

**Die humane RNA-Helikase DDX19**  
**Identifizierung ihres Kernimportsignals und**  
**Analyse ihrer Rolle beim Export von mRNA**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
**Vidura Lawrance Liyanage**  
aus  
Bonn-Duisdorf

Bonn, September 2022



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

1. Gutachter : Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: PD Dr. Gregor Hagelüken

Tag der Promotion: 20.12.2022

Erscheinungsjahr: 2023



# Zusammenfassung

## Der mRNP-Export durch DDX19

Der nukleare Export von mRNPs (*messenger*-Ribonukleoproteine) wird in menschlichen Zellen durch die RNA-Helikase DDX19, zusammen mit dem Nukleoporin NUP214 und dem Exportfaktor Gle1 vermittelt. Durch frühere biochemische und genetische Experimente und durch die Aufklärung der molekularen Strukturen der an diesem Prozess beteiligten Proteinen und Kofaktoren konnte dieser Mechanismus bereits zu einem Großteil entschlüsselt werden.

Um die bestehenden Studien zu diesem Prozess zu ergänzen und zu vervollständigen, wurde im Folgenden eine detaillierte Analyse des DDX19-vermittelten mRNP-Exports in menschlichen HeLa-Zellen *in vivo* unter Verwendung der Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenzmikroskopie auf Einzelmolekülebene durchgeführt. Auf diese Weise konnten drei Aspekte des Prozesses aufgeklärt werden.

Als Erstes konnte die zugrunde liegende Kinetik des mRNP-Exports beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine stabile Zelllinie erzeugt, die das induzierbare Fusionsprotein bestehend aus DDX19 mit dem sogenannten HaloTag exprimiert, das die Visualisierung einzelner DDX19-Moleküle in HeLa-Zellen ermöglicht. Darüber hinaus wurde eine Zelllinie erzeugt, die das Fusionsprotein bestehend aus hnRNP A1 mit dem sogenannten SnapTag exprimiert. hnRNP A1 ist ein Ribonukleoprotein, das in der frühen Phase der RNP-Biogenese an mRNPs bindet und diese während ihrer Translokation durch die Kernporenkomplexe (NPCs) ins Zytoplasma begleitet. Die gleichzeitige Visualisierung der NPCs durch das Fusionsprotein, welches aus dem spezifischen Importfaktor NTF2 und dem fluoreszierenden Protein eGFP besteht, ermöglichte die Einzelmolekülanalyse der Bindungszeiten von DDX19-HaloTag und hnRNP A1-SnapTag-gebundenen mRNPs mit den NPCs. Dabei betrug die Bindungszeit von DDX19-HaloTag Proteinen an den NPCs  $\sim 45$  ms und die von hnRNP A1-SnapTag-gebundenen mRNPs  $\sim 36$  ms..

Als Zweites konnte anhand dieser Bindungszeiten die Vermutung aufgestellt werden, dass *ein* DDX19-HaloTag-Protein für den Export *eines* hnRNP A1-SnapTag-gebundenen mRNPs zuständig ist, da die Bindungszeit der hnRNP A1-SnapTag-

Moleküle kürzer ist.

Als Drittes konnte der Reaktionsablauf zwischen DDX19, mRNP, Gle1 und NUP214 beim mRNP-Export entschlüsselt und ein Reaktionszyklus für DDX19 auf der Grundlage der durchgeführten *in vivo*-Messungen festgelegt werden. Zu diesem Zweck mussten drei zusätzliche Zelllinien erzeugt werden, die jeweils eine mutierte DDX19-Variante induzierbar exprimierten. Die erste war die K385E-Mutante, die defizient in der Gle1-Bindung ist. Die zweite war die D223R-Mutante, die defizient in der NUP214 *und* mRNP-Bindung ist und die dritte war die E243Q-Mutante, die nicht in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren. Die gleichzeitige Visualisierung von eGFP-NTF2 ermöglichte auch in diesen Zellen die Bestimmung der Bindungszeiten mit den Kernporen. Durch den Vergleich dieser Bindungszeiten und -häufigkeiten mit den Kernporen pro Minute mit den Bindungszeiten und -häufigkeiten des Wildtyps (DDX19-HaloTag) konnte der Reaktionszyklus für den DDX19-vermittelten mRNP-Export bestimmt werden. In diesem bindet DDX19 im ersten Schritt an das NUP214 und wird so auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert. Darüber hinaus führt die Bindung zu NUP214 zu einer erhöhten Affinität von DDX19 zu Gle1. Die darauffolgende Bindung an das Gle1 führt wiederum zu einer erhöhten Affinität von DDX19 zu mRNP, was zur Bindung an mRNP führt. Die anschließende ATP-Hydrolyse führt zur Entfernung der Exportfaktoren vom mRNP und der Freigabe in das Zytoplasma.

## Die NLS des DDX19

Moleküle mit einem Durchmesser  $\geq 5$  nm oder einer Masse  $\geq 30$  kDa benötigen Transportfaktoren, um das hydrophobe Innere der NPCs zu passieren. Die Bindungsstellen auf den Molekülen, die die Transportfaktoren binden, werden als Kernlokalisierungs- (NLS) bzw. Kernexportsignale (NES) bezeichnet. Obwohl bereits Funktionen von DDX19 im Zellkern, am NPC und im Zytoplasma bekannt sind, ist nur wenig über den Transport des Proteins durch die NPCs bekannt. Vor drei Jahren konnten Lari *et al.* (2019) die NES auf der N-terminalen Seite des Proteins identifizieren, aber die NLS blieb bis heute unbekannt.

In dieser Arbeit wurde eine basenreiche Sequenz auf der C-terminalen Seite von DDX19 (<sup>425</sup>HRIGRTGRFGKR<sup>436</sup>) als potenzielle NLS identifiziert und auf ihre Funktionalität hin überprüft. Zu diesem Zweck wurde die Sequenz mit zwei eGFP-Molekülen kloniert und die subzelluläre Verteilung des Peptids mit der von aus-

gewählten Referenzsequenzen verglichen, die ebenfalls mit zwei eGFP-Molekülen kloniert wurden. Es zeigte sich, dass die untersuchte Sequenz eine signifikante Anreicherung im Zellkern aufwies, was darauf hindeutet, dass es sich um eine effiziente NLS handelt.

Des Weiteren wurde diese Sequenz im Kontext des gesamten Proteins auf ihre Funktion als NLS hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde eine Mutante von DDX19 erstellt (DDX19-NLS<sup>mut</sup>), bei der die basischen Aminosäuren der mutmaßlichen NLS mutiert wurden. Anschließend wurde die Fähigkeit von DDX19 und von DDX19-NLS<sup>mut</sup>, in den Zellkern importiert zu werden, verglichen. Dabei zeigte sich, dass das DDX19 mit doppelt so hoher Effizienz im Zellkern angereichert wurde wie das DDX19-NLS<sup>mut</sup>. Folglich führte die Mutation in der Sequenz (<sup>425</sup>HRIGRTGRFGKR<sup>436</sup>) zu einer Beeinträchtigung im Import und bestätigt die im ersten Teil aufgestellte Vermutung, dass es sich bei der Sequenz um die NLS von DDX19 handelt.



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Der Kern - Zytoplasma Transport . . . . .	6
1.2 Der Export von mRNA . . . . .	8
1.3 Die RNA-Helikase DDX19 . . . . .	10
1.3.1 DDX19 beim mRNP-Export . . . . .	11
1.4 Motivation und Zielsetzung . . . . .	12
1.4.1 DDX19 beim mRNP-Export . . . . .	12
1.4.2 Identifizierung der NLS von DDX19 . . . . .	13
<b>2 Material</b>	<b>15</b>
2.1 Chemikalien . . . . .	15
2.2 Primer und Plasmide . . . . .	16
2.3 Enzyme . . . . .	17
2.4 Medien und Puffer . . . . .	18
2.5 Spezielles Verbrauchsmaterial . . . . .	20
2.6 Geräte . . . . .	20
<b>3 Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 Rekombinantes DDX19-HaloTag . . . . .	21
3.1.1 Klonierung des DDX19-HaloTag-Fusionsproteins . . . . .	21
3.1.2 Mutagenese-PCR . . . . .	23
3.2 Zellkultur . . . . .	25
3.2.1 Retroviraler Gentransfer . . . . .	25
3.2.2 Passagieren von Zellen . . . . .	27
3.2.3 Transiente Expression . . . . .	27
3.2.4 Induktion und Fluoreszenzfärbung . . . . .	27
3.2.5 Kontrollmessungen mit Actinomycin D . . . . .	28

3.2.6	siRNA-Knockout des endogenen DDX19 . . . . .	28
3.3	Mikroskopische Methoden . . . . .	29
3.3.1	Referenzpartikel zur Alignierung . . . . .	31
3.3.2	Datenaufnahme . . . . .	31
3.4	Datenanalyse . . . . .	32
3.4.1	Transformation . . . . .	32
3.4.2	Analyse der Kymographen . . . . .	33
3.4.3	Anpassung der Bindungszeiten . . . . .	36
3.4.4	Kategorisierung der Trajektorien . . . . .	37
3.4.5	Mobilitätsanalyse einzelner DDX19-HaloTag-Moleküle im Zytoplasma . . . . .	38
3.4.6	Mobilitätsanalyse einzelner hnRNP A1-SnapTag Moleküle im Nukleoplasma . . . . .	40
3.4.7	Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision . . . . .	40
3.5	Identifizierung der NLS . . . . .	41
3.5.1	Anhand der isolierten Sequenz . . . . .	41
3.5.2	Anhand des gesamten Proteins . . . . .	43
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Funktionalitätstest der Fusionsproteine . . . . .	46
4.1.1	DDX19-HaloTag . . . . .	46
4.1.2	hnRNP A1-SnapTag . . . . .	47
4.2	Bindungszeiten an den Kernporenkomplexen . . . . .	49
4.2.1	DDX19-HaloTag . . . . .	50
4.2.2	DDX19 <sup>NUP214/RNA</sup> -HaloTag . . . . .	52
4.2.3	DDX19 <sup>ATPase</sup> -HaloTag . . . . .	53
4.2.4	DDX19 <sup>Gle1</sup> -HaloTag . . . . .	53
4.2.5	Photobleaching des Farbstoffes JaneliaFluor549 . . . . .	54
4.2.6	DDX19 <sup>Gle1</sup> -HaloTag unter Einwirkung von Actinomycin D . . . . .	55
4.2.7	hnRNP A1-SnapTag . . . . .	57
4.2.8	hnRNP A1-SnapTag unter Einwirkung von Actinomycin D . . . . .	59
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	60
4.4	Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision . . . . .	61
4.5	Mobilität von DDX19/Mutanten-HaloTag im Zytoplasma . . . . .	62
4.6	Identifizierung der NLS . . . . .	65
4.6.1	Anhand der isolierten Sequenz . . . . .	65
4.6.2	Anhand des gesamten Proteins . . . . .	67

<b>5 Diskussion</b>	<b>69</b>
5.1 Der Reaktionszyklus von DDX19 . . . . .	69
5.1.1 Die Bindung an NUP214 . . . . .	70
5.1.2 Die Bindung an Gle1 . . . . .	71
5.1.3 Die Bindung an mRNPs . . . . .	73
5.1.4 Die Funktionen von Gle1 . . . . .	74
5.1.5 Die Stöchiometrie des mRNP-Exports . . . . .	75
5.1.6 Das gesamte Modell im Kontext der Literatur . . . . .	77
5.2 Identifizierung der NLS von DDX19 . . . . .	79
<b>6 Fazit und Ausblick</b>	<b>81</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>Anhang</b>	<b>97</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung</b>	<b>111</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>113</b>



# Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
ADP	Adenosindiphosphat
AIC	Akaike Information Criterion
ALS	<i>Amyotrophic Lateral Sclerosis</i>
AMD	Actinomycin D
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Airyunit
cm	Zentimeter
cNLS	klassische NLS
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTD	C-terminale Domäne
Dbp5	DEAD box protein 5 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
DDX19	Dbp5 ( <i>Human</i> )
DEAD	Asparaginsäure-Glutaminsäure-Alanin-Asparaginsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DoG	<i>Difference of Gaussian</i>
Dox	Doxycyclin
Dr.	Doktor
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
et al.	und andere
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FG	Phenylalanin-Glycin
fw	vorwärts
g	Erdanziehungskraft
Gag	group-specific antigen
GANP	<i>Germinal center-Associated Nuclear Protein</i>
GDP	Guanosindiphosphat

GTP	Guanosintriphosphat
GW	<i>Gateway</i>
h	Stunde
hCG1	<i>nuclear pore complex protein Nup42</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HILO	<i>Highly Inclined and Laminated Optical sheet</i>
hnRNP	<i>heterogeneous ribonucleoprotein particle</i>
Hz	Hertz
I	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
J	Joule
JF549	Janelia-Fluor-549-HaloTag-Ligand
K	Lysin
$K_D$	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
$k_{off}$	Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion
L	Leucin
LAAHD	<i>Lethal Arthrogryposis with Anterior Horn cell Disease</i>
LAP	<i>Linear Assignment Problem</i>
LB	Luria/Miller
LCCS1	<i>Lethal Contracture Congenital Syndrome 1</i>
LSM	<i>Laserscanning</i>
M	Methionin
MDa	Megadalton
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mRNP	<i>messenger-Ribonukleoprotein</i>
ms	Millisekunden
Mut	Mutation
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NLS	<i>Nuclear Localization signal</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Np	Nukleoplasma
NPC	<i>Nuclear Pore Complex</i>
NTD	N-terminale Domäne
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i>

NTR	<i>Nuclear Transport Receptor</i>
Nup	Nukleoporin
NUP214	<i>Nuclear pore complex protein Nup214</i>
NXF1	<i>Nuclear RNA export factor 1</i>
NXT1	<i>NTF2-related export protein</i>
P	Prolin
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potential of Hydrogen</i>
PMT	<i>Photon Multiplier Tube</i>
R	Arginin
RanGAP	<i>Ran GTPase-activation protein</i>
RanGEF	<i>Ran GTP exchange factor</i>
RanGTP	<i>Ras-related nuclear protein gebunden an GTP</i>
rev	rückwärts
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROI	<i>Region Of Interest</i>
RSS	<i>Residual Sum of Squares</i>
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s.	siehe
sCMOS	<i>scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
SF2	<i>Superfamily 2</i>
SiR	<i>Silicon Rhodamin</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNR	<i>Signal-Noise-Ratio</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Volt
Y	Tyrosin
Zp	Zytoplasma



# Kapitel 1

## Einleitung

Die Genexpression in eukaryotischen Zellen setzt sich aus der Transkription der mRNA im Zellkern und deren Translation im Zytoplasma zusammen. Entsprechend erfordert eine erfolgreiche Genexpression einen effizienten und ordnungsgemäßen Transport der mRNA vom Zellkern in das Zytoplasma.

Der Transport erfolgt dabei durch die Kernporenkomplexe (englisch *nuclear pore complex* - NPC). Diese verfügen im Inneren über ein Netzwerk, bestehend aus Phenylalanin- und Glycin-reichen Nukleoporinen (kurz FG-Nups), die eine elektrostatische Barriere für Moleküle mit einer Größe von  $\geq 5$  nm oder  $\geq 30$  kDa stellen. Um dennoch durch die NPCs zu gelangen, werden posttranskriptionell Transportfaktoren an die mRNA gebunden, die in der Lage sind, mit den FG-Nups zu wechselwirken. Einmal im NPC angekommen, erfolgt die Bewegung von mRNPs (*messenger*-Ribonukleoproteinen) durch die Pore diffusiv. Die Direktionalität der Bewegung wird dabei durch die gezielte Entfernung der Transportfaktoren von der RNA-Helikase DDX19 auf der zytoplasmatischen Seite der NPCs gesteuert. Defekte in diesem Prozess können dabei zu Krankheiten wie LCCS1 (englisch *lethal contracture congenital syndrome 1*), LAAHD (englisch *lethal arthrogryposis with anterior horn cell disease*) und in seltenen Fällen von ALS (englisch *amyotrophic lateral sclerosis*) führen.

Mit biochemischen und genetischen Ansätzen ist dieser Mechanismus in Hefe- und Fliegenmodellen bereits sehr detailliert untersucht worden. Auch in menschlichen Zellen haben ähnliche Ansätze und die Aufklärung der molekularen Strukturen der an diesem Prozess beteiligten Proteinen und Kofaktoren bereits einen großen Teil davon aufgedeckt. Um diese Studien weiter zu ergänzen und zu vervollständigen, wurde im Folgenden eine detaillierte Analyse des mRNP-Exports in menschlichen

HeLa-Zellen unter Verwendung der Hochgeschwindigkeits-Fluoreszenzmikroskopie auf Einzelmolekülebene durchgeführt.

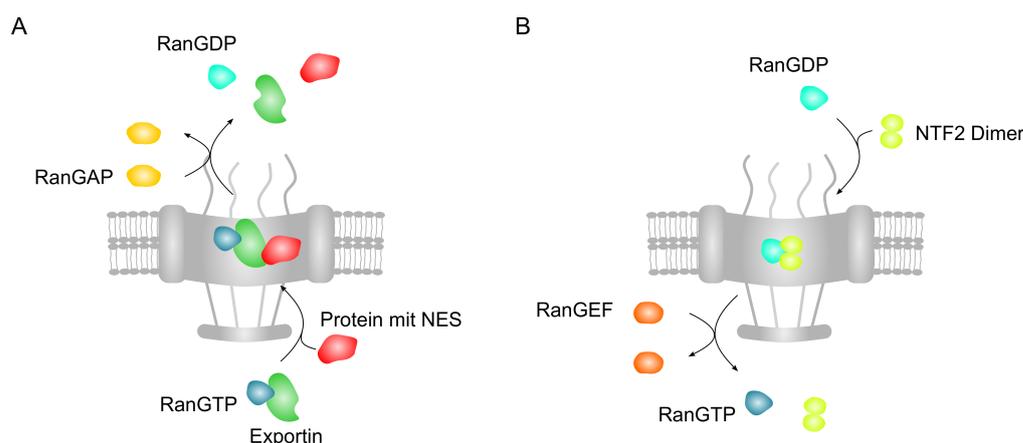
## 1.1 Der Kern - Zytoplasma Transport

Eukaryotische Zellen bestehen aus definierten Kompartimenten, die jeweils auf eine bestimmte Funktion in der Zelle spezialisiert sind<sup>[1],[2]</sup>. Das wohl wichtigste und auch bekannteste Kompartiment ist der Zellkern, in dem die DNA der Zelle verwahrt ist<sup>[3]</sup>. Begrenzt wird der Zellkern durch die Kernhülle, die aus zwei Lipiddoppelschicht besteht<sup>[4]</sup>. Eingebettet in dieser Kernhülle liegen die Kernporenkomplexe (NPC), die das Zytoplasma mit dem Nukleoplasma verbinden<sup>[5]</sup>. Diese makromolekularen Strukturen bestehen jeweils aus  $\sim 1000$  einzelnen Proteinen, den sogenannten Nukleoporinen (Nup) und verfügen über eine Gesamtmasse von  $\sim 110$  MDa<sup>[6]</sup>. Aufgebaut ist ein NPC aus einer zylindrischen Kernstruktur, welche eine achtfache Rotationssymmetrie entlang der Höhe und eine zweifache Rotationssymmetrie parallel zur Kernhülle besitzt<sup>[7],[8]</sup>. Der Durchmesser beträgt dabei  $\sim 130$  nm und die Länge  $\sim 80$  nm. Auf der zytoplasmatischen Seite setzt sich die Struktur mit acht  $\sim 50$  nm langen Filamenten fort, während auf der nukleoplasmatischen Seite acht Filamente zu einem Korb verbunden sind und  $\sim 70$  nm in das Nukleoplasma hineinragen<sup>[9],[10]</sup>. Die Gesamtstruktur weist somit lediglich über eine achtfache Rotationssymmetrie entlang der Höhe auf<sup>[6]</sup>. Das Innere der NPC bildet eine Permeabilitätsbarriere, die für kleine Moleküle frei durchlässig ist, aber zunehmend restriktiver wird, wenn der Durchmesser der Moleküle  $\geq 5$  nm oder die Masse der Moleküle  $\geq 30$  kDa erreicht<sup>[11],[12]</sup>. Die Permeabilitätsbarriere wird dabei von Nups mit einem hohen Anteil an den Aminosäuren Phenylalanin (F) und Glycin (G) gebildet. Dabei können einzelne FG-Domänen innerhalb eines Nups aus bis zu 50 FG-Motiven bestehen, die zusammen mit den FG-Motiven anderer Nups eine sieb- bzw. gelartige Struktur bilden<sup>[13],[14],[15],[16]</sup>. Die Barriere der FG-Nups wirkt dabei sowohl als mechanische als auch als hydrophobe Barriere.

Damit größere Moleküle sich zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma frei bewegen können, benötigen sie Transportrezeptoren (englisch *nuclear transport receptor* - NTR). Das sind Proteine, die zur Familie der Karyopherine gehören<sup>[17],[18]</sup>. Diese NTRs können mit den FG-Domänen der Nups wechselwirken und pendeln ständig zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma hin und her<sup>[19],[20]</sup>. Obwohl die NTRs mit den FG-Domänen wechselwirken können, werden sie nicht über diese Wechselwirkungen in den NPCs festgehalten, da die Wechselwirkungen von gerin-

ger Affinität sind<sup>[16],[19],[21]</sup>. Abhängig von der Richtung, in die die großen Moleküle transportiert werden, wird bei den Transportfaktoren zwischen Importinen (vom Zytoplasma in den Zellkern) oder Exportinen (vom Zellkern in das Zytoplasma) unterschieden<sup>[22]</sup>. Dabei ist die Direktionalität des Transports oft an die Zufuhr von Stoffwechselenergie in Form von GTP- oder ATP-Hydrolyse gebunden.

Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das RanGTPase-System (s. Abbildung 1.1). Hier erzeugen das nukleare RanGEF (Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor) und das zytoplasmatische RanGAP (GTPase aktivierendes Protein) einen RanGTP-Gradienten entlang der Kernhülle<sup>[23],[24]</sup>. So kann das im Zellkern vorhandene RanGTP an ein Exportin binden und so die Bindung zwischen Exportin und dem zu exportierenden Molekül stabilisieren<sup>[25],[26]</sup>. Anschließend ist dieser trimere Komplex im Stande, durch den NPC zu passieren. Auf der zytoplasmatischen Seite angekommen katalysiert das RanGAP die enzymatische Hydrolyse von GTP zu GDP, was bedingt durch eine Konformationsänderung am Ran zur Dissoziation des Komplexes führt (s. Abbildung 1.1 A).<sup>[25],[27]</sup> Das freie RanGDP kann dann über den spezifischen Importfaktor NTF2 (*nuclear transport factor 2*) in den Zellkern zurückgeführt werden. Im Zellkern kommt es dann durch das RanGEF zum Austausch von GDP mit GTP, was zur Freisetzung von NTF2 führt (s. Abbildung 1.1 B)<sup>[27],[28]</sup>. Darüber hinaus kann RanGTP den Import eines an ein Importin gebundenen Moleküls beenden, indem es an das Importin bindet und so die Bindung zwischen dem Molekül und dem Importin aufhebt<sup>[28]</sup>.



**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung (A) des Protein-Exports durch RanGTP und (B) des Re-Imports von RanGDP durch NTF2. Details siehe Text.

Damit Transportfaktoren erkennen können, welches Molekül exportiert bzw. im-

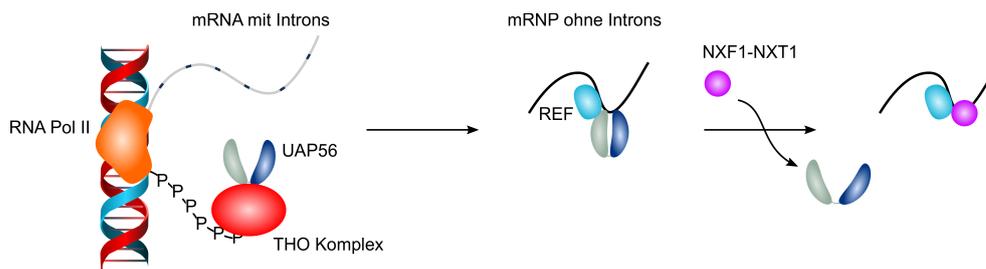
portiert werden muss, besitzen die zu transportierenden Moleküle ein sogenanntes Kernexportsignal (englisch *nuclear export signal* - NES) bzw. ein Kernlokalisierungssignal (englisch *nuclear localization signal* - NLS), an das die Exportine bzw. Importine binden können<sup>[22]</sup>. Eine NES besteht in der Regel aus einer Aminosäuresequenz mit vielen Leucinen und hydrophoben Aminosäuren, die oft die Form  $\varphi$ -X<sub>(2-3)</sub>- $\varphi$ -X<sub>(2-3)</sub>- $\varphi$ -X- $\varphi$  hat, wobei  $\varphi$  eine der Aminosäuren I, L, V, F, M und X eine beliebige Aminosäure sein kann<sup>[29],[30]</sup>. Bei den NLS gibt es hingegen keine Konsenssequenz. Sie bestehen jedoch häufig aus ein oder zwei Clustern basischer Aminosäuren, die hauptsächlich aus Lysin- und Argininresten bestehen<sup>[31],[32]</sup>. Diese basischen Aminosäuren sind wichtig, da sie an die hydrophobe(n) Bindungstasche(n) der Importine binden<sup>[33]</sup>.

## 1.2 Der Export von mRNA

Der allgemeine mRNA-Export unterscheidet sich jedoch mechanistisch von dem der meisten anderen Moleküle insofern, dass die Transportrezeptoren der mRNA nicht zur Familie der Karyopherine gehören und der Export unabhängig von dem RanGTPase-System abläuft<sup>[34],[35]</sup>.

Die Bildung von exportfähiger mRNA erfolgt durch den mRNA-Exportkomplex TREX, der unter anderem aus REF (oft auch ALY genannt), UAP56 und dem Subkomplex THO besteht<sup>[36]</sup>. Dabei bindet der THO-Subkomplex zunächst an die phosphorylierte C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II und rekrutiert die RNA-Helikase UAP56<sup>[37],[38]</sup>. Auf diese Weise wird das UAP56 bereits während der Transkription in die Nähe der mRNA gebracht. Nach erfolgter Transkription und mRNA-Prozessierung kann das UAP56 an das gespleißte mRNP binden. Gleichzeitig bindet das REF über UAP56 an die mRNP<sup>[39],[40],[41]</sup>. Das REF wiederum bindet den heterodimeren Exportfaktor der mRNP, das NXF1-NXT1 und erhöht gleichzeitig dessen RNA-Bindungsaffinität, wodurch im nächsten Schritt eine Bindung zwischen NXF1-NXT1 und der mRNP erstellt wird<sup>[42],[43]</sup>. Die Bindung von NXF1-NXT1 an REF führt gleichzeitig zur Freisetzung von UAP56 (s. Abbildung 1.2), da sich die Bindungsstellen zwischen UAP56 und NXF1-NXT1 mit der Bindungsstelle zwischen REF und NXF1-NXT1 überschneiden<sup>[40]</sup>.

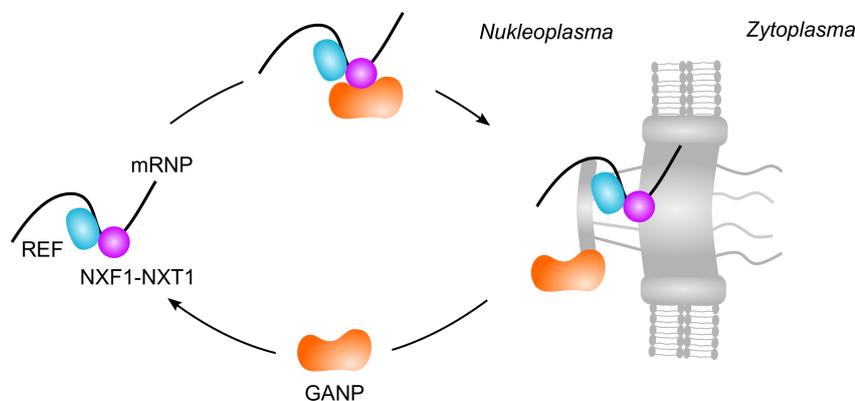
Auf diese Weise wird sichergestellt, dass nur vollständig prozessierte und gespleißte mRNPs mit Exportfaktoren versehen werden und den Zellkern verlassen können.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der Bindung des heterodimeren Exportfaktors NXF1-NXT1 an das mRNP und die damit gekoppelte Qualitätskontrolle der exportfähigen mRNP. Details siehe Text.

Nach der Herstellung des exportfähigen mRNP-Komplexes sorgt das Keimzentrum-assoziierte Kernprotein GANP (*germinal center-associated nuclear protein*) dafür, dass das mRNP effizient am NPC lokalisiert wird.

Ähnlich wie Transportfaktoren zwischen dem Zellkern und dem Zytoplasma diffundieren, diffundiert GANP zwischen dem Inneren des Zellkerns und den NPCs<sup>[44]</sup>. Dabei kann das GANP im Inneren des Zellkerns über den Transportfaktor NXF1 an das mRNP binden und diffusiv zur Kernpore transportieren. An der Kernpore angekommen, führt die stärkere Bindung zwischen dem NXF1 und den FG-Nups zur Dissoziation vom GANP (s. Abbildung 1.3)<sup>[44]</sup>.



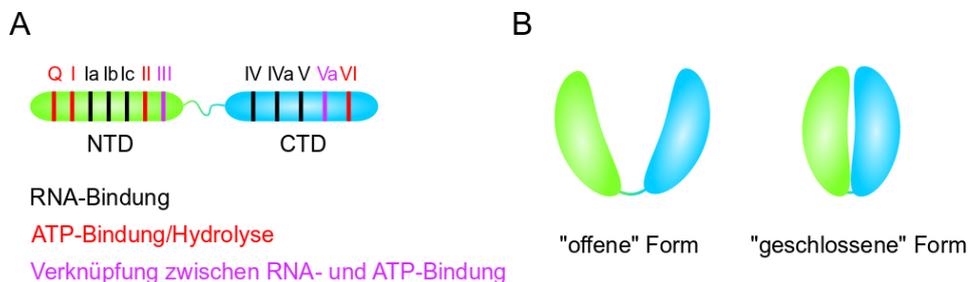
**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Anreicherung von exportfähiger mRNP durch GANP an den Kernporenkomplex. Details siehe Text.

Im NPC angekommen erfolgt die Bewegung des mRNP erneut rein diffusiv. Eine Direktionalität des Transports wird durch das Entfernen der Exportfaktoren auf zytoplasmatischer Seite des NPCs erzeugt. Dies geschieht in menschlichen Zellen durch die RNA-Helikase DDX19.

### 1.3 Die RNA-Helikase DDX19

RNA-Helikasen können in drei Superfamilien und zwei Familien unterteilt werden, die wiederum in weitere Subfamilien unterteilt werden können<sup>[45]</sup>.

Das DDX19 gehört zur Superfamilie 2 (SF2) und der Subfamilie der DEAD-Box Proteine<sup>[46],[47]</sup>. Diese Proteine zeichnen sich durch neun bis zwölf konservierte Motive und eine besondere Tertiärstruktur aus<sup>[48]</sup>. Diese besteht aus zwei globulären, zueinander flexiblen, kovalent miteinander verbundenen Domänen, die in ihrer Faltung der RecA-ATPase ähneln und daher als N-terminale- und C-terminale-RecA-ähnliche Domäne (in dieser Arbeit mit NTD und CTD abgekürzt) bezeichnet werden (s. Abbildung 1.4 B)<sup>[49]</sup>. Auf der NTD von DDX19 befinden sich die Motive Q, I, Ia, Ib, Ic, II sowie III und auf der CTD die Motive IV, IVa, V, Va und VI (s. Abbildung 1.4 A)<sup>[48]</sup>. Das Motiv Q ist zusammen mit den Motiven I, II und VI für die ATP-Bindung und die Motive Ia, Ib, Ic, IV, IVa und V für die RNA-Bindung zuständig<sup>[50],[51],[52],[53],[54]</sup>. Motiv III und Va verbinden die ATPase-Aktivität mit der Helikase-Aktivität des Proteins, indem die Wirkung der ATP-Bindung und -Hydrolyse an die RNA-Bindungsmotive weitergeleitet werden<sup>[48]</sup>.



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung (A) der N- sowie C-terminalen Domäne von DDX19 mit den entsprechend wichtigsten Motiven. Die Farbkodierung der Motive zeigt die Hauptfunktionen an, die mit jedem Motiv verbunden ist. (B) Schematische Darstellung von DDX19 in der „offenen“ sowie „geschlossenen“ Form.

Gemeinsam ermöglichen diese Motive dem DDX19, RNA und ATP zu erkennen und zu binden und darüber hinaus ATP zu hydrolysieren<sup>[55]</sup>. Die RNA-Bindung erfolgt dabei zwischen der NTD und CTD von DDX19 und dem Zucker-Phosphat-Grundgerüst der RNA, einschließlich mehrerer Wechselwirkungen mit den 2'-OH-Gruppen<sup>[56]</sup>. So kann DDX19 auf sequenzspezifische Weise an RNA binden, aber gleichzeitig zwischen RNA und DNA unterscheiden.

Darüber hinaus verfügt das DDX19 auf N-terminaler Seite eine flexible Aminosäure-

kette mit einer  $\alpha$ -Helix Struktur. Diese Struktur kann zwischen den beiden RecA-ähnlichen Domänen binden und so die Bindungsstelle für ATP blockieren. Somit übt diese N-terminale Verlängerung eine auto-inhibitorische Funktion auf die intrinsische ATPase Aktivität des Proteins aus<sup>[57],[58]</sup>.

