

Intranukleäre Mobilität und Export der kleinen Untereinheit in humanen Zellen

vorgelegt von

Lisa Landvogt, geb. Büttner
aus Würzburg

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich–Wilhelms–Universität Bonn

Bonn im September 2017

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Merkel

Tag der Promotion: 04. April 2018
Erscheinungsjahr: 2018

*But there's no sense crying over every mistake.
You just keep on trying 'til you run out of cake.*

Portal

Zusammenfassung

Die Ribosomenbiogenese ist ein essentieller Prozess aller lebender Zellen, da ohne funktionale Ribosomen die Proteinsynthese in der Zelle zusammenbricht. Da der Prozess der Ribosomenbiogenese demnach so wichtig ist, wurde dieser bereits seit langem und detailliert untersucht. Dennoch blieb der Blick auf den Prozess ein statischer.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Biogenese auf Einzelmolekülebene *in vivo* durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Fluoreszenzmarkierung der in dieser Arbeit untersuchten kleinen Untereinheit *in vivo* gelang durch Dim2, einem Prozessierungsfaktor, der alle Vorläuferstufen der naszierenden Untereinheit begleitet. Dim2 wurde homolog als autofluoreszentes Fusionsprotein exprimiert, einmal mit eGFP, zum anderen mit einem Snap-Protein. Das Snap-Protein ist ein Derivat der O-6-Alkylguaninalkyltransferase und muss mit einem organischen Farbstoff gekoppelt werden. In dieser Arbeit wurde mit SiR-Snap gefärbt.

Zur Expression beider Fusionsproteine wurden sowohl transiente als auch stabile Transfektionen durchgeführt. Die stabil überexprimierende Zelllinie zeigte einen hohen Anteil an ungebundenem Dim2, sodass für die weiteren Mobilitätsuntersuchungen eine mit Tetracyclin induzierbare Zelllinie verwendet wurde.

Durch FRAP- und Einzelmolekülexperimente konnte die intranukleäre Mobilität des Dim2 und der kleinen Untereinheit erfolgreich bestimmt werden. Die gefundenen Trajektorien wurden auf zwei verschiedene Arten analysiert. In beiden Analysen wurden drei Mobilitätskomponenten gefunden. Eine frei diffundierende Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von etwa $D_f = 2,5 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$, eine verlangsamte von etwa $D_r = 0,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ sowie eine immobile Komponente von etwa $D_i = 0,05 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. In den beiden Kerndomänen Nukleolus und Nukleoplasma sind die drei Mobilitätskomponenten jedoch unterschiedlich stark vertreten. Während im Nukleolus die immobile Fraktion mit etwa 60 % den größten Anteil stellt und die mobile Fraktion mit etwa 7 % kaum vorhanden ist, sind im Nukleoplasma nur etwa 35 % der beobachteten Untereinheiten immobil.

Außer der intranukleären Mobilität wurde zusätzlich der Exportprozess der Vorläuferuntereinheit aus dem Kern heraus verfolgt. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Ansätze gewählt, um die Bewegung durch die Kernhülle visualisieren zu können. Einmal wurden Messungen auf Höhe des Zellkernäquators durchgeführt, die anderen Messungen auf dem Boden des Zellkerns. Damit waren Untereinheiten, die exportiert werden, einmal in horizontaler und einmal in vertikaler Bewegung zu beobachten. Es konnten allerdings nur einzelne Teilschritte des Exportprozesses abgebildet werden. Die ununterbrochene Beobachtung eines vollständigen Exportereignisses mit den Teilschritten Andocken - Transport - Loslösen gelang nicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
1.1	Zelle und Zellaufbau	1
1.1.1	HeLa-Zellen	2
1.1.2	Speicheldrüsen von <i>Chironomus tentans</i>	2
1.2	DNA und RNA-Typen	3
1.2.1	DNA	3
1.2.2	RNA	3
1.2.2.1	Boten-RNA	4
1.2.2.2	Ribosomale RNA	4
1.2.2.3	Kleine nukleoläre RNA	4
1.2.2.4	Transfer-RNA	4
1.3	Ribosomen und Translation	5
1.4	Nukleolus	7
1.5	Maturation der rRNA und Ribosomenbiogenese	8
1.6	Dim2	13
1.6.1	Aufbau von Dim2	13
1.6.2	Vergleich der Dim2-Sequenz unterschiedlicher Lebensformen	15
1.7	Exportprozesse in eukaryotischen Zellen	17
1.7.1	Kernporenkomplexe	17
1.7.2	Visualisierung des mRNA-Exports in fixiertem Gewebe	18
1.7.3	Visualisierung des mRNA-Exports <i>in vivo</i>	18
1.8	Motivation	22

2	Material	25
2.1	Chemikalien	25
2.2	Enzyme	27
2.3	Medien und Puffer	27
2.4	Plasmide	28
2.5	Oligonukleotide	29
2.6	Bakterienstämme	30
2.7	Farbstoffe	31
2.8	Zelllinien	31
2.9	Spezielle Geräte	32
2.10	Spezielles Verbrauchsmaterial	32
3	Methoden	33
3.1	Molekularbiologische Methoden	33
3.1.1	Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien	33
3.1.2	Plasmidamplifikation in Bakterien	33
3.1.3	Proteinexpression aus Bakterien	34
3.1.4	Färben der Proteine	34
3.2	Zellkultur	35
3.2.1	Passagieren von Zellen	35
3.2.2	Cryokonservierung von Zelllinien	35
3.2.3	Klonierungen	35
3.2.3.1	Klonierung von peGFP-c1-Dim2	35
3.2.3.2	Klonierung von pSnap-Dim2	37
3.2.3.3	Klonierung von pSnap-repair-Dim2	40
3.2.3.4	Klonierung von pQCXIP-eGFP-Dim2	41
3.2.3.5	Klonierung von pQCXIP-Snap-Dim2	43
3.2.4	Transiente Expression	43
3.2.5	Färben der Snap-Dim2-Zelllinien	43
3.2.5.1	Anfärben aller Snap-Moleküle	44
3.2.5.2	Färben für Einzelmolekülexperimente	44
3.3	Mikroskopie	45
3.3.1	FRAP-Experiment	46

3.3.2	Einzelmolekülmikroskopie	47
3.3.2.1	Äquatoriale Exportmessungen	48
3.3.2.2	Kompartimentabhängige Messungen der Mobilität	49
3.3.3	Automatisiertes Auffinden der Kernmembran	49
3.3.4	Lokalisieren von Signalen im Bereich der Kernmembran	50
3.3.5	Auffinden der Einzelmolekültrajektorien mit Hilfe von Diatrack	51
3.3.6	Analyse der Trajektorien	52
3.3.6.1	Analyse des mittleren Verschiebungsquadrates	52
3.3.6.2	Sprungweiten-Analyse der Trajektorien	53
3.3.6.3	Trajektorienanalyse mit vbSPT	54
3.3.7	Axiale Lokalisierung mittels der PSF-Verzerrung	54
3.3.7.1	Aufnahme und Auswertung des Kalibrationsdatensatzes	55
3.3.7.2	Datenakquise	57
3.3.7.3	Auswertung der Daten	58
4	Ergebnisse	61
4.1	Versuche mit rekombinantem Dim2	61
4.1.1	Proteinexpression und chemische Färbung	61
4.1.2	Funktionalitätskontrolle durch Mikroinjektion	61
4.2	Klonierung von stabil überexprimierenden Dim2-Zelllinien	64
4.2.1	Klonierung der Konstrukte zur transienten Expression	64
4.2.2	Klonierung der Vektoren zur stabilen Expression	65
4.2.3	Stabile konstitutiv überexprimierende Zelllinien	65
4.3	Klonierung von stabilen, induzierbaren Dim2-Zelllinien	67
4.3.1	Stabile induzierbare Zelllinien	67
4.3.2	Einfluss des Expressionslevels auf die intrazelluläre Mobilität	67
4.3.3	Intrazelluläre Verteilung von Dim2	69
4.4	Intranukleäre Mobilität von Dim2	70
4.4.1	Abschätzung der theoretischen Mobilität und der Lokalisierungsgenauigkeit	70
4.4.2	Kompartimentabhängige Mobilität	71
4.4.2.1	FRAP-Experimente in Nukleolus und Nukleoplasma	71
4.4.2.2	Einteilung der Zelle in Segmente	72
4.4.2.3	Mobilität im Nukleoplasma	74

4.4.2.4	Mobilität in den Nukleoli	75
4.4.2.5	Immobilisierung in den Trajektorien im Experiment	77
4.4.2.6	Immobilisierung von Partikeln in der Simulation	78
4.4.2.7	Sterischer Einfluss des Chromatins im Kern auf die Molekülbewegung	79
4.4.3	Transition vom Nukleolus zum Nukleoplasma und <i>vice versa</i>	82
4.5	Export der ribosomalen Untereinheit 40S	87
4.5.1	Abschätzung der Exportraten	87
4.5.2	Äquatoriale Untersuchungen	87
4.5.2.1	Lokalisieren der Kernmembran	88
4.5.2.2	Lokalisieren der ribosomalen Untereinheiten im Bereich Kernmembran	88
4.5.3	Äquatoriale Untersuchungen mit automatisierter Auswertung	89
4.5.3.1	Analyse ausgewählter Kategorien	95
4.5.4	Axiale Untersuchungen	97
4.5.4.1	Lokalisierungsgenauigkeit in den drei Raumrichtungen auf Basis von auf dem Deckglas immobilisierten TetraSpecks	97
4.5.4.2	Bestimmen der Kalibrationsgeraden bei Verwendung von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze	98
4.5.4.3	Lokalisierungsgenauigkeit bei Verwendung von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze	99
4.5.4.4	Chromatischer Fehler der axialen Lokalisierung	99
4.5.4.5	Trajektorien von Dim2 <i>in vivo</i>	102
4.5.4.6	Lokalisierung der Kernporen	103
5	Diskussion	105
5.1	Fluoreszenzmarkierung der ribosomalen Untereinheit <i>in vivo</i>	105
5.1.1	Heterologe Expression	105
5.1.2	Homologe Expression und stabile Zelllinien	106
5.1.3	Sterischer Einfluss der Fluoreszenzmarkierungen	106
5.2	Kompartimentabhängige Mobilität von Dim2 im Kern	109
5.2.1	Mobilität im Nukleolus und im Nukleoplasma im Vergleich	109
5.2.2	Transition	112
5.3	Exportmessungen der kleinen ribosomalen Untereinheit bei äquatorialer Membranbetrachtung	113

5.3.1	Wahrscheinlichkeitsabschätzung eines Exportereignisses	113
5.3.2	Bleichen und Helligkeit des Farbstoffs	115
5.3.3	Qualität der Membranmarkierung	115
5.3.4	Mobilität der kleinen ribosomalen Untereinheit an der Kernmembran	116
5.4	Exportmessungen der kleinen ribosomalen Untereinheit bei axialer Membranbe- trachtung	119
5.4.1	Messungen mit TetraSpecks	119
5.4.2	Messungen <i>in vivo</i>	119
5.4.2.1	Aufnahmen der Einzelmoleküle im roten Kanal	120
5.4.2.2	Aufnahmen der Kernporen	120
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	123
	Anhang	126
	Literaturverzeichnis	127
	Abbildungsverzeichnis	136
	Tabellenverzeichnis	139
	Abkürzungsverzeichnis	141

Kapitel 1

Einleitung und Motivation

In eukaryotischen Zellen finden sich eine Vielzahl an unterschiedlichen Kompartimenten und Organellen, wobei das größte Organell der Zellkern ist. Die Größe des Zellkerns variiert in verschiedenen Zelltypen jedoch deutlich. So ist beispielsweise in den Speicheldrüsen von *C. tentans* der Nukleus mit einem Durchmesser von etwa 75 μm sehr groß, wohingegen in Säugerzellen der Zellkern nur einen Durchmesser von etwa 10 μm besitzt. Ein Kompartiment innerhalb des Zellkerns ist der Nukleolus, der durch sein prominentes Aussehen bereits früh entdeckt wurde. So gab es bereits 1898 mehr als 700 Veröffentlichungen, die den Nukleolus beschrieben [Alberts et al., 2002]. Dennoch blieb die Funktion des Nukleolus unklar. Brown *et al.* konnten 1964 in Oozyten von *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) zeigen, dass Zellen ohne Nukleolus nicht lebensfähig sind [Brown und Gurdon, 1964]. 1966 konnte die Synthese ribosomaler RNA dort lokalisiert werden [Birnstiel et al., 1966]. Da die ribosomale Biogenese unentbehrlich für das Überleben einer Zelle ist, war und ist der Nukleolus und die Ribosomenbiogenese Gegenstand intensiver Forschung.

1.1 Zelle und Zellaufbau

Eine Zelle ist die kleinste mögliche Form von Leben. Eukaryotische Zellen unterscheiden sich von prokaryotischen Zellen durch das Vorhandensein eines abgegrenzten Zellkerns, in dem die genetische Information in Form der DNA gespeichert ist (Kapitel 1.2). Der Zellkern wird durch die Kernhülle vom restlichen Zelllumen abgegrenzt, wodurch die DNA vor schädlichen Einflüssen von außen besser geschützt ist. Da jedoch ein Stofftransport zwischen den beiden Kernkompartimenten gewährleistet sein muss, um zum einen die genetische Information in Form von RNA aus dem Zellkern zu transportieren, zum anderen jedoch Energie in Form von z.B. GTP oder ATP hineinzubringen, wird die Doppellipidschicht von Kernporen (*nuclear pore complex, NPC*) durchdrungen (Kapitel 1.7.1). Der perinukleäre Spalt zwischen den beiden Membranen der Doppelschicht beträgt etwa 20 nm bis 40 nm.

In den beiden folgenden Unterkapiteln sollen noch zwei spezifische Zelltypen kurz vorgestellt werden, die in dieser Arbeit oder anderen Arbeiten zum nukleären Export verwendet wurden.

1.1.1 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen waren die ersten Zellen, die sich in Form einer potentiell unsterblichen Zelllinie etablieren ließen, und sind bis heute die am weitesten verbreitete humane Zelllinie. Die Unsterblichkeit bringt jedoch einige Veränderungen der Zellen im Vergleich zu gesunden menschlichen Zellen mit sich. In gesunden Zellen findet bei jeder Zellteilung und der dafür nötigen DNA-Replikation eine Kürzung der Telomere, also der Chromosom-Enden, statt. Wenn diese Telomere eine kritische Länge erreicht haben, findet keine Zellteilung mehr statt und die Zelle stirbt. Diese Kürzung der Telomere wird in HeLa-Zellen durch ein Enzym namens Telomerase verhindert [Ivanković et al., 2007]. Zusätzlich wird in HeLa-Zellen das Protein p53, das als Tumorsuppressor wirkt, inaktiviert. Die Rolle von p53 besteht darin, bei DNA-Schädigung den Zellzyklus zu stoppen, so dass eine DNA-Replikation nicht mehr möglich ist. Gleichzeitig werden DNA-Reperaturmechanismen oder aber die Apoptose, der programmierte Zelltod, eingeleitet [Qian und Chen, 2010]. Die Unterdrückung der p53-Aktivität hat zur Konsequenz, dass sich das Genom von HeLa-Zellen deutlich von dem einer normalen humanen Zelle unterscheidet. Während eine normale humane Zelle einen diploiden Chromosomensatz mit 46 Chromosomen enthält, haben HeLa-Zellen einen hypertriploiden Chromosomensatz (also mindestens 70 Chromosomen) [Macville et al., 1999], wobei die zusätzlichen Chromosomen häufig abnormale Chromosomen sind. Diese Anhäufung von Chromothripsien wurde von [Landry et al., 2013] bestätigt, die weiterhin zeigen konnten, dass durch die hohe Anzahl an Chromosomen bis zu 2000 Gene überexprimiert werden. Diese Gene codieren Sequenzen zur Vermehrung, Transkription und DNA-Reparatur, sowie die rRNAs [Landry et al., 2013]. Diese Überexpression von rRNA in HeLa-Zellen könnte demnach Auswirkungen auf die Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zu gesunden humanen Zellen haben.

HeLa-Zellen wachsen als Monolayer direkt auf dem Deckglas, und sind während des Wachstums von Medium umgeben. Unter optimalen Bedingungen verdoppeln sich HeLa-Zellen alle 18 – 24 Stunden [Amineva et al., 2011]. Das Aussehen von HeLa-Zellen ist leicht dreieckig, wobei sich in der Mitte der Zelle ein elliptischer Kern befindet. Der Kern hat im Durchschnitt Halbachsen von 8 μm Länge, 6,4 μm Breite und 5,2 μm Höhe, woraus sich ein Kernvolumen von 1130 μm^3 und eine Kernoberfläche von 540 μm^2 ergibt [Ribbeck und Görlich, 2001].

1.1.2 Speicheldrüsen von *Chironomus tentans*

Ein anderer Zelltyp, der in der Erforschung der mRNA-Biogenese und des mRNA-Exports als Modellsystem etabliert ist, ist die Speicheldrüse von *C. tentans*. Bei den Speicheldrüsenzellen handelt es sich im Gegensatz zu den HeLa-Zellen nicht um eine Zelllinie, die in Kultur gehalten wird, sondern um für jedes Experiment frisch präpariertes Gewebe.

Die Zuckmücke *Chironomus tentans* hat einen für Insekten typischen Lebenszyklus, der sich in die vier Phasen Eistadium, Larvenstadium, Puppe, sowie adulte Erscheinungsform untergliedern lässt. Die Eiablage erfolgt in Wasser, sodass auch das Larvenstadium und die anschließende Verpuppung aquatisch stattfinden. Dort baut sich die Larve aus Umgebungspartikeln eine Röhre, die mit seidenartigen Speichelproteinen zusammengeklebt werden [Oliver, 1971]. Für den Bau dieser Röhre wird sehr viel Speichel benötigt, weshalb die Speicheldrüsen in den Larven von *C. tentans*

besonders stark ausgebildet sind. Die Speicheldrüsen haben eine Länge von etwa 1,5 mm bis 3 mm. Sie sind also mit bloßem Auge sichtbar. In einer Speicheldrüse befinden sich etwa 30-40 Zellen. Eine einzelne Zelle hat einen Durchmesser von 200 μm , der Zellkern einen Durchmesser von etwa 75 μm [Veith, 2011]. Die eigentliche Besonderheit des Modellsystems liegt nun in der Organisation der Chromosomen im Zellkern. Da die Speicheldrüsen zum Bau und Erhalt der Wohnröhre sehr viele Speichelproteine produzieren müssen, kommen die Chromosomen dort als Polytäanchrosomen vor. Jedes der vier Chromosomen ist also 8.000 bis 16.000 mal in jedem Zellkern vorhanden. Zudem liegen diese bis zu 16.000 Chromosomenstränge im Zellkern aligniert vor – alle Chromosomen liegen also in derselben Ausrichtung exakt nebeneinander. Durch die Vielzahl an Chromosomen und die schiere Größe der Zellen ist in diesem Modellsystem so eine Unterscheidung in chromatinhaltige und chromatinfreie Bereiche sehr leicht möglich.

1.2 DNA und RNA-Typen

1.2.1 DNA

Die DNA besteht aus den vier Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C), die zusammen alle genetischen Informationen der Zelle codieren. Um aus dieser codierten Information das dort hinterlegte Protein zu synthetisieren, muss diese entschlüsselt werden. Insgesamt gibt es 21 proteinogene Aminosäuren, die codiert werden müssen. Da zur Codierung jedoch nur 4 DNA-Basen zur Verfügung stehen, reichen diese als Code nicht aus. Auch eine Codierung aus 2 Basenpaaren würde nur für $4^2 = 16$ codierte Elemente ausreichen, sodass noch eine Base hinzugenommen werden muss. Da mit einem Code aus 3 Basenpaaren jedoch $4^3 = 64$ Kombinationen zur Verfügung stehen, ist der Code nun nicht mehr eineindeutig. So codiert beispielsweise für die beiden Aminosäuren Tryptophan und Methionin jeweils nur ein einziges Triplet, für Leucin hingegen gibt es sechs verschiedene Triplets.

Natürlich ist für eine Zelle essentiell, dass die auf der DNA abgelegte Information über das gesamte Leben der Zelle bewahrt bleibt. Daher liegt diese geschützt im Zellkern, während die Proteinbiosynthese in den Ribosomen im Zytoplasma stattfindet. Um nun die intranukleär gespeicherte Information zu den extranukleären Ribosomen zu bringen, wird eine Abschrift des betreffenden Abschnitts erstellt. Diese Abschrift erfolgt in Form der RNA.

1.2.2 RNA

Zwischen der in Abschnitt 1.2.1 vorgestellten DNA und der RNA bestehen mehrere Unterschiede. Zum einen wird in der RNA als komplementäre Base zu Adenin nicht Thymin, sondern Uracil (U), die unmethylierte Form von Thymin, verwendet. Zudem wird im Strang ein anderer Zucker verbaut. Während bei der DNA Desoxyribose zum Einsatz kommt, übernimmt diese Rolle in der RNA der Zucker Ribose. Diese zusätzliche Hydroxygruppe hat zur Folge, dass die RNA etwas weniger stabil als die DNA ist, da sie hydrolyseanfällig ist. Ein dritter Unterschied ist, dass RNA üblicherweise einsträngig vorliegt, die DNA hingegen als Doppelstrang. Da auf einer RNA nur Teile

der DNA dupliziert werden, sind die RNA-Stränge zumeist auch kürzer als die DNA-Stränge. RNAs können zahlreiche Aufgaben übernehmen, von denen nun einige, die im Verlauf dieser Arbeit noch erwähnt werden, kurz erläutert werden sollen.

1.2.2.1 Boten-RNA

Die Boten-RNA (mRNA, *messenger*-RNA) dient zum Transport der genetischen Information aus dem Zellkern. Hierzu wird die DNA mit Hilfe von Polymerasen durch die Transkription vervielfältigt. Da die Transkription auf dem DNA-Strang erfolgt, auf dem die Information gespeichert ist (*Antisense-Strang*), stellt die mRNA das Komplement dazu dar. Diese Transkripte werden anschließend aus dem Zellkern exportiert und die Information von einem Ribosom zu einem Protein übersetzt, wobei es durch die tRNA (Abschnitt 1.2.2.4) zur erneuten Umkehrung der DNA-Basen kommt (Kapitel 1.3).

1.2.2.2 Ribosomale RNA

Bei der ribosomalen RNA (rRNA) handelt es sich um RNA mit enzymatischer und struktureller Funktion. Insgesamt gibt es vier verschiedene rRNAs, die das Grundgerüst der Ribosomen bilden. Diese RNAs sind durch Peptidyltransferaseaktivität bei der Proteinbiosynthese katalytisch aktiv (Kapitel 1.3, [Alberts et al., 2002]).

1.2.2.3 Kleine nukleoläre RNA

Kleine nukleoläre RNAs (snoRNA, *small nucleolar*-RNA) codieren keine genetischen Informationen. Sie kommen üblicherweise nicht alleine, sondern zusammen mit Proteinen als snoRNP ($P = \text{Partikel}$) vor. Ihre Funktion besteht darin, durch gezielte Basenpaarung die Faltung und Modifikation anderer RNAs zu unterstützen. Man kennt zwei verschiedene Familien von snoRNAs, die unterschiedliche Modifikationen an der RNA durchführen.

1.2.2.4 Transfer-RNA

Bei der Transfer-RNA (tRNA) handelt es sich um kurze RNA-Abschnitte von etwa 80 Nukleotiden, die keine genetischen Informationen enthalten. Zusätzlich kommen in der tRNA weitere Basen neben A, U, G und C vor. Diese entstehen durch chemische Modifikation der vier bereits bekannten Basen, so gibt es beispielsweise Pseudouridin Ψ oder Dihydrouridin D. Außerdem gehört die tRNA zu den RNAs, die durch Basenpaarung eine dreidimensionale Struktur erhalten. tRNAs falten sich so, dass sich vier doppelsträngige Sequenzen bilden. Dies führt zu einer Struktur, die schematisch an ein Kleeblatt erinnert. Durch diese Struktur dient die tRNA als Brückenmolekül bei der Proteintranslation. Am 3'-Ende der RNA ist die Aminosäure gebunden, die durch einen Tripletcode kodiert wird. Das Anticodon zu diesem Triplet befindet sich in der tRNA in der Schleife, die der

gebundenen Aminosäure gegenüber liegt. Das Anticodon bildet während der Translation eine Bindung zur mRNA aus, was dafür sorgt, dass die passende Aminosäure in die wachsende Peptidkette eingebaut wird.

1.3 Ribosomen und Translation

Ribosomen sind essentiell für jede bekannte Form von Leben, da die Ribosomen der Ort der Translation sind. Hier wird die auf der DNA codierte Information in Proteine übersetzt. Ribosomen kommen in der Zelle sowohl einzeln frei im Zytoplasma, als auch gebunden an das Endoplasmatische Reticulum vor.

Ein Ribosom setzt sich während der Translation aus zwei Teilen zusammen: der großen 60S-, sowie der kleinen 40S-Untereinheit. „S“ steht hierbei für *Svedberg*. Dies ist eine Einheit für die Sedimentationsgeschwindigkeit. Die Sedimentationsgeschwindigkeit eines Partikels ist abhängig von seiner Größe und Beschaffenheit, sowie der Zentrifugengeschwindigkeit.

Beide Untereinheiten bestehen aus ribosomaler RNA (rRNA) sowie einer Vielzahl an Proteinen. In Eukaryoten besteht die große Untereinheit aus drei rRNAs und 46 Proteinen, die kleine Untereinheit aus einer rRNA und 33 Proteinen [Henras et al., 2015]. Die rRNA der kleinen Untereinheit ist die 18S-rRNA, die drei rRNAs der 60S-Untereinheit sind die 5S-, 5,8S sowie die 25/28S-rRNA. Die 25S-rRNA kommt in Hefen vor, die 28S-rRNA in höheren Eukaryoten. Die 5S-rRNA stellt einen Sonderfall unter den ribosomalen RNAs dar, da sie als einzige nicht von der Polymerase I, sondern von der Polymerase III transkribiert wird. Die Information zur 5S-rRNA liegt zudem auf Chromosom 1, welches nicht im Nukleolus lokalisiert ist. Die drei anderen rRNAs, also die 5,8S-, 18S- und 25/28S-rRNA, werden in einer gemeinsamen Vorläufer-rRNA im Nukleolus von der Polymerase I transkribiert und anschließend weiter prozessiert (Kapitel 1.5).

Um die Translation erfolgreich durchführen zu können, befinden sich im Inneren des zusammengesetzten Ribosoms drei tRNA-Bindungsstellen, diese werden A-, P-, und E-Platz genannt (Abbildung 1.1 b). A, P und E stehen hier für „*Arrival*“, „*Process*“ und „*Exit*“. Die Translation erfolgt auf der mRNA vom 5'-Ende zum 3'-Ende. Die mRNA durchläuft das Ribosom so, dass sich das 5'-Ende der mRNA am E-Platz befindet. Auf dem A-Platz befindet sich dementsprechend das Basentriplett, was als nächstes übersetzt werden soll. An dieses Basentriplett kann eine mit einer Aminosäure beladene tRNA binden, die in ihrem Anticodon das komplementäre Basentriplett zur mRNA im A-Platz trägt (Abbildung 1.1 a1). Daraufhin wird die zugehörige Aminosäure durch katalytische Wirkung der großen Untereinheit mit der bereits existierenden Peptidkette verknüpft, wodurch die Aminosäure von der tRNA auf dem P-Platz abgetrennt wird. Zusätzlich kommt es währenddessen zu einer Konformationsänderung des Ribosoms, wodurch beide tRNAs eine Position im Ribosom weiter geschoben werden. Die tRNA, die nun keine Aminosäure mehr trägt, befindet sich anschließend auf Position E. Die gerade neu an die Peptidkette geknüpfte Aminosäure samt zugehöriger tRNA wird auf den P-Platz verschoben (Abbildung 1.1 a2), sodass Position A wieder frei wird. Durch eine weitere Konformationsänderung wird nun die entladene tRNA aus dem E-Platz freigesetzt (Abbildung 1.1 a3). Das Ribosom schiebt sich entlang der mRNA in 3'-Richtung um drei Basen weiter und eine neue, beladene tRNA kann an Position A binden (Ab-

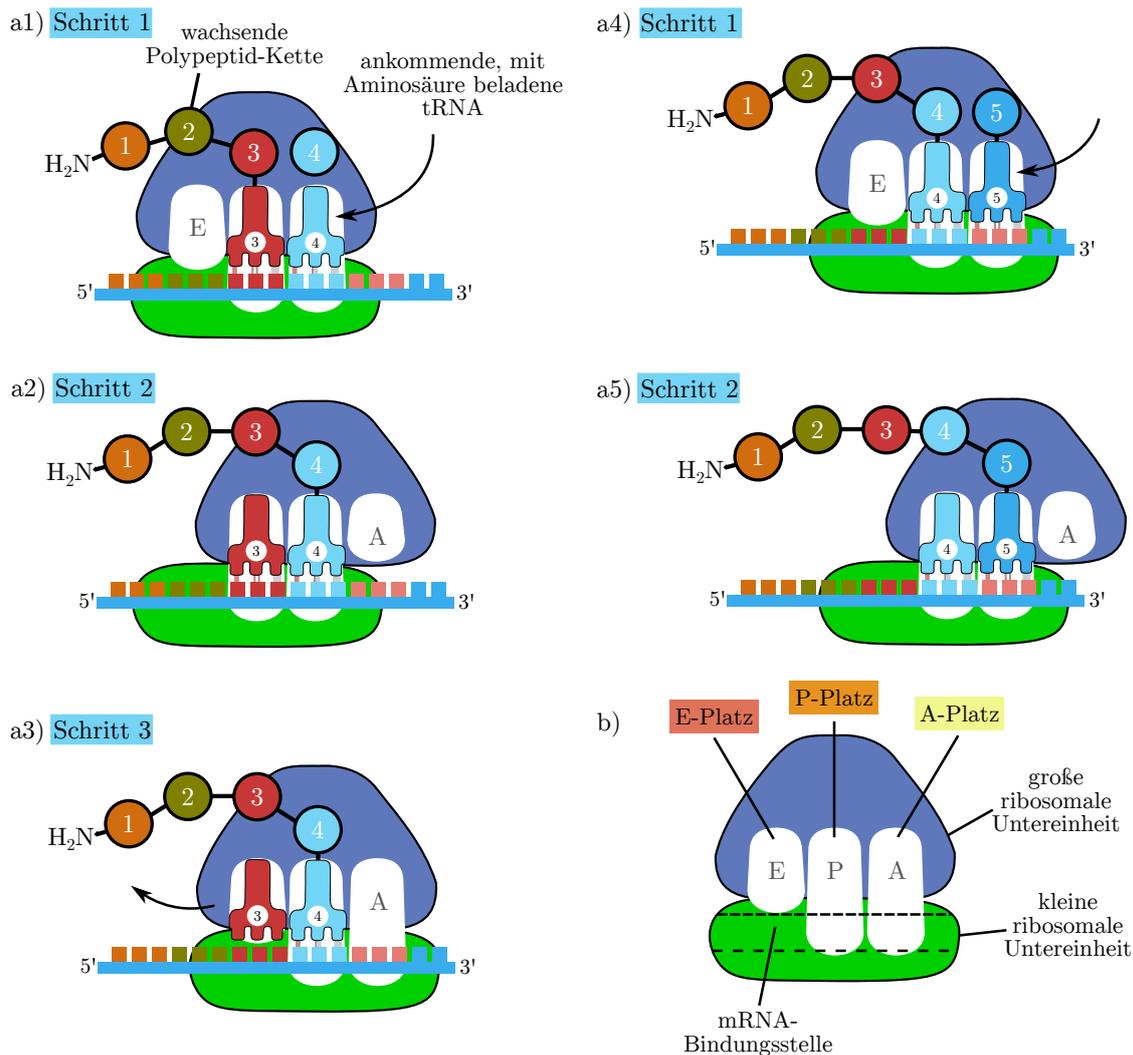


Abbildung 1.1: a) Schritte der Translation: a1) eine beladene tRNA kommt ins Ribosom, a2) durch eine Konformationsänderung kommt es zur Peptidbindung zwischen den Aminosäuren 3 und 4, a3) die entladene tRNA verlässt das Ribosom, a4) eine neue beladene tRNA kann binden, a5) der Replikationszyklus beginnt von vorne. b) Schematisch dargestelltes Ribosom; Abbildung nach [Alberts et al., 2002].

bildung 1.1 a4). Hiernach beginnt der Zyklus zur Elongation erneut (Abbildung 1.1 a5). Dadurch, dass sich immer zwei tRNAs gleichzeitig im Ribosom befinden müssen, um eine Peptidknüpfung zu realisieren, werden Lesefehler und somit inkorrekte Proteine durch Rasterverschiebung vermieden [Alberts et al., 2002].

In Hefezellen befinden sich normalerweise etwa 200.000 Ribosomen, in Säugerzellen, wie den in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen, befinden sich mit ungefähr 10 Millionen Ribosomen deutlich mehr. Um diese hohe Zahl an Ribosomen aufrecht zu erhalten, muss die Zelle in 24 Stunden 8 bis 10 Millionen neue Ribosomen herstellen, also etwa 7.500 Ribosomen pro Minute [Phipps et al., 2011, Goodfellow und Zomerdiik, 2013].

1.4 Nukleolus

Der Nukleolus ist ein Kompartiment innerhalb des Zellkerns, das zwar differenziert und deutlich zu erkennen ist, jedoch über keine Membran zur Abgrenzung gegenüber dem Nukleoplasma verfügt. Wie genau die Abgrenzung gegenüber der Umgebung erfolgt, ist noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand der Forschung. So kamen Brangwynne *et al.* in Versuchen mit Oozyten von *Xenopus laevis* (Krallenfrosch) zu dem Schluss, dass Nukleoli sich wie hochviskose Flüssigkeiten verhalten. Dies erklärt zum einen, dass Nukleoli üblicherweise kugelförmig erscheinen, als auch, dass im Lauf des Zellzyklus mehrere kleine zu wenigen großen Nukleoli fusionieren können [Brangwynne *et al.*, 2011, Marko, 2012]. Die Anzahl und die Größe der Nukleoli variiert im Zuge eines Zellzyklus, was in Abbildung 1.2 veranschaulicht ist. Während der Zellteilung löst sich der Nukleolus auf. Nach der Teilung kommt es zu einer Neuausbildung mehrerer Nukleoli um die sogenannten *nucleolar organizer regions (NOR)* herum, die dann zu einem großen Nukleolus verschmelzen [Alberts *et al.*, 2002, Boisvert *et al.*, 2007]. Die NORs sind die kurzen Arme der acrozentrischen Chromosome 13, 14, 15, 21 und 22. Auf diesen ist die genetische Information zur rRNA lokalisiert [Hernandez-Verdun *et al.*, 2010].

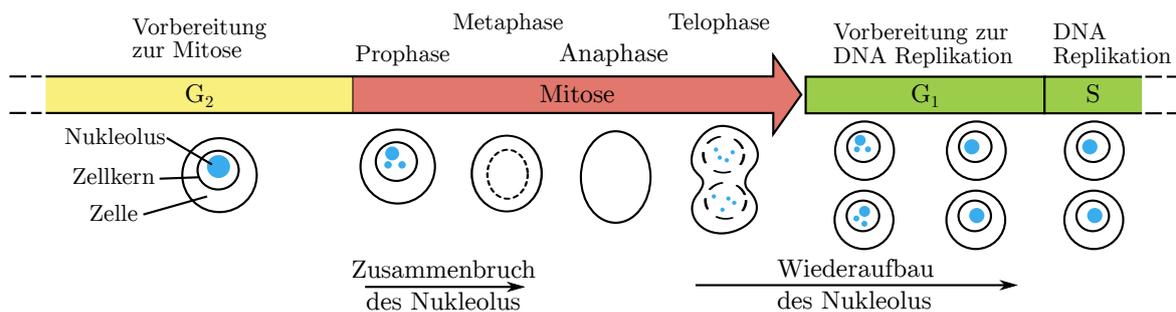


Abbildung 1.2: Fusion und Disruption der Nukleoli im Laufe des Zellzyklus. Abbildung verändert nach [Albert *et al.*, 2012].

Weiterhin ist aus elektronenmikroskopischen (EM) Studien über die Struktur bekannt, dass Nukleoli aus mehreren, unterschiedlich dichten Bereichen bestehen. Während sich in Amphibien nur zwei Bereiche unterscheiden lassen, finden sich bei Vögeln, Eidechsen und Säugern drei unterscheidbare Gebiete [Thiry und Lafontaine, 2005]. Diese drei Gebiete werden *fibrillar center (FC)*, *dense fibrillar components (DFC)* und *granular components (GC)* genannt. In jedem der drei Bereiche finden unterschiedliche Schritte der ribosomalen Biogenese statt (Abbildung 1.3 und Kapitel 1.5) [Sirri *et al.*, 2008].

Die FCs stellen den innersten Bereich der Nukleoli dar, sie bilden sich um inaktive NORs aus. In einer NOR befinden sich etwa 400 Kopien des 43 kb großen DNA-Motivs, das den rRNA-Precursor codiert. Diese inaktiven DNA-Abschnitte weisen einen hohen Methylierungsgrad auf, der verhindert, dass eine Bindung zur Polymerase I gebildet werden kann [Boisvert *et al.*, 2007]. Zusätzlich sind die rRNA-Gene im FC zu dichtem Heterochromatin kondensiert.

Die aktiven NORs sind im DFC lokalisiert und etwa zehnmal weniger kondensiert als die inaktiven NORs im FC [Boisvert *et al.*, 2007]. Im DFC findet die pre-rRNA-Synthese mit Hilfe der Polymerase I statt, sowie die frühen Maturierungsschritte [Phipps *et al.*, 2011].

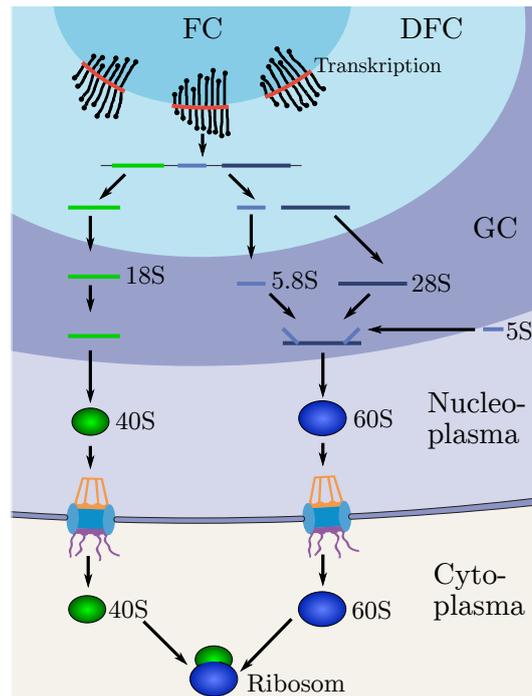


Abbildung 1.3: Die verschiedenen Bereiche des Nukleolus und ihre Funktion in der Ribosomenbiogenese. Die Transkription der rRNA findet auf der Grenze zwischen FC und DFC statt, im DFC schließen sich auch die frühen Maturationsschritte an. Im GC kommt es zu den späten Maturationsschritten, wonach die fast fertigen Untereinheiten zum Export ins Nucleoplasma entlassen werden. Abbildung verändert nach [Boisvert et al., 2007].

Im GC erfolgen anschließend die späten Maturierungsschritte. Zudem erfolgt hier auch der Zusammenbau der 5S-, 5,8S- und 25/28S-rRNA in das Vorläuferpartikel der großen Untereinheit [Phipps et al., 2011, Boisvert et al., 2007].

Wie konserviert sowohl der Prozess der ribosomalen Biogenese, als auch die Ausbildung von Nukleoli als Ort der Biogenese sind, konnten [Grob et al., 2014] in einem interessanten Experiment zeigen. Hierzu wurde eine Genkassette gebaut, die aus dem Polymerase I-Bindungsfaktor aus *X. laevis*, dem humanen Promoter, sowie den rDNA-Abschnitten aus Mäusen zusammengesetzt ist. Diese Kassette wurde in ein metazentrisches Chromosom in humanen Zellen eingebracht. Dieser neue Genabschnitt war sowohl dazu in der Lage, sich in Nukleoli zu organisieren, als auch, sich in bereits bestehende, native Nukleoli zu integrieren. Diese neu gebildeten Nukleoli führten zudem die Ribosomenbiogenese korrekt durch [Grob et al., 2014, McCann und Baserga, 2014].

1.5 Maturation der rRNA und Ribosomenbiogenese

Drei der vier rRNAs gehen aus einer einzigen Precursor-DNA hervor. Diese Precursor unterscheiden sich in verschiedenen biologischen Systemen deutlich. In Abbildung 1.4 sind die Precursor von Mensch und Hefe gezeigt. In *Saccharomyces cerevisiae* liegen etwa 150 Kopien der Precursor-DNA im Genom vor, in *Homo sapiens* gibt es 300-400 Kopien [Henras et al., 2015].

In den Precursor-rRNA-Strängen befinden sich bereits die 18S-, 5,8S- und die 25/28S-rRNAs. Die-

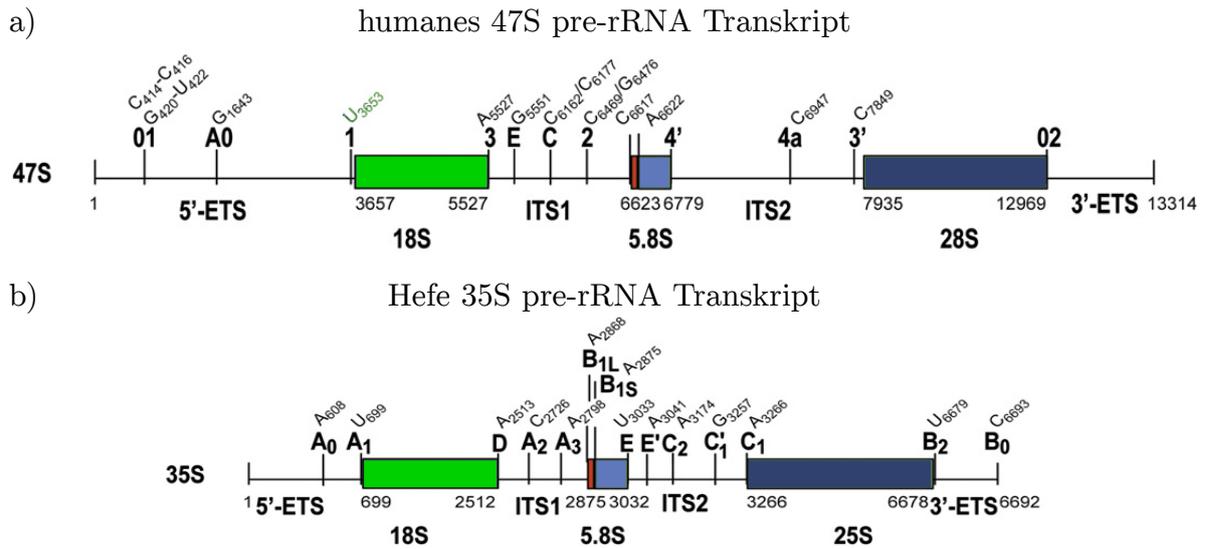


Abbildung 1.4: Precursor-rRNAs aus a) Mensch und b) Hefen im Vergleich. Die Anordnung der drei rRNAs ist in beiden Precursoren gleich, die Spacer zwischen den rRNA-Einheiten unterscheiden sich in ihrer Größe jedoch deutlich. Abbildung verändert aus [Mullineux und Lafontaine, 2012].

se sind in zwei interne (ITS) sowie zwei externe (ETS) Spacer eingebettet. Die externen Sequenzen befinden sich am Anfang und Ende des Precursors und sind daher nur mit einem rRNA-Abschnitt benachbart, wohingegen die internen Trennsequenzen zwischen zwei rRNA-Abschnitten zu finden sind. Dadurch, dass die drei ribosomalen RNAs immer gemeinsam abgelesen werden, entsteht auch immer dieselbe Anzahl an kleinen und großen Untereinheiten.

In Abbildung 1.4 sind zusätzlich die verschiedenen Schnittstellen eingezeichnet, die im Laufe der Biogenese durchtrennt werden müssen. Wie der Abbildung zu entnehmen ist, unterscheidet sich die Nomenklatur in den verschiedenen Systemen auch deutlich. So heißen die Schnittstellen im humanen Precursor 01/A', 02, 1, 2, 3, 3', 4', 4a, 4b, A0, C und E, wohingegen sie in Hefe A0-A3, B1-B2, C1-C2, D und E genannt werden [Fromont-Racine et al., 2003, Tafforeau et al., 2013, Mullineux und Lafontaine, 2012, Sloan et al., 2013, Henras et al., 2015]. Wie bereits in Kapitel 1.4 erläutert, ist die ribosomale Biogenese jedoch ein hoch konservierter Prozess. Die meisten Experimente zur Aufklärung wurden in *S. cerevisiae* durchgeführt, und für viele Faktoren, die in der Biogenese in Hefen eingebunden sind, konnten humane Analoga gefunden werden, die während der Maturierungsschritte analoge Aufgaben übernehmen. Die im folgenden Abschnitt aufgeführten Experimente und deren Erkenntnisse wurden in verschiedenen biologischen Systemen durchgeführt, dieses wird jeweils erwähnt.

Da die ribosomale Biogenese von essentieller Bedeutung für die Zelle ist, gibt es nicht nur einen Weg, in dem aus der 47S-rRNA die drei kleineren rRNAs hergestellt werden. Die alternativen Wege, die die Ribosombiogenese durchlaufen kann, sind in Abbildung 1.5 gezeigt. Das Schema bezieht sich auf den Maturierungsweg in humanen Zellen. An die naszierende pre-rRNA bindet zuerst der Subkomplex UtpA/t-Utp, welcher aus den *U-three-proteins* (Utp) 4, 5, 8, 9, 10, 15 und 17, sowie dem Protein Pol5 besteht [Dutca et al., 2011, Phipps et al., 2011]. Der Subkomplex ist zur Transkription der pre-rRNA sowohl in Hefen, als auch in humanen Zellen erforderlich. Die beiden U3-Proteine Utp8 und Utp9 sind nur in Hefe bekannt und haben anscheinend keine hu-

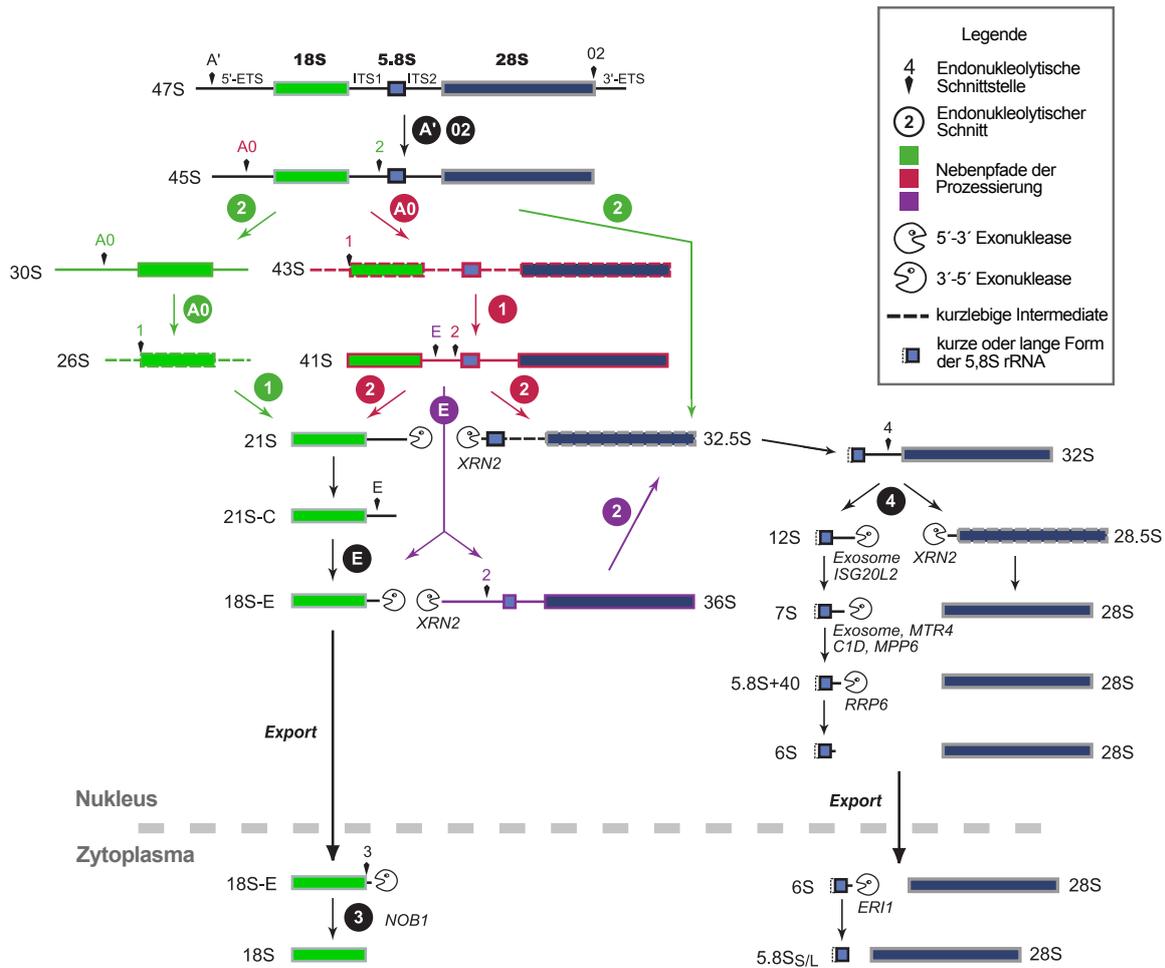


Abbildung 1.5: Gezeigt sind die unterschiedlichen Wege, wie aus dem rRNA-Präcursor in humanen Zellen die reifen rRNAs prozessiert werden. In weinrot ist der Hauptprozessierungsweg dargestellt. Abbildung verändert aus [Henras et al., 2015].

manen Analoga. Zu diesem Grundstock aus acht Proteinen werden weitere Faktoren sowie die U3-snoRNA selbst hinzugefügt. [Chaker-Margot et al., 2015] konnten zeigen, dass die zusätzlichen Faktoren konsekutiv zu sehr spezifischen Zeitpunkten an die naszierende rRNA gebunden werden. Die U3-snoRNA bildet mit den Faktoren das sogenannte *small subunit (SSU) processome*, also die Prozessierungsmaschine für die kleine Untereinheit. Diese besteht in Hefe (soweit bisher bekannt) aus der U3-snoRNA, 72 Proteinen, 10 RNA-Helicasen sowie deren Cofaktoren und diversen Endonukleasen, ATPasen, GTPasen und weiteren regulatorischen Proteinen [Phipps et al., 2011]. Die Größe der Prozessierungsmaschinerie wurde von unterschiedlichen Gruppen untersucht, die deutlich differierende Ergebnisse zu Tage brachten. So wurden 2011 von Phipps *et al.* 2,2 MDa postuliert [Phipps et al., 2011], wohingegen Chaker-Margot *et al.* 2015 eine mit 6 MDa fast dreimal so große Masse fanden [Chaker-Margot et al., 2015]. Die SSU-Prozessierungsmaschinerie ist - mit Ausnahme des UtpA/t-Utp-Subkomplexes - nur in die Prozessierung der pre-rRNA eingebunden. So bindet die U3-snoRNA über Basenpaarung an mehreren Stellen an die pre-rRNA, so dass die Schnittstellen A0, A1 und A2 an den vorgesehen Stellen durchtrennt werden und die rRNA korrekt gefaltet wird. Dies ist in Abbildung 1.6 zu sehen [Dutca et al., 2011, Phipps et al., 2011]. Im Ge-

gensatz zur Biogenese in Hefe, wo der Schnitt an A2 cotranskriptional erfolgt, finden alle Teilungen in Säugerzellen posttranskriptional statt [Henras et al., 2015]. Das SSU-Prozessom verlässt nach dem Schnitt an A2, der die 40S- von den 60S-rRNAs trennt, die pre-40S-Untereinheit und bleibt an den abgeschnittenen ETS-Abschnitt gebunden [Tschochner und Hurt, 2003, Sardana et al., 2013]. Die Untersuchungen von [Popov et al., 2013] in humanen Zellen lassen eine Vorstellung davon zu, wie lange diese ersten Schritte der Maturierung dauern. So dauert es etwa fünf bis acht Minuten, bis dem roten Weg in Abbildung 1.5 folgend die 5'-ETS-Prozessierung beendet und aus der 47S-rRNA die 41S-rRNA prozessiert worden ist. Nach dem Schnitt an A2 (Hefe), bzw. 2 (humane

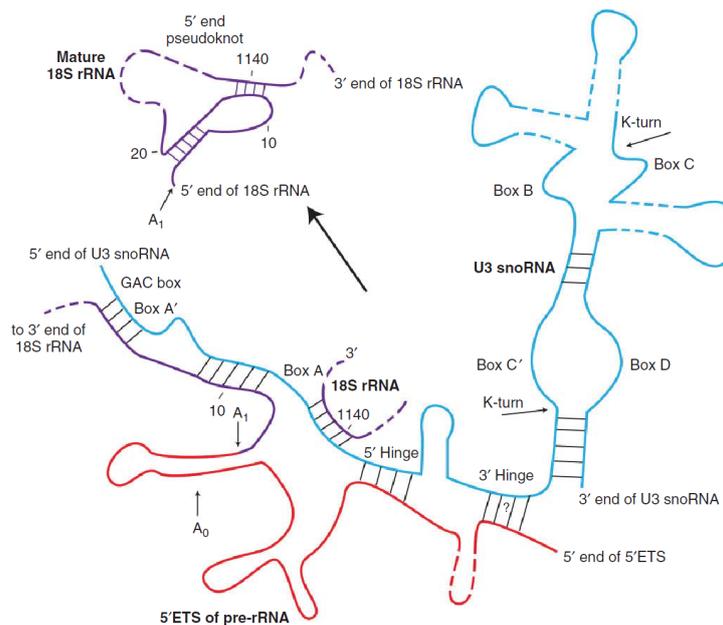


Abbildung 1.6: Faltung der 18S-pre-rRNA durch gerichtetes Durchtrennen der Schnittstellen mithilfe der U3 snoRNA [Phipps et al., 2011].

Zellen), trennen sich die Wege der kleinen und der großen Untereinheit. Da sich die vorliegende Arbeit mit der kleinen Untereinheit befasst, wird die weitere Biogenese der 60S-Untereinheit nicht weiter vertieft. Dass die sich anschließenden Maturierungsschritte unabhängig voneinander sind, konnten [Liang und Fournier, 1997] zeigen. Hierzu verlagerten sie den DNA-Abschnitt für die pre-18S-rRNA sowie diejenigen für die pre-5,8/25S-rRNA auf unterschiedliche DNA-Loci. Auch die separat abgelesenen pre-rRNA-Transkripte wurden korrekt prozessiert und zu funktionalen Ribosomen zusammengebaut. Diese Unabhängigkeit der Maturierung der Untereinheiten sieht man auch daran, dass es nur einen einzigen bekannten Faktor gibt, der sowohl am 40S- als auch am 60S-Pfad beteiligt ist. Der Haupt- und die Nebenwege der Prozessierung der rRNA ist in Abbildung 1.5 dargestellt - falls einer der Wege blockiert ist, gibt es mehrere Nebenpfade, mit denen doch noch funktionale Ribosomen erreicht werden können.

Wenn der Hauptweg in humanen Zellen beschriftet wird, hat die pre-18S-rRNA nach der Teilung ein vollständig prozessiertes 5'-Ende und ein unfertiges 3'-Ende. In humanen Zellen ist endo- und exonukleolytische Enzymaktivität nötig, um die 21S-rRNA bis zur 18S-E-rRNA zu degradieren [Sloan et al., 2013], wohingegen in Hefe nur zwei endonukleolytische Schnitte nötig sind.

[Montellese et al., 2017] und [Ishikawa et al., 2017] fanden kürzlich unabhängig voneinander einen weiteren Zwischenschritt. An den rRNA-Schnitt zum Herstellen der 18S-E-rRNA schließt sich ein Trimmen des 18S-E-Endes durch exonukleolytische Aktivität der bereits aus mRNA-Katabolismus bekannten Ribonuklease PARN an. Ob die PARN-Aktivität auf das Innere des Nukleus beschränkt ist [Montellese et al., 2017] oder bis ins Zytoplasma reicht [Ishikawa et al., 2017], konnte bisher nicht geklärt werden.

Um die pre-40S-Untereinheit aus dem Zellkern zu exportieren, ist ein RanGTP-Crm1-vermittelter Exportprozess nötig. Es sind bisher drei Faktoren bekannt, die auf dem späten pre-40S-Vorläufer gebunden sind und eine NES (*nuclear export sequence*) tragen. Diese sind Ltv1, Rio2 und Dim2. Bei allen drei konnte gezeigt werden, dass sie als Crm1-Adaptoren wirken [Merwin et al., 2014, Fischer et al., 2015, Woolls, 2011]. Eine Rekonstruktion der späten humanen Vorläuferuntereinheit aus Cryo-EM-Aufnahmen zeigt die Positionierung der noch vorhandenen Prozessierungsfaktoren (Abbildung 1.7). Dim2 befindet sich am 3'-Ende der rRNA bei Nob1, jedoch noch etwas tiefer in der pre-40S-Untereinheit verborgen [Larburu et al., 2016, Johnson et al., 2017].

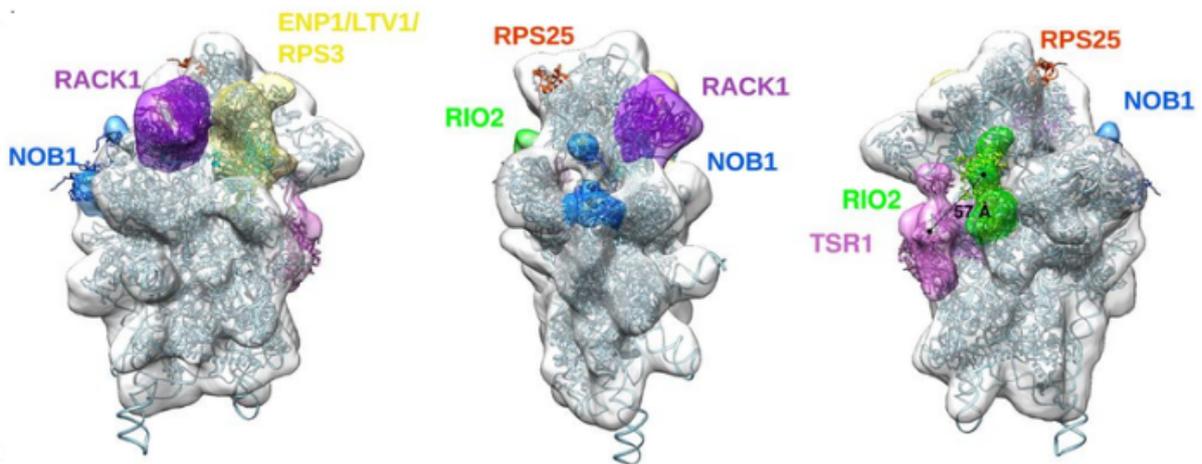


Abbildung 1.7: pre-40S-Untereinheit mit Prozessierungsfaktoren, gezeigt aus mehreren Perspektiven. Abbildung aus [Larburu et al., 2016].

Der letzte rRNA-Schnitt in humanen Zellen, der an der pre-18S-rRNA an der Schnittstelle E nötig ist um die letzten Nukleotide des ITS1 zu entfernen, findet erst im Zytoplasma statt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich noch sieben fest gebundene Faktoren auf dem Partikel: Dim1, Nob1, Dim2, Ltv1, Enp1, Rio2 und Tsr1 [Karbstein, 2011]. Dieser letzte RNA-Schnitt wird durch die Endonuklease Nob1 katalysiert. Hierzu ist jedoch die Bildung eines 80S-Vorläuferpartikels mit einer fertiggestellten 60S-Untereinheit nötig [Peña et al., 2016]. Damit die 60S-Untereinheit binden kann, muss zuerst Tsr1, was bis hierhin die Bindungsstelle blockiert hat, die pre-40S-Untereinheit verlassen [McCaughan et al., 2016]. Im Zuge der Ausbildung des 80S-Vorläuferpartikels verlassen auch Rio2, Ltv1 und Enp1 den Komplex, und die durch Dim1 durchgeführte Methylierung in der Helix 45 findet statt, wonach auch Dim1 den Komplex verlässt. Hiernach kommt es zu einer Konformationsänderung der pre-rRNA, durch die das unfertige 3'-Ende der RNA zu Nob1 hin verschoben wird (Abbildung 1.8). Durch den anschließenden Schnitt an D wird die fertige 18S-rRNA der kleinen Untereinheit gebildet [Hartwick und Wimberly, 2017, Johnson et al., 2017].

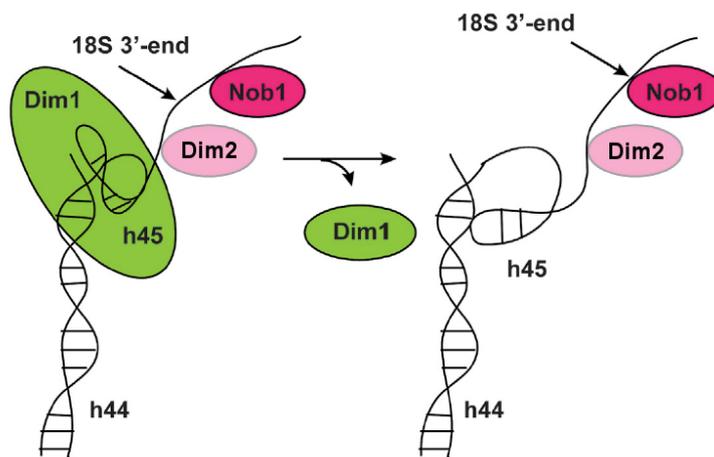


Abbildung 1.8: Konformationsänderung der rRNA nach Methylierung durch Dim1. Abbildung aus [Johnson et al., 2017].

Auch auf dieser Untereinheit befindet sich weiterhin Dim2. Wann genau Dim2 die Untereinheit zu ihrer endgültigen Fertigstellung verlässt und welche Faktoren daran beteiligt sind, ist bis jetzt unklar [de la Cruz et al., 2015]. Zwar konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass sich Dim2 in Abwesenheit von Rio2 nicht mehr von der kleinen Vorläuferuntereinheit löst [Wyler et al., 2011], in neueren Untersuchungen konnte jedoch demonstriert werden, dass Rio2 bereits vor der Nob1-Aktivität die kleine Untereinheit verlässt [Meyer et al., 2016].

1.6 Dim2

Bei Dim2 handelt es sich um ein essentielles Protein, das an der ribosomalen Biogenese sowie beim Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten benötigt wird. Dieses Protein samt seiner Funktionalität ist stark konserviert und findet sich in Prokaryoten und Eukaryoten gleichermaßen [Woolls, 2011]. Dim2 erhielt seinen Namen, da zuerst eine Wechselwirkung mit Dim1 vermutet wurde. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass Dim2 nicht mit Dim1 interagiert, sondern mit Nob1. Dies führte dazu, dass Dim2 in der neueren Literatur häufig auch Pno1, *Partner of Nob1*, genannt wird [Campbell und Karbstein, 2011]. Die native Verteilung von Dim2 in eukaryotischen Zellen ist eine Anreicherung im Nukleolus [Zemp et al., 2009].

