

**Mobilität endogener mRNA im chromatinfreien
Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von
*Chironomus tentans***

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

vorgelegt von
Roman Veith
aus
Remagen

Bonn, Mai 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel

Tag der Promotion: 20.07.2011

Erscheinungsjahr: 2011

*Für
meine Mutter und meinen Vater
Fabian
und
Susanne*

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Die intranukleäre mRNP-Mobilität	5
1.2 Die Speicheldrüsenzellkerne von <i>Chironomus tentans</i> als Modellsystem	14
1.3 Motivation und offene Fragestellungen	23
2 Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Medien und Puffer	27
2.1.2.1 Medien	27
2.1.2.2 Puffer	27
2.1.3 Sonstiges Verbrauchsmaterial	27
2.1.4 Oligonukleotide und Molecular Beacons	27
2.1.5 Aminodextran	28
2.1.6 Actinomycin D	29
2.1.7 hrp65-Peptide	29
2.2 Methoden	31
2.2.1 <i>Chironomus tentans</i> -Aufzucht	31
2.2.2 Speicheldrüsenpräparation	31
2.2.3 Zellkultur und Lebendzellmessungen	33
2.2.4 Mikroinjektion	33
2.2.5 Fluorescence Recovery After Photobleaching	34
2.2.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	37

2.2.7	Fluoreszenz-Videomikroskopie	39
2.2.8	Einzelpartikeltracking	41
2.2.9	Trajektorienanalyse	42
2.2.9.1	Sprungweitenhistogramme	42
2.2.9.2	Das mittlere Verschiebungsquadrat	43
2.2.9.3	Monte Carlo Simulation: Diffusion mit mehreren Komponenten	45
2.2.9.4	Die diskontinuierliche Partikeldiffusion	46
2.2.9.5	Die Ermittlung von Bindungsgleichgewichtskonstanten	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Die Charakterisierung der Bindungsanalyse	51
3.2	Der Einfluss der Lokalisierungsungenauigkeit auf die Sprungweitenverteilung	54
3.3	Die nukleoplasmatische Viskosität im Speicheldrüsenzellkern	60
3.3.1	FRAP-Messungen mit FITC-Dextran	60
3.4	Die BR2.1 mRNP-Mobilität im Nukleoplasma	65
3.4.1	<i>In-situ</i> -Markierung und Markierungsgrad	65
3.4.2	Einzelmolekülmikroskopie mit RNA-Oligonukleotiden	67
3.4.3	Die BR2.1 mRNPs zeigen eine diskontinuierliche Bewegung	71
3.4.4	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit RNA-Oligonukleotiden	73
3.4.5	Einzelmolekülmikroskopie mit RNA-Molecular Beacons	75
3.5	Das Nukleoplasma enthält ausgedehnte Nichtchromatinstrukturen	78
3.5.1	Eine vergleichende MSD-Analyse in <i>C. tentans</i> - und Säugerzellen	78
3.5.2	Zum Ursprung der beiden Hauptmobilitätskomponenten	81
3.6	Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität	85
3.6.1	Inkubation in Hämolymphe	85
3.6.2	Inkubation in Hämolymphe und Actinomycin D	87
3.6.3	Der Effekt von hrp65-1-Peptiden	89
3.6.3.1	Inkubation in Hämolymphe und hrp65-1-CTS	90
3.6.3.2	Inkubation in Hämolymphe und hrp65-PBD	92
3.6.4	Die Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität: Ein Überblick	94

4 Diskussion	95
4.1 Die komplexe Mobilität der BR2.1 mRNPs	96
4.2 Hinweise auf nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen	98
4.3 Die BR2.1 mRNP-Mobilität im strukturierten Nukleoplasma	101
4.4 Die Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität	105
4.5 Ein zusammenfassendes Mobilitätsmodell	106
4.6 Das Mobilitätsmodell im Kontext aktueller Publikationen	108
4.7 Fazit und Ausblick	112
Literaturverzeichnis	113
Abbildungsverzeichnis	121
Tabellenverzeichnis	123
Abkürzungsverzeichnis	125
Anhang	127
A Liste wissenschaftlicher Beiträge	127
A.1 Publikationen - Zeitschriftenbeiträge	127
A.2 Publikationen - Buchartikel	127
A.3 Eigene Vorträge (Auswahl)	128
A.4 Eigene Poster	128
Danksagung	130

Zusammenfassung

In eukaryotischen Zellen ist fast die gesamte genetische Information in Form chromosomaler DNA im Zellkern gespeichert, während die molekulare Maschinerie zur Translation ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist. Der Transport der genetischen Information aus dem Kern in das Cytoplasma ist einer der wichtigsten Transportprozesse in eukaryotischen Zellen. Er erfolgt mittels sog. *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNPs), die aus der eigentlichen mRNA sowie verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sind. Die Dynamik der intranukleären mRNP-Bewegung ist komplex und wird in Säugerzellkernen maßgeblich durch das entfaltete Chromatin beeinflusst. Die spezifischen Wechselwirkungen, bedingt durch die nukleäre Prozessierung der mRNPs, werden in Säugerzellkernen durch die unspezifischen Interaktionen mit dem entfalten Chromatin verdeckt. Die spezifischen Wechselwirkungen sichtbar zu machen und ihre Kinetik zu analysieren, ist jedoch eine Grundvoraussetzung, um Bindungspartner zu identifizieren und die komplexe mRNP-Prozessierung zu verstehen.

In dieser Arbeit wurde die Mobilität endogener BR2.1 mRNPs in den Speicheldrüsenzellkernen von *Chironomus tentans* untersucht. In diesen Zellkernen liegt die DNA auch in der Interphase kondensiert vor, in Form so genannter Polytäanchromosomen. Hieraus resultieren weite Zellkernbereiche, die *frei* von dem in Säugerzellen strukturbestimmenden Chromatin sind. Die Mobilität der BR2.1 mRNPs hängt hier nur noch von der Organisation des Nukleoplasmas ab, was die Möglichkeit eröffnet, selektiv nur chromatinunabhängige Wechselwirkungen der BR2.1 mRNPs zu analysieren.

Die nukleäre Diffusion fluoreszenzmarkierter BR2.1 mRNPs wurde mit modernen mikroskopischen Methoden wie Einzelpartikeltracking, FCS und FRAP *in vivo* mit einer Zeitaufösung im Millisekundenbereich untersucht. Bemerkenswerterweise zeigen die BR2.1 mRNPs auch in Abwesenheit von Chromatinbarrieren eine komplexe Mobilität. Es konnten zwei Mobilitätskomponenten der BR2.1 mRNPs mit Diffusionskoeffizienten von $0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ identifiziert werden.

Durch den Vergleich der Mobilität von Dextranmolekülen in Säugerzellkernen mit der in Speicheldrüsenzellkernen konnten in letzteren Nichtchromatinstrukturen im Nukleoplasma nachgewiesen werden, welche die Mobilität sowohl von mRNPs als auch von Dextranmolekülen beeinflussen. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Nichtchromatinstrukturen nicht nur als physikalische Barriere, sondern auch durch spezifische Wechselwirkungen eine Retardierung der BR2.1 mRNPs bewirken. Diese transienten Bindungen wurden durch das Protein hrp65 vermittelt und bewirkten auf einer Zeitskala von Millisekunden die gemessenen, scheinbaren Diffusionskoeffizienten. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte ein integriertes Modell der nukleären mRNP-Mobilität in Speicheldrüsenzellkernen aufgestellt werden, welches auch Rückschlüsse auf die mRNP-Diffusion in Säugerzellen erlaubt. Zusätzlich führt es die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zur nukleären mRNP-Mobilität in der Literatur zusammen. Somit zeigte sich, dass nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen einen wesentlichen Einfluss auf die Mobilität endogener mRNPs haben.

Kapitel 1

Einleitung

Der größte Teil der genetischen Information findet sich bei Eukaryoten im Zellkern verpackt. Hier liegt die DNA, abhängig von der Information welche auf ihren einzelnen Abschnitten - den Genen - gespeichert ist, in verschiedenen Faltungszuständen vor. Die DNA fungiert als Speichermedium, das fast sämtliche Informationen enthält, die eine Zelle zu Wachstum und Vermehrung braucht. Der größte Teil der zellulären Stoffwechselfabrikation hingegen befindet sich im Cytoplasma, welches den Zellkern umgibt. Im Cytoplasma werden sämtliche Proteine und Enzyme synthetisiert, prozessiert und sortiert, die den Aufbau der Zelle funktionell und strukturell möglich machen. Die Verknüpfung des Informationsspeichers DNA, der praktisch alle Baupläne für Enzyme und Proteine enthält, mit den Proteinsynthesefabriken im Cytoplasma, ist einer der wichtigsten Stoffwechselwege in eukaryotischen Zellen.

Die räumliche Trennung von DNA im Zellkern und Ribosomen im Cytoplasma erfordert Überträgermoleküle, welche die genetische Information, ausgehend vom jeweiligen DNA-Abschnitt im Zellkern, in das Cytoplasma zu den Ribosomen transportieren. Diese Moleküle nennt man mRNAs (engl. *messenger RNAs*). Ihre Entstehung an der Transkriptionsstelle eines Gens und ihr Transport durch das Nukleoplasma zur Kernpore sind in ein kompliziertes Netzwerk von Regelungs- und Rückkopplungsschritten eingebunden [Maniatis and Reed, 2002]. Lange bevor die ersten zeitlich hochaufgelösten Aufnahmen zur mRNA-Mobilität im Zellkern zur Verfügung standen, war durch biochemische Untersuchungen bekannt, dass die Transkription und die Prozessierung der mRNA ein komplexer und hoch regulierter Prozess mit unzähligen Einzelschritten ist [Hager et al., 2009]. Diese Schritte laufen zum Teil lokal an der Transkriptionsstelle ab, verlagern sich im späteren Verlauf jedoch zunehmend in andere nukleoplasmatische Bereiche [Aguilera, 2005, Moore, 2005, Luna et al., 2008]. Schon während der Transkription lagern sich Packungs- und Regulationsproteine an das wachsende mRNA-Molekül an. Der dabei gebildete Protein-mRNA-Komplex wird mRNP (engl. *messenger ribonucleoprotein particle*) genannt und stellt die Grundtransportform der mRNA-Moleküle im Zellkern dar. Eine Vielzahl solcher Verpackungsproteine ist bekannt, die wichtige regulatorische Funktionen beim mRNP-Transport ausüben [Dreyfuss et al., 2002, Daneholt, 2001a]. Wo und wie die fertig transkribierte mRNA im Nukleoplasma prozessiert und in eine exportkompetente Form gebracht wird, welche den Kern durch die Kernporen verlassen kann, ist noch immer nicht geklärt. Die Kinetik dieser Prozesse zu visualisieren ist eine Grund-

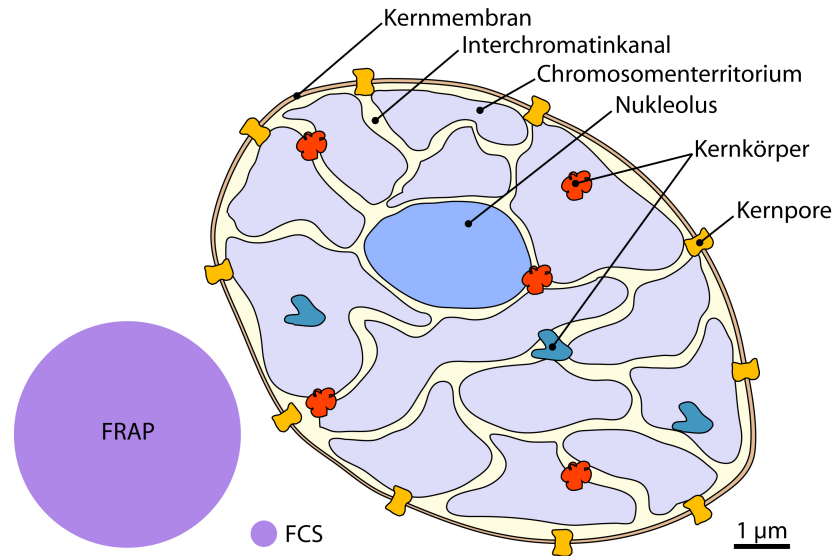


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Säugerzellkerns. Wichtige Strukturen sind gekennzeichnet und werden im Text näher erläutert. Ein Säugerzellkern hat einen Durchmesser von ca. 10-15 µm. Relativ zum Kern sind links der xy -Durchmesser sowohl eines typischen FRAP-Bleichbereichs als auch eines FCS-Fokus eingezeichnet. Während FRAP die globale Mobilität nukleärer Makromoleküle abbildet, zeigt FCS auch die lokale Mobilität im Bereich der Interchromatinkanäle. Verändert nach [Lanctôt et al., 2007].

voraussetzung um sie zu verstehen.

Abbildung 1.1 zeigt die schematische Darstellung eines Säugerzellkerns. Der Zellkern ist von einer Kernmembran umschlossen, in welcher die Kernporen den streng regulierten Austausch zellulärer Substanzen zwischen Kern und Cytoplasma ermöglichen [Köhler and Hurt, 2007]. In einer wässrigen, proteinreichen Grundsubstanz, dem Nukleoplasma, liegt das entfaltete Chromatin in Form von relativ dichten Chromosomenterritorien vor, die von Interchromatinkanälen durchzogen sind [Cremer et al., 2006, Cremer and Cremer, 2010]. In diesen Interchromatinkanälen, so wird vermutet, findet der größte Teil des intranukleären Stofftransports statt. Der Nukleolus stellt als Syntheseort der Ribosomenuntereinheiten ein besonders auffälliges nukleäres Kompartiment dar. Verschiedenste Kernkörper (engl. *nuclear bodies*) unterschiedlicher Größe sind vermutlich an der Prozessierung der mRNA-Moleküle und der Regelung der strukturellen Integrität des Kerns beteiligt [Spector, 2006]. Damit stellt sich der Säugerzellkern als im höchsten Maße inhomogen dar, was insbesondere bei der Interpretation der mit verschiedenen mikroskopischen Techniken ermittelten Diffusionskoeffizienten nukleärer Makromoleküle berücksichtigt werden muss.

Das Verständnis der Kinetik der mRNA-Prozessierung erfordert die Beobachtung der nukleoplasmatischen mRNP-Bewegung mit zeitlich und räumlich hochauflösenden mikroskopischen Methoden und die Verknüpfung der daraus gewonnenen Daten mit den Zusammenhängen, die bereits aus *in vitro*-Messungen bekannt sind. Fragestellungen wie:

- Welche Bewegungsformen zeigen nukleoplasmatische mRNP-Partikel?
- Existiert ein gerichteter Transport nukleärer mRNPs, ähnlich dem im Cytoplasma, entlang des Cytoskeletts?

- Existieren nukleoplasmatische Bindungen der mRNPs, hervorgerufen z.B. durch Prozessierungsschritte?
- Wie wirkt sich das strukturbestimmende Chromatin auf die mRNP-Bewegung aus?
- Können spezifische Bindungen (z.B. durch mRNP-Prozessierung) von unspezifischen (z.B. durch Hindernisse) unterschieden werden?

warten zum Großteil auch heute noch auf eine Antwort. Die Versuche, sie zu beantworten, haben eine neue, dynamische Sichtweise des Zellkerns eingeläutet [Gorski et al., 2006, Pederson, 2010]. Den Transport der mRNA-Moleküle vom Ort der Transkription bis hin zur Ribosomenbindung im Cytoplasma in Echtzeit zu verfolgen stellt höchste Ansprüche an das bildgebende mikroskopische Equipment und gelang erst in den letzten Jahren [Tyagi, 2009]. Die geringe Größe eines typischen Säugerzellkerns (Durchmesser 10 μm) gepaart mit einer hohen Dichte von unterschiedlichsten Proteinen und Nukleinsäuren erfordert einerseits räumlich hochauflösende Mikroskopietechniken, andererseits aber auch Techniken, die in der Lage sind schnelle Prozesse im Millisekundenbereich abzubilden. Solche Techniken, wie die Einzelmolekülmikroskopie, stehen heute zur Verfügung und können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des nukleoplasmatischen mRNA-Transports liefern [Kubitscheck et al., 2009].

Endogene mRNA-Moleküle spezifisch zu markieren und ihren nukleoplasmatischen Transport *in vivo* und in Echtzeit zu analysieren war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit. Dazu wurde ein bisher kaum genutztes, aber besonders geeignetes biologisches System mit Einzelmolekülmikroskopietechniken analysiert. Diese innovative Kombination barg das Potential die Dynamik des nukleären mRNP-Transports in einer bisher nicht erreichten räumlichen und zeitlichen Auflösung zu studieren.

Im Folgenden werden die wichtigsten Arbeiten zum nukleoplasmatischen mRNA-Transport der letzten Jahre zusammengefasst, um die aktuell offenen Fragen herauszuarbeiten. Im Anschluss daran werden das hier untersuchte System und abschließend die ganz konkreten Fragestellungen vorgestellt, zu deren Beantwortung diese Arbeit einen Beitrag leisten soll.

1.1 Die intranukläre mRNP-Mobilität

Zur kinetischen Untersuchung der nukleären Mobilität von mRNPs wurden bis heute hauptsächlich Techniken wie Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS, siehe Kap. 2.2.6), Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP, siehe Kap. 2.2.5), Photoactivation-Mikroskopie (siehe unten) und Einzelpartikeltracking (SPT, siehe Kap. 2.2.7 bzw. 2.2.8) genutzt. Um die in den einzelnen Publikationen z.T. sehr stark voneinander differierenden Diffusionskoeffizienten vernünftig beurteilen zu können sind einige technische Vorbemerkungen notwendig.

Die oben genannten Methoden unterscheiden sich einerseits hinsichtlich ihrer zeitlichen andererseits aber auch hinsichtlich ihrer räumlichen Auflösung. Es wird heute angenommen, dass sich die Zellkernstruktur auf verschiedenen räumlichen Größenordnungen unterschiedlich auf den Diffusionskoeffizienten nukleärer Makromoleküle wie auch der mRNPs auswirkt [Politz et al., 1999,

Wachsmuth et al., 2008, Veith et al., 2010]. Dies liegt daran, dass Chromatin und nukleäre Körper den Zellkern nicht vollkommen homogen ausfüllen (siehe Abb. 1.1). So weiß man heute, dass Kompartimente mit einer Größe im Bereich weniger hundert Nanometer, wie beispielsweise das Innere eines Interchromatinkanals, die Viskosität einer proteinreichen, wässrigen Lösung aufweisen und die Größenordnung der *lokalen* Diffusion beeinflussen [Cremer and Cremer, 2010]. In diesen Domänen - so die aktuelle Vorstellung - diffundieren nukleäre Makromoleküle weitestgehend frei, was sich entsprechend in *lokal* hohen Diffusionskoeffizienten äußert. Strukturen, welche sich über mehrere Mikrometer erstrecken, wie beispielsweise das entfaltete Chromatin, stellen vermutlich Hindernisse für die Partikeldiffusion über größere räumliche Skalen dar. Die Interchromatinkanäle sind im Säugerzellkern durch das entfaltete Chromatin stark verzweigt (siehe Abb. 1.1) und verlangsamen dadurch die *globale* Diffusion nukleärer Makromoleküle über Wegstrecken von mehreren Mikrometern [Saxton, 2007, Saxton, 2008]. Entsprechend werden für Diffusionsstrecken im Bereich einiger Mikrometer reduzierte *globale* Diffusionskoeffizienten ermittelt. Der Bereich des Übergangs von lokaler zu globaler Diffusion hängt von der Dichte des entfalteten Chromatins und dem Grad der Verzweigung der Interchromatinkanäle ab und ist nur schwer allgemeingültig zu quantifizieren. Es ist jedoch davon auszugehen, dass umso eher die lokale Diffusion in Interchromatinkanälen abgebildet wird, je kürzer die untersuchten Diffusionsstrecken sind (siehe unten). Zusätzlich zu den *unspezifischen* Hindernissen des entfalteten Chromatins im Säugerzellkern können auch Retardierungen durch *spezifische* Bindungen auftreten, die beispielsweise mit der Prozessierung der untersuchten Makromoleküle zusammenhängen. Diese spezifischen Bindungen sind jedoch im Säugerzellkern nur schwierig von den unspezifischen zu unterscheiden.

Daher sind die Ergebnisse, die mit den unterschiedlichen oben genannten Techniken erhalten wurden insbesondere im Hinblick auf die strukturelle Größenordnung des Zellkerns zu interpretieren, die durch sie abgebildet wird. Dies wurde in der Literatur nicht immer berücksichtigt und führte teilweise zu scheinbar widersprüchlichen Werten (siehe Diskussion).

Bei einer FRAP-Analyse werden typischerweise Kernbereiche von $\gg 1 \mu\text{m}$ Durchmesser geblichen, gefolgt von einer Analyse der Fluoreszenzrückkehr (siehe Kapitel 2.2.5 und Abbildung 1.1, FRAP). Umgekehrt wurden bei der hier vorgestellten Variante der Photoactivation-Mikroskopie fluoreszenzmarkierte mRNAs im Bereich von $\gg 1 \mu\text{m}$ aktiviert und die zeitliche Verteilung des Signals im Zellkern wurde verfolgt. Damit liefern sowohl FRAP als auch die Photoactivation-Mikroskopie Daten zur nukleären Diffusion, die über räumliche Bereiche von mehreren Mikrometern gemittelt sind. Entsprechend werden mit diesen Techniken *globale* Diffusionskoeffizienten ermittelt, die im Säugerzellkern maßgeblich durch das verzweigte Netzwerk von Interchromatinkanälen beeinflusst werden. Zudem kann ihre Zeitauflösung im Sekundenbereich schnelle kinetische Prozesse nicht direkt abbilden und erfordert komplexe Modelle, um Rückschlüsse auf schnellere Prozesse zu erhalten [Braga et al., 2007].

FCS hingegen, mit einer Zeitauflösung im Mikrosekundenbereich, ist im Vergleich dazu eine sehr schnelle Technik und liefert Diffusionsdaten zu Kernbereichen, die nur einige hundert Nanometer groß sind. Damit werden in FCS-Analysen eher *lokale* Diffusionskoeffizienten ermittelt, die Informationen zur Diffusion in Interchromatinkanälen liefern können - sofern Interchromatinkanäle zumindest teilweise im FCS-Fokus liegen (siehe Abbildung 1.1, FCS). Da das FCS-Volumen ty-

pischerweise Abmessungen von 300 nm (xy-Ausdehnung) mal 1000 nm (z-Ausdehnung) aufweist (siehe Kapitel 2.2.6), ist es sehr wahrscheinlich, dass durch die hohe z-Ausdehnung Interchromatinkanäle im FCS-Fokus liegen.

Die Zeitauflösung des Einzelpartikeltrackings hängt im hohen Maße von der verwendeten Ausrüstung ab und liegt bei hochwertigen Kameras im Millisekundenbereich. Das Einzelpartikeltracking liefert durch eine Vereinzelnung der Signale Daten mit hoher räumlicher Auflösung, die durch Nanolokalisierung im Bereich von 50 nm liegen kann. Durch die Visualisierung einzelner Signale nimmt das Einzelpartikeltracking eine Sonderstellung unter den hier besprochenen Techniken ein und liefert Informationen zu einzelnen mRNP-Trajektorien, die unabhängig voneinander analysiert werden können. Damit ermöglicht das Einzelpartikeltracking eine tiefgreifende Analyse der Kinetik von Bindungsprozessen im Zellkern [Dange et al., 2011]. Auch können hier die kinetischen Prozesse auf mehreren Größenordnungen der Kernstruktur visualisiert werden. Prinzipiell sind bei hoher Zeitauflösung im Millisekundenbereich lokale Diffusionskoeffizienten zugänglich, da die Partikelbewegung im Bereich von wenigen hundert Nanometern untersucht wird. Durch nachträgliche Reduktion der Zeitauflösung (z.B. durch Mittelung) beeinflusst die Diffusion auf größeren räumlichen Skalen zunehmend den dann *globalen* Diffusionskoeffizienten. Einzelpartikeltracking schlägt also eine Brücke zwischen Techniken wie FCS und FRAP und erweitert diese gleichzeitig.

Mit Hilfe der erwähnten Techniken wurden Messungen nukleärer mRNP-Diffusion hauptsächlich in Säugerzellen durchgeführt, was aufgrund der oben beschriebenen Inhomogenität des Zellkerns die Vergleichbarkeit der erhaltenen Ergebnisse erschwert. Um Missverständnisse zu vermeiden werden deshalb einige Begriffe für den Rahmen dieser Arbeit vereinfachend wie folgt definiert:

Ein Zellkern besteht aus *Chromatin*, d.h. der DNA und der an sie gebundenen Proteine, und *Nukleoplasma*, einer wässrigen, proteinreichen Grundsubstanz, die alle Nichtchromatinstrukturen (wie z.B. Kernkörper etc.) enthält. Die *nukleäre* Diffusion von Makromolekülen bezieht sich auf die Diffusion im Kern, die von den Eigenschaften sowohl des Nukleoplasmas als auch des Chromatins beeinflusst wird, wie z.B. die globale Diffusion über Strecken von mehreren Mikrometern. Ist jedoch von einer Diffusion die Rede, die wenig oder gar nicht durch das Chromatin beeinflusst wird, also hauptsächlich die Eigenschaften des Nukleoplasmas und seiner Nichtchromatinstrukturen abbildet, so wird diese *nukleoplasmatische* Diffusion genannt - z.B. die lokale Diffusion in einem Interchromatinkanal. *Freie* bzw. *uneingeschränkte* Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten, der nach Gleichung 2.9 der Partikelgröße in Abhängigkeit der Viskosität entspricht, wird reduzierter Partikelmobilität gegenübergestellt. Letztere äußert sich in einem im Vergleich zur freien Diffusion reduzierten Diffusionskoeffizienten und/oder einem nicht-linearen MSD-Verlauf (siehe Kapitel 2.2.9.2), beispielsweise wenn die freie Diffusion durch Bindungen an nukleäre Strukturen unterbrochen wird.

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die wichtigsten bis 2008 erschienen Publikationen zur nukleären mRNP-Diffusion. Sie werden im Folgenden vorgestellt.

[Politz et al., 1998] ist die erste wichtige Publikation zum Thema mRNP-Diffusion im Zellkern. Die Autoren untersuchten die Bewegung endogener mRNP-Partikel mit Hilfe von FCS. Fluoreszenzmarkierte DNA-Oligonukleotide mit einer Poly(T)-Sequenz wurden in Säugerzellen ein-

Publikation	Technik	mRNP-Typ	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
[Politz et al., 1998]	FCS poly(T)-Oligon.	alle endogenen	9, 0.6, 0.01
[Politz et al., 1999]	Photoactivation poly(T)-Oligon.	alle endogenen	0.7
[Calapez et al., 2002]	FRAP mRNP-Proteine	alle endogenen	0.6
[Molenaar et al., 2004]	FRAP poly(U)-Oligon.	alle endogenen	0.04
[Shav-Tal et al., 2004]	SPT MS2-System	artifizieller mRNP	0.04
[Vargas et al., 2005]	SPT MB-Oligon.	artifizieller mRNP	0.03
[Politz et al., 2006]	FCS poly(T)-Oligon.	alle endogenen	0.7
[Siebrasse et al., 2008]	SPT DNA-Oligon.	endogener mRNP (BR2.1 mRNP)	3.7, 0.6, 0.2, (0.015)

Tabelle 1.1: Wichtige Publikationen zur nukleären mRNP-Diffusion bis 2008. Blau, Studien zur Diffusion endogener mRNPs. Unter Technik sind die jeweilige Mikroskopiemethode sowie die Methode zur Markierung der mRNPs aufgeführt. Ergebnisse z.T. gerundet. Oligon., Oligonukleotide.

gebracht. Da prozessierte mRNA-Moleküle nach Abschluss der Transkription einen Poly(A)-Schwanz aufweisen, konnten von der Zelle aufgenommene und in den Kern diffundierte Poly(T)-Oligonukleotide potentiell sämtliche endogenen mRNP-Partikel markieren. Es wurden Mobilitäten auf mehreren zeitlichen Skalen von 0.1 bis > 100 ms mit 3 Diffusionskoeffizienten gefunden, die spezifisch für die Bewegung endogener mRNPs waren: $\leq 9 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (siehe Tabelle 1.1). Die Autoren betonten, dass es abhängig von der Messposition im Zellkern (zufällige Position, außer Nukleoli) zu deutlichen Variationen in der ermittelten Mobilität kam. Dies war ein deutlicher Hinweis auf die oben beschriebene lokale strukturelle Inhomogenität des Säugerzellkerns (siehe Abb. 1.1). Die ermittelten Diffusionskoeffizienten deuteten erstmals darauf hin, dass endogene mRNPs *lokal*, im Bereich eines FCS-Volumenelements mit einem Durchmesser von einigen hundert Nanometern, einerseits eine Mobilität ähnlich der in wässriger Lösung zeigen, andererseits jedoch auch deutlich retardierte Diffusionskoeffizienten aufweisen. Die retardierten Komponenten wurden als Bindungen der mRNPs an nukleäre Strukturen interpretiert. Die Diffusion freier Oligonukleotide im Zellkern entsprach ebenfalls der in wässriger Lösung. Die Autoren spekulierten, dass „wässrige Mikrodomänen“ über den gesamten Zellkern verteilt sind, die einerseits eine diffusive mRNP-Mobilität ähnlich der in wässriger Lösung ermöglichen, ande-

rerseits aber auch eine heterogene Umgebung darstellen, in welcher mRNPs in ihrer Bewegung retardiert werden können. Sie fanden damit erste kinetische Hinweise auf die wichtige Rolle der bereits *in vitro* durch Anfärbung der Chromosomenterritorien (siehe Abb. 1.1) nachgewiesenen Interchromatinkanäle beim Transport nukleärer mRNPs. Sie konnten außerdem zeigen, dass das die Interchromatinkanäle ausfüllende Nukleoplasma, als Grundsubstanz des Zellkerns, eine Viskosität ähnlich der einer wässrigen Lösung aufweist. Die molekulare Grundlage der vermuteten mRNP-Bindungen konnte nicht geklärt werden. Insbesondere blieb offen, ob es sich hierbei um spezifische, der Regulation/Prozessierung dienende Bindungen handelte, oder ob hier das ubiquitär im Kern vorhandene Chromatin als passives Hindernis in Erscheinung trat.

In einer anschließenden Studie adressierten Politz et al. die Frage, ob es im Zellkern neben der gefundenen rein diffusiven eine gerichtete mRNP-Bewegung gibt, ähnlich der Bewegung entlang cytoskelettaler Proteinfilamente [Politz et al., 1999]. Erneut wurden Poly(T)-Oligonukleotide verwendet, dieses mal jedoch mit einem aktivierbaren Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch Photolyse wurden die in den Zellkern eingebrachten Poly(T)-Oligonukleotide aktiviert und es wurde die Verteilung des Fluoreszenzsignals mit der Zeit verfolgt (Photoactivation-Mikroskopie). Die Ausbreitung des Fluoreszenzsignals zeigte eine *lineare* Zunahme des quadratisch gemittelten Abstands (MSD) mit der Zeit, was keine Hinweise auf eine gerichtete Bewegung lieferte (s. Kap. 2.2.9.2). Durch die Technik der Photoactivation-Mikroskopie wurde ein Diffusionskoeffizient von $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden, der über mehrere Mikrometer gemittelt war, also hauptsächlich die Diffusion auf größeren räumlichen Skalen - *global* - abbildete (siehe Tab. 1.1). Insofern standen die in dieser Studie erhaltenen Daten nicht im Widerspruch zu [Politz et al., 1998], sondern zeigten erstmals, dass zwischen lokaler (Interchromatinkanal-)Diffusion, die mit FCS zugänglich ist, und globaler Diffusion im verzweigten Interchromatinkanalnetz und darüber hinaus unterschieden werden muss. Es wurde außerdem keine Temperaturabhängigkeit der Mobilität im Bereich zwischen Raumtemperatur und 37°C gefunden und damit kein Hinweis auf einen direkt an der mRNP-Mobilität beteiligten energieabhängigen Prozess.

[Calapez et al., 2002] untersuchten die Diffusion fluoreszenzmarkierter Proteine, welche auch unmarkiert Bestandteil prozessierter, endogener mRNP-Partikel sind. Mit Hilfe von FRAP konnten Daten zur globalen Diffusion endogener mRNP-Partikel gewonnen werden. Ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde gefunden (siehe Tab. 1.1), wodurch die Ergebnisse von [Politz et al., 1999] bestätigt wurden. Interessanterweise fand diese Gruppe eine (über den reinen Viskositätseffekt hinausgehende) Reduktion der mRNP-Mobilität bei reduzierter Temperatur (Temperaturbereich wie bei [Politz et al., 1999]) bzw. bei ATP-Depletion, was im Gegensatz zu [Politz et al., 1999] sehr wohl auf energieabhängige Prozesse bei der mRNP-Diffusion hindeutete. Diese Prozesse, so die Spekulation der Autoren, könnten mit der Freisetzung durch das entfaltete Chromatin immobilisierter mRNPs zusammenhängen, was ebenfalls mit der Möglichkeit einer prinzipiell freien Diffusion nicht immobilisierter mRNPs in den Interchromatinkanälen zu vereinbaren war.

Bei einer weiteren Analyse endogener mRNPs wurden wiederum Oligonukleotide verwendet, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA-Moleküle binden konnten [Molenaar et al., 2004]. Diesmal wurden Poly(U)-RNA-Oligonukleotide mikroinjiziert, welche eine im Vergleich zu den DNA-

Oligonukleotiden deutlich höhere Stabilität im Zellkern, sowie eine erhöhte Bindungsaffinität an die Ziel-mRNA zeigen [Molenaar et al., 2001]. Interessanterweise lieferten die durchgeführten FRAP-Analysen deutlich von den bisher vorgestellten Studien abweichende Werte. Ein mittlerer Diffusionskoeffizient von nur $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde gefunden (siehe Tab. 1.1), der auf eine grundsätzliche Retardierung *aller* analysierten mRNPs hindeutete und somit im deutlichen Gegensatz zu den bis dahin bekannten Daten stand. Molenaar et al. führten diese Diskrepanz auf eine höhere Zuverlässigkeit ihrer RNA-Oligonukleotid-Sonde zurück. Sie untersuchten auch Poly(dT)-DNA-Oligonukleotide im Kern, die schon von [Politz et al., 1998] genutzt worden waren. Molenaar et al. kamen zu dem Schluss, dass ihre FRAP-Daten auf einen hohen Anteil *ungebundener* DNA-Oligonukleotide deuteten, was nahe legte, dass der von Politz et al. ermittelte größere mittlere Diffusionskoeffizient nicht spezifisch für mRNPs war. Ebenso kritisierten die Molenaar et al. den Ansatz von Calapez et al. Auch hier nahmen sie aufgrund ihrer Daten an, dass der größte Teil der von Calapez et al. untersuchten mRNP-bindenden Proteine nicht an mRNP-Partikel gebunden vorlag, Calapez et al. somit also vornehmlich die Diffusion freier mRNP-Proteine abbildeten. Damit betonten Molenaar et al., dass ihrer Ansicht nach die nukleäre mRNP-Bewegung *nicht* hauptsächlich diffusiv abläuft, sondern energieabhängige, die Mobilität reduzierende Prozesse (wie Bindungen) die wichtigere Rolle spielen und ihren unerwartet niedrigen Diffusionskoeffizienten erklären. Allerdings ist zu beachten, dass die Analyse von Molenaar et al. methodische Probleme aufweist, welche die ermittelten Werte sehr in Frage stellen. So lag die Bleichzeit der FRAP-Analyse hier bei 5 s, was deutlich zu lang ist im Vergleich zu den bei schneller Diffusion zu erwartenden Fluoreszenzrückkehrzeiten von nur einigen Sekunden [Braeckmans et al., 2003]. Daher ist anzunehmen, dass es für Molenaar et al. schwierig gewesen sein dürfte eine schnelle Diffusion der untersuchten mRNPs ($\geq 0.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$) *überhaupt* abbilden zu können, womit die Ergebnisse vermutlich deutlich in Richtung einer Übergewichtung retardierter mRNPs verzerrt waren. Trotz der methodischen Probleme begann mit dieser Studie in der Literatur eine Grundsatzdiskussion, ob sich mRNPs im Nukleoplasma primär frei diffundierend bewegen, mit Diffusionskoeffizienten, die ihrer Größe nach zu erwarten wären, oder ob die mRNP-Mobilität (beispielsweise durch Bindungen) ständig deutlich reduziert ist.

In einer weiteren Studie von Politz et al. zum Thema nukleäre mRNP-Diffusion nutzten die Autoren nochmals fluoreszenzmarkierte Poly(T)-Oligonukleotide um alle endogenen mRNPs anzufärben und untersuchten diese mit FCS, einerseits im von Interchromatinkanälen dominierten Nukleoplasma, andererseits auch gezielt in speziellen nukleoplasmatischen Kernkörpern (sog. *nuclear speckles*) [Politz et al., 2006]. Sie ermittelten einen nukleären Diffusionskoeffizienten von $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$, der sich nicht von dem in den Kernkörpern unterschied (siehe Tab. 1.1). Dies legte eine strukturelle Ähnlichkeit von chromatindominierten Zellkernbereichen und *speckles* nahe und war ein Hinweis darauf, dass speckles, wie möglicherweise auch die meisten anderen Kernkörper, kein abgeschlossenes nukleäres Mikrokompartment sind, sondern dynamisch in den Zellkern eingebettet vorliegen.

Interessanter im Hinblick auf die nukleäre Diffusion der mRNPs ist jedoch, dass die Autoren Zweifel daran äußerten, ob die schnellste 1998 von ihnen gefundene Komponente von $\leq 9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ spezifisch für mRNPs war. Damit nahmen sie Bezug auf die Kritik von [Molenaar et al., 2004],

nicht ohne jedoch auf Probleme in der Analyse von Molenaar et al. hinzuweisen. Politz et al. bestätigten aber noch einmal den von ihnen ermittelten *globalen* mRNP-Diffusionskoeffizienten von $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Damit blieb zu diesem Zeitpunkt eine Unvereinbarkeit der Daten von Politz et al./Calapez et al. und Molenaar et al. bestehen, die jedoch wahrscheinlich auf die Probleme in der Datenakquisition von Molenaar et al. zurückgeführt werden kann. Politz et al. fanden Diffusionskoeffizienten von 0.7 und $0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für endogene mRNPs, von denen Molenaar et al. durch eine deutlich zu lange Bleichzeit nur noch die langsamere Komponente wiederfanden.

Die Datenlage sprach zu diesem Zeitpunkt klar für die Annahme, dass sich nukleäre mRNPs lokal hauptsächlich frei diffundierend in Interchromatinkanälen bewegen können, ihr globaler Diffusionskoeffizient jedoch durch die netzartige Verzweigung dieser Transportstraßen reduziert ist. Dies wurde *qualitativ* durch zwei Studien endgültig bestätigt, welche kurz vor der Arbeit von [Politz et al., 2006] erschienen waren [Shav-Tal et al., 2004, Vargas et al., 2005]. Diese Studien untersuchten erstmals einen speziellen, aber künstlichen mRNP-Typ mit Einzelpartikeltracking. Dies war in zweierlei Hinsicht eine Neuerung, da bisher (1.) nur Gesamtpopulationen von (2.) endogenen mRNPs untersucht worden waren, was nur eine relativ allgemeine Interpretation der experimentellen Daten zuließ. Außerdem wurde erstmals Einzelpartikeltracking genutzt, eine Technik, welche die Analyse einzelner Partikeltrajektorien möglich macht und damit deutlich detailliertere Informationen zur nukleären Mobilität von mRNPs liefern konnte, als dies mit FRAP oder FCS möglich war.

In der ersten, in ihrer molekularbiologischen Methodik höchst aufwändigen Studie, versuchten die Autoren sich dem Thema mRNP-Diffusion durch eine komplett neue Vorgehensweise zu nähern, indem sie sich erstmals auf die Untersuchung eines künstlichen jedoch *spezifisch* markierten mRNP-Typs beschränkten [Shav-Tal et al., 2004]. Dies war mit Hilfe gentechnischer Methoden möglich, indem eine Genkassette, die für ein artifizielles mRNA-Molekül kodiert, stabil in den Säugerzellkern eingebracht wurde. Obwohl artifizuell, durchlief das künstliche Konstrukt alle wichtigen Stationen einer mRNA im Kern, von der Transkription am Gen, über die Prozessierung des Spleißens bis hin zum Export aus dem Kern. Der Vorteil der Methode bestand darin, dass durch geschickte Planung des Konstrukts die Ankunft der mRNA an allen wichtigen Stationen *in vivo* visualisiert werden konnten (für Details siehe auch [Janicki et al., 2004]). Nach Transkription enthielt die künstliche mRNA eine Vielzahl von Sequenzabschnitten, an welche jeweils ein (ebenfalls gentechnisch eingebrachtes) fluoreszenzmarkiertes Protein, das MS2-Protein, andocken konnte. So wurde ein hoch fluoreszenzmarkierter mRNP geschaffen, der mit Hilfe von Einzelpartikeltracking verfolgt werden konnte. Shav-Tal et al. konnten so erstmals die Bewegung *einzelner* nukleärer mRNPs primär in Interchromatinkanälen visualisieren. Zur Analyse der Trajektorien führten sie eine MSD-Analyse durch. Hier fanden die Autoren vornehmlich eine lineare Zunahme des MSDs mit der Zeit, was für eine freie Diffusion spricht. Allerdings ermittelten sie so Diffusionskoeffizienten von nur $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die künstlichen mRNPs, ein Wert der angesichts bisheriger Studien als erstaunlich niedrig anzusehen war, aber gut zu den strittigen Daten von Molenaar et al. passte (siehe Tab. 1.1). Die Einschränkungen der Trajektorienanalyse durch die Fokussierung ausschließlich auf die MSD-Analyse (siehe Kap. 2.2.9.2) und die nur geringe

Zeitauflösung des Einzelpartikeltrackings (alle 300 ms ein Bild) deutlich unter dem, was schon 2004 möglich war, hatten jedoch einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf den ermittelten Diffusionskoeffizienten. Dies aber blieb bei der Interpretation der Daten in der Literatur bis 2008 unberücksichtigt und nährt nach wie vor die Diskussion, ob sich mRNPs in nukleoplasmatischen Bereichen mit Diffusionskoeffizienten bewegen (können), die ihrer Größe entsprechen oder ob sie ständig retardiert sind (siehe Diskussion).

Diese bis heute andauernde Uneinigkeit wird auch daran liegen, dass nur ein Jahr später eine weitere Publikation erschien, welche mit einer etwas anderen Methode zu einem ganz ähnlichen Ergebnis wie Shav-Tal et al. kam [Vargas et al., 2005]. Auch hier wurde ein artifizieller mRNP untersucht, welcher jedoch nicht über an die mRNA bindende Proteine markiert wurde, sondern über spezielle fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide, sogenannte *molecular beacons* (MB-Oligonukleotide). Die Fluoreszenz dieser MB-Oligonukleotide ist nur dann anregbar, wenn sie an ein Zielmolekül, hier die mRNA, gebunden sind (siehe Erläuterung in Kapitel 3.4.5). Auch Vargas et al. ermittelten einen sehr kleinen Diffusionskoeffizienten von $0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für den von ihnen untersuchten künstlichen mRNP - ein Wert der die Daten von Shav-Tal et al. bestätigte (siehe Tab. 1.1). Allerdings nutzen Vargas et al. trotz eines neuen artifiziellen mRNPs methodisch die selbe Vorgehensweise wie Shav-Tal et al., sowohl hinsichtlich der verwendeten Zeitauflösung (300 ms), als auch hinsichtlich der Analyse (Fokussierung einzig auf die MSD-Analyse). Daher verwundert nicht, dass Vargas et al. und Shav-Tal et al. zu sehr ähnlichen Ergebnissen kamen, die jedoch nicht zuletzt durch das methodische Vorgehen bei der Datenanalyse eine Verzerrung erfahren haben (siehe Diskussion).

Nichtsdestotrotz lieferten Shav-Tal et al. und Vargas et al. erste Hinweise darauf, wie die schon vorher zum Teil gefundenen energieabhängigen Prozesse bei der nukleären mRNP-Diffusion zu erklären waren. So fanden beide Gruppen, dass energieabhängige Prozesse nur bei der *Freisetzung* der mRNPs von putativen Bindungsstellen eine Rolle spielen, womit eine wichtige Frage zur mRNP-Dynamik beantwortet werden konnte. Durch die Fokussierung beider Gruppen auf ausschließlich die MSD-Analyse blieben ihre Ergebnisse jedoch trotz der damals molekularbiologisch richtungsweisenden Methodik *analytisch* hinter den Möglichkeiten des Einzelpartikeltrackings zurück. Die Dynamik der Diffusion einzelner mRNPs wird bei der Untersuchung einzelner Trajektorien allein durch die MSD-Analyse nicht sichtbar. Insbesondere die Frage nach spezifischen nukleären Bindungen und damit die Frage nach der funktionellen Dynamik putativer Retardierungen konnte so nicht beantwortet werden.

Die erstmalige spezifische Visualisierung *einzelner* künstlicher mRNPs stellte zweifelsfrei einen Meilenstein in der Analyse nukleärer mRNA-Mobilität dar, barg sie doch das *Potenzial* in sich die Dynamik einzelner mRNPs auf ihrem Weg durch den Zellkern in einem bis dato nicht erreichten Maße aufzulösen. Obwohl kein Konsens hinsichtlich der Größenordnung der Diffusionskoeffizienten nukleärer mRNPs bestand, herrschte weitgehende Einigkeit darüber, dass die Bewegung nukleärer mRNP-Partikel ein diffusiver, nicht primär aktiver Prozess ist, welcher ungerichtet abläuft und von Retardierungen unbekannter Natur unterbrochen ist. Die meisten der bisherigen Studien legten den Schluss nahe oder konnten zeigen, dass die mRNP-Diffusion hauptsächlich in Interchromatinkanälen stattfindet, die einerseits eine wässrige Umgebung für eine putativ schnelle

lokale Partikeldiffusion schaffen, andererseits aber auch durch ihr verzweigtes Netzwerk kombiniert mit ihren kleinen Durchmessern im Bereich einiger hundert Nanometer *unspezifisch* retardierend auf die Diffusion nukleärer Makromoleküle einwirken. Die interessanteren *spezifischen* Bindungen nukleärer mRNPs, die Rückschlüsse auf zugrundeliegende molekulare Prozessierungsschritte zuließen, traten aufgrund des dominierenden Einflusses der unspezifischen Bindungen auf die nukleäre mRNP-Mobilität bisher in den Hintergrund. So gelang es in keiner der bis dahin durchgeführten Studien zu ermitteln, was die Grundlage der Retardierungen sowohl endogener als auch (mehr noch) künstlicher mRNPs war bzw. ob *spezifische* Bindungen überhaupt eine Rolle spielen. Wichtige, spezifische Bindungen von den unspezifischen, wahrscheinlich primär durch das komplexe Chromatinnetzwerk hervorgerufenen Retardierungen zu unterscheiden, blieb ein generelles, bisher ungelöstes Problem bei der Untersuchung nukleärer mRNP-Mobilität im Säugerzellsystem.

Ein weiterer Nachteil des Säugerzellsystems ist die Schwierigkeit, die Mobilität eines einzelnen *endogenen* mRNP-Typs zu untersuchen. Da die verschiedenen mRNAs im Säugerzellkern nur in geringen Mengen vorkommen und *in vivo* kaum spezifisch markiert werden können, gelang es bisher nicht einzelne *endogene* mRNA-Typen zu visualisieren [Björk and Wieslander, 2010]. Grundsätzlich muss zudem hinterfragt werden, ob künstlich eingebrachte, artifizielle mRNA-Konstrukte bzw. deren mRNP-Partikel Ergebnisse liefern, die uneingeschränkte Schlüsse über die Dynamik endogener mRNPs zulassen, oder ob gerade die Nutzung künstlicher, nicht perfekter mRNA-Konstrukte, ein verzerrtes Bild der nukleären mRNP-Mobilität liefert. Die in Tabelle 1.1 vorgenommene Gegenüberstellung der Diffusionskoeffizienten endogener (blau) und artifizieller mRNPs deutet aufgrund der stark unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten zumindest ein nicht zu vernachlässigendes Problem an (siehe Diskussion).

In meiner Diplomarbeit wurde erstmals ein System zur Untersuchung nukleärer mRNP-Mobilität benutzt, welches die nachteiligen Eigenschaften des Säugerzellsystems nicht aufweist. In diesem System *kann* - wie unten beschrieben - ein spezieller endogener mRNP-Typ spezifisch markiert und seine Mobilität untersucht werden. Insbesondere aber sind die passiv retardierenden Effekte des entfalten Chromatins hier aufgrund der Konzentration der DNA in Polytänchromosomen nicht vorhanden. Diese besonderen Voraussetzungen bieten die Speicheldrüsenzellkerne der Zuckmückenlarve (*Chironomus tentans*), die im folgenden Kapitel detailliert beschrieben werden. In diesen gelang es die Diffusion eines spezifischen *endogenen* mRNP-Typs in *chromatinfreien* Nukleoplasmabereichen mit Hilfe von Einzelpartikeltracking zu untersuchen, womit die mRNP-Diffusion erstmalig unabhängig von den unspezifisch retardierenden Effekten des Chromatins untersucht werden konnte [Veith, 2007].

In einer ersten Publikation, die meine Diplomarbeit und erste Teile der hier vorliegenden Dissertation einschließt, konnte mit Hilfe von Einzelpartikeltracking die Diffusion einzelner *endogener* BR2.1 mRNPs mit einer deutlich über bisherige Studien hinausgehenden Zeitauflösung von 50 ms aufgenommen werden [Siebrasse et al., 2008]. Um möglichst viele Informationen über die BR2.1 mRNP-Mobilität zu erhalten, wurden mehrere, z.T. neu entwickelte Analysemethoden parallel eingesetzt. So konnte die Bewegung einzelner endogener BR2.1 mRNPs im chromatinfreien Nukleoplasma nur mit mehreren Diffusionskoeffizienten angenähert werden: $D_I = 3.74 \mu\text{m}^2/\text{s}$, D_{II}

= $0.64 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{III} = 0.23 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_{IV} = 0.015 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Diese Diffusionskoeffizienten entsprechen einerseits dem mit 50 nm (siehe unten) genau bekannten Durchmesser der mRNPs (D_I), deuteten andererseits aber auch auf nukleoplasmatische Retardierungen hin (D_{II} , D_{III} , D_{IV} , wobei die langsamste Komponente nur zu einem verschwindend kleinen Anteil gefunden wurde und daher in der Tabelle eingeklammert ist). Damit wurde die Diskussion über die Größenordnung der nukleären mRNP-Diffusionskoeffizienten erneut entfacht. Besonders interessant war jedoch die Entdeckung, dass auch deutlich retardierte Trajektorienanteile gefunden werden konnten, obwohl nur Trajektorien in *chromatinfreien* nukleoplasmatischen Bereichen analysiert wurden. Hier deutete sich erstmals ein bisher unbekannter, hoher Einfluss chromatinunabhängiger Bindungen an, welcher im Säugerzellsystem verborgen blieb. Diese Entdeckung war nur aufgrund der einzigartigen Struktur der Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* möglich, was sie zu einem herausragenden Modellsystem zur Untersuchung der nukleoplasmatischen mRNP-Mobilität macht.

1.2 Die Speicheldrüsenzellkerne von *Chironomus tentans* als Modellsystem

Chironomus tentans (dt. Zuckmücke) gehört zu der Insektenordnung der Dipteren und ist ein enger Verwandter der bekannten Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* [Daneshmandi, 2001b]. Der komplette Lebenszyklus dauert ca. 4-6 Wochen und kann grob in 4 Stadien eingeteilt werden: Ei-, Larven- und Puppenstadium sind aquatisch, das Imagostadium nicht [Wieslander, 1994]. Die adulte weibliche Zuckmücke (siehe Abbildung 1.2 A) legt einmal in ihrem Leben einen Eistrang ins Wasser ab, welcher aus 300 bis 3000 Einzeleiern besteht, die in eine gelartige Masse eingebettet sind. Nachdem die Larven, zu diesem Zeitpunkt kaum einen Millimeter groß, unter Wasser geschlüpft sind, verlassen sie den Eistrang und beginnen eine Röhre zu bauen, in welcher sie bis zum Ende des Puppenstadiums leben und wachsen. Die Röhre wird aus umherschwimmenden Partikeln gebildet, welche die Larven mit Hilfe seidenartiger Speichelproteine, die in ihren Speicheldrüsen gebildet werden, verkleben. Die röhrenförmige Behausung wird kontinuierlich der Larvengröße angepasst und ständig ausgebessert. Nach einigen Wochen haben Larve und Röhre eine Länge von ca. 2 cm erreicht (siehe Abbildung 1.2 A, unten). Die Verpuppung der Larve findet ebenfalls innerhalb der Behausungsröhre statt. Nach Abschluss der Metamorphose steigt die Puppe zur Wasseroberfläche auf, wo die adulte Zuckmücke schlüpft. Diese lebt nur wenige Tage, die zur Reproduktion genutzt werden, womit sich der Lebenszyklus schließt. *C. tentans* kann mit relativ geringem Aufwand unter Laborbedingungen kultiviert werden (siehe Kap. 2.2.1).

Das Larvenstadium selbst kann wiederum in 4 Stadien aufgeteilt werden. Diese Stadien werden in der englischsprachigen Literatur *1st - 4th instar* genannt und ergeben sich durch die Beschaffenheit der Larvenhaut [Ineichen et al., 1983]. In dieser Arbeit wurden Larven aus dem letzten, unmittelbar vor der Verpuppung liegenden Stadium (*4th instar*) benutzt (siehe Kapitel 2.2.2). Die Larve ist für Untersuchungen zum nukleoplasmatischen Transport die eigentlich interessante Erscheinungsform. Sie besitzt 2 Speicheldrüsen, welche im 4. Larvenstadium aus 30 - 40 Zellen

bestehen (siehe Abbildung 1.2 B). Eine Speicheldrüse ist etwa 1.5 mm lang, 0.75 mm breit und 0.15 mm hoch. Sie ist damit auch mit bloßem Auge sichtbar, was die Präparation dieser Gewebe möglich macht (siehe Kap. 2.2.2). Die einzelnen speichelproduzierenden Zellen sind mit bis zu 200 μm Durchmesser sehr groß und ragen sattelförmig in das Lumen der Speicheldrüse. Sie enthalten einen entsprechend großen Zellkern, welcher typischerweise einen Durchmesser von etwa 75 μm aufweist (zum Vergleich: der Zellkerndurchmesser einer HeLa-Zelle beträgt etwa 10 - 15 μm , siehe auch 1.3 B) und eignen sich daher allein aufgrund ihrer Größe gut für die auflösungsbegrenzte Lichtmikroskopie. Abbildung 1.3 A zeigt eine präparierte Speicheldrüse, aufgenommen mit einem 20x Objektiv. Die einzelnen Zellen (schwarze Umrandung), ebenso wie die Zellkerne (Nuc), sind auch bei dieser geringen Vergrößerung bereits zu erkennen.

C. tentans besitzt 4 unterschiedliche Chromosomen. Alle Speicheldrüsenzellkerne durchlaufen mehrere DNA-Replikationszyklen, ohne sich dabei zu teilen (Endomitose), wodurch polyploide Zellkerne entstehen. Die Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* unterscheiden sich zusätzlich aber auch morphologisch von typischen Säugerzellkernen. Besonders ist hier, dass sich die Chromatiden der 4 Chromosomen auch nach den Teilungen nicht voneinander trennen. Die Chromosomen werden dabei polytän, d.h. sie enthalten 8000 bis 16000 Chromatiden, welche genau aneinander aliniert vorliegen und auch in der Interphase dicht gepackte Chromosomen bilden. Abbildung 1.3 B zeigt eine aus mehreren konfokalen Schichtaufnahmen errechnete Darstellung der Polytänchromosomen eines einzelnen Zellkerns aus einer speichelproduzierenden Zelle. Die DNA einer fixierten Speicheldrüsenzelle wurde hier mit Propidiumiodid angefärbt. Die morphologischen Unterschiede zwischen den Speicheldrüsen- und Säugerzellkernen werden insbesondere bei einem Vergleich mit Abbildung 1.1 deutlich.

