC**TKTQ--**GN**D**QW**GG**DI**Y**AE**V**VL**NG---**GLEAEAT**Y**PYE**
 hCL KGVFOEPLF---**YEAPRSVDWRK**KG-Y--**VTPYKN**---**QGCSC**WAFSA**TGAL**EQ**WFR**--**KTGRL**PL**SVQNLVDCS**GPQ--**GN**CG**GN**GL**MDY**A**FQ**VL**NG**---**GLDSEES**Y**PYE**
 hCV KGVFREPLF---**LDLPKSDWRK**KG-Y--**VTPYKN**---**QKCS**WAFSA**TGAL**EQ**WFR**--**KTGK**LV**SL**SE**QNLVDCS**GPQ--**GN**CG**GN**GG**FW**AR**AFQ**V**K**ENG---**GLDSEES**Y**PYE**
 hCk SRNDTLYPE---**WGRAPDSYDRK**KG-Y--**VTPYKN**---**QGCSC**WAFSA**SVGA**LE**Q**L**KK**--**KTGKL**LNLS**QNLVDC**VSE---**ND**CG**GG**Y**M**T**NA**FQ**V**V**Q**KNR---**GID**SE**DA**Y**PYV**
 hCS QRN--ITYKSN---**PNRILPDSVDWRK**KG-C--**VTEYKY**---**QSC**GA**WAF**SA**VGAL**EA**Q**L**LK**--**KTGKL**VTLS**QNLVDC**ST**EK**Y**GN**KG**CG**GF**MT**AFQ**YII**DNK---**GIDSDA**Y**PYK**
 hCC PA-PLTAEIQ---**KILHLP**TS**WDR**NR**VH**GN**INF**VP**YRN**---**QAS**CS**Y**SA**S**AM**GL**EA**R**IR**IL**T**N**NS**Q**T**PL**S**Q**LV**DCS**QY---**AQ**CE**GG**FP**Y**LI**AG**Y**Q**AD**F**---**GLVEA**CP**Y**IT
 hCF PG-NKMQAOKS---**VGDIA**PE**WDR**SK**GA**--**VTRVKD**---**QGM**CS**WAF**S**VT**GN**VE**Q**WFL**--**NQ**GTLS**SE**Q**ELLDC**DKM---**DKA**CG**GL**PS**NA**Y**SAI**KN**L**G---**GLE**TE**DD**Y**SYQ**
 hCW PSMGREIRSEE---**PEESV**FC**DWR**K**VAGA**--**ISPIKD**---**QK**NC**C**WA**AA**AG**NI**ET**L**W**R**I--**SF**WD**F**VD**V**S**H**EL**LDC**GR**C**---**GD**CG**HG**FW**MD**AF**IT**VL**NS**---**GLA**SE**KD**Y**PFQ**
 hCO RYSAEVHMSI---**PNVSLP**LR**FDR**DK**QV**--**VTQVRN**---**QOM**CG**C**WAF**S**V**GA**VE**S**AYAI--**KG**KL**ED**LS**Q**Q**VID**CS**YN**---**NY**CG**GN**GS**TL**NA**L**N**L**NR**K**W**Q**---**VKL**Y**KD**SE**Y**PF**K**
 hCX PRPHEYLSPA---**DLPKS**W**DR**NR**V**GN**V**Y**AS**IT**R**Q**H**LP**QY****CG**SC**WA**HA**ST**SA**M**ADR**IN**IK**R**GA**WP**LS**L**SV**Q**N**VID**CG**NR**--**G**-**SCE**GG**N**DL**SV**WD**Y**A**HQ**H**I**---**SDE**TC**N**NY**Q**
 Konlp.s.DwR.kg.....vtp!kn...Qg.CgsCwafs..ga.e.q.....ktg.l.l.ls.q!lvdC.....n.gc.gg.....a.yv..ng..gl..e..yp%.

391\$ leichte Kette schwere Kette \$ 520
 hCB IPPCEHHVNGSRPPCTGEGDTEPK**CS**KICE**PG**YS**PT**Y**K**RQ**K**HY**GN**YS**VS**NS**EB**KD**IM**AE**II**Y**R**KN**GP**VE**GA**FS**V**-**YS**DE**FL**LL**Y**K**S**GV**Y**QH---**VT**GEM**MG**GH**AI**RI**LL**GM**VE**---
 Pap **GV**QRY---**CR**S--**RE**K**GY**A**K**T**D**GV**R**Q**V**Q**PY**---**NE**G**AL**L**Y**S**IA**N**Q**--**P**SV**V**LE**A**AG**K**D**Q**L**Y**R**G**G**I**F**V**G---**PC**---**GN**K**V**D**H**AV**AA**V**GY**G---
 hCh **GR**DGY---**CK**F--**Q**PK**RA**-**I**GF**K**VD**VAN**IT**Y**---**DE**EA**VE**AV**AL**YN**P**VS**FA**FE**VT**Q**D**--**F**MM**Y**R**T**G**I**Y**SS**--**T**S**CH**K**T**P**D**K**V**NA**H**AV**L**V**GY**G---**E**K---
 mCJ **GR**DGP---**CR**Y--**R**SE**NA**-**S**AN**IT**D**Y**N**L**--**PP**---**NE**L**Y**L**W**VA**S**I**GP**VS**AA**IDA**S**H**S**FR**F**Y**NG**I**Y**E--**P**NC--**S**S**F**V**N**HA**V**L**V**Y**GY**G**S**E**G**D**V**K---
 mCM **E**KDGS---**CR**Y--**S**PE**NS**-**T**AN**IT**GF**EV**-**PK**---**NE**D**AL**M**NA**VA**S**I**GP**I**S**VA**IDA**R**H**AS**FL**Y**K**R**G**I**Y**E--**P**NC--**S**SV**V**I**H**S**M**L**L**V**Y**GY**G**FT**G**RES---
 rCQ **R**KEGV---**CR**Y--**N**PK**NS**-**S**A**K**IT**GF**V**L**-**PE**---**SE**D**V**L**M**DA**V**A**T**KG**PI**AT**GV**V**H**Y**SS**FR**F**Y**Q**K**GV**Y**HE**--**PK**C--**S**S--**Y**NA**H**AV**L**V**Y**GY**G**FE**G**NET---
 mCR **GR**DGP---**CR**Y--**N**PK**NS**-**K**A**E**IT**GF**V**SL**-**PQ**---**S**E**D**IL**MA**VA**T**IG**PI**TA**GI**DA**S**H**S**FK**N**Y**K**G**I**Y**HE**--**P**NC--**S**SD**TV**I**H**GV**L**V**Y**GY**G**FK**GI**ET---
 mC6 **GR**EGP---**CR**Y--**N**PK**NS**-**K**A**B**IT**GF**V**SL**-**PE**---**S**E**D**IL**ME**VA**T**IG**PI**SA**AV**DA**S**FN**R**S**F**Y**DC**G**I**H**Q**--**P**NC--**S**NN**T**V**N**HA**V**L**V**Y**GY**G**TE**G**NET**---
 hCL **A**TEES---**CR**Y--**N**PK**Y**S--**V**AN**D**T**GF**V**DI**-**PK**---**Q**E**K**AL**M**KA**V**A**T**IG**PI**SA**IDA**G**H**ES**FL**Y**K**G**I**Y**FE**--**PC**--**S**SE**D**M**D**H**GV**L**V**Y**GY**G**F**EST**S**---
 hCV **A**VEI---**CR**Y--**R**PE**NS**--**V**AN**D**T**GF**V**AP**G---**K**E**K**AL**M**KA**V**A**T**IG**PI**SV**AM**D**A**GH**S**S**FQ**Y**K**S**G**I**Y**F--**PC**--**S**SK**N**LD**H**GV**L**V**Y**GY**G**FE**G**ANS---
 hCk **Q**BEES---**CM**Y--**N**PT**Q**K--**A**A**C**R**G**Y**RE**I**PE**G---**NE**K**AL**K**R**AV**AV**GP**SV**AI**DA**LS**T**S**FQ**Y**K**S**G**Y**Y**D--**E**SC--**N**SD**N**L**H**AV**L**AV**GY**G---**I**Q---
 hCs **A**MDQK---**CQ**Y--**D**SK**YR**--**A**A**C**S**K**Y**TE**L**PY**G---**RE**D**V**L**KE**AV**AN**K**GP**SV**GD**AR**H**PS**FL**Y**R**S**G**V**Y**E--**PC**--**T**Q**N**V**N**H**GV**L**V**Y**GY**G---**D**L---
 hCC **G**TDSP---**CK**M--**K**E**D**C**F**--**K**V**Y**S**S**E**H**Y**V**GG**Y**GC**CE**AL**M**K**LE**V**H**H**GP**SV**GA**VE**F**V--**Y**DD**LE**H**Y**KK**G**I**Y**H**H**T**GL**R**DP**FN**PE**L**T**HA**V**L**L**V**Y**GY**G**TD**S**AS**G**---
 hCF **G**HVRS---**CN**F--**S**A**E**RA--**K**V**Y**IN**D**S**Y**EL**S**Q---**NE**Q**L**AA**L**A**R**K**GP**I**S**VA**INA**-**F**G--**Q**F**Y**R**H**G**I**SR**P**--**L**R**EL**CS**P**--**L**ID**H**AV**L**V**Y**GY**G**--**N**RS**D**---
 hCW **G**KVRAHR---**CH**P--**K**K**Y**Q**K**--**V**AM**IQ**D**F**IM**L**Q**N**---**NE**H**R**IA**Q**Y**L**A**T**IG**PI**VT**IN**M--**K**P--**L**Q**L**Y**R**K**G**Y**IK**AT--**P**TC**D**P--**Q**L**D**H**S**V**L**L**V**Y**GY**G**S**Y**K**E**G**IM**A**ET**V**SS**Q**S**Q**PQ
 hCO **A**QNGL---**CH**Y--**F**SG**S**H**S**GF**S**IK**G**Y**S**A**D**F**S**D--**Q**E**D**E**M**A**K**AL**L**TF**GP**IV**VD**A--**V**S**Q**W**D**Y**L**GG**I**IQ**H**---**H**CS**S**GE**A**NA**H**AV**L**IG**F**DK**T**GS---
 hCX **A**KDQE---**CD**K**F**N**Q**CG**T**C**NE**FK**E**CH**A**IR**N**Y**L**WR**V**GD**Y**GS**LS**--**G**RE**K**--**M**MA**E**I**Y**AN**GP**I**SC**GI**VA**--**T**ER**L**AN**Y**IG**GI**Y**A**E---**Y**Q**D**TTY**I**N**H**V**V**SA**W**GI**S**---
 KonC.y.....a.....E.l.....ava..gp.sva.a.....f..y..G!y.....p.c.o.....n.ha!l.vgyg.....

Homologievergleich der Kathepsin-Sequenzen.



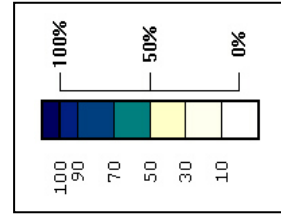
Multalin Vers. 5.4.1 (© I.N.R.A. Frankreich bis 1996)
 CORPET F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.
Nucl Acids Res 16(22): 10881–10890.

Konsensusgrade: hoch = 90 %, niedrig = 50 %

Konsensus-Symbole der AS:
 ! IV
 \$ LM
 % FY
 # NDQEBZ

Symbolmarkierungen der CB-Sequenz:
 * aktives Zentrum
 § Disulfidbrücke
 % Glykosylierung
 Δ Deletion

Macaw (© Greg Schuler; NCBI; Bethesda, Maryland, USA)
 Blockdiagramm eines halbautomatischen Homologievergleichs
 Methode: *segment pair overlap*
 Die Kolorierung zusammengehörender Blöcke erfolgt nach Identität.