1.6.1 Aufbau von Dim2

Das humane Dim2 besteht aus 252 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 27,9 kDa und besitzt eine C-terminale KH-Domäne. KH-Domänen sind ein Strukturmotiv aus dem Protein hnRNP K, ein RNA-bindendes Protein, das an pre-mRNAs bindet und Einfluss auf die mRNA-Prozessierung hat [Dejgaard et al., 1994]. Die Protein-RNA-Bindung wird durch die KH (*hnRNP K homologe*) Domäne vermittelt. Die KH-Domänen bestehen aus ca. 70 Aminosäuren, die sich in ein $\beta\alpha\alpha\beta$ -Strukturmotiv falten. Zwischen den beiden α -Helices findet sich eine GxxG-Schleife. Mindestens eine der beiden variablen Aminosäuren (x) zwischen den beiden Glycinen muss zum

Funktionserhalt positiv geladen sein. Bei Mutation von xx zu zwei negativ geladenen Aminosäuren kommt es zum Funktionsverlust [Hollingworth et al., 2012]. Die GxxG-Schleife in humanem Dim2 befindet sich an den Positionen 185-188 [Vanrobays et al., 2008]. [Woolls, 2011] stellt in ihrer Arbeit zwei weitere Domänen zur Diskussion, die eine starke Ähnlichkeit zu KH-Domänen aufweisen. Die erste dieser beiden KH-ähnlichen Domänen befindet sich in der Mitte des Proteins, die kanonische GxxG-Schleife ist in Hefe jedoch durch eine NSWT-Schleife ersetzt sowie in *H. sapiens* durch ENWM. Diese Domäne ermöglicht die Bindung zu Nob1. Die zweite KH-ähnliche Domäne befindet sich am N-Terminus. In dieser Domäne ist das $\beta\alpha\beta$ -Strukturmotiv schlechter konserviert. Diese KH-ähnliche Domäne ermöglicht eine Dimerisierung von zwei Dim2-Proteinen. Die drei Domänen und ihre Funktion sind in Abbildung 1.9 nochmal kurz zusammengefasst. Weiterhin fanden [Vanrobays et al., 2008] heraus, dass sich am C-Terminus des Proteins eine NES befindet. Es handelt sich hierbei um eine klassische Leucin-reiche Exportsequenz im Protein, welche sich an den Position 153-158 befindet.

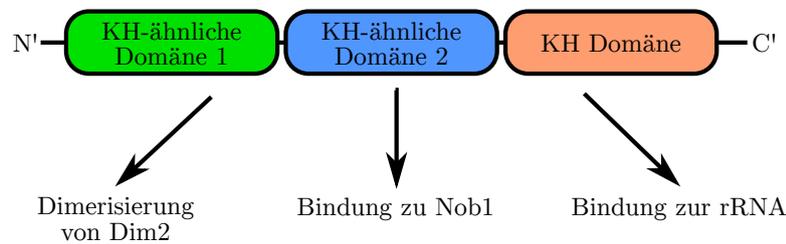


Abbildung 1.9: Proteinstruktur von Dim2. KH- und KH-ähnliche Domänen und ihre Funktion im Protein. Abbildung nach [Woolls, 2011].

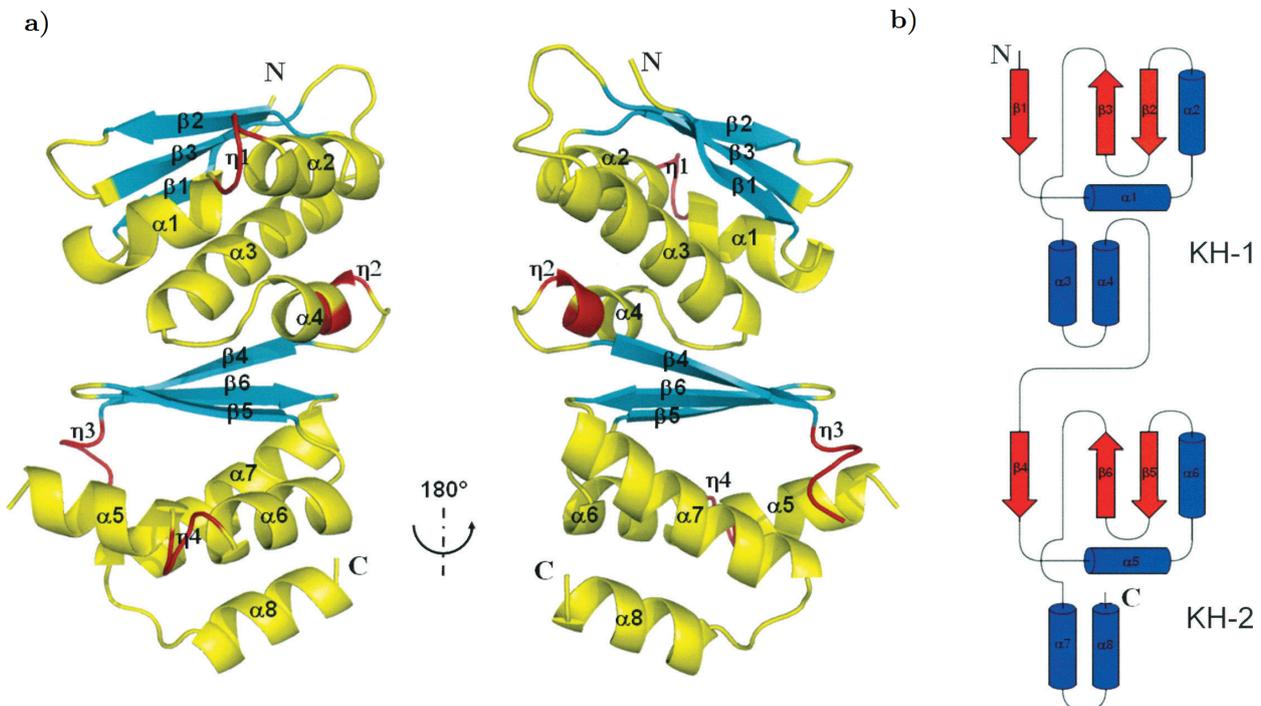


Abbildung 1.10: Kristallstruktur von Dim2 aus *P. horikoshii*. a) Bändermodell der Proteinfaltung, b) Schematische Abfolge der Strukturmodule. Abbildung aus [Jia et al., 2007].

Die genaue Struktur von humanem Dim2 ist nicht bekannt, da es hiervon keine Einkristallstruktur gibt. Es existiert jedoch eine Kristallstruktur von Dim2 aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus horikoshii* OT3. Die Kristallstruktur sowie ein Schema der α - und β -Faltungen ist in Abbildung 1.10 gezeigt. Aufgrund der hohen Konservierung der Ribosomen und der mit der Ribosomenbiogenese verknüpften Proteinen wird davon ausgegangen, dass die Grundstruktur in allen Dim2 sehr ähnlich ist. Diese Annahme ermöglicht, Dim2-Proteine aus anderen Lebensformen auf die Grundstruktur hin zu modellieren [Woolls, 2011].

1.6.2 Vergleich der Dim2-Sequenz unterschiedlicher Lebensformen

In Abbildung 1.11 ist eine Alignierung verschiedener Dim2-Sequenzen gezeigt. Für diese Alignierung wurden die folgenden Organismen ausgewählt:

- *H. sapiens*, da mit diesem Protein gearbeitet wurde.
- *S. cerevisiae*, da in Hefen ein Großteil der Aufklärungsexperimente zur ribosomalen Biogenese durchgeführt wurde.
- *D. melanogaster*, da diese Verwandte von *C. tentans* sind, von denen keine Sequenz verfügbar ist. Die Speicheldrüsenzellen aus *C. tentans* wurden jedoch für Experimente in dieser Arbeit herangezogen.
- *P. horikoshii*, da hiervon eine Kristallstruktur existiert, auf deren Grundlage Modelle von Dim2-Proteinen höherer Eukaryoten modelliert wurden.

Auch in der Alignierung wird die hohe Konservierung des Dim2 deutlich. So liegen zwischen *H. sapiens* und *S. cerevisiae* 45,6 % identische sowie 57,7 % ähnliche Positionen vor. Wenn man nun das humane Dim2 mit dem aus *P. horikoshii* vergleicht, liegen immerhin noch 21,5 % identische und 31,9 % konsensuale Positionen vor.

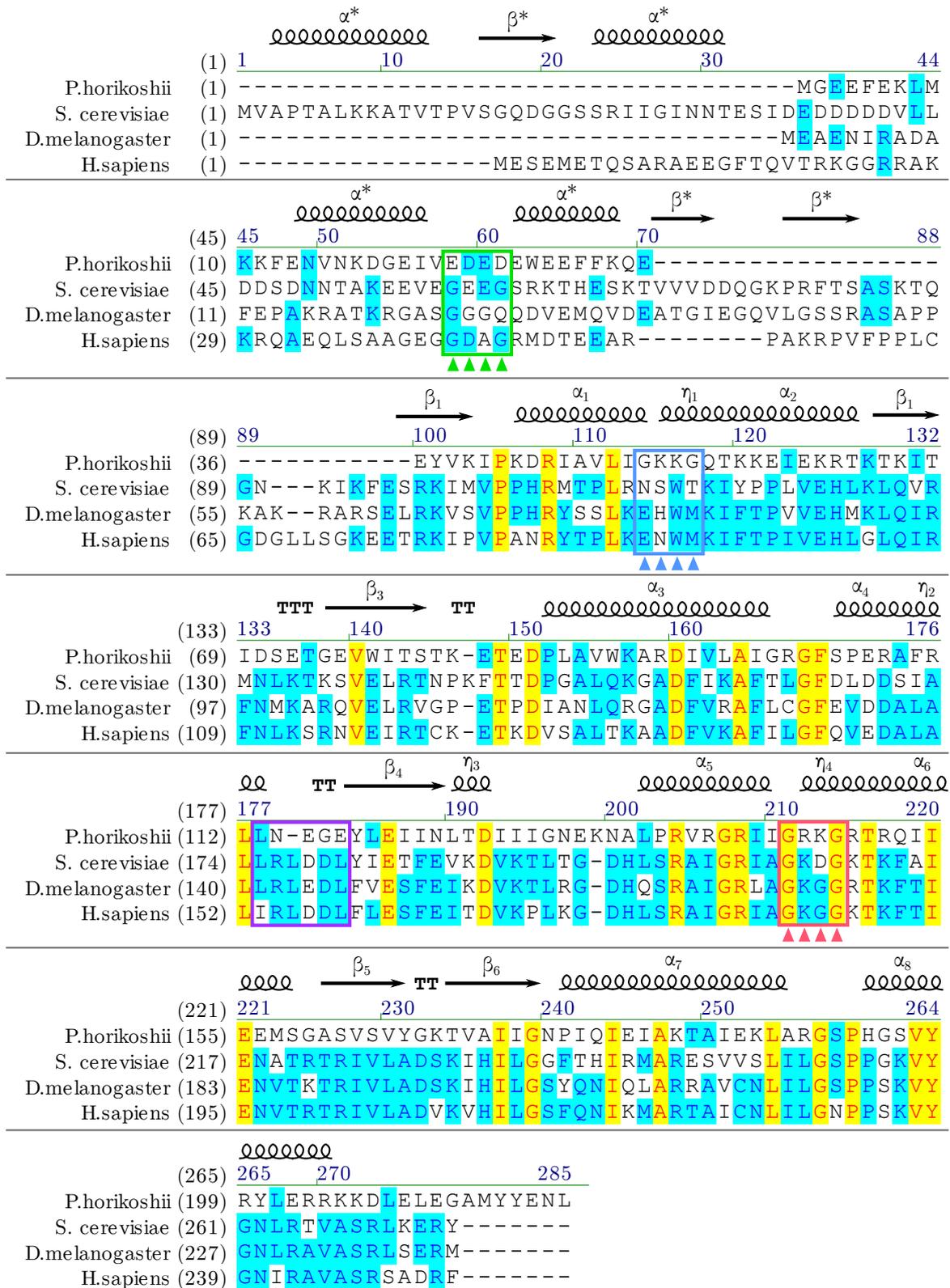


Abbildung 1.11: Alignierung der Dim2-Sequenzen aus *P. horikoshii*, *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* und *H. sapiens*. Über der Sequenz dargestellt sind die Tertiärstrukturelemente aus der Kristallstruktur von *P. horikoshii* (β_1 bis α_8), sowie die in [Woolls, 2011] postulierten (β^* , α^*). In den grünen, blauen und roten Kästen sind die GxxG-Sequenzen, bzw. deren Mutationsanaloge, gezeigt. Zusätzlich ist die Exportsequenz in lila umkreist (Positionen 178-183). Abbildung nach [Jia et al., 2007].

1.7 Exportprozesse in eukaryotischen Zellen

Obgleich der Zellkern in Eukaryoten durch eine Hülle vom Rest der Zelle getrennt ist, muss ein Energie- und Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten möglich sein. Dieser Austausch wird von den in die Kernmembran eingelassenen Kernporen realisiert.

1.7.1 Kernporenkomplexe

Durch die Kernporen werden das Nukleoplasma und das Zytoplasma miteinander verbunden, die eigentlich durch die Kernmembran voneinander getrennt sind. Eine schematische Abbildung einer Kernpore mit Größenverhältnissen ist in Abbildung 1.12 a gezeigt. Es ist zu sehen, dass der Mittelteil (*central framework*) der Pore (in gelb dargestellt) mit 40 nm Höhe die Membran vollständig durchdringt. Die gesamte Symmetrie des NPC ist achtzählig. Dies lässt sich in elek-

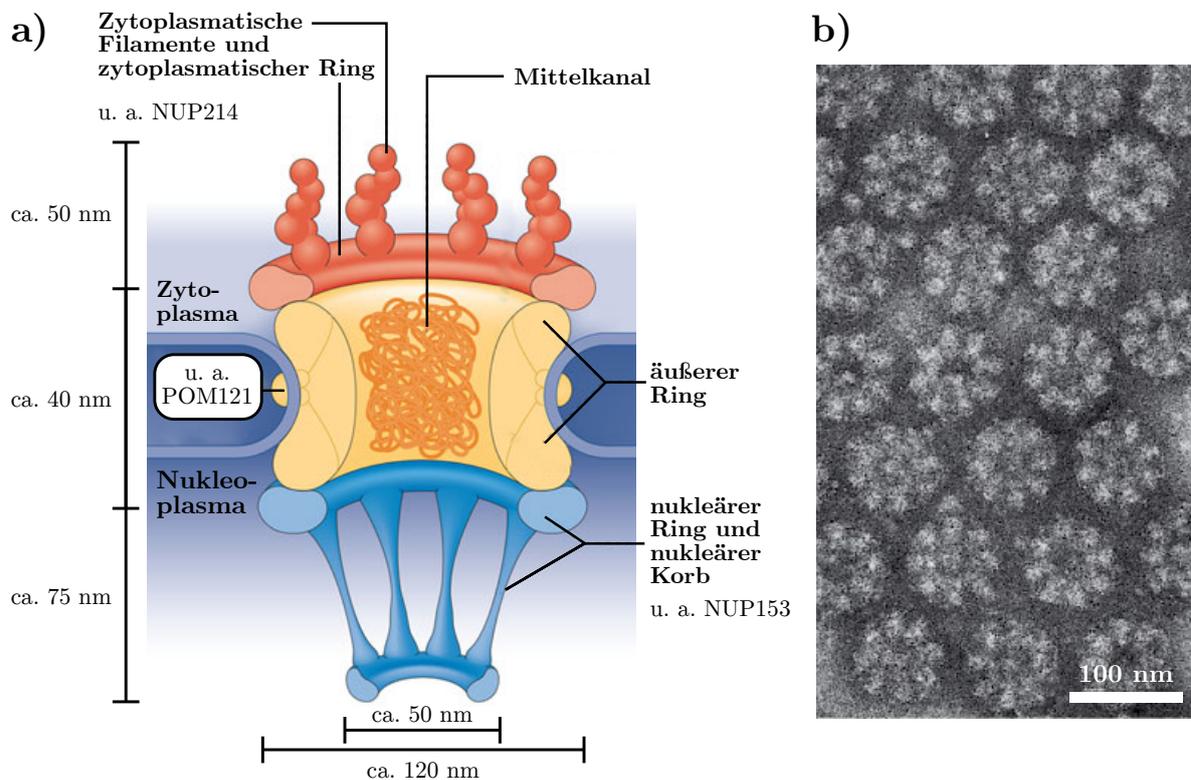


Abbildung 1.12: a) Schematische Darstellung der Kernpore mit Größenverhältnissen, Abbildung verändert aus [Raices und D'Angelo, 2012, Goryaynov et al., 2012]; b) Elektronenmikroskopische Aufnahme der achtzähligen Symmetrie, vom Zytoplasma aus betrachtet. Abbildung verändert aus [Alberts et al., 2002].

tronenmikroskopischen Bildern gut erkennen (Abbildung 1.12 b). Im Mittelteil besteht der NPC aus verschiedenen Nukleoporinen (Nups). Bei den Nukleoporinen handelt es sich um Proteine, die den Kernporenkomplex aufbauen. Durch die achtsymmetrische Symmetrie ist jedes Nup pro NPC 8-mal, oder einem Vielfachen davon, enthalten [Raices und D'Angelo, 2012]. Ein Hauptbestandteil der Nups des Kanals sind *FG-Repeats*, also Bereiche, in denen die Aminosäuren Glycin und Phenylalanin angereichert sind. Diese FG-Repeats ragen in den Kanal hinein und bilden dort ein

Netzwerk aus, sodass eine Barriere im Kanallinneren entsteht [D'Angelo et al., 2009]. Diese Barriere ist jedoch so gestaltet, dass Ionen und kleine Moleküle frei durch die Poren diffundieren können. Erst für Moleküle, die größer als 40-60 kDa sind, wird ein rezeptorvermittelter Transport mit der Hilfe von Transportrezeptoren nötig. Ob für die unterschiedlichen Übertrittsmöglichkeiten verschiedene Bereiche innerhalb des *central channel* verantwortlich sind, ob es also beispielsweise kleine Diffusionskanäle im FG-Netzwerk gibt, ist Gegenstand aktueller Forschung und Diskussion [Raices und D'Angelo, 2012]. Vom Mittelteil aus in den Kern hinein reicht der *nuclear basket*, also der nukleäre Korb. Ein Bestandteil, der am Aufbau dieses Korbs beteiligt ist, ist das Protein Nup153. Der Korb wirkt vermutlich als erste Bindungsstelle für RNA-Protein-Komplexe, die aus dem Zellkern exportiert werden sollen. Auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore befinden sich die zytoplasmatischen Filamente.

1.7.2 Visualisierung des mRNA-Exports in fixiertem Gewebe

In Kapitel 1.1.2 wurde bereits erwähnt, dass sich die Larven von *C. tentans* eine Wohnröhre aus Umgebungspartikeln aufbauen. Diese Umgebungspartikel werden durch seidenartigen Speichelproteine miteinander verbunden. Die Codierung für diese Speichelproteine findet sich auf den dekondensierten Bereichen der Polytänchromosomen, den sogenannten Balbiani-Ringen. Die davon translatierte mRNA ist mit 35 bis 40 kb sehr groß [Kiseleva et al., 1996]. Diese werden zusammen mit den notwendigen Proteinen in mRNPs verpackt, die einen Durchmesser von 50 nm aufweisen [Kiseleva et al., 1996]. Partikel und Strukturen mit einer Größe von 50 nm können mit Elektronenmikroskopie problemlos aufgelöst werden. So war es möglich, den Transport von Balbiani-Ring-mRNPs durch die Kernporen in den einzelnen Schnitten von Cryo-EM-Aufnahmen zu identifizieren und zu untersuchen (Abbildung 1.13). [Kiseleva et al., 1996] konnte in ihren Experimenten zudem zeigen, dass während der einzelnen Stufen des Transports eine Konformationsänderung des NPCs zu beobachten ist. Der äußere Ring, der die Kernpore zum Nukleoplasma hin begrenzt, kann völlig geschlossen sein, oder unterschiedliche Öffnungen bis zu einem Durchmesser von 60 nm aufweisen. Der Vorteil der EM-Untersuchungen ist die hohe Auflösung, die es ermöglicht, auch kleine intrazelluläre Strukturen detailliert abzubilden. Zur Aufnahme solcher Bilder sind jedoch zum einen enorm dünne Schichten mit einer Dicke von etwa 100 nm nötig, zum anderen muss die Messung im Vakuum stattfinden. Beides verhindert, dass Untersuchungen *in vivo* durchgeführt werden können und geben daher immer nur einen statischen Eindruck von dynamischen Prozessen wider.

1.7.3 Visualisierung des mRNA-Exports *in vivo*

Um den Prozess des mRNA-Exports *in vivo* beobachten zu können, statt nur Schlüsse aus den statischen EM-Daten zu ziehen, erschien die Fluoreszenzmikroskopie die Technik der Wahl zu sein. Damit die Fluoreszenzmikroskopie anwendbar ist, müssen jedoch die beiden am Export beteiligten Strukturen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Diese beiden Strukturen sind zum einen die Kernpore, bzw. die Kernhülle, sowie zum anderen das Exportgut. Die Markierung wurde in unterschiedlichen Arbeitsgruppen auf ganz verschiedene Weise erreicht.

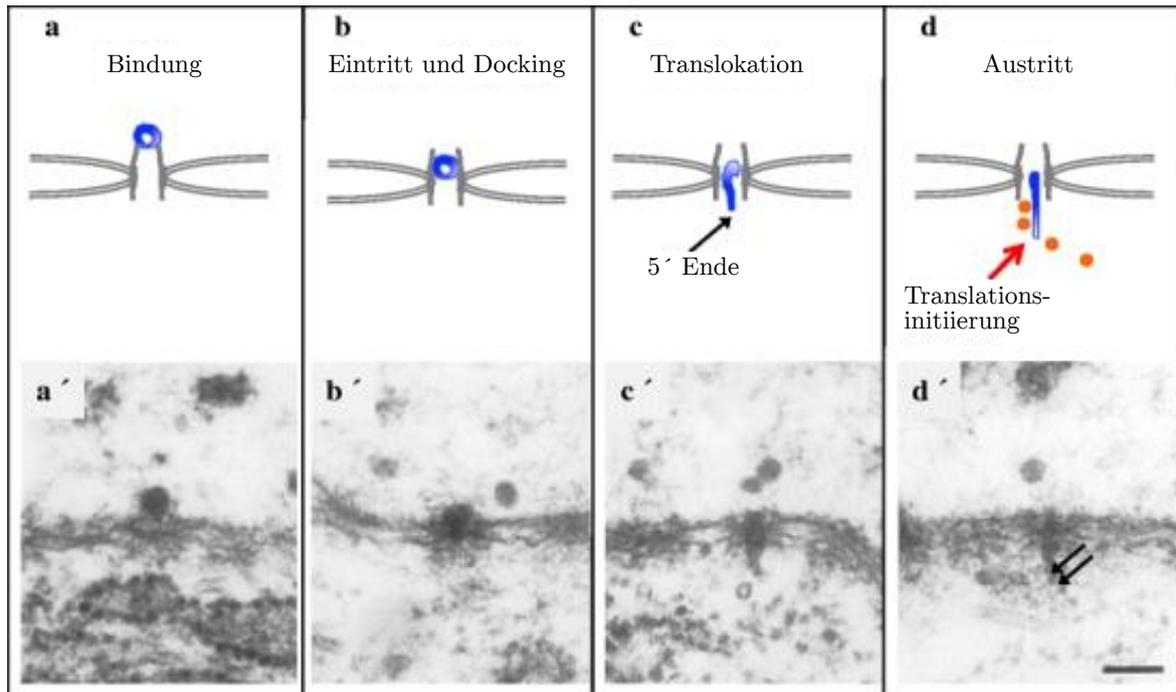


Abbildung 1.13: Schritte des Nukleus-Zytoplasma-Transports von BR-mRNPs. a) Andocken des mRNPs an den nukleären Korb; b) Eintritt des mRNPs in die Pore; c) Entfaltung des Partikels und Durchqueren der Pore; d) Austritt des Partikels aus der Pore und Beginn der Translation durch ankommende Ribosomen (Pfeile). Der Maßstabsbalken beträgt 100 nm. Bild verändert aus [Björk und Wieslander, 2011].

[Grünwald und Singer, 2010] gelang die Visualisierung von Export-Prozessen in einer Maus-Embryo-Fibroblasten-Zelllinie, indem sie für die Markierung des Cargos das MS2-System verwendeten (Abbildung 1.14 a). Hierbei wird die Ziel-mRNA mit 24 RNA-Hairpin-Sequenzen fusioniert. Die Ziel-mRNA codiert den essentiellen Zellbestandteil β -Aktin. Die fusionierten Hairpin-Sequenzen stammen aus einer Bakteriophage und können von einem MS2-Mantelprotein gebunden werden (Abbildung 1.14 a). Dieses Mantelprotein ist zusätzlich an das gelb fluoreszierende Protein YFP gekoppelt [Tyagi, 2009]. Die Markierung der Kernporen erfolgte über die Einführung eines gentechnisch veränderten Proteins in der äußeren Hülle der Kernpore, POM121-tdTomato. Es gelang, markierte Partikel auf beiden Seiten der Kernhülle zu visualisieren. Zudem konnten Exportereignisse beobachtet werden. Die Aufnahme der Einzelmolekülfilme erfolgte mit einer Belichtungszeit von 20 ms.

Dieselbe RNA-Markierung mit Hilfe des MS2-Hairpin-System nutzten auch Ma *et al.* [Ma et al., 2013]. Zusätzlich wurden noch Experimente in HeLa-Zellen, die zur Markierung der Kernporen GFP-POM121 exprimieren, durchgeführt. Das Exportcargo war hier eine über das MS2-System mCherry-markierte Luciferase aus Glühwürmchen. Die Messungen wurden mit einer enorm kurzen Belichtungszeit von 2 ms durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit zu [Grünwald und Singer, 2010] herzustellen, wurde zusätzlich mit 20 ms Belichtungszeit gemessen. Das MS2-System hat jedoch den Nachteil, dass eine systemfremde mRNA-Sequenz exportiert werden muss. Zusätzlich wird der mRNP-Partikel, in dem die Hairpin- β -Aktin-mRNA verpackt ist, durch den Anhang des GFP-markierten Mantelproteins deutlich vergrößert, da bis zu 24 dieser Mantelproteine an die 24 Hairpin-Sequenzen binden können.

[Siebrasse et al., 2012] wählten einen anderen Weg, um mRNPs und Kernporen zu färben. Die Markierung der Kernporen erfolgte durch das in *E. coli* exprimierte und chemisch mit Alexa-Fluor488-markierte Protein NTF2. Bei NTF2 handelt es sich um einen kleinen (14,5 kDa) *nuclear export factor*, der mit den FxFG-Wiederholungsmotiven der NUPs wechselwirken und so die Kernpore passieren kann [Ribbeck et al., 1998]. Durch die ständige Anwesenheit in den Kernporen bei Im- und Exportprozessen kommt es zu einer gleichmäßigen Verteilung des injizierten Proteins über alle Poren, woraus eine Färbung der Kernmembran resultiert. Da wie in den Studien von [Daneholt, 2001] und [Björk und Wieslander, 2011] Speicheldrüsen von *C. tentans* (Kapitel 1.1.2) verwendet wurden, war hier das anvisierte Exportgut die Balbiani-Ring-mRNPs. Diese wurden jedoch im Gegensatz zu anderen Studien nicht über eine RNA-Bindung gefärbt. Stattdessen wurde das Protein hrp36 verwendet (Abbildung 1.14 b). Dieses gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine, die während der Transkription unselektiv an naszierende RNAs binden, wodurch nicht nur die BR-mRNPs markiert wurden, sondern auch weitere mRNPs. hrp36 bleibt im Gegensatz zu vielen anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie auch während des Exports an den mRNP gebunden. hrp36 wurde als Fusionsprotein mit einem Tetracystein-Baustein (tc) zum Anbringen der Fluoreszenzfarbstoffe in *E. coli* exprimiert und chemisch mit Atto647 gefärbt. Um die beiden markierten Proteine in die Zellen einzubringen, erfolgte eine Co-Mikroinjektion der beiden Proteine. Die Aufnahme der Einzelmolekülfilm erfolgte mit Hilfe der Lichtscheibenmikroskopie bei einer Belichtungszeit von 20 ms. Der Vorteil dieser Markierung liegt darin, dass eine völlig unveränderte, native mRNA beobachtet werden kann. Nachteilig ist, dass die chemisch markierten Proteine über eine Mikroinjektion in die Zelle eingebracht werden müssen, wodurch sich der experimentelle Aufwand beträchtlich erhöht.

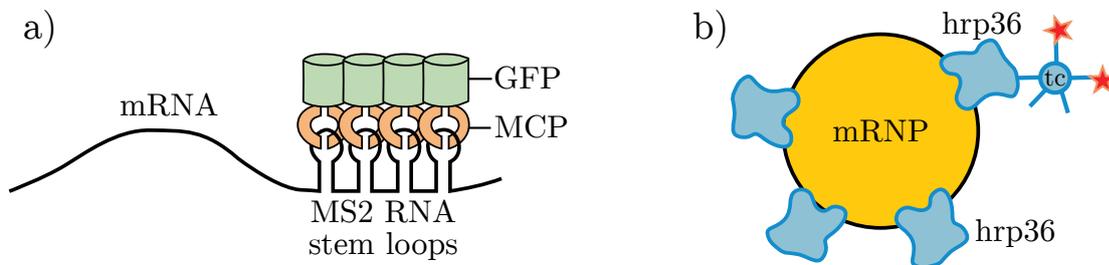


Abbildung 1.14: RNA-Markierungsvarianten zur Beobachtung des Exports *in vivo*. a) MS2-Stemloop-System, das mit GFP markierte Mantelprotein (MCP) erkennt die, an die Ziel-RNA fusionierte, MS2-Stemloop-Sequenz der RNA; Abbildung nach [Buxbaum et al., 2015]. b) Markierung mit chemisch gefärbtem hrp36, die mRNA wird hier nicht modifiziert. Durch Mikroinjektion befinden sich im Zellkern vereinzelt tc-hrp36-Fusionsproteine, die bis zu vier Farbstoffmoleküle tragen können.

In allen Studien wurden aus den Einzelmolekülaufnahmen Zeitkonstanten für den Export von mRNA-Partikeln bestimmt. Hierzu wurde eine Exponentialfunktion an die beobachteten Verweilzeiten der gefärbten Partikel an der Membran angepasst. Die Zeitkonstanten sind in Tabelle 1.1 aufgelistet. In [Siebrasse et al., 2012] wurden zusätzlich acht Ereignisse gefunden, die Verweilzeiten zwischen 0,5 s und 6 s an der Kernhülle zeigten. Diese langen Ereignisse gingen nicht in die Analyse der Verweilzeiten mit ein. In [Grünwald und Singer, 2010] und in [Siebrasse et al., 2012] wurde zur Beschreibung der Statistik eine biexponentielle Funktion benötigt, was in zwei Zeit-

konstanten τ_1 und τ_2 resultiert; [Ma et al., 2013] fanden hingegen eine Konstante zur Beschreibung ausreichend. Ein weiterer Unterschied zwischen den Studien von [Grünwald und Singer, 2010] und [Ma et al., 2013] ist die Mobilität des Partikels im Laufe des Exportprozesses. Während [Grünwald und Singer, 2010] postulieren, dass im dreischrittigen Prozess Andocken - Transport - Freilassen die Teile Andocken und Freilassen langsamer vor sich gehen als der Export, fanden [Ma et al., 2013] ein konträres Bewegungsmuster. Hier stellt der Transport den langsamen Teil des Prozesses dar.

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung der gemessenen Export-Verweilzeiten in unterschiedlichen Studien.

	beobachtete RNA	τ_1 in ms	τ_2 in ms	Zeitauflösung
[Grünwald und Singer, 2010]	β -Aktin-MS2	172 ± 3	2000 ± 120	20 ms
[Siebrasse et al., 2012]	BR-mRNPs	65 ± 5	350 ± 25	20 ms
[Ma et al., 2013]	β -Aktin-MS2	12 ± 2		2 ms
[Ma et al., 2013]	β -Aktin-MS2	21 ± 1		20 ms

1.8 Motivation

In den letzten Jahren sind viele Studien zur Mobilität und Dynamik von RNA innerhalb des Zellkerns und der Zelle durchgeführt worden, einige davon wurde im voranstehenden Abschnitt 1.7 vorgestellt. In [Siebrasse et al., 2012] war bereits die Visualisierung von Exportereignissen sowie das Verfolgen der Trajektorien des Exportguts auf Einzelmolekülebene gelungen. Das dort als Marker verwendete Protein hrp36 hat jedoch den Nachteil, ein unspezifisches Markierungsprotein zu sein, sodass hier eine Vielzahl an unterschiedlichen mRNPs beobachtet wurde. Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, nur eine spezifische RNA zu markieren und in Folge auch nur diese zu beobachten. Im Zuge dieser Überlegung rückte schnell die ribosomale RNA (rRNA) in den Mittelpunkt. Es gibt genau vier rRNAs in Säugerzellen, genauer die 28S-, 18S-, 5,8S- und 5S-rRNAs. Die vier ribosomalen RNAs haben eigene Maturationswege mit sehr spezifischen Faktoren, sodass ein Faktor gesucht wurde, der zum einen eine eindeutige Markierung ermöglicht, und zum anderen über einen möglichst langen Teil des Maturationsweges erhalten bleibt.

Ein Protein, das sich hier anbot, war Dim2, da dieses bereits cotranskriptional an die rRNA bindet, um anschließend während der gesamten Dauer der Maturierung zur 40S-Untereinheit an die rRNA gebunden zu bleiben, mit dieser exportiert wird und erst beim letzten Maturierungsschritt das Ribosom verlässt.

Gleichzeitig konnte so die Ribosomenbiogenese weiter erforscht werden. Wenngleich in den letzten Jahren sehr viel Forschung sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *H. sapiens* geleistet wurde, ist der Blick auf die Ribosomenbiogenese weiterhin sehr „statisch“. Während immer mehr rRNA-Intermediate sowie zugehörige Prozessierungsfaktoren identifiziert und deren Rolle immer weiter geklärt werden konnte, blieb die Dynamik der Prozessierung weitgehend im Dunkeln. Mit dieser Arbeit sollte nun erstmals ein Blick auf die Mobilität der kleinen ribosomalen Untereinheit, bzw. ihrer Vorläufer, geworfen werden.

Mit dem nun möglichen Blick auf die Dynamik der Ribosomenbiogenese und dem Wissen um den essentiellen Exportprozess in dieser sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden:

- Was ist die intranukleäre Mobilität von Dim2? Können unterschiedliche Mobilitäten festgestellt werden?
 - Können, ausgehend von der Mobilität, Aussagen zu Bindungsstellen im Kern getroffen werden?
 - Wie lange dauert der Export der pre-40S-Untereinheiten?
 - Wie verhalten sie die Verweilzeiten an der Membran zu Ergebnissen anderer Transportstudien?
 - Ist es möglich, die pre-40S-Untereinheit nach dem Export weiter im Zytoplasma zu verfolgen?
-

Kapitel 2

Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden bei den in Tabelle 2.1 aufgeführten Firmen erworben und in der angegebenen Reinheit ohne weitere Aufreinigungsschritte eingesetzt.

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien.

Name	Zusatzbezeichnung	Firma
Agar-Agar	für die Bakteriologie	AppliChem, Darmstadt
Agarose Basic		AppliChem, Darmstadt
Albumine from bovine serum	minimum 98 % electrophoresis	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ampicillin		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BioRad-P6	Entsalzungssäule, 6 kDa cutoff	BioRad, München
Bradford Reagent		Sigma Life Science, St. Louis, USA
Chloramphenicol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Brilliant-Blau	R250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DMEM		Biochrom, Berlin
DMSO	Hybri-Max, sterile-filtered	Sigma Life Science, St. Louis, USA
DTT	1,4-Dithiothreitol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA		Amresco, Solon, Ohio, USA
Eisessig	AnalaR NORMAPUR	VWR Chemicals, Carnot, FR
FCS		Biochrom, Berlin
GelRed	Nucleic Acid Gel Stain 10000x in water	Biotium

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien (Fortsetzung).

Name	Zusatzbezeichnung	Firma
GeneRuler TM 1 kb DNA Ladder		Thermo Fisher, Schwerte
α -D(+)-Glucose Monohydrat	für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin		Merck, Darmstadt
Glutathione-Agarose	Lyophilized	Sigma Life Science, St. Louis, USA
L-Glutathion reduziert	$\geq 98\%$, für die Biochemie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerin	ROTIPURAN	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	PUFFERAN	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	pulv., für die Bakteriologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hepes	for buffer solutions	AppliChem, Darmstadt
Hygromyzin B	Lypophilized Powder	Alfa aesar, Ward Hill, USA
Isopropyl- β -D-galactopyranosid	\cong IPTG	Fermentas, St. Leon-Rot
Kaliumacetat	99 %	Alfa Aesar, Ward Hill, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	puriss. p.a.	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kanamyzin		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Di-Kaliumhydrogenphosphat	$\geq 99\%$, p.a., wasserfrei	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat		ZVE
Natriumchlorid	99,8 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	$\geq 98\%$, p.a., ACS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Dulbecco	w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptavidin		Biochrom, Berlin
Puromyzin		Alfa aesar, Ward Hill, USA
Roti ®-Mark 10-150 PLUS	Protein-Leiter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetracycline hydrochloride	powder, BioReagent	Sigma Aldrich, Hamburg
Tris(2-chlorethyl)phosphat	\cong TCEP	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin		AppliChem, Darmstadt
Trypton/Pepton aus Casein	pankreatisch verdaut, für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.2 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme wurden mit den jeweils mitgelieferten Puffern und Zusätzen verwendet.

Tabelle 2.2: Verwendete Enzyme.

Name	Funktion	Firma
Age I	Restriktionsenzym	Thermo Scientific
Bam	Restriktionsenzym	Thermo Scientific
Eco RI	Restriktionsenzym	Thermo Scientific
Herculase II	DNA-Polymerase	Agilent Technologies
Pac I	Restriktionsenzym	Thermo Scientific
Phusion	DNA-Polymerase	NEB
Taq	DNA-Polymerase	Fermentas
T4	Ligase	Fermentas
Xma I	Restriktionsenzym	NewEngland BioLabs
XbaI	Restriktionsenzym	NewEngland BioLabs

2.3 Medien und Puffer

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer.

Name	Zusammensetzung
2x YT Medium	16 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Trypton 10 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Hefeextrakt 5 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ NaCl pH = 7, autoklavieren, Lagerung bei RT
Coomassie-Entfärbelösung	500 mL Methanol 400 mL Wasserm 100 mL Eisessig [Sambrook und Russel, 2001]
Coomassie-Färbelösung	2,5 g Coomassie Brilliant-Blau 450 mL Methanol 450 mL Wasser [Sambrook und Russel, 2001]
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 250 mM Glycin 0,1 % SDS [Sambrook und Russel, 2001]

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer (Fortsetzung).

Name	Zusammensetzung
LB-Agar	10 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Trypton 5 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Hefeextrakt 10 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ NaCl 15 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Agar-Agar pH = 7, autoklavieren, Lagerung bei RT
LB-Medium	10 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Trypton 5 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Hefeextrakt 10 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ NaCl pH = 7, autoklavieren, Lagerung bei RT
SOC-Medium	20 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Trypton 5 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Hefeextrakt 0,5 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ NaCl 3,6 $\frac{\text{g}}{\text{L}}$ Glukose pH = 7, autoklavieren, Lagerung bei RT
Transportpuffer (TB)	20 mM Hepes 110 mM Kaliumacetat 5 mM Natriumacetat 2 mM Magnesiumacetat 1 mM EGTA 2 mM DTT pH = 7,3 über KOH, Lagerung bei 4 °C, [Kubitscheck et al., 2005]
Zellkulturmedium	500 mL DMEM 50 mL FCS 5 mL L-Glutamin (2 mM) 5 mL Penicillin/Streptomycin (100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$), Lagerung bei 4°C

2.4 Plasmide

Um die Fragestellung bearbeiten zu können, waren verschiedene Plasmide nötig. Klonierungen, die während dieser Arbeit durchgeführt wurden, finden sich im Kapitel 3.2.3.

- 305-PGK-MCS-hPOM121complete-eGFP: ein lentiviraler Vektor, auf dem das Fusionsprotein hPOM121-eGFP codiert ist
- peGFP-c1: mit pEGFP-c1 (Clontech) können eGFP-Fusionsproteine erzeugt werden, wobei c1 den *open reading frame* hinter der eGFP-Kassette angibt
- peGFP-c1-Dim2: Vektor mit einem Fusionsprotein aus eGFP und humanem Dim2

- pET-MCN-His-Tev-tc-Dim2: dieser Vektor wurde uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Kutay, ETH Zürich, zur Verfügung gestellt und enthält das humane Dim2 mit Tetracycling-Tag, Tev-Schnittstelle und His-Tag zur Aufreinigung
- p_{max}GFP: Kontrollvektor zur Bestimmung der Transfektionseffizienz
- pQCXIP-Snap-Dim2: ein retroviraler Vektor, über den das Zielprotein Snap-Dim2 zusammen mit einer Puromycin-Resistenz in die Zielzelllinie eingeführt wird
- pQCXIP-eGFP-Dim2: ein retroviraler Vektor, über den das Zielprotein eGFP-Dim2 zusammen mit einer Puromycin-Resistenz in die Zielzelllinie eingeführt wird
- pSS26m-Snap: aus diesem Vektor wurde die Sequenz für das Snap-Tag amplifiziert

2.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei Microsynth (Balgach, Schweiz) spezifisch angefertigt. Die Oligonukleotide kamen bei PCR-Amplifikationen sowie bei Sequenzierungen zum Einsatz.

Tabelle 2.4: Verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz (5' nach 3')
305-for	TCA CCG ACC TCT CTC CCC A
305-rev	TAG CCC GGG GTA CAG TAG ATT G
CMV-for	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
Dim2-rev	GGA TCC TCA GAA TCG ATC TGC
EBV-rev	GTG GTT TGT CCA AAC TCA TC
pQC-for	ACG CCA TCC ACG CTG TTT TGA CCT
pQC-rev	AAG CGG CTT CGG CCA GTA ACG TTA
Snap-Age-for	AAA CCG GTA TGG ACA AAG ACT GCG AAA TG
Snap-EcoRI-rev	AAG AAT TCC CCA GCC CAG GCT TGC CCA G
Snap-for	ATG GAC AAA GAC TGC GAA ATG AAG C
Snap-repair-for	AAT TGC GGC GGC GGC GGC C
Snap-repair-rev	AAT TGG CCG CCG CCG CCG C

2.6 Bakterienstämme

Es wurden verschiedene Bakterienstämme verwendet, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Genotypen für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt wurden.

Tabelle 2.5: Verwendete kompetente Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Verwendung	Firma
E.coli BL21 (DE3) pLysS	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) λ(DE3) pLysS(cm ^R)	Proteinexpression	Promega
E.coli DH5α	F- Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk ⁻ , mk ⁺) phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1	Plasmidamplifizierung	invitrogen
E.coli JM109	endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB ⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZΔM15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)	Plasmidamplifizierung	Sigma-Aldrich
E.coli Rosetta (DE3) pLysS	F ⁻ ompT hsdS _B (R _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam ^R)	Proteinexpression	Novagen
E.coli One Shot TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Plasmidamplifizierung	invitrogen

2.7 Farbstoffe

Die zur Lasermikroskopie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe sowie die jeweiligen Funktionalisierungen sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

Tabelle 2.6: Verwendete Farbstoffe.

Farbstoff	Funktionalisierung	λ_{ex} / nm	λ_{em} / nm	Hersteller
AlexaFluor488	Maleimid	490	525	invitrogen
AlexaFluor546	Maleimid	556	573	invitrogen
AlexaFluor647	Maleimid	650	665	invitrogen
FITC		495	517	gekoppeltes Peptid von C. Cardoso
Snap-Cell Oregon Green	Snap	490	514	NEB
SiR-Snap	Snap	645	661	Geschenk von K. Johnson
TAMRA		549	577	gekoppeltes Peptid von C. Cardoso
TMR-Star	Snap	554	581	NEB

2.8 Zelllinien

In Tabelle 2.7 sind die unterschiedlichen HeLa-Zelllinien, die verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 2.7: Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Resistenz	Bezugsquelle
HeLa eGFP-Dim2	HeLa-Zellen, die eGFP-Dim2 exprimieren	Puromyzin	PD Dr. rer. nat. Thomas Weide (Uni Münster)
HeLa Flp-In TM T-REx TM eGFP-Dim2	HeLa-Zellen, die tet-induziert eGFP-Dim2 exprimieren	Hygromycin B	Prof. U. Kutay (ETH Zürich, Schweiz)
HeLa Flp-In TM T-REx TM Snap-Dim2	HeLa-Zellen, die tet-induziert Snap-Dim2 exprimieren	Hygromycin B	Prof. U. Kutay (ETH Zürich, Schweiz)
HeLa POM	HeLa-Zellen, die eGFP-POM121 exprimieren	Geneticin	B. Burke (University of Florida, USA)
HeLa Snap-Dim2	HeLa-Zellen, die Snap-Dim2 exprimieren	Puromyzin	PD Dr. rer. nat. Thomas Weide (Uni Münster)

2.9 Spezielle Geräte

Die folgenden Geräte wurden für einige Experimente verwendet.

Tabelle 2.8: Spezielle Geräte.

Name	Zusatzbezeichnung	Firma
nanoDrop 2000 c		ThermoScientific
Nucleofector II		amaxa
inject Man		Eppendorf
Heizkammer	Universal Fit	ibidi

2.10 Spezielles Verbrauchsmaterial

Das folgende Verbrauchsmaterial wurde zur Zellkultivierung und zum Durchführen verschiedener Experimente benötigt.

Tabelle 2.9: Spezielles Verbrauchsmaterial.

Name	Zusatzbezeichnung	Firma
Cryo-Konservierungsröhrchen		Nalgene
GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit	# 0831	ThermoFisher
ibidi-Schalen	glass bottom, high	ibidi
Küvetten zu Elektroporation		lonza
Matteck-Schalen		Matteck
Mini-Prep-Kit	# 0502	ThermoFisher
150 cm ² Zellkulturflaschen		TPP
25 cm ² Zellkulturflaschen		TPP
Mikroinjektionskapillaren	Femtotip [®] 2	Eppendorf
Microloader	zum Befüllen von Mikroinjektionskapillaren	Eppendorf

Kapitel 3

Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Hitzeschock-Transformation kompetenter Bakterien

Bei der Hitzeschock-Transformation wird ein Vektor in die Bakterien eingebracht. 50 μL oder 100 μL der chemisch kompetenten Bakterien (Tabelle 2.5) werden aus dem $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -Gefrierschrank entnommen, sofort auf Eis gestellt und dort aufgetaut. Zu diesen wird die Plasmid-DNA (Kapitel 2.4) zugegeben, wobei darauf geachtet wird, dass die Bakterien nicht wärmer als $0\text{ }^\circ\text{C}$ werden. Hierzu wurden insbesondere gekühlte Pipettenspitzen verwendet. Die DNA-Bakterien-Suspension wird für 10 Minuten bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ oder $42\text{ }^\circ\text{C}$, abhängig vom jeweiligen Bakterienstamm, für 45 Sekunden. Hiernach wird die Suspension für weitere 2 Minuten auf Eis relaxiert. Danach erfolgt die Zugabe von 450 μL /900 μL SOC-Medium, und eine einstündige Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm im Schüttelinkubator. Das Ausplattieren der transformierten Bakterien erfolgt auf Agar-Platten mit passendem Antibiotikum. Der Transformationsansatz wird auf zwei Platten zu $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ aufgeteilt.

3.1.2 Plasmidamplifikation in Bakterien

Eine Über-Nacht-Kultur aus 100 mL LB-Medium und 50 μL Ampicillin ($c = 100\text{ mg/mL}$) bzw. 100 μL Kanamycin ($c = 50\text{ mg/mL}$) wurde mit einer Zahnstocherspitze Cryo-Stock angeimpft, und über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 150 rpm inkubiert. Hieraus wurden 2 mL entnommen, in ein Schnappdeckelgefäß überführt und für 5 Minuten bei 12500 xg zentrifugiert. Alle weiteren Aufreinigungsschritte wurden mit einem Mini-Prep-Kit (Tabelle 2.9) durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 250 μL Resuspendierungspuffer resuspendiert. Zu den resuspendierten Bakterien wurden 250 μL Lysispuffer sowie 350 μL Neutralisierungspuffer gegeben und durch über-Kopf-Drehen des Schnappdeckelgefäßes durchmischt. Die dabei flockig ausgefallene Genom-DNA wurde durch erneutes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 12500 xg abgetrennt, der Überstand wurde in eine Mini-Säule überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 12500 xg, durch die die Plasmid-DNA in die Membran der Säule gebracht wurde. Hiernach

wurde zweifach mit Waschpuffer gewaschen, und die entleerte Säule anschließend zum Trocknen der Membran für eine Minute bei 12500 xg zentrifugiert. Auf die Membran wurden 20 μL Elutionspuffer gegeben, 2 Minuten inkubiert und anschließend für 2 Minuten bei 12500 xg zentrifugiert. Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Plasmids erfolgte mithilfe des NanoDrop 2000c.

3.1.3 Proteinexpression aus Bakterien

Die Vorkultur wurde am Abend vor der Expression angesetzt. Hierzu wurde ein 250 mL-Erlenmeyerkolben mit 100 mL LB-Medium befüllt und 50 μL Ampicillin bzw. 100 μL Kanamycin zugegeben, mit einer Zahnstocherspitze Cryo-Stock angeimpft, und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein 2 L-Erlenmeyerkolben mit 1 L 2xYT-Medium befüllt, adäquate Mengen der jeweils nötigen Antibiotika zugegeben und mit 25 mL aus der Vorkultur angeimpft. Der Kolben wurde bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. In etwa einstündigen Abständen wurde die optische Dichte (OD) der Bakterienkultur kontrolliert. Bei einer OD von etwa 0,6 – 0,7 wurde mit IPTG die Proteinexpression induziert. Diese erfolgte bei 150 rpm und Raumtemperatur über Nacht.

Zum Ernten der Proteine wurde die Kultur auf drei Zentrifugenröhren aufgeteilt und bei 6000 xg für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 10 mL PBS resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden dreimal für 5 Minuten auf Eis sonifiziert. Zwischen den Durchgängen lag jeweils eine zehnminütige Pause, um ein Erwärmen der Proteinlösung zu verhindern. Die Lösung wurde in Zentrifugenröhrchen aus Polycarbon überführt und bei 40000 xg für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde auf gewaschene GST-Beads gegeben und schüttelnd 30 Minuten inkubiert. Die beladenen Beads wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die gewaschenen Beads wurden in eine Mini-Säule überführt, überstehendes PBS wurde abgenommen und die Beads wurden mit einer Unit Thrombin versetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In der aufgefangenen Flüssigkeit befand sich nun das aufgereinigte Protein. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem NanoDrop 2000c.

3.1.4 Färben der Proteine

Alle heterolog exprimierte Proteine wurden mit einem tc-Tag gekoppelt, der die Sequenz CCPG-CC besitzt. Diese Sequenz faltet sich sehr verlässlich zu einem Pinhole, das außerhalb der Proteinstruktur liegt. Nach der Reduktion mit TCEP oder DTT zeigen somit vier freie Thiol-Gruppen nach außen, an die über eine Maleimid-Brücke ein Farbstoff gekoppelt werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Farbstoffe Alexa Fluor 488 (AF488), Alexa Fluor 546 (AF546) sowie Alexa Fluor 647 (AF647) verwendet. Die Markierung erfolgte mit allen Farbstoffen nach demselben Protokoll.

Die Proteinlösung lag in einem thiol- und sulfidfreien Puffer vor, die Konzentration der jeweiligen Lösung wurde mittels des NanoDrop 2000c bestimmt. Die Lösung wurde mit einem vierfachen molaren Überschuss an Farbstoff versetzt und lichtgeschützt für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Trennung von gefärbtem Protein und freiem Farbstoff geschah über

eine Bio-Rad-Säule (Länge ca. 10 cm, Durchmesser 1 cm). Da es sich bei dieser Form der Chromatografie um eine Gelfiltration handelt, bewegt sich das größere gefärbte Protein schneller durch die Säule als der kleine Farbstoff. Dementsprechend konnte das Protein in der ersten farbigen Fraktion in Schnappdeckelgefäße aufgefangen werden. Anschließend erfolgte eine sofortige Aliquotierung und ein Schockfrieren des Proteins in flüssigem Stickstoff. Alle weiteren Banden wurden verworfen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte bei etwa 70–80 %iger Konfluenz der Zellen. Die Zellen wurden mit 10 mL PBS gewaschen und mit 0,5 mL Trypsin versetzt. Die Inkubation mit Trypsin für etwa 5 Minuten erfolgte bei 37 °C im Inkubator. Die gelösten Zellen wurden in 10 mL frischem, auf 37 °C vorgewärmten Medium aufgenommen. Hiervon wurde 1 mL in eine neue 25 cm²-Zellkulturflasche überführt und mit vorgewärmtem Medium auf 10 mL aufgefüllt. Falls die Zellen eine Resistenz aufwiesen, wurde das passende Antibiotikum zugegeben.

3.2.2 Cryokonservierung von Zelllinien

Die Zellen wuchsen bis zu etwa 90 %iger Konfluenz. Sobald diese erreicht war, wurden sie mit PBS gewaschen, mit Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Die Medium-Zell-Suspension wurde bei 200 xg für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in Medium mit einem Zusatz von 5 % DMSO aufgelöst, und die Zell-Suspension wurde in Aliquoten zu je 1 mL in Cryo-Konservierungsröhrchen aufgeteilt. Anschließend musste die Zellsuspension langsam abgekühlt werden. Dies geschah, indem die befüllten Cryo-Konservierungsröhrchen einzeln mit Papierhandtüchern umwickelt und in eine Styroporbox gestellt wurden. Diese wurde für etwa 3 Tage im -80 °C-Gefrierschrank gelagert. Die weitere langfristige Lagerung geschah in der Gasphase über flüssigem Stickstoff.

Aus einer 25 cm²-Zellkulturflasche konnten 3 Cryo-Konservierungsröhrchen, aus einer 150 cm²-Zellkulturflasche 10 Cryo-Konservierungsröhrchen gewonnen werden.

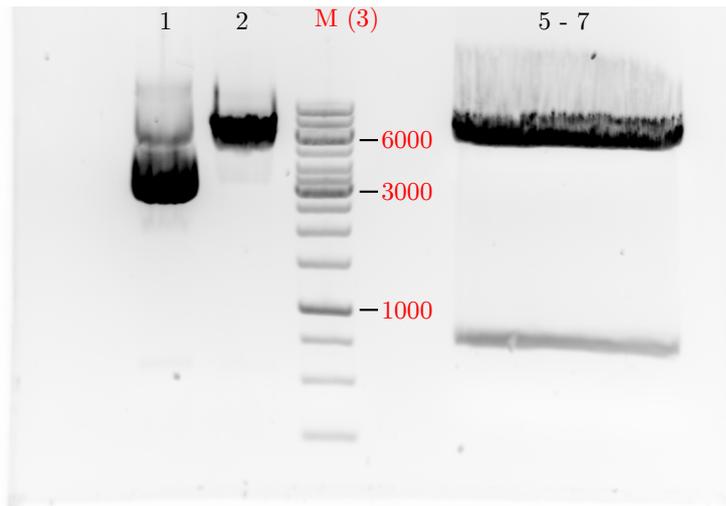
3.2.3 Klonierungen

3.2.3.1 Klonierung von peGFP-c1-Dim2

Als Startpunkt dienten die beiden Vektoren pEGFP-c1 und pET-MCN-His-TEV-TC-Dim2. In den Multiple-Cloning-Sites (MCS) beider Vektoren befinden sich die Schnittstellen XmaI und XbaI, die so liegen, dass die Schnitte ohne weitere Modifikationen verwendet werden konnten und auch das Leseraster bei der Kopplung erhalten blieb. Der Restriktionansatz für beide Vektoren ist aus Tabelle 3.1 zu entnehmen. Die Restriktion war erfolgreich, wie auf dem Gel in Abbildung 3.1 zu sehen ist. In Linie 1 ist der ungeschnittene Vektor zu sehen, der aufgrund der Faltung kleiner

Tabelle 3.1: Restriktionsansatz *XmaI* und *XbaI*.

	pEGFP-c1	pET-MCN-His-TEV-TC-Dim2
H ₂ O	38 μ L	33 μ L
10x Tango Puffer	5 μ L	5 μ L
DNA	5 μ L	10 μ L
<i>XbaI</i>	1 μ L	1 μ L
<i>XmaI</i>	1 μ L	1 μ L
Σ	50 μ L	50 μ L

**Abbildung 3.1:** Agarose-Gel des *XmaI*/*XbaI*-Restriktionsansatzes. Die Markergröße ist angegeben in Basenpaaren.

erscheint als der linearisierte Vektor in Linie 2. In Linie 3 ist der Marker aufgetragen, auf den Linien 5-7 ist das aus pET-MCN-His-TEV-TC-Dim2 ausgeschnittene Insert samt dem leeren Vektor zu sehen. Die Aufreinigung beider Restriktionsansätze erfolgte mit Hilfe des ThermoFisher Kits #K0831 [ThermoFisher, 2013]. Für den Vektor wurde Protokoll A verwendet, für das Insert Protokoll C, da dieses aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden musste, um es vom Restvektor zu trennen. Mit den beiden aufgereinigten DNA-Komponenten erfolgte eine Ligation, der Ansatz sowie der der zugehörigen Negativkontrolle ist Tabelle 3.2 zu entnehmen. Mit je 5 μ L Lösung aus den beiden Ligationsansätzen wurden Hitzeschocktransformationen von JM109-Bakterien, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, durchgeführt. Beide Ansätze wurden zu $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ auf mit Ampicillin

Tabelle 3.2: Ligationsansatz *XmaI* und *XbaI* zur Klonierung von pEGFP-c1-Dim2.

	Ansatz	Negativkontrolle
H ₂ O	9,9 μ L	16 μ L
Vektor	0,73 μ L	1 μ L
Insert	6,37 μ L	
Ligase	1 μ L	1 μ L
Puffer	2 μ L	2 μ L
Σ	20 μ L	20 μ L

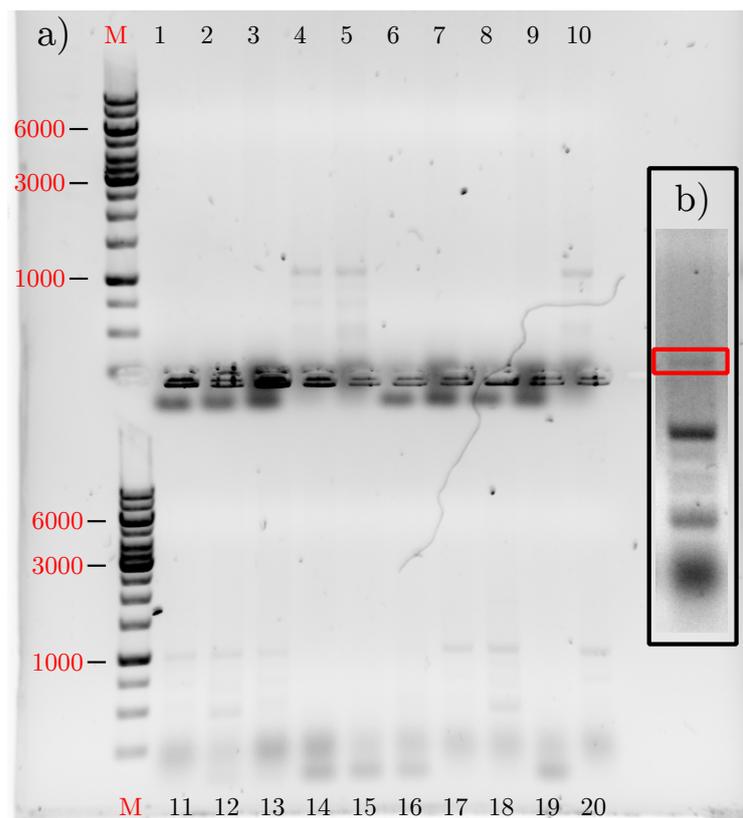


Abbildung 3.2: PCR-Screening der Klonierung von *peGFP-c1-Dim2*. a) komplettes Agarosegel, b) Vergrößerung von Linie 18 mit gesuchter Bande.

versetzten Agarose-Platten ausgebracht und ÜN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen waren nur die Platten des Ligationsansatzes mit Insert bewachsen. Von diesen Platten wurden nun insgesamt 20 Klone für ein PCR-Screening mit den Primern CMV-for und EBV-rev mit einem Zahnstocher aufgenommen. Falls das Insert erfolgreich eingebaut wurde, müsste dieses dazwischen amplifiziert werden und auf einem Agarosegel eine der neuen Länge entsprechende sichtbare Bande erzeugen. Das Agarosegel ist in Abbildung 3.2 a gezeigt. Bei Klon 18 zeigte sich eine hauchdünne Bande bei 2000 bp, der Gelausschnitt ist vergrößert und stärker kontrastiert nochmals in Abbildung 3.2 b gezeigt. Der Klon wurde in einer ÜN-Kultur vervielfältigt und das enthaltene Plasmid wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben aufgereinigt. Eine Sequenzierung des Plasmids mit CMV-for zeigte, dass das Fusionsziel eGFP-Dim2 erfolgreich kloniert und in Bakterien transformiert werden konnte.

3.2.3.2 Klonierung von pSnap-Dim2

Um eine flexiblere Farbstoffwahl zu ermöglichen, sollte im Vektor eGFP gegen das Snap-Tag ausgetauscht werden [Keppler et al., 2004].

Hierzu wurde zuerst eGFP aus dem Vektor *peGFP-c1-Dim2* entfernt, indem mit den Restriktionsenzymen EcoRI und AgeI geschnitten wurde. Der Restriktionsansatz ist Tabelle 3.3 zu entnehmen. Der Erfolg der Restriktion wurde mit einem 1 %-Agarose-Gel kontrolliert. Dieses ist in Abbildung 3.3 zu sehen. In den Linien 1 und 6 ist ein Marker aufgetragen, in Linie 2 der ungeschnittene

Tabelle 3.3: Restriktionsansatz mit *EcoRI* und *AgeI*, um *eGFP* aus dem Vektor *peGFP-c1-Dim2* zu entfernen.

	pEGFP-c1-Dim2
H ₂ O	26 μ L
10x oranger Puffer	10 μ L
DNA	12 μ L
<i>EcoRI</i>	1 μ L
<i>AgeI</i>	1 μ L
Σ	50 μ L

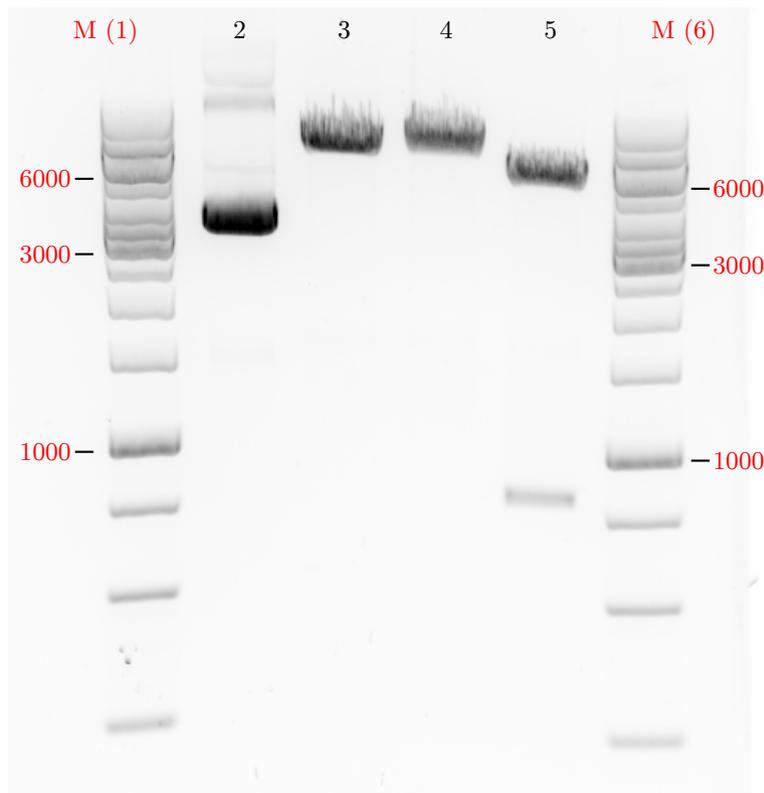


Abbildung 3.3: Agarosegel zur Restriktionskontrolle des Vektors *peGFP-c1-Dim*. Linien 1 und 6: Marker, Größe angegeben in Basenpaaren; Linie 2: ungeschnittener Vektor; Linien 3 und 4: Einzelverdau mit *EcoRI* bzw. *AgeI* zur Schnittkontrolle durch Linearisieren des Vektors; Linie 5: Doppelverdau mit *EcoRI* und *AgeI*, ausgeschnittenes *eGFP* bei etwa 800 bp sichtbar.