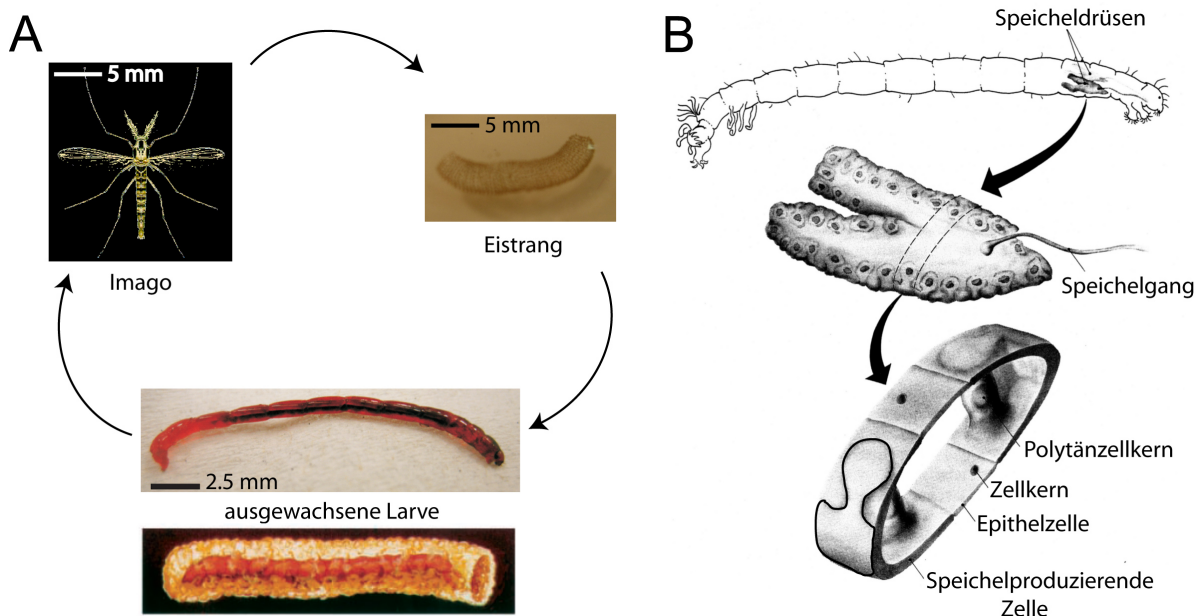
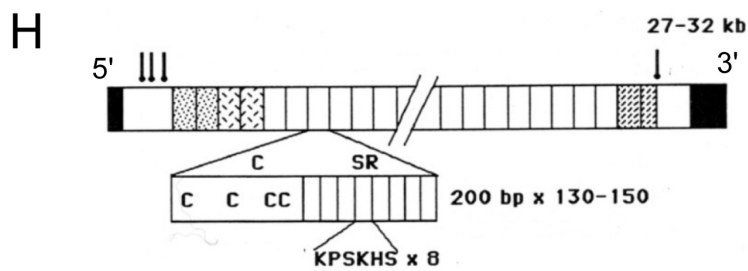
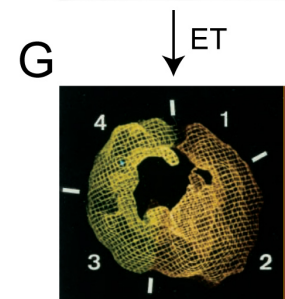
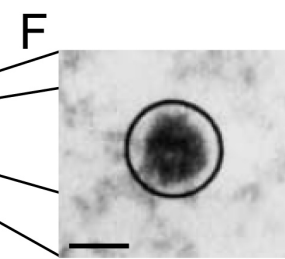
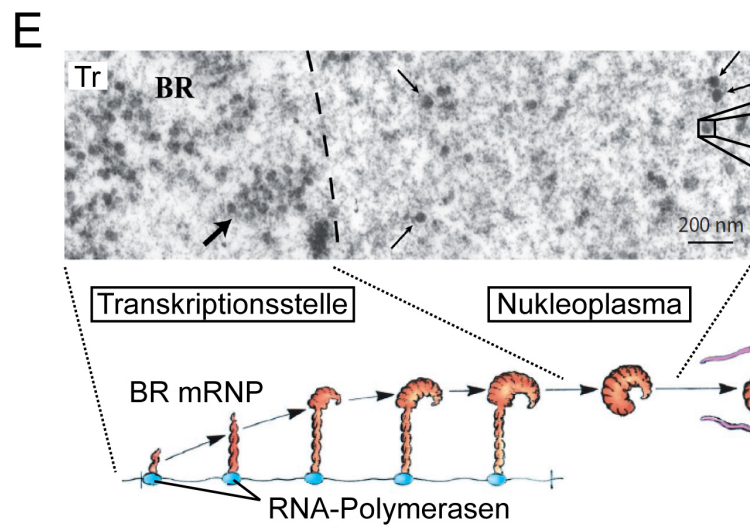
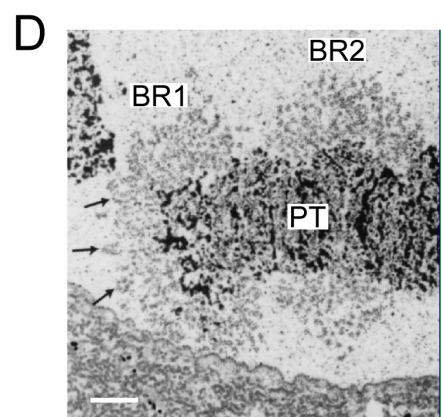
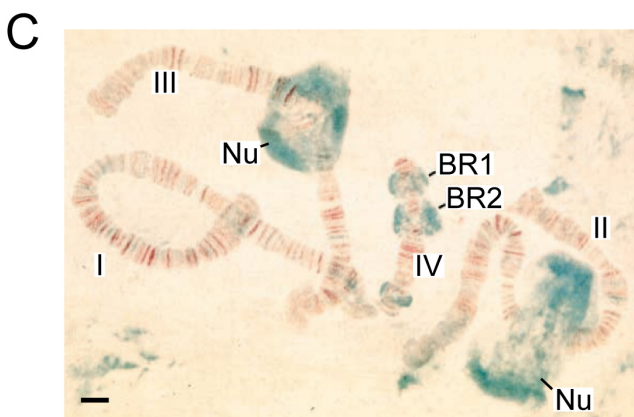
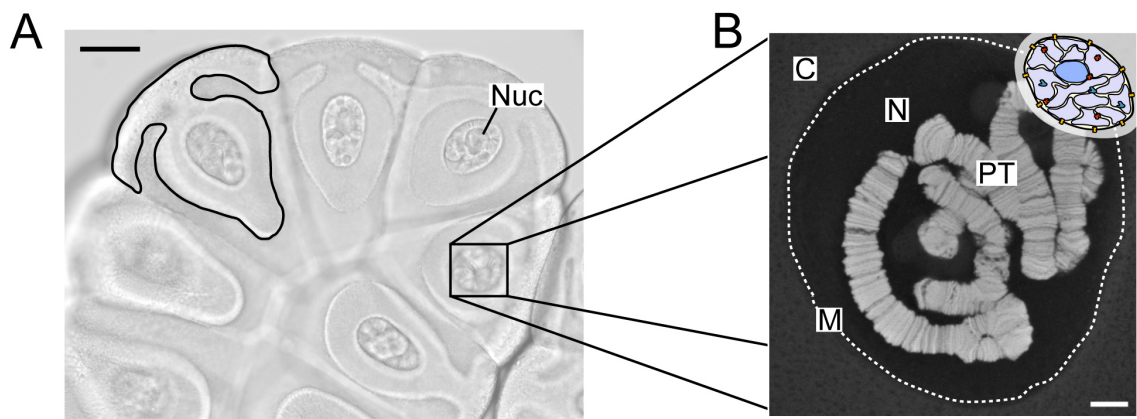


Abbildung 1.2: Die Biologie von *C. tentans* (I) (A) Der Lebenszyklus von *C. tentans*. Die Larve lebt aquatisch in einer Behausung, die aus Speichelproteinen besteht (siehe unten). Z.T. aus [Danesholt, 2001b] (B) Eine Larve enthält 2 Speicheldrüsen (Mitte), welche aus 30 - 40 speichelproduzierenden Zellen bestehen (unten). Verändert nach [Wieslander, 1994].



Die Polytäanchrosomen zeigen ein gut sichtbares Bandenmuster [Wehner, 1995]. Dieses Bandenmuster lässt Rückschlüsse auf den aktuellen Faltungsstatus des jeweiligen DNA-Abschnitts und damit auch auf den aktuellen Transkriptionsstatus zu. So entspricht eine optisch dichte Bande funktionell eher dem Heterochromatin des Säugerzellkerns, wo eine räumlich dichte Packung vorherrscht und keine Transkription stattfindet. Die optisch weniger dichten Bereiche entsprechen aktiven Transkriptionsorten, in welchen die DNA aufgefaltet vorliegt (engl. *puffs*). Jedes Polytäanchrosom hat einen Durchmesser von bis zu $10\ \mu\text{m}$ und eine Länge von 45 bis $100\ \mu\text{m}$, wobei Chromosom IV das kleinste ist (siehe Abbildung 1.3 C). Trotz der vermeintlichen morphologischen Ähnlichkeit der Polytäanchrosomen mit den bei der Mitose/Meiose auftretenden kondensierten Chromosomen der Säugerzellen, muss betont werden, dass die Polytäanchrosomen *funktionell* den Interphasechromosomen der Säugerzellen entsprechen.

Die Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* sind also neben ihrer Größe für mRNP Mobilitätsuntersuchungen deshalb so interessant, weil die DNA auch während der Interphase nur in ganz distinkten Bereichen, den Polytäanchrosomen, vorliegt und einen großen DNA-freien Nukleoplasmabereich freigibt. Hier eröffnet sich die einzigartige Situation, die mRNP-Mobilität unabhängig von strukturell behindernden Effekten des Chromatins zu untersuchen, welches in Säugerzellkernen die maßgebliche Kernstrukturkomponente ist. Entsprechend kann man den Speicheldrüsenzellkern also in 4 Hauptkompartimente aufteilen (siehe Abbildung 1.3 B): die Kernmembran (M), die Polytäanchrosomen (PT), die Nukleoli (assoziiert mit den Chromosomen II und III, durch Propidiumiodid nicht angefärbt) und das Nukleoplasma (N). Die Charakterisierung des nukleoplasmatischen Kompartiments hinsichtlich der Viskosität und der funktionellen Feinstruktur war eines der Ziele dieser Arbeit.

Abbildung 1.3: *Biologie von C. tentans (II)* (A) Eine freipräparierte Speicheldrüse im Durchlicht. Einzelne speichelproduzierende Zellen (schwarze Umrandung) sind zu erkennen. Nuc, Zellkern. Balken: $100\ \mu\text{m}$. (B) Zellkern einer speichelproduzierenden Zelle (gestrichelte Umrandung). Die Polytäanchrosomen (PT) wurden mit Propidiumiodid gefärbt. Das Nukleoplasma (N) ist frei von Chromatin. M, Kernmembran, C, Cytoplasma. Balken: $5\ \mu\text{m}$. Zum Größenvergleich ist oben rechts der schematische Säugerzellkern aus Abb. 1.1 maßstabsgetreu eingezeichnet. Verändert nach [Veith, 2007]. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme der isolierten 4 Polytäanchrosomen. An Chromosom II und III befindet sich je ein Nukleolus (Nu). An Chromosom IV sind die beiden größten Transkriptionsstellen BR1 und BR2 zu erkennen. Balken: $5\ \mu\text{m}$. Verändert nach [Daneholt, 2001b]. (D) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Teils von Chromosom IV. Die Feinstruktur der Transkriptionsstellen BR1 und BR2 ist zu erkennen. Naszierende mRNP-Partikel werden sichtbar (Pfeile). Balken: $2\ \mu\text{m}$. Verändert nach [Daneholt, 2001a]. (E) Oben: Elektronenmikroskopische Aufnahme des Grenzbereichs Transkriptionsstelle/Nukleoplasma. Naszierende BR2 mRNP-Partikel sind im Bereich der Transkriptionsstelle (Tr) zu erkennen (dicker Pfeil). Auch im Nukleoplasma finden sich BR mRNPs (dünne Pfeile, schwarzer Kasten). Verändert nach [Siebrasse et al., 2008]. Unten: Schematische Darstellung der Genese eines BR mRNPs von der Transkription bis zum Export. Verändert nach [Daneholt, 2001a] (F) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines vereinzelt BR mRNPs in starker Vergrößerung. Balken: $50\ \text{nm}$. Aus [Daneholt, 2001b]. (G) Gemittelte elektronentomographische Aufnahme mehrerer BR mRNPs. 4 Domänen sind zu erkennen. Das 5'-Ende der mRNA befindet sich in Domäne 1. Aus [Daneholt, 2001b]. (H) Schematische Darstellung des BR 2.1-Gens. Die 4 Pfeile kennzeichnen die Bereiche der Introns. Aus [Wieslander, 1994].

Einige der Speichelproteine, welche die Larve zum Aufbau ihrer Wohnröhre benutzt, sind mit einem Molekulargewicht von 1 bis 1.4 MDa außergewöhnlich groß. Die korrespondierenden Gene weisen eine entsprechende Größe von bis zu 42 kb auf. Die drei größten Gene liegen auf Chromosom IV. Sie bilden, wenn transkriptionell aktiv, besonders groß aufgefaltete Chromatinbereiche, welche mikroskopisch nach entsprechender Anfärbung als zwei gut sichtbare Transkriptionsstellen, die sogenannten Balbiani Ringe (kurz BR, nach ihrem Entdecker Balbiani benannt) BR1 und BR2 in Erscheinung treten (siehe Abbildung 1.3 C). BR2 enthält 2 Genloci, BR2.1 und BR2.2. Die aus den BR1- und BR2-Genen entstehenden Proteine stellen die Hauptbestandteile der Wohnröhre dar, in welcher die Larve lebt. Sie müssen daher ständig in großen Mengen synthetisiert werden, was die evolutive Entwicklung solcher Riesenchromosomen mit ihren bis zu 16 000 Genkopien mit bewirkt haben dürfte.

Bertil Daneholt und Mitarbeiter haben in den letzten 40 Jahren die Transkription der BR-Gene sowie den Transport und Export der korrespondierenden mRNPs mit Hilfe elektronenmikroskopischer Methoden intensiv erforscht. Dadurch ist der mRNP-Transport im Speicheldrüsenzellkern von *C. tentans* morphologisch deutlich besser verstanden als in allen anderen Systemen. Viele der ganz allgemeinen Informationen wie, wo und zu welchem Zeitpunkt mRNPs produziert und prozessiert werden, wurden erstmals in *C. tentans* ermittelt und gelten nach wie vor auch als Referenz für die mRNP-Prozessierung im Säugerzellkern.

Abbildung 1.3 D zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Teils von Chromosom IV mit den beiden Transkriptionsstellen BR1 und BR2. Die Transkriptionsstellen setzen sich hier hauptsächlich aus korpuskulären Strukturen (Pfeile) zusammen, die dem Polytänchromosom (PT) anliegen. Vergrößert man den Bereich an einer Transkriptionsstelle weiter (Abbildung 1.3 E, oben), so zeigen sich die korpuskulären Strukturen (Pfeil) nicht nur an der Transkriptionsstelle (Tr), sondern auch im Nukleoplasma (abgegrenzt durch die gestrichelte Linie). Diese korpuskulären Strukturen entsprechen den mRNPs der BR-Gene (BR1, BR2.1 und BR2.2) und sind die einzigen endogenen mRNP-Partikel, die in derart hoher Auflösung *in situ* visualisiert werden konnten. Wie oben beschrieben, werden die wachsenden mRNA-Stränge kotranskriptionell mit Verpackungs- und Regulationsproteinen, den hnRNPs, umhüllt. Im Falle der BR-Gene konnte dieser Vorgang *in situ* mit Hilfe der Elektronenmikroskopie verfolgt werden [Daneholt, 2001a]. Abbildung 1.3 E zeigt unten schematisch den Ablauf der Transkription. Mehrere RNA-Polymerasen laufen hintereinander an einem einzelnen der 8 000 - 16 000 Chromatinstränge entlang und synthetisieren je ein mRNA-Molekül [Lamb and Daneholt, 1979]. Dieses wird durch kotranskriptionelle sukzessive Anlagerung der hnRNPs in eine höher geordnete Struktur, den BR mRNP, gefaltet. Der mRNA-Strang liegt im mRNP-Partikel um einen filamentartigen Proteinkern gewunden vor, womit bestimmte Sequenzbereiche der mRNA von außen, d.h. vom Nukleoplasma aus, zugänglich bleiben [Lönnroth et al., 1992]. Dies ist eine entscheidende Voraussetzung um die BR mRNPs mit homologen Oligonukleotiden spezifisch und selektiv anfärben zu können (siehe unten). Man geht davon aus, dass die hier beschriebenen Vorgänge der mRNA-Transkription und Prozessierung genauso oder sehr ähnlich in Säugerzellen stattfinden.

Nach dem Abschluss der Transkription werden die BR mRNPs ins Nukleoplasma entlassen. Abbildung 1.3 F zeigt einen solchen BR mRNP-Partikel in der elektronenmikroskopischen Vergrößerung

(Kreis). Die im Nukleoplasma befindliche Population von BR mRNPs setzt sich hauptsächlich aus Produkten der BR1- und BR2-Gene zusammen [Skoglund et al., 1986]. Unter physiologischen Bedingungen ist BR2.1 das am aktivsten transkribierte Gen, während BR1 eine mittlere Aktivität aufweist und BR2.2 nur eine geringe Aktivität zeigt. Mit Hilfe der Elektronentomographie konnte die durchschnittliche räumliche Struktur eines BR mRNPs ermittelt werden, der sich frei im Nukleoplasma befindet und aufgrund der unterschiedlichen Genaktivitäten hauptsächlich die Struktur eines BR2.1 mRNPs widerspiegelt (siehe Abbildung 1.3 G). So ähnelt der nukleoplasmatische mRNP-Partikel der Form eines Doughnuts, in welcher 4 Domänen abgegrenzt werden können. Dabei liegt in Domäne 1 das 5'-Ende der aufgewundenen mRNA, in Domäne 4 das 3'-Ende.

Die Sequenz des BR2.1-Gens, dessen mRNPs in dieser Arbeit untersucht wurde, ist in Abbildung 1.3 H dargestellt. Alle BR-Gene, so auch BR2.1, enthalten 4 kurze Introns, 3 nahe dem 5'-Ende der mRNA, eins nahe dem 3'-Ende (siehe Pfeile). Das Spleißen der ersten 3 Introns erfolgt kotranskriptionell, während das letzte Intron sowohl ko- als auch posttranskriptionell gespleißt werden kann [Kiseleva et al., 1994, Baurén et al., 1998]. Die den BR-Genen korrespondierenden mRNA-Stränge werden durch das Spleißen nur geringfügig verkürzt [Wieslander, 1994], womit die BR2.1 mRNA eine Länge von bis zu 32 kb behält. Das zentrale Exon 4 zwischen dem 3. und 4. Intron ist das größte und enthält repetitive Einheiten von 200 bp Länge, welche in 130 bis 150 Kopien vorliegen und damit für die leicht variable Länge der mRNA verantwortlich sind. Auf Nukleotidebene ist die Basensequenz der repetitiven Einheiten nahezu identisch [Wieslander, 1994]. Die einzelnen repetitiven Einheiten selbst enthalten ebenfalls eine interne repetitive Sequenz (SR in Abbildung 1.3 H), sowie eine nicht repetitive Region C. Die SR-Bereiche der repetitiven Einheiten enthalten 8 sich wiederholende DNA-Stücke mit einer Länge von 24 bp (in Abbildung 1.3 H als korrespondierende Aminosäuresequenz angegeben). Insgesamt besteht also der größte Teil der BR-Gene und damit auch der hier untersuchten BR2.1 mRNA aus hochrepetitiven Einheiten. Damit besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die oben beschriebenen nukleoplasmatisch zugänglichen Bereiche der im mRNP aufgewundenen mRNA aus repetitiven Einheiten bestehen. So ergibt sich von Natur aus die außergewöhnliche Möglichkeit, die BR mRNPs mit fluoreszenzmarkierten, zu den bekannten repetitiven Sequenzen homologen Oligonukleotiden spezifisch zu markieren. Solche Oligonukleotide können durch Mikroinjektion in einen Speicheldrüsenzellkern eingebracht werden (siehe Kapitel 2.2.4). Dass die BR2.1 mRNPs so tatsächlich reproduzierbar und effektiv *in vivo* markiert werden können, konnte ich bereits in meiner Diplomarbeit zeigen [Veith, 2007]. Die Möglichkeit, einen endogenen mRNP-Partikel relativ einfach spezifisch markieren zu können ist ein weiterer Vorteil des *C. tentans*-Systems, der im Säugerzellsystem nicht gegeben ist.

Ein fertig transkribierter BR mRNP weist, abgesehen von seiner Größe, alle Eigenschaften eines typischen (Säuger-)mRNPs auf: 5'-Kappe, einen Poly(A)-Schwanz und Exons [Visa et al., 1996b, Baurén and Wieslander, 1994, Baurén et al., 1998]. Er besteht im Mittel aus ungefähr 400 bis 500 hnRNP-Proteinen [Wurtz et al., 1990], von denen viele bereits identifiziert werden konnten (für eine komplette Übersicht siehe [Kiesler and Visa, 2004]). Abhängig von ihrer Funktion verhalten sich diese Proteine während mRNP-Entstehung und -Transport unterschiedlich

[Wurtz-T et al., 1996, Visa et al., 1996a]. Damit zeigte sich, dass die den mRNP aufbauenden Proteine nach verschiedenen Mustern im mRNP angeordnet sind, wenige oder viele, gleichmäßig verteilt oder spezifisch lokalisiert und mit höchst unterschiedlichem Bindungszeitpunkt und unterschiedlicher Verweildauer. Das ist der Grund warum man heute ganz allgemein davon ausgeht, dass mRNP-Aufbau und -Transport hoch dynamische Prozesse sind [Daneholt, 2001a].

Neben dem Vorteil der hohen räumlichen Auflösung hat die Elektronenmikroskopie den Nachteil, dass nur fixierte und somit tote Präparate untersucht werden können, die immer nur eine Momentaufnahme der physiologischen Prozesse ermöglichen. Damit blieb die dem BR mRNP-Transport zugrundeliegende Dynamik größtenteils verborgen. Singh et al. haben trotzdem elektronenmikroskopisch versucht zumindest einen ersten Eindruck der mRNP-Mobilität *in vivo* zu erhalten [Singh et al., 1999]. Dafür wurden die Larven unterschiedliche Zeiten lang mit BrUTP inkubiert, einem Basenanalogen, welches nach Einbau in die mRNA mit Hilfe von immunoelektronenmikroskopischen Methoden nachgewiesen werden kann. Nach definierten Inkubationszeiträumen wurden die Speicheldrüsen präpariert und fixiert und elektronenmikroskopisch untersucht. Mit Hilfe eines anti-BrUTP-Antikörpers konnten die BR mRNPs, in welche bereits BrUTP eingebaut worden war, selektiv markiert und ihre Distanz zur Transkriptionsstelle, in Abhängigkeit der verstrichenen Zeit seit BrUTP-Gabe, bestimmt werden. So konnten die Autoren zeigen, dass sich die BR mRNP-Partikel mit zunehmender Zeit immer weiter vom Transkriptionsort entfernten. Sie konnten dadurch einen *minimalen* nukleoplasmatischen Diffusionskoeffizienten der BR mRNPs von $\geq 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ abschätzen. Es ist mittlerweile bekannt, dass dieser abgeschätzte minimale Diffusionskoeffizient erstaunlich gut zu *in vivo*-Ergebnissen passt.

Das *C. tentans*-System bietet aufgrund der Lokalisierung des gesamten Chromatins in distinkten Polytänchromosomen die einzigartige Möglichkeit die Interaktion von mRNPs mit nukleoplasmatischen *Nichtchromatinstrukturen* zu visualisieren, was in Säugerzellen aufgrund des entfaltenen Interchromatins bisher nicht möglich war. Bereits 1986 fanden Skoglund et al. mit Hilfe elektronentomographischer Analysen *in vitro* erste Hinweise darauf, dass die BR mRNPs an nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen binden können [Skoglund et al., 1986]. Miralles et al. haben diese Strukturen elektronentomographisch genauer untersucht [Miralles et al., 2000]. Sie konnten zeigen, dass zu einem gegebenen Zeitpunkt nur etwa 25% aller nukleoplasmatischen BR-Partikel frei im Nukleoplasma vorliegen (Abbildung 1.4 A, I). Der größte Teil (44% der BR mRNPs) lag dicht assoziiert mit größeren nukleoplasmatischen Strukturen bzw. Komplexen vor (Abbildung 1.4 A, II). Der verbleibende Teil der untersuchten BR mRNP-Partikel (31%) wies einen faserartigen Fortsatz (*connecting fiber*, kurz CF) variabler Länge auf (Abbildung 1.4 A, III und IV, bzw. B). Etwa 20% aller mRNPs mit Fortsatz mündeten in über einige hundert Nanometer ausgedehnte, netzartige Strukturen, welche die Autoren *fibrogranular clusters* (kurz FGCs) nannten (siehe Abbildung 1.4 A, V). Damit konnten erstmals möglicherweise auch funktionell verschiedene Populationen von BR mRNPs nachgewiesen werden. Die genaue Funktion der CFs und der FGCs ist bisher nicht bekannt [Kiesler and Visa, 2004]. Die CFs haben einen Durchmesser von 7 nm und eine Länge zwischen 15 und 50 nm. Als Hauptbestandteil konnte das Protein hrp65-1 identifiziert werden, ein etwa 65 kDa großes RNA-bindendes Protein, welches selbst *kein* Bestandteil des mRNPs ist [Miralles et al., 2000]. hrp65-1 ist eng verwandt mit den humanen Proteinen PSF,

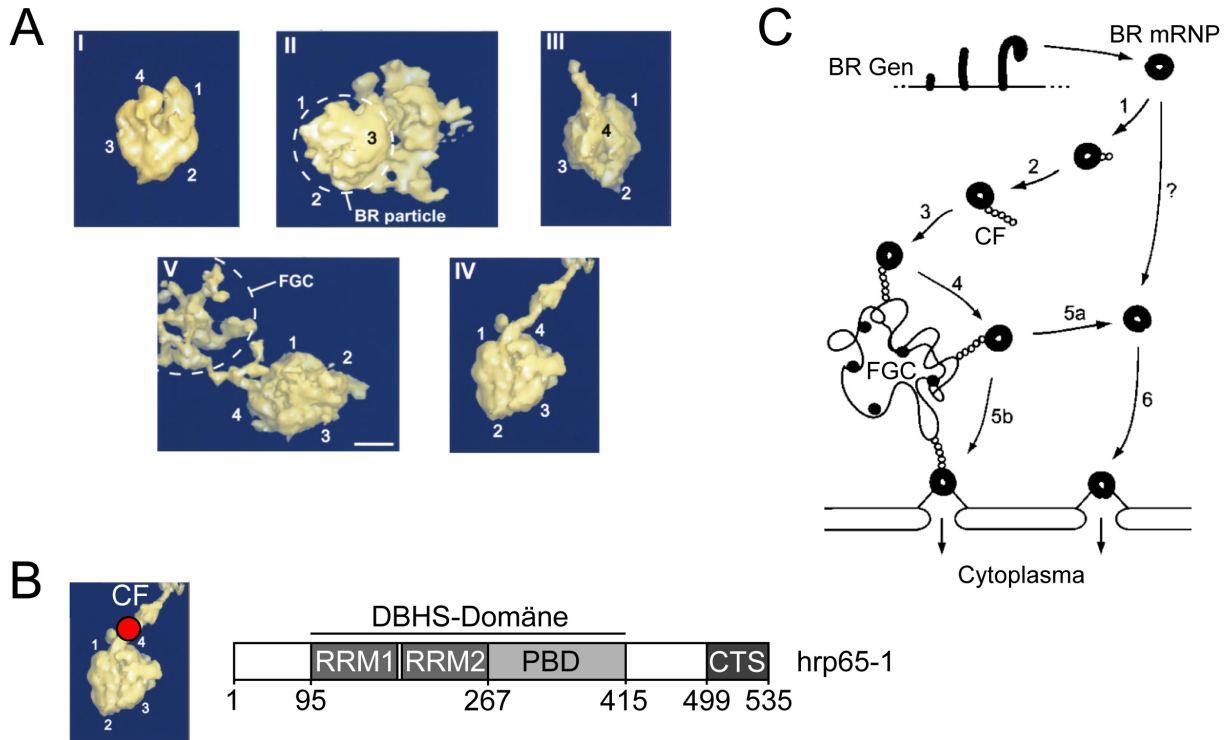


Abbildung 1.4: Biologie von *C. tentans* (III) (A) Übersicht über die elektronentomographisch gefundenen nukleoplasmatischen Zustände der BR mRNPs. Die Domänen der BR mRNPs sind gekennzeichnet. FGC, fibrogranular cluster. Balken: 25 nm. (B) Links, roter Kreis: Lokalisation des hrp65-1-Proteins in der connecting fiber (CF). Rechts: Schematische Struktur des hrp65-1-Proteins. Die Aminosäurenummern sind eingezeichnet. (C) Modell zur BR mRNP-Mobilität im Nukleoplasma. Alle Bilder verändert nach [Miralles et al., 2000].

p54^{nrb} und PSP1, sowie mit dem Drosophilaprotein NonA/BJ6. Diese multifunktionalen Proteine sind in verschiedenste nukleäre Prozesse wie Transkriptionsregulation, mRNA-Spleißen und Retention defekter mRNAs im Zellkern eingebunden. Alle diese Proteine weisen, wie hrp65-1 auch, eine *drosophila behaviour and human splicing*-Domäne (kurz DBHS) auf und stehen in enger Verbindung mit den erst kürzlich entdeckten *paraspeckles*, einem weiteren Kernkörper-Subtyp. Ob *paraspeckles* auch in *C. tentans* vorkommen wurde bisher nicht untersucht.

hrp65-1 zeigt eine hohe Tendenz zur Oligomerisation *in vitro*, was eine Aufreinigung des Proteins entsprechend erschwert (siehe Ergebnisse), jedoch gut zu einem faserbildenden Protein passt [Kiesler et al., 2003]. Hrp65-1 kommt in *C. tentans* in 2 weiteren Isoformen vor, hrp65-2 und -3. Die Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen der hrp65-prä-mRNA und unterscheiden sich nur in ihrem C-Terminus [Miralles and Visa, 2001]. Hrp65-2 spielt zusammen mit Aktin, für welches es in seiner C-terminalen Domäne (kurz CTS) eine Bindungsdomäne aufweist, eine Rolle bei der Transkription [Percipalle et al., 2003, Percipalle and Visa, 2006]. Hrp65-3 wurde nur in einer Zelllinie embryonalen Ursprungs gefunden. Hrp65-1 hingegen ist als Bestandteil der CFs die häufigste Isoform im Zellkern. Es sitzt im proximalen Teil der CFs was in Abbildung 1.4 B (links) durch die rote Markierung angedeutet ist [Miralles et al., 2000]. Abbildung 1.4 B (rechts) zeigt schematisch den Aufbau des hrp65-1-Proteins [Miralles and Visa, 2001, Kiesler et al., 2003].

Die CTS-Sequenz des Proteins enthält einen Abschnitt, welcher als *nuclear localization sequence* (kurz NLS) identifiziert werden konnte und für den Import des Proteins in den Zellkern sorgt. Über zwei *RNA recognition motive*-Domänen (kurz RRM) kann das Protein RNA binden. Eine *protein binding domain* (kurz PBD), welche aufgrund der Gleichheit der ersten 499 Aminosäuren alle hrp65-Isoformen aufweisen, ermöglicht die Wechselwirkung der Isoformen mit sich selbst (Homooligomerisation) und untereinander (Heterooligomerisation). Über die PBD-vermittelte Interaktion von hrp65-1 und hrp65-2 wird die hrp65-2-Isoform, welche keine eigene NLS aufweist, in den Zellkern transportiert [Kiesler et al., 2003].

Die CTS-Sequenz der hrp65-Isoformen ist also für ihre *spezifischen* Funktionen entscheidend, während die PBD-Domäne ihre Vernetzung ermöglicht. Den Einfluss dieser beiden Domänen auf die BR mRNP-Mobilität zu untersuchen war eines der wichtigsten Ziele dieser Arbeit.

Die elektronentomographische Analyse der nukleoplasmatischen Strukturen brachte einerseits eine hohe räumliche Auflösung mit sich, hatte andererseits jedoch den Nachteil keine kinetischen Daten zu Bindungsprozessen zu liefern. Miralles et al. konnten daher nur aufgrund ihrer statischen Daten ein erstes Modell vorschlagen, wie die Bindung der BR mRNPs an nukleäre Strukturen ihre Mobilität beeinflussen könnte und welche Rolle die CFs dabei möglicherweise spielen (siehe Abbildung 1.4 C). Hierbei wurde angenommen, dass die CF-vermittelte Interaktion der BR-Partikel mit den FGCs einerseits transient oder aber stabil bis zum Export sein könnte. Eine stabile Interaktion, spekulierten die Autoren, könnte mit einem gerichteten Transport der BR mRNPs zur Kernpore verbunden sein. So wurde angenommen, dass der mRNP nach Abschluss der Transkription und kurzer freier Diffusion eine stabile Verbindung mit den FGCs eingeht (1 bis 3 in Abbildung 1.4 C). Diese könnten dann ein gerichtetes Gleiten zur Kernpore ermöglichen (4 und 5b in Abbildung 1.4 C). Es ist jedoch mittlerweile bekannt, dass die BR2.1 mRNPs keinen gerichteten nukleoplasmatischen Transport zeigen [Veith, 2007, Siebrasse et al., 2008]. Allerdings deuteten schon die in [Siebrasse et al., 2008] vorgestellten Daten vermehrte transiente Interaktionen der BR2.1 mRNPs mit Nichtchromatinstrukturen an (siehe oben und folgendes Kapitel). Dies würde im Modell von Miralles et al. dem Weg 1-5a in Abbildung 1.4 C entsprechen. Dieses Modell berücksichtigt jedoch nicht die Möglichkeit, dass es auch zu *mehrfachen* transienten Bindungen der BR mRNPs an die FGCs kommen könnte. Dass diese Möglichkeit jedoch nicht vernachlässigt werden darf, zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit.

Die Interaktionen der BR mRNPs mit den FGCs sind - unabhängig von ihrer Dauer - generell endlicher Natur, da 80 bis 100% aller synthetisierten BR mRNPs ins Cytoplasma exportiert werden, also einen gebundenen Zustand früher oder später wieder verlassen [Edström et al., 1978]. Die Interaktionen der BR mRNPs mit den FGCs *in vivo* nachzuweisen war ebenfalls eines der Hauptziele dieser Arbeit (siehe nächstes Kapitel).

In einer aktuellen Studie aus der Danholt-Arbeitsgruppe wurden Hinweise auf eine enge Kopplung von Transkription und Export gefunden [Kylberg et al., 2008]. So zeigten Kylberg et al., dass in isolierten Speicheldrüsen, deren Transkription durch Actinomycin D bzw. DRB gehemmt war, die Anzahl der BR mRNPs im Nukleoplasma konstant blieb. Die Inhibition der Transkription ging also zugleich mit einer Inhibition des mRNP-Exports einher. Die Autoren konnten zeigen, dass die Zahl der an Kernporen gebundenen mRNPs binnen 90 Minuten nach Applikation von

Actinomycin D oder DRB signifikant abnahm, die mRNPs also nach der Transkriptionshemmung nicht mehr in der Lage waren an die Kernpore zu binden. Dies könnte, so die Spekulation der Autoren, auf eine durch die Transkriptionshemmung induzierte stabile Bindung der noch im Zellkern verbleibenden mRNPs an nukleäre Strukturen *ohne* erneute Freisetzung zurückzuführen sein, was zu einer deutlichen Retardierung der mRNP-Mobilität führen sollte („mRNPs in Wartestellung“, siehe Diskussion). Ob Actinomycin D oder DRB tatsächlich den vermuteten retardierenden Einfluss auf die BR mRNP-Mobilität haben, sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation ebenfalls geklärt werden.

Der Transport endogener mRNP-Partikel im Speicheldrüsenzellkern von *C. tentans* ist morphologisch so detailliert untersucht worden, wie für kein anderes System. Dies ist zweifelsfrei eine Folge seiner besonderen strukturellen Voraussetzungen, insbesondere jener, die BR mRNPs alleine aufgrund ihrer Größe elektronenmikroskopisch visualisieren zu können. Dass sich diese mRNPs auch, wie oben beschrieben, fluoreszenzmikroskopisch hervorragend markieren lassen darf als Glücksfall gewertet werden. So steht ein System zur *in vivo*-Untersuchung des Transports *endogener* mRNPs in *chromatinfreien* Nukleoplasmabereichen zur Verfügung, das gleichzeitig einzigartige Verknüpfungsmöglichkeiten mit bereits vorliegenden ultrastrukturellen Erkenntnissen ermöglicht. Dadurch stellen die Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der nukleoplasmatischen mRNP-Mobilität dar.

1.3 Motivation und offene Fragestellungen

In [Veith, 2007] und [Siebrasse et al., 2008] war es erstmals gelungen die Diffusion der endogenen BR2.1 mRNPs in Echtzeit mit einer bis dato nicht erreichten Zeitauflösung abzubilden und die Dynamik der mRNP-Mobilität losgelöst vom Einfluss des in Säugerzellen strukturbestimmenden Chromatins zu analysieren. Der sich andeutende große Einfluss chromatinunabhängiger Bindungen war unerwartet und warf viele neue Fragen nach der strukturellen Organisation des chromatinfreien Nukleoplasmas auf. Wie in Kapitel 1.1 bereits kurz angesprochen, wurden mit Hilfe von DNA-Oligonukleotiden und einer tiefgehenden Trajektorienanalyse 4 Diffusionskomponenten der BR2.1 mRNPs im chromatinfreien Nukleoplasma gefunden:

$$\begin{aligned} D_{I,DNA} &= 3.74 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (15 \pm 3\%) \\ D_{II,DNA} &= 0.64 \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (66 \pm 2\%) \\ D_{III,DNA} &= 0.23 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (19 \pm 3\%) \\ D_{IV,DNA} &= 0.015 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (0.7 \pm 0.3\%) \end{aligned}$$

(in Klammern sind die relativen Anteile der Komponenten angegeben). Dies zeigte erstmals, dass ein endogener mRNP auch in Bereichen, in welchen kein entfaltetes Chromatin vorliegt, eine sehr komplexe Mobilität aufweist. Insbesondere die deutlichen Retardierungen konnten nicht auf Chromatinhindernisse zurückgeführt werden. Die Frage, *welche* Strukturen *wie* für diese Retardierung verantwortlich sind, konnte zum damaligen Zeitpunkt nicht beantwortet werden, jedoch lag ein Zusammenhang mit den von Miralles et al. gefundenen FGCs nahe. Die ermittelten Diffusionskomponenten fanden sich teilweise zusammen in einzelnen Trajektorien wieder, was

in [Siebrasse et al., 2008] als „diskontinuierliche mRNA-Diffusion“ bezeichnet wurde. Eine dort durchgeführte MSD-Analyse zeigte einen anomalen Verlauf und deutete somit Hindernisse bzw. Bindungsstellen im chromatinfreien Nukleoplasma an.

So konnten wir schon in dieser Publikation zeigen, dass der Einfluss des Chromatins im Säugerzellkern einen Großteil der nukleoplasmatischen mRNA-Dynamik schlicht verdeckt hatte, womit sich nun Fragen stellten, deren Relevanz erst im Lichte der Erkenntnisse aus [Siebrasse et al., 2008] klar wurde und die stellvertretend für Fragen zur Mobilität aller endogenen mRNPs standen:

- Wieso zeigen die BR2.1 mRNPs in *chromatinfreien* Nukleoplasmaebereichen mehrere Mobilitätskomponenten?
- Wieso weisen einzelne Trajektorien mehrere dieser Mobilitätskomponenten auf?
- Gibt es einen funktionellen Zusammenhang der mRNA-Retardierungen mit den von Miralles et al. gefundenen FGCs?
- Wieso zeigen die BR2.1 mRNPs einen anomalen MSD-Verlauf im chromatinfreien Nukleoplasma, der ein Hinweis auf Bindungen bzw. Hindernisse ist, obwohl keine nukleoplasmatischen mRNA-*Immobilisierungen* gefunden werden konnten?
- Können tatsächlich *spezifische* Bindungen der BR2.1 mRNPs an nukleoplasmatische Strukturen identifiziert werden?
- Lassen sich Effektoren finden, welche die vermuteten spezifischen Bindungen beeinflussen und so Hinweise auf die Bindungspartner liefern?

Während die BR2.1 mRNA-Mobilität in [Siebrasse et al., 2008] noch hauptsächlich deskriptiv vorgestellt wurde, war es das Anliegen der hier vorliegenden Dissertation, konkrete Antworten auf die oben gestellten Fragen zu finden und damit die Dynamik endogener BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma zu *verstehen*. Dazu sollten mehrere sich ergänzende Mikroskopietechniken wie FCS, FRAP und Einzelpartikeltracking angewandt werden. Aufbauend auf die Beantwortung dieser Fragen sollte ein aktuelles Modell der nukleoplasmatischen BR2.1 mRNA-Mobilität entwickelt werden. So sollte im Idealfall, neben dem grundlegenden Verständnis der mRNA-Mobilität im *C. tentans*-System, eine integrierte Sicht auf die nukleäre mRNA-Dynamik auch im Säugerzellsystem gewonnen werden, um die z.T. widersprüchlichen Ergebnisse vergangener Studien zusammenzuführen.

In [Veith, 2007] und [Siebrasse et al., 2008] wurden wir außerdem mit zwei methodischen Problemen konfrontiert, welche die Zuverlässigkeit des Einzelpartikeltrackings negativ beeinflussten (siehe auch Diskussion):

1. Wegen der begrenzten Sensitivität des damals genutzten konfokalen Mikroskops mussten hohe Konzentrationen der DNA-Oligonukleotide (10 nmol/mL) eingesetzt werden, um die BR2.1 mRNPs ausreichend hoch markieren zu können. Mit solch hohen Injektionskonzentrationen gelang es zwar die einzelnen BR2.1 mRNPs mit mehreren fluoreszenzmarkierten
-

Oligonukleotiden zu markieren, so dass sie auch mit der wenig sensitiven CCD-Zeile des konfokalen Linienscanners detektiert werden konnten. Als problematisch erwies sich hierbei aber, dass im Speicheldrüsenkern im Schnitt 70 bis 90 mRNP-Partikel pro μm^3 vorliegen, von welchen der größte Teil den BR2.1 mRNPs zuzuordnen ist [Kylberg et al., 2008]. Mit den hohen Oligonukleotidkonzentrationen wurden potenziell alle BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma markiert. Um die für das Einzelpartikeltracking unabdingbar notwendige Vereinzelung der markierten BR2.1 mRNPs zu erreichen ($\ll 5$ mRNP-Partikel pro μm^3), mussten Bleichphasen von mehreren Minuten vor jeder Messungen in Kauf genommen werden. Typischerweise wurde so 1/3 des Zellkernvolumens für bis zu 5 Minuten mit höchster Laserleistung gebleicht, bevor unmittelbar im Anschluss daran die Diffusion ungebleichter BR2.1 mRNPs aus den Randbereichen verfolgt wurde. Trotz der langen Bleichphasen blieb die Dichte der Signale relativ hoch. Dies wirkte sich negativ auf die Zuverlässigkeit des SPT aus, da die Wahrscheinlichkeit für Falschzuweisungen bei der Verknüpfung der Trajektorien erhöht war (siehe Kapitel 2.2.8).

2. Nicht alle Mikroinjektionen waren erfolgreich, d.h. nicht immer waren die BR2.1-Transkriptionsstelle bzw. nukleoplasmatische Signale sichtbar. Hier spielte möglicherweise die geringe Lebensdauer von DNA-Oligonukleotiden im Zellkern eine Rolle [Molenaar et al., 2001].

Diese beiden Probleme zu beheben, war eine unabdingbare Grundvoraussetzung für eine tiefgreifende Mobilitätsanalyse der ermittelten Trajektorien, die nötig war, um die oben genannten Fragen überhaupt beantworten zu können.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

In Tabelle 2.1 sind die Chemikalien aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

2.1.2 Medien und Puffer

2.1.2.1 Medien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) wurde bei Biochrom (Biochrom AG, Berlin) erworben, fötales Kälberserum (FCS) bei Hyclone (Thermo Scientific HyClone, Logan, USA).

2.1.2.2 Puffer

Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Puffer und deren Herstellung.

2.1.3 Sonstiges Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.3 sind sonstige Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

2.1.4 Oligonukleotide und Molecular Beacons

Spezifische, zur BR2.1 mRNA homologe (BR2.1 RNA), und unspezifische, nicht homologe (CTR RNA), fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide wurden bei IBA bestellt (IBA GmbH, Göttingen). Beide waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto647N markiert. Die Konzentration der Stocklösung betrug jeweils 0.1 nmol/ μ L.

Spezifische (BR2.1 MB RNA) und unspezifische (CTR MB RNA) Molecular Beacons wurden von Dr. Sanjay Tyagi (Public Health Research Institute Center, University of Medicine and Dentistry

Name	Beschreibung	Firma
L-Glutamin	Proteinogene Aminosäure	Biochrom AG, Berlin
Penicillin	Antibiotikum	Biochrom AG, Berlin
Streptomycin	Antibiotikum	Biochrom AG, Berlin
PBS	Puffergemisch, Feststoff	Biochrom AG, Berlin
Gentamycin	Antibiotikum	Gibco, Invitrogen, Darmstadt
FITC-Dextran	150 kDa u. 500 kDa	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMSO	Lösungsmittel	Sigma-Aldrich, Hamburg
Actinomycin D	Feststoff	Sigma-Aldrich, Hamburg
Poly-L-Lysin	Lösung	Sigma-Aldrich, Hamburg
Amino-Dextran	500 kDa	Invitrogen, Darmstadt
Atto647N	Succinimidylester u. Maleimid	Attotec, Siegen
Atto647	Succinimidylester	Attotec, Siegen
BioRad-P6	Entsalzungssäule, 6 kDa cutoff	BioRad, München
Tris/HCl	Puffersubstanz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCH ₃ COO	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCH ₃ COO	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mg(CH ₃ COO) ₂	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EGTA	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
DTT	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KOH	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO ₃	Feststoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Puffersubstanz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 2.1: Chemikalien

of New Jersey, USA) bezogen. Beide waren am 5'-Ende mit Atto647N und am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzlöcher BHQ2 markiert. Die Stockkonzentration betrug jeweils 0.16 nmol/ μ L. Alle Nukleotide wurden als 2'-O-Methyl-RNAs synthetisiert. Eine Übersicht ist in Tabelle 2.4 gezeigt.

2.1.5 Aminodextran

Aminodextran mit einer molaren Masse von 500 kDa wurde in 0.1 M Natriumhydrogencarbonatlösung mit einem pH-Wert von 8.0 gelöst. Es wurde mit einem 5-fachen molaren Überschuss an Atto647-Succinimidylester fluoreszenzmarkiert. Die Markierungsreaktion wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Freier Farbstoff wurde per Gelfiltration über eine Biorad-P6 Entsalzungssäule abgetrennt, welche zuvor frisch gepackt worden war. Das markierte Dextran wurde schließlich über eine Superose12-Gelfiltrationssäule von kleineren Dextranfragmenten abgetrennt. Die finale Stocklösung wurde bei 4 ° C aufbewahrt.

Puffer	Herstellung
HEPES	Eine 100 mM Stocklösung wurde mit deionisiertem Wasser angesetzt und der pH-Wert auf 7.3 eingestellt. Nach Sterilfiltration wurde die Stocklösung bei 4 ° C aufbewahrt.
Transportpuffer (TP)	Transportpuffer wurde aus 20 mM Hepes/KOH (pH 7.3), 110 mM Kaliumacetat, 5 mM Natriumacetat, 2 mM Magnesiumacetat, 1 mM EGTA und 2 mM DTT in ionisiertem Wasser hergestellt. Aufgrund der Zersetzung des DTTs wurde der Puffer nicht länger als 2 Wochen bei 4 ° C aufbewahrt.
PBS	Wurde als gebrauchsfertige Mischung bezogen, in 1 Liter deionisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert auf 7.3 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4 ° C aufbewahrt.

Tabelle 2.2: Puffer

Bezeichnung	Beschreibung	Firma
MatTek Schalen	Zellkulturschalen	MatTek Corporation, Ashland, USA
Femtotips II	Mikroinjektionsnadeln	Eppendorf, Hamburg
Microloader	zum Beladen der Femtotips	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Porengröße 0.22 μm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Fischfutter	Larvenfutter	sera GmbH, Heinsberg
Brennesselpulver	Larvenfutter	Alfred Galke GmbH, Gittelde/Harz

Tabelle 2.3: Sonstiges Verbrauchsmaterial

2.1.6 Actinomycin D

5 mg Actinomycin D wurden in 50 μL DMSO gelöst. Diese Lösung wurde mit 950 μL PBS aufgefüllt. Als Kontrolllösung wurden 950 μL PBS mit 50 μL reinem DMSO versetzt. In beiden Lösungen wurden spezifische RNA-Oligonukleotide jeweils 1:400 (von der Stocklösung) gelöst.

2.1.7 hrp65-Peptide

Tabelle 2.5 beschreibt die Injektionslösungen der hrp65-1-Peptide. Alle Peptidlösungen wurden in Kerne injiziert, in welche zuvor bereits spezifische RNA-Oligonukleotide 1:400 in Transportpuffer injiziert worden waren (Doppelinjektion).

Die Synthese und Aufreinigung des hrp65-1-CTS-Peptids wurde bei der PSL GmbH, Heidelberg, in Auftrag gegeben.

Das hrp65-PBD-Peptid wurde als GST(Glutathion-S-Transferase)-Fusionsprotein heterolog ex-

Probenname	Basensequenz u. Beschreibung
BR2.1 RNA	ACU UGG CUU GCU GUG UUU GCU UGG UUU GCU Homologe Sequenz zu einem repetitiven Abschnitt in der BR2.1 mRNA.
CTR RNA	AGC AAA CCA AGC AAA CAC AGC AAG CCA AGU Nichthomologe Kontrollsequenz.
BR2.1 MB RNA	<u>cacg</u> ACU UGG CUU GCU GUG UUU GCU UGG UUU GCU <u>cgug</u> Homologe Sequenz zu einem repetitiven Abschnitt in der BR2.1 mRNA (siehe BR2.1 RNA). Die unterstrichenen Bereiche bilden den Stamm des Beacons.
CTR MB RNA	<u>cacg</u> AGC AAA CCA AGC AAA CAC AGC AAG CCA AGU <u>cgug</u> Nichthomologe Kontrollsequenz (siehe CTR RNA). Die unterstrichenen Bereiche bilden den Stamm des Beacons.

Tabelle 2.4: Oligonukleotide und Molecular Beacons

primiert, über GST-bindende beads aufgereinigt und als Stocklösung in 20 mM Tris/HCl-Puffer gelagert. Zur Überprüfung der Funktionalität wurde es mit einem 4-fach Überschuss von Atto647-Succinimidylester markiert. Die Experimente zur Untersuchung des Einflusses auf die BR2.1 mRNP Mobilität wurden mit unmarkiertem Protein durchgeführt.

Probenname	Aminosäuresequenz u. Beschreibung
hrp65-1-CTS	DQGNRFDGPPQRGNVRPWNNNDRGHRDDFQNKRRRY Sequenz aus [Miralles and Visa, 2001]. Injektionskonzentration: 60 mg/mL in TP.
hrp65-PBD	RPCVVETFDHIDETDGFPEKSNYYKARQNGPRFAEMGSFGTKWKQM YDMYKQKHDALKREMQLEEEKLEAQMEYAKFEHETESLREQLRKREQ DRDRQKKEWEDRERQADESIRDEQQMRRQQDDMQMRMQRQDEEM RRRQQENSL Sequenz aus [Kiesler et al., 2003]. GST-Fusionsprotein. Injektionskonzentrationen: Markiert: 1.7 mg/mL in Tris/HCl. Unmarkiert: 5.8 mg/mL in Tris/HCl.

Tabelle 2.5: Die hrp65-Peptide

2.2 Methoden

2.2.1 *Chironomus tentans*-Aufzucht

Generelles zur *Chironomus tentans*-Aufzucht findet sich auch in [Veith, 2007]. Die *Chironomus tentans*-Aufzucht fand in einem eigens hierfür eingerichteten Raum statt, der ständig auf 17 ° C gekühlt wurde. Adulte Mücken wurden in einem Käfig auf einer Schale mit Leitungswasser gehalten, in welches die Weibchen nach Befruchtung die Eistränge ablegen konnten. Das Wasser im Eiablagebecken wurde einmal pro Woche erneuert. Alle 2 Tage wurden die Eistränge aus dem Becken gesammelt und in einem kleinen Glasgefäß aufbewahrt. Nach wenigen Tagen konnten geschlüpfte Larven unter dem Binokular beobachtet werden. Dann wurden 3-5 Eistränge in eine Anzuchtschale überführt, welche zuvor mit 17 ° C kaltem Leitungswasser gefüllt und mit wenigen Blättern Zellstoff ausgelegt worden war. Nachdem die Eistränge in die Schale überführt worden waren, wurden 15 mL Fischfutterlösung (1 g Trockenfutter auf 50 mL Leitungswasser) zugegeben. Die Anzuchtschalen wurden mit einem Deckel aus feinmaschigem Insektengitter abgedeckt. Nach einer Woche wurden die Larven in den Schalen erstmals mit 15 mL Brennesselfutter (10 % Gewicht/Volumen Brennesselpulver in Leitungswasser, mindestens 2 Wochen fermentiert) gefüttert, was wöchentlich wiederholt wurde. Nach einer Woche wurden die Anzuchtschalen außerdem mit Raumluft über ein Pumpensystem belüftet, welches in jeweils eine Pasteurglaspipette pro Schale mündete. Die Öffnung der Pipette wurde etwa 2-3 cm unterhalb der Wasseroberfläche platziert und die Luftzufuhr so geregelt, dass ein leichter Blasenwurf erzeugt wurde. Das verdunstete Wasser der Anzuchtschalen wurde regelmäßig mit deionisiertem Wasser ersetzt, um eine Übersalzung zu verhindern. Nach ca. 4 Wochen schlüpfen die ersten adulten Mücken. Ab diesem Zeitpunkt wurde dreimal wöchentlich 40 mL Brennesselfutter gefüttert. Die adulten Mücken wurden alle 2 Tage in den Käfig über dem Eiablagebecken überführt, wo sie nach der Eiablage innerhalb weniger Tage zugrundegeringen und mit dem Wechsel des Eiablagewassers entsorgt wurden. Es wurden laufend neue Zuchtschalen angesetzt, um die ständige Versorgung mit für Experimente verwendbaren Larven sicherzustellen.

Nach dem Schlüpfen aller Mücken wurden die Anzuchtschalen lediglich mit Natriumcitratlösung (5 % (Gewicht/Volumen)) gereinigt, da die Larven sehr empfindlich auf alle Formen von Reinigungsdetergenzien reagierten.

2.2.2 Speicheldrüsenpräparation

Chironomus tentans im 4. Larvenstadium (engl. *4th instar* [Wieslander, 1994]) wurde etwa 30 Minuten vor Beginn der Messung mit einer Lebendpinzette (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) gesammelt. Dabei wurden sie falls möglich aus ihrer Behausungsröhre gezogen und in ein Glasgefäß mit Leitungswasser (17 ° C) oder mit abgeschöpftem Anzuchtbeckenwasser überführt. Vor der Präparation wurde eine Larve aus dem Glasgefäß entnommen, auf einem Papier vorsichtig von Schmutz befreit, auf einen Objektträger gelegt und mit der Lebendpinzette fixiert. Zur Präparation wurde ein Binokular (Leica Microsystems, Wetzlar) benutzt. Dann wurde der Kopf

der Larve vor der Einschnürung zum nächsten Segment mit einem Skalpell abgetrennt (Abbildung 2.1, S1). Dies führte fast immer zur Freisetzung der beiden Speicheldrüsen, welche durch den Überdruck im Inneren der Larve nach außen gepresst wurden. Alternativ wurde - zur besonders behutsamen Präparation und Minderung der Verletzungsgefahr der Drüsen - zuerst ein Schnitt nach dem 4. Segment durchgeführt, um den Überdruck im Inneren der Larve zu mindern, bevor das Abtrennen des Kopfes folgte (Abbildung 2.1, S2a). Das so entstandene Larvenstück, bestehend aus 3 Segmenten, wurde danach mit einer Pinzette zügig in ein Glasgefäß mit PBS überführt, um so potentiell problematische Sekrete der bei der Präparation verletzten Verdauungsorgane zu verdünnen. Mit einer feinen Präparationsschere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg) wurde das Larvenstück der Länge nach aufgeschnitten, um die Speicheldrüsen freizusetzen (Abbildung 2.1, S2b).

Bei dem größten Teil der Experimente wurde die gesamte Präparation in einem Glasgefäß mit PBS durchgeführt, in welches die unverschmutzte Larve unmittelbar aus dem Sammelgefäß überführt wurde. Die Verletzungsgefahr der Drüsen war bei dieser Präparationsart geringer.

Unmittelbar nach der Freipräparation wurden die Speicheldrüsen noch im Glasgefäß mit PBS auf Verletzungen untersucht, welche sich nach einiger Zeit durch eine milchig-weißliche Eintrübung des Drüsengewebes zeigten. Nur Speicheldrüsen, die nach optischer Kontrolle unverletzt waren, wurden für Experimente genutzt. Jeweils eine Speicheldrüse wurde mit Hilfe einer Pipette auf eine mit Poly-L-Lysin benetzte MatTek-Schale überführt. Die Drüsen wurden zur Mikroinjektion mit 300 μ L PBS überschichtet.

Nach Abschluss der Mikroinjektion verblieben die Speicheldrüsen entweder in PBS oder wurden nach Abnahme des Puffers mit frischer Hämolymphe überschichtet. Hämolymphe wurde üblicherweise von 4 Larven aus demselben Zuchtbecken gewonnen, indem ihnen, ohne den Darm zu verletzen, auf einem Objektträger nur mit Schnitt S1 (s. Abb. 2.1) der Kopf entfernt wurde. Die nach dem Schnitt ohne zusätzlich ausgeübten Druck austretende Hämolymphe wurde gesammelt und 15 Minuten bei 10 000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die Hämolymphemenge zur Überschichtung der Speicheldrüse wurde so gering gewählt, dass die Speicheldrüse gerade vollständig bedeckt war. Um der Verdunstung der geringen Flüssigkeitsmenge vorzubeugen, wur-

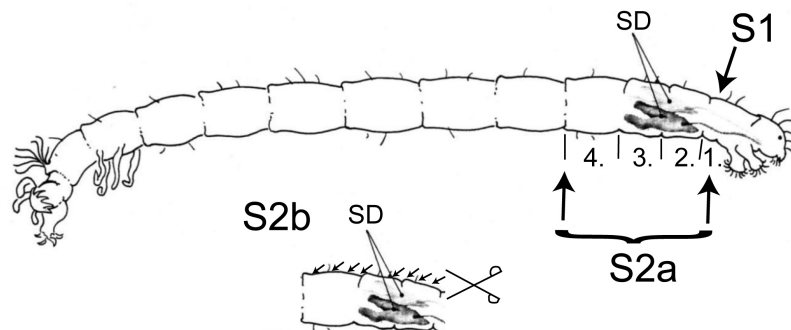


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt die beiden Methoden zur Speicheldrüsenpräparation (Details im Text). Die Segmentnummerierung ist angegeben. Die Pfeile deuten Schnitte an. SD, Speicheldrüsen. S1, S2a und S2b, Schnittführung. Verändert nach [Wieslander, 1994].

de eine Glasschale, in welche tropfnasser Zellstoff eingelegt wurde, über die MatTek-Schale gelegt. Die injizierten und mit PBS oder Hämolymphe überschichteten Speicheldrüsen wurden nie länger als 1 Stunde für Experimente benutzt. Typischerweise wurden die Messungen nach etwa 45 Minuten abgeschlossen. Darauffolgend wurden die Speicheldrüsen erneut unter dem Binokular auf verletzte bzw. milchige Bereiche hin untersucht. Nur Daten von unverletzten Drüsen, die vor bzw. nach der Messung keinerlei Anzeichen für Beschädigungen aufwiesen, wurden weiter prozessiert.