F: Sequenzierung genetischer Konvertanten

Die Sequenzierung dreier LCLC-103H-Zellklone aus einem Konversionsexperiment (§4.1.3) belegt die Rekombinationereignisse, die während der simultanen Kotransfektion zwischen den homologen Fluoreszenzprotein-Sequenzen stattgefunden haben (Abb. VIII).

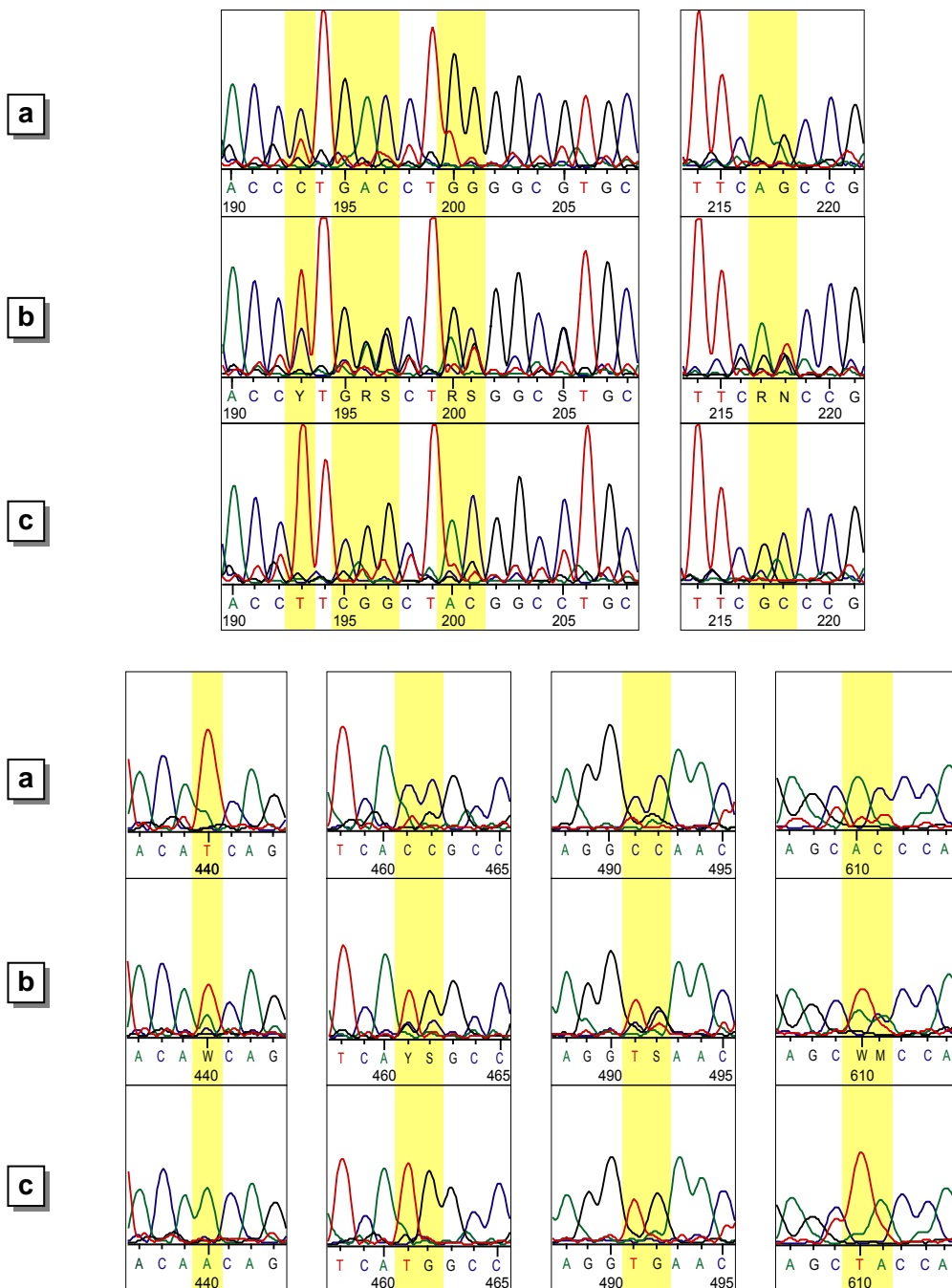


Abb. VIII Sequenzierung von Konvertanten. Neben einem H2A-ECFP-Zellklon, der keine Anzeichen für eine Konversion trägt (a), wurde ein Mischklon sequenziert, der offensichtlich beide Sequenzen enthält (b) sowie ein Zellklon, der eine komplette Umwandlung von ECFP zu EYFP zeigt (c). Mutierte Positionen sind gelb unterlegt. Die Sequenzdaten stimmen mit der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung der Zellklone überein.

G: Auswertung der Photobleichkinetiken

Die aufgenommenen Bilderserien aus den Bindungsstudien (§4.3.4) wurden mit Makros ausgewertet, die im Programm „ScionImage“ erstellt worden waren (Abb. IX).

```

a
macro 'Measure All from Disk';
{Loads and measures a set of images from disk.}
{The images should be named in the way '01', '02', '03', etc.}
var i,width,height:integer;
begin
GetPicSize(width,height);
  if width=0 then begin
    PutMessage('Before running this macro, open and outline
              the first image("01") in the series.');
```

```

    exit;
  end;
ResetCounters;
Measure;
close;
for i:=2 to 1000 do begin
  open(i:2);
  RestoreROI;
  Measure;
  close;
end;
end;
```

```

b
macro 'Position fixed size ROI';
var width,height,x,y:integer;
begin
  width:=50; height:=50;
  repeat
    GetMouse(x, y);
    MakeRoi(x-width/2, y-height/2, width, height);
    DrawBoundary;
    Undo;
  until button;
end;
```

```

c
macro 'Measure All in Stack';
{Measures an image stack using the current selection.}
var i,left,top,width,height:integer;
begin
  ResetCounter;
  for i:=1 to nSlices do begin
    SelectSlice(i);
    RestoreROI;
    Measure;
  end;
end;
```

Abb. IX Makros zur Auswertung der Photobleichscans. (a) Kontinuierliches Photobleichen. **(b,c)** FRAP. Der Meßbereich wurde in **(b)** manuell dem gebleichten Bereich angepaßt, da Verschiebungen des Bildausschnitts aufgrund (intra-)zellulärer Bewegungen während der Aufnahmen nicht verhindert werden konnten.

H: OpenLab-Automatationen

Komplexe automatische Abläufe wie Akquisition und Prozessierung von optischen Schnitten und Kinetiken, Dekonvolution, Hintergrundabzug, Superposition von Kanälen, Grauwertmessungen usw. wurden mit Hilfe sog. „Automatationen“ im „OpenLab“-Programm realisiert. Diese setzen sich aus Sequenzen einzelner, parametrisierbarer Module zusammen (Abb. X).