### 1.3.1 DDX19 beim mRNP-Export

Als RNA-Helikase ist DDX19 maßgeblich an verschiedenen Schritten des RNA-Metabolismus beteiligt<sup>[55],[59],[60]</sup>. Die am längsten erforschte Funktion ist dabei der mRNP-Export. Dort entfernt DDX19 auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore den heterodimeren Transportfaktor NXF1-NXT1 vom mRNP<sup>[61]</sup>. Dabei binden sowohl NTD als auch CTD von DDX19 in einer „geschlossenen“ Konformation an das mRNP. Der darauffolgende Wechsel in die „geöffnete“ Struktur im Zuge der ATP-Hydrolyse führt zur Störung in der lokalen mRNP-Struktur und zur Entfernung der Transportfaktoren<sup>[48]</sup>. Um diese lokale Funktion auszuüben und so die Direktionalität des mRNP-Exports sicherzustellen, benötigt DDX19 die Nukleoporene NUP214, hCG1, die Nukleotide ATP und ADP sowie den Exportfaktor Gle1<sup>[57],[62]</sup>.

Das Nukleoporin NUP214 sitzt auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore und besteht aus einer N-terminalen  $\beta$ -Propeller Domäne, einer zentralen *coiled coil* Domäne und einer C-terminalen FG-reichen Domäne<sup>[63]</sup>. Die Bindung von DDX19 an das NUP214 erfolgt über die  $\beta$ -Propeller Domäne von NUP214 und der NTD von DDX19<sup>[6],[57],[64]</sup>. Diese Bindung führt zu einer „geöffneten“ Konformation des DDX19, die den Austausch von Nukleotiden gewährleistet<sup>[55]</sup>. Außerdem überlappen die Bindungsstellen von NUP214 und mRNP auf dem DDX19, was dazu führt, dass im NUP214-gebundenen Zustand kein mRNP an DDX19 binden kann und umgekehrt<sup>[57],[65]</sup>. In Einstimmigkeit damit weist mRNP die höchste Affinität an DDX19 in der geschlossenen mit ATP-beladenen Konformation auf<sup>[57],[58],[66]</sup>.

Der mRNP Exportfaktor Gle1 bindet über seine C-terminale Domäne an die C-terminale Domäne des Nukleoporins hCG1, das ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore angereicherte ist<sup>[6],[57],[67],[68]</sup>. Ebenfalls auf der C-terminalen Domäne des Gle1, aber gegenüber liegend zu der Bindungsstelle zu hCG1 befindet sich die Bindungsstelle für DDX19<sup>[6]</sup>. Diese kann mit der CTD von DDX19 interagieren und das DDX19 so ebenfalls auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisieren<sup>[67],[69]</sup>. Eine gleichzeitige Bindung von DDX19 an NUP214 *und* Gle1 ist dabei möglich<sup>[6],[70]</sup>. Die Nukleoporene hCG1 und NUP214 befinden sich bei-

de auf der zytoplasmatischen Seite in unmittelbarer Nähe zueinander. So wird die lokale Ausführung der Funktionen von Gle1 und DDX19 beim mRNP-Export ermöglicht<sup>[6],[71],[72]</sup>.

Die Funktion von Gle1 besteht, zusammen mit dem mRNP die ATPase Aktivität von DDX19 anzuregen. Der genaue Mechanismus ist dabei noch umstritten<sup>[57],[58],[66]</sup>. In der Studie von Noble *et al.* (2011) führt die Bindung von Gle1 an DDX19 zu einer verstärkten ATP-Beladung, was wiederum dazu führt, dass sich DDX19 in einer „geschlossenen“ Konformation befindet, die für die RNA-Bindung bevorzugt ist<sup>[66]</sup>. Ähnlich dazu postulierten Lin *et al.* (2018), dass die Bindung von Gle1 zu einer teilweisen Freisetzung der auto-inhibitorischen Helix führt und die Bildung der geschlossenen Konformation anregt<sup>[57]</sup>. Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von Montpetit *et al.* (2011), die postulieren, dass die Bindung von Gle1 zu einer teilweise offenen, katalytisch inaktiven und ADP-gebundenen Konformation führt, die die mRNP-Bindung ausschließt<sup>[58]</sup>.

In den ersten beiden Publikationen wurde durch das Gle1 die RNA-Bindung an das DDX19 vorbereitet/begünstigt während in der dritten Publikation das Gle1 eine effektive mRNP-Freisetzung nach erfolgter ATP-Hydrolyse bewirkte.

## 1.4 Motivation und Zielsetzung

### 1.4.1 DDX19 beim mRNP-Export

Die Direktionalität des Exports von mRNPs aus dem Zellkern in das Zytoplasma gewährleistet, dass die im Zellkern transkribierten mRNPs mit hoher Effizienz zu den Ribosomen im Zytoplasma weitergeleitet werden. Dieser Prozess ist somit von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Proteinbiosynthese. Entsprechend wichtig ist es, den genauen Mechanismus des mRNP-Exports zu verstehen.

Im Gegensatz zum Proteinexport durch RanGTP sorgt beim mRNP-Export die RNA-Helikase DDX19 zusammen mit NUP214 und Gle1 für die gezielte Entfernung der Exportfaktoren der mRNPs auf der zytoplasmatischen Seite der NPCs. Dieser Prozess wird bereits seit sehr vielen Jahren auf Grundlage von Strukturdaten und *in vitro*-Studien erforscht. Dennoch herrscht Uneinigkeit über die genaue Funktion von Gle1<sup>[55]</sup>. Die Frage nach der Funktionalität von Gle1 ist jedoch besonders vor dem Hintergrund wichtig, dass genetische Studien ein defektes GLE1-Gen

in einen Zusammenhang mit den Motoneuronen-Krankheiten LCCS1 (englisch *lethal contracture congenital syndrome 1*), LAAHD (englisch *lethal arthrogryposis with anterior horn cell dieses*) und in seltenen Fällen von ALS (englisch *amyotrophic lateral sclerosis*) stellen konnten<sup>[73],[74],[75]</sup>.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte der Prozess des mRNP-Exports in HeLa-Zellen *in vivo* mittels Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Auf diese Weise sollte der genaue Mechanismus des mRNP-Exports, einschließlich der Funktion von Gle1, sowie die Kinetik des Prozesses bestimmt werden.

Zu diesem Zweck musste eine induzierbare Zelllinie erzeugt werden, die DDX19-HaloTag exprimiert, das die Visualisierung einzelner DDX19-Proteine ermöglicht. Für die Visualisierung der mRNPs wurde ein Ribonukleoprotein, das hnRNP A1, verwendet, das kotranskriptionell an die mRNPs bindet und diese bis in das Zytoplasma begleitet. Um einzelne hnRNP A1-Proteine zu visualisieren, musste eine Zelllinie erzeugt werden, die das hnRNP A1-SnapTag exprimiert. Gleichzeitig mussten beide Zelllinien eGFP-NTF2 zur zeitgleichen Visualisierung der NPCs exprimieren.

Darüber hinaus sollten drei induzierbare Zelllinie erzeugt werden, die jeweils eine DDX19-Mutante exprimieren. Die drei Mutanten waren die K385E-Mutante, die defizient in der Gle1-Bindung ist, die D223R-Mutante, die defizient in der NUP214 *und* mRNA-Bindung ist und die E243Q-Mutante, die nicht im Stande ist ATP zu hydrolysieren. Ein Vergleich der Bindungszeiten und -häufigkeiten (Anzahl der Bindungen pro Minute) zwischen den Wildtyp- und den mutierten Proteinen sollte genutzt werden, um die Reaktionsabfolge der einzelnen Komponenten im mRNP-Export zu bestimmen.

## 1.4.2 Identifizierung der NLS von DDX19

Obwohl bereits ein sehr detailliertes Bild über den DDX19 vermittelten mRNP-Export herrscht, ist nur wenig über den Transport von DDX19 selbst durch die Kernporenkomplexe bekannt. Erst vor drei Jahren gelangen es Lari *et al.* (2019) die NES auf der N-terminalen Seite des DDX19 zu identifizieren<sup>[76]</sup>. Die Position und Sequenz der NLS blieb bis heute unbekannt.

Deshalb sollte eine basenreiche Sequenz auf der C-terminalen Seite des Proteins

(<sup>425</sup>HRIGRTGRFGKR<sup>436</sup>) auf ihre Funktionalität als NLS untersucht werden. Zu diesem Zweck sollte die Sequenz mit zwei eGFP-Molekülen kloniert und ihre subzelluläre Verteilung anschließend in HeLa-Zellen untersucht werden. Diese Verteilung sollte mit Referenzsequenzen verglichen werden, um die Effektivität der zu untersuchenden NLS qualitativ einzuordnen.

Weiterhin sollte eine DDX19-HaloTag-Mutante erstellt werden, bei der die basischen Aminosäuren in der potentiellen NLS durch Alanine substituiert wurden. Dies sollte zu einer Reduktion der Wechselwirkungen mit den Transportfaktoren führen. Anschließend wurde die Fähigkeit der DDX19-HaloTag-Mutante und des Wildtyps DDX19-HaloTag, *in vivo* in den Zellkern importiert zu werden, verglichen.

# Kapitel 2

## Material

### 2.1 Chemikalien

**Tabelle 2.1:** Chemikalienliste

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
1-Step Ultra TMB Blotting Solution	Thermo Scientific
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC)	Sigma-Aldrich
2 kb Plus DNA ladder	NEB
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth GmbH
Actinomycin D	Calbiochem/ Merck
Agar-Agar	Carl Roth GmbH
Aarose Broad Range	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
Doxycyclin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom
Ethanol	VWR
Ethidiumbromid 0.025 %	Carl Roth GmbH
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom
Fluoresbrite Carboxy BB. 10 Micron Microspheres	Polysciences
Glycerol	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
HEPES-Puffer (1M)	Sigma-Aldrich
INTERFERin <sup>®</sup>	Polyplus
Immersionsöl Immersol 518 F	Zeiss
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Life Technologies
Janelia-Fluor-549-HaloTag-Ligand	Janelia

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
jetPRIME <sup>®</sup> Reagenz	Polyplus
jetPRIME <sup>®</sup> Puffer	Polyplus
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH
L-Glutamin	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 20 %	AppliChem
N-hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin 100x	Sigma-Aldrich
Puromycin	Alfa Aesar
Rotiphorese Gel 30 (37.5:1)	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH
Trypsin/EDTA-Lösung 10x	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck

## 2.2 Primer und Plasmide

Die verwendeten Ausgangsplasmide sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.2:** Verwendete Ausgangsplasmide.

<b>Plasmid</b>	<b>Herkunft</b>
pDONR221	Invitrogen
pQCXIP-eGFP-GW-NTF2	Clontech (modifiziert von Sabine Wirths)
pReceiver-B09-DDX19	GeneCopeia
pRetroX-TetOne-GW-Halo	Clontech (modifiziert von Sabine Wirths)

In Tabelle 2.3 sind sämtliche Primer aufgelistet, die zur Erzeugung der nötigen Plasmide verwendet wurden.

Die ersten beiden Primer wurden verwendet, um ausgehend von dem pReceiver-B09-DDX19 ein attB flankiertes DDX19 PCR-Produkt zu erzeugen, welches im Folgeschritt in den pDONR221 Vektor eingebracht werden konnte. Die Plasmide drei bis acht wurden verwendet, um die jeweilige Mutation in die DDX19-Sequenz

im pDONR221 Vektor einzuführen. Die Plasmide neun bis vierzehn wurden verwendet, um die NLS-Sequenz von DDX19 ausgehend vom pReceiver-B09-DDX19 zu mutieren (s. Kapitel 3.5.1).

Die jeweils überlappenden Bereiche der Primer, die für die Mutationen verwendet wurden sind fett hervorgehoben und die jeweiligen Nukleotide, die die Mutationen einführen sind rot markiert.

**Tabelle 2.3:** Verwendete Primer.

Name	Sequenz in 5' - 3' Richtung
DDX19 attB fw	ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctccaccatggccactgactcatgggc
DDX19 attB rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgttggtatTTTTtcaatctcgtc
DDX19 D223R fw	<b>gtgctg</b> <b>cgct</b> <b>gg</b> gtgctccaagctcaagttcattgatccaagaaaatcaaggtg
DDX19 D223R rev	<b>gcaccag</b> <b>cg</b> <b>cag</b> <b>cac</b> agtcaccaggggtgccaatgacaatc
DDX19 E243Q fw	<b>g</b> ttctggat <b>cagg</b> ctgatgcatgatagccactcagggccac
DDX19 E243Q rev	<b>catcag</b> <b>ct</b> <b>gat</b> <b>ccaga</b> acaaacaccttgattttcttgggatcaatgaactgagc
DDX19 K385E fw	<b>g</b> caaagag <b>gag</b> gtttt <b>gg</b> tgaccaccaactgtgtgccccg
DDX19 K385E rev	<b>cac</b> caaa <b>ac</b> <b>ct</b> <b>c</b> ctcttt <b>gc</b> ccctctcggaagcgtcaatcactg
DDX19 NLS Mut1 fw	<b>cac</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>at</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b>
DDX19 NLS Mut1 rev	<b>gt</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>c</b>
DDX19 NLS Mut2 fw	<b>a</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>g</b>
DDX19 NLS Mut2 rev	<b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b>
DDX19 NLS Mut3 fw	<b>t</b> <b>t</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>a</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>c</b>
DDX19 NLS Mut3 rev	<b>a</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>a</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>t</b> <b>g</b> <b>g</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b> <b>c</b>

## 2.3 Enzyme

Die Enzyme, die zur Erzeugung der nötigen Plasmide verwendet wurden, sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.4:** Verwendete Enzyme.

<b>Enzym</b>	<b>Firma</b>
BamHI	NEB
BP Clonase II Enzym Mix	Thermo Scientific
DpnI	NEB
Herculase II Fusion DNA-Polymerase	Agilent
LR Clonase II Enzym Mix	Thermo Scientific
NcoI	NEB
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Proteinase K	Thermo Scientific
ROTI <sup>®</sup> -Pol ProofRead	Carl Roth

## 2.4 Medien und Puffer

Die nachfolgende Tabelle fasst die für die Transformation von DH5 $\alpha$ -Bakterien verwendeten Medien zusammen.

**Tabelle 2.5:** Transformations-Medien für DH5 $\alpha$ -Bakterien.

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
LB-Agar	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid 15 g/l Agar-Agar pH 7
LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Natriumchlorid pH 7
SOC	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 0.5 g/l Natriumchlorid 3.6 g/l Glukose pH 7

Die benötigten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.6:** Zusammensetzung der verwendeten Puffer.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DNA-Ladepuffer	0.25 % (w/v) Bromphenolblau 60 % Glycerol
PBS	137 mM Natriumchlorid 2.7 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1.8 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7.0
MES	100 mM MES 500 mM Natriumchlorid pH 6.0

Die verwendeten Zellmedien sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 2.7:** Zusammensetzung der verwendeten Zellmedien.

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Zellkulturmedium	500 ml DMEM 10 % (v/v) FBS 2 mM L-Glutamin 1x Penicillin, Streptomycin 0.5 µg/ml Puromycin
Wachstumsmedium	500 ml DMEM 10 % (v/v) FBS 2 mM L-Glutamin 1x Penicillin, Streptomycin
Selektionsmedium	500 ml DMEM 10 % (v/v) FBS 2 mM L-Glutamin 1x Penicillin, Streptomycin 2 µg/ml Puromycin

## 2.5 Spezielles Verbrauchsmaterial

**Tabelle 2.8:** Spezielle Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller
35-mm- $\mu$ -ibidi Schalen	Ibidi
Amicon Ultra-4 100 K	Merck
Cryo-Konservierungsröhrchen	nunc
Deckgläser 24x24 mm	Marienfeld
Einmal-Küvetten	BRAND
Gateway System	Thermo Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoScientific
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
Retro-X <sup>™</sup> Tet-One <sup>™</sup> Inducible Expression System	TaKaRa
siRNA (GCU CCA AGC UCA AGU UCA U dTdT)	Microsynth
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> )	VWR
Zentrifugenflaschen 500 ml	Nalgene
Zentrifugenrotor JA 10 Rotor	BeckmanCoulter
Zentrifugenröhrchen mit verschließbarer Kappe	VWR

## 2.6 Geräte

**Tabelle 2.9:** Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Axiovert 200 Mikroskopstativ	Zeiss
Brutschrank	Binder
ibidi Heating System, Universal Fit	Ibidi
LSM 880 mit Airyscan	Zeiss
nanoDrop 2000 c	Thermo Scientific
Pipetierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Schüttelinkubator Ecotron	Infors HT
Sterilbank KS12	Heraus
ThermoMixer C	Eppendorf
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex
UV-Tisch	biostep
Vortexmischer Genius 3i	IKA
Waage ALC-8120.2 Acculab	Bradford
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Allegra X-22R	BeckmanCoulter
Zentrifuge Avanti J-30 I	BeckmanCoulter

# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Rekombinantes DDX19-HaloTag

Ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit lag in der Analyse der Bindungskinetik von DDX19 an den Kernporenkomplexen von lebenden HeLa-Zellen durch die Einzelmolekülfluoreszenzmikroskopie. Um die einzelnen DDX19-Moleküle zu visualisieren, wurden diese mit einem HaloTag fusioniert und anschließend fluoreszenzmarkiert. Die molekularbiologischen Methoden, die für die Klonierung nötig waren, sind im nachfolgenden beschrieben.

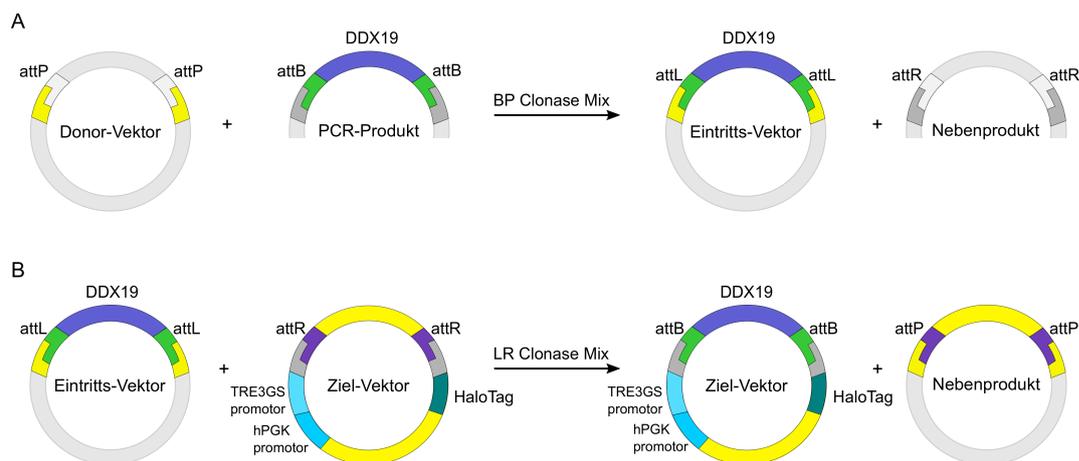
#### 3.1.1 Klonierung des DDX19-HaloTag-Fusionsproteins

Ausgehend vom kommerziell erhältlichen Vektor pReceiver-B09-DDX19 von GeneCopeia wurde das Gen für das DDX19 in einer PCR-Reaktion isoliert und vervielfältigt. Hierfür wurde der Vektor mit den *Primern* (s. Tabelle 2.3), den Nukleotiden und der DNA-Polymerase Herculase II im entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben zusammengegeben und umgesetzt<sup>[77]</sup>.

Um den Erfolg der Reaktion zu prüfen, wurde die gesamte Probe mit DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1%-igen Agarosegel 30 min bei einer Spannung von 130 V aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurde das PCR-Produkt aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *NucleoSpin<sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up Kit* aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend in das pDONR221-Plasmid von Invitrogen eingeführt. Hierfür wurde die *Gateway*-Klonierung von Invitrogen verwendet<sup>[78]</sup>.

Dabei wurde das PCR-Produkt, welches das Gen für DDX19 enthielt, zunächst im ersten Schritt, der BP-Reaktion, in ein Donor-Plasmid eingefügt. Das dabei entstandene Plasmid hieß Eintritts-Plasmid. Anschließend wurde das Gen für DDX19 im zweiten Schritt, der LR-Reaktion, aus dem Eintritts-Plasmid in das gewünschte Ziel-Plasmid rekombiniert. (s. Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung (A) der BP- und (B) der LR-Reaktion. Details siehe Text.

Für die BP-Reaktion wurden Donor-Plasmid, PCR-Produkt und der *BP Clonase II Enzym Mix* im entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben zusammengegeben und 3:30 h bei RT inkubiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde anschließend 1  $\mu$ l Proteinase K hinzugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. 5  $\mu$ l der BP-Reaktion wurden anschließend in chemokompetente DH5 $\alpha$  Bakterien transformiert<sup>[79]</sup>.

Nach der Transformation wurde die Bakteriensuspension auf LB Platten mit 0.1 mM Kanamycin aufgebracht und die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Klon von der Platte ausgewählt und die Miniprep nach Protokoll von *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* von Thermo Scientific durchgeführt<sup>[80]</sup>.

Die Kontrolle auf Erfolg der BP-Reaktion erfolgte zunächst durch einen Kontrollverdau mit NcoI nach Herstellerangaben bei 37°C für 1 h<sup>[81]</sup>. Zusätzlich zum Kontrollverdau wurde das Plasmid durch die Firma SeqLab-Microsynth sequenziert.

Im zweiten Schritt der *Gateway*-Klonierung wurde das Gen für DDX19 aus dem Eintritts-Plasmid in das Ziel-Plasmid rekombiniert (s. Abbildung 3.1 B). Als Ziel-Plasmid wurde dabei der pRetroX-TetOne-Puro von Clontech verwendet, das im Vorfeld an C-terminaler Seite mit einem HaloTag kloniert<sup>1</sup> wurde und im Rahmen dieser Arbeit als pRetroX-TetOne-GW-Halo bezeichnet wird. Dieses Plasmid ermöglichte im späteren Verlauf die induktive Expression des gewünschten Proteins über den hPGK- und TRE3GS-Promotor (s. Abbildung 3.1 B)<sup>[82]</sup>.

Für die LR-Reaktion wurden das Eintritts-Plasmid, das Ziel-Plasmid und der *LR Clonase II Enzym Mix* im entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben zusammen gegeben und 18 h bei RT inkubiert.

Um die Reaktion zu stoppen, wurde anschließend 1 µl Proteinase K hinzugegeben und 10 min bei 37°C inkubiert. 5 µl der LR-Reaktion wurden anschließend in chemokompetente DH5α Bakterien transformiert<sup>[79]</sup>.

Nach der Transformation wurde die Bakteriensuspension auf LB Platten mit 0.1 mM Kanamycin aufgebracht und die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Klon von der Platte ausgewählt und eine Midiprep nach dem Protokoll von Macherey-Nagel durchgeführt<sup>[83]</sup>.

Die Kontrolle auf Erfolg der LR-Reaktion erfolgte zunächst durch einen Kontrollverdau mit NcoI nach Herstellerangaben bei 37°C für 1 h<sup>[81]</sup>. Zusätzlich zum Kontrollverdau wurde das Plasmid durch die Firma Seqlab-Microsynth sequenziert. Das fertige Produkt wird im Rahmen dieser Arbeit pRetro-TetOne-DDX19-Halo bezeichnet.

### 3.1.2 Mutagenese-PCR

Weiterhin wurden drei DDX19-Mutanten erzeugt, die jeweils in einem bestimmten Schritt des mRNP-Exports gehemmt waren. Diese Mutanten sollten später dabei helfen, die genaue Funktion von DDX19, mRNP, NUP214 und Gle1 im mRNP-Export besser zu verstehen.

Die Mutanten wurden ausgehend vom pReceiver-B09-DDX19 Plasmid nach dem

---

<sup>1</sup>Die Klonierung des HaloTags an das Plasmid wurde von Sabine Wirths durchgeführt.

Protokoll von Liu und Naismith (2008) erstellt<sup>[84]</sup>. Dabei wurden die Mutanten D223R, E243Q und K385E hergestellt. Die jeweiligen funktionalen Defizite der Mutanten sind in der Tabelle (3.1) zusammengefasst.

**Tabelle 3.1:** Auflistung der erstellten DDX19-Mutanten.

<b>Mutante</b>	<b>Eigenschaft</b>
DDX19 D223R	Keine Bindung zu Nup214 <i>und</i> mRNP
DDX19 E243Q	ATPase Funktion gehemmt
DDX19 K385E	Keine Bindung zu Gle1

Der Einfachheit halber erhalten die mutierten Proteine folgende Bezeichnungen für den weiteren Verlauf der Arbeit:

**Tabelle 3.2:** Alternative Bezeichnung der DDX19-Mutanten.

<b>Mutante</b>	<b>Alternative Bezeichnung</b>
DDX19 D223R	DDX19 <sup>-NUP214/RNA</sup>
DDX19 E243Q	DDX19 <sup>-ATPase</sup>
DDX19 K385E	DDX19 <sup>-Gle1</sup>

Zur Herstellung wurden die entsprechenden *Primer* (Tabelle 2.3) zusammen mit dem pReceiver-B09-DDX19-Plasmid, den Nukleotiden und der *Pfu* DNA-Polymerase im entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben zusammengegeben und umgesetzt<sup>[85]</sup>.

Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 1 h bei 37°C mit DpnI verdaut. Dadurch wurde sichergestellt, dass das methylierte Ausgangsplasmid (pReceiver-B09-DDX19) entfernt wurde. Der Erfolg der Mutationen wurde mittels eines 1%-igen Agarosegels sowie einer darauffolgenden Sequenzierung der Firma SeqLab-Microsynth überprüft.

Nachfolgend ist eine Zusammenfassung der hergestellten Plasmide aufgeführt.

**Tabelle 3.3:** Auflistung der erstellten Plasmide.

Plasmid	Exprimiertes Protein
pRetroX-TetOne-DDX19-Halo	DDX19-Halo
pRetroX-TetOne-DDX19-D223R-Halo	DDX19 <sup>-NUP214/RNA</sup> -HaloTag
pRetroX-TetOne-DDX19-E243Q-Halo	DDX19 <sup>-ATPase</sup> -HaloTag
pRetroX-TetOne-DDX19-K385E-Halo	DDX19 <sup>-Gle1</sup> -HaloTag

## 3.2 Zellkultur

Die wie in den Kapiteln 3.1.1 - 3.1.2 beschrieben hergestellten Plasmide wurden im nächsten Schritt in das Genom von HeLa-Zellen eingebaut, um stabile Zelllinien zu erzeugen.

### 3.2.1 Retroviraler Gentransfer

Für diesen Zweck wurde der retrovirale Gentransfer nach dem Protokoll von Clontech durchgeführt<sup>[86]</sup>. Als „Verpackungszelllinie“ wurden HEK GP2-293-Zellen verwendet, die konstitutiv die gag- (*group-specific antigen*) und pol- (reverse Transkriptase) Proteine exprimieren. Als Hüllprotein wurde das VSV-G Protein verwendet, das auf dem pVSV-G-Plasmid kodiert war und zusätzlich mit dem retroviralen Expressionsplasmid pRetroX-TetOne-DDX19-Halo in die HEK GP2-293 Zellen transfiziert werden musste, um infektiöse Viren herzustellen. Das retrovirale Expressionsplasmid enthielt abseits des Transgens (DDX19-HaloTag) das retrovirale Verpackungselement psi, eine Antibiotikaresistenz sowie für die Transkription und Prozessierung notwendigen Elemente.

Um infektiöse Viren herzustellen, wurde ca.  $3 \times 10^5$  HEK GP2-293 Zellen auf eine 60-mm-Zellkulturschale passagiert (Kapitel 3.2.2). Nach drei Tagen wurden dann 2  $\mu\text{g}$  pVSV-G mit 2  $\mu\text{g}$  pRetroX-TetOne-DDX19-Halo nach dem Transfektionsprotokoll von Polyplus mit jetPRIME in die Zellen transfiziert und für 48 h im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert, bis sich ausreichend Virenpartikel gebildet haben.

Einen Tag vor der Transduktion wurden die HeLa-Zellen vorbereitet, indem ca.  $1.2 \times 10^6$  HeLa-Zellen mit 2 ml Zellkulturmedium (s. Tabelle 2.7) auf eine Zellkulturschale passagiert und für 24 h im Inkubator gelagert wurden.

Am Tag der Transduktion wurde 1 ml des Überstands aus den HEK GP2-293-Zellen mit infektiösen Retroviren entnommen und zu den am Vortag vorbereiteten HeLa-Zellen gegeben. Nach erneuten 24 h wurde das Transduktionsmedium gegen frisches Wachstumsmedium (s. Tabelle 2.7) ersetzt und die Zellen für weitere 24 h im Inkubator gelagert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium gegen Selektionsmedium (s. Tabelle 2.7) ausgetauscht und der Prozess der Selektion für sieben Tage fortgeführt.

Nach den sieben Tagen haben nur diejenigen Zellen überlebt, bei denen die Transduktion erfolgreich verlief und die somit über eine entsprechende Antibiotikaresistenz besaßen. Diese Zellen wurden für die Langzeitlagerung nach einem Standardprotokoll von ThermoFisher Scientific kryokonserviert.

Dieses Vorgehen wurde mit den Plasmiden pRetroX-TetOne-DDX19-D223R-Halo, pRetroX-TetOne-DDX19-E243Q-Halo und pRetroX-TetOne-DDX19-K385E-Halo wiederholt.

Für die Visualisierung von mRNPs wurde dieses Protokoll mit dem Plasmid pQCXIIH-hnRNP A1-SnapTag wiederholt<sup>2</sup>. Das in dem Plasmid enthaltene Transgen (hnRNP A1-SnapTag) exprimiert das heterogene nukleare Ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1) zusammen mit dem SnapTag.

Das hnRNP A1 ist ein RNA-bindendes Protein, das bereits während der Transkription an die mRNA bindet und dieses bis ins Zytoplasma begleitet<sup>[87],[88]</sup>. Somit eignet es sich hervorragend zur Visualisierung von mRNPs während ihres Exports in das Zytoplasma<sup>[89]</sup>.

Die Transduktion des Plasmids pQCXIIH-hnRNP A1-SnapTag erfolgte dabei in HeLa-Zellen, die eGFP-NTF2 bereits stabil exprimierten. Diese eGFP-NTF2 exprimierenden Zellen wurden im Vorfeld von Sabine Wirths angefertigt.

Eine Zusammenfassung der erstellten Zelllinien ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

---

<sup>2</sup>Die Erstellung des Plasmids erfolgte mittels der *Gateway* Klonierung in der Bachelorarbeit von Ricarda Seifert (2020).

**Tabelle 3.4:** Auflistung der erstellten Zelllinien.

Zelllinie	Exprimiertes Protein
HeLa S3-DDX19	DDX19-HaloTag
HeLa S3-DDX19 <sup>-NUP214/RNA</sup>	DDX19 <sup>-NUP214/RNA</sup> -HaloTag
HeLa S3-DDX19 <sup>-ATPase</sup>	DDX19 <sup>-ATPase</sup> -HaloTag
HeLa S3-DDX19 <sup>-Gle1</sup>	DDX19 <sup>-Gle1</sup> -HaloTag
HeLa eGFP-NTF2-hnRNP A1	eGFP-NTF2 und hnRNP A1-SnapTag

### 3.2.2 Passagieren von Zellen

Lagen Zellen bereits in Kultur vor, so wurden diese bei einer 80-90%igen Konfluenz nach einem Standardprotokoll passagiert<sup>[90]</sup>. Dabei wurden die Zellen zwei Mal pro Woche in einem Verhältnis von 1:10 in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

Sollten Zellen mikroskopiert werden, wurden diese zwei Tage zuvor in einem Verhältnis von 1:5 zusätzlich in 35-mm- $\mu$ -Ibdi-Schalen ausgesät.

### 3.2.3 Transiente Expression

Die Visualisierung der Kernporenkomplexe erfolgte über den nukleären Transportfaktor 2 (NTF2), welches als eGFP-NTF2 Fusionsprotein transient in den Zellen aus Tabelle 3.3 exprimiert wurde. Hierfür wurde am Vortag der Messung das Plasmid pQCXIP-eGFP-NTF2 nach dem Transfektionsprotokoll von Polyplus<sup>[91]</sup> mit jetPRIME in die HeLa-Zellen transfiziert, wo es von den Zellen konstitutiv exprimiert wurde.

### 3.2.4 Induktion und Fluoreszenzfärbung

Die Expression der DDX19-HaloTag-Fusionsproteine (s. Tabelle 3.3) erfolgte hingegen induktiv. Um die Expression zu starten, wurden die Zellen 20 Stunden vor der Messung mit 500 nM Doxycyclin induziert.

Die Visualisierung der Proteine erfolgte über die Färbung mit 0.3 nM des Farbstoffes Janelia Fluor 549 (JF549). Dieser wurde für 30-45 min mit den Zellen inkubiert und nicht reagierter Farbstoff mit drei anschließenden Waschschritten mit je 2 ml PBS entfernt.

Die Färbung des hnRNP A1-SnapTag erfolgte mit 1.3 nM des Farbstoffes 647-SiR. Dieser wurde 45 min mit den Zellen inkubiert und nicht reagierter Farbstoff mit vier anschließenden Waschschritten mit je 2 ml Zellkulturmedium (s. Tabelle 2.7) entfernt. Das Zellkulturmedium enthielt zusätzlich noch 200 µg/mL Hygromycin. Bei jedem Waschschrift wurde das Medium für 5 min mit den Zellen inkubiert.

### 3.2.5 Kontrollmessungen mit Actinomycin D

Weiterhin wurden die Zelllinien HeLa S3-DDX19<sup>Gle1</sup> sowie HeLa eGFP-NTF2-hnRNP A1 unter Zugabe von Actinomycin D (AMD) nach Kapitel 3.3 vermessen. Hierbei sorgte das AMD durch Interkalation mit transkribierender DNA für die Hemmung der RNA-Polymerase II und so den Stopp der Transkription<sup>[92]</sup>.