2.2.3 Zellkultur und Lebendzellmessungen

HeLa H2B-GFP Zellen exprimieren stabil ein Histon 2B, das C-terminal mit GFP markiert ist. Diese Zelllinie wurde uns von Prof. Dr. Heinrich Leonhard (LMU, München) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM mit 20 mM HEPES, 10 % fötalem Kälberserum, 5 mM L-Glutamin sowie Penicillin (100 Einheiten/mL), Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und Gentamycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) kultiviert.

Für Lebendzelleexperimente am Mikroskop wurden die Zellen ein oder zwei Tage vor der Messung auf MatTek-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden unmittelbar vor der Messung aus dem Brutschrank entnommen. Sämtliche Messungen wurden nicht länger als 40 Minuten bei Raumtemperatur (20 bis 22 °C) durchgeführt.

2.2.4 Mikroinjektion

Nach der Speicheldrüsenpräparation bzw. der Entnahme der Zellkulturzellen wurde eine Mikroinjektionsnadel mit der zu injizierenden Substanz beladen und in die Halterung des Femtojets (Eppendorf, Hamburg) geschraubt. Die Mikroinjektionsnadel wurde bei Betrachtung der Drüse mit einem 20x-Objektiv über dem zu injizierenden Zellkern positioniert. Zur Injektion wurde die Nadel mit Hilfe des Femtojets manuell in den Zellkern eingebracht. Zur Durchführung der ersten FRAP und FCS-Messungen wurde die zu untersuchende Substanz nun ausschließlich mit einer manuellen Applikation in den Kern eingebracht, indem die CLEAN-Taste der Mikroinjektionsanlage kurz betätigt wurde. Bei den übrigen Experimenten wurde teilweise zu einer automatischen Applikation (Injektionsdruck 522 hPa, Injektionszeit 0.3 s) übergegangen, da so die eingebrachte Injektionsmenge besser zu kontrollieren war. Allerdings konnten mit dieser Methode nur 1 bis 2 Kerne injiziert werden, da die Mikroinjektionsnadel häufig verstopfte (falls dies der Fall war, wurde mit der manuellen Applikation weiterinjiziert). Der Haltedruck wurde in beiden Fällen auf etwa 26 hPa eingestellt. Es wurden grundsätzlich nur Kerne zur Messung ausgewählt, in welche möglichst geringe Substanzmengen injiziert worden waren, da so ein hoher Vereinzelnungsgrad der Signale erreicht werden konnte. Eine Injektion wurde als gut bewertet, wenn beim Injektionsvorgang eine leichte Bewegung der Chromosomen aufgrund der aus der Nadel strömenden Injektionssubstanz zu erkennen war. Wurden zu große Mengen injiziert, so dass während der Injektion eine deutliche Bewegung des gesamten Kerninhalts zu erkennen war, wurde der Kern nicht weiter untersucht, da davon ausgegangen werden musste, dass das nukleäre Milieu durch die Injektion zu stark verändert worden war. Falls während der mikroskopischen Messung Anzei-

chen einer Drüsenverletzung sichtbar wurden, typischerweise durch ein Aufquellen der Zellkerne und/oder eine Änderung der Cytosolbeschaffenheit zu erkennen, so wurde die Speicheldrüse nach Binokularkontrolle verworfen (siehe oben).

Bei Zellkulturzellen wurde ähnlich verfahren, hier wurde jedoch grundsätzlich mit Haltedruck injiziert. Dabei wurden ca. 15 Zellen pro Experiment kurz angestochen und durch den Haltedruck von 26 hPa konnten geringe Probenmengen einströmen.

Tabelle 2.6 gibt eine Übersicht über die Injektionsverdünnungen. Alle Proben wurden in Transportpuffer verdünnt und vor Injektion 20 Minuten bei 22 000 g zentrifugiert.

Bei einigen Experimenten (siehe Ergebnisse) wurde der PBS-Puffer, welcher die Drüse bedeckte, nach der Mikroinjektion wieder abgezogen und die Speicheldrüse wurde vor Beginn der Messung mit 1 bis 2 Tropfen frischer Hämolymphe überschichtet (siehe oben).

Technik	Probe(n)	Verdünnung
FCS	BR2.1 RNA, CTR RNA	1:1000
SPT	BR2.1 RNA	1:300 - 1:400
SPT	BR2.1 MB RNA, CTR MB RNA	1:200 - 1:400
SPT	500 kDa Aminodextran	1:1000
SPT	hrp65(-1)-Domänen	s. Kap. 2.1.7
FRAP	500 kDa FITC-Dextran	0.05 - 1%
FRAP	150 kDa FITC-Dextran	0.01 - 1%

Tabelle 2.6: Konzentration der Injektionslösungen. Siehe Tabellen 2.4 und 2.5 für Probendetails. Verdünnungsangaben beziehen sich auf die Stockkonzentration, die im jeweiligen Unterkapitel angegeben ist. Prozentangaben in Gewicht/Volumen.

2.2.5 Fluorescence Recovery After Photobleaching

Eine grundlegende Beschreibung der Methode, die Fluoreszenzrückkehr nach einer definierten Bleichphase zu messen (engl. *fluorescence recovery after photobleaching* (kurz FRAP)), findet sich in [Axelrod et al., 1976]. Fluoreszenzmarkierte Teilchen werden innerhalb einer Probe in einem definierten, oft kreisrunden Bereich mit hoher Laserintensität geblichen. Die Rückkehr der Fluoreszenz in den geblichenen Bereich durch Diffusion ungeblichener Teilchen aus der Umgebung wird in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Die Form der Kurve und die Geschwindigkeit der Fluoreszenzrückkehr lassen auf den Diffusionskoeffizienten der markierten Teilchen schließen.

Alle FRAP-Messungen wurden an einem konfokalen Mikroskop der Firma Zeiss (LSM 510 META, Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Zur Untersuchung der nukleären Viskosität wurde FITC-Dextran mit 500 oder 150 kDa Molekulargewicht im Speicheldrüsenkern und zum Vergleich in Pufferlösung untersucht. FITC wurde mit der 488 nm Laserlinie angeregt.

Die Durchführung reproduzierbarer, *quantitativer* FRAP-Messungen erfordert eine besonders sorgfältige Abwägung verschiedener Parameter. Alle gewählten Einstellungen wurden nach Braeckmans et al. optimiert und werden im Folgenden erläutert [Braeckmans et al., 2003]. Bei Beach-

tung dieser Vorgaben gelten die unten genannten Gleichungen. Es wurde ein kreisrunder Fleck mit Radius w im Probenfokus geblichen. Ein 20x-Objektiv mit einer geringen numerischen Apertur (NA) von 0.5 wurde gewählt um ein möglichst zylindrisches Bleichprofil durch den Probenraum zu erhalten. Je geringer die NA, desto geringer ist auch die Radiusänderung des Bleichzylinders in z -Richtung. Damit reduziert sich die mathematische Berechnung der Fluoreszenzrückkehr durch Diffusion auf ein zweidimensionales Problem, für welches eine analytische Lösung bekannt ist [Braeckmans et al., 2003]. Die charakteristische Zeit der Fluoreszenzrückkehr τ_r ist für den zweidimensionalen Fall gegeben durch

$$\tau_r = w^2/4D \quad (2.1)$$

wobei D der Diffusionskoeffizient der geblichenen Probenteilchen ist [Soumpasis, 1983]. Um eine aussagekräftige Kurve der Fluoreszenzrückkehr zu erhalten, muss Verschiedenes beachtet werden:

1. Der Bleichfleck muss einen bestimmten Mindestradius aufweisen damit Randeffekte vernachlässigt werden können. Das Profil eines fokussierten Laserstrahls kann durch eine Gaussfunktion mit einer definierten Halbwertsbreite (engl. *full width at half maximum*, kurz *FWHM*) beschrieben werden. *FWHM* wird umso größer, je kleiner die NA des fokussierenden Objektivs ist. Der Bleichbereich ist nur dann näherungsweise zylindrisch, wenn w deutlich größer als *FWHM* ist. In dieser Arbeit wurde $w = 6.5 \mu\text{m}$ gewählt. Da $FWHM = 0.52\lambda/NA$ ist ([Slunder and Wolf, 2007], λ ist die Bleichwellenlänge von 488 nm) ergibt sich für den fokussierten Laserstrahl $FWHM = 510 \text{ nm}$. Damit war w deutlich größer als *FWHM*.
2. Der Bleichvorgang selbst muss deutlich schneller als τ_r abgeschlossen sein, damit der Bleichprozess als instantan angenommen werden kann und nicht mit der Fluoreszenzrückkehr interferiert. Die Geschwindigkeit, mit welcher im konfokalen Mikroskop ein Bereich bestimmter Größe geblichen werden kann, hängt von der Querschnittsfläche dieses Bereichs und damit von w ab. Hier gilt, je kleiner w , desto schneller kann geblichen werden. w kann jedoch nicht beliebig klein gewählt werden (siehe oben). Außerdem kann es je nach Laserleistung nötig sein, den gewünschten Bereich mehrmals hintereinander zu bleichen um eine sichtbare Bleichtiefe zu erreichen, was die Bleichzeit erhöht. Bei $w = 6.75 \mu\text{m}$ dauerte der Bleichvorgang 128 ms.
3. Möglichst direkt nach dem Bleichvorgang muss ein erstes Bild aufgenommen werden, damit die Bleichtiefe korrekt bestimmt werden kann. Generell ist es wichtig mit einer Aufnahmezeit kleiner als τ_r aufzunehmen, da die Fluoreszenzrückkehr sonst nicht abgebildet werden kann. Die Aufnahmedauer eines Bildes hängt im konfokalen Mikroskop insbesondere von der y -Ausdehnung des Aufnahmebereichs ab, da hierdurch die erforderliche Anzahl der Abrasterwiederholungen bestimmt wird. Generell gilt, je kleiner die y -Ausdehnung, desto weniger Rasterschritte nötig, desto schneller die Bildaufnahme. In dieser Arbeit konnte eine Bildaufnahmedauer von 100 ms erreicht werden. Da mit zunehmender Aufnahmezeit auch das

Photobleichen steigt, welches zunehmend mit der Fluoreszenzrückkehr interferiert, wurde abhängig vom zu erwartenden Probendiffusionskoeffizient zwischen den Bildaufnahmen eine Pause von 100 bzw. 250 ms (für das 150 bzw. 500 kDa-Dextran) eingestellt. Somit wurde spätestens alle 350 ms eine neue Aufnahme gestartet. Wenn die Aufnahmezeit beispielsweise mindestens 3 mal kleiner als τ_r sein soll, können damit nach Gleichung 2.1 theoretisch Diffusionskoeffizienten bis zu $35 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($\tau_r = 0.3\text{s}$) gemessen werden. Um möglichst geringe Aufnahmezeiten zu erreichen kann auf eine Verzögerung zwischen einzelnen Bildern ganz verzichtet werden.

4. Die konfokale Detektionsblende wurde vollständig geöffnet, so dass der konfokale Effekt praktisch nicht mehr in Erscheinung trat. Dadurch wurde die Detektionseffizienz deutlich erhöht, so dass entsprechend weniger Anregungslaserleistung nötig war, um ein rauscharmes Bild aufzunehmen. Da durch die niedrige NA des Objektivs im ca. $100 \mu\text{m}$ hohen Speicheldrüsenzellkern ein zylinderförmiges Bleichprofil in z-Richtung entstand, konnte auf den konfokalen Effekt (bzw. eine erhöhte räumliche z-Auflösung) verzichtet werden.
5. Um die Vollständigkeit der Fluoreszenzrückkehr sicher bestimmen zu können, sollte der Prozess über eine Länge von mindestens $10 \tau_r$ abgebildet werden. Es zeigte sich, dass die Länge des Beobachtungszeitraums eine deutliche Auswirkung auf den in der Auswertung ermittelten Wert von τ_r hatte, wenn der Beobachtungszeitraum entweder zu kurz gewählt oder zwischen verschiedenen Messungen geändert wurde. Es wurden daher in dieser Arbeit immer insgesamt 350 Bilder mit den oben gewählten Einstellungen aufgenommen. Um eine Gesamtaufnahmelänge von ungefähr $10 \tau_r$ zu erreichen, wurde lediglich die Pause zwischen zwei Aufnahmen entsprechend variiert (siehe Punkt 3).

Zu Beginn jeder FRAP-Messung wurden 3 Probenbilder vor dem Bleichen aufgenommen. Der darauf folgende Bleichvorgang wurde mit 100 % Laserintensität (AOTF) mit 488 nm durchgeführt. Die Fluoreszenzrückkehr wurde mit nur 0.1 % Laserintensität (AOTF) abgebildet, um Photobleichen während der Aufnahme weitestgehend zu verhindern. Da selbst bei geringer Aufnahmeintensität ein Photobleichen nicht ausgeschlossen werden kann, muss die Intensitätskurve der Fluoreszenzrückkehr bezüglich eines Referenzbereichs normiert werden. Außerdem ist zu beachten, dass der Bleichvorgang in einem kleinen Volumen wie beispielsweise in einem Zellkern, einen Großteil *aller* fluoreszenzmarkierten Teilchen bleichen kann, wodurch schon theoretisch *nie* eine einhundertprozentige Fluoreszenzrückkehr beobachtet werden kann. Für die FRAP-Analyse in den Speicheldrüsenkernen wurde eine Normierung nach [Phair and Misteli, 2001] gewählt:

$$I(t) = \frac{[B(t) - Bg][N_0 - Bg]}{[N(t) - Bg][B_0 - Bg]} \quad (2.2)$$

Hier ist $I(t)$ die normierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit, $B(t)$ die Fluoreszenzintensität der gebleichten Region in Abhängigkeit von der Zeit, Bg der Hintergrund, aufgenommen bei Null Laserintensität, $N(t)$ die Fluoreszenzintensität des gesamten Zellkerns in Abhängigkeit von der Zeit, N_0 die Fluoreszenzintensität des Kerns vor dem Bleichen und B_0 die

Fluoreszenzintensität der Bleichregion vor dem Bleichen.

Referenzmessungen der Proben in Pufferlösungen wurden in einer speziell angefertigten Kammer durchgeführt [Veith, 2007]. Hier war das geblichene Volumen vernachlässigbar klein gegenüber dem ungeblichenen Volumen. Daher konnte eine einfachere Normierung gewählt werden, die nur für ein Photobleichen während der Aufnahme korrigierte:

$$I(t) = \frac{B(t) - Bg}{R(t) - Bg} \quad (2.3)$$

Hier ist $I(t)$ wiederum die normierte Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit, $B(t)$ die Fluoreszenzintensität der geblichenen Region in Abhängigkeit von der Zeit, Bg der Hintergrund und $R(t)$ die Fluoreszenzintensität einer Referenzregion in Abhängigkeit von der Zeit. Die Referenzregion wurde hier nach persönlicher Rücksprache mit Dr. Kevin Braeckmans (Universität Gent, Belgien) in einem Abstand von mindestens $5w$ zur Bleichregion gewählt. Die Bleichregion wurde entsprechend links, die Referenzregion rechts im Bild positioniert. An die normierten Fluoreszenzintensitäten $I(t)$ wurde mit Hilfe von Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) folgende Formel über einen Algorithmus zur Minimierung der Fehlerquadrate angepasst [Braeckmans et al., 2003]:

$$I(t) = e^{-K} + k\{1 + (e^{-K} - 1)[1 - e^{2\tau_r/t}(I_0(2\frac{\tau_r}{t}) + I_1(2\frac{\tau_r}{t}))] - e^{-K}\} \quad (2.4)$$

Hier ist der Parameter K ein Maß für die Bleichtiefe (größeres K entspricht größerer Bleichtiefe), k beschreibt die Vollständigkeit der Fluoreszenzrückkehr ($k = 1$ bedeutet 100%, $k = 0$ bedeutet 0% Fluoreszenzrückkehr) und I_0 und I_1 sind Besselfunktionen 0. und 1. Ordnung [Braeckmans et al., 2003].

2.2.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) misst die Aufenthaltsdauer fluoreszenzmarkierter Teilchen in einem konfokalen Volumenelement. Damit kann auch diese Technik zumindest hinsichtlich ihrer Detektionsmöglichkeiten zur Einzelmolekülmikroskopie gezählt werden. Ein guter Überblick über die Grundlagen der Technik findet sich in [Bulsecu and Wolf, 2007].

Das konfokale Volumenelement entsteht, indem ein Laserstrahl so in das Mikroskop eingekoppelt wird, dass er die hintere fokale Ebene des Objektivs möglichst komplett ausfüllt. Dadurch wird der Laserstrahl vom Objektiv im Idealfall beugungsbegrenzt in die Probe fokussiert. Fluoreszenzmarkierte Probenmoleküle, welche sich durch den fokussierten Laserstrahl bewegen, werden angeregt und emittieren rotverschoben Fluoreszenzlicht. Durch die konfokale Anordnung einer Detektionslochblende werden Photonen von Probenmolekülen, die nicht im Fokus emittiert wurden, abgeblockt. So entsteht ein Detektionsvolumen definierter Größe im Femtoliterbereich, dessen Form durch ein Ellipsoid mit einem e^{-2} -Radius(x/y) von w_0 und einem e^{-2} -Radius(z) von z_0 angenähert werden kann. Die Größe dieses Detektionsvolumens wird typischerweise mit einer

Probe, deren Diffusionskoeffizient genau bekannt ist, bestimmt.

Die vom fluoreszenzmarkierten Probenmolekül emittierten Photonen werden von einem möglichst sensitiven Detektor registriert. Hierbei handelt es sich meistens um eine Avalanche Photodiode (APD). Diese zeichnet die Photonenzahl bzw. die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Zeit auf. Die Autokorrelation der Intensitätsspur $I(t)$ erfolgt durch die Hardware des FCS-Systems nach

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (2.5)$$

wobei $G(\tau)$ die Autokorrelationsfunktion ist, τ die Korrelationsvariable und $\langle \rangle$ den Mittelwert kennzeichnet. Außerdem ist $\delta I(t) = I(t) - \langle I \rangle$, d.h. die Abweichung der Intensität $I(t)$ vom Mittelwert der Intensitätsspur $\langle I \rangle$. An die erhaltene Autokorrelationsfunktion kann ein Modell für die dreidimensionale Diffusion mehrerer Komponenten x mit Triplettanteil T angepasst werden:

$$G(\tau) = 1 + (1 + \frac{T}{1-T} e^{-\tau/\tau_T}) \sum_{j=1}^x \frac{f_j}{N} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,j}}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,j} \kappa^2}}} \quad (2.6)$$

Hierbei sind τ die Korrelationsvariable (oder Verschiebezeit), $\tau_{D,j}$ die charakteristische Diffusionszeit der Komponente j , τ_T die Triplettzeit, f_j der Anteil der Diffusionskomponente j , N die mittlere Teilchenanzahl im Detektionsvolumen und $\kappa = z_0/w_0$ der Strukturparameter. Gleichung 2.6 wird über einen Algorithmus zur Minimierung der Summe der Fehlerquadrate an die gemessenen Autokorrelationskurven angepasst. $\tau_{D,j}$ hängt über

$$D_j = \frac{w_0^2}{4\tau_{D,j}} \quad (2.7)$$

direkt mit dem Diffusionskoeffizienten D_j der Probenmoleküle zusammen.

Sämtliche FCS-Messungen in dieser Arbeit wurden an einem ConfoCor 1 der Firma Zeiss durchgeführt. Der Laser (Emissionswellenlänge 633 nm) wurde mit einem Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss C-Apochromat, 63x/1.2) in die Probe fokussiert. Die Laserleistung des gesamten Lichtstrahls nach Austritt aus dem Objektiv betrug ca. 5 μ W.

Zur Kalibration des Probenvolumens wurden typischerweise 10 Autokorrelationskurven einer fluoreszierenden Referenzlösung aufgenommen. Diese wurden dann jeweils frei, d.h. ohne vorab Parameter festzulegen mit Gleichung 2.6 angepasst, wobei $x = 1$ gesetzt wurde. Als Referenzlösung diente Atto647N-Maleimid in Puffer (molare Masse 870 Da). Der Diffusionskoeffizient für Atto655-Maleimid (810 Da) wurde bereits mit hoher Präzision zu 400 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ bestimmt [Müller et al., 2008]. Der mit dem im Rahmen dieser Arbeiten verwendeten FCS-Gerät ermittelte τ_D -Wert von Atto-647N-Maleimid betrug 63 μs , der von Atto655-Maleimid 62 μs . Da beide Farbstoffe vergleichbare Molekulargewichte aufweisen, wurde im Rahmen der Genauigkeit der FCS-Messungen auch für Atto647N-Maleimid ein Diffusionskoeffizient von 400 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ angenommen. κ lag typischerweise bei 5. Damit ergaben sich nach Gleichung 2.7 folgende Werte für die Dimensionen des Detektionsellipsoids: $w_0 = 320$ nm und $z_0 = 1600$ nm. Die ermittelten Triplett-

zeiten und -anteile streuten breit und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter beachtet. Um die Autokorrelationskurven der BR2.1 RNA bzw. der CTR RNA Proben anzupassen wurden zwei oder drei Mobilitätskomponenten ($x = 2$ oder 3 in Gleichung 2.6) benötigt. Dabei zeigte sich, dass eine dieser Komponenten meist eine Korrelationszeit im Bereich von $\tau_D = 20 - 80 \mu\text{s}$ aufwies. Da diese Korrelationszeit im Bereich der Diffusion von freiem Farbstoff in Wasser (siehe oben) oder schneller liegt, kann sie nicht diffusionsbedingt entstanden sein. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass sie von einem langsamen Triplettübergang des Atto647N-Farbstoffs hervorgerufen wird. Diese Komponente wurde hier als gegeben hingenommen und nicht weiter analysiert. Um den Diffusionskoeffizient freier Oligonukleotide in Puffer zu bestimmen, wurde eine Lösung spezifischer und unspezifischer Oligonukleotide mit einer Verdünnung von 1:100 000 (von der Stocklösung) in einer MatTek-Schale vermessen. Um die Adsorption der geladenen Oligonukleotide an die Deckglasoberfläche zu reduzieren, wurde das Deckglas der MatTek-Schalen vor der Messung 10 Minuten mit einer 1 %-igen BSA-Lösung inkubiert, welche vor Zugabe der Oligonukleotidlösung mit destilliertem Wasser abgespült wurde. Nach Zugabe von $350 \mu\text{L}$ Oligonukleotidlösung auf das Deckglas wurde die Lösung mit einem zweiten Deckglas abgedeckt, um die Verdunstung zu reduzieren.

Bei den Oligonukleotidmessungen in Puffer wurde eine sehr schnelle Komponente mit einem hohem Anteil von $> 90 \%$ und eine um einen Faktor 10 langsamere Komponente mit kleinem Anteil ermittelt. Letztere wies eine deutlich höhere Helligkeit auf, weshalb angenommen werden konnte, dass es sich hierbei um Aggregate von Oligonukleotiden handelte, die möglicherweise an hydrophobe BSA-Aggregate mit einem langsamen Diffusionskoeffizienten gebunden hatten. Im Falle des Auftretens von 2 Mobilitätskomponenten in der Autokorrelationsfunktion mit unterschiedlichen Helligkeiten q_1 und q_2 gilt

$$\frac{f_1^P}{f_2^P} = \left[\frac{q_2}{q_1}\right]^2 \frac{f_1}{f_2} \quad (2.8)$$

wobei f_1^P und f_2^P die relativen Anteile der Partikel sind, wie sie tatsächlich in Lösung vorliegen und f_1 und f_2 die relativen Anteile der Komponenten sind, wie sie (gewichtet mit der jeweiligen Helligkeit q) in der Autokorrelationskurve ermittelt werden [Wolf, 2010]. Da hier die Aggregate eine deutliche höhere Helligkeit aufwiesen, kann davon ausgegangen werden, dass ihr Anteil an der Population aller Partikel vernachlässigt werden kann. So ergibt sich bei einer 5-fachen Helligkeit der Aggregate (d.h. $q_2/q_1=5$) und einem in der Autokorrelation ermittelten Verhältnis von f_1/f_2 von 90:10 ein tatsächlicher Anteil der langsamen Komponente 2 von nur 0.4%, so dass diese vernachlässigt werden kann.

2.2.7 Fluoreszenz-Videomikroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Video-Mikroskopie kann die Mobilität fluoreszenzmarkierter Proben untersucht werden. Eine umfangreiche Beschreibung findet sich im 81. Band der *Methods in Cell Biology - Digital Microscopy* [Slunder and Wolf, 2007]. Eine speziellere Beschreibung des hier verwendeten Mikroskops findet sich in [Siebrasse et al., 2007]. Zur Probenbeleuchtung dienten ein oder mehrere Laser mit Ausgangsleistungen von typischerweise 10 bis 100 mW. Die Proben-

beleuchtung wurde durch einen AOTF gesteuert. Hier wurden ein Laser mit den Wellenlängen 491 und 532 nm (Cobolt Dual Calypso, 100 mW, Cobolt AB, Solna, Schweden) und ein Laser mit der Wellenlänge 635 nm (Coherent CUBE, 25 mW, Coherent GmbH, Dieburg) verwendet. Die Laserstrahlen wurden vor der Einkopplung in das Mikroskop über ein Teleskop aufgeweitet, damit der Strahldurchmesser durch eine Feldblende hinter der Teleskopoptik reguliert werden konnte. Der kollimierte Strahl wurde dann in die hintere fokale Brennebene des Mikroskopobjektivs fokussiert. So wurde gewährleistet, dass der Strahl die Probe ebenfalls kollimiert durchquerte und den auf der Kamera sichtbaren Probenbereich möglichst vollständig ausleuchtete. Die Regulation des Strahldurchmessers mit Hilfe der Blende ist wichtig, um eine Ausleuchtung des Probenbereichs über die Kameradetektionsfläche hinaus zu verhindern. Da die markierten Proben meist nur wenige Fluoreszenzfarbstoffmoleküle als Markierung tragen ist es angebracht eine unnötige Bestrahlung der Probe in nicht aufnahmerelevanten Bereichen zu verhindern (Photobleichen). Die Detektion der von der Probe emittierten Fluoreszenz erfolgte über eine Kamera. Die Qualität der Kamera bestimmt hier, wie schnell und lichtsensitiv Aufnahmen erfolgen können. Hier wurde eine elektronenvervielfachende (engl. *electron multiplying*) CCD-Kamera der Firma Andor (Ixon DV860DCS-BV, Andor Technology, Belfast, Großbritannien) verwendet. Dieser Kameratyp ist für sehr lichtschwache Aufnahmen geeignet [Rasnik et al., 2007]. Die Verwendung eines kleinen Kamerachips mit 128 mal 128 Pixeln (Pixelgröße 24 mal 24 μm^2) ermöglicht Aufnahmeraten bis zu 1 000 Hz. Typischerweise wurden hier Aufnahmeraten von ungefähr 100 oder 200 Hz genutzt. Die genauen Aufnahmeraten sind bei den jeweiligen Experimenten im Ergebnisteil angegeben. Die Kamera wurde grundsätzlich im sogenannten „frame transfer“-Modus betrieben. Typischerweise wurden die folgenden Einstellungen für den Betrieb der Kamera benutzt (die Begriffe sind spezifisch für die Kamerasoftware):

- „PreAmplifier Gain“ 11x
- „vertical shift speed“ 1.7
- „horizontal readout rate“ 3 Mhz (bei ca. 100 Hz), 5 Mhz (bei ca. 200 Hz)
- „exposure time“ 10 ms (entsprechend 97.847 Hz Aufnahmerate) oder 5 ms (entsprechend 191.57 Hz Aufnahmerate)
- „EM gain“ 200 - 250

Die Laserbeleuchtung wurde über eine Elektronik so gesteuert, dass der Laser die Probe nur zu den Belichtungszeiten der Kamera bestrahlt, nicht aber während der Auslesezeit der einzelnen Bilder.

Die Ausleserate (d.h. „horizontal readout rate“) wurde für eine gegebene Aufnahmezeit so gering wie möglich gewählt, um unnötiges Ausleserauschen zu vermeiden. Der Lüfter der Kamera wurde nicht genutzt, da er störende Vibrationen verursacht. Der Kamerachip wurde durch ein wassergekühltes Peltier-Element auf -80°C gekühlt.

Unmittelbar hinter dem Objektiv wurden sogenannte Notch-Filter (optische Dichte 6) positioniert, welche den größten Teil des reflektierten Laseranregungslichts absorbieren und so Kamera

und menschliches Auge vor den Gefahren intensiver Laserstrahlung schützen.

Eine gute Übersicht über die Detektionswahrscheinlichkeit eines einzelnen von der Probe emittierten Photons gibt [Rasnik et al., 2007]. Es wird deutlich, dass in einem zur Einzelmolekülmikroskopie befähigten Mikroskop nur so viele optische Komponenten wie gerade notwendig verbaut werden sollten, da keine Komponente eine einhundertprozentige Transmission aufweist. Großen Einfluss auf die Detektionswahrscheinlichkeit eines emittierten Fluoreszenzphotons hat man besonders durch die Wahl einer Kamera mit hoher Detektionsquanteneffizienz und durch die Wahl eines Objektivs mit hoher numerischer Apertur (NA). Die detektierte Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur NA^4 [Salmon et al., 2007]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein 63x-Wasserobjektiv mit einer NA von 1.2 verwendet.

Das Nyquist-Theorem besagt, dass die Kameraauflösung mindestens doppelt so hoch sein muss wie die optische Auflösung, damit keine Auflösungsinformationen verloren gehen. Zwischen Objektiv und Kamera befand sich daher außerdem in den ersten Experimenten eine 4x-Vergrößerung, später eine 2.5x-Vergrößerung. So wurde sichergestellt, dass die Kameraauflösung mindestens der doppelten optischen Auflösung entsprach: es wurden bildseitige Pixelgrößen von 95.2 nm (4x) oder 152.4 nm (2.5x) erreicht, wobei die zu erwartende optische Auflösung r_{opt} bei einer Emissionswellenlänge λ_{em} von 650 nm (nach $r_{opt} = 0.61\lambda_{em}/NA$) 300 nm betrug. Der Übergang zur 2.5x-Vergrößerung hatte außerdem den Vorteil, dass sich das Signal-zu-Rausch-Verhältnis deutlich verbesserte, da nun ein größerer Probenbereich pro Pixel abgebildet wurde, wodurch mehr Photonen pro Pixel detektiert werden konnten.

Das Mikroskop befand sich in einem klimatisierten Raum, die Angabe *Raumtemperatur* bei den Experimenten bezieht sich also auf ca. 20 °C.

2.2.8 Einzelpartikeltracking

Eine detaillierte Beschreibung des Einzelpartikeltrackings findet sich in [Siebrasse et al., 2007] und [Kubitscheck et al., 2009]. Im Folgenden soll daher nur eine zusammenfassende Beschreibung gegeben werden.

Die aufgenommenen Filme wurden zur Bestimmung der Partikeltrajektorien mit DiaTrack 3.03 PRO (<http://www.semasopt.com/>) analysiert. Nach Einlesen eines zu analysierenden Films wurde über „subtract background“ der Hintergrund abgezogen. Über die Option „Filter data“ wurden die Daten außerdem mit einem Gaussfilter geglättet. Hier lieferte ein Wert von 1.2 bis 1.4 meistens die besten Ergebnisse. „Find particles“ initialisierte die Suche nach lokalen Intensitätsmaxima im aktuellen Bild des Films. Über „Trash dim“ wurde die Detektionsschwelle so eingestellt, dass möglichst alle Partikelsignale detektiert werden konnten. Im Zweifelsfall wurde die Detektionsschwelle auf Kosten der Detektionsquantität erhöht, um die Detektion artifizierlicher Rauschsignale zu vermeiden. Überlicherweise lieferten Werte zwischen 25 und 35 hier die besten Ergebnisse, meist musste der gewählte Wert jedoch selbst bei Analyse von mehreren Filmen derselben Probe bei jedem Film leicht angepasst werden. Es war daher wichtig die automatisiert ablaufende Signalsuche ständig visuell zu kontrollieren. Zudem wurde der „High Precision mode“ aktiviert, um die Nanolokalisation der Partikelsignale über Anpassen einer Gaussfunktion auto-

matisiert durchzuführen [Kubitscheck et al., 2002]. Über „Process next frames“ wurde dann die Suche nach Partikelsignalen mit den gewählten Einstellungen für den gesamten Film gestartet. Nach abgeschlossener Suche und Nanolokalisierung der Partikelpositionen wurde über „Track!“ die Routine zur Verknüpfung der Einzelpunkte zu Trajektorien gestartet. Die maximal zulässige Sprungdistanz r_{max} , die ein Partikel zwischen zwei verschiedenen Bildern im Film zurücklegen kann, lässt sich über die Formel $r_{max} = 2RMS = 2\sqrt{4Dt}$ abschätzen [Veith, 2007]. Hierbei ist RMS die Standardabweichung der Gausskurve der Sprungweitenverteilung für Partikel, die in zwei Dimensionen frei diffundieren, D ist der Diffusionskoeffizient und t die Aufnahmezeit. Je größer der Faktor vor RMS gewählt wird, desto mehr potentielle Sprünge werden detektiert, dies jedoch auf Kosten der Detektionsqualität, da mit größerem r_{max} auch Falschzuweisungen wahrscheinlicher werden. Es zeigte sich, dass der Faktor 2 (korrespondierend zu 95.6% aller Sprünge bei gegebenen D und t) ausreichend ist. Der Diffusionskoeffizient D musste ebenfalls abgeschätzt werden oder war aus vorangegangenen Experimenten bekannt. Eine einfache Abschätzung kann grundsätzlich mittels der Stokes-Einstein-Gleichung erfolgen:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (2.9)$$

Hier ist k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur in Kelvin, η die Viskosität und r_H der hydrodynamische Radius des Teilchens. Wurde r_{max} zu klein gewählt, zeigte sich das an einem abrupt endenden statt asymptotisch zur Abszisse auslaufenden Sprungweitenhistogramm. In diesem Fall wurde mit einem größeren r_{max} erneut getrackt.

Die Trajektorien wurden als Textdatei exportiert und in Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) weiter analysiert.

Um statt der gefilterten die absoluten Intensitätswerte der detektierten Signale zu erhalten, wurde die entsprechende Einstellung unter „Optionen“ aktiviert und außerdem das standardmäßig eingestellte „Bleach compensation“ ausgestellt. So konnten die absoluten Intensitätswerte der detektierten Partikel an der zentralen Position der angepassten 2D-Gaussfunktion als MatLab-Datei exportiert werden.

2.2.9 Trajektorienanalyse

2.2.9.1 Sprungweitenhistogramme

Die Beweglichkeit mobiler Probenpartikel kann mit Hilfe einer Sprungweitenanalyse beschrieben werden. Details zur Ableitung finden sich in [Veith, 2007] und [Kues, 2001]. Die Wahrscheinlichkeit $p(r,t)$ einen Partikel mit dem Diffusionskoeffizienten D , welcher im Ursprung startet, in einem Abstand zwischen r und $r + dr$ nach einer Zeit t anzutreffen, ist für eine 2D-Diffusion gegeben durch:

$$p(r,t)dr = \frac{1}{2Dt} e^{-r^2/4Dt} r dr \quad (2.10)$$

Diese Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion kann über ein Histogramm über die Distanzen (Sprungweiten), welche die Partikel nach der Zeit t zurückgelegt haben, angenähert werden. Typischerweise wurde das sogenannte JD1-Histogramm (engl. *Jump Distance 1*-Histogramm) analysiert. Hier gehen alle Sprünge (Distanzen) ein, die die Partikel zwischen zwei unmittelbar aufeinanderfolgenden Bildern zurücklegen. t ist hier also gleich der einfachen Aufnahmezeit (daher JD1). Nur wenn die untersuchten Probenpartikel frei diffundieren (reine Brownsche Molekularbewegung) lässt sich Gleichung 2.10 sinnvoll an das Sprungweitenhistogramm anpassen. Komplexere Beweglichkeiten, wie sie typischerweise durch die heterogene Struktur biologischer Gewebe hervorgerufen werden können, erfordern die Annahme mehrerer Mobilitätskomponenten (siehe z.B. [Siebrasse et al., 2008]). Die erweiterte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion $p'(r,t)$ für mehrere Mobilitätskomponenten lautet

$$p'(r,t)dr = \sum_{j=1}^x \frac{f_j}{2D_j t} e^{-r^2/4D_j t} r dr \quad (2.11)$$

Hier ist x die Anzahl der Komponenten, mit $x \leq 3$, und f_j der relative Anteile der jeweiligen Beweglichkeitskomponente, mit $\sum_j f_j = 1$. Gleichung 2.11 wurde mit Origin 8 an die experimentellen Sprungweitenhistogramme angepasst, wobei diese zuvor von absoluten Häufigkeiten in relative Häufigkeitsdichten konvertiert wurden, indem jede Klasse durch ihre Breite in μm (= Häufigkeitsdichte) und durch die Gesamtzahl der Sprünge (= relativ) geteilt worden war. Die Aufnahmezeit t wurde konstant gehalten. Anhand der Residuen (Differenz der angepassten Kurve von den Originaldaten) wurde entschieden ob die Anzahl der benötigten Komponenten verändert werden musste.

2.2.9.2 Das mittlere Verschiebungsquadrat

Von den verschiedenen gängigen Analysemethoden um Partikeltrajektorien in biologischen Geweben zu untersuchen, ist die Analyse des mittleren Verschiebungsquadrats (engl. *mean square displacement*, MSD) die bekannteste. Die Auftragung des MSD gegen die Zeit zeigt für verschiedene Bewegungsmodi einen charakteristischen Verlauf (Abb. 2.2). Grundsätzlich werden freie Diffusion (freie Diff.), Diffusion mit Fluss (Diff.+Fluss), eingeschränkte Diffusion (eingeschr. Diff.) und anomale Diffusion (anom. Diff.) unterschieden (die jeweiligen Gleichungen für hier nicht relevante Bewegungsmodi finden sich in [Saxton and Jacobson, 1997]). Für freie Diffusion gilt die Beziehung

$$\langle r^2 \rangle_{2D} = 4Dt \quad (2.12)$$

wobei $\langle r^2 \rangle_{2D}$ das mittlere Verschiebungsquadrat für den Fall zweidimensionaler Diffusion, D der Diffusionskoeffizient und t die Zeit ist. Die 3. Dimension wird nicht beachtet, da es bei der Videomikroskopie zu einer Projektion der dreidimensionalen Partikelbewegung auf die zweidimensionale Kameraoberfläche kommt [Kues, 2001]. Eine detailliertere Beschreibung der Ableitung des MSD-Verlaufs bei freier Diffusion findet sich in [Berg, 1993] (Zusammengefasst in [Veith, 2007]).

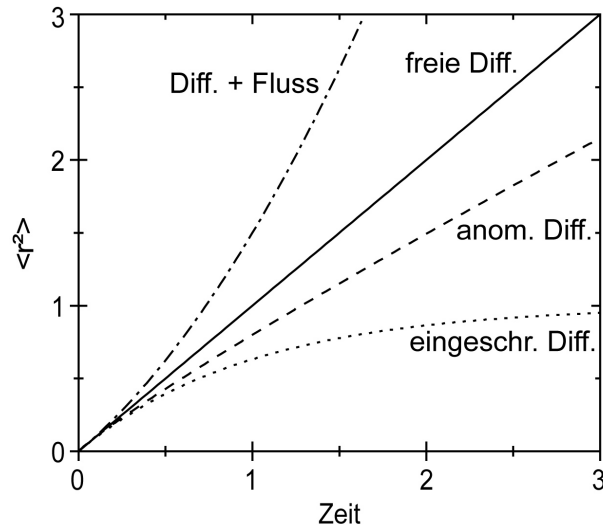


Abbildung 2.2: Zeitabhängige MSD-Verläufe für verschiedene Bewegungsmodi nach [Saxton and Jacobson, 1997]. Siehe Text für Details. $\langle r^2 \rangle$, MSD.

Der einfache lineare Zusammenhang zwischen MSD und der Zeit gilt in komplexen biologischen Systemen mit einer heterogenen lokalen Struktur selten. Für die anomale Diffusion gilt

$$\langle r^2 \rangle_{2D} = 4Dt^\alpha \quad (2.13)$$

wobei $\alpha < 1$ ist. Ein solcher nicht-linearer MSD-Verlauf, welcher klar von einem asymptotisch verlaufenden MSD der eingeschränkten Diffusion unterschieden werden kann, gibt Hinweise auf eine der Bewegung zugrundeliegende Wechselwirkung der Partikel mit Probenstrukturen [Saxton, 2007, Saxton, 2008].

Gegeben sei eine Trajektorie der Länge N mit i einzelnen Positionen $[x_i, y_i]$. Typischerweise wird der m te MSD-Punkt berechnet, indem die Distanz zwischen jeweils zwei Trajektorienpositionen $[x_i, y_i]$ und $[x_{i+m}, y_{i+m}]$ ermittelt und diese dann quadriert wird. Pro Trajektorie erfolgt dies für alle Trajektorienpunkte mit dem Abstand m . Entsprechendes wird für alle Trajektorien wiederholt. Zuletzt wird über alle quadrierten m -ten Distanzen gemittelt, um den m -ten MSD-Punkt zu erhalten.

Werden Partikelpopulationen mit unterschiedlichen Beweglichkeiten untersucht, ist bei der Berechnung des mittleren Verschiebungsquadrats Vorsicht geboten, um eine Übergewichtung langer und damit langsamer Trajektorien ausschließen zu können [Veith et al., 2010]. Insbesondere sollte in diesem Fall die oben beschriebene Berechnung so nicht durchgeführt werden (siehe unten). Grundsätzlich ist bekannt, dass durch eine endliche Tiefenschärfe (engl. *depth of field*) der mikroskopisch sichtbare Probenbereich in z-Richtung deutlich eingeschränkt ist. Partikel, die permanent oder bei Wechsel des Beweglichkeitsmodus kurzzeitig einen schnellen Diffusionskoeffizienten aufweisen, verlassen die fokale Ebene schneller als Partikel mit einem relativ dazu langsamen Diffusionskoeffizienten [Siebrasse et al., 2008]. Folgendes Beispiel soll verdeutlichen, warum es bei klassischer Berechnung des MSD im Falle heterogener Partikelpopulationen zu einer immen-

sen Übergewichtung langsamer Trajektorien kommt:

100 Trajektorien seien in einem Film mit 1000 Bildern (999 Zeitschritten) gemessen worden. 99% dieser Trajektorien zeigen eine schnelle freie Diffusion mit einem Diffusionskoeffizienten von beispielsweise $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Nach 11 Zeitschritten sei angenommen, haben die zugehörigen Partikel den Fokusbereich verlassen. Die verbleibende *eine* Trajektorie hingegen zeigt eine Bindung im Fokus und verlässt den Fokusbereich während der gesamten 1000 Bilder des Films nicht. Bei der Berechnung des beispielsweise 10. MSD-Punkts würden die 99 schnellen Trajektorien jeweils *einmal* zum Wert des MSD an diesem Punkt beitragen, insgesamt mit 99 Werten. Die *eine* „bindende“ Trajektorie würde jedoch mit 989 Werten zum 10. MSD-Punkt beitragen. Insofern wird ersichtlich, dass es hier zu einer deutlichen Übergewichtung der einzelnen langsamen Trajektorie kommt. Dieses Artefakt fällt umso mehr ins Gewicht je unterschiedlicher die Diffusionskoeffizienten der Partikelpopulationen sind und je weiter der MSD berechnet wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der MSD daher so berechnet, dass eine Übergewichtung von Trajektorien ausgeschlossen ist, indem jede Trajektorie nur *einmal* zum m -ten MSD-Punkt beiträgt. Um dies zu erreichen, wurde zu Beginn der Auswertung entschieden bis zu welchem Punkt $M - 1$ der MSD berechnet werden sollte. Daraufaufgehend wurden nur solche Trajektorien mit einer Mindestlänge $N \geq M$ ausgewählt. Der m -te MSD-Punkt mit $m < M$ wurde dann berechnet indem die Abstände zwischen dem jeweiligen Trajektorienstart und Punkten $[x_m, y_m]$ ermittelt, quadriert und gemittelt wurden. So trägt jede Trajektorie nur einmal zu jedem m -ten MSD-Punkt bei und eine Übergewichtung langer, meist langsamer Trajektorien wird ausgeschlossen (siehe auch [Veith et al., 2010]).

2.2.9.3 Monte Carlo Simulation: Diffusion mit mehreren Komponenten

Um die Ursache des Auftretens mehrerer Mobilitätskomponenten in den Experimenten zu verstehen, wurde mit Matlab (The MathWorks, Natick, MA, USA) eine Monte Carlo Simulation programmiert. Trajektorien konnten mit einer variablen Zeitauflösung t und einem Diffusionskoeffizienten D_1 simuliert werden. Um die Distanz zwischen aufeinanderfolgenden Partikelpositionen, beispielsweise $[x_1, y_1]$ und $[x_2, y_2]$, zu ermitteln, wurden jeweils unabhängig für die x- und y-Bewegung Zufallszahlen Δx und Δy aus einer Normalverteilung mit der Standardabweichung $\sqrt{4D_1 t}$ gezogen, welche dann zur letzten Partikelposition addiert wurden: $x_2 = x_1 + \Delta x$ und $y_2 = y_1 + \Delta y$. Der Trajektorienstart wurde auf $[0,0]$ festgelegt. Die Trajektorienlänge N betrug typischerweise mehr als 1000 Positionen, um eine ausreichende Statistik für folgende JD- bzw. MSD-Analysen zu gewährleisten.

Um einen Wechsel der Partikelbeweglichkeit zu einem anderen Diffusionskoeffizienten D_2 zu simulieren, wurden Wahrscheinlichkeiten festgelegt, die die Häufigkeit eines solchen Übergangs bestimmten. Vor jedem Sprung zu einer neuen Position $[x_i, y_i]$ wurde eine gleichverteilte Zufallszahl Z zwischen 0 und 1 gezogen. $p(on)$ und $p(off)$, d.h. die Wahrscheinlichkeiten den Diffusionskoeffizienten von D_1 zu D_2 zu wechseln bzw. von D_2 zurück zu D_1 , wurden so gewählt, dass sie zwischen 0 und 1 liegen, wobei 0 bedeutete dass der Wechsel ausgeschlossen ist und 1, dass der Wechsel auf jeden Fall stattfindet. Wenn $Z < p(on)$ bzw. $Z < p(off)$ war, kam es zu einem

Wechsel des Diffusionskoeffizienten.

Um den Effekt der Lokalisierungsungenauigkeit auf die Sprungweitenverteilung zu untersuchen, wurden die simulierten sog. „realen“ Positionen künstlich „verwischt“. Dazu wurde zu jeder realen Position sowohl in x als auch in y jeweils eine Zufallszahl aus einer Normalverteilung mit dem Mittelwert Null und einer frei wählbaren Standardabweichung σ gezogen. σ ist hierbei die Lokalisierungsungenauigkeit (s. Kap. 3.2). Diese Zufallszahlen wurden dann jeweils zu der realen x - und y -Position addiert. Der nächste Diffusionsschritt innerhalb einer Trajektorie erfolgte jedoch immer ausgehend von der letzten realen Partikelposition.

Für jede Position wurde diese Prozedur automatisch wiederholt und so wurden Trajektorien generiert, deren reale und deren (eindeutig definierte) verwischte Positionen bekannt waren.

2.2.9.4 Die diskontinuierliche Partikeldiffusion

Oft erfordert die Sprungweitenanalyse das Anpassen von zwei verschiedenen Diffusionskoeffizienten D_1 und D_2 , um die Daten adäquat zu beschreiben. Falls es sich tatsächlich um zwei reale Diffusionskoeffizienten (siehe Kap. 2.2.9.5) handelt, beispielsweise durch Partikel deutlich unterschiedlicher Größe, sind zwei Szenarien denkbar:

- Die Diffusionskoeffizienten stammen aus zwei verschiedenen, nicht ineinander überführbaren Partikelpopulationen.
- Die beiden Diffusionskoeffizienten stammen aus nur einer Partikelpopulation, deren einzelne Partikel sich „diskontinuierlich“ bewegen. Dies bedeutet, dass die Partikel ihren Diffusionskoeffizienten innerhalb einer Trajektorie ändern können, z.B. durch eine transiente Bindung an andere mobile Objekte.

Um diese beiden Fälle unterscheiden zu können, wurde eine Analysemethode entwickelt (siehe auch [Siebrasse et al., 2008]). In Abbildung 2.3 A ist ein simuliertes Sprungweitenhistogramm zu sehen, an welches Gleichung 2.11 mit zwei Diffusionskoeffizienten angepasst wurde: $D_1 = 0.31 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_2 = 0.77 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Distanzen zwischen zwei benachbarten Trajektorienpunkten, die größer als (hier) 250 nm sind, werden praktisch nur von Partikeln zurückgelegt, die mit D_2 diffundieren, wie die gestrichelte Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion zeigt. Für Partikel, die mit D_1 diffundieren, wird es mit zunehmender Sprungdistanz immer unwahrscheinlicher eine solche Distanz zurückzulegen. Ob *zwei* Partikelpopulationen mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten vorliegen oder aber nur *eine* Partikelpopulation mit einem Wechsel der Diffusionskoeffizienten vorliegt, kann anhand der innerhalb *einzelner* Trajektorien vorkommenden Sprungweiten unterschieden werden. Aus allen experimentell ermittelten Trajektorien werden nur solche ausgewählt, die Sprünge von (hier) $\gg 250$ nm aufweisen, d.h. Sprungweiten, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von Partikeln stammen, die mit D_2 diffundieren. Anhand des Sprungweitenhistogramms lässt sich ein solcher Grenzwert ermitteln, der die genannte Bedingung erfüllt. Allerdings darf dieser Wert nicht zu groß ist, da eine gewisse Wahrscheinlichkeit bestehen muss, dass Partikel, die mit D_2 diffundieren noch ausgewählt werden. Hier wurde ein Selektionswert von 425 nm gewählt, welcher

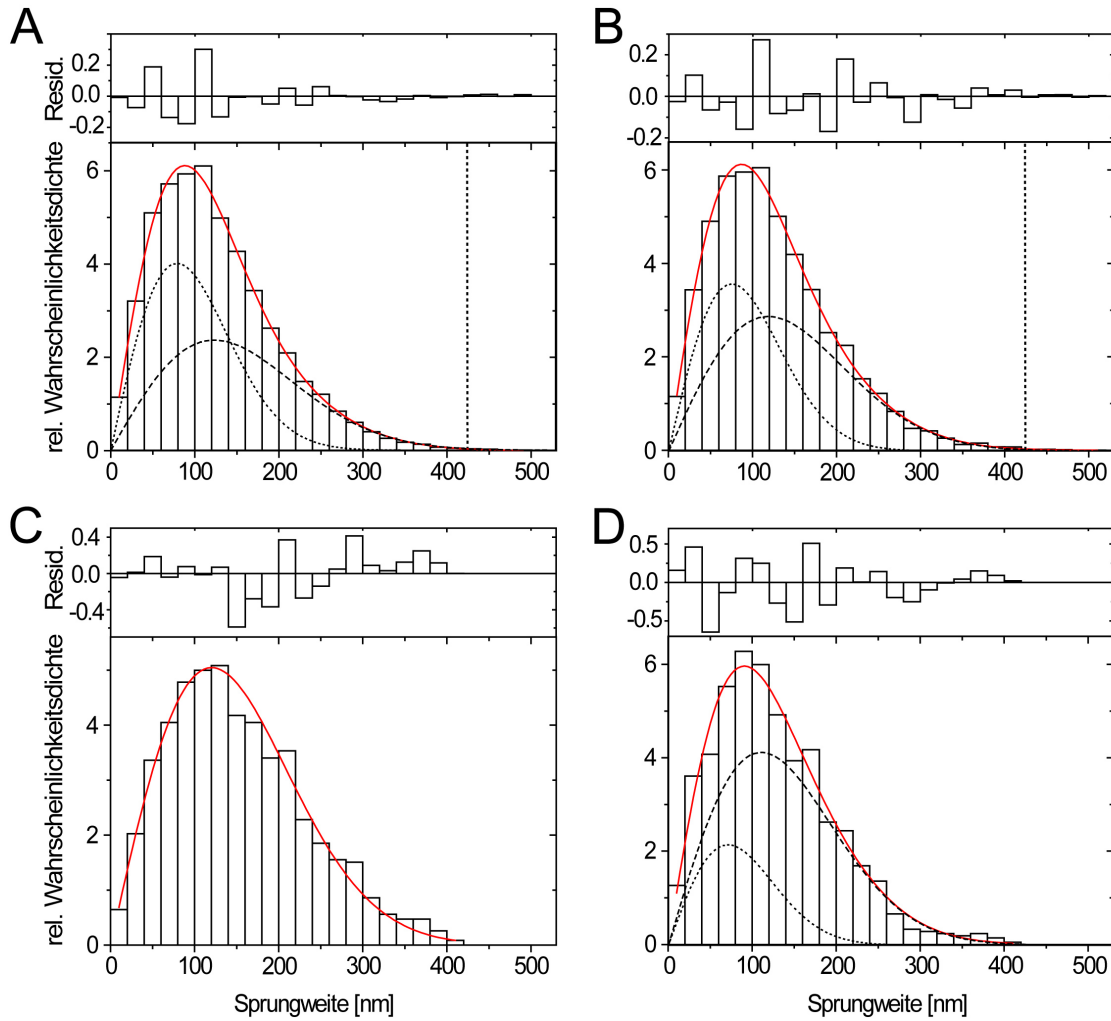


Abbildung 2.3: Sprungweitenanalyse zur Überprüfung diskontinuierlicher Partikeldiffusion. (A) Simulation von zwei unterschiedlichen Partikeltypen mit verschiedenen Diffusionskoeffizienten. Der Fit ergab: $D_1 = 0.31 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gepunktete Kurve) und $D_2 = 0.77 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gestrichelte Kurve). Sprungweiten von 425 nm und mehr (vertikale Linie) werden praktisch nur von Partikeln absolviert, die mit D_2 diffundieren. (B) Simulation eines Partikeltyps, welcher den Diffusionskoeffizient von $D_1 = 0.28 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gepunktete Kurve) zu $D_2 = 0.70 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gestrichelte Kurve), bzw. umgekehrt, ändern konnte. Nach Filtern der Trajektorien auf Sprünge länger als 425 nm, lassen sich die beiden Fälle unterscheiden: Für unterschiedliche Partikelpopulationen (Ausgangshistogramm A) wurde nach Filterung nur eine, die schnellere, Komponente erhalten (siehe C). Für Partikel, die ihren Bewegungsmodus ändern (Ausgangshistogramm B), wurden beide Komponenten erhalten (siehe D). Hier sind $D_1 = 0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gepunktete Kurve) und $D_2 = 0.61 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (gestrichelte Kurve). Für Details siehe Text.

beide Bedingungen erfüllt. Damit wurden alle Trajektorien bestimmt, die Sprünge von 425 nm und größer aufweisen. Von diesen nach D_2 selektierten Trajektorien wird nun ein Sprungweitenhistogramm erstellt. Wenn in diesem trotz der Selektion auf schnelle Trajektorien(-abschnitte) nun wiederum D_1 auftaucht, so müssen Trajektorien vorliegen, die *beide* Diffusionskoeffizienten enthalten. Ein Beispiel soll verdeutlichen, dass die beiden eingangs genannten Szenarien so auch bei nur geringer Datenmenge klar unterschieden werden können.

Der Abbildung 2.3A und B liegen jeweils simulierte Daten zugrunde (siehe Kap. 2.2.9.3). Folgende Parameter wurden in beiden Fällen als Ausgangswerte für die Simulation gewählt: $D_{1,SIM} = 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{2,SIM} = 0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$, 100 Partikel mit jeweils 99 Positionen, Zeitauflösung $t=0.01 \text{ s}$. Der Unterschied zwischen beiden Simulationen ist, dass Abbildung 2.3 A zwei unterschiedliche Partikelpopulationen zu gleichen Anteilen zugrundeliegen (jeweils 50 Partikel), die ihren jeweiligen Diffusionskoeffizienten D_1 bzw. D_2 *nicht* ändern konnten. Abbildung 2.3 B hingegen liegt nur eine Partikelpopulation zugrunde. Die einzelnen Partikel konnten hier ihren Diffusionskoeffizienten nach jedem Sprung mit $p(\text{on})=p(\text{off})=0.5$ ändern. Die Anzahl der simulierten Datenpunkte (in beiden Fällen 9800 Sprünge) wurde bewusst klein gewählt, um zu demonstrieren, dass die Analyse auch bei geringeren Datenmengen und einem damit einhergehenden relativ starken Rauschen noch anwendbar ist. Für den Graphen Abbildung 2.3 A wurden mit Gleichung 2.11 folgende Werte ermittelt: $D_1 = 0.31 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$, mit einem relativen Anteil von $52 \pm 10\%$ (gepunktete Kurve) und $D_2 = 0.77 \pm 0.09 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Anteil von $48 \pm 10\%$ (gestrichelte Kurve). Für Abbildung 2.3 B wurden folgende Werte ermittelt: $D_1 = 0.28 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($44 \pm 10\%$) und $D_2 = 0.70 \pm 0.07 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($56 \pm 10\%$). Angegeben ist hier und im Folgenden immer der Standardfehler. Es wird deutlich, dass die in die Simulation eingesetzten Werte im Rahmen der Fehlergenauigkeit zurückerhalten wurden.

