

Kurzfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Messung der Bindungskonstanten der Oestrogenrezeptoren, deren Konzentrationen großen Einfluss auf bestimmte Tumorphiliferationsraten haben. Die Bindungskonstanten (k_D -Werte) der Oestrogenrezeptoren α und β werden mit zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt, dem molekularbiologischen 'Bandshift-Assay' und der physikalischen Methode, der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.

Ausgehend von der RNA-Isolierung wird die Expression der Oestrogenrezeptoren ER- α und ER- β bis zum aufgereinigten biologisch aktiven Rezeptor durchgeführt. Mittels des 'Bandshift-Assay' werden die Bindungskonstanten der Rezeptoren bestimmt. Aus der Analyse ergibt sich für die Gleichgewichtskonstanten $k_{D-\alpha} = 0.42 \pm 0.03$ nM und $k_{D-\beta} = 0.33 \pm 0.028$ nM.

In systematischen Untersuchungen der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wird gezeigt, daß die statistischen Abweichungen der Messungen deutlich verringert werden können. Aus der Parametrisierung der fundamentale Autokorrelationsfunktion (AKF), welche die komplette Information der Messung enthält, wurden die Bindungskonstanten bestimmt.

Die mit der FCS-Methode ermittelten Bindungskonstanten betragen $k_{D-\alpha} = 0.62 \pm 0.015$ nM und $k_{D-\beta} = 0.28 \pm 0.008$ nM. Der Vergleich der beiden Methoden zeigt eine deutliche Zunahme der Genauigkeit der FCS-Messungen.

Abstract

This thesis describes the measurement of equilibrium binding constants for the estrogen-receptors by two methods, bandshift-assay and fluorescence correlation spectroscopy. The complete procedure of the protein expression (pro- and eucaryont cells), for the estrogen-receptor α and β , is successfully accomplished.

To determine the constants the molecular-biological 'bandshift-assay' method is used. Using this method the equilibrium constants are determined to $k_{D-\alpha} = 0.42 \pm 0.03$ nM and $k_{D-\beta} = 0.33 \pm 0.028$ nM.

Substantial systematic studies of the fluorescence correlation spectroscopy (fcs) are performed and a noticeable decrease of the statistical error of the measurements is achieved. The binding constants are determined by parametrisation of the fundamental autocorrelationfunction (acf) which contains the complete information of the measurement.

The equilibrium binding constants for the estrogen receptors measured by the fcs-method are: $k_{D-\alpha} = 0.62 \pm 0.015$ nM and $k_{D-\beta} = 0.26 \pm 0.008$ nM. Comparisons of the results of these two methods show that the precision of the fcs measurements is significantly improved.