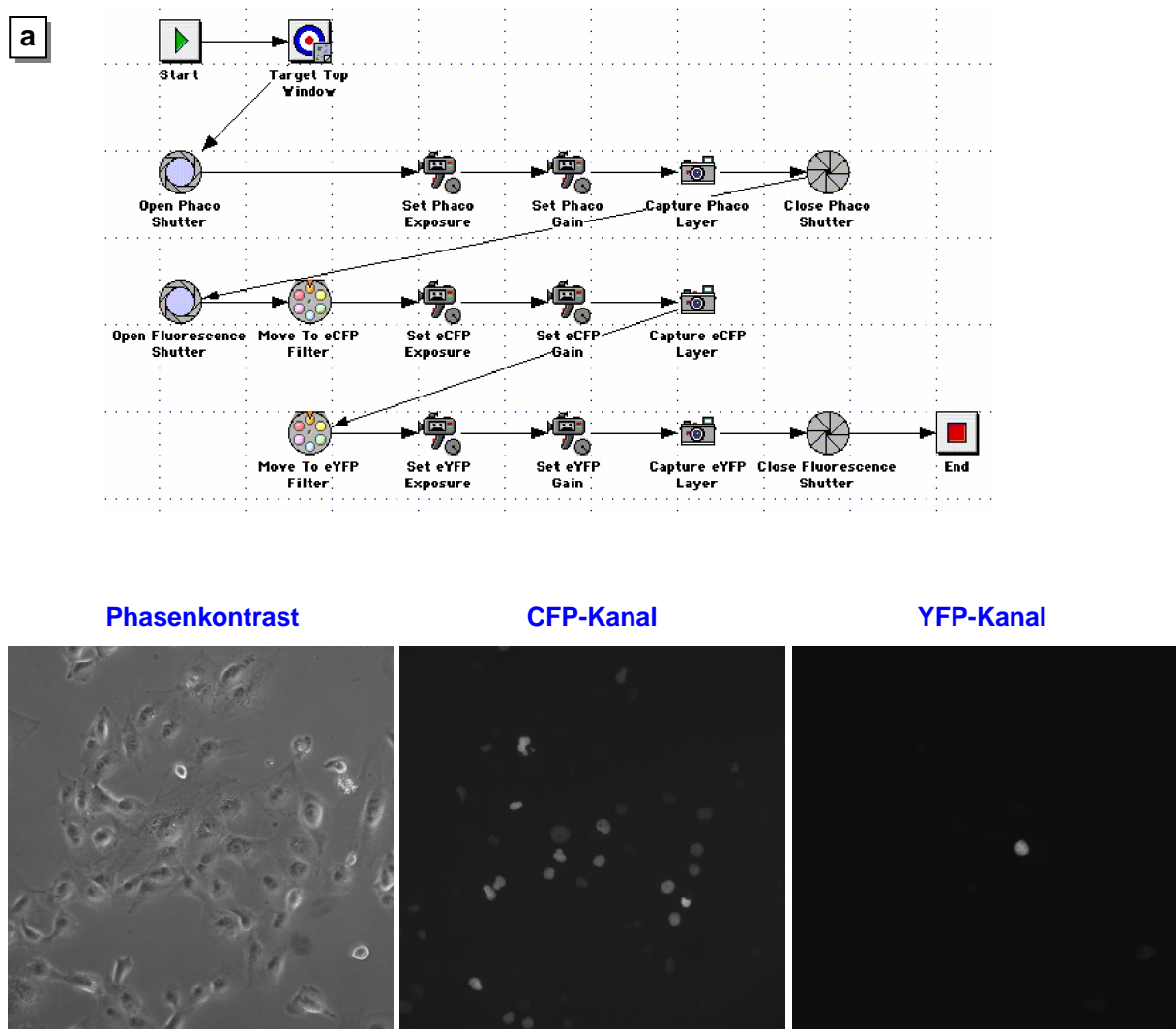
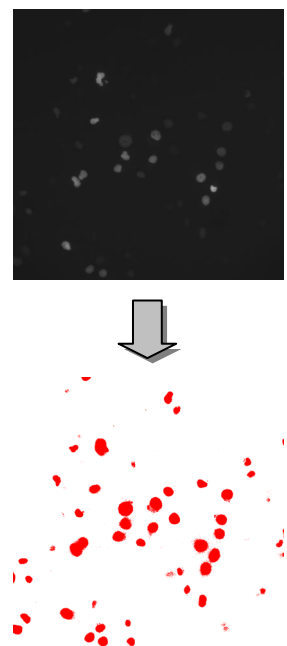
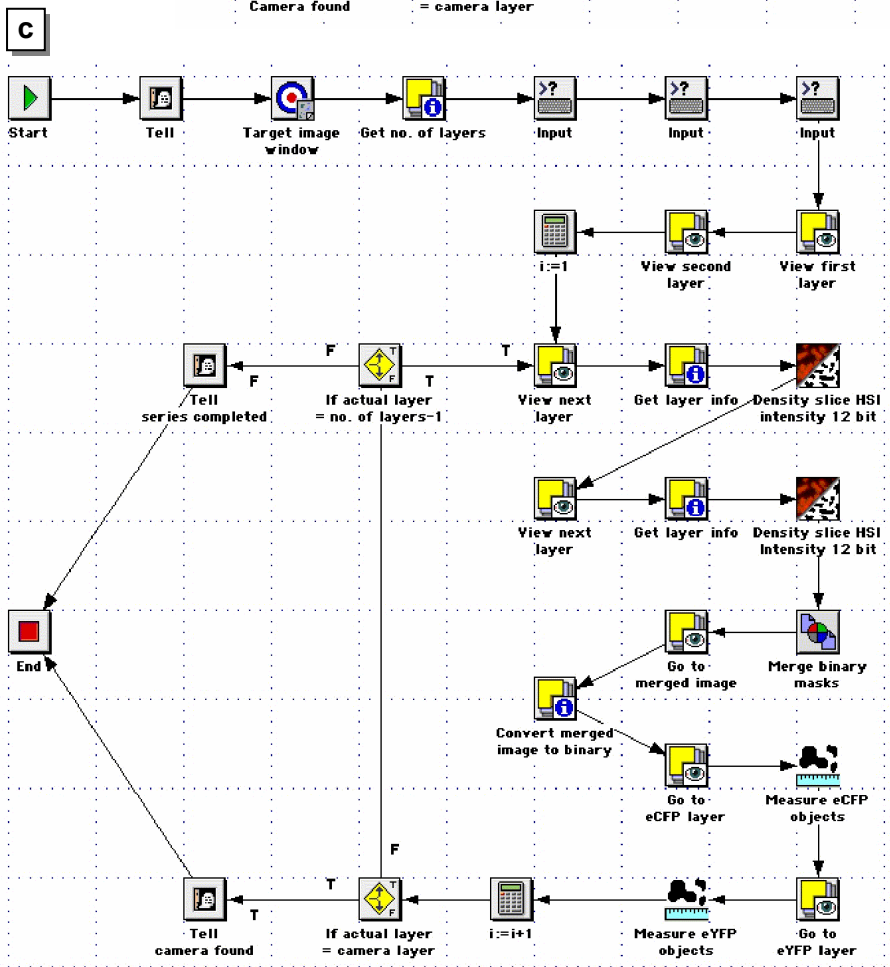
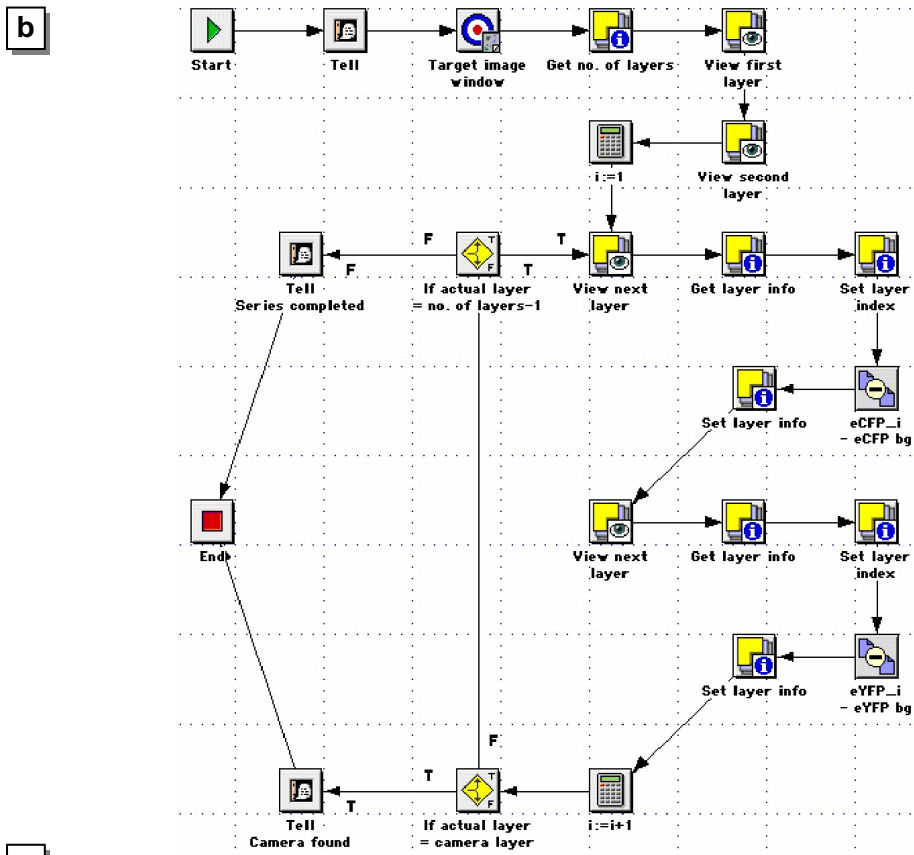


Abb. X Automatisierung der Konversionsexperimente. Für die Akquisition und die statistische Auswertung der nukleären Fluoreszenzsignale im Rahmen der Konversionsexperimente (§4.1.3) wurden 3 Prozeßabläufe entwickelt: (a) Aufnahmen in 2 Fluoreszenzkanälen (CFP, YFP) sowie im Phasenkontrast, (b) Numerierung der Bilder und Bildverbesserung durch Hintergrundabzug (siehe nächste Seite) sowie (c) Erstellung von Binärmasken aufgrund von Intensitätsschwellenwerten (*density slicing*) und deren Überlagerung (siehe nächste Seite). Die resultierende Maske wurde zur Ermittlung der mittleren Grauwerte der Kernsignale in beiden Kanälen verwendet, wobei ein Flächenschwellenwert der Eliminierung kleinerer Objekte (CB-Signale im Golgi bzw. Vesikeln) diente. Die weitere Datenverarbeitung erfolgte in einer Tabellenkalkulation.



LITERATURVERZEICHNIS

Seite

- ALBOTA MA, XU C, WEBB WW (1998). Two-photon fluorescence excitation cross sections of biomoecular probes from 690 to 960 nm. *Appl Opt* **37**: 7352–7356. **143**
- AMSTERDAM A, LIN S, MOSS L, HOPKINS N (1996). Requirements for green fluorescent protein detection in transgenic zebrafish embryos. *Gene* **173**: 99–103. **158**
- ANASTASI A, BROWN MA, KEMBHAVI AA, NICKLIN MJ, SAYERS CA, SUNTER DC, BARRETT AJ (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* **211**: 129–138. **22**
- ANDERSON RA, ELIASON SL (1986). Recombination of homologous DNA fragments transfected into mammalian cells occurs predominantly by terminal pairing. *Mol Cell Biol* **6**: 3246–3252. **81, 140**
- ANDO R, HAMA H, YAMAMOTO-HINO M, MIZUNO H, MIYAWAKI A (2002). An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12651–12656. **160**
- ANDREASON GL, EVANS GA (1988). Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation. *Biotechniques* **6**: 650–660. **63**
- ANDREWS PD, HARPER IS, SWEDLOW JR (2002). To 5D and beyond: quantitative fluorescence microscopy in the postgenomic era. *Traffic* **3**: 29–36. **135, 136**
- ARONSON NN JR, BARRETT AJ (1978). The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochem J* **171**: 759–765. **16, 20**
- ASSFALG-MACHLEIDT I, ROTHE G, KLINGEL S, BANATI R, MANGEL WF, VALET G, MACHLEIDT W (1992). Membrane permeable fluorogenic rhodamine substrates for selective determination of cathepsin L. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 433–440. **21**
- AUBIN JE (1979) Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* **27**: 36–43. **137**
- AUTHIER F, BERGERON JJ, OU WJ, RACHUBINSKI RA, POSNER BI, WALTON PA (1995). Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3859–3863. **23**
- AXELROD D, KOPPEL DE, SCHLESSINGER J, ELSON E, WEBB WW (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**: 1055–1069. **70, 156**
- BAICI A, LANG A, HORLER D, KISSLING R, MERLIN C (1995). Cathepsin B in osteoarthritis: cytochemical and histochemical analysis of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* **54**: 289–297. **23**
- BAICI A, LANG A, HORLER D, KNOPFEL M (1988). Cathepsin B as a marker of the dedifferentiated chondrocyte phenotype. *Ann Rheum Dis* **47**: 684–691. **23**
- BAIRD GS, ZACHARIAS DA, TSIEN RY (2000). Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11984–11989. **79, 139, 140, 144, 160**
- BALAJI KN, SCHASCHKE N, MACHLEIDT W, CATALFAMO M, HENKART PA (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* **196**: 493–503. **23**
- BARRETT AJ (1980). Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates. *Biochem J* **187**: 909–912. **59**
- BARRETT AJ (1986). The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* **45**: 1363–1374. **21**
- BARRETT AJ, KIRSCHKE H (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80**: 535–561. **21, 59**
- BAYLISS R, CORBETT AH, STEWART M (2000). The molecular mechanism of transport of macromolecules through nuclear pore complexes. *Traffic* **1**: 448–456. **31**
- BEPLER G, KÖHLER A, KIEFER P, HAVEMANN K, BEISENHERZ K, JAQUES G, GROPP C, HAEDER M (1988). Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* **37**: 158–171. **61**

- BERARDI S, LANG A, KOSTOULAS G, HORLER D, VILEI EM, BAICI A (2001). Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum* **44**: 1819–1831..... 26
- BERNAS T, ZAREBSKI M, COOK RR, DOBRUCKI JW (2004). Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. *J Microsc* **215**: 281–296..... 138
- BERQUIN IM, CAO L, FONG D, SLOANE BF (1995). Identification of two new exons and multiple transcription start points in the 5'-untranslated region of the human cathepsin-B-encoding gene. *Gene* **159**: 143–149..... 26
- BERQUIN IM, SLOANE BF (1996). Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* **389**: 281–294..... 24, 27
- BESTVATER F, DALLNER C, SPIESS E (2005). The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability. *BMC Cell Biol* **6**:16..... 114
- BESTVATER F, KNOCH TA, LANGOWSKI J, SPIESS E (2002a). Construct conversions caused by simultaneous cotransfection: "GFP-Walking". *Biotechniques* **32**: 844–854..... 80
- BESTVATER F, KNOCH TA, SPIESS E (2002c). "Verfahren zur Untersuchung der homologen Rekombination". Deutsche Patentanmeldung 101 16 826.8..... 142
- BESTVATER F, KNOCH TA, SPIESS E (2002d). "Nachweisverfahren für homologe Rekombinationsereignisse". Internationale Patentanmeldung PCT/DE02/01207 (WO 02/081675 A2)..... 142
- BESTVATER F, SPIESS E, STOBRAWA G, HACKER M, FEURER T, PORWOL T, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, WOTZLAW C, ACKER H (2002b). Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. *J Microsc* **208**: 108–115..... 86
- BEVER CT JR, GARVER DW (1995). Increased cathepsin B activity in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci* **131**: 71–73..... 23
- BIRGE RR (1986). Two-photon spectroscopy of protein bound chromophores. *Acc Chem Res* **19**: 138–146..... 142
- BIRNBOIM HC, DOLY J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523..... 48
- BISHOP JO (1996). Chromosomal insertion of foreign DNA. *Reprod Nutr Dev* **36**: 607–618..... 140
- BLAZQUEZ M, SHENNAN KI (2000). Basic mechanisms of secretion: sorting into the regulated secretory pathway. *Biochem Cell Biol* **78**: 181–191..... 29
- BLOBEL G, DOBBERSTEIN B (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**: 835–851..... 28
- BOCCACCI P, BERTERO M (2002). Image-restoration methods: basics and algorithms. In: Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances (DIASPRO A, ed) (Wiley-Liss, New York). pp 253–269..... 164
- BOURETT TM, SWEIGARD JA, CZYMMEK KJ, CARROLL A, HOWARD RJ (2002). Reef coral fluorescent proteins for visualizing fungal pathogens. *Fungal Genet Biol* **37**: 211–220..... 160
- BRADFORD MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254..... 59
- BROWN EB, CAMPBELL RB, TSUZUKI Y, XU L, CARMELIET P, FUKUMURA D, JAIN R (2001). *In vivo* measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumours using multiphoton laser scanning microscopy. *Nature Med* **7**: 864–868..... 142
- BUCK MR, KARUSTIS DG, DAY NA, HONN KV, SLOANE BF (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* **282**: 273–278..... 146
- BUHLING F, GERBER A, HACKEL C, KRUGER S, KOHNLEIN T, BROMME D, REINHOLD D, ANSORGE S, WELTE T (1999). Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**: 612–619..... 59
- CALKINS CC, SLOANE BF (1995). Mammalian cysteine protease inhibitors: biochemical properties and possible roles in tumor progression. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 71–80..... 21
- CAMPBELL RE, TOUR O, PALMER AE, STEINBACH PA, BAIRD GS, ZACHARIAS DA, TSIEN RY (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7877–7882..... 139
- CANBAY A, GUICCIARDI ME, HIGUCHI H, FELDSTEIN A, BRONK SF, RYDZEWSKI R, TANIAI M, GORES GJ (2003). Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis. *J Clin Invest* **112**: 152–159..... 25