Die Abbildungen 2.3 C und D zeigen die Sprungweitenhistogramme der jeweils nach der oben beschriebenen Selektion erhaltenen Trajektorien. Die Bereiche größer 425 nm wurden abgeschnitten, da ab diesem Punkt das Histogramm der ausgewählten Trajektorien in das Histogramm der Ausgangsdaten übergeht, was bei realen Daten in einem sprunghaften Anstieg der Klassenanzahl resultieren und dann das folgende Anpassen einer Kurve stören würde. Abbildung 2.3 C zeigt, dass die Auswahlprozedur für den Fall unterscheidbarer Partikelpopulationen nur eine - die schnelle - Partikelpopulation zurückliefert, hier ist $D = 0.72 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Abbildung 2.3 D hingegen zeigt, dass im Falle der sich diskontinuierlich bewegenden Partikel beide Diffusionskomponenten zurückerhalten werden, hier sind $D_1 = 0.25 \pm 0.14 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0.61 \pm 0.14 \mu\text{m}^2/\text{s}$, sowie $f_1 = 0.25 \pm 0.31$ und $f_2 = 0.75 \pm 0.30$. Im letzteren Fall können die Anteile nicht mehr sicher bestimmt werden (siehe Fehler), da sich hier die geringe resultierende Datenmenge bemerkbar macht. Trotzdem ist ersichtlich, dass die einzelnen Trajektorien aufgrund ihrer schnelleren Bereiche selektiert werden, ihre langsamen Bereiche jedoch *ebenfalls* in das Sprungweitenhistogramm eingehen und so die diskontinuierliche Partikeldiffusion kennzeichnen.

Zu beachten ist hier, dass sich im Beispiel die zu untersuchenden Diffusionskoeffizienten absolut nicht sehr weit unterscheiden. Daher muss eine relativ hohe Grenze zur Selektion der Trajektorien gewählt werden, bei welcher dann allerdings auch für die schnellere Komponente nur noch eine sehr geringe Chance besteht selektiert zu werden. Grundsätzlich wird also ersichtlich, je näher die zu separierenden Diffusionskoeffizienten liegen und je höher die Grenze demnach gewählt werden muss, um die Sprungwahrscheinlichkeit der langsameren Komponente vernachlässigen zu können, desto mehr Datenpunkte im Ausgangshistogramm sind nötig. Für jeden Sprung oberhalb der gewählten Grenze wird im Algorithmus die eine zugehörige Trajektorie mit ihren restlichen Sprüngen selektiert. Insbesondere, wenn der Datensatz wenige Trajektorien enthält, kann hier sehr schnell eine Situation erreicht werden, bei welcher die aussortierte Trajektorienanzahl für

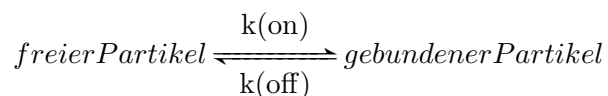
die folgende Sprungweitenanalyse nicht mehr ausreicht. Da sich im oben gezeigten Beispiel bereits Effekte zeigen, die auf eine zu geringe Datenmenge nach der Filterung zurückzuführen sind, kann davon ausgegangen werden, dass ein Sprungweitenhistogramm *nach* Anwendung des Algorithmus noch mindestens 1 000 Sprünge beinhalten muss, damit die Fehler, die das Anpassen von Gleichung 2.11 liefert, nicht zu groß werden.

Ein Ausgangshistogramm mit etwa 10 000 Datenpunkten kann im hier gezeigten Fall, welcher beispielhaft für die spätere Analyse der BR2.1 mRNP-Bewegung steht (s. Kap. 3.4.3), also ausreichen, um eine diskontinuierliche Partikeldiffusion zu detektieren. Unterscheiden sich die Diffusionskoeffizienten stärker, liegen also relativ gesehen deutlich mehr Sprünge der schnelleren Komponente über der zu wählenden Grenze, so kann auch ein Datensatz mit deutlich weniger Trajektorien erfolgreich analysiert werden, solange das aus der Filterung resultierende Histogramm mindestens 1 000 Sprünge beinhaltet.

2.2.9.5 Die Ermittlung von Bindungsgleichgewichtskonstanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell entwickelt, welches zeigt, dass sich ein häufiger Wechsel zwischen immobilisierender Bindung und freier Diffusion deutlich *unterhalb* der Messzeitaufösung im Sprungweitenhistogramm als Zweikomponentendiffusion darstellen kann (siehe Ergebnisteil). Die im Sprungweitenhistogramm erhaltenen Diffusionskoeffizienten entsprechen dann nicht mehr realen Diffusionskoeffizienten, sondern enthalten Informationen über die Bindungswahrscheinlichkeiten der zugrundeliegenden anomalen Partikeldiffusion. Dies kann mit Hilfe einer Monte Carlo Simulation illustriert werden, in der eine Teilchendiffusion mit einer Zeitaufösung t von $100 \mu\text{s}$ simuliert wurde. 100 000 Sprünge wurde gewählt, um ein möglichst glattes Sprungweitenhistogramm zu erhalten. Auf der Zeitskala von $100 \mu\text{s}$ pro Sprung wurde eine diskontinuierliche Bewegung generiert, bei der ein Teilchen mit fest gewählten Werten von $p(\text{on})$ und $p(\text{off})$ (jeweils zwischen 0 und 1) zwischen einer freien Diffusion mit $D_{\text{frei}} = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem gebundenen Zustand mit $D_{\text{bind}} = 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wechselte. Wie in Kapitel 3.5.2 erläutert, wurde $D_{\text{frei}} = 3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gewählt, da ein BR2.1 mRNP nach der Stokes-Einstein-Gleichung mit bekanntem Durchmesser von 50 nm (bei Annahme einer Kugelform) bei einer Nukleoplasmaviskosität von 3 cP (siehe Einleitung und Kap. 3.3) eben diesen Diffusionskoeffizienten aufweisen sollte. Der Diffusionskoeffizient der gebundenen Partikel $D_{\text{bind}} = 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde gewählt, um einer nicht ganz vollständigen Immobilisierung z.B. durch Bindung an flexible Strukturen Rechnung zu tragen.

Es gilt für eine solche Reaktion erster Ordnung:



$k(\text{on})$ und $k(\text{off})$ sind die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion. Die in der Simulation gewählten Wahrscheinlichkeiten „gebunden“ ($p(\text{on})$) bzw. „wieder frei gelassen“ ($p(\text{off})$) zu werden, hängen mit den Geschwindigkeitskonstanten über $k(\text{on}) = p(\text{on})/t$ und $k(\text{off}) = p(\text{off})/t$ zusammen. Damit gibt die in der Simulation gewählte grundständige Zeitaufösung t

den maximal simulierbaren Wert für $k(on)$ bzw. $k(off)$ vor. Hier ist $k(on)_{max} = k(off)_{max} = 1/0.0001 s^{-1} = 10\,000 s^{-1}$, da $t = 100 \mu s$ ist und $p(on)$ bzw. $p(off)$ maximal 1 sind.

Es gilt außerdem $K = k(on)/k(off) = N(geb. Partikel)/N(freie Partikel)$, wobei K die Gleichgewichtskonstante der Reaktion darstellt und N die Anzahl der Partikel im gebundenen bzw. freien Zustand. K ist ein Maß für die Bindungstendenz der simulierten Partikel. So deuten große Werte von K ($K \gg 1$) entsprechend auf einen hohen Anteil gebundener Partikel hin, kleine Werte von K ($K \ll 1$) auf einen geringen Anteil gebundener Partikel.

Um einen frequenten Wechsel zwischen Bindung und freier Diffusion unterhalb der Messzeitauflösung zu generieren, wurde von den simulierten Daten mit einer Zeitauflösung von $100 \mu s$ pro Schritt nur jede 100. Position ausgewählt und zu einer neuen Trajektorie mit einer Zeitauflösung von $10 ms$ pro Schritt zusammengefasst. Für nicht zu geringe Werte von $k(on)$ bzw. $k(off)$ lag die diskontinuierliche Bewegung der simulierten Partikel nun deutlich unterhalb der Zeitauflösung: Ist ein Partikel gebunden, so hängt die Dauer seiner Immobilisierung im Modell nur von $k(off)$ ab. Die durchschnittliche Dauer der Bindung t_L ist gegeben durch $t_L = 1/k(off) = t/p(off)$. Übersteigt die durchschnittliche Lebensdauer nun die Zeitauflösung von (hier) $10 ms$, so wird die diskontinuierliche Partikelbewegung zeitlich aufgelöst. Werte von $k(off) < 100 Sekunde^{-1}$ bzw. von $p(off) < 0.01$ liefern also einen Fall, der experimentell nicht beobachtet wird (siehe Ergebnisse). Insofern wurden für $p(off)$ nur Werte oberhalb von 0.01 simuliert.

Um später aus experimentellen Sprungweitenhistogrammen Werte für $k(on)$ bzw. $k(off)$ und K zu erhalten, wurden simulierte Sprungweitenhistogramme für verschiedene Werte von $p(on)$ und $p(off)$ erstellt. Es wurden mit den oben genannten Diffusionskoeffizienten $100\,000$ Sprünge auf einer Zeitskala von $100 \mu s$ simuliert, welche $99\,900$ Sprüngen auf einer Zeitskala von $10 ms$ entsprechen, wenn eine überlappende Berechnung der Sprungweiten von 1. zur 100. Position, der 2. zur 101. Position usw., gewählt wird. Die Werte von $p(on)$ und $p(off)$ wurden in 0.01 -Schritten zwischen 0.01 und 1 gewählt, was in 100 mal 100 Wertepaaren und damit 100 mal 100 simulierten Histogrammen resultierte. Die Klassenbreite des für jedes Wertepaar simulierten Histogramms wurde mit $20 nm$ so gewählt, dass sie genau so groß war wie die bei den später zu untersuchenden experimentellen Daten. Um letztlich $k(on)$ bzw. $k(off)$ und K für ein experimentelles Histogramm zu erhalten, wurde dieses mit jedem der 100 mal 100 simulierten Histogramme verglichen, d.h. mit jeweils einem Histogramm für ein bestimmtes Wertepaar von $p(on)$ und $p(off)$. Um das simulierte Histogramm zu ermitteln, welches am besten zu dem experimentellen passte, wurde für jedes Wertepaar $p(on)$ und $p(off)$ die quadratische Abweichung zwischen zu testendem und simuliertem Histogramm einzeln für jede Klasse ermittelt und aufsummiert. So ergab sich ein absoluter Abweichungskoeffizient δ , welcher aufgetragen gegen $p(on)$ und $p(off)$ visualisiert wurde. Der Bereich minimaler Abweichung zwischen zu testendem und simuliertem Histogramm zeigte das am besten passende simulierte Histogramm an und die gesuchten Werte für $k(on)$, $k(off)$ bzw. für K .

Diese Analyse zur Ermittlung kinetischer Ratenkonstanten aus der Sprungweitenanalyse (im Folgenden kurz Bindungsanalyse genannt) wurde zur Charakterisierung verschiedenen Tests mit simulierten Daten unterzogen. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung finden sich in Kapitel 3.1.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Die Charakterisierung der Bindungsanalyse

Die in Kapitel 2.2.9.5 vorgestellte Analyse zu Ermittlung kinetischer Ratenkonstanten aus der Sprungweitenanalyse (kurz Bindungsanalyse) wurde entwickelt, um etwaige Bindungen der BR2.1 mRNPs an nukleäre Strukturen zu untersuchen (siehe Kapitel 3.5.2).

Zur Charakterisierung wurde die Analysemitmethode verschiedenen Tests mit simulierten Daten unterzogen. Der Abweichungskoeffizient δ gibt die absolute Abweichung eines simulierten von einem zu untersuchenden Sprungweitenhistogramm an (s. Kapitel 2.2.9.5). Durch die endliche Zahl simulierter Sprünge sind zwei mit gleichen Parametern simulierte Sprungweitenhistogramme jedoch nicht exakt gleich, sondern unterscheiden sich geringfügig. Um dieses Rauschen zu charakterisieren, wurden für alle genannten Wertepaare von $0.01 < p(on) \leq 1$ und $0.01 < p(off) \leq 1$ jeweils zwei Sprungweitenhistogramme mit exakt den selben Parametern $p(on)$ und $p(off)$ berechnet. Die Klassenbreite betrug immer 20 nm. Für alle Sprungweitenhistogrammpaare wurde dann δ bestimmt (siehe Abbildung 3.1 A). Hier zeigte sich, dass δ , abgesehen von vernachlässigbaren Randeffekten für Werte von $p(off) \ll 0.03$, nie größer als 3.3, hauptsächlich jedoch nicht größer als 1.7 war. Ein genereller Trend zur Zunahme des Abweichungskoeffizienten für kleinere Werte von $p(off)$ ist damit zu begründen, dass mit kleiner werdender Wahrscheinlichkeit den gebundenen Zustand zu verlassen auch die Mobilität sank. Bei konstanter Klassenbreite der Sprungweitenhistogramme von 20 nm wurden mit kleiner werdendem $p(off)$ zunehmend nur noch die kleineren Histogrammklassen gefüllt. Da die Klassenbreite aus den zu untersuchenden experimentellen Daten mit 20 nm vorgegeben war, wurden für kleine Werte von $p(off)$ Histogramme erhalten, in denen nur noch wenige (< 5) Klassen gefüllt waren. Damit wurden diese Histogramme durch die relativ hohe Klassenbreite nur noch unzureichend aufgelöst und δ stieg an. Da experimentell jedoch nie Histogramme ermittelt wurden, bei denen bei 20 nm Klassenbreite nur die ersten Klassen mit Werten gefüllt waren, wurde dieser Randeffekt hier nicht weiter berücksichtigt.

Zur Überprüfung, ob auch vorab definierte Werte für $p(on)$, $p(off)$ und K mit Hilfe der Analyse aus dem zugehörigen Sprungweitenhistogramm extrahiert werden konnten, wurden simulierte Sprungweitenhistogramme mit jeweils definiertem $p(on)_{sim}$, $p(off)_{sim}$ und damit K_{sim} gene-

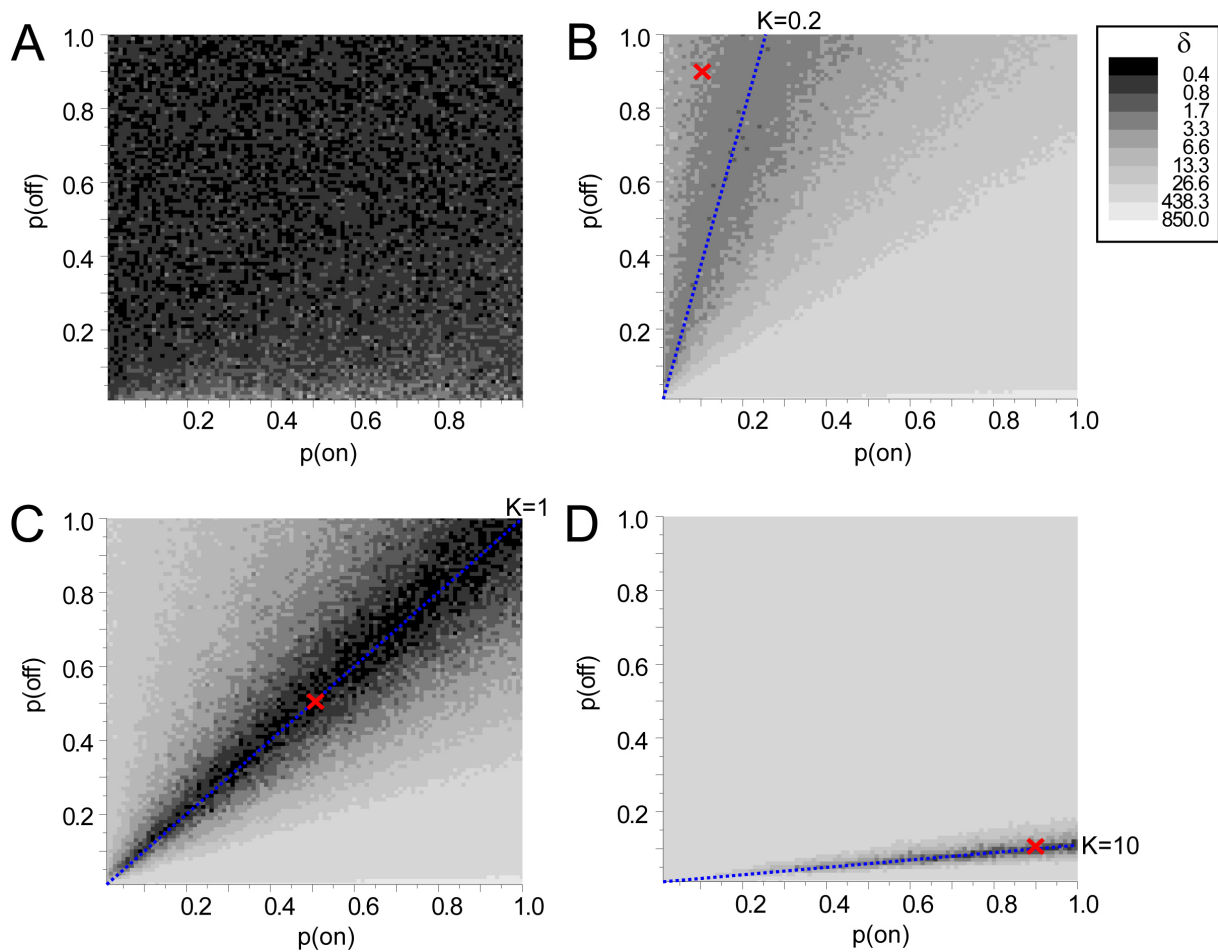


Abbildung 3.1: Referenzsimulationen zur Ermittlung von Bindungskonstanten aus den Sprungweitenhistogrammen bei diskontinuierlicher Partikeldiffusion unterhalb der Zeitauflösung. Aufgetragen ist jeweils der absolute Abweichungskoeffizient δ gegen $p(\text{on})$ und $p(\text{off})$. (A) Um das Grundrauschen des Abweichungskoeffizienten zu ermitteln, wurden für jeden Wert von $p(\text{on})$ und $p(\text{off})$ je zwei Histogramme simuliert und δ zwischen beiden bestimmt. Abgesehen von Randeffekten ist δ praktisch immer kleiner 1.7 (siehe Legende rechts oben). (B) Ein Sprungweitenhistogramm mit $p(\text{on})_{\text{sim}}=0.1$, $p(\text{off})_{\text{sim}}=0.9$ und damit $K_{\text{sim}}=0.11$ wurde simuliert (rotes Kreuz) und mit simulierten Sprungweitenhistogrammen für $0.01 < p(\text{on}) \leq 1$ und $0.01 < p(\text{off}) \leq 1$ verglichen. Es zeigte sich, dass δ nicht in einem Punkt minimal wird, sondern in einem Bereich, der dem Verhältnis von $p(\text{on})_{\text{sim}}$ und $p(\text{off})_{\text{sim}}$ also K_{sim} entspricht. Die gestrichelte Linie zeigt das Verhältnis $K=0.2$ an. (C) Ein Sprungweitenhistogramm mit $p(\text{on})_{\text{sim}}=0.5$, $p(\text{off})_{\text{sim}}=0.5$ und damit $K_{\text{sim}}=1$ wurde simuliert (rotes Kreuz) und analog zu B analysiert. Hier wurde ein Bereich von $K=1$ ermittelt, wo δ minimal wird (gestrichelte Linie). (D) Ein Sprungweitenhistogramm mit $p(\text{on})_{\text{sim}}=0.9$, $p(\text{off})_{\text{sim}}=0.1$ und damit $K_{\text{sim}}=9$ wurde simuliert (rotes Kreuz) und analog zu B analysiert. Die gestrichelte Linie zeigt einen Bereich von $K=10$ an. Details siehe Text. Die Legende rechts oben gilt für alle Abbildungsteile.

riert und überprüft, ob die Analyse die eingesetzten Werte wieder als Ergebnis zurücklieferte. Es wurden:

$$K_{sim} = 0.11 \text{ mit } p(on)_{sim} = 0.1 \text{ und } p(off)_{sim} = 0.9$$

$$K_{sim} = 1 \text{ mit } p(on)_{sim} = 0.5 \text{ und } p(off)_{sim} = 0.5$$

$$K_{sim} = 9 \text{ mit } p(on)_{sim} = 0.9 \text{ und } p(off)_{sim} = 0.1$$

gewählt und nach oben beschriebener Methode analysiert. Abbildung 3.1 B - D zeigt die Ergebnisse. Die gestrichelten Linien in Abbildung 3.1 zeigen die K -Werte, welche aus der Analyse zurückerhalten wurden:

$$K = 0.2 \text{ für } K_{sim} = 0.11 \text{ (Abb. 3.1 B)}$$

$$K = 1 \text{ bei } K_{sim} = 1 \text{ (Abb. 3.1 C)}$$

$$K = 10 \text{ bei } K_{sim} = 9 \text{ (Abb. 3.1 D)}$$

Die eingesetzten Werte wurden ausreichend genau zurückerhalten (siehe Diskussion). Die Auflösung der Analyse war nicht hoch genug um die genauen Werte von $p(on)_{sim}$ und $p(off)_{sim}$ (bzw. $k(on)_{sim}$ und $k(off)_{sim}$) zurück zu erhalten. K_{sim} konnte jedoch mit der vorgestellten Methode zügig abgeschätzt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass mit der vorgestellten Analyse Aussagen zur Bindungskinetik der untersuchten Partikel aus den Sprungweitenhistogrammen extrahiert werden können. Die Anwendung dieser Analyse auf die Trajektorien der BR2.1 mRNPs wird in Kapitel 3.5.2 beschrieben.

3.2 Der Einfluss der Lokalisierungsungenauigkeit auf die Sprungweitenverteilung

Die Position eines fluoreszenzmarkierten Partikels kann durch Anpassung einer zweidimensionalen Gaussfunktion an das Fluoreszenzsignal nur mit endlicher Genauigkeit bestimmt werden. Der Fehler dieser Positionsbestimmung wird durch die Lokalisierungsungenauigkeit σ angegeben. Um eine Vorstellung von σ zu bekommen, denke man sich ein gaussförmiges Fluoreszenzsignal auf einem Kamerachip, welches von einem immobilisierten Partikel stammt. Durch verschiedene Rauschquellen aus der Probe und vom Detektor (Photonenrauschen, Dunkelrauschen, etc.) fluktuiert die Intensität des Signals von Aufnahme zu Aufnahme. Nun wird in jedem Bild zur Lokalisierung der Partikelposition eine zweidimensionale Gaussfunktion an das Fluoreszenzsignal angepasst. Durch die Signalfluktuations wird in jedem Bild eine neue, um die reale Partikelposition streuende „scheinbare“ Partikelposition ermittelt. Stellt man nun diese ermittelten Positionen graphisch dar, so ergibt sich eine gaussförmige Positionsverteilung, deren Mittelpunkt der putativen Partikelposition und deren Standardabweichung σ der Lokalisierungsungenauigkeit entspricht. Die Lokalisierungsungenauigkeit ist vom Signal-zu-Rausch-Verhältnis (SRV) abhängig [Kues, 2001]. Eine Abschätzung des SRV gibt: $SRV = I_{Sig}/SD_{Bg}$, wobei I_{Sig} die maximale Amplitude des Signals über dem Hintergrundrauschen und SD_{Bg} die Standardabweichung des Hintergrundrauschens ist. Typischerweise liegt σ bei einem SRV von 5 in einem Bereich von 25 nm und kann ab einem SRV von etwa 10 ca. 10 nm betragen [Kues, 2001].

Durch σ kommt es zu einem zusätzlichen Beitrag zur Partikelbewegung mit unterschiedlichem Einfluss auf den in der MSD-Analyse bzw. in der JD-Analyse bestimmten Diffusionskoeffizienten. σ wirkt bildlich gesprochen wie eine, der eigentlichen Diffusionsbewegung überlagerte, zusätzliche Beweglichkeit. Bei einem schlechten SRV von unter 5 kann σ Werte von 50 nm und mehr erreichen. Für hohe Aufnahmezeiten von beispielsweise 500 Hz, die einerseits notwendig sind um schnellere diffusive Bewegungen effektiv zeitlich auflösen zu können, die andererseits aber oft mit einem schlechten SRV einhergehen, kann der Beitrag von σ einen relativ großen Effekt auf den ermittelten Diffusionskoeffizienten haben. Ein Beispiel soll den Einfluss von σ auf die Sprungweiten der untersuchten Partikel verdeutlichen. Bei einem angenommenen Diffusionskoeffizienten von $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zeigen die untersuchten Partikel bei 500 Hz im quadratischen Mittel Sprungweiten von ungefähr 200 nm (siehe Gl. 2.12). Eine Überschätzung der Sprungweiten durch ein mittleres σ von 50 nm würde also einem Fehler von 25% entsprechen. Dies würde sich entsprechend auf den durch die Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten auswirken. Das Beispiel verdeutlicht, dass eine quantitative Analyse des Einflusses von σ auf den in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten wichtig ist.

Um den Effekt der Lokalisierungsungenauigkeit auf die Sprungweitenverteilung zu quantifizieren wurden Partikel mit einem definierten Diffusionskoeffizienten und mit definierter Lokalisierungsungenauigkeit simuliert (siehe Kapitel 2.2.9.3). Dabei wurden die sog. „realen“ Koordinaten der erzeugten Trajektorien, d.h. die Koordinaten ohne Beitrag von σ , den korrespondierenden sog. „verwischten“ Koordinaten (mit Beitrag von σ) gegenübergestellt, um bei einer vergleichenden Analyse den Effekt von σ zu ermitteln. Abbildung 3.2 A zeigt eine solche simulierte Trajekto-

rie eines Partikels, welcher sich mit einem Diffusionskoeffizienten von $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bewegt, einmal ohne (schwarz) und einmal mit einer Lokalisierungsungenauigkeit von 50 nm (rot). Die gewählte Zeitauflösung betrug 100 Hz . Es ist zu erkennen, dass sich die „verwischten“ Trajektorienpositionen durch den Beitrag von σ bereits deutlich von den „realen“ Trajektorienpositionen unterscheiden. Die korrespondierende MSD-Analyse ist in Abbildung 3.2 B gezeigt. Ohne den Effekt der Lokalisierungsungenauigkeit (Dreiecke) wurde ein linearer MSD-Verlauf mit der Zeit ermittelt, welcher nach Anpassen einer Geradenfunktion den (eingesetzten) Diffusionskoeffizienten von $0.5 \pm 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zurücklieferte (schwarze Gerade). Die angepasste Gerade läuft außerdem durch den Koordinatenursprung.

Zum Vergleich ist ebenfalls die MSD-Analyse für die gleichen Trajektorien *mit* Lokalisierungsungenauigkeit gezeigt (Quadrate). Eine angepasste Gerade (rot) lieferte auch hier den (eingesetzten) Diffusionskoeffizienten von $0.5 \pm 0.004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zurück. Diese Gerade verläuft allerdings nicht mehr durch den Koordinatenursprung. Es ist bekannt, dass die Ungenauigkeit in der Positionsbestimmung bei der MSD-Analyse keinen Effekt auf den bestimmten Diffusionskoeffizienten hat, sondern sich im Ordinatenabschnitt der angepassten Geraden niederschlägt. Es gilt nach [Thompson et al., 2002]

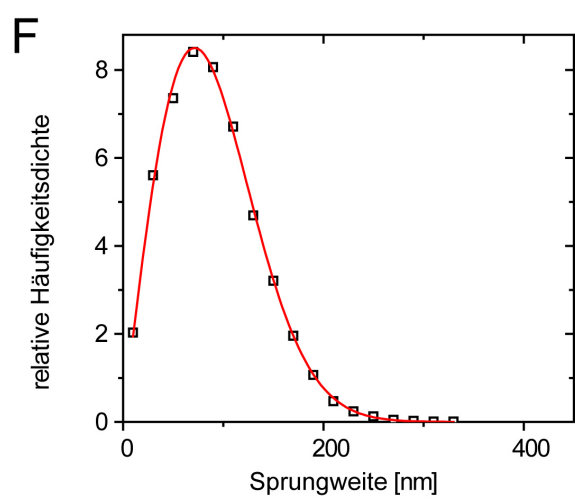
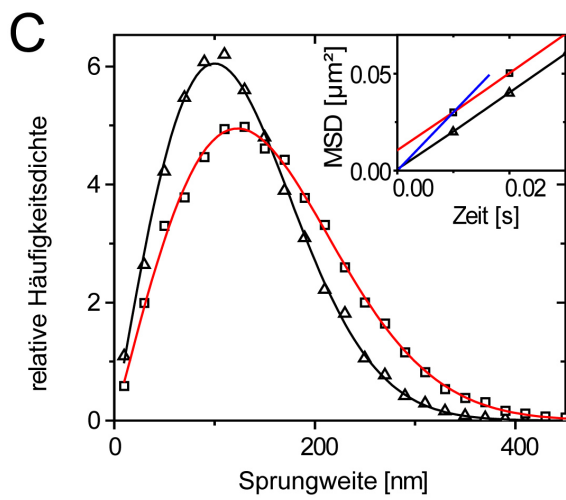
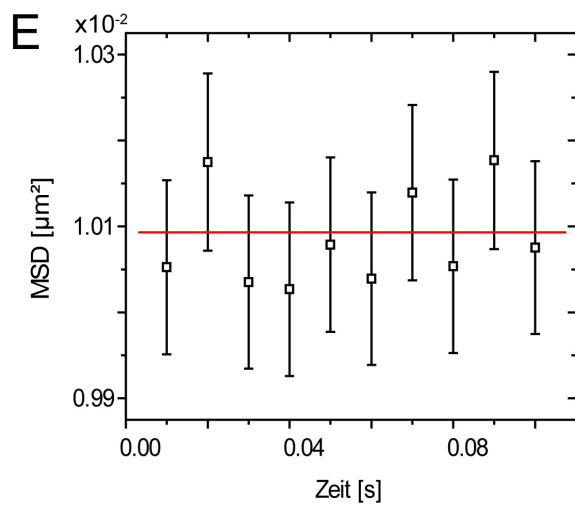
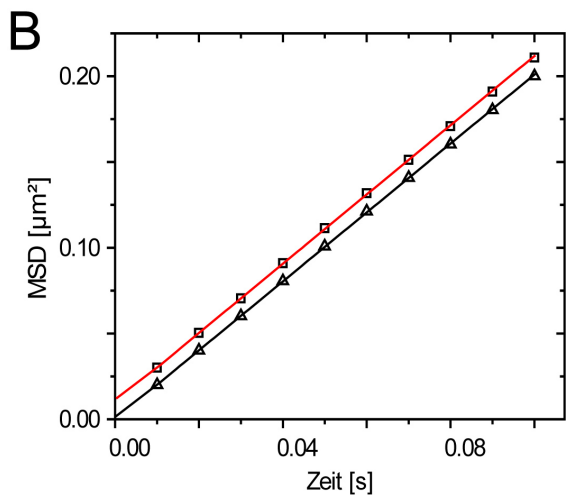
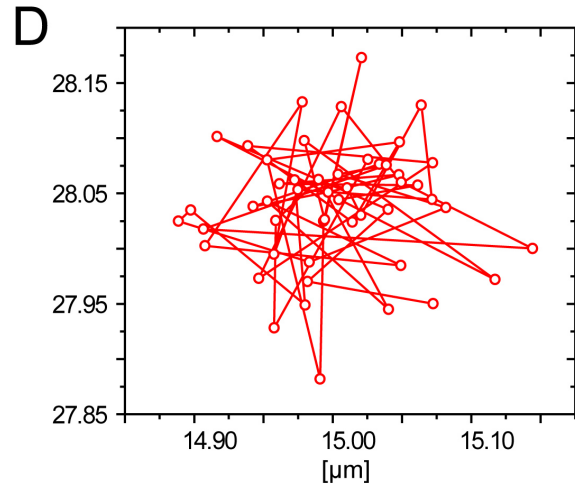
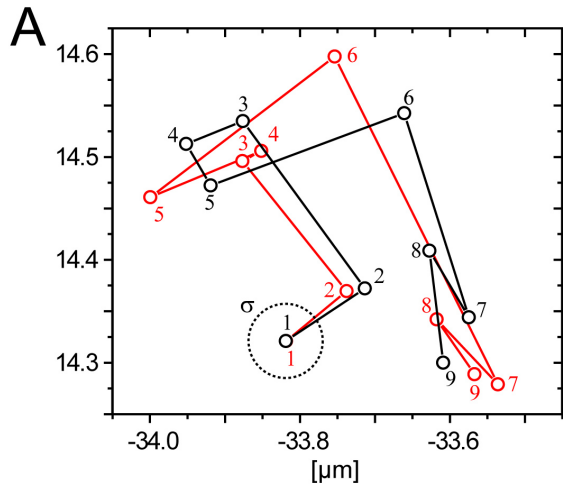
$$\langle r^2 \rangle_{2D} = 4Dt + 4\sigma^2 \quad (3.1)$$

Die Lokalisierungsungenauigkeit σ stellt sich also als zusätzlicher Beitrag zu *jedem* MSD-Punkt dar. Die angepasste rote Gerade in Abbildung 3.2 B liefert einen y-Achsenabschnitt von $0.01 \pm 0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$, was nach Gleichung 3.1 einem (eingesetzten) σ von $50 \pm 5 \text{ nm}$ entspricht.

Da der Diffusionskoeffizient D in der MSD-Analyse *relativ* zwischen verschiedenen MSD-Punkten bestimmt wird, die gleichermaßen durch den systematischen Fehler der Lokalisierungsungenauigkeit beeinflusst werden, wird D hier durch σ nicht beeinflusst. Anders ist dies jedoch bei der Sprungweitenanalyse. Abbildung 3.2 C zeigt die Sprungweitenanalysen der simulierten Partikel, einmal ohne (Dreiecke) und einmal mit Lokalisierungsungenauigkeit (Quadrate). Während die Sprungweitenanalyse für $\sigma = 0$ den eingesetzten Diffusionskoeffizienten von $0.5 \pm 0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zurück lieferte (schwarze Kurve), zeigt sich mit $\sigma = 50 \text{ nm}$ ein grundlegend anderes Bild. Die angepasste rote Kurve lieferte hier einen Diffusionskoeffizienten von $0.75 \pm 0.007 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zurück, ein Wert der deutlich über dem eingesetzten Diffusionskoeffizienten von $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ liegt. Dies bestätigt die oben erläuterte Abschätzung, dass die Lokalisierungsungenauigkeit unter ungünstigen Bedingungen in der Sprungweitenanalyse einen deutlichen Einfluss auf den ermittelten Diffusionskoeffizienten haben kann.

Da die MSD-Analyse grundsätzlich nur mittlere Diffusionskoeffizienten liefert, kann (wie in dieser Arbeit gezeigt) die MSD-Analyse die Sprungweitenanalyse nicht ersetzen. Insofern war es wichtig, den Beitrag von σ zum in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten zu quantifizieren.

Ausgehend von Gleichung 3.1 kann der Beitrag von σ zu dem in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten berechnet werden. Der entscheidende Unterschied in der Bestimmung von D zwischen der MSD- und der Sprungweitenanalyse ist, dass D in der MSD-Analyse relativ aus zwei oder mehr Datenpunkten bestimmt wird, die beide um den gleichen Betrag von $4\sigma^2$ erhöht sind. Entsprechend ist der absolute Wert der einzelnen MSD-Punkte nicht relevant, solan-



ge alle MSD-Punkte um den selben Betrag erhöht sind (sonst würde sich die Steigung ändern). Entsprechend ist es nicht richtig, die an den MSD-Verlauf angepasste Gerade durch den Koordinatenursprung zu zwingen. In der Sprungweitenanalyse jedoch wird der Diffusionskoeffizient - um im Bild des MSD-Verlaufs zu bleiben - genau so bestimmt, als ob man die MSD-Gerade durch den Koordinatenursprung *zwingen* würde (siehe Abb. 3.2 C, Einfügung rechts oben). Da typischerweise für JD1, JD2, etc. separate Sprungweitenanalysen erstellt werden, wird eine relative Bestimmung des Diffusionskoeffizienten (analog zum MSD) innerhalb der JD-Analyse nicht vorgenommen. Der Referenzpunkt ist in der JD-Analyse der Koordinatenursprung, denn hier gilt, dass bei $t = 0$ kein Sprung vollzogen wird (was einem MSD von 0 bei $t = 0$ entspricht). Dadurch wirkt σ in der Sprungweitenanalyse wie eine allgemeine Vergrößerung der Sprungweiten bzw. wie eine Verbreiterung der Sprungweitenverteilung (siehe Abbildung 3.2 C), da streng genommen eine falsche Extrapolation auf $t = 0$ zugrundeliegt. Entsprechend liefert eine durch den 1. MSD-Punkt und den Koordinatenursprung gezwungene Gerade in der MSD-Analyse der „verwischten“ Trajektorien als Diffusionskoeffizient $0.75 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und somit den Wert, den auch die Sprungweitenanalyse lieferte (Abbildung 3.2 C, blaue Gerade).

Ein Bezug zwischen dem Diffusionskoeffizienten, welcher in der Sprungweitenanalyse ermittelt wird D_{JD} , und dem Diffusionskoeffizienten, welcher in der MSD-Analyse bestimmt wird D_{MSD} , besteht daher über folgende Gleichung:

$$4D_{JD}t = 4D_{MSD}t + 4\sigma^2 \quad (3.2)$$

wobei die linke Seite der Gleichung als eine durch den jeweiligen t -ten MSD-Punkt und den Koordinatenursprung erzwungene MSD-Gerade aufgefasst werden kann. Aus Gleichung 3.2 ergibt sich unmittelbar

$$D_{JD} = D_{MSD} + \frac{\sigma^2}{t} \quad (3.3)$$

Hierin kann D_{MSD} als sog. „realer“ Diffusionskoeffizient verstanden werden, welcher unabhängig vom Ausmaß der Positionsverwischung durch σ gilt. D_{JD} stellt sich entsprechend als durch σ

Abbildung 3.2: (A) Gezeigt ist eine simulierte Beispieltrajektorie ($D = 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$) mit (rot) und ohne (schwarz) Beitrag von σ . Ein σ von 50 nm ist um die erste Position eingezeichnet (gestrichelter Kreis). Es sei angemerkt, dass hier verwischte und reale Partikelposition nur zufällig aufeinander liegen. (B) Die zu A gehörigen MSD-Verläufe mit (Quadrate, rot) und ohne (Dreiecke, schwarz) Beitrag von σ . σ bewirkt hier eine Parallelverschiebung des MSD-Verlaufs zu größeren Werten. Der „relativ“ ermittelte Diffusionskoeffizient ändert sich nicht. (C) Die zu A zugehörigen Sprungweitenverteilungen mit (Quadrate, rot) und ohne (Dreiecke, schwarz) Beitrag von σ . σ verbreitert die Sprungweitenverteilung und wirkt sich so auf den ermittelten Diffusionskoeffizienten aus. Die blaue Gerade rechts oben zeigt den Zusammenhang zwischen der MSD- und der Sprungweitenanalyse (siehe Text). (D) Beispieltrajektorie eines simulierten immobilisierten Partikels, dessen bestimmte Position aufgrund von $\sigma = 50 \text{ nm}$ um seine reale Position fluktuiert. (E) Zu D korrespondierende MSD-Analyse. Die Steigung des MSD-Verlaufs ist 0 (rote Gerade), der Ordinatenabschnitt beträgt etwa 0.0101. Die Standardfehler sind angegeben. (F) Zu D korrespondierende Sprungweitenanalyse. Die Sprungweiten sind ein reiner Effekt der Lokalisierungsungenauigkeit σ , ebenso wie der ermittelte Diffusionskoeffizient (rote Kurve). Für Details siehe Text.

erhöhter Diffusionskoeffizient dar. Gleichung 3.3 zeigt auch, dass sich für größere Werte von t , d.h. für Sprungweitenanalysen über größere Zeitintervalle (JD2, JD3,...), D_{JD} zunehmend D_{MSD} annähert.

Um den beschriebenen Bezug zwischen D_{JD} und D_{MSD} zu überprüfen, wurden Trajektorien simuliert, welche einen Diffusionskoeffizienten von 0 (immobilisierte Partikel) und ein σ von 50 nm aufwiesen. Hier sollte nach Gleichung 3.3 D_{JD} nur von σ abhängen und bei $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ liegen. Abbildung 3.2 D zeigt eine Beispieltrajektorie. Es ist zu erkennen, dass die Partikelposition durch σ fluktuiert. Die korrespondierende MSD-Analyse ist in Abbildung 3.2 E gezeigt. Wie nach Gleichung 3.1 zu erwarten, zeigt sich der MSD im Rahmen der Fehlergenauigkeit als Parallele zur Abszisse mit einer Steigung und damit einem (eingesetzten) Diffusionskoeffizienten von 0. Der Ordinatenabschnitt liegt bei etwa 0.0101, was wie erwartet einem σ von ungefähr 50 nm entspricht. In der zugehörigen Sprungweitenanalyse (Abbildung 3.2 F) zeigt sich nun jedoch der reine σ -Effekt: hier wurde ein Diffusionskoeffizient von $0.25 \pm 0.003 \mu\text{m}^2/\text{s}$ erhalten. Dies illustriert die Gültigkeit der oben vorgestellten Ableitung.

Damit zeigte sich, dass bei bekannter Lokalisierungsungenauigkeit über Gleichung 3.3 quantitativ bestimmt werden kann, wie hoch die Abweichung des in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten ist. Dabei kann die Lokalisierungsungenauigkeit durch das SRV abgeschätzt werden [Kues, 2001]. Es gilt also

$$\Delta D_{JD} = \frac{\sigma^2}{t} \quad (3.4)$$

wobei ΔD_{JD} die durch σ bedingte Abweichung im Diffusionskoeffizienten der Sprungweitenanalyse ist.

Wichtig ist das oben dargelegte immer dann, wenn aufgrund heterogener Mobilitätskomponenten in der Probe eine einfache MSD-Analyse nicht ausreicht, um die Partikelbewegung hinreichend zu beschreiben bzw. den in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten, wie in dieser Arbeit, ein großes Gewicht zukommt. Dann ist es hilfreich zu wissen, in wie weit ein in der Sprungweitenanalyse ermittelter Diffusionskoeffizient „künstlich“ erhöht ist.

Tauchen mehrere klar voneinander separierbare Mobilitätskomponenten in der untersuchten Probe auf, so reicht die Bestimmung eines mittleren SRV normalerweise nicht mehr aus, da schnellere Partikel typischerweise eine höhere Lokalisierungsungenauigkeit zeigen, weil ihr Signal durch die erhöhte Beweglichkeit verwischt wird. Für den Fall, dass beispielsweise zwei *unterschiedliche* (und damit separierbare) Mobilitätskomponenten in der Probe diffundieren, kann eine bereits von Schütz et al. vorgestellte Kombinationsanalyse genutzt werden, welche die Sprungweitenanalyse und die MSD-Analyse kombiniert [Schütz et al., 1997]. Hier werden für mehrere Zeitpunkte t_1, t_2, t_3 , usw. Sprungweitenanalysen JD1, JD2, JD3,... erstellt. Aus diesen Sprungweitenanalysen kann dann für jeden Zeitpunkt t über Gleichung 2.11 separat für jede Diffusionskomponente i ein $\langle r(t)^2 \rangle_i$ ermittelt werden. Die so aus den Sprungweitenanalysen erhaltenen $\langle r(t)^2 \rangle_i$ können dann für jede Komponente *separat* gegen t aufgetragen werden. Durch Anpassen einer Geradenfunktion an den linearen Bereich, kann so für jede Komponente ein eigener MSD-Verlauf erstellt werden. Unter Voraussetzung eines zumindest anfänglich linearen MSD-Verlaufs können diese Einzelkomponenten-MSDs dann über Anpassen einer Geradenfunktion auf Null extrapoliert

werden, um die Lokalisierungsungenauigkeit der jeweiligen Mobilitätskomponenten und damit die Abweichung im Diffusionskoeffizienten der jeweiligen Sprungweitenanalyse zu bestimmen.

Wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, lag das *durchschnittliche* SRV der mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden markierten BR2.1 mRNPs meist bei ungefähr 8. Nach [Kues, 2001] entspricht dies einem σ von etwa 15 nm. Mit Gleichung 3.4 kann hier ein in der Sprungweitenanalyse ermittelter Diffusionskoeffizient der BR2.1 mRNPs als im Mittel um $0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zu hoch angesehen werden. Dies ist für die Diffusionskoeffizienten der mobilen Komponenten vernachlässigbar. Fällt das SRV jedoch auf einen Wert von 5 ab ($\sigma = 35 \text{ nm}$ [Kues, 2001]), was insbesondere bei den Experimenten mit Hämolymphe häufiger der Fall war, steigt nach Gleichung 3.4 der Beitrag von σ zum in der Sprungweitenanalyse ermittelten Diffusionskoeffizienten auf $0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dieser Wert täuscht für immobilisierte Partikel bereits eine langsame Diffusion vor und kann daher missinterpretiert werden (siehe Diskussion).

3.3 Die nukleoplasmatische Viskosität im Speicheldrüsenzellkern

In einer vorhergehenden Arbeit wurde die nukleoplasmatische Viskosität der *C. tentans* Speicheldrüsenzellkerne bereits mit Hilfe inerter Nanopartikel bestimmt, welche einen Durchmesser von 30 nm (QuantumDots) bzw. 210 nm (Polystyrol-Partikel) aufwiesen [Veith, 2007]. Diese Proben wurden mit Einzelpartikeltracking untersucht. Die BR2.1 mRNP-Partikel weisen jedoch einen Durchmesser von etwa 50 nm auf. Die effektive Viskosität kann sich in heterogenen Medien wie einem Zellkern als größenabhängig erweisen (siehe Diskussion). Daher wurde die Kernviskosität im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich mit inerten Referenzpartikeln vermessen, welche eine ähnliche Größe wie die BR2.1-Partikel aufweisen. Hierzu wurde die nukleoplasmatische Diffusion von inertem 500 kDa FITC-Dextran mit Hilfe von FRAP untersucht. Die durchschnittliche Größe der hier benutzten Charge an Dextran wurde über Referenzmessungen in Puffer bestimmt. Um die potentielle Größenabhängigkeit der Viskosität festzustellen, wurde außerdem kleineres 150 kDa FITC-Dextran mit der selben Technik unter gleichen Bedingungen im Speicheldrüsenzellkern vermessen. So sollte sichergestellt werden, dass zu beobachtende Effekte probenspezifisch sind und die Messungen sich gut vergleichen lassen.

3.3.1 FRAP-Messungen mit FITC-Dextran

Die Durchführung der FRAP-Messungen ist in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Zur Bestimmung seiner durchschnittlichen Größe wurde der mittlere Diffusionskoeffizient von 500 kDa FITC-Dextran in Transportpuffer gemessen, da dieser Puffer auch für die Kerninjektionen genutzt wurde. Hierzu wurde eine 0.05%-ige Lösung (Gewicht/Volumen) angesetzt und in eine Probenkammer überführt. Das Ergebnis einer typischen Messung ist in Abbildung 3.3 A gezeigt. Die an die normierte Fluoreszenzintensität angepasste Gleichung 2.4 beschrieb den experimentellen Kurvenverlauf bis auf geringe Abweichungen im Bereich von 10 s gut. Insgesamt wurden 5 unterschiedliche Messungen durchgeführt. Im Mittel wurde für τ_r ein Wert von 1.48 ± 0.02 s erhalten (siehe Tabelle 3.1). Die Fluoreszenzrückkehr lag bei 100% ($k=1 \pm 0.004$), wie für freie Diffusion in Puffer zu erwarten war. Der geblichene Bereich ist auf dem ersten Bild nach dem Bleichvorgang noch deutlich zu erkennen. Die Aufnahmezeit ist deutlich kürzer als die Fluoreszenzrückkehrzeit, daher befinden sich nach 0.13 s die meisten geblichenen Teilchen noch im Bleichbereich. Die mittlere Bleichtiefe K beträgt 1.15 ± 0.02 .

Die Viskosität des verwendeten Puffers kann mit der von reinem Wasser gleichgesetzt werden. Somit ergibt sich für das 500 kDa FITC-Dextran nach Gleichung 2.1 bei einer Viskosität von 1 cP ein Diffusionskoeffizient $D_{500,Ref}$ von $7.7 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Damit errechnet sich nach der Stokes-Einstein-Gleichung (Gleichung 2.9) ein hydrodynamischer Durchmesser von 57 ± 0.8 nm. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem Durchmesser der BR2.1 mRNP-Partikel.

Zur Untersuchung der Viskosität im Kern wurde 500 kDa FITC-Dextran als 1%-ige Lösung (Gewicht/Volumen) in insgesamt 15 Speicheldrüsenzellkerne von 2 verschiedenen Speicheldrüsen injiziert. Die höhere Konzentration wurde gewählt, da möglichst geringe Probenvolumina injiziert werden sollten, um die lokale nukleoplasmatische Umgebung möglichst wenig zu beeinflussen.

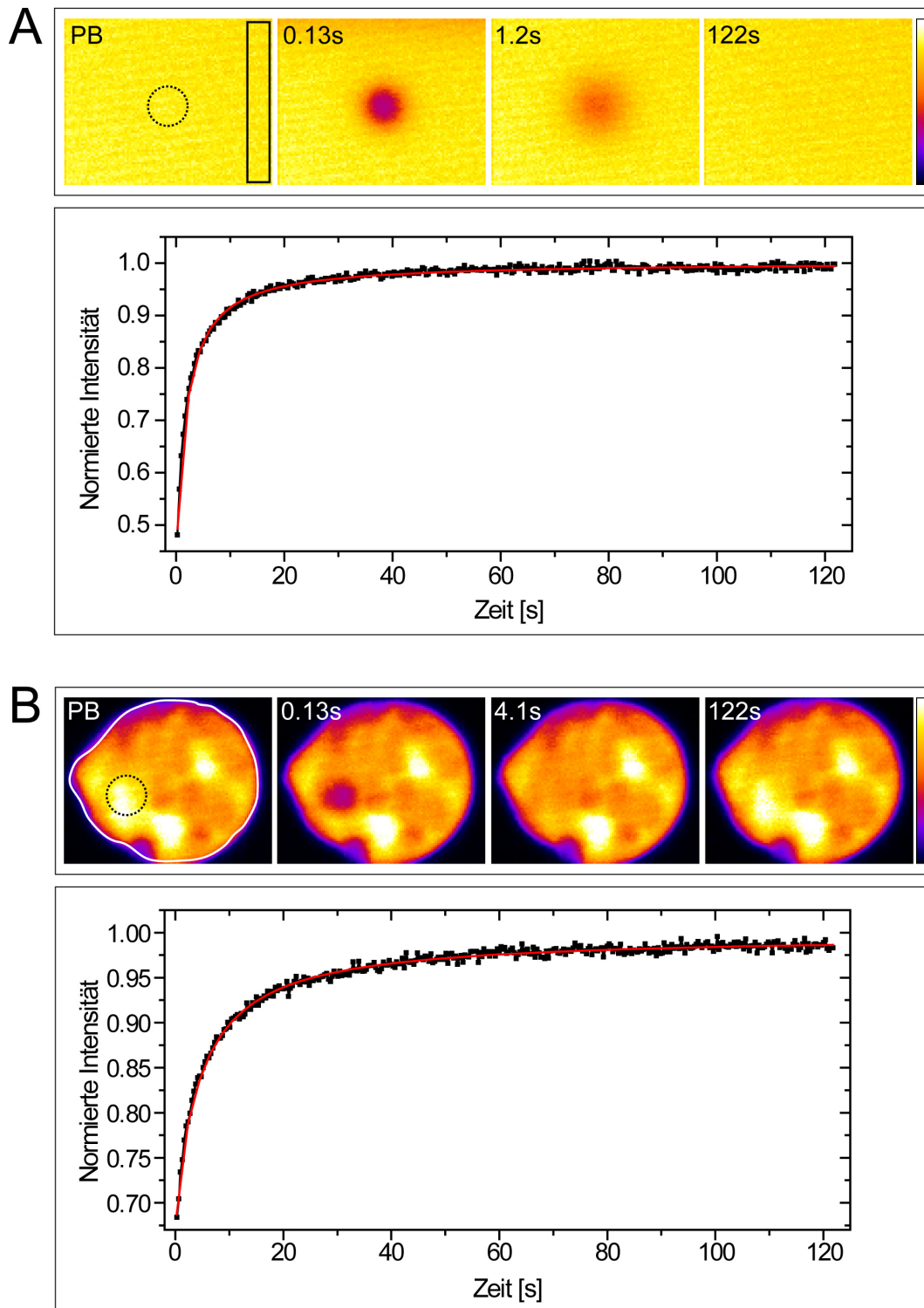


Abbildung 3.3: Gezeigt ist das Ergebnis einer typischen FRAP-Referenzmessung von 500 kDa FITC-Dextran in Transportpuffer (**A**) bzw. von 500 kDa FITC-Dextran, welches in einen Speicheldrüsenkern mikroinjiziert wurde (**B**). Die oberen Bilder zeigen jeweils die Fluoreszenzintensität zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Farbcodierung ist nebenstehend abgebildet. Das erste Bild wurde jeweils sofort nach dem ca. 130 ms dauernden Bleichvorgang aufgenommen. Die rote Kurve wurde nach Gleichung 2.4 an die Daten angepasst. PB, Bild vor Beginn des Bleichvorgangs. Gestrichelte Umrandung, Bleichbereich. Durchgezogene Umrandung, Referenzbereich. Siehe Text für Details.

Eine 1%-ige Injektionslösung lieferte die besten Ergebnisse. Die Speicheldrüsen verblieben jeweils während der gesamten Messung in PBS. Abbildung 3.3 B zeigt eine typische FRAP-Messung im Zellkern. Das 500 kDa FITC-Dextran blieb aus den Bereichen der Nukleoli und der Polytänchromosomen ausgeschlossen (hier wegen der geöffneten konfokalen Lochblende schlecht zu erkennen), durchdrang sonst jedoch den verbleibenden Nukleoplasmabereich vollständig. Durch die voll geöffnete Detektionslochblende (siehe Kapitel 2.2.5) sind auch Elemente zu erkennen, die nicht mehr im Fokus liegen. Die Bleichregion wurde so im Kern platziert, dass ein Bereich mit großem Nukleoplasmaanteil geblichen wurde. Die angepasste Gleichung 2.4 beschrieb die gemessenen Daten typischerweise sehr gut. Lediglich zwei Messungen mussten verworfen werden, da Gleichung 2.4 hier nicht an die Daten angepasst werden konnte. Die Fluoreszenzrückkehr war auch im Zellkern vollständig. Die Bleichtiefe lag mit 0.67 ± 0.04 geringer als in Lösung, wahrscheinlich bedingt durch Laserlichtabsorption des zu durchdringenden Gewebes. Im Mittel wurde für τ_r ein Wert von 4.72 ± 0.33 s erhalten. Der hier deutlich größere Standardfehler zeigt, dass eine höhere Streuung in den ermittelten Werten für τ_r gefunden wurde. Da der Diffusionskoeffizient umgekehrt proportional zu τ_r ist, sind nach Gleichung 2.9 das Verhältnis der τ_r -Werte in Puffer und im Zellkern gleich dem Verhältnis der Viskositäten im Puffer und im Zellkern. Damit erhält man für die mittlere Zellkernviskosität $\eta_{Nuc,500} = 3.2 \pm 0.27$ cP. Der Diffusionskoeffizient des 500 kDa FITC-Dextrans im Zellkern $D_{500,Kern}$ beträgt $2.4 \pm 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Tabelle 3.1 fasst die Ergebnisse zusammen.

Probe	τ_r [s]	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	k	K	N
Puffer (0.05%)	1.48 ± 0.02	7.7 ± 0.1	1 ± 0.004	1.15 ± 0.02	5
Kern (1%)	4.72 ± 0.33	2.4 ± 0.17	1 ± 0.004	0.67 ± 0.04	15

Tabelle 3.1: Zusammenfassung der FRAP-Messungen mit 500 kDa FITC-Dextran. Die Werte für τ_r , k und K sind Mittelwerte. Die Einzelwerte wurden nach Anpassen der Funktion 2.4 an die einzelnen Datensätze erhalten. τ_r , charakteristische Zeit der Fluoreszenzrückkehr. D , Diffusionskoeffizient. k , Vollständigkeit der Fluoreszenzrückkehr. K , Bleichtiefe. N , Anzahl der Messungen (bei Kernmessungen Anzahl unterschiedlicher Kerne). Der Standardfehler ist angegeben. Prozentangaben beziehen sich auf die Konzentration der Injektionslösung. Weitere Details im Text.