Vektor. Auf den Linien 3 und 4 sind zur Kontrolle die linearisierten Vektoren aufgetragen, die bei der Einzelrestriktion mit *EcoRI*, bzw. *AgeI*, entstanden. In Linie 5 ist der Doppelverdau zu sehen. Im Vergleich zu den einfach linearisierten Vektoren ist hier der Vektor deutlich verkleinert. Das ausgeschnittene *eGFP* ist als zusätzliche Bande bei etwa 800 bp sichtbar.

Das gewünschte Snap-Insert wurde über eine PCR aus dem Vektor pSS26m repliziert. Der Ansatz für 300 ng Ausgangsvektor ist in Tabelle 3.4 aufgelistet. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide wurden speziell für diese Klonierung angefertigt und sind unter den Namen Snap-*AgeI* und Snap-*EcoRI* Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die PCR wurde mit einer Anlagerungstemperatur von 69,2 °C und einer Anlagerungszeit von 20 Sekunden durchgeführt. Die Reaktionszeit betrug 30 Sekunden, insgesamt wurden 30 Zyklen durchlaufen. Die Aufreinigung erfolgte nach Protokoll

Tabelle 3.4: PCR-Ansatz zur Amplifikation des Snap-Tags.

	Ansatz
H ₂ O	35,2 μ L
5x Herculase Puffer	10 μ L
dNTP (10 mM)	1,5 μ L
DNA	0,33 μ L
Snap-AgeI	1,25 μ L
Snap-EcoRI	1,25 μ L
Herculase II	0,5 μ L
Σ	50 μ L

Tabelle 3.5: Restriktionsansatz mit EcoRI und AgeI, um am Insert die passenden Schnittstellen zum geschnittenen Vektor zu erzeugen.

	Ansatz
H ₂ O	31 μ L
10x oranger Puffer	10 μ L
DNA	6 μ L
EcoRI	1 μ L
AgeI	1 μ L
Σ	50 μ L

B des ThermoFisher-Kits #K0832 [ThermoFisher, 2013].

Der Ansatz zur anschließenden EcoRI-AgeI-Restriktion des Inserts ist Tabelle 3.5 zu entnehmen. Die Restriktion wurde über 2 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

Die anschließende Ligation erfolgte mit einem Insert:Vektor-Verhältnis von 3:1, die Ansatzgröße ist Tabelle 3.6 zu entnehmen. Es folgte eine Transformation in JM109-Bakterien, die in $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ auf Kanamycin-Agaroseplatten ausgesät wurden. Von den am nächsten Morgen bewachsenen Platten wurden 20 Klone isoliert und einem PCR-Screening mit CMV-for und SV40-rev unterworfen. Die PCR-Ansätze wurden in einem Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 3.4) und die Klone 7 und 8 kultiviert. Deren Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und sequenziert, das gewünschte neue Plasmid konnte erfolgreich in Klon 7 identifiziert werden.

Tabelle 3.6: Ligationsansatz zum Fusionieren des geschnittenen peGFP-c1-Dim2- Δ eGFP mit dem PCR-amplifizierten Snap-Insert.

	Ansatz
H ₂ O	15,957 μ L
Vektor	0,676 μ L
Insert	0,367 μ L
Ligase	1 μ L
Puffer	2 μ L
Σ	20 μ L

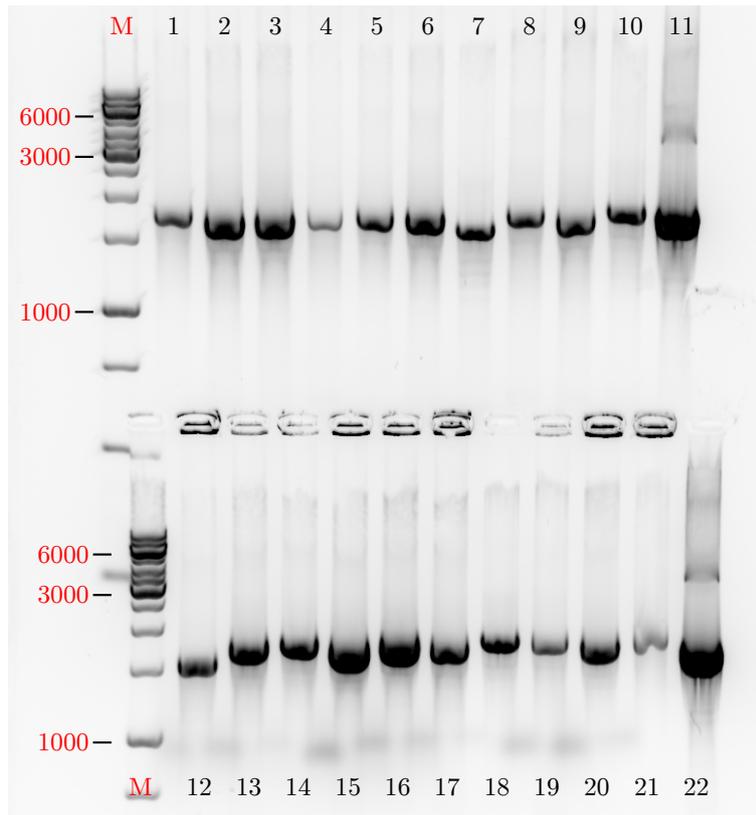


Abbildung 3.4: Agarosegel zum PCR-Screening nach der erfolgten Ligation für das Snap-Dim2-Fusionskonstrukt. Die Markergröße ist angegeben in Basenpaaren.

3.2.3.3 Klonierung von pSnap-repair-Dim2

Nachdem das Plasmid pSnap-Dim2 komplett sequenziert worden war, fiel auf, dass bei der im Abschnitt 3.2.3.2 beschriebenen Klonierung übersehen wurde, dass sich in der MCS zwei EcoRI-Schnittstellen befanden. In der oben beschriebenen, erfolgreichen Klonierung wurde jedoch die falsche Schnittstelle geschnitten, wodurch sich das Leseraster zwischen den beiden im Fusionsprotein enthaltenen Proteinen um ein Nukleotid verschob. So wurde das Snap-Tag noch korrekt exprimiert, das angehängte Dim2 jedoch nicht mehr. Um diesen Fehler zu korrigieren, wurde ein Oligonukleotid zwischen die beiden Proteine eingeschoben, um so mit Hilfe des Linkers das Leseraster wieder herzustellen. Die Sequenz der beiden verwendeten Oligonukleotide Snap-repair-for und Snap-repair-rev befindet sich im Kapitel 2.5.

Zuerst wurde das Plasmid pSnap-Dim2 mit einer EcoRI-Restriktion an der Stelle linearisiert, an welcher das Oligonukleotid eingeschoben werden sollte. Der Restriktionsansatz kann Tabelle 3.7 entnommen werden. Die Restriktion lief 2 Stunden bei 37 °C, anschließend erfolgte eine Denaturierung des Restriktionsenzym bei 65 °C für 30 Minuten.

Parallel wurden die beiden Snap-repair-Oligonukleotide zu einer doppelsträngigen DNA zusammengefügt. Hierzu wurden je 25 µL der beiden Oligonukleotide zusammengegeben und für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz über eine Temperaturrampe bis auf 25 °C abgekühlt, wobei die Kühlgeschwindigkeit 2 °C pro Minute betrug.

Anschließend wurden zwei Ligationsansätze mit verschiedenen Vektor:Insert-Verhältnissen ange-

Tabelle 3.7: Restriktionsansatz *EcoRI* zum Einschieben des Repair-Oligonukleotids

	PCR-amplifiziertes Insert
H ₂ O	11,5 μ L
10x oranger Puffer	2,5 μ L
DNA	10 μ L
<i>EcoRI</i>	1 μ L
Σ	25 μ L

Tabelle 3.8: Ligationsansatz zum Einbau des Snap-repair-Oligonukleotide in den fehlerhaften Snap-Dim2-Vektor.

	Ansatz 1	Ansatz 2
H ₂ O	16,48 μ L	15,43 μ L
Vektor	0,35 μ L (100 ng)	1,4 μ L (400 ng)
Insert	0,17 μ L (1,32 ng)	0,17 μ L (1,32 ng)
Ligase	1 μ L	1 μ L
Puffer	2 μ L	2 μ L
Σ	20 μ L	20 μ L

setzt. Diese können Tabelle 3.8 entnommen werden.

Da im Plasmid, in dem das Oligonukleotid erfolgreich eingebaut wurde, keine *EcoRI*-Schnittstelle mehr enthalten ist, im religierten Vektor ohne Oligonukleotid jedoch schon, wurde vor der Transformation noch ein *killer cut* durchgeführt. Hierbei wurde eine *EcoRI*-Restriktion mit den beiden Ligations-Ansätzen durchgeführt. Der religierte Vektor wird dabei wieder aufgeschnitten und so linearisiert, wodurch er bei der anschließenden Transformation von den Bakterien nicht aufgenommen werden kann. Der Einbau des repair-Oligonukleotids verlief erfolgreich. Im folgenden Verlauf der Arbeit wird unter „Snap-Dim2“ immer das Konstrukt mit korrektem Leseraster verstanden.

3.2.3.4 Klonierung von pQCXIP-eGFP-Dim2

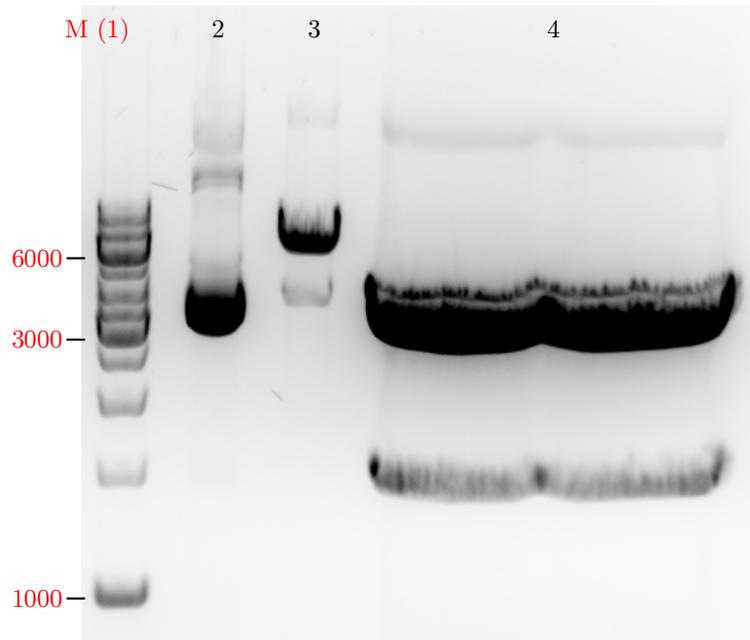
Um das eGFP-Dim2-Fusionsprotein stabil in eine Zelllinie zu integrieren, musste die kodierende DNA in einen retroviralen Vektor umgesetzt werden. Bei diesem Zielvektor handelte es sich um pQCXIP (Clontech).

Die *multiple cloning site* besitzt jeweils eine *AgeI*- sowie eine *BamHI*-Schnittstelle, die zum Einbau des Fusionsproteins verwendet werden sollten. Günstigerweise besaß auch der Vektor peGFP-Dim2 die beiden Schnittstellen an passender Position, sodass auf eine aufwändige PCR-Replikation verzichtet werden konnte. Der Restriktionsansatz ist in Tabelle 3.9 aufgeführt, das Ergebnis der Restriktion ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Die Insert-Bande wurde ausgeschnitten und mit dem ThermoFisher Kit #0831, Protokoll C, aufgereinigt. Die Molalität des eGFP-Dim2-Insert betrug 100,3 $\frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$.

Anschließend sollte auch der Zielvektor pQCXIP linearisiert werden. Da die beiden Enzyme jedoch nur mäßig kompatibel sind, konnte in mehrfachen Versuchen keine erfolgreiche Restriktion erreicht werden. Daher wurden die beiden Restriktionen nacheinander durchgeführt. Nach dem *BamHI*-Verdau (Ansatz in Tabelle 3.10) erfolgte eine Aufreinigung des geschnittenen Vektors mit dem

Tabelle 3.9: Restriktionsansätze *Bam*HI und *Age*I zum Ausschneiden des *eGFP-Dim2*-Inserts.

	Ansatz <i>Age</i> I	Ansatz <i>Age</i> I und <i>Bam</i> HI
H ₂ O	15,5 μ L	33 μ L
10x roter Puffer	2 μ L	5 μ L
DNA	2 μ L	10 μ L
<i>Age</i> I	0,5 μ L	1 μ L
<i>Bam</i> HI	0 μ L	1 μ L
Σ	20 μ L	50 μ L

**Abbildung 3.5:** Agarosegel zur Aufreinigung der *eGFP-Dim2*-Kassette. Linie 1: Marker; Linie 2: unverdauter Vektor; Linie 3: mit *Age*I linearisierter Vektor; Linie 4: Doppelverdau mit ausgeschnittenem Insert. Die Markergröße ist angegeben in Basenpaaren.

ThermoFisher Kit# 0831 [ThermoFisher, 2013], welcher dann als Ausgangs-DNA für die *Age*I-Restriktion (Ansatz in Tabelle 3.10) diente. Auch das Ergebnis der zweiten Restriktion wurde mit dem ThermoFisher-Kit aufgereinigt, der linearisierte Vektor hatte anschließend eine Molalität von $90,4 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$. Der Ansatz zur anschließenden Ligation kann Tabelle 3.11 entnommen werden.

Es folgte eine Transformation in JM109-Bakterien, die in $\frac{1}{10}$ und $\frac{9}{10}$ auf Ampicillin-Agaroseplatten ausgestrichen wurden. Von den am nächsten Morgen bewachsenen Platten wurden 20 Klone isoliert und einem PCR-Screening mit pQC-for und pQC-rev unterworfen. Die PCR-Ansätze wurden in

Tabelle 3.10: Restriktionsansätze *Bam*HI und *Age*I zur Linearisierung des pQCXIP-Vektors

	Ansatz <i>Bam</i> HI	Ansatz <i>Age</i> I
H ₂ O	34 μ L	35 μ L
DNA	10 μ L	9 μ L
jeweiliger Puffer zum Enzym	5 μ L	5 μ L
Enzym	1 μ L	1 μ L
Σ	50 μ L	50 μ L

Tabelle 3.11: Ligationsansatz zum Einführen der eGFP-Dim2-Kassette in den retroviralen pQCXIP-Vektor.

	Ansatz 1
H ₂ O	14,786 μ L
Vektor	1,106 μ L
Insert	1,108 μ L
T4-Ligase	1 μ L
T4-Ligase-Puffer	2 μ L
Σ	20 μ L

einem Agarosegel aufgetrennt und die Klone 12 und 14 in einer ÜN-Kultur vervielfältigt. Deren Plasmid-DNA wurde aufgereinigt und sequenziert. Das gewünschte neue Plasmid konnte erfolgreich in Klon 14 identifiziert werden. Es wurde eine Cryo-Kultur dieses Klons angelegt.

3.2.3.5 Klonierung von pQCXIP-Snap-Dim2

Zur Klonierung des pQCXIP-Snap-Dim2 wurde der in Kapitel 3.2.3.4 mit AgeI und BamHI linearisierte pQCXIP-Vektor als Ausgangspunkt genommen. Die anschließende Klonierungsstrategie verlief analog zum Vektor peGFP-Dim2. Auch hier konnte das Plasmid erfolgreich gewonnen und eine Cryo-Kultur davon angelegt werden.

3.2.4 Transiente Expression

Ein bis zwei Tage vor der geplanten Transfektion wurden die Zellen passagiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Bei etwa 90 %iger Konfluenz wurden die Zellen aus dem Inkubator entnommen, mit 10 mL PBS gewaschen und mit 500 μ L Trypsin versetzt. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte wieder im Inkubator. Es dauerte etwa 3 – 5 Minuten, bis die Zellen sich abgelöst hatten. Die gelösten Zellen wurden anschließend in 10 mL Medium aufgenommen und in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Von der Zell-Medium-Suspension wurden 15 μ L abgenommen und in eine Neubauer-Zellzählkammer überführt, um die Anzahl an Zellen zu bestimmen. Der Rest der Suspension wurde für 10 Minuten bei 200 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Nucleofector Solution V gelöst. Die Menge an Lösung variierte mit der Anzahl der im Pellet enthaltenen Zellen. Es wurden für jeden Ansatz von 100 μ L 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen benötigt. 100 μ L der Zellsuspension wurden mit 2 μ g Plasmid-DNA gemischt und in die Elektroporationsküvette gegeben. Die Küvette wurde in den Nucleofector II eingesetzt und das Programm I-013 eingestellt. Nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension mit 500 μ L vorgewärmtem Medium versetzt, durchmischt und mit weiteren 500 μ L Medium in ibidi-Schalen gegeben. Die neu ausgesäten Zellen wuchsen über Nacht bei 37 °C im Inkubator.

3.2.5 Färben der Snap-Dim2-Zelllinien

Um ein Snap-Fusionsprotein visualisieren zu können, musste das Snap-Tag mit einem Farbstoff verbunden werden. Hierfür wurde der membranpermeable Farbstoff SiR-Snap verwendet, der in

der Johnsson-Gruppe entwickelt wurde [Lukinavičius et al., 2013].

Da es sich um eine induzierbare Zelllinie handelt, wurden die Zellen 16 – 24 h vor dem geplanten Experiment mit $2 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$ Tetracyclin versetzt und anschließend bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert.

3.2.5.1 Anfärben aller Snap-Moleküle

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit $2,5 \mu\text{L}$ einer $2,5 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mL}}$ SiR-Snap-Lösung versetzt und für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 2 mL PBS gewaschen und nach dem letzten Waschen das Medium erneuert. Um die Zellen im Mikroskop zu beobachten, erfolgte zur pH-Stabilisierung die Zugabe von 50 mM Hepes-Lösung.

3.2.5.2 Färben für Einzelmolekülexperimente

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit $2,5 \mu\text{L}$ einer $0,25 \frac{\text{nmol}}{\text{mL}}$ SiR-Snap-Lösung versetzt und für 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit je 2 mL PBS gewaschen und die Zellen erneut in 2 mL frischem Medium für 1 h inkubiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Unmittelbar vor dem Experiment erfolgte ein erneutes Tauschen des Mediums sowie die zusätzliche Zugabe von 50 mM Hepes-Puffer.

3.3 Mikroskopie

In Kapitel 2.8 wurden verschiedene Zelllinien vorgestellt, die das Zielprotein Dim2 in verschiedenen Fusions-Varianten tragen. Diese verschiedenen Zelllinien konnten für unterschiedliche lichtmikroskopische Experimente verwendet werden, durch die unterschiedliche Rückschlüsse auf die Mobilität möglich sind. Dies ist in Abbildung 3.6 illustriert.

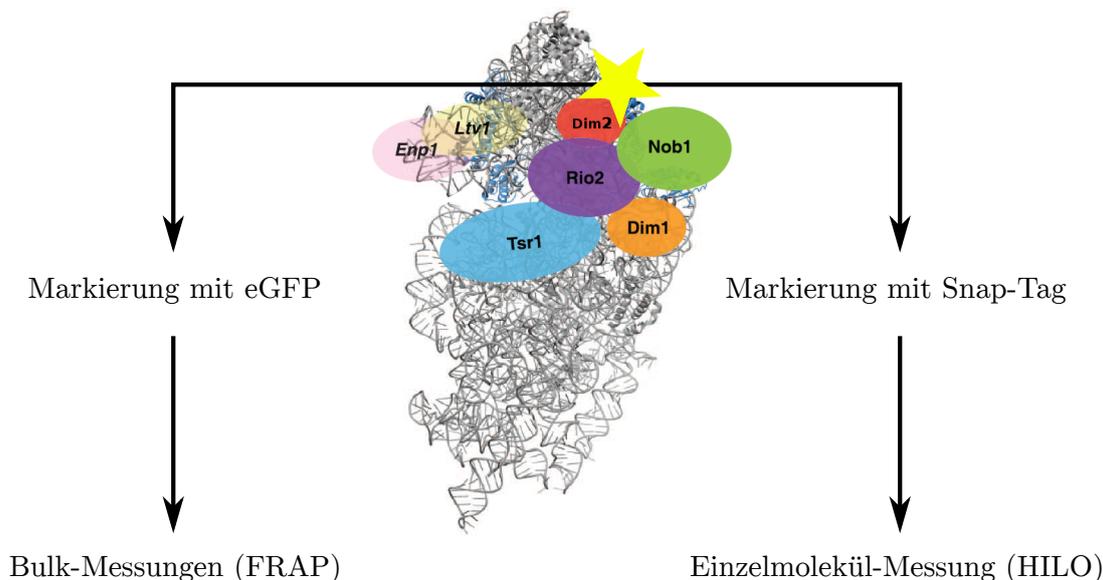


Abbildung 3.6: Markierungswahl und Mikroskopie-Techniken im Vergleich. Gezeigt ist die rRNA-Struktur der späten Vorläuferuntereinheit mit noch vorhandenen Prozessierungsfaktoren. Dim2 wird durch die rote Ellipse oben rechts symbolisiert. An Dim2 wurden zwei unterschiedliche Proteine (durch einen Stern dargestellt) zur Fluoreszenzmarkierungen fusioniert, einmal das Protein eGFP, zum anderen das Snap-Tag-Protein, was einen zusätzlichen organischen Farbstoff trägt. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Markierung ist die Anwendung verschiedener Mikroskopietechniken möglich. Struktur der Vorläuferuntereinheit verändert aus [Campbell und Karbstein, 2011].

Die beiden verwendeten Fluoreszenzmarker eGFP und SiR-Snap differieren in ihren Eigenschaften erheblich. Der wohl entscheidendste Unterschied ist die Bleichstabilität. Die Photostabilität des organischen Farbstoffs SiR-Snap ist höher als die des eGFP. Dadurch bieten sich verschiedene Experimente an.

Die Tatsache, dass eGFP leicht ausbleicht, kann in der Technik FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) ausgenutzt werden. Da alle exprimierten Fusionsproteine auch fluoreszieren, handelt es sich hierbei um Bulkmessungen. Diese sind in Abschnitt 3.3.1 näher beschrieben.

Beim Snap-Tag-Fusionsprotein verhält sich die Situation anders, da das Snap-Tag selbst nicht fluoresziert. Dieses wird erst nach der Kupplung an einen organischen Farbstoff markiert. Somit kann über die zugegebene Menge an Farbstoff bestimmt werden, wie hoch der Grad an fluoreszierenden Proteinen innerhalb der Zelle ist. Die Möglichkeit, nur sehr geringe Anteile des Proteins zu färben, sowie die hohe Photostabilität von SiR-Snap machen es ideal für Einzelmolekülexperimente. Diese werden in Kapitel 3.3.2 genauer beschrieben.

Beide Techniken unterscheiden sich auch deutlich im beobachteten Bereich, der zur Beurteilung der Mobilität herangezogen werden kann. Während in den Einzelmolekülexperimenten fast die gesamt-

te Fläche des Zellkern im Fokus aufgenommen werden konnte (Abbildung 3.7 c), werden bei den FRAP-Messungen nur sehr kleine Ausschnitte des Zellkerns abgebildet. Daher kann hier auch jeweils nur die Mobilität in einem der Kernkompartimente beobachtet werden. Rückschlüsse über die Mobilität konnten daher in den FRAP-Messungen nur über Partikel im Nukleolus (Abbildung 3.7 a) oder im Nukleoplasma (Abbildung 3.7 b) gezogen werden.

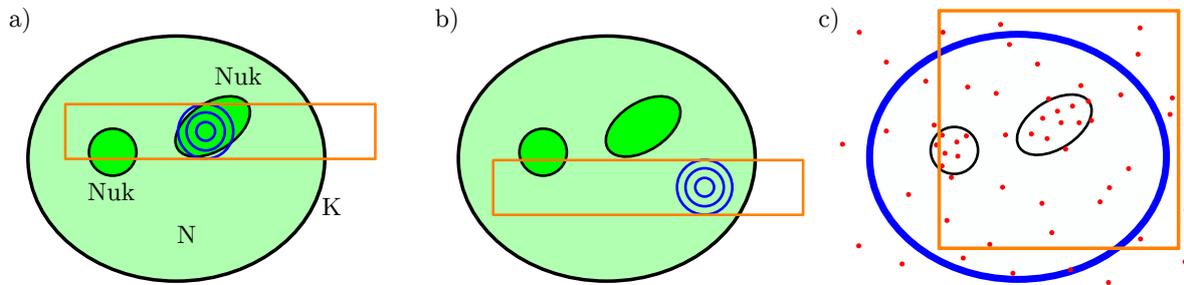


Abbildung 3.7: Beobachtungsfeld der Mikroskopiertechniken im Vergleich. K = Kernhülle, N = Nukleoplasma, Nuk = Nukleolus; in orange dargestellt ist jeweils der abgebildete Bildausschnitt. a) Bildausschnitt ($3,4 \mu\text{m} \times 22,5 \mu\text{m}$) und Bleichgröße bei einer FRAP-Messung im Nukleolus; die drei blauen Kreise zeigen Bleich-Regionen mit einem Durchmesser von $1,1 \mu\text{m}$, $2,2 \mu\text{m}$ und $3,4 \mu\text{m}$ Größe an. b) Bildausschnitt und Bleich-Regionen im Nukleoplasma, die Größen verhalten sich analog zu a; c) Bildausschnitt ($19,3 \mu\text{m} \times 19,3 \mu\text{m}$) bei den Einzelmolekülexperimenten. Hier ist die Kernhülle aufgrund ihrer Markierung in blau gezeigt, die vereinzelt gefärbten Dim2-Moleküle sind als rote Punkte dargestellt.

3.3.1 FRAP-Experiment

Das Messprinzip der FRAP-Messungen beruht auf der Diffusion von Partikeln und ist in Abbildung 3.8 schematisch dargestellt [Axelrod et al., 1976]. Zu Beginn der Messung erfolgt eine Aufnahme der Fluoreszenzintensität in einem vorher definierten Ausschnitt, genannt ROI (*region of interest*). Nach einer festgelegten Anzahl von Aufnahmen erfolgt die Photobleichung der fluoreszierenden Partikel, indem das ROI einem kurzen Laserimpuls maximaler Leistung ausgesetzt wird. Anschließend wird der Verlauf der Intensität im ROI verfolgt. Durch die Diffusion der gebleichten Partikel aus dem ROI heraus, und die gleichzeitige Diffusion ungebleichter Partikel in den ROI hinein, kommt es zu einem Wiederanstieg der Fluoreszenz im beobachteten Bereich. Die Gleichung $\langle r^2 \rangle = \sqrt{4Dt}$ (Abschnitt 3.3.6.1) stellt die Bleichfläche des ROIs $\langle r^2 \rangle$ in einen Zusammenhang mit dem globalen Diffusionskoeffizienten D der Partikel, sowie der benötigten Zeit t zum Wiederanstieg der Fluoreszenz. Aus der Intensität der wiederansteigenden Fluoreszenz ist zusätzlich ein Rückschluss auf eine eventuell vorhandene immobile Komponente möglich, da hier kein Austausch durch neue fluoreszierende Partikel erfolgt.

Die Experimente zur Fluoreszenzrückkehr nach Photobleichung wurden an einem LSM 510 meta von Zeiss durchgeführt. Bei den für diese Experimente verwendeten Zelllinien handelte es sich um HeLa eGFP-Dim2 und HeLa FlipIn-TREX eGFP-Dim2. Diese wurden 16 h bis 24 h vor den Experimenten passagiert, in Mattek-Schalen ausgesät und ggf. mit Tetracyclin induziert.

Das Mikroskop wurde auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmt. Als Objektiv wurde ein 20x Plan-NEOFLUAR Luftobjektiv mit einer NA von 0,5 verwendet, welches keinen Korrekturring für die Temperatur besitzt. Um die Fluoreszenzrückkehr bestimmen zu können, wurden zu Beginn einer jeden Messung drei

pre-bleach-Bilder aufgenommen, wobei die Laserlinie 488 nm mit 1 % der Maximalleistung verwendet wurde. Um das Anregungs- vom Emissionslicht zu trennen, wurde ein Bandpassfilter mit einem Transmissionsbereich von 505 – 530 nm verwendet. Die abgerasterte Region war jeweils 15 px x 100 px groß, wobei ein Pixel $0,22 \times 0,22 \mu\text{m}^2$ groß ist. Mit einer Scan-Zeit von $6,5 \mu\text{s}$ pro Pixel konnte so eine Scanzeit von 0,07 s pro Bild erreicht werden. Anschließend erfolgte das Bleichen, wofür alle zur Verfügung stehenden Laserlinien (458 nm, 477 nm, 488 nm, 514 nm) des Argonlasers mit einer Gesamtleistung von 30 mW mit 100 % Leistung verwendet wurden. Die Fluoreszenzrückkehr wurde bei einer Frequenz von 13,9 Hz beobachtet, wobei die Laserintensität von 1 % der Maximalleistung wie bei den *pre-bleach*-Bildern verwendet wurde.

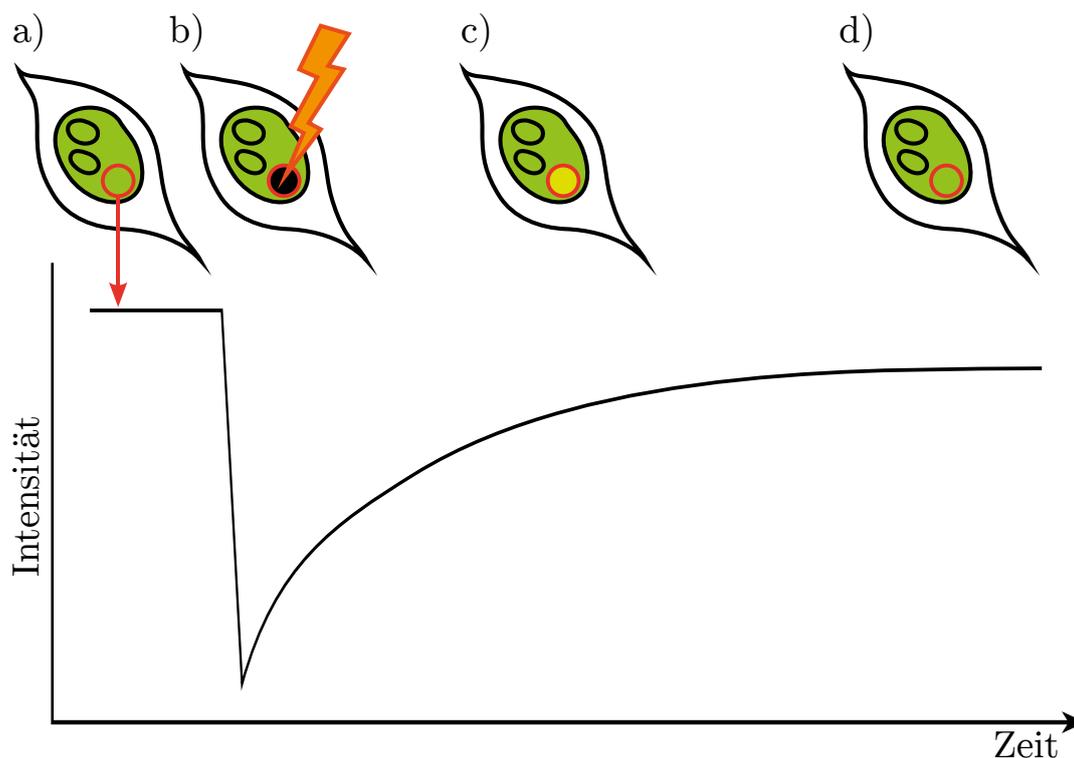


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung eines FRAP-Experiments. a) Aufnahme der Intensität in der rot dargestellten ROI vor dem Bleichprozess, b) Ausbleichung der fluoreszierenden Partikel in der ROI durch einen Laserimpuls hoher Intensität, c) Fluoreszenzrückkehr im gebleichten ROI durch Partikelaustausch durch Diffusion, d) Stabilisierung der Fluoreszenzrückkehr auf einem Niveau.

3.3.2 Einzelmolekülmikroskopie

Die Einzelmolekülmikroskopie stellt das Gegenstück zu den FRAP-Experimenten dar, da hier keine Aussagen über die gemittelte Mobilität durch eine Ensemblemessung getroffen werden, sondern die Mobilität einzelner Partikel selektiv beobachtet werden kann [Kubitscheck et al., 2005, Veenendaal, 2013].

Die Einzelmolekülmessungen wurden an einem Ti Eclipse von Nikon durchgeführt, das verwendete Objektiv war ein 60x Ölimmersionsobjektiv Apo TIRF mit einer NA von 1,49. Das Objektiv verfügt über einen Korrekturring für die Temperatur sowie die Deckglasdicke. Bei diesem wurde die Einstel-

lung $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $0,17\text{ }\mu\text{m}$ für die Glasdicke eingestellt. Zusätzlich wurde eine 2,5x-Vorvergrößerung im Emissionsstrahlengang verwendet, welche sich direkt vor der Kamera befand. Bei der Kamera handelte es sich um eine iXon+ 897D von Andor (Belfast, UK), die mit einem EM-CCD-Chip mit 512×512 Pixeln mit einer Pixelgröße von $16 \times 16\text{ }\mu\text{m}^2$ ausgestattet ist. Der Kamerachip wurde für die Aufnahmen auf $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt, zum Abführen der Abwärme wurde eine Wasserkühlung verwendet. Im Mikroskopaufbau standen zwei Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um einen blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm (Sapphire-100, Coherent, Santa Clara, USA) mit einer Leistung von 100 mW , sowie einen roten Laser mit einer Wellenlänge von 640 nm (Cube 640-40C, Coherent) mit einer Leistung von 40 mW . Die Einstellung der Laserleistung betrug $0,5\%$ für die blaue und 40% für die rote Laserlinie, relativ zur Maximalleistung.

Um auch hier die Proben bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ messen zu können, wurde eine Heizkammer der Firma ibidi verwendet. Da diese jedoch während der Mikroinjektionen nicht geschlossen werden konnte, betrug die Temperatur der Proben während der Messung nur etwa $31\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Bildaufnahme erfolgte mit einer Belichtungszeit von $11,66\text{ ms}$, was sich mit der zusätzlich benötigten Auslesezeit der Kamera auf eine Gesamtzeit von $12,56\text{ ms}$ zwischen zwei Aufnahmen summiert. Dies entspricht einer Bildfrequenz von $79,6\text{ Hz}$.

3.3.2.1 Äquatoriale Exportmessungen

Für die äquatorialen Exportmessungen wurde die Mikroskopiemethode „HILO“ (*highly inclined and optical laminated sheet microscopy*) verwendet [Tokunaga et al., 2008]. Hierfür wird der ins Ölimmersionsobjektiv eingehende Laserstrahl parallel zur optischen Achse seitlich verschoben, sodass der Strahl hinter dem Objektiv nicht senkrecht auf das Deckglas auftritt, sondern in einem Winkel knapp unterhalb des Grenzwinkels für die Totalreflektion. Dadurch kommt es an der Grenzfläche zwischen dem Immersionsöl und dem Deckglas zu einer Brechung, durch die ein schmales Lichtblatt schräg durch die auf dem Deckglas befindliche Probe gelenkt wird. Das Prinzip wird schematisch in Abbildung 3.9 verdeutlicht.

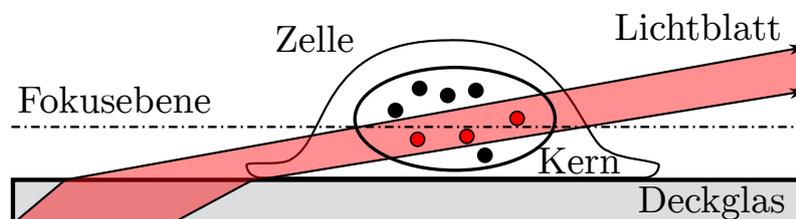


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung des HILO-Prinzips. Der in rot dargestellte Lichtstrahl wird an den Phasengrenzen gebrochen und tritt somit schräg aus dem Glas aus. Dadurch wird nur der Teil der Fluorophore innerhalb des dünnen Lichtblatts angeregt und fluoresziert. Abbildung verändert nach [Tokunaga et al., 2008].

Um die Messungen zu realisieren, wurde ein Bruchteil der heterolog exprimierten Snap-Dim2-Moleküle wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben in rot markiert. Um den Export visualisieren zu können,

musste zusätzlich die Kernmembran angefärbt werden. Hierzu wurde AF488-tc-NTF2 verwendet, was in *E. coli* exprimiert und kovalent markiert wurde (Kapitel 3.1.3 und 3.1.4). Dieses wurde im Verhältnis 1:4 mit Transportpuffer vermischt und anschließend 60 Minuten bei 15000 xg und 10 °C abzentrifugiert. Dadurch wurde verhindert, dass ausgefallenes Protein oder Staubpartikel die zu dünnen Glaskapillaren ausgezogenen Mikroinjektionskanülen verstopften. Die Mikroinjektionskanülen wurden mittels MicroLoadern mit der abzentrifugierten Proteinlösung beladen und in die Mikroinjektionsanlage eingesetzt. Die Mikroinjektion der HeLa-Zellen erfolgte mit einem Haltedruck von 16 hPa sowie einem Injektionsdruck von 26 hPa bei einer Injektionszeit von 0,3 s. Es wurden immer 5 bis 10 Zellen in naher Umgebung gleichzeitig injiziert. Anschließend wurde die Nadel aus dem in der ibidi-Schale befindlichen Medium entfernt. Dies dient dazu, die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren, da durch den Haltedruck ein ständiger Ausfluss des fluoreszenzmarkierten NTF2 stattfindet.

Die Messungen wurden so durchgeführt, dass immer zuerst 50 Bilder im blauen Kanal von der Kernmembran aufgenommen wurden. Direkt daran schloss sich die Aufnahme von 950 Bildern im roten Kanal an, um die Einzelmolekülbewegung aufnehmen zu können. Um die Stabilität des Fokus während der Messung zu gewährleisten, wurde zur Fokusbildung die *PerfectFocus*-Routine von Nikon eingesetzt.

3.3.2.2 Kompartimentabhängige Messungen der Mobilität

Auch hier wurde die Aufnahme von 50 Bildern im blauen Kanal und 950 Bildern im roten Kanal aufgeteilt. Die Akquise der 950 Bilder im roten Kanal erfolgte analog zu den Aufnahmen der äquatorialen Exportmessungen. Die 50 Bilder im blauen Kanal wurden in diesen Messungen jedoch dazu verwendet, um die Nukleoli innerhalb des Zellkerns sichtbar zu machen. Hierzu wurde das Färbeprotokoll von 3.2.5 leicht verändert. Es erfolgte eine Zugabe von 2,5 μL des Farbstoffs SnapCell Oregon Green zusätzlich zu den 2,5 μL SiR-Snap. Die weiteren Waschschriffe wurden nach dem Einzelmolekülprotokoll durchgeführt. Auch bei diesen Messungen erfolgte eine Fokusbildung mit Hilfe des *PerfectFocus*.

3.3.3 Automatisiertes Auffinden der Kernmembran

Zunächst werden die 50 Bildern der Kernfärbung mittels z-Projektion aufsummiert, die Farbtiefe des resultierenden 32 Bit Bildes wieder auf 8 Bit reduziert, der Hintergrund subtrahiert (Option „Rolling Ball“ mit Parameter 15) und der Kontrast verstärkt (0,1 % gesättigte Pixel). Über ein weiteres Makro wird auf das resultierende Bild ein richtungs-unabhängiger Kantefilter angewendet: Das Bild wird zweimal dupliziert, wobei die Kopien um 8 Pixel in x- bzw. y-Richtung verschoben werden. Die Kopien werden jeweils vom Originalbild subtrahiert und die beiden daraus resultierenden Bilder anschließend addiert. Der Prozess wird in Abbildung 3.10 illustriert. Es ist klar zu erkennen, wie aus dem verwaschenen Signal eines einzelnen Bildes ein deutlich besser kontrastiertes Abbild der Kernhülle entsteht. Um nicht-Membran Artefakte an dieser Stelle manuell entfernen zu können, wird die automatisierte Auswertung hier Benutzer-definiert angehalten.

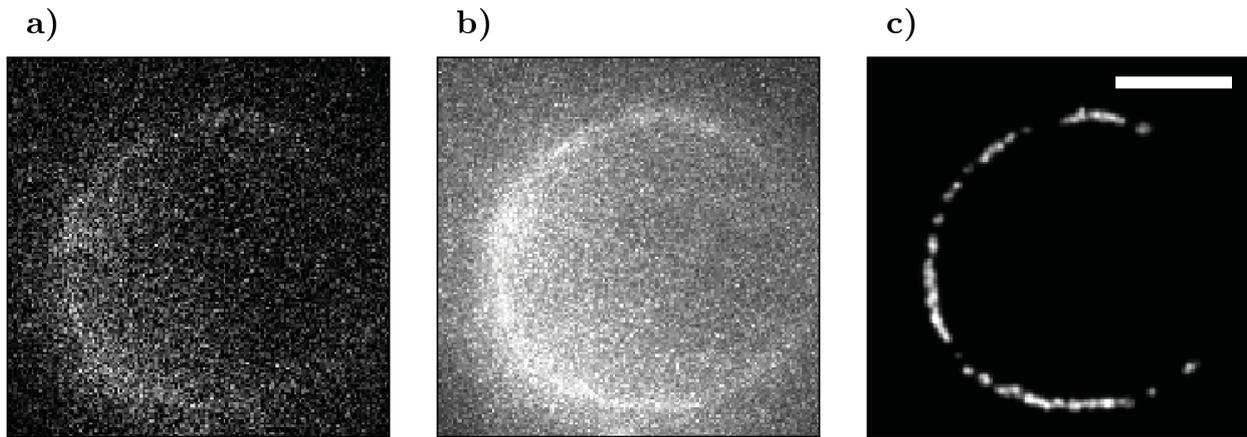


Abbildung 3.10: Prozess zum automatisierten Auffinden der Membran: a) Rohdaten, b) Maximum-Projektion, c) gefilterte Daten. Der Maßstabsbalken beträgt 5 μm .

3.3.4 Lokalisieren von Signalen im Bereich der Kernmembran

Anschließend wird aus dem Graustufen-Bild der gefilterten Membran mit der ImageJ-Funktion „Binary“ ein binäres (1 Bit) Bild erstellt, das als Maske auf die 950 Bilder aus dem roten Kanal gelegt wird. Die Intensität aller Pixel außerhalb dieser Maske wird auf 0 gesetzt, so dass im Folgenden nur noch die Fluoreszenzsignale der ribosomalen Untereinheiten im Bereich der Kernmembran betrachtet werden. Es wird eine Maximum-Projektion erstellt; diese wird geglättet und – nach Anwendung des o.a. Kantensfilters – werden über die ImageJ Funktion „Find Maxima“ (Noise Parameter = 25) die Intensitätsmaxima identifiziert (ROI_{Max}). Die Maxima werden automatisch mit einem quadratischen ROI markiert (Abbildung 3.11) und mit dem DwellTimer ImageJ Plug-In der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität in dieser Region analysiert, um Bindungsereignisse zu identifizieren und deren Verweilzeiten zu quantifizieren. Bindungsereignisse werden als solche identifiziert, wenn die Fluoreszenzintensität mindestens fünffach über der Standardabweichung des Hintergrundrauschens liegt. Dazu wird im roten Kanal nicht nur die Intensität im markierten ROI ermittelt, sondern auch in vier weiteren ROIs, die mit sechs Pixeln Abstand links, rechts, oben und unten zum Maximum-ROI platziert werden. Die gemittelte Standardabweichung aus den 4 ROIs wird dann mit 5 multipliziert als Schwellenwert definiert, entweder dynamisch pro Bild oder gemittelt über den gesamten Film, wobei für die vorliegenden Messungen die Mittelung über den gesamten Film gewählt wurde. Wenn das Signal im ROI_{Max} über den Schwellenwert steigt, wertet das Plug-In das als Bindungsereignis und berechnet die Verweilzeit anhand der Bilder, in denen das Signal über dem Schwellenwert bleibt. Sobald das Signal für mehr als zwei Bilder unter den Schwellenwert sinkt, gilt das Ereignis als beendet. Die Intensitätssignale können optional auch geglättet werden, als mathematische Glättungsfilter sind gleitender Mittelwert bzw. Savatzky-Golay-Filter implementiert (Fensterbreite wahlweise 2, 4 oder 8 Datenpunkte). Intensitätsprofile und Bindungszeiten werden automatisch zur weiteren Bearbeitung gespeichert.

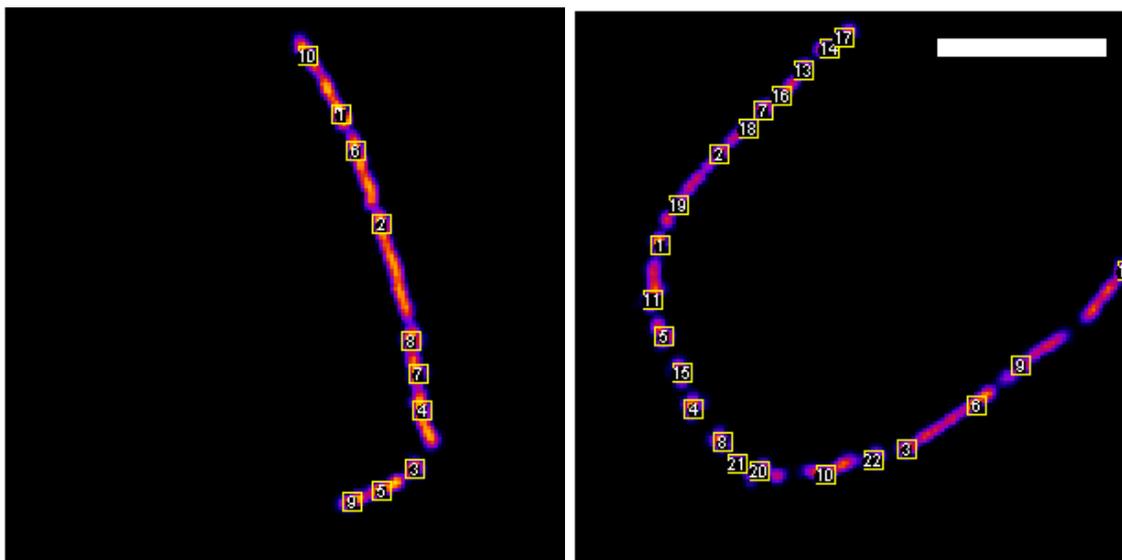


Abbildung 3.11: Gefundene lokale Intensitätsmaxima entlang der definierten Membranposition am Beispiel zweier Zellen. Der Maßstabsbalken beträgt $5 \mu\text{m}$.

3.3.5 Auffinden der Einzelmolekültrajektorien mit Hilfe von Diatrack

Die Auswertung der Einzelmolekülaufnahmen erfolgte mit DiaTrack (Semasopt). In dieses Programm wurden die ungefilterten Filme eingelesen, die nun durch Diatrack selbst prozessiert wurden. Zuerst wurde über die Option „*Subtract Background*“ der Hintergrund abgezogen. Anschließend wurden die Filme mit der Funktion „*Filter Data*“ geglättet. Hier wurde als Parameter für alle Auswertungen 1,1 gewählt. Gegebenenfalls wurde über „*Select region*“ ein Bereich ausgewählt, in dem die Auswertung stattfinden soll. Zusätzlich wurde für die sub-Pixel-Lokalisation die erwartete Größe der Partikel über die Funktion „*High Precision mode*“ angewählt, wodurch die Lokalisierung nicht mehr durch den Massenschwerpunkt, sondern über eine Gaußverteilung bestimmt wurde. Hier wurde ein Wert von 1,2 eingegeben. Die dadurch simulierte Signalgröße entsprach der Signalgröße der Aufnahmen.

Nachdem das „*Pre-Processing*“ abgeschlossen war, konnte mit der „*Particle Selection*“ begonnen werden. Hierzu gibt es drei Einstellungsmöglichkeiten, und zwar „*Trash dim*“, „*Trash bright*“ und „*Trash blurred*“. „*Trash dim*“ setzt einen unteren Schwellenwert, den ein Partikel an Intensität haben muss, um als solcher betrachtet zu werden. „*Trash bright*“ ist das Gegenstück zu „*Trash dim*“. Hier kann ein oberer Schwellenwert für die Helligkeit gesetzt werden, die ein Partikel nicht überschreiten darf. Diese Funktion dient beispielsweise dazu, Aggregate zu filtern. Da im vorliegenden Projekt jedoch keine Aggregate zu erwarten waren und die Partikel auch sehr ähnliche Helligkeiten zeigten, wurde diese Funktion nicht verwendet. Sowohl „*Trash dim*“ als auch „*Trash bright*“ haben als Wahlmöglichkeit die 8-bit-Tiefe 0 bis 256. Die letzte Einstellungsmöglichkeit ist „*Trash blurred*“. Mit dieser kann definiert werden, wie sehr ein Partikel höchstens von der angenommenen Kreisform abweichen darf. Hier können Werte zwischen 0 und 1 gewählt werden, wobei mit Annäherung an 1 der Anspruch an die Kreisform ansteigt. Die Einstellungen für „*Trash dim*“ und „*Trash blurred*“ wurden für jeden Film einzeln angepasst.

Nach Abschluss der Einstellungen konnte nun über „*Process next frames*“ die Partikelsuche angestoßen werden. Alle Filmanalysen wurden visuell verfolgt und die Einstellungen angepasst, falls sich die Einstellungen, die am ersten Bild getroffen wurden, als nicht praktikabel für den kompletten Film erwiesen. Nach Beenden der Partikelsuche konnte mit „*Track !*“ die Verknüpfung der gefundenen Partikelpositionen zu Trajektorien gestartet werden, wobei als Verknüpfungskriterium *nearest neighbour* verwendet wurde. Dieser nächste Nachbar durfte nicht weiter entfernt sein als das 2,6-fache MSD (Kapitel 3.3.6.1), wobei die Eingabe der Begrenzung in Diatrack in Pixeln erfolgte. Zur Auswertung der Daten lag die maximale Sprungweite bei 8 Pixeln, also ca. 850 nm. Befanden sich im infrage kommenden Intervall mehrere Partikel, erfolgte die Verknüpfung zum nächstgelegenen Partikel. Falls sich kein Signal in der betreffenden Region im nächsten Bild wiederfand, blieb die Position unverknüpft, bzw. die Trajektorie brach ab. Es wurden keine Lücken zwischen den Bildern erlaubt, ein Blinken eines Farbstoffes resultierte demnach in zwei getrennten Trajektorien.

3.3.6 Analyse der Trajektorien

Zur weiteren Analyse der Trajektorien wurden die von DiaTrack erstellten Tabellen weiter analysiert. Hierzu wurden diese entweder mit einem Mehrfach-ASCII-Import in Origin eingelesen, oder es geschah mit einem selbstgeschriebenen Skript eine Umwandlung in einzelne Matlab-Matrizen. Anschließend wurden die Trajektorientabellen in Origin oder Matlab weiter prozessiert.

3.3.6.1 Analyse des mittleren Verschiebungsquadrates

Das mittlere Verschiebungsquadrat (MSD, *mean squared displacement*) kann bei freier Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten D mit

$$\langle r^2 \rangle = 4Dt \quad (3.1)$$

beschrieben werden, was einem linearen Anstieg mit der Zeit t entspricht.

Die freie Diffusion ist in biologischen Systemen jedoch meistens nicht gegeben, da es zusätzliche Effekte gibt, die sich auf die Partikelmobilität auswirken. Zum einen kann eine Beschleunigung stattfinden, indem Partikel durch Transportsysteme der Zelle gezielt transportiert werden, zum anderen behindern Zellstrukturen wie Chromatin im Zellkern oder das Aktinskelett im Zelllumen die freie Diffusion. Zusätzlich setzt Gleichung 3.1 voraus, dass das Partikel unendlich viel Platz hat. Dies ist in der Zelle nicht gegeben, das Zellvolumen ist durch die Membran begrenzt. Noch stärker wird die Begrenzung, wenn die Diffusion nur in definierten Kompartimenten der Zelle, wie dem Zellkern oder den Nukleoli, stattfinden kann. Wenn ein solcher Fall auftritt verändert sich auch der Verlauf der MSD-Kurve, wie in Abbildung 3.12 illustriert ist [Saxton und Jacobson, 1997, Saxton, 2007].

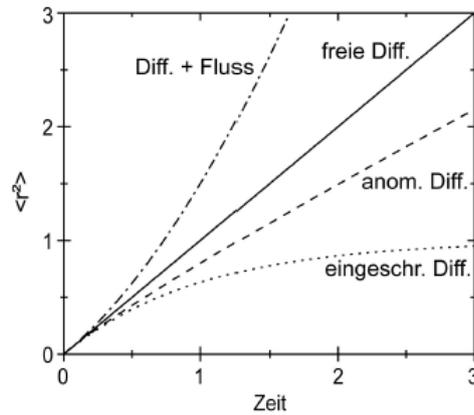


Abbildung 3.12: Verlauf der MSD-Auftragung für frei diffundierende Partikel in unterschiedlichen Umgebungen, die sich auf die Sprungweite auswirken. Im Fall der freien Diffusion (freie Diff.) ergibt sich gemäß Gleichung 3.1 eine Gerade. Wenn zusätzlich zur Diffusion noch ein Fluss (Diff. + Fluss) auftritt, erhöht sich $\langle r^2 \rangle$ bei gleicher Zeiteinheit. Auf der anderen Seite kann es zu Verlangsamung durch Hindernisse oder einen eingeschränkten Diffusionsbereich kommen. Dies führt zu den abgeflachten Kurven der anomalen Diffusion (anom. Diff.) sowie der eingeschränkten Diffusion (eingeschr. Diff.).

3.3.6.2 Sprungweiten-Analyse der Trajektorien

Für die Sprungweitenanalyse (SWA) wurde ein von Dr. Roman Veith geschriebenes Programm verwendet [Veith, 2011]. Dieses beruht darauf, dass die Wahrscheinlichkeit, ein Partikel bei freier Diffusion mit dem Diffusionskoeffizienten D nach einem definierten Zeitintervall t in einem Abstand r anzutreffen, mit einem exponentiellen Abfall beschrieben werden kann:

$$p(r,t)dr = \frac{1}{2} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} r dr \quad (3.2)$$

Gleichung 3.2 gilt jedoch nur, wenn sich alle Partikel mit demselben Diffusionskoeffizienten fortbewegen. Da vom beobachteten Protein Dim2 jedoch bekannt ist, dass es sich während der gesamten Entwicklung der ribosomalen 40S-Untereinheit auf diesem sich mehrfach ändernden Partikel befindet, wurden unterschiedliche Mobilitäten erwartet. Hierzu kann Gleichung 3.2 so modifiziert werden, dass eine Anzahl an Mobilitätskomponenten γ , die mit einem Anteil A_i an der Gesamtmobilität beteiligt sind, an die Verteilung angepasst wird:

$$p'(r,t)dr = \sum_{j=1}^{\gamma} \frac{A_j}{2D_j t} e^{-\frac{r^2}{4D_j t}} r dr \quad (3.3)$$

Um nun die Theorie auf die gewonnenen Trajektorien anzuwenden, wurde mit dem Befehl „all“ eine Tabellentransformation angestoßen, bei der die Sprungdistanz (*jump distance*, JD) der jeweiligen Trajektorien nach einem Bild berechnet wird. Diese Sprungdistanzen werden mit $JD1$ bezeichnet. Die $JD1$ -Werte wurden in einem Histogramm aufgetragen, wobei die gewählte Klassenbreite 40 nm betrug. Das Histogramm wurde in eine Häufigkeitsdichteverteilung umgerechnet, indem die Anzahl an Sprüngen der jeweiligen Klasse sowohl durch die Gesamtzahl an Sprüngen als auch durch die Klassenbreite dividiert wurde. An diese Häufigkeitsdichteverteilung kann nun

eine Verteilungsfunktion angepasst werden, um die darunter liegenden Mobilitäten zu bestimmen. Verwendet wurde eine Drei-Komponenten-Anpassung, die sich aus Gleichung 3.3 ergibt:

$$y = \frac{A_1}{2D_1 t[\text{ms}]} \cdot e^{-\frac{r^2}{4000D_1 t[\text{ms}]}} \cdot r + \frac{A_2}{2D_2 t[\text{ms}]} \cdot e^{-\frac{r^2}{4000D_2 t[\text{ms}]}} \cdot r + \frac{A_3}{2D_3 t[\text{ms}]} \cdot e^{-\frac{r^2}{4000D_3 t[\text{ms}]}} \cdot r \quad (3.4)$$

wobei A_1 , A_2 , A_3 die gesuchten Anteile und D_1 , D_2 , D_3 die zugehörigen Diffusionskoeffizienten der einzelnen Mobilitätsfraktionen sind. y ist die Häufigkeitsdichte, r die Sprungweite, und $t[\text{ms}]$ steht für den Zeitschritt in Millisekunden. Die Nebenbedingung $\sum A_i = 1$ muss durch die Anpassung erfüllt werden.

3.3.6.3 Trajektorienanalyse mit vbSPT

Bei vbSPT handelt es sich um eine Matlab-Implementierung zur Trajektorienanalyse, die von Elf *et al.* veröffentlicht wurde [Persson et al., 2013]. „vbSPT“ steht für *variational Bayesian Single Particle Tracking*. Die Grundlage der Analyse ist die Modellierung der zugrunde liegenden Kinetik durch das *hidden Markov Modell* (HMM). Dieses wird verwendet, um die Wahrscheinlichkeiten von Zustandsänderungen aus erinnerungslosen Zuständen, die nicht direkt beobachtet werden können, zu analysieren. Oftmals können Daten jedoch mit mehreren Modellen ähnlich gut beschrieben werden. Um nun den Zustand zu finden, der die Realität am wahrscheinlichsten beschreibt, wird das HMM zusätzlich mit einem *variational Bayes (vb)*-Ansatz kombiniert. Die Modellauswahl erfolgt nun durch einen selbstlernenden Algorithmus, der die Plausibilität vieler Zustände gegen die Verbesserung der Modellqualität durch zusätzliche Parameter abwägt. Da der Sourcecode ohne Änderungen übernommen und angewandt wurde, wird auf eine detaillierte mathematische Beschreibung verzichtet. Diese findet sich in der Originalveröffentlichung.

Die Analyse kann mit einer GUI oder skriptbasiert gestartet werden. In dieser Arbeit wurde die skriptbasierte Variante gewählt. In diesem „*ruinputfile*“ wurden die im Folgenden aufgezählten Einstellungen vorgenommen, bei den anderen Optionen wurden die Standardvorgaben genutzt.

Unter „*timestep*“ wurde die jeweilige Aufnahmezeit eines einzelnen Bildes eingestellt. Mit „*dim*“ wird die Dimensionalität des Datensatzes abgefragt, diese betrug 2. Unter „*trjLmin*“ wurde die Mindestlänge einer Trajektorie festgelegt, die in die Analyse eingeht. Diese betrug 2 Positionen, also ein Sprung. Unter „*maxHidden*“ kann vorgegeben werden, wieviele Mobilitätsfraktionen dem optimierten Modell maximal zugrunde liegen dürfen. Da die Anzahl an Fraktionen modelliert wird, kann diese im Ergebnis kleiner sein als der hier vorgegebene Wert. Die Vorgaben lagen zwischen 2 und 10. „*fullBootstrap*“ wurde immer auf 1 gesetzt und Bootstrapping wurde somit für alle Modellgrößen durchgeführt. Unter „*init_D*“ wurde ein Intervall für die erwarteten Diffusionskoeffizienten als Startwert für die Optimierung vorgegeben.

3.3.7 Axiale Lokalisierung mittels der PSF-Verzerrung

Durch das Einfügen einer Zylinderlinse mit langreichweitiger Brennweite in den Emissionsstrahlengang wird die PSF (*Point Spread Function*), abhängig von der Position der Partikel zum Fokus, ellipsoidal verzerrt [Kao und Verkman, 1994, Spille, 2013] (Abbildung 3.13).

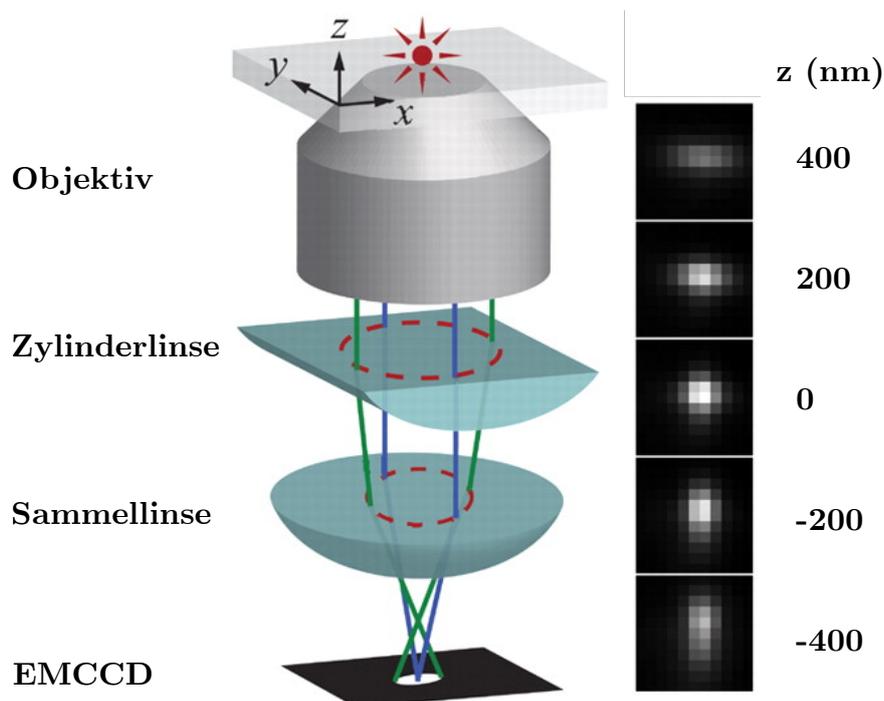


Abbildung 3.13: Prinzip der PSF-Verzerrung durch Einsatz einer Zylinderlinse in den Emissionsstrahlengang. Abbildung verändert aus [Huang et al., 2008].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verzerrung mit zwei zur Verfügung stehenden Brennweiten getestet, wobei die beiden Linsen Brennweiten von 1 m und 10 m hatten. Die Verzerrung, die durch die Zylinderlinse mit einer Brennweite von 10 m hervorgerufen wurde, erwies sich im Lauf der Arbeit als besser geeignet. Um die Möglichkeit zu schaffen, die Zylinderlinse in den Strahlengang einzubringen, wurde von der Feinmechanikwerkstatt ein erweiterter *c-Mount* gebaut, der die Möglichkeit bietet, die Linse aufzunehmen und die Verzerrung zusätzlich durch das Verschieben der Linse um bis zu einen Zentimeter im Strahlengang zu optimieren.