- CAO L, TAGGART RT, BERQUIN IM, MOIN K, FONG D, SLOANE BF (1994). Human gastric adenocarcinoma cathepsin B: isolation and sequencing of full-length cDNAs and polymorphisms of the gene. *Gene* **139**: 163–169. 26
- CARMO-FONSECA M, MENDES-SOARES L, CAMPOS I (2000). To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* **2**: E107–E112. 153
- CARR DT (1991). Lung cancer: from triumph to tragedy. *Int J Cell Cloning* **9**: 548–558. 134
- CASPER S, HOLT C (1996). Expression of the green fluorescent protein-encoding gene from a tobacco mosaic virus-based vector. *Gene* **173**: 69–73. 158
- CATALDO AM, NIXON RA (1990). Enzymatically active lysosomal proteases are associated with amyloid deposits in Alzheimer brain. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 3861–3865. 23
- CAVALLO-MEDVED D, SLOANE BF (2003). Cell-surface cathepsin B: understanding its functional significance. *Curr Top Dev Biol* **54**: 313–341. 24, 26
- CENTONZE VE, WHITE JG (1998). Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J* **75**: 2015–2024. 142
- CHALFIE M, KAIN S (1998). *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Wiley-Liss, New York). .. 15
- CHALFIE M, TU Y, EUSKIRCHEN G, WARD W, PRASHER D (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802–805. 158
- CHANG CN, BLOBEL G, MODEL P (1978). Detection of prokaryotic signal peptidase in an *Escherichia coli* membrane fraction: endoproteolytic cleavage of nascent fl pre-coat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 361–365. 28
- CHAPMAN HA (2004). Cathepsins as transcriptional activators? *Dev Cell* **6**: 610–611. 154
- CHAPMAN HA, RIESE RJ, SHI GP (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Ann Rev Phys* **59**: 63–88. 16
- CHOI WJ, KIM JK, CHOI SH, PARK JS, AHN WS, KIM CK (2004). Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. *Biomaterials* **25**: 5893–5903. 138
- CODY CW, PRASHER DC, WESTLER WM, PRENDERGAST FG, WARD WW (1993). Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**: 1212–1218. 158
- COLOSIMO A, GONCZ KK, HOLMES AR, KUNZELMANN K, NOVELLI G, MALONE RW, BENNETT MJ, GRUENERT DC (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* **29**: 314–331. 63
- COMPAGNI A, CHRISTOFORI G (2000). Recent advances in research on multistage tumorigenesis. *Br J Cancer* **83**: 1–5. 23
- COONROD A, LI FQ, HORWITZ M (1997). On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses. *Gene Ther* **4**: 1313–1321. 140
- CORMACK BP, VALDIVIA R, FALKOW S (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**: 33–38. 159, 160
- CUBITT AB, HEIM R, ADAMS SR, BOYD AE, GROSS LA, TSIEN RY (1995). Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci* **20**: 448–455. 158, 159
- CUOZZO JW, TAO K, WU QL, YOUNG W, SAHAGIAN GG (1995). Lysine-based structure in the proregion of procathepsin L is the recognition site for mannose phosphorylation. *J Biol Chem* **270**: 15611–15619. 18
- CYGLER M, MORT JS (1997). Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* **79**: 645–652. 18
- DAGERT M, EHRLICH SD (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23–28. 46
- DANELL AS, PARKS JH (2003). Fraying and electron autodetachment dynamics of trapped gas phase oligonucleotides. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 1330–1339. 129
- DAVIS DF, WARD WW, CUTLER MW (1995). Posttranslational chromophore formation in recombinant GFP from *E. coli* requires oxygen. *Proceedings of the 8th international symposium on bioluminescence and chemiluminescence*. 158
- DEGIORGI F, BRINI M, BASTIANUTTO C, MARSAULT R, MONTERO M, PIZZO P, ROSSI R, RIZZUTO R (1996). Targeting aequorin and green fluorescent protein to intracellular organelles. *Gene* **173**: 113–117. 158
- DENK W, PISTON DW, WEBB WW (1995). Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy. *In: Handbook of Biological Confocal Microscopy* (PAWLEY JB, ed) (Plenum Press, New York). pp 445–458. 142

- DENK W, STRICKLER JH, WEBB WW (1990). Two-photon fluorescence scanning microscopy. *Science* **248**: 73–75. 162
- DENK W, SVOBODA K (1997). Photon upmanship. Why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* **18**: 351–357. 142
- DEUSSING J, ROTH W, SAFTIG P, PETERS C, PLÖGH HL, VILLADANGOS JA (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4516–4521. 23
- DJUROVIC S, IVERSEN N, JEANSSON S, HOOVER F, CHRISTENSEN G (2004). Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes. *Mol Biotechnol* **28**: 21–32. 138
- EBERT DH, DEUSSING J, PETERS C, DERMODY TS (2002). Cathepsin L and cathepsin B mediate reovirus disassembly in murine fibroblast cells. *J Biol Chem* **277**: 24609–24617. 23
- EBERT W, KNOCH H, WERLE B, TREFZ G, MULEY T, SPIESS E (1994). Prognostic value of increased lung tumor tissue cathepsin B. *Anticancer Res* **14**: 895–899. 24
- ELLIOTT B, RICHARDSON C, WINDERBAUM J, NICKOLOFF JA, JASIN M (1998). Gene conversion tracts from double-strand break repair in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **18**: 93–101. 81
- ELSLIGER MA, WACHTER RM, HANSON GT, KALLIO K, REMINGTON SJ (1999). Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry* **38**: 5296–5301. 79, 139, 140
- EPEL B, PADGETT H, HEINLEIN M, BEACHY R (1996). Plant virus movement protein dynamics probed with a GFP-protein fusion. *Gene* **173**: 75–79. 158
- ERDAL H, BERNDTSSON M, CASTRO J, BRUNK U, SHOSHAN MC, LINDER S (2005). Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 192–197. Epub 2004 Dec 23. 114
- FAUBION WA, GUICCIARDI ME, MIYOSHI H, BRONK SF, ROBERTS PJ, SVINGEN PA, KAUFMANN SH, GORES GJ (1999). Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest* **103**: 137–145. 27
- FELDSTEIN AE, WERNEBURG NW, CANBAY A, GUICCIARDI ME, BRONK SF, RYDZEWSKI R, BURGART LJ, GORES GJ (2004). Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* **40**: 185–194. 114
- FELGNER PL, GADEK TR, HOLM M, ROMAN R, CHAN HW, WENZ M, NORTHROP JP, RINGOLD GM, DANIELSEN M (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413–7417. 63
- FIDLER IJ, YANO S, ZHANG RD, FUJIMAKI T, BUCANA CD (2002). The seed and soil hypothesis: vascularisation and brain metastases. *Lancet Oncol* **3**: 53–57. 24
- FISHER WG, WACHTER EA, LYTLE FE, ARMAS M, SEATON C (1998). Source-corrected two-photon excited fluorescence measurements between 700 and 880 nm. *Appl Spect* **52**: 536–545. 143
- FLORES-ROZAS H, KOLODNER RD (2000). Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **25**: 196–200. 140
- FOGHSGAARD L, LADEMANN U, WISSING D, POULSEN B, JÄÄTTELA M (2002). Cathepsin B mediates tumor necrosis factor-induced arachidonic acid release in tumor cells. *J Biol Chem* **277**: 39499–39506. 25
- FOGHSGAARD L, WISSING D, MAUCH D, LADEMANN U, BASTHOLM L, BÖS M, ELLING F, LEIST M, JÄÄTTELA M (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999–1010. 25
- FOSANG AJ, NEAME PJ, LAST K, HARDINGHAM TE, MURPHY G, HAMILTON JA (1992). The interglobular domain of cartilage aggrecan is cleaved by PUMP, gelatinases, and cathepsin B. *J Biol Chem* **267**: 19470–19474. 20
- FOX T, DE MIGUEL E, MORT JS, STORER AC (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**: 12571–12576. 18
- FRADKOV AF, CHEN Y, DING L, BARSOVA EV, MATZ MV, LUKYANOV SA (2000). Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possess a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett* Aug **479**: 127–130. 160
- GARCIA-PARAJO MF, KOOPMAN M, VAN DIJK EM, SUBRAMANIAM V, VAN HULST NF (2001). The nature of fluorescence emission in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14392–14397. 144
- GAZDAR AF (1986) Advances in the biology of non-small cell lung cancer. *Chest* **89**: 277S–283S. 134