Dafür wurden die DDX19-HaloTag- sowie hnRNP A1-SnapTag-Proteine vor der Messung nach Kapitel 3.2.4 gefärbt und die Zellen anschließend mit 2 µg/ml AMD für 2 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nicht reagiertes AMD wurde in drei Waschschritten mit je 2 ml PBS von den Zellen entfernt<sup>3</sup>. Mit diesen Messungen sollte unter anderem die Funktionalität des hnRNP A1-SnapTag-Fusionsproteins überprüft werden (Details siehe in Kapitel 4.1.2).

### 3.2.6 siRNA-Knockout des endogenen DDX19

Auch das zum Färben benötigte HaloTag hat mit 297 Aminosäuren eine zusätzliche Masse von 33 kDa in das DDX19 eingeführt<sup>[93]</sup>, weshalb die Funktionalität dieses Fusionsproteins ebenfalls im Vorfeld überprüft werden musste. Da das DDX19 mit dem Export der mRNPs eine zentrale Rolle in der Proteinbiosynthese hat, führt die Abwesenheit dieses Proteins zum Zelltod<sup>[94]</sup>.

Um nun die Funktionalität des DDX19-HaloTags zu überprüfen, wurde die Überlebensrate der DDX19-HaloTag-Zellen unter Abwesenheit von endogenem DDX19 und Anwesenheit von rekombinantem DDX19-HaloTag überprüft. Hierfür wurde die Translation der endogenen DDX19-Proteine mit einer geeigneten siRNA gehemmt und die Expression der rekombinanten DDX19-HaloTag-Proteine mit Doxycyclin nach Kapitel 3.2.4 induziert. Die Überlebensrate dieser Zellen wurde mit den Überlebensraten unbehandelter Zellen (nur endogenes DDX19 in den Zellen) sowie Zellen mit siRNA und ohne Doxycyclin (kein endogenes DDX19 *und* kein rekomb-

---

<sup>3</sup>Die Messungen an den HeLa-eGFP-NTF2-hnRNP A1-Zellen mit und ohne AMD wurden von Max Kaida im Rahmen seiner Masterarbeit (2022) und von Julia Nehls durchgeführt,

binantes DDX19-HaloTag in den Zellen) verglichen.

Zu diesem Zweck wurde die siRNA (5' - GCU CCA AGC UCA AGU UCA UdTdT - 3') nach Hodroj *et al.* (2017)<sup>[59]</sup> verwendet. Die Zellen für diese Messungen wurden wie nachfolgend beschrieben vorbereitet.

An Tag eins wurden  $10^5$  Zellen in je drei *Wells* einer 6-*Well*-Platte ausgesät. Eines der *Wells* wurde an Tag zwei für 20 Stunden mit 500 nM Doxycyclin inkubiert. An Tag drei wurde das gleiche sowie ein weiteres *Well* mit 5 nM siRNA für vier Stunden behandelt. Dafür wurde das Transfektionsprotokoll von Polyplus<sup>[95]</sup> mit INTERFERin verwendet. Die Zellen im dritten *Well* blieben unbehandelt. Nach drei weiteren Tagen wurden die Zellen aller drei *Wells* untersucht.

Die Untersuchung der *Wells* erfolgte mittels Trypanblau-*Assay* nach Louis und Siegel (2011)<sup>[96]</sup>. Trypanblau ist ein Vital-Farbstoff, der von abgestorbenen oder perforierten Zellen aufgenommen wird und diese dadurch blau färbt.

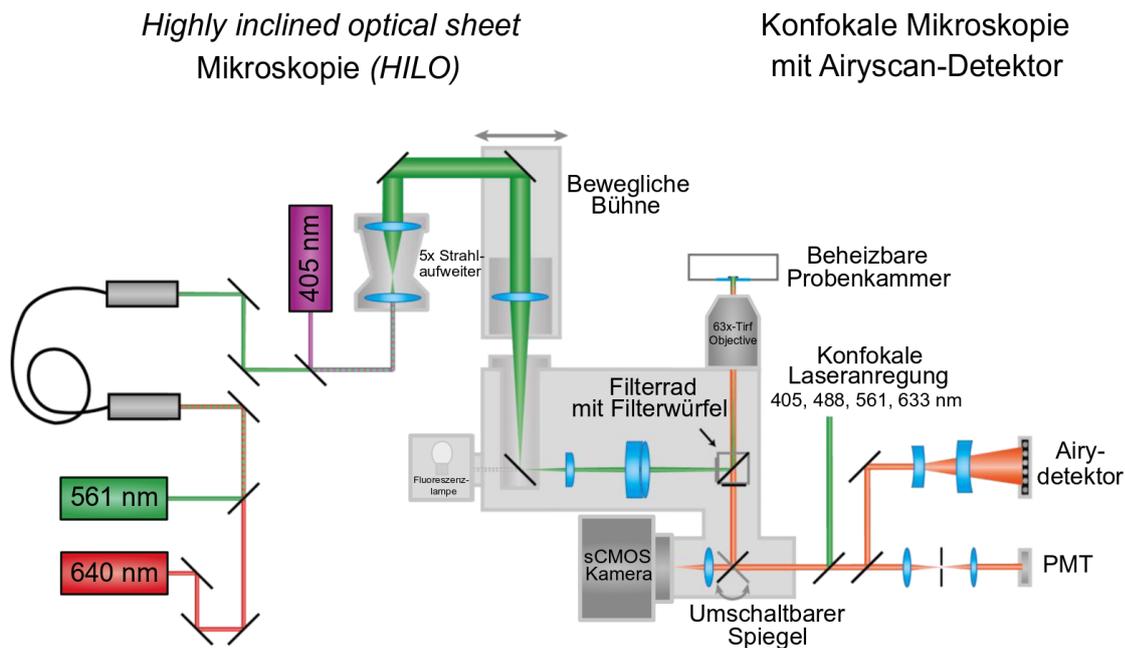
Dafür wurde zunächst der Zellüberstand in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und die Zellen mit je 1 ml PBS gewaschen. Die Waschlösung wurde ebenfalls in dem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit 500  $\mu$ l Trypsin inkubiert und die Trypsinierung mit 500  $\mu$ l Zellmedium gestoppt. Die gesamte Lösung wurde ebenfalls in dem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei 200 x g für 5 min (Dec. 1) zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 500  $\mu$ l Zellmedium resuspendiert. Anschließend wurden 500  $\mu$ l Trypanblau-Lösung (0.4 %) hinzugegeben und die ungefärbten Zellen mittels einer Neubauer-Kammer gezählt.

### 3.3 Mikroskopische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine spezielle Kombination aus einem kommerziell erhältlichen konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop und einer Ergänzung um eine HILO-Beleuchtung (*Highly Inclined Optical Sheet*) verwendet (s. Abbildung 3.2)<sup>4</sup>,<sup>[97]</sup>.

---

<sup>4</sup>Die Ergänzung der HILO-Beleuchtung erfolgte im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Jan Ruland (2021).



**Abbildung 3.2:** Schematische Darstellung des verwendeten Mikroskops. Auf der linken Seite befindet sich die von Dr. Jan Ruland aufgebaute HILO-Beleuchtung. Das Emissionslicht aus diesem Strahlengang wurde mit einer sCMOS-Kamera detektiert. Auf der rechten Seite ist der Strahlengang des LSM880 schematisch abgebildet. Das Emissionslicht kann hier entweder durch einen PMT- oder einen Airyscan-Detektor aufgefangen werden. Abbildung modifiziert aus Ruland *et al.* (2021)

Der konfokale Teil diente der Abbildung der Kernporen (eGFP-NTF2) mit hoher räumlicher Auflösung, wohingegen die Ergänzung verwendet wurde, um einzelne DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Proteine mit hoher zeitlicher Auflösung abzubilden.

Bei dem konfokalen Mikroskop handelte es sich um das konfokale *Laserscanning* Mikroskop 880 (LSM880) von Zeiss. Dieses war mit einer Airyscan-Detektionseinheit ausgestattet, die hochauflösende Aufnahmen unterhalb des Rayleigh-Kriteriums ermöglichte, indem eine Kombination aus dem konfokalen Prinzip und dem Prinzip der Pixel-Neuzuordnung verwendet wurde. Eine anschließende Wiener Dekonvolution der erhaltenen Aufnahmen ermöglichte eine weitergehende Verbesserung der Auflösung. Eine detaillierte Beschreibung der Prinzipien sowie der Wiener Dekonvolution findet sich in Weisshart (2014), Kubitscheck (2017) und in Wiener (1949)<sup>[98],[99],[100]</sup>.

Für die Einzelmolekülaufnahmen wurde das konfokale Mikroskop um eine *highly inclined and laminated optical sheet* (HILO)-Beleuchtung<sup>[101]</sup> erweitert. Eine ge-

naue Beschreibung des Aufbaus findet sich in Ruland *et al.* (2021)<sup>[97]</sup>.

Im Unterschied zu dem dort beschriebenen Aufbau wurde in dieser Arbeit statt der Andor iXon+ 879D EMCCD-Kamera die Prime BSI sCMOS-Kamera von Teledyne Photometrics verwendet. Dies ermöglichte dank einem Kamerachip mit 4 Megapixeln und einer Quanteneffizienz nahe 95 % Aufnahmen der Einzelmoleküle in einem  $30 \times 30 \mu\text{m}^2$  großem Sichtfeld mit einer Belichtungszeit von 5 ms (DDX19-HaloTag) bzw. 15 ms (hnRNP A1-SnapTag).

Für eine hohe räumliche Auflösung wurde das Ölimmersionsobjektiv  $\alpha$ -Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil Corr M27 TIRF Objektiv von Zeiss verwendet. Sämtliche Aufnahmen wurden über das Beheizungssystem von ibdi bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt.

### 3.3.1 Referenzpartikel zur Alignierung

Da die Aufnahmen der DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Moleküle im Unterschied zu den eGFP-NTF2-Molekülen mit einem separaten Detektionssystem erfolgten, mussten beide Aufnahmen im Nachhinein übereinandergelegt werden, um die Bindungszeiten der DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Moleküle an den Kernporen bestimmen zu können (s. Kapitel 3.4). Zu diesem Zweck war es notwendig, ein Referenzobjekt in die Probe einzuführen, das sowohl von der sCMOS-Kamera als auch mit dem Airyscan-Detektor abgelichtet wurde. Dafür wurden im UV fluoreszierende Mikropartikel der Firma Polysciences verwendet, die nach dem Protokoll von Ruland *et al.* (2021) an die äußere Membran der HeLa-Zellen gebunden wurden. Dazu wurden diese zunächst mit EDAC um eine NHS-Gruppe funktionalisiert und anschließend an die primären Amin-Gruppen der transmembranen Proteine gebunden<sup>[97]</sup>.

### 3.3.2 Datenaufnahme

Um nun die Verweilzeit einzelner DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Proteine an den Kernporen zu messen, wurden zunächst 1000 Bilder über die sCMOS Kamera aufgenommen. Hierbei wurden die mittleren  $300 \times 300$  Pixel mit einer effektiven Pixelgröße von  $0.1 \mu\text{m}$  und einer Belichtungs- sowie Integrationszeit von 5 ms durchgeführt. Die Aufnahmen der hnRNP A1-Proteine erfolgte bei einer Integrationszeit von 15 ms, da der 647-SiR Farbstoff im Vergleich zum JF549-Farbstoff eine  $\sim 7\text{x}$  niedrigere Helligkeit aufweist<sup>[102],[103]</sup>. Die ersten 900 Bilder wurden bei einer Anregung mit 561 nm (DDX19-HaloTag) bzw. mit 640 nm (hnRNP A1-

SnapTag) und die letzten 100 Bilder bei einer Anregung mit 405 nm (Mikropartikel) aufgenommen. Die Farbtiefe betrug 16-Bit. Bei der Anregung wurde eine HILO-Beleuchtung gewählt, um das Signal-zu-Rausch-Verhältnis zu verbessern<sup>[101]</sup>.

Direkt im Anschluss erfolgten die konfokalen Aufnahmen der Kernporen. Hierfür wurden die Proben über 20 Zyklen alternierend mit einer Anregung bei 405 nm (Mikropartikel) und 488 nm (eGFP-NTF2 - Kernporen) auf dem Airyscan-Detektor abgelichtet. Belichtet wurden die mittleren 860 x 860 Pixel mit einer effektiven Pixelgröße von  $\sim 35$  nm. Die Lochblende war auf ca. 2 AU geöffnet und der Airyscan-Detektor jedes Mal optimal justiert. Der Fokus der Probe wurde durch das *Definite Focus* System von Zeiss stabilisiert.

## 3.4 Datenanalyse

Nach erfolgter Datenaufnahme mussten die konfokalen Bilder mit den Einzelmolekülbildern übereinandergelegt werden, um im Nachhinein die Bindungszeiten einzelner DDX19-HaloTag- sowie hnRNP A1-SnapTag-Moleküle mit den NPC feststellen zu können. Da zur Anregung der NTF2-eGFP sowie DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Moleküle zwei unterschiedliche Strahlengänge verwendet wurden, mussten beide Bilder hinsichtlich ihrer Skalierung, Rotation, Verzerrung und Translation angepasst werden. Dies erfolgte mit der Bildauswertungssoftware ImageJ und dafür geschriebenen Makros und Plug-ins<sup>5</sup>. Im nachfolgenden Abschnitt erfolgt eine grobe Beschreibung der Routine. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Ruland *et al.* (2021)<sup>[97]</sup>.

### 3.4.1 Transformation

Die Farbtiefe der sCMOS-Kameraaufnahmen wurde von 16- auf 8-Bit konvertiert. Anschließend wurde der Bildstapel in die 900 Aufnahmen der DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Proteine und die 100 Aufnahmen der Mikropartikel aufgeteilt. Bei beiden Aufnahmen wurde der Hintergrund mit der *Rolling Ball*-Methode (*Rolling Ball*-Radius von 20 Pixeln) subtrahiert und der Kontrast verbessert (0.3 % gesättigte Pixel). Anschließend wurde eine Maximale-Intensitäts-

---

<sup>5</sup>Die Makros und Plug-ins wurden im Rahmen der Promotionsarbeit von Dr. Jan Ruland (2021) geschrieben.

Projektion aus den 100 Aufnahmen der Mikropartikel durchgeführt.

Die Airyscan-Bilder wurden über den Airyscan-Algorithmus entfaltet und die Aufnahmen nach Membran- und Mikropartikelbildern aufgeteilt. Anschließend wurde auch hier der Hintergrund subtrahiert und der Kontrast mit den gleichen Einstellungen wie zuvor verbessert. Die Aufnahmen der Mikropartikel wurden gemittelt und erneut kontrastiert. Die Aufnahmen der Membran wurden aufsummiert und beide Projektionen in 8-Bit umgewandelt.

Mit StackReg wurde Rotation, Skalierung und Verzerrung der beiden Aufnahmen durch eine affine prä-Transformation an den konfokalen Bildern zueinander angepasst und in einem zweiten Schritt dann die Translation über eine weitere affine Transformation an den konfokalen Bildern korrigiert. Die Farbverschiebung aufgrund der chromatischen Aberration zwischen den Aufnahmen bei 488 nm (eGFP-NTF2 - Kernpore) und 561 nm (DDX19-HaloTag) bzw. 640 nm (hnRNP A1-SnapTag) wurde im letzten Schritt durch eine weitere Transformation korrigiert<sup>[97]</sup>.

Der Erfolg der Transformation wurde abschließend für jede einzelne Aufnahme visuell überprüft.

### 3.4.2 Analyse der Kymographen

Nach erfolgreicher Transformation beider Aufnahmen wurden Kymographen von den Einzelmolekülaufnahmen entlang der Kernmembran erstellt, die die einzelnen Bindungsereignisse zwischen DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Molekülen mit den NPCs aufzeigen sollten. In den Kymographen wurden die Signalintensitäten der DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Proteine entlang der Kernmembran als Funktion der Zeit wiedergegeben. Die Kymographen wurden mit Makros und Plug-ins für ImageJ erstellt und werden im Nachfolgenden erklärt<sup>6</sup>.

Die aus der Transformation erhaltene Summen-Projektion der Kernporenkomplexe wurde auf 8-Bit konvertiert, der Hintergrund mit einem *Rolling Ball*-Radius von 15 Pixel subtrahiert, der Kontrast verstärkt (0.1 % gesättigte Pixel) (Abbildung 3.3 A) und anschließend auf 1-Bit skaliert.

---

<sup>6</sup>Die Makros und Plug-ins zur Erstellung der Kymographen wurden von Dr. Jan-Peter Siebrasse erstellt.

Die Maxima wurden über die ImageJ Funktion *Find Maxima* gefunden und anhand dieser die Kernhülle lokalisiert.

Anschließend wurden die Maxima nach dem *nearest neighbour*-Algorithmus sortiert<sup>[104]</sup>. Hierfür wurde ausgehend von einem manuell gewählten Startpunkt der Abstand zwischen jeweils zwei Punkten nach

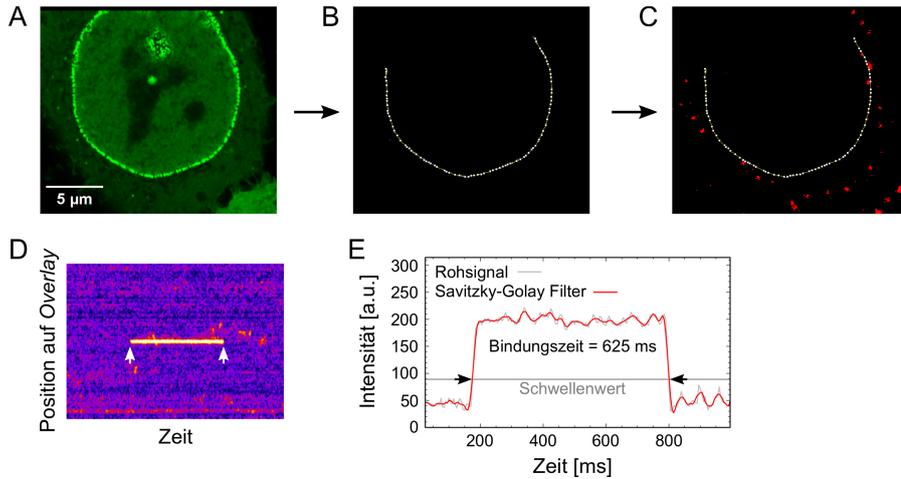
$$d = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2} \quad (3.1)$$

berechnet, wobei  $d$  der Abstand und  $x_{1,2}$  und  $y_{1,2}$  die x,y-Koordinaten der jeweiligen Punkte sind. Anschließend wurden die Punkte entsprechend ihrer Position der Reihe nach sortiert und zu einer Polylinie verknüpft (Abbildung 3.3 B).

Diese Polylinie wurde dann als *Overlay* auf die Einzelmolekülaufnahmen gelegt (Abbildung 3.3 C) und die Intensitäten im Einzelmolekülkanal entlang des *Overlays* gemessen.

Diese Intensitäten wurden graphisch in einem Kymographen wiedergegeben, wobei auf der y-Achse die Intensitäten im Einzelmolekülkanal entlang des *Overlays* und auf der x-Achse die Zeit aufgetragen wurde (Abbildung 3.3 D). Ein Pixel entlang der x-Achse entsprach dabei der Integrationszeit der Kamera bei der jeweiligen Aufnahme.

Um einen gewissen Grad der Flexibilität in der Bindung zu erlauben und so die Ko-Lokalisierungsungenauigkeit, die  $35 \text{ nm}$ <sup>[97]</sup> betrug, zu berücksichtigen, wurden jeweils zwei zusätzliche Kymographen erstellt, die jeweils einen Pixel nach innen bzw. außen verschoben waren.



**Abbildung 3.3:** (A) Summen-Projektion der mit eGFP-NTF2 markierten Kernporenkomplexe. (B) Die aus den Kernporenkomplexen erstellte Polyline nach der manuellen Entfernung "schlechter" NPCs. (C) Überlagerung der Polyline auf die Einzelmolekülaufnahmen von DDX19-HaloTag. (D) Ein Ausschnitt aus dem aus (C) resultierten Kymographen. Bindungen von DDX19-HaloTag-Molekülen auf den Kernporen sind als waagerechte Linien im Kymographen zu erkennen. (E) Intensitäts-Zeit-Plot der in (D) gezeigten Bindung. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$ .

Eine Bindung wurde als solche registriert, wenn die Fluoreszenzintensität der DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Proteine auf dem *Overlay* über dem fünffachen der Standardabweichung des Hintergrundrauschens lag (Abbildung 3.3 E). Diese Bindungen wurden dann über die Zeit gemessen und konnten in den Kymographen als senkrechte Linie zur y-Achse erkannt werden (Abbildung 3.3 D).

Die aus den Bindungsereignissen erhaltenen Intensitätswerte wurden mit dem Savitzky-Golay Filter geglättet. Hierbei wurden gleichgroße Teilmengen der Daten mit dem Polynom

$$Y_j = \frac{1}{N} \sum_{i=\frac{1-m}{2}}^{\frac{m-1}{2}} C_i \cdot y_{j+1}, \quad \frac{m+1}{2} \leq j \leq n - \frac{m-1}{2} \quad (3.2)$$

nach dem Prinzip des kleinsten Fehlerquadrates gefaltet<sup>[105]</sup>.

Die unabhängigen Variable  $x_j$  ist dabei die Zeit und die beobachtete Variable  $y_j$  die Intensität, wobei  $j = 1, \dots, n$  ist. Die Größe der verwendeten Datenmenge pro Faltung betrug  $m$  und  $C_i$  war ein Faltungskoeffizient. Die für  $m$ ,  $C_i$  und  $N$  verwendeten Werte stammen aus Savitzky *et al.* (1964) und sind in Tabelle 3.5

zusammengefasst<sup>[105]</sup>.

**Tabelle 3.5:** Die erste Zeile gibt die verwendete Datenmenge pro Faltung  $m$  an. Hieraus ergibt sich der Start- und Endwert der Summe, die entsprechend der Datenmenge  $m$  in der linken Spalte zusammengefasst sind. Der Faltungskoeffizient  $C_i$  für den jeweiligen Summanden ist in den Spalten unterhalb der Datenmenge aufgelistet. Die Werte für  $N$  sind in der untersten Zeile wiedergegeben.

Datenmenge	5	9	17
-8			-21
-7			-6
-6			7
-5			18
-4		-21	27
-3		14	34
-2	-3	39	39
-1	12	54	42
0	17	59	43
1	12	54	42
2	-3	39	39
3		14	34
4		-21	27
5			18
6			7
7			-6
8			-21
N	35	231	323

### 3.4.3 Anpassung der Bindungszeiten

Nachdem die einzelnen Bindungszeiten der fünf Proteine aus Tabelle 3.4 mittels Kymographen bestimmt wurden, wurden diese Bindungszeiten in Klassen zusammengefasst und für jedes Protein ein entsprechendes Histogramm erstellt. Hierbei erfolgte eine Abschätzung der Klassenbreite nach Freedman und Diaconis (1981)<sup>[106]</sup>.

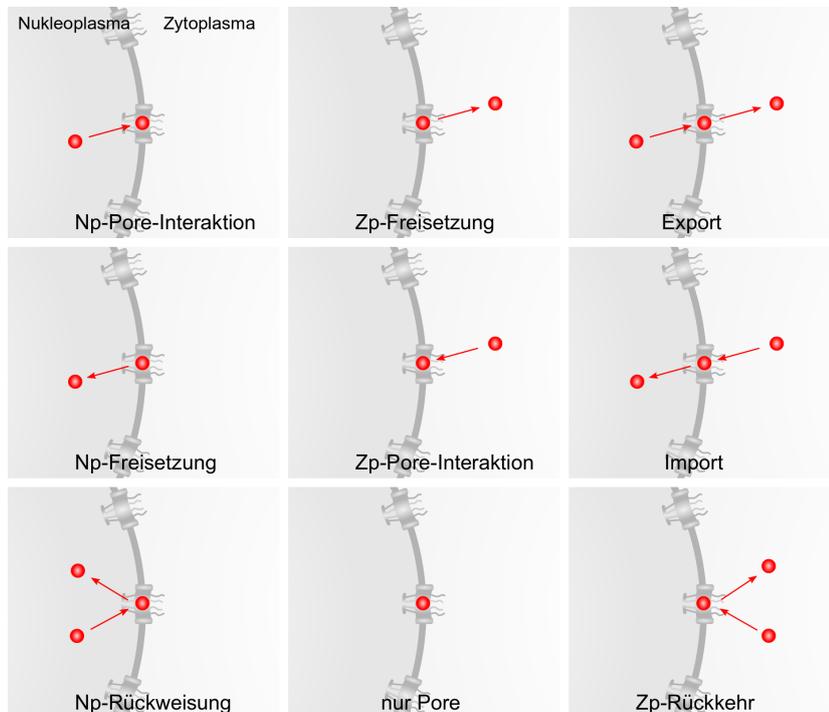
Bei den Bindungszeiten handelt es sich um poissonverteilte Zufallszahlen. Wird der Fall betrachtet, wie lange eine solche Bindung bestehen bleibt, so lassen sich die Wahrscheinlichkeiten  $P(x)$  mit der Funktion

$$P(x) = A \cdot e^{-\left(\frac{x}{t}\right)} \quad (3.3)$$

beschreiben, wobei  $A$  die Wahrscheinlichkeit bei einer Bindungszeit von 0 s ist,  $x$  die jeweiligen Bindungszeiten sind und  $t$  der Erwartungswert der Bindungszeit ist. Die aus den Bindungszeiten erstellten Histogramme konnten entsprechend mit der Funktion (3.3) angepasst und so der Erwartungswert für die Bindungszeit des jeweiligen Proteins (Tabelle 3.4) an den Kernporen bestimmt werden.

### 3.4.4 Kategorisierung der Trajektorien

Nachdem die Bindungsereignisse an den Kernporen mittels Kymographen bestimmt wurden, konnte die Bewegung der Proteine in den Einzelmolekülaufnahmen vor- und nach der Bindung näher untersucht werden. Aus diesen Bewegungen konnten Trajektorien erstellt werden, die je nach Start- und Endpunkt in neun Kategorien unterteilt wurden. Die nachfolgende Abbildung stellt die jeweiligen Kategorien grafisch da. Die Erfassung sowie Kategorisierung der Trajektorien erfolgte manuell.



**Abbildung 3.4:** Alle denkbaren Trajektorien eines Moleküls (rot) in Verbindung mit einem Kernporenkomplex (grau).

### 3.4.5 Mobilitätsanalyse einzelner DDX19-HaloTag-Moleküle im Zytoplasma

Zusätzlich zur Bestimmung der Bindungszeiten der einzelnen Proteine mit den Kernporen wurde auch die Mobilität der Proteine im Zytoplasma untersucht.

Hierfür wurden zunächst mit dem ImageJ Plug-in *TrackMate*<sup>[107]</sup> sämtliche Trajektorien der Proteine aus den Einzelmolekülaufnahmen erstellt.

Die Detektion der Einzelmolekül-Signale erfolgte über den *Difference of Gaussian (DoG)-based detector*, wobei ein Signaldurchmesser von 0.5  $\mu\text{m}$  angenommen wurde. Bei dieser Methode werden zwei Gauß-Filter mit unterschiedlicher Standardabweichung auf das gewünschte Bild angewendet und beide resultierenden Bilder voneinander subtrahiert. Das Ergebnis liefert ein geglättetes Bild mit scharfen lokalen Maxima an den Partikelpositionen, die anschließend detektiert wurden. Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der detektierten Signale über einen Schwellenwert auf ungefähr 1500 Signale je Aufnahme reduziert, um die Erstellung fehlerhafter Trajektorien zu vermeiden. Daraufhin wurden die einzelnen Signale über den *Simple LAP tracker*<sup>[108]</sup> zu Trajektorien verknüpft. Hierbei wurde eine maximale Verknüpfungslänge von 1  $\mu\text{m}$  erlaubt. Der maximale Abstand zum Schließen von Lücken zwischen zwei Signalen betrug ebenfalls 1  $\mu\text{m}$  und eine maximale Bildlücke von zwei Bildern wurde erlaubt. Diese Parameter wurden in Vorversuchen empirisch bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde ein *Overlay* der jeweiligen Kernmembran (s. Kapitel 3.4.2) auf die Einzelmolekülaufnahme mit den erstellten Trajektorien gelegt und sämtliche Trajektorien innerhalb des *Overlays* manuell verworfen. So verblieben nur noch Trajektorien innerhalb des Zytoplasmas. Für das hnRNP A1-SnapTag wurde es genau umgekehrt gemacht. Hier wurden sämtliche Trajektorien außerhalb des *Overlays* verworfen, sodass nur die Trajektorien im Zellkern verblieben.

Mit diesen verbliebenen Trajektorien wurden mittels des *Webinterfaces Spot-On*<sup>[109]</sup> die Diffusionskoeffizienten im Zytoplasma (DDX19-HaloTag und Mutanten) bzw. im Nukleoplasma (hnRNP A1-SnapTag) bestimmt.

Die Klassenbreite der Sprungweiten-Histogramme wurde auf 0.02  $\mu\text{m}$  gesetzt und die maximale Sprungweite auf 1  $\mu\text{m}$  begrenzt. Außerdem wurden nur die ersten vier Sprünge jeder Trajektorie verwendet, um eine Übergewichtung der langsamen Proteine zu vermeiden. Die Modellanpassung erfolgte an die kumulierte Wahr-

scheinlichkeitsverteilung der Sprungweitenhistogramme.

Die Abschätzung, ob ein Zwei- bzw. Drei-Zustands-Modell die Daten besser beschreibt, erfolgte über den *Akaike Information Criterion* (AIC)<sup>[110]</sup>. Hierbei wurden die Residuen der Anpassung mit der Anzahl an Beobachtungen sowie der Anzahl an Anpassungsparameter nach

$$AIC = n \cdot \ln\left(\frac{RSS}{n}\right) + 2k \quad (3.4)$$

gewichtet, um eine Übergewichtung durch zusätzliche Parameter zu vermeiden (3.4).

Die Variable  $n$  beschreibt dabei die Anzahl der Beobachtungen,  $RSS$  die Residuenquadratsumme und  $k$  die Anzahl der Anpassungsparameter. Entsprechend beschreibt das Modell mit dem kleineren AIC, die zugrundeliegenden Daten besser.

Dabei zeigte sich, dass sämtliche in dieser Arbeit analysierten Proteine am besten durch ein Drei-Zustands-Modell beschrieben wurden (s. Kapitel 4.6). Entsprechend ergaben sich drei Diffusionskoeffizienten -  $D_{\text{Immobil}}$ ,  $D_{\text{Retardiert}}$  und  $D_{\text{Mobil}}$ . SpotOn lieferte nicht nur die Größen der Diffusionskoeffizienten, sondern auch die jeweiligen Fraktionsgrößen.

Um die Änderung in der Mobilität zwischen DDX19-HaloTag und den Mutanten DDX19-<sup>ATPase</sup>-HaloTag und DDX19-<sup>Gle1</sup>-HaloTag vergleichen zu können, wurden die drei Diffusionskoeffizienten von DDX19-HaloTag und den Mutanten gemittelt und diese gemittelten Diffusionskoeffizienten SpotOn vorgegeben. Somit konnte die Änderung der jeweiligen Fraktionsgröße bei gleichbleibenden Diffusionskoeffizienten bestimmt werden. Die Diffusionskoeffizienten für DDX19-HaloTag und die DDX19-<sup>ATPase</sup>-HaloTag-Mutante wurden dabei auf folgende Werte gemittelt:  $D_{\text{Immobil}} = 0.044 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{Retardiert}} = 0.80 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{\text{Mobil}} = 4.67 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Die Diffusionskoeffizienten für DDX19-HaloTag und die DDX19-<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante wurden auf  $D_{\text{Immobil}} = 0.097 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{Retardiert}} = 0.47 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{\text{Mobil}} = 1.11 \mu\text{m}^2/\text{s}$  gemittelt.

### 3.4.6 Mobilitätsanalyse einzelner hnRNP A1-SnapTag Moleküle im Nukleoplasma

Das gleiche Vorgehen wurde angewendet, um die Mobilität von hnRNP A1-SnapTag-Molekülen im Nukleoplasma von AMD behandelten und unbehandelten Zellen zu bestimmen und miteinander zu vergleichen.

Hierbei wurden die Diffusionskoeffizienten auf  $D_{\text{Immobil}} = 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{Retardiert}} = 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{\text{Mobil}} = 0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$  festgelegt.

### 3.4.7 Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision

SpotOn benötigt außer den in Kapitel 3.4.5 genannten Parametern noch die Angabe des Lokalisierungsfehlers der Einzelmoleküle in laterale Richtung. Dieser wurde für die sCMOS-Kamera mit Hilfe von fixierten Zellen bzw. Proteinen bestimmt.

Dafür wurden die DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Proteine nach Kapitel 3.4.2 mit dem Farbstoff JF549 (DDX19-HaloTag) bzw. 647-SiR (hnRNP A1-SnapTag) angefärbt und die Zellen anschließend für 10 min bei 37°C in einer 4 %-igen Paraformaldehyd (PFA) Lösung inkubiert. Nach erfolgter Reaktion wurden die Zellen dreimal je 5 min mit PBS gewaschen und sofort wie in Kapitel 3.3 beschrieben mikroskopisch untersucht. Hierbei wurden 900 Bilder bei einer Anregung von 561 nm (DDX19-HaloTag) bzw. 640 nm (hnRNP A1-SnapTag) und einer Integrationszeit von 5 ms (DDX19-HaloTag) bzw. 15 ms (hnRNP A1-SnapTag) aufgenommen. Gemessen wurde der untere Bereich der Zellen, welcher im direkten Kontakt mit dem Deckglas stand. An dieser Stelle war es möglich, die an die Kernporen gebundenen DDX19-HaloTag- bzw. hnRNP A1-SnapTag-Moleküle über den gesamten Bildausschnitt zu sehen.