Das Prinzip der Höhenbestimmung des Partikels beruht nun darauf, an die Intensitätsverteilung eine elliptische 2D-Gaußverteilung anzupassen. Die Verzerrung in x und y wird dabei durch die Achsen der Ellipse wiedergegeben und wird im folgenden σ_x und σ_y genannt. Indem σ_y von σ_x subtrahiert wird, wird ein linearer Zusammenhang zwischen der Verzerrung und der Änderung der axialen Position hergestellt. Das Prinzip der Höhenbestimmung ist in Abbildung 3.14 illustriert, eine genaue Beschreibung der Umsetzung folgt in den nächsten Abschnitten.

3.3.7.1 Aufnahme und Auswertung des Kalibrationsdatensatzes

Um das in Abbildung 3.14 dargestellte Auswertungsprinzip nutzen zu können, muss zuerst der lineare Zusammenhang gefunden werden, der im verwendeten Mikroskop mit der verwendeten Linse an ihrer Position erzeugt wird. Hierzu wurde ein Kalibrationsdatensatz aufgenommen. Zur Aufnahme des Kalibrationsdatensatzes wurden TetraSpecks immobilisiert. Die genaue Art und Immobilisierung der Beads wird in den jeweiligen Kapiteln genauer ausgeführt. Mit den immobilisierten TetraSpecks wurden die folgenden Aufnahmen gemacht:

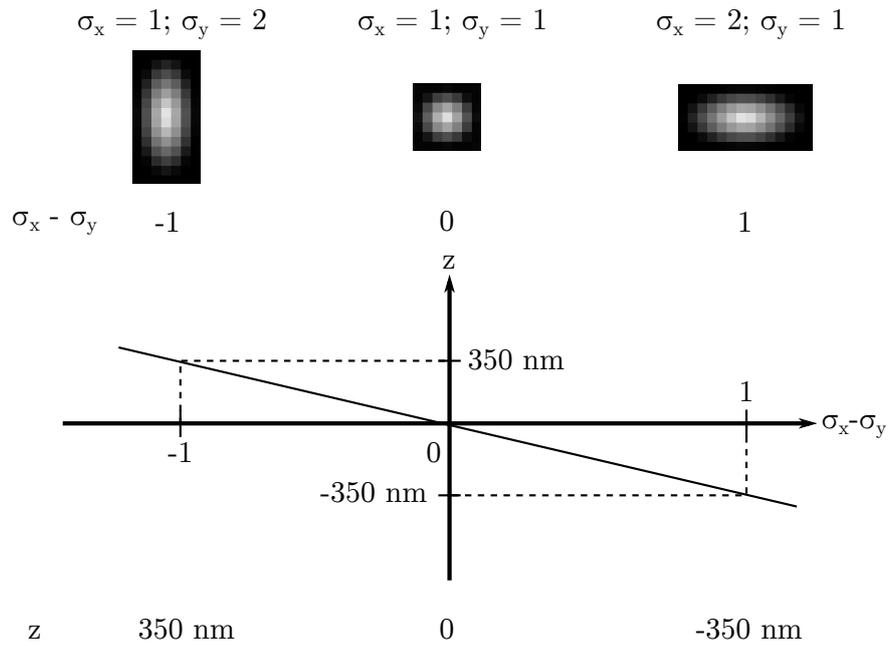


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung der Auswertung der astigmatischen PSF-Verzerrung. Aus der Differenz der Ellipsenachsen entsteht ein Zusammenhang mit der Position des Objekts relativ zum Fokus.

- Ein z-Bildstapel mit der Anregungswellenlänge 488 nm. Die z-Schrittweite betrug $50 \mu\text{m}$, die Höhe des Bildstapels betrug vom Fokus aus jeweils $500 \mu\text{m}$ nach unten und oben.
- Ein z-Bildstapels mit der Anregungswellenlänge 633 nm. Die z-Schrittweite betrug $50 \mu\text{m}$, die Höhe des Bildstapels betrug vom refokussierten Fokus aus jeweils $500 \mu\text{m}$ nach unten und oben.
- Eine Serie von 100 Bildern im Fokus mit einer Anregungswellenlänge von 633 nm.
- Eine Serie von 100 Bildern im Fokus der vorangegangenen Serie mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm.

Die Aufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 30 ms. Die Leistung des roten Lasers betrug 10 %, die Leistung des blauen Lasers betrug 80 % der Maximalleistung.

Die Auswertung des Datensatzes erfolgte im ersten Schritt mit Hilfe des ImageJ-Plugin Thunderstorm von [Ovesný et al., 2014]. Die weitere Bearbeitung wurde mit mehreren selbstgeschriebenen Matlabskripten durchgeführt [The Mathworks, Inc., 2014]. Alle vier Filme des Kalibrationsdatensatzes wurde in ImageJ geladen und durch Thunderstorm die Position der Signale über einem definierten Helligkeitsgrenzwert in allen Bildern bestimmt. Anschließend wurden die Rohdaten und Positionslisten in Matlab importiert und an den dort eingetragenen Positionen eine zweidimensionale elliptische Gaußkurve an die Intensitätsverteilung der Signale angepasst. Aus der elliptischen Gaußanpassung konnte nun die Verzerrung in x, σ_x sowie die Verzerrung in y, σ_y , entnommen werden. Aus diesen wurde die Differenz $\Delta\sigma = \sigma_x - \sigma_y$ berechnet. Da die Signale im Fokus die geringste Verzerrung aufweisen, sollte für ein Partikel im Fokus $\Delta\sigma = \sigma_x - \sigma_y = 0$ sein. Mit dieser

Information und dem definierten Abstand von 50 nm zwischen zwei Bildern war es möglich, die Verzerrung einer Höhe zuzuordnen.

Dies geschah, indem jedem Partikel mittels einer *nearest neighbour*-Routine entlang des Bildstapels eine ID zugeordnet wurde. Anschließend wurde zuerst jedes Bead einzeln betrachtet. Für jede ID wurde zuerst bestimmt, wo das Minimum von $|\sigma_x - \sigma_y|$ liegt, da ungefähr dort der Fokus für dieses Bead sein muss. Da der Verlauf von $\sigma_x - \sigma_y$ nur über einen kurzen Abschnitt von etwa 700 nm linear ist, wurden alle Positionen dieses Beads jenseits dieses Korridors gelöscht. An die verbleibenden Positionen wurde nun in der Auftragung $\Delta\sigma$ gegen die Höhe, die durch die Schrittweite der Kalibrationsmessung bekannt ist, eine Gerade angepasst. Der Nulldurchgang der linearen Anpassung wurde als Fokus definiert. Durch das konsekutive Bearbeiten aller IDs wurde so für jeden aufgenommenen TetraSpeck ein eigener Fokus bestimmt. Im nächsten Schritt wurden alle Verzerrungen $\Delta\sigma$ gegen die jeweilige z-Höhe aufgetragen, wobei der Nulldurchgang der Einzelanpassung als Nullpunkt erhalten blieb. Mit den so verschobenen Punkten wurde erneute eine lineare Anpassung durchgeführt. Der lineare Zusammenhang zwischen der Verzerrung und der Höhe wird nun zur Kalibrationsgeraden. Es wurde jeweils eine eigene Kalibrationsgerade für den roten und den blauen Kanal erstellt. Die Höhe eines Partikels, dessen Verzerrung bekannt ist, kann aus der Steigung m und dem Achsenabschnitt b der Kalibrationsgeraden nach

$$z = f(\Delta\sigma) = \frac{\Delta\sigma - b}{m} \quad (3.5)$$

berechnet werden.

Durch diese beiden Kalibrationsgeraden konnte nun aus den Serienaufnahmen die longitudinale chromatische Verschiebung zwischen den beiden Farbkanälen bestimmt werden. Hierzu wurde die Verzerrung der Signale in jedem Bild der Serienaufnahme bestimmt und aus diesen für jede Position eine gemittelte Verzerrung berechnet. Die gemittelte Verzerrung wurde nun für beide Kanäle in eine z-Höhe umgerechnet. Die Differenz zwischen den scheinbaren Höhen stellte die chromatische Verschiebung zwischen den Wellenlängen dar.

3.3.7.2 Datenakquise

Für die Aufnahmen wurde die Zelllinie HeLa Flp-In T-REx Snap-Dim2 verwendet, die wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben gefärbt und vorbereitet wurde. Das Mikroskop wurde zur Aufnahme auf 37 °C vorgeheizt.

Es wurden 50 Bilder mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm bei einer Laserleistung von 10 % aufgenommen. Anschließend erfolgte die Aufnahme von 950 Bildern mit einer Anregungswellenlänge von 635 nm bei einer Laserleistung von 60 %. Nachdem die Aufnahme im roten Kanal beendet war, erfolgte eine erneute Aufnahme von 50 Bildern bei 488 nm. Die Aufnahme erfolgte mit dem Programm NIS (Nikon) bei einer Bildfrequenz von 50 Hz.

Da die Kalibrationsaufnahmen nur über einen Bereich von etwa 700 nm einen linearen Verlauf zeigten, war nur eine Auswertung über einen sehr eingeschränkten z-Bereich möglich. Dieser Bereich wurde durch die longitudinale chromatische Verschiebung nochmals verkleinert. Daher sollte

schon während der Aufnahme für einen geringeren räumlichen Versatz zwischen den Kanälen gesorgt werden. Hierzu wurde zwischen den Aufnahmen in unterschiedlichen Farbkanälen die Probe mit Hilfe des Mikroskoptischs automatisiert in der Höhe versetzt.

3.3.7.3 Auswertung der Daten

Da das Mikroskop kein ideales Verhalten zeigte und die Aufnahme der Zellen *in vivo* erfolgte, war eine leichte Drift der Zellen in x- und y-Richtung festzustellen. Um diese Drift zu korrigieren, wurden die Aufnahmen im blauen Kanal vor und nach der Aufnahme im roten Kanal als Referenz verwendet.

Im roten Kanal wurden zuerst mit Thunderstorm Partikel identifiziert, deren Helligkeit höher war als die fünffache Standardabweichung der Helligkeit in der direkten Nachbarschaft des potentiellen Partikels. Von diesen Partikeln wurde die Position bestimmt. Die Positionsliste samt Rohdaten wurde analog zur Kalibration in Matlab eingelesen und eine elliptische Gaußanpassung an die gefunden Partikelpositionen optimiert. Mit der erstellten Kalibrationsgeraden und der elliptischen Verzerrung in x und y wurde nun jedem Partikel eine Höhe zugeordnet.

Aus den gemittelten Bildern der 50 aufgenommenen Bilder im blauen Kanal jeweils vor und nach einer Messung im roten Kanal wurden mit Thunderstorm Porenpositionen ermittelt und diese mit einem selbstgeschriebenen Matlabskript abgeglichen. Aus der Verschiebung der einzelnen Poren wurde eine gemittelte Verschiebung berechnet. Es wurde angenommen, dass die Drift gleichmäßig über die gesamte Länge des roten Films stattfindet, sodass nun jedes Bild um $\frac{\text{Bildnummer}}{950} \cdot dx$ bzw. dy verschoben wurde. Hierdurch wurden nun alle Positionen, die im roten Kanal gefunden wurden, relativ zur Position von Bild 1 verschoben.

Weiterhin erfolgte eine Korrektur der longitudinalen chromatischen Verschiebung. Um diese Verschiebung auszugleichen, wurde die rekonstruierte Höhe für jede Partikelposition im roten Kanal um den Wert verschoben, der mit Hilfe der Serienaufnahmen der Kalibrationsdaten gefunden wurde.

Anschließend erfolgte eine Verknüpfung der Partikel zu Trajektorien mit einem von Dr. J.-H. Spille geschriebenen Skript. Hier kam nur die x,y-Position zum Einsatz, die Höheninformation wurde vernachlässigt. Die Verknüpfung der Partikel geschah mit einer ebenfalls von ihm implementierten *nearest neighbour*-Routine. Der nächste Schritt war nun die Verknüpfung der Trajektorien mit den Porenpositionen. Hierzu wurde die Positionsliste des blauen Kanals verwendet, die vor der Aufnahme des roten Kanals gemacht wurde, da sämtliche Positionen auf dieses Bild hin verschoben wurden. Die Verknüpfung geschah wieder ungeachtet der axialen Position, sowohl der der Poren als aus der der Trajektorien. Um die x,y-Position der Poren wurde ein Kreis mit einem Radius von 100 nm gelegt, der anschließend als Zylinder durch das aufgenommene Volumen gelegt wurde. Nun wurden alle Trajektorien, bei denen sich mindestens eine Position innerhalb dieses Zylinders befand, dieser Pore zugeordnet. Dies ist in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt. Zusätzlich wurden anschließend alle x-,y- und z-Werte der Trajektorie im roten Kanal relativ zur Pore verschoben. Die Position in der Mitte der Kernpore entsprach anschließend der Position 0, 0, 0 in der Trajektorie.

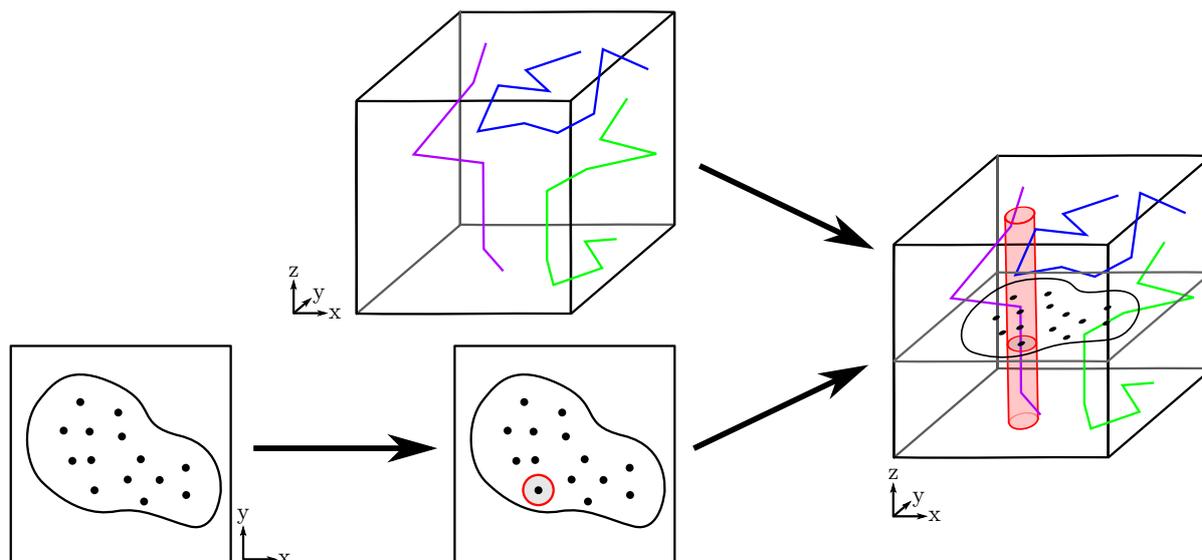


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Trajektorienauswertung in 3D. Obere Zeile: drei im beobachtbaren Volumen gefundene Trajektorien in x -, y - und z -Richtung. Untere Zeile: Zellböden mit Porenpositionen - um eine ausgewählte Porenposition wird ein Kreis mit einem Radius von 100 nm gelegt. Kombiniertes Bild: Die Kreisfläche stellt eine Ebene des Zylinders dar, der durch das gesamte beobachtete Volumen verläuft. Die grüne Trajektorie hat keine Position innerhalb des Zylinders und wird der ausgewählten Pore nicht zugeordnet. Die blaue und die lila Trajektorie haben beide mindestens einen Punkt, der sich innerhalb des Zylinders befindet, und werden dementsprechend der Pore zugeordnet. Ob es sich um einen Membrandurchtritt wie bei der lila Trajektorie handelt, muss anschließend durch weiterführende Analyse der Trajektorien festgestellt werden.

Zur weiteren Auswertung der Poren und Trajektorien wurden weitere Matlab-Skripte mit unterschiedlichen Filtermöglichkeiten programmiert. Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war der Export von pre-18S-rRNAs durch die Kernporen. Mit dem bisher beschriebenen Skript war der Datensatz auf die Trajektorien geschrumpft, die im räumlichen Zusammenhang mit einer Pore stehen könnten. Durch die Normierung der Trajektorienpositionen auf die Kernpore hin resultiert ein Kernporendurchtritt in einem Wechsel im Vorzeichen der Höhe der Trajektorie. Hierdurch ergab sich die Möglichkeit, automatisiert nach Poren mit einem potentiellen Porendurchtritt zu suchen. Solche Trajektorien konnten anschließend auch visualisiert werden, um einen ersten Eindruck von der Qualität der Trajektorie und der Lage relativ zur Pore zu erhalten.

Kapitel 4

Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde die intranukleäre Dynamik der kleinen ribosomalen Untereinheit untersucht. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kutay an der ETH Zürich wurde das für die rRNA-Biogenese und den rRNA-Export essentielle Protein Dim2 markiert, um so die Mobilität und den Export der rRNA in humanen Zellen zu beobachten.

4.1 Versuche mit rekombinantem Dim2

4.1.1 Proteinexpression und chemische Färbung

Die ersten Versuche der Kooperation sollten mit Proteinen durchgeführt werden, die von Christian Montellese an der ETH Zürich exprimiert und aufgereinigt wurden. Die beiden Proteine His-TEV-tc-Dim2 und Dim2-tc-TEV-His wurden tiefgefroren versandt.

Die Proteinlösungen wurden auf Eis aufgetaut. Dabei zeigte sich, dass die Löslichkeit der Proteine ein großes Problem darstellt, da bereits während des Auftauens ein Großteil des Proteins ausfiel. Um die Probleme, die durch das Einfrieren und Auftauen der Proteine entstanden, zu umgehen, wurde die Expression der Proteine nach Bonn verlagert. Die Expression wurde wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben durchgeführt, wobei sich herausstellte, dass das Protein mit N-terminalem Tag deutlich löslicher war als das C-terminal fusionierte Protein. Das aufgereinigte His-TEV-tc-Dim2 konnte erfolgreich mit AlexaFluor 647 gefärbt werden, wobei jedoch durch die Färbung deutliche Konzentrationsverluste hingenommen werden mussten. Die Konzentration des gefärbten Proteins lag zwischen $0,9 \mu\text{M}$ und $1,5 \mu\text{M}$.

4.1.2 Funktionalitätskontrolle durch Mikroinjektion

Um die Funktionalität des gefärbten Proteins zu testen, wurden verschiedene Mikroinjektionsexperimente durchgeführt.

Zuerst wurde eine Co-Injektion des Dim2-AF647 mit BSA-AF546 und CFP-NES-AF488 in C2C12-Zellen durchgeführt. Die Proteinmischung wurde vor der Injektion nochmals abzentrifugiert, hierbei fiel jedoch kein Protein mehr aus. Die Co-Injektion des BSA diente dazu, die Unversehrtheit der

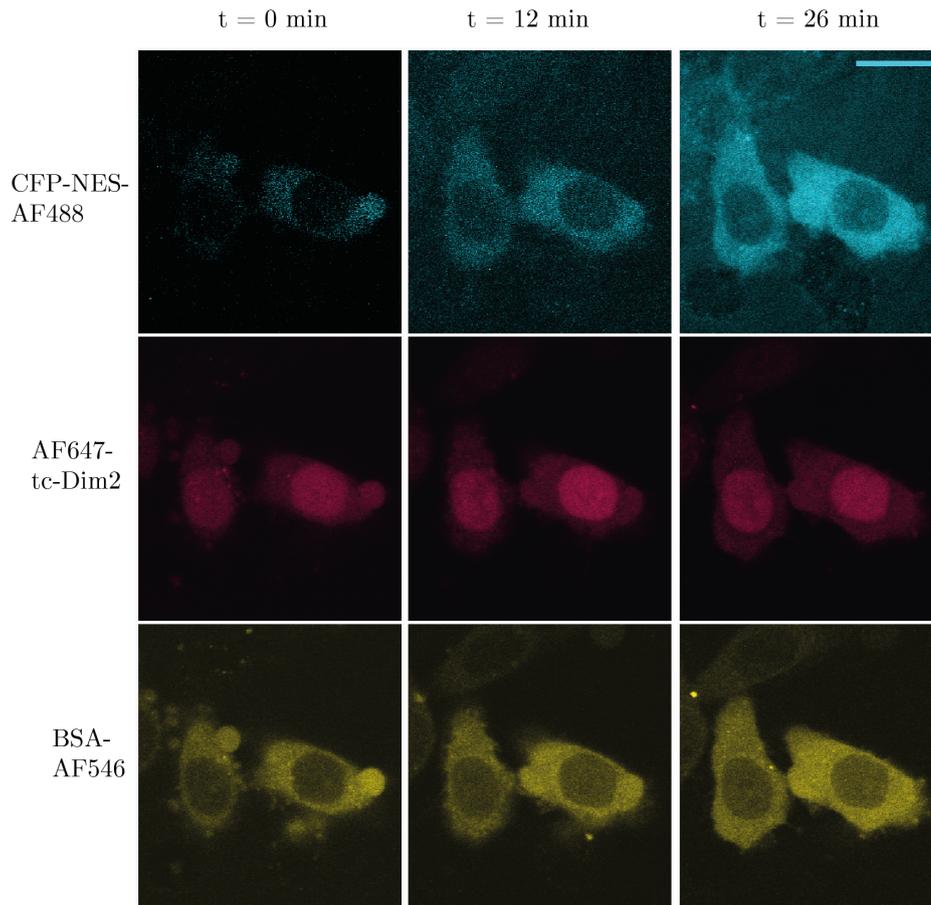


Abbildung 4.1: Zeitserie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Mikroinjektion in murine C2C12-Zellen. Obere Zeile: CFP-NES-AF488 als Vitalitätskontrolle, hier wurde die Laserleistung für die späteren Zeitpunkte erhöht; mittlere Zeile: Verteilung von AF647-tc-Dim2, untere Zeile: BSA-AF546 als Dichtigkeitskontrolle. Maßstabsbalken: 20 μm .

Kernhülle zu überprüfen, da dieses zu groß ist, um in den Zellkern zu diffundieren. Die Co-Injektion von CFP-NES-AF488 wurde als Vitalitätskontrolle verwendet, da dieses Protein in den Zellkern diffundieren kann, jedoch aktiv aus dem Kern transportiert wird. Das Ergebnis des Experiments ist in Abbildung 4.1 zu sehen.

In gelb dargestellt ist BSA, in blau CFP-NES-AF488. Beide Proteine sind nur im Zytoplasma lokalisiert, die Kernhülle ist also intakt und die Zelle vital. In rot zu sehen ist Dim2-AF647. Dieses ist im Kern angereichert, was auf einen aktiven Transport des markierten Proteins in den Zellkern schließen lässt, da durch Diffusion nur eine Gleichverteilung zu erreichen wäre. Das Protein zeigt eine gleichmäßige Verteilung im Zellkern, es werden keine nukleären Domänen markiert.

Da es sich bei dem exprimierten Protein um die humane Variante des Dim2 handelt, die getesteten C2C12-Zellen jedoch aus Mäusen stammen, wurde die Co-Injektion in HeLa-Zellen wiederholt (Abbildung 4.2). Hier zeigte sich dasselbe Bild wie in den C2C12-Zellen: die Kernhülle ist unverletzt, das Dim2 ist zum Import befähigt, zeigt jedoch keine Anreicherung. Es deutete sich jedoch in einigen Zellen an, dass die Kernbereiche, in denen sich die Nukleoli befinden, insbesondere zu späteren Zeitpunkten von der Dim2-Verteilung ausgeschlossen werden (Abbildung 4.2).

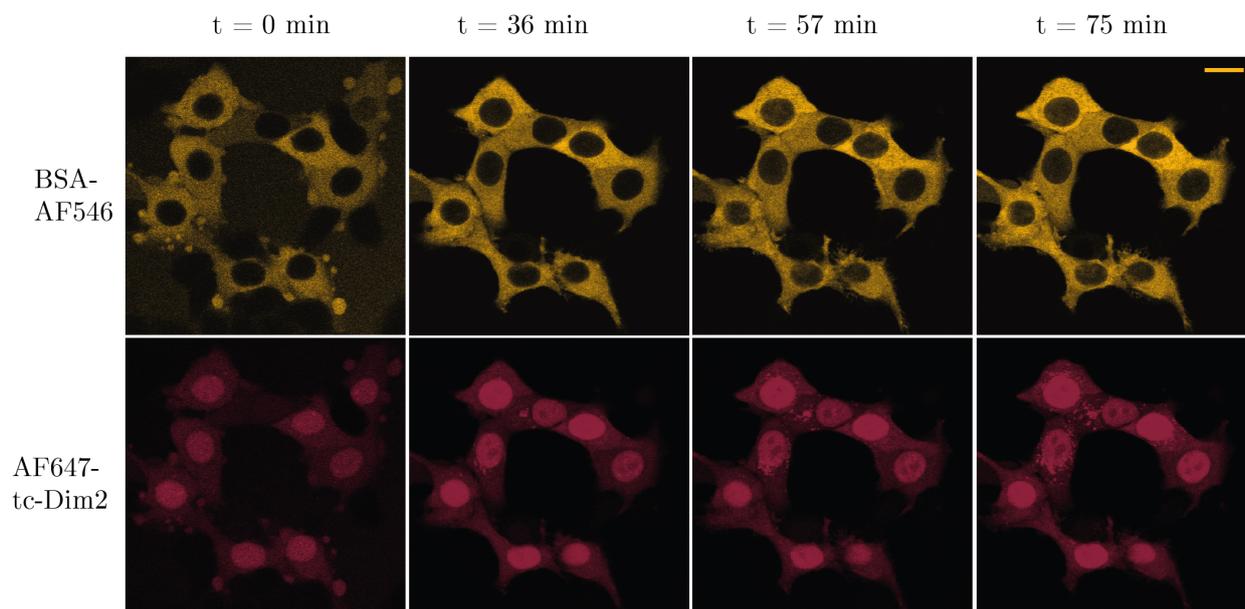


Abbildung 4.2: Zeitserie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Mikroinjektion in HeLa-Zellen. Obere Zeile: BSA-AF546 als Dichtigkeitskontrolle, untere Zeile: Verteilung von AF647-tc-Dim2. Maßstabsbalken: 20 μm .

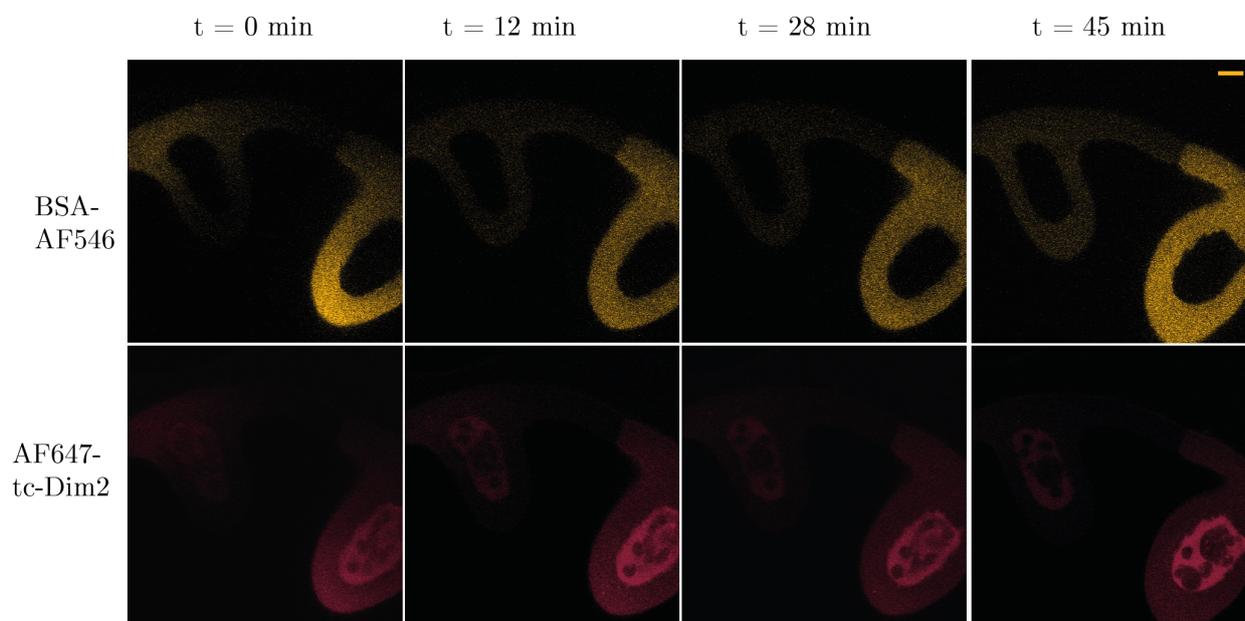


Abbildung 4.3: Zeitserie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Mikroinjektion in Speicheldrüsen von *C. tentans*. Obere Zeile: BSA-AF546 als Dichtigkeitskontrolle, untere Zeile: Verteilung von AF647-tc-Dim2. Maßstabsbalken: 20 μm .

Um nun auszuschließen, dass die beobachtete Gleichverteilung im Kern durch eine Überpopulation des Proteins in der Zelle durch die Mikroinjektion hervorgerufen wurde, wurde das Dim2 zusätzlich noch in Speicheldrüsenzellen von *C. tentans* injiziert, da hier das Verhältnis von Plasma zu injiziertem Protein viel geringer ist (Abbildung 4.3). Auch hier zeigte das heterolog exprimierte Dim2 eine klare Anreicherung im Kern, jedoch sind hier die Bereiche der Polytänychrosomen sowie der Nukleoli klar ausgeschlossen.

Es gelang also, das Protein Dim2 heterolog zu exprimieren, aufzureinigen und zu färben. Die Mikroinjektionsexperimente zeigten jedoch keine native Verteilung des Proteins im Zellkern, welches daher als unfunktional eingestuft wurde.

4.2 Klonierung von stabil überexprimierenden Dim2-Zelllinien

Alternativ sollten stabile Zelllinien hergestellt werden, die ein gentechnisch markiertes Dim2 exprimieren. Um verschiedene Experimente durchführen zu können, sollte das Dim2 zunächst mit eGFP und anschließend mit einem Snap-Tag markiert werden.

4.2.1 Klonierung der Konstrukte zur transienten Expression

Das erste Fusionsprotein, das kloniert wurde, war eGFP-Dim2 aus peGFP-c1 und pET-MCN-His-TEV-TC-Dim2 (Kapitel 3.2.3.1). Nachdem der Erfolg der Klonierung über eine Sequenzierung bestätigt worden war, sollte die Funktionalität des Konstrukts getestet werden. Das Konstrukt liegt hinter einem CMV-Promoter, der eine Expression des gewünschten Proteins in Säugerzellen erlaubt. Um den Vektor in die Zellen einzubringen, wurde eine Elektroporation durchgeführt (Kapitel 3.2.4). Verwendet wurde die murine Zelllinie C2C12. Zusätzlich zur Transfektion mit dem Fusionsprotein wurde eine Kontrolltransfektion mit dem unveränderten Plasmid peGFP-c1 durchgeführt. Diese Kontrolle diente dazu, auszuschließen, dass die Verteilung des Fusionsproteins im Kern nicht durch das Protein, sondern den eGFP-Tag hervorgerufen ist. Das Ergebnis beider Transfektionen ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Der Unterschied in der Fluoreszenzverteilung des eGFP-Signals ist deutlich zu sehen. Während in den Zellen, die peGFP-c1 erhalten haben, die transfizierten Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität über das gesamte Zellvolumen aufweisen, ist die Fluoreszenz in den Zellen mit dem Fusionsprotein peGFP-Dim2 auf kleine Bereiche im Zellkern beschränkt. Eine Überlagerung der Fluoreszenz mit dem Durchlichtbild erlaubte die Aussage, dass die Fluoreszenz mit der Position der Nukleoli korreliert. Die Klonierung des Fusionsproteins war erfolgreich und das transient exprimierte Protein wurde als funktional eingestuft.

Zusätzlich wurden FRAP-Messungen durchgeführt. Auch hier ließ sich ein Unterschied feststellen. Die Rückkehr des reinen eGFP verläuft deutlich schneller als die des etwa doppelt so schweren eGFP-Dim2 (Abbildung 4.5).

Im nächsten Schritt wurde der eGFP-Tag durch ein Snap-Tag ersetzt (Kapitel 3.2.3.3). Auch hier wurde eine Elektroporation in HeLa-Zellen wie beschrieben durchgeführt. Zur Färbung des Snap-Tags wurde der Farbstoff TMR Star verwendet. Auch hier zeigte sich das native intrazelluläre

Färbemuster. Das vorhandene Fluoreszenzsignal wurde als ausreichend beurteilt, und somit auch das Konstrukt Snap-Dim2 als funktional eingestuft.

4.2.2 Klonierung der Vektoren zur stabilen Expression

Im nächsten Schritt sollten stabile Zelllinien mit den beiden Fusionsproteinen erstellt werden. Diese sollten Elektroporationen überflüssig machen und ein gleichbleibendes Expressionslevel gewährleisten. Um diese stabilen Zelllinien herstellen zu können, mussten die beiden Genkassetten in den retroviralen Vektor pQCXIP eingebaut werden. Die beiden Plasmide pQCXIP-eGFP-Dim2 und pQCXIP-Snap-Dim2 konnten erfolgreich kloniert werden (Kapitel 3.2.3).

Um die Funktionalität dieser Vektoren zu testen, wurden transiente Expressionen mit Hilfe von Elektroporationen (Kapitel 3.2.4) durchgeführt. Die Elektroporation war erfolgreich, eGFP-Dim2 konnte in den Zellen beobachtet werden. Auffällig war jedoch das deutlich unterschiedliche Expressionslevel der verschiedenen Zellen. Während sich in einigen Zellen die Nukleoli klar vom Nukleoplasma abhoben, war in anderen Zellen das Expressionsniveau so hoch, dass der ganze Kern gleichmäßig gefärbt erschien.

Analog wurde auch das Snap-Konstrukt getestet, als Farbstoff wurde erneut TMR-Star verwendet. Die Anreicherung des Fluoreszenzsignals wurde wieder als ausreichend gewertet, und auch dieser Vektor als Träger des funktionalen Proteins betrachtet.

Nachdem die Tests der transient endogen exprimierten Proteine vielversprechend aussahen, sollten nun stabile Zelllinien der Konstrukte erstellt werden, um den Zeitaufwand für die folgenden Experimente zu reduzieren.

4.2.3 Stabile konstitutiv überexprimierende Zelllinien

Die retrovirale Infektion der HeLa-Zellen mit den pQCXIP-Vektoren erfolgte im Labor von Priv.-Doz. Dr. Thomas Weide an der Universität Münster. Da bei der Infektion über die Retroviren die Plasmidsequenz hinter einem CMV-Promotor liegt, war eine Kontrolle des Expressionslevels nicht möglich, was eine Überexpression des markierten Proteins zur Folge hat.

Die Fluoreszenzverteilung in der stabilen eGFP-Zelllinie zeigte wie erwartet ein Maximum in den Nukleoli, wenig Fluoreszenz im Nukleoplasma und sehr wenig im Zytoplasma. Im Vergleich zur transienten Expression konnte in der Zelllinie jedoch ein einheitlicheres Expressionslevel erreicht werden.

Auch die Etablierung einer stabil überexprimierenden Zelllinie mit dem Konstrukt Snap-Dim2 war erfolgreich.

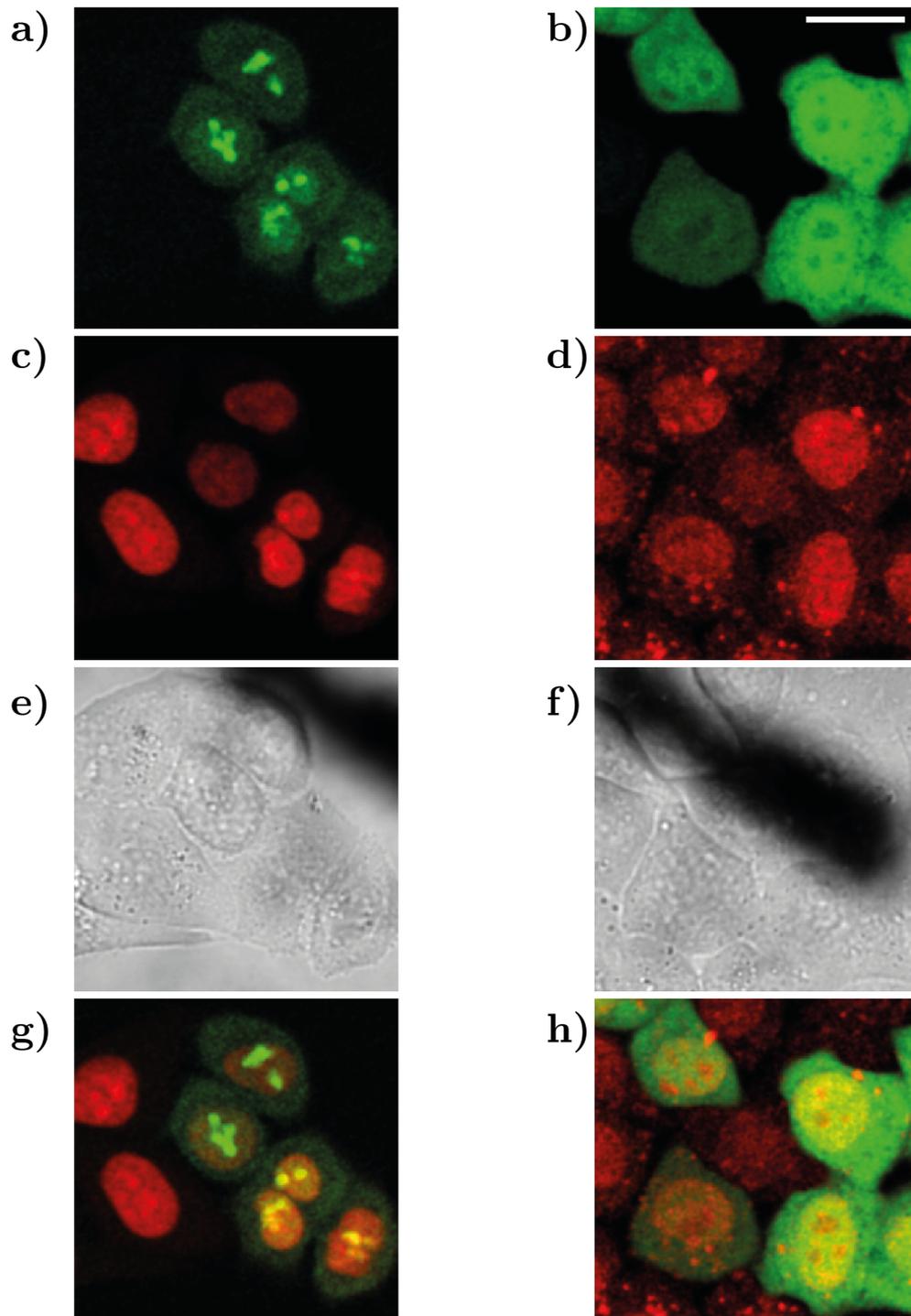


Abbildung 4.4: Transiente Expression von eGFP und eGFP-Dim2 im Vergleich. a) Transiente Expression von eGFP-Dim2. Es ist eine klare Anreicherung in den Nukleoli im Vergleich zum Nukleoplasma und zum Zytoplasma sichtbar. b) Transiente Expression von eGFP. Die Zellen sind deutlich heller als die Expression von eGFP-Dim2, das Zytoplasma ist etwas weniger gefärbt als die Kerne. Die Nukleoli hingegen sind klar ausgeschlossen. c) + d) Chromatinfärbung mit DRAQ5. e) + f) Durchlichtbilder der Zellen. g) Überlagerung des DRAQ5-Signals mit eGFP-Dim2. h) Überlagerung des DRAQ5-Signals mit eGFP. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μm .

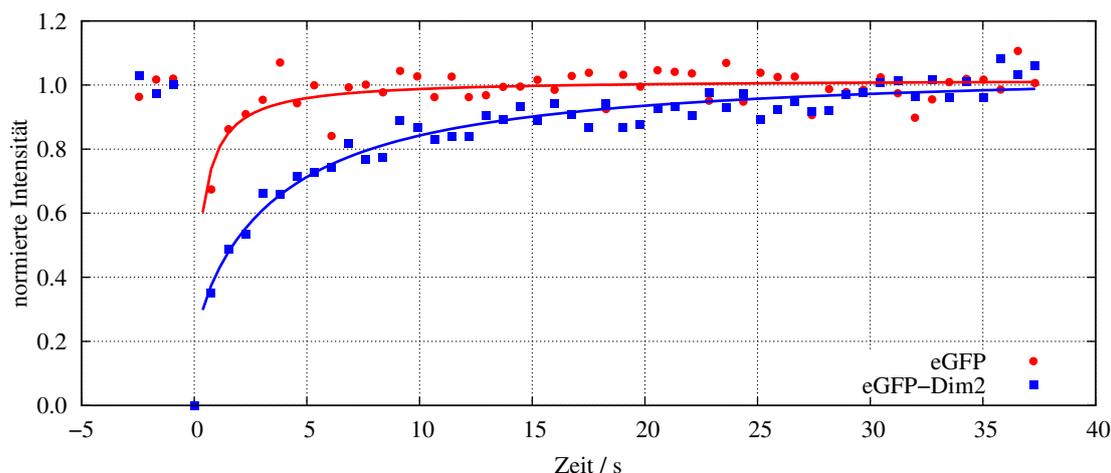


Abbildung 4.5: Fluoreszenzrückkehrkurven von *eGFP* (rot) und *eGFP-Dim2* (blau) im Nukleoplasma. Die schnellere Fluoreszenzrückkehr des frei diffundierenden *eGFP* ist klar ersichtlich.

4.3 Klonierung von stabilen, induzierbaren Dim2-Zelllinien

4.3.1 Stabile induzierbare Zelllinien

Die Herstellung der stabil überexprimierenden Zelllinie verlief, wie im vorherigen Abschnitt erläutert, zwar erfolgreich; sie hat jedoch den offensichtlichen Nachteil der Überexpression. Diese Überexpression führte häufig zu sehr hellen Zellen, bei denen kaum noch ein Intensitätsunterschied zwischen Nukleolus und Nukleoplasma festzustellen war. Daher wurden anschließend zusätzlich zwei weitere stabile Zelllinien mit Hilfe des lentiviralen Plasmids pLex für diese Arbeit hergestellt. Die Klonierung und Infektion geschah in der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Kutay, ETH Zürich. Die Zelllinien unterscheiden sich von den in Kapitel 4.2.2 vorgestellten dadurch, dass die Sequenz des markierten Dim2 hier hinter dem *Tn10*-kodierte Tetracyclin-Repressor-Operon aus *E. coli* liegt. So kann die Zielprotein-Sequenz nur abgelesen und exprimiert werden, wenn der Promotor durch die Zugabe von Tetracyclin freigegeben wird [Invitrogen, 2012]. Eine endogene Proteinkonzentration wurde durch Zugabe von $2 \frac{\text{ng}}{\mu\text{L}}$ Tetracyclin und einer Inkubationszeit von 16 h bis 24 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt liegt dieselbe Menge an markiertem wie unmarkiertem Dim2 in der Zelle vor, d.h. die Proteinkonzentration von Dim2 wurde in etwa verdoppelt [C. Montellese, ETH Zürich, unveröffentlichte Ergebnisse].

Die Zelllinien *eGFP-Dim2* und *Snap-Dim2*, gefärbt mit SiR-Snap, sind in Abbildung 4.6 gezeigt. Beide Zelllinien zeigen die literaturbekannte Anreicherung von Dim2 in den Nukleoli [Zemp et al., 2009].

4.3.2 Einfluss des Expressionslevels auf die intrazelluläre Mobilität

Die enorm helle Fluoreszenz der *eGFP-Dim2*-überexprimierenden Zelllinie ließ bereits die Vermutung zu, dass durch die deutlich erhöhte Konzentration von Dim2 im Zellkern und der Zelle eine andere Mobilität des Dim2 gemessen wird, da mehr ungebundene Dim2-Proteine zur Verfügung

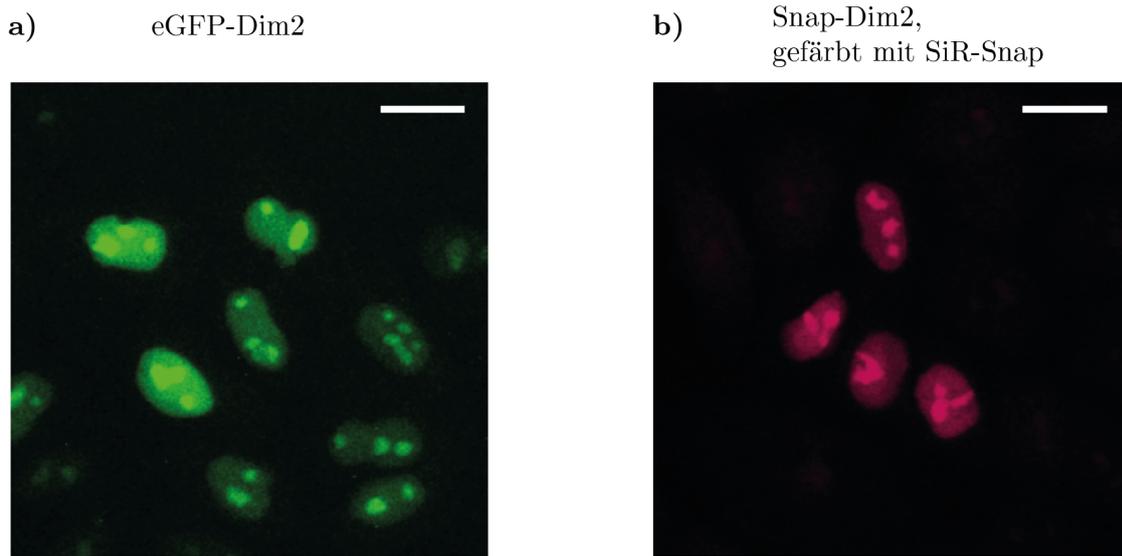


Abbildung 4.6: Fluoreszenzverteilung des markierten in *Dim2* in den tet-induzierbaren Zelllinien. a) eGFP-*Dim2*, b) Snap-*Dim2*, gefärbt mit SiR-Snap. Die Maßstabsbalken betragen jeweils 20 µm.

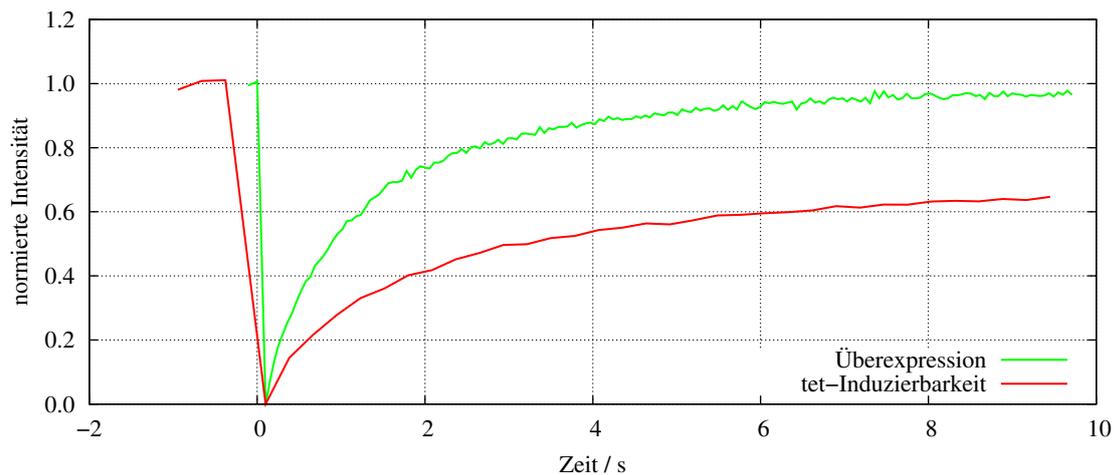


Abbildung 4.7: Die in rot dargestellte induzierbare Zelllinie zeigt eine deutlich geringere Fluoreszenzrückkehr als die in grün dargestellte, überexprimierende Zelllinie. Um die Steigung der beiden Kurven besser vergleichen zu können, wurden die Messungen auf das erste Bild nach Bleichen verschoben.

stehen. Dieser Einfluss konnte durch den Vergleich mit der induzierbaren Zelllinie nachgewiesen werden. Um den Einfluss der Überexpression des markierten *Dim2* auf die Mobilität zu bewerten, wurden qualitative FRAP-Experimente durchgeführt (Kapitel 3.3.1).

Die Fluoreszenz-Rückkehr-Kurven der beiden Zelllinien in den Nukleoli unterscheiden sich deutlich (Abbildung 4.7). In grün dargestellt ist die Rückkehr-Kurve der nicht-induzierbaren Zelllinie. Hier wurde nach 10 Sekunden eine Erholung von 96 % erreicht. Im Vergleich dazu konnte in der induzierbaren Zelllinie, dargestellt in rot, nur eine Fluoreszenzrückkehr von 65 % festgestellt werden. Dies wurde als Indiz gewertet, dass die Überexpression mit einer Überschätzung der Mobilität einhergeht. Für alle weiteren vorgestellten Experimente wurde daher die induzierbare Zelllinie verwendet.

4.3.3 Intrazelluläre Verteilung von Dim2

Um die Funktionalität des Proteins weiter zu überprüfen, wurde die Kolokalisation von Dim2 mit den Nukleoli getestet. Die nukleäre Anreicherung von nativem Dim2 ist aus der Literatur bekannt [Zemp et al., 2009]. Erste Hinweise auf die Kolokalisation lieferten bereits die Durchlichtbilder aller erzeugten Zelllinien. Es wurde jedoch noch ein zusätzlicher Nachweis mit zwei verschiedenen Markerpeptiden TAT und R9 erbracht. Diese beiden membranpermeablen Peptide werden selektiv in den Nukleoli angereichert [Herce et al., 2014]. Verwendet wurde einmal ein FITC-markiertes TAT, und zum anderen ein TAMRA-markiertes R9. Für das Experiment wurde die induzierbare Snap-Zelllinie mit zwei verschiedenen Snap-Farbstoffen gefärbt, einmal SiR-Snap [Lukinavičius et al., 2013] und einmal Snap-Cell Oregon Green. Getestet wurde neben der Farbstoff-Kombination TAMRA/Snap-Cell Oregon Green (Abbildung 4.8 d, e, f) auch FITC/SiR-Snap (Abbildung 4.8 a, b, c), sodass eine Anregung der FITC-Fluoreszenz durch den Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm ausgeschlossen werden kann. In beiden Experimenten gelang die Färbung, es wurde die literaturbekannte Anreicherung in den Nukleoli und dem Zytoplasma erreicht [Lättig-Tünnemann et al., 2011]. Die Anreicherung der Snap-Farbstoffe in den Nukleoli konnte durch eine Kolokalisation der Signale gezeigt werden.

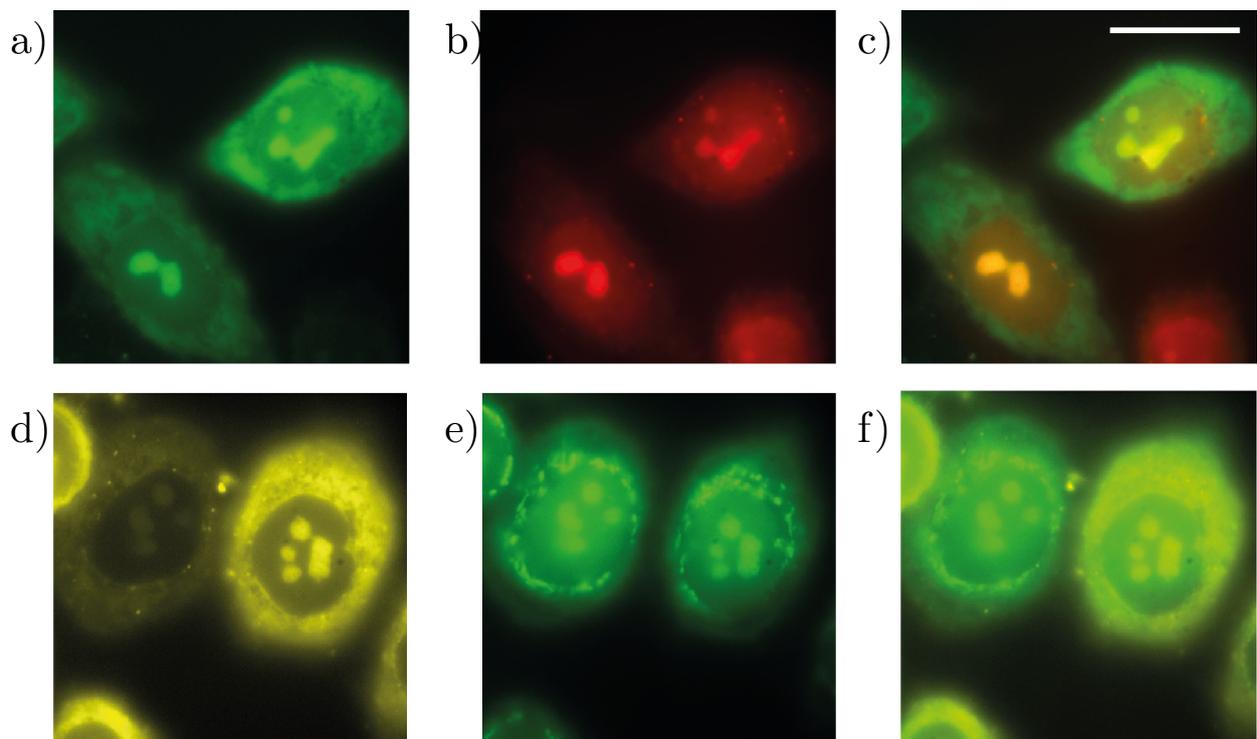


Abbildung 4.8: Nachweis der nukleolären Anreicherung von homolog exprimiertem Dim2. a) Verteilung von FITC-TAT. b) Verteilung von Snap-Dim2, angefärbt mit SiR-Snap. c) Kolokalisation von FITC-TAT und Dim2. Die Anreicherung beider in den Nukleoli ist klar zu erkennen. d) Verteilung von R9-Tamra, auch hier sind die Nukleoli im Zellkern deutlich sichtbar. e) Verteilung von Snap-Dim2, gefärbt mit Snap-Cell Oregon Green. f) Kolokalisation von R9-TAMRA und Dim2. Der Maßstabsbalken beträgt 20 μm .

4.4 Intranukleäre Mobilität von Dim2

Eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, die Dynamik der Ribosomenbiogenese genauer zu untersuchen. Mit der Tetracyclin-induzierbaren Zelllinie, die das Dim2 als Snap-Tag-Fusionsprotein besitzt, waren mit Hilfe des neu entwickelten Farbstoffs SiR-Snap Einzelmolekülmessungen möglich, da es sich hierbei um einen membranpermeablen Farbstoff mit einer Anregung im roten Spektralbereich handelt [Lukinavičius et al., 2013]. Mit den Einzelmolekülexperimenten sollte zum einen die Mobilität im Nukleoplasma, zum anderen die Mobilität im Nukleolus untersucht werden.

4.4.1 Abschätzung der theoretischen Mobilität und der Lokalisierungsgenauigkeit

Um die Frequenz der Bildaufnahme in den FRAP- und Einzelmolekülmessungen sinnvoll wählen zu können, wurde die erwartete Mobilität der Partikel zuerst theoretisch abgeschätzt. Für diese Berechnungen wurde eine Viskosität im Nukleoplasma von 4,8 cP angenommen [Veith et al., 2010]. Zuerst wurde der Diffusionskoeffizient für ungebundenes eGFP-Dim2 (58 kDa) berechnet. Hierzu wurde nach [Fischer et al., 2004] die Proteindichte zu $1,4 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ abgeschätzt, woraus ein Kugelvolumen von 68 nm^3 bestimmt wurde. Dies führt zu einem Proteinradius von 2,5 nm. Die genannten Parameter sowie eine Temperatur von $33,5 \text{ }^\circ\text{C}$ wurden in die Stokes-Einstein-Gleichung eingesetzt, was in einem Diffusionskoeffizienten $D_{\text{frei}} = 21 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ resultierte. Eine analoge Rechnung für das Fusionsprotein Snap-Dim2 (48 kDa) führt zu einem Diffusionskoeffizienten von $22 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

Die Größe des pre-40S-Partikels wurde aus den TEM-Messungen von [Schäfer et al., 2006] zu ca. $25 \times 16 \times 10 \text{ nm}$ geschätzt. Hier wurden zwei verschiedene Diffusionskoeffizienten bestimmt, einmal über eine Kugel-, zum anderen über eine Ellipsoid-Annäherung.

Die Kugelabschätzung wurde mit einem Radius von $(25+16+16)/3 \text{ nm} = 19 \text{ nm}$ durchgeführt und resultiert in $D_{\text{pre40S, Kugel}} = 2,45 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

Für die Ellipsoidabschätzung wurde folgende Formel aus [Cussler, 1997] verwendet:

$$D_{\text{pre40S, Ellipsoid}} = \frac{k_B T}{6\pi\eta \left[\frac{(a^2-b^2)^{1/2}}{\ln\left(\frac{a+(a^2-b^2)^{1/2}}{b}\right)} \right]} \quad (4.1)$$

Hierbei ist a mit 25 nm die lange Achse, b repräsentiert mit 16 nm die kurze Achse. Es resultiert ein der Kugelabschätzung sehr ähnlicher Diffusionskoeffizient von $2,59 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

Mithilfe dieser Diffusionskoeffizienten konnte berechnet werden, welche Sprungweiten bei verschiedenen Bildwiederholungsraten zu erwarten sind. So ergibt sich beispielsweise bei einer Belichtungszeit von 50 ms für die pre-40S-Untereinheit eine durchschnittliche Sprungweite von $\langle r \rangle = \sqrt{4Dt} = 0,7 \mu\text{m}$. Dies entspricht bei einer effektiven Pixelgröße von 106,65 nm etwa 7 Pixeln. $\langle r \rangle$ gibt jedoch nur eine durchschnittliche Sprungweite an. Um auch längere Sprungweiten erfassen zu können, wird die berechnete Sprungweite noch mit einem Faktor von 2,6 multipliziert. Damit werden nun alle Sprünge in einem Vertrauensintervall von 99 % abgedeckt. Für die oben berechnete Sprungweite von $0,7 \mu\text{m}$ ergibt sich so eine Sprungdistanz von $1,8 \mu\text{m}$, was 17 Pixeln

entspricht. Eine Sprungdistanz von $1,8 \mu\text{m}$ entspricht bei einem durchschnittlichen Zellkerndurchmesser von $19 \mu\text{m}$ jedoch bereits $9,5 \%$ der gesamten Strecke. Bei so langen Distanzen fällt eine sichere Zuordnung eines Partikels auf Einzelmolekülebene jedoch schwer, was in vielen Fehlzuordnungen bei der Einzelpartikelverfolgung resultiert. Daher wurde eine kürzere Belichtungszeit von $11,7 \text{ ms}$ gewählt, was zusammen mit der Auslesezeit des Chips in $12,6 \text{ ms}$ zwischen dem Beginn der Aufnahme zweier aufeinander folgender Bilder resultiert. Hier konnte eine Sprungweite $\langle r \rangle = 361 \text{ nm}$ berechnet werden, was $3,5$ Pixeln entspricht. Mit einbezogenem Vertrauensintervall wurden somit Sprungdistanzen von bis zu 9 Pixeln berücksichtigt.

Gleichsam stellt sich natürlich die Frage nach der Lokalisierungsgenauigkeit, die in den Einzelmolekülmessungen mit dem gewählten Mikroskopaufbau und dem biologischen System überhaupt erreicht werden kann. Diese wurde mit Hilfe von Gleichung 4.2 abgeschätzt [Mortensen et al., 2010]. F ist der Korrekturfaktor für den verwendeten Kameratyp und lautet für EMCCD-Kameras 2 ; a ist die Pixelgröße, diese betrug $106,7 \text{ nm}$. s entspricht der Standardabweichung der Gaußanpassung an die gemessenen Signale und konnte aus den Daten zu 216 nm bestimmt werden. N ist die Photonenzahl pro Signal, diese wurde auf $100 - 300$ Photonen geschätzt. Als Grundlage für diese Abschätzung dienten Daten von Dr. Jan-Hendrik Spille, sowie die Daten zum verwendeten Farbstoff [Spille, 2013, Lukinavičius et al., 2013]. b ist der Hintergrund in Photonen pro Pixel und abhängig von der Photonenzahl, der Hintergrund betrug etwa $\frac{N}{100}$.

$$\sigma = \sqrt{F \left[\left(\frac{4}{3}\right)^2 \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi b^2 \left(s^2 + \frac{a^2}{12}\right)^2}{a^2 N^2} \right]} \quad (4.2)$$

Für eine angenommene Photonenausbeute von 100 Photonen pro Signal resultierte die Rechnung in $\sigma = 52 \text{ nm}$.