- GLOMBIK MM, GERDES HH (2000). Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie* **82**: 315–326. 29
- GOLDFARB DS, GARIEPY J, SCHOOLNIK G, KORNBERG RD (1986). Synthetic peptides as nuclear localization signals. *Nature* **322**: 641–644. 31
- GONG Q, CHAN SJ, BAJKOWSKI AS, STEINER DF, FRANKFATER A (1993). Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol* **12**: 299–309. 26, 27
- GÖPPERT-MAYER M (1931). Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* **9**: 273–295. 162
- GÖRLICH D (1997). Nuclear protein import. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 412–419. 32
- GOULET B, BARUCH A, MOON NS, POIRIER M, SANSREGRET LL, ERICKSON A, BOGYO M, NEPVEU A (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* **14**: 207–219. 26, 152, 154, 157
- GRAHAM FL, VAN DER EB AJ (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**: 456–467. 63
- GRATTON E, BARRY NP, BERETTA S, CELLI A (2001). Multiphoton fluorescence microscopy. *Methods* **25**: 103–110. 142, 143
- GROSS LA, BAIRD GS, HOFFMAN RC, BALDRIDGE KK, TSIEN RY (2000). The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11990–11995. 144
- GUICCIARDI ME, DEUSSING J, MIYOSHI H, BRONK SF, SVINGEN PA, PETERS C, KAUFMANN SH, GORES GJ (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* **106**: 1127–1137. 25, 156
- GUICCIARDI ME, LEIST M, GORES GJ (2004). Lysosomes in cell death. *Oncogene* **23**: 2881–2890. 114
- GUINEC N, DALET-FUMERON V, PAGANO M (1993). ‘In vitro’ study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe Seyler* **374**: 1135–1146. 24, 146
- HABER JE (1999). DNA recombination: the replication connection. *Trends Biochem Sci* **24**: 271–275. 140, 141
- HAENSLER J, SZOKA FC JR (1993). Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* **4**: 372–379. 63
- HAMES BD, RICKWOOD D (eds) (1990). Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach (2nd ed) (Oxford University Press, New York). 57
- HANAHAH D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580. 46
- HANEWINKEL H, GLOSSL J, KRESSE H (1987). Biosynthesis of cathepsin B in cultured normal and I-cell fibroblasts. *J Biol Chem* **262**: 12351–12355. 18, 23
- HASNAIN S, HUBER CP, MUIR A, ROWAN AD, MORT JS (1992). Investigation of structure function relationships in cathepsin B. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 413–418. 20
- HEIDTMANN HH, SALGE U, ABRAHAMSON M, BENCINA M, KASTELIC L, KOPITAR-JERALA N, TURK V, LAH TT (1997). Cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors in human lung cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* **15**: 368–381. ... 134, 150, 151
- HEIDTMANN HH, SALGE U, HAVEMANN K, KIRSCHKE H, WIEDERANDERS B (1993). Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol Res* **5**: 441–451. 24
- HEIKAL AA, HESS ST, BAIRD GS, TSIEN RY, WEBB WW (2000). Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11996–12001. 79, 139, 143
- HEIM R, CUBITT AB, TSIEN RY (1995). Improved green fluorescence. *Nature* **373**: 663–664. 159
- HEIM R, PRASHER DC, TSIEN, RY (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 12501–12504. 158
- HEIM R, TSIEN RY (1996). Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* **6**: 178–182. 159, 160
- HELL SW, BOOTH M, WILMS S, SCHNETTER CM, KIRSCH AK, ARNDT-JOVIN DJ, JOVIN T (1998). Two-photon near and far-field fluorescence microscopy with continuous-wave excitation. *Opt Lett* **23**: 1238–1240. 144

- HENTZE H, LIN XY, CHOI MS, PORTER AG (2003). Critical role for cathepsin B in mediating caspase-1-dependent interleukin-18 maturation and caspase-1-independent necrosis triggered by the microbial toxin nigericin. *Cell Death Differ* **10**: 956–968. 25
- HIESINGER PR, FISCHBACH K-F (2000). Hochauflösende und dreidimensionale Visualisierung der Gehirnentwicklung von *Drosophila*. *Biospektrum* **6**: 408–411. 71
- HODEL MR, CORBETT AH, HODEL AE (2001). Dissection of a nuclear localization signal. *J Biol Chem* **276**: 1317–1325. 31
- HONN KV, TIMAR J, ROZHIN J, BAZAZ R, SAMENI M, ZIEGLER G, SLOANE BF (1994). A lipoxygenase metabolite, 12-(S)-HETE, stimulates protein kinase C-mediated release of cathepsin B from malignant cells. *Exp Cell Res* **214**: 120–130. 30
- HOPT A, NEHER E (2001). Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J* **80**: 2029–2036. 137
- HUANG Q, RAYA A, DEJESUS P, CHAO SH, QUON KC, CALDWELL JS, CHANDA SK, IZPISUA-BELMONTE JC, SCHULTZ PG (2004). Identification of p53 regulators by genome-wide functional analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 3456–3461. 61
- HUET G, FLIPO RM, COLIN C, JANIN A, HEMON B, COLLYN-D'HOOGHE M, LAFYATIS R, DUQUESNOY B, DEGAND P (1993). Stimulation of the secretion of latent cysteine proteinase activity by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1. *Arthritis Rheum* **36**: 772–780. 30
- ILLY C, QURAIISHI O, WANG J, PURISIMA E, VERNET T, MORT JS (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* **272**: 1197–1202. 20
- IMAMOTO N (2000). Diversity in nucleocytoplasmic transport pathways. *Cell Struct Funct* **25**: 207–216. 28
- INOUE S & TSUJI FI (1994a). *Aequorea* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein. *FEBS Letters* **341**: 277–280. 158
- INOUE S & TSUJI FI (1994b). Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Letters* **351**: 211–214. 158
- ISIDORO C, HORST M, BACCINO FM, HASILIK A (1991). Differential segregation of human and hamster cathepsin D in transfected baby-hamster kidney cells. *Biochem J* **273**: 363–367. 146
- JAKOBS S, SUBRAMANIAM V, SCHONLE A, JOVIN TM, HELL SW (2000). EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett* **479**: 131–135. 144
- JANS DA, XIAO CY, LAM MH (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* **22**: 532–544. 28
- JOHNSON RD, LIU N, JASIN M (1999). Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* **401**: 397–399. 141
- KAHANA J, SCHAPP B, SILVER P (1995). Kinetics of spindle pole body separation in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9707–9711. 158
- KALDERON D, RICHARDSON WD, MARKHAM AF, SMITH AE (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33–38. 31
- KEMINER O, PETERS R (1999). Permeability of single nuclear pores. *Biophys J* **77**: 217–228. 32
- KESSEL D, LUO Y, MATHIEU P, REINERS JJ JR (2000). Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol* **71**: 196–200. 114
- KIEFER K, CLEMENT J, GARIDEL P, PESCHKA-SUSS R (2004). Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells. *Pharm Res* **21**: 1009–1017. 138
- KISELEVA E, GOLDBERG MW, CRONSHAW J, ALLEN TD (2000). The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**: 101–112. 28
- KNEEN M, FARINAS J, LI Y, VERKMAN AS (1998). Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys J* **74**: 1591–1599. 60, 79, 139
- KNOCH TA (2002). Approaching the three-dimensional organization of the human genome. Physikalisches Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Dissertation. 80
- KNOP M, BARR F, RIEDEL CG, HECKEL T, REICHEL C (2002). Improved version of the red fluorescent protein (drFP583/DsRed/RFP). *Biotechniques* **33**: 592,594,596–598 passim. 139

- KÖHLER CM, MERCHANT S, SCHATZ G (1999). How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci* **24**: 428–432. 30
- KOHN EC (1991). Invasion and metastasis: biology and clinical potential. *Pharmacol Ther* **52**: 235–244. 23
- KOMINAMI E, KUNIO I, KATUNUMA N (1987). Activation of the intramyofibrillar autophagic-lysosomal system in muscular dystrophy. *Am J Pathol* **127**: 461–466. 23
- KOMINAMI E, TSUKAHARA T, HARA K, KATUNUMA N (1988). Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett* **231**: 225–228. 18
- KÖNIG K (2000). Multiphoton microscopy in life sciences. *J Microsc* **200**: 83–104. 136, 137, 142
- KÖNIG K, SO PT, MANTULIN WW, TROMBERG BJ, GRATTON E (1996). Two-photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. *J Microsc* **183**: 197–204. 136
- KONOPLEVA M, ZHAO S, XIE Z, SEGALL H, YOUNES A, CLAXTON DF, ESTROV Z, KORNBLAU SM, ANDREEFF M (1999). Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **457**: 217–236. 25
- KOS J, WERLE B, LAH T, BRUNNER N (2000). Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers* **15**: 84–89. 24
- KOWALCZYKOWSKI SC (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* **25**: 156–165. 140
- KREPELA E, KASAFIREK E, NOVAK K, VIKLICKY J (1990). Increased cathepsin B activity in human lung tumors. *Neoplasma* **37**: 61–70. 24
- KULIAWAT R, KLUMPERMAN J, LUDWIG T, ARVAN P (1997). Differential sorting of lysosomal enzymes out of the regulated secretory pathway in pancreatic beta-cells. *J Cell Biol* **137**: 595–608. 147
- LABAS YA, GURSKAYA NG, YANUSHEVICH YG, FRADKOV AF, LUKYANOV KA, LUKYANOV SA, MATZ MV (2002). Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4256–4261. 160
- LAH TT, KOS J (1998). Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* **379**: 125–130. 21
- LEYTUS SP, PATTERSON WL, MANGEL WF (1983). New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *Biochem J* **215**: 253–260. 21
- LIANG F, HAN M, ROMANIENKO PJ, JASIN M (1998). Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5172–5177. 81
- LIU N, RAJA SM, ZAZZERONI F, METKAR SS, SHAH R, ZHANG M, WANG Y, BROMME D, RUSSIN WA, LEE JC, PETER, ME, FRÖLICH CJ, FRANZOSO G, ASHTON-RICKARDT PG (2003). NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *EMBO J* **22**: 5313–5322. 25, 26
- LLOPIS J, MCCAFFERY JM, MIYAWAKI A, FARQUHAR MG, TSIEN RY (1998). Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6803–6808. 140
- LORENSEN WE, CLINE HE (1987) Marching cubes: A high resolution 3-D surface construction algorithm. *Comput Graph* **21**: 163–169. 71
- LORENZ WW, MCCANN RO, LONGIARU M, CORMIER MJ (1991). Isolation and expression of a cDNA encoding *Renilla reniformis* luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4438–4442. 158
- LUDIN B, DOLL T, MEILL R, KAECH S, MATUS A (1996). Application of novel vectors for GFP-tagging of proteins to study microtubule-associated proteins. *Gene* **173**: 107–111. 158
- MACH L, MORT JS, GLOSSL J (1994). Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. *J Biol Chem* **269**: 13036–13040. 22
- MACHLEIDT W, THIELE U, ASSFALG-MACHLEIDT I, FORGER D, AUERSWALD EA (1991). Molecular mechanism of inhibition of cysteine proteinases by their protein inhibitors: kinetic studies with natural and recombinant variants of cystatins and stefins. *Biomed Biochim Acta* **50**: 613–620. 151
- MACIEWICZ RA, WARDALE RJ, ETHERINGTON DJ, PARASKEVA C (1989). Immunodetection of cathepsins B and L present in and secreted from human pre-malignant and malignant colorectal tumour cell lines. *Int J Cancer* **43**: 478–486. 24
- MACIEWICZ RA, WOTTON SF (1991). Degradation of cartilage matrix components by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *Biomed Biochim Acta* **50**: 561–564. 24