Anschließend wurde die Lokalisierungspräzision der fixierten Einzelmoleküle mit

$$\sigma = \sqrt{F \left[ \left( \frac{4}{3} \right)^2 \cdot \frac{s^2 + \frac{a^2}{12}}{N} + \frac{8\pi b^2 (s^2 + \frac{a^2}{12})}{N^2 a^2} \right]} \quad (3.5)$$

nach Mortensen *et al.* (2010) bestimmt<sup>[111]</sup>.

Hierbei ist  $F$  der Korrekturfaktor, der bei der sCMOS-Kamera 1 beträgt.  $s$  ent-

spricht dem FWHM der Signalintensitäten.  $a$  entspricht der Pixelgröße und ist 103 nm.  $N$  ist die Anzahl an Photonen pro Signal, die bei dem verwendeten Farbstoff (JF549) auf  $\sim 300$  und für 647-SiR auf  $\sim 100$  geschätzt wurden<sup>[112]</sup>.  $b$  ist der Hintergrund in Photonen pro Pixel, was  $N/100$  entspricht.

## 3.5 Identifizierung der NLS

Zusätzlich zur Analyse des mRNP-Exports durch DDX19-HaloTag wurde der Import von DDX19 in einem separaten Teil der Arbeit untersucht. Hierbei sollte die NLS von DDX19 identifiziert werden.

### 3.5.1 Anhand der isolierten Sequenz

In einem Vorversuch gelang es, den Aminosäurebereich 425 - 436 von DDX19 als vermeintliche NLS zu identifizieren<sup>7</sup>. Dafür wurden die zwölf Aminosäuren auf N-terminaler Seite mit einem eGFP-Molekül kloniert und transient in HeLa-Zellen eingeführt. Eine anschließende mikroskopische Untersuchung der Gleichgewichtsverteilung der Fluoreszenz markierten Aminosäuresequenz ergab eine leichte Anreicherung im Zellkern.

Um diesen Befund zu erhärten, wurde daraufhin die entsprechende Aminosäuresequenz auf N-terminaler Seite mit *zwei* eGFP-Proteinen kloniert und die Gleichgewichtsverteilung des Fusionsproteins erneut untersucht<sup>8</sup>. Durch das zweite eGFP-Molekül wurde der diffusionsbedingte Export der Moleküle ins Zytoplasma reduziert, sodass eine deutlichere Anreicherung der potenziellen NLS im Zellkern erreicht werden kann.

Die subzelluläre Gleichgewichtsverteilung der Aminosäuresequenz wurde anschließend mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen verglichen, um die Effektivität der Sequenz einschätzen zu können.

Als Positivkontrolle wurde die NLS des großen T-Antigens von SV40 verwendet<sup>[113]</sup>. Bei dieser Sequenz handelt es sich um die erste NLS, die entdeckt wurde und zugleich um eine der stärksten NLS-Sequenzen<sup>[114]</sup>.

---

<sup>7</sup>Die Versuche hierfür erfolgten im Rahmen der Bachelorarbeit von Julius Wijbenga (2020).

<sup>8</sup>Dies erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Lisa Övermöhle (2021).

Als Negativkontrollen dienten die NLS des großen T-Antigens und die Aminosäuresequenz 425 - 436 von DDX19, bei denen jeweils die basischen Aminosäuren nach dem Protokoll der Mutagenese-PCR (s. Kapitel 3.1.2) durch Alanine substituiert wurden (s. Tabelle 3.6)<sup>9</sup>. Auf diese Weise konnten die Bindungen der NLS-Sequenzen an die hydrophoben Bindungstaschen der Importine blockiert werden (s. Kapitel 1.1).

Eine Zusammenfassung der hergestellten und untersuchten Plasmide ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben.

**Tabelle 3.6:** Im Rahmen der Bachelorarbeit von Lisa Övermöhle erstellten Plasmide zur Untersuchung der NLS von DDX19. Details siehe Text.

Plasmid	Exprimierte Aminosäure
pQCXIP-2x eGFP-NLS <sup>SV40</sup>	<sup>126</sup> PKKKRKV <sup>132</sup>
pQCXIP-2x eGFP-mut. NLS <sup>SV40</sup>	<sup>126</sup> PAAARAV <sup>132</sup>
pQCXIP-2x eGFP-NLS <sup>DDX19</sup>	<sup>425</sup> HRIGRTGRFGKR <sup>436</sup>
pQCXIP-2x eGFP-mut. NLS <sup>DDX19</sup>	<sup>425</sup> HAIGATGAFGAA <sup>436</sup>

Diese Konstrukte wurden einen Tag vor der Messung nach Kapitel 3.2.3 transient in HeLa-Zellen transfiziert und anschließend unter dem Zeiss LSM880 mikroskopiert.

Die Proteine wurden dabei mit einem Argon-Laser der Anregungswellenlänge 488 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 493 bis 598 nm detektiert. Die Lochblende wurde auf eine *Airy*-Einheit eingestellt. Eine *Airy*-Einheit beschreibt den Durchmesser der Lochblende, bei der nur das Hauptmaximum der Anregungs-PSF die Lochblende passiert<sup>[98]</sup>. Weiterhin wurde das  $\alpha$ -Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIX M27 Ölimmersionsobjektiv verwendet. Somit wurden Bildausschnitte mit einer Größe von 135 x 135  $\mu\text{m}^2$  und einer Farbtiefe von 16-Bit aufgenommen. Die Temperatur wurde während der Messung mit dem Beheizungssystem von ibidi auf 37°C gehalten.

<sup>9</sup>Die Erstellung der Negativkontrollen erfolgte ebenfalls in der Bachelorarbeit von Lisa Övermöhle.

Aus den aufgenommenen Bildern wurde das Intensitätsverhältnis  $Q_{N/C}$  zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma nach

$$Q_{N/C} = \frac{I_{Nukleoplasma} - I_{Hintergrund}}{I_{Zytoplasma} - I_{Hintergrund}} \quad (3.6)$$

bestimmt. Dabei bezeichnet  $I_{Nukleoplasma}$  die Intensität im Nukleoplasma,  $I_{Zytoplasma}$  die Intensität im Zytoplasma und  $I_{Hintergrund}$  die Intensität des Hintergrundes außerhalb einer Zellen. Die jeweiligen Intensitäten wurden mittels ROIs (*Region of Interest*) über ImageJ bestimmt.

Die Standardabweichung  $\sigma$  wurde nach

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Q_{N_i/C_i} - \bar{Q}_{N/C})^2}{(n-1)}} \quad (3.7)$$

und der Standardfehler des Mittelwerts  $SEM$  nach

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (3.8)$$

bestimmt, wobei  $n$  die Anzahl der Messungen beschreibt.

### 3.5.2 Anhand des gesamten Proteins

In einem weiteren Schritt wurde die Importfähigkeit der potenziellen NLS im Kontext des gesamten Proteins untersucht. Für diesen Zweck wurden die basischen Aminosäuren der Aminosäuresequenz 425 - 436 im Genom von DDX19 im pQCXIH-DDX19-Halo-Plasmid nach Tabelle 3.6 mutiert<sup>10</sup>. Das erhaltene Plasmid enthielt das Transgen für das DDX19-Protein mit einer mutierten NLS-Sequenz (DDX19-NLS<sup>mut</sup>). Der Erfolg der Reaktion wurde durch eine Sequenzierung der Firma SeqLab-Microsynth überprüft.

Das Plasmid wurde am Vortag der Messung nach Kapitel 3.2.3 transient in HeLa-Zellen transfiziert und die Proteine am Tag der Messung mit 0.1  $\mu$ M JF549 gefärbt.

---

<sup>10</sup>Dies erfolgte im Rahmen der Bachelorarbeit von Mark Majer (2021).

Die mikroskopische Untersuchung der subzellulären Verteilung des Proteins erfolgte nach Kapitel 3.5.1. Die Anregung der Fluorophore erfolgte in diesem Fall mit einem DPSS 561-10 Laser der Wellenlänge 561 nm und die Detektion des Emissionslichtes wurde in einem Bereich zwischen 566 und 680 nm detektiert.

Da die subzelluläre Verteilung von DDX19 im Normalzustand der Zelle auf Seiten des Zytoplasmas liegt, mussten die DDX19- bzw. DDX19-NLS<sup>mut</sup>-Proteine zum Import angeregt werden, um letztlich die Importfähigkeit beider Proteine miteinander vergleichen zu können. Um dies zu erreichen, wurden die Zellen im Vorfeld der Messung mit  $\sim 180 \text{ J/cm}^2$  UV-C Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Die starke UV-C Strahlung verursacht DNA-Schäden in den Zellen, die dazu führen, dass DDX19 in den Zellkern importiert wird, um diese Schäden zu reparieren<sup>[59]</sup>.

Die anschließende Auswertung der subzellulären Verteilung und dessen Fehlers erfolgte nach Gleichung (3.6) - (3.8).

# Kapitel 4

## Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei Aspekte der RNA-Helikase DDX19 analysiert. Zum einen wurden die Kinetik und der Mechanismus des mRNP-Exports an NPCs mittels Einzelmolekülexperimenten *in vivo* bestimmt, zum anderen wurde der Importmechanismus von DDX19 selbst untersucht. Dabei sollte die bislang unbekannt NLS identifiziert werden.

Zur Untersuchung des mRNP-Exports wurden die Bindungszeiten von einzelnen DDX19-HaloTag-Proteinen an Kernporen gemessen und mit den Bindungszeiten ausgewählter Mutanten verglichen. Diese Mutanten wurden dabei so gewählt, dass sie in einem bestimmten Schritt des mRNP-Exports gehemmt waren. Auf diese Weise konnten Rückschlüsse auf die Funktion von DDX19, mRNP, NUP214 und Gle1 in den einzelnen Schritten des mRNP-Exports gezogen werden. Darüber hinaus wurden die Bindungszeiten von hnRNP A1-SnapTag gebundenen mRNPs selbst an den Kernpore gemessen und mit den Bindungszeiten von DDX19-HaloTag verglichen.

Um die NLS von DDX19 zu identifizieren, wurde eine in Vorversuchen bestimmte Aminosäuresequenz auf der C-terminalen Seite des Proteins *in vivo* auf ihre Importfähigkeit hin untersucht. Dies geschah einmal mit der isolierten Sequenz und einmal im Kontext des gesamten Proteins.

## 4.1 Funktionalitätstest der Fusionsproteine

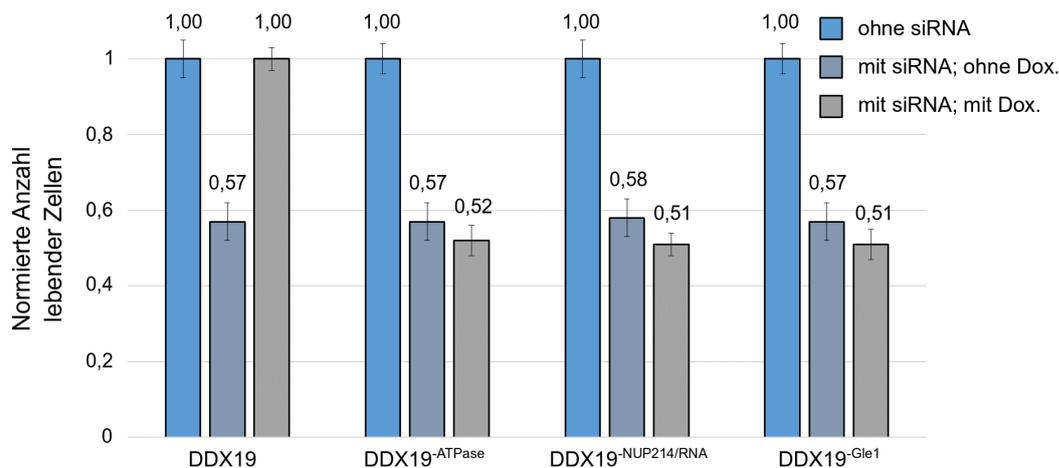
Um das zu untersuchende DDX19-Protein (DDX19, DDX19<sup>-NUP214/RNA</sup>, DDX19<sup>-Gle1</sup> oder DDX19<sup>-ATPase</sup>) zu visualisieren, wurde das jeweilige Protein als HaloTag-Fusionsprotein stabil in HeLa-Zellen induzierbar exprimiert. Die anschließende Färbung des HaloTags mit JF549 ermöglichte dann die Einzelmolekülanalyse der DDX19-HaloTag-Proteine *in vivo*. Analog wurde das hnRNP A1-Protein unter Verwendung des SnapTag und des Farbstoffes 647-SiR in HeLa-Zellen visualisiert.

Nachdem die fünf Zelllinien hergestellt waren, wurde die Funktionalität der Fusionsproteine zunächst untersucht.

### 4.1.1 DDX19-HaloTag

Um die Funktionalität der DDX19-HaloTag-Fusionsproteine zu untersuchen, wurde die Überlebensrate der DDX19-HaloTag-Zellen unter Abwesenheit des endogenen DDX19 (siRNA-behandelt) und unter Anwesenheit des jeweiligen Fusionsproteins (s. Tabelle 3.3) untersucht (induzierte Expression durch Doxycyclin - s. Kapitel 3.2.6). Verglichen wurden diese Überlebensraten mit den Überlebensraten unbehandelter Zellen (ohne siRNA und ohne Doxycyclin) sowie Zellen ohne dem endogenen DDX19 (siRNA-behandelt) *und* ohne dem rekombinanten DDX19-HaloTag (ohne Doxycyclin).

Die Zahl der lebenden Zellen aus der unbehandelten Probe diente als Referenzwert und wurde gleich eins gesetzt. Die Zahlen der lebenden Zellen der beiden anderen Proben wurden relativ zu diesem Wert bestimmt und sind grafisch für alle DDX19-Proteine in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4.1:** Die relative Menge an lebenden Zellen in den Proben ohne siRNA und ohne Doxycyclin (hellblau), mit siRNA aber ohne Doxycyclin (dunkelblau) und mit siRNA und mit Doxycyclin (grau) bei den Zelllinien mit DDX19-HaloTag, DDX19<sup>-ATPase</sup>-HaloTag, DDX19<sup>-NUP214/RNA</sup>-HaloTag und DDX19<sup>-Gle1</sup>-HaloTag. Details s. Text.

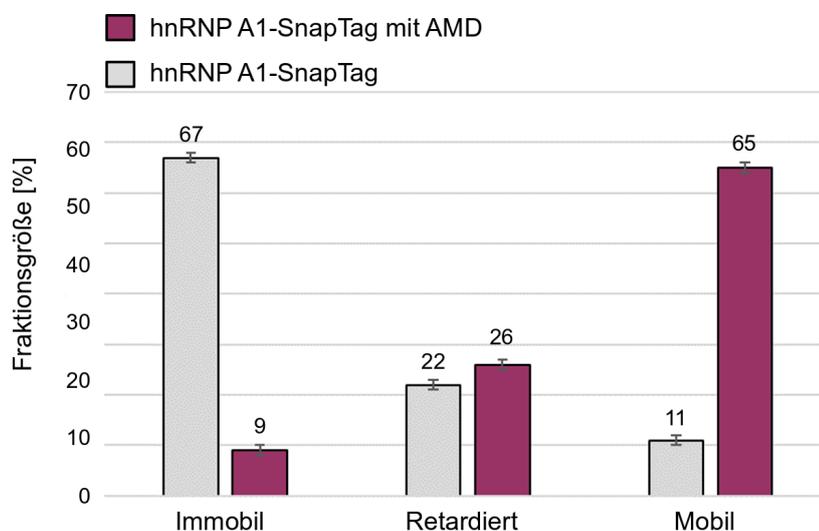
Der Vergleich der relativen Häufigkeiten von lebenden Zellen mit und ohne endogenes DDX19 zeigt, dass sich die Zahl der lebenden Zellen ohne DDX19 fast halbiert (hellblaue und dunkelblaue Balken in Abbildung 4.1) wird. Das rekombinante DDX19-HaloTag kann diesem Effekt entgegenwirken (grauer Balken in der ersten Spalte von Abbildung 4.1), was zeigt, dass die ursprüngliche Funktionalität von DDX19 im Fusionsprotein erhalten bleibt. Die drei Mutanten, die im mRNA-Export gehemmt sind, konnten dies jedoch nicht (graue Balken in den Spalten zwei bis vier in Abbildung 4.1). Da der Export von mRNA für das Überleben der Zellen unerlässlich ist, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen.

#### 4.1.2 hnRNP A1-SnapTag

Die Bestimmung der Bindungszeiten von mRNPs an NPCs wurde mit dem hnRNP A1-SnapTag-Fusionsprotein durchgeführt. Da hnRNP A1 bereits in der frühen Phase der RNP-Biogenese an mRNPs bindet und diese während ihrer Translokation durch die NPCs in das Zytoplasma begleitet, eignet es sich für diesen Zweck sehr gut. Es wurde jedoch im Vorfeld geprüft, ob das Fusionsprotein (hnRNP A1-SnapTag) im Zellkern tatsächlich mit den mRNPs gebunden vorliegt. Dies erfolgte anhand der Mobilitätsanalyse einzelner hnRNP A1-SnapTag-Moleküle einmal nach Inkubation mit und einmal ohne AMD gemäß Kapitel 3.4.6. Durch das AMD sollte die mRNA-Konzentration in den Zellen reduziert werden und vermehrt freie hnRNP A1-SnapTag-Moleküle vorliegen, was zu einer Erhöhung der mobilen Fraktion führen sollte.

Zur Erfassung der Diffusionskoeffizienten wurden die Sprungweiten der Proteine mit Trackmate bestimmt und die Histogramme mit SpotOn erstellt. Die Bewertung, ob die zugrunde liegenden Sprungweiten mit einem Zwei-Zustands- oder mit einem Drei-Zustands-Modell beschrieben werden können, wurde mit SpotOn unter Verwendung des *Akaike Information Criterion* (AIC) durchgeführt (s. Kapitel 3.4.5). Für die hnRNP A1-SnapTag-Proteine nach Inkubation mit und ohne AMD ergab dies jeweils einen niedrigeren Wert für das Drei-Zustands-Modell. Dies deutet darauf hin, dass das hnRNP A1-SnapTag mit den drei Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{Immobil}}$ ,  $D_{\text{Retardiert}}$  und  $D_{\text{Mobil}}$  in den Zellen vorliegen.

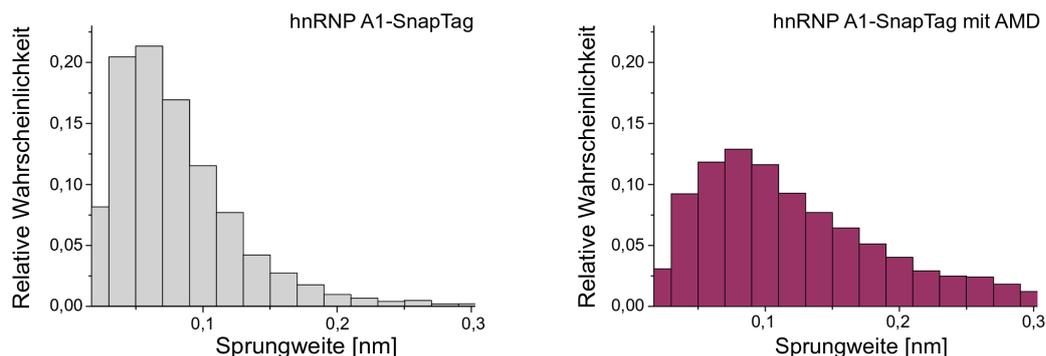
Die drei Diffusionskoeffizienten für die hnRNP A1-SnapTag-Proben nach Inkubation mit AMD und ohne AMD wurden anschließend miteinander gemittelt. Die gemittelten Diffusionskoeffizienten (s. Kapitel 3.4.6) wurden danach für beide hnRNP A1-SnapTag-Proben in SpotOn vorgegeben und die Änderung der jeweiligen Fraktionsgrößen bestimmt. Dabei ergab sich folgende Verteilung.



**Abbildung 4.2:** Die Fraktionsgrößen der drei Diffusionskoeffiziente (s. Kapitel 3.4.6) von hnRNP A1-SnapTag im Nukleoplasma mit (lila) und ohne (grau) Behandlung von AMD nach Kapitel 3.2.5

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach der Zugabe von AMD der Anteil der immobilen Proteine in die mobile Fraktion übergeht. Die Hemmung der Transkription durch das AMD führt folglich zu einer erhöhten Mobilität der hnRNP A1-SnapTag Proteine im Zellkern. Daraus kann geschlossen werden, dass ein Großteil der hnRNP A1-SnapTag-Proteine im unbehandelten Zustand an mRNPs gebunden vorliegt.

Zusätzlich wird der Unterschied in den Mobilitäten beider Proben anhand der Sprungweitenhistogramme in der nachfolgenden Abbildung veranschaulicht. Es wurden 3730 Sprünge nach Inkubation mit AMD und 3726 Sprünge ohne AMD untersucht.



**Abbildung 4.3:** Die Sprungweitenhistogramme von hnRNP A1-SnapTag Molekülen im Nukleoplasma von AMD behandelten (lila) und unbehandelten (grau) Zellen.

Darüber hinaus wurden die jeweiligen Bindungshäufigkeiten von hnRNP A1-SnapTag-Proteinen an NPCs pro Minute gemessen. Ohne Inkubation mit AMD konnten im Durchschnitt 2.3 Bindungen pro Minute beobachtet werden. Nach der Zugabe von AMD sank die Bindungshäufigkeit um  $\sim 74\%$  auf 0.6 Bindungen pro Minute. Da AMD die Transkription hemmt und folglich die mRNP-Konzentration in den Zellen reduziert, können die Bindungen der unbehandelten Probe in direkten Zusammenhang mit den mRNPs gestellt werden.

## 4.2 Bindungszeiten an den Kernporenkomplexen

Nachdem die Funktionalität der Fusionsproteine verifiziert war, wurden die Bindungszeiten der einzelnen Proteine an den Kernporen gemäß Kapitel 3.4 bestimmt.

Hierbei liegen die Bindungszeiten zwischen Protein und Kernpore Poisson-verteilt vor, ähnlich wie beim radioaktiven Zerfall von Atomkernen. Wird der Fall betrachtet, wie lange eine Bindung anhält, so wird die Wahrscheinlichkeit der Bindungszeit durch eine abnehmende Exponentialfunktion beschrieben.

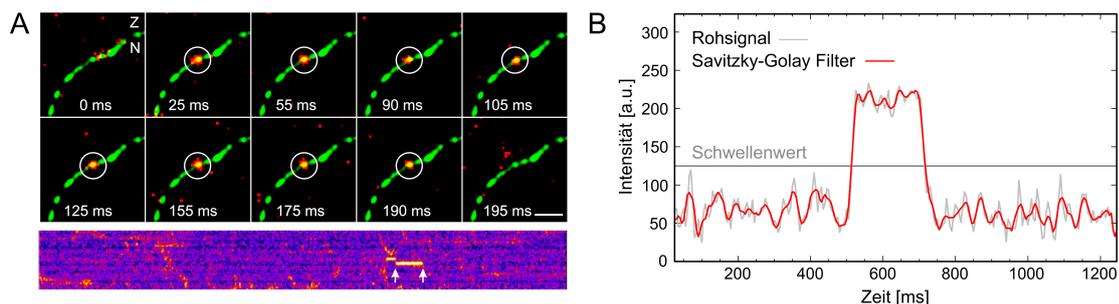
Um zu prüfen, ob die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Bindungszeiten einer einfach, zweifach oder dreifach abnehmenden Exponentialfunktion folgen, wurden die jeweiligen Anpassungen mit Hilfe des *Akaike Information Criterion* (AIC) bewertet (s. Kapitel 3.4.5). Dabei zeigte sich, dass die Daten aller DDX19-Zelllinien sowie der hnRNP A1-Zelllinie (s. Tabelle 3.4) einer einfach abnehmenden Exponentialfunktion folgten. Somit lag von dem jeweiligen Protein nur eine Population an Partikeln an den Kernporen vor und es konnte der jeweilige Erwartungswert der Bindungszeit bestimmt werden.

### 4.2.1 DDX19-HaloTag

Insgesamt ergaben sich für das DDX19-HaloTag 92 Bindungsereignisse aus 116 Messungen an 92 verschiedenen Zellen. Ein solches Bindungsereignis ist beispielhaft für DDX19-HaloTag in Abbildung 4.4 A dargestellt. Sämtliche Bindungsbeispiele der nachfolgenden Messungen aus den Kapiteln 4.2.2 - 4.3 sind im Anhang aufgeführt.

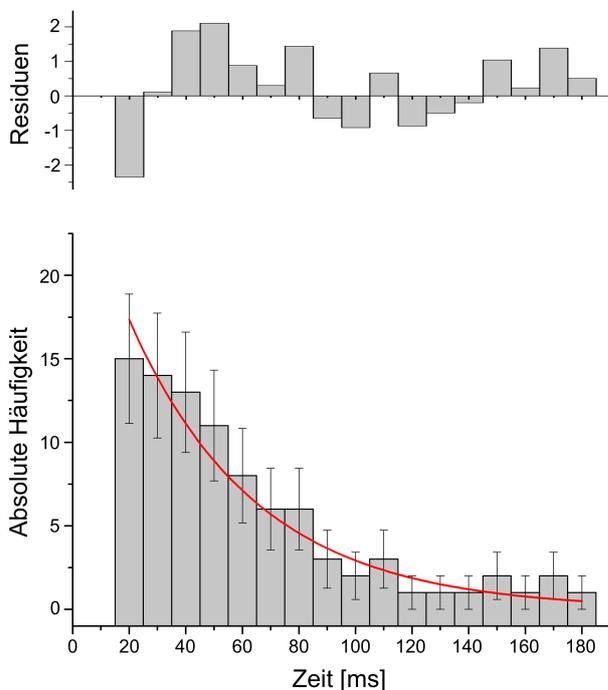
Abbildung 4.4 A zeigt die Bildsequenz der Bindung eines DDX19-HaloTag-Moleküls (rot) mit einer Kernpore (grün). Die einzelnen Bilder sind entsprechend der Bildrate von 200 Hz zeitlich nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der dazugehörige Kymograph dargestellt. Wenn ein Molekül an die Kernpore bindet, wird dies je nach Länge der Bindung entweder durch einen gelben Punkt oder durch eine gelbe Linie im Kymographen angezeigt. Dieser ist für die in Abbildung 4.4 A gezeigte Bindung mit zwei weißen Pfeilen im Kymographen markiert.

Abbildung 4.4 B zeigt den zeitlichen Verlauf der Intensität der in Abbildung 4.4 A dargestellten Bindung. Diese Bindung dauerte 190 ms.



**Abbildung 4.4:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Die Integrationszeit eines Bildes lag bei 5 ms. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 190 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

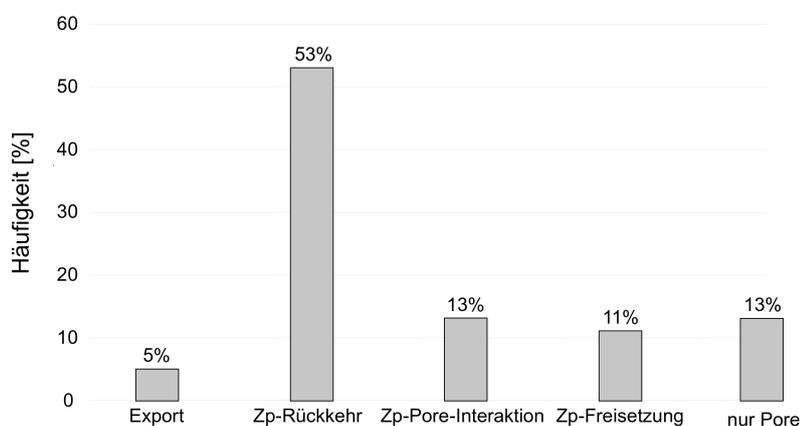
Das arithmetische Mittel aus den 92 Bindungszeiten lag bei  $53 \pm 4$  ms und es konnten im Mittel 11.0 Bindungen der DDX19-HaloTag-Moleküle mit den NPCs pro Minute beobachtet werden.



**Abbildung 4.5:** Verteilung der Bindungszeiten von DDX19-HaloTag. Fehlerbalken wurden nach der Standardabweichung der Poisson-Verteilung berechnet. Die Anpassung an die Bindungszeiten unter Berücksichtigung der Fehlerbalken ist anhand der roten Kurve dargestellt. Die entsprechenden Residuen sind oberhalb der Verteilung gezeigt.

Die 92 Bindungszeiten wurden in Abbildung 4.5 zu einem Histogramm mit einer Klassenbreite von 10 ms zusammengefasst und mit einer einfach abnehmenden Exponentialfunktion (3.3) angepasst. Oberhalb des Histogramms sind die entsprechenden Residuen der Anpassung dargestellt. Die Anpassung ergab eine Bindungszeit von  $45 \pm 3$  ms.

Weiterhin konnten die Trajektorien der DDX19-HaloTag-Moleküle, die eine Bindung an den Kernporen aufwiesen, gemäß Kapitel 3.4.4 in die verschiedenen Kategorien eingeordnet werden. Dabei konnte in 5 % der Fälle ein Export vom Zellkern in das Zytoplasma beobachtet werden. In 53 % der Fälle und damit weitaus am häufigsten wurde die Kategorie „Zp-Rückkehr“ beobachtet. Hierbei begann die Trajektorie des Proteins im Zytoplasma, bindet dann an die Kernpore und verließ diese wieder in Richtung Zytoplasma. In weiteren 13 % der Fälle erfolgte die Bindung an die Kernpore vom Zytoplasma aus („Zp-Pore-Interaktion“). In 11 % der Fälle wurde das Protein von der Kernpore in Richtung Zytoplasma freigesetzt („Zp-Freisetzung“) und in wiederum 13 % der Fälle konnte das Protein nur an der Kernpore beobachtet werden. Die Häufigkeiten der Trajektorien sind in Abbildung 4.6 zusammengefasst.



**Abbildung 4.6:** Die Häufigkeit der Kategorien (s. Kapitel 3.4.4) für DDX19-HaloTag. Gezeigt werden nur Trajektorien mit einer relativen Häufigkeit  $\geq 5$  %.

## 4.2.2 DDX19-<sup>NUP214/RNA</sup>-HaloTag

Mit 1.1 Bindungen pro Minute mit den NPCs war die Bindungshäufigkeit der DDX19-<sup>NUP214/RNA</sup>-HaloTag-Proteine im Vergleich zum Wildtypen um ca. 90 % reduziert. Es konnten lediglich 9 Bindungsereignisse von 98 Messungen aus 80 ver-

schiedenen Zellen beobachtet werden. Daher konnte nur das arithmetische Mittel der Bindungszeiten bestimmt werden. Dieses betrug  $121 \pm 32$  ms.

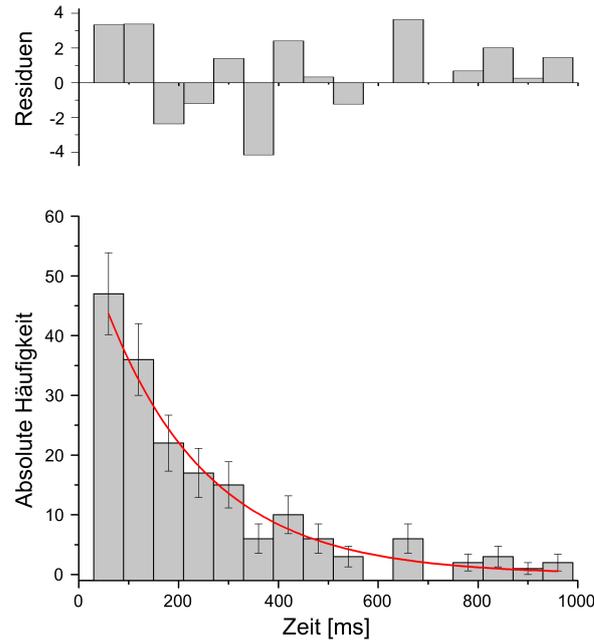
### 4.2.3 DDX19-<sup>ATPase</sup>-HaloTag

Mit 2.3 Bindungen pro Minute mit den NPCs war die Bindungshäufigkeit der DDX19-<sup>ATPase</sup>-HaloTag-Proteine im Vergleich zum Wildtypen um ca. 80 % reduziert. Es konnten 15 Bindungsereignisse aus 86 Messungen von 65 verschiedenen Zellen beobachtet werden. Aufgrund der ebenfalls niedrigen Anzahl an Ereignissen konnte auch hier nur das arithmetische Mittel der Bindungszeiten bestimmt werden. Dieses betrug  $306 \pm 89$  ms.

### 4.2.4 DDX19-<sup>Gle1</sup>-HaloTag

Für die Gle1-bindungsdefiziente DDX19-<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante wurden 176 Bindungsereignisse aus 241 Messungen von 176 verschiedenen Zellen beobachtet. Das arithmetische Mittel aus den Bindungszeiten betrug  $209 \pm 15$  ms. Im Mittel konnten 10.2 Bindungen der DDX19-<sup>Gle1</sup>-Proteine an NPCs pro Minute beobachtet werden.

Die Bindungszeiten wurden in Abbildung 4.7 zu einem Histogramm mit einer Klassenbreite von 60 ms zusammengefasst und mit einer einfach abnehmenden Exponentialfunktion (3.3) angepasst. Oberhalb des Histogramms sind die entsprechenden Residuen dargestellt. Die Anpassung ergab eine Bindungszeit von  $206 \pm 19$  ms.