4.4.2 Kompartimentabhängige Mobilität

4.4.2.1 FRAP-Experimente in Nukleolus und Nukleoplasma

Damit ein erster Eindruck der Mobilität und der kompartimentabhängigen Mobilitätsunterschiede des Dim2 und der kleinen Vorläuferuntereinheit gewonnen werden konnte, wurden FRAP-Experimente geplant, da diese mit vergleichsweise geringem experimentellem Aufwand zu realisieren waren. Es wurden FRAP-Experimente wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben durchgeführt, wobei das Bleich-ROI in unterschiedliche Bereiche der Zelle gesetzt wurde. Die Unterscheidung in Nukleoplasma und Nukleolus wurde anhand der Fluoreszenzintensität getroffen, da diese, wie in Kapitel 4.3.3 gezeigt wurde, mit dem Ort korreliert. Zum einen wurde eine Kreisfläche mit einem Durchmesser von 10 Pixeln (entspricht $2,2 \mu\text{m}$) in einem Nukleolus gebleicht, zum anderen eine Kreisfläche gleicher Größe im Nukleoplasma. Das Bleichen erfolgte prinzipbedingt nicht nur in der beobachteten Ebene, sondern durch die ganze Zelle. Da die Fluoreszenzrückkehr jedoch nur zweidimensional in einer Ebene betrachtet wird, entspricht das Bleichprofil einer Kreisfläche. Es wurden jeweils 30 Zellen vermessen, die Fluoreszenzrückkehr für jede Messung auf die Helligkeit

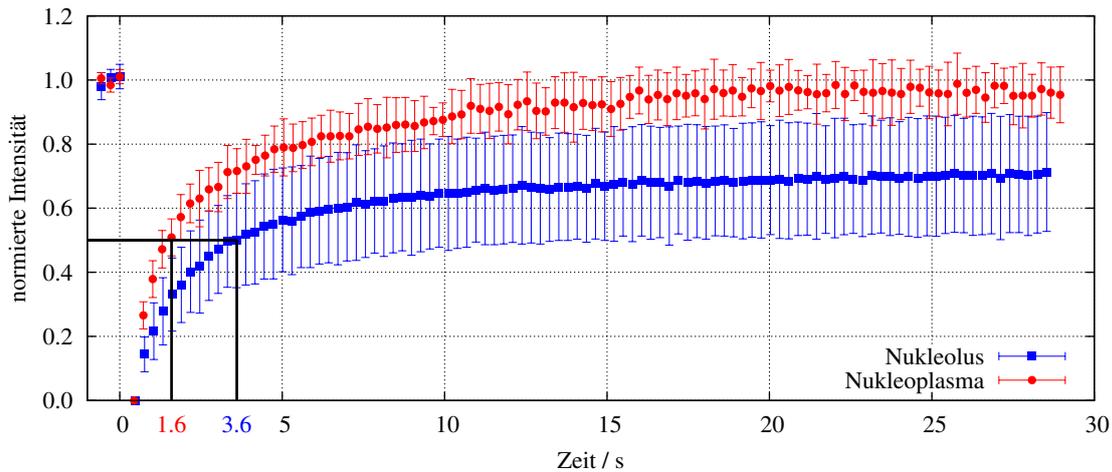


Abbildung 4.9: Fluoreszenzrückkehr in Nukleolus und Nukleoplasma. Die obere rote Kurve zeigt die fast vollständige Fluoreszenzrückkehr im Nukleoplasma. Die untere blaue Kurve zeigt die deutlich geringere Fluoreszenzrückkehr in den Nukleoli. Eingezeichnet sind auch die $\tau_{0,5}$ -Werte, diese betragen 1,6 Sekunden im Nukleoplasma sowie 3,6 Sekunden im Nukleolus.

vor dem Bleichen normiert und die normierten Intensitäten anschließend gemittelt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 4.9 zu sehen.

Die Kurve bildet die Mobilität verschiedener Partikel ab, die sich durch unterschiedlich weit fortgeschrittene Biogenese in ihrer Größe und ihrem Diffusionsverhalten deutlich unterscheiden. So gibt es sehr schnelles ungebundenes Dim2, die noch in der Transkription befindliche rRNA, 90S-Partikel sowie vielfältige 40S-Vorstufen. Da die Anzahl an Zwischenstufen unklar ist und über deren Mobilität nichts bekannt war, wurde mit den FRAP-Kurven keine quantitative Auswertung durchgeführt, da eine Vielkomponentenanpassung mit kaum vorhandenen Rahmenbedingungen nicht sinnvoll erschien. Die Kurven lassen jedoch auch bei rein qualitativer Betrachtung bereits Rückschlüsse auf die Mobilität zu.

Der Unterschied der Fluoreszenzrückkehr in den unterschiedlichen Kompartimenten ist klar zu erkennen. Während im Nukleoplasma eine Fluoreszenzrückkehr von fast 100 % erreicht wird, kehrt diese im Nukleolus auch nach 30 Sekunden nur zu ca. 60 % zurück. Der Anteil an immobilen Partikeln im Nukleoplasma wäre also bei etwa (0 – 2) % anzusiedeln, wohingegen im Nukleolus etwa 40 % der Partikel immobilisiert sind. Ein weiterer deutlicher Unterschied der beiden Kurven besteht in der Steigung beim Wiederanstieg. Die Fluoreszenzrückkehr im Nukleoplasma erfolgt deutlich schneller, als dies in den Nukleoli der Fall ist. Das ist insbesondere auch an den Halbwertszeiten zu sehen. Diese betragen $\tau_{0,5}(\text{Nukleoplasma}) = 1,6$ Sekunden sowie $\tau_{0,5}(\text{Nukleolus}) = 3,6$ Sekunden.

4.4.2.2 Einteilung der Zelle in Segmente

Um auch in den Einzelmolekülmessungen, bei denen keine native Färbung des Nukleolus mehr vorhanden war, den Zellkern in Nukleolus und Nukleoplasma unterteilen zu können, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Da erfolgreich gezeigt werden konnte, dass Dim2 in den Nukleoli akkumuliert (Kapitel 4.3.3), wurde Dim2 mit zwei verschiedenen Snap-Farbstoffen gefärbt. Verwendet wurde zum einen der rote Farbstoff SiR-Snap für die Einzelmolekülmarkierung, zum anderen Snap-

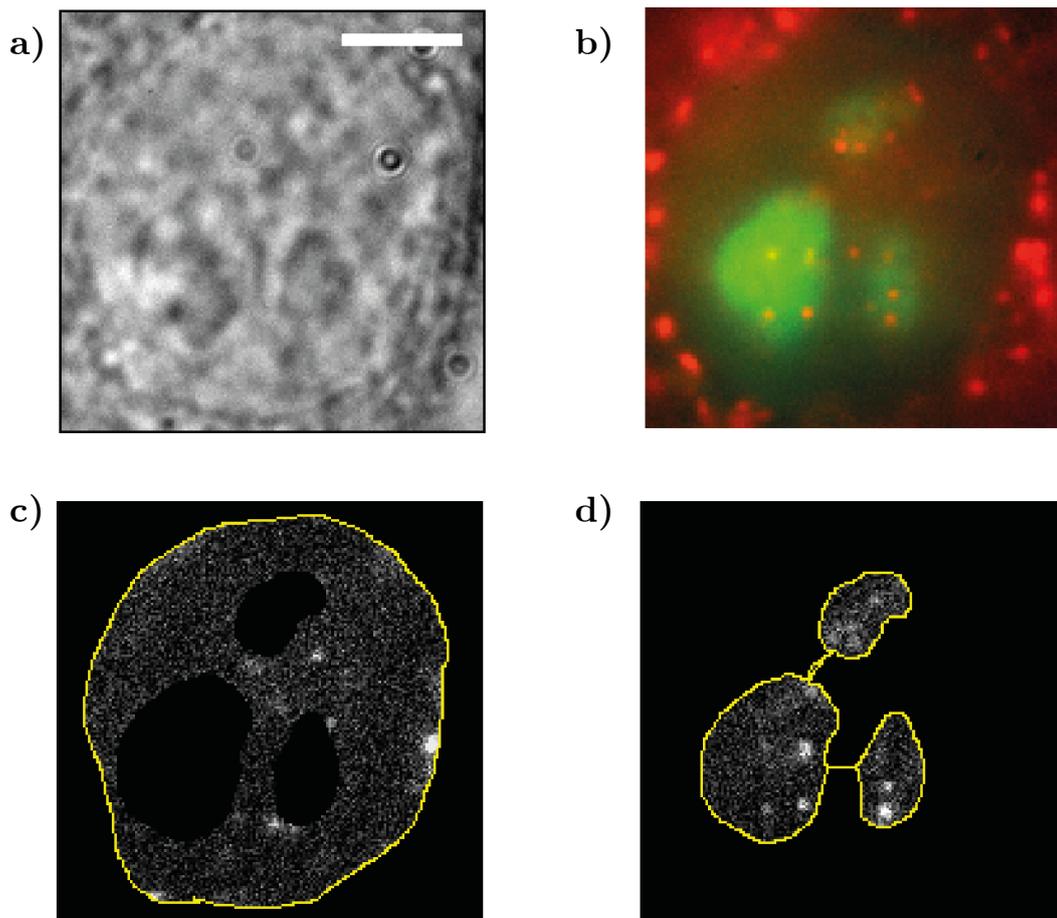


Abbildung 4.10: Beispielhafte Aufnahme einer Zelle zum Bestimmen der kompartimentabhängigen Mobilität. a) Durchlichtbild, b) Mittelwert-Projektion eines Film; in grün gezeigt sind die mit Snap-Dim2-OregonGreen gefärbten Nucleoli, in rot die vereinzelter Vorläuferuntereinheiten, gefärbt mit Snap-Dim2-SiR; c) ausgeschnittenes Nucleoplasma; d) ausgeschnittener Bereich der Nucleoli. Der Maßstabsbalken beträgt 5 μm .

Cell Oregon Green in grün zum Markieren der Position der Nucleoli. Aufgenommen wurden 50 Bilder der Bulkfärbung, anschließend 950 Bilder der roten Einzelmolekülmarkierung, jeweils mit einer Bildrate von 79,55 Hz.

Die 50 Bilder der Bulkfärbung wurden aus dem Film herausgeschnitten und eine Durchschnitts-Projektion in ImageJ durchgeführt, wodurch es zu einer deutlichen Glättung der Außengrenze der Nucleoli kam (Abb. 4.10 b, in grün). Um diese wurde manuell ein Polygon-ROI gelegt.

Nun wurden mit diesem ROI die 950 Bilder der Einzelmolekülaufnahme (Abb. 4.10 b, in rot) in zwei Teile zerlegt. Einmal erfolgte ein Löschen des gesamten Bildes außerhalb der Nucleoli (Abb. 4.10 d). Mit diesem Teil der Filme wurde anschließend die Mobilität im Nucleolus bestimmt. Um die Mobilität im Nucleoplasma zu bestimmen, wurde das Polygon-ROI aus dem Einzelmolekülfilm gelöscht. Zusätzlich wurde hier mit Hilfe eines Durchlichtbilds (Abb. 4.10 a) die Zellkerngrenze bestimmt und alles außerhalb des Zellkerns gelöscht, sodass nur noch die im Nucleoplasma befindlichen Partikel übrig bleiben (Abb. 4.10 c). Durch die Doppelmarkierung mit zwei Snap-Farbstoffen in unterschiedlicher Konzentration gelang es also sehr gut eine Unterteilung der Aufnahmen in die Zellkompartimente vorzunehmen, ohne dass weitere, zusätzliche Marker benötigt wurden.

4.4.2.3 Mobilität im Nukleoplasma

Um die Mobilität im Nukleoplasma zu bestimmen, wurden alle Filme ausgewertet, bei denen sowohl das Zytoplasma als auch die Nukleoli ausgeschnitten worden waren. Die Schwellenwert-Einstellung für *Trash bright* blieb unverändert für alle Filme auf 256, die Einstellungen für *Trash dim* sowie *Trash blurred* wurden für jeden Film abhängig vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis einzeln angepasst. Genaueres findet sich in Kapitel 3.3.5.

Die gefundenen Sprungweiten wurden anschließend weiter mit SWA analysiert (Kapitel 3.3.6.2). Verwendet wurden hierzu die JD1-Werte. Insgesamt standen 17045 Sprünge aus 3718 Trajektorien zur Verfügung, die aus 98 Filmen aus 86 Zellen mit einer Gesamtlänge von 19 Minuten stammten. Die Sprungweitenverteilung ist in Abbildung 4.11 a dargestellt und ließ sich mit drei Komponenten beschreiben. Die Dreikomponentenanpassung ergab eine frei diffundierende Komponente mit $D_f=(2,3 \pm 0,3) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und einem Anteil von $(28 \pm 2) \%$, eine retardierte Komponente mit $D_r=(0,31 \pm 0,03) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und einem Anteil von $(39 \pm 2) \%$ sowie eine immobile Komponente mit $D_i=(0,054 \pm 0,002) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ und einem Anteil von $(33 \pm 2) \%$.

Ergänzend zur oben beschriebenen SWA erfolgte eine weitere Analyse der Daten mit vbSPT (Kapitel 3.3.6.3, [Persson et al., 2013]). Dieses bestimmte anhand der Trajektorien ebenfalls die Diffusionskoeffizienten und deren Anteil an der Gesamtmobilität, außerdem wurden hier noch Verweilzeiten innerhalb einer Fraktion sowie Übergangswahrscheinlichkeiten zwischen jeweils zwei Fraktionen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Analyse einmal mit einer Beschränkung auf drei Diffusionskoeffizienten durchgeführt. Zum anderen wurde die Optimierung mit bis zu zehn erlaubten Diffusionskoeffizienten gestartet, wobei vbSPT für mehr als sechs Fraktionen keine Verbesserung des Modells mehr fand. Die Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit relativen Anteilen im Nukleoplasma in drei unterschiedlichen Analysen. Alle Diffusionskoeffizienten sind in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben. Die Fehler wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen und finden sich im Anhang in Tabelle A.1.

Methode	Anz. Komp.	D_f	%	$D_{r,1}$	%	$D_{r,2}$	%	$D_{r,3}$	%	$D_{i,1}$	%	$D_{i,2}$	%
SWA	3	2,3	28			0,31	39					0,054	33
vbSPT	3	2,8	24			0,36	37					0,06	39
vbSPT	6	3,7	14	1,1	19	0,36	15	0,22	11	0,1	22	0,04	19

Die Ergebnisse der drei-Fraktionen-Analyse sind in Abbildung 4.11 b dargestellt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten zeigen, dass es am wahrscheinlichsten ist, dass ein Partikel keine Änderung seiner Mobilität erfährt. Ein Übergang von freier Diffusion hin zur Immobilität und *vice versa* findet mit Wahrscheinlichkeiten von $< 1 \%$ kaum statt. Gleichzeitig lässt sich die Tendenz ablesen, dass Partikel eher verlangsamt werden, als dass sie in einen Zustand mit höherer Mobilität übergehen. Die Verweilzeiten der retardierten und der mobilen Partikel in ihrem Zustand beträgt etwa 80 ms. Ein Partikel, das immobilisiert ist, behält diesen Zustand mit einer durchschnittlichen Verweilzeit von 290 ms deutlich länger.

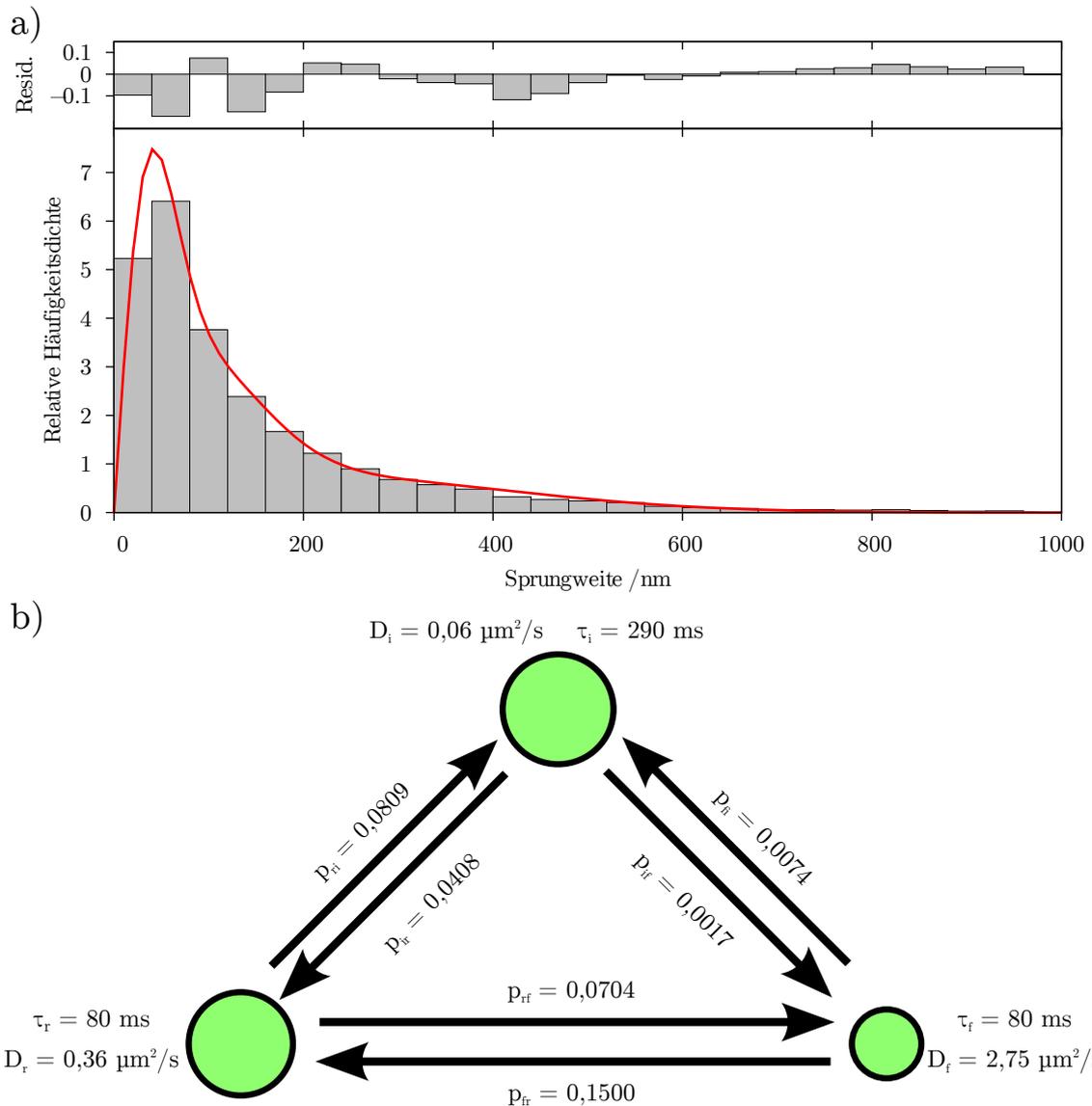


Abbildung 4.11: a) Sprungweitenhistogramm der Sprünge im Nukleoplasma. Gezeigt sind zusätzlich die Dreikomponentenanpassung (rote Kurve) sowie die zugehörigen Residuen. b) Ergebnisse der vbSPT-Optimierung mit Übergangswahrscheinlichkeiten und Verweilzeiten. Die Fläche der grünen Kreise veranschaulicht die jeweiligen Anteile der einzelnen Komponenten an der Gesamtmobilität.

4.4.2.4 Mobilität in den Nukleoli

Die Mobilität der Partikel in den Nukleoli wurde analog zur Auswertung im Nukleoplasma durchgeführt. Es konnten 102 Filme aus 87 Zellen mit einer Gesamtlänge von 20 Minuten für die Auswertung herangezogen werden, in denen 21225 Sprünge in 3243 Trajektorien identifiziert werden konnten. Die Sprungweitenverteilung ist in Abbildung 4.12 a gezeigt. Zum Anpassen der SWA an die Sprungweitenverteilung wurden die drei Diffusionskoeffizienten aus Kapitel 4.4.2.3 festgesetzt und somit bei der Anpassung nicht weiter verfeinert. Die Anteile der einzelnen Mobilitätskomponenten in den Nukleoli wurden mit $D_f = 2,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil von $(7 \pm 4) \%$, $D_r = 0,31 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil von $(28 \pm 3) \%$ sowie $D_i = 0,054 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil von $(65 \pm 4) \%$ bestimmt.

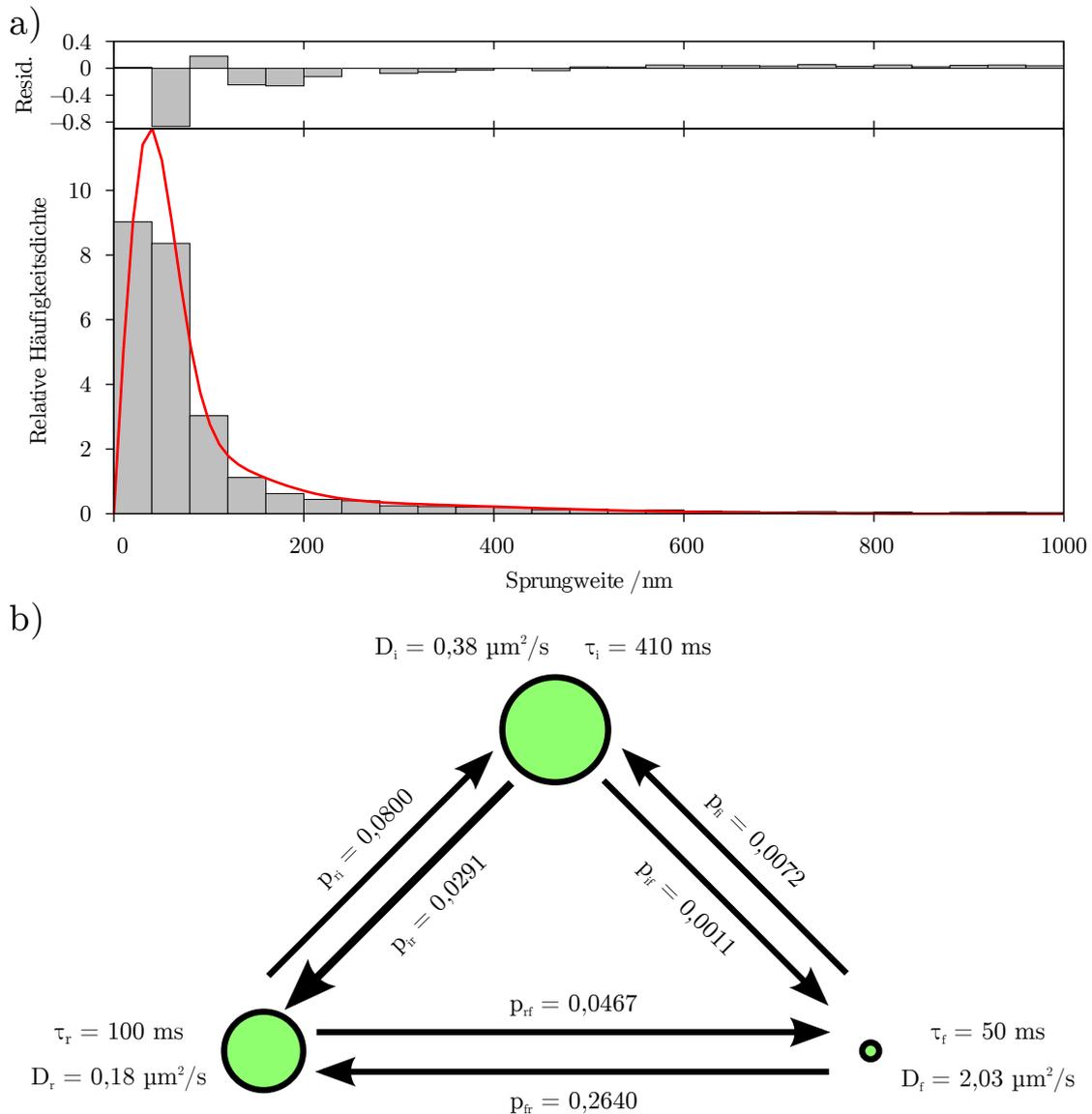


Abbildung 4.12: a) Sprungweitenverteilung im Nukleolus. Gezeigt sind zusätzlich die Dreikomponentenanpassung (rote Kurve) sowie die zugehörigen Residuen. b) Ergebnisse der vbSPT-Optimierung mit Übergangswahrscheinlichkeiten und Verweilzeiten. Die Fläche der grünen Kreise veranschaulicht die jeweiligen Anteile der einzelnen Komponenten an der Gesamtmobilität.

Ebenfalls analog zur Auswertung im Nukleoplasma wurde zusätzlich die vbSPT-Analyse durchgeführt. Auch hier wurde die Analyse einmal mit der Begrenzung auf drei Komponenten durchgeführt, bei der Analyse ohne Begrenzung der Komponentenanzahl wurden hier fünf Komponenten gefunden. Da es nicht möglich war, hier Diffusionskoeffizienten zu fixieren, unterscheiden sich diese von den im Nukleoplasma gefundenen. Die Diffusionskoeffizienten sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Die Ergebnisse der drei-Komponenten-Analyse sind in Abbildung 4.12 b gezeigt. Die Übergangswahrscheinlichkeiten zeigen erneut, dass ein Partikel seine Mobilität am wahrscheinlichsten behält, gleichzeitig jedoch auch, dass ein Mobilitätswechsel umso wahrscheinlicher wird, je schneller das Partikel ist. Der bereits im Nukleoplasma erhaltene Befund, dass ein Wechsel eines frei diffun-

Tabelle 4.2: Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit relativen Anteilen im Nukleolus in drei unterschiedlichen Analysen. Alle Diffusionskoeffizienten sind in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben. Die Fehler wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen und finden sich im Anhang in Tabelle A.2.

Methode	Anz. Komp.	D_f	%	$D_{r,1}$	%	$D_{r,2}$	%	$D_{i,1}$	%	$D_{i,2}$	%
SWA	3	2,3	7			0,31	28			0,054	65
vbSPT	3	2,0	9			0,18	39			0,04	52
vbSPT	5	5,1	2	0,73	10	0,25	17	0,08	40	0,03	31

dierenden Partikels zu einem immobilisierten Partikel und *vice versa* sehr unwahrscheinlich ist, wiederholte sich im Nukleolus. Zusätzlich ist auch hier ein Trend von mobileren zu immobilere Zuständen hin festzustellen. Die Verweilzeiten in den einzelnen Zuständen im Nukleolus waren umso länger, je immobilere der Zustand war. Immobilisierte Partikel verweilten durchschnittlich 410 ms in diesem Zustand, die Retardierung dauerte etwa 100 ms und mobile Phasen hielten sich nur für 50 ms.

4.4.2.5 Immobile Phasen in den Trajektorien im Experiment

Bei der Betrachtung der Mobilität ist nicht nur interessant, wie sich der Durchschnitt der betrachteten Partikel verhält, sondern auch, wie sich ein Partikel entlang einer Trajektorie verhält. Im nicht zu realisierenden Idealfall würde das durchgeführte Experiment als Ergebnis sehr lange Trajektorien liefern, die die komplette Maturation der kleinen ribosomalen Untereinheit abbilden. In einer solchen Trajektorie würden sich immobile Phasen, beispielsweise während der Transkription oder dem Export, mit mobilen Phasen abwechseln. In diesen mobilen Phasen wiederum unterscheiden sich Phasen hoher Mobilität, in denen das beobachtete Partikel frei diffundiert, von Phasen geringerer Mobilität, in welchen die freie Diffusion beispielsweise durch Chromatin verlangsamt wird. In der Realität wird das Zustandekommen solch langer Trajektorien jedoch von mehreren Faktoren verhindert. Ein Faktor ist die Bleichung des Farbstoffs. Da an jedem Protein nur ein Farbstoff gebunden ist, bricht die Trajektorie mit seiner Bleichung ab. Ein anderer Faktor ist die Tatsache, dass die Verfolgung von Partikeln nur innerhalb der Fokusebene möglich ist. Partikel, die eine Diffusionsrichtung senkrecht zur Fokusebene aufweisen, verlassen diese und können anschließend nicht weiter verfolgt werden. Eine Trajektorie, die im Experiment gefunden wurde, stellt somit immer nur einen zufälligen Ausschnitt dar. Dennoch können Aussagen über die Mobilität der Partikel getroffen werden, wenngleich keine so detaillierte Einzelfallbetrachtung wie in den langen, dreidimensionalen Trajektorien aus *C. tentans* möglich sind [Spille und Kubitscheck, 2015]. Von besonderem Interesse sind Phasen der Immobilisierung, da hier biologische Prozesse stattfinden könnten. Daher wurden die immobilen Phasen der Trajektorien in Nukleoli und Nukleoplasma genauer untersucht.

In einer ersten Analyse wurden nur Trajektorien betrachtet, die aus mindestens 10 Sprüngen, also 11 Positionen, bestehen. Dadurch reduzierte sich der Datensatz deutlich. Im Nukleolus blieben noch 14021 Sprünge in 551 Trajektorien übrig, im Nukleoplasma verringerte sich die Anzahl auf 8621 Sprünge in 342 Trajektorien. Für jede Trajektorie wurde nun bestimmt, welchen Anteil an der Gesamtheit der Sprünge diejenigen Sprünge haben, die eine Länge von weniger als 52 nm

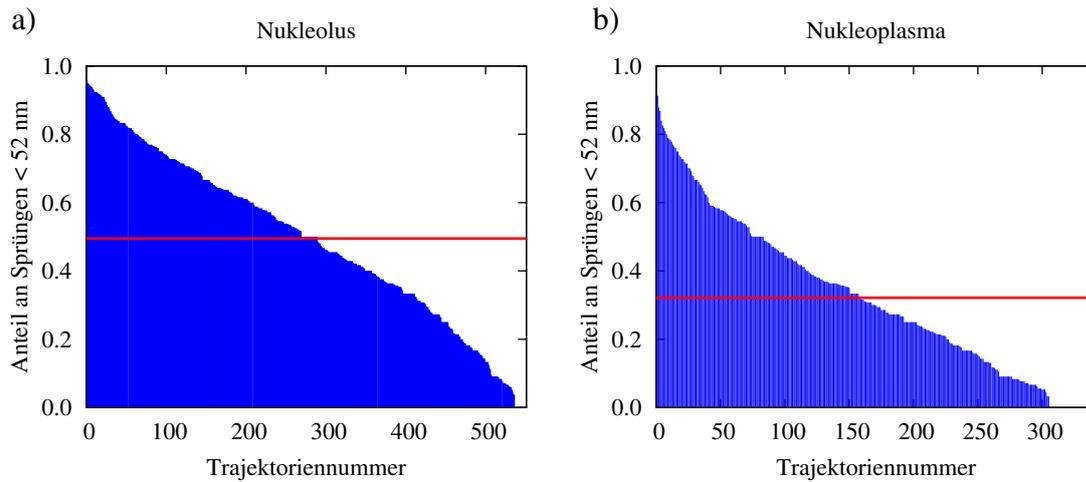


Abbildung 4.13: Anteil an immobilen Phasen innerhalb der Trajektorien. a) Immobiler Anteil in den Nukleoli, b) mobiler Anteil im Nukleoplasma. Der rote Balken zeigt den durchschnittlichen Anteil an immobilen Phasen im jeweiligen Kompartiment an.

aufweisen. Hierbei handelt es sich um die immobile Komponente mit dem Diffusionskoeffizienten $D_i = 0,054 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Dieser immobile Anteil an der Trajektorie wurde prozentual berechnet und als Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 4.13). In beiden Kompartimenten fällt sofort auf, dass der immobile Anteil stark schwankt. Es wird deutlich, dass bei den Trajektorien, die in den Nukleoli gefunden wurden, ein deutlich höherer Anteil an Immobilisierung vorliegt.

Dieser Befund lässt sich auch gut in einer anderen Form der Auftragung verdeutlichen, bei der alle Trajektorien analysiert wurden. In Abbildung 4.14 ist gezeigt, wie häufig Sequenzlängen von immobiligen Phasen auftreten. Augenfällig ist, dass der Anteil an kurzen Immobilisierungen (also mit einer Länge von etwa ein bis vier Sprüngen) im Nukleoplasma höher ausfällt als in den Nukleoli, und sich dies mit längeren Immobilisierungen zunehmend umkehrt, sodass lange immobile Phasen hauptsächlich in den Nukleoli anzutreffen sind. Die breite Verteilung der Länge der Immobilisierung warf die Frage auf, ob diese der Verteilung bei freier Diffusion entspricht. Diese Frage sollte mit einer Simulation angegangen werden.

4.4.2.6 Immobilisierung von Partikeln in der Simulation

Die durchgeführte Simulation beruhte darauf, dass Diffusion ein stochastischer Prozess ist, der zusätzlich durch die Aufnahme in zufällige Abschnitte unterteilt wird. Untersucht wurden, wie oben, Sprünge, die kürzer als 52 nm waren. Die relevanten Daten, die als Grundlage für die Simulation verwendet wurden, sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst und beruhen auf den in den Abschnitten 4.4.2.3 und 4.4.2.4 vorgestellten Sprungweitenverteilungen.

Die Simulation wurde als Bernoulli-Experiment mit den beiden Ereignissen „Sprung < 52 nm“ und „Sprung \geq 52 nm“ durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeit für einen Sprung < 52 nm betrug 0,3 im Nukleoplasma und 0,5 im Nukleolus (Tabelle 4.3). Das Bernoulli-Experiment wurde N -mal wiederholt, wobei N der Anzahl an Sprüngen im jeweiligen Kernkompartiment entsprach. Diese

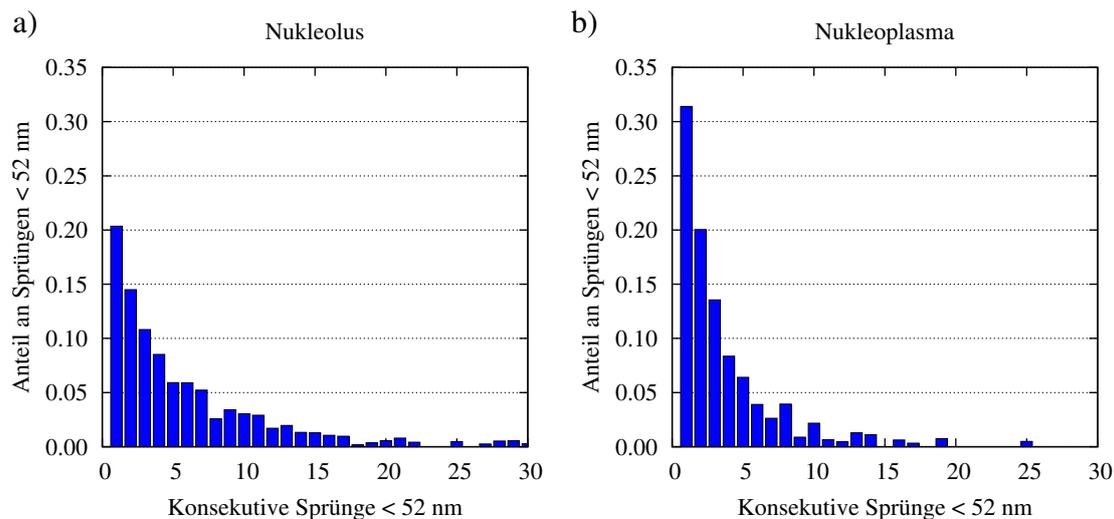


Abbildung 4.14: Prozentualer Anteil an immobilen Phasen in den Trajektorien im Nukleolus und im Nukleoplasma im Vergleich. a) Anteil der immobilen Phasen im Nukleolus, b) Anteil der immobilen Phasen im Nukleoplasma.

Tabelle 4.3: Daten, auf deren Grundlage die Simulation durchgeführt wurde.

	Sprünge gesamt	Sprünge < 52 nm	Anteil in %
Nukleolus	21225	10566	50
Nukleoplasma	17045	5069	30

Folge aus N Ereignissen wurde anschließend in „Trajektorien“ unterteilt, wobei die Anzahl und die Länge den Trajektorien in dem jeweiligen Kompartiment entsprach. Im nächsten Schritt wurden die Längen aller Sequenzen von konsekutiven Sprüngen < 52 nm gezählt. Die Simulation wurde pro Kompartiment 10.000-mal durchgeführt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt.

Analog wurden im experimentellen Datensatz ebenfalls Abfolgen von kurzen Sprüngen gezählt. Wenn es sich bei den immobilen, kurzen Sprüngen um zufällige Ereignisse handeln würde, sollten die aus den experimentellen Daten und der Simulation gewonnenen Verteilungen von immobilen Sprungsequenzen sehr ähnlich ausfallen. Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse im Nukleolus ist in Abbildung 4.15 a dargestellt, 4.15 b veranschaulicht die Situation im Nukleoplasma. In beiden Kompartimenten fällt auf, dass weniger kurze Immobilisierungen in den Daten zu finden sind, als von der Simulation vorhergesagt. Weiterhin wird deutlich, dass lange immobile Phasen im Experiment signifikant häufiger auftraten, als in der Simulation. Um das Zustandekommen dieser langen immobilen Phasen insbesondere im Nukleoplasma näher zu betrachten, wurde der Einfluss des Chromatins auf die Molekülbewegung analysiert.

4.4.2.7 Sterischer Einfluss des Chromatins im Kern auf die Molekülbewegung

Die Untersuchung der Mobilität von Dim2 im Nukleolus und im Nukleoplasma förderte sowohl bei der Betrachtung mit SWA, als auch bei der mit vbSPT eine Mobilität zutage, die eine Beschreibung mit mindestens drei Komponenten erfordert. Da die zugrunde liegenden Experimente *in vivo*

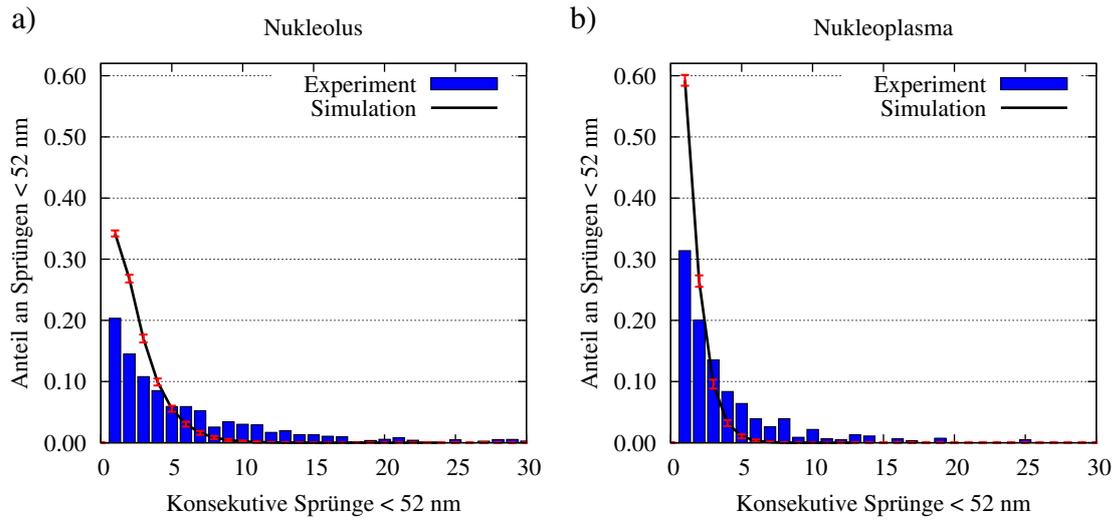


Abbildung 4.15: Prozentualer Anteil immobilier Phasen in den Trajektorien in Simulation und experimentellen Daten. Die experimentellen Daten werden durch blaue Balken dargestellt, die Simulation als schwarze Kurve mit roter Standardabweichung. a) Ergebnis aus Experiment und Simulation im Nukleolus, b) Ergebnis aus Experiment und Simulation im Nukleoplasma. Beiden Auftragnungen ist zu entnehmen, dass in der Simulation mehr kurze immobile Phasen, im Experiment hingegen längere immobile Phasen auftraten.

durchgeführt wurden, stellte sich schnell die Frage nach der biologischen Relevanz insbesondere der retardierten Komponente mit dem Diffusionskoeffizienten D_r , der im Bereich von $(0,18 - 0,36) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ liegt. Um herauszufinden, ob diese Retardierung durch Kernstrukturen oder durch Bindungseignisse verursacht wird, wurden Daten von Dr. Roman Veith näher untersucht. Bei den Daten handelt es sich um Filme, die mit einer Frequenz von 192 Hz in den Zellkernen von HeLa-Zellen aufgenommen wurden. In diese Kerne wurden fluoreszenzmarkierte Dextrane mit einer Größe von 500 kDa, und einem hydrodynamischen Radius von 80 nm, injiziert [Veith et al., 2010]. Die Größe des pre-Ribosoms beträgt zum Vergleich etwa 2 MDa, mit einem mittleren Radius von 19 nm. Bei Dextranen handelt es sich um ungeladene Biopolysaccharide, die keine Bindungsstellen im Kern haben. Eine eventuelle Retardierung oder Immobilisierung der inerten Dextrane ist daher ein Indikator für sterische oder strukturelle Behinderung der Diffusion durch die Kernumgebung. In der oben zitierten Veröffentlichung wurde lediglich der nicht-lineare MSD-Verlauf diskutiert, eine weitere Betrachtung der Daten fand nicht statt. Der nicht-lineare MSD-Verlauf lieferte jedoch bereits einen Hinweis darauf, dass auch hier unterschiedlich mobile Fraktionen zu finden sind.

Der Datensatz bestand aus 82 Filmen, die in 20 verschiedenen Zellen in drei Experimenten aufgenommen wurden. In diesen Zellen wurden von Dr. Roman Veith 13975 Trajektorien mit 34503 Sprüngen identifiziert.

Aufbauend auf diesen Sprüngen wurde nun die oben beschriebene SWA durchgeführt. Die Sprungweitenverteilung sowie die Mehrkomponentenanpassung ist in Abbildung 4.16 a dargestellt. Die Anpassung mit zwei Komponenten ergab die Diffusionskoeffizienten $D(Dex)_f = (2,8 \pm 0,2) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil $A(Dex)_f = (71 \pm 2) \%$ sowie $D(Dex)_r = (0,50 \pm 0,04) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil $A(Dex)_r = (29 \pm 3) \%$. Der R^2 -Wert der Anpassung lag bei 0,99444. Wie oben wurde zusätzlich zur SWA eine vbSPT-Analyse durchgeführt [Persson et al., 2013]. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 4.16 b dargestellt. Auch hier wurde die Anpassung auf zwei Komponenten begrenzt. In

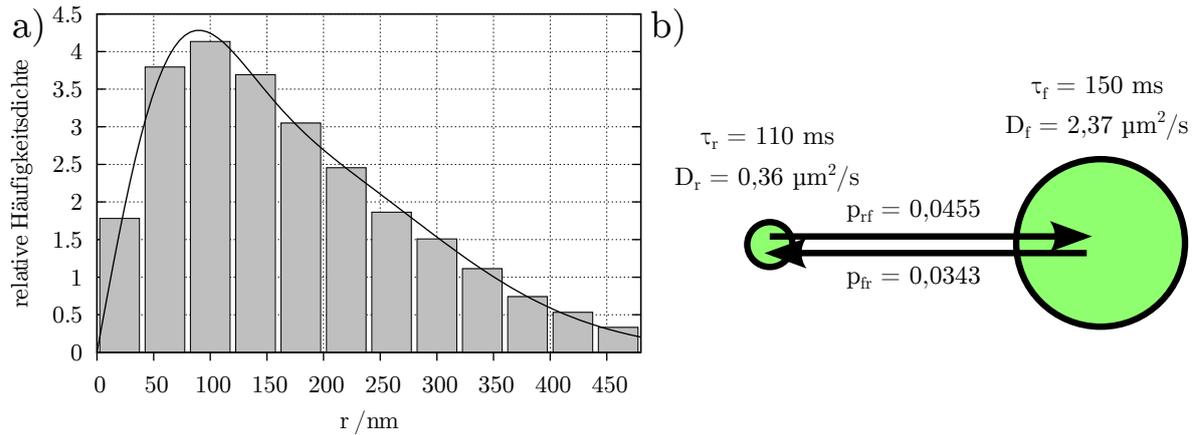


Abbildung 4.16: a) Sprungweitenverteilung von 500 kDa Dextranen in HeLa-Zellkernen. b) vbSPT-Analyse derselben Aufnahmen. Daten von Dr. Roman Veith [Veith et al., 2010].

Tabelle 4.4: Diffusion von Dextranen in HeLa-Zellkernen. Diffusionskoeffizienten und Anteil an der Gesamtmobilität in den einzelnen Anpassungen. Die Fehler wurden der Übersichtlichkeit halber weggelassen und finden sich im Anhang in Tabelle A.3.

Anpassung	Komp.	D_f in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	%	$D_{r,1}$ in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	%	$D_{r,2}$ in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	%	$D_{r,3}$ in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$	%
SWA	2	2,83	71	0,50	29				
SWA	3	3,13	64	0,72	32	0,16	4		
vbSPT	2	2,37	78	0,36	22				
vbSPT	3	2,57	66	0,94	21	0,26	13		
vbSPT	4	2,59	64	1,17	17	0,50	11	0,20	8

dieser Auswertung ergaben sich die Diffusionskoeffizienten $D(Dex)_f = (2,37 \pm 0,01) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil $A(Dex)_f = 78$ % sowie $D(Dex)_r = (0,36 \pm 0,004) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil $A(Dex)_r = 22$ %. Darüber hinaus wurden beide Analyseverfahren auch noch mit drei Komponenten angewendet. Beim vbSPT-Modell wurde zusätzlich noch eine Analyse mit bis zu zehn Komponenten gestartet, wobei nur vier Fraktionen gefunden wurden. All diesen Auswertungen war gemein, dass ein schneller Diffusionskoeffizient D_f im Bereich von $(2,37 - 3,13) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ mit einem Anteil von $(64 - 78)$ % gefunden wurde. Die langsamere Komponente spaltete sich mit der Freigabe von mehr Zuständen in mehrere Diffusionskoeffizienten auf. Die Ergebnisse der einzelnen Anpassungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

4.4.3 Transition vom Nukleolus zum Nukleoplasma und *vice versa*

Nachdem die Dynamik der 40S-Vorläufer in den Nukleoli und dem Nukleoplasma einzeln bestimmt worden war, stellte sich die Frage, wie der Übergang von einem Kompartiment ins andere verläuft. Hierzu wurden die Filme, die in den vorangegangenen Kapiteln in Teilen verwendet worden waren, erneut ausgewertet. Diese neugewonnenen Trajektorien wurden anschließend weiter analysiert.

Um eine Vorstellung davon zu erhalten, wie die Trajektorien sich innerhalb des Zellkerns verteilen, wurde eine Möglichkeit gesucht, die Trajektorien in Relation zur Geografie des Kerns darzustellen. Dazu wurde mithilfe von Matlab ein weiteres Skript programmiert. Mit diesem war nun eine zusätzliche Auswertung der Sprünge möglich. Neben den gewonnenen Trajektorien wurde das zum Eingrenzen des Nukleolus erstellte ROI (Kapitel 4.4.2.2) eingelesen.

Nun wurde nach Trajektorien gesucht, die die Grenze Nukleoplasma-Nukleolus überschreiten, und diese anschließend auch visualisiert. Die so herausgefilterten Trajektorien wurden in vier Kategorien einsortiert:

- Eintritt: Partikel, die aus dem Nukleoplasma kommen und den Nukleolus betreten (Beispieltrajektorien in Abbildung 4.18),
- Verlassen: Partikel, die den Nukleolus verlassen (Beispieltrajektorien in Abbildung 4.19),
- Umkehr: Partikel, die vom Nukleoplasma kommen, umkehren und ins Nukleoplasma zurückgehen (Beispieltrajektorien in Abbildung 4.20),
- Grenze: Partikel, die auf der Grenze liegen und weder dem Nukleoplasma noch dem Nukleolus eindeutig zuzuordnen waren (Beispieltrajektorien in Abbildung 4.21).

Insgesamt wurden in 93 Filmen 225 Trajektorien gefunden und bewertet. Diese teilten sich in die erwähnten Kategorien auf wie folgt: 54 Ereignisse fallen in die Kategorie „Eintritt“, 58 Ereignisse in „Verlassen“, 25 in „Umkehr“ sowie 88 in „Grenze“ (Abbildung 4.17).

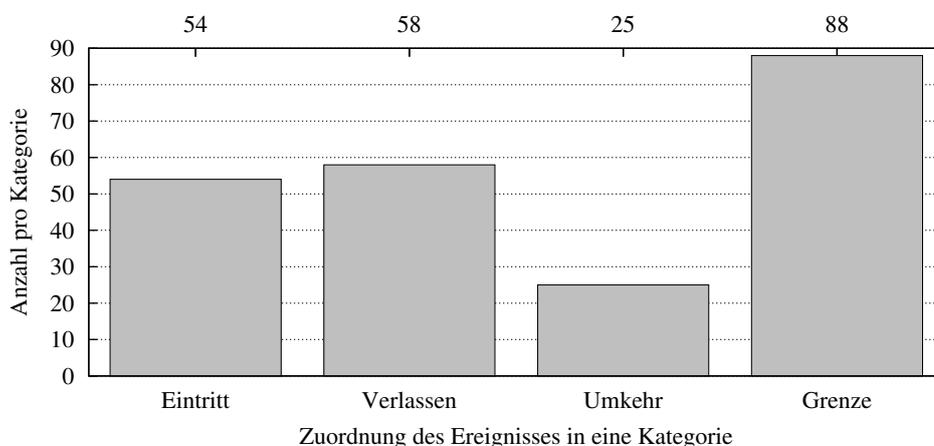


Abbildung 4.17: Trajektorien, die sich an der Grenze zwischen Nukleoli und Nukleoplasma fanden.

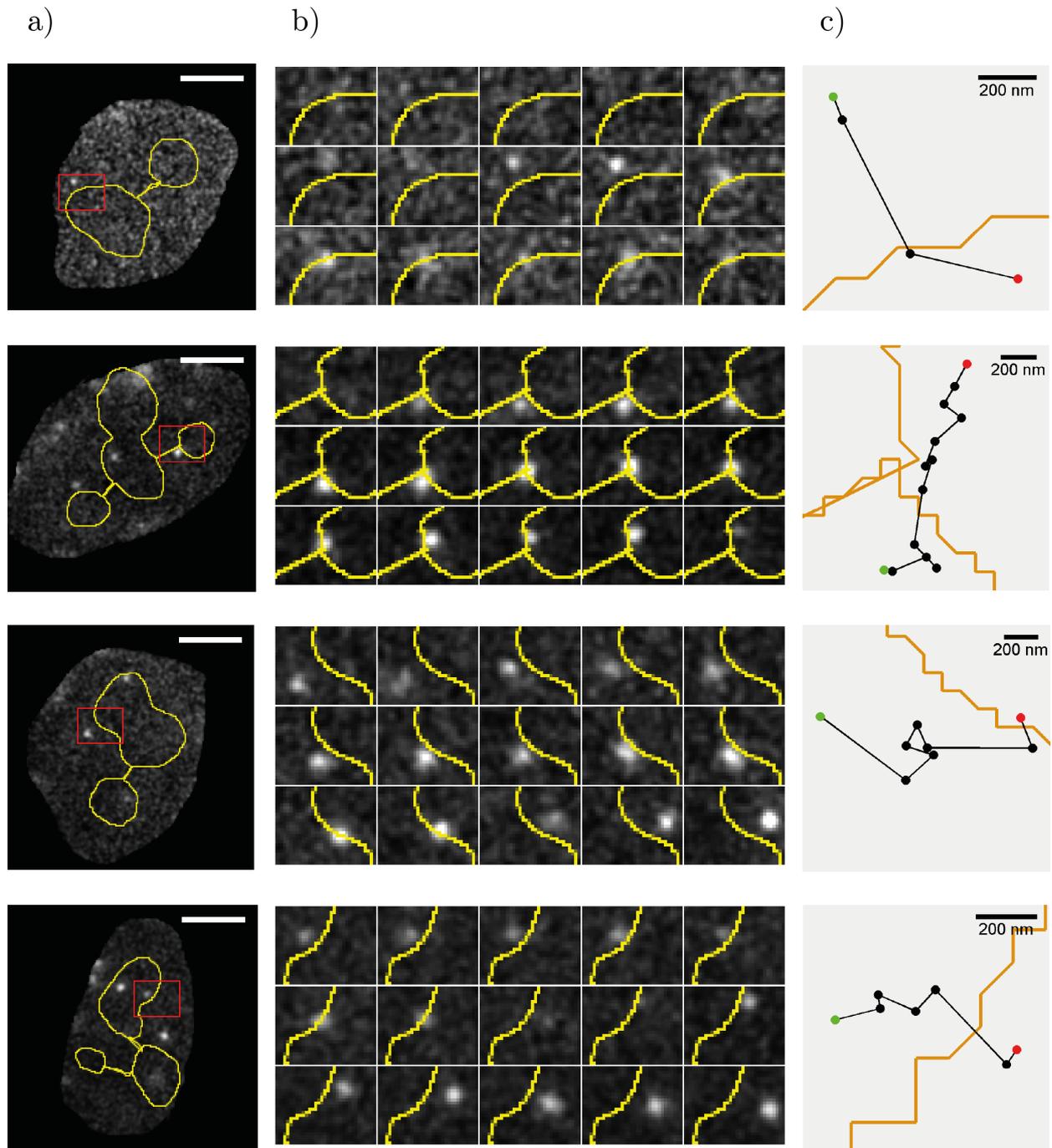


Abbildung 4.18: Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Eintritt“. a) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2 im gesamten Zellkern. In gelb sind die Umrisse der Nucleoli dargestellt, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . b) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils 12,6 ms. Die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in gelb dargestellt. c) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

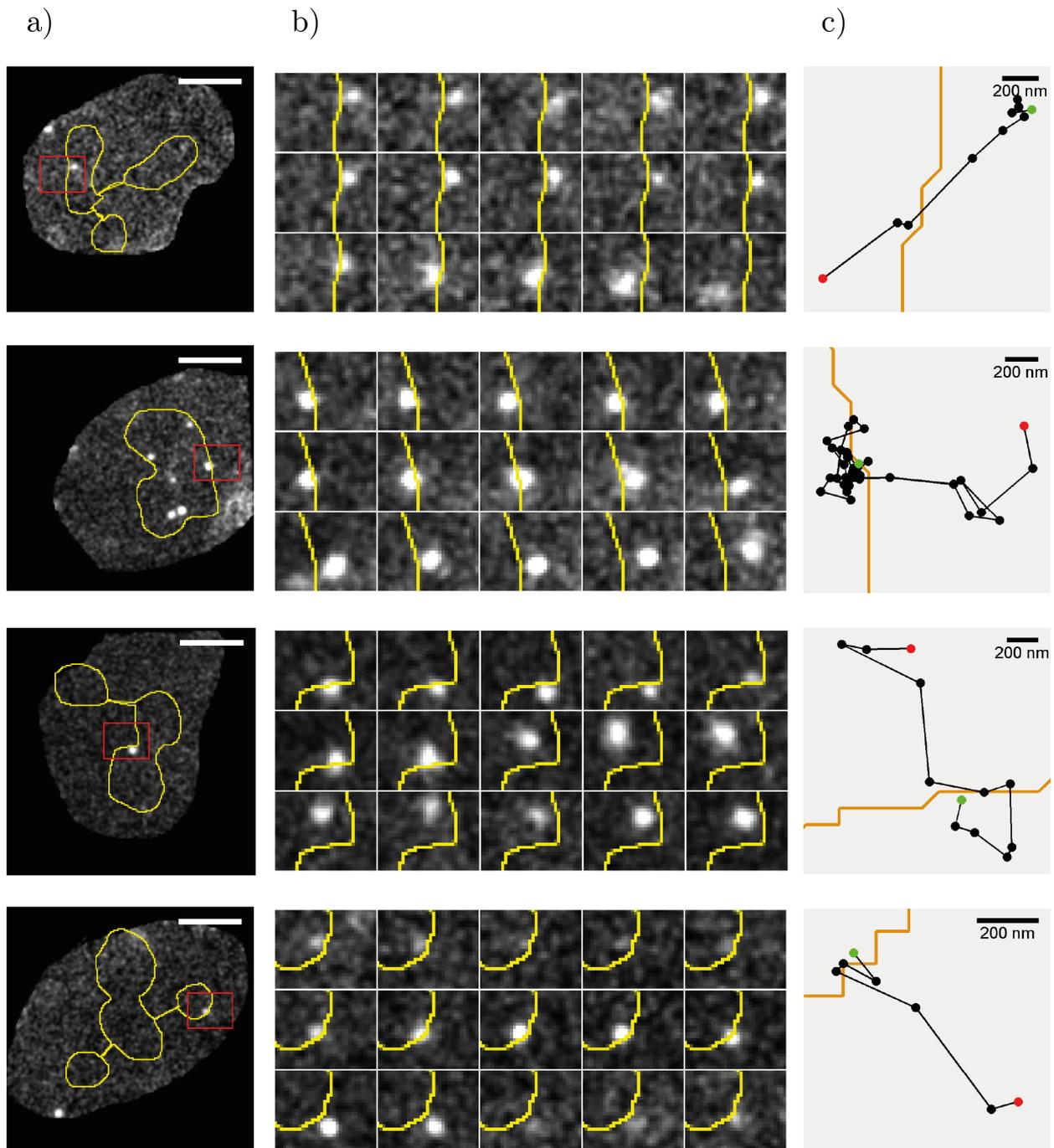


Abbildung 4.19: Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Verlassen“. a) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2 im gesamten Zellkern. In gelb sind die Umrisse der Nucleoli dargestellt, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b. Der Maßstabsbalken entspricht $5\ \mu\text{m}$. b) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils $12,6\ \text{ms}$. Die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in gelb dargestellt. c) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

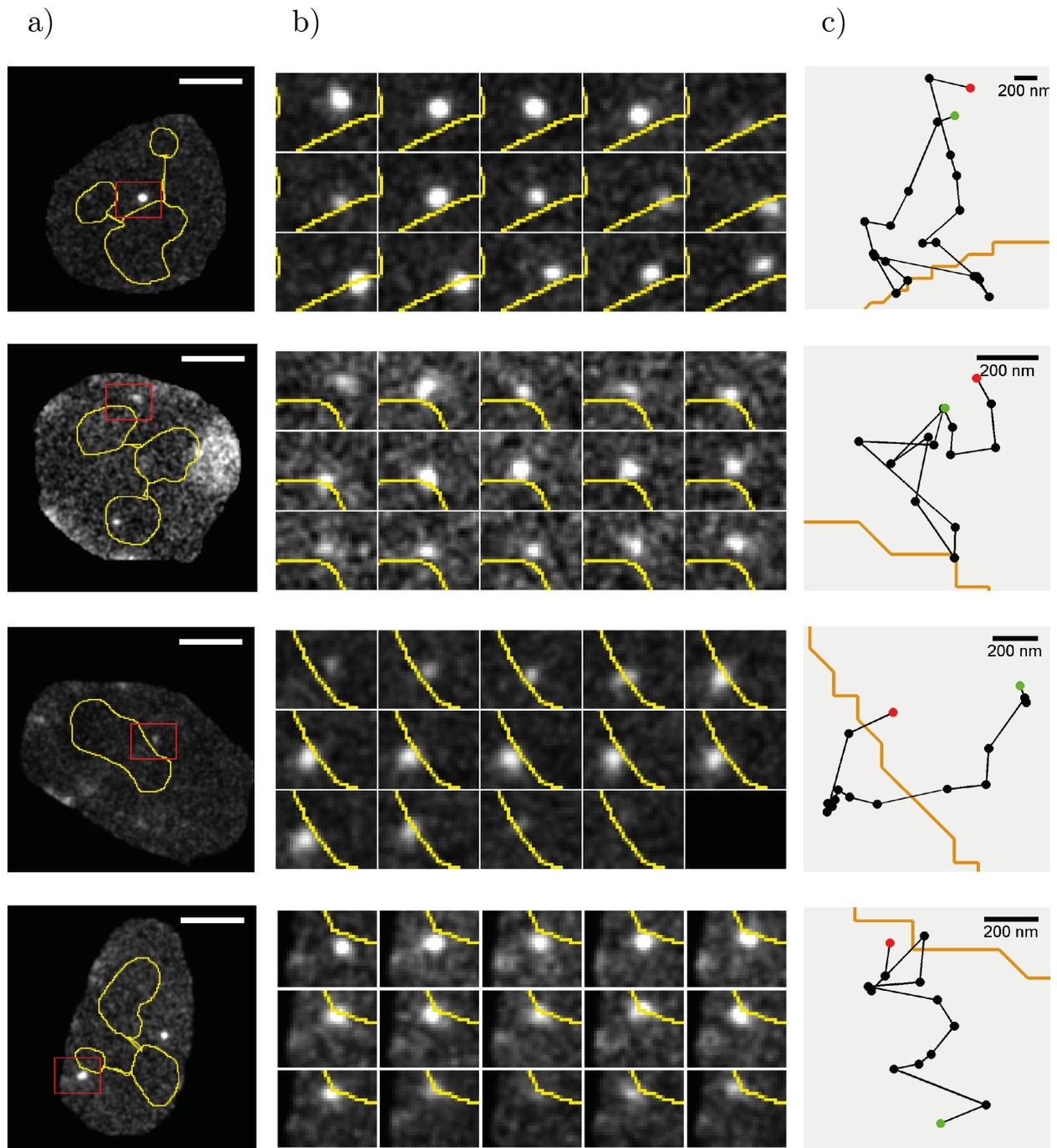


Abbildung 4.20: Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Umkehr“. a) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2 im gesamten Zellkern. In gelb sind die Umrisse der Nucleoli dargestellt, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . b) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils 12,6 ms. Die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in gelb dargestellt. c) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Nucleoplasma-Nucleolus-Grenze ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

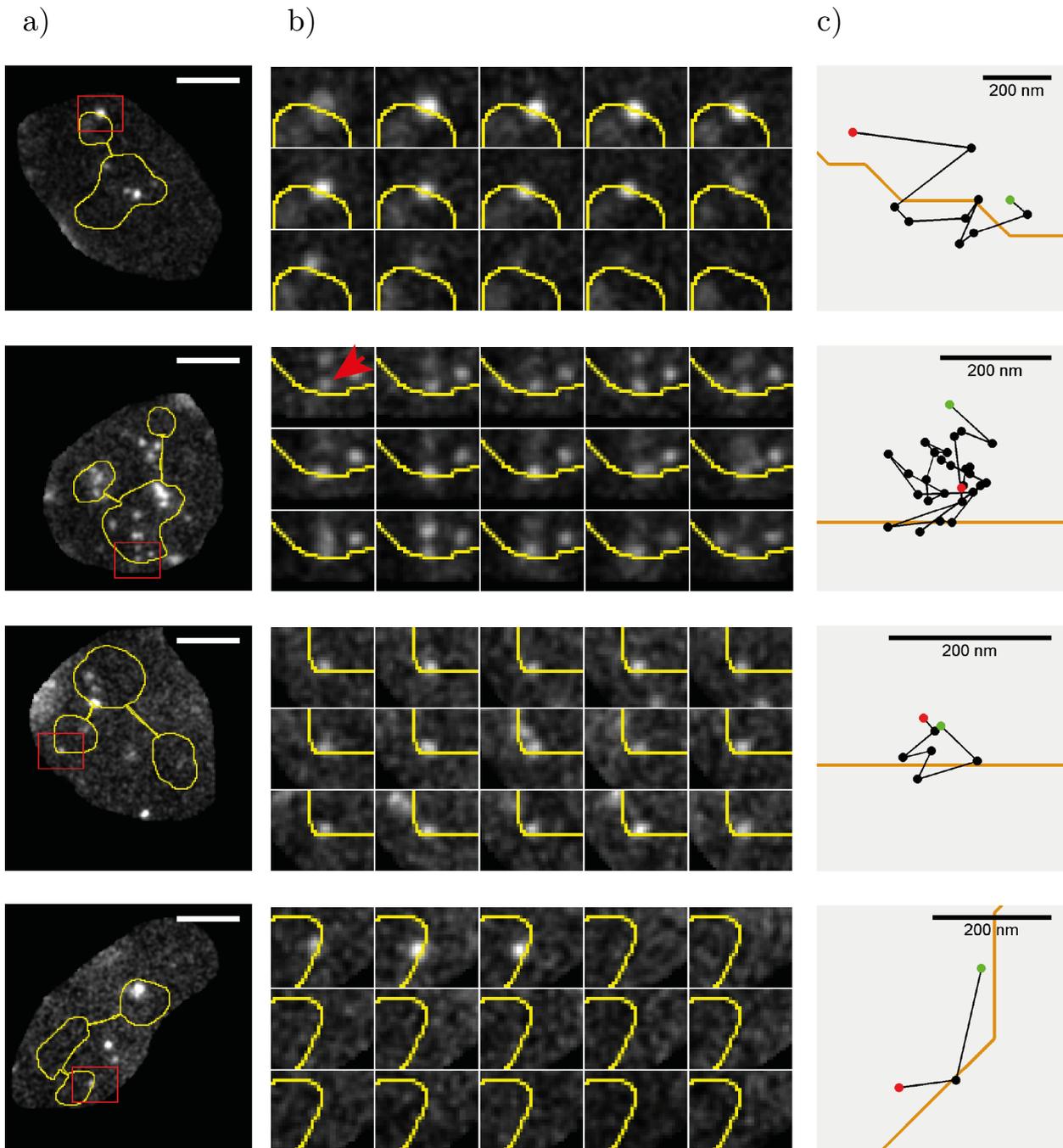


Abbildung 4.21: Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Grenze“. a) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2 im gesamten Zellkern. In gelb sind die Umrisse der Nukleoli dargestellt, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b). Der Maßstabsbalken entspricht $5\ \mu\text{m}$. b) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils $12,6\ \text{ms}$. Die Nukleoplasma-Nukleolus-Grenze ist in gelb dargestellt. c) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Nukleoplasma-Nukleolus-Grenze ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

4.5 Export der ribosomalen Untereinheit 40S

4.5.1 Abschätzung der Exportraten

Um einschätzen zu können, mit welcher Frequenz Exportereignisse durch den NPC *in vivo* in HeLa-Zellen beobachtet werden können, wurde eine Abschätzung der Exportraten vorgenommen. Hierzu war die Annahme unterschiedlicher Parameter notwendig:

Als erstes stellt sich die Frage, wieviele pre-40S-Partikel zum Export zur Verfügung stehen. Eine Säugerzelle benötigt in 24 Stunden etwa 8 – 10 Millionen neue rRNA-Transkripte, um eine gleichbleibende Anzahl an Ribosomen zu gewährleisten [Goodfellow und Zomerdijs, 2013]. Da keine Anreicherung von rRNA im Zellkern zu beobachten ist, ist davon auszugehen, dass alle abgelesenen Transkripte auch kontinuierlich exportiert werden, was in einer Exportrate von 116 Transkripten pro Sekunde resultiert.