Um zu klären, ob eine ausgeprägte Größenabhängigkeit der nukleoplasmatischen Viskosität vorliegt, wurden die oben beschriebenen Messungen mit 150 kDa FITC-Dextran wiederholt, deren mittlere Größe ebenfalls durch Referenzmessungen in einer Probenkammer bestimmt wurde. Hierzu wurde eine 0.01%-ige Lösung (Gewicht/Volumen) in Transportpuffer insgesamt 6 mal vermessen. Abbildung 3.4 A zeigt eine typische Messung. Auch hier beschreibt Gleichung 2.4 die Daten gut. Auf dem ersten Bild nach dem Bleichvorgang ist jedoch deutlich zu erkennen, dass der Rand des Bleichbereichs bereits durch die höhere Mobilität des 150 kDa Dextrans verschwommen abgebildet ist. Wie Tabelle 3.2 zu entnehmen ist, errechnet sich für das 150 kDa FITC-Dextran ein mittlerer Diffusionskoeffizient $D_{150,Ref}$ von $27.8 \pm 0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Es ergibt sich entsprechend ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von 16 ± 0.4 nm. Beide Werte passen gut zu früheren Daten [Lang et al., 1986]. Die mittlere Bleichtiefe K liegt mit 0.51 ± 0.005 deutlich niedriger

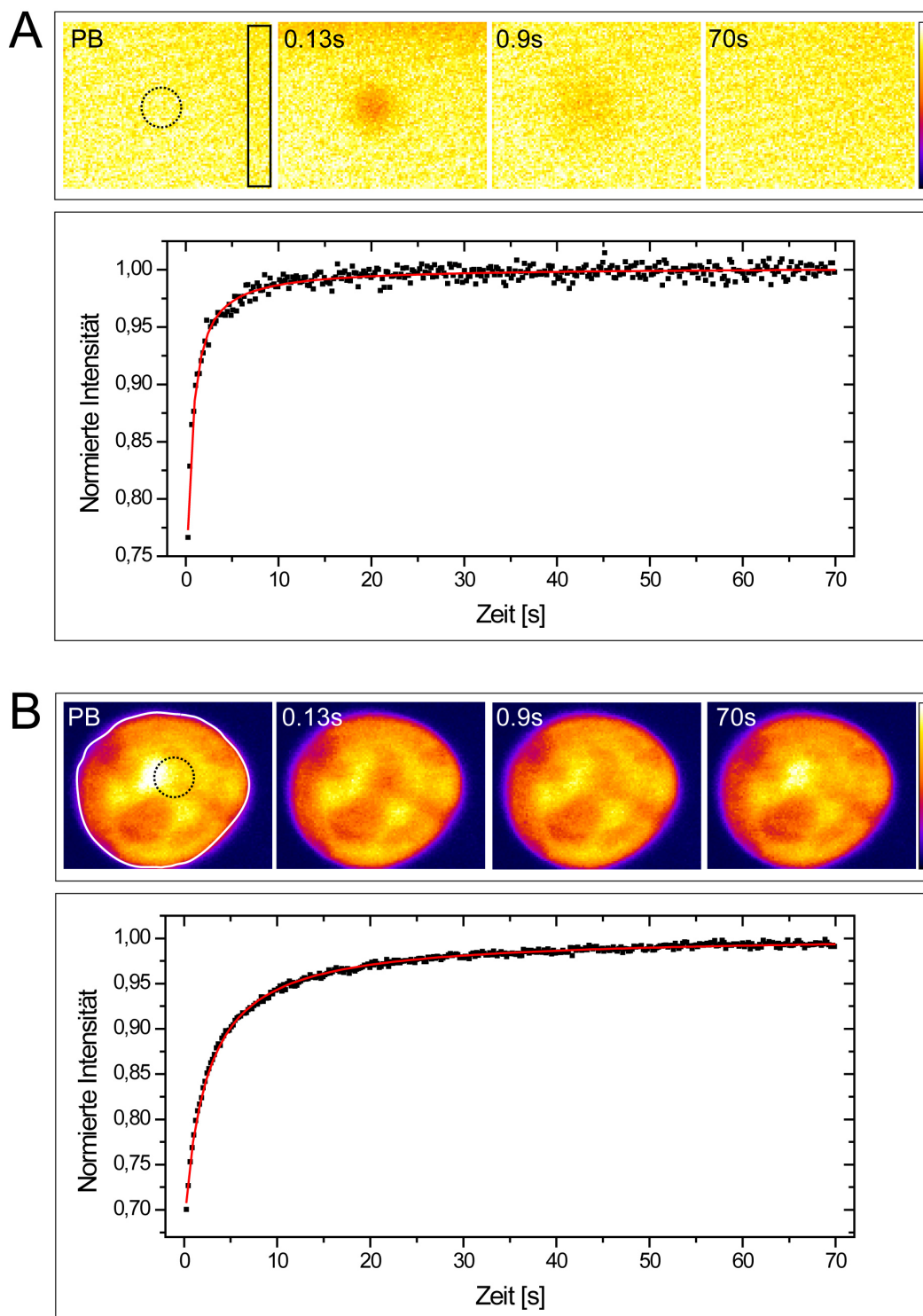


Abbildung 3.4: Gezeigt ist das Ergebnis einer typischen Referenzmessung mit 150 kDa FITC-Dextran in Transportpuffer (**A**) bzw. von in einen Speicheldrüsenzellkern mikroinjiziertem 150 kDa FITC-Dextran (**B**). Die oberen Bilder zeigen jeweils die Fluoreszenzintensität zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Farbcodierung ist nebenstehend abgebildet. Die rote Kurve wurde nach Gleichung 2.4 an die Daten angepasst. PB, Bild vor Beginn des Bleichvorgangs. Gestrichelte Umrandung, Bleichbereich. Durchgezogene Umrandung, Referenzbereich. Siehe Text für Details.

Probe	τ_r	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	k	K	N
Puffer (0.01%)	0.41 ± 0.01	27.8 ± 0.7	1 ± 0.004	0.51 ± 0.005	6
Kern (1%)	1.77 ± 0.2	6.4 ± 0.7	1.02 ± 0.006	0.6 ± 0.2	4(x2)

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der FRAP-Messungen mit 150 kDa-FITC-Dextran. Die Werte für τ_r und k sind Mittelwerte. Die Einzelwerte wurden nach Anpassen der Funktion 2.4 an die einzelnen Datensätze erhalten. N , Anzahl der Messungen. x2, 2 Messungen pro Kern. Der Standardfehler ist angegeben. Prozentangaben beziehen sich auf die Injektionslösung. Weitere Details im Text.

als bei den Puffermessungen des 500 kDa Dextrans bei gleicher Bleichintensität. Auch hier zeigt sich der Effekt des hohen Diffusionskoeffizienten: Mit zunehmendem D diffundieren während des Bleichvorgangs bereits ungebleichene Teilchen in den Bleichbereich. Die Fluoreszenzrückkehr ist wie erwartet vollständig.

Abbildung 3.4 B zeigt eine Beispielmessung im Kern. Aus oben beschriebenen Gründen wurde auch hier eine 1%-ige Lösung zur Injektion verwendet. Betrachtet man den Mittelwert für K (siehe Tabelle 3.2), so fällt auf, dass K mit 0.6 ± 0.2 zwar nur wenig kleiner ist, als im Fall des 500 kDa Dextrans im Kern, der Standardfehler hier jedoch deutlich größer ist. Dies zeigt eine breitere Streuung der Einzelmessungen an. Grundsätzlich wird, wie im Beispiel zu sehen, die Fluoreszenzrückkehr des 150 kDa FITC-Dextrans im Kern durch Gleichung 2.4 gut beschrieben. Insgesamt wurden 4 unterschiedliche Kerne jeweils 2 mal vermessen. Im Mittel ergibt sich für das 150 kDa Dextran im Kern ein Diffusionskoeffizient $D_{150,Kern}$ von $6.4 \pm 0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Verglichen mit den Referenzmessungen ergibt sich für das 150 kDa Dextran eine Viskosität im Kern von $\eta_{Nuc,150} = 4.3 \pm 0.6 \text{ cP}$.

Damit zeigten sowohl das 500 kDa als auch das 150 kDa FITC-Dextran ein qualitativ ähnliches Verhalten im Kern wie in Lösung. In allen Fällen wurde eine vollständige Fluoreszenzrückkehr beobachtet und die für rein diffusive Prozesse gültige Gleichung 2.4 beschrieb die Daten in allen Fällen gut. Insofern kann auf eine diffusiv dominierte Bewegung der Dextrane im Speicheldrüsenzellkern geschlossen werden. Tabelle 3.3 fasst die ermittelten Viskositätswerte zusammen. Demnach sind die Unterschiede zwischen den ermittelten Viskositätswerten gering. Zumindest als Trend deutet sich eine tendenziell höhere Kernviskosität für Teilchen kleineren Durchmessers an. Die ermittelten Viskositätswerte liegen insgesamt im Bereich der mit 30 nm QuantumDots (5 cP) und 210 nm Polystyrol-Partikeln (4 cP) gemessenen [Veith, 2007].

Dextran	η_{Kern} [cP]	d [nm]
500 kDa (1%)	3.2 ± 0.27	57 ± 0.8
150 kDa (1%)	4.3 ± 0.6	16 ± 0.4

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der mit FRAP ermittelten Kernviskositätswerte und Dextrandurchmesser. Der Durchmesser d wurde aus dem in Puffer gemessenen Diffusionskoeffizienten berechnet. Prozentangaben beziehen sich auf die Injektionslösung. Der Standardfehler ist angegeben. Details im Text.

3.4 Die BR2.1 mRNP-Mobilität im Nukleoplasma

3.4.1 *In-situ*-Markierung und Markierungsgrad

Endogene BR2.1 mRNPs wurden mit Hilfe fluoreszenzmarkierter 2'O-Me-RNA-Oligonukleotide (kurz: spezifische RNA-Oligonukleotide), welche komplementär zu Teilen der repetitiven BR2.1-Sequenz sind, spezifisch *in situ* markiert (siehe Kapitel 2.1.4). Sie weisen im Vergleich zu DNA-Oligonukleotiden eine deutlich höhere Lebensdauer im Nukleoplasma auf und zeichnen sich durch eine stärkere Bindung an die Ziel-RNA aus [Molenaar et al., 2001]. Die Oligonukleotide wurden in Speicheldrüsenzellkerne mikroinjiziert. Abbildung 3.5 A zeigt eine konfokale Aufnahme eines Speicheldrüsenkerns nach Oligonukleotidmikroinjektion. Die BR2.1-Transkriptionsstelle ist deutlich zu erkennen, was bestätigt, dass die Oligonukleotide spezifisch an die BR2.1 mRNA binden. Der gegenüber dem Nukleoplasma deutliche erhöhte Markierungsgrad der Transkriptionsstelle ist mit der hohen lokalen Konzentration an mRNA zu erklären, da bis zu 16 000 Chromatinfäden mehrfach parallel transkribiert werden (siehe Einleitung) und eine entsprechende Anzahl von unfertigen mRNA-Molekülen markiert werden kann. Das Nukleoplasma ist ebenfalls durch die Oligonukleotide angefärbt. Auffällig ist, dass die Oligonukleotide vom Polytänchromosomen ausgeschlossen bleiben. Hier zeigt sich, dass die meisten Oligonukleotide gebunden an BR2.1 mRNPs vorliegen, da die kondensierten Polytänchromosomen eine äußerst dichte Struktur bilden, die für mRNPs mit einem Durchmesser von 50 nm undurchdringlich sind.

Um die nukleoplasmatische Mobilität der BR2.1 mRNPs zu untersuchen wurden Messungen an

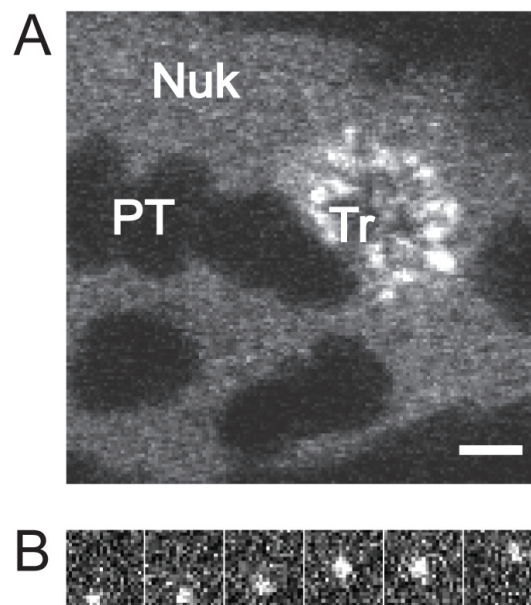


Abbildung 3.5: (A) Konfokale Aufnahme eines Speicheldrüsenzellkerns nach Mikroinjektion fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide, die spezifisch BR2.1 mRNA markieren. Tr, BR2.1 Transkriptionsstelle. PT, Polytänchromosom. Nuk, Nukleoplasma. Balken: 5 µm. (B) Filmsequenz (Ausschnitt) eines am Einzelmolekülmikroskop aufgenommenen BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma. Gezeigt ist jedes 5. Bild (entsprechend 50 ms Zeitdifferenz zwischen den Bildern). Pixelgröße 95.2 nm.

einem Fluoreszenz-Videomikroskop (Einzelmolekülmikroskop, siehe Kapitel 2.2.7) durchgeführt. Diese Technik ist in der Lage Signale *einzelner* Fluoreszenzfarbstoffe mit hoher Geschwindigkeit aufzulösen. Damit konnte die Injektionskonzentration der Oligonukleotide nun so gering gewählt werden, dass rechnerisch nur ein Bruchteil aller im Kern befindlichen BR2.1 mRNPs markiert wurde, diese dann allerdings potentiell jeweils nur noch mit (wahrscheinlich) einem Fluoreszenzfarbstoff. Dadurch konnte das in früheren Studien notwendige exzessive Bleichen vor den eigentlichen Messungen verhindert werden. Im Speicheldrüsenkern befinden sich 70 bis 90 mRNP-Partikel pro μm^3 [Kylberg et al., 2008], von welchen der Hauptanteil BR2.1 bzw. BR2.2 mRNPs sind. Es lässt sich abschätzen, dass bei ausreichend geringer Injektionskonzentration nur noch ein Bruchteil dieser mRNPs markiert wird. Bei Annahme eines kugelförmigen Zellkerns, mit einem Durchmesser von $70 \mu\text{m}$, ergibt sich ein Gesamtkernvolumen von $180\,000 \mu\text{m}^3$. Bei Annahme eines Injektionsvolumens von 125 fL (was einem Würfel mit $5 \mu\text{m}$ Kantenlänge entspricht) sollten mit einer Injektionskonzentration von beispielsweise 0.25 nmol/mL (1:400 Verdünnung der Stockkonzentration, siehe Kapitel 2.2.4) durch die Mikroinjektion ca. 3 100 Oligonukleotide in den Kern eingebracht werden, welche wie in Kapitel 3.4.4 gezeigt, sofort an die BR2.1 mRNPs binden (die Zahl der nicht gebundenen Oligonukleotide ist gering). Da Polytäanchrosomen und Nucleoli für die BR2.1 mRNPs unpassierbar sind, muss das Kernvolumen, welches sie ausfüllen (aus konfokalen Aufnahmen abgeschätzt etwa 50%), vom Gesamtkernvolumen abgezogen werden, um die Dichte markierter BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma zu errechnen. Bei Annahme einer Gleichverteilung der Oligonukleotide auf 50% des Kerns, kommt so theoretisch etwa ein markierter BR2.1 mRNP auf $30 \mu\text{m}^3$. Trotz der Tatsache, dass es sich um eine grobe Abschätzung handelt, zeigte sich, dass sich mit einer Injektionskonzentration von 0.25 nmol/mL - kombiniert mit der Sensitivität des Mikroskopaufbaus - das gewünschte Ergebnis, nämlich die Beobachtung einzelner BR2.1 mRNPs ohne längere Bleichphasen, realisieren ließ. Abbildung 3.5 B zeigt einen vereinzelt BR2.1 mRNP, welcher im Nukleoplasma diffundiert. Typischerweise wurden so unmittelbar nach der Injektion selten mehr als 20 Partikel in einem Gesichtsfeld von ca. $150 \mu\text{m}^2$ beobachtet, teilweise nach einer nur noch sehr kurzen Bleichphase von unter einer Minute mit voller Laserintensität um die Signale weiter zu vereinzeln. Nimmt man eine Feldtiefe von ungefähr $1 \mu\text{m}$ an, so wurde experimentell maximal etwa ein BR2.1 mRNP pro $8 \mu\text{m}^3$ beobachtet, was in etwa in der Größenordnung der oben durchgeführten Berechnung liegt. Durch fortlaufendes zwangsläufiges Photobleichen während der sukzessiven Aufnahme mehrerer Filme sank dieser Wert im Laufe eines Experiments.

Abbildung 3.6 zeigt ein Intensitätshistogramm aller in einem typischen Film durch die Trackingroutine detektierten, ungefilterten Signale, welche nach Mikroinjektion spezifischer RNA-Oligonukleotide beobachtet werden konnten (dunkelgrau). Das Intensitätshistogramm ist annähernd gaussförmig und deutet damit auf eine einheitliche Markierung aller detektierten Partikel hin. Verglichen mit dem Histogramm der Hintergrundintensitäten (Abbildung 3.6, hellgrau) zeigt sich, dass detektierte Signale im Schnitt um den Faktor 4.5 heller waren, als der Hintergrund. Im hier vorgestellten Fall betrug das durchschnittliche Signal-zu-Rausch-Verhältnis (abgeschätzt als absolute Intensität über Hintergrund, geteilt durch die Standardabweichung des Hintergrundrauschens) der detektierten Partikel ungefähr 8. Typischerweise wurden solche SRVs erreicht, lagen

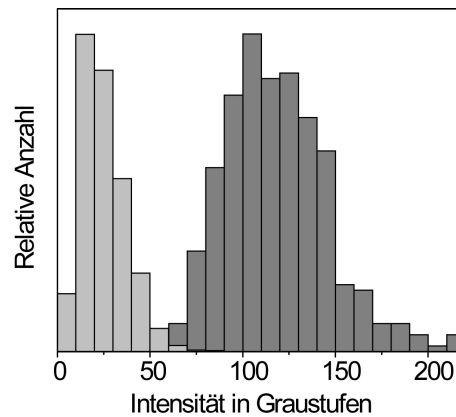


Abbildung 3.6: Gezeigt ist ein Intensitätshistogramm aller in einem typischen Film detektierten Signale, welche nach Mikroinjektion spezifischer RNA-Oligonukleotide beobachtet werden konnten (dunkelgrau). Dem gegenüber gestellt ist ein Histogramm über die Intensität des Hintergrundrauschens aus einem Bereich, in welchem keine Partikelsignale zu finden waren.

aber zum Teil auch deutlich darunter, insbesondere bei Hämolympheinkubation der Drüse. Angesichts der guten Übereinstimmung der theoretischen Abschätzung der markierten Partikel-dichte und dem experimentellem Befund ist es wahrscheinlich, dass die beobachteten Partikel wie erwartet im Schnitt einfach, d.h. mit einem Oligonukleotid und damit einem Farbstoffmolekül pro mRNP, markiert waren.

3.4.2 Einzelmolekülmikroskopie mit RNA-Oligonukleotiden

Durch die Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops mit einer schnellen CCD-Kamera, konnte die Mobilität der BR2.1 mRNPs erstmals mit einer Zeitauflösung von 100 Hz untersucht werden. Dazu wurden spezifische RNA-Oligonukleotide in insgesamt 6 Zellkerne in 4 verschiedenen Speicheldrüsen mikroinjiziert und am Einzelmolekülmikroskop beobachtet. Die unmittelbar nach der Injektion sichtbaren vereinzelt Signale wurden mittels Einzelpartikeltracking verfolgt und zu insgesamt 28 861 Trajektorien verknüpft. Die dreidimensionale Mobilität der BR2.1 mRNPs wird beim hier genutzten Einzelpartikeltracking in zwei Dimensionen projiziert (siehe Kapitel 2.2.8). Die Diffusion in der 3. Dimension sorgt allerdings dafür, dass die untersuchten Partikel den Fokusbereich abhängig von ihrer Mobilität früher (hohe Mobilität) oder später (geringe Mobilität) verlassen. Daher wiesen nur knapp 17% aller Trajektorien 5 oder mehr Positionen im Fokusbereich auf.

Aus früheren Studien war bekannt, dass die BR2.1 mRNPs eine heterogene Mobilität zeigen, welche sich am besten mit Hilfe der Sprungweitenanalyse beschreiben lässt (siehe [Veith, 2007] und [Siebrasse et al., 2008]). Abbildung 3.7 A zeigt die Histogramme der Sprungweiten zwischen jeweils zwei folgenden Bildern (JD1-Histogramme, siehe Kapitel 2.2.9.1), aufgeschlüsselt nach den jeweils untersuchten Zellkernen als Linienplot. Es zeigte sich, dass zwischen den einzelnen Zellkernen trotz gleicher Präparations- und Inkubationsbedingungen eine gewisse Variabilität herrschte, welche sich in nicht exakt überlappenden Sprungweitenhistogrammen äußerte. Diese

Variabilität konnte mit keiner makroskopisch zugänglichen Größe korreliert werden und musste als grundständige Eigenheit des biologischen Systems betrachtet werden. Qualitativ zeigten sich jedoch Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Zellkernen. So zeigte jedes Sprungweitenhistogramm eine zugrundeliegende heterogene Mobilität, welche nur mit einer Linearkombination von Gleichung 2.10 beschrieben werden konnte. Auch in den MSD-Verläufen der jeweiligen Kerne, welche unter besonderer Berücksichtigung der heterogenen Partikelmobilität so berechnet wurden, dass alle Trajektorien gleich gewichtet waren (siehe Kapitel 2.2.9.2), wurde diese Variabilität deutlich (siehe Abbildung 3.7 B). Hier zeigte sich, dass alle untersuchten Kerne qualitativ einen ähnlichen MSD-Verlauf aufwiesen, welcher mehr oder weniger stark vom linearen Verlauf abwich (siehe zum Vergleich die gestrichelten Geraden in Abbildung 3.7 B). Zur Konzentration auf die den einzelnen Kernen zugrundeliegenden (qualitativen) Gemeinsamkeiten wurde eine konsequente Mittelung der zur Verfügung stehenden Daten durchgeführt. Insofern ist zu betonen, dass im Folgenden stets mittlere Größen angegeben sind, denen die Daten mehrerer Kerne zugrundeliegen. Dies war zwar mit dem Nachteil verbunden, dass sich die vorgestellten Daten stets auf einen virtuellen Standardzellkern beziehen, jedoch notwendig, um die der BR2.1 mRNP Mobilität zugrunde liegenden Prozesse herauszuarbeiten.

Abbildung 3.7 C zeigt entsprechend die mittlere Sprungweitenanalyse der 6 untersuchten Kerne. Insgesamt gingen in diese Analyse über 124 000 Sprünge ein. Wie erwartet musste eine Linearkombination von Gleichung 2.10 verwendet werden, um den Verlauf des Sprungweitenhistogramms passend zu beschreiben. Erst die Annahme von insgesamt 3 Mobilitätskomponenten in Gleichung 2.11 lieferte eine Gleichverteilung der Residuen um Null (Abbildung 3.7 C oben) und beschrieb das Histogramm gut (rote Linie in Abbildung 3.7 C). Dabei wurden mit einem Anteil von insgesamt ungefähr 99 % zwei Hauptmobilitätskomponenten 1 und 2 ermittelt: Komponente 1 mit einem Diffusionskoeffizient D_1 von $0.3 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $38 \pm 4\%$ (gepunktete Kurve), sowie Komponente 2 mit einem Diffusionskoeffizient D_2 von $0.73 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $61 \pm 4\%$ (gestrichelte Kurve). Der verbleibende kleine Anteil von 0.7 % konnte einer dritten, immobilen Fraktion mit einem Diffusionskoeffizient von $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zugeordnet werden. Ein 0.7%-iger Anteil von 124 000 Sprüngen entspricht nur 868 Sprüngen insgesamt, womit auch unspezifische Wechselwirkungen nicht ausgeschlossen werden konnten (siehe Diskussion). Allerdings konnten vereinzelt Partikelsignale beobachtet werden, welche in Kernmembran- oder Chromosomennähe kurzzeitig immobilisiert waren.

Abbildung 3.7 D zeigt den Verlauf des MSDs mit der Zeit. Insgesamt gingen 306 Trajektorien mit 35 Positionen in die Berechnung des MSDs ein. Obwohl zu Beginn ein linearer Verlauf zu erkennen ist, zeigt der MSD-Verlauf für höhere Zeiten eine klare Abweichung von der Linearität, ohne sich allerdings asymptotisch einem bestimmten Wert zu nähern. Ein solches Verhalten ist charakteristisch für anomale Diffusion (siehe Kapitel 2.2.9.2 und Kapitel 3.5). Das Anpassen einer Geradengleichung an den linearen Anfangsverlauf des MSDs lieferte einen initialen mittleren Diffusionskoeffizienten von $0.71 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Eine schnelle Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von $> 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (bzw. genauer $D_{I,alt} = 3.74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [Veith, 2007, Siebrasse et al., 2008]) konnte hier nicht beobachtet werden. Im Unterschied zu meiner Diplomarbeit [Veith, 2007] und [Siebrasse et al., 2008], konnten in dieser Arbeit

wichtige methodische Verbesserungen realisiert werden: durch eine signifikante Verringerung der Injektionskonzentrationen und eine deutliche Erhöhung der Zeitaufösung wurde schnell ein sehr hoher Vereinzelungsgrad der BR2.1 mRNPs erreicht. Eine Korrelation zwischen den methodischen Verbesserungen und dem Wegfallen der Komponente $D_{I,alt}$ ist daher anzunehmen (siehe Diskussion).

Als Kontrolle wurden unspezifische RNA-Oligonukleotide, welche nicht spezifisch an die BR2.1 mRNA binden konnten, in 4 Kerne aus 3 verschiedenen Speicheldrüsen mikroinjiziert [Anzt, 2009]. Eine Markierung der Transkriptionsstelle konnte erwartungsgemäß nie beobachtet werden. Trotz einer vergleichbaren Anzahl an Messungen wurden *insgesamt* nur 822 Trajektorien mit 4761 Sprüngen detektiert. Abbildung 3.8 A zeigt das JD1-Histogramm. Auch hier wurden 3 Mobi-

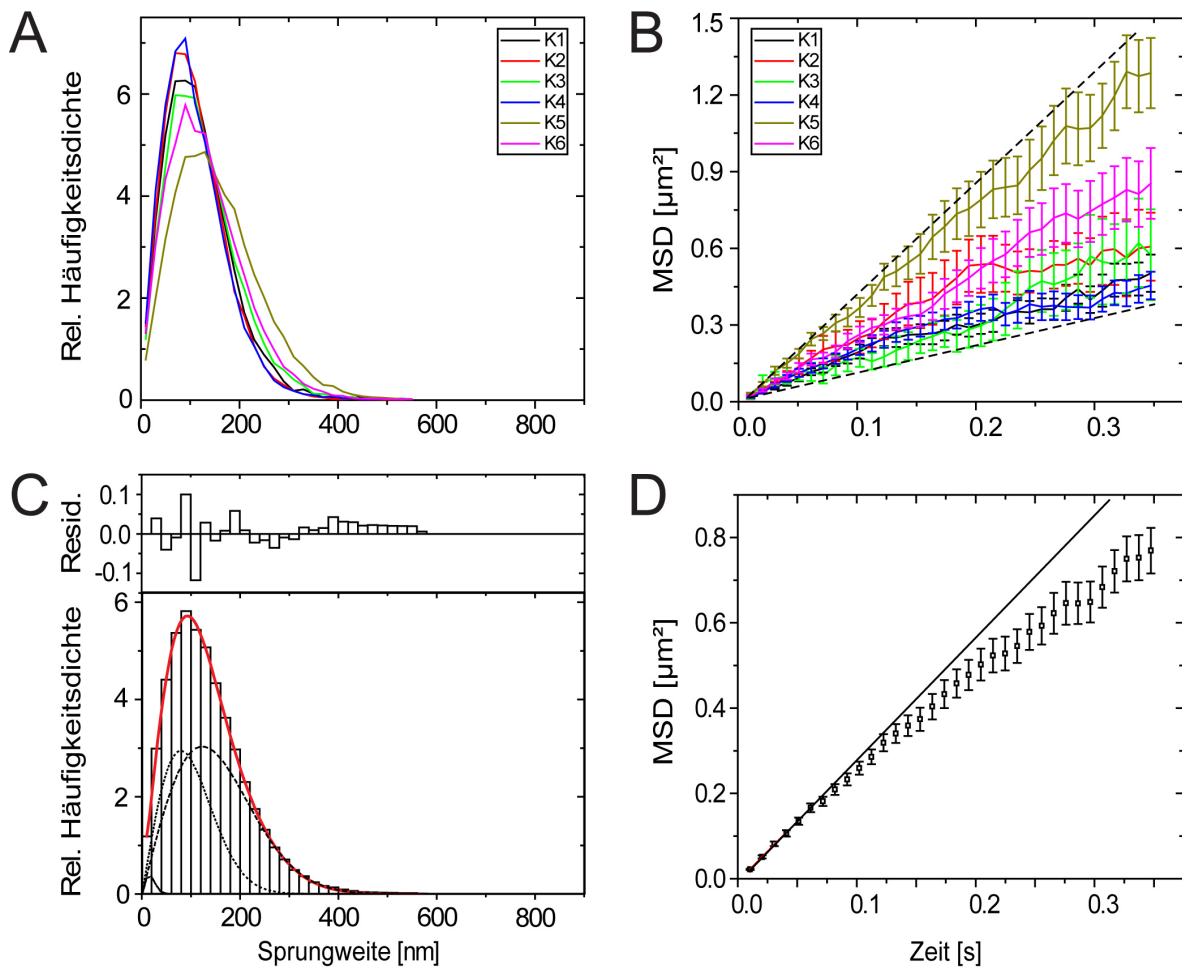


Abbildung 3.7: Variabilität der Sprungweitenverteilung (A) und des MSD-Verlaufs (B) aufgeschlüsselt nach den einzelnen Zellkernen (siehe Legende; K, Kern). (C) Sprungweitenanalyse der spezifischen Oligonukleotide. Es wurden zwei Hauptkomponenten $D_1 = 0.3 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($38 \pm 4\%$, gepunktete Kurve), $D_2 = 0.73 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($61 \pm 4\%$, gestrichelte Kurve) und eine langsamste Fraktion mit $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (1% , durchgezogene Kurve) ermittelt. Die rote Kurve ist die Summe aller Komponenten, deren Residuen oben abgebildet sind. (D) Auftragung des MSD gegen die Zeit für Trajektorien mit mindestens 35 Positionen. Im linearen Anfangsbereich (erste 6 Punkte) wurde ein Diffusionskoeffizient von $0.71 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (schwarze Linie).

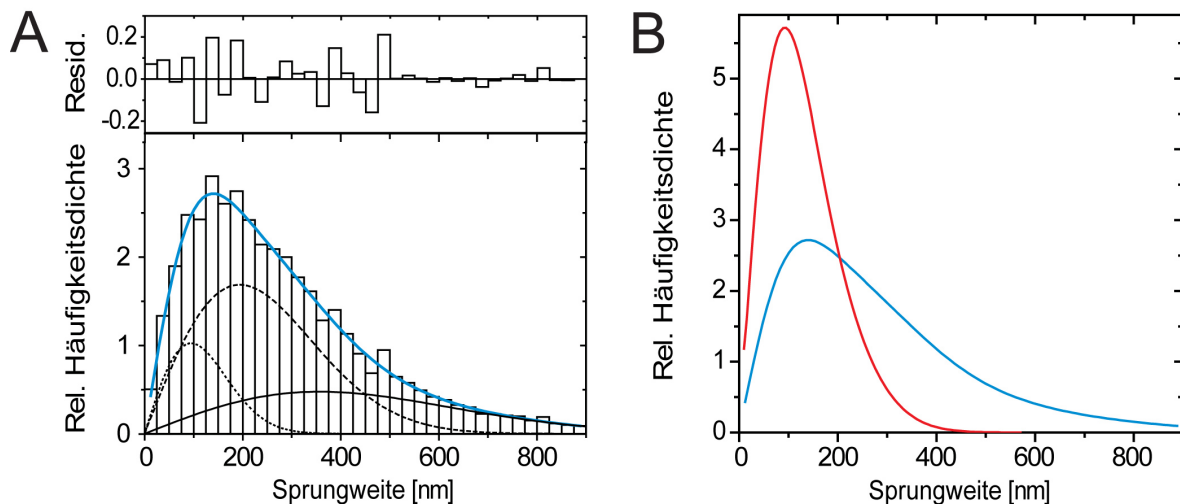


Abbildung 3.8: (A) Sprungweitenanalyse der unspezifischen Oligonukleotide. Es wurden drei Mobilitätskomponenten $D_1 = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($17 \pm 5\%$, gepunktete Kurve), $D_2 = 2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($54 \pm 11\%$, gestrichelte Kurve) und $D_3 = 6.5 \pm 2.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($29 \pm 14\%$, durchgezogene Kurve) ermittelt. Die blaue Kurve ist die Summe der 3 Komponenten. (B) Zum Vergleich der mit spezifischen (rote Kurve) und unspezifischen (blaue Kurve) Oligonukleotiden ermittelten Mobilitäten sind die aufsummierten Kurven aus A und Abb. 3.7 C übereinandergelegt. Details siehe Text.

litätskomponenten in Gleichung 2.11 benötigt, um das Histogramm passend zu beschreiben (blaue Linie). Deutliche Unterschiede hingegen zeigten sich in den Absolutwerten der Diffusionskoeffizienten: für Komponente 1 wurde ein Diffusionskoeffizient D_1 von $0.5 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt, bei einem relativen Anteil von $17 \pm 5\%$ (gepunktete Kurve), für Komponente 2 ein Diffusionskoeffizient D_2 von $2 \pm 0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei einem relativen Anteil von $54 \pm 11\%$ (gestrichelte Kurve) und für Komponente 3 ein Diffusionskoeffizient D_3 von $6.5 \pm 2.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ bei einem relativen Anteil von $29 \pm 14\%$ (durchgezogene Kurve). Insgesamt zeigten die wenigen Signale, welche nach Injektion der Kontrolloligonukleotide beobachtet wurden (nur 3.8% der mit spezifischen Oligonukleotiden detektierten Sprünge) also eine deutliche höhere Mobilität, wie Abbildung 3.8 B verdeutlicht. Im Vergleich mit den spezifischen RNA-Oligonukleotiden, liegen sowohl Komponente 2, als auch Komponente 3 im Diffusionskoeffizient deutlich über der schnellsten Komponente, welche hier mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden detektiert werden konnte. Das entspricht insgesamt 83% der Sprünge. Ein Vergleich der detektierten Trajektorienanzahl, welche mit spezifischen (28 861 Trajektorien) bzw. unspezifischen (822 Trajektorien) Oligonukleotiden bei ähnlicher Anzahl der Experimente gefunden wurden zeigt, dass die Detektionswahrscheinlichkeit eines Signals mit Kontrolloligonukleotiden um den Faktor 35 niedriger lag. Signale waren also auch mit unspezifischen Oligonukleotiden detektierbar, jedoch zeigten die detektierten Partikel hier eine höhere Mobilität und eine damit einhergehende niedrigere Detektionswahrscheinlichkeit. Offensichtlich zeigten die Kontrolloligonukleotide eine gewisse Tendenz zur unspezifischen Bindung, weshalb sie vereinzelt sichtbar wurden. Dies war ein Hinweis darauf, dass die in der vorhergehenden Studie detektierte Komponente 4 (mit $D_{I,alt} = 3.74 \mu\text{m}^2/\text{s}$) nicht spezifisch für die BR2.1 mRNPs und damit möglicherweise auf unspezifisch gebundene Oligonukleotide zurückzuführen war (siehe Diskussion). Tabelle 3.4 fasst die ermittelten Werte zusammen. Komponente 2 und 3 der unspezifischen

Oligonukleotide sind zur besseren Übersichtlichkeit hier zu einer Komponente zusammengefasst.

Spezifische O.	A_1 [%]	D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_2 [%]	D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_3 [%]	D_3 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
SPT, RNA	38 ± 4	0.3 ± 0.02	61 ± 4	0.73 ± 0.03	-	-
FCS, RNA	20 ± 4	0.15 ± 0.05	80 ± 2	0.8 ± 0.05	10 ± 1	11 ± 2
SPT, MB	56 ± 12	0.31 ± 0.03	44 ± 11	0.68 ± 0.08	-	-
Unspezifische O.	A_1 [%]	D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_2 [%]	D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_3 [%]	D_3 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
SPT, RNA	17 ± 5	0.5 ± 0.01	-	-	83 ± 15	2 - 6
FCS, RNA	-	-	13 ± 1	0.95 ± 0.1	73 ± 1	10 ± 0.4

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der einzelmolekülmikroskopischen Messungen. SPT, Einzelpartikeltracking. FCS, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. RNA, RNA-Oligonukleotide. MB, MB RNA-Oligonukleotide. Die Daten sind nach spezifischen und unspezifischen Oligonukleotiden (O.) sortiert.

3.4.3 Die BR2.1 mRNPs zeigen eine diskontinuierliche Bewegung

Die BR2.1 mRNP-Diffusion ließ sich also effektiv mit zwei Komponenten (99 % Anteil) beschreiben, deren Ursprung zu klären war. Interessant war in diesem Zusammenhang die Frage, ob es sich bei diesen beiden Komponenten - wie die simple Diffusionsbetrachtung suggeriert - um zwei unterschiedliche Populationen von BR2.1 mRNPs handelte, oder ob die BR2.1 mRNPs ihre Beweglichkeit und damit ihren Diffusionskoeffizienten im Laufe einer Trajektorie änderten (engl. *change in movement mode*, kurz CIMM). Es wurde eine Analyse entwickelt, um diese beiden Fälle unterscheiden zu können (siehe Kapitel 2.2.9.4). Kurz gefasst wurden Trajektorien nach der Länge der zurückgelegten Distanz (d.h. der Sprünge) zwischen zwei benachbarten Bildern sortiert. Im Falle zweier unterscheidbarer Partikelpopulationen mit definierten Diffusionskonstanten D_{langsam} und D_{schnell} , welche nicht ineinander übergehen können, werden Sprünge, welche eine gewisse Länge übersteigen, nur noch von Partikeln mit D_{schnell} mit einer nennenswerten Wahrscheinlichkeit absolviert. Diese Länge lässt sich anhand des Sprungweitenhistogramms bestimmen (siehe Kapitel 2.2.9.4). Werden so also Trajektorien nach ihren schnellen Anteilen (großen Sprüngen) selektiert, sollten alle ausgewählten Trajektorien im Fall unterschiedlicher Partikelpopulationen nur noch einen Diffusionskoeffizienten D_{schnell} zeigen. Wird allerdings nach entsprechender Sortierung auch D_{langsam} wiedergefunden, so muss davon ausgegangen werden, dass es innerhalb einzelner Trajektorien zu einem Wechsel des Diffusionskoeffizienten kommt. Wie in Kapitel 2.2.9.4 dargelegt, konnten diese Annahmen mit simulierten Daten bestätigt werden.

Die Analyse wurde mit dem in Abbildung 3.7 C gezeigten Sprungweitenhistogramm durchgeführt. Dort ist ersichtlich, dass Sprünge $\gg 300$ Nanometer nur noch von Partikeln mit einem Diffusionskoeffizienten von $0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$ absolviert werden können. Die Grenze zur Trajektorienselektion wurde auf 425 Nanometer festgelegt, um einerseits einen möglichst großen Abstand zur Sprungweitenverteilung der langsameren Komponente zu haben, andererseits aber noch eine Mindestan-

zahl Sprünge oberhalb der Grenze finden zu können. Abbildung 3.9 zeigt das nach Anwendung der Trajektorienselektion erhaltene Sprungweitenhistogramm, welches 3367 Sprünge beinhaltet. Dieses ließ sich nur mit 2 Mobilitätskomponenten passend beschreiben (rote Kurve), nicht aber mit einer (blaue Kurve). Im Detail wurden folgende Fraktionen ermittelt: Komponente 1 mit einem Diffusionskoeffizient $D_{1,CIMM}$ von $0.4 \pm 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $40 \pm 34\%$ (gestrichelte Kurve), sowie Komponente 2 mit einem Diffusionskoeffizient $D_{2,CIMM}$ von $0.99 \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $60 \pm 33\%$ (durchgezogene Kurve). Im Vergleich zu den Werten, welche im Ausgangssprungweitenhistogramm ermittelt wurden, zeigte sich im Rahmen der Fehlergenauigkeit eine gute Übereinstimmung. Damit konnte nachgewiesen werden, dass formal beide Mobilitätskomponenten in einzelnen Trajektorien vorkommen, was sich damit wie ein Wechsel des Diffusionskoeffizienten innerhalb der Trajektorien darstellte. Die BR2.1 mRNPs zeigen also eine „diskontinuierliche Bewegung“ (*change in movement mode*). Wichtig ist jedoch, dass sich die BR2.1 mRNP Mobilität in der Sprungweitenanalyse zwar zutreffend mit zwei Mobilitätskomponenten beschreiben ließ, dies jedoch keinerlei Aussagen über die Zeitauflösung beinhaltete, auf welcher sich ein solcher Wechsel vollzog. Experimentell wurde keine Trajektorie gefunden, bei welcher sich tatsächlich ein Wechsel zwischen den beiden Diffusionskoeffizienten, in Form ausgedehnter Bereiche mit kleinerem bzw. größerem Diffusionskoeffizienten, auflösen lies. Erst im Lichte weiterer Experimente konnte eine mögliche Erklärung hierfür gefunden werden (siehe Kapitel 3.5.2).

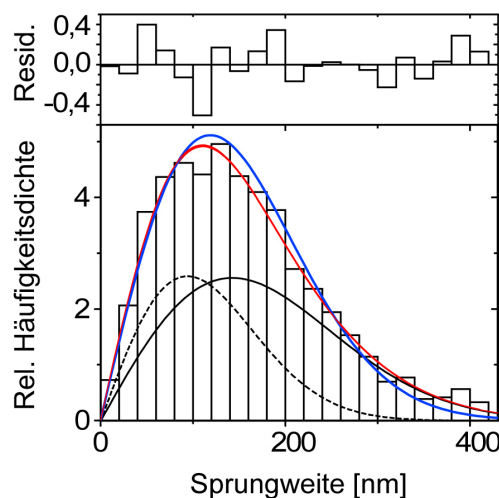


Abbildung 3.9: Sprungweitenanalyse von BR2.1 mRNP-Trajektorien, welche mindestens einen Sprung von >425 Nanometer zwischen aufeinanderfolgenden Bildern aufwiesen. Ein solcher Sprung kann nur von der schnelleren Mobilitätskomponente mit nicht vernachlässigbarer Wahrscheinlichkeit absolviert werden. Die CIMM-Analyse lieferte zwei Mobilitätskomponenten mit $D_{1,CIMM} = 0.4 \pm 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($40 \pm 34\%$, gestrichelte Kurve) und $D_{2,CIMM} = 0.99 \pm 0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($60 \pm 33\%$, durchgezogene Kurve). Die Residuen beziehen sich auf die Summe der beiden Mobilitätskomponenten (rote Kurve). Eine Mobilitätskomponente beschrieb den Verlauf des Histogramms unzureichend (blaue Kurve).

3.4.4 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie mit RNA-Oligonukleotiden

Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (kurz FCS) ist eine Technik, bei welcher die Aufenthaltsdauer einzelner fluoreszenzmarkierter Partikel in einem konfokalen Volumenelement gemessen wird (siehe Kapitel 2.2.6). Sie zeichnet sich insbesondere durch eine hohe Zeitauflösung und eine sehr hohe Sensitivität aus. Damit kann sie schnelle diffusive Prozesse besser auflösen als die Fluoreszenz-Video-Mikroskopie.

Spezifische RNA-Oligonukleotide wurden in insgesamt 9 Zellkerne aus 3 verschiedenen Speicheldrüsen mikroinjiziert. Durch die im Vergleich zur Fluoreszenz-Video-Mikroskopie erhöhte Sensitivität konnte die Mikroinjektionskonzentration nochmal um den Faktor 2.5 gesenkt werden. Der FCS-Fokus wurde manuell so im Kern positioniert, dass das konfokale Volumen möglichst im nukleoplasmatischen Bereich lag, jedoch konnte der Kontakt zu Polytänchromosombereichen nicht völlig ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden 77 einzelne FCS-Messungen durchgeführt. Abbildung 3.10 A zeigt eine typische Intensitätsspur, deren Autokorrelation in Abbildung 3.10 B zu sehen ist (Kreise). Gleichung 2.6 wurde an die Autokorrelationskurve angepasst (rote Kurve). Typischerweise wurden 3 Komponenten in Gleichung 2.6 benötigt, um die Autokorrelationskurve passend zu beschreiben (siehe Kapitel 2.2.6). Die im folgenden angegebenen Werte sind immer Mittelwerte der Daten, die in den einzelnen FCS-Messungen erhalten wurden. Es wurden insgesamt 3 unterschiedliche Mobilitätskomponenten ermittelt. In 13 von 77 Messungen (und 7 von 9 Kernen) wurde eine langsame Komponente 1 mit einem Diffusionskoeffizient D_1 von $0.15 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Anteil von $20 \pm 4\%$ gefunden. Die Hauptkomponente (Komponente 2) mit einem mittleren Diffusionskoeffizient D_2 von $0.8 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde in allen 77 Einzelmessungen gefunden mit einem relativen mittleren Anteil von $80 \pm 1.5\%$. Abbildung 3.10 B zeigt eine Autokorrelationskurve (Kreise, rote Kurve), in welcher nur die Hauptkomponente auftrat, Abbildung 3.10 C eine Autokorrelationskurve, in welcher Komponente 1 und 2 zusammen auftraten. Beide Komponenten 1 und 2 zeigten eine gute Übereinstimmung mit den im Einzelpartikeltracking ermittelten Diffusionskoeffizienten. Eine schnellste Komponente 3 mit einem Diffusionskoeffizient D_3 von $11 \pm 2 \mu\text{m}^2/\text{s}$, wurde in 7 von 77 Messungen und 3 von 9 Kernen gefunden. Ihr relativer Anteil betrug $10 \pm 1\%$. Abbildung 3.10 D fasst die Ergebnisse, welche mit den spezifischen Oligonukleotiden ermittelt wurden, zusammen. Hier fällt auf, dass insbesondere Komponente 1 eine relativ breite Streuung der Diffusionskoeffizienten zeigt. Die hier gefundene schnellste Komponente 3 tauchte in den Videomikroskopiemessungen mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden nicht auf. Aufgrund des hohen Diffusionskoeffizienten und des seltenen Auftretens lag die Annahme nahe, dass es sich um ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Oligonukleotide handelte.

Um dies zu klären wurden unspezifische Oligonukleotide in insgesamt 7 Kerne aus 3 Speicheldrüsen mikroinjiziert. Insgesamt wurden 61 Einzelmessungen durchgeführt. Abbildung 3.10 B (Dreiecke) zeigt eine typische Autokorrelationskurve der unspezifischen Oligonukleotide. Im Vergleich zu den mit spezifischen Oligonukleotiden ermittelten Daten ist zu erkennen, dass die Autokorrelationskurve der Kontrolloligonukleotide deutlich nach links verschoben ist, was auf eine schnellere Diffusion hindeutet. Entsprechend zeigte die hier gefundene Hauptkomponente,

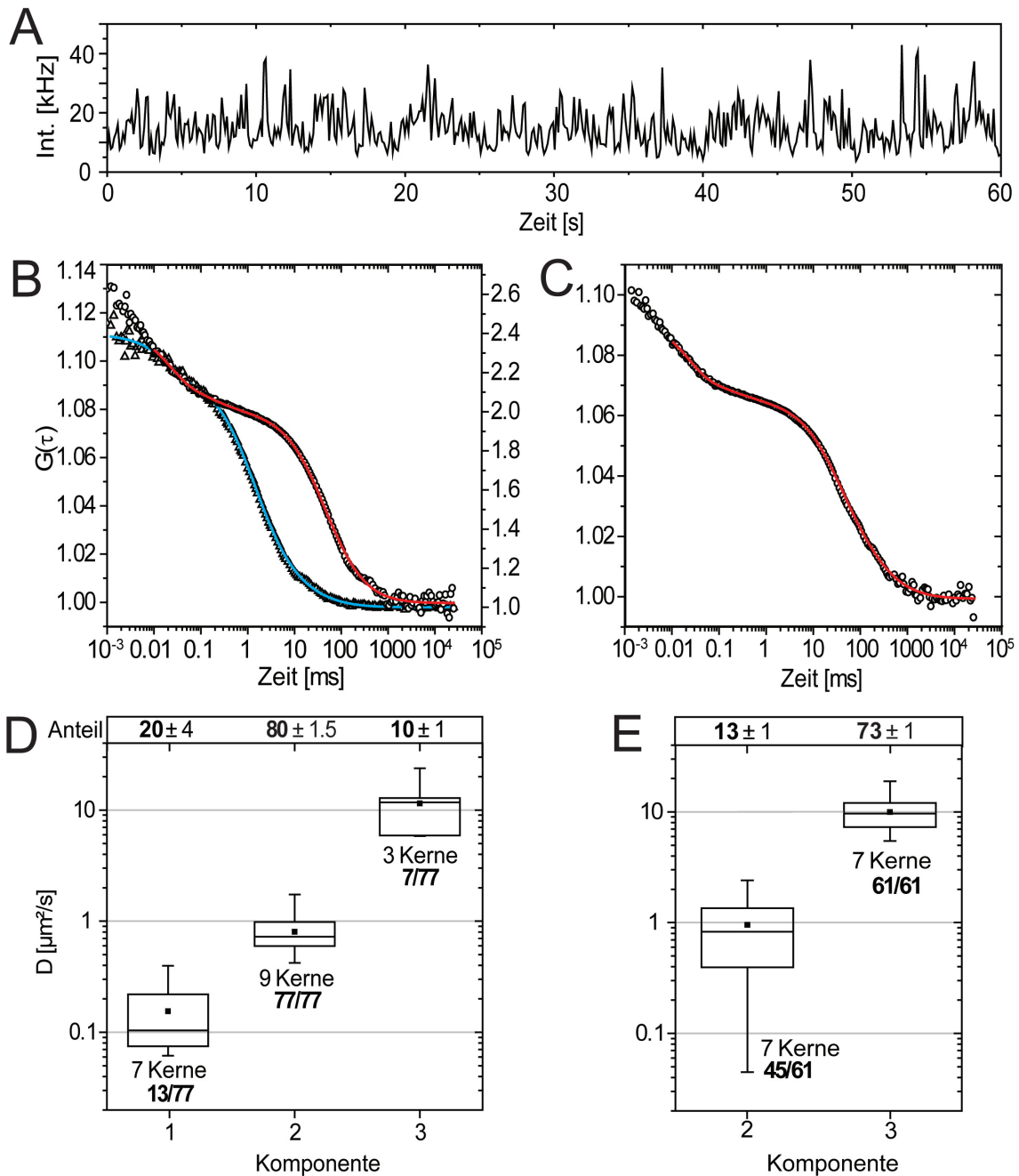


Abbildung 3.10: (A) Typische Intensitätsspur, welche während einer Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie-Messung erhalten wurde. (B) Autokorrelationskurven $G(\tau)$ für spezifische (Kreise) und unspezifische (Dreiecke) Oligonukleotide mit den jeweils nach Gleichung 2.6 angepassten Kurven (rot bzw. blau). Die rote Kurve zeigte nur Komponente 2. (C) Datensatz in welchem Komponenten 1 und 2 zusammen auftraten. (D, E) Zusammenfassung der mit spezifischen (D) und unspezifischen (E) Oligonukleotiden ermittelten Mobilitätskomponenten. Um die Streuung der Einzelmessungen zu visualisieren wurden Kastengrafiken gewählt. Der Mittelwert (schwarzes Quadrat), der Median (Linie), sowie der maximale und der minimale Wert (oberer bzw. unterer Whisker) sind gezeigt. Der Kasten enthält 50% der Werte. Am Kasten ist jeweils die Anzahl der Kerne und der Messungen angegeben, in welchen die Komponente ermittelt werden konnte. Der relative Anteil der Komponenten ist oben zu sehen. Die Abweichung zu 100% ergeben sich, da nicht jede Komponente in jeder Messung gefunden wurde. Verändert nach [Veith et al., 2010].

welche in allen Messungen präsent war, einen deutlich größeren Diffusionskoeffizienten von $10 \pm 0.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem Anteil von $73 \pm 1\%$. Dieser stimmt sehr genau mit dem Diffusionskoeffizienten der schnellsten Komponente D_3 der spezifischen Oligonukleotide überein. Dies bestätigte die Vermutung, dass es sich bei D_3 der spezifischen Oligonukleotide um nicht spezifisch gebundene bzw. ungebundene Oligonukleotide handelte. Aufgrund der zahlenmäßigen Übereinstimmung wird die schnellste Komponente der Kontrolloligonukleotide im Folgenden ebenfalls als Komponente 3 bezeichnet, entsprechend mit dem Diffusionskoeffizienten $D_{3,CTR}$.

Für die Kontrolloligonukleotide wurde selten auch eine langsamere Komponente gefunden, die zwar in 45 von 61 Messungen auftrat, dann aber nur mit einem mittleren Anteil von $13 \pm 1\%$. Ihr Diffusionskoeffizient von $0.95 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ist geringfügig schneller als der der schnellsten Komponente der spezifischen Oligonukleotide und wird im folgenden analog zu oben als $D_{2,CTR}$ bezeichnet. Da die Kontrolloligonukleotide soweit bekannt keinen spezifischen Bindungspartner im Kern haben, war davon auszugehen, dass es sich bei Komponente $D_{2,CTR}$ um unspezifisch gebundene Oligonukleotide handelte. Abbildung 3.10 E fasst die mit den Kontrolloligonukleotiden ermittelten Werte zusammen. Man beachte die starke Streuung der Diffusionskoeffizienten $D_{2,CTR}$. Diese Tatsache zeigt, dass es sich um eine sehr heterogene Gruppe handelte, in welcher sowohl langsamere als auch schnellere Teilchen gefunden wurden. Dies war ein weiterer Beleg dafür, dass es sich auch bei den am Einzelmolekülmikroskop ermittelten schnellsten Komponenten 2 und 3 der Kontrolloligonukleotide hauptsächlich um unspezifisch gebundene Oligonukleotide handelte.

Die schnellste Komponente der Oligonukleotide, $D_{3,CTR}$ bzw. D_3 , kann als weitere Probe für die Viskosität im Kern herangezogen werden. Analog zu den oben beschriebenen FRAP-Referenzmessungen, wurde der Diffusionskoeffizient freier Oligonukleotide ebenfalls in Puffer bestimmt. Dafür wurden jeweils 10 FCS-Messungen mit spezifischen und unspezifischen RNA-Oligonukleotiden durchgeführt. Hier wurde ein mittlerer Diffusionskoeffizient $D_{Olig.,Puffer}$ von $100 \pm 10 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt. Mit einer angenommenen Pufferviskosität von 1 cP (siehe oben) ergibt sich bei Annahme einer Kugelform für die Oligonukleotide (und damit als sehr grobe Abschätzung) nach Gleichung 2.9 ein Durchmesser von etwa 4 nm, was im Bereich der Erwartung für ein 30 Basen langes Oligonukleotid liegt. Das Verhältnis der Diffusionskoeffizienten $D_{3,CTR}$ und $D_{Olig.,Puffer}$ ist umgekehrt proportional zum Verhältnis der Viskositäten in Puffer und im Kern. Damit ergibt sich hier für die nukleoplasmatische Viskosität ein Wert $\eta_{Nuc,Olig.}$ von etwa 10 cP. Im Vergleich mit den Dextran-daten aus den FRAP-Messungen kann also doch eine Größenabhängigkeit der nukleoplasmatischen Viskosität angenommen werden (siehe Diskussion).

Tabelle 3.4 fasst die ermittelten Werte zusammen.

3.4.5 Einzelmolekülmikroskopie mit RNA-Molecular Beacons

Um das Signal unspezifisch gebundener Oligonukleotide zu reduzieren, wurden Molecular Beacons (kurz MB RNA-Oligonukleotide, siehe Kapitel 2.1.4) verwendet. Dies sind einzelsträngige Oligonukleotide, welche sich durch eine kürzere Stamm- und eine längere Schleifensequenz auszeichnen. Die Schleifensequenz ist homolog zu der oben bereits erwähnten repetitiven Se-

quenz der BR2.1 mRNA, die Stammsequenz besteht aus einer zu sich selbst homologen Basensequenz, welche die Schleifensequenz beidseitig flankiert. Ein Fluoreszenzfarbstoff und ein Fluoreszenzlöscher (engl. *quencher*) sind jeweils kovalent an ein Ende des MB RNA-Oligonukleotids gebunden. Im ungebundenen Zustand ist ein MB RNA-Oligonukleotid über die Stammsequenz geschlossen und fluoresziert nicht, da Fluoreszenzfarbstoff und Fluoreszenzlöscher sich in enger räumlicher Nähe befinden. Sobald die Schleifensequenz jedoch spezifisch an ihr Zielmolekül bindet, werden Fluoreszenzfarbstoff und Fluoreszenzlöscher räumlich getrennt und der Fluoreszenzfarbstoff beginnt Licht zu emittieren, sobald er angeregt wird [Tyagi and Kramer, 1996]. Molecular Beacons reduzieren somit das Signal ungebundener Oligonukleotide [Bonnet et al., 1999]. MB RNA-Oligonukleotide wurden analog zu oben in 4 Zellkerne in 3 Speicheldrüsen mikroinjiziert. In der Sprungweitenanalyse wurden in guter Übereinstimmung mit den spezifischen RNA-Oligonukleotiden zwei Mobilitätskomponenten gefunden (siehe Abbildung 3.11): Komponente 1 mit einem Diffusionskoeffizienten D_1 von $0.31 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem Anteil von $56 \pm 12\%$ und Komponente 2 mit einem Diffusionskoeffizienten D_2 von $0.68 \pm 0.08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem Anteil von $44 \pm 11\%$. Insgesamt gingen 16 051 Sprünge aus 4 953 Trajektorien in die Analyse ein. Mit den MB-Oligonukleotiden wurde keine Komponente mit einem schnellen Diffusionskoeffizienten von größer $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden. Da MB RNA-Oligonukleotide im Falle nicht auftretender oder nur kurzer unspezifischer Bindung kaum Fluoreszenzphotonen emittieren sollten, deutet sich an, dass Komponenten mit einem schnellen Diffusionskoeffizienten von größer $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ eben genau von solchen Signalen stammen. Dies bestätigt die Ergebnisse, welche mit den RNA-Oligonukleotiden ermittelt wurden. Auffällig war auch, dass keine Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten von $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden wurde. Dies deutet nochmals darauf hin, dass die mit dieser Komponente verbundenen Signale nur äußerst selten sichtbar waren und den Charakter einer als Zufallsereignis anzunehmenden Bindung zeigten.

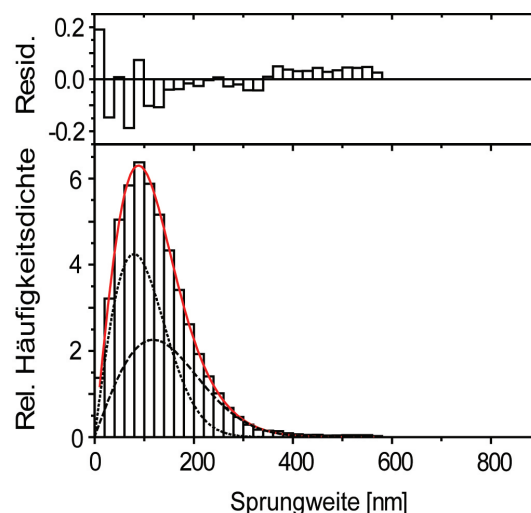


Abbildung 3.11: Sprungweitenanalyse spezifischer MB RNA-Oligonukleotide. Es wurden zwei Mobilitätskomponenten ermittelt, $D_1 = 0.31 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($56 \pm 12\%$, gepunktete Kurve) und $D_2 = 0.68 \pm 0.08 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($44 \pm 11\%$, gestrichelte Kurve). Die Summe der beiden Kurven (rot) mit den zugehörigen Residuen ist gezeigt.