**Abbildung 4.7:** Verteilung der Bindungszeiten von DDX19<sup>Gle1</sup>. Details s. Abbildung 4.5.

#### 4.2.5 Photobleaching des Farbstoffes JaneliaFluor549

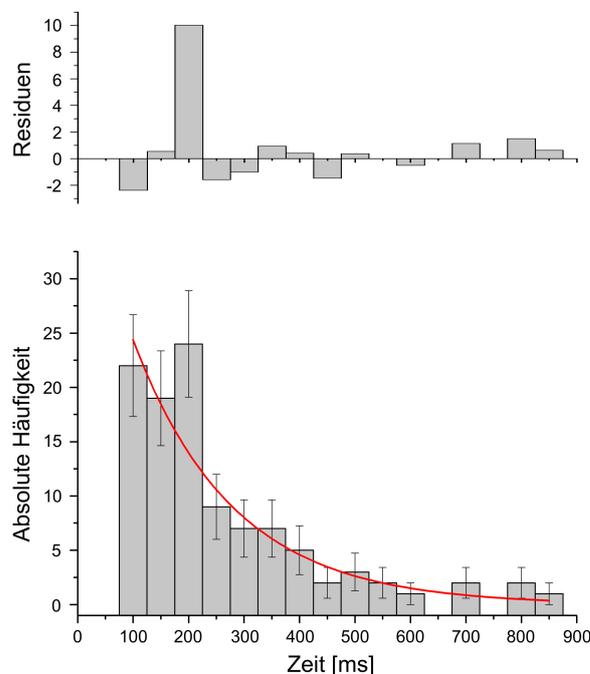
Der Vergleich der Bindungszeiten zwischen DDX19-HaloTag und DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag zeigt, dass die DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante fast fünf Mal länger an den NPCs gebunden vorliegt als der Wildtyp. Um sicherzustellen, dass die Bindungszeit der Mutante nicht durch das Bleichen des Farbstoffes limitiert war, wurden zusätzliche Messungen mit dieser Mutante unter veränderten Belichtungsbedingungen durchgeführt.

Es wurde eine Belichtungszeit von 5 ms und eine anschließende Dunkelzeit von 45 ms gewählt, was zu einer Integrationszeit von 50 ms zwischen zwei Bildern führte. Dadurch konnten die Proteine über einen längeren Zeitraum beobachtet werden, ohne dass die Farbstoffe einer zusätzlichen Anregung durch den Laser ausgesetzt wurden.

Unter diesen Belichtungsbedingungen wurden 35 Messungen an 30 verschiedenen Zellen mit der DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante durchgeführt. Bei diesen Messungen wurden 106 Bindungsereignisse beobachtet. Das arithmetische Mittel aus den Bindungszeiten betrug  $251 \pm 16$  ms. Unter diesen Belichtungsbedingungen konnten im Mittel 4.0 Bindungen der DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Proteine an NPCs pro Minute

beobachtet werden.

Alle 106 Bindungszeiten sind in Abbildung 4.8 zu einem Histogramm mit einer Klassenbreite von 50 ms zusammengefasst und mit einer einfach abnehmenden Exponentialverteilung (3.3) angepasst. Oberhalb des Histogramms sind die entsprechenden Residuen abgebildet. Die Anpassung ergab eine Bindungszeit von  $180 \pm 19$  ms und weicht somit nicht signifikant von der Bindungszeit in Kapitel 4.2.4 ab. Dementsprechend hatte das Bleichen der Farbstoffe keine Auswirkung auf die zuvor ermittelte Bindungszeit der DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante.



**Abbildung 4.8:** Verteilung der Bindungszeiten von DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag bei einer Integrationszeit von 50 ms. Details s. Abbildung 4.5.

## 4.2.6 DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag unter Einwirkung von Actinomycin D

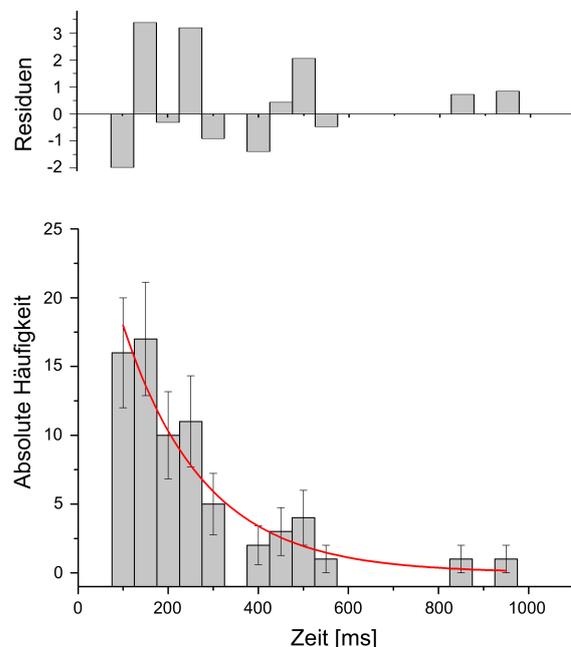
Weitere Messungen an der Gle1-bindungsdefizienten Mutante wurden unter Einwirkung von AMD durchgeführt.

Aufgrund der höheren Anzahl an Bindungsereignissen pro Aufnahme bei den Messungen aus Kapitel 4.2.5 (3 Bindungsereignisse pro Aufnahme) im Vergleich zu den Messungen aus Kapitel 4.2.1 (0.8 Bindungsereignisse pro Aufnahme) oder Ka-

pitel 4.2.4 (0.7 Bindungsereignisse pro Aufnahme) wurden in diesem Kapitel die gleichen Belichtungszeiten wie in Kapitel 4.2.5 verwendet. Es wurde also eine Belichtungszeit von 5 ms und einer anschließenden Dunkelzeit von 45 ms gewählt, sodass zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern eine Intervallzeit von 50 ms lag.

So wurden bei 30 Messungen an 27 unterschiedlichen Zellen 73 Bindungsereignisse beobachtet. Das arithmetische Mittel der Bindungszeiten betrug  $238 \pm 19$  ms. Unter diesen Belichtungsbedingungen konnten mit AMD im Mittel 3.2 Bindungen der DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Proteine an NPCs pro Minute beobachtet werden.

Alle 73 Bindungszeiten wurden in Abbildung 4.9 zu einem Histogramm mit einer Klassenbreite von 50 ms zusammengefasst und mit einer einfach abnehmenden Exponentialfunktion (3.3) angepasst. Oberhalb des Histogramms sind die entsprechenden Residuen der Anpassung dargestellt. Die Anpassung ergab eine Bindungszeit von  $180 \pm 25$  ms. Folglich hatte die Hemmung der Transkription durch das AMD und die daraus resultierende Verringerung an mRNPs in den Zellen keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungszeit der DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Mutante an NPCs.



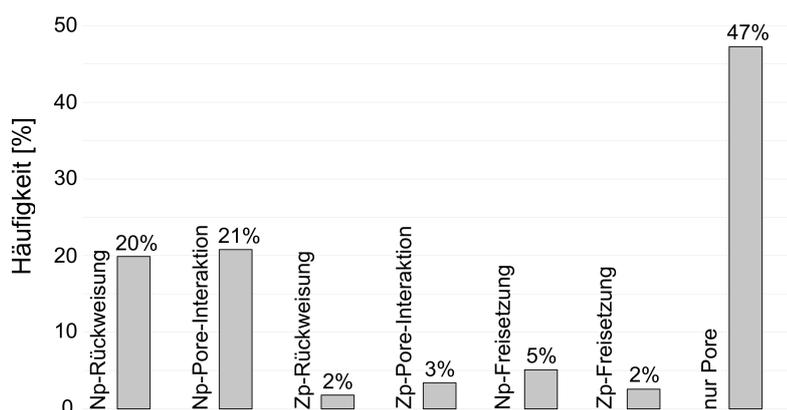
**Abbildung 4.9:** Verteilung der Bindungszeiten von AMD-behandelten DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Zellen. Details s. Abbildung 4.8.

## 4.2.7 hnRNP A1-SnapTag

Weiterhin wurden die Bindungszeiten von mRNPs mit Hilfe von hnRNP A1-SnapTag an den NPCs gemäß Kapitel 3.4 gemessen. Dabei wurde eine Integrationszeit von 15 ms gewählt, um ein ausreichendes Signal-zu-Rausch-Verhältnis mit dem 647-SiR-Farbstoff zu erreichen.

Es wurden insgesamt 122 Bindungsereignisse aus 229 Messungen von 273 verschiedenen Zellen beobachtet. Das arithmetische Mittel der Bindungszeiten betrug  $64 \pm 5$  ms.

Anschließend wurden die 122 Trajektorien, die eine Bindung an den Kernporen aufwiesen, in die verschiedenen Kategorien gemäß Kapitel 3.4.4 eingeteilt. Daraus ergab sich nachfolgende Verteilung (s. Abbildung 4.10).



**Abbildung 4.10:** Die Häufigkeit der Trajektorien (nach Kapitel 3.4.4) für hnRNP A1-SnapTag. Es konnten keine Importe oder Exporte beobachtet werden.

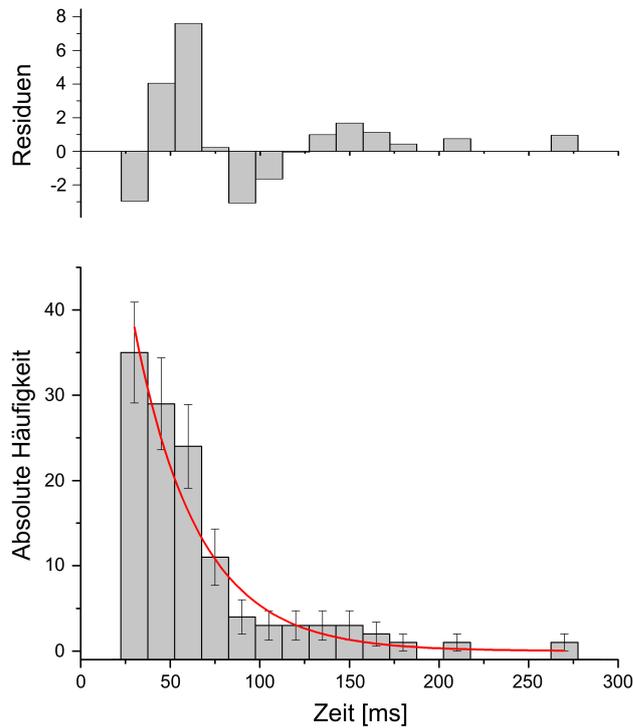
In 20 % der Fälle bindet das Protein ausgehend vom Nukleoplasma an die Kernpore und verließ sie wieder in Richtung Nukleoplasma („Np-Rückweisung“). In wiederum 21 % der Fälle erfolgte die Bindung an die Kernpore ausgehend vom Nukleoplasma, wonach die Trajektorie endete („Np-Pore-Interaktion“). In nur 2 % der Fälle konnte beobachtet werden, dass das Protein ausgehend vom Zytoplasma an die Kernpore bindet und anschließend wieder in das Zytoplasma freigesetzt wurde („Zp-Rückweisung“). In weiteren 3 % der Fälle konnte eine Bindung an der Kernpore, ausgehend vom Zytoplasma beobachtet werden („Zp-Pore-Interaktion“). In 5 % der Fälle konnte eine Freisetzung des Proteins aus der Kernpore in das Nukleoplasma beobachtet werden („Np-Freisetzung“). Wiederum 2 % der Fälle resultierten

aus Trajektorien, bei denen das Protein aus der Kernpore in das Zytoplasma freigesetzt wurde („Zp-Freisetzung“). In 47 % der Fälle und damit weitaus am häufigsten wurde das Protein nur an der Kernpore beobachtet. Es konnten keine vollständige Importe oder Exporte beobachtet werden.

Da das Ziel der Messungen darin bestand, die Bindungszeiten von exportierten mRNPs an den Kernporen zu erfassen und diese mit den Bindungszeiten der DDX19-HaloTag-Proteine zu vergleichen, wurden für die weitere Analyse nur diejenigen Trajektorien berücksichtigt, die einem unvollständigen Exportereignis zugeordnet werden konnten. Dazu gehörten die Trajektorien in den Kategorien „Np-Pore-Interaktion“, „nur Pore“ sowie „Zp-Freisetzung“ (s. Abbildung 5.5). Diesem Schritt liegt die Annahme zugrunde, dass die Trajektorien der Exportereignisse nicht in ihrer Gesamtheit verfolgt werden konnten und daher nur ein Teil der Exporttrajektorien aufgezeichnet wurde. Eine ausführlichere Diskussion hierzu findet sich in Kapitel 5.1.5.

So verblieben von den 122 Bindungsereignissen noch 84 übrig. Das arithmetische Mittel aus den Bindungszeiten betrug  $63 \pm 4$  ms. Im Mittel konnten 2.4 Bindungen der hnRNP A1-Proteine an NPCs pro Minute beobachtet werden.

Die Bindungszeiten wurden weiterhin in Abbildung 4.11 zu einem Histogramm mit einer Klassenbreite von 15 ms zusammengefasst und mit einer einfach abfallenden Exponentialfunktion (3.3) angepasst. Oberhalb des Histogramms sind die entsprechenden Residuen abgebildet. Der Erwartungswert der Bindungszeit lag bei  $36 \pm 4$  ms.



**Abbildung 4.11:** Verteilung der Bindungszeiten von hnRNP A1 nach Ausschluß der Trajektorien, die keinen Export darstellen können (Details siehe Text). Details s. Abbildung 4.5

#### 4.2.8 hnRNP A1-SnapTag unter Einwirkung von Actinomycin D

Zusätzlich wurden die Bindungszeiten von hnRNP A1-SnapTag nach Inkubation mit AMD an den Kernporen gemessen. Diese Messungen dienten, wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, in erster Linie als Kontrolle, um zu überprüfen, ob die hnRNP A1-Proteine im Zellkern an mRNPs gebunden vorlagen.

Mit 0.6 Bindungen pro Minute mit den NPCs war die Bindungshäufigkeit nach Zugabe von AMD um  $\sim 74\%$  gesunken. Es konnten lediglich 5 Bindungsereignisse aus 36 Messungen von 29 verschiedenen Zellen beobachtet werden. Daher konnte nur das arithmetische Mittel der Bindungszeiten bestimmt werden. Dieses betrug  $42 \pm 6$  ms.

## 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

**Tabelle 4.1:** Zusammenfassung aller kinetischer Daten aus den Kapiteln 4.2 - 4.3.

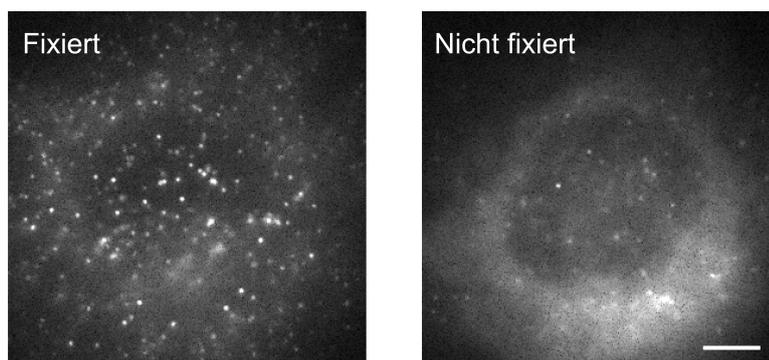
Zelllinie	Integrationszeit [ms]	Erwartungswert [ms]	arithmetisches Mittel [ms]	Ereignisse [1/min]
DDX19	5	$45 \pm 3$	$53 \pm 4$	11.0
DDX19 <sup>-Gle1</sup>	5	$206 \pm 19$	$209 \pm 15$	10.2
DDX19 <sup>-Gle1</sup>	50	$180 \pm 19$	$251 \pm 16$	4.0
DDX19 <sup>-Gle1</sup> +AMD	50	$180 \pm 25$	$238 \pm 19$	3.2
hnRNP A1	15	$36 \pm 4$	$64 \pm 5$	2.4
hnRNP A1+AMD	15	-	$42 \pm 6$	0.6
DDX19 <sup>-NUP214/RNA</sup>	5	-	$121 \pm 32$	1.1
DDX19 <sup>-ATPase</sup>	5	-	$306 \pm 89$	2.3

## 4.4 Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision

Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten nach Kapitel 3.4.5 erfolgte über das Webinterface Spot-On von Hansen *et al.* (2018)<sup>[109]</sup>. Dieses benötigte unter anderem die laterale Lokalisierungsgenauigkeit der zu untersuchenden Einzelmoleküle.

Zu diesem Zweck wurden DDX19-HaloTag- und hnRNP A1-SnapTag-Moleküle, die gemäß Kapitel 3.2.4 gefärbt worden waren, nach Kapitel 3.4.7 fixiert und die laterale Lokalisierungsgenauigkeit der fixierten Proteine bestimmt. Zellen, die nicht fixiert wurden, dienten als Kontrolle, um zu überprüfen, ob die Fixierung der Proteine erfolgreich verlief.

Nachfolgend ist beispielhaft eine Mittelwert-Projektion für die fixierten und nicht fixierten DDX19-HaloTag-Moleküle gezeigt. Dabei wurden die Intensitäten der 900 Bilder (s. Kapitel 3.4.7) aus jeweils einer Messung gemittelt.



**Abbildung 4.12:** (Links) Eine Mittelwert-Projektion von einer nach Kapitel 3.4.7 fixierten, mit Doxycyclin induzierten und mit JF549 gefärbte Zelle. Die Signale entsprechen gefärbtem DDX19-HaloTag. (Rechts) Eine Mittelwert-Projektion einer mit Doxycyclin induzierten und mit JF549 gefärbten Zelle. Es wurde der am Deckglas aufliegende Bereich der Zelle mikroskopiert. Maßstabsbalken: 5  $\mu\text{m}$

Im Falle der nicht fixierten Probe ist eine deutliche Abnahme in der Anzahl der Einzelmolekülintensitäten in der Mittelwert-Projektion zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass die Fixierung der Proteine zu einer ausreichenden Immobilisierung führte. Anschließend wurde anhand der fixierten Proteine die laterale Lokalisierungsgenauigkeit bestimmt.

Dies erfolgte nach Kapitel 3.4.7 anhand Gleichung (3.5) und ergab für die DDX19-

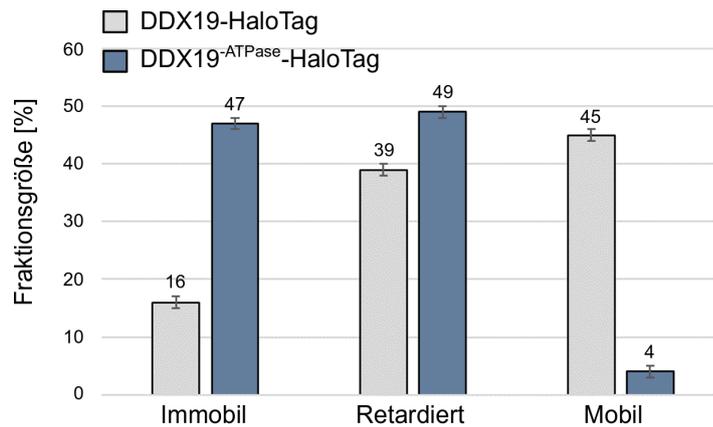
HaloTag-Moleküle eine Halbwertsbreite von  $313 \pm 41$  nm und eine laterale Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision von  $24 \pm 3$  nm. Für die hnRNP A1-SnapTag-Moleküle ergab sich eine Halbwertsbreite von  $433 \pm 9$  nm und eine laterale Einzelmolekül-Lokalisierungspräzision von  $21 \pm 1$  nm.

## 4.5 Mobilität von DDX19/Mutanten-HaloTag im Zytoplasma

Unter Verwendung der ermittelten Lokalisierungsgenauigkeit - von DDX19-HaloTag - wurden die Mobilitäten von DDX19-, DDX19<sup>Gle1</sup>- und DDX19<sup>ATPase</sup>-HaloTag mit SpotOn gemäß Kapitel 3.4.5 bestimmt.

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 wurden die Sprungweiten der Proteine mit Trackmate analysiert und anhand dessen die Diffusionskoeffizienten mit SpotOn berechnet. Auch hier wurde mit Hilfe des *Akaike Information Cirterion* (AIC) beurteilt, ob die zugrundeliegenden Sprungweiten mit einem Zwei-Zustands oder mit einem Drei-Zustands-Modell beschrieben werden können (s. Kapitel 3.4.5). Für alle drei Proteine führte das Drei-Zustands-Modell zu einem niedrigeren AIC-Wert. Demnach lag das Protein mit drei unterschiedlichen Mobilitäten im Zytoplasma vor und es konnten die drei Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{Immobil}}$ ,  $D_{\text{Retardiert}}$  und  $D_{\text{Mobil}}$  bestimmt werden.

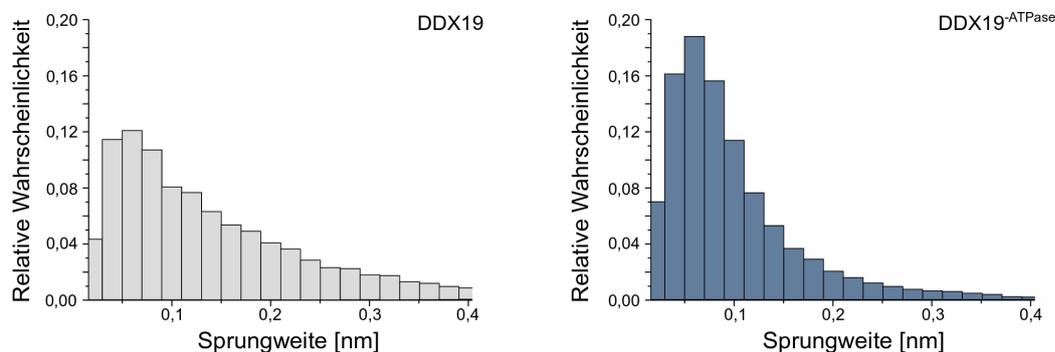
Die Bestimmung der Diffusionskoeffizienten wurde einmal für DDX19- und DDX19<sup>ATPase</sup>-HaloTag gemäß Kapitel 3.4.5 durchgeführt und die so bestimmten Diffusionskoeffizienten-Paare miteinander gemittelt. Die gemittelten Diffusionskoeffizienten lagen bei  $D_{\text{Immobil}} = 0,044 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{Retardiert}} = 0,80 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{\text{Mobil}} = 4,67 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Diese wurden dann in SpotOn für beiden Proteine vorgegeben und die Veränderung der jeweiligen Fraktionsgröße untersucht. Dabei ergab sich folgende Verteilung im Vergleich zwischen DDX19-HaloTag und der Mutante DDX19<sup>ATPase</sup>-HaloTag.



**Abbildung 4.13:** Die Fraktionsgrößen der drei Diffusionskoeffizienten (s. Kapitel 3.4.5) von DDX19-HaloTag (grau) und DDX19-ATPase-HaloTag (blau) im Zytoplasma.

Es ist deutlich zu sehen, dass die ATPase-defiziente Mutante wesentlich weniger mobile und entsprechend mehr retardierte und immobile Moleküle im Zytoplasma aufweist als der Wildtyp. Aufgrund der ATPase-Defizienz der Mutante können gebundene mRNPs schlechter wieder freigegeben werden und führen so zu der beobachteten Verlangsamung im Zytoplasma.

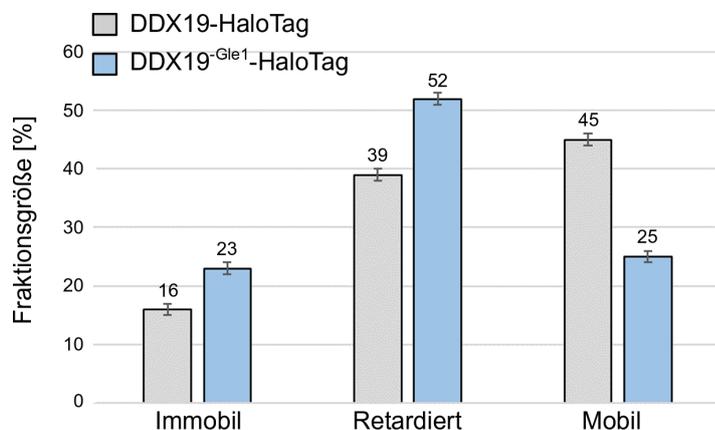
Zusätzlich wird der Unterschied in der Mobilitäten beider Proteine anhand der beiden Sprungweitenhistogramme in der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht. Es wurden 11531 Sprünge von DDX19-HaloTag und 15184 Sprünge von DDX19-ATPase-HaloTag analysiert.



**Abbildung 4.14:** Die Sprungweitenhistogramme von DDX19-HaloTag und DDX19-ATPase-HaloTag im Zytoplasma.

Die gleiche Analyse wurde für den Vergleich von DDX19- und DDX19-Gle1-HaloTag durchgeführt. Die gemittelten Diffusionskoeffizienten lagen bei  $D_{\text{Immobil}} = 0,097$

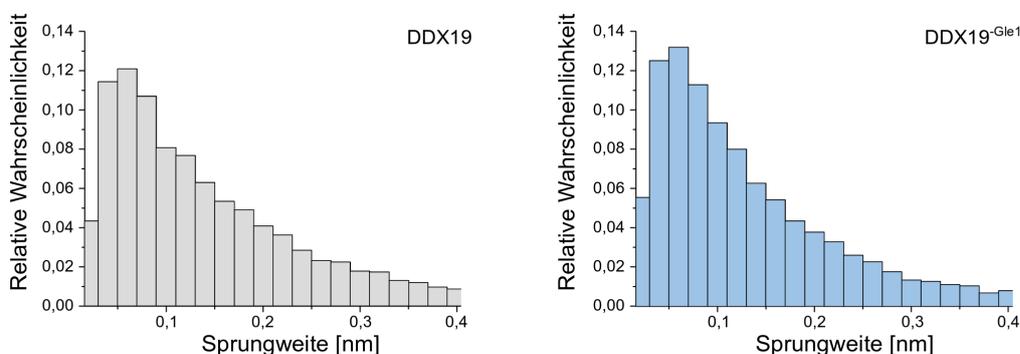
$\mu\text{m}^2/\text{s}$ ,  $D_{\text{Retardiert}} = 0,47 \mu\text{m}^2/\text{s}$  und  $D_{\text{Mobil}} = 1,11 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Es ergab sich folgende Verteilung der Fraktionsgrößen.



**Abbildung 4.15:** Die Fraktionsgrößen der drei Diffusionskoeffizienten (s. Kapitel 3.4.5) von DDX19-HaloTag (grau) und DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag (blau) im Zytoplasma.

Der Vergleich zeigt, dass auch die Gle1-bindungsdefiziente Mutante, wenn auch weniger als die ATPase-defiziente Mutante, mehr retardierte und immobile Moleküle im Zytoplasma aufweist als das Wildtyp-Protein. Eine mögliche Ursache hierfür wird in Kapitel 5.1.4 diskutiert.

Zusätzlich wird der Unterschied in der Mobilität beider Proteine anhand der beiden Sprungweitenhistogramme in der nachfolgenden Abbildung verdeutlicht. Es wurden 11531 Sprünge von DDX19-HaloTag und 7532 Sprünge von DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag analysiert.



**Abbildung 4.16:** Die Sprungweitenhistogramme von DDX19-HaloTag und DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag im Zytoplasma.

## 4.6 Identifizierung der NLS

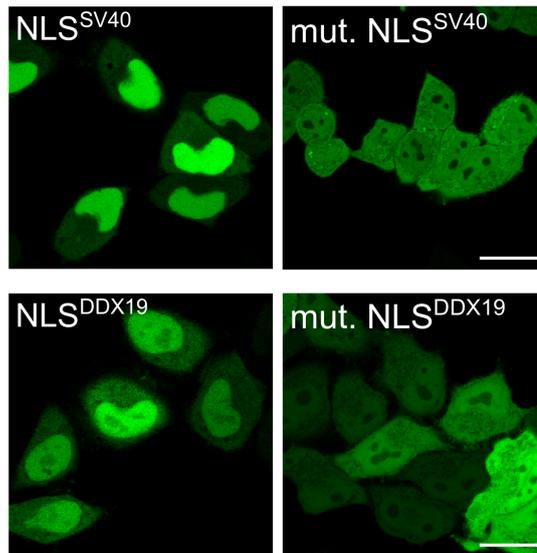
Die Identifizierung der NLS von DDX19 verlief in zwei Schritten.

Im ersten Schritt wurde eine basenreiche Sequenz auf der C-terminalen Seite von DDX19 mit jeweils zwei eGFP-Molekülen einmal mutiert und einmal unverändert in den retroviralen pQCXIP-Vektor (s. Tabelle 3.6) kloniert. Bei der Mutation wurden die basischen Aminosäuren gegen Alanine substituiert. Nach einer anschließenden Transfektion in HeLa-Zellen wurde die subzelluläre Verteilung der Sequenzen *in vivo* untersucht. Eine wirksame NLS würde dazu führen, dass sich das Polypeptid im Zellkern anreichert.

Im zweiten Schritt wurden die zuvor verwendeten Mutationen der NLS in das Genom von DDX19-HaloTag kloniert. Nach anschließender Transfektion in HeLa-Zellen konnte die subzelluläre Verteilung mit der subzellulären Verteilung des Wildtyp-DDX19-HaloTag *in vivo* verglichen werden. Unter Normalbedingungen reichert sich das DDX19 im Zytoplasma an. Um also die Importfähigkeit beider Proteine zu vergleichen, mussten sie im Vorfeld zum Import angeregt werden. 2017 konnten Hodroj *et al.* zeigen, dass die Bestrahlung von Zellen mit UV-C-Strahlung zu DNA-Schäden in Form von R-Loops führten<sup>[59]</sup>. Sie konnten weiterhin zeigen, dass diese Schäden durch importierte DDX19-Moleküle repariert wurden. Falls es sich bei der hier mutierten Sequenz um die NLS von DDX19 handelt, sollte die UV-C-Bestrahlung zu einem reduzierten Import der mutierten Proteine führen.

### 4.6.1 Anhand der isolierten Sequenz

Für den ersten Schritt wurden die Plasmide aus Tabelle 3.6 gemäß Kapitel 3.2.3 in HeLa-Zellen transfiziert. Neben der mutierten und unveränderten NLS von DDX19 wurde auch eine Kontroll-NLS verwendet, die vom großen T-Antigen von SV40, von der bekannt ist, dass sie eine effektive NLS darstellt. Diese wurde ebenfalls sowohl mutiert als auch unverändert in HeLa-Zellen auf die subzelluläre Gleichgewichtsverteilung hin untersucht. Abbildung 4.17 zeigt ein Beispiel für jedes der vier Konstrukte.



**Abbildung 4.17:** Gezeigt sind die subzellulären Gleichgewichtsverteilungen von (oben links) der NLS des großen T-Antigens von SV40, (oben rechts) der mutierten NLS des großen T-Antigens von SV40, (unten links) der NLS von DDX19 und (unten rechts) der mutierten NLS von DDX19. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit jeweils zwei eGFP-Molekülen. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$

Die nach (2) berechneten Intensitätsverhältnisse und die nach (3) berechneten Standardfehler der Mittelwerte (SEM) sind in der nachfolgenden Tabelle für die vier Sequenzen zusammengefasst. Dabei entspricht ein Intensitätsverhältnis von  $Q_{N/C} = 1$  einer Gleichverteilung des NLS-Peptids zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma. Ein Intensitätsverhältnis von  $Q_{N/C} > 1$  entspricht einer Akkumulation im Nukleoplasma und umgekehrt ein Intensitätsverhältnis von  $Q_{N/C} < 1$  einer Akkumulation im Zytoplasma.

**Tabelle 4.2:** Die nach 3.5.1 berechneten Intensitätsverhältnisse sowie SEM zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma für die angegebenen NLS. Die jeweilige Anzahl an vermessenen Zellen ist unter der Spalte  $n_{\text{Zellen}}$  angegeben.

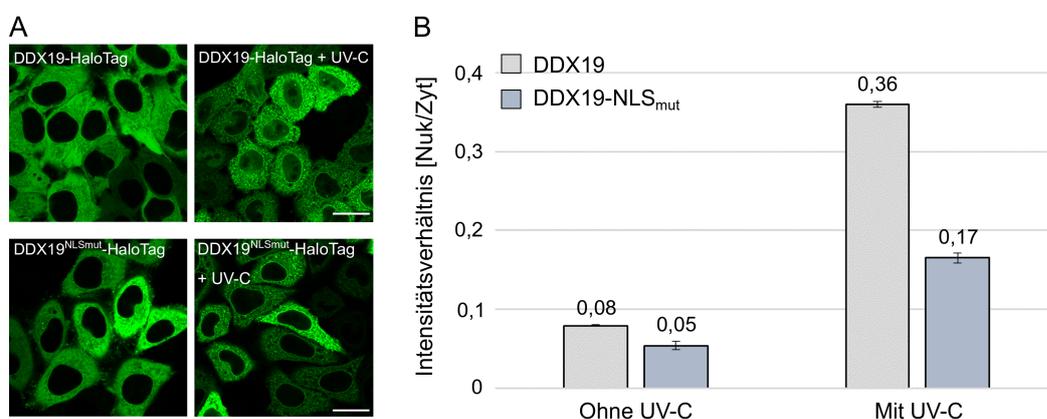
	$n_{\text{Zellen}}$	$Q_{N/C}$	SEM
2x eGFP-SV40 NLS	127	60	4
2x eGFP-SV40 NLS <sub>mut</sub>	157	1.1	0.1
2x eGFP-DDX19 NLS	139	2.1	0.1
2x eGFP-DDX19 NLS <sub>mut</sub>	219	1.1	0.1

Sowohl aus der Abbildung als auch aus dem Intensitätsverhältnis ist ersichtlich, dass die NLS des großen T-Antigens von SV40 eine sehr starke Anreicherung im Nukleoplasma aufweist. Einmal im Zytoplasma angekommen, wird diese Sequenz mit hoher Effizienz wieder in den Zellkern importiert.

Auch die NLS von DDX19 weist im Vergleich zur mutierten Sequenz eine Anreicherung im Nukleoplasma auf. Diese ist zwar schwächer als bei der NLS des großen T-Antigens, aber mit einem Intensitätsverhältnis von  $2.1 \pm 0.1$  immer noch signifikant.