Weiter ist bekannt, dass HeLa-Zellen etwa 3200 Poren in der Kernhülle besitzen, mit einer Dichte von ca. 5 Poren pro μm^2 . [Kubitschek et al., 1996, Maul et al., 1972, Ori et al., 2013, Ribbeck und Görlich, 2001]. Damit kann nun der Anteil beobachtbarer Poren im Sichtfeld abgeschätzt werden. Da die Messungen am Äquator stattfanden, wurde als Modell die Mantelfläche eines ellipsoiden Zylinders berechnet, welcher sich nach $M = U \cdot h$ mit U = Umfang und h = Höhe berechnet. Zum Berechnen des Umfangs wurde als durchschnittliche Kerngröße 16 μm Länge und 12,8 μm Breite zugrunde gelegt [Ribbeck und Görlich, 2001]. Da für den Umfang einer Ellipse keine exakte Lösung bekannt ist, wurde die Näherung nach Ramanujan verwendet, was einen Umfang von 45,4 μm ergibt. Die beobachtbare Schichtdicke wurde als etwa 400 nm angenommen, was etwa 91 Poren (2,8 %) im Sichtfeld entspricht.

Wenn nun alle kleinen Untereinheiten angefärbt wären, würde man theoretisch 3 Exporte/Sekunde beobachten können. Um jedoch Einzelmoleküluntersuchungen durchführen zu können, liegt der Markierungsgrad deutlich niedriger. Wenn man – analog zu [Siebrasse et al., 2012] – von einem Markierungsgrad von 1 ‰ ausgeht, würde man im Durchschnitt einen Export in etwa 5 Minuten beobachten können.

4.5.2 Äquatoriale Untersuchungen

Bei den äquatorialen Untersuchungen zum Export der kleinen ribosomalen Vorläufer-Untereinheit wurde die Beobachtungsebene aus den Messungen der intranukleären Mobilität von Dim2 beibehalten. Es wurde jedoch im blauen Kanal die Kernhülle abgebildet, die Position der Nukleoli in diesen Aufnahmen ist unbekannt. Die Kernmembran wurde dabei durch Mikroinjektion von tc-NTF2-AF488 angefärbt. Es wurden zunächst 50 Bilder der Membran im blauen Kanal aufgenommen, bevor anschließend zum roten Kanal gewechselt wurde. Um die Lage und den Verlauf der Membran automatisiert zu finden und eventuell kolokalisierte Untereinheiten zu identifizieren, wurden von Dr. Jan-Peter Siebrasse geschriebene Bildanalyseprogramme verwendet.

4.5.2.1 Lokalisieren der Kernmembran

Der Membranverlauf wurde automatisiert rekonstruiert (Kapitel 3.3.3). Es wurde jedoch deutlich, dass die Qualität der Rohdaten nicht ausreichte, um die Membranposition über Gaußanpassungen genauer zu lokalisieren. In Abbildung 4.22 ist die Mittelwert-Projektion einer Zelle exemplarisch gezeigt. Es wird zum einen deutlich, dass die Qualität der Membranfärbung entlang der Membran unterschiedlich gut ist und auch mit der Ausrichtung des Lichtblatts korreliert. Zum anderen zeigte sich, dass mit den vorhandenen Daten keine Gaußanpassung an die Intensitätsverteilung erreicht werden kann, mit der eine ausreichend gute Lokalisierung der Membran möglich ist. Die σ - und FWHM-Werte der einzelnen Anpassungen sind ebenfalls Abbildung 4.22 zu entnehmen.

Zur weiteren Auswertung wurde daher das Abbild der Membran verwendet, das in Abbildung 3.10 c gezeigt wurde. Diese Membranmaske erstreckt sich meist über 3 – 5 Pixel, was einer Strecke von 320 – 530 nm entspricht. Diese Ausdehnung ist eher schmaler als die Werte, die mit der Gaußanpassung an die Intensitätsverteilung erreicht werden konnte. Dennoch ist die so gefundene wahrscheinliche Membranposition immer noch deutlich größer als die Höhe einer Kernpore. Dies stellte für die weiteren Auswertungen der Daten ein Hindernis dar, wie sich in den folgenden Abschnitten zeigen wird.

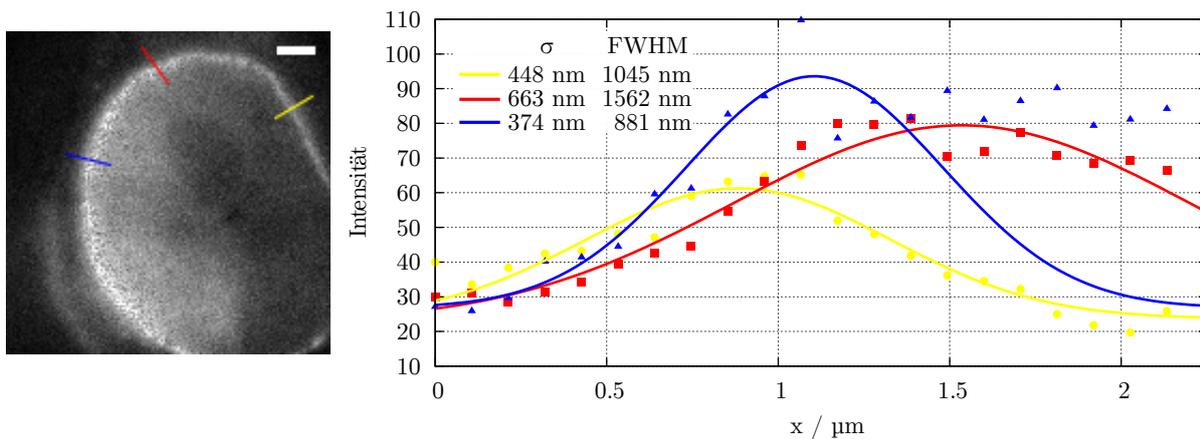


Abbildung 4.22: Gaußanpassungen an den Verlauf der Membranintensität. Gezeigt ist die Mittelwert-Projektionen der Membranfärbung. In der Abbildung wurden drei unterschiedliche Membranpositionen ausgewählt, diese sind in gelb, rot und blau markiert. Die Intensitätsverläufe entlang dieser Geraden wurden graphisch aufgetragen und eine Gaußanpassung an den Signalverlauf durchgeführt, auch diese sind zugehörig in gelb, rot und blau gezeigt. Es wird deutlich, dass die Qualität der Gaußanpassung stark von der Position entlang der Membran abhängt. Der Maßstabsbalken beträgt 2 μm .

4.5.2.2 Lokalisieren der ribosomalen Untereinheiten im Bereich Kernmembran

Für die Auswertung wurden 451 Filme aufgenommen, was einer Gesamtbeobachtungszeit der markierten pre-40S-Untereinheiten von knapp 90 Minuten entspricht.

Die Filme wurden im Bereich der Membranmaske nach Intensitätsmaxima durchsucht (Kapitel 3.3.4). Diese Maxima werden durch ribosomale Untereinheiten verursacht, die sich für mehrere Bilder im Membranbereich aufgehalten haben. Anschließend wurden die von ImageJ gefundenen Intensitätsereignisse einzeln manuell durchgesehen und visuell beurteilt.

In 155 Filmen wurde kein Intensitätsereignis im von ImageJ definierten ROI gefunden, was die Anzahl der auszuwertenden Filme auf 296 reduzierte. In diesen wurden insgesamt 1023 mögliche Ereignisse identifiziert. In 57 Filmen konnten die Ereignisse nicht klar einem definierten Partikel zugeordnet werden, diese wurden nicht weiter betrachtet. Dies reduzierte die Anzahl an Ereignissen, die noch zur statistischen Auswertung zur Verfügung standen, auf 500. Diese sollten anschließend manuell in Kategorien sortiert werden, die sich an [Siebrasse et al., 2012] orientierten. Die Sortierung erwies sich jedoch als sehr schwierig und häufig uneindeutig, sodass auch hier eine automatisierte Auswertung gewählt wurde.

4.5.3 Äquatoriale Untersuchungen mit automatisierter Auswertung

Für diese automatisierte Auswertung wurde für die 296 Filme, in denen Intensitätsmaxima an der Membran gefunden worden waren, eine Einzelpartikelverfolgung durchgeführt. Zur weiteren Kategorisierung der gefundenen Trajektorien wurde ein Matlab-Skript programmiert.

Dieses Skript bedarf dreier Informationsquellen. Zum einen wurden die Trajektorien der Partikel benötigt, zum anderen wurde die in ImageJ gefundene wahrscheinliche Membranposition als Bitmaske eingelesen. Als dritte Information wurde die Trennung von Nukleoplasma und Zytoplasma benötigt, welche durch ein geschlossenes Polygon-ROI entlang des Membranverlaufs realisiert wurde. Mit diesen drei Informationen war nun eine automatisierte Kategorisierung der Trajektorien in 9 Kategorien möglich. Diese sind in Abbildung 4.23 gezeigt und umfassten:

- Membran (M): keine Position der Trajektorie befindet sich außerhalb der Membranverlaufsmaske (Abbildung 4.25 a, b, c)
 - Zytoplastisch (Z): die Trajektorie startet im Zytoplasma und endet innerhalb der Membranmaske (Abbildung 4.26 a, b, c)
 - Zytoplastischer Kontakt (ZK): Die Trajektorie kommt aus dem Zytoplasma, hat mindestens eine Position innerhalb der Membranmaske und läuft anschließend zurück ins Zytoplasma (Abbildung 4.26 d, e, f)
 - Membran-Zytoplastisch (MZ): der Startpunkt der Trajektorie liegt in der Membranmaske, der Endpunkt befindet sich im Zytosol (Abbildung 4.27 a, b, c)
 - Membran-Nukleoplastisch (MN): der Startpunkt der Trajektorie liegt in der Membranmaske, der Endpunkt befindet sich jedoch im Nukleoplasma (Abbildung 4.27 d, e, f)
 - Nukleoplastischer Versuch (NV): Start- und Endpunkt der Trajektorie liegen im Nukleoplasma, dazwischen gibt es jedoch mindestens eine Position innerhalb der Membranmaske (Abbildung 4.28 a, b, c)
 - Nukleoplastisch (N): die Trajektorie beginnt im Nukleoplasma und endet innerhalb der Membranmaske (Abbildung 4.28 d, e, f)
-

- Export (E): die Trajektorie startet im Nukleoplasma, hat mindestens eine Position innerhalb der Membranmaske und endet auf der zytoplasmatischen Seite
- Import (I): der Startpunkt der Trajektorie liegt im Zytoplasma, es gibt mindestens eine Position innerhalb der Membranmaske und die Trajektorie endet im Nukleoplasma

Von den neun Kategorien wurden jedoch nur zu sieben auch Beispiele gefunden, die Kategorien „Import“ sowie „Export“ blieben leer. Die sortierten Trajektorien verteilten sich auf die Kategorien wie in Abbildung 4.24 gezeigt.

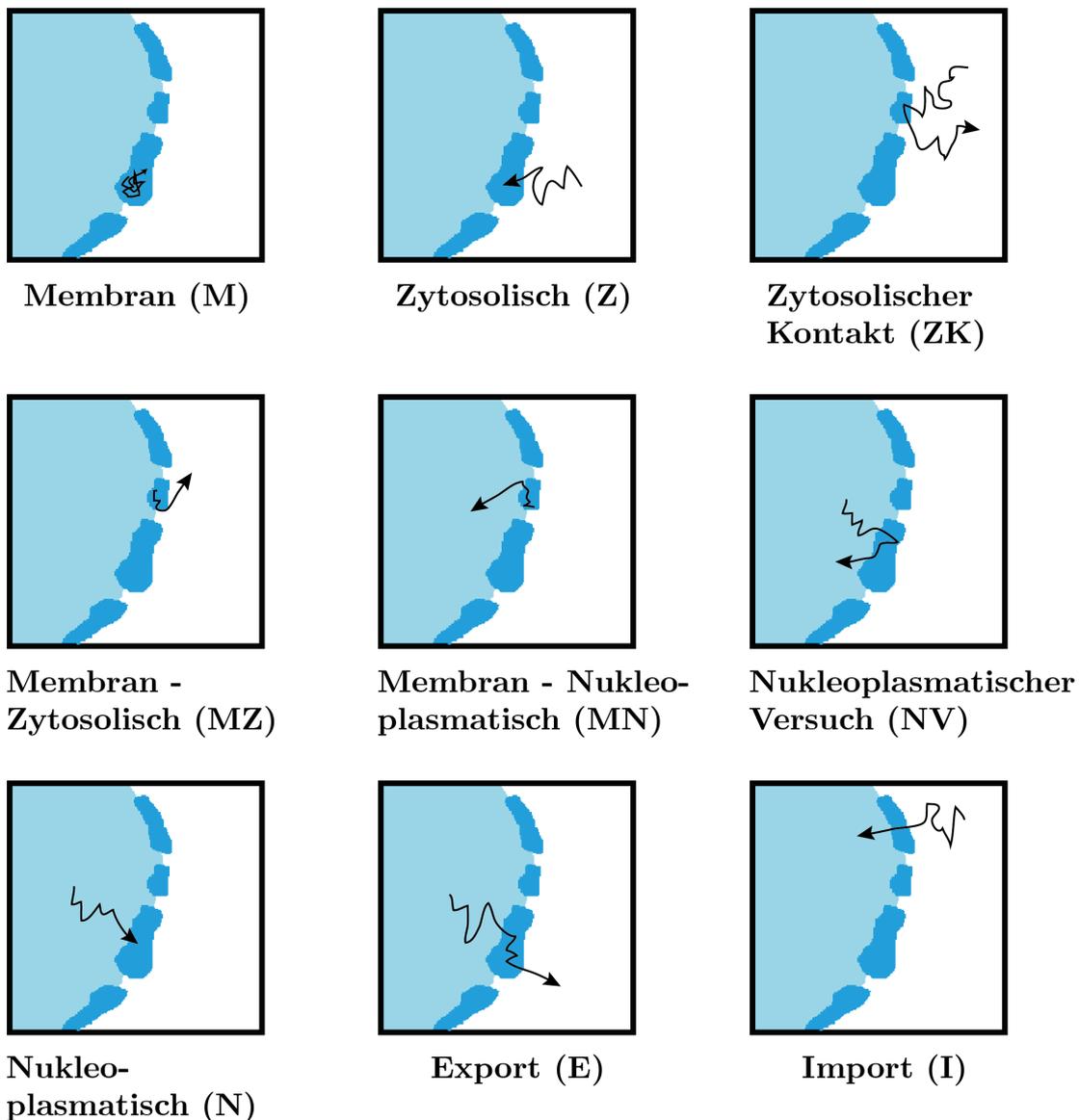


Abbildung 4.23: Kategorieneinteilung zur automatisierten Sortierung der gefundenen Trajektorien, die sich im Bereich der Kernhülle aufhalten.

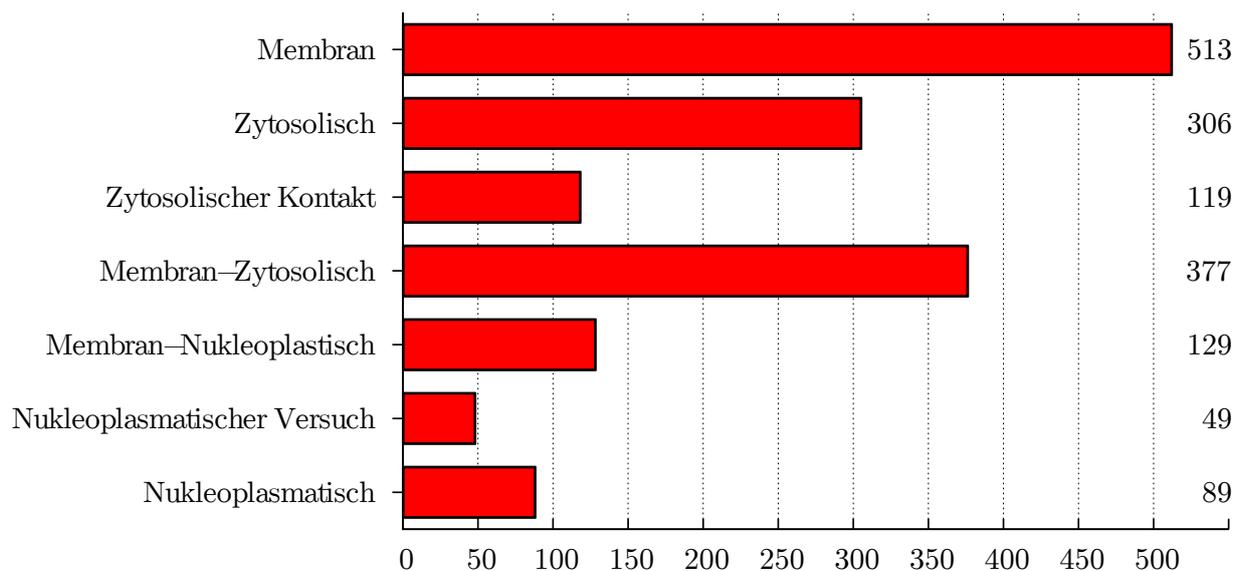


Abbildung 4.24: Häufigkeit der Trajektorien in den einzelnen Kategorien.

Kategorie Membran (M)

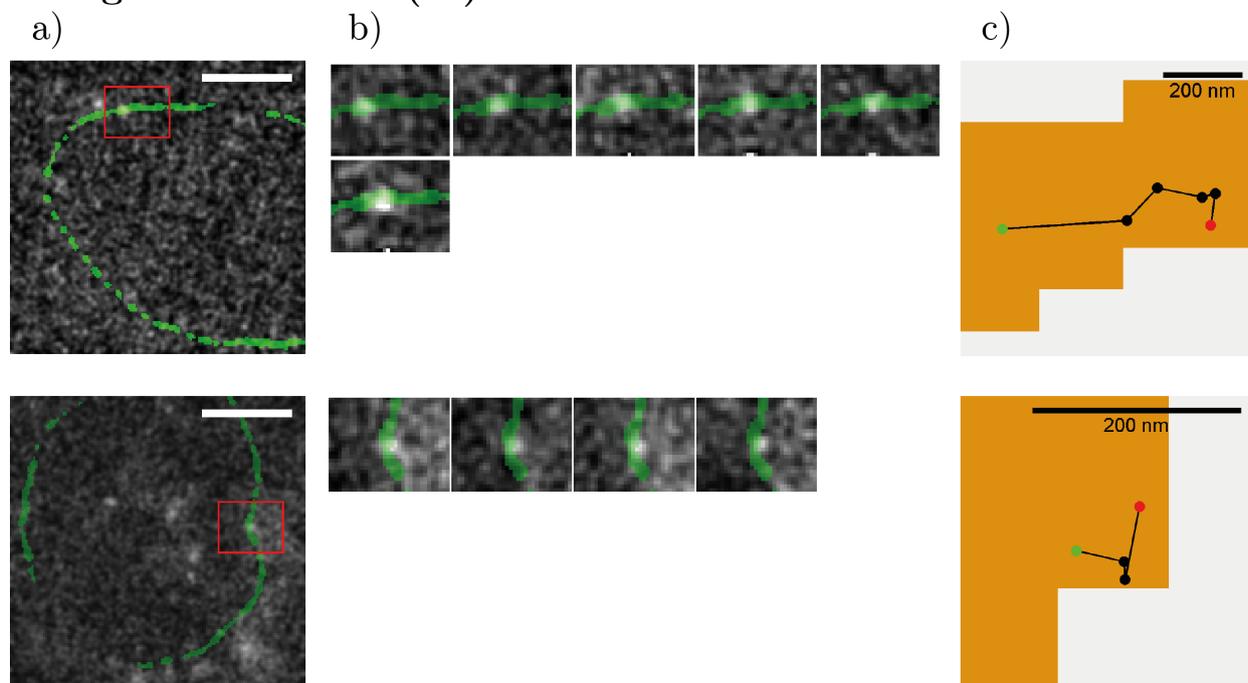
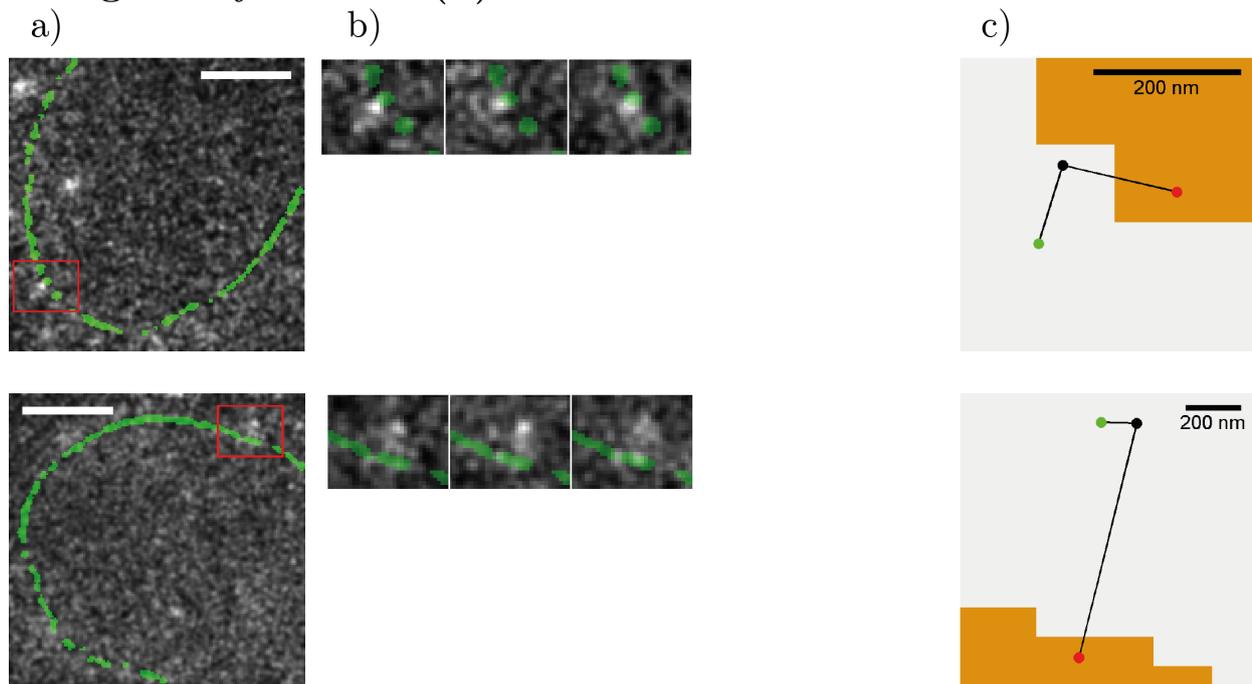


Abbildung 4.25: Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Membran“. a) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2. In grün gezeigt ist die Membranmaske, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b. Der Maßstabsbalken entspricht $5\ \mu\text{m}$. b) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils $12,6\ \text{ms}$. Der Verlauf der Membranmaske ist in grün gezeigt. c) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Membranmaske ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

Kategorie Zytosolisch (Z)



Kategorie Zytoplasmatischer Kontakt (ZK)

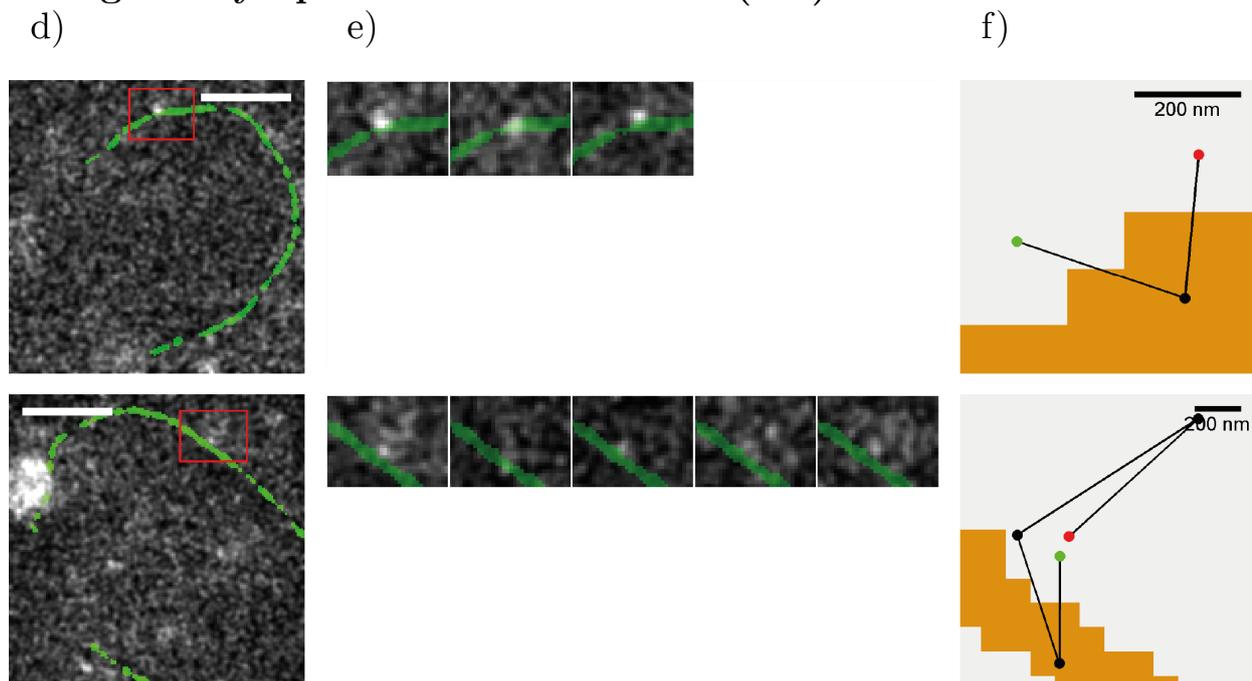
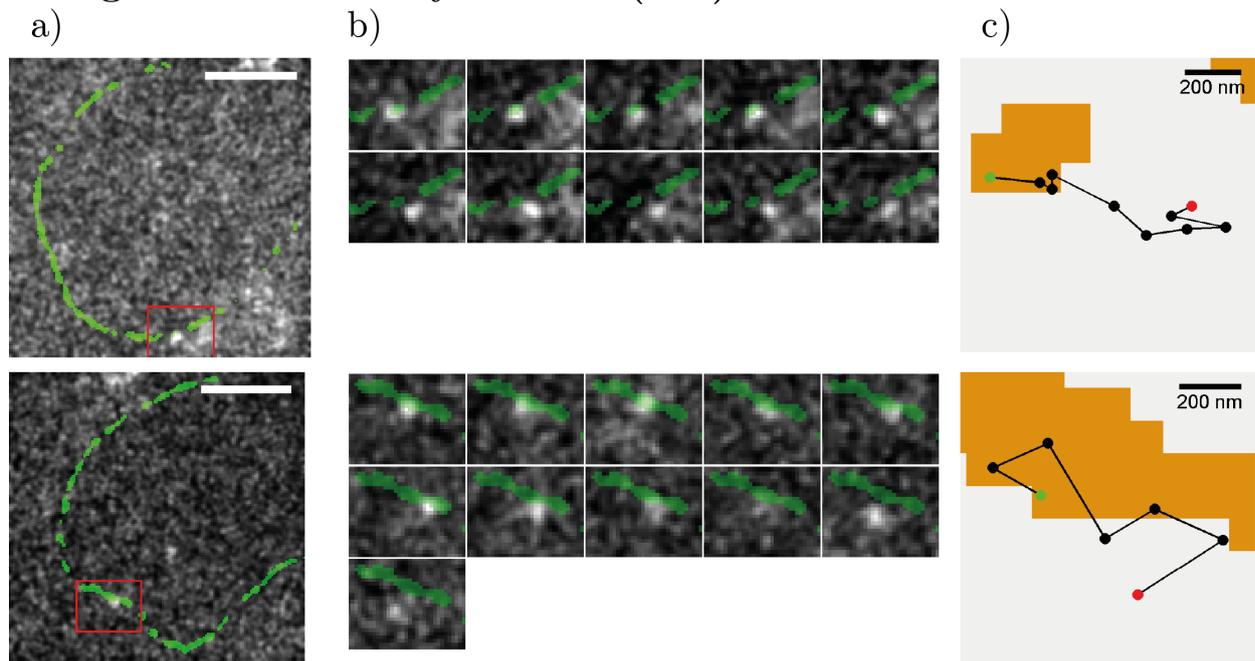


Abbildung 4.26: Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „Z“ und „ZK“. a/d) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2. In grün gezeigt ist die Membranmaske, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b/d. Der Maßstabsbalken entspricht $5 \mu\text{m}$. b/d) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils $12,6 \text{ ms}$. Der Verlauf der Membranmaske ist in grün gezeigt. c/f) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Membranmaske ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

Kategorie Membran-Zytosolisch (MZ)



Kategorie Membran-Nukleoplasmatisch (MN)

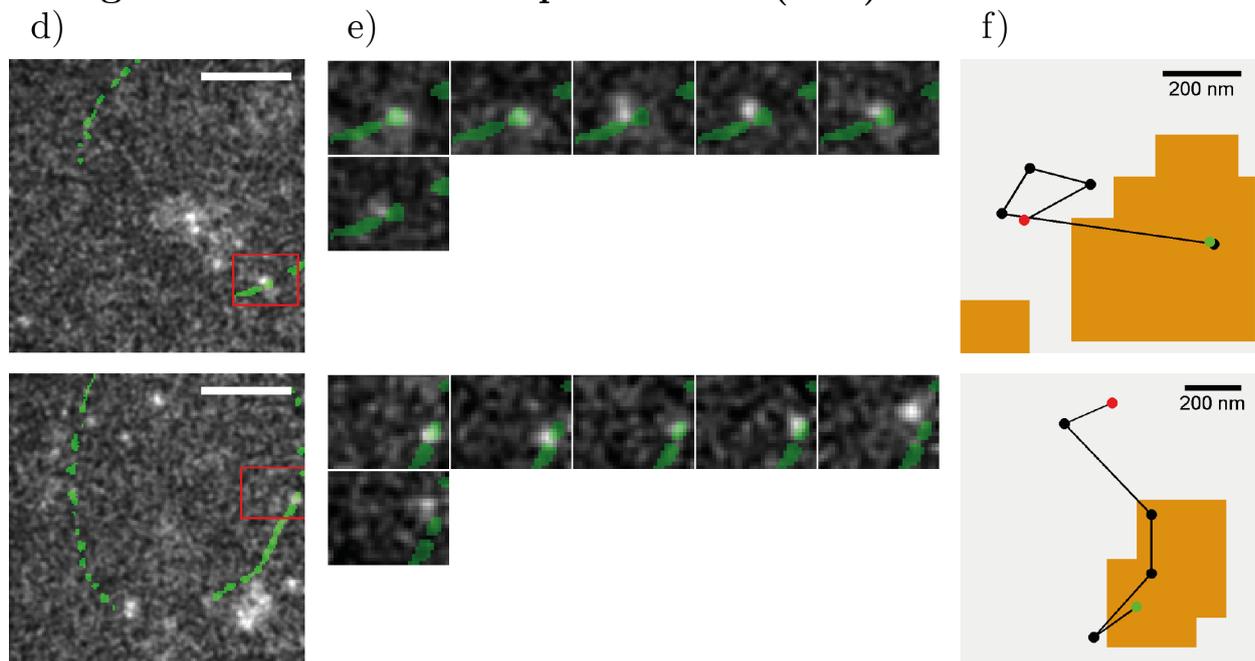
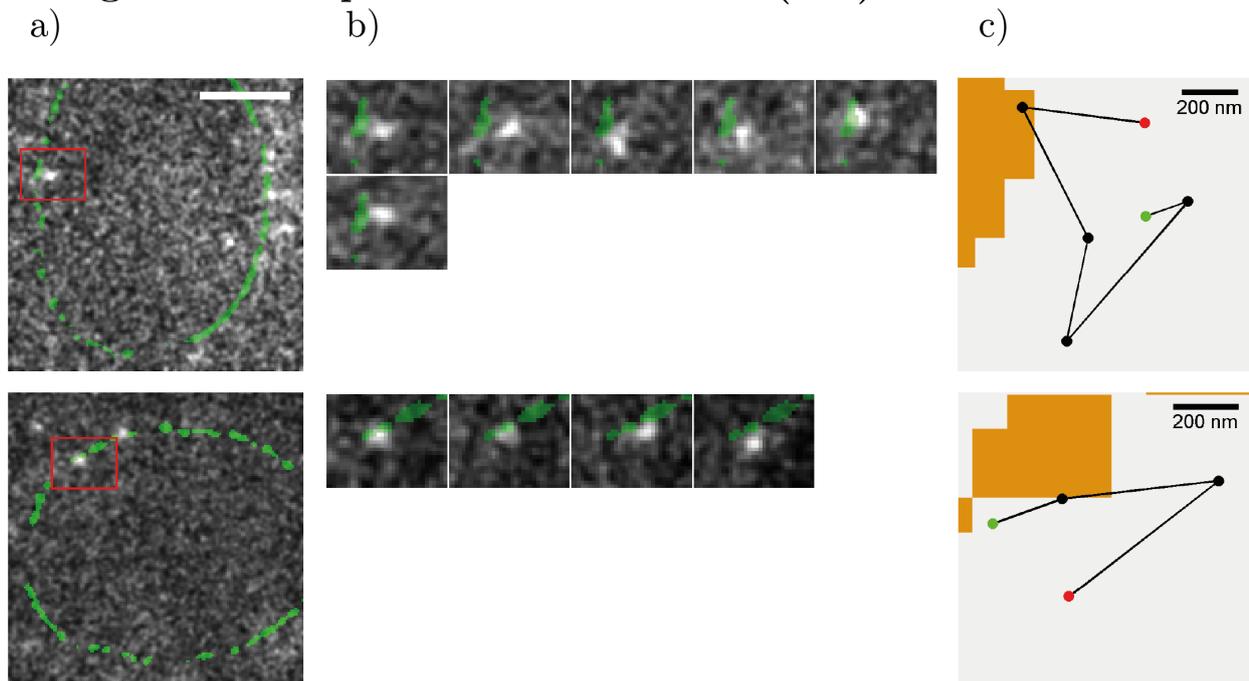


Abbildung 4.27: Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „MZ“ und „MN“. a/d) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2. In grün gezeigt ist die Membranmaske, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b/d. Der Maßstabsbalken entspricht $5\ \mu\text{m}$. b/d) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils $12,6\ \text{ms}$. Der Verlauf der Membranmaske ist in grün gezeigt. c/f) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Membranmaske ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

Kategorie Nukleoplasmatischer Versuch (NV)



Kategorie Nukleoplasmatisch (N)

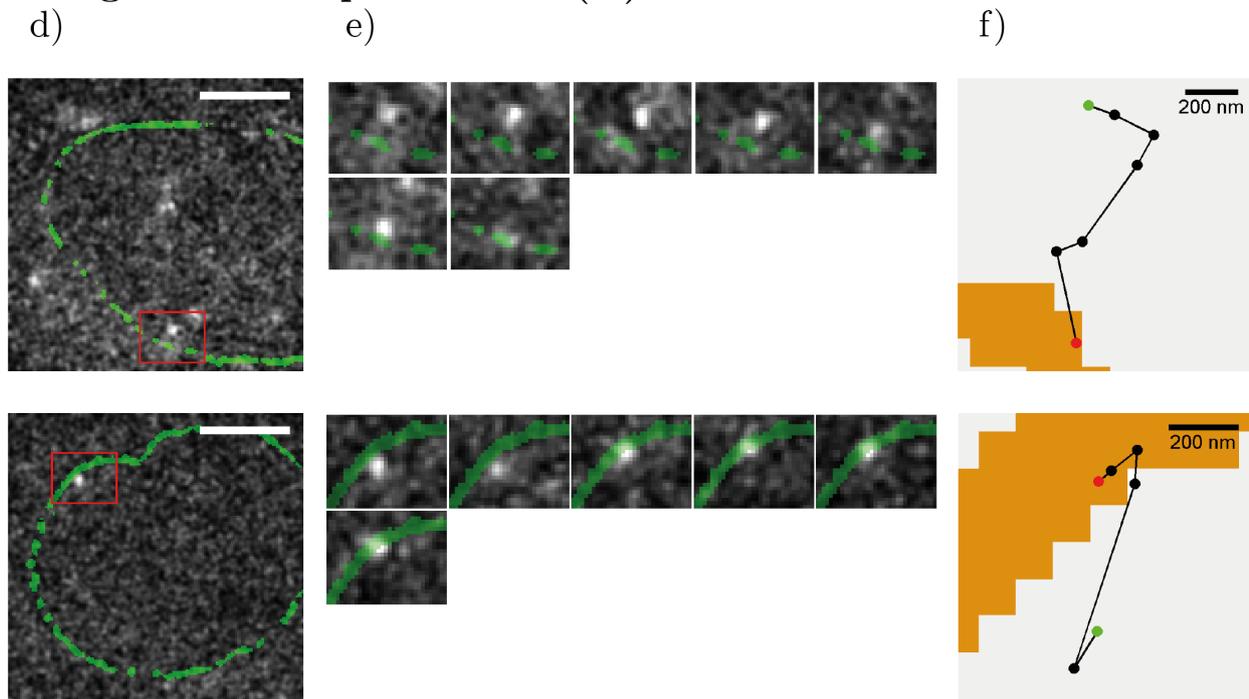


Abbildung 4.28: Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „NV“ und „N“. a/d) Einzelmolekülaufnahmen von SiR-Snap-Dim2. In grün gezeigt ist die Membranmaske, der rote Umriss entspricht dem gezeigten vergrößerten Ausschnitt in b/d. Der Maßstabsbalken entspricht 5 μm . b/d) Einzelaufnahmen des Partikels mit einem Zeitintervall von jeweils 12,6 ms. Der Verlauf der Membranmaske ist in grün gezeigt. c/f) Trajektorienverlauf der Nanolokalisierung, die Membranmaske ist in orange dargestellt. Der grüne Punkt kennzeichnet den Trajektorienbeginn, der rote Punkt das Trajektorienende.

4.5.3.1 Analyse ausgewählter Kategorien

Auffällig ist, dass mit 51 % der größte Teil der Trajektorien einen Bezug zum Zytoplasma hat, sich also in den Kategorien Zytoplasmatisch, Zytoplasmatischer Versuch oder Membran-Zytoplasma befindet. Trajektorien, die eine eindeutige Position im Nukleoplasma haben, fallen in die Kategorien Nukleoplasmatisch, Nukleoplasmatischer Versuch und Membran-Nukleoplasmatisch und machen nur 17 % aller gefundenen Ereignisse aus. Die verbleibenden 32 % stellt die Kategorie Membran, die keine Trajektorienposition außerhalb der Membranmaske haben.

Aufgrund der hohen Anzahl an Signalen im Zytoplasma und der Abschätzung der Exportwahrscheinlichkeit (Abschnitt 4.5.1) wurde angenommen, dass Exportprozesse stattfinden, diese jedoch aufgrund der schlechten Membranlokalisierung nicht identifiziert werden konnten. Daher sollen im Folgenden einzelne Kategorien oder Gruppen von Kategorien analysiert werden, um Rückschlüsse auf die Mobilität der pre-40S-Untereinheit in der Nähe der Kernmembran zu gewinnen.

Zum einen bietet sich ein Blick auf die Kategorien NV und ZK an. Hierbei handelt es sich um Ereignisse, die keinesfalls einen Kompartimentübertritt vollzogen haben. Diese eindeutigen Trajektorien sollten daher zuerst einzeln betrachtet werden. Aus den Verweilzeiten an der Membran wurden analog zu [Siebrasse et al., 2012] die Zeitkonstanten τ der Interaktion bestimmt. Die Verweilzeit wurde bestimmt, indem die Länge der Trajektoriensequenz verwendet wurde, bei der sich die Positionen innerhalb der Membransequenz befinden. Aufgrund der Lokalisierungsschwierigkeiten des genauen Membranverlaufs wurde ein einmaliger Schritt nach außen ignoriert und die Verweilzeit des Gesamt ereignisses zur Auswertung verwendet.

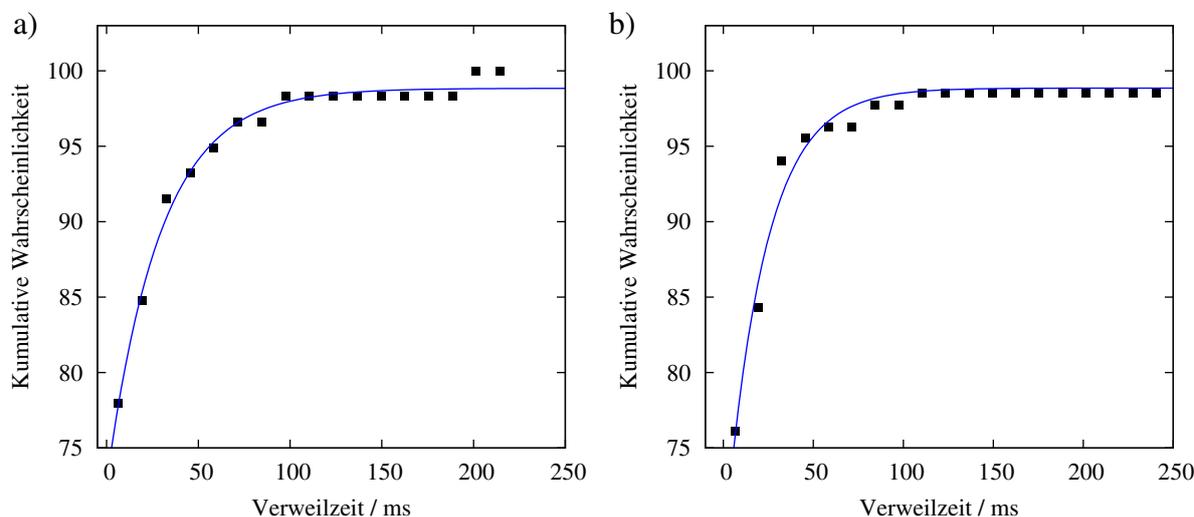


Abbildung 4.29: Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten innerhalb der Membranmaske in den Kategorien a) „NV“ und b) „ZK“. Die Anpassung mit einer einfachen Exponentialfunktion war erfolgreich und lieferte die Zeitkonstanten $\tau_{NV} = 29$ ms und $\tau_{ZK} = 22$ ms.

Zum Bestimmen der Zeitkonstanten des Kernhüllenkontakts wurden die kumulativen Häufigkeiten der gefundenen Ereignisanzahl gegen die beobachtete Zeit aufgetragen und eine Exponentialfunktion an diese Verteilung angepasst. Die Auftragung für die Kategorie NV ist in Abbildung 4.29 a gezeigt und umfasst 49 Trajektorien, die Kategorie ZK mit 119 Trajektorien findet sich in Abbil-

dung 4.29 b. Zur Beschreibung mit einer Exponentialfunktion war in beiden Fällen eine einfache Exponentialfunktion ausreichend. Beide Zeitkonstanten τ weisen auf kurze Interaktionszeiten hin. Für die nukleoplasmatische Seite ergab sich $\tau_{NV} = (29 \pm 2)$ ms, auf zytosolischer Seite wurde $\tau_{ZK} = (22 \pm 1)$ ms gefunden.

Anschließend wurden Kategorien zusammengefasst, in denen sich nicht eindeutig zu identifizierende Exportereignisse befinden können. Aufgrund der mangelnden Lokalisierungsgenauigkeit der Kernhülle kommen hierfür die Kategorien M, MZ und N infrage, also die Kategorien, die einen Teilschritt eines möglichen Exportes abbilden könnten. In diesen drei Kategorien befinden sich 979, also 62 %, der Trajektorien. Die Membranverweilzeiten dieser drei Kategorien wurden gebündelt und gemeinsam analysiert. Diese ist in Abbildung 4.30 a gezeigt. Hier zeigte sich, dass eine Anpassung mit einer einfachen Exponentialfunktion nicht mehr ausreicht, um eine gute Beschreibung der Daten zu realisieren. Daher wurde hier eine Anpassung mit einer Doppelsexponentialfunktion durchgeführt, die somit auch zwei Zeitkonstanten liefert. Diese konnten zu $\tau_{E,1} = (15 \pm 0,3)$ ms mit einem Anteil von 82 % und zu $\tau_{E,2} = (65 \pm 3)$ ms mit einem Anteil von 18 % bestimmt werden.

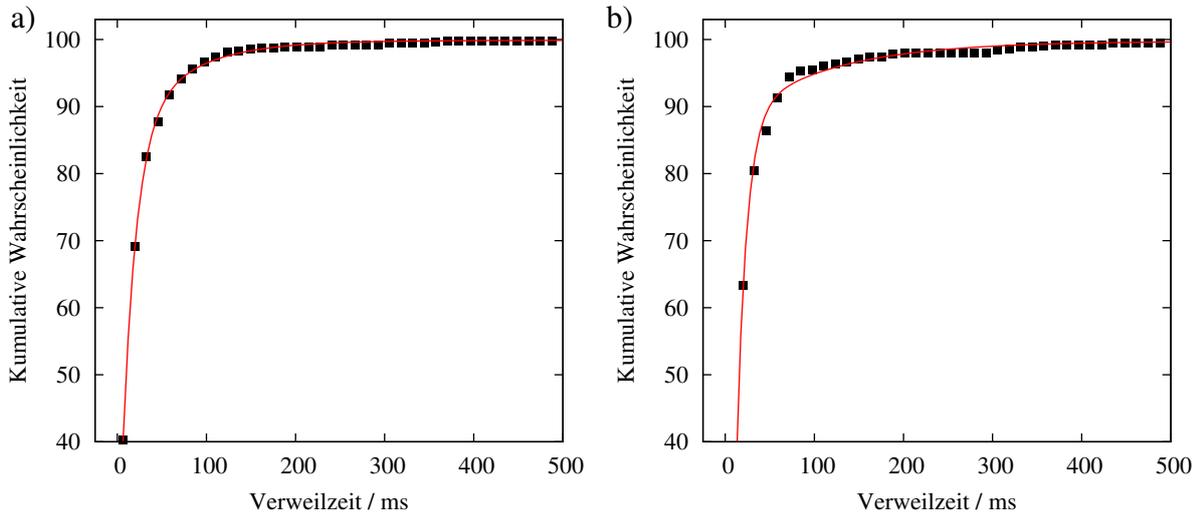


Abbildung 4.30: Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten innerhalb der Membranmaske. a) Verteilung in den gebündelten Kategorien „M“, „MZ“ und „N“. Die Anpassung mit einer Doppelsexponentialfunktion war erfolgreich und lieferte die Zeitkonstanten $\tau_{E,1} = 15$ ms und $\tau_{E,2} = 65$ ms. b) Verteilung der Kategorie „M“. Die Anpassung mit einer Doppelsexponentialfunktion war erfolgreich und lieferte die Zeitkonstanten $\tau_{E,1} = 11$ ms und $\tau_{E,2} = 106$ ms.

Da mit 32 % fast ein Drittel aller gefundenen Trajektorien in die Kategorie M fiel, wurde diese zusätzlich noch separat analysiert. Auch hier wurde zur Beschreibung der Daten die Anpassung einer Doppelsexponentialfunktion nötig. Diese ist in Abbildung 4.30 b gezeigt. Die Zeitkonstanten dieser Anpassung waren $\tau_{M,1} = (11 \pm 0,2)$ ms mit einem Anteil von 93 % und $\tau_{M,2} = (106 \pm 6)$ ms mit einem Anteil von 7 %.

Die Kategorien Z und MN wurden nicht näher betrachtet, da die darunter liegenden Ereignisse nicht von zentraler Bedeutung für die Fragestellung waren.

4.5.4 Axiale Untersuchungen

Da in den äquatorialen Untersuchungen kein Exportereignis beobachtet werden konnte, sollte eine weitere Versuchsreihe durchgeführt werden. Ein großes Problem bei den Aufnahmen am Äquator der Kernhülle war, den exakten Membranverlauf aus den Daten zu extrahieren. Durch das Verschieben des Fokus vom Membranäquator auf den Boden der Zelle sollte es möglich sein, die Position der einzelnen Kernporen in der Kernhülle exakt zu bestimmen. Da die Kernhülle am Boden abgeflacht ist, verläuft diese nun als Auflagefläche parallel zur Fokusebene. Eine Exporttrajektorie liegt nun jedoch nicht mehr in der Fokusebene, sondern verläuft senkrecht zur Fokusebene. Eine Molekülbewegung in axialer Richtung zu verfolgen, stellt aufgrund der symmetrischen PFS ein Problem dar. Es ist aus dem Abbild des Partikels auf der Kamera nicht festzustellen, ob sich ein Partikel nach oben oder unten aus der Fokusebene entfernt hat. Eine Möglichkeit, die Information der Partikelhöhe mit einer Messgröße zu verknüpfen liegt darin, die eigentlich symmetrische PSF asymmetrisch zu gestalten. Hierzu wurde die in Kapitel 3.3.7 vorgestellte Methode der astigmatischen PSF-Verzerrung angewandt. Damit ist eine Rekonstruktion der Höhe relativ zur Fokusebene möglich, sofern bekannt ist, wie genau sich die Asymmetrie der PSF auf das Abbild auswirkt.

Die Bearbeitung dieses neuen Ansatzes erfolgte in mehreren Stufen. Zuerst wurde die Machbarkeit mit dem vorhandenen Mikroskopaufbau geprüft, indem TetraSpecks mit einer Größe von $0,5 \mu\text{m}$ auf Deckgläsern immobilisiert wurden. Anschließend erfolgten weitere Tests mit kleineren, nur $0,1 \mu\text{m}$ großen TetraSpecks in Agarose, um die Verwertbarkeit der Daten von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze zu untersuchen. Daran schlossen sich Versuche mit SiR-Snap-gefärbtem Dim2 *in vivo* an.

4.5.4.1 Lokalisierungsgenauigkeit in den drei Raumrichtungen auf Basis von auf dem Deckglas immobilisierten TetraSpecks

Die erste wichtige Frage, die im Rahmen dieses Projekts zu beantworten war, war die Verlässlichkeit der aus der PSF-Verzerrung bestimmten Höhe. Um dies herauszufinden, wurden TetraSpecks mit einem Durchmesser von $0,5 \mu\text{m}$ in einer ibidi-Schale mit Poly-L-Lysin auf dem Deckglas immobilisiert und mit Wasser bedeckt. Anschließend wurde ein Kalibrationsdatensatz aufgenommen und ausgewertet (Kapitel 3.3.7.1). Die entsprechende Kalibrationsgerade des roten Kanals ist in Abbildung 4.31 gezeigt und besitzt eine Steigung von $-0,0037 \text{ nm}^{-1}$.

Mit dieser Kalibrationsgerade wurde nun eine Höhenbestimmung des Datensatzes durchgeführt, aus dem die Kalibrationsgerade berechnet wurde. Dies hat den Vorteil, dass die Position der einzelnen Beads in jedem Bild zum einen gleich, und zum anderen bekannt ist - immer um 50 nm zum letzten Bild versetzt. Aus diesen Daten wurde anschließend eine Lokalisierungsgenauigkeit bestimmt, indem eine Gaußanpassung über die Abweichung eines jeden einzelnen Punktes von seiner theoretischen Position gelegt wurde. Deutlich zu sehen sind die Ausreißer der Rekonstruktion für große $|z|$ -Werte. Von diesen wenigen Datenpunkten abgesehen zeigten die Abweichungen das klassische Profil einer Gaußkurve (Abbildung 4.32). Das σ der Anpassung beträgt 31 nm , das FWHM 72 nm . Mit diesen Werten sollte eine Kernporenlokalisierung gut möglich sein, sodass ein weiterer Test zum geplanten Versuch erfolgte.

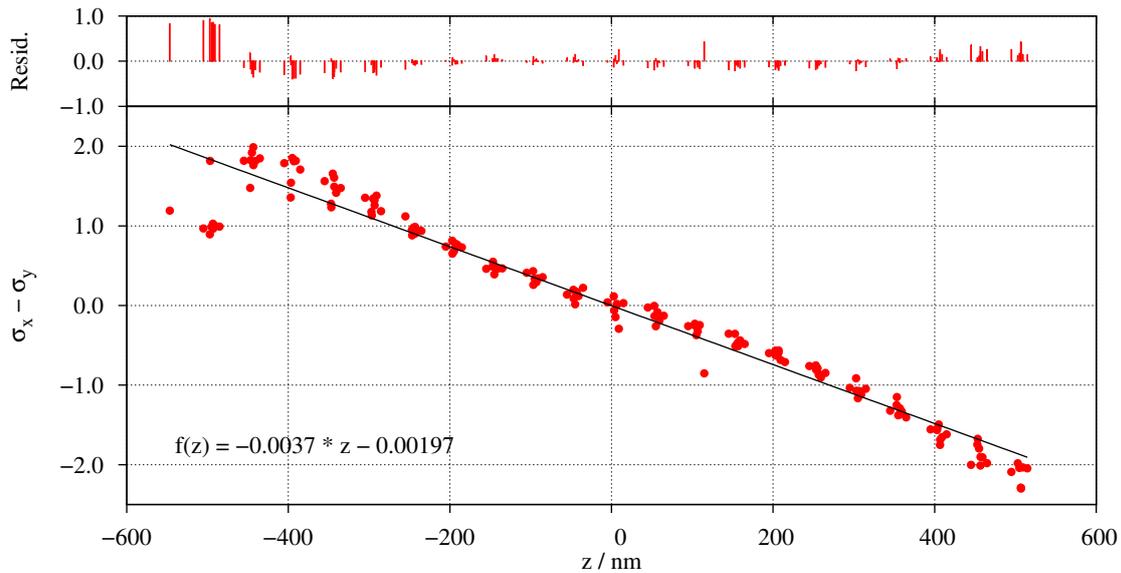


Abbildung 4.31: Kalibrationsgerade des roten Kanals von TetraSpecks einer Größe von $0,5 \mu\text{m}$, die auf einem Deckglas immobilisiert wurden.

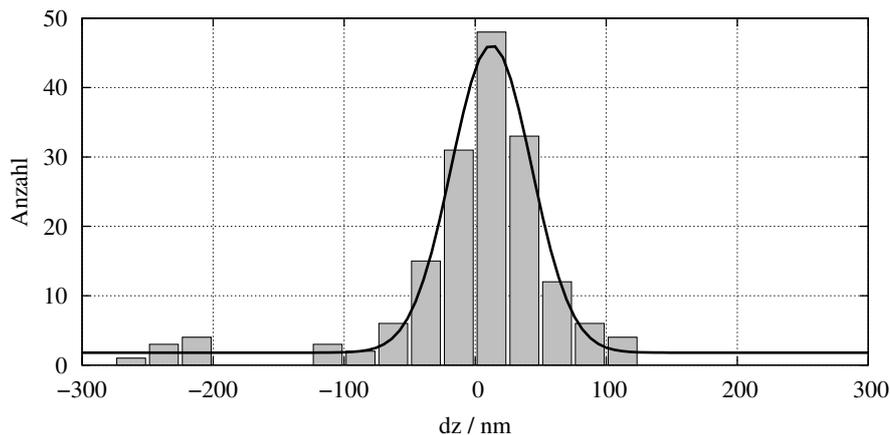


Abbildung 4.32: Abweichung der berechneten von der theoretischen Position. Die daran angepasste Gauß-Verteilung ergibt ein σ von 31 nm und ein FWHM von 72 nm .

4.5.4.2 Bestimmen der Kalibrationsgeraden bei Verwendung von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze

Um einen besseren Eindruck davon zu erhalten, wie gut die Lokalisierungsgenauigkeit bei den geplanten *in vivo*-Experimenten ausfallen würde, wurden weitere Untersuchungen mit TetraSpecks durchgeführt. Für die neue Versuchsreihe wurden nun TetraSpecks mit einer Größe von $0,1 \mu\text{m}$ in Agarose fixiert. Dies hatte verschiedene Auswirkungen auf den Verlauf des Experiments. Zum einen bieten die kleineren TetraSpecks weniger Farbstoffe, was zu einem schlechteren SNR der Aufnahmen führt. Zum anderen zeigte sich, dass sich die Verzerrung von Beads, die sich nicht auf der Glasoberfläche befinden, deutlich anders gestaltet und wesentlich schlechter auswertbar ist. Weiterhin befinden sich nun nicht mehr alle TetraSpecks auf einer definierten Höhe, sondern

jedes Beads wird an einer zufälligen Position innerhalb des Agarosegels immobilisiert. All diese Änderungen hatten Auswirkungen auf die Auswertung und das Ergebnis dieser Untersuchung.

Die Aufnahmen für die Kalibrationsgeraden erfolgten mit TetraSpecks mit einem Durchmesser von $0,1 \mu\text{m}$, die in 1%iger Agarose eingebettet waren. Es wurde ein Bildstapel von 100 Bildern bei einer Schrittweite von 10 nm aufgenommen. Wie in Kapitel 3.3.7.1 beschrieben, war es nötig, jedes Bead einzeln zu betrachten. Für jedes Bead wurde durch Suchen des Minimums von $\sigma_x - \sigma_y$ dessen Nullpunkt bestimmt und nur die Positionen zum Anpassen der linearen Funktion verwendet, die sich in einem Bereich von (-400 bis +300) nm um den bestimmten Nullpunkt befanden. Anschließend wurden die gefundenen Positionen aller Beads auf ihren jeweiligen Nullpunkt verschoben. Durch die so korrigierten Höhen wurde nun eine neue Geradenanpassung gelegt, aus der die Kalibrationsgerade berechnet wurde.

Die Steigung der Gerade für den blauen Kanal betrug $-0,0016 \text{ nm}^{-1}$, die für den roten Kanal $-0,0012 \text{ nm}^{-1}$ (Abbildung 4.33). Im Vergleich mit Abbildung 4.31 fällt sofort auf, wie viel breiter die Streuung der einzelnen Positionen um die Ausgleichsgerade mit den kleineren TetraSpecks ist. Diese Kalibrationsgeraden wurden sowohl für weitere Charakterisierungsmessungen verwendet, als auch für die späteren *in vivo*-Experimente (Abschnitt 4.5.4.5).

4.5.4.3 Lokalisierungsgenauigkeit bei Verwendung von Partikeln unterhalb der Auflösungsgrenze

Die Lokalisierungsgenauigkeit wurde bestimmt, indem vier Filme mit einer Länge von jeweils 100 Bildern in rot sowie Filme mit demselben Fokus in blau aufgenommen wurden. Nun wurde für alle Filme die Position der Signale in jedem Bild bestimmt, wobei nur die Beads verwendet wurden, die sich innerhalb von ± 400 nm um den Nullpunkt der Kalibrationsgeraden befanden. Anschließend wurde der Mittelwert aller Positionen eines einzigen Beads bestimmt, sowie die Abweichung der einzelnen gefundenen Positionen von diesem Mittelwert. Über diese Verteilung wurde anschließend eine Gauß-Anpassung gelegt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.34 zu sehen. Die Lokalisierungsgenauigkeit im roten Kanal beträgt $\sigma_x = 7$ nm in x, sowie $\sigma_y = 12$ nm in y. Die Werte für die Anpassung an den blauen Kanal sind mit $\sigma_x = 6$ nm in x und $\sigma_y = 12$ nm in y sehr ähnlich.

Analog wurde auch eine Bestimmung der axialen Lokalisierungsgenauigkeit, bzw. deren Reproduzierbarkeit, gemacht. Die Lokalisierung in z stellte erheblich mehr Schwierigkeiten dar. Dies liegt daran, dass die elliptische Gaußanpassung, auf dem die Höhenbestimmung basiert, bereits durch das Rauschen eines Pixels erheblich verzerrt wird, jedoch unter Umständen nur in eine Richtung. Dadurch ändert sich der $\Delta\sigma$ -Wert erheblich, sodass eine falsche Höhe ausgelesen wird. Die Lokalisierungsgenauigkeit in z betrug in rot $\sigma_z = 85$ nm und in blau $\sigma_z = 65$ nm, die Gauß-Anpassung über die Abweichungen sind in Abbildung 4.34 gezeigt.