Auch mit unspezifischen MB RNA-Oligonukleotiden wurden Signale beobachtet. Hier zeigte sich jedoch qualitativ ein anderes Bild als mit den spezifischen MB RNA-Oligonukleotiden: die Signale waren, sofern vereinzelt sichtbar, dicht und nur von kurzer Lebensdauer (oft kurzes Aufblinken) bzw. verschmiert, was auf kurze unspezifische Bindungen und auf eine erhöhte Beweglichkeit hindeutete. Aufgrund der schwachen Signale wurden diese Daten nicht analysiert, zeigten jedoch, dass die MB RNA-Oligonukleotide auch wenn sie unspezifisch gebunden sind Fluoreszenzsignale emittieren können. Da diese Signale jedoch äußerst schwach waren, traten sie neben den spezifisch gebundenen MB RNA-Oligonukleotiden nicht in Erscheinung.

Damit konnten die mit spezifischen und unspezifischen RNA-Oligonukleotiden ermittelten Werte bestätigt werden (siehe Tabelle 3.4).

3.5 Das Nukleoplasma enthält ausgedehnte Nichtchromatinstrukturen

Während mit Hilfe der Einzelmolekülmikroskopie wichtige Hinweise auf den Ursprung der früher gefundenen Komponenten $D_{I,DNA} = 3.74 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_{IV,DNA} = 0.015 \mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden werden konnten, lieferte die Kombination von Einzelpartikeltracking und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zunächst keine unmittelbare Antwort auf die Herkunft der beiden Hauptmobilitätskomponenten mit den mittleren Diffusionskoeffizienten $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Auffällig in diesem Zusammenhang war, dass die BR2.1 mRNPs keinen linearen MSD-Verlauf zeigten. Ein nicht linearer - oder anomaler - MSD-Verlauf wird in biologischen Systemen typischerweise dann sichtbar, wenn neben Diffusionsprozessen entweder Bindungen an lokale Strukturen die Partikelmobilität beeinflussen oder strukturelle Hindernisse eine heterogene Umgebung für die Bewegungsmöglichkeiten der diffundierenden Partikel schaffen [Saxton, 2007, Saxton, 2008]. Um zu verstehen, warum die BR2.1 mRNPs ein solches Verhalten im chromatinfreien Nukleoplasma zeigen, wurden Experimente mit inertem 500 kDa Dextran, welches mit Atto647 markiert war und in die Speicheldrüsenkerne mikroinjiziert wurde, durchgeführt. Diese Experimente wurden am Einzelmolekülmikroskop durchgeführt, um eine zeitlich und räumlich hochaufgelöste Analyse der Mobilität einzelner Trajektorien durchführen zu können. Zum Vergleich wurde das Dextran in die Zellkerne von HeLa H2B-GFP-Zellen injiziert. Der Zellkern dieser Säugerzellen ist im Gegensatz zu den Speicheldrüsenzellkernen mit entfaltetem Chromatin gefüllt, welches einen starken Einfluss auf den MSD-Verlauf hat [Wachsmuth et al., 2008]. Durch die Markierung des Histons 2B mit GFP ließen sich hier dichte Chromatinbereiche von weniger dichten unterscheiden.

3.5.1 Eine vergleichende MSD-Analyse in *C. tentans*- und Säugerzellen

Um die MSD-Verläufe der unterschiedlichen Experimente besser vergleichen zu können, wurde entschieden den jeweiligen MSD-Verlauf entweder nur bis zu einem Wert von $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$, oder bis zu einer Zeit von 0.13 s zu analysieren, je nachdem welcher Fall zuerst erreicht wurde (siehe Diskussion). Der MSD wurde unter besonderer Berücksichtigung der Gleichgewichtung aller Trajektorien berechnet (siehe hierzu Kapitel 2.2.9.2).

Als Referenz für eine ungehinderte Dextranmobilität wurde der MSD-Verlauf von 500 kDa Dextran in Puffer bestimmt. Hierzu wurde das Dextran mit einer Aufnahmezeit von 200 Hz in Puffer vermessen. Insgesamt wurden 3184 Dextrantrajektorien ermittelt. 322 dieser Trajektorien bestanden aus 9 oder mehr Positionen ($\langle r^2 \rangle > 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$) und wurden zur Bestimmung des zeitabhängigen MSD-Verlaufs verwendet (siehe Abbildung 3.12, Dreiecke). Wie für reine Diffusion erwartet, wurde in Lösung ein linearer Verlauf des MSDs mit der Zeit erhalten. Durch Anpassen einer linearen Funktion an die Daten wurde ein mittlerer Diffusionskoeffizient von $5.3 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt, was einem mittleren hydrodynamischen Durchmesser von 80 nm entspricht.

Das 500 kDa Dextran wurde außerdem in Zellkernen von HeLa-H2B-GFP-Zellen untersucht. Insgesamt wurden 22 unterschiedliche Zellen analysiert und 13974 Trajektorien gefunden. 66 dieser Trajektorien wiesen eine Länge von 25 oder mehr Positionen, entsprechend 125 ms oder länger,

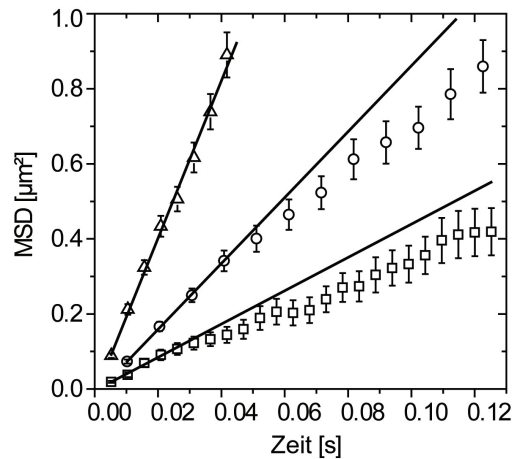


Abbildung 3.12: Vergleich der Mobilität von 500 kDa Dextran in Lösung (Dreiecke) bzw. mikroinjiziert in Speicheldrüsenzellkerne (Kreise) und HeLa-Zellkerne (Quadrate). Nur das Dextran in Lösung zeigte einen linearen MSD-Verlauf mit der Zeit. Der Standardfehler ist angegeben. Siehe Text für Details.

auf und gingen in die MSD-Analyse ein (Abbildung 3.12, Quadrate). Auffällig ist hier, dass der MSD-Verlauf nach kurzer linearer Phase ab $t \geq 30$ ms deutlich von der Linearität abweicht. Anhand der ersten 5 MSD-Punkte (linearer Verlauf) wurde ein Diffusionskoeffizient von $1.1 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt. Der nicht lineare MSD-Verlauf deutete das Vorhandensein von Hindernissen an, was angesichts des entfalteten Chromatins erwartet worden war. Die mittlere nukleäre Viskosität η_{Nuc} im HeLa-Zellkern konnte analog zu oben bestimmt werden und errechnet sich zu 4.8 cP, was gut mit früheren Daten übereinstimmt [Lang et al., 1986].

Sehr ähnliche Resultate wurden mit C2C12-Zellen erhalten, in deren Zellkerne das 500 kDa Dextran ebenfalls mikroinjiziert wurde (hier nicht gezeigt). Von insgesamt 4550 Trajektorien wiesen 121 Trajektorien 25 oder mehr Positionen (125 ms oder länger) auf und gingen in die MSD-Analyse ein. Ab $t \geq 40$ ms wurde auch hier ein nicht linearer MSD-Verlauf beobachtet. Aus dem linearen Teil des MSD-Verlaufs wurde ein Diffusionskoeffizient von $0.92 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt, was zu einem mit den HeLa-Zellen vergleichbaren Wert für die Kernviskosität führte.

Um die strukturelle Beschaffenheit des chromatinfreien Nukleoplasmas der Speicheldrüsenzellkerne im direkten Vergleich zu den mit Chromatin gefüllten Säugerzellkernen zu analysieren, wurde das 500 kDa Dextran in 11 Zellkerne aus insgesamt 6 Speicheldrüsen mikroinjiziert. 6673 Trajektorien konnten aus den Filmen extrahiert werden. Von diesen Trajektorien wiesen 226 eine Länge von 12 oder mehr Sprüngen (entsprechend 120 ms oder länger) auf. Der Verlauf des MSDs als Funktion der Zeit ist in Abbildung 3.12 aufgetragen (Kreise). Obwohl zu Beginn linear, weicht der MSD mit steigender Zeit ($t \geq 50$ ms) zunehmend vom linearen Verlauf ab. Dieser Befund zeigt eindeutig eine distanzabhängige Retardierung des als inert angenommenen Dextrans an. Da hier das entfaltete Chromatin als Grund für die distanzabhängige Retardierung ausgeschlossen werden konnte, muss die Existenz ausgedehnter nukleoplasmatischer Nichtchromatinstrukturen angenommen werden. Diese haben einen vergleichbaren Effekt auf die Partikelmobilität im chromatinfreien Speicheldrüsen nukleoplasma, wie das entfaltete Chromatin in HeLa-Zellkernen

(siehe Diskussion). Da Trajektorien aus allen Nukleoplasma-bereichen in die Analyse gingen, konnte auch davon ausgegangen werden, dass diese Strukturen ubiquitär im Nukleoplasma der Speicheldrüsenkerne vorkommen.

Durch Anpassen einer Geradenfunktion an die ersten 4 Punkte des MSDs wurde ein mittlerer intranukleärer Diffusionskoeffizient des Dextrans von $2.2 \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ erhalten. Verglichen mit dem in Puffer ermittelten Wert ergibt sich eine nukleäre Viskosität η_{Nuc} von 2.4 cP. Dieser Wert stimmt gut mit den mit FRAP ermittelten Werten überein.

Tabelle 3.5 fasst alle Daten zusammen und zeigt zum Vergleich auch noch einmal die Werte für die BR2.1 mRNPs, welche mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden erhalten wurden. Ein direkter Vergleich der Diffusionskoeffizienten von BR2.1 mRNPs und 500 kDa Dextran im Speicheldrüsenzellkern zeigt, dass die BR2.1 mRNPs trotz ihrer relativ zu dem 500 kDa Dextran geringeren Größe eine stärkere Retardierung als letztere erfahren. Unspezifische Bindungen bzw. Mobilitätseinschränkungen durch rein strukturelle Hindernisse sollten sowohl endogene BR2.1 mRNPs wie auch inertes Dextran beeinflussen. Da die endogenen mRNP-Partikel jedoch deutlich stärker in ihrer Mobilität beeinflusst bzw. retardiert wurden als das 500 kDa Dextran, ist davon auszugehen, dass hier *zusätzlich* zu einer strukturellen Behinderung der Beweglichkeit *spezifische* Bindungen für die stärkere Mobilitätsreduktion der BR2.1 mRNPs verantwortlich sind (siehe Diskussion).

Probe	$D_{MSD}[\mu\text{m}^2/\text{s}]$	MSD linear?	N	Anzahl Traj.
BR2.1 mRNPs	0.71 ± 0.02	nein	6 Kerne 4 Drüsen	306
500 kDa Dextran Puffer	5.3 ± 0.1	ja	–	322
500 kDa Dextran Speicheldrüsenzellkern	2.2 ± 0.04	nein	11 Kerne 6 Drüsen	226
500 kDa Dextran HeLa-Zellkerne	1.1 ± 0.1	nein	22 Zellen	66
500 kDa Dextran C2C12-Zellkerne	0.92 ± 0.03	nein	15 Zellen	121

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der MSD-Vergleichsmessungen von 500 kDa Dextran in Lösung, Speicheldrüsen-, HeLa- und C2C12-Zellkernen. Zum Vergleich sind die für die BR2.1 mRNPs ermittelten Werte hier noch einmal angegeben. Es ist gekennzeichnet, ob der MSD vollständig linear ist. Die in die Analyse eingegangene Trajektorienanzahl, sowie die Anzahl der Messungen (N) sind angegeben. Die Diffusionskoeffizienten sind aus dem linearen Teil des MSD-Verlaufs nach Gleichung 2.12 bestimmt. Der Standardfehler ist angegeben. Für Details siehe Text.

3.5.2 Zum Ursprung der beiden Hauptmobilitätskomponenten

Die Analyse des MSD-Verlaufs von 500 kDa Dextran im Speicheldrüsenzellkern lieferte deutliche Hinweise darauf, dass ausgedehnte Strukturen im chromatinfreien Nukleoplasma nicht nur die Mobilität inerter sondern auch endogener Partikel beeinflussen. Es zeigte sich, dass die endogenen BR2.1 mRNPs stärker retardiert wurden als inerte Partikel vergleichbarer Größe, ein Hinweis auf zusätzliche spezifische Bindungen. Für die BR2.1 mRNPs wurden zwei Hauptmobilitätskomponenten (0.3 und $0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$) gefunden, welche 99% aller Sprünge abdeckten. Es konnten keine komplett immobilisierten Bereiche entlang dieser Trajektorien beobachtet werden, anhand welcher eine Bindung klar hätte identifiziert werden können. Ein in der Messzeitauflösung sichtbarer Wechsel zwischen den beiden Hauptmobilitätskomponenten, d.h. Trajektorienabschnitte mit Diffusionskoeffizienten von 0.3 oder $0.73 \mu\text{m}^2/\text{s}$, war nicht nachweisbar, obwohl mit Hilfe der Sprungweitenanalyse beide Mobilitätskomponenten innerhalb einzelner Trajektorien nachgewiesen werden konnten (siehe Kap. 3.4.3). Insofern stellte sich die Frage ob Bindungs- bzw. Immobilisierungsprozesse auch zu zwei *mobilen* Diffusionskomponenten in der Sprungweitenverteilung führen konnten.

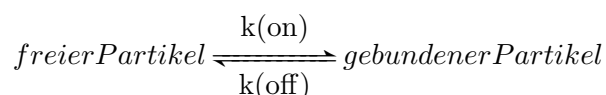
Da kurze Immobilisierungsprozesse mit der zur Verfügung stehenden Messzeitauflösung nicht sichtbar gemacht werden konnten, blieb die Möglichkeit, dass hochfrequente Bindungsereignisse deutlich *unterhalb* der Zeitauflösung

- eine Sprungweitenverteilung mit zwei *scheinbar* mobilen Komponenten und
- einen nicht linearen MSD-Verlauf

zur Folge haben könnten.

Um dies zu überprüfen wurde eine Monte Carlo Simulation programmiert, die den Wechsel zwischen freier Diffusion und Bindung unterhalb der Zeitauflösung zuließ (siehe Kap. 2.2.9.3). Hierbei wurde im Rahmen eines einfachen Modells folgendes angenommen:

- Freie Partikel mit einem Durchmesser von 50 nm (Durchmesser der BR2.1 mRNPs) diffundieren im Nukleoplasma mit einer Viskosität von 3 cP mit einem Diffusionskoeffizient von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (berechnet nach Gleichung 2.9).
- Es kommt zu einer Immobilisierung der mRNPs, welche immobilisiert einen Diffusionskoeffizient von $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aufweisen (s. Kap. 2.2.9.5).
- Die simulierten Partikel ändern ihren Bewegungszustand sehr rasch, d.h. hier auf einer Zeitskala von $100 \mu\text{s}$ und damit deutlich unterhalb der Messzeitauflösung von 10 ms. Dies geschieht mit den frei wählbaren Geschwindigkeitskonstanten $k(\text{on})$ und $k(\text{off})$ für die Hin- und Rückreaktion einer einfachen Reaktion 1. Ordnung:



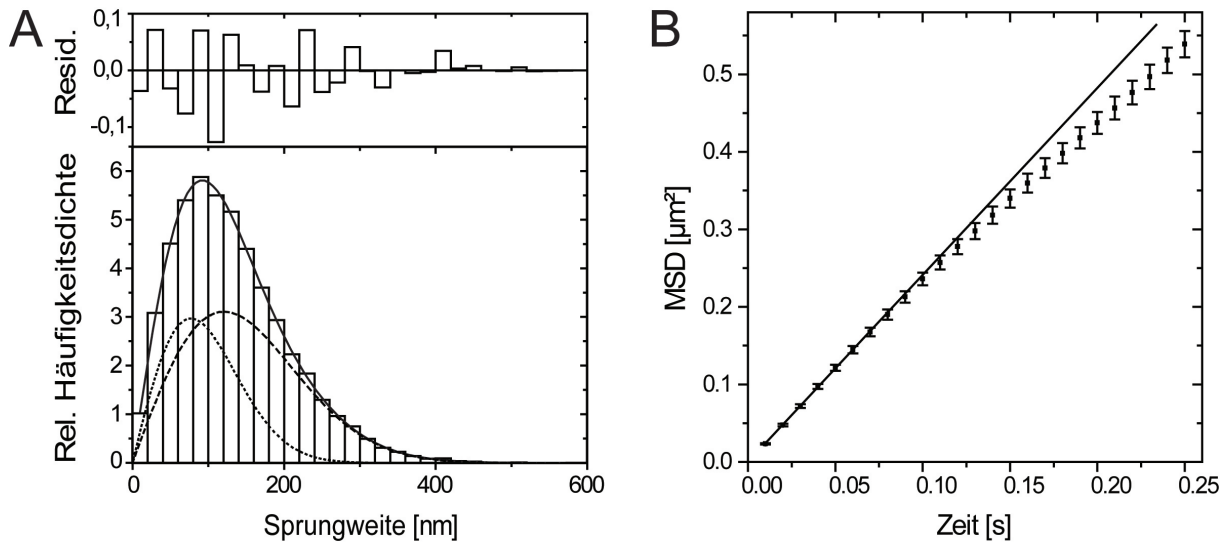


Abbildung 3.13: Simulierte Partikel, die hochfrequent unterhalb der Messzeitauflösung zwischen freier Diffusion und Immobilisierung wechselten, zeigten in der Sprungweitenanalyse zwei Mobilitätskomponenten (**A**) und einen nicht linearen MSD-Verlauf (**B**). Mit $k(on) = 4100s^{-1}$ und $k(off) = 950s^{-1}$ ergab die Sprungweitenanalyse $D_{1,SIM} = 0.30 \pm 0.02 \mu m^2/s$ ($38 \pm 5\%$, gepunktete Kurve) und $D_{2,SIM} = 0.73 \pm 0.03 \mu m^2/s$ ($62 \pm 5\%$, gestrichelte Kurve). Man beachte die Übereinstimmung der Werte mit den für die spezifischen RNA-Oligonukleotide gemessenen (siehe Tab. 3.4). Im linearen Teil des in B gezeigten MSD-Verlaufs wurde ein Diffusionskoeffizient von $D_{MSD,SIM} = 0.62 \pm 0.01 \mu m^2/s$ (Gerade) ermittelt.

Eine umfangreiche Beschreibung des Modells findet sich in Kapitel 2.2.9.5. Es zeigte sich, dass dieses einfache Modell ausreichte, um sowohl ein Sprungweitenhistogramm mit zwei (scheinbar) mobilen Diffusionskomponenten als auch einen nicht linearen MSD-Verlauf zu generieren. Abbildung 3.13 A zeigt ein simuliertes Sprungweitenhistogramm mit $k(on) = 4100 s^{-1}$ und $k(off) = 950 s^{-1}$. Diese Werte lieferten im Rahmen der Fehlergenauigkeit vergleichbare Werte für die Diffusionskoeffizienten der beiden Hauptmobilitätskomponenten, wie sie für die BR2.1 mRNPs mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden gemessen worden waren (siehe Tabelle 3.4). Das heißt also, dass ein einfacher Wechsel zwischen freier Diffusion und Bindung *unterhalb* der Zeitauflösung im Sprungweitenhistogramm zu zwei *mobilen* Diffusionskomponenten führen kann. Diese kommen dann beide innerhalb einzelner Trajektorien vor, können jedoch hier nicht unabhängig voneinander visualisiert werden. Gleichzeitig zeigte sich bei einem solchen Wechsel zwischen Bindung und freier Diffusion auch ein nicht linearer MSD-Verlauf (siehe Abb. 3.13 B), wie für eine fortwährende Retardierung der Partikel durch Bindungen zu erwarten ist.

Bis zu diesem Zeitpunkt war ungeklärt, wie die mobilen Diffusionskoeffizienten in der Sprungweitenanalyse im Kontext von erkennbaren Bindungstendenzen in der MSD-Analyse zu interpretieren waren. Im Rahmen des vorgeschlagenen Modells konnten die den mobilen Diffusionskoeffizienten zugrundeliegenden Werte für die Geschwindigkeitskonstanten $k(on)$ und $k(off)$ und damit für die Gleichgewichtskonstante K ermittelt werden. Um dies zu ermöglichen wurden simulierte Sprungweitenverteilungen für verschiedenste Werte von $k(on)$ und $k(off)$ erstellt. Es wurden jedoch nur Wertepaare für $k(on)$ und $k(off)$ gewählt, welche zu keinem in der Messzeitauflösung sichtbaren Wechsel zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand führten, da dieser Wech-

sel experimentell nicht zu beobachten war (siehe Kapitel 2.2.9.5). Durch Vergleich der absoluten Abweichungen zwischen simulierten Sprungweitenhistogrammen für je ein bestimmtes Wertepaar von $k(on)$ und $k(off)$ und dem Sprungweitenhistogramm der mit spezifischen Oligonukleotiden gemessenen BR2.1 mRNPs, wurde ein absoluter Abweichungskoeffizient δ ermittelt. Dieser wurde gegen die Wertepaare von $p(on)$ und $p(off)$ aufgetragen, welche jeweils ein simuliertes Sprungweitenhistogramm definieren. $p(on)$ und $p(off)$ lassen sich in $k(on)$ und $k(off)$ umrechnen. Der Bereich von $k(on)$ und $k(off)$, in welchem δ und damit die Abweichung zwischen simuliertem und experimentellem Sprungweitenhistogramm minimal wurde, gab den zum experimentellen Sprungweitenhistogramm korrespondierenden Bereich von $k(on)$, $k(off)$ und K an.

Wie in Kapitel 3.1 beschrieben, zeigte sich bei Testläufen mit simulierten (und daher definierten) Datensätzen, dass keine exakten Werte für $k(on)$ und $k(off)$ (bzw. $p(on)$ und $p(off)$) ermittelt werden konnten. Jedoch konnte schnell und eindeutig deren Verhältnis, d.h. die Gleichgewichtskonstante K , bestimmt werden. Insofern war es möglich, im Rahmen des Modells den untersuchten BR2.1 mRNPs im chromatinfreien Speicheldrüsennukleoplasma mit Hilfe der jeweiligen Sprungweitenverteilung über K eine größere oder kleinere Bindungstendenz an putativ immobilisierende Strukturen zuzuschreiben. So wurde für die BR2.1 mRNPs, welche mit spezifischen Oligonukleotiden markiert waren, die in Abbildung 3.14 gezeigte Verteilung des Abweichungskoeffizienten δ in Abhängigkeit von $p(on)$ und $p(off)$ ermittelt. Die gestrichelte blaue Linie zeigt hier das Verhältnis von $p(on)$ und $p(off)$ bei $K = 5$ an. Entlang dieser Linie, ab $p(on) > 0.15$, wurde δ minimal und die simulierten Sprungweitenhistogramme wiesen nur noch minimale Ab-

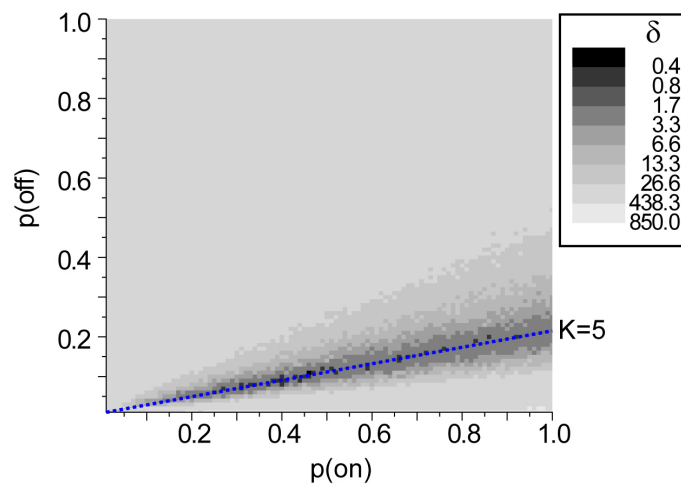


Abbildung 3.14: Die Bindungsanalyse der BR2.1 mRNPs. Das mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden ermittelte Sprungweitenhistogramm der BR2.1 mRNPs aus Abb. 3.7 C wurde, wie in Kapitel 2.2.9.5 beschrieben, hinsichtlich putativer Bindungstendenzen der mRNPs an immobilisierende Strukturen untersucht. Beim Vergleich mit verschiedenen Werten von Bindungs- und Ablösewahrscheinlichkeiten ($p(on)$ bzw. $p(off)$) zeigte sich, dass simulierte Histogramme mit $K = 5$ und $p(on) > 0.15$ den geringsten Abweichungskoeffizienten (Legende) aufwiesen (gestrichelte Linie). So konnte gezeigt werden, dass die in der Sprungweitenanalyse ermittelten mobilen Komponenten Ausdruck einer unterhalb der Messzeitauflösung verborgenen Bindungskinetik sein können.

weichungen zu dem experimentell ermittelten auf. Damit deutet das Modell auf eine deutliche Tendenz der BR2.1 mRNPs zu frequenten Bindungen hin, denn mit $K = 5$ liegt die Gleichgewichtskonstante deutlich auf Seite des gebundenen Zustands.

Eine diskontinuierliche Partikelbewegung unterhalb der Messzeitauflösung kann also zu mobilen Komponenten in der Sprungweitenanalyse führen. Diese mobilen Komponenten sollten jedoch nur bei Vorliegen eines klar auf frequente Bindungen hindeutenden MSD-Verlaufs und weiterer entsprechender Indizien für Bindungsreaktionen unterhalb der Zeitauflösung als unmittelbare Folgen solcher Bindungsprozesse interpretiert werden. Da für die BR2.1 mRNPs Hinweise hierauf hier vorlagen, wird diese Analyse in den folgenden Kapiteln zusätzlich zur Sprungweiten- und MSD-Analyse angewandt.

3.6 Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Hinweise präsentiert, dass die BR2.1 mRNPs an nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen binden, was zu einer diskontinuierlichen Mobilität unterhalb der Messzeitauflösung führt. In diesem Kontext wurde eine neue Methode vorgestellt, um aus der Sprungweitenverteilung Informationen zur Bindungstendenz zu extrahieren. Der Einfluss verschiedener putativer Effektoren auf die mRNP-Mobilität wurde in einem nächsten Schritt untersucht. Ziel war es messbare Änderungen in der mRNP-Mobilität bzw. der Bindungstendenz zu verursachen. So sollten tiefere Einblicke in die molekulare Natur der die mRNP-Diffusion beeinflussenden Strukturen gewonnen werden. Angesichts der durchaus nicht zu vernachlässigenden Variabilität des biologischen Systems (siehe Abbildung 3.7) musste ein Effekt, um als solcher erkannt zu werden, deutliche Abweichungen von den in Kapitel 3.4.2 ermittelten mittleren Größen liefern.

3.6.1 Inkubation in Hämolymphe

Sämtliche bisher vorgestellten Messungen wurden in Speicheldrüsen durchgeführt, welche nach der Präparation in PBS inkubiert worden waren. Die Inkubation in PBS brachte einige Vorteile mit sich: So verursachte die Hämolymphe, das Blut der Larven, eine hohe Hintergrundstrahlung im Weitfeldeinzelmolekülmikroskop, wodurch sich die BR2.1-mRNP-Signale ohne besondere Maßnahmen praktisch nicht vom Hintergrund unterscheiden ließen. Außerdem mussten zur Gewinnung der für eine Messung ausreichenden Menge an Hämolymphe anfangs ca. 10 Larven präpariert werden (entsprechend 200 μ L Hämolymphe zur Überschichtung der Drüse). Ein typisches Experiment, bei welchem 3 Drüsen analysiert wurden, dezimierte die Larvenpopulation der relativ kleinen Zucht enorm. Jedoch gelang es später die für eine Messung notwendige Hämolympfemenge auf nur noch ca. 50 μ L pro Drüse zu reduzieren, indem die präparierte Drüse nach Hämolympheüberschichtung in einer feuchten Kammer inkubiert wurde, in welcher sie auch während der Messung verblieb (siehe Kapitel 2.2.2). So wurden für eine Speicheldrüsenmessung nur noch 3 bis 4 Larven zur Hämolympfegewinnung benötigt. Insbesondere reduzierte dies auch den Hämolympfegrund deutlich. In Kombination mit einer Reduktion der Zwischenvergrößerung vor der Detektionskamera von 4x auf 2.5x (siehe Kap. 2.2.7), wodurch mehr Photonen pro Pixel gesammelt wurden, konnte auch unter Hämolympheinkubation ein SRV von bis zu 6 erreicht werden.

Damit konnte die BR2.1-mRNP-Mobilität nun unter Bedingungen analysiert werden, die der physiologischen Situation im Organismus sehr nahe kamen. Dazu wurden in 5 Zellkerne aus 3 verschiedenen Speicheldrüsen spezifische RNA-Oligonukleotide mikroinjiziert. Unmittelbar nach Beendigung der Mikroinjektion wurde die Drüse mit frischer Hämolymphe überschichtet (siehe Kap. 2.2.2). 10769 Trajektorien wurden gefunden, von denen ungefähr 12% 5 oder mehr Positionen aufwiesen, wohingegen dies bei PBS-Inkubation noch bei knapp 17% aller Trajektorien der Fall war. Es deutete sich also eine höhere Mobilität der BR2.1 mRNPs bei Hämolympheinkubation an. Die Sprungweitenanalyse, welche in Abbildung 3.15 A gezeigt ist, bestätigte dies.

31 026 Sprünge gingen in die Analyse ein. Zwar wurden auch hier zwei Hauptmobilitätskomponenten gefunden, allerdings zeigten die BR2.1 mRNPs bei Hämolympheinkubation der Speicheldrüse für beide Mobilitätskomponenten deutlich höhere Diffusionskoeffizienten: $D_{1,HL}$ von $0.52 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Anteil von $25 \pm 5\%$ (gepunktete Kurve), sowie $D_{2,HL}$ von $1.38 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit einem relativen Anteil von $75 \pm 5\%$ (gestrichelte Kurve) - siehe Tabelle 3.6 auf Seite 94 zum Vergleich. Wie in Abbildung 3.15 B (Quadrate) zu sehen, zeigten die BR2.1 mRNPs jedoch auch unter Hämolympheinkubation einen MSD-Verlauf, welcher zwar

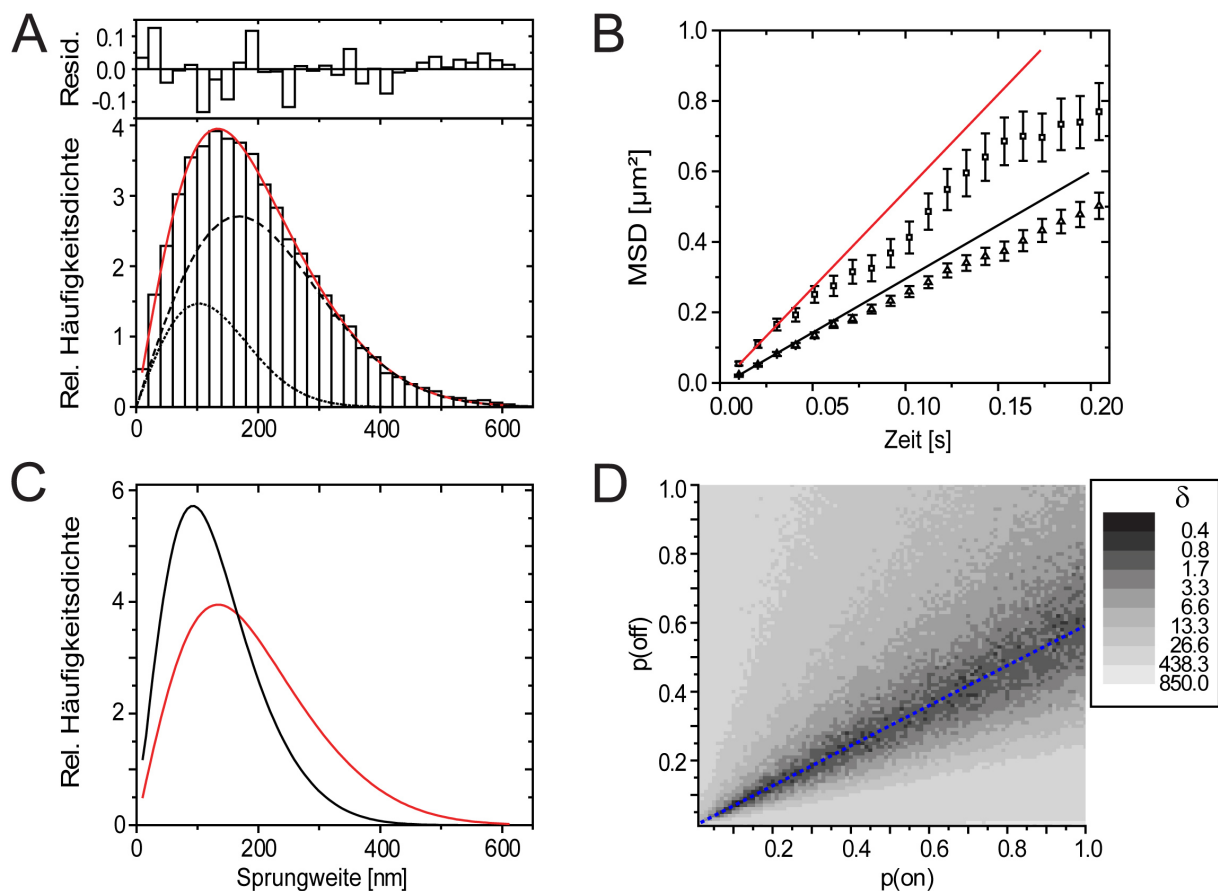


Abbildung 3.15: (A) Sprungweitenanalyse der spezifischen RNA-Oligonukleotide bei Hämolympheinkubation. Die Drüse wurde nach der Mikroinjektion in Hämolymphe inkubiert. Es wurden zwei Hauptkomponenten $D_1 = 0.52 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($25 \pm 5\%$, gepunktete Kurve), $D_2 = 1.38 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($75 \pm 5\%$, gestrichelte Kurve) ermittelt. Die rote Kurve ist die Summe aller Komponenten, deren Residuen darüber abgebildet sind. (B) Auftragung des MSDs gegen die Zeit für Trajektorien mit mindestens 20 Positionen (Quadrate). Im linearen Anfangsbereich (erste 3 Punkte) wurde ein Diffusionskoeffizient von $1.36 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (rote Gerade). Zum Vergleich ist der MSD-Verlauf für spezifische RNA-Oligonukleotide und Drüseninkubation in PBS aus Abbildung 3.7 D eingezeichnet (Dreiecke). (C) Vergleich der Sprungweitenverteilungen (Summe aller Komponenten) von RNA-Oligonukleotiden in Drüsen, welche in Hämolymphe (rote Kurve) bzw. in PBS (schwarze Kurve) inkubiert wurden. (D) Bindungsanalyse der BR2.1 mRNPs unter Hämolympheinkubation. Siehe Kapitel 2.2.9.5 für Details. Die gestrichelte Linie zeigt die Region an, in welcher der Abweichungskoeffizient δ minimal wird. Die Gleichgewichtskonstante K der Bindung beträgt hier etwa 1.7.

anfangs linear ist, ab ungefähr 40 ms jedoch deutlich vom linearen Verlauf abweicht. Trotzdem zeigte sich die höhere Mobilität der BR2.1 mRNPs unter Hämolympheinkubation auch im MSD-Verlauf deutlich. Insgesamt 110 Trajektorien mit einer Länge von 20 oder mehr Positionen gingen in die Berechnung des MSDs ein. Eine an den linearen MSD-Bereich angepasste Gerade ist in rot eingezeichnet und lieferte einen Diffusionskoeffizient $D_{MSD,HL}$ von $1.36 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Zum Vergleich ist der erste Teil des MSD-Verlaufs von in PBS inkubierten Speicheldrüse dargestellt (Dreiecke, aus Abb. 3.7 D). Abbildung 3.15 C zeigt entsprechend einen Vergleich der Sprungweitenhistogramme der BR2.1 mRNPs in PBS (schwarz) bzw. Hämolymphe (rot) inkubierten Speicheldrüsen.

Entsprechend der Ausführungen im vorangegangenen Kapitel können die beiden Mobilitätskomponenten in der Sprungweitenanalyse hinsichtlich einer Bindungstendenz der BR2.1 mRNPs interpretiert werden. Abbildung 3.15 D zeigt die Ergebnisse der Bindungsanalyse. Der Abweichungskoeffizient δ wird im Bereich der gestrichelten blauen Linie minimal. Diese Linie entspricht einer Gleichgewichtskonstante K von 1.7, während bei Inkubation der Speicheldrüse in PBS $K = 5$ ermittelt wurde (siehe Abb. 3.14). In der modellhaften Betrachtung führt also eine verminderte Bindungstendenz der BR2.1 mRNPs (eine kleinere Gleichgewichtskonstante) bei Inkubation der Speicheldrüse in Hämolymphe zu der erhöhten Mobilität. Tabelle 3.6 auf Seite 94 fasst die Daten zusammen.

3.6.2 Inkubation in Hämolymphe und Actinomycin D

Kylberg et al. wiesen in einer neueren Publikation eine enge Kopplung der Regulation von Transkription und mRNP-Export bei *C. tentans* nach ([Kylberg et al., 2008], siehe Einleitung). So zeigte sich, dass bei globaler Inhibition der Transkription mit Actinomycin D auch der mRNP-Export zum Erliegen kam. Ohne fortlaufende Transkription und ohne fortlaufenden mRNP-Export blieb die mittlere Anzahl der mRNP-Partikel im Nukleoplasma gleich. Bezogen auf diesem Zustand warfen die Autoren die Frage auf, ob es zu einer Retardierung der mRNP-Partikel im Nukleoplasma, möglicherweise unter der Beteiligung der bekannten nukleoplasmatischen Nichtchromatinstrukturen kam, oder ob die mRNP-Mobilität im Vergleich zum physiologischen Zustand nicht eingeschränkt war. Um diese Frage zu klären, wurden spezifische RNA-Oligonukleotide zusammen mit einer Actinomycin D-Lösung in Zellkerne von Speicheldrüsen koinjiziert (siehe Kapitel 2.1.6). Actinomycin D hemmt unmittelbar nach Mikroinjektionen die Transkription und verhindert den weiteren Einbau von hnRNP-Proteinen in die BR mRNPs (Siebrasse et al., unpublizierte Daten). Um einen Effekt des verwendeten Lösungsmittels (DMSO + Puffer) ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle jeweils in einen Zellkern der selben Drüsen RNA-Oligonukleotide zusammen mit dem DMSO-haltigen Puffer koinjiziert, in welchem kein Actinomycin D gelöst war. Diese Kontrollzellkerne (genannt *DMSO*) hatten immer mindestens eine Zelle Abstand zum nächsten mit Actinomycin D injizierten Kern. Die Drüsen wurden unmittelbar nach der Mikroinjektion in Hämolymphe inkubiert.

Insgesamt wurden 2 Drüsen untersucht: In 4 Kerne wurde Actinomycin D mikroinjiziert und 8 834 Trajektorien wurden gefunden. Abbildung 3.16 A zeigt die Sprungweitenverteilung für BR2.1

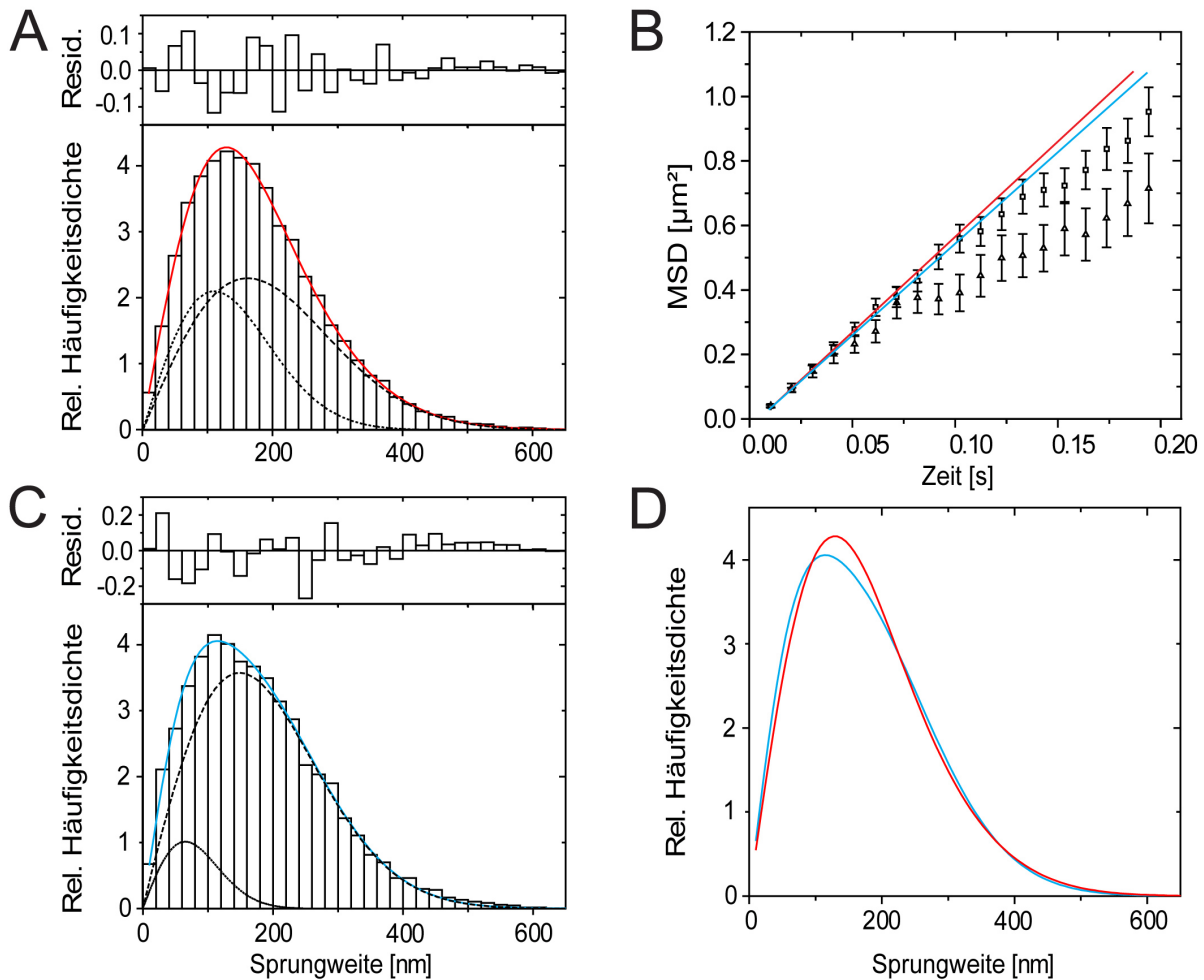


Abbildung 3.16: (A) Sprungweitenanalyse mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden und Actinomycin D in DMSO. Die Drüse wurde nach der Präparation in Hämolymphe inkubiert. Es wurden zwei Hauptkomponenten $D_1 = 0.59 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($38 \pm 10\%$, gepunktete Kurve), $D_2 = 1.27 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($62 \pm 10\%$, gestrichelte Kurve) ermittelt. Die rote Kurve ist die Summe aller Komponenten, deren Residuen oben abgebildet sind. (B) Auftragung des MSD gegen die Zeit für Trajektorien mit mindestens 20 Positionen (Quadrate). Im linearen Anfangsbereich (erste 6 Punkte) wurde ein Diffusionskoeffizient von $1.44 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (rote Linie). Zum Vergleich ist der MSD-Verlauf für spezifische RNA-Oligonukleotide und DMSO eingezeichnet. Im linearen Anfangsbereich (hier die ersten 4 Punkte) wurde ein Diffusionskoeffizient von $1.33 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (blaue Linie). Die Standardfehler sind eingezeichnet. (C) Sprungweitenanalyse mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden und DMSO. Hier wurden zwei Hauptkomponenten $D_1 = 0.21 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($12 \pm 2\%$, gepunktete Kurve), $D_2 = 1.09 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($88 \pm 2\%$, gestrichelte Kurve) ermittelt. Die blaue Kurve ist die Summe aller Komponenten (Residuen oben). (D) Vergleich der Sprungweitenverteilungen der Messungen mit Actinomycin D (rote Kurve, aus A) und nur DMSO (blaue Kurve, aus C). Siehe Text für weitere Details.

mRNPs unter Actinomycin D-Einfluss mit 30 695 Sprüngen. Es wurden 2 Diffusionskomponenten mit $D_{1,ActD}$ von $0.59 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $38 \pm 10\%$ (gepunktete Kurve), sowie $D_{2,ActD}$ von $1.27 \pm 0.1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $62 \pm 10\%$ (gestrichelte Kurve) ermittelt (Summenkurve rot, Residuen oben). Der korrespondierende MSD-Verlauf von Trajektorien mit 20 oder mehr Positionen (159 Trajektorien insgesamt) war nur zu Beginn linear und zeigte ab etwa 100 ms einen eindeutig nicht-linearen Verlauf (siehe Abbildung 3.16 B, Quadrate). Im linearen Teil (erste 6 Punkte) wurde ein mittlerer Diffusionskoeffizient $D_{MSD,ActD}$ von $1.44 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (rote Gerade in B). Abbildung 3.16 C zeigt die Sprungweitenanalyse von 2 Kontrollkernen aus denselben Drüsen. Hier wurden aufgrund der geringeren Anzahl an Kernen nur 2570 Trajektorien gefunden, welche ebenfalls 2 Mobilitätskomponenten aufwiesen: $D_{1,DMSO}$ von $0.21 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $12 \pm 2\%$ (gepunktete Kurve), sowie $D_{2,DMSO}$ von $1.09 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $88 \pm 2\%$ (durchgezogene Kurve). Die Summe der beiden Komponenten ist blau in die Abbildung eingezeichnet. 10 592 Sprünge gingen in die Analyse ein. Der MSD-Verlauf für die Kontrollzellen ist zum Vergleich ebenfalls in 3.16 B eingezeichnet (Dreiecke). Auch hier verläuft der MSD, welcher 67 Trajektorien beinhaltet, anfangs linear. Der Diffusionskoeffizient $D_{MSD,DMSO}$ im Anfangsbereich (erste 4 Punkte) betrug $1.33 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und lag damit geringfügig unter dem mit Actinomycin D ermittelten. Abgesehen davon, dass der MSD im Falle der Kontrollmessungen ab etwa 75 ms die Tendenz zeigt deutlicher vom linearen Anfangsverlauf abzuweichen, zeigen die MSD-Verläufe der Proben mit und ohne Actinomycin D qualitativ einen sehr ähnlichen Verlauf. Im Rahmen der Fehlergenauigkeit bzw. im Hinblick auf die dem biologischen System zugrundeliegende Variabilität (siehe Abbildung 3.7 B auf Seite 69) ist der Unterschied gering. Auch der direkte Vergleich der Sprungweitenverteilungen (Abbildung 3.16 D) deutet an, dass trotz unterschiedlicher Komponentengewichtung (siehe Zusammenfassung der Daten in Tabelle 3.6) die Sprungweitenverteilungen eine hohe Ähnlichkeit aufweisen. Im Vergleich mit den Daten zu spezifischen RNA-Oligonukleotiden, die ohne Effektor und unter Hämolympheinkubation ermittelt wurden (siehe Abb. 3.15 und Tabelle 3.6 auf Seite 94), zeigt sich, dass Transkriptionshemmung mit Actinomycin D keinen eindeutigen Effekt auf die Partikelmobilität hat. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sprungweitenhistogramme wurde keine eigene Bindungsanalyse durchgeführt.

3.6.3 Der Effekt von hrp65-1-Peptiden

Es konnte gezeigt werden, dass die Mobilität der BR2.1 mRNPs bei PBS-Inkubation der Drüse gegenüber Inkubation in Hämolymphe deutlich retardiert war. Die Bindungsanalyse deutete an, dass sich dieses Verhalten durch eine höhere Tendenz der BR2.1 mRNPs zur Bindung an nukleäre Strukturen erklären ließ. Ausgehend von dieser Modellvorstellung lag die Frage nahe, welchen Einfluss der zur Zeit einzige nachgewiesene Mediator der Bindung der BR mRNPs an die nukleären Strukturen, das hrp65-1-Protein, auf die Mobilität der mRNPs hat. Da die Aufreinigung des gesamten hrp65-1-Proteins problematisch war und das Protein nach heterologer Expression nie in höheren Konzentrationen präpariert werden konnte, wurden nur die interessanten Effektor-domänen von hrp65-1 (CTS und PBD, siehe Diskussion) synthetisiert bzw. exprimiert und

untersucht. Dies brachte außerdem den Vorteil mit sich, einen putativen Effekt sofort einer spezifischen Proteindomäne zuordnen zu können. Sowohl das CTS- als auch das PBD-Peptid wurden als Doppelinjektionen in die Speicheldrüsenzellen eingebracht. Das heißt, dass die zu untersuchenden Zellkerne zuerst mit einer Lösung mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden mikroinjiziert wurden. Dann, in einer zweiten Injektion, wurde eine Lösung des jeweiligen Peptids in das Cytoplasma injiziert, da beide Peptide entweder direkt oder indirekt in den Zellkern importiert werden. Ein Überblick über die Injektionskonzentrationen der Peptide findet sich in Kapitel 2.1.7.

3.6.3.1 Inkubation in Hämolymphe und hrp65-1-CTS

Spezifische RNA-Oligonukleotide wurden in 4 Zellkerne in 2 verschiedenen Speicheldrüsen mikroinjiziert. In einer zweiten Injektionsphase wurde dann in die selben Zellen cytosolisch zusätzlich eine hrp65-1-CTS-Lösung injiziert. Da die CTS-Domäne des hrp65-1-Proteins eine NLS enthält, wird das Peptid aus dem Cytoplasma in den Zellkern importiert [Kiesler et al., 2003]. Daher konnte auf eine Kerninjektion verzichtet werden. Die Drüsen wurden unmittelbar nach Abschluss der zweiten Injektion in Hämolymphe inkubiert. Abbildung 3.17 A zeigt die Sprungweitenverteilung von insgesamt 16 469 Trajektorien, aus denen 64 775 Sprünge in die Analyse gingen. Es wurden 2 Diffusionskomponenten mit $D_{1,CTS}$ von $0.71 \pm 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $63 \pm 23\%$ (gepunktete Kurve), sowie $D_{2,CTS}$ von $1.58 \pm 0.51 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $34 \pm 23\%$ (gestrichelte Kurve) ermittelt. Eine dritte Komponente, mit einem Diffusionskoeffizienten $D_{0,CTS}$ von $0.05 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von nur $2 \pm 0.7\%$, war auf wenige in unmittelbarer Kernmembrannähe kurz immobilisierte Partikel zurückzuführen (durchgezogene schwarze Kurve).

Der Verlauf des MSDs für Trajektorien mit 20 oder mehr Positionen (389 Trajektorien) ist in Abbildung 3.17 B gezeigt. Der MSD verläuft bis etwa 75 ms linear, weicht dann aber eindeutig vom linearen Verhalten ab. Der im linearen Teil (erste 8 Punkte) ermittelte Diffusionskoeffizient $D_{MSD,CTS}$ betrug $1.27 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Um einen direkten Vergleich der Mobilität der BR2.1 mRNPs ohne hrp65-1-CTS zu ermöglichen, sind in Abbildung 3.17 C die angepassten Kurven unter hrp65-1-CTS-Inkubation (rot) und ohne Peptidinkubation (schwarz, aus Abbildung 3.15 A, spezifische RNA-Oligonukleotide, Hämolymphe-Inkubation) gezeigt. Die Sprungweitenverteilungen unterscheiden sich angesichts der dem biologischen System zugrundeliegende Variabilität nur minimal (siehe Abbildung 3.7 A auf Seite 69 zum Vergleich). Auch beim Vergleich der MSD-Verläufe in Abbildung Abb. 3.17 D unter hrp65-1-CTS-Inkubation (rote Quadrate) und ohne Peptidinkubation (schwarze Dreiecke) zeigt sich, dass qualitativ und quantitativ im Rahmen der Fehlergenauigkeit kein Unterschied festgestellt werden kann. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse zeigt allerdings, dass eine Doppelinjektion (erst nukleoplasmatisch, dann cytosolisch) keinen Unterschied zu einer einfachen Kerninjektion macht. Daher können beide Injektionsvarianten verglichen werden, ohne dass zusätzliche Kontrollen nötig sind. Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse zusammen wobei die langsamste Diffusionskomponente $D_{0,CTS}$ nicht aufgenommen wurde. Auch hier wurde aufgrund der ähnlichen Sprungweitenhistogramme (s. Abb. 3.17 C) keine separate Bindungsanalyse durchgeführt.

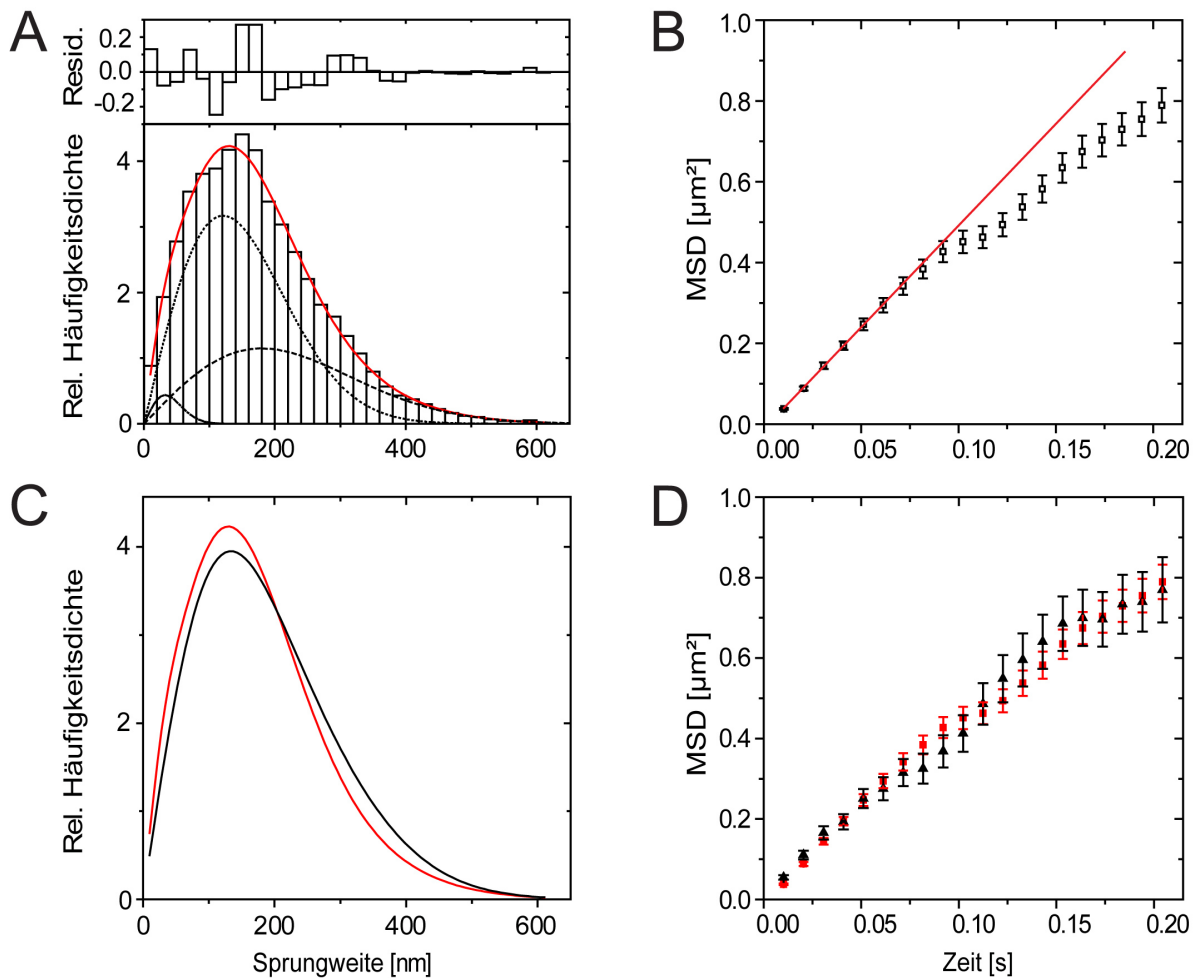


Abbildung 3.17: (A) Sprungweitenanalyse mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden und *hrp65-1-CTS*. Die Drüse wurde nach der letzten Injektion in Hämolymphe inkubiert. Es wurden zwei Hauptkomponenten $D_{1,CTS} = 0.71 \pm 0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($63 \pm 23\%$, gepunktete Kurve) und $D_{2,CTS} = 1.58 \pm 0.51 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($34 \pm 23\%$, gestrichelte Kurve) ermittelt. Eine dritte Komponente $D_{0,CTS} = 0.05 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit nur $2 \pm 0.7\%$ relativem Anteil wurde ebenfalls gefunden (schwarze durchgezogene Kurve). Die rote Kurve ist die Summe aller Komponenten, deren Residuen darüber abgebildet sind. (B) Auftragung des MSD gegen die Zeit für Trajektorien mit mindestens 20 Positionen. Im linearen Anfangsbereich (erste 8 Punkte) wurde ein Diffusionskoeffizient von $1.27 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt (rote Gerade). (C) Vergleich der Sprungweitenverteilungen mit (rot) und ohne (schwarz, aus Abbildung 3.15 A) *hrp65-1-CTS*-Inkubation. (D) Vergleich der MSD-Verläufe mit (rote Quadrate) und ohne *hrp65-1-CTS*-Inkubation (schwarze Dreiecke, aus Abbildung 3.15 B, spezifische RNA-Oligonukleotide, Hämolymphe-Inkubation). Für Details siehe Text.