- MADGE LA, LI JH, CHOI J, POBER JS (2003). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 21295–21306. 25
- MALAK H, CASTELLANO FN, GRYCZINSKI I, LAKOWICZ JR (1997). Two-photon excitation of ethidium bromide labeled DNA. *Biophys Chem* **67**: 35–41. 143
- MANIATIS T, FRITSCH EF, SAMBROOK J (ed) (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York). 46, 49
- MARKS N, BERG MJ (1987). Rat brain cathepsin L: characterization and differentiation from cathepsin B utilizing opioid peptides. *Arch Biochem Biophys* **259**: 131–143. 21
- MASON RW, GAL S, GOTTESMAN MM (1987). The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell line as a catalytically active precursor form of cathepsin L. *Biochem J* **248**: 449–454. 18
- MATZ MV, FRADKOV AF, LABAS YA, SAVITSKY AP, ZARAISKY AG, MARKELOV ML, LUKYANOV SA (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**: 969–973. 160
- MCILVAINE TC (1921). A buffer solution for colorimetric comparison. *J Biol Chem* **49**: 183–186. 60
- MCNALLY JG, PREZA C, CONCHELLO JA, THOMAS LJ JR (1994). Artifacts in computational optical-sectioning microscopy. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **11**: 1056–1067. 136
- MCQUENEY MS, AMEGADZIE BY, D'ALESSIO K, HANNING CR, MCLAUGHLIN MM, McNULTY D, CARR SA, IJAMES C, KURDYLA J, JONES CS (1997). Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* **272**: 13955–13960. 18
- MEHTANI S, GONG Q, PANELLA J, SUBBIAH S, PEFFLEY DM, FRANKFATER A (1998). *In vivo* expression of an alternatively spliced human tumor message that encodes a truncated form of cathepsin B. Subcellular distribution of the truncated enzyme in COS cells. *J Biol Chem* **273**: 13236–13244. 26, 145, 152, 155, 156, 157
- MELO RL, BARBOSA POZZO RC, ALVES LC, PERISSUTTI E, CALIENDO G, SANTAGADA V, JULIANO L, JULIANO MA (2001). Synthesis and hydrolysis by cathepsin B of fluorogenic substrates with the general structure benzoyl-X-ARG-MCA containing non-natural basic amino acids at position X. *Biochim Biophys Acta* **1547**: 82–94. 21
- MICHALLET MC, SALTEL F, PREVILLE X, FLACHER M, REVILLARD JP, GENESTIER L (2003). Cathepsin-B-dependent apoptosis triggered by antithymocyte globulins: a novel mechanism of T-cell depletion. *Blood* **102**: 3719–3726. ... 25, 26
- MITRA R, SILVA C, YOUVAN D (1996). Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein. *Gene* **173**: 13–17. 166
- MIYAWAKI A (2002). Green fluorescent protein-like proteins in reef Anthozoa animals. *Cell Struct Funct* **27**: 343–347. ... 160
- MIYAWAKI A, LLOPIS J, HEIM R, MCCAFFERY J, ADAMS J, IKURA M, TSIEN R (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882–887. 160
- MIZUNO H, SAWANO A, ELI P, HAMA H, MIYAWAKI A (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochem* **40**: 2502–2510. 79
- MOIN K, DAY NA, SAMENI M, HASNAIN S, HIRAMA T, SLOANE BF (1992). Human tumour cathepsin B. Comparison with normal liver cathepsin B. *Biochem J* **285**: 427–434. 150
- MOORES S, SABRY J, SPUDICH J (1996). Myosin dynamics in live *Dictyostelium* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 443–446. 158
- MORIN J, HASTINGS J (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* **77**: 313–318. 158
- MORT JS, RECKLIES AD (1986). Interrelationship of active and latent secreted human cathepsin B precursors. *Biochem J* **233**: 57–63. 24
- MORT JS, RECKLIES AD, POOLE AR (1984). Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis Rheum* **27**: 509–515. 23
- MOSAMMAPARAST N, EWART CS, PEMBERTON LF (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J* **21**: 6527–6538. 156
- MULLINS JM, MCINTOSH JR (1982). Isolation and initial characterization of the mammalian midbody. *J Cell Biol* **94**: 654–661. 155
- MULLIS K, FALOONA F, SCHARF S, SAIKI R, HORN G, ERLICH H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**: 263–273. 47

- MÜNTENER K, WILLIMANN A, ZWICKY R, SVOBODA B, MACH L, BAICI A (2005). Folding competence of N-terminally truncated forms of human procathepsin B. *J Biol Chem* Jan 18; [Epub ahead of print] **18, 26, 152**
- MÜNTENER K, ZWICKY R, CSUCS G, BAICI A (2003). The alternative use of exons 2 and 3 in cathepsin B mRNA controls enzyme trafficking and triggers nuclear fragmentation in human cells. *Histochem Cell Biol* **119**: 93–101. **27, 116, 123**
- MÜNTENER K, ZWICKY R, CSUCS G, ROHRER J, BAICI A (2004). Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death. *J Biol Chem* **279**: 41012–41017. **26, 30, 116, 127, 148, 152, 153, 156, 157**
- MURATA M, MIYASHITA S, YOKOO C, TAMAI M, HANADA K, HATAYAMA K, TOWATARI T, NIKAWA T, KATUNUMA N (1991). Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, *in vitro*. *FEBS Lett* **280**: 307–310. **22**
- MUSIL D, ZUCIC D, TURK D, ENGH RA, MAYR I, HUBER R, POPOVIC T, TURK V, TOWATARI T, KATUNUMA N, *et al.* (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* **10**: 2321–2330. **19, 20**
- NEUHOFF V, AROLD N, TAUBE D, EHRHARDT W (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**: 255–262. **57**
- NISHIMURA Y, FURUNO K, KATO K (1988). Biosynthesis and processing of lysosomal cathepsin L in primary cultures of rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* **263**: 107–116. **18**
- NISHIMURA Y, KAWABATA T, KATO K (1988). Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing *in vitro*. *Arch Biochem Biophys* **261**: 64–71. **30**
- NIXON RA, CATALDO AM (1993). The lysosomal system in neuronal cell death: a review. *Ann NY Acad Sci* **679**: 87–109. . **25**
- OLSON K, MCINTOSH J, OLMSTEAD J (1995). Analysis of MAP4 function in living cells using green fluorescent protein (GFP) chimeras. *J Cell Biol* **130**: 639–650. **158**
- ONUIGBO WI (1975). Human model for studying seed-soil factors in blood-borne metastasis. *Arch Pathol* **99**: 342–343. **23**
- ORMÖ M, CUBITT AB, KALLIO K, GROSS LA, TSIEN RY, REMINGTON SJ (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**: 1392–1395. **158, 160**
- OZEKI Y, TAKISHIMA K, TAKAGI K, AIDA S, TAMAI S, MAMIYA G, OGATA T (1993). Immunohistochemical analysis of cathepsin B expression in human lung adenocarcinoma: the role in cancer progression. *Jpn J Cancer Res* **84**: 972–975. **24**
- PADDOCK S (2001). A brief history of time-lapse. *Biotechniques* **30**: 283–286, 288–289. **165**
- PATTERSON G, DAY RN, PISTON D (2001). Fluorescent protein spectra. *J Cell Sci* **114**: 837–838. **160**
- PATTERSON GH, KNOBEL SM, SHARIF WD, KAIN SR, PISTON DW (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* **73**: 2782–2790. **139**
- PATTERSON GH, PISTON DW (2000). Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophys J* **78**: 2159–2162. **16, 142**
- PATTERSON GH, PISTON DW, BARISAS BG (2000). Forster distances between green fluorescent protein pairs. *Anal Biochem* **284**: 438–440. **16**
- PATTERSON SD, SPAHR CS, DAUGAS E, SUSIN SA, IRINOPOULOU T, KÖHLER C, KRÖMER G (2000). Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ* **7**: 137–144. **156**
- PENNACCHIO LA, BOULEY DM, HIGGINS KM, SCOTT MP, NOEBELS JL, MYERS RM (1998). Progressive ataxia, myoclonic epilepsy and cerebellar apoptosis in cystatin B-deficient mice. *Nat Genet* **20**: 251–258. **151**
- PENTZ S, HÖRLER H (1992). A variable cell culture chamber for ‘open’ and ‘closed’ cultivation, perfusion and high microscopic resolution of living cells. *J Microsc* **167**: 97–103. **62**
- PERIASAMY A, SKOGLUND P, NOAKES C, KELLER R (1999). An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus morphogenesis*. *Microsc Res Tech* **47**: 172–181. **142**
- PHAIR RD, MISTELI T (2000). High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* **404**: 604–609. **69, 122, 156**
- PICCINI A, PERKUS ME, PAOLETTI E (1987). Vaccinia virus as an expression vector. *Methods Enzymol* **153**: 545–563. **63**
- PIETRAS RJ AND ROBERTS JA (1981). Cathepsin B like enzymes: Subcellular distribution and properties in neoplastic and control cells from human ectocervix. *J Biol Chem* **256**: 8536–8542. **26, 147**

- PIETRAS RJ, SZEGO CM, ROBERTS JA, SEELER BJ (1981). Lysosomal cathepsin B-like activity: mobilization in prereplicative and neoplastic epithelial cells. *J Histochem Cytochem* **29**: 440–450. **30, 153**
- PISTON DW (1999). Imaging living cells and tissues by two-photon excitation microscopy. *Trends Cell Biol* **9**: 66–69. **142, 144, 162**
- PISTON DW, PATTERSON GH, KNOBEL SM (1999). Quantitative imaging of the green fluorescent protein (GFP). *Methods Cell Biol* **58**: 31–48. **16, 138**
- PIZZORNO MC (2001). Nuclear cathepsin B-like protease cleaves transcription factor YY1 in differentiated cells. *Biochim Biophys Acta* **1536**: 31–42. **26, 153**
- PODGORSKI I, SLOANE BF (2003). Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. *Biochem Soc Symp* **70**: 263–276. **24**
- POLLOK BA, HEIM R (1999). Using GFP in FRET-based applications. *Trends Cell Biol* **9**: 57–60. **139, 166**
- POOLE AR, WILLIAMS DC (1968). The role of lysosomal enzymes in malignant growth. *Biochem J* **110**: 6P–7P. **24**
- PORWOL T, STROHMAIER AR, SPIESS E (1999). Cytotomography. *Methods Enzymol* **307**: 108–118. **71**
- PRASHER D, ECKENRODE V, WARD W, PRENDERGAST F, CORMIER M (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**: 229–233. **158**
- RAWLINGS ND, BARRETT AJ (2000). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **28**: 323–325. **16, 168**
- REED CH (2000). Diagnostic applications of cystatin C. *Br J Biomed Sci* **57**: 323–329. **22**
- REINHECKEL T, DEUSSING J, ROTH W, PETERS C (2001). Towards specific functions of lysosomal cysteine peptidases: phenotypes of mice deficient for cathepsin B or cathepsin L. *Biol Chem* **382**: 735–741. **23**
- REMINGTON SJ (2000). Structural basis for understanding spectral variations in green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **305**: 196–211. **139**
- REMY JS, SIRLIN C, VIERLING P, BEHR JP (1994). Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* **5**: 647–654. **63**
- RESCHELEIT DK, ROMMERSKIRCH WJ, WIEDERANDERS B (1996). Sequence analysis and distribution of two new human cathepsin L splice variants. *FEBS Lett* **394**: 345–348. **26**
- RIBBECK K, GÖRLICH D (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J* **20**: 1320–1330. **32**
- RICCIO M, DI GIAIMO R, PIANETTI S, PALMIERI PP, MELLI M, SANTI S (2001). Nuclear localization of cystatin B, the cathepsin inhibitor implicated in myoclonus epilepsy (EPM1). *Exp Cell Res* **262**: 84–94. **26, 150, 151**
- RICHARDSON C, JASIN M (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* **405**: 697–700. **141**
- RICKWOOD D, MESSENT A, PATEL D (1997). Isolation and characterization of nuclei and nuclear subfractions. In: *Subcellular Fractionation: A Practical Approach*. (GRAHAM JM, RICKWOOD D, eds) (IRL Press, Oxford). pp 73–105. **64**
- ROBBINS J, DILWORTH SM, LASKEY RA, DINGWALL C (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplamin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**: 615–623. **32**
- ROBERTS LR, ADJEI PN, GORES GJ (1999). Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem Biophys* **30**: 71–88. **27**
- ROBERTS LR, KUROSAWA H, BRONK SF, FESMIER PJ, AGELLON LB, LEUNG WY, MAO F, GORES GJ (1997). Cathepsin B contributes to bile salt-induced apoptosis of rat hepatocytes. *Gastroenterology* **113**: 1714–1726. **25, 27, 157**
- RODRIGUES F, VAN HEMERT M, STEENSMA HY, CORTE-REAL M, LEO C (2001). Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **183**: 3791–3794. **139**
- ROSHY S, SLOANE BF, MOIN K (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* **22**: 271–286. **24**
- ROTH W, DEUSSING J, BOTCHKAREV VA, PAULY-EVERS M, SAFTIG P, HAFNER A, SCHMIDT P, SCHMAHL W, SCHERER J, ANTON-LAMPRECHT I, VON FIGURA K, PAUS R, PETERS C (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* **14**: 2075–2086. **23**
- ROTHER G, KLINGEL S, ASSFALG-MACHLEIDT I, MACHLEIDT W, ZIRKELBACH C, BANATI RB, MANGEL WF, VALET G (1992). Flow cytometric analysis of protease activities in vital cells. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 547–554. **21**