4.5.4.4 Chromatischer Fehler der axialen Lokalisierung

Zudem stellte sich die Frage, wie groß die longitudinale chromatische Verschiebung zwischen den beiden Farbkanälen ist. Dieses Wissen ist wichtig, da die Porenposition und die Position der Proteine in zwei unterschiedlichen Farbkanälen bestimmt werden, jedoch im Zuge der Analyse eine Aussa-

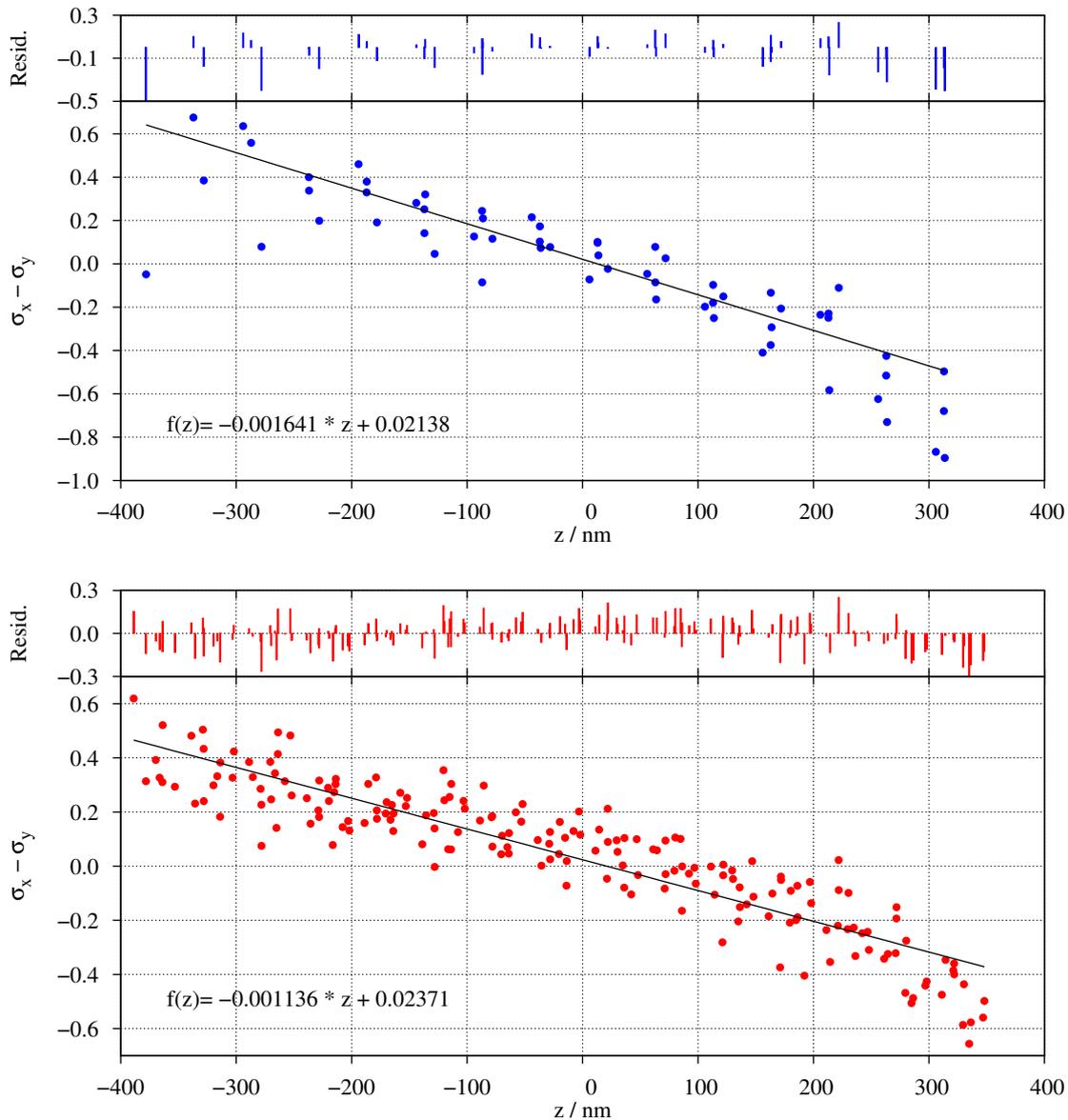


Abbildung 4.33: oben: Kalibrationsgerade für den blauen Kanal; unten: Kalibrationsgerade für den roten Kanal. Da sich die Kalibrationsgeraden durch das Einsetzen einer anderen Linse oder die Veränderung der Linsenposition im Strahlengang ändern, sind diese Kalibrationsgeraden beispielhaft für eine Konfiguration.

ge darüber getroffen werden soll, wann sich die rot fluoreszierende, diffundierende pre-Untereinheit innerhalb der blau fluoreszierenden Pore befindet.

Hierzu wurden dieselben Aufnahmen verwendet wie zum Bestimmen der Lokalisierungsgenauigkeit, sie wurden jedoch anders prozessiert. Es wurde zur Verbesserung der Bildqualität eine Mittelwert-Projektion der 100 Bilder erstellt, was in einem rauschärmeren Bild resultierte. Aus diesem Bild wurde nun mit dem ImageJ-Plugin Thunderstorm die Position der Beads im roten und blauen Kanal bestimmt. Diese Werte wurden nun einem Skript übergeben, das die Differenzen Δx , Δy und Δz aus den x, y, z -Werten der Partikelposition in beiden Kanälen bestimmte [Spille, 2013].

Die Verschiebung zwischen den beiden Farbkanälen Δx ist von der x -Position des Beads auf dem Kamerachip abhängig; je weiter man an die Kameraränder kommt, umso größer wird die Verschie-

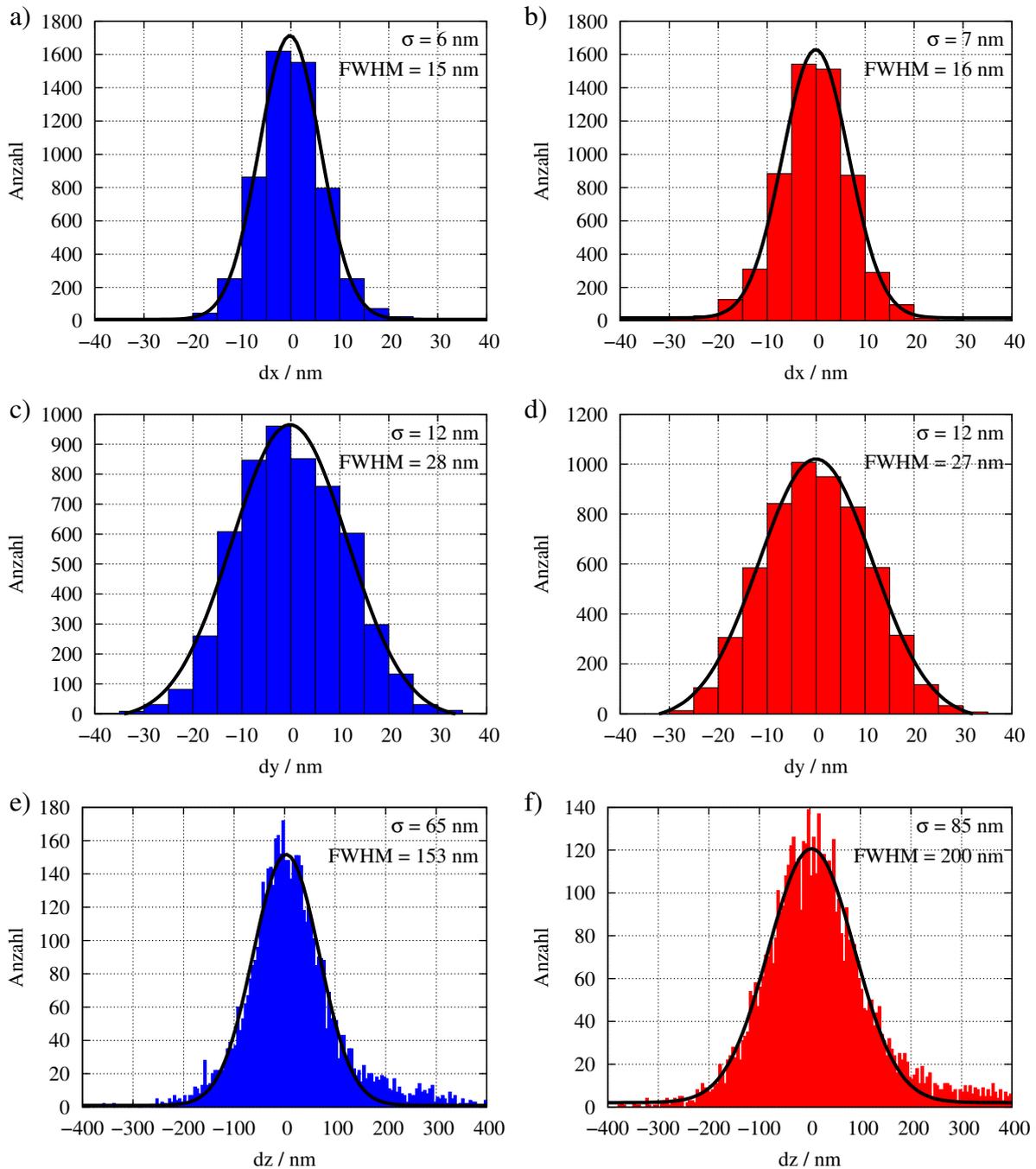


Abbildung 4.34: a) und b) Lokalisierungsgenauigkeit in x; c) und d) Lokalisierungsgenauigkeit in y; e) und f) die Lokalisierungsgenauigkeit in z war mit $\sigma_z(\text{rot}) = 85$ nm und $\sigma_z(\text{blau}) = 65$ nm in ausreichend, um eine verlässliche Lokalisierung der Kernpore (ca. 120 nm Höhe) zu gewährleisten. a), c) und e) zeigen die Abweichung der Lokalisierung bei einer Anregung mit 488 nm, b), d) und f) bei Anregung mit 635 nm.

bung (Abbildung 4.35 a). Dies trifft analog auch für die Verschiebung Δy zu (Abbildung 4.35 b). Für die Differenz Δz konnte jedoch keine Abhängigkeit von der Position auf dem Kamerachip gefunden werden. Die Schwankungsbreite lag zwischen 40 nm und 690 nm. Hier wurde auf eine Darstellung verzichtet.

Obgleich sowohl die axiale Lokalisierungsgenauigkeit als auch die chromatische Verschiebung deutliche Hinweise darauf waren, dass sich die *in vivo*-Messungen sehr kompliziert gestalten würden, da hier das SNR nochmals schlechter ausfällt, sollten die *in vivo*-Messungen als Beweis der prinzipiellen Machbarkeit dennoch durchgeführt werden.

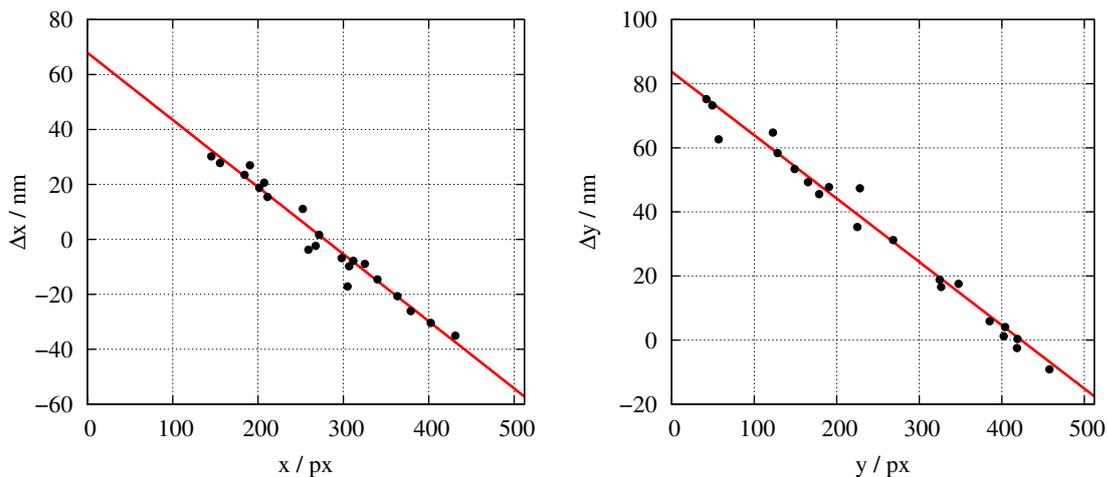


Abbildung 4.35: Chromatische Verschiebung in zwei Raumrichtungen. a) Abhängigkeit der Verschiebung Δx von der Position auf dem Chip, b) Abhängigkeit der Verschiebung Δy von der Position auf dem Chip.

4.5.4.5 Trajektorien von Dim2 *in vivo*

Nachdem die Funktionalität der Kalibrations- und Auswertungsroutinen mit Testdaten auf der Basis von immobilisierten TetraSpecks erfolgreich getestet werden konnte, wurden Messungen in der induzierbaren Zelllinie durchgeführt. Die Färbung der Kernporen wurde durch Mikroinjektion von AF488-tc-NTF2 erreicht, die Markierung der pre-40S-Untereinheit erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben mit SiR-Snap. Hier erfolgte die Aufnahme, indem erst 50 Bilder im blauen Kanal aufgenommen wurden, um so die Position der Poren bestimmen zu können. Hieran schlossen sich 950 Bilder bei roter Anregung an, gefolgt von weiteren 50 Bildern der Poren bei blauer Anregung. Die Belichtungszeit betrug 20 ms.

Die 3D-Trajektorien der pre-40S-Untereinheit wurden wie in Kapitel 3.3.7.3 beschrieben unter Verwendung der Kalibrationsgerade aus Abschnitt 4.5.4.2 bestimmt. Auch wenn eine Vielzahl an Trajektorien gefunden werden konnte, gelang es nicht, Trajektorien zu finden, die einer Pore zugeordnet wurden und den beim Export zu erwartenden Vorzeichenwechsel der Höhe relativ zur Pore zeigten.

4.5.4.6 Lokalisierung der Kernporen

Die Lokalisierung der Porenposition erwies sich als ungleich schwieriger. Dies lag daran, dass die Porendichte in HeLa-Zellen mit ca. 5 Poren pro μm^2 [Kubitscheck et al., 1996, Maul et al., 1972, Ori et al., 2013, Ribbeck und Görlich, 2001] ziemlich hoch ist und so die PSF der einzelnen Poren nicht mehr aufgelöst werden konnten (Abbildung 4.36).

Während in der Zellübersicht einzelne Poren visuell gut zu erkennen sind, sieht man am Beispiel der Vergrößerung der Poren 1, 2 und 3 deutlich, dass die Helligkeitsverteilungen benachbarter Poren ineinander übergehen. Dadurch war es nicht mehr möglich, die Helligkeitsverteilung mit einer elliptischen Gaußanpassung korrekt zu beschreiben, was dazu führte, dass die zugehörige ermittelte Höhe nicht verlässlich war. Die axialen Positionen sind in Tabelle 4.5 aufgelistet.

Tabelle 4.5: Rekonstruierte axiale Positionen dreier beispielhaft ausgewählter Poren (Abbildung 4.36 b).

Pore	axiale Position in nm
1	-175
2	-13209
3	-352

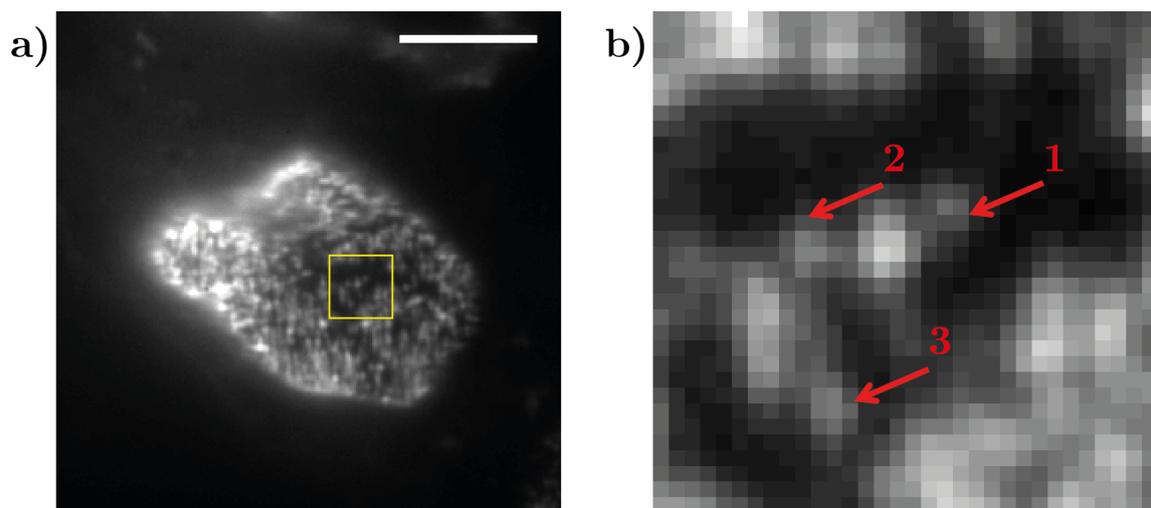


Abbildung 4.36: a) Mittelwertprojektion eines Bildstapels auf dem Kernboden einer HeLa-Zelle, einzelne Kernporen sind zu erkennen. In gelb eingezeichnet ist der vergrößerte Ausschnitt in b. b) Vergrößerter Ausschnitt des gelben Rahmens. Auch wenn die Poren prinzipiell einzeln zu erkennen sind, liegen sie so nah zusammen, dass eine Zuordnung der Intensitätsverteilung zu einer einzigen Pore nicht mehr sauber möglich ist. Der Maßstabsbalken beträgt $5 \mu\text{m}$.

Insgesamt traten somit nun zwei Probleme auf, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr gelöst werden konnten. Zum einen ergab sich mit dem in den *in vivo*-Messungen erreichbaren SNR keine hinreichend gute Lokalisierungsgenauigkeit. Zum anderen stellte sich heraus, dass die Porendichte in HeLa-Zellen zu groß ist, um die Helligkeitsverteilung sicher einzelnen Poren zuordnen zu können. Beide Probleme zusammen hatten zur Folge, dass auch mit der Verschiebung der Fokusebene vom Membranäquator auf den Boden des Zellkerns das Ziel dieser Arbeit, rRNA-Exporte *in vivo* zu beobachten, nicht erreicht werden konnte.

Kapitel 5

Diskussion

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Kutay an der ETH Zürich wurde die ribosomale Biogenese näher untersucht. Hierzu wurde das Protein Dim2 verwendet. Dim2 begleitet die 18S-rRNA und ihre Vorläufer von der Transkription bis zum Zusammenbau des fertigen Ribosoms. Es erfolgte zunächst eine heterologe Expression in *E. coli*, die jedoch nicht in einem funktionalen Protein resultierte. Daraufhin wurde die Expression homolog gestaltet, erst transient, später in stabilen Zelllinien. Mit diesen Zelllinien wurden anschließend Experimente zur Mobilität der markierten rRNA durchgeführt. An diese schlossen sich Experimente zum Export der rRNA an, wobei diese mit zwei verschiedenen Mikroskopietechniken durchgeführt wurden. In den folgenden Abschnitten soll nun der Verlauf und Erfolg der einzelnen Experimente diskutiert werden, sowie Schlüsse gezogen werden, die aus diesen in Relation zu bereits publizierten Erkenntnissen über die ribosomale Biogenese möglich sind.

5.1 Fluoreszenzmarkierung der ribosomalen Untereinheit *in vivo*

Am C-terminalen Ende von Dim2 befinden sich zwei Proteindomänen, die wichtig für seine Funktionalität sind. Zum einen befindet sich dort eine NES, somit könnte Dim2 mitverantwortlich für den Export der SSU aus dem Kern sein [Vanrobays et al., 2008]. Zum anderen gibt es dort eine KH-Domäne, die für die rRNA-Bindung verantwortlich ist [Vanrobays et al., 2008], sowie eine KH-ähnliche Domäne, die die Bindung zu Nob1 vermittelt. Eine Mutation dieser Domäne führt zum Funktionsverlust und einem folgenden Verlust der Produktion der 18S-rRNA [Woolls et al., 2011].

5.1.1 Heterologe Expression

Im Zuge der Kooperation wurden uns von der Arbeitsgruppe von Prof. Kutay zwei Vektoren zur Verfügung gestellt, die das Protein Dim2 mit einem His-Tag zur Aufreinigung tragen. Das His-Tag ist einmal C- und einmal N-terminal fusioniert. Bei der heterologen Expression des Proteins in *E. coli* zeigte sich, dass das C-terminal fusionierte Protein deutlich schwieriger aufzureinigen war als das mit N-terminalem His-Tag. Eine Fluoreszenzmarkierung von Dim2 am C-Terminus verlief nicht erfolgreich, wohingegen eine chemische Markierung mit AF647 am N-Terminus gelang.

Durch Mikroinjektionsexperimente konnte jedoch gezeigt werden, dass sich dieses Protein nicht nativ verhält (Abbildungen 4.1, 4.2 sowie 4.3). Dim2 wurde zwar im Zellkern akkumuliert, was auf einen aktiven Transport des Proteins in den Kern schließen lässt, da es durch reine Diffusion nur zu einer Gleichverteilung in der Zelle kommt. Teilweise konnte zu späteren Zeitpunkten nach der Mikroinjektion festgestellt werden, dass die Nukleoli entgegen der bekannten nativen Verteilung sogar von der Dim2-Verteilung ausgeschlossen wurden. Da sich dieses Verhalten auch in Speicheldrüsen von *C. tentans* zeigte, obwohl hier die injizierte Proteinmenge in Relation zum Zellvolumen erheblich geringer ist, konnte ausgeschlossen werden, dass die nicht-native Verteilung durch eine Überpopulation von Dim2 hervorgerufen wurde. Eine weitere naheliegende Vermutung war, dass bei der Expression in *E. coli* ein unbekannter Partner fehlt, der dafür sorgt, dass Dim2 korrekt – und somit funktional – gefaltet wird. Um dies zu prüfen und gegebenenfalls zu umgehen, konnten erfolgreich eGFP- und Snap-Tag-Dim2-Fusionskonstrukte kloniert werden, um das Protein homolog zu exprimieren.

5.1.2 Homologe Expression und stabile Zelllinien

Die beiden klonierten Fusionsproteine eGFP-Dim2 und Snap-Dim2 wurden beide am N-Terminus von Dim2 fusioniert. Die N-terminale Fusion wurde gewählt, da das C-terminale Fusionsprotein in der heterologen Expression erheblich mehr Probleme bereitete und zusätzlich bekannt ist, dass die funktionell wichtigen KH-(ähnlichen-)Domänen von Dim2 am C-Terminus lokalisiert sind. Eine N-terminale Fusion sollte demnach die C-terminalen Struktur motive erhalten.

Die Fluoreszenzverteilungen, die in den transienten und stabilen Expressionen beobachtet werden konnten, unterschieden sich nicht. Es konnte auch kein Unterschied in den Verteilungen der beiden Fusionskonstrukte festgestellt werden. Da die Verteilung des Fusionsproteins in Fluoreszenzexperimenten der Verteilung von nativem Dim2 in Immunfärbungen entspricht [Zemp et al., 2009], wurde Dim2 als korrekt gefaltet und funktional bewertet (Abbildung 5.1 a und b). In Abbildung 5.1 c ist zusätzlich gezeigt, wie Dim2 relokalisiert, wenn das Protein Rio2 aus der Zelle entfernt wird. Da ohne Rio2 eine Ablösung des Dim2 von der Vorläuferuntereinheit nicht mehr möglich ist (vgl. Kapitel 1.5), verbleibt Dim2 nach dem Export auf der Untereinheit im Zytoplasma. Dadurch kommt es zu einer Erhöhung der Fluoreszenz im Zytoplasma. Zur selben Fluoreszenzverteilung von eGFP- und Snap-Dim2 nach Entfernen von Rio2 mittels RNAi aus der Zelllinie kam auch C. Montellese [C. Montellese, ETH Zürich, unveröffentlichte Ergebnisse]. Auch eine RNAi gegen Crm1 führte zu einer durch Immunfluoreszenzfärbung bereits bekannten Relokalisation von Dim2. Auch diese konnte mit den stabilen Zelllinien demonstriert werden [C. Montellese, ETH Zürich, unveröffentlichte Ergebnisse]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass beide Fusionsproteine voll funktional sind. Durch die Relokalisation nach RNAi von Rio2 konnte zudem nachgewiesen werden, dass auch das Fusionsprotein zum Export fähig ist.

5.1.3 Sterischer Einfluss der Fluoreszenzmarkierungen

Aufgrund der nativen Verteilung von Dim2 und der weiteren Experimente von C. Montellese (Kapitel 5.1.2) wurde davon ausgegangen, dass sowohl das eGFP- als auch das Snap-markierte Dim2

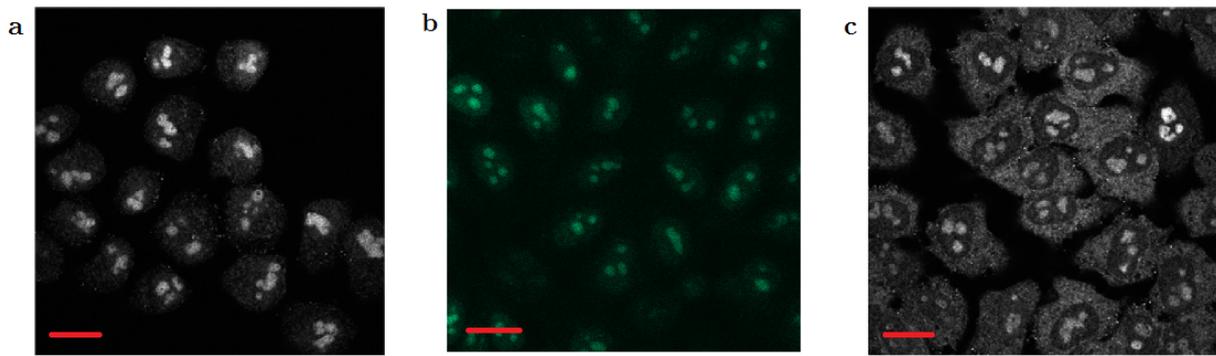


Abbildung 5.1: Lokalisierung von Dim2. a) Immunfärbung von nativem Dim2, Abbildung aus [Zemp et al., 2009]. b) Fluoreszenzverteilung von eGFP-Dim2 der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie. c) Immunfluoreszenz der Relokalisation von Dim2 nach Rio2-RNAi. Abbildung aus [Zemp et al., 2009]. Alle Maßstabsbalken betragen 20 μm .

funktional ist. Dennoch soll hier kurz diskutiert werden, wie groß die fusionierten Markierungsproteine relativ zu Dim2 sind, und inwieweit diese eine sterische Hinderung verursachen könnten. In Kapitel 1.6 wurde der Aufbau von Dim2 besprochen. Es gibt in der Proteinstruktur drei KH(-ähnliche)-Domänen, die die Bindung zu einem weiteren Dim2, Nob1 und der rRNA vermitteln [Woolls, 2011]. Zudem befindet sich am C-terminalen Ende eine Exportsequenz. Dim2 ist mit 252 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 27,9 kDa nicht viel größer als die beiden fusionierten Tags. eGFP besteht aus 238 Aminosäuren (26,9 kDa), das Snap-Tag ist mit 182 Aminosäuren (19,4 kDa) geringfügig kleiner. Die Größenverhältnisse der Kristallstrukturen von Dim2 und eGFP sind in Abbildung 5.2 a als „Fusionsprotein“ dargestellt. Zwischen den beiden Termini befindet sich jedoch noch eine Aminosäurenkette, da das humane Dim2 einen um 40 Aminosäuren längeren N-Terminus besitzt, und zusätzlich noch die Aminosäuren aus den *Cloning Sites* der Vektoren dazwischen liegen.

Die Struktur des in dieser Arbeit verwendeten Snap-Dim2 wurde mit Hilfe von RaptorX berechnet. Bei RaptorX handelt es sich um einen templatbasierten Modellierungsalgorithmus zur Strukturvorhersage von Proteinsequenzen. RaptorX bietet zwei Vorteile gegenüber anderen Modellierungsalgorithmen: zum einen können mehrere Template verwendet werden, um eine längere Sequenz zu modellieren, zum anderen wird die Qualität mehrerer Template für einen Sequenzabschnitt gegeneinander abgewogen [Källberg et al., 2012]. Das Ergebnis der Strukturvorhersage ist in Abbildung 5.2 b dargestellt. Die beiden einzelnen Domänen sind gut zu erkennen, die humane Dim2-Struktur entspricht der der Dim2-Kristallstruktur aus *P. horikoshii*, und auch die Snap-Tag-Struktur passt zur Kristallstruktur von [Schmitt et al., 2009]. Es wird jedoch deutlich, dass die in [Woolls, 2011] postulierte, schwach konservierte KH-Domäne am N-Terminus von Dim2 in dieser Strukturvorhersage keine Faltung zugewiesen bekommt, sondern zusammen mit der *multiple cloning site* als etwa 11 nm lange, frei bewegliche Aminosäurenkette vorliegt. Hier wäre vorstellbar, dass dieser Teil des Proteins nur gefaltet wird, wenn Dim2 ein passender Bindungspartner zur Verfügung steht. Da bisher jedoch keine Strukturbestimmung des humanen Dim2 veröffentlicht wurde, ist also sowohl vorstellbar, dass eine freie Aminosäurenkette vorliegt, als auch, dass diese zu Strukturmotiven gefaltet wird. Eine vorhandene freie Kette hätte zwei Konsequenzen. Zum einen würde

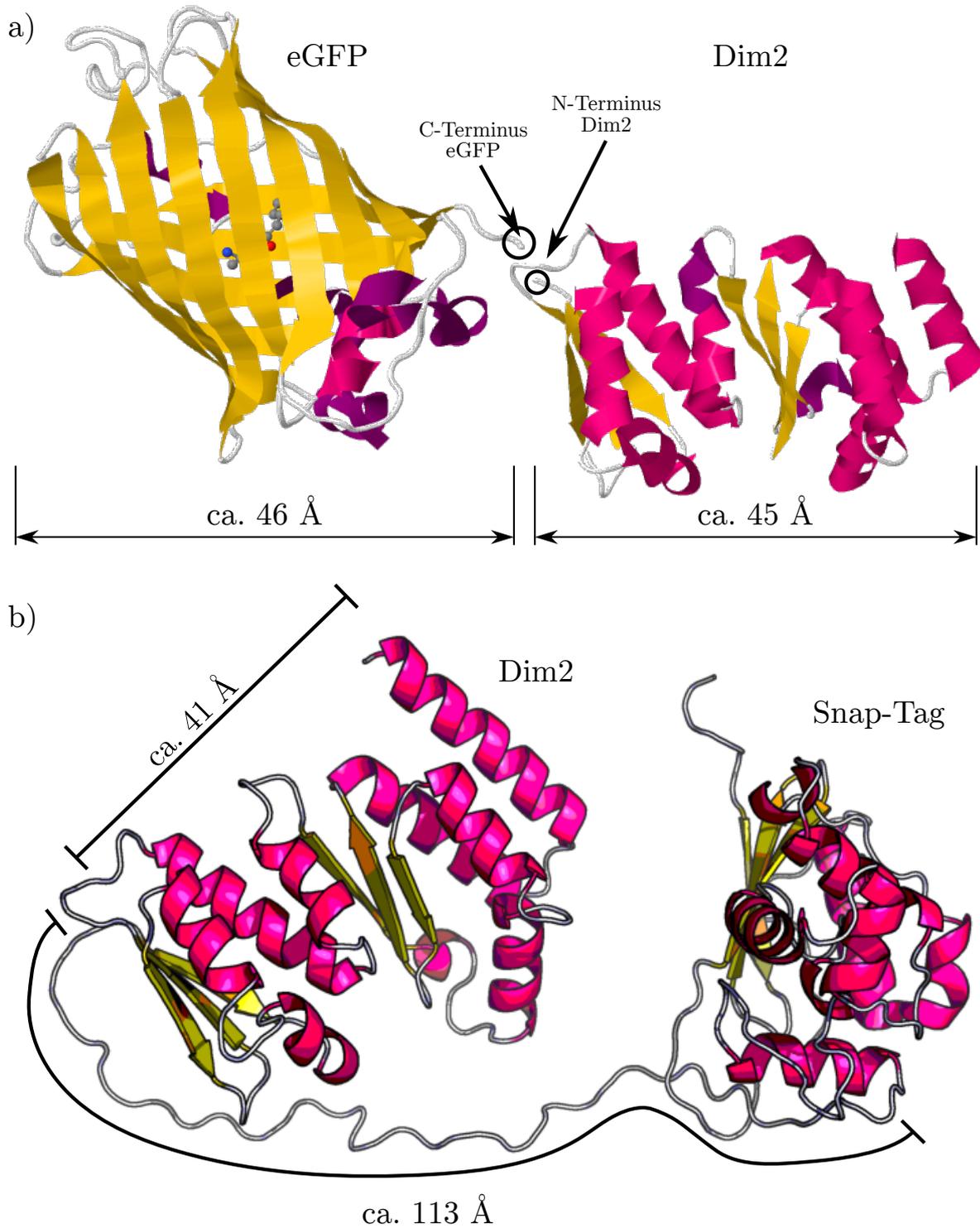


Abbildung 5.2: a) Kristallstrukturen von eGFP und Dim2 aus *P. horikoshii* als C-N-verknüpftes Fusionsprotein. Kristallstrukturen aus [Royant und Noirclerc-Savoie, 2011] und [Jia et al., 2007]. b) Modellierter Struktur von Snap-Dim2 [Källberg et al., 2012]. Zwischen den beiden Proteindomänen befindet sich vermutlich ein etwa 11 nm langer Aminosäurelinker, der frei beweglich ist und so keine Fixierung der beiden Domänen erfolgt.

eine Aminosäurenkette dafür sorgen, dass sich das Snap-Tag frei um Dim2 bewegen kann, sodass nicht vollständig ausgeschlossen werden kann, dass in ungünstigen Konformationen eine Blockade von Bindungsstellen oder funktionellen Einheiten erfolgt. Zum anderen wirkt sich die Kette auf die Lokalisierungsgenauigkeit in den in den folgenden Abschnitten besprochenen Einzelmolekülmessungen aus, da selbst im Falle einer kompletten Immobilisierung des Dim2 noch die Bewegung der Kette möglich sein könnte, die dann als eine scheinbare Bewegung des beobachteten Moleküls interpretiert wird, obwohl sich nur der Fluoreszenzmarker, nicht jedoch das Molekül bewegt hat.

5.2 Kompartimentabhängige Mobilität von Dim2 im Kern

Nachdem die Etablierung von stabilen Tetrazyklin-induzierbaren Zelllinien, die Dim2 als funktionales, fluoreszenzmarkiertes Fusionsprotein exprimieren, gelungen war, war die Voraussetzung geschaffen, um fluoreszenzmikroskopische Experimente durchführen zu können. Mit eGFP-Dim2 wurden FRAP-Experimente gemacht, mit Snap-Dim2 konnten Einzelmolekülverfolgungen realisiert werden.

5.2.1 Mobilität im Nukleolus und im Nukleoplasma im Vergleich

Der reine Vergleich der Diffusionskoeffizienten, die in den beiden Kompartimenten mit den beiden Analysen gefunden wurden, lässt schon erste Schlüsse zu. In der SWA wurden die Diffusionskoeffizienten, die im Nukleoplasma gefunden wurden, auch für die Auswertung im Nukleolus festgesetzt. Eine solche Möglichkeit bietet die Modellierung mit vbSPT nicht, sodass hier die Diffusionskoeffizienten in beiden Kompartimenten einzeln angepasst wurden. In allen Auswertungen trat eine immobile Fraktion auf, deren Diffusionskoeffizient mittlere Sprungweiten unterhalb der Lokalisierungsgenauigkeit aufweist. In den beiden mobilen Fraktionen hingegen differieren die Diffusionskoeffizienten durchaus. So beträgt der Diffusionskoeffizient der mobilsten Fraktion D_f in der vbSPT-Analyse $(2,03 \pm 0,05) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ im Nukleolus, aber $(2,75 \pm 0,04) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ im Nukleoplasma. D_f in der SWA liegt mit $(2,3 \pm 0,3) \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ dazwischen. Ein ähnliches Bild ergibt sich beim retardierten Diffusionskoeffizienten D_r . Die Ähnlichkeit der Diffusionskoeffizienten, die mit vbSPT gefunden wurden, validieren das Festsetzen der Diffusionskoeffizienten in Origin.

Im Folgenden sollen nun die drei Fraktionen hinsichtlich ihrer biologischen Bedeutung diskutiert werden.

Der Diffusionskoeffizient der mobilsten Komponente $D_f = 2,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bzw. $2,75 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ passt hervorragend zu den theoretisch berechneten Werten für eine freie Diffusion der pre-40S-Untereinheit von $D_{\text{pre40S, Kugel}} = 2,45 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ sowie $D_{\text{pre40S, Ellipsoid}} = 2,59 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ (Kapitel 4.4.1). Dies wurde als weiterer Beleg für die Funktionalität des markierten Dim2 gewertet, da ungebundenes Snap-Dim2 mit 48 kDa so klein und mit etwa $22 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ so schnell ist, dass es in den Einzelmolekülaufnahmen nicht sichtbar wurde.

Der Anteil der mobilsten Fraktion D_f mit dem Diffusionskoeffizienten von $2,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ nahm von 7 % im Nukleolus auf 28 % im Nukleoplasma deutlich zu. Die Verschiebung hin zu einer deutlich

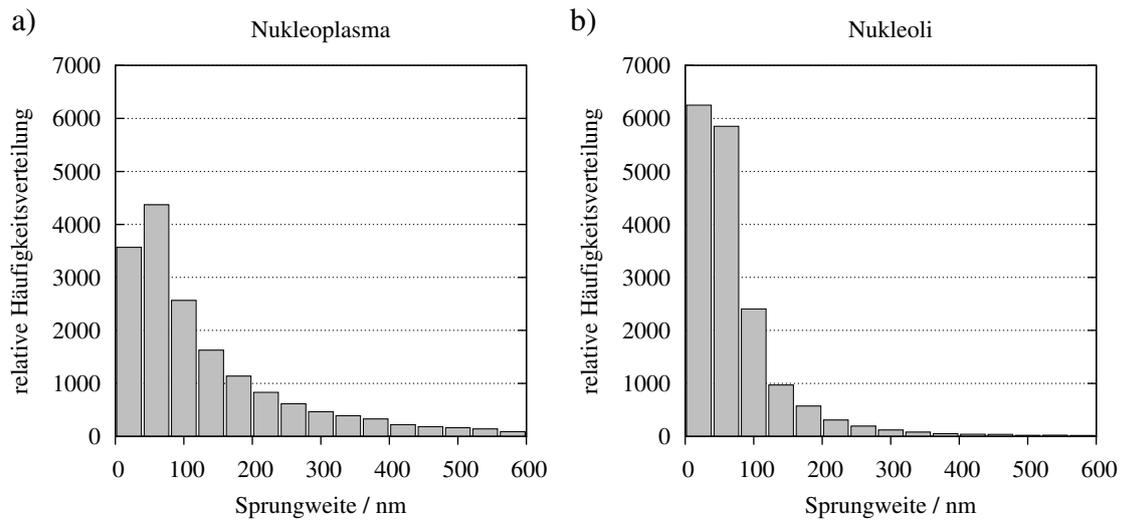


Abbildung 5.3: a) Sprungweitenverteilung im Nukleoplasma, b) Sprungweitenverteilung im Nukleolus. Zwecks Vergleichbarkeit wurden die Nukleolus-Werte auf die Nukleoplasma-Werte hin normiert.

höheren Mobilität von den Nukleoli hin zum Nukleoplasma lässt sich auch gut an der Sprungweitenverteilung ablesen (Abbildung 5.3). Auch dieses Ergebnis entsprach der Erwartung. Der hohe Anteil an frei diffundierenden Vorläuferuntereinheiten im Nukleoplasma passt zu der Vorstellung, dass diese zum Export zu den Poren gelangen müssen. Dass im Nukleolus kaum Partikel zu finden waren, die diese hohe Mobilität aufwiesen, könnte durch Bindungsstellen im Nukleolus verursacht sein, die zur Unterstützung der posttranskriptionalen Prozessierung beitragen.

Weiter wurde bei der Dreikomponentenanpassung in beiden Kompartimenten eine Fraktion gefunden, die sich mit einem retardierten Diffusionskoeffizienten im Bereich von $0,31 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bewegte. Es stellte sich die Frage, ob diese Retardierung durch Bindungen hervorgerufen wird, oder ob es sich dabei um eine sterische Hinderung durch Kernstrukturen handelt. Um diese Frage zu beantworten, wurden zwei verschiedene Untersuchungen von vorhandenen Daten durchgeführt. Eine dieser Untersuchungen wurde durch die vbSPT-Analyse ermöglicht, da hier, im Gegensatz zur SWA, die Anzahl an Zuständen, bzw. Komponenten, nicht vorgegeben wird, sondern durch den Algorithmus selbst bestimmt wird. Hier konnte sowohl im Nukleoplasma als auch im Nukleolus beobachtet werden, dass durch die Freigabe von weiteren Zuständen das System besser beschrieben werden konnte. Diese zusätzlichen Zustände beschreiben ebenfalls retardierte Komponenten mit Diffusionskoeffizienten im Bereich von $D_r \approx 0,2 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ bis $0,7 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$.

Die zweite Untersuchung basierte auf Daten von Dr. Roman Veith. In dieser Messung wurden Dextrane mit einer Größe von 500 kDa und einem hydrodynamischen Radius von 89 nm in den Zellkern von HeLa-Zellen injiziert. Da diese inert sind und keine Bindungsstellen in der Zelle besitzen, ist eine Retardierung durch Bindungen ausgeschlossen. Diese Daten wurden analog zu den Dim2-Trajektorien analysiert. Auch hier wurde eine frei diffundierende und eine retardierte Fraktion gefunden, die sich bei Freigabe weiterer Zustände noch aufspaltete. Wie erwartet wurde hier keine immobilisierte Komponente aufgrund der mangelnden Bindungsmöglichkeit gefunden.

Beide Ergebnisse zusammen sprechen deutlich dafür, dass die Retardierung durch Kernstrukturen und nicht durch Bindungen verursacht wird. Die Aufspaltung der retardierten Komponente zeigt,

dass es sich bei dieser Fraktion nicht um eine homogene Gruppe handelt. Die Art und das Ausmaß der Retardierung hängt von der Umgebung ab, in der ein Partikel sich befindet. Dass es sich bei der Retardierung der Dextrane und der pre-40S-Untereinheit um einen ähnlichen strukturbedingten Mechanismus handelt wird auch dadurch klar, dass die durchschnittlichen Verweilzeiten im retardierten Zustand sehr ähnlich sind. Für die Dextrane wurde eine Verweilzeit von 110 ms gefunden, für die Untereinheit 100 ms im Nukleolus sowie 80 ms im Nukleoplasma.

Der kleinste Diffusionskoeffizient beträgt $D_i \approx 0,05 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Hieraus lässt sich eine mittlere Sprungweite von $\langle r \rangle = \sqrt{4 \cdot 0,05 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}} \cdot 0,0125 \text{ s}} = 50 \text{ nm}$ berechnen. 50 nm entsprechen etwa der Lokalisierungsgenauigkeit, die in den Messungen vorlag (Kapitel 4.4.1). Gleichzeitig handelt es sich bei $\langle r \rangle$ nur um einen Mittelwert - der Diffusionskoeffizient setzt sich also aus Sprungweiten zusammen, die sowohl länger als auch kürzer als dieses Mittel sind. Der Diffusionskoeffizient beschreibt somit eine Mischung aus hauptsächlich im Rahmen der Lokalisierungsgenauigkeit immobilisierten und einigen stark retardierten Partikeln. Deutlich zu sehen ist der Anstieg dieser immobilisierten Komponente D_i im Nukleolus, deren Anteil sich von 33 % im Nukleoplasma auf 65 % im Nukleolus fast verdoppelt. Der hohe Anteil an statischen Partikeln im Nukleolus ist nicht unerwartet. Der rRNA-Precursor ist mit 13,7 kb ein langer RNA-Abschnitt, die Transkription nimmt knapp 2,5 Minuten in Anspruch. Da in humanen Zellen alle Prozessierungsschritte posttranskriptional stattfinden, Dim2 jedoch schon an die naszierende rRNA gebunden ist, war eine längere Immobilisierung der Moleküle im Nukleolus nicht überraschend. Diese Interpretation passt auch gut zu der langen Verweilzeit von Partikeln im immobilisierten Zustand, die mit der vbSPT-Analyse zusätzlich aus den Daten extrahiert werden konnte. Diese beträgt $\tau_i = 410 \text{ ms}$. Überraschend hingegen war, dass im Nukleoplasma 1/3 aller Partikel ebenfalls diesen geringen Diffusionskoeffizienten aufwiesen. Die bisherigen Erkenntnisse über die Ribosomenbiogenese (Kapitel 1.5) sprechen stark dafür, dass nach der Freisetzung der pre-40S-Untereinheit aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma keine Maturierungsschritte mehr stattfinden, bis die Untereinheiten ins Zytoplasma exportiert worden sind. Damit waren weitere Bindungsstellen für die Vorläuferuntereinheit im Nukleoplasma nicht zu erwarten. Beim Nukleoplasma handelt es sich jedoch nicht um ein leeres, mit Wasser gefülltes Volumen. Vielmehr ist der Kern ausgefüllt mit Chromatin. Dieses befindet sich als dicht gepacktes Euchromatin an der Kernhülle, und als weniger dicht gepacktes Heterochromatin eher im Kerninneren. Diese dichte Packung spiegelt sich auch in der Viskosität des Nukleoplasma wider, die mit 4 cP – 8 cP deutlich über der Viskosität von Wasser mit 1 cP liegt [Veith, 2011]. Die Vorläuferuntereinheit ist mit einem Radius von etwa 19 nm deutlich kleiner als die 500 kDa Dextrane mit einem Radius von etwa 80 nm, deren Diffusionsverhalten oben bereits diskutiert wurde. Es fällt bei den Daten in Abbildung 4.14 sofort auf, dass die Anzahl an kurzen Immobilisierungen der pre-Untereinheit im Nukleoplasma deutlich höher ist als im Nukleolus. Dies spricht dafür, dass es sich bei den Immobilisierungen nicht um Bindungen handelt.

Beide Befunde zusammen, die Erhöhung der Mobilität vom Nukleolus zum Nukleoplasma sowie die freie Diffusion im Nukleoplasma, untermauern den in Kapitel 1.5 vorgestellten Maturierungsweg, der unterstellt, dass ein Großteil der Fertigung der 40S-Untereinheit bereits im Nukleolus vollzogen wird.

Die Ergebnisse der Einzelmolekülauswertung passen damit außerdem gut zu der ersten Einschät-

zung, die durch die FRAP-Experimente in Kapitel 4.4.2.1 gewonnen wurde. Auch hier wurde die Mobilität der Partikel im Nukleoplasma als weit höher eingeschätzt als im Nukleolus. Auffällig ist jedoch, dass in den FRAP-Experimenten in beiden Kompartimenten die immobile Komponente deutlich kleiner ist als in den Einzelmolekülmessungen. Die in den FRAP-Experimenten erhöhte mobile Fraktion lässt sich durch eGFP-Dim2 erklären, das nicht an eine Untereinheit gebunden ist und somit frei durch den Kern diffundieren kann. Dieses hat einen theoretischen Diffusionskoeffizienten $D_{\text{theo}} = 21 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$. Dieser resultiert bei der in den Einzelmolekülmessungen verwendeten Belichtungszeit von 11,66 ms nicht mehr in einem Signal, sondern trägt nur zu einer erhöhten Hintergrundfluoreszenz bei. In den FRAP-Experimenten wird dieser verschmierte Beitrag jedoch auch mit in die Fluoreszenzrückkehr aufgenommen, da hier alle mit eGFP fusionierten Dim2 auch fluoreszieren. Damit summiert sich die geringe Fluoreszenz der frei diffundierenden eGFP-Dim2 zu einem detektierbaren Signal, weshalb sich die gemessene Mobilität von eGFP-Dim2 sowohl aus Anteilen von freiem, als auch aus Anteilen von gebundenem eGFP-Dim2 zusammensetzt. Für das freie Dim2 sind keine weiteren Bindungsstellen bekannt und aufgrund der im Vergleich zur pre-Untereinheit deutlich verminderten Größe (50 kDa für das markierte Dim2 vs. 2 MDa für die pre-Untereinheit) ist auch eine sterische Retardierung durch Chromatin deutlich unwahrscheinlicher. Daher trägt das freie Dim2 nur zu mobilen Fraktion bei, deren Anteil sich damit in Relation zu den Einzelmolekülmessungen erhöht.

Zusätzlich wurde in der Gegenüberstellung der FRAP-Kurven von reinem eGFP gegen diejenigen von eGFP-Dim2 nochmals deutlich (Abbildung 4.5), dass die Expression des Fusionsproteins gelang. Das reine eGFP zeigt Rückkehrkurven, die aufgrund der hohen Mobilität so schnell sind, dass die Fluoreszenzrückkehr mit der verwendeten Frequenz von 13,89 Hz fast nicht abbildbar ist.

5.2.2 Transition

Im Zuge der Mobilität der Partikel in den beiden Kernkompartimenten Nukleoplasma und Nukleolus wurde auch untersucht, wie der Übergang vom Nukleolus ins Nukleoplasma stattfindet. Hierzu wurden alle Trajektorien, die einen Übergang von einem in das andere Kernkompartiment zeigten, in Kategorien sortiert.

Die erste interessante Feststellung war, dass mit 58 und 54 in etwa gleich viele Trajektorien gefunden wurden, die eine Bewegung aus dem Nukleolus heraus oder in ihn hinein zeigten. Bei den Trajektorien, die den Nukleolus verlassen, handelt es sich um fertig prozessierte Vorläuferuntereinheiten. Welche Partikel beim Eintritt in den Nukleolus beobachtet wurden, konnte nicht abschließend geklärt werden. Freies Dim2, was für den nächsten Maturierungszyklus zurückkehrt, diffundiert zu schnell um es zu beobachten, und ein Wiedereintritt der Vorläuferuntereinheit erscheint unwahrscheinlich.

Die Kategorien „Grenze“ und „Umkehr“ wurden nicht weiter analysiert, da die Umrisse der Nukleoli nur händisch bestimmt wurden. Dieser Umriss stellt somit keine perfekte Trennung zwischen dem Nukleolus und dem Nukleoplasma dar, wenn, mangels einer umgebenden Membran, überhaupt eine scharfe Grenze existiert.

5.3 Exportmessungen der kleinen ribosomalen Untereinheit bei äquatorialer Membranbetrachtung

Nachdem nun die Mobilität von Dim2 im Kern detailliert bekannt war, sollte auch die Dynamik des Exports der kleinen Untereinheit untersucht werden. Es konnte jedoch, wie in Kapitel 4.5.3.1 erläutert, kein Exportereignis gefunden werden, bei dem eine zweifelsfreie Verfolgung einer Vorläuferuntereinheit vom Nukleoplasma über die Membran hin zum Zytoplasma gelang. Obgleich kein Export beobachtet werden konnte, wurden 1582 Ereignisse innerhalb der Kernhüllenmaske identifiziert. Dies wirft die Frage auf, warum kein kompletter Export mit den Stufen Andocken - Transport - Loslösen beobachtet wurde.

5.3.1 Wahrscheinlichkeitsabschätzung eines Exportereignisses

In Kapitel 4.5.1 wurde bereits eine Abschätzung der Exportraten durchgeführt. Diese führte zu dem Ergebnis, dass im Mittel ein Export einer markierten Untereinheit etwa alle drei Minuten im Sichtfeld stattfindet. Ein Durchschnittswert sagt jedoch noch nichts über die Wahrscheinlichkeit aus, dass ein Ereignis auch tatsächlich eintritt. Daher wurde zusätzlich die Zeit berechnet, nach der ein Export mit einer Sicherheit von 95 % beobachtet werden kann.

Die genaue Anzahl an Poren im Sichtfeld ist ebenfalls eine Abschätzung, genauso wie der Markierungsgrad der Vorläuferuntereinheit. Diese werden später noch diskutiert und begründet. Für die nun folgende Abschätzung wurden zwei Beispielwerte herausgegriffen.

Über alle Kernporen verteilt findet – bei Annahme eines Markierungsgrades der Untereinheit von 0,1 % – ein Export einer markierten Untereinheit alle 8,6 Sekunden statt. Da jedoch von den 3200 Kernporen nur 5 %, also 160 Poren, beobachtet werden konnten, resultiert dies darin, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von

$$p(\text{kein Export}) = \frac{3040}{3200} = 0,95 \quad (5.1)$$

dieser Export nicht beobachtet wird.

Damit nun die Gegenwahrscheinlichkeit $p(\text{Export}) \geq 0,95$ wird, muss

$$p(\text{Export}) = 1 - (p(\text{keinExport}))^n \geq 0,95 \quad (5.2)$$

werden. Es folgt also $n \geq 58,4$.

Mit einer Sicherheit von 95 % ist also nach $8,6 \text{ s} \cdot 58,4 \approx 500$ Sekunden ein Export zu beobachten. Die Wahrscheinlichkeitsfunktion ist in Abbildung 5.4 zusätzlich visualisiert. Mit 89,4 Minuten Messzeit würde damit die Wahrscheinlichkeit, keinen Export beobachtet zu haben, auf $3,2 \cdot 10^{-14}$ sinken. Wie bereits erwähnt, stellen sowohl die Porenzahl als auch der Markierungsgrad einen Unsicherheitsfaktor dar. Die Abschätzung wurde für unterschiedliche Kombinationen aus sichtbaren Poren und gefärbten Untereinheiten durchgeführt, sodass ein Eindruck des Einflusses der beiden Faktoren gewonnen werden konnte. Das Ergebnis ist in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Ob die Beobachtung eines Exports wahrscheinlich ist, hängt also besonders vom Markierungsgrad

Tabelle 5.1: Die Wahrscheinlichkeit, in den knapp 90 Minuten Messzeit ein Exportereignis zu beobachten, abhängig von der Anzahl beobachteter Poren und gefärbter Vorläuferuntereinheiten.

beobachtete Poren in %	Markierungsgrad		
	1 %	0,1 %	0,01 %
5,0	1	1	0,96
2,5	1	1	0,79
1,0	1	0,998	0,47

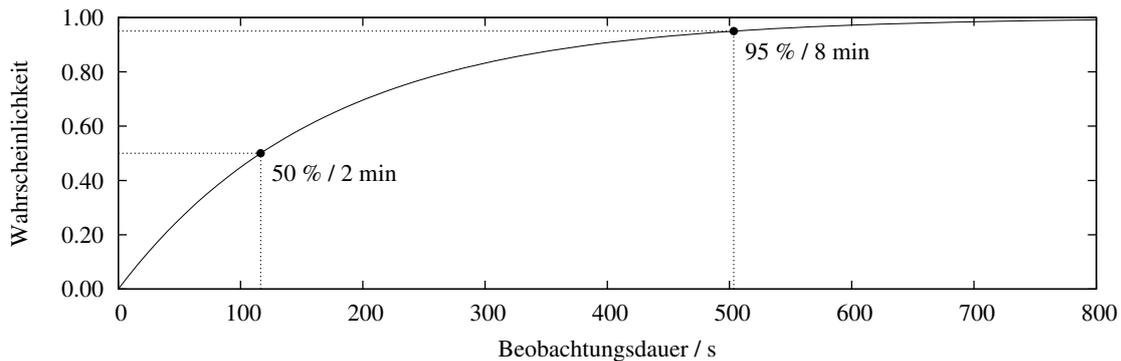


Abbildung 5.4: Anstieg der Wahrscheinlichkeit, einen Export zu beobachten, mit steigender Messzeit. Für die Abschätzung wurde ein Markierungsgrad von 0,1 % sowie 5 % Poren im Sichtfeld angenommen.

der pre-40S-Untereinheit durch gefärbtes Dim2 ab. Dieser soll im Folgenden abgeschätzt werden. [Goodfellow und Zomerdijs, 2013] berichteten, dass in 24 Stunden die Nachbildung von 8 – 10 Millionen ribosomaler Untereinheiten nötig ist, um ein gleichbleibendes Level an Ribosomen in der Zelle zu gewährleisten. Dies entspricht etwa 116 neuen Untereinheiten pro Sekunde. Damit diese zur Verfügung stehen, muss eine Menge an Ribosomenvorläufern im Kern sein, die $116 \frac{\text{Untereinheiten}}{\text{Sekunde}}$ multipliziert mit der Maturierungsdauer entspricht. Um dies nun berechnen zu können, muss die Maturierungsdauer abgeschätzt werden. Die Biogenese beginnt mit der Transkription des 13,7 kBa großen RNA-Precursors durch die Polymerase I, die eine Geschwindigkeit von ca. 95 Nukleotiden pro Sekunde aufweist. Dies führt zu einer Transkriptionsdauer von 144 Sekunden, was sich mit den Untersuchungen von [Popov et al., 2013] deckt - diese fanden etwa drei Minuten vom Beginn der Transkription bis zum ersten rRNA-Prozessierungsschritt. Weiter fanden [Popov et al., 2013] eine Zeitspanne von 5 – 8 Minuten, bis die ersten vier rRNA-Schnitte vollzogen waren. Über den restlichen zeitlichen Verlauf der Maturierung wurden bisher keine Untersuchungen angestellt. Aus Abbildung 1.5 kann jedoch entnommen werden, dass nun noch fünf weitere rRNA-Schnitte bis zur reifen Untereinheit nötig sind. Diese Prozessierungsschritte werden mit nochmals etwa acht Minuten abgeschätzt. Zusätzlich braucht die Vorläuferuntereinheit noch Zeit, um nach dem Freisetzen aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma zur Kernpore zu diffundieren. Bei einer Strecke von etwa $5 \mu\text{m}$, die das Partikel dazu zurücklegen muss, werden bei einem retardierten Diffusionskoeffizienten von $0,3 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ etwa 21 Sekunden benötigt. Dies fällt also, ebenso wie der Export, kaum ins Gewicht. Die Gesamtzeit der Biogenese summiert sich somit zu etwa 1200 Sekunden. Daraus folgt, dass sich $116 \frac{\text{Untereinheiten}}{\text{Sekunde}} \cdot 1200 \text{ s} = 139200$ Untereinheiten im Zellkern befinden sollten. Zusätzlich wurden exemplarisch in einigen Filmen im ersten Bild gezählt, wieviele Signale zu sehen waren.

Es handelt sich um ca. 30. Mit der Annahme, dass etwa 6 % des Kernvolumens abgebildet wird, befinden sich im Kern ca. 500 markierte Untereinheiten. Dies entspricht einem Markierungsgrad von etwa 0,5 % aller im Kern befindlichen Vorläuferuntereinheiten.

Beide Abschätzungen zusammen zeigen, dass bei der erreichten Gesamtbeobachtungszeit von 89 Minuten ein Exportereignisse mit hoher Wahrscheinlichkeit beobachtet werden müsste.

5.3.2 Bleichen und Helligkeit des Farbstoffs

Eine Schwachstelle der gewählten rRNA-Markierung über das Snap-fusionierte Protein Dim2 im Vergleich zu den von [Siebrasse et al., 2012], [Grünwald und Singer, 2010] und [Ma et al., 2013] verwendeten Markierungsvarianten (Kapitel 1.7.3) ist das Vorhandensein von nur einem einzigen Farbstoff je Untereinheit.

Während bei [Grünwald und Singer, 2010] und [Ma et al., 2013] bis zu 24 GFP-Moleküle zur Verfügung stehen, und bei [Siebrasse et al., 2012] immerhin noch bis zu vier Farbstoffe pro Tetracyclin-Tag gebunden sein können, bindet in der vorliegenden Arbeit genau ein SiR-Snap-Molekül an ein Fusionsprotein, von dem wiederum nur genau eines an das beobachtete Vorläuferpartikel bindet. Dies führt einerseits zu einem geringeren Signal-zu-Rausch-Verhältnis und daraus resultierend auch zu einer geringeren Lokalisierungsgenauigkeit des Partikels. Zudem kann eine Untereinheit, wenn der Farbstoff blinkt oder bleicht, nicht mehr weiter beobachtet werden. Die Partikel sind durchaus über lange Zeiten sichtbar, insbesondere, wenn gerade immobile Phasen der Mobilität durchlaufen werden. Die längsten gefundenen Trajektorien betragen 260 Bilder im Nukleolus und 288 Bilder im Nukleoplasma, was einer ununterbrochenen Beobachtungsdauer von 3265,6 ms, bzw. 3617,3 ms entspricht. Solche langen Trajektorien stellen jedoch eine Ausnahme dar, die meisten Trajektorien sind deutlich kürzer. Welche Photonenausbeuten mit dem Farbstoff SiR-Snap möglich sind, ist nicht bekannt. In dieser Arbeit wurden auch keine Versuche unternommen, um die Eigenschaften von SiR-Snap zu charakterisieren, zumal die Optimierung von Umgebungsparametern bei *in vivo*-Untersuchungen ohnehin schwierig ist.

5.3.3 Qualität der Membranmarkierung

Das größte Problem, was sich bereits in Kapitel 4.5.2.1 zeigte, war die Qualität der Membranmarkierung. Die Markierung der Membran erfolgte durch Mikroinjektion von AF488-NTF2. Durch die Mikroinjektion ist eine exakte Kontrolle der injizierten Menge an Proteinelösung nicht möglich. Daraus resultierten Zellen, die deutlich unterschiedliche Membranhelligkeiten sowie stark differierende Hintergrundfluoreszenzen zeigten. Gleichzeitig ist jedoch nur so wenig Protein in der Zelle enthalten, dass eine Feinjustierung von Laserstärke und Verstärkungsfaktor der EM-CCD nicht für jede Zelle einzeln möglich war, da auch so schon beim Suchen der Äquatorposition einer Zelle ein sichtbares Bleichen der Membranhelligkeit stattfand.

In [Siebrasse et al., 2012] gelang eine Nanolokalisierung der Membran durch das Anpassen von Gaußverteilungen an den Intensitätsverlauf senkrecht zum Membranverlauf. Dies misslang in den hier verwendeten HeLa-Zellen. Dies lag zum einen an der deutlich stärker gekrümmten Membran,

die das Anlegen einer senkrechten Anpassung deutlich erschwerte. Zum anderen war durch die hohe Hintergrundfluoreszenz auch die angepasste Gaußverteilung sehr breit. Um einen Eindruck der Membranlokalisierung zu erhalten, wurden zufällig zehn Messungen ausgewählt, von denen drei exemplarisch in Abbildung 4.22 gezeigt wurden. In der Abbildung wurden nur die Durchschnittsprojektionen gezeigt, derselbe Test wurde jedoch zusätzlich mit Maximumprojektionen durchgeführt. Es war kein klarer Trend sichtbar, ob für eine automatisierte Auswertung die Maximum- oder die Durchschnittsprojektion besser geeignet wäre. Die gemittelten Halbwertsbreiten von etwa 900 nm machen erneut deutlich, wie schwierig die Abgrenzung der beiden Kompartimente voneinander ist. In Kapitel 1.7.1 wurde eine schematische Kernpore gezeigt, aus der auch die Größenverhältnisse einer Pore sichtbar wurden. Die gesamte Pore mit den Filamenten und dem nukleären Korb hat eine Ausdehnung von etwa 165 nm. Dies ist deutlich schmaler als sowohl die gemessene Halbwertsbreite von 900 nm – als auch das zugehörige σ von etwa 390 nm – für das Membransignal.

Die verwaschenen Membranaufnahmen und die daraus resultierende Unsicherheit in der Lokalisierung der Membran sind auch der Grund für das Vorhandensein der Kategorie „reine Membranereignisse (M)“, da so keine eindeutige Zuteilung zu einer Seite hin mehr möglich ist. Weiterhin provoziert die Membranbreite die Unmöglichkeit der Visualisierung eines kompletten, dreistufigen Exportprozesses mit der Freisetzung des Cargos von der Kernpore. Es ist durchaus vorstellbar, dass ein Partikel den Export abgeschlossen hat und auf zytoplasmatischer Seite noch lose mit den FG-Filamenten assoziiert ist, was jedoch aufgrund des schlechten Membransignals noch als „innerhalb“ statt als „neben“ der Membran interpretiert wird.

Eine Möglichkeit, um besser einschätzen zu können, welche Ereignisse an der Kernhülle Exporte sein könnten, wären biochemische Kontrollversuche. Ein solcher Versuch wäre der Einsatz von Digitonin. Dieses Steroid-Glycosid ist ein nichtionisches Tensid, was zur Permeabilisierung von Zellmembranen verwendet werden kann. Durch die so entstandenen Löcher in der Zellmembran fließt das Zytoplasma samt aller kleinen Moleküle, wie Salzen und Zuckern, aus der Zelle aus. Zu diesen entfernten kleinen Molekülen gehören auch die Energieträger der Zelle, im Speziellen ATP und ADP. Durch den Verlust dieser Energieträger ist kein energieabhängiger Prozess in der Zelle mehr möglich [Adam et al., 1990]. Zu diesen energieabhängigen Prozessen gehört auch der rezeptorvermittelte Export von großen Molekülen aus dem Zellkern. Wenn man nun analoge Messungen mit solchen permeabilisierten Zellen durchführt, und auch hier die Verweilzeiten der Signale an der Membran analysiert, ließe sich im Vergleich zu den Messungen in unbehandelten Zellen Rückschlüsse ziehen. Sollten nun keine langen Verweilzeiten mehr gefunden werden, spräche dies stark dafür, dass es sich bei den Ereignissen mit einer langen Verweilzeit an der Membran um Exportereignisse handelt, die im Zuge der Energiedepletion nicht mehr möglich sind.