3.6.3.2 Inkubation in Hämolymphe und hrp65-PBD

Über die PBD-Domäne wechselwirken die verschiedenen hrp65-Isoformen miteinander, was möglicherweise die Grundlage der Struktur der CFs ist, über welche die BR2.1 mRNPs an die FGCs binden (siehe Einleitung).

Zur Überprüfung der Funktionalität des heterolog exprimierten PBD-Peptids, wurde mit Atto647 markiertes hrp65-PBD-GST zusammen mit BSA-Alexa488 cytosolisch mikroinjiziert (siehe Abbildung 3.18 A). BSA-Alexa488 ist mit einer molaren Masse von 66 kDa so groß, dass es die Kernporen nicht diffusiv passieren kann. Es diente daher als Dichtigkeitskontrolle, um die Unversehrtheit der Zellkernmembran zu demonstrieren. Wie in Abbildung 3.18 A gezeigt, blieb BSA-Alexa488 vom Kern ausgeschlossen (Mitte). Während ein Teil des hrp65-PBD-GST cytosolisch aggregierte (Abbildung 3.18 A, rechts, Pfeil), konnte auch eine Akkumulation von hrp65-PBD-GST im Kern beobachtet werden. Da das PBD-Peptid nur über die Wechselwirkung mit endogenem hrp65-1 aktiv in den Kern importiert werden kann, konnte die prinzipielle Funktionalität des PBD-Peptids angenommen werden.

Spezifische RNA-Oligonukleotide wurden in 3 Zellkerne in 2 verschiedenen Speicheldrüsen mikroinjiziert. In der zweiten Injektionsphase wurden dann die selben Zellen cytosolisch hrp65-PBD-GST injiziert (siehe Kapitel 2.1.7). Die Drüsen wurden unmittelbar nach Abschluss der zweiten Injektion in Hämolymphe inkubiert. Abbildung 3.18 B zeigt die Sprungweitenverteilung von insgesamt 11 208 Trajektorien (43 332 Sprünge). Es wurden erneut 2 Hauptdiffusionskomponenten mit $D_{1,PBD}$ von $0.85 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $72 \pm 12\%$ (gepunktete Kurve), sowie $D_{2,PBD}$ von $1.71 \pm 0.34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $24 \pm 13\%$ (gestrichelte Kurve) ermittelt. Auch hier wurde eine dritte Komponente mit einem Diffusionskoeffizienten $D_{0,PBD}$ von $0.13 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem relativen Anteil von $4 \pm 0.7\%$ gefunden, die auf einige in Membrannähe immobilisierte Partikel zurückzuführen war (Strich-Punkt-Kurve).

Der Verlauf des MSDs mit der Zeit für Trajektorien mit 20 oder mehr Positionen ist in Abbildung 3.17 C (Quadrate) gezeigt. 255 Trajektorien gingen in die Analyse ein. Der MSD verläuft hier im Rahmen der Fehlergenauigkeit linear und zeigt damit einen deutlichen Unterschied zum MSD, welcher ohne hrp65-PBD-GST ermittelt wurde (3.17 C (Dreiecke), spezifische RNA-Oligonukleotide, Hämolymphe-Inkubation, aus Abbildung 3.15 A). Der ermittelte Diffusionskoeffizient $D_{MSD,PBD}$ betrug $1.42 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und liegt damit im Bereich der bisher ermittelten initialen Diffusionskoeffizienten.

Abbildung 3.17 D zeigt den Vergleich der Sprungweitenhistogramme mit (rot) und ohne (schwarz) hrp65-PBD-GST. Die Sprungweitenhistogramme unterscheiden sich kaum, was auch hier eine Bindungsanalyse obsolet macht. Damit deutet sich ein Effekt von hrp65-PBD-GST an, der sich nur auf größere räumliche Distanzen bemerkbar macht. Hier konnte damit erstmals ein direkter Effekt einer hrp65-Domäne auf die BR2.1 mRNP Mobilität *in vivo* dokumentiert werden.

Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse zusammen. Hier wurde die langsamste Diffusionskomponente $D_{0,PBD}$ nicht aufgenommen.

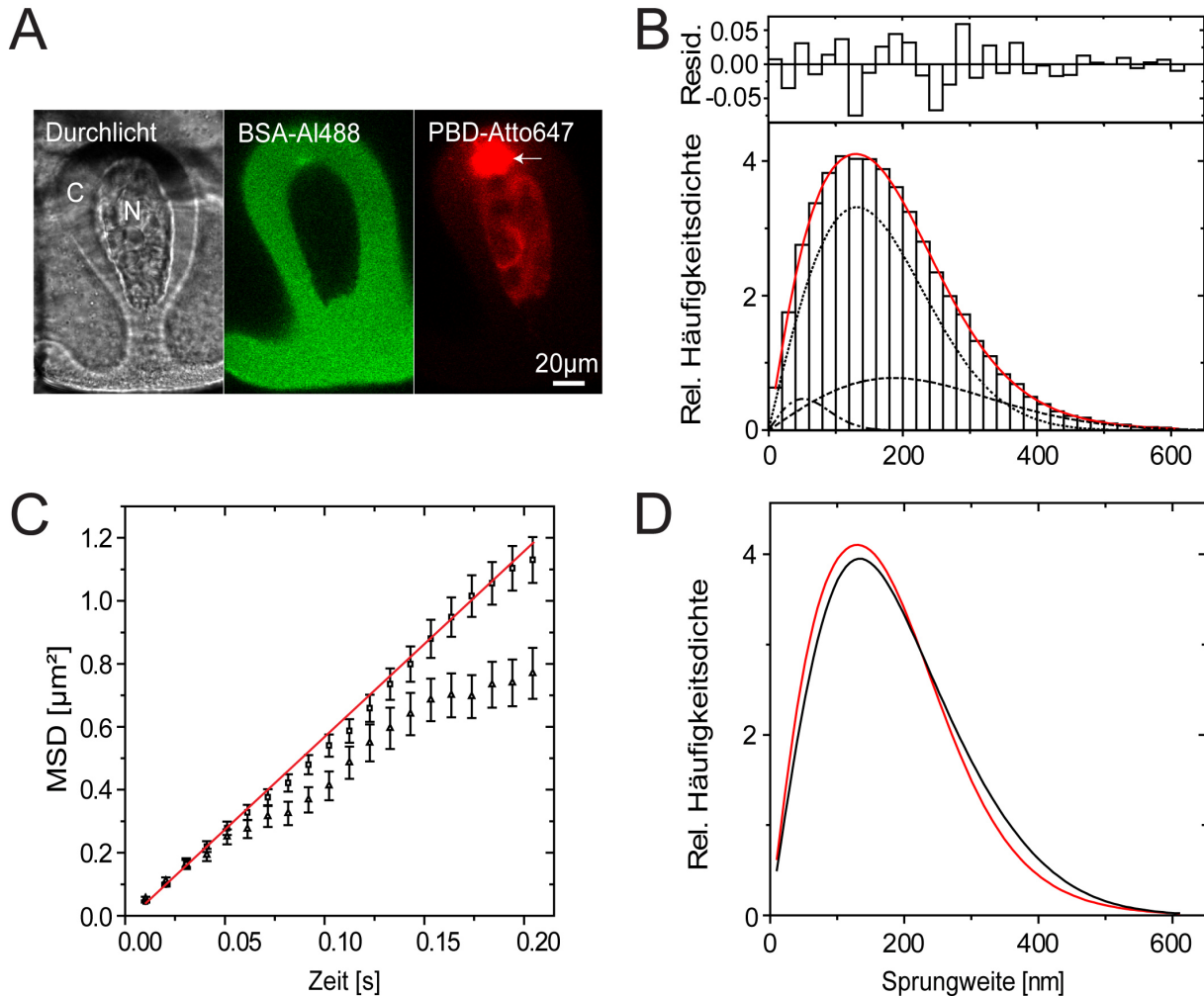


Abbildung 3.18: (A) Funktionalitätskontrolle des *hrp65*-PBD-GST-Proteins. Während BSA-Alexa488 nach cytosolischer Injektion vom Zellkern ausgeschlossen bleibt, wird mit Atto647 markiertes *hrp65*-PBD-GST im Kern akkumuliert. Pfeil, Injektionsstelle. C, Cytosol. N, Zellkern. (B) Sprungweitenanalyse mit spezifischen RNA-Oligonukleotiden und *hrp65*-PBD-GST. Die Drüse wurde nach der letzten Injektion in Hämolymphe inkubiert. Es wurden zwei Hauptkomponenten $D_{1,PBD} = 0.85 \pm 0.06 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($72 \pm 12\%$, gepunktete Kurve) und $D_{2,PBD} = 1.71 \pm 0.34 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($24 \pm 13\%$, gestrichelte Kurve) ermittelt. Eine dritte Komponente $D_{0,PBD} = 0.13 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ mit $4 \pm 0.7\%$ relativem Anteil wurde ebenfalls gefunden (Strich-Punkt-Kurve). Die rote Kurve ist die Summe aller Komponenten, deren Residuen darüber abgebildet sind. (C) Vergleich der MSD-Verläufe mit (Quadrate) und ohne *hrp65*-PBD-GST-Inkubation (Dreiecke, aus Abbildung 3.15 B). Der MSD-Verlauf unter Proteininkubation ist linear. Ein Diffusionskoeffizient von $1.42 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wurde ermittelt (rote Gerade). (D) Vergleich der Sprungweitenverteilungen mit (rot) und ohne *hrp65*-PBD-GST-Inkubation (schwarz, aus Abbildung 3.15 A). Für Details siehe Text.

3.6.4 Die Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität: Ein Überblick

Tabelle 3.6 fasst alle Effektordaten zusammen. Abbildung 3.19 zeigt alle Sprungweitenhistogramme und MSD-Verläufe zum Vergleich in jeweils einer Abbildung. Wie in Abbildung 3.19 A zu sehen, zeigt sich auf kurzen Zeitskalen (d.h. im Bereich der einzelnen Sprungweiten) nur zwischen PBS- und Hämolympheinkubation der Drüse ein eindeutiger Effekt. Die sonstigen potentiellen Effektoren ändern die lokale Mobilität hingegen nicht. Auf längeren Zeitskalen - und damit auch größeren räumlichen Skalen - zeigt sich im MSD-Verlauf (Abb. 3.19 B) ebenfalls ein Effekt zwischen PBS- und Hämolympheinkubation. Von den potentiellen Effektoren beeinflusst jedoch nur hrp65-PBD-GST die BR2.1 mRNP-Mobilität über den Hämolympheeffekt hinaus und bewirkt einen linearen Verlauf des MSDs mit der Zeit.

Spezifische RNA-O.	A_1 [%]	D_1 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	A_2 [%]	D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	D_{MSD} [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
HL	25 ± 5	0.52 ± 0.05	75 ± 5	1.38 ± 0.06	1.36 ± 0.01
HL u. ActD/DMSO	38 ± 10	0.59 ± 0.06	62 ± 10	1.27 ± 0.1	1.44 ± 0.05
HL u. DMSO	12 ± 2	0.21 ± 0.03	88 ± 2	1.09 ± 0.03	1.33 ± 0.02
HL u. hrp65-1-CTS ^a	63 ± 23	0.71 ± 0.12	34 ± 23	1.58 ± 0.51	1.27 ± 0.01
HL u. hrp65-PBD ^a	72 ± 12	0.85 ± 0.06	24 ± 13	1.71 ± 0.34	1.42 ± 0.05

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Messungen mit putativen Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität. Es wurden immer spezifische RNA-Oligonukleotide verwendet, um die BR2.1 mRNPs zu visualisieren. HL, Hämolympheinkubation. ActD, Actinomycin D. ^a, die langsamste Komponente ist nicht gezeigt. Die Standardfehler sind angegeben.

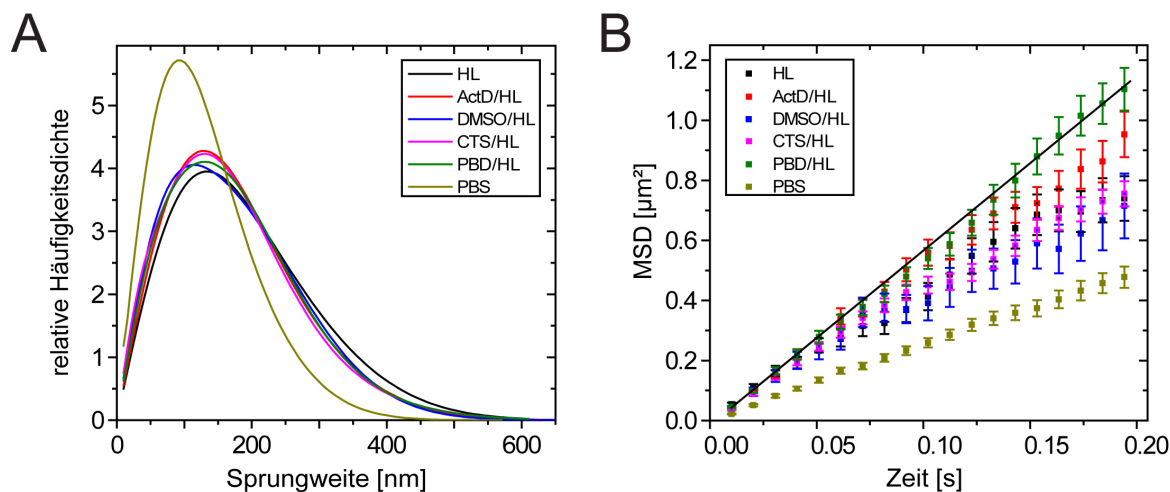


Abbildung 3.19: (A) Die Sprungweitenhistogramme sämtlicher Messungen sind zusammengefasst dargestellt. Es zeigt sich, dass nur zwischen PBS- und Hämolympheinkubation (HL) ein signifikanter Effekt auftritt. Die sonstigen potentiellen Effektoren zeigen keinen Effekt in der Sprungweitenanalyse. ActD, Actinomycin D. CTS, hrp65-1-CTS. PBD, hrp65-PBD-GST. (B) Die MSD-Verläufe sämtlicher Messungen sind zusammengefasst dargestellt. Ein Effekt zwischen PBS- und Hämolympheinkubation ist auch hier erkennbar. Von den Effektoren wirkt sich nur hrp65-PBD-GST auf die BR2.1 mRNP Mobilität aus.

Kapitel 4

Diskussion

In den Speicheldrüsenzellkernen von *C. tentans* kann die Mobilität endogener BR2.1 mRNPs in chromatinfreien Nukleoplasmaebereichen *in situ* untersucht werden. In [Siebrasse et al., 2008] zeigte sich, dass sich die BR2.1 mRNPs nicht frei diffundierend im Nukleoplasma bewegen, sondern retardiert werden (siehe Motivation in Kapitel 1.3 bzw. Tabelle 4.1 auf Seite 110). Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es diese komplexe Mobilität der BR2.1 mRNPs zu verstehen. In [Siebrasse et al., 2008] wurde die BR2.1 mRNP-Bewegung mit Hilfe von spezifisch bindenden DNA-Oligonukleotiden an einem konfokalen Mikroskop untersucht. Hierbei erwies sich einerseits die kurze Lebensdauer der DNA-Oligonukleotide im Kern als problematisch, andererseits erforderte die geringe Sensitivität des dort genutzten Mikroskops die Mikroinjektion relativ hoher Oligonukleotidkonzentrationen. Dadurch wurden vor jeder Messung minutenlange Bleichphasen notwendig, um vereinzelt BR2.1 mRNPs auflösen und mit einer maximalen Zeitaufösung von 50 ms beobachten zu können. Mit Hilfe der Sprungweitenanalyse wurden dort folgende Diffusionskoeffizienten für die nukleoplasmatischen BR2.1 mRNPs ermittelt [Siebrasse et al., 2008]:

$$\begin{aligned}D_{I,DNA} &= 3.74 \pm 1 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (15 \pm 3\%) \\D_{II,DNA} &= 0.64 \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (66 \pm 2\%) \\D_{III,DNA} &= 0.23 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (19 \pm 3\%) \\D_{IV,DNA} &= 0.015 \mu\text{m}^2/\text{s} \quad (0.7 \pm 0.3\%)\end{aligned}$$

(in Klammern sind die relativen Anteile der Komponenten angegeben). Das wichtigste Ziel der hier nun vorliegenden Arbeit war es, den Ursprung dieser verschiedenen BR2.1 mRNP-Mobilitätskomponenten zu klären und im Hinblick auf die besondere Zellkernstruktur der *C. tentans*-Speicheldrüsenzellen zu interpretieren.

Hierzu sollte die bereits in [Siebrasse et al., 2008] vorgestellte Trajektorienanalyse umfangreich erweitert werden. Dies brachte die Notwendigkeit mit sich, zuerst die Zuverlässigkeit des Einzelpartikeltrackings zu erhöhen. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, gelang in [Veith, 2007] und [Siebrasse et al., 2008] die Markierung der BR2.1 mRNPs mit DNA-Oligonukleotiden nicht in jedem Experiment. Dies lag vermutlich daran, dass die verwendeten DNA-Oligonukleotide mit den mRNA-Molekülen DNA-RNA-Hybride bilden, welche ein potentielles Ziel nukleärer RNAse H sind - einem Enzym, welches DNA-RNA-Hybride abbaut [Molenaar et al., 2001]. Durch

einen Wechsel zu 2'-O-Methyl-RNA-Oligonukleotiden, welche gebunden an mRNA kein Ziel nukleärer RNase H darstellen und daher eine deutlich höhere Stabilität im Zellkern aufweisen [Molenaar et al., 2001], konnte dieses Problem behoben werden. Mit den RNA-Oligonukleotiden gelang es, in praktisch jedem Experiment die BR2.1 mRNPs bzw. die BR2.1-Transkriptionsstelle anzufärben (s. Kap. 3.4.1).

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, gelang es außerdem durch den Wechsel vom konfokalen Linienscanner zum Einzelmolekülmikroskop - einem sensitiven Videomikroskop mit schneller emCCD-Kamera (s. Kap. 2.2.7) - im Vergleich zu [Siebrasse et al., 2008] die Mikroinjektionskonzentration der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide bei sogar verbesserter Signalqualität um den Faktor 20 zu reduzieren. In [Siebrasse et al., 2008] mussten aufgrund der geringen Sensitivität der CCD-Zeile des Linienscanners hohe Mikroinjektionskonzentrationen gewählt werden, um die BR2.1 mRNPs mit mehreren Oligonukleotiden und damit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Dadurch wurde jedoch ein Großteil der BR2.1 mRNPs angefärbt, was zu einer sehr hohen Signaldichte von 70 bis 90 markierten BR2.1 mRNPs pro μm^3 führte. Nur durch Bleichphasen mit höchster Laserintensität von mehreren Minuten Länge gelang es die Signaldichte so weit zu reduzieren, dass vereinzelte Signale sichtbar wurden. Jedoch blieb die Signaldichte für das Einzelpartikeltracking immer noch sehr hoch, was die Wahrscheinlichkeit für Falschzuweisungen bei der Trajektorienverknüpfung erhöhte. Durch die deutlich höhere Sensitivität des Einzelmolekülmikroskops konnte die Injektionskonzentration nun stark reduziert werden. Damit wurde theoretisch nur noch ein Bruchteil der im Zellkern vorhandenen BR2.1 mRNPs mit einem fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid markiert, was zu einer deutlich besseren Vereinzelung der Signale führte und lange Bleichphasen überflüssig machte. Da trotz der geringen Mikroinjektionskonzentration relativ hohe Signal-zu-Rausch-Verhältnisse von bis zu 8 erreicht wurden, ist jedoch nicht auszuschließen, dass einige der markierten BR2.1 mRNPs durch die zu Beginn der Mikroinjektion lokal erhöhte Oligonukleotidkonzentration auch mit mehr als einem Oligonukleotid und damit mit mehr als einem Fluoreszenzfarbstoff markiert waren.

Zusammenfassend gelang es mit einem Wechsel zu 2'-O-Me-RNA-Oligonukleotiden und zum Einzelmolekülmikroskop die Wahrscheinlichkeit für Falschzuweisungen beim Einzelpartikeltracking deutlich zu reduzieren. Es stand nun ein stabiles System mit sehr guter Reproduzierbarkeit von deutlich vereinzelt und trotzdem gut sichtbaren Signalen zur Verfügung.

4.1 Die komplexe Mobilität der BR2.1 mRNPs

Durch die beschriebenen methodischen Verbesserungen konnten am Einzelmolekülmikroskop im Vergleich zu [Siebrasse et al., 2008] nicht nur deutlich mehr BR2.1 mRNP-Trajektorien aufgenommen werden sondern auch die Aufnahmezeit um den Faktor 4 auf 100 Hz erhöht werden. Damit standen ca. 30 000 zeitlich hochaufgelöste BR2.1 mRNP-Trajektorien aus 6 Zellkernen für eine tiefgehende Trajektorienanalyse zur Verfügung. Im Folgenden beziehen sich die beschriebenen Analysen und Schlussfolgerungen - sofern nichts gegenteiliges genannt - auf diesen Datensatz. In Abbildung 3.7 ist zu sehen, dass den 6 analysierten Zellkernen eine gewisse Variabilität zugrundeliegt, die in diesem biologischen System nicht umgangen werden kann. In den verschie-

denen Einzelmessungen ließen sich jedoch Gemeinsamkeiten erkennen. So zeigten fast alle JD1-Sprungweitenhistogramme einen vergleichbaren Verlauf. Ebenso war der MSD-Verlauf für alle Kerne nicht-linear. Um die primär interessierenden Gemeinsamkeiten der Einzelmessungen herauszuarbeiten, wurden die Trajektorien aller Kerne zusammengefasst und gemeinsam ausgewertet.

Die Analyse der nun vorliegenden neuen Daten bestätigte die Ergebnisse aus [Siebrasse et al., 2008] teilweise, lieferte aber auch neue Erkenntnisse hinsichtlich des Ursprungs der 4 damals gefundenen Mobilitätskomponenten. In den neuen, mit methodischen Verbesserungen ermittelten Daten, wurden mit Hilfe der Sprungweitenanalyse zwei Hauptmobilitätskomponenten mit einem Diffusionskoeffizient von 0.73 bzw. $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ identifiziert, die auch schon mit vergleichbaren Werten in [Siebrasse et al., 2008] ermittelt werden konnten (siehe Tabelle 4.1 auf Seite 110). Eine dritte Diffusionskomponente mit einem Diffusionskoeffizient von $0.001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und einem Anteil von 0.7% aller 124 000 analysierten Sprünge wurde ebenfalls nachgewiesen. Diese wurde zwar schon in [Siebrasse et al., 2008] gefunden, konnte damals aber keinem konkreten Ereignis zugeordnet werden. Erst durch die nun erreichte deutliche Vereinzelung der Signale in Kombination mit der hohen Reproduzierbarkeit konnten so viele Daten gesammelt werden, dass diese langsamste Komponente trotz ihres seltenen Auftretens erstmals zweifelsfrei mit *sowohl* kurzzeitig an Polytänchromosomen *als auch* in Membrannähe immobilisierten BR2.1 mRNPs in Verbindung gebracht werden konnte. Dieses Ergebnis verwundert nicht: Dass sich die großen 50 nm-BR2.1 mRNPs auch im Speicheldrüsenzellkern in Chromatinschleifen verfangen können, wenn die Partikel diffusiv die unmittelbare Nähe eines Chromosoms erreichen, ist plausibel. Das zeigt, dass auch das relativ dicht gepackte Chromatin der Polytänchromosomen die mRNP-Bewegung *lokal* beeinflussen kann. Die Seltenheit solcher Ereignisse zeigt jedoch auch, dass die passiven, diffusionsbeeinflussenden Eigenschaften des Chromatins im Speicheldrüsenzellkern in den Hintergrund treten und nur noch im Rahmen solcher Zufallsereignisse eine Rolle spielen. Es ist anzumerken, dass sich eine Immobilisierung im Sprungweitenhistogramm als Diffusion darstellt, mit einem Diffusionskoeffizient, der vom SNR abhängt (siehe Kapitel 3.2). Daher wird im Sprungweitenhistogramm auch für eine Immobilisierung ein Diffusionskoeffizient > 0 ermittelt.

Auch Immobilisierungen der BR2.1 mRNPs an der Kernmembran sind prinzipiell nicht verwunderlich, ist doch die Kernmembran mit ihren Kernporen letztlich das Ziel exportkompetenter nukleärer mRNPs, welche die genetische Information ins Cytoplasma transportieren. Solche Immobilisierungsereignisse in Membrannähe wurden jedoch nur ebenso selten - „zufällig“ - gesichtet wie die kurzen Immobilisierungen an den Polytänchromosomen. Damit konnte zwar einerseits der Ursprung dieser langsamen Komponente erklärt werden, andererseits verwunderte aber auch der Zufalls- bzw. Seltenheitscharakter der Bindungsereignisse in Membrannähe: So konnten auch mit den neuen RNA-Oligonukleotiden - abgesehen von diesen kurzen Membranereignissen - keine eindeutigen mRNP-Exportereignisse visualisiert werden. In [Siebrasse et al., 2008] wurde die Vermutung geäußert, dass der Export von BR2.1 mRNPs mit Oligonukleotiden prinzipiell nicht visualisiert werden kann, weil die Oligonukleotide während oder kurz nach der Kernporenbinding abgestreift werden und sich das Andocken eines BR2.1 mRNPs an der Kernpore nur als kurzes Aufflackern andeutet. Die hier vorliegenden Ergebnisse passen gut zu dieser Modellvorstellung.

Abgesehen von den Immobilisierungen in Membrannähe bzw. an Polytäanchromosomen konnten mit einer Aufnahmerate von 100 Hz in *rein nukleoplasmatischen*, also chromatinfreien Kernbereichen *keine* sichtbaren mRNP-Immobilisierungen gefunden werden.

Besonders auffällig beim Vergleich der Ergebnisse der hier vorliegenden Dissertation mit [Siebrasse et al., 2008] war außerdem, dass die schnellste damals gefundene Komponente mit knapp $4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ hier nicht wiedergefunden wurde. Da im Rahmen dieser Dissertation insbesondere Maßnahmen zur Steigerung der Zuverlässigkeit des Einzelpartikeltrackings ergriffen worden waren, lag ein Zusammenhang zwischen verbesserter Methodik und dem Verlust dieser schnellsten Komponente nahe. Mit Hilfe von Kontroll- bzw. MB-Oligonukleotiden am Einzelmolekülmikroskop, insbesondere aber auch durch FCS, konnte gezeigt werden, dass Diffusionskoeffizienten $\gg 1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in der Tat *nicht* spezifisch für die BR2.1 mRNPs sind, sondern zu freien oder unspezifisch an Kernproteine gebundenen Oligonukleotiden gehören (siehe Kapitel 3.4.2, 3.4.4 und 3.4.5). Die Visualisierung und Identifizierung freier bzw. unspezifisch gebundener (Kontroll-)Oligonukleotide war erst nach dem Wechsel zu deutlich sensitiveren Mikroskopietechniken wie der Einzelmolekülmikroskopie und FCS möglich und damit eine weitere wichtige Folge der methodischen Verbesserungen. In geringem Umfang wurden auch freie *spezifische* Oligonukleotide gefunden, die jedoch aufgrund der hohen Bindungsaffinität an die BR2.1 mRNA und dem hohen Anteil freier Bindungsstellen an unmarkierten BR2.1 mRNPs kaum eine Rolle spielten und nur im besonders sensitiven FCS in Erscheinung traten. Durch die Kombination von FCS und Einzelpartikeltracking konnte also auch der Ursprung der schnellsten in [Siebrasse et al., 2008] gefundenen Mobilitätskomponente aufgeklärt werden.

Die beiden im Einzelpartikeltracking ermittelten Hauptmobilitätskomponenten wurden mit Hilfe von FCS bestätigt (siehe Tabelle 3.4 auf Seite 71), womit erstmals gezeigt werden konnte, dass Einzelpartikeltracking und FCS prinzipiell vergleichbare Ergebnisse zur nukleären mRNP-Diffusion liefern - zumindest, wenn das in Säugerzellen strukturbestimmende Chromatin als Mobilitätseinfluss keine Rolle spielt. Dass die beiden Hauptmobilitätskomponenten nicht in jeder FCS-Messung nebeneinander gefunden wurden, sondern teilweise nur je eine von beiden, war ein erster Hinweis auf eine lokale strukturelle Inhomogenität des chromatinfreien Nukleoplasmas. Hier wirkte sich der im Vergleich zum Einzelpartikeltracking kleinere Aufnahmebereich des FCS aus und deutete an, dass der durch die in Kapitel 3.3 vorgestellten FRAP-Messungen entstandene Eindruck, das Nukleoplasma sei eine relativ *homogene* Proteinlösung, eine zu große Vereinfachung darstellt.

Während damit sowohl der Ursprung der schnellsten, wie auch der langsamsten in [Siebrasse et al., 2008] gefundenen Mobilitätskomponente geklärt werden konnte, blieb der Ursprung der beiden - nun auch mit FCS bestätigten - Hauptmobilitätskomponenten mit 0.3 bzw. $0.73 \mu\text{m}^3/\text{s}$ vorerst unklar.

4.2 Hinweise auf nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen

Die FRAP-Messungen mit 500 und 150 kDa-Dextran bestätigten die nukleoplasmatischen Viskositätswerte, die bereits in [Veith, 2007] mit Polystyrolbeads bzw. Quantumdots ermittelt worden

waren (siehe Kapitel 3.3). So liegt im chromatinfreien Nukleoplasma eine Viskosität von 3-4 cP vor, die für Partikel mit einem Durchmesser zwischen 16 und 57 nm kaum größenabhängig ist (für deutlich kleinere Oligonukleotide allerdings schon, siehe Kapitel 3.4.4). Das hier analysierte 500 kDa Dextran wies einen mittleren Durchmesser von 57 nm auf, der ungefähr dem eines BR2.1 mRNPs mit 50 nm entspricht. Trotzdem wurde für das 500 kDa-Dextran mit FRAP ein deutlich höherer (mittlerer) Diffusionskoeffizient von $2.4 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ermittelt als für die BR2.1 mRNPs (0.73 bzw. $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$). Dieser Vergleich verdeutlicht, dass die nukleoplasmatische Mobilität der BR2.1 mRNPs eindeutig retardiert ist.

Mit der in Kapitel 3.4.3 vorgestellten Analyse der diskontinuierlichen Mobilität der BR2.1 mRNPs konnte außerdem gezeigt werden, dass beide Diffusionskoeffizienten 0.73 bzw. $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ nebeneinander in einzelnen BR2.1 mRNP-Trajektorien zu finden sind. Bei der Aufnahme von 100 Hz konnten allerdings keine klar voneinander abzugrenzenden Trajektorienabschnitte mit jeweils nur einem der beiden Diffusionskoeffizienten gefunden werden. Jedoch war ein schneller, bei 100 Hz nicht auflösbarer Wechsel der nukleären BR2.1 mRNP-Mobilität denkbar. Zudem deutete ein nicht-linearer MSD-Verlauf der BR2.1 mRNPs in *chromatinfreien Bereichen* stark auf Bindungen bzw. Hindernisse hin, obwohl direkt keine nukleoplasmatischen Immobilisierungen visualisiert werden konnten. Diese Ergebnisse lassen sich durch komplexe Vorgänge erklären, die der nukleoplasmatischen BR2.1 mRNP-Mobilität zugrundeliegen. Es war denkbar, dass diese Komplexität eine *strukturelle* Ursache im Nukleoplasma hat. Bereits durch die Ergebnisse der FCS-Messungen, bei welchen lokale Unterschiede in den Diffusionskoeffizienten gefunden wurden, lagen erste Hinweise darauf vor, dass das chromatinfreie Nukleoplasma im Speicheldrüsenzellkern keine homogene Suspension ist, so dass die Frage nach seiner eigentlichen strukturellen Beschaffenheit erneut in den Vordergrund rückte.

Anzunehmen war, dass verschiedene regulatorische Faktoren die Mobilität der BR2.1 mRNPs beeinflussen können. Damit eignete sich die Analyse der komplexen BR2.1 mRNP-Trajektorien *allein* kaum, um fokussiert die strukturelle Beschaffenheit des Nukleoplasmas im Speicheldrüsenzellkern zu untersuchen. Um den Einfluss unbekannter endogener (Regulations-)Faktoren auszuschließen, musste eine Sonde gefunden werden, die einerseits als regulatorisch inert angenommen werden konnte, trotzdem jedoch in Größe und Form dem BR2.1 mRNP ähnelt, um so die passiven Mobilitätseigenschaften des chromatinfreien Nukleoplasmas abzubilden.

Dextran wurde bereits in verschiedensten Publikationen als inerte Sonde eingesetzt, um die Struktur sowohl von Zellkern als auch Cytoplasma zu untersuchen (z.B. [Handwerker et al., 2005]). Wie in Kapitel 3.3 beschrieben, wurde 500 kDa Dextran bereits in Kombination mit FRAP verwendet, um die Viskosität des Speicheldrüsenzellkerns zu untersuchen. FRAP ist jedoch aufgrund des großen Bleichfeldes von mehreren Mikrometern keine geeignete Technik, um *lokale* Strukturunterschiede im Nukleoplasma herauszuarbeiten. Dies zeigte sich schon daran, dass die in [Braeckmans et al., 2003] für reine Diffusion aufgestellten Gleichungen die Fluoreszenzrückkehr von Dextran im Speicheldrüsenzellkern erstaunlich gut beschrieben und damit für die sich im FCS andeutenden lokalen „Viskositätsunterschiede“ des chromatinfreien Nukleoplasmas unsensitiv waren.

Insofern lag es nahe als inerte Sonde zwar erneut auf 500 kDa Dextran zurückzugreifen, sich

jedoch methodisch dem Einzelpartikeltracking zuzuwenden, da die Aufnahme von Einzelpartikeltrajektorien räumlich hochaufgelöste Aussagen zu lokalen Strukturunterschieden ermöglicht. Durch die Markierung einzelner Dextranmoleküle mit mehreren Farbstoffmolekülen konnte die Aufnahmezeit bei gleich bleibender Signalqualität bis auf 200 Hz erhöht werden.

Die am besten verstandene Analyseverfahren zur Untersuchung der strukturellen Zusammensetzung eines Mediums ist die MSD-Analyse [Saxton, 2007, Saxton, 2008]. Der Vorteil der MSD-Analyse ist in diesem Zusammenhang, dass in einem einzigen Graph Aussagen sowohl über die Mobilitätssituation auf kleinen Zeit- und Raumskalen (über die ersten Datenpunkte im MSD), als auch über die Situation auf größeren räumlichen Skalen (über die MSD-Punkte bei späteren Zeiten) getroffen werden können. Daher lag es nahe sich bei der Analyse der im Einzelpartikeltracking erhaltenen Trajektorien in diesem speziellen Fall auf die MSD-Analyse zu konzentrieren. Da sich Unterschiede in der strukturellen Beschaffenheit des Mediums auf verschiedenen zeitlichen und räumlichen Skalen unterschiedlich auf die Mobilität diffundierender Partikel auswirken (siehe unten), konnte die Sprungweitenanalyse hier nicht weiterhelfen.

Um die Eigenschaften der Sonde in definierten Umgebungen zu charakterisieren, wurde das 500 kDa Dextran sowohl in Pufferlösung wie auch in Zellkernen von Säugerzellen untersucht (siehe Kapitel 3.5): In Säugerzellen füllen Eu- und Heterochromatin den gesamten Zellkern aus und wirken daher passiv retardierend auf die Mobilität von inerten Makromolekülen wie Dextran, während diese im Puffer frei diffundieren. Entsprechend wurde für die Mobilität des Dextrans in Pufferlösung wie erwartet ein linearer MSD-Verlauf mit der Zeit ermittelt, der die freie Diffusion des 500 kDa-Dextrans bestätigt. Über den ermittelten Diffusionskoeffizienten von $5.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ konnte der Durchmesser des Atto647-markierten Dextrans über Gleichung 2.9 mit 80 nm errechnet werden und lag damit ca. 20 nm über dem mit FRAP für das 500 kDa FITC-Dextran ermittelten. Da Dextran laut Herstellerinformationen generell eine sehr breite Größenverteilung zeigt, ist nicht auszuschließen, dass durch die der Markierung folgende Aufreinigungszugang im Vergleich zu dem bei den FRAP-Messungen verwendeten Dextran hier Dextranmoleküle mit einem (im Mittel) etwas größeren Durchmesser selektiert worden waren, was diese Diskrepanz erklärt.

Im Säugerzellkernen wurde erwartet, dass das entfaltete Chromatin ein passives strukturelles Hindernis darstellt, wodurch das 80 nm-Dextran in der Mobilität eingeschränkt werden sollte. Dies zeigte sich deutlich in einem nicht-linearen Verlauf des MSDs und in einem im Vergleich zur Pufferlösung verminderten initialen Diffusionskoeffizienten von etwa $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Durch die hohe Zeitauflösung von 200 Hz bilden die ersten Punkte im MSD die Dextranmobilität im Bereich von $\ll 300 \text{ nm}$ ab ($\sqrt{0.1 \mu\text{m}^2}$, siehe Abbildung 3.12, Quadrate) und damit lokal hauptsächlich im Bereich der Interchromatinkanäle. Der Einfluss des entfalten Chromatins auf die verschiedenen Zeitpunkte im MSD hängt bildlich gesprochen von der Dichte der Netzwerkmaschen und von der Aufnahmezeit ab. Bei einer ausreichend hohen Aufnahmezeit werden die ersten Punkte des MSDs hauptsächlich von der Diffusion *innerhalb* der Netzwerkmaschen beeinflusst, die hier den Interchromatinkanälen entsprechen (lokaler Diffusionskoeffizient, siehe dazu auch [Wachsmuth et al., 2008]). Erst die folgenden MSD-Punkte werden nach und nach, abhängig von der Dichte des Netzwerks, durch die Diffusion *zwischen* den Netzwerkmaschen beeinflusst. Die Maschendichte wirkt sich auf den *globalen* Diffusionskoeffizienten aus.

Damit beträgt die über den initialen Diffusionskoeffizient im MSD abgeschätzte *lokale* Viskosität des Nukleoplasmas im Bereich der Interchromatinkanäle eines Säugerzellkerns ca. 5 cP und liegt so nur um 2 cP höher als der mit FRAP ermittelte Wert für den Speicheldrüsenzellkern. Mit zunehmender Entfernung tritt dann der strukturelle Einfluss der Chromatins im Säugerzellkern immer deutlicher in Erscheinung und wirkt weiter retardierend auf die Mobilität. Diese retardierende Wirkung ist umso stärker, je weiter sich die untersuchten Partikel im Mittel von ihrer Ausgangsposition entfernen.

Besonders interessant war es nun zu vergleichen, wie sich das Dextran im ausgedehnten, chromatinfreien Nukleoplasma des Speicheldrüsenzellkerns verhielt. Wie in Abbildung 3.12 zu erkennen, zeigte sich, dass mit dem Dextran auch im Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne ein *nicht linearer* MSD-Verlauf gefunden wurde, obwohl ein solcher nur bei Vorhandensein von ausgedehnten Strukturen wie dem Chromatin der Säugerzellkerne erwartet wurde.

Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch im chromatinfreien Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* ausgedehnte Strukturen angenommen werden müssen, die jedoch hier eben *nicht* aus Chromatin bestehen. Als ausgedehnt konnten sie deshalb angenommen werden, da in die Analyse Trajektorien aus allen Nukleoplasmaebenen eingingen. Diese ausgedehnten Nichtchromatinstrukturen beeinflussen die Mobilität nicht-endogener, inerter Makromoleküle wie Dextran demnach passiv und sorgen aufgrund ihrer Ausdehnung für eine mit der Entfernung zunehmende Retardierung der Mobilität, ähnlich jener, die in chromatingefüllten Säugerzellkernen gefunden wurde. Der initiale Diffusionskoeffizient war mit $2.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ im Vergleich zur Diffusion in Puffer ebenfalls reduziert, bestätigte aber den mit FRAP im Speicheldrüsenzellkern ermittelten Diffusionskoeffizient für ein (vom Durchmesser her etwas kleineres) 500 kDa FITC-Dextran. Dass der initiale Diffusionskoeffizient des Dextrans, wie oben beschrieben, insbesondere durch lokale strukturelle Eigenschaften beeinflusst wird, im Speicheldrüsenzellkern jedoch größer als im Säugerzellkern ist, bedeutet, dass die ausgedehnten Strukturen im Speicheldrüsenzellkern weniger dicht und raumfüllend sind, als das entfaltete Chromatin im Säugerzellkern. Zu einer relativ geringen Dichte der Nichtchromatinstrukturen passt auch, dass der mit FRAP ermittelte Diffusionskoeffizient *hier* dem lokalen MSD-Diffusionskoeffizient entspricht, obwohl FRAP wegen des Bleichflecks von mehreren Mikrometern Durchmesser in Säugerzellkernen hauptsächlich Informationen über die globale Diffusion liefert.

4.3 Die BR2.1 mRNP-Mobilität im strukturierten Nukleoplasma

Im Lichte dieser Ergebnisse kann nun auch der zunächst unerwartete nicht-lineare MSD-Verlauf der BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma verstanden werden. Es ist zu erwarten, dass die das 500 kDa Dextran retardierenden Strukturen mindestens ebenso retardierend auf die in etwa gleich großen BR2.1 mRNPs wirken. Diese rein passive Retardierung sollte jedoch ebenfalls zu einem initialen Diffusionskoeffizienten von $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die BR2.1 mRNPs führen, da diese etwa den gleichen Durchmesser aufweisen wie das 500 kDa Dextran. Dies war jedoch nicht der Fall: Die BR2.1

mRNPs zeigten zwar ebenfalls einen nicht-linearen MSD-Verlauf, besaßen jedoch *trotz* ähnlichem Durchmesser einen initialen Diffusionskoeffizienten von nur $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Es muss daher eine über den passiven „Hinderniseffekt“ *hinausgehende*, nur auf endogene mRNPs wirkende und damit *spezifische* Retardierung angenommen werden. Dieser sogenannte spezifische Anteil an der Retardierung konnte mit der inerten Sonde nicht nachgewiesen werden. Damit gelang es erstmals, Hinweise auf spezifische nukleoplasmatische Bindungen endogener mRNPs zu finden.

Wie in der Einleitung erläutert, konnten [Miralles et al., 2000] bereits nukleoplasmatische Strukturen - die FGCs - beschreiben, deren Existenz jedoch technisch bedingt durch Elektronentomographie nur lokal, im Bereich weniger hundert Nanometer, nachgewiesen werden konnte. Nimmt man diese FGCs als ausgedehnt an, weisen sie genau die Eigenschaften der nun gefundenen nukleoplasmatischen Strukturen auf. So konnten Miralles et al. zeigen, dass die FGCs netzartige Strukturen bilden, die überall im Nukleoplasma gefunden werden, und an welche die BR2.1 mRNPs binden. Somit lag die Spekulation nahe, dass die von Miralles et al. gefundenen FGCs den im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Strukturen entsprechen, auch wenn zu diesem Zeitpunkt noch kein experimenteller Hinweis auf einen strukturellen Zusammenhang vorlag.

Damit konnten der Ursprung der strukturellen Inhomogenität des Nukleoplasmas im Speicheldrüsenzellkern ebenso wie der nicht-lineare MSD-Verlauf der BR2.1 mRNPs erklärt werden. Fraglich war jedoch nach wie vor, wie diese ausgedehnten nukleoplasmatischen Nichtchromatinstrukturen zu den beiden Mobilitätskomponenten der BR2.1 mRNPs mit 0.73 und $0.3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ führen. Über den nicht-linearen MSD-Verlauf lagen Hinweise auf spezifische Bindungen der BR2.1 mRNPs an die nukleoplasmatischen Strukturen vor, jedoch zeigten die mit 100 Hz aufgenommenen Trajektorien keine direkten Hinweise auf längere nukleoplasmatische Immobilisierungen. Da gezeigt werden konnte, dass beide Mobilitätskomponenten schnell wechselnd in einzelnen Trajektorien vorkamen (s. Kap. 3.4.3) und Hinweise auf Bindungen vorlagen, die jedoch bei 100 Hz nicht visualisiert werden konnten, bestand die Möglichkeit, dass diese Bindungen *unterhalb* der Zeitauflösung stattfanden. Die Zeitauflösung konnte jedoch nicht ohne deutliche Einbußen in der Signalqualität über 100 Hz erhöht werden, so dass weder ein schneller Wechsel der Diffusionskoeffizienten noch mögliche kurzzeitige Immobilisierungen durch eine Steigerung der Aufnahmerate abgebildet werden konnten.

Um zu testen, ob z.B. sehr kurzzeitige Bindungen zu der beobachteten Dynamik führen können, wurde untersucht, wie sich ein frequenter Wechsel zwischen Binden und Lösen deutlich unterhalb der Zeitauflösung von 100 Hz auf das Erscheinungsbild von mit 100 Hz abgebildeten Trajektorien auswirkt. Dies war ein Szenario, das zumindest den nicht linearen MSD-Verlauf hätte erklären können. Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, konnte dieses Ziel am einfachsten *in silico* realisiert werden. Es wurde eine Simulation entworfen, in welche alle bisher bekannten Ergebnisse zur BR2.1 mRNP-Diffusion in ein einfaches Modell einfließen. Es wurde angenommen, dass die 50 nm großen BR2.1 mRNPs im Nukleoplasma, zumindest für sehr kurze Strecken, prinzipiell frei diffundieren können, wobei der dafür angenommene Diffusionskoeffizient von $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ sich aus der Partikelgröße und der mit inertem Dextran ermittelten lokalen (passiven) Viskosität des Nukleoplasmas von 3 cP ergibt. Sobald die mRNPs spezifisch an die als ubiquitär angenommenen nukleären Strukturen binden, werden sie, so die Modellvorstellung, immobilisiert. Um diese Bindung zu

beschrieben wurde eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Die Geschwindigkeitskonstanten für Hinreaktion $k(on)$ und Rückreaktion $k(off)$ konnten frei gewählt werden (s. Kap. 2.2.9.3). Um der in einer dynamischen Umgebung wie dem Zellkern niemals absoluten Immobilisierung gerecht zu werden, wurde der Diffusionskoeffizient für die gebundenen mRNPs auf $0.001 \mu m^2/s$ festgesetzt, was jedoch bei kurzen Bindungszeiten im Millisekundenbereich einer Immobilisierung gleichkommt. Die entscheidende Annahme in der Simulation bestand jedoch darin, dass die simulierte Bindungskinetik auf einer Zeitskala von $100 \mu s$, also um den Faktor 100 unterhalb der Messzeitauflösung von 100 Hz ablief. Wie in den Kapiteln 2.2.9.3 und 3.5.2 beschrieben, wurden so Trajektorien simuliert, die hochfrequente Bindungs- und Freisetzungseignisse auf einer Zeitskala von $100 \mu s$ zeigten. Dazu wurden jeweils 100 Trajektorienschritte auf der Zeitskala von $100 \mu s$ zusammengefasst, um Trajektorien mit einer Zeitauflösung von 100 Hz zu generieren. $k(on)$ und $k(off)$ wurden so groß gewählt, dass es zu keinem bei 100 Hz *sichtbaren* Wechsel zwischen den beiden Mobilitätskomponenten kam (siehe Kapitel 2.2.9.5).

Erste Testsimulationen mit Werten in der Größenordnung von $1000 s^{-1}$ für $k(on)$ und $k(off)$ zeigten, dass dieses einfache Modell einer Bindungskinetik erster Ordnung unterhalb der Zeitauflösung bereits in der Lage war, sämtliche experimentellen Befunde *in silico* zu reproduzieren: So führte die in diesem einfachen Modell angenommene hochfrequente Bindung *unterhalb* der Zeitauflösung bei 100 Hz tatsächlich sowohl zu scheinbar zwei *mobilen* Diffusionskoeffizienten als auch zu einem nicht-linearen MSD-Verlauf (siehe Kapitel 3.5.2). Damit deutete sich an, dass die beiden mRNP-Mobilitätskomponenten die Manifestation einer anomalen Diffusion im Sprungweitenhistogramm darstellen.

Wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben, konnten Wertepaare für $k(on)$ und $k(off)$ gefunden werden, für die simuliertes und experimentelles Sprungweitenhistogramm nahezu identisch waren und auch die MSD-Analysen zu vergleichbaren Ergebnissen kamen ($k(on) = 4100 s^{-1}$ und $k(off) = 950 s^{-1}$).

Nun konnte zum ersten Mal ein umfangreiches, alle experimentellen Befunde vereinendes Modell der BR2.1 mRNP-Mobilität im chromatinfreien Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne aufgestellt werden:

- BR2.1 mRNPs diffundieren *lokal* - im Bereich weniger Nanometer - frei, mit einem Diffusionskoeffizient, der nach Gleichung 2.9 ihrer Größe entspricht und der sich aus einer Grundviskosität des Nukleoplasmas von ca. 3 cP ergibt.
 - In diesem chromatinfreien Nukleoplasma existieren ubiquitäre Nichtchromatinstrukturen, die vermutlich den von Miralles et al. gefundenen FGCs entsprechen und die auf inerte Makromoleküle als passiv retardierende Hindernisse wirken. Für endogene mRNPs jedoch stellen sie *zusätzlich* spezifische Bindungsstellen dar.
 - Die BR2.1 mRNPs zeigen häufige und spezifische Bindungen an diese Strukturen, die über eine rein passive Retardierung hinausgehen und eine Bindungsfrequenz von $\gg 100$ Hz aufweisen.
 - Diese Bindungen führen auf einer Zeitskala von 100 Hz zu zwei mobilen Diffusionskompo-
-

nenten in der Sprungweitenanalyse (0.73 und $0.3 \mu\text{m}^2/s$), sowie zu einem initialen Diffusionskoeffizient von $0.7 \mu\text{m}^2/s$ in der MSD-Analyse.

- Der (über Gleichung 2.9) abgeschätzte Diffusionskoeffizient der freien BR2.1 mRNPs kann bei einer Aufnahme rate von 100 Hz bereits nicht mehr abgebildet werden, was andeutet, dass die BR2.1 mRNPs früher und stärker retardiert werden als vergleichbar großes inertes Dextran. Dies ist vermutlich deshalb der Fall, weil für BR2.1 mRNPs spezifische Bindungsstellen eine höhere Dichte aufweisen als „unspezifische Hindernisse“.
- Auf längeren Zeit- und Raumskalen tritt der retardierende Effekt der spezifischen und unspezifischen Bindungen immer stärker in Erscheinung und führt so zu einem nicht-linearen MSD-Verlauf.

Der MSD-Verlauf für die BR2.1 mRNPs hätte ohne vorherige Charakterisierung der passiven Nukleoplasmaeigenschaften mit Hilfe von Dextran kaum verstanden werden können und zeigt, dass die Kombination von *in vivo*-Experimenten und *in silico*-Simulationen das Verständnis komplexer Mobilitätsfragen ermöglicht.

Einen wichtigen Hinweis für die Plausibilität des oben skizzierten Modells lieferte eine Studie, in welcher untersucht wurde, wie sich eine freie, von Bindungen unterbrochene Diffusion im FCS darstellt [Michelman-Ribeiro et al., 2009]. Die Autoren konnten zeigen, dass sich „freie Diffusion + Bindung“ auch mit FCS (abhängig von der Größenordnung von $k(\text{on})$ und $k(\text{off})$) als eine Zweikomponentendiffusion darstellen kann. Dr. Davide Mazza, einer der Autoren der Studie, bestätigte nach freundlicher Überprüfung meiner Daten, dass sich die FCS-Kurven der BR2.1 mRNP-Diffusion in der Tat auch mit ihrem Modell als von hochfrequenten Bindungen unterbrochene freie Diffusion beschreiben lassen. Damit fügen sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten FCS-Daten zur BR2.1 mRNP-Diffusion ebenfalls sehr gut in das oben beschriebene Modell ein. Dies zeigt, dass Einzelpartikeltracking und FCS prinzipiell zu vergleichbaren Ergebnissen kommen und sich hervorragend ergänzen.

Diese Ergebnisse werteten die Sprungweitenanalyse zusätzlich zu der qualitativen Interpretation auf, da sich die beiden Mobilitätskomponenten nun auch in Form von *quantitativen* Aussagen zu der der BR2.1 mRNP-Mobilität zugrundeliegenden Bindungskinetik interpretieren ließen. Wie in Kapitel 2.2.9.5 beschrieben, wurden Sprungweitenhistogramme für verschiedenste Wertepaare von $k(\text{on})$ und $k(\text{off})$ simuliert und mit dem experimentellen JD1-Sprungweitenhistogramm verglichen. Der die Abweichungen zwischen simuliertem und experimentellen Histogrammen beschreibende Abweichungskoeffizient δ wurde allerdings nur für Quotienten aus $k(\text{on})$ und $k(\text{off})$ minimal. Dies reichte aber aus, um Informationen zu der der BR2.1 mRNP-Mobilität zugrundeliegenden Bindungskinetik zu gewinnen, da das konstante Verhältnis von $k(\text{on})$ und $k(\text{off})$ der Gleichgewichtskonstante K der angenommenen Bindungsreaktion erster Ordnung entspricht. Für die oben beschriebene BR2.1 mRNP-Diffusion in in PBS inkubierten Speicheldrüsenzellen wurde ein mittleres K von 5 ermittelt. Dieses impliziert einen hohen Anteil an gebundenen BR2.1 mRNPs pro Zeiteinheit, bestätigt also die qualitative Interpretation des MSD-Verlaufs.

4.4 Die Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität

Durch die Untersuchung putativer Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität sollten Hinweise auf die *molekulare Natur* der ausgedehnten nukleoplasmatischen Nichtchromatinstrukturen gefunden werden, um das oben skizzierte Mobilitätsmodell zu vervollständigen. Bislang konnte nur spekuliert werden, dass die ausgedehnten nukleoplasmatischen Nichtchromatinstrukturen den von Miralles et al. gefundenen FGCs entsprechen. Ein experimenteller Hinweis darauf fehlte allerdings.

Während die Speicheldrüsen nach der Präparation und bei der Messung bis dato immer in PBS inkubiert worden waren, gelang es nun, durch weitere methodische Verbesserungen, die Drüsen auch unter dem Mikroskop in Hämolymphe zu inkubieren (siehe Kapitel 3.6.1). Unter Hämolympheinkubation wurden sowohl in der Sprungweitenanalyse weiterhin 2 Mobilitätskomponenten als auch in der MSD-Analyse nach wie vor ein nicht linearer Verlauf gefunden. Quantitativ änderten sich die ermittelten Diffusionskoeffizienten der beiden Hauptmobilitätskomponenten jedoch deutlich, zu 1.4 und $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (siehe Tabelle 3.6 auf Seite 94). Wie die oben bereits beschriebene Bindungsanalyse des Sprungweitenhistogramms zeigen konnte, korrespondierten diese höheren Diffusionskoeffizienten hier mit einem K der angenommenen, mobilitätsbestimmenden Bindungsreaktion von 1.7 , was einen deutlich geringeren Anteil gebundener BR2.1 mRNPs pro Zeiteinheit als bei PBS-Inkubation implizierte. Hier zeigte sich erstmals der interpretative Wert des neuen Modells, konnten die beiden neuen Diffusionskoeffizienten doch nun sofort als Folge einer veränderten Bindungskinetik verstanden werden. Hämolymphe enthält eine Vielzahl unbekannter Regulationsfaktoren, Zucker und Proteine, die PBS nicht aufweist. So zeigte sich, dass die Mobilität der BR2.1 mRNPs deutlich von externen, nicht im Drüsengewebe vorhandenen Faktoren beeinflusst werden kann; es muss also Reaktionskaskaden geben, die von der Drüsenoberfläche bis in den Zellkern wirken. Dies war ein weiterer Hinweis auf spezifische - weil regulierbare - und damit aktive nukleoplasmatische Bindungen der BR2.1 mRNPs.

Diese Ergebnisse legten nahe alle weiteren Untersuchungen ebenfalls unter Hämolympheinkubation vorzunehmen, da es nun quantitative Hinweise dafür gab, dass unter PBS-Inkubation keine optimalen Inkubationsbedingungen herrschten.

Wie Abbildung 3.19 und Tabelle 3.6 auf Seite 94 zeigen, änderte sich die Mobilität unter dem Einfluss der Transkriptioninhibition durch Actinomycin D im Rahmen der Fehlergenauigkeit nicht. Überhaupt konnte die Hämolympheinkubation als einziger Effektor auf das Sprungweitenhistogramm identifiziert werden. Somit konnte die in Kapitel 1.2 geäußerte Vermutung, dass die Bindungen eine Retardierung der nukleären mRNPs insbesondere aufgrund von Transkriptioninhibition darstellen, *nicht* bestätigt werden.