#### 4.6.2 Anhand des gesamten Proteins

Für den zweiten Schritt wurde das Plasmid mit der mutierten NLS im DDX19-HaloTag-Genom aus Kapitel 3.5.2 und das Plasmid von DDX19-HaloTag aus Kapitel 3.1.1 gemäß Kapitel 3.2.3 in HeLa-Zellen transfiziert. Die Proteine wurden dann gemäß Kapitel 3.2.4 mit JF549 gefärbt und mit  $180 \text{ J/cm}^2$  UV-C Strahlung der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, um den Import der DDX19-HaloTag-Proteine zu induzieren. Für die UV-C-Bestrahlung wurde ein UV-Tisch von *biostep* verwendet. Als Kontrolle wurden Zellen vorbereitet, die nicht mit UV-C bestrahlt wurden. Abbildung 4.18 A zeigt ein Beispiel je Probe.



**Abbildung 4.18:** A: Ein beispielhaftes Bild von DDX19-HaloTag und DDX19-NLS<sub>mut</sub>-HaloTag mit und ohne UV-C-Behandlung und B: die jeweiligen Intensitätsverhältnisse. Details siehe Text. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

Die jeweils nach (2) berechneten Intensitätsverhältnisse und die nach (3) berechneten Standardfehler der Mittelwerte (SEM) sind in der Abbildung 4.18 B gezeigt. Hierfür wurden 133 DDX19- und 116 DDX19-NLS<sub>mut</sub>-Zellen ohne UV-C und 132 DDX19- und 167 DDX19-NLS<sub>mut</sub>-Zellen mit UV-C untersucht.

Der Vergleich zeigt, dass sich DDX19-HaloTag unter Normalbedingungen überwiegend im Zytoplasma befindet. Nach UV-C-Bestrahlung liegt der Anteil der Proteine im Zellkern bei  $\sim 36\%$ . Bei der mutierten NLS wurden deutlich weniger Proteine importiert. Hier lag der Anteil an Proteinen im Zellkern bei  $\sim 17\%$ . Dies entspricht einer Abnahme von  $\sim 53\%$  und deutet darauf hin, dass es sich bei der mutierten Sequenz um die NLS von DDX19 handeln könnte. Eine ausführliche Diskussion diesbezüglich findet sich in Kapitel 5.2.

# Kapitel 5

## Diskussion

### 5.1 Der Reaktionszyklus von DDX19

Der Export von mRNPs wird in menschlichen Zellen durch ein Zusammenspiel von DDX19, Gle1 und NUP214 auf der zytoplasmatischen Seite der Kernporenkomplexe reguliert. Fast das gesamte Wissen über den Ablauf dieser Reaktion stammt aus Strukturdaten und *in vitro*-Studien<sup>[55]</sup>. Um diese Studien zu ergänzen und die Funktion der Proteine unter natürlichen Bedingungen zu analysieren, wurde der Prozess des mRNP-Exports in dieser Arbeit *in vivo* untersucht. Zu diesem Zweck wurden einzelne DDX19-Moleküle mittels HaloTag fluoreszenzmarkiert und mit einer zeitlichen Auflösung von 200 Hz relativ zu den Kernporen (eGFP-NTF2) beobachtet. Dies erforderte einerseits eine hohe zeitliche Auflösung der DDX19-Moleküle und andererseits eine hohe räumliche Auflösung der Kernporen. Beide Anforderungen wurden durch eine Kombination von konfokaler Abbildung und Kamera-basierter Einzelmolekülmikroskopie erfüllt<sup>[97]</sup>. Bei der Kamera-basierten Einzelmolekülmikroskopie erfolgte die Anregung über eine HILO-Beleuchtung und die Detektion mit einer sCMOS Kamera (s. Kapitel 3.3). Mit diesem Aufbau konnten schließlich Trajektorien und Bindungszeiten von DDX19 auf den Kernporen gewonnen werden.

Für das DDX19 ergaben sich 96 Bindungsereignisse mit einer Bindungshäufigkeit von 11.0 Bindungen pro Minute. Es ist anzunehmen, dass diese Bindungen mit der Kernpore im Zuge des mRNP-Export erfolgen<sup>[57],[66],[115]</sup>. Diese Annahme wurde durch eine Kontrollmessung mit der ATPase-defizienten DDX19-ATPase-Mutante gestützt. Bei dieser Mutante wurde in der für das Protein namensgebenden Aminosäuresequenz D-E-A-D die Glutaminsäure gegen ein Glutamin ausgetauscht, was

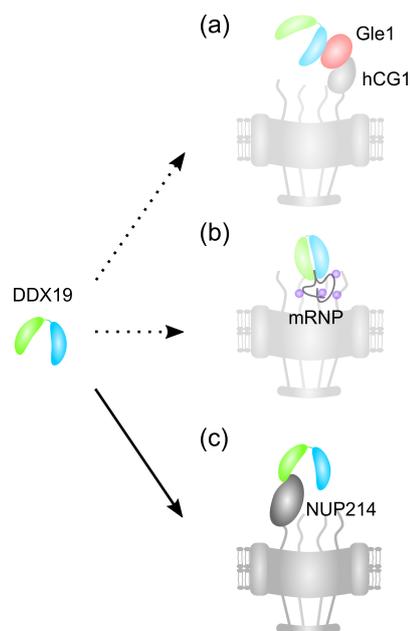
zu einer deutlichen Reduktion der ATPase-Aktivität und somit einem Stopp des mRNP-Exports führte<sup>[47]</sup>. Dies führte zu einer 80%-igen Reduktion der Bindungshäufigkeit im Vergleich zum Wildtyp, was die Vermutung stützt, dass die beobachteten Bindungsereignisse vom Wildtyp im Zuge des mRNP-Exports entstanden sind.

Im Folgenden soll der mechanistische Ablauf des mRNP-Exports auf Basis der Messergebnisse zeitlich aufgeschlüsselt und die mögliche Funktion von Gle1 im Zyklus beschrieben werden.

### 5.1.1 Die Bindung an NUP214

Anhand der DDX19-Trajektorien (s. Abbildung 4.6) ist ersichtlich, dass DDX19 in der Mehrzahl der beobachteten Fälle ausgehend vom Zytoplasma an die Kernpore bindet, dort verweilt und dann in das Zytoplasma zurückkehrt. Es kann daher angenommen werden, dass DDX19 im ersten Schritt des mRNP-Exports aus dem Zytoplasma an die Kernpore binden muss.

Die Bindung des DDX19 an der Kernpore kann theoretisch über die Bindung an (a) Gle1, (b) ein mRNP oder an das (c) NUP214 erfolgen (s. Abbildung 5.1).

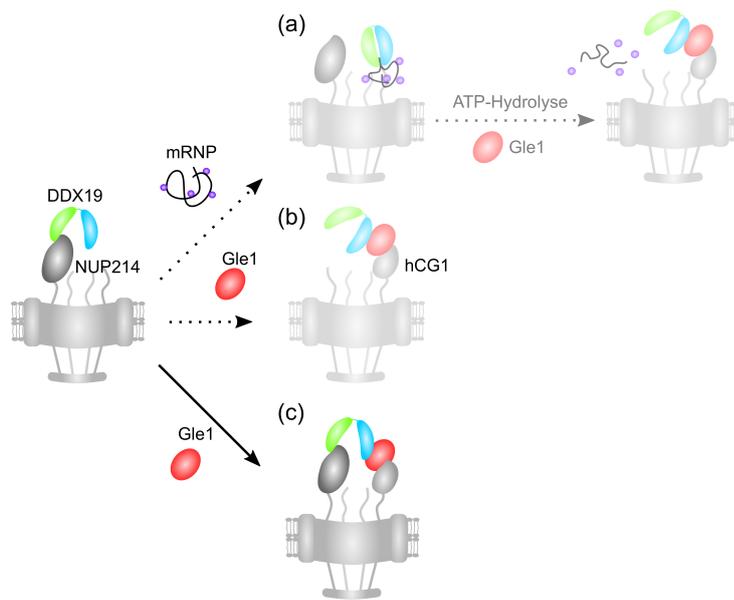


**Abbildung 5.1:** Schematische Abbildung der drei Bindungsmöglichkeiten des DDX19-HaloTag an die Kernpore. Details siehe Text.

Um zwischen den drei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden Messungen mit zwei Mutanten durchgeführt. Die erste war die Doppelmutante DDX19<sup>-NUP214/RNA</sup>-Mutante, die in ihrer Bindung zu NUP214 und den mRNPs gehemmt war<sup>[65]</sup> und die zweite war die DDX19<sup>-Gle1</sup>-Mutante, die in ihrer Bindung zu Gle1 gehemmt war<sup>[64]</sup>. Bei den Messungen im Falle der DDX19<sup>-NUP214/RNA</sup>-Mutante konnte eine um 90 % reduzierte Bindungshäufigkeit an der Kernpore beobachtet werden. Da diese Mutante nur im Stande war, an Gle1 zu binden, kann die Bindung von DDX19 an die Kernpore über das Gle1 ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der DDX19<sup>-Gle1</sup>-Mutante eine vergleichbare Bindungshäufigkeit zum Wildtyp beobachtet (s. Tabelle 4.1). Das zeigt, dass die Gle1 bindungsdefiziente Mutante in der Lage war, an die Kernpore zu binden. Dies konnte in diesem Fall nur über das NUP214 oder über mRNPs erfolgen. Um weiter zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden zusätzliche Messungen der Gle1-bindungsdefizienten Mutante nach Hemmung der Transkription durchgeführt. Diese Messungen zeigten, dass die Hemmung der Transkription keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungshäufigkeit der Gle1-bindungsdefizienten Mutante hatte (s. Tabelle 4.1). Dies spricht dafür, dass die beobachteten Bindungsereignisse der DDX19<sup>-Gle1</sup>-Mutante über die Bindung an NUP214 erfolgten, da über die Mutation die Bindung zu Gle1 gehemmt war und über die Hemmung der Transkription die Konzentration an mRNPs in den Zellen stark reduziert wurde. Entsprechend können wir schließen, dass das DDX19 im ersten Schritt an das NUP214 bindet und damit vermutlich für den Export von mRNPs auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore angereichert wird.

### 5.1.2 Die Bindung an Gle1

Nachdem DDX19 an NUP214 gebunden hat, muss es als Nächstes entweder direkt mit einem mRNP (s. Abbildung 5.2 a) interagieren oder vorher Gle1 binden (s. Abbildung 5.2 b - c).



**Abbildung 5.2:** Schematische Abbildung der möglichen Bindungen des DDX19-HaloTag-NUP214-Komplexes an ein (a) mRNP oder (b)/(c) Gle1. Details siehe Text.

Falls das DDX19 mit einem mRNP interagiert, kommt es zur Dissoziation von NUP214 aufgrund der überlappenden Bindungsstellen zwischen mRNPs und NUP214 auf dem DDX19<sup>[6],[65],[71]</sup>. Die gebildeten DDX19-mRNP-Komplexe könnten aufgrund der Exportfaktoren auf den mRNPs durch die Kernpore zurück in den Zellkern gelangen, was bereits darauf hindeutet, dass die Bindung von mRNPs an diesem Punkt des Zyklus unwahrscheinlich ist.

Montpetit *et al.* (2011) postulierten jedoch, dass der mRNP-Bindung eine ATP-Hydrolyse durch DDX19 folgt. Dadurch werden die Transportfaktoren vom mRNP entfernt und eine anschließende Bindung an Gle1 führt zur Dissoziation des DDX19-mRNP-Komplexes<sup>[58]</sup>. Dieser Reaktionsweg ist jedoch aus den folgenden Gründen unwahrscheinlich.

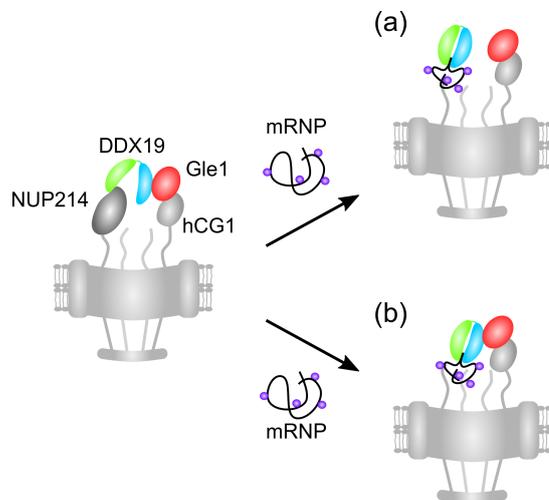
Erstens zeigten Dossani *et al.* (2009), dass die intrinsische ATPase-Aktivität von DDX19 sowohl alleine als auch im DDX19-RNA-Komplex zu gering ist, um einen effizienten mRNP-Export zu gewährleisten<sup>[58],[116]</sup>.

Zweitens sollte die beschriebene Gle1-Bindung des DDX19-mRNP-Komplexes zu einer verkürzten Bindungszeit der Gle1-bindungsdefizienten DDX19<sup>-Gle1</sup>-Mutante in dieser Arbeit führen. Das Gegenteil war jedoch der Fall - die Bindungszeit stieg von  $45 \pm 3$  ms auf  $206 \pm 19$  ms.

Es ist daher anzunehmen, dass im zweiten Schritt Gle1 an DDX19 bindet. Dabei wäre sowohl die Bildung eines DDX19-Gle1- (s. Abbildung 5.2 b)<sup>[58]</sup> als auch eines NUP214-DDX19-Gle1-Komplexes (s. Abbildung 5.2 b)<sup>[6]</sup> denkbar. Die Bildung des DDX19-Gle1-Komplexes ist jedoch aufgrund der niedrigen Bindungshäufigkeit der NUP214 und RNA-bindungsdefizienten DDX19<sup>NUP214/RNA</sup>-Mutante unwahrscheinlicher (gleiche Argumentation wie in Kapitel 5.1.1).

### 5.1.3 Die Bindung an mRNPs

Abschließend bindet das mRNP an DDX19. Dies führt wie zuvor beschrieben, zur Dissoziation von NUP214. Sowohl die Bildung eines DDX19-mRNP- (s. Abbildung 5.3 a) als auch eines Gle1-DDX19-mRNP-Komplexes (s. Abbildung 5.3 c) wäre denkbar. An dieser Stelle kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen keine Aussage darüber getroffen werden, welche der beiden Komplexe eher in den Zellen vorliegt. Dies wird in Kapitel 5.1.6 basierend auf den Daten aus der Literatur nachgeholt.



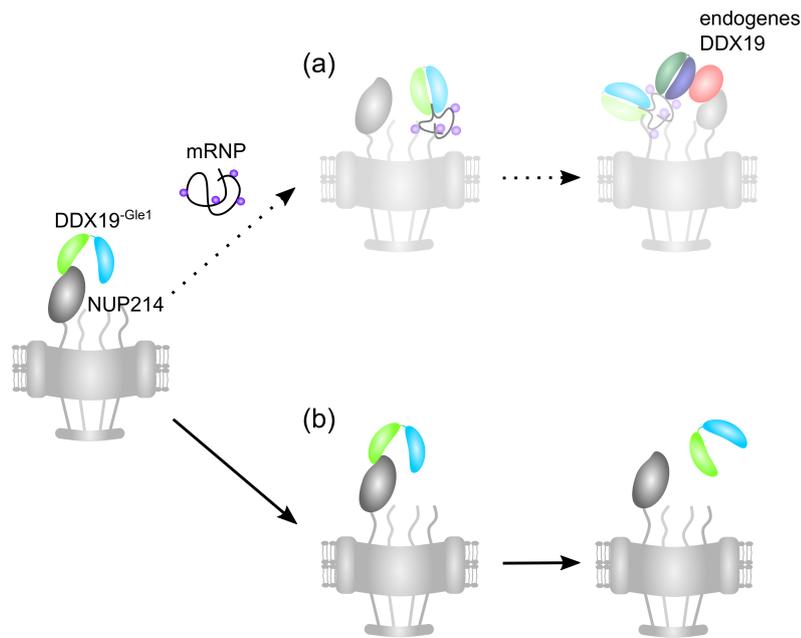
**Abbildung 5.3:** Schematische Abbildung der beiden Folgeszenarien nach der mRNP-Bindung an den DDX19-HaloTag-Komplex. Details siehe Text.

Da die ATP-Hydrolyse und damit einhergehenden Konformationsänderungen im DDX19 dafür sorgen, dass die Exportfaktoren vom mRNP entfernt werden<sup>[55]</sup>, muss die ATP-Hydrolyse zwangsläufig nach der Bindung des mRNPs an DDX19 erfolgen. Dieser Schritt führt zum Ende des Exportzyklus und dem Transfer des mRNPs in das Zytoplasma.

Ausgehend davon, dass wie eingangs beschrieben, ein Großteil der DDX19-Trajektorien aus dem Zytoplasma an die Kernpore bindet, dort verweilt und anschließend ins Zytoplasma zurückkehrt, kann angenommen werden, dass DDX19 nach erfolgter ATP-Hydrolyse wieder ins Zytoplasma diffundiert.

### 5.1.4 Die Funktionen von Gle1

Nachdem der Reaktionsablauf zwischen DDX19, NUP214, mRNP und Gle1 beim mRNP-Export aufgestellt wurde, stellte sich die Frage, wieso die Gle1-bindungsdefiziente Mutante eine erhöhte Bindungszeit an den NPCs zeigt. Mit der Erwartung, Rückschlüsse auf die Funktion von Gle1 beim mRNP-Export ziehen zu können, wurden zwei mögliche Reaktionsabläufe (s. Abbildung 5.4) untersucht.



**Abbildung 5.4:** Schematische Abbildung der beiden Reaktionsabläufe, die eine verlängerte Bindungszeit von DDX19<sup>Gle1</sup> erklären. Details siehe Text.

Als Gle1-bindungsdefiziente Mutante kann das DDX19<sup>Gle1</sup> nur auf zwei Weisen an der Kernpore gebunden bleiben. Der wahrscheinlichste Weg ist die Bindung an NUP214 (s. Abbildung 5.4 b).

Alternativ könnte es auch an ein mRNP binden, das wiederum an ein endogenes DDX19 bindet (s. Abbildung 5.4 a). In diesem Fall ist es denkbar, dass das DDX19<sup>Gle1</sup> eine sterische Hinderung für das endogene DDX19 darstellt, das die

ATP-Hydrolyse und damit die Entfernung der Exportfaktoren vom mRNP verlangsamt.

Die Bindungszeit der Gle1-bindungsdefizienten Mutante zeigte jedoch nach Hemmung der Transkription keine Änderung (s. Tabelle 4.1). Dies deutet darauf hin, dass die verlängerte Bindungszeit unabhängig von der mRNP-Konzentration der Zellen ist. Folglich ist die Bindungszeit der Gle1-bindungsdefizienten Mutante aller Voraussicht nach auf eine verlängerte Bindung an NUP214 zurückzuführen.

Der Vergleich mit der Bindungszeit des Wildtyp-DDX19 zeigt, dass die Bindung an Gle1 zu einer verkürzten Bindungszeit mit den NPCs führt. Dies deutet darauf hin, dass Gle1 die Bindungsaffinität von DDX19 an mRNPs erhöht und die darauffolgende ATP-Hydrolyse begünstigt, sodass eine verkürzte Bindungszeit an den NPCs resultiert. In Abwesenheit der Gle1-Bindung scheint DDX19 aufgrund einer geringeren mRNP-Affinität am NUP214 auf ein mRNP zu „warten“.

Einen weiteren Hinweis, dass Gle1 die intrinsische ATPase-Aktivität von DDX19 erhöht, zeigt der Vergleich der Mobilitäten zwischen DDX19 und DDX19<sup>Gle1</sup> im Zytoplasma. DDX19<sup>Gle1</sup> weist ~20 % weniger mobile Proteine im Zytoplasma auf als DDX19 (s. Abbildung 4.15). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der ATPase-defizienten Mutante DDX19<sup>ATPase</sup> beobachtet. Hier lag die Reduktion der mobilen Fraktion bei ~40 % (s. Abbildung 4.13). Von dieser Mutante ist bekannt, dass sie aufgrund einer sehr niedrigen ATPase-Aktivität nicht in der Lage ist, gebundene mRNPs freizusetzen<sup>[47]</sup>, was zu der Verlangsamung der Proteine führt. Auf dieser Grundlage liegt die Vermutung nahe, dass die Reduktion der mobilen DDX19<sup>Gle1</sup>-Proteine auch auf mRNP-beladene Proteine zurückzuführen ist. Gleichzeitig würde das bedeuten, dass die fehlende Gle1-Bindung die ATPase-Aktivität von DDX19<sup>Gle1</sup> reduziert.

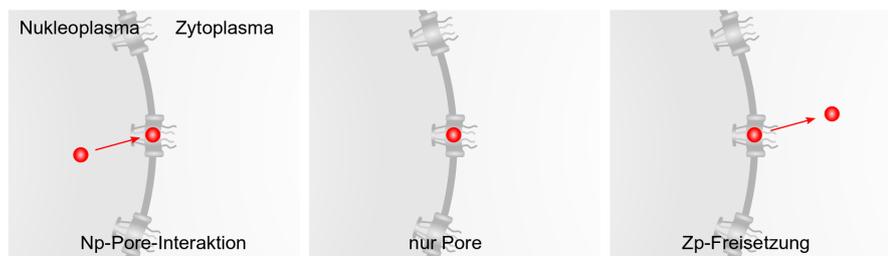
### 5.1.5 Die Stöchiometrie des mRNP-Exports

Die Bindungszeit von DDX19 an der Kernpore während des mRNP-Exports lag bei  $45 \pm 3$  ms.

Die Bindungszeit von hnRNP A1-gebundenen mRNPs während des mRNP-Exportes konnte nicht direkt bestimmt werden, da keine expliziten Exportereignisse beobachtet wurden. Dies könnte auf zwei Gründe zurückzuführen sein. Erstens waren die

zeitliche Auflösung von 66 Hz sowie das Signal-zu-Rausch Verhältnis des 647-SiR-Farbstoffes unzureichend, um vollständige Exportereignisse zu erfassen<sup>[89],[117],[118],[119]</sup>. Zweitens erlaubten die spärliche Färbung der hnRNP A1-Proteine (notwendig für Einzelmolekülaufklärung) und der Fokus auf den äquatorialen Bereich der Zelle nur die Visualisierung eines Bruchteils der in der Zelle ablaufenden Exportereignisse.

Um dennoch die Bindungszeit der hnRNP A1-gebundenen mRNPs während des Exports abschätzen zu können, wurden nur solche Bindungsereignisse berücksichtigt, denen eine der drei Trajektorien aus Abbildung 5.5 zugrunde lagen. So wurde angenommen, dass der Exportprozess nur in Teilen und nie in seiner Gesamtheit beobachtet wurde.



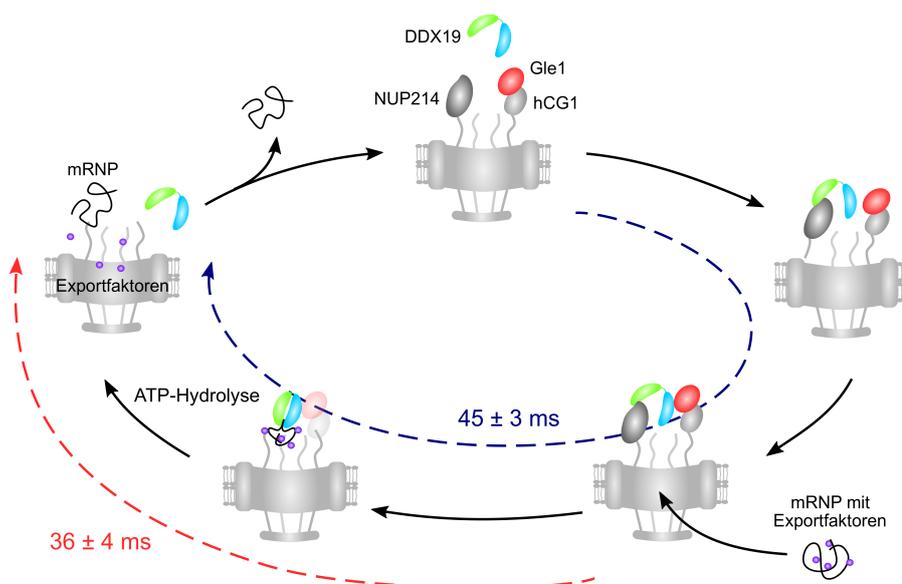
**Abbildung 5.5:** Die drei Trajektorien, die einem unvollständig beobachteten Export entsprechen.

Ausgehend davon ergab sich für die hnRNP A1-gebundenen mRNPs eine Bindungszeit von  $36 \pm 4$  ms. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass mRNPs durchschnittlicher Größe ( $\sim 2.2$  kb) eine Transportgeschwindigkeit von 11 - 350 ms haben<sup>[117],[120],[121],[122]</sup>. Wird berücksichtigt, dass einige dieser Studien Markierungsmethoden verwendet haben, die Größe und Form der mRNPs beeinflussen und somit eventuell die Bindungszeit überschätzen<sup>[117],[121],[123]</sup>, ist der hier gemessene Wert in guter Übereinstimmung<sup>[120]</sup>.

Der Vergleich der Bindungszeiten von DDX19 ( $45 \pm 3$  ms) und den an hnRNP A1 gebundenen mRNPs ( $36 \pm 4$  ms) legt die Vermutung nahe, dass *ein* DDX19 für den Export *eines* mRNPs zuständig ist. Weitere Messungen der hnRNP A1-Moleküle sind jedoch notwendig, um eine belastbarere Aussage treffen zu können (s. Kapitel 6).

### 5.1.6 Das gesamte Modell im Kontext der Literatur

Auf der Grundlage der Schlussfolgerungen in den Kapiteln 5.1 - 5.1.5 lässt sich unter Berücksichtigung der Literatur folgende Abfolge für den Reaktionszyklus von DDX19 beim Export von mRNP in menschlichen HeLa-Zellen aufstellen (s. Abbildung 5.6)



**Abbildung 5.6:** Schematische Abbildung des Reaktionszyklus von DDX19. Details siehe Text.

In diesem Modell sorgt die Bindung von DDX19 an das NUP214 zur Lokalisierung von DDX19 auf der zyttoplasmatischen Seite der NPCs, was wiederum die räumlich gezielte Entfernung der Exportfaktoren der mRNPs ermöglicht. Darüber hinaus begünstigt das NUP214 die Bindung von DDX19 zu Gle1.

Das Gle1 wiederum erhöht sowohl die Bindungsaffinität von DDX19 zu mRNP, als auch dessen intrinsische ATPase-Aktivität. Diese Funktionen des Gle1 konnten bereits in vorherigen Studien<sup>[57],[64],[69],[124]</sup> gezeigt werden, während sie nun auch erstmals *in vivo* bestätigt werden konnten.

Die Bindung vom mRNP an das DDX19 führt zur Dissoziation von DDX19 und NUP214<sup>[65]</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung vom mRNP an das DDX19 die Bindung zwischen DDX19 und Gle1 beeinflusst. Lin *et al.* (2018) konnten jedoch basierend auf kristallographischen Daten zeigen, dass die Konformationsänderung im DDX19 nach der RNA-Bindung die Freisetzung von Gle1 begünstigt<sup>[57]</sup>.

Die ATP-Hydrolyse und damit verbundene Entfernung der Exportfaktoren von mRNPs konnte in dieser Arbeit nicht direkt beobachtet werden, aber der Logik nach ergibt sich, dass dieser Prozess im letzten Schritt des Zyklus stattfinden muss. Der genaue Mechanismus, wie die mit der ATP-Hydrolyse gekoppelte Konformationsänderung im DDX19 die Exportfaktoren entfernt, ist noch unklar und Gegenstand aktueller Forschung<sup>[62]</sup>.

Nach erfolgter Reaktion kehrt das DDX19 schließlich zurück in das Zytoplasma.

Darüber hinaus deuten die Bindungszeiten von DDX19-Halo-Tag ( $45 \pm 3$  ms) und hnRNP A1-SnapTag gebundener mRNPs ( $36 \pm 4$  ms) darauf hin, dass *ein* DDX19-Molekül wahrscheinlich den Export von *einem* mRNP reguliert.

## 5.2 Identifizierung der NLS von DDX19

Als RNA-Helikase verfügt das DDX19 über viele Funktionen im RNA-Metabolismus<sup>[76],[125],[126]</sup>. So ist es für die effiziente Erkennung von Stoppcodons in der Translation, der Direktionalität des mRNP-Exports, sowie der Reparatur von DNA-Schäden in Form von *R-Loops* zuständig<sup>[59],[60]</sup>. Das bedeutet, dass das DDX19 ( $\sim 54$  kDa schwer und  $\sim 3$  nm groß) eine NES und eine NLS verfügen muss, damit es sich frei zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern bewegen kann<sup>[127]</sup>.

2019 konnten Lari *et al.* die für den Export erforderliche NES identifizieren, nicht aber die NLS<sup>[76]</sup>. Rajan und Montpetit mutmaßten 2020 in einem *Review*, dass sich die NLS von DDX19 vermutlich auf Motiv VI befinden könnten<sup>[55]</sup>. Daraufhin wurde in dieser Arbeit eine basenreiche Sequenz in Motiv VI untersucht und die Aminosäuren 425 - 436 (<sup>425</sup>HRIGRTGRFGKR<sup>436</sup>) in zwei separaten Ansätzen als NLS identifiziert werden.

Für den ersten Ansatz wurden die Aminosäuren 425 - 436 mit zwei eGFP-Molekülen kloniert und transient in HeLa-Zellen exprimiert. Anschließend wurde die Importfähigkeit der Sequenz anhand der subzellulären Gleichgewichtsverteilung mit der NLS des großen T-Antigens von SV40 verglichen, die ebenfalls mit zwei eGFP-Molekülen kloniert wurde. Der Zusatz von zwei eGFP-Molekülen stellte dabei sicher, dass der diffusionsbedingte Export der Proteine ins Zytoplasma minimiert wurde.

Dabei zeigte sich, dass der Aminosäurebereich 425 - 436 von DDX19 sich mit einem Intensitätsverhältnis von  $2.1 \pm 0.1$  im Nukleoplasma anreichert. Im Vergleich zur NLS des großen T-Antigens von SV40 fiel die Anreicherung jedoch deutlich schwächer aus (s. Tabelle 4.2), was darauf hindeutet, dass es sich bei dem gefundenen Aminosäurebereich um eine schwache NLS handelt. Dies kann verschiedenen Ursachen haben. Zum einen könnte es auf eine geringe Affinität der Importine zu der gefundenen NLS zurückzuführen sein<sup>[128]</sup>. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, dass der gefundene Aminosäurebereich nicht die gesamte NLS umfasst und die Importine deshalb eine schwächere Affinität haben.

Im zweiten Ansatz wurde die Importfähigkeit des gesamten Proteins DDX19 bei mutierter Sequenz im Aminosäurebereich 425 - 436 untersucht. Zu diesem Zweck wurden wie zuvor die basischen Aminosäuren in der Sequenz gegen Alanine sub-

stituiert und das mutierte DDX19 transient in HeLa-Zellen exprimiert. Der aktive Import wurde dann durch UV-C-Bestrahlung der Zellen induziert (Details s. Kapitel 4.6)<sup>[59]</sup> und die subzelluläre Gleichgewichtsverteilung des Proteins analysiert und mit der von DDX19 verglichen. Die aktive Induktion des Imports war notwendig, da DDX19 im Gleichgewichtszustand auf der zytoplasmatischen Seite angereichert ist (s. Abbildung 4.18 A).

Dabei zeigte sich, dass das Intensitätsverhältnis (zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma) des mutierten DDX19 im Vergleich zum Wildtyp-DDX19 um 50 % abnahm (s. Abbildung 4.18 B). Dies zeigt, dass das Protein schlechter importiert wird, wenn die Sequenz <sup>425</sup>HRIGRTGRFGKR<sup>436</sup> mutiert ist und deutet daraufhin, dass es sich bei der Sequenz um die NLS des von DDX19 handelt. Dennoch blockierte die Mutationen den Import von DDX19 nicht vollständig, was wiederum dafürspricht, dass das Protein entweder über einen Huckepack-Transport in den Zellkern gelangt ist oder dass die NLS von DDX19 sich über den Aminosäurebereich 425 - 436 erstreckt und das mutierte DDX19 somit immer noch eine teilweise funktionale NLS verfügte.

# Kapitel 6

## Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit ist es gelungen, den Reaktionsablauf zwischen mRNPs, DDX19, NUP214 und Gle1 beim mRNP-Export zu bestimmen und weiterhin die Funktion von Gle1 im Zyklus *in vivo* zu beschreiben.

Zu diesem Zweck wurden induzierbare Zelllinien von DDX19-HaloTag und drei weiteren Mutanten (DDX19<sup>NUP214/RNA</sup>-HaloTag, DDX19<sup>ATPase</sup>-HaloTag und DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag) erzeugt. Die Messung und der Vergleich der jeweiligen Bindungszeiten sowie der Bindungshäufigkeiten pro Minute an der Kernpore ermöglichte die Erstellung des Reaktionszyklus von DDX19 im mRNP-Export. Hier zeigte sich, dass DDX19 im ersten Schritt über die Bindung an NUP214 auf der zytoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert wird. Darüber hinaus sorgt die Bindung an NUP214 zu einer erhöhten Affinität von DDX19 zu Gle1. Die darauffolgende Bindung an das Gle1 führt wiederum zu einer erhöhten Affinität von DDX19 zu mRNPs und zu einer erhöhten ATPase-Aktivität. Nach der Bindung eines mRNPs folgt schließlich die ATP-Hydrolyse, die zur Entfernung der Exportfaktoren vom mRNP und der Freigabe in das Zytoplasma führt.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Export *eines* mRNP mit großer Wahrscheinlichkeit von *einem* DDX19 reguliert wird.

Zu diesem Zweck wurden die Bindungszeiten von DDX19-HaloTag- mit denen von mRNP-gebundenen hnRNP A1-SnapTag-Proteinen verglichen. Dabei ergab sich, dass keine kompletten Exportereignisse der hnRNP A1-SnapTag-Moleküle gemessen werden konnten, so dass nur diejenigen hnRNP-A1-SnapTag-Proteine für die Analyse der Bindungszeit verwendet wurden, die eine Trajektorie aufwiesen, die zu einem Teil einem Exportvorgang zugeordnet werden konnten (s. Abbildung 5.5).