- ROWAN AD, MASON P, MACH L, MORT JS (1992). Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form *in vitro*. *J Biol Chem* **267**: 15993–15999. 18
- ROZMAN J, STOJAN J, KUHELJ R, TURK V, TURK B (1999). Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* **459**: 358–362. 18
- SACCHETTI A, CICCOCIOPPO R, ALBERTI S (2000). The molecular determinants of the efficiency of green fluorescent protein mutants. *Histol Histopathol* **15**: 101–107. 140
- SACCHETTI A, SUBRAMANIAM V, JOVIN TM, ALBERTI S (2002). Oligomerization of DsRed is required for the generation of a functional red fluorescent chromophore. *FEBS Lett* **525**: 13–19. 139
- SALVESEN GS (2001). A lysosomal protease enters the death scene. *J Clin Invest* **107**: 21–22. 15, 25
- SEDO A, MANDYS V, KREPELA E (1996). Cell membrane-bound proteases: not ‘only’ proteolysis. *Physiol Res* **45**: 169–176. 24
- SELLITTO C, KURIYAMA R (1988). Distribution of a matrix component of the midbody during the cell cycle in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* **106**: 431–439. 155
- SHANNON P, PENNACCHIO LA, HOUSEWEART MK, MINASSIAN BA, MYERS RM (2002). Neuropathological changes in a mouse model of progressive myoclonus epilepsy: cystatin B deficiency and Unverricht-Lundborg disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**: 1085–1091. 151
- SHARIAT-MADAR Z, SCHMAIER AH (1999). Kininogen-cytokeratin 1 interactions in endothelial cell biology. *Trends Cardiovasc Med* **9**: 238–244. 22
- SHAW PJ, RAWLINS DJ (1991). The point-spread of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *J Microsc* **163**: 151–165. 136
- SHIGEKAWA K, DOWER WJ (1988). Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6**: 742–751. 63
- SHIMOMURA O, JOHNSON FH, SAIGA Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**: 223–227. 158
- SINHA AA, GLEASON DF, LIMAS C, REDDY PK, WICK MR, HAGEN KA, WILSON MJ (1989). Localization of cathepsin B in normal and hyperplastic human prostate by immunoperoxidase and protein A-gold techniques. *Anat Rec* **223**: 266–275. 153
- SINHA AA, JAMUAR MP, WILSON MJ, ROZHIN J, SLOANE BF (2001). Plasma membrane association of cathepsin B in human prostate cancer: biochemical and immunogold electron microscopic analysis. *Prostate* **49**: 172–184. 147
- SKOP AR, LIU H, YATES J 3RD, MEYER BJ, HEALD R (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* **305**: 61–66. 155
- SLEBOS RJ, TAYLOR JA (2001). A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* **281**: 212–219. 142
- SLOANE BF, DUNN JR, HONN KV (1981). Lysosomal cathepsin B: correlation with metastatic potential. *Science* **212**: 1151–1153. 24
- SLOANE BF, MOIN K, SAMENI M, TAIT LR, ROZHIN J, ZIEGLER G (1994). Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. *J Cell Sci* **107**: 373–384. 24, 30, 147
- SLOANE BF, MOIN K, SAMENI M, TAIT LR, ROZHIN J, ZIEGLER G (1994). Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene. *J Cell Sci* **107**: 373–384. 18
- SMITH RE, REYNOLDS CJ, ELDER EA (1992). The evolution of proteinase substrates with special reference to dipeptidylpeptidase IV. *Histochem J* **24**: 637–647. 21
- SMITH RE, VAN FRANK RM (1975). The use of amino acid derivatives of 4-methoxy- β -naphthylamine for the assay and subcellular localization of tissue proteinases. *Front Biol* **43**: 193–249. 21
- SMITH WL (1986). Two-photon absorption in condensed media. In: Handbook of Laser Science and Technology (WEBER J, ed) (CRC, Boca Raton, USA). pp 229–258. 142
- SPIESS E, BESTVATER F, HECKEL-POMPEY A, TOTH K, HACKER M, STOBRAWA G, FEURER T, WOTZLAW C, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, PORWOL T, ACKER H (2005). Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP, and EYFP. *J Microsc* **217**: 200–204. 86

- SPIESS E, BRÜNING A, GACK S, ULBRICHT B, SPRING H, TREFZ G, EBERT W (1994). Cathepsin B activity in human lung tumor cell lines: ultrastructural localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular level. *J Histochem Cytochem* **42**: 917–929. **26, 149, 153**
- SPRAGUE BL, PEGO RL, STAVREVA DA, MCNALLY JG (2004). Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J* **86**: 3473–3495. **70**
- STARK WM, BOOCOCK MR, SHERRATT DJ (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet* **8**: 432–439. Erratum: *Trends Genet* **9**: 45 (1993). **140**
- STELLER H (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**: 1445–1449. **25**
- STETLER-STEVENSON WG, AZNAVOORIAN S, LIOTTA LA (1993). Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* **9**: 541–573. **23**
- STOKA V, TURK B, SCHENDEL SL, KIM TH, CIRMAN T, SNIPAS SJ, ELLERBY LM, BREDESEN D, FREEZE H, ABRAHAMSON M, BRÖMME D, KRAJEWSKI S, REED JC, YIN XM, TURK V, SALVESEN GS (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* **276**: 3149–3157. **156**
- STREMMER A (2001). Molekulare Expression von Cathepsin B und Stefin B in Tumoren des humanen Bronchialkarzinoms. Medizinische Fakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. Dissertation. **66**
- STROHMAIER AR, PORWOL T, ACKER H, SPIESS E (1997). Tomography of cells by confocal laser scanning microscopy and computer-assisted three-dimensional image reconstruction: localization of cathepsin B in tumor cells penetrating collagen gels *in vitro*. *J Histochem Cytochem* **45**: 975–983. **26**
- STROHMAIER AR, PORWOL T, ACKER H, SPIESS E (2000). Three-dimensional organization of microtubules in tumor cells studied by confocal laser scanning microscopy and computer-assisted deconvolution and image reconstruction. *Cells Tissues Organs* **167**: 1–8. **71**
- STRYER L, HAUGLAND RP (1967). Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci USA* **58**: 719–726. **166**
- STUBBS MT, LABER B, BODE W, HUBER R, JERALA R, LENARCIC B, TURK V (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J* **9**: 1939–1947. **150**
- SUGDEN J (2004). Photochemistry of dyes and fluorochromes used in biology and medicine: some physicochemical background and current applications. *Biotech Histochem* **79**: 71–90. **137**
- SUKOH N, ABE S, OGURA S, ISOBE H, TAKEKAWA H, INOUE K, KAWAKAMI Y (1994). Immunohistochemical study of cathepsin B. Prognostic significance in human lung cancer. *Cancer* **74**: 46–51. **24**
- SWEDLOW JR, HU K, ANDREWS PD, ROOS DS, MURRAY JM (2002). Measuring tubulin content in *Toxoplasma gondii*: a comparison of laser-scanning confocal and wide-field fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 2014–2019. **136**
- SZPADERSKA AM, FRANKFATER A (2001). An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* **61**: 3493–3500. **24**
- TAKEDA A, JIMI T, WAKAYAMA Y, MISUGI N, MIYAKE S, KUMAGAI T (1992). Demonstration of cathepsins B, H and L in xenografts of normal and Duchenne-muscular-dystrophy muscles transplanted into nude mice. *Biochem J* **288**: 643–648. **23**
- TAO K, STEARNS NA, DONG J, WU QL, SAHAGIAN GG (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys*. **311**: 19–27. **146**
- TERRY BR, MATTHEWS EK, HASELOFF J (1995). Molecular characterisation of recombinant green fluorescent protein by fluorescence correlation microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **217**: 21–27. **79**
- THACKER J (1999). The role of homologous recombination processes in the repair of severe forms of DNA damage in mammalian cells. *Biochimie* **81**: 77–85. **140, 141**
- THIELE U, AUERSWALD EA, GEBHARD W, ASSFALG-MACHLEIDT I, POPOVIC T, MACHLEIDT W (1988). Inhibitorily active recombinant human stefin B. Gene synthesis, expression and isolation of an inhibitory active MS-2 pol-stefin B fusion protein and preparation of Des[Met1,2(2)]stefin B. *Biol Chem Hoppe Seyler* **369**: 1167–1178. **44, 55**
- THOMAS CF, WHITE JG (1998). Four-dimensional imaging: the exploration of space and time. *Trends Biotechnol* **16**: 175–182. **165**
- TOOZE J, HOLLINSHEAD M, HENSEL G, KERN HF, HOFACK B (1991). Regulated secretion of mature cathepsin B from rat exocrine pancreatic cells. *Eur J Cell Biol* **56**: 187–200. **30**

- TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 4350–4354. 57
- TSIEN RY (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem.* **67**: 509–544. 138
- TSIEN RY (1999). Rosy down for fluorescent proteins. *Nat Biotechnol* **17**: 954–957. 139
- TSIEN RY, WAGGONER AS (1995). Fluorophores for confocal microscopy: Photophysics and photochemistry. In: Handbook of Confocal Microscopy (PAWLEY J, ed) (Plenum Press). pp 267–277. 166
- TURK B, TURK D, TURK V (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* **1477**: 98–111. 20
- TURK V, BODE W (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* **285**: 213–219. 21
- TURK V, BRZIN J, KOTNIK M, LENARCIC B, POPOVIC T, RITONJA A, TRSTENJAK M, BEGIC-ODOBASIC L, MACHLEIDT W. (1986). Human cysteine proteinases and their protein inhibitors stefins, cystatins and kininogens. *Biomed Biochim Acta* **45**: 1375–1384. 21
- ULBRICHT B, HENNY H, HORSTMANN H, SPRING H, FAIGLE W, SPIESS E (1997). Influence of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) on the localization of cathepsin B and cathepsin L in human lung tumor cells. *Eur J Cell Biol* **74**: 294–301. 18, 30, 152
- UYTTERSROT N, COSTAGLIOLA S, MIOT F (1998). A new tool for efficient transfection of dog and human thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* **142**: 35–39. 63
- VAN DER STAPPEN JW, WILLIAMS AC, MACIEWICZ RA, PARASKEVA C (1996). Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D. *Int J Cancer* **67**: 547–554. 30
- VAN NOORDEN CJ, BOONACKER E, BISSELL ER, MEIJER AJ, VAN MARLE J, SMITH RE (1997). Ala-Pro-cresyl violet, a synthetic fluorogenic substrate for the analysis of kinetic parameters of dipeptidyl peptidase IV (CD26) in individual living rat hepatocytes. *Anal Biochem* **252**: 71–77. 21
- van Thor JJ, Pierik AJ, Nugteren-Roodzant I, Xie A, Hellingwerf KJ (1998). Characterization of the photoconversion of green fluorescent protein with FTIR spectroscopy. *Biochemistry* **37**: 16915–16921. 79
- VANCOMPENOLLE K, VAN HERREWEGHE F, PYNAAERT G, VAN DE CRAEN M, DE VOS K, TOTTY N, STERLING A, FIERS W, VANDENABEELE P, GROOTEN J (1998). Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* **438**: 150–158. 25, 153, 156
- VIADANA E, AU K-L (1975). Patterns of metastases in adenocarcinomas of man. An autopsy study of 4,728 cases. *J Med* **6**: 1–14. 23
- VON ARNIM AG, DENG XW, STACEY MG (1998). Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene* **221**: 35–43. 155
- VRZHESHCH PV, AKOVBIAN NA, VARFOLOMEYEV SD, VERKHUSHA VV (2000). Denaturation and partial renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions. *FEBS Lett* **487**: 203–208. 79
- WACHSMUTH M, WEIDEMANN T, MULLER G, HOFFMANN-ROHRER UW, KNOCH TA, WALDECK W, LANGOWSKI J (2003). Analyzing intracellular binding and diffusion with continuous fluorescence photobleaching. *Biophys J* **84**: 3353–3363. 122, 156
- WACHTER RM, ELSLIGER MA, KALLIO K, HANSON GT, REMINGTON SJ (1998). Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* **6**: 1267–1277. 139
- WAGHRAY A, KEPPLER D, SLOANE BF, SCHUGER L, CHEN YQ (2002). Analysis of a truncated form of cathepsin H in human prostate tumor cells. *J Biol Chem* **277**: 11533–11538. Epub 2002 Jan 16. 157
- WAKE CT, GUDEWICZ T, PORTER T, WHITE A, WILSON JH (1984). How damaged is the biologically active subpopulation of transfected DNA? *Mol Cell Biol* **4**: 387–398. 140
- WALL MA, SOCOLICH M, RANGANATHAN R (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat Struct Biol* **7**: 1133–1138. 140, 144, 160
- WANG S & HAZELRIGG T (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* **369**: 400–403. 158
- WARD W, ALVARADO L, RAWLINGS ND, ENGEL JC, FRANKLIN C, MCKERROW JH (1997). A primitive enzyme for a primitive cell: the protease required for excystation of *Giardia*. *Cell* **89**: 437–444. 23