Interessanter war jedoch die Frage, wie sich die Domänen des hrp65-1-Proteins, über welches in [Miralles et al., 2000] *in vitro* eine direkte Verbindung der BR mRNP-Mobilität zu den FGCs hergestellt werden konnte, *in vivo* auf die BR2.1 mRNP-Mobilität auswirken. Die CTS-Domäne des hrp65-1-Proteins, durch welche sich hrp65-1 von seinen Isoformen unterscheidet, zeigte, wie Actinomycin D, ebenfalls keinen Effekt auf die BR2.1 mRNP-Mobilität. Wie in der Einleitung beschrieben, wurde explizit nur hrp65-1 in den CFs gefunden, welche die BR mRNPs mit den

FGCs verbinden (siehe Abbildung 1.4 auf Seite 21). Dies muss als unmittelbarer Effekt der CTS-Domäne angesehen werden, da sie, wie beschrieben, der einzige Unterschied zwischen hrp65-1 und hrp65-2 bzw. -3 ist, die beide von Miralles et al. nie mit FGCs oder CFs in Verbindung gebracht werden konnten. Damit zeigte die Koinjektion ausgerechnet der Domäne, welche die exklusive Lokalisation von hrp65-1 an den FGCs bewirkt, keinen Effekt auf die BR2.1 mRNP-Mobilität, womit eine Effektorrolle der CTS-Domäne allein ausgeschlossen werden konnte. Da aber nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die CTS-Domäne allein, d.h. ohne den Rest des hrp65-Proteins, nicht in der Lage ist eine Wirkung zu entfalten, wurde zusätzlich der Einfluss der (in allen Isoformen gleichen) hrp65-PBD-Domäne auf die BR2.1 mRNP-Mobilität untersucht, welche für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist und damit möglicherweise die Struktur der fadenartigen CFs bestimmt. Tatsächlich konnte unter Einfluss von hrp65-PBD eine Änderung der BR2.1 mRNP-Mobilität festgestellt werden. Obwohl das Sprungweitenhistogramm praktisch unverändert blieb, war der MSD-Verlauf zu allen untersuchten Zeitpunkten *linear*, ein Ergebnis das zuvor noch unter keinen Bedingungen gefunden worden war. Da der nicht-lineare MSD-Verlauf als direkte Folge der spezifischen und unspezifischen Bindungen der BR2.1 mRNPs an die nukleären Nichtchromatinstrukturen verstanden wurde und hrp65-PBD eine unmittelbare Wirkung auf den Verlauf des MSDs zeigte, konnte auf einen Zusammenhang der hrp65-PBD-Domäne mit den nukleären Nichtchromatinstrukturen geschlossen werden. Da, wie oben bereits erwähnt, zumindest nukleäres hrp65-1 in Verbindung mit den von Miralles et al. gefundenen FGCs vorkommt und hrp65-1 (ebenso wie alle Isoformen) die PBD-Domäne enthält, lag damit erstmals ein klarer Zusammenhang des hrp65-1-CF-FGC-Komplexes mit den ausgedehnten Nichtchromatinstrukturen vor. Damit wären die FGCs in der Tat deutlich ausgedehnter, als Miralles et al. es durch Elektronentomographie nachweisen konnten.

Dass hrp65-PBD keinen Einfluss auf das Sprungweitenhistogramm hatte, legt einen komplexen, indirekten Einfluss auf die Mobilität nahe, der im angenommenen einfachen Bindungsmodell nicht beschrieben werden kann. Insbesondere scheint hrp65-1 jedoch kein einfacher Bindungsmediator zu sein, mit dem sich die Bindung der BR2.1 mRNPs an die FGCs im Sinne einer simplen Bindungsreaktion an- oder abschalten lässt. Die genaue Wirkung von hrp65-1 auf die nukleoplasmatischen Bindungen muss in zukünftigen Studien untersucht werden.

4.5 Ein zusammenfassendes Mobilitätsmodell

Da nun experimentelle Hinweise auf die strukturelle Organisation der FGCs vorlagen, konnte der Ursprung aller in [Veith, 2007] bzw. [Siebrasse et al., 2008] gefundenen BR2.1 mRNP-Mobilitätskomponenten entweder aufgeklärt oder im Rahmen eines plausiblen Modells erklärt werden. Damit konnte schließlich ein umfassendes Modell zur nukleoplasmatischen Mobilität von Makromolekülen wie Dextran und mRNPs sowohl in den Speicheldrüsenzellkernen von *C. tentans* als auch in Säugerzellkernen entwickelt werden (siehe Abbildung 4.1): Wie in Abbildungen 4.1 A und E schematisch dargestellt, diffundiert 500 kDa Dextran in Lösung frei und zeigt einen linearen MSD-Verlauf mit einem (nicht retardierten) Diffusionskoeffizient, der zu allen Zeitpunkten proportional zur Größe des untersuchten Partikels ist (für das Dextran $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$). In Säugerzellkernen hingegen

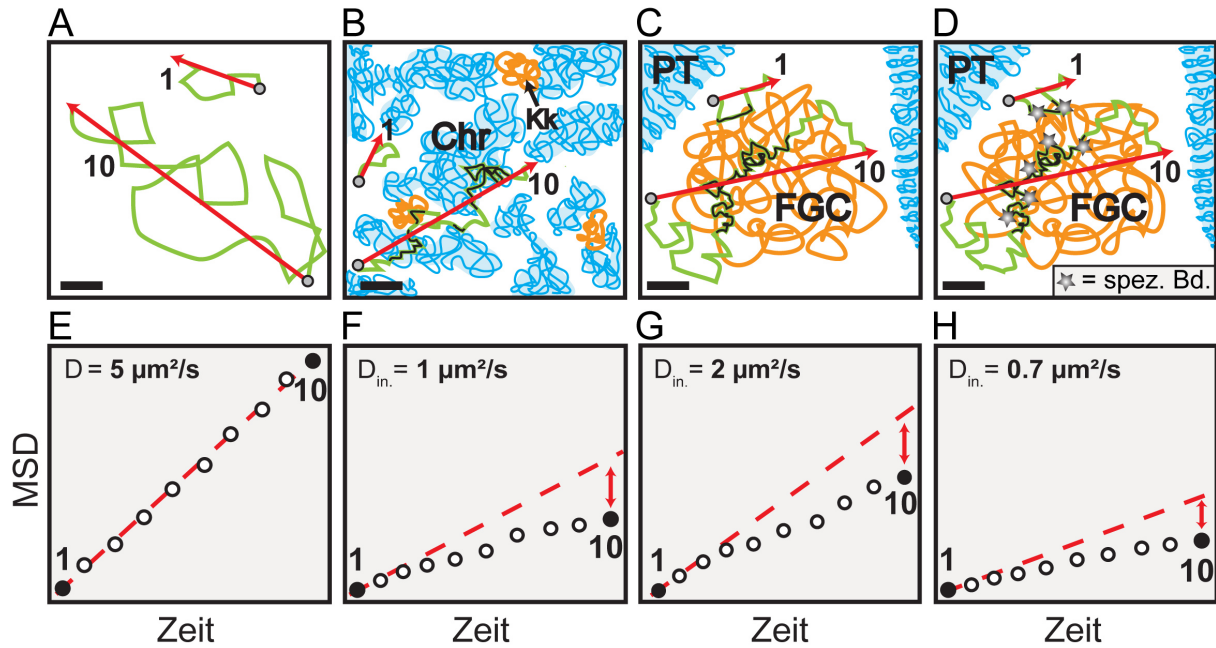


Abbildung 4.1: Modell der nukleoplasmatischen Mobilität endogener und inerer Makromoleküle. **A,E** Inertes Dextran diffundiert frei in Pufferlösung und zeigt zu allen Zeitpunkten einen linearen MSD-Verlauf mit einem Diffusionskoeffizient, der nach Gl. 2.9 seiner Größe entspricht. **B,F** In Säugerzellkernen wirkt das entfaltete Chromatin passiv retardierend auf inertes Dextran. Der initiale Diffusionskoeffizient des nicht linearen MSD-Verlaufs bildet bei ausreichend hoher Aufnahme rate die lokale Viskosität im Interchromatinkanal ab („1“), während der Diffusionskoeffizient bei größeren Zeitskalen mehr und mehr vom entfalten Chromatin beeinflusst wird („10“). **C,G** Das chromatinfreie Nucleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne von *C. tentans* enthält ausgedehnte Nichtchromatinstrukturen (FGCs). Diese wirken passiv retardierend auf inertes Dextran. Auch hier ist der initiale Diffusionskoeffizient des nicht-linearen MSD-Verlaufs ein Maß für die lokale Viskosität („1“). **D,H** Die FGCs wirken auf endogene Makromoleküle wie die BR2.1 mRNPs durch spezifische Bindungen zusätzlich, über das passive Maß hinausgehend, retardierend und stellen ein dichtes Netzwerk von spezifischen Bindungsstellen dar. Daher ist die BR2.1 mRNP-Mobilität im MSD-Verlauf zu allen Zeitpunkten deutlich reduziert. Im Sprungweitenhistogramm äußert sich dieser Wechsel zwischen freier Diffusion und Bindung in Form von 2 Mobilitätskomponenten, welche ein Maß für die Gleichgewichtskonstante der zugrundeliegenden Bindungsreaktion sind. Chr, entfaltetes Chromatin. Kk, Kernkörper. PT, Polytäanchromosom. FGC, Fibro Granular Cluster. *in.*, initial. Der graue Stern kennzeichnet spezifische Bindungen. Die Maßstabsbalken ermöglichen einen relativen Größenvergleich. Eine detailliertere Beschreibung findet sich im Text. Abbildung verändert nach [Veith et al., 2010].

bestimmt das entfaltete Chromatin die Kernstruktur und beeinflusst die Mobilität endogener wie auch exogener, inerer Makromoleküle (Abbildung 4.1 B und F). Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in Säugerzellkernen der passive, unspezifische Einfluss des entfalten Chromatins das inerte Dextran retardiert. Während bei ausreichend hohen Aufnahme rates im MSD ein initialer Diffusionskoeffizient ermittelt werden kann, welcher der Grundviskosität des proteinreichen Nucleoplasmas im Bereich der Interchromatinkanäle entspricht (hier $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für das Dextran, siehe Kennzeichnung „1“), wirkt sich der passiv retardierende Einfluss des Chromatins auf größeren Entfernungen mehr und mehr aus und verursacht so einen nicht-linearen

MSD-Verlauf („10“). Somit bestimmt das verzweigte Netz an Interchromatinkanälen den globalen Diffusionskoeffizient (siehe Kapitel 1.1 und [Saxton, 2007]). Es ist zu erwarten, dass auch im Säugerzellkern spezifische Bindungen zusätzliche Retardierungen für einen endogenen Partikel bewirken können, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht explizit gezeigt wurde.

Es ist zu erwarten, dass mit FCS, wie bereits in der Einleitung angedeutet, hauptsächlich die Mobilität im Bereich der Interchromatinkanäle abgebildet wird, der hier ermittelte Diffusionskoeffizient also hauptsächlich ein Maß für die lokale Grundviskosität ist.

Im chromatinfreien Nukleoplasma des Speicheldrüsenzellkerns von *C. tentans* hingegen ist der initiale MSD für inertes Dextran weniger stark reduziert als im Säugerzellkern, da zwar dem entfalten Chromatin der Säugerzellen vergleichbare ausgedehnte nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen vorliegen, diese jedoch anscheinend ein weniger dichtes Netzwerk bilden (Abbildung 4.1 C und G). Diese Strukturen entsprechen wahrscheinlich den von Miralles et al. gefundenen FGCs. Sie bewirken zwar als passives Hindernis ebenfalls einen nicht-linearen MSD-Verlauf des inerten Dextrans, allerdings mit einem im Vergleich zum Säugerzellkern höheren initialen Diffusionskoeffizienten von $2 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Auf endogene Makromoleküle, wie BR2.1 mRNPs, wirken die FGCs jedoch nicht nur als ein passives Hindernis, sondern stellen zusätzlich ein dichtes Netzwerk an Bindungsstellen dar, an welches die BR2.1 mRNPs spezifisch und mit hoher Frequenz binden können. Diese zusätzlichen, spezifischen Bindungen bewirken eine über die mit Dextran detektierten passiven Eigenschaften der FGCs hinausgehende Retardierung der BR2.1 mRNPs auf allen im MSD untersuchten Zeitskalen. Das äußert sich in einem bereits reduzierten initialen Diffusionskoeffizient von $0.7 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und dies sogar obwohl die BR2.1 mRNPs einen kleineren Durchmesser als das 500 kDa Dextran aufweisen. Dieser reduzierte Diffusionskoeffizient ist vermutlich die unmittelbare Folge einer hohen Dichte an spezifischen Bindungsstellen.

Damit konnte ein alle experimentellen Befunde einschließendes Modell zur BR2.1 mRNP-Mobilität im Speicheldrüsenzellkern aufgestellt werden, welches zusätzlich Einblicke in die Situation im Säugerzellkern gibt. Die biologische Bedeutung der spezifischen, häufigen und kurzzeitigen Bindungen der BR2.1 mRNPs an die FGCs konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

4.6 Das Mobilitätsmodell im Kontext aktueller Publikationen

Wie in Kapitel 1.1 dargelegt, besteht bis heute Uneinigkeit darüber, ob sich mRNPs im Zellkern mit Diffusionskoeffizienten bewegen, die ihrem Durchmesser entsprechen, oder ob sie deutlich retardiert sind. Während praktisch alle bisher vorgestellten Untersuchungen zur Diffusion *endogener* mRNPs einen hohen, zumindest in der Größenordnung dem Durchmesser des mRNPs entsprechenden Diffusionskoeffizienten ausweisen (siehe blaue Einfärbungen in der Tabelle 1.1 auf Seite 8), widersprechen die Studien von Shav-Tal. et al. und Vargas et al. dem deutlich. Vergleicht man die mit endogenen und artifiziellen mRNPs ermittelten Werte, so fällt auf, dass die Unterschiede scheinbar charakteristisch für den untersuchten mRNP-Typ sind. Dies deutet ein grundlegendes Problem der artifiziellen Konstrukte an, was interessanterweise in der Literatur kaum auf diese Weise interpretiert wurde. Die beeindruckende molekularbiologische Kontrolle des artifiziellen MS2-Systems, in welchem alle Prozessierstationen sichtbar gemacht werden konnten (siehe

insbesondere [Shav-Tal et al., 2004]), sowie die erstmalige Visualisierung einzelner mRNPs, bewirkten eine bis heute anhaltende Tendenz in der Fachliteratur, den Ergebnissen von Shav-Tal et al. und Vargas et al. ein größeres Gewicht beizumessen als den Studien zur Mobilität endogener mRNPs. Daran änderte sich auch durch die Veröffentlichung von [Siebrasse et al., 2008] bislang nur wenig, obwohl dort die bis dato umfassendste Analyse von Einzelpartikeltrajektorien endogener mRNPs vorlegt wurde, die erneut klar darlegte, dass sich endogene mRNPs mit Diffusionskoeffizienten bewegen können, die deutlich größer sind.

Aufgrund des geringen Diffusionskoeffizienten, den Shav-Tal et al. für eine freie mRNP-Diffusion ermittelten, war anzunehmen, dass das verwendete künstliche und voll mit MS2-Proteinen beladene Konstrukt eine Größe aufwies, die nicht mehr mit der von endogenen mRNPs einer Säugerzelle zu vergleichen war. Über Gleichung 2.9 lässt sich abschätzen, dass ein Diffusionskoeffizient von $0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ im wässrigen Milieu eines Interchromatinkanals einem mRNP-Radius von mehreren Mikrometern entspricht. Dies würde jedoch so großen Partikelsignalen entsprechen, dass sie mit den damals genutzten lichtmikroskopischen Methoden klar hätten aufgelöst werden müssen. Signale dieser Größe wurden aber nicht gefunden. Vielmehr wiesen die von Shav-Tal et al. aufgenommenen Signale Durchmesser von ca. 300 nm, im Bereich der Auflösungsgrenze, auf (abgeschätzt aus Abbildung 1 E in [Shav-Tal et al., 2004]). Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass die künstlichen mRNPs, deren Diffusion Shav-Tal et al. abbildeten, deutlich kleiner waren, als der geringe Diffusionskoeffizient dies nahe legt. Der geringe Diffusionskoeffizient lässt sich also scheinbar nur durch eine Retardierung der artifiziellen mRNPs erklären - zumindest bis man die von [Shav-Tal et al., 2004] verwendete Analysemethode berücksichtigt. Denn auffällig ist, dass Shav-Tal et al. trotz Einzelpartikeltracking keinerlei Hinweise auf eine schnellere Diffusionskomponente finden konnten, die - wenn schon nicht durch eine schnelle mRNP-Diffusion - zumindest aufgrund der freien, ungebundenen MS2-Proteine hätte detektiert werden müssen. Dies kann als unmittelbare Folge der genutzten Analysemethode interpretiert werden, welche die Detektion einer schnellen Diffusionskomponente deutlich *erschwerte*. So griffen die Autoren zum einen bei der Trajektorienanalyse nur auf eine mittelnde MSD-Analyse zurück, die generell nicht zwischen verschiedenen Diffusionskomponenten unterscheiden kann (s. Kap. 2.2.9.2). Als ungleich problematischer dürfte sich zum anderen jedoch ausgewirkt haben, dass die Partikeltrajektorien mit einer sehr langen Aufnahmezeit von 300 ms pro Bild abgebildet wurden. Dies liegt bereits auf der Zeitskala von FRAP-Messungen und bildet damit maßgeblich die Diffusion auf größeren, im Säugerzellkern deutlich vom Chromatin beeinflussten räumlichen Skalen ab - eine unnötige Beschränkung der Möglichkeiten des Einzelpartikeltrackings. Als größter Einfluss auf die von Shav-Tal et al. angewandte Analysemethode muss schließlich jedoch angenommen werden, dass nur Trajektorien in die Analyse einbezogen wurden, die eine Mindestlänge von 7 Punkten aufwiesen, wodurch lediglich Partikel in den Analyseprozess gelangten, die sich mindestens 2.1 s im Fokusbereich befanden. Dies dürfte in Kombination mit der ausschließlichen Fokussierung auf die MSD-Analyse zu einer deutlichen Übergewichtung der langen Trajektorien von sehr langsamen, retardierten mRNP-Partikeln geführt haben, da schnelle Partikel mit einem hohen Diffusionskoeffizienten die Fokusebene bereits nach kurzer Zeit wieder verlassen [Siebrasse et al., 2008]. Da Vargas et al. sich in ihrer Aufnahme- und Analysemethodik deutlich an Shav-Tal et al. anlehnten,

gelten diese Anmerkungen ebenso für [Vargas et al., 2005].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass auch in [Poltz et al., 1998] bereits deutlich retardierte mRNA-Diffusionskoeffizienten für *endogene* Säugerzell-mRNPs ermittelt wurden. Die umfangreichen Retardierungen der künstlichen mRNPs müssen also nicht notwendigerweise artifiziell sein, sondern können eine Folge des dichten Chromatinnetzwerks der Säugerzellen sein, in welchem sich endogene wie künstliche mRNPs verfangen (siehe Mobilitätsmodell oben). Als artifiziell hingegen kann die analysebedingte Übergewichtung langsamer Trajektorien angenommen werden, durch welche bei [Shav-Tal et al., 2004] und [Vargas et al., 2005] ein verzerrtes Gesamtbild einer *permanent* retardierten Diffusion künstlicher mRNPs entsteht.

Wie Tabelle 4.1 zeigt, erschien mit [Mor et al., 2010] erst vor kurzem eine weitere Publikation aus der Arbeitsgruppe von Y. Shav-Tal, die sich primär auf den Export von artifiziellen mRNPs fokussierte. Trotzdem nutzten die Autoren die Gelegenheit, noch einmal die Richtigkeit der in [Shav-Tal et al., 2004] ermittelten Daten zu bestätigen und betonten, dass keine schnellere Diffusion der artifiziellen mRNPs nachgewiesen werden konnte. Mor et al. nutzten neue mRNA-Konstrukte verschiedener Größe, die ebenfalls über MS2-Proteine markiert wurden, und daher vergleichbar mit den schon in [Shav-Tal et al., 2004] verwendeten Konstrukten waren. Für das größte Konstrukt fanden sie einen mittleren Diffusionskoeffizienten von nur $0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$, nie aber Werte über $0.012 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Unglücklicherweise *verlängerten* die Autoren ihre Aufnahmezeit im Vergleich zu [Shav-Tal et al., 2004] auf jetzt 1 s pro Bild und stützten sich bei der Trajektorienanalyse nach wie vor ausschließlich auf die MSD-Analyse von Trajektorien, die mehr als 6 Punkte aufwiesen (womit sich die analysierten mRNPs jetzt mindestens 6 s im Fokus befanden). Aufgrund der oben erläuterten Zusammenhänge ist davon auszugehen, dass diese Analysestrategie zu einer noch stärkeren Gewichtung der retardierten Partikelpopulationen geführt hat. Daher verwundert es kaum, dass die Autoren nun im Vergleich zu [Shav-Tal et al., 2004] noch kleinere Diffusionskoeffizienten für ähnlich große artifizielle mRNPs ermittelten. [Mor et al., 2010] konnten trotzdem

Publikation	Technik	mRNP-Typen	D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
[Siebrasse et al., 2008]	SPT DNA-Oligon.	endogener mRNP (BR2.1 mRNP)	(3.7), 0.6, 0.2, (0.015)
Dissertation bzw. [Veith et al., 2010]	SPT, FCS RNA-Oligon.	endogener mRNP (BR2.1 mRNP)	0.73, 0.3, (0.001)
[Mor et al., 2010]	SPT MS2-System	artifizieller mRNP	0.005
[Grünwald and Singer, 2010]	SPT MS2-System	artifizieller mRNP	≤ 3.5

Tabelle 4.1: Aktuelle Publikationen zur nukleären mRNA-Diffusion (ab 2008) im Überblick. Blau, Studien zur Diffusion endogener mRNPs. Unter Technik sind die Mikroskopiemethode sowie die Methode zur Markierung der mRNPs aufgeführt. Ergebnisse z.T. gerundet. Vernachlässigbare Mobilitätskomponenten sind eingeklammert Details im Text.

zeigen, dass sich die untersuchten artifiziellen mRNPs primär durch die Interchromatinkanäle bewegen, was zumindest die in der Einleitung vorgestellte gängige Ansicht zum mRNP-Transport *qualitativ* bestätigt. Sowohl vorhergehende Studien, wie auch die im Rahmen dieser Dissertation mit Dextran in Säugerzellen ermittelten Daten deuten eine Viskosität der Interchromatinkanäle von etwa 3 cP an. Ein maximaler initialer Diffusionskoeffizient von $0.012 \mu\text{m}^2/\text{s}$ würde bei freier Diffusion in einem Medium mit einer Viskosität von 3 cP einem mRNP-Durchmesser von $30 \mu\text{m}$ entsprechen. Über den MSD lässt sich außerdem abschätzen, dass bei einem mittleren Diffusionskoeffizienten von $0.005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ eine Transportdauer des mRNPs von der Transkriptionsstelle bis zur Kernpore von ca. 30 Minuten resultieren würde, wobei die Dauer der Transkription und der Einfluss von zusätzlichen Retardierungen durch Prozessierungsschritte nicht eingerechnet sind. Diese Zeit erscheint deutlich zu lang verglichen mit den bekannten schnellen Reaktionen von Zellen auf äußere Stimuli binnen weniger Minuten. Diese Fragestellungen bleiben jedoch in der Studie unkommentiert. So wird deutlich, dass eine durch die Analyse bedingte Verzerrung der Ergebnisse von Mor et al. hin zu einer deutlichen Übergewichtung stark retardierter mRNPs nicht ausgeschlossen werden kann, die mRNP-Mobilitätssituation im Säugerzellkern durch die Daten also möglicherweise nicht vollständig wiedergegeben wird.

Aus dem in Abbildung 4.1 vorgestellten Modell kann geschlossen werden, dass sowohl Shav-Tal et al. und Vargas et al., insbesondere aber Mor et al., alleine durch ihre langen Aufnahmezeit maßgeblich die durch das entfaltete Chromatin bedingten Retardierungen analysierten und somit nur die langsamsten Anteile der globalen mRNP-Diffusion abbilden konnten. Dass die durch die Analyse- und Messmethode eingeführten Einschränkungen die Detektion einer schnellen Diffusionskomponente gar nicht erst ermöglichten blieb in der Literatur bislang praktisch unbeachtet [Noble and Wentz, 2010].

Die intensive Auseinandersetzung mit den in den verschiedenen Studien genutzten Analysemethoden legt also nahe, dass die Differenzen zwischen den Ergebnissen für artifizielle und denen für endogene mRNPs bisher zum Großteil *methodisch* bedingt waren und nicht zwangsläufig auf eine prinzipielle Unvergleichbarkeit endogener und artifizieller mRNPs hindeuten. Damit blieb die eigentlich interessante Frage der Vergleichbarkeit der Ergebnisse unter auch methodisch gleichartigen Bedingungen bisher unbeantwortet.

Mit [Grünwald and Singer, 2010] erschien Ende 2010 eine Studie, die erneut den Transport eines artifiziellen mRNPs untersuchte, welcher dem in [Shav-Tal et al., 2004] verwendeten Konstrukt sehr ähnlich ist. Wie Mor et al. fokussierten sich auch Grünwald & Singer maßgeblich auf den Export der künstlichen mRNA-Konstrukte, untersuchten aber auch ihre Diffusion im Zellkern. Hierbei *reduzierten* sie die Aufnahmezeit im Vergleich zu Shav-Tal et al./Vargas et al./Mor et al. jedoch *deutlich* auf nur noch 10 ms je Bild. Damit bildeten sie die Trajektorien der artifiziellen mRNPs mit einer ebenso hohen Aufnahmezeit ab, wie die BR2.1 mRNPs im Rahmen dieser Dissertation verfolgt wurden (100 Hz). Trotz ihrer Fokussierung auf ausschließlich die MSD-Analyse konnten sie Diffusionskoeffizienten von bis zu $3.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die artifiziellen mRNPs nachweisen, und das für eine Sonde, die mit der von [Shav-Tal et al., 2004] vergleichbar ist. Dieser Wert liegt deutlich über den von Shav-Tal et al., Vargas et al. und Mor et al. ermittelten Werten für gleiche bzw. vergleichbare artifizielle mRNPs (siehe Tabellen 1.1 auf Seite 8 und 4.1).

Dies kann als experimentelle Bestätigung der oben geäußerten Vermutung aufgefasst werden, dass die mit endogenen und artifiziellen mRNPs ermittelten Unterschiede bezüglich der Diffusionskoeffizienten in der Tat maßgeblich methodischer Natur waren. Es zeigt sich jetzt, dass auch artifizielle mRNPs einen nukleären Diffusionskoeffizienten aufweisen, der ihrem Durchmesser entspricht, wenn keine methodischen Beschränkungen die Ergebnisse verzerren. Eine prinzipielle Widersprüchlichkeit der mit artifiziellen und endogenen mRNPs ermittelten Ergebnisse scheint also nach aktueller Datenlage nicht mehr vorzuliegen, womit eine wichtige Frage zur nukleären mRNP-Mobilität geklärt ist. Damit deutet sich auch an, dass letztlich alle - sowohl die mit endogenen als auch die mit artifiziellen mRNPs ermittelten - Daten gut in das in Abbildung 4.1 aufgestellte Modell passen, dieses also die angestrebte systemübergreifende Relevanz besitzt.

4.7 Fazit und Ausblick

Ziel der hier vorliegenden Dissertation war es ein Modell für die nukleäre Mobilität endogener mRNP-Partikel aufzustellen, um die komplexe Mobilität der BR2.1 mRNP-Partikel im chromatinfreien Nukleoplasma der Speicheldrüsenzellkerne zu erklären. Eine tiefgehende Analyse zeitlich hochaufgelöster mRNP-Trajektorien konnte die komplexe Mobilität der BR2.1 mRNPs auf hochfrequente spezifische Bindungen an ausgedehnte nukleoplasmatische Nichtchromatinstrukturen zurückführen. Durch die vergleichende Analyse inerter Makromoleküle auch in Säugerzellkernen konnte ein Modell der Mobilität endogener mRNPs aufgestellt werden, welches dazu beiträgt die stark unterschiedlichen, für endogene und artifizielle mRNPs ermittelten Diffusionskoeffizienten im Säugerzellkern zu verstehen.

Damit konnten die in Kapitel 1.3 aufgestellten Fragen prinzipiell beantwortet werden. Diese Antworten vermitteln jedoch nur einen ersten Eindruck der komplexen Vorgänge, welche die nukleoplasmatische mRNP-Mobilität beeinflussen. Viele Fragen konnten im beschränkten zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr geklärt werden: Was ist die Funktion der FGCs und welchen biologischen Nutzen haben die postulierten häufigen Bindungen der BR2.1 mRNPs? Welche strukturelle nukleoplasmatische Organisation weisen die FGCs auf? Sind es ubiquitäre, aber unzusammenhängende nukleoplasmatische „Inseln“? Oder durchziehen sie den Zellkern als ausgedehntes, aber zusammenhängendes Netzwerk? Wie ist die molekulare Zusammensetzung der FGCs und wie ist hrp65-PBD in die funktionelle Organisation eingebunden? Und schließlich: Gibt es ein strukturelles Korrelat zu den FGCs in Säugerzellen und wie kann man es nachweisen? Ein erster Schritt die strukturelle Organisation der FGCs besser zu verstehen, wäre beispielsweise die Mobilität von markiertem hrp65-1 selbst oder seiner Domänen zu untersuchen. Außerdem wäre es interessant zu überprüfen, ob hrp65-1 auch einen Effekt auf die mRNP-Mobilität in Säugerzellen hat, was erste Hinweise auf verwandte Strukturen in Säugerzellkernen liefern kann. Es wird jedoch die Aufgabe nachfolgender Arbeiten sein zu zeigen, in wie weit das hier vorgestellte mRNP-Mobilitätsmodell vor dem Hintergrund dieser Fragen in Zukunft noch erweitert werden muss. Nichtsdestotrotz haben die in den Speicheldrüsenzellkernen von *Chironomus tentans* gewonnenen Erkenntnisse einen Beitrag zum Verständnis der nukleoplasmatischen mRNP-Diffusion in allen Organismen geleistet.

Literaturverzeichnis

- [Aguilera, 2005] Aguilera, A. (2005). Cotranscriptional mRNP assembly: from the DNA to the nuclear pore. *Curr Opin Cell Biol*, 17(3):242–250.
- [Anzt, 2009] Anzt, J. (2009). Untersuchung der intranukleären Mobilität der BR-mRNP-Partikel von *Chironomus tentans*. Master’s thesis, Universität Bonn.
- [Axelrod et al., 1976] Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E., and Webb, W. W. (1976). Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J*, 16(9):1055–1069.
- [Baurén et al., 1998] Baurén, G., Belikov, S., and Wieslander, L. (1998). Transcriptional termination in the Balbiani ring 1 gene is closely coupled to 3’-end formation and excision of the 3’-terminal intron. *Genes Dev*, 12(17):2759–2769.
- [Baurén and Wieslander, 1994] Baurén, G. and Wieslander, L. (1994). Splicing of Balbiani ring 1 gene pre-mRNA occurs simultaneously with transcription. *Cell*, 76(1):183–192.
- [Berg, 1993] Berg, H. C. (1993). *Random Walks in Biology - Rev. ed.* Princeton University Press.
- [Björk and Wieslander, 2010] Björk, P. and Wieslander, L. (2010). Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma*.
- [Bonnet et al., 1999] Bonnet, G., Tyagi, S., Libchaber, A., and Kramer, F. R. (1999). Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11):6171–6176.
- [Braeckmans et al., 2003] Braeckmans, K., Peeters, L., Sanders, N. N., Smedt, S. C. D., and Demeester, J. (2003). Three-dimensional fluorescence recovery after photobleaching with the confocal scanning laser microscope. *Biophys J*, 85(4):2240–2252.
- [Braga et al., 2007] Braga, J., McNally, J. G., and Carmo-Fonseca, M. (2007). A reaction-diffusion model to study RNA motion by quantitative fluorescence recovery after photobleaching. *Biophys J*, 92(8):2694–2703.
- [Bulsecu and Wolf, 2007] Bulsecu, D. A. and Wolf, D. E. (2007). Fluorescence correlation spectroscopy: molecular complexing in solution and in living cells. *Methods Cell Biol*, 81:525–559.
-

- [Calapez et al., 2002] Calapez, A., Pereira, H. M., Calado, A., Braga, J., Rino, J., Carvalho, C., Tavanez, J. P., Wahle, E., Rosa, A. C., and Carmo-Fonseca, M. (2002). The intranuclear mobility of messenger RNA binding proteins is ATP dependent and temperature sensitive. *J Cell Biol*, 159(5):795–805.
- [Cremer and Cremer, 2010] Cremer, T. and Cremer, M. (2010). Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(3):a003889.
- [Cremer et al., 2006] Cremer, T., Cremer, M., Dietzel, S., Müller, S., Solovei, I., and Fakan, S. (2006). Chromosome territories—a functional nuclear landscape. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3):307–316.
- [Daneholt, 2001a] Daneholt, B. (2001a). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(13):7012–7017.
- [Daneholt, 2001b] Daneholt, B. (2001b). Packing and delivery of a genetic message. *Chromosoma*, 110(3):173–185.
- [Dange et al., 2011] Dange, T., Joseph, A., and Grünwald, D. (2011). A perspective of the dynamic structure of the nucleus explored at the single-molecule level. *Chromosome Res*, 19(1):117–129.
- [Dreyfuss et al., 2002] Dreyfuss, G., Kim, V. N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(3):195–205.
- [Edström et al., 1978] Edström, J. E., Ericson, E., Lindgren, S., Lönn, U., and Rydlander, L. (1978). Fate of Balbiani-ring RNA in vivo. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 42 Pt 2:877–884.
- [Gorski et al., 2006] Gorski, S. A., Dundr, M., and Misteli, T. (2006). The road much traveled: trafficking in the cell nucleus. *Curr Opin Cell Biol*, 18(3):284–290.
- [Grünwald and Singer, 2010] Grünwald, D. and Singer, R. H. (2010). In vivo imaging of labelled endogenous beta actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 467(7315):604–607.
- [Hager et al., 2009] Hager, G. L., McNally, J. G., and Misteli, T. (2009). Transcription dynamics. *Mol Cell*, 35(6):741–753.
- [Handwerger et al., 2005] Handwerger, K. E., Cordero, J. A., and Gall, J. G. (2005). Cajal bodies, nucleoli, and speckles in the *Xenopus* oocyte nucleus have a low-density, sponge-like structure. *Mol Biol Cell*, 16(1):202–211.
- [Ineichen et al., 1983] Ineichen, H., Meyer, B., and Lezzi, M. (1983). Determination of the developmental stage of living fourth instar larvae of *Chironomus tentans*. *Dev Biol*, 98(2):278–286.
- [Janicki et al., 2004] Janicki, S. M., Tsukamoto, T., Salghetti, S. E., Tansey, W. P., Sachidanandam, R., Prasanth, K. V., Ried, T., Shav-Tal, Y., Bertrand, E., Singer, R. H., and Spector, D. L. (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell*, 116(5):683–698.
-

- [Köhler and Hurt, 2007] Köhler, A. and Hurt, E. (2007). Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10):761–773.
- [Kiesler et al., 2003] Kiesler, E., Miralles, F., Farrants, A.-K. O., and Visa, N. (2003). The Hrp65 self-interaction is mediated by an evolutionarily conserved domain and is required for nuclear import of Hrp65 isoforms that lack a nuclear localization signal. *J Cell Sci*, 116(Pt 19):3949–3956.
- [Kiesler and Visa, 2004] Kiesler, E. and Visa, N. (2004). Intranuclear pre-mRNA trafficking in an insect model system. *Prog Mol Subcell Biol*, 35:99–118.
- [Kiseleva et al., 1994] Kiseleva, E., Wurtz, T., Visa, N., and Daneholt, B. (1994). Assembly and disassembly of spliceosomes along a specific pre-messenger RNP fiber. *EMBO J*, 13(24):6052–6061.
- [Kubitscheck et al., 2002] Kubitscheck, U., Kues, T., and Hoekstra, A. (2002). Visualization and tracking of single molecules within cells. *G.I.T. Imaging&Microscopy*, 4:2–4.
- [Kubitscheck et al., 2009] Kubitscheck, U., Veith, R., Ritter, J., and Siebrasse, J. (2009). *Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer: Applications in the Bio and Nano Sciences*. Wiley-VCH Weinheim.
- [Kues, 2001] Kues, T. (2001). *Visualisierung einzelner Proteinmoleküle und Analyse ihrer Trajektorien in intakten Zellkernen mittels Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie*. PhD thesis, Universität Bremen.
- [Kylberg et al., 2008] Kylberg, K., Björkroth, B., Ivarsson, B., Fomproix, N., and Daneholt, B. (2008). Close coupling between transcription and exit of mRNP from the cell nucleus. *Exp Cell Res*, 314(8):1708–1720.
- [Lamb and Daneholt, 1979] Lamb, M. M. and Daneholt, B. (1979). Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans*. *Cell*, 17(4):835–848.
- [Lanctôt et al., 2007] Lanctôt, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet*, 8(2):104–115.
- [Lang et al., 1986] Lang, I., Scholz, M., and Peters, R. (1986). Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. *J Cell Biol*, 102(4):1183–1190.
- [Lönnroth et al., 1992] Lönnroth, A., Alexciev, K., Mehlin, H., Wurtz, T., Skoglund, U., and Daneholt, B. (1992). Demonstration of a 7-nm RNP fiber as the basic structural element in a premessenger RNP particle. *Exp Cell Res*, 199(2):292–296.
- [Luna et al., 2008] Luna, R., Gaillard, H., González-Aguilera, C., and Aguilera, A. (2008). Biogenesis of mRNPs: integrating different processes in the eukaryotic nucleus. *Chromosoma*, 117(4):319–331.
-

- [Maniatis and Reed, 2002] Maniatis, T. and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature*, 416(6880):499–506.
- [Michelman-Ribeiro et al., 2009] Michelman-Ribeiro, A., Mazza, D., Rosales, T., Stasevich, T. J., Boukari, H., Rishi, V., Vinson, C., Knutson, J. R., and McNally, J. G. (2009). Direct measurement of association and dissociation rates of DNA binding in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J*, 97(1):337–346.
- [Miralles et al., 2000] Miralles, F., Ofverstedt, L. G., Sabri, N., Aissouni, Y., Hellman, U., Skoglund, U., and Visa, N. (2000). Electron tomography reveals posttranscriptional binding of pre-mRNPs to specific fibers in the nucleoplasm. *J Cell Biol*, 148(2):271–282.
- [Miralles and Visa, 2001] Miralles, F. and Visa, N. (2001). Molecular characterization of Ct-hrp65: identification of two novel isoforms originated by alternative splicing. *Exp Cell Res*, 264(2):284–295.
- [Müller et al., 2008] Müller, C., Loman, A., Pacheco, V., Koberling, F., Willbold, D., Richter, W., and Enderlein, J. (2008). Precise measurement of diffusion by multi-color dual-focus fluorescence correlation spectroscopy. *EPL*, 83:46001.
- [Molenaar et al., 2004] Molenaar, C., Abdulle, A., Gena, A., Tanke, H. J., and Dirks, R. W. (2004). Poly(A)+ RNAs roam the cell nucleus and pass through speckle domains in transcriptionally active and inactive cells. *J Cell Biol*, 165(2):191–202.
- [Molenaar et al., 2001] Molenaar, C., Marras, S. A., Slats, J. C., Truffert, J. C., Lemaître, M., Raap, A. K., Dirks, R. W., and Tanke, H. J. (2001). Linear 2' O-Methyl RNA probes for the visualization of RNA in living cells. *Nucleic Acids Res*, 29(17):E89–E89.
- [Moore, 2005] Moore, M. J. (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309(5740):1514–1518.
- [Mor et al., 2010] Mor, A., Suliman, S., Ben-Yishay, R., Yunger, S., Brody, Y., and Shav-Tal, Y. (2010). Dynamics of single mRNP nucleocytoplasmic transport and export through the nuclear pore in living cells. *Nat Cell Biol*, 12(6):543–552.
- [Noble and Went, 2010] Noble, K. N. and Went, S. R. (2010). Nuclear mRNA on the move. *Nat Cell Biol*, 12(6):525–527.
- [Pederson, 2010] Pederson, T. (2010). The Nucleus Introduced. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- [Percipalle et al., 2003] Percipalle, P., Fomproix, N., Kylberg, K., Miralles, F., Bjorkroth, B., Daneholt, B., and Visa, N. (2003). An actin-ribonucleoprotein interaction is involved in transcription by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11):6475–6480.
- [Percipalle and Visa, 2006] Percipalle, P. and Visa, N. (2006). Molecular functions of nuclear actin in transcription. *J Cell Biol*, 172(7):967–971.
-

- [Phair and Misteli, 2001] Phair, R. D. and Misteli, T. (2001). Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(12):898–907.
- [Politz et al., 1998] Politz, J. C., Browne, E. S., Wolf, D. E., and Pederson, T. (1998). Intranuclear diffusion and hybridization state of oligonucleotides measured by fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):6043–6048.
- [Politz et al., 1999] Politz, J. C., Tuft, R. A., Pederson, T., and Singer, R. H. (1999). Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells. *Curr Biol*, 9(6):285–291.
- [Politz et al., 2006] Politz, J. C. R., Tuft, R. A., Prasanth, K. V., Baudendistel, N., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Langowski, J., Spector, D. L., and Pederson, T. (2006). Rapid, diffusional shuttling of poly(A) RNA between nuclear speckles and the nucleoplasm. *Mol Biol Cell*, 17(3):1239–1249.
- [Rasnik et al., 2007] Rasnik, I., French, T., Jacobson, K., and Berland, K. (2007). Electronic cameras for low-light microscopy. *Methods Cell Biol*, 81:219–249.
- [Salmon et al., 2007] Salmon, E. D., Shaw, S. L., Waters, J. C., Waterman-Storer, C. M., Maddox, P. S., Yeh, E., and Bloom, K. (2007). A high-resolution multimode digital microscope system. *Methods Cell Biol*, 81:187–218.
- [Saxton, 2007] Saxton, M. J. (2007). A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. I. Qualitative model. *Biophys J*, 92(4):1178–1191.
- [Saxton, 2008] Saxton, M. J. (2008). A biological interpretation of transient anomalous subdiffusion. II. Reaction kinetics. *Biophys J*, 94(3):760–771.
- [Saxton and Jacobson, 1997] Saxton, M. J. and Jacobson, K. (1997). Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 26:373–399.
- [Schütz et al., 1997] Schütz, G. J., Schindler, H., and Schmidt, T. (1997). Single-molecule microscopy on model membranes reveals anomalous diffusion. *Biophys J*, 73(2):1073–1080.
- [Shav-Tal et al., 2004] Shav-Tal, Y., Darzacq, X., Shenoy, S. M., Fusco, D., Janicki, S. M., Spector, D. L., and Singer, R. H. (2004). Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, 304(5678):1797–1800.
- [Siebrasse et al., 2007] Siebrasse, J. P., Grünwald, D., and Kubitscheck, U. (2007). Single-molecule tracking in eukaryotic cell nuclei. *Anal Bioanal Chem*, 387(1):41–44.
- [Siebrasse et al., 2008] Siebrasse, J. P., Veith, R., Dobay, A., Leonhardt, H., Daneholt, B., and Kubitscheck, U. (2008). Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(51):20291–20296.
-

- [Singh et al., 1999] Singh, O. P., Björkroth, B., Masich, S., Wieslander, L., and Daneholt, B. (1999). The intranuclear movement of Balbiani ring pre-messenger ribonucleoprotein particles. *Exp Cell Res*, 251(1):135–146.
- [Skoglund et al., 1986] Skoglund, U., Andersson, K., Strandberg, B., and Daneholt, B. (1986). Three-dimensional structure of a specific pre-messenger RNP particle established by electron microscope tomography. *Nature*, 319(6054):560–564.
- [Slunder and Wolf, 2007] Slunder, G. and Wolf, D. E., editors (2007). *Digital Microscopy - 3rd Edition*. Elsevier. Methods in Cell Biology, Volume 81, ISBN 978-0-12-374025-0.
- [Soumpasis, 1983] Soumpasis, D. M. (1983). Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J*, 41(1):95–97.
- [Spector, 2006] Spector, D. L. (2006). SnapShot: Cellular bodies. *Cell*, 127(5):1071.
- [Thompson et al., 2002] Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W. (2002). Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J*, 82(5):2775–2783.
- [Tyagi, 2009] Tyagi, S. (2009). Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nat Methods*, 6(5):331–338.
- [Tyagi and Kramer, 1996] Tyagi, S. and Kramer, F. R. (1996). Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 14(3):303–308.
- [Vargas et al., 2005] Vargas, D. Y., Raj, A., Marras, S. A. E., Kramer, F. R., and Tyagi, S. (2005). Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(47):17008–17013.
- [Veith, 2007] Veith, R. (2007). Untersuchung der intranukleären Mobilität endogener mRNA und inerte Nanopartikel in *Chironomus tentans* mit Hilfe hochsensitiver lasermikroskopischer Verfahren. Master’s thesis, Universität Bonn.
- [Veith et al., 2010] Veith, R., Sorkalla, T., Baumgart, E., Anzt, J., Häberlein, H., Tyagi, S., Siebrasse, J. P., and Kubitscheck, U. (2010). Balbiani Ring mRNPs Diffuse through and Bind to Clusters of Large Intranuclear Molecular Structures. *Biophys J*, 99(8):2676–2685.
- [Visa et al., 1996a] Visa, N., Alzhanova-Ericsson, A. T., Sun, X., Kiseleva, E., Björkroth, B., Wurtz, T., and Daneholt, B. (1996a). A pre-mRNA-binding protein accompanies the RNA from the gene through the nuclear pores and into polysomes. *Cell*, 84(2):253–264.
- [Visa et al., 1996b] Visa, N., Izaurralde, E., Ferreira, J., Daneholt, B., and Mattaj, I. W. (1996b). A nuclear cap-binding complex binds Balbiani ring pre-mRNA cotranscriptionally and accompanies the ribonucleoprotein particle during nuclear export. *J Cell Biol*, 133(1):5–14.
- [Wachsmuth et al., 2008] Wachsmuth, M., Caudron-Herger, M., and Rippe, K. (2008). Genome organization: balancing stability and plasticity. *Biochim Biophys Acta*, 1783(11):2061–2079.
-

- [Wehner, 1995] Wehner, R.; Gehring, W. (1995). *Zoologie*. Georg Thieme Verlag.
- [Wieslander, 1994] Wieslander, L. (1994). The Balbiani ring multigene family: coding repetitive sequences and evolution of a tissue-specific cell function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 48:275–313.
- [Wolf, 2010] Wolf, D. E. (2010). <http://www.fcsxpert.com/classroom/theory/autocorrelation-diffusion-multiple.html>.
- [Wurtz et al., 1990] Wurtz, T., Lönnroth, A., Ovchinnikov, L., Skoglund, U., and Daneholt, B. (1990). Isolation and initial characterization of a specific premessenger ribonucleoprotein particle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(2):831–835.
- [Wurtz-T et al., 1996] Wurtz-T, Kiseleva, E., Nacheva, G., Alzhanova-Ericsson, A., Rosén, A., and Daneholt, B. (1996). Identification of two RNA-binding proteins in Balbiani ring premessenger ribonucleoprotein granules and presence of these proteins in specific subsets of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol*, 16(4):1425–1435.
-

Abbildungsverzeichnis

1.1	Der Säugerzellkern schematisch	4
1.2	Die Biologie von <i>C. tentans</i> (I)	15
1.3	Die Biologie von <i>C. tentans</i> (II)	17
1.4	Die Biologie von <i>C. tentans</i> (III)	21
2.1	Die Speicheldrüsenpräparation	32
2.2	Charakteristische MSD-Verläufe	44
2.3	Die diskontinuierliche Partikeldiffusion	47
3.1	Referenzsimulationen zur Ermittlung von Bindungskonstanten	52
3.2	Der Einfluss der Lokalisierungsungenauigkeit auf die Sprungweitenverteilung	57
3.3	FRAP-Beispielmessungen mit 500 kDa FITC-Dextran	61
3.4	FRAP-Beispielmessungen mit 150 kDa FITC-Dextran	63
3.5	Die BR2.1-Oligonukleotide im Speicheldrüsenzellkern	65
3.6	Das Intensitätshistogramm markierter BR2.1 mRNPs	67
3.7	Die Sprungweitenanalyse der spezifischen RNA-Oligonukleotide	69
3.8	Die Sprungweitenanalyse der unspezifischen RNA-Oligonukleotide	70
3.9	Der Nachweis einer diskontinuierlichen BR2.1 mRNP-Mobilität	72
3.10	FCS-Messungen der spezifischen und unspezifischen RNA-Oligonukleotide	74
3.11	Die Sprungweitenanalyse spezifischer Molecular Beacons	76
3.12	Vergleichende MSD-Analyse von 500 kDa Dextran	79
3.13	Sprungweitenhistogramm und MSD-Verlauf simulierter Trajektorien	82
3.14	Die Bindungsanalyse der BR2.1 mRNPs	83
3.15	Die BR2.1 mRNP-Mobilität bei Hämolympheinkubation	86
3.16	Die BR2.1 mRNP-Mobilität und Actinomycin D	88
3.17	Die BR2.1 mRNP-Mobilität und hrp65-1-CTS	91

3.18 Die BR2.1 mRNP-Mobilität und hrp65-PBD	93
3.19 Die Effektoren der BR2.1 mRNP-Mobilität im Überblick	94
4.1 Das Modell der nukleoplasmatischen Mobilität	107

Tabellenverzeichnis

1.1	Wichtige Publikationen zur nukleären mRNP-Diffusion bis 2008	8
2.1	Chemikalien	28
2.2	Puffer	29
2.3	Sonstiges Verbrauchsmaterial	29
2.4	Oligonukleotide und Molecular Beacons	30
2.5	Die hrp65-Peptide	30
2.6	Die Mikroinjektionskonzentrationen	34
3.1	Zusammenfassung der FRAP-Messungen mit 500 kDa FITC-Dextran	62
3.2	Zusammenfassung der FRAP-Messungen mit 150 kDa FITC-Dextran	64
3.3	Zusammenfassung der mit FRAP ermittelten Kernviskositätswerte und Dextran- durchmesser	64
3.4	Zusammenfassung der einzelmolekülmikroskopischen Messungen	71
3.5	Zusammenfassung der MSD-Vergleichsmessungen von 500 kDa Dextran in Lösung, Speicheldrüsen- und Säugerzellkernen.	80
3.6	Zusammenfassung der Effektormessungen	94
4.1	Aktuelle Publikationen zur nukleären mRNP-Diffusion ab 2008	110

Abkürzungsverzeichnis

APD	Avalanche Photo Diode
AOTF	Acousto-Optic Tunable Filter
bp	Basenpaare
CF	Connecting Fiber
cP	Centipoise [$mPa * s$]
D	Diffusionskoeffizient [$\mu m^2/s$]
Da	Dalton [g/mol]
FCS	Fluorescence Correlation Spectroscopy
FGC	Fibro Granular Cluster
fL	Femtoliter
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FWHM	Full Width at Half Maximum (Halbwertsbreite)
GST	Glutathion-S-Transferase
Hz	Hertz [s^{-1}]
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molar
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunden
MSD	Mean Square Displacement
mW	Milliwatt
NA	numerische Apertur
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
RMS	Root Mean Square
rpm	Rounds Per Minute
s	Sekunde
SPT	Single Particle Tracking
SRV	Signal-zu-Rausch-Verhältnis
TP	Transportpuffer
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunde
μW	Mikrowatt

Anhang

A Liste wissenschaftlicher Beiträge

A.1 Publikationen - Zeitschriftenbeiträge

1. Ritter JG, **Veith R**, Siebrasse JP, Kubitscheck U.
High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy.
Opt Express. 2008 May 12;16(10):7142-52.
2. Siebrasse JP, **Veith R**, Dobay A, Leonhardt H, Daneholt B, Kubitscheck U.
Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23;105(51):20291-6. Epub 2008 Dec 12.
3. Ritter JG, **Veith R**, Veenendaal A, Siebrasse JP, and Kubitscheck U.
Light sheet microscopy for single molecule tracking in living tissue.
PLoS ONE 5(7): e11639. doi:10.1371/journal.pone.0011639
4. **Veith R**, Sorkalla T, Baumgart E, Anzt J, Häberlein H, Tyagi S, Siebrasse JP, and Kubitscheck U.
Balbani Ring mRNPs diffuse through and bind to clusters of large intranuclear molecular structures.
Biophys J. 2010 Oct 20; 99(8): 2676-85.
5. Scharf A, Grozdanov PN, **Veith R**, Kubitscheck U, Meier UT, and von Mikecz A.
Variable positioning and activity of proteasomes in transcription processes.
Nucleic Acids Res. 2011 Feb 8. [Epub ahead of print]
6. Speil J, Baumgart E, Siebrasse JP, **Veith R**, Vinkemeier U, and Kubitscheck U.
Intracellular Dynamics of Single STAT1 Transcription Factors upon Cytokine Stimulation.
submitted

A.2 Publikationen - Buchartikel

1. Kubitscheck U, **Veith R**, Ritter JG, Siebrasse JP.
Messenger-RNA Trafficking in Living Cells.
-

Single Particle Tracking and Single Molecule Energy Transfer: Applications in the Bio and Nano Sciences, eds. C. Bräuchle, J. Michaelis, D.C. Lamb, Wiley-VCH Weinheim, 2009, ISBN 978-3527322961

A.3 Eigene Vorträge (Auswahl)

Präsentierender Autor im Fettdruck.

1. **Roman Veith**, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck, 02.2008
Intranuclear Dynamics of Single Balbiani Ring mRNP Particles in Living Salivary Gland Cells
Biophysical Society 52nd Annual Meeting, Los Angeles, California, USA
2. **Roman Veith**, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck, 04.2008
Intranukleärer Transport von einzelnen, nativen mRNA-Molekülen
Gesellschaft deutscher Chemiker - Junge Wissenschaftler stellen sich vor, Bonn, Deutschland
3. **Roman Veith**, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck, 06.2008
Intranuclear Dynamics of Single mRNA Molecules in Living C. tentans Salivary Gland Cell Nuclei
Workshop Cell Biology and Microscopy, Altleiningen, Deutschland
4. **Roman Veith**, Jan Peter Siebrasse, Jörg G Ritter, Ulrich Kubitscheck, 04.2009
Single Molecule Microscopy Of Intranuclear mRNP Dynamics In Living C. Tentans Salivary Gland Cell Nuclei
Focus on Microscopy 2009, Krakow, Poland

A.4 Eigene Poster

Präsentierender Autor im Fettdruck.

1. **Roman Veith**, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck
Intranuclear dynamics of single mRNA molecules living C. tentans salivary gland cell nuclei
Deutsche Physikalische Gesellschaft - Frühjahrstagung, Regensburg, Deutschland
2. **Roman Veith**, Jörg G Ritter, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck
In-vitro analysis of intranuclear nanoparticle movement using SPIM
20th Wilhelm Bernard Workshop on the Cell Nucleus, St. Andrews, Scotland, United Kingdom
3. Roman Veith, **Jörg G Ritter**, Jan Peter Siebrasse, Akos Dobay, Heinrich Leonhardt, Bertil Daneholt, Ulrich Kubitscheck
Discontinuous Movement of mRNPs in Nucleoplasmic Regions Devoid of Chromatin
Biophysical Society 53rd Annual Meeting, Boston, Massachusetts, USA

4. **Roman Veith**, Johannes Anzt, Thomas Sorkalla, Eugen Baumgart, Hanns Häberlein, Sanjay Tyagi, Jan Peter Siebrasse, Ulrich Kubitscheck
New insight into native mRNP dynamics in living C. tentans salivary gland cell nuclei
Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, California, USA
-

Danksagung

Viele Personen haben mich während meiner Promotionszeit unterstützt und standen mir mit Rat und Tat zur Seite. Bedanken möchte ich mich vor allem bei:

Prof. **Ulrich Kubitscheck** für die Möglichkeit an einem spannenden und fordernden Thema arbeiten zu dürfen, ebenso für seine stets offene Tür und die Möglichkeit im Laufe meiner Promotion an vielen hochkarätigen Tagungen im In- und Ausland teilnehmen zu dürfen.

Prof. **Rudolf Merkel** für die freundliche Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Dr. **Jan-Peter Siebrasse** für seine Hilfe bei der Planung und Durchführung der Protein- und Dextranpräparationen sowie für das Korrekturlesen der Doktorarbeit.

Andreas Veenendaal und **Werner Wendler** für die Hilfe beim Mikroskopumbau und die Mikroskopwartung.

Julia Hockling und **Claudio Nietzel** für die Präparation der Peptide und die kompetente Hilfe im Labor, sowie **Marc Mimberg** für die gute Versorgung der *C. tentans*-Zucht.

Der ganzen AG Kubitscheck für die unkomplizierte Arbeitsatmosphäre.

Prof. **Hanns Häberlein** für die Möglichkeit, die FCS-Messungen in seinem Labor durchführen zu dürfen und **Thomas Sorkalla** für die umfangreiche Hilfe bei den FCS-Messungen.

Johannes Anzt für die Mitarbeit an meinem Projekt im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Dr. **Andrea Scharf** für die nette Zusammenarbeit und die Möglichkeit, ein Stück weit an ihrem spannenden Projekt mitarbeiten zu dürfen.

Eugen Baumgart insbesondere für die Hilfe bei der Programmierung der MATLAB-Routinen und das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit.

Dr. **Roland Schlesinger** für die vielen interessanten Gespräche zu fachnahen und fachfernen Themen, die mir immer eine besondere Freude waren, und seine stete Hilfsbereitschaft bei Fragen zu analytisch-mathematischen Problemen.

Meiner lieben Kollegin **Ulrike Schmitz-Ziffels** ganz besonders, für ihre Hilfsbereitschaft während der gesamten Promotionszeit, dafür, dass Sie sich immer wieder die Zeit genommen hat sich in meine Fragen einzudenken und mir stets mit einem freundschaftlichen Rat zur Seite stand. Danken möchte ich ihr nicht zuletzt auch für das intensive Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und ihre vielen Tipps und Ideen, die mir bei der Verbesserung sehr weitergeholfen haben.

Meinem besten Freund **Michael Emrich** insbesondere für die gründliche Durchsicht meiner Doktorarbeit so kurz vor der Abgabe, ohne die ich die letzte Nacht nicht hätte ruhig schlafen können.

Meiner Mutter, meinem Vater und meinem Bruder **Fabian** für die fortwährende Unterstützung während der letzten Jahre, für ihr stets offenes Ohr, all die unzähligen Kleinigkeiten, die mir das Leben erleichtert haben und dafür, dass sie immer für mich da sind, wenn ich sie brauche. Danke, für alles!

Meiner Freundin **Susanne** für Ihre Geduld, wenn Abends doch noch eine Messung klappte und es mal wieder später wurde, ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, die Hilfe bei der Korrektur der Doktorarbeit und stellvertretend für alles andere einfach dafür, dass es sie gibt.