In Zukunft sollten diese Messungen mit hnRNP A1-HaloTag-Proteinen wiederholt werden, da dies die Verwendung der JF549-Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht, die aufgrund ihrer erhöhten Helligkeit eine zeitliche Auflösung der Einzelmolekülaufnahmen bei 200 Hz erlauben. Dies wird den Vergleich der Bindungszeiten zwischen DDX19 und hnRNP A1 robuster machen.

Abseits des mRNP-Exports konnte die NLS von DDX19 auf die Aminosäureregion 425 - 436 im DDX19 eingegrenzt werden. Mutationen der basischen Aminosäuren in dieser Region zeigten eine deutlich reduzierte Importfähigkeit der Sequenz. Da die Importfähigkeit der mutierten Sequenz nicht zu einem vollständigen Stopp im Import von DDX19-HaloTag führte, liegt die Vermutung nahe, dass die NLS sich über den Aminosäurebereich 425 - 436 hinaus erstreckt. Hier müssten weitere Messungen unter Berücksichtigung der umliegenden Aminosäuren durchgeführt werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] Jennifer Flechsler, Thomas Heimerl, Harald Huber, Reinhard Rachel, and Ivan A Berg. Functional compartmentalization and metabolic separation in a prokaryotic cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(25), 2021.
- [2] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. The compartmentalization of cells. In *Molecular Biology of the Cell. 4th edition*. Garland Science, 2002.
- [3] Patrick Cramer. Organization and regulation of gene transcription. *Nature*, 573(7772):45–54, 2019.
- [4] Michael L Watson. The nuclear envelope: Its structure and relation to cytoplasmic membranes. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 1(3):257, 1955.
- [5] Kevin E Knockenhauer and Thomas U Schwartz. The nuclear pore complex as a flexible and dynamic gate. *Cell*, 164(6):1162–1171, 2016.
- [6] Daniel H Lin and André Hoelz. The structure of the nuclear pore complex (an update). *Annual review of biochemistry*, 88:725–783, 2019.
- [7] Martin Beck, Friedrich Forster, Mary Ecke, Jürgen M Plitzko, Frauke Melchior, Gunther Gerisch, Wolfgang Baumeister, and Ohad Medalia. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 306(5700):1387–1390, 2004.
- [8] Tal Maimon, Nadav Elad, Idit Dahan, and Ohad Medalia. The human nuclear pore complex as revealed by cryo-electron tomography. *Structure*, 20(6):998–1006, 2012.
- [9] Joseph G Gall. Octagonal nuclear pores. *The Journal of cell biology*, 32(2):391–399, 1967.

- [10] H Ris. 3-dimensional imaging of cell ultrastructure with high resolution low voltage sem. In *Institute of Physics Conference Series*, number 98, pages 657–662. IOP publishing LTD temple circus, temple way, Bristol BS1 6BE, England, 1990.
- [11] William M Bonner. Protein migration into nuclei. i. frog oocyte nuclei in vivo accumulate microinjected histones, allow entry to small proteins, and exclude large proteins. *The Journal of cell biology*, 64(2):421–430, 1975.
- [12] Dagmar Mohr, Steffen Frey, Torsten Fischer, Thomas Güttler, and Dirk Görlich. Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *The EMBO journal*, 28(17):2541–2553, 2009.
- [13] Edward A Lemke. The multiple faces of disordered nucleoporins. *Journal of molecular biology*, 428(10):2011–2024, 2016.
- [14] Timothy A Isgro and Klaus Schulten. Binding dynamics of isolated nucleoporin repeat regions to importin- $\beta$ . *Structure*, 13(12):1869–1879, 2005.
- [15] H Broder Schmidt and Dirk Görlich. Transport selectivity of nuclear pores, phase separation, and membraneless organelles. *Trends in biochemical sciences*, 41(1):46–61, 2016.
- [16] Katharina Ribbeck and Dirk Görlich. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *The EMBO journal*, 20(6):1320–1330, 2001.
- [17] Dirk Görlich, Siegfried Prehn, Ronald A Laskey, and Enno Hartmann. Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, 79(5):767–778, 1994.
- [18] Neil C Chi, EJ Adam, and Stephen A Adam. Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear protein import factor p97. *The Journal of cell biology*, 130(2):265–274, 1995.
- [19] Catherine Chaillan-Huntington, Carolina Villa Braslavsky, Jürgen Kuhlmann, and Murray Stewart. Dissecting the interactions between ntf2, rangdp, and the nucleoporin xfxg repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8):5874–5879, 2000.
- [20] Janna Bednenko, Gino Cingolani, and Larry Gerace. Importin  $\beta$  contains a cooh-terminal nucleoporin binding region important for nuclear transport. *The Journal of cell biology*, 162(3):391–401, 2003.

- [21] Richard Bayliss, Katharina Ribbeck, Debra Akin, Helen M Kent, Carl M Feldherr, Dirk Görlich, and Murray Stewart. Interaction between ntf2 and xfxfg-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of rangdp. *Journal of molecular biology*, 293(3):579–593, 1999.
- [22] Katharine S Ullman, Maureen A Powers, and Douglass J Forbes. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell*, 90(6):967–970, 1997.
- [23] Elisa Izaurralde, Ulrike Kutay, Cayetano von Kobbe, Iain W Mattaj, and Dirk Görlich. The asymmetric distribution of the constituents of the ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *The EMBO journal*, 16(21):6535–6547, 1997.
- [24] Petr Kalab, Karsten Weis, and Rebecca Heald. Visualization of a rangtp gradient in interphase and mitotic xenopus egg extracts. *Science*, 295(5564):2452–2456, 2002.
- [25] Lucy F Pemberton and Bryce M Paschal. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6(3):187–198, 2005.
- [26] Tommaso Cavazza and Isabelle Vernos. The rangtp pathway: from nucleocytoplasmic transport to spindle assembly and beyond. *Frontiers in cell and developmental biology*, 3:82, 2016.
- [27] Ki Lui and Ying Huang. Rangtpase: a key regulator of nucleocytoplasmic trafficking. *Molecular and cellular pharmacology*, 1(3):148, 2009.
- [28] Katharina Ribbeck, Gerd Lipowsky, Helen M Kent, Murray Stewart, and Dirk Görlich. Ntf2 mediates nuclear import of ran. *The EMBO journal*, 17(22):6587–6598, 1998.
- [29] Tanja La Cour, Lars Kiemer, Anne Mølgaard, Ramneek Gupta, Karen Skriver, and Søren Brunak. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection*, 17(6):527–536, 2004.
- [30] Ulrike Kutay and Stephan Güttinger. Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends in cell biology*, 15(3):121–124, 2005.
- [31] Colin Dingwall and Ronald A Laskey. Nuclear targeting sequences - a consensus? *Trends in biochemical sciences*, 16:478–481, 1991.
- [32] Teni Boulikas. Nuclear localization signals (nls). *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 3(3):193–227, 1993.

- [33] Allison Lange, Ryan E Mills, Christopher J Lange, Murray Stewart, Scott E Devine, and Anita H Corbett. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin  $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry*, 282(8):5101–5105, 2007.
- [34] Elena Conti and Elisa Izaurralde. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Current opinion in cell biology*, 13(3):310–319, 2001.
- [35] Robin Reed and Ed Hurt. A conserved mrna export machinery coupled to pre-mrna splicing. *Cell*, 108(4):523–531, 2002.
- [36] Binkai Chi, Qingliang Wang, Guifen Wu, Ming Tan, Lantian Wang, Min Shi, Xingya Chang, and Hong Cheng. Aly and tho are required for assembly of the human trex complex and association of trex components with the spliced mrna. *Nucleic acids research*, 41(2):1294–1306, 2013.
- [37] Dominik M Meinel, Cornelia Burkert-Kautzsch, Anja Kieser, Eoghan O’Duibhir, Matthias Siebert, Andreas Mayer, Patrick Cramer, Johannes Söding, Frank CP Holstege, and Katja Sträßer. Recruitment of trex to the transcription machinery by its direct binding to the phospho-ctd of rna polymerase ii. *PLoS genetics*, 9(11):e1003914, 2013.
- [38] Yi Ren, Philip Schmiede, and Günter Blobel. Structural and biochemical analyses of the dead-box atpase sub2 in association with tho or yra1. *Elife*, 6:e20070, 2017.
- [39] Ming-Juan Luo, Zhaolan Zhou, Keith Magni, Claudine Christoforides, Juri Rappsilber, Matthias Mann, and Robin Reed. Pre-mrna splicing and mrna export linked by direct interactions between uap56 and aly. *Nature*, 413(6856):644–647, 2001.
- [40] Katja Sträßer and Ed Hurt. Splicing factor sub2p is required for nuclear mrna export through its interaction with yra1p. *Nature*, 413(6856):648–652, 2001.
- [41] Seiji Masuda, Rita Das, Hong Cheng, Ed Hurt, Nijse Dorman, and Robin Reed. Recruitment of the human trex complex to mrna during splicing. *Genes & development*, 19(13):1512–1517, 2005.
- [42] Eugene Valkov, Jack C Dean, Divyang Jani, Sonja I Kuhlmann, and Murray Stewart. Structural basis for the assembly and disassembly of mrna nuclear

- export complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(6):578–592, 2012.
- [43] Jun Katahira, Lyudmila Dimitrova, Yumiko Imai, and Ed Hurt. Ntf2-like domain of tap plays a critical role in cargo mrna recognition and export. *Nucleic acids research*, 43(3):1894–1904, 2015.
- [44] Vihandha O Wickramasinghe, Paul IA McMurtrie, Anthony D Mills, Yoshinori Takei, Sue Penrhyn-Lowe, Yoko Amagase, Sarah Main, Jackie Marr, Murray Stewart, and Ronald A Laskey. mrna export from mammalian cell nuclei is dependent on ganp. *Current Biology*, 20(1):25–31, 2010.
- [45] Alexander E Gorbalenya and Eugene V Koonin. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current opinion in structural biology*, 3(3):419–429, 1993.
- [46] N Kyle Tanner. The newly identified q motif of dead box heicases is involved in adenine recognition. *Cell cycle*, 2(1):18–19, 2003.
- [47] Christel Schmitt, Cayetano von Kobbe, Angela Bachi, Nelly Pante, Joao P Rodrigues, Cecile Boscheron, Guillaume Rigaut, Matthias Wilm, Bertrand Seraphin, Maria Carmo-Fonseca, et al. Dbp5, a dead-box protein required for mrna export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with can/nup159p. *The EMBO journal*, 18(15):4332–4347, 1999.
- [48] Olivier Cordin, Josette Banroques, N Kyle Tanner, and Patrick Linder. The dead-box protein family of rna helicases. *Gene*, 367:17–37, 2006.
- [49] Randall M Story and Thomas A Steitz. Structure of the reca protein–adp complex. *Nature*, 355(6358):374–376, 1992.
- [50] Andrew B Carmel and Brian W Matthews. Crystal structure of the bstdead n-terminal domain: a novel dead protein from bacillus stearothermophilus. *Rna*, 10(1):66–74, 2004.
- [51] Jörg Benz, Hans Trachsel, and Ulrich Baumann. Crystal structure of the atpase domain of translation initiation factor 4a from saccharomyces cerevisiae—the prototype of the dead box protein family. *Structure*, 7(6):671–679, 1999.

- [52] Randall M Story, Hong Li, and John N Abelson. Crystal structure of a dead box protein from the hyperthermophile methanococcus jannaschii. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4):1465–1470, 2001.
- [53] George W Rogers Jr, Anton A Komar, and William C Merrick. eif4a: the godfather of the dead box helicases. 2002.
- [54] Isabelle Iost, Marc Dreyfus, and Patrick Linder. Ded1p, a dead-box protein required for translation initiation in *saccharomyces cerevisiae*, is an rna helicase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(25):17677–17683, 1999.
- [55] Arvind Arul Nambi Rajan and Ben Montpetit. Emerging molecular functions and novel roles for the dead-box protein dbp5/ddx19 in gene expression. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(5):2019–2030, 2021.
- [56] Toru Sengoku, Osamu Nureki, Akira Nakamura, Satoru Kobayashi, and Shigeyuki Yokoyama. Structural basis for rna unwinding by the dead-box protein drosophila vasa. *Cell*, 125(2):287–300, 2006.
- [57] Daniel H Lin, Ana R Correia, Sarah W Cai, Ferdinand M Huber, Claudia A Jette, and André Hoelz. Structural and functional analysis of mrna export regulation by the nuclear pore complex. *Nature communications*, 9(1):1–19, 2018.
- [58] Ben Montpetit, Nathan D Thomsen, Kara J Helmke, Markus A Seeliger, James M Berger, and Karsten Weis. A conserved mechanism of dead-box atpase activation by nucleoporins and insp6 in mrna export. *Nature*, 472(7342):238–242, 2011.
- [59] Dana Hodroj, Bénédicte Recolin, Kamar Serhal, Susan Martinez, Nikolay Tzanov, Raghida Abou Merhi, and Domenico Maiorano. An atr-dependent function for the ddx19 rna helicase in nuclear r-loop metabolism. *The EMBO journal*, 36(9):1182–1198, 2017.
- [60] Thomas Gross, Anja Siepmann, Dorotheé Sturm, Merle Windgassen, John J Scarcelli, Matthias Seedorf, Charles N Cole, and Heike Krebber. The dead-box rna helicase dbp5 functions in translation termination. *Science*, 315(5812):646–649, 2007.
- [61] Mette K Lund and Christine Guthrie. The dead-box protein dbp5p is required to dissociate mex67p from exported mrnps at the nuclear rim. *Molecular cell*, 20(4):645–651, 2005.

- [62] Yihu Xie and Yi Ren. Mechanisms of nuclear mrna export: A structural perspective. *Traffic*, 20(11):829–840, 2019.
- [63] Johanna Napetschnig, Günter Blobel, and André Hoelz. Crystal structure of the n-terminal domain of the human protooncogene nup214/can. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6):1783–1788, 2007.
- [64] Andrew W Folkmann, Kristen N Noble, Charles N Cole, and Susan R Wenthe. Dbp5, gle1-ip6 and nup159: a working model for mrnp export. *Nucleus*, 2(6):540–548, 2011.
- [65] Holger Von Moeller, Claire Basquin, and Elena Conti. The mrna export protein dbp5 binds rna and the cytoplasmic nucleoporin nup214 in a mutually exclusive manner. *Nature structural & molecular biology*, 16(3):247–254, 2009.
- [66] Kristen N Noble, Elizabeth J Tran, Abel R Alcázar-Román, Christine A Hodge, Charles N Cole, and Susan R Wenthe. The dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mrna export ii: nucleotide cycling and mrnp remodeling by dbp5 are controlled by nup159 and gle1. *Genes & development*, 25(10):1065–1077, 2011.
- [67] Yvan Strahm, Birthe Fahrenkrog, Daniel Zenklusen, Elizabeth Rychner, Julia Kantor, Michael Rosbash, and Françoise Stutz. The rna export factor gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the npc and physically interacts with the fg-nucleoporin rip1p, the dead-box protein rat8p/dbp5p and a new protein ymr255p. *The EMBO journal*, 18(20):5761–5777, 1999.
- [68] Frederic Kendirgi, Deborah J Rexer, Abel R Alcázar-Román, Halina M Onishko, and Susan R Wenthe. Interaction between the shuttling mrna export factor gle1 and the nucleoporin hcg1: a conserved mechanism in the export of hsp70 mrna. *Molecular biology of the cell*, 16(9):4304–4315, 2005.
- [69] Christine A Hodge, Elizabeth J Tran, Kristen N Noble, Abel R Alcazar-Roman, Rakefet Ben-Yishay, John J Scarcelli, Andrew W Folkmann, Yaron Shav-Tal, Susan R Wenthe, and Charles N Cole. The dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mrna export i: dbp5 mutants with defects in rna binding and atp hydrolysis define key steps for nup159 and gle1. *Genes & development*, 25(10):1052–1064, 2011.
- [70] Christine A Hodge, Hildur V Colot, Phillip Stafford, and Charles N Cole. Rat8p/dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with

- rat7p/nup159p and gle1p and suppresses the mrna export defect of xpo1-1 cells. *The EMBO journal*, 18(20):5778–5788, 1999.
- [71] Rebecca L Adams, Aaron C Mason, Laura Glass, and Susan R Wente. Nup42 and ip6 coordinate gle1 stimulation of dbp5/ddx19b for mrna export in yeast and human cells. *Traffic*, 18(12):776–790, 2017.
- [72] Aimee L Miller, Mythili Suntharalingam, Sylvia L Johnson, Anjon Audhya, Scott D Emr, and Susan R Wente. Cytoplasmic inositol hexakisphosphate production is sufficient for mediating the gle1-mrna export pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49):51022–51032, 2004.
- [73] Heidi O Nousiainen, Marjo Kestilä, Niklas Pakkasjärvi, Heli Honkala, Satu Kuure, Jonna Tallila, Katri Vuopala, Jaakko Ignatius, Riitta Herva, and Leena Peltonen. Mutations in mrna export mediator gle1 result in a fetal motoneuron disease. *Nature genetics*, 40(2):155–157, 2008.
- [74] Hannah M Kaneb, Andrew W Folkmann, Véronique V Belzil, Li-En Jao, Claire S Leblond, Simon L Girard, Hussein Daoud, Anne Noreau, Daniel Rochefort, Pascale Hince, et al. Deleterious mutations in the essential mrna metabolism factor, hgle1, in amyotrophic lateral sclerosis. *Human molecular genetics*, 24(5):1363–1373, 2015.
- [75] KE Zhang, Christopher J Donnelly, Aaron R Haeusler, Jonathan C Grima, James B Machamer, Peter Steinwald, Elizabeth L Daley, Sean J Miller, Kathleen M Cunningham, Svetlana Vidensky, et al. The c9orf72 repeat expansion disrupts nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 525(7567):56–61, 2015.
- [76] Azra Lari, Arvind Arul Nambi Rajan, Rima Sandhu, Taylor Reiter, Rachel Montpetit, Barry P Young, Chris JR Loewen, and Ben Montpetit. A nuclear role for the dead-box protein dbp5 in trna export. *Elife*, 8:e48410, 2019.
- [77] Agilent Technologies. Herculase enhanced dna polymerase, 2009.
- [78] Federico Katzen. Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert opinion on drug discovery*, 2(4):571–589, 2007.
- [79] New England Biolabs. High efficiency transformation protocol (c2987i), 2022.
- [80] Thermo Scientific. Thermo scientific genejet plasmid miniprep kit, 2014.
- [81] New England Biolabs. Restriction digest protocol, 2022.

- [82] Niels Heinz, Axel Schambach, Melanie Galla, Tobias Maetzig, Christopher Baum, Rainer Loew, and Bernhard Schiedlmeier. Retroviral and transposon-based tet-regulated all-in-one vectors with reduced background expression and improved dynamic range. *Human gene therapy*, 22(2):166–176, 2011.
- [83] Macherey-Nagel. Nucleobond xtra plasmid dna purification, 2021.
- [84] Huanting Liu and James H Naismith. An efficient one-step site-directed deletion, insertion, single and multiple-site plasmid mutagenesis protocol. *BMC biotechnology*, 8(1):1–10, 2008.
- [85] Promega. *Pfu* dna polymerase protocol, 2013.
- [86] Asia Pacific. Retroviral gene transfer and expression user manual. *Europe*, 1(9):19–7300.
- [87] Stavroula Mili, Hong Jun Shu, Yingming Zhao, and Serafin Pin̄fol-Roma. Distinct rnp complexes of shuttling hnrnp proteins with pre-mrna and mrna: candidate intermediates in formation and export of mrna. *Molecular and cellular biology*, 21(21):7307–7319, 2001.
- [88] Jacques Jean-Philippe, Sean Paz, and Massimo Caputi. hnrnp a1: the swiss army knife of gene expression. *International journal of molecular sciences*, 14(9):18999–19024, 2013.
- [89] Jan Peter Siebrasse, Tim Kaminski, and Ulrich Kubitscheck. Nuclear export of single native mrna molecules observed by light sheet fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24):9426–9431, 2012.
- [90] John R Masters and Glyn N Stacey. Changing medium and passaging cell lines. *Nature protocols*, 2(9):2276–2284, 2007.
- [91] Polyplus. jetprime *in vitro* dna and sirna transfection reagent, 2020.
- [92] Henry M Sobell. Actinomycin and dna transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(16):5328–5331, 1985.
- [93] Georgyi V Los, Lance P Encell, Mark G McDougall, Danette D Hartzell, Natasha Karassina, Chad Zimprich, Monika G Wood, Randy Learish, Rachel Friedman Ohana, Marjeta Urh, et al. Halotag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS chemical biology*, 3(6):373–382, 2008.

- [94] Dana Hodroj, Kamar Serhal, and Domenico Maiorano. Ddx19 links mrna nuclear export with progression of transcription and replication and suppresses genomic instability upon dna damage in proliferating cells. *Nucleus*, 8(5):489–495, 2017.
- [95] Polyplus. Interferin *in vitro* sirna/mirna transfection reagent, 2021.
- [96] Kristine S Louis and Andre C Siegel. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In *Mammalian cell viability*, pages 7–12. Springer, 2011.
- [97] Jan Andreas Ruland, Annika Marie Krüger, Kerstin Dörner, Rohan Bhatia, Sabine Wirths, Daniel Poetes, Ulrike Kutay, Jan Peter Siebrasse, and Kubitscheck Ulrich. Nuclear export of the pre-60s ribosomal subunit through single nuclear pores observed in real time. *Nature communications*, 12(6211), 2021.
- [98] Klaus Weisshart. The basic principle of airyscanning. *Zeiss Technology Note*, 22, 2014.
- [99] Ulrich Kubitscheck. *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*. John Wiley & Sons, 2017.
- [100] Norbert Wiener, Norbert Wiener, Cyberneticist Mathematician, Norbert Wiener, Norbert Wiener, and Cybernéticien Mathématicien. *Extrapolation, interpolation, and smoothing of stationary time series: with engineering applications*, volume 113. MIT press Cambridge, MA, 1949.
- [101] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto, and Kumiko Sakata-Sogawa. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature methods*, 5(2):159–161, 2008.
- [102] Roman S Erdmann, Stephanie Wood Baguley, Jennifer H Richens, Rebecca F Wissner, Zhiqun Xi, Edward S Allgeyer, Sheng Zhong, Alexander D Thompson, Nicholas Lowe, Richard Butler, et al. Labeling strategies matter for super-resolution microscopy: a comparison between halotags and snap-tags. *Cell chemical biology*, 26(4):584–592, 2019.
- [103] Jonathan B Grimm, Brian P English, Heejun Choi, Anand K Muthusamy, Brian P Mehl, Peng Dong, Timothy A Brown, Jennifer Lippincott-Schwartz, Zhe Liu, Timothée Lionnet, et al. Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging. *Nature methods*, 13(12):985–988, 2016.

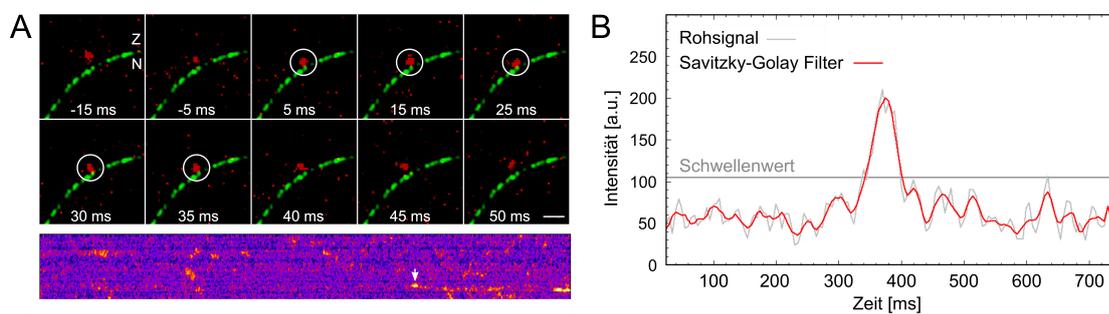
- [104] Laura Weimann, Kristina A Ganzinger, James McColl, Kate L Irvine, Simon J Davis, Nicholas J Gay, Clare E Bryant, and David Klenerman. A quantitative comparison of single-dye tracking analysis tools using monte carlo simulations. *PloS one*, 8(5):e64287, 2013.
- [105] Abraham Savitzky and Marcel JE Golay. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical chemistry*, 36(8):1627–1639, 1964.
- [106] David Freedman and Persi Diaconis. On the histogram as a density estimator: L 2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und verwandte Gebiete*, 57(4):453–476, 1981.
- [107] Jean-Yves Tinevez, Nick Perry, Johannes Schindelin, Genevieve M Hoopes, Gregory D Reynolds, Emmanuel Laplantine, Sebastian Y Bednarek, Spencer L Shorte, and Kevin W Eliceiri. Trackmate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115:80–90, 2017.
- [108] Khuloud Jaqaman, Dinah Loerke, Marcel Mettlen, Hirotaka Kuwata, Sergio Grinstein, Sandra L Schmid, and Gaudenz Danuser. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nature methods*, 5(8):695–702, 2008.
- [109] Anders S Hansen, Maxime Woringer, Jonathan B Grimm, Luke D Lavis, Robert Tjian, and Xavier Darzacq. Robust model-based analysis of single-particle tracking experiments with spot-on. *Elife*, 7:e33125, 2018.
- [110] H. Akaike. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19(6):716–723, 1974.
- [111] Kim I Mortensen, L Stirling Churchman, James A Spudich, and Henrik Flyvbjerg. Optimized localization analysis for single-molecule tracking and super-resolution microscopy. *Nature methods*, 7(5):377–381, 2010.
- [112] Jonathan B Grimm, Brian P English, Jiji Chen, Joel P Slaughter, Zhengjian Zhang, Andrey Revyakin, Ronak Patel, John J Macklin, Davide Normanno, Robert H Singer, et al. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nature methods*, 12(3):244–250, 2015.
- [113] Daniel Kalderon, Bruce L Roberts, William D Richardson, and Alan E Smith. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3):499–509, 1984.

- [114] Mary R Hodel, Anita H Corbett, and Alec E Hodel. Dissection of a nuclear localization signal. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2):1317–1325, 2001.
- [115] Kristen N Noble, Elizabeth J Tran, Abel R Alcázar-Román, Christine A Hodge, Charles N Cole, and Susan R Wente. The dbp5 cycle at the nuclear pore complex during mrna export ii: nucleotide cycling and mrnp remodeling by dbp5 are controlled by nup159 and gle1. *Genes & development*, 25(10):1065–1077, 2011.
- [116] Zain Y Dossani, Christine S Weirich, Jan P Erzberger, James M Berger, and Karsten Weis. Structure of the c-terminus of the mrna export factor dbp5 reveals the interaction surface for the atpase activator gle1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38):16251–16256, 2009.
- [117] David Grünwald and Robert H Singer. In vivo imaging of labelled endogenous  $\beta$ -actin mrna during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 467(7315):604–607, 2010.
- [118] Rajdeep Chowdhury, Abhishek Sau, and Siegfried M Musser. Super-resolved 3d tracking of cargo transport through nuclear pore complexes. Technical report, Nature Publishing Group, 2022.
- [119] Jan Peter Siebrasse, Roman Veith, Akos Dobay, Heinrich Leonhardt, Bertil Daneholt, and Ulrich Kubitscheck. Discontinuous movement of mrnp particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51):20291–20296, 2008.
- [120] Ulrich Kubitscheck and Jan-Peter Siebrasse. Kinetics of transport through the nuclear pore complex. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, volume 68, pages 18–26. Elsevier, 2017.
- [121] Jiong Ma, Zhen Liu, Nicole Michelotti, Sethuramasundaram Pitchiaya, Ram Veerapaneni, John R Androsavich, Nils G Walter, and Weidong Yang. High-resolution three-dimensional mapping of mrna export through the nuclear pore. *Nature communications*, 4(1):1–9, 2013.
- [122] Carlas Smith, Azra Lari, Carina Patrizia Derrer, Anette Ouwehand, Ammeret Rossouw, Maximiliaan Huisman, Thomas Dange, Mark Hopman, Aviva Joseph, Daniel Zenklusen, et al. In vivo single-particle imaging of nuclear mrna export in budding yeast demonstrates an essential role for mex67p. *Journal of Cell Biology*, 211(6):1121–1130, 2015.

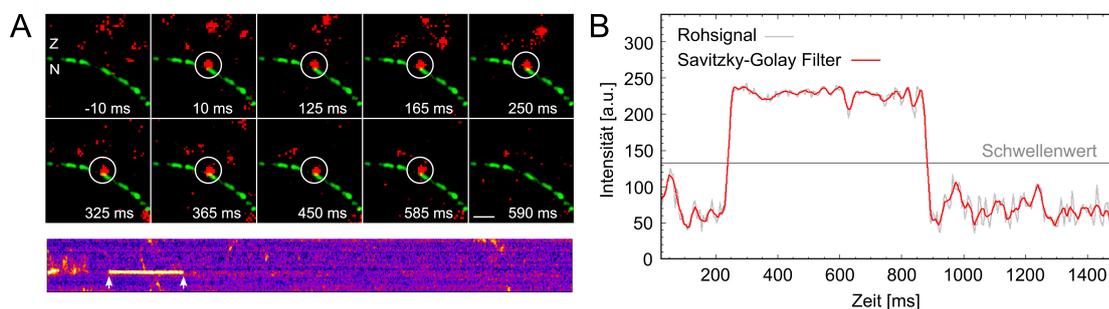
- [123] Deborah A Kuzmanovic, Ilya Elashvili, Charles Wick, Catherine O’Connell, and Susan Krueger. Bacteriophage ms2: molecular weight and spatial distribution of the protein and rna components by small-angle neutron scattering and virus counting. *Structure*, 11(11):1339–1348, 2003.
- [124] Christine S Weirich, Jan P Erzberger, Jeffrey S Flick, James M Berger, Jeremy Thorner, and Karsten Weis. Activation of the dexd/h-box protein dbp5 by the nuclear-pore protein gle1 and its coactivator insp6 is required for mrna export. *Nature cell biology*, 8(7):668–676, 2006.
- [125] Christian Beißel, Sebastian Grosse, and Heike Krebber. Dbp5/ddx19 between translational readthrough and nonsense mediated decay. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3):1085, 2020.
- [126] Patrick Linder and Eckhard Jankowsky. From unwinding to clamping the dead box rna helicase family. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8):505–516, 2011.
- [127] Christina Li, Alexander Goryaynov, and Weidong Yang. The selective permeability barrier in the nuclear pore complex. *Nucleus*, 7(5):430–446, 2016.
- [128] Alec E Hodel, Michelle T Harreman, Kanika F Pulliam, Mary Elizabeth Harben, Jordan S Holmes, Mary R Hodel, Keith M Berland, and Anita H Corbett. Nuclear localization signal receptor affinity correlates with in vivo localization in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(33):23545–23556, 2006.



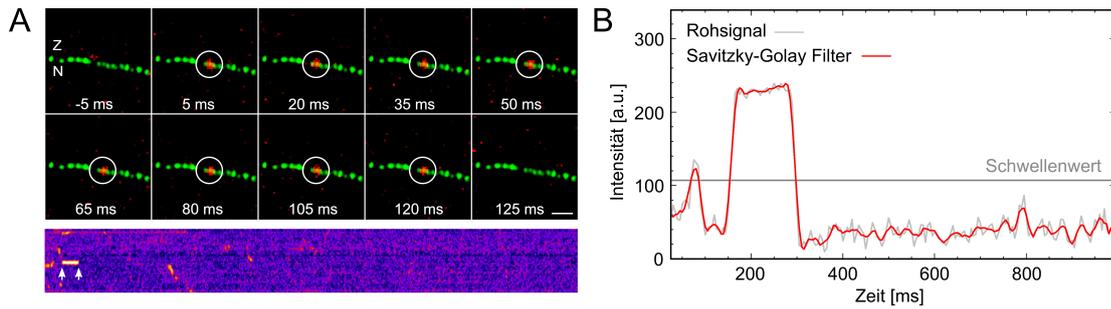
# Anhang



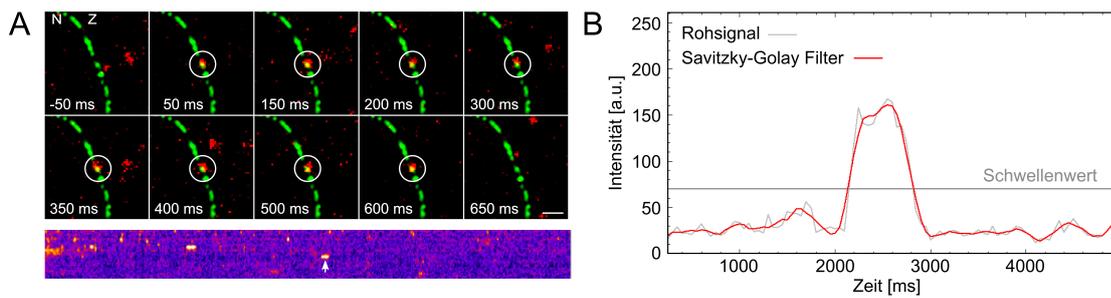
**Abbildung A.1:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19-NUP214/RNA-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 35 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .



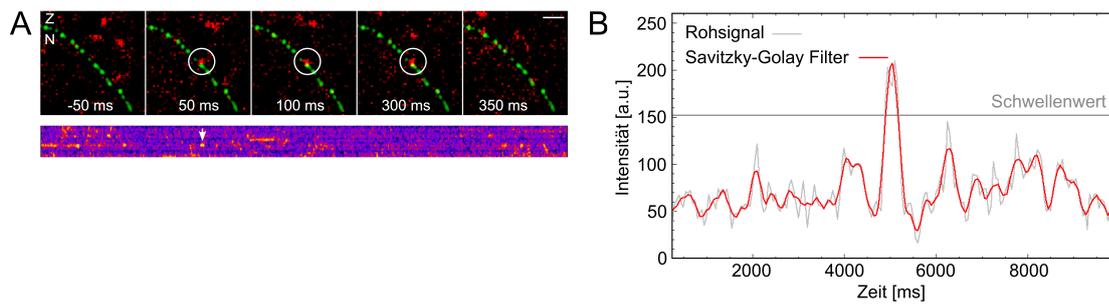
**Abbildung A.2:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19-ATPase-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 585 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .



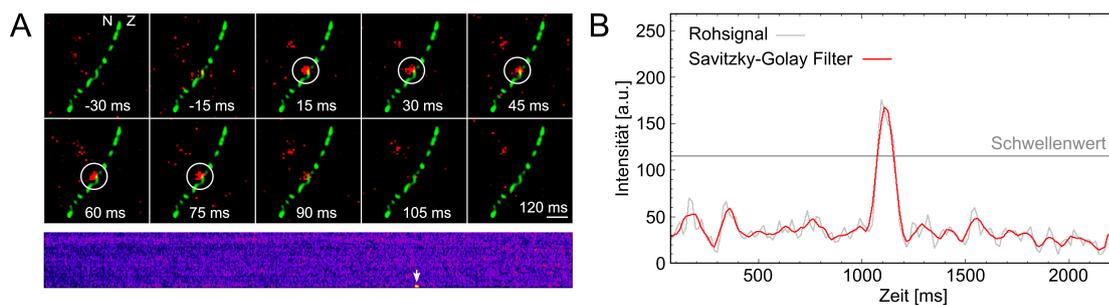
**Abbildung A.3:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19<sup>-Gle1</sup>-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 120 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung A.4:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19<sup>-Gle1</sup>-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 600 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung A.5:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines DDX19<sup>Gle1</sup>-HaloTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 300 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung A.6:** (A) Die Bildsequenz einer Bindung eines hnRNP A1-SnapTag-Moleküls (rot) an einer Kernpore (grün). Ein Bild umfasst die Dauer von 5 ms. Die Bilder vor der Bindung wurden mit einer negativen Zeit nummeriert. Unterhalb der Bildsequenz ist der Ausschnitt des Kymographen mit der gezeigten Bindung dargestellt. (B) zeigt den Intensitätsverlauf, der in (A) gezeigten Bindung über die Zeit. Die Bindung dauert 75 ms lang. Maßstabsbalken: 2  $\mu\text{m}$ .

	952	960	970	980	990	1000	1010	1020
DDX19	ATGGCCACTGACTCATGGGCCCTGGCCGGTGGACGAGCAGGAAGCTGCCGGCTGAGTCGTTGAGCAACTTGCATC							
DDX19 Probe	ATGGCCACTGACTCATGGGCCCTGGCCGGTGGACGAGCAGGAAGCTGCCGGCTGAGTCGTTGAGCAACTTGCATC							
Konsens	ATGGCCACTGACTCATGGGCCCTGGCCGGTGGACGAGCAGGAAGCTGCCGGCTGAGTCGTTGAGCAACTTGCATC							
	1025	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1096
DDX19	TTAAGGAAGAGAAAATCAAACCAGATACCAATGGTGCTGTTGTCAAGACCAATGCCAATGCAGAGAAGACAGATG							
DDX19 Probe	TTAAGGAAGAGAAAATCAAACCAGATACCAATGGTGCTGTTGTCAAGACCAATGCCAATGCAGAGAAGACAGATG							
Konsens	TTAAGGAAGAGAAAATCAAACCAGATACCAATGGTGCTGTTGTCAAGACCAATGCCAATGCAGAGAAGACAGATG							
	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
DDX19	AAGAAGAGAAAAGAGGACAGAGCTGCCAGTCTTACTCAACAAGCTGATCAGAAGCAACCTTGTGATAACACA							
DDX19 Probe	AAGAAGAGAAAAGAGGACAGAGCTGCCAGTCTTACTCAACAAGCTGATCAGAAGCAACCTTGTGATAACACA							
Konsens	AAGAAGAGAAAAGAGGACAGAGCTGCCAGTCTTACTCAACAAGCTGATCAGAAGCAACCTTGTGATAACACA							
	1174	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240
DDX19	AACCAAGTGGAAAGTCTGCAGCGGGATCCAAACTCCCCTCTGTACTCGGTGAAGTCTTTGAAGAGCTTCGGCTG							
DDX19 Probe	AACCAAGTGGAAAGTCTGCAGCGGGATCCAAACTCCCCTCTGTACTCGGTGAAGTCTTTGAAGAGCTTCGGCTG							
Konsens	AACCAAGTGGAAAGTCTGCAGCGGGATCCAAACTCCCCTCTGTACTCGGTGAAGTCTTTGAAGAGCTTCGGCTG							
	1248	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1319
DDX19	AAACCACAGCTTCTCCAAGGAGTCTATGCCATGGGTTTCAATCGTCCATCCAAGATACAAGAGAACGCATTGCCA							
DDX19 Probe	AAACCACAGCTTCTCCAAGGAGTCTATGCCATGGGTTTCAATCGTCCATCCAAGATACAAGAGAACGCATTGCCA							
Konsens	AAACCACAGCTTCTCCAAGGAGTCTATGCCATGGGTTTCAATCGTCCATCCAAGATACAAGAGAACGCATTGCCA							
	1323	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390
DDX19	CTGATGCTTGCTGAGCCCCACAGAACTTAATTGCCCAATCTCAGTCTGGTACTGGTAAACAGCTGCCTTCGTG							
DDX19 Probe	CTGATGCTTGCTGAGCCCCACAGAACTTAATTGCCCAATCTCAGTCTGGTACTGGTAAACAGCTGCCTTCGTG							
Konsens	CTGATGCTTGCTGAGCCCCACAGAACTTAATTGCCCAATCTCAGTCTGGTACTGGTAAACAGCTGCCTTCGTG							
	1398	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
DDX19	CTGGCCATGCTTAGCCAAGTAGAACCTGCAAAACAAATACCCCCAGTGTCTATGTCTCTCCCCAACGTATGAGCTCG							
DDX19 Probe	CTGGCCATGCTTAGCCAAGTAGAACCTGCAAAACAAATACCCCCAGTGTCTATGTCTCTCCCCAACGTATGAGCTCG							
Konsens	CTGGCCATGCTTAGCCAAGTAGAACCTGCAAAACAAATACCCCCAGTGTCTATGTCTCTCCCCAACGTATGAGCTCG							
	1474	1490	1500	1510	1520	1530	1540	
DDX19	CCCTCCAACAGGAAAAGTGATTGAACAAATGGGCAAATTTACCCTGAAGCTAGCTTATGCTGTTTCGAGG							
DDX19 Probe	CCCTCCAACAGGAAAAGTGATTGAACAAATGGGCAAATTTACCCTGAAGCTAGCTTATGCTGTTTCGAGG							
Konsens	CCCTCCAACAGGAAAAGTGATTGAACAAATGGGCAAATTTACCCTGAAGCTAGCTTATGCTGTTTCGAGG							
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620
DDX19	CAATAAATTGAAAAGAGGCCAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGGACTGGT							
DDX19 Probe	CAATAAATTGAAAAGAGGCCAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGGACTGGT							
Konsens	CAATAAATTGAAAAGAGGCCAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGGACTGGT							
	1624	1640	1650	1660	1670	1680	1690	
DDX19	CTCCAAGCTCAAGTTCATTGATCCCAAGAAAATCAAGGTGTTTGTCTGGATGAGGCTGATGTCATGATAGCCAC							
DDX19 Probe	CTCCAAGCTCAAGTTCATTGATCCCAAGAAAATCAAGGTGTTTGTCTGGATGAGGCTGATGTCATGATAGCCAC							
Konsens	CTCCAAGCTCAAGTTCATTGATCCCAAGAAAATCAAGGTGTTTGTCTGGATGAGGCTGATGTCATGATAGCCAC							

**Abbildung A.7:** Sequenzierung von DDX19-HaloTag - Teil 1. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz von DDX19-HaloTag. Zweite Zeile: die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: Die übereinstimmenden Aminosäuren.

	1699	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1768
DDX19	TCAGGGCCACCAAGATCAGAGCATCCGCATCCAGAGGATGCTGCCAGGAACTGCCAGATGCTGCTTTTCTCC							
DDX19 Probe	TCAGGGCCACCAAGATCAGAGCATCCGCATCCAGAGGATGCTGCCAGGAACTGCCAGATGCTGCTTTTCTCC							
Konsens	TCAGGGCCACCAAGATCAGAGCATCCGCATCCAGAGGATGCTGCCAGGAACTGCCAGATGCTGCTTTTCTCC							
	1772	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840
DDX19	GCCACCTTTGAAGACTCTGTGTGGAAGTTTGCCAGAAAAGTGGTCCAGACCCAAACGTTATCAAACCTGAAGCG							
DDX19 Probe	GCCACCTTTGAAGACTCTGTGTGGAAGTTTGCCAGAAAAGTGGTCCAGACCCAAACGTTATCAAACCTGAAGCG							
Konsens	GCCACCTTTGAAGACTCTGTGTGGAAGTTTGCCAGAAAAGTGGTCCAGACCCAAACGTTATCAAACCTGAAGCG							
	1846	1860	1870	1880	1890	1900	1910	
DDX19	TGAGGAAGAGACCCCTGGACACCATCAAGCAGTACTATGCTCCTGTGCAGCAGCAGAGACGAGAAGTTCCAGGCC							
DDX19 Probe	TGAGGAAGAGACCCCTGGACACCATCAAGCAGTACTATGCTCCTGTGCAGCAGCAGAGACGAGAAGTTCCAGGCC							
Konsens	TGAGGAAGAGACCCCTGGACACCATCAAGCAGTACTATGCTCCTGTGCAGCAGCAGAGACGAGAAGTTCCAGGCC							
	1918	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1989
DDX19	TTGTGTAACCTCTACGGGGCCATCACCATTGCTCAAGCCATGATCTTCTGCCATACTCGCAAAACAGCTAGTTGG							
DDX19 Probe	TTGTGTAACCTCTACGGGGCCATCACCATTGCTCAAGCCATGATCTTCTGCCATACTCGCAAAACAGCTAGTTGG							
Konsens	TTGTGTAACCTCTACGGGGCCATCACCATTGCTCAAGCCATGATCTTCTGCCATACTCGCAAAACAGCTAGTTGG							
	1993	2000	2010	2020	2030	2040	2050	2060
DDX19	CTGGCAGCAGAGCTCTCAAAGAAGGCCACCAGGTGGCTCTGCTGAGTGGGGAGATGATGGTGAACAGAGGG							
DDX19 Probe	CTGGCAGCAGAGCTCTCAAAGAAGGCCACCAGGTGGCTCTGCTGAGTGGGGAGATGATGGTGAACAGAGGG							
Konsens	CTGGCAGCAGAGCTCTCAAAGAAGGCCACCAGGTGGCTCTGCTGAGTGGGGAGATGATGGTGAACAGAGGG							
	2066	2080	2090	2100	2110	2120	2130	
DDX19	CTGCAGTGATTGAGCGCTTCCGAGAGGGCAAAGAGAAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATT							
DDX19 Probe	CTGCAGTGATTGAGCGCTTCCGAGAGGGCAAAGAGAAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATT							
Konsens	CTGCAGTGATTGAGCGCTTCCGAGAGGGCAAAGAGAAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATT							
	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
DDX19	GATGTTGAACAAGTGTCTGTGTCGTCATCAACTTTGATCTTCCCGTGGACAAGGACGGGAATCCTGACAATGAGACC							
DDX19 Probe	GATGTTGAACAAGTGTCTGTGTCGTCATCAACTTTGATCTTCCCGTGGACAAGGACGGGAATCCTGACAATGAGACC							
Konsens	GATGTTGAACAAGTGTCTGTGTCGTCATCAACTTTGATCTTCCCGTGGACAAGGACGGGAATCCTGACAATGAGACC							
	2216	2230	2240	2250	2260	2270	2280	
DDX19	TACCTGCACCGGATCGGGCGCACGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCCTGGCAGTGAACATGGTGGACAGCAAG							
DDX19 Probe	TACCTGCACCGGATCGGGCGCACGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCCTGGCAGTGAACATGGTGGACAGCAAG							
Konsens	TACCTGCACCGGATCGGGCGCACGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCCTGGCAGTGAACATGGTGGACAGCAAG							
	2288	2300	2310	2320	2330	2340	2350	2360
DDX19	CACAGCATGAACATCCTGAACAGAATCCAGGAGCATTTAATAAGAAGATAGAAAGATTGGACACAGATGATTTGG							
DDX19 Probe	CACAGCATGAACATCCTGAACAGAATCCAGGAGCATTTAATAAGAAGATAGAAAGATTGGACACAGATGATTTGG							
Konsens	CACAGCATGAACATCCTGAACAGAATCCAGGAGCATTTAATAAGAAGATAGAAAGATTGGACACAGATGATTTGG							
	2364	2380	2390	2400				
DDX19	ACGAGATTGAGAAAATAGCCAACGACCCAGCTTTCTTGACAAA							
DDX19 Probe	ACGAGATTGAGAAAATAGCCAACGACCCAGCTTTCTTGACAAA							
Konsens	ACGAGATTGAGAAAATAGCCAACGACCCAGCTTTCTTGACAAA							

**Abbildung A.8:** Sequenzierung von DDX19-HaloTag - Teil 2. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz von DDX19-HaloTag. Zweite Zeile: die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: Die übereinstimmenden Aminosäuren.

	1249	1260	1270	1280	1290	1300	1310	1320
hnRNP A1	ATGTCTAAGTCAGAGTCTCCTAAAGAGCCCGAACAGCTGAGGAAGCTCTTCATTGGAGGGTTGAGCTTTGAAACA							
hnRNP A1 Probe	ATGTCTAAGTCAGAGTCTCCTAAAGAGCCCGAACAGCTGAGGAAGCTCTTCATTGGAGGGTTGAGCTTTGAAACA							
Konsens	ATGTCTAAGTCAGAGTCTCCTAAAGAGCCCGAACAGCTGAGGAAGCTCTTCATTGGAGGGTTGAGCTTTGAAACA							
	1324	1340	1350	1360	1370	1380	1390	
hnRNP A1	ACTGATGAGAGCCTGAGGAGCCATTTTGAGCAATGGGGAACGCTCACGGACTGTGTGGTAATGAGAGATCCAAA							
hnRNP A1 Probe	ACTGATGAGAGCCTGAGGAGCCATTTTGAGCAATGGGGAACGCTCACGGACTGTGTGGTAATGAGAGATCCAAA							
Konsens	ACTGATGAGAGCCTGAGGAGCCATTTTGAGCAATGGGGAACGCTCACGGACTGTGTGGTAATGAGAGATCCAAA							
	1398	1410	1420	1430	1440	1450	1460	
hnRNP A1	CACCAAGCGCTCCAGGGGCTTTGGGTTTGTACATATGCCACTGTGGAGGAGGTGGATGCAGCTATGAATGCAA							
hnRNP A1 Probe	CACCAAGCGCTCCAGGGGCTTTGGGTTTGTACATATGCCACTGTGGAGGAGGTGGATGCAGCTATGAATGCAA							
Konsens	CACCAAGCGCTCCAGGGGCTTTGGGTTTGTACATATGCCACTGTGGAGGAGGTGGATGCAGCTATGAATGCAA							
	1472	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
hnRNP A1	GGCCACACAAGGTGGATGGAAGAGTTGTGGAACCAAGAGAGCTGTCTCCAGAGAAGATTCTCAAAGACCAGG							
hnRNP A1 Probe	GGCCACACAAGGTGGATGGAAGAGTTGTGGAACCAAGAGAGCTGTCTCCAGAGAAGATTCTCAAAGACCAGG							
Konsens	GGCCACACAAGGTGGATGGAAGAGTTGTGGAACCAAGAGAGCTGTCTCCAGAGAAGATTCTCAAAGACCAGG							
	1545	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1617
hnRNP A1	TGCCCACTTAACTGTGAAAAAGATATTTGTTGGTGGCATTAAAGAAGACACTGAAGAACATCACCTAAGAGATTAT							
hnRNP A1 Probe	TGCCCACTTAACTGTGAAAAAGATATTTGTTGGTGGCATTAAAGAAGACACTGAAGAACATCACCTAAGAGATTAT							
Konsens	TGCCCACTTAACTGTGAAAAAGATATTTGTTGGTGGCATTAAAGAAGACACTGAAGAACATCACCTAAGAGATTAT							
	1621	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690
hnRNP A1	TTTGAACAGTATGAAAAAATTGAAGTGATTGAAATCATGACTGACCGAGGCAGTGCCAAGAAAAGGGGCTTTGCC							
hnRNP A1 Probe	TTTGAACAGTATGAAAAAATTGAAGTGATTGAAATCATGACTGACCGAGGCAGTGCCAAGAAAAGGGGCTTTGCC							
Konsens	TTTGAACAGTATGAAAAAATTGAAGTGATTGAAATCATGACTGACCGAGGCAGTGCCAAGAAAAGGGGCTTTGCC							
	1696	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770
hnRNP A1	TTTGTAAACCTTTGACGACCATGACTCCGTGGATAAGATTGTCATTGAGAAATACCATACTGTGAATGGCCACAACCTG							
hnRNP A1 Probe	TTTGTAAACCTTTGACGACCATGACTCCGTGGATAAGATTGTCATTGAGAAATACCATACTGTGAATGGCCACAACCTG							
Konsens	TTTGTAAACCTTTGACGACCATGACTCCGTGGATAAGATTGTCATTGAGAAATACCATACTGTGAATGGCCACAACCTG							
	1777	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1848
hnRNP A1	TGAAGTTAGAAAAAGCCCTGTCAAAGCAAGAGATGGCTAGTGCTTCATCCAGCCAAAGAGGTCGAAAGTGGTTCTGG							
hnRNP A1 Probe	TGAAGTTAGAAAAAGCCCTGTCAAAGCAAGAGATGGCTAGTGCTTCATCCAGCCAAAGAGGTCGAAAGTGGTTCTGG							
Konsens	TGAAGTTAGAAAAAGCCCTGTCAAAGCAAGAGATGGCTAGTGCTTCATCCAGCCAAAGAGGTCGAAAGTGGTTCTGG							
	1852	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920
hnRNP A1	AAACTTTGGTGGTGGTCGTGGAGGTGGTTTCGGTGGGAATGACAACCTTCGGTCTGGAGGAAACTTCAGTGGTC							
hnRNP A1 Probe	AAACTTTGGTGGTGGTCGTGGAGGTGGTTTCGGTGGGAATGACAACCTTCGGTCTGGAGGAAACTTCAGTGGTC							
Konsens	AAACTTTGGTGGTGGTCGTGGAGGTGGTTTCGGTGGGAATGACAACCTTCGGTCTGGAGGAAACTTCAGTGGTC							
	1926	1940	1950	1960	1970	1980	1990	1996
hnRNP A1	GTGGTGGCTTTGGTGGCAGCCGTGGTGGTGGTGGATATGGTGGCAGTGGGGATGGCTATAATGGATTTGGTAAT							
hnRNP A1 Probe	GTGGTGGCTTTGGTGGCAGCCGTGGTGGTGGTGGTGGATATGGTGGCAGTGGGGATGGCTATAATGGATTTGGTAAT							
Konsens	GTGGTGGCTTTGGTGGCAGCCGTGGTGGTGGTGGTGGATATGGTGGCAGTGGGGATGGCTATAATGGATTTGGTAAT							
	2000							
hnRNP A1	GATGG							
hnRNP A1 Probe	GATGG							
Konsens	GATGG							

**Abbildung A.9:** Sequenzierung von hnRNP A1-SnapTag. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz von hnRNP A1-SnapTag. Zweite Zeile: die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: die übereinstimmenden Aminosäuren.

	711	720	730	740	750
NLS <sup>DDX19</sup>	CACCGGATCGGGCGCACGGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCTGG				
NLS <sup>DDX19</sup> Probe	CACCGGATCGGGCGCACGGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCTGG				
Konsens	CACCGGATCGGGCGCACGGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCTGG				

**Abbildung A.10:** Die Sequenzierung der Aminosäuresequenz 425-436 von DDX19. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz der Aminosäuren 425 - 436 von DDX19. Zweite Zeile: Die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: die übereinstimmenden Aminosäuren

	711	720	730	740	750
NLS <sup>DDX19</sup>	CACCGGATCGGGCGCACGGGCCGCTTTGGCAAGAGGGGCTGG				
mutierte NLS <sup>DDX19</sup>	CACGCGATCGGGGCCACGGGCCGCTTTGGCGCAGCTGGCTGG				
mutierte NLS <sup>DDX19</sup> Probe	CACGCGATCGGGGCCACGGGCCGCTTTGGCGCAGCTGGCTGG				
Konsens	CACGCGATCGGGGCCACGGGCCGCTTTGGCGCAGCTGGCTGG				

**Abbildung A.11:** Die Sequenzierung der Aminosäuresequenz 425-436 von DDX19, bei der die Arginine gegen Alanine substituiert wurden. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz der Aminosäuren 425 - 436 von DDX19. Zweite Zeile: Die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: die übereinstimmenden Aminosäuren. Nicht übereinstimmende Aminosäuren sind blau markiert.

	711	720	730	740
NLS <sup>SV40</sup>	CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACCCCTAA			
NLS <sup>SV40</sup> Probe	CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACCCCTAA			
Konsens	CCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGAGGACCCCTAA			

**Abbildung A.12:** Die Sequenzierung der NLS des großen T-Antigens von SV40. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz der NLS des großen T-Antigens von SV40. Zweite Zeile: Die in der Probe ermittelte Basensequenz. Dritte Zeile: die übereinstimmenden Aminosäuren.

	711	720	730	740
NLS <sup>SV40</sup>	CCC	AAGAAGAAG	CGGAAG	GTGGAGGACCCCTAA
mutierte NLS <sup>SV40</sup>	CCC	GCCGCTGCA	CGG	GCTGTGGAGGACCCCTAA
mutierte NLS <sup>SV40</sup> Probe	CCC	GCCGCTGCA	CGG	GCTGTGGAGGACCCCTAA
Konsens	CCCGCCGCTGCACGGGCTGTGGAGGACCCCTAA			

**Abbildung A.13:** Die Sequenzierung der NLS des großen T-Antigens von SV40, bei der die Lysine gegen Alanine substituiert wurden. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz der NLS des großen T-Antigens von SV40. Zweite Zeile: die vorgegebene Basensequenz der NLS des großen T-Antigens, bei der die Lysine gegen Alanine substituiert wurden. Dritte Zeile: die in der Probe ermittelte Basensequenz. Vierte Zeile: die mit der vorgegebenen mutierten Basensequenz (zweite Zeile) übereinstimmenden Aminosäuren. Mit der ersten Zeile nicht übereinstimmende Aminosäuren sind blau markiert.

	1376	1390	1400	1410
DDX19 <sup>NLS</sup>	CACCG	GATCGGG	CGCACGGGC	CGCTTTGGCAAGAGGGGCTGG
mutierte DDX19 <sup>NLS</sup>	CAC	GC	GATCGGG	GC
mutierte DDX19 <sup>NLS</sup> Probe	CAC	GC	GATCGGG	GC
Konsens	CACGCGATCGGGGCCACGGGCGCCTTTGGCGCAGCTGGCTGG			

**Abbildung A.14:** Ausschnitt der Sequenzierung der Aminosäuren 425 - 436 von DDX19. Erste Zeile: die vorgegebene Basensequenz der Aminosäuren 425 - 436 von DDX19. Zweite Zeile: die vorgegebene Basensequenz der Aminosäuren 425 - 436 von DDX19, in der die Arginine gegen Alanine substituiert wurden. Dritte Zeile: die in der Probe ermittelte Basensequenz. Vierte Zeile: die mit der vorgegebenen mutierten Basensequenz (zweite Zeile) übereinstimmenden Aminosäuren. Mit der ersten Zeile nicht übereinstimmenden Aminosäuren sind blau markiert.

	2319	2330	2340	2350	2360	2378
DDX19 reverse	CAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGGA	CTGGTGCTCCA				
DDX19 D223R reverse	CAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTG	CG	CTGGTGCTCCA			
DDX19 D223R Probe reverse	CAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTG	CG	CTGGTGCTCCA			
Konsens	CAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGCGCTGGTGCTCCA					

**Abbildung A.15:** Ausschnitt der *reverse* Sequenzierung der D223R-HaloTag-Mutante. Erste Zeile: Die vorgegebene Basensequenz von DDX19. Zweite Zeile: die vorgegebene Basensequenz von DDX19-D223R-HaloTag. Dritte Zeile: die in der Probe gemessene Basensequenz. Vierte Zeile: die mit der mutierten Sequenz übereinstimmenden Basenpaare. Mit der ersten Zeile nicht übereinstimmende Basen sind blau markiert.

	2441	2450	2460	2470	2480	2490	2498
DDX19 reverse	TCAAGGTGTTTGTCTGGATGAGGCTGATGTCATGATAGCCACTCAGGGCCACCAAGATCA						
DDX19 E243Q reverse	TCAAGGTGTTTGTCTGGATCAGGCTGATGTCATGATAGCCACTCAGGGCCACCAAGATCA						
DDX19 E243Q Probe reverse	TCAAGGTGTTTGTCTGGATCAGGCTGATGTCATGATAGCCACTCAGGGCCACCAAGATCA						
Konsens	CAGAAGATCAGTGAGCAGATTGTCATTGGCACCCCTGGGACTGTGCTGCGCTGGTGTCTCCA						

**Abbildung A.16:** Ausschnitt der *reverse* Sequenzierung der E243Q-HaloTag-Mutante. Erste Zeile: Die vorgegebene Basensequenz von DDX19. Zweite Zeile: die vorgegebene Basensequenz von DDX19-E243Q-HaloTag. Dritte Zeile: die in der Probe gemessene Basensequenz. Vierte Zeile: die mit der mutierten Sequenz übereinstimmenden Basenpaare. Mit der ersten Zeile nicht übereinstimmende Basen sind blau markiert.

	2868	2880	2890	2900	2910	2925
DDX19 reverse	AGAAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATTGATGTTGAACAAGTGTCTGT					
DDX19 K385E reverse	AGCAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATTGATGTTGAACAAGTGTCTGT					
DDX19 K385E Probe reverse	AGCAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATTGATGTTGAACAAGTGTCTGT					
Konsens	AGGAGGTTTTGGTGACCACCAACGTGTGTGCCCGCGGCATTGATGTTGAACAAGTGTCTGT					

**Abbildung A.17:** Ausschnitt der *reverse* Sequenzierung der K385E-HaloTag-Mutante. Erste Zeile: Die vorgegebene Basensequenz von DDX19. Zweite Zeile: die vorgegebene Basensequenz von DDX19-K385E-HaloTag. Dritte Zeile: die in der Probe gemessene Basensequenz. Vierte Zeile: die mit der mutierten Sequenz übereinstimmenden Basenpaare. Mit der ersten Zeile nicht übereinstimmende Basen sind blau markiert.



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Abbildung 1-1 . . . . .	7
1.2	Abbildung 1-2 . . . . .	9
1.3	Abbildung 1-3 . . . . .	9
1.4	Abbildung 1-4 . . . . .	10
3.1	Abbildung 3-1 . . . . .	22
3.2	Abbildung 3-2 . . . . .	30
3.3	Abbildung 3-3 . . . . .	35
3.4	Abbildung 3-4 . . . . .	37
4.1	Abbildung 4-1 . . . . .	47
4.2	Abbildung 4-2 . . . . .	48
4.3	Abbildung 4-3 . . . . .	49
4.4	Abbildung 4-4 . . . . .	51
4.5	Abbildung 4-5 . . . . .	51
4.6	Abbildung 4-6 . . . . .	52
4.7	Abbildung 4-7 . . . . .	54
4.8	Abbildung 4-8 . . . . .	55
4.9	Abbildung 4-9 . . . . .	56
4.10	Abbildung 4-10 . . . . .	57
4.11	Abbildung 4-11 . . . . .	59
4.12	Abbildung 4-12 . . . . .	61
4.13	Abbildung 4-13 . . . . .	63
4.14	Abbildung 4-14 . . . . .	63
4.15	Abbildung 4-15 . . . . .	64
4.16	Abbildung 4-16 . . . . .	64
4.17	Abbildung 4-17 . . . . .	66
4.18	Abbildung 4-18 . . . . .	67
5.1	Abbildung 5-1 . . . . .	70

5.2	Abbildung 5-2 . . . . .	72
5.3	Abbildung 5-3 . . . . .	73
5.4	Abbildung 5-4 . . . . .	74
5.5	Abbildung 5-5 . . . . .	76
5.6	Abbildung 5-6 . . . . .	77
A.1	Abbildung A-1 . . . . .	97
A.2	Abbildung A-2 . . . . .	97
A.3	Abbildung A-3 . . . . .	98
A.4	Abbildung A-4 . . . . .	98
A.5	Abbildung A-5 . . . . .	99
A.6	Abbildung A-6 . . . . .	99
A.7	Abbildung A-7 . . . . .	100
A.8	Abbildung A-8 . . . . .	101
A.9	Abbildung A-9 . . . . .	102
A.10	Abbildung A-10 . . . . .	103
A.11	Abbildung A-11 . . . . .	103
A.12	Abbildung A-12 . . . . .	103
A.13	Abbildung A-13 . . . . .	104
A.14	Abbildung A-14 . . . . .	104
A.15	Abbildung A-15 . . . . .	104
A.16	Abbildung A-16 . . . . .	105
A.17	Abbildung A-17 . . . . .	105

# Tabellenverzeichnis

2.1	Chemikalienliste . . . . .	15
2.2	Verwendete Ausgangsplasmide. . . . .	16
2.3	Verwendete Primer. . . . .	17
2.4	Verwendete Enzyme. . . . .	18
2.5	Transformations-Medien für DH5 $\alpha$ -Bakterien. . . . .	18
2.6	Zusammensetzung der verwendeten Puffer. . . . .	19
2.7	Zusammensetzung der verwendeten Zellmedien. . . . .	19
2.8	Spezielle Verbrauchsmaterialien. . . . .	20
2.9	Verwendete Geräte. . . . .	20
3.1	Auflistung der erstellten DDX19-Mutanten. . . . .	24
3.2	Alternative Bezeichnung der DDX19-Mutanten. . . . .	24
3.3	Auflistung der erstellten Plasmide. . . . .	25
3.4	Auflistung der erstellten Zelllinien. . . . .	27
3.5	Faltungparameter nach Savitzky <i>et al.</i> (1964). . . . .	36
3.6	Plasmide zur Untersuchung der NLS von DDX19. . . . .	42
4.1	Zusammenfassung aller kinetischer Daten aus den Kapiteln 4.2 - 4.3. . . . .	60
4.2	Subzelluläre Intensitätsverteilung der Plasmide aus Tabelle 3.6 . . . . .	66



# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden und interessanten Thema zu arbeiten. Als Doktorvater hast Du es mir ermöglicht, dass ich auch über das Fachliche hinaus an mir arbeiten und wachsen konnte - dafür möchte ich Dir sehr danken!

Das Weiterm möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Gregor Hagelüken für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken. Auch Herrn Prof. Dr. Arne Lützen und Herrn Prof. Dr. Ben Odermatt danke ich für die freundliche Teilnahme als Dritt- und Viertgutachter.

Ein großer Dank geht auch an Dr. Jan-Peter Siebrasse, der mir bei jeglichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich auch für das Korrekturlesen der Arbeit sehr bedanken. Du warst eine große Unterstützung!

Als Nächstes möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Jan Ruland bedanken, der immer zur Hilfe war, wenn es mal zu Problemen am Mikroskop kam. Auch die zahlreichen fachlichen Diskussionen mit Dir waren von unschätzbarem Wert. Es war toll dich als Bürokollegen zu haben.

Ich möchte mich auch bei Sabine Wirts für Ihre tatkräftige Unterstützung beim Klonieren und den Zellkulturarbeiten herzlichst bedanken. Du hattest immer ein offenes Ohr für meine Probleme und konntest mir immer weiterhelfen, vielen Dank!

Mein Dank gilt ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe für das angenehme und entspannte Arbeitsklima und die zahlreichen fachlichen Gespräche. Ich habe mich bei Euch sehr wohl gefühlt und es war mir immer eine Freude, zur Arbeit zu kommen. Ihr habt maßgeblich dazu beigetragen, dass meine Promotionszeit eine schöne Zeit war!

Als Nächstes möchte ich meinen Eltern danken, die immer an mich geglaubt haben und für Ihre ständige Unterstützung. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Auch möchte ich mich bei meinem Bruder Christoph für das Korrekturlesen der Arbeit sowie die ständige Unterstützung außerhalb der Arbeit bedanken!

Außerdem möchte ich meinen besten Freunden Deniz, Frederic und Kevin von ganzem Herzen für die immerwährende Unterstützung in Form von Spieleabenden, Unternehmungen oder einfachen Gesprächen bedanken! Ihr habt mich in schwierigen Zeiten immer zum Lächeln gebracht.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin Ronja bedanken. Dafür, dass Du immer an mich geglaubt hast und mir in schwierigen Zeiten Mut und Zuversicht gegeben hast! Ich weiß, dass ich mich immer auf Dich verlassen kann. Es ist schön, Dich an meiner Seite zu haben!

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht habe. Ich habe keine früheren Promotionsversuche unternommen und die Dissertation ist in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde im In- oder Ausland eingereicht worden. Ich habe keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- oder Beratungsstellen, für die Anfertigung der eingereichten Dissertation und/oder die Möglichkeit zur Promotion in Anspruch genommen.

Bonn, \_\_\_\_\_

(Datum)

\_\_\_\_\_

(Vidura Lawrance Liyanage)