5.3.4 Mobilität der kleinen ribosomalen Untereinheit an der Kernmembran

Obwohl mehr als 1500 Signale innerhalb der Kernhüllenmaske gefunden wurden, konnte kein Exportereignis zweifelsfrei beobachtet werden. Die 1582 Membranereignisse wurden in sieben Ereigniskategorien eingeteilt, die dann partiell singulär und partiell gruppiert näher untersucht wurden. Eine Kategorie waren die „zytosolischen Kontakte“, ZK. Diese Trajektorien waren auch in den

hrp36-Experimenten in *C. tentans* untersucht worden [Siebrasse et al., 2012]. Hier wurden die Zeitkonstanten τ für zwei unterschiedliche Moleküle bestimmt, einmal für das Verpackungsprotein hrp36, was als Markierung für die mRNPs diente, zum anderen für den mRNA-Exportfaktor Dbp5. Für beide Moleküle konnte eine gute Anpassung an die Verweilzeiten mit einer Exponentialfunktion erreicht werden. Die daraus abgeleiteten Zeitkonstanten betragen $\tau(\text{Dbp5}) = 54$ ms und $\tau(\text{hrp36}) = 95$ ms. In dieser Arbeit wurde für die Dim2-markierte kleine Untereinheit eine Zeitkonstante $\tau(\text{pre40S})_{ZK} = 15$ ms gemessen. Ein Kontakt auf zytosolischer Seite war also deutlich kürzer als in *C. tentans*. Es könnte sich hierbei um Vorläuferuntereinheiten handeln, die erfolgreich aus dem Kern exportiert wurden. Beim Export der pre-40S-Untereinheit sind an diese noch die sieben Prozessierungsfaktoren Dim1, Nob1, Dim2, Ltv1, Enp1, Rio2 und Tsr1 [Karbstein, 2011] gebunden. Auch ist die rRNA-Prozessierung noch nicht abgeschlossen. Der letzte Schnitt am 3'-Ende der 18S-rRNA wird erst im Zytoplasma von Nob1 durchgeführt, wozu zusätzlich noch die Bindung an eine reife 60S-Untereinheit nötig ist (Kapitel 1.5). Dim2 verlässt die Untereinheit erst nach diesem letzten RNA-Schnitt, sodass diese bis zu diesem Schnitt fluoreszenzmarkiert und damit beobachtbar bleibt. An die zytoplasmatische Seite der Kernmembran schließt sich direkt das ER an, das den Zellkern in mehreren Schichten umhüllt. Zusätzlich ist das ER auch ein Aufenthaltsort der Ribosomen. Das ER stellt somit eine Barriere dar, die die Untereinheit von einer Diffusion ins Zytoplasma abhält, und diese so eventuell zurück zur Kernhülle diffundiert. Die gefundene Zeitkonstante $\tau_{ZK} = 15$ ms zeigt eine sehr kurze Interaktion an, sodass die Interpretation, dass ein zufälliger Kontakt durch Diffusion zustande kommt, sehr wahrscheinlich scheint.

Weiter wurde die Kategorie NV, „nukleoplasmatische Versuche“, genauer betrachtet. In dieser Arbeit wurde nur eine Zeitkonstante für die nukleoplasmatischen Versuche gefunden, diese betrug $\tau(\text{pre40S})_{NV} = 29$ ms. Siebrasse et al. fanden jedoch für die hrp36-markierten mRNPs zwei Zeitkonstanten, $\tau(\text{hrp36})_{NV,1} = 50$ ms (94 %) und $\tau(\text{hrp36})_{NV,2} = 275$ ms (6 %). Die lange Zeitkonstante schrieben sie fehlgeschlagenen Exportversuchen zu, die zwar in einen Erstkontakt mit der Pore kommen, diese jedoch nicht betreten können. Warum in dieser Arbeit keine lange Zeitkonstante gefunden wurde, könnte darin begründet sein, dass die Kategorie NV mit nur 49 Ereignissen sehr klein ist, sodass die mit nur 6 % in *C. tentans* auftretenden Ereignisse noch nicht gefunden wurden. Die kurze Verweilzeit führten Siebrasse et al. auf Versuche zurück, bei denen der mRNP zwar mit der Kernmembran kollidiert, jedoch auf die nicht-transportbefähigte Doppellipidschicht statt einer Kernpore trifft. In HeLa-Zellen sind nur etwa 6 % der Membranfläche Kernporen (Porendichte von 5,1 Poren pro μm^2 mit einer Kernoberfläche von $540 \mu\text{m}^2$ [Ribbeck und Görlich, 2001]), auf die die Vorläuferuntereinheiten durch ungerichtete freie Diffusion auftreffen. Es ist also gut vorstellbar, dass nicht jede Kollision mit der Kernmembran auch eine Interaktion mit einer Kernpore zur Folge hat. Auch die kurze Interaktionszeit spricht gegen Wechselwirkungen von Membran und pre-40S-Untereinheit.

Zuletzt wurden noch die Kategorien betrachtet, die unter Umständen Exporte enthalten könnten. Dies ist zum einen die Kategorie Membran (M), die einzeln betrachtet wurde, wie auch der Pool aus den Kategorien M, Membran-Zytosolisch (MZ) und Nukleoplasmatisch (N). Diese Verweilzeiten können in Relation zu den Zeitkonstanten anderer bekannter Exportereignisse gesetzt werden. Tabelle 5.2 soll hierzu noch einmal einen kurzen Überblick verschaffen (Kapitel 1.7.3).

Tabelle 5.2: Gegenüberstellung der gemessenen Export-Verweilzeiten in unterschiedlichen Studien.

	beobachtete RNA	$\tau_{E,1}$ / ms	$\tau_{E,2}$ / ms	Zeitauflösung
[Grünwald und Singer, 2010]	β -Aktin-MS2	172 ± 3	2000 ± 120	20 ms
[Siebrasse et al., 2012]	(BR-)mRNPs	65 ± 5	350 ± 25	20 ms
[Ma et al., 2013]	β -Aktin-MS2	12 ± 2		2 ms
[Ma et al., 2013]	β -Aktin-MS2	21 ± 1		20 ms
vorliegende Arbeit (M)	pre-40S-SSU	$11 \pm 0,2$	106 ± 6	12,6 ms
vorliegende Arbeit (M, MZ, N)	pre-40S-SSU	$15 \pm 0,3$	65 ± 3	12,6 ms

Mit Ausnahme von [Ma et al., 2013] wurden in allen Untersuchungen zwei Zeitkonstanten gefunden. [Siebrasse et al., 2012] führten dies auf Exportcargos unterschiedlicher Größe zurück, da das zur Markierung verwendete hrp36 Bestandteil aller mRNPs in *C. tentans* ist. Dies könnte hier aufgrund der schlechten Membranlokalisierung in ähnlicher Form ebenfalls der Fall sein. Die kurze Zeitkonstante, die mit 11 ms, bzw. 15 ms, sehr kurz ist, könnte den Import von isoliertem Dim2 in den Kern beschreiben, und die lange Zeitkonstante von 65 ms, bzw. 106 ms, den Export der kleinen Untereinheit. Die Zeitkonstante $\tau_{E,1} = 11$ ms/15 ms passt gut zu den Ergebnissen einer Importstudie von Yang et al.. Hier wurde beobachtet, wie schnell der Import von NLS-2xGFP in HeLa-Zellen erfolgt. Für diesen Import wurde eine Zeitkonstante von $\tau(\text{NLS}) = 8 \pm 0,1$ ms gefunden [Yang und Musser, 2006]. Erstaunlich ist jedoch, dass in dieser Arbeit die kurzen Konstanten einen Anteil von 93 % bzw. 82 % haben. Das Import-Export-Verhältnis müsste bei etwa 1 liegen, denn jedes exportierte Dim2 muss zum nächsten Maturationszyklus auch wieder reimportiert werden. Vermutlich sind in dieser Zeitkonstante also sowohl Importereignisse als auch Membrankontakte von beiden Seiten der Kernhülle überlagert, von denen jedoch der Weg zurück ins Kompartiment nicht aufgenommen werden konnte.

Bleibt nun noch ein Vergleich der gefundenen $\tau_{E,2}$ -Werte. Auffällig ist, dass diese bereits zwischen den verschiedenen Studien stark schwanken, was nur zum Teil mit unterschiedlichen Exportcargos erklärt werden kann, nutzten doch [Grünwald und Singer, 2010] und [Ma et al., 2013] dieselbe β -Aktin-MS2-Fusions-RNA. Das Gewicht eines solchen mRNPs wird in [Ma et al., 2013] mit etwa (4 – 5) MDa angegeben, wovon allein 1,5 MDa auf die 24 angehängten MS2-Schleifen entfallen. Ein solches Partikel hätte einen Durchmesser von etwa 25 nm. Die genaue Größe des in dieser Arbeit als Exportcargo verwendeten pre-40S-Partikels ist nicht bekannt. Die adulte 40S-Untereinheit in *S. cerevisiae* hat zum Vergleich ein Gewicht von 1,2 MDa [Llácer et al., 2015], die pre-40S-rRNA 1,6 MDa [Strunk et al., 2011]. Da die Untereinheit in Säugerzellen mit 1,4 MDa größer ist als die der Hefen [R. H. Garrett, 2017], wird die Vorläuferuntereinheit auf etwa 2 MDa geschätzt und wäre damit in etwa halb so groß wie das β -Aktin-MS2-Konstrukt. Die Zeitkonstante liegt mit $\tau_{E,2} = 65$ ms/106 ms zwischen den 21 ms von [Ma et al., 2013] und den 172 ms von [Grünwald und Singer, 2010], sowie nah an den kurzen $\tau_{E,1}$ -Werten von Siebrasse et al., die kleineren mRNPs zugeordnet wurden. Die beobachteten Ereignisse könnten demnach Exportereignisse sein, die aufgrund der bereits diskutierten Umstände nicht vollständig abgebildet werden konnten.

5.4 Exportmessungen der kleinen ribosomalen Untereinheit bei axialer Membranbetrachtung

Um die Probleme der äquatorialen Exportmessungen zu umgehen, sollte mit Hilfe der astigmatischen PSF-Verzerrung noch eine zweite Mikroskopie-Technik verwendet werden, um Exportereignisse aufnehmen zu können. Dazu wurden zahlreiche neue Skripte und Makros programmiert. Die Softwareseite des Projekts war somit sehr erfolgreich. Es wurden Skripte zur Datenakquise gebraucht, etwa um das Problem der longitudinalen chromatischen Verschiebung durch automatisches Versetzen des Mikroskoptischs um den Versatz zwischen den Aufnahmen in beiden Farbkanälen zu lösen. Weiterhin wurden viele Skripte zur Datenauswertung geschrieben, beispielsweise eine Korrekturroutine, die die Aufnahmen um die x,y-Drift bereinigte.

Auf der experimentellen Seite des Projekts traten viele Probleme auf, die sich jedoch im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nur begrenzt lösen ließen.

5.4.1 Messungen mit TetraSpecks

Die ersten Messungen, die in diesem Projekt durchgeführt wurden, verwendeten als beobachtetes Objekt auf einem Deckglas immobilisierte TetraSpecks einer Größe von $0,5 \mu\text{m}$. Diese Messungen waren durchweg erfolgreich. Die Kalibrationskurve verlief über einen Bereich von einem Mikrometer linear. Durch die gleichmäßige Verzerrung der Beads, sowohl über, als auch unter der Fokusebene, konnte aus den rekonstruierten Höhen eine axiale Lokalisierungsgenauigkeit von 31 nm erzielt werden. Da eine Kernpore eine Ausdehnung von etwa 165 nm inklusive Korb und Filamenten hat, ist diese Lokalisierungsgenauigkeit ausreichend, um ihre Position festzulegen.

Um die geplanten *in vivo*-Messungen besser nachzustellen, wurden nach dem erfolgreichen Verlaufen der ersten Tests TetraSpecks mit einer Größe von $0,1 \mu\text{m}$ in Agarose eingegossen. Dies brachte neue Schwierigkeiten mit sich, die zusammen in einer Abnahme der axialen Lokalisierungsgenauigkeit resultierten. Diese betrug in den Experimenten nur noch $\sigma_z = 85 \text{ nm}$ im roten und $\sigma_z = 65 \text{ nm}$ im blauen Kanal, was eine Positionierung der Pore noch ermöglicht. An dieser Stelle wurde jedoch deutlich, dass das Projekt mit dem zusätzlichen Problem der chromatischen longitudinalen Verschiebung sehr schwierig werden würde.

5.4.2 Messungen *in vivo*

Trotz den – durch die Messungen von $0,1 \mu\text{m}$ -großen TetraSpecks in Agarose absehbaren – Schwierigkeiten wurde noch die *in vivo*-Messung durchgeführt. Auch hier konnte bestätigt werden, dass die Softwareseite des Projekts funktional ist, da Datenakquise und -auswertung ohne Probleme durchgeführt werden konnten.

5.4.2.1 Aufnahmen der Einzelmoleküle im roten Kanal

Das Problem des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses im roten Kanal, in dem die Bewegung der SSU verfolgt werden sollte, verschlechterte sich im Vergleich zu den Messungen von TetraSpecks in Agarose nochmals. Es konnte gezeigt werden, dass die Verfolgung einer Trajektorie prinzipiell möglich ist, jedoch war auch hier eine hohe Unsicherheit in der Bestimmung der axialen Position der pre-Untereinheit festzustellen. Um eine bessere axiale Lokalisierungsgenauigkeit zu erreichen, wäre es nötig, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern, da sich bereits kleine Schwankungen massiv auf die Anpassung der elliptischen Gaußverteilung auswirken. Hier wären verschiedene Möglichkeiten denkbar. Zum einen verbessert sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis, wenn die Vergrößerung reduziert wird. Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit 60x2,5x1,5-facher Vergrößerung aufgenommen, da so die beste Verzerrung der PSF erreicht werden konnte. Man könnte jedoch auf die 1,5x Vorvergrößerung verzichten und stattdessen weitere Zylinderlinsen anderer Brennweiten ausprobieren, um auch so eine hinreichend gute Verzerrung zu erreichen. Alternativ wäre auch der Einsatz einer anderen Kamera denkbar. Vorhanden wäre neben der in dieser Arbeit verwendeten iXON-897D (512x512 Pixel, 16x16 μm^2 Pixelgröße) auch das Modell iXon-DV8 (128x128 Pixel, 24x24 μm^2 Pixelgröße). Auch hier ist die Helligkeit pro Pixel aufgrund ihrer größeren Fläche höher. Weiterhin hätte diese Kamera aufgrund der reduzierten Pixelzahl den Vorteil, Aufnahmen mit höheren Bildfrequenzen zu ermöglichen.

Eine weitere Möglichkeit, das Signal-zu-Rausch-Verhältnis anzuheben, läge in der Verbesserung der Markierung. Da auf jeder gefärbten pre-40S-Einheit genau ein Dim2 mit genau einem Snap-Farbstoff sitzt, könnte man die Helligkeit durch das Einsetzen einer weiteren Snap-Einheit, an die ein zweiter Farbstoff binden könnte, anheben. Wie jedoch bereits in Kapitel 5.1.3 besprochen wurde, ist eine Snap-Untereinheit fast genauso groß wie ein Dim2, sodass dies eine erhebliche Vergrößerung des Fusionsproteins nach sich ziehen würde. Hier wäre eine genaue Untersuchung der Funktionalität des Proteins vonnöten. Zusätzlich brächte der geringe Markierungsgrad, der zur Einzelmolekülverfolgung nötig ist, mit sich, dass statistisch wohl nur in einem Bruchteil der Untereinheiten beide Snap-Farbstoffe markiert wären, während bei einem Großteil der Partikel das Problem bestehen bliebe.

5.4.2.2 Aufnahmen der Kernporen

Das größte Problem bei der Durchführung *in vivo* war jedoch die Porenmarkierung bzw. die Porendichte. Dadurch, dass durch die Mikroinjektion von AF488-NTF2 alle Kernporen markiert werden, sitzen die Poren in der Kernmembran zu dicht, um die Poren einzeln aufzulösen. Auch wenn man visuell die meisten Poren eindeutig identifizieren kann, ist es nicht mehr möglich, eine verlässliche elliptische Gaußverteilung an die Intensitätsverteilung einer einzelnen Pore anzupassen. Da sich die Intensitätsverteilungen der einzelnen Poren durch die räumliche Nähe überlagern, kann somit die exakte Höhe einer Pore nicht bestimmt werden. Ein Versuch, die Poren durch geringere Injektion von NTF2 zu vereinzeln, schlug fehl. Dies liegt daran, dass NTF2 nicht stabil an eine Pore bindet, sondern dauernd mit verschiedenen Transportvorgängen die Kernpore passiert. Durch die geringere Injektionsmenge wurden also weiterhin alle Poren gefärbt, verloren jedoch an Intensität,

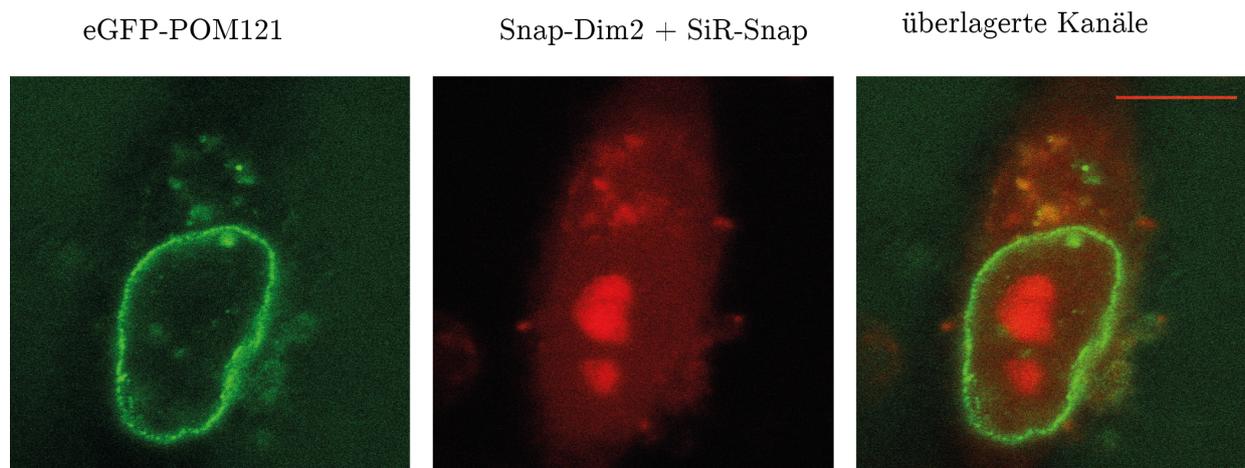


Abbildung 5.5: *Tranfektion von HeLa-POM121 mit pQCXIP-Snap-Dim2. Die Kolokalisation zeigt, dass sich beide homolog exprimierte Fusionsproteine an der erwarteten Position in der Zelle befinden. Der Maßstabsbalken beträgt 10 μm .*

was das Problem noch weiter verstärkte. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu lösen, wäre ein gentechnischer Ansatz. Statt die Poren mit mikroinjiziertem NTF2 zu markieren, besteht die Möglichkeit, eGFP-POM121 zu verwenden. Dass dies auch als Doppelmarkierung mit Snap-Dim2 möglich ist, konnte mit Elektroporationsexperimenten gezeigt werden (Abbildung 5.5). Hierbei handelte es sich jedoch nur um den prinzipiellen Nachweis dieser Möglichkeit, bei der die Zelllinie HeLa-POM121 verwendet wurde. Diese Zelllinie exprimiert eGFP-POM121 und weist dementsprechend gefärbte Kernporen auf. In diese Zelllinie wurde der das Fusionsprotein tragende Vektor eingebracht, sodass nun zusätzlich eine Überexpression von Snap-Dim2 vorlag. Da jedoch mit FRAP-Experimenten gezeigt wurde, dass eine Überexpression von Dim2 zu einer Überschätzung der Mobilität führt, konnten die so erzeugten Zellen nicht für die Einzelmolekülmessungen herangezogen werden. Der gentechnische Ansatz, POM121 umzuklonieren, sodass dieser Vektor in die induzierbare HeLa-Zelllinie mit kontrolliertem Dim2-Expressionslevel eingebracht werden konnte, konnte aus Zeitmangel nicht mehr umgesetzt werden. Wenn es gelänge, das eGFP-POM121 darüber hinaus unter Kontrolle eines induzierbaren Promoters in das Genom der Zelle einzubauen, statt eine Überexpression durchzuführen, könnten möglicherweise weniger Poren markiert sein – diese wären dann allerdings aus statistischen Gründen wohl deutlich dunkler, da nicht mehr alle acht POM121 einer Pore mit einem GFP markiert wären. Eine noch größere Kontrolle über den Markierungsgrad würde man erreichen, wenn anstelle der eGFP-Markierung ein nicht-fluoreszierendes Tag, wie ein Clip- oder Halo-Tag, verwendet würde. Somit wären alle Kernporen grundsätzlich nicht-fluoreszent. Nun könnte man, analog zu den Aufnahmen der Dim2-Moleküle, den zugehörigen Farbstoff nur auf Einzelmolekülebene einsetzen. So sollte es möglich sein, die Poren einzeln aufzulösen. Auch so sind jedoch nur sehr schwach angefärbte Poren möglich. Eine alternativ denkbare Verbesserung wäre, die Auflösung zu erhöhen statt die Poren zu vereinzeln. Dies könnte erreicht werden, indem die Porenaufnahme anstelle der HILO-Beleuchtung mit einem konfokalen Mikroskop erfolgt. Hier sind für die praktische Ausführung mehrere Varianten denkbar. So könnte das von [Baumgart und Kubitscheck, 2012] eingeführte konfokale Lichtscheiben-Mikroskop verwendet werden, wenn die Zellen statt auf einem Glasboden z.B. auf

Beads wachsen würden. Eine anderweitige Möglichkeit wäre, ein kombiniertes Mikroskop zu bauen, in dem Kanal 1 mit einem Pinhole und Detektor konfokal, und Kanal 2 mit einer Kamera mit HILO-Beleuchtung aufgenommen wird. Da bei beiden Techniken sowohl der Anregungs- als auch der Detektionsstrahlengang durch dasselbe Objektiv erfolgt, dürfte dies mit überschaubarem technischen Aufwand zu realisieren sein.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Am Ende der Einleitung wurde die Motivation und Fragestellungen dieser Arbeit ausgearbeitet. Die Fragestellungen sollen an dieser Stelle nochmals aufgegriffen und auf ihren Erfolg hin überprüft werden.

- Was ist die intranukleäre Mobilität von Dim2? Können unterschiedliche Mobilitäten festgestellt werden?

Die Mobilität kann mit drei unterschiedlich mobilen Komponenten beschrieben werden. Es gibt eine frei diffundierende Komponente, eine retardierte Komponente sowie eine immobile Komponente. Alle drei Komponenten konnten sowohl im Nukleolus als auch im Nukleoplasma gefunden werden, es verschob sich jedoch der Anteil der jeweiligen Fraktionen. Während im Nukleolus ein Großteil der Partikel immobil waren, sind im Nukleoplasma 60 % aller Partikel mobil. Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung an die Mobilität der Partikel, die auf Grundlage des bis dato bekannten Ablaufs der Biogenese gemacht wurde.

- Können durch die Mobilität Aussagen zu Bindungsstellen im Kern getroffen werden?

Der Anteil an immobilen Partikeln im Nukleolus beträgt 65 % und ist auf die rRNA-Transkription sowie frühe Maturierungsschritte zurückzuführen. Im Nukleoplasma beträgt der Anteil an immobilen Partikeln nur etwa 35 %. Bei der Analyse der Dauer, die ein Partikel in einer immobilen Phase verbringt, ergab sich, dass Immobilisierungen von nur ein oder zwei Bildern im Nukleoplasma häufiger auftraten als im Nukleolus, während hier längere Immobilisierungszeiten öfter anzutreffen waren.

- Wie lange dauert der Export der pre-40S-Untereinheiten?

Im Zuge dieser Arbeit gelang es nicht, einen kompletten Exportprozess zu beobachten. Durch die schlechte Lokalisierung der Membranposition war eine eindeutige Zuordnung der Partikel zu einem Kernkompartiment nicht möglich. Es wurden jedoch Trajektorien beobachtet, die vermutlich Teilschritte eines Exports abbilden. Diese Trajektorien wurden genauer untersucht. Eine Analyse der Verweilzeiten und der anschließende Vergleich dieser Zeiten mit Exportzeiten aus anderen Untersuchungen lässt so mit Einschränkungen Schlüsse zu. Gefunden wurden zwei Zeitkonstanten an der Kernhülle. Die kurze Zeitkonstante τ_1 ist vermutlich Importen und abgebrochenen Exportversuchen zuzuordnen. Die längere Zeitkonstante τ_2 könnte Exportereignisse repräsentieren. Um dies weiter zu untersuchen, bieten sich mehrere Möglichkeiten an. Eine Möglichkeit wäre, die Belichtungszeit noch weiter zu reduzieren und so die Aufnahmefrequenz zu erhöhen. Hierdurch könnte die Beobachtung des Andockens und Ablösens des Partikels von der Kernpore leichter zu realisieren sein. Zusätzlich muss unbedingt eine Verbesserung der Qualität der Membranaufnahme erreicht werden, um so eine bessere Lokalisierung der Kernhülle und damit verbunden eine bessere Zuordnung der Partikel zu einem Kernkompartiment zu erreichen.

- Wie verhalten sie die Verweilzeiten an der Membran zu Ergebnissen anderer Transportstudien?

Die Zeitkonstante von potentiellen rRNA-Exportprozessen lag in dieser Arbeit bei $\tau_2(M, MZ, N) = 65$ ms bzw. $\tau_2(M) = 106$ ms. Von [Siebrasse et al., 2012] wurden in *C. tentans* zwei Export-Zeitkonstanten von 65 ms und 350 ms gefunden. Die Zeitkonstanten liegen also in beiden Arbeiten in einer ähnlichen Größenordnung. [Grünwald und Singer, 2010] fanden eine Zeitkonstante von 172 ms und eine sehr lange von 2000 ms, wobei das dort beobachtete β -Aktin-MS2-Konstrukt zum einen größer, und zum anderen mit mehr Farbstoffen beladen ist, sodass eine längere Exportdauer nicht unwahrscheinlich ist. Auch die potentiellen Importe der kurzen Zeitkonstante $\tau_1(M, MZ, N) = 15$ ms bzw. $\tau_1(M) = 11$ ms ähneln der Exportstudie von [Yang und Musser, 2006]. Diese fanden für den Import eine Zeitkonstante von 8 ms.

- Ist es möglich, die pre-40S-Untereinheit nach dem Export weiter im Zytoplasma zu verfolgen?

Dies konnte nicht erreicht werden. Zum einen lag dies daran, dass kein Export beobachtet werden konnte, zum anderen jedoch auch an den zur Exportbeobachtung gemachten Aufnahmen. Da schnell klar wurde, dass die Beobachtung eines Exportprozesses schwierig werden würde, wurde bei den Aufnahmen das Augenmerk darauf gelegt, einen möglichst großen Abschnitt der Kernmembran in den Bildausschnitt zu legen, um so die Anzahl der beobachteten Poren zu erhöhen. Dadurch rutschte die Kernmembran jedoch nah an den Rand des Bilds, wodurch Untereinheiten, die sich von der Kernhülle wegbewegten, oft nach einem Bild bereits aus dem Sichtfeld verschwunden waren. Wenn eine Verbesserung der Qualität der Membranaufnahme möglich wäre, beispielsweise durch die gentechnische Markierung von Poren mit POM-121-eGFP, könnte auf die Maximierung der Membranstrecke verzichtet werden. Durch die verbesserte Membranlokalisierung könnten Exporte leichter beobachtet werden, und die anschließende Diffusion ins ER oder Zytoplasma könnte verfolgt werden.

Anhang

Tabelle A.1: Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Fehlern im Nukleoplasma in drei unterschiedlichen Analysen. Alle Diffusionskoeffizienten sind in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben. Die zugehörigen jeweiligen relativen Anteile finden sich in Tabelle 4.1.

Methode	K	D_f	\pm	$D_{r,1}$	\pm	$D_{r,2}$	\pm
SWA	3	2,3	0,3			0,31	0,03
vbSPT	3	2,75	0,04			0,363	0,005
vbSPT	6	3,74	0,08	1,10	0,01	0,363	0,007
Methode	K	$D_{r,3}$	\pm	$D_{i,1}$	\pm	$D_{i,2}$	\pm
SWA	3			0,054	0,004		
vbSPT	3			0,0596	0,0007		
vbSPT	6	0,218	0,005	0,096	0,002	0,0412	0,0007

Tabelle A.2: Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Fehlern im Nukleolus in drei unterschiedlichen Analysen. Alle Diffusionskoeffizienten sind in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben. Die zugehörigen jeweiligen relativen Anteile finden sich in Tabelle 4.2.

Methode	K	D_f	\pm	$D_{r,1}$	\pm	$D_{r,2}$	\pm	$D_{i,1}$	\pm	$D_{i,2}$	\pm
SWA	3	2,3				0,31				0,054	
vbSPT	3	2,03	0,05			0,178	0,002			0,0379	0,0004
vbSPT	5	5,1	0,2	0,73	0,02	0,247	0,004	0,0809	0,0009	0,0275	0,0003

Tabelle A.3: Diffusion von Dextranen in HeLa-Zellkernen. Diffusionskoeffizienten mit Fehler in den einzelnen Anpassungen. Alle Diffusionskoeffizienten sind in $\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$ angegeben. Die zugehörigen jeweiligen relativen Anteile finden sich in Tabelle 4.4.

Methode	K	D_f	\pm	$D_{r,1}$	\pm	$D_{r,2}$	\pm	$D_{r,3}$	\pm
SWA	2	2,8	0,1	0,50	0,004				
SWA	3	3,1	0,1	0,72	0,08	0,16	0,04		
vbSPT	2	2,37	0,01	0,360	0,004				
vbSPT	3	2,57	0,02	0,94	0,01	0,260	0,004		
vbSPT	4	2,59	0,02	1,17	0,02	0,498	0,008	0,203	0,004

Literaturverzeichnis

- [Adam et al., 1990] Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *The Journal of cell biology*, 111:807–816.
- [Albert et al., 2012] Albert, B., Perez-Fernandez, J., Léger-Silvestre, I., and Gadad, O. (2012). Regulation of ribosomal RNA production by RNA polymerase I: Does elongation come first? *Genet Res Int*, 2012:276948.
- [Alberts et al., 2002] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- [Amineva et al., 2011] Amineva, S. P., Aminev, A. G., Gern, J. E., and Palmenberg, A. C. (2011). Comparison of rhinovirus A infection in human primary epithelial and HeLa cells. *The Journal of general virology*, 92:2549–2557.
- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16:1055–1069.
- [Baumgart und Kubitscheck, 2012] Baumgart, E. and Kubitscheck, U. (2012). Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Optics express*, 20:21805–21814.
- [Birnstiel et al., 1966] Birnstiel, M. L., Wallace, H., Sirlin, J. L., and Fischberg, M. (1966). Localization of the ribosomal DNA complements in the nucleolar organizer region of *Xenopus laevis*. *National Cancer Institute monograph*, 23:431–447.
- [Björk und Wieslander, 2011] Björk, P. and Wieslander, L. (2011). Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma*, 120:23–38.
- [Boisvert et al., 2007] Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7):574–585.
- [Brangwynne et al., 2011] Brangwynne, C. P., Mitchison, T. J., and Hyman, A. A. (2011). Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:4334–4339.
-

- [Brown und Gurdon, 1964] Brown, D. D. and Gurdon, J. B. (1964). Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51:139–146.
- [Buxbaum et al., 2015] Buxbaum, A. R., Haimovich, G., and Singer, R. H. (2015). In the right place at the right time: Visualizing and understanding mRNA localization. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16:95–109.
- [Campbell und Karbstein, 2011] Campbell, M. G. and Karbstein, K. (2011). Protein-protein interactions within late pre-40S ribosomes. *PLoS One*, 6(1):e16194.
- [Chaker-Margot et al., 2015] Chaker-Margot, M., Hunziker, M., Barandun, J., Dill, B. D., and Klinge, S. (2015). Stage-specific assembly events of the 6-MDa small-subunit processome initiate eukaryotic ribosome biogenesis. *Nature structural & molecular biology*, 22:920–923.
- [Cussler, 1997] Cussler (1997). *Diffusion Mass Transfer in Fluid Systems*. Cambridge University Press.
- [Daneholt, 2001] Daneholt, B. (2001). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7012–7017.
- [D’Angelo et al., 2009] D’Angelo, M. A., Raices, M., Panowski, S. H., and Hetzer, M. W. (2009). Age-dependent deterioration of nuclear pore complexes causes a loss of nuclear integrity in postmitotic cells. *Cell*, 136(2):284–295.
- [de la Cruz et al., 2015] de la Cruz, J., Karbstein, K., and Woolford, J. L. (2015). Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annual review of biochemistry*, 84:93–129.
- [Dejgaard et al., 1994] Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H. H., Madsen, P., Kruse, T. A., Gesser, B., Nielsen, H., and Celis, J. E. (1994). Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *Journal of molecular biology*, 236:33–48.
- [Dutca et al., 2011] Dutca, L. M., Gallagher, J. E. G., and Baserga, S. J. (2011). The initial U3 snoRNA:pre-rRNA base pairing interaction required for pre-18S rRNA folding revealed by in vivo chemical probing. *Nucleic Acids Res*, 39(12):5164–5180.
- [Fischer et al., 2004] Fischer, H., Polikarpov, I., and Craievich, A. F. (2004). Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci*, 13(10):2825–2828.
- [Fischer et al., 2015] Fischer, U., Schäuble, N., Schütz, S., Altvater, M., Chang, Y., Faza, M. B., and Panse, V. G. (2015). A non-canonical mechanism for Crm1-export cargo complex assembly. *eLife*, 4.
- [Fromont-Racine et al., 2003] Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, 313:17–42.
-

- [Goodfellow und Zomerdijk, 2013] Goodfellow, S. J. and Zomerdijk, J. C. B. M. (2013). Basic mechanisms in RNA polymerase I transcription of the ribosomal RNA genes. *Subcell Biochem*, 61:211–236.
- [Goryaynov et al., 2012] Goryaynov, A., Ma, J., and Yang, W. (2012). Single-molecule studies of nucleocytoplasmic transport: From one dimension to three dimensions. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 4:10–21.
- [Grünwald und Singer, 2010] Grünwald, D. and Singer, R. H. (2010). In vivo imaging of labelled endogenous beta-actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 467(7315):604–607.
- [Grob et al., 2014] Grob, A., Colleran, C., and McStay, B. (2014). Construction of synthetic nucleoli in human cells reveals how a major functional nuclear domain is formed and propagated through cell division. *Genes & development*, 28:220–230.
- [Hartwick und Wimberly, 2017] Hartwick, E. W. and Wimberly, B. T. (2017). Resolving late-stage intermediates of eukaryotic ribosome assembly. *Structure (London, England : 1993)*, 25:216–218.
- [Henras et al., 2015] Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O’Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 6:225–242.
- [Herce et al., 2014] Herce, H. D., Garcia, A. E., and Cardoso, M. C. (2014). Fundamental molecular mechanism for the cellular uptake of guanidinium-rich molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 136:17459–17467.
- [Hernandez-Verdun et al., 2010] Hernandez-Verdun, D., Roussel, P., Thiry, M., Sirri, V., and Lafontaine, D. L. J. (2010). The nucleolus: Structure/function relationship in RNA metabolism. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 1:415–431.
- [Hollingworth et al., 2012] Hollingworth, D., Candel, A. M., Nicastro, G., Martin, S. R., Briata, P., Gherzi, R., and Ramos, A. (2012). KH domains with impaired nucleic acid binding as a tool for functional analysis. *Nucleic acids research*, 40:6873–6886.
- [Huang et al., 2008] Huang, B., Wang, W., Bates, M., and Zhuang, X. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864):810–813.
- [Invitrogen, 2012] Invitrogen (2012). *Flp-In T-REX Core Kit*, 1 edition.
- [Ishikawa et al., 2017] Ishikawa, H., Yoshikawa, H., Izumikawa, K., Miura, Y., Taoka, M., Nobe, Y., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Simpson, R. J., Isobe, T., and Takahashi, N. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease regulates the processing of small-subunit rRNAs in human cells. *Nucleic acids research*, 45:3437–3447.
- [Ivanković et al., 2007] Ivanković, M., Cukusić, A., Gotić, I., Skrobot, N., Matijasić, M., Polancec, D., and Rubelj, I. (2007). Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, 8:163–172.
-

- [Jia et al., 2007] Jia, M. Z., Ohtsuka, J., Lee, W. C., Nagata, K., and Tanokura, M. (2007). Crystal structure of Dim2p: a preribosomal RNA processing factor, from *Pyrococcus horikoshii* OT3 at 2.30 Å. *Proteins*, 69:428–432.
- [Johnson et al., 2017] Johnson, M. C., Ghalei, H., Doxtader, K. A., Karbstein, K., and Stroupe, M. E. (2017). Structural heterogeneity in pre-40S ribosomes. *Structure (London, England : 1993)*, 25:329–340.
- [Kao und Verkman, 1994] Kao, H. P. and Verkman, A. S. (1994). Tracking of single fluorescent particles in three dimensions: Use of cylindrical optics to encode particle position. *Biophysical journal*, 67:1291–1300.
- [Karbstein, 2011] Karbstein, K. (2011). Inside the 40S ribosome assembly machinery. *Current opinion in chemical biology*, 15:657–663.
- [Keppler et al., 2004] Keppler, A., Kindermann, M., Gendreizig, S., Pick, H., Vogel, H., and Johnson, K. (2004). Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods (San Diego, Calif.)*, 32:437–444.
- [Kiseleva et al., 1996] Kiseleva, E., Goldberg, M. W., Daneholt, B., and Allen, T. D. (1996). RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket. *Journal of molecular biology*, 260:304–311.
- [Källberg et al., 2012] Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., and Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature protocols*, 7:1511–1522.
- [Kubitscheck et al., 2005] Kubitscheck, U., Grünwald, D., Hoekstra, A., Rohleder, D., Kues, T., Siebrasse, J. P., and Peters, R. (2005). Nuclear transport of single molecules: Dwell times at the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 168(2):233–243.
- [Kubitscheck et al., 1996] Kubitscheck, U., Wedekind, P., Zeidler, O., Grote, M., and Peters, R. (1996). Single nuclear pores visualized by confocal microscopy and image processing. *Biophys J*, 70(5):2067–2077.
- [Landry et al., 2013] Landry, J. J. M., Pyl, P. T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M. M., Stütz, A. M., Jauch, A., Aiyar, R. S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J. O., Huber, W., and Steinmetz, L. M. (2013). The genomic and transcriptomic landscape of a HeLa cell line. *G3 (Bethesda, Md.)*, 3:1213–1224.
- [Larburu et al., 2016] Larburu, N., Montellese, C., O’Donohue, M.-F., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and Plisson-Chastang, C. (2016). Structure of a human pre-40S particle points to a role for RACK1 in the final steps of 18S rRNA processing. *Nucleic acids research*, 44:8465–8478.
- [Liang und Fournier, 1997] Liang, W. Q. and Fournier, M. J. (1997). Synthesis of functional eukaryotic ribosomal RNAs in trans: development of a novel in vivo rDNA system for dissecting
-

- ribosome biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94:2864–2868.
- [Llácer et al., 2015] Llácer, J. L., Hussain, T., Marler, L., Aitken, C. E., Thakur, A., Lorsch, J. R., Hinnebusch, A. G., and Ramakrishnan, V. (2015). Conformational differences between open and closed states of the eukaryotic translation initiation complex. *Molecular cell*, 59:399–412.
- [Lättig-Tünnemann et al., 2011] Lättig-Tünnemann, G., Prinz, M., Hoffmann, D., Behlke, J., Palm-Apergi, C., Morano, I., Herce, H. D., and Cardoso, M. C. (2011). Backbone rigidity and static presentation of guanidinium groups increases cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Nat Commun*, 2:453.
- [Lukinavičius et al., 2013] Lukinavičius, G., Umezawa, K., Olivier, N., Honigsmann, A., Yang, G., Plass, T., Mueller, V., Reymond, L., Corrêa, Jr, I. R., Luo, Z.-G., Schultz, C., Lemke, E. A., Heppenstall, P., Eggeling, C., Manley, S., and Johnsson, K. (2013). A near-infrared fluorophore for live-cell super-resolution microscopy of cellular proteins. *Nat Chem*, 5(2):132–139.
- [Ma et al., 2013] Ma, J., Liu, Z., Michelotti, N., Pitchiaya, S., Veerapaneni, R., Androsavich, J. R., Walter, N. G., and Yang, W. (2013). High-resolution three-dimensional mapping of mRNA export through the nuclear pore. *Nature communications*, 4:2414.
- [Macville et al., 1999] Macville, M., Schröck, E., Padilla-Nash, H., Keck, C., Ghadimi, B. M., Zimonjic, D., Popescu, N., and Ried, T. (1999). Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer research*, 59:141–150.
- [Marko, 2012] Marko, J. F. (2012). The liquid drop nature of nucleoli. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 3:115–117.
- [Maul et al., 1972] Maul, G. G., Maul, H. M., Scogna, J. E., Lieberman, M. W., Stein, G. S., Hsu, B. Y., and Borun, T. W. (1972). Time sequence of nuclear pore formation in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes and in HeLa cells during the cell cycle. *J Cell Biol*, 55(2):433–447.
- [McCann und Baserga, 2014] McCann, K. L. and Baserga, S. J. (2014). Driving nucleolar assembly. *Genes & development*, 28:211–213.
- [McCaughan et al., 2016] McCaughan, U. M., Jayachandran, U., Shchepachev, V., Chen, Z. A., Rappsilber, J., Tollervey, D., and Cook, A. G. (2016). Pre-40S ribosome biogenesis factor Tsr1 is an inactive structural mimic of translational GTPases. *Nature communications*, 7:11789.
- [Merwin et al., 2014] Merwin, J. R., Bogar, L. B., Poggi, S. B., Fitch, R. M., Johnson, A. W., and Lycan, D. E. (2014). Genetic analysis of the ribosome biogenesis factor Ltv1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 198:1071–1085.
- [Meyer et al., 2016] Meyer, B., Wurm, J. P., Sharma, S., Immer, C., Pogoryelov, D., Kötter, P., Lafontaine, D. L. J., Wöhnert, J., and Entian, K.-D. (2016). Ribosome biogenesis factor Tsr3 is the aminocarboxypropyl transferase responsible for 18S rRNA hypermodification in yeast and humans. *Nucleic acids research*, 44:4304–4316.
-

- [Montellese et al., 2017] Montellese, C., Montel-Lehry, N., Henras, A. K., Kutay, U., Gleizes, P.-E., and O'Donohue, M.-F. (2017). Poly(A)-specific ribonuclease is a nuclear ribosome biogenesis factor involved in human 18S rRNA maturation. *Nucleic acids research*.
- [Mortensen et al., 2010] Mortensen, K. I., Churchman, L. S., Spudich, J. A., and Flyvbjerg, H. (2010). Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nature methods*, 7:377–381.
- [Mullineux und Lafontaine, 2012] Mullineux, S.-T. and Lafontaine, D. L. J. (2012). Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie*, 94:1521–1532.
- [Oliver, 1971] Oliver, D. R. (1971). Life history of the chironomidae. *Annu. Rev. Entomol.*, 16:211–230.
- [Ori et al., 2013] Ori, A., Banterle, N., Iskar, M., Andrés-Pons, A., Escher, C., Khanh Bui, H., Sparks, L., Solis-Mezarino, V., Rinner, O., Bork, P., Lemke, E. A., and Beck, M. (2013). Cell type-specific nuclear pores: A case in point for context-dependent stoichiometry of molecular machines. *Mol Syst Biol*, 9:648.
- [Ovesný et al., 2014] Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Svindrych, Z., and Hagen, G. M. (2014). ThunderSTORM: A comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30:2389–2390.
- [Peña et al., 2016] Peña, C., Schütz, S., Fischer, U., Chang, Y., and Panse, V. G. (2016). Prefabrication of a ribosomal protein subcomplex essential for eukaryotic ribosome formation. *eLife*, 5.
- [Persson et al., 2013] Persson, F., Lindén, M., Unoson, C., and Elf, J. (2013). Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nat Methods*, 10(3):265–269.
- [Phipps et al., 2011] Phipps, K. R., Charette, J. M., and Baserga, S. J. (2011). The small subunit processome in ribosome biogenesis—progress and prospects. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 2:1–21.
- [Popov et al., 2013] Popov, A., Smirnov, E., Kováčik, L., Raška, O., Hagen, G., Stixová, L., and Raška, I. (2013). Duration of the first steps of the human rRNA processing. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 4:134–141.
- [Qian und Chen, 2010] Qian, Y. and Chen, X. (2010). Tumor suppression by p53: Making cells senescent. *Histology and histopathology*, 25:515–526.
- [R. H. Garrett, 2017] R. H. Garrett, C. M. G. (2017). *Biochemistry*. 6 edition.
- [Raices und D'Angelo, 2012] Raices, M. and D'Angelo, M. A. (2012). Nuclear pore complex composition: A new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13:687–699.
-

- [Ribbeck und Görlich, 2001] Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J*, 20(6):1320–1330.
- [Ribbeck et al., 1998] Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., and Görlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *The EMBO journal*, 17:6587–6598.
- [Royant und Noirclerc-Savoye, 2011] Royant, A. and Noirclerc-Savoye, M. (2011). Stabilizing role of glutamic acid 222 in the structure of Enhanced Green Fluorescent Protein. *Journal of structural biology*, 174:385–390.
- [Sambrook und Russel, 2001] Sambrook, J. and Russel, D. (2001). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [Sardana et al., 2013] Sardana, R., White, J. P., and Johnson, A. W. (2013). The rRNA methyltransferase Bud23 shows functional interaction with components of the SSU processome and RNase MRP. *RNA (New York, N.Y.)*, 19:828–840.
- [Saxton, 2007] Saxton, M. J. (2007). A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. I. Qualitative model. *Biophys J*, 92(4):1178–1191.
- [Saxton und Jacobson, 1997] Saxton, M. J. and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26:373–399.
- [Schäfer et al., 2006] Schäfer, T., Maco, B., Petfalski, E., Tollervey, D., Böttcher, B., Aebi, U., and Hurt, E. (2006). Hrr25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature*, 441(7093):651–655.
- [Schmitt et al., 2009] Schmitt, S., Mollwitz, B., Pojer, F., Bannwarth, M., Schiltz, M., and Johnson (2009). Crystal structure of SNAP-tag PDB ID: 3KZY.
- [Siebrasse et al., 2012] Siebrasse, J. P., Kaminski, T., and Kubitscheck, U. (2012). Nuclear export of single native mRNA molecules observed by light sheet fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109:9426–9431.
- [Sirri et al., 2008] Sirri, V., Urcuqui-Inchima, S., Roussel, P., and Hernandez-Verdun, D. (2008). Nucleolus: The fascinating nuclear body. *Histochemistry and cell biology*, 129:13–31.
- [Sloan et al., 2013] Sloan, K. E., Mattijssen, S., Lebaron, S., Tollervey, D., Pruijn, G. J. M., and Watkins, N. J. (2013). Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology*, 200:577–588.
- [Spille, 2013] Spille, J.-H. (2013). *Three-dimensional single particle tracking in a light sheet microscope*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Spille und Kubitscheck, 2015] Spille, J.-H. and Kubitscheck, U. (2015). Labelling and imaging of single endogenous messenger RNA particles in vivo. *Journal of cell science*, 128:3695–3706.
-

- [Strunk et al., 2011] Strunk, B. S., Loucks, C. R., Su, M., Vashisth, H., Cheng, S., Schilling, J., Brooks, C. L., Karbstein, K., and Skiniotis, G. (2011). Ribosome assembly factors prevent premature translation initiation by 40S assembly intermediates. *Science (New York, N.Y.)*, 333:1449–1453.
- [Tafforeau et al., 2013] Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamato-poulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D. L. J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of pre-rRNA processing factors. *Mol Cell*, 51(4):539–551.
- [The Mathworks, Inc., 2014] The Mathworks, Inc. (2014). *MATLAB version 8.4.0 (R2014b)*.
- [ThermoFisher, 2013] ThermoFisher (2013). *GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit*, 4 edition.
- [Thiry und Lafontaine, 2005] Thiry, M. and Lafontaine, D. L. J. (2005). Birth of a nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*, 15(4):194–199.
- [Tokunaga et al., 2008] Tokunaga, M., Imamoto, N., and Sakata-Sogawa, K. (2008). Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature methods*, 5:159–161.
- [Tschochner und Hurt, 2003] Tschochner, H. and Hurt, E. (2003). Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol*, 13(5):255–263.
- [Tyagi, 2009] Tyagi, S. (2009). Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nature methods*, 6:331–338.
- [Vanrobays et al., 2008] Vanrobays, E., Leplus, A., Osheim, Y. N., Beyer, A. L., Wacheul, L., and Lafontaine, D. L. J. (2008). TOR regulates the subcellular distribution of DIM2, a KH domain protein required for cotranscriptional ribosome assembly and pre-40S ribosome export. *RNA*, 14(10):2061–2073.
- [Veenendaal, 2013] Veenendaal, A. (2013). *Untersuchung der Dynamik von Transportrezeptoren an der Kernpore mittels kontrastverstärkter Einzelmolekül-Fluoreszenzmikroskopie*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- [Veith, 2011] Veith, R. (2011). *Mobilität endogener mRNA im chromatinfreien Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von Chironomus tentans*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- [Veith et al., 2010] Veith, R., Sorkalla, T., Baumgart, E., Anzt, J., Häberlein, H., Tyagi, S., Siebrasse, J. P., and Kubitscheck, U. (2010). Balbiani ring mRNPs diffuse through and bind to clusters of large intranuclear molecular structures. *Biophys J*, 99(8):2676–2685.
- [Woolls, 2011] Woolls, H. A. (2011). *Shining Light On Dim2: Dissectione the Roles of an RNA-Binding Protein in Ribosomal Small Subunit Assembly*. Dissertation, University of Michigan.
-

- [Woolls et al., 2011] Woolls, H. A., Lamanna, A. C., and Karbstein, K. (2011). Roles of Dim2 in ribosome assembly. *J Biol Chem*, 286(4):2578–2586.
- [Wyler et al., 2011] Wyler, E., Zimmermann, M., Widmann, B., Gstaiger, M., Pfannstiel, J., Kutay, U., and Zemp, I. (2011). Tandem affinity purification combined with inducible shRNA expression as a tool to study the maturation of macromolecular assemblies. *RNA (New York, N.Y.)*, 17:189–200.
- [Yang und Musser, 2006] Yang, W. and Musser, S. M. (2006). Nuclear import time and transport efficiency depend on importin beta concentration. *J Cell Biol*, 174(7):951–961.
- [Zemp et al., 2009] Zemp, I., Wild, T., O’Donohue, M.-F., Wandrey, F., Widmann, B., Gleizes, P.-E., and Kutay, U. (2009). Distinct cytoplasmic maturation steps of 40S ribosomal subunit precursors require hRio2. *J Cell Biol*, 185(7):1167–1180.
-

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schritte der Translation und schematisch dargestelltes Ribosom	6
1.2	Fusion und Disruption der Nukleoli im Laufe des Zellzyklus	7
1.3	Die verschiedenen Bereiche des Nukleolus und ihre Funktion in der Ribosomenbiogenese	8
1.4	Precursor-rRNAs aus Mensch und Hefen im Vergleich	9
1.5	rRNA-Prozessierung in der Ribosomenbiogenese	10
1.6	U3-snoRNA induzierte pre-18S-Faltung	11
1.7	pre-40S-Untereinheit mit Prozessierungsfaktoren	12
1.8	Nob1-Enzymaktivität zur adulten 18S-rRNA	13
1.9	Proteinstruktur von Dim2	14
1.10	Kristallstruktur von Dim2 aus <i>P. horikoshii</i>	14
1.11	Alignierung von Dim2-Sequenzen	16
1.12	Darstellungen der Kernpore	17
1.13	Schritte des Nukleus-Zytoplasma-Transports von BR-mRNPs	19
1.14	RNA-Markierungsvarianten zur Beobachtung des Exports in vivo	20
3.1	Agarose-Gel des XmaI-/XbaI-Restriktionsansatzes	36
3.2	PCR-Screening der Klonierung von peGFP-c1-Dim2	37
3.3	Agarosegel zur Restriktionskontrolle des Vektors peGFP-c1-Dim	38
3.4	Agarosegel zum PCR-Screening nach der erfolgten Ligation für das Snap-Dim2-Fusionskonstrukt	40
3.5	Agarosegel zur Aufreinigung der eGFP-Dim2-Kassette	42
3.6	Markierungswahl und Mikroskopie-Techniken im Vergleich	45
3.7	Beobachtungsfeld der Mikroskopietechniken im Vergleich	46
3.8	Schematische Darstellung eines FRAP-Experiments	47
3.9	Schematische Darstellung des HILO-Prinzips	48

3.10	Prozess zum automatisierten Auffinden der Membran	50
3.11	ROIs entlang der Membran	51
3.12	Verlauf der MSD-Auftragung für frei diffundierende Partikel in unterschiedlicher Umgebung	53
3.13	PSF-Verzerrung durch Einsatz einer Zylinderlinse in den Emissionsstrahlengang . .	55
3.14	Schematische Auswertung der PSF-Verzerrung	56
3.15	Schematische Darstellung der Trajektorienauswertung in 3D	59
4.1	Mikroinjektion von Dim2-AF647 in murine Zellen	62
4.2	Mikroinjektion von Dim2-AF647 in humane Zellen	63
4.3	Mikroinjektion von Dim2-AF647 in Insektenzellen	63
4.4	Transiente Expression von eGFP und eGFP-Dim2 im Vergleich	66
4.5	FRAP-Kurven von eGFP versus eGFP-Dim2	67
4.6	Fluoreszenzverteilung des markierten in Dim2 in den tet-induzierbaren Zelllinien .	68
4.7	FRAP-Experiment zum Einfluß der Überexpression	68
4.8	Nachweis der nukleolären Anreicherung von homolog exprimiertem Dim2	69
4.9	Fluoreszenzrückkehr in Nukleolus und Nukleoplasma	72
4.10	Einteilung der Zellaufnahmen in Segmente	73
4.11	Sprungweitenhistogramm der Sprünge im Nukleoplasma	75
4.12	Sprungweitenverteilung im Nukleolus	76
4.13	Anteil an immobilen Phasen innerhalb der Trajektorien	78
4.14	Prozentualer Anteil an immobilen Phasen in den Trajektorien im Nukleolus und im Nukleoplasma im Vergleich	79
4.15	Prozentualer Anteil immobiler Phasen in den Trajektorien in Simulation und experimentellen Daten	80
4.16	Sprungweitenverteilung von 500 kDa Dextranen in HeLa-Zellkernen	81
4.17	Trajektorien, die sich an der Grenze zwischen Nukleoli und Nukleoplasma fanden. .	82
4.18	Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Eintritt“	83
4.19	Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Verlassen“	84
4.20	Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Umkehr“	85
4.21	Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Grenze“	86
4.22	Gaußanpassungen an den Verlauf der Membranintensität	88
4.23	Kategorieneinteilung zur automatisierten Sortierung der gefundenen Trajektorien, die sich im Bereich der Kernhülle aufhalten.	90

4.24	Häufigkeit der Trajektorien in den einzelnen Kategorien.	91
4.25	Beispielaufnahmen und -trajektorien zur Kategorie „Membran“	91
4.26	Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „Z“ und „ZK“	92
4.27	Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „MZ“ und „MN“	93
4.28	Beispielaufnahmen und -trajektorien zu den Kategorien „NV“ und „N“	94
4.29	Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten innerhalb der Membranmaske in den Kategorien a) „NV“ und b) „ZK“	95
4.30	Kumulative Wahrscheinlichkeitsverteilung der Verweilzeiten innerhalb der Membranmaske in den Kategorien a) „M“, „MZ“ und „N“, und b) „M“	96
4.31	Kalibrationsgerade des roten Kanals von TetraSpecks einer Größe von 0,5 μm , die auf einem Deckglas immobilisiert wurden.	98
4.32	Abweichung der berechneten von der theoretischen Position	98
4.33	Kalibrationsgeraden für die astigmatische PSF-Verzerrung	100
4.34	Lokalisierungsgenauigkeit in x, y und z für beide Kanäle	101
4.35	Chromatische Verschiebung in zwei Raumrichtungen.	102
4.36	Kernboden mit Kernporen in astigmatischer Verzerrung.	103
5.1	Lokalisierung von Dim2	107
5.2	Kristallstrukturen von eGFP, Snap und Dim2	108
5.3	Sprungweitenverteilung im Nukleolus und im Nukleoplasma als Vergleich	110
5.4	Exportwahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der Messzeit	114
5.5	Transfektion von HeLa-POM121 mit pQCXIP-Snap-Dim2	121

Tabellenverzeichnis

1.1	Gegenüberstellung der gemessenen Export-Verweilzeiten in unterschiedlichen Studien.	21
2.1	Verwendete Chemikalien.	25
2.1	Verwendete Chemikalien (Fortsetzung).	26
2.2	Verwendete Enzyme.	27
2.3	Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer.	27
2.3	Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer (Fortsetzung).	28
2.4	Verwendete Oligonukleotide.	29
2.5	Verwendete kompetente Bakterienstämme.	30
2.6	Verwendete Farbstoffe.	31
2.7	Verwendete Zelllinien.	31
2.8	Spezielle Geräte.	32
2.9	Spezielles Verbrauchsmaterial.	32
3.1	Restriktionsansatz XmaI und XbaI.	36
3.2	Ligationsansatz XmaI und XbaI zur Klonierung von pEGFP-c1-Dim2.	36
3.3	Restriktionsansatz mit EcoRI und AgeI, um eGFP aus dem Vektor peGFP-c1-Dim2 zu entfernen.	38
3.4	PCR-Ansatz zur Amplifikation des Snap-Tags.	39
3.5	Restriktionsansatz mit EcoRI und AgeI	39
3.6	Ligationsansatz zum Fusionieren des geschnittenen peGFP-c1-Dim2- Δ eGFP mit dem PCR-amplifizierten Snap-Insert.	39
3.7	Restriktionsansatz EcoRI zum Einschleiben des Repair-Oligonukleotids	41
3.8	Ligationsansatz zum Einbau des Snap-repair-Oligonukleotide in den fehlerhaften Snap-Dim2-Vektor.	41
3.9	Restriktionsansätze BamHI und AgeI zum Ausschneiden des eGFP-Dim2-Inserts.	42

3.10	Restriktionsansätze BamHI und AgeI zur Linearisierung des pQCXIP-Vektors	42
3.11	Ligationsansatz zum Einführen der eGFP-Dim2-Kassette in den retroviralen pQCXIP-Vektor.	43
4.1	Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit relativen Anteilen im Nukleoplasma in drei unterschiedlichen Analysen	74
4.2	Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit relativen Anteilen im Nukleolus in drei unterschiedlichen Analysen	77
4.3	Daten, auf deren Grundlage die Simulation durchgeführt wurde.	79
4.4	Diffusion von Dextranen in HeLa-Zellkernen	81
4.5	Rekonstruierte axiale Positionen dreier beispielhaft ausgewählter Poren	103
5.1	Wahrscheinlichkeiten auf ein Exportereignis	114
5.2	Gegenüberstellung der gemessenen Export-Verweilzeiten in unterschiedlichen Studien.	118
A.1	Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Fehlern im Nukleoplasma	126
A.2	Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Fehlern im Nukleolus	126
A.3	Vergleich der Diffusionskoeffizienten mit Fehlern von Dextranen in HeLa-Zellkernen	126

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, DNA-Base
AF	AlexaFluor, Fluoreszenzfarbstoffe
bp	<i>base pair</i> , Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Bovines Serumalbumin
<i>C. tentans</i>	<i>Chironomus tentans</i> , Zuckmücke
C	Cytosin, DNA-Base
DFC	<i>dense fibrillar components</i> , Bereich des Nukleolus
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> , Fruchtfliege
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSTORM	<i>direct stochastic optical reconstruction microscopy</i> , Mikroskopietechnik
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , Darmbakterium; häufig zur Proteinexpression verwendet
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> , verbessertes grün fluoreszierendes Protein
EM	elektronenmikroskopisch
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ETS	<i>external transcribed spacer</i> , externe Trenn-DNA-Sequenz
FC	<i>fibrillar center</i> , innerster Bereich des Nukleolus
FG	Phenylalanin-Glycin, Aminosäuren
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i> , Fluoreszenzrückkehr nach Photobleichung
G	Guanin, DNA-Base
GC	<i>granular components</i> , Bereich des Nukleolus
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GUI	<i>graphical user interface</i> , grafische Benutzeroberfläche
GxxG	Aminosäuren-Motiv einer KH-Domäne
HILO	<i>highly inclined and laminated optical sheet microscopy</i> , Mikroskopietechnik
HMM	<i>hidden Markov Model</i> , stochastisches Modell auf Grundlage der Markov-Kette
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>

Fortsetzung auf der nächsten Seite

<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i> , Mensch
ITS	<i>internal transcribed spacer</i> , interne Trenn-DNA-Sequenz
JD	<i>jump distance</i> , Sprungweite
mRNA	<i>messenger-RNA</i> , Boten-RNA
mRNP	mRNA-Partikel, bestehend aus mRNA und Proteinen
ms	Millisekunde
MSD	<i>mean squared displacement</i> , mittleres Verschiebungsquadrat
NES	<i>nuclear export sequence</i> , Erkennungssequenz von Exportfaktoren
NLS	<i>nuclear localization sequence</i>
NOR	<i>nucleolar organizer regions</i> , Organisationsregion des Nukleolus
NPC	<i>nuclear pore complex</i> , Kernporenkomplex
Nup	Nukleoporin
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
<i>P. horikoshii OT3</i>	<i>Pyrococcus horikoshii OT3</i> , ein Archaeobakterium
Pol	Polymerase
PSF	<i>Point Spread Function</i> , Punktbildfunktion
R ²	Bestimmtheitsmaß der Anpassungsgüte
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i> , ausgewählter Bereich
rRNA	ribosomale RNA
rpm	<i>rounds per minute</i> , Schüttelgeschwindigkeit bei der Bakterieninkubation
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Hefe
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i> , kleine nukleoläre RNA
SNR	<i>signal-to-noise-ratio</i> , Signal-zu-Rausch-Verhalten
SPEED	<i>single-point edge-excitation subdiffraction microscopy</i> , Mikroskopietechnik
SPT	<i>single particle tracking</i> , Einzelmolekülverfolgung
SSU	<i>small subunit</i> , kleine Ribosomenuntereinheit
SWA	Sprungweitenanalyse
T	Thymin, DNA-Base
tc-Tag	Tetracystein-Tag, kleine Aminosäuresequenz mit vier Cysteinen zum Koppeln von Farbstoffen
tRNA	Transfer-RNA
Utp	<i>U-three-proteins</i> , U3-Proteine
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung, Zentrifugengeschwindigkeit
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i> , Krallenfrosch
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , gelb fluoreszierendes Protein