- WARD WW, CODY CW, HART RC, CORMIER MJ (1980). Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochem Photobiol* **31**: 611–615. 158
- WEBER W, HELMS V, MCCAMMON JA, LANGHOFF PW (1999). Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 6177–6182. 87
- WEISS RE, LIU BC, AHLERING T, DUBEAU L, DROLLER MJ (1990). Mechanisms of human bladder tumor invasion: role of protease cathepsin B. *J Urol* **144**: 798–804. 24
- WERLE B, JÜLKE B, LAH T, SPIESS E, EBERT W (1997). Cathepsin B fraction active at physiological pH of 7.5 is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of human lung. *Br J Cancer* **75**: 1137–1143. 24, 59
- WERLE B, LOTTERLE H, SCHANZENBACHER U, LAH TT, KALMAN E, KAYSER K, BULZEBRUCK H, SCHIRREN J, KRASOVEC M, KOS J, SPIESS E (1999). Immunochemical analysis of cathepsin B in lung tumours: an independent prognostic factor for squamous cell carcinoma patients. *Br J Cancer* **81**: 510–519. 24
- WERNEBURG NW, GUICCIARDI ME, BRONK SF, GORES GJ (2002). Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**: G947–G956. 25, 27
- WHITE J, STELZER E (1999). Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol* **9**: 61–65. ... 156, 166
- WIEDEMANN N, FRAZIER AE, PFANNER N (2004). The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 14473–14476. 30
- WILDT S, DEUSCHLE U (1999). cobA, a red fluorescent transcriptional reporter for *Escherichia coli*, yeast, and mammalian cells. *Nat Biotechnol* **17**: 1175–1178. 139
- WILLIAMS RM, PISTON DW, WEBB WW (1994). Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry. *FASEB J* **8**: 804–813. 142
- WILLIAMS RM, ZIPFEL WR, WATT WW (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Current Opin Chem Biol* **5**: 603–608. 142
- XIA AD, WADA S, TASHIRO H, HUANG WH (1999). One- and two-photon-induced fluorescence from recombinant green fluorescent protein. *Arch Biochem Biophys* **372**: 280–284. 143
- XU C, WEBB W (1996). Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J Opt Soc Am B* **13**: 481–491. 142, 143
- XU C, ZIPFEL W, SHEAR JB, WILLIAMS RM, WEBB WW (1996). Multiphoton fluorescence excitation: new spectral windows for biological non-linear microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 10763–10768. 143
- YAN S, BERQUIN IM, TROEN BR, SLOANE BF (2000). Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma. *DNA Cell Biol* **19**: 79–91. 26
- YAN S, SLOANE BF (2003). Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* **384**: 845–854. 26
- YANG F, MOSS LG, PHILLIPS, GN (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnol* **14**: 1246–1251. 158
- YANG TT, SINAI P, GREEN G, KITTS PA, CHEN YT, LYBARGER L, CHERVENAK R, PATTERSON GH, PISTON DW, KAIN SR (1998). Improved fluorescence and dual color detection with enhanced blue and green variants of the green fluorescent protein. *J Biol Chem* **273**: 8212–8216. 159
- YARBROUGH D, WACHTER RM, KALLIO K, MATZ MV, REMINGTON SJ (2001). Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 462–467. 144
- YONEDA Y (2000). Nucleocytoplasmic protein traffic and its significance to cell function. *Genes Cells* **5**: 777–787. 28
- YONEDA Y, HIEDA M, NAGOSHI E, MIYAMOTO Y (1999). Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell Struct Funct* **24**: 425–433. 32
- YONEDA Y, IMAMOTO-SONOBE N, YAMAIZUMI M, UCHIDA T (1987). Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp Cell Res* **173**: 586–595. 31
- YOUNG AT, LAKEY JR, MURRAY AG, MOORE RB (2002). Gene therapy: a lipofection approach for gene transfer into primary endothelial cells. *Cell Transplant* **11**: 573–582. 138
- YUAN XM, LI W, DALEN H, LOTEM J, KAMA R, SACHS L, BRUNK UT (2002). Lysosomal destabilization in p53-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 6286–6291. 25, 26

EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

Begutachtete Publikationen

- BESTVATER F, KNOCH TA, LANGOWSKI J, SPIESS E (2002a). Construct conversions caused by simultaneous co-transfection: “GFP-Walking”. *Biotechniques* **32**: 844–854. *†‡
- BESTVATER F, SPIESS E, STOBRAWA G, HACKER M, FEURER T, PORWOL T, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, WOTZLAW C, ACKER H (2002b). Two-photon fluorescence absorption and emission spectra of dyes relevant for cell imaging. *J Microsc* **208**: 108–115. *§
- GIL-PARRADO S, FERNÁNDEZ-MONTALVAN A, ASSFALG-MACHLEIDT I, POPP O, BESTVATER E, HOLLOSCHI A, KNOCH TA, AUERSWALD EA, WELSH K, REED JC, FRITZ H, FUENTES-PRIOR P, SPIESS E, SALVESEN GS, MACHLEIDT W (2002). Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem* **277**: 27217–27226. Epub 2002 May 8.
- GIL-PARRADO S, POPP O, KNOCH TA, ZÄHLER S, BESTVATER F, FELGENTRAGER M, HOLLOSCHI A, FERNANDEZ-MONTALVAN A, AUERSWALD EA, FRITZ H, FUENTES-PRIOR P, MACHLEIDT W, SPIESS E (2003). Subcellular localization and *in vivo* subunit interactions of ubiquitous μ -calpain. *J Biol Chem* **278**: 16336–16346. Epub 2003 Feb 18.
- BAUM M, BIELAU S, RITTNER N, SCHMID K, EGGELBUSCH K, DAHMS M, SCHLAUERSBACH A, TAHEDL H, BEIER M, GUIMIL R, SCHEFFLER M, HERMANN C, FUNK JM, WIXMERTEN A, REBSCHER H, HONIG M, ANDREAE C, BUCHNER D, MOSCHEL E, GLATHE A, JÄGER E, THOM M, GREIL A, BESTVATER F, OBERMEIER F, BURGMAIER J, THOME K, WEICHERT S, HEIN S, BINNEWIES T, FOITZIK V, MÜLLER M, STAHLER CF, STAHLER PF (2003). Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Res* **31**: e151.
- SPIESS E, BESTVATER F, HECKEL-POMPEY A, TOTH K, HACKER M, STOBRAWA G, FEURER T, WOTZLAW C, BERCHNER-PFANNSCHMIDT U, PORWOL T, ACKER H (2005). Two-photon excitation and emission spectra of the green fluorescent protein variants ECFP, EGFP, and EYFP. *J Microsc* **217**: 200–204.
- BESTVATER F, DALLNER C, SPIESS E (2005). The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability. *BMC Cell Biol* **6**:16.*

* Titelbild der jeweiligen Ausgabe

† „Hidden Jewels Top 10“ der „Faculty of 1000“ im September 2002 (Platz 3)

‡ Verkürzte Wiedergabe in: LABBE JP ed (2002). Fluorescent proteins change during simultaneous co-transfection. *Biophot Int* **4**: 59.

§ Die TPE-Spektren sind zusätzlich im Online-Spektrenkatalog „Curv-o-matic“ (Omega® Optical, Inc.; Brattleboro, VT, USA) wiedergegeben (<http://www.omegafilters.com/>).

Patentanmeldungen

BESTVATER F, KNOCH TA, SPIESS E (2002c). „Verfahren zur Untersuchung der homologen Rekombination“. Deutsche Patentanmeldung 101 16 826.8.

BESTVATER F, KNOCH TA, SPIESS E (2002d). „Nachweisverfahren für homologe Rekombinationsereignisse“. Internationale Patentanmeldung PCT/DE02/01207 (WO 02/081675 A2).

Vorträge

Tracking of EGFP-tagged cathepsin B in living cells (1998). Towards 4D Light Microscopy. European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany.

Live cell imaging of GFP-chimeras by two-photon excitation (2000). Nikon-Workshop „Neue Techniken und Applikationen in der Konfokalen Laser-Scan-Mikroskopie“. MPI für Molekulare Physiologie, Dortmund, Germany.

Posterpräsentationen und Abstracts

BESTVATER F, WERLE B, SPIESS E (1999). Expression, intracellular transport and secretion of cathepsin B in tumor cells. 1st General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS). Michigan, USA.

BESTVATER F, WERLE B, SPIESS E (1999). Mutational analysis of cathepsin B in tumor cells. VIth International Symposium on Proteinase Inhibitors and Biological Control. Brdo/Ljubljana, Slovenia.

STREMMER A, KAYSER K, BESTVATER F, SPIESS E, EBERT W, FIEHN W, WERLE B (2000). Imbalance between cathepsin B and stefin B-mRNA in tumors of patients with non-small cell lung cancer. In: Portoroz 2000 Organization committee (eds), 4th International Conference on Cysteine Proteinases and their Inhibitors: the New Millenium. Department of biochemistry and molecular biology, Jozef Stefan Institute, Ljubljana, Slovenia.

PORWOL T, BESTVATER F, SPIESS E, STOBRAWA G, HACKER M, FEURER T, ACKER H (2000). Multi photon excitation as a minimal invasive tool for imaging of oxygen sensing. Hypoxia and its Role In Angiogenesis. Centro Stefano Franscini-Workshop Mone Verità, Ascona, Switzerland.

GIL-PARRADO S, FERNÁNDEZ A, ASSFALG-MACHLEIDT I, POPP O, BESTVATER F, HOLLOSCHI A, FUENTES PRIOR P, AUERSWALD E, FRITZ H, SPIESS E, SALVESEN G, MACHLEIDT W (2001). Involvement of calpain in ionomycin-induced apoptosis. 2nd General Meeting of the International Proteolysis Society (IPS) associated with the International Conference on Protease Inhibitors (ICPI). Freising/Munich, Germany. L37.

Internetseite der Arbeitsgruppe „Biomedizinische Strukturanalyse“ des Deutschen Krebsforschungszentrums Heidelberg. Invasion and Metastasis of Tumor Cells (A0602):

<http://www.dkfz-heidelberg.de/a0600/a0602/context